

馬の涙液を用いたコルチゾールの測定

瀨上真帆*[†]・内山秀彦**・太田光明*

(平成 29 年 6 月 1 日受付/平成 29 年 10 月 23 日受理)

要約：馬からもたらされる効果に関して、馬の揺れや体温、一体感などの人側から見た要因は多く検討されているが馬側の要因はほとんど解明されていない。生理的評価の一つとしてストレス反応を調べるために、サンプルとして血液が利用されることが多いが、一方で穿刺による馬のストレスがある。そのため穿刺による侵襲的な方法ではなく、非侵襲的に採取可能なサンプルの有用性を明らかにすることは、馬の負荷を減らし、生理的な反応をより明らかにするために重要である。涙液は血液から生成され、たんぱく質や電解質が含まれている。本研究では涙液中のコルチゾールを測定し、その有用性を明らかにすることを目的とした。穿刺による採血と、シルマー法による涙液採取によって得られたサンプル内コルチゾールの濃度とその相関を求めた。得られた結果から、血漿と涙液のコルチゾールの値には、正の相関が得られた ($r_s=0.5$, $P<0.01$)。これにより涙液は血液の変化を反映することが示唆され、十分に利用可能であることが明らかになった。採血に頼らず非侵襲的に採取できる涙液を用いることで、今後セラピーホースや障がい者乗馬を生理的に評価できる。

キーワード：馬、涙液、血漿、コルチゾール

1. はじめに

人が動物から受ける効果には、精神的効果¹⁾をはじめ社会的効果²⁾など様々な効果が得られる。このような効果から、動物介在活動や療法が国内外で取り組まれている。人との関わりが深い様々な動物の中でも、馬と人との関わりは長く、使役動物としての役割は古い³⁾。その走行力や観察力をはじめとする馬の能力は高く、なかでも Clever Hans と呼ばれた馬のもつ能力は有名である⁴⁾。この馬は「計算」もできることで一躍有名になったが、実際には周囲の人間の反応を観察して答えを得ていたことが判明し、馬の観察力の高さを証明した。これらの特性から、馬に関する様々な研究が行われてきた。

また、乗馬による効果も数多く報告されており、特に様々な障がいや疾患に有用であるといわれている。馬を用いた研究や活動は治療的乗馬³⁹⁾や、ホースセラピー³⁹⁾、馬介在活動⁴⁰⁾など多岐にわたる。これらの効果に関して、馬の揺れ³⁸⁾や体温³⁷⁾、一体感³⁸⁾などの人側から見た要因の検討は多くおこなわれているが、馬側の要因の解明はほとんど見受けられない。

馬側の要因を解明することは、馬の活用に貢献するのみにとどまらず、ホースセラピーや馬介在活動の詳細なプログラムの作成に不可欠である。また、馬は健康者や障害児の活動内容の違いに異なったストレス反応を示すことが報告されている⁵⁾。また、練習と本番では馬も人もコルチゾールが上昇する⁶⁾といった報告がある。

馬の他にも、介在活動に使われる動物種として犬は多くの研究で使われる。犬を用いた介在活動の研究では、カテコールアミンの変化が報告されている⁷⁾。この研究では、老人ホームへ訪問する犬のノルアドレナリンやアドレナリンの活動前後の上昇率の変化に着目しており、参加日数が増えるにつれてアドレナリンやノルアドレナリンが減少することが報告されている。馬の特性を評価する研究としては、「気質」⁸⁾や「行動評価」⁹⁾「学習」¹⁰⁾に関するものが多く、これらの研究では馬はいずれも高い能力があることを報告している。気質に関する研究では、刺激物に対する馬の反応のみを評価するものや、ハンドラーからの促しによる刺激物への反応を人との関わりの有無によって評価している¹¹⁾。刺激に対する反応では、行動遺伝学との関連を調べた研究もあり、馬の気質と遺伝子の配列には関係があることが報告されている¹²⁾。さらに、乗馬による子供への判断力や学習の効果に関する研究では、馬によって効果が異なることが分かった¹³⁾。

ストレスの程度を評価する生理学的な研究では、主に心拍変動解析や液性サンプルを用いる。馬の平常時の心拍は一般的に 20~40 bpm 程度といわれており、競走馬ではレースによって 200 bpm 以上になると言われている。このように馬の心拍は平常時と運動時との差が大きい。

ストレス刺激は「視床下部-下垂体前葉-副腎皮質」へと伝わる「HPA 系」と「視床下部-交感神経-副腎髄質系」へと伝わる「SAM 系」とがある。これらが刺激されると、ストレスマーカーであるカテコールアミンや糖質コルチコ

* 東京農業大学大学院農学研究科バイオセラピー学専攻

** 東京農業大学農学部バイオセラピー学科

[†] Corresponding author (E-mail: 43814001@nodai.ac.jp)

イドが分泌される。これらの生理的ストレス反応を調べるために馬の頸静脈に穿刺し血液をサンプルとして利用することが多く見受けられるが、一方で穿刺によるストレスが存在する¹⁴⁾。そのため、穿刺による侵襲的な方法ではなく、非侵襲的な方法を工夫することは、動物のためにも重要である。ストレスマーカーによる研究は血液によるものが多く¹⁵⁾、ほかには尿¹⁶⁾や唾液¹⁷⁾を用いて研究が行われている。ストレスマーカーとして唾液や尿が使われる理由としては、非侵襲的に採取できることに加え、血液から唾液へと移行する成分の一つにコルチゾールなどが含まれるからである。馬における唾液中と血液中のコルチゾールの濃度を検証した論文には、輸送ストレス¹⁸⁾や新馬のトレーニングに関するもの¹⁹⁾がある。

尿も唾液と同じように非侵襲的に測定が可能ではあるが、リアルタイムでの測定が難しいことや代謝物も含めた測定も必要になる²⁰⁾。同様に唾液も口腔内環境によって汚染や希釈等が懸念される。そのため尿や唾液に関しては採取前の注意事項や前処理の工程が多くあり、このことは得られた濃度の信頼性にも関わる。

さらに馬は人と同じように汗をかき動物である。汗を用いたものでは、輸送による電解質の成分変化に関する研究がある²⁴⁾。より有用な汗の採取方法と場所を検討した研究もあるが、乾燥による濃縮など課題もみられた³⁵⁾。

涙液は血液から生成され、成分中には血液由来のホルモンなどのたんぱく質や電解質が含まれていることが一般的に知られている²¹⁾。涙液中のホルモンの測定に関して、ハタネズミに性ホルモンを投薬し、涙液からその効果を観たとの報告²²⁾があり、涙液中には多くのたんぱく質の存在が証明されている。人の涙に関する研究では、アレルギー反応の検査に涙液が有用である²³⁾といった報告もあり、血液同等の用途が報告されている。

また馬の涙液を用いた研究では、眼病の検査のための方法としてコルチゾールを測定した報告がある²⁴⁾。この研究では、採取の方法としてチューブを瞬膜に入れている。さらに穿刺によってコルチゾールを直接投薬し、涙液中と血漿中のコルチゾールが同様に上昇したことを述べている。また、涙液中コルチゾールにはたんぱく質結合及び非結合のコルチゾールが確認されている。さらに、老齢馬と若齢馬での涙液中コルチゾール濃度の変化を測定した研究では下垂体性間質機能障害の有無で涙液の生産に差があることを報告している²⁵⁾。しかし、これらの研究は眼病における臨床研究を目的としており、ストレスや行動指標としての研究報告は見受けられない。

本研究では涙液によるコルチゾールの測定の検証と涙液の病理目的以外での有用性を明らかにすることを目的とした。

2. 方 法

(1) 使用馬

馬は、東京農業大学農学部バイオセラピーセンター（神奈川県厚木市）で飼育されている4頭（アラブ セン27歳、北海道和種 セン11歳、アパルーサ 牝18歳、シェットラ

表1 使用馬の品種・性別・年齢・飼育場所

品種	性別	年齢	飼育施設
アラブ	セン	26	東京農業大学
北海道和種	セン	13	
アパルーサ	牝	17	
シェットランドポニー	牝	16	麻布大学
木曾	セン	24	
木曾	牝	10	
中半血	牝	19	
ポニー	牝	19	

ンドポニー 牝16歳) および麻布大学（神奈川県相模原市）で飼育されている4頭（木曾 セン25歳、木曾 牝10歳、中半血 牝20歳、ポニー 牝20歳）を用いた。すべての馬は、獣医師によって健康であることが確認され、十分な馴致を行った上で実験を行った。本実験は東京農業大学動物実験委員会の承認のもと、行った（承認番号260029）。

(2) 採血および採涙

採涙及び採血は、PreとPostの安静時に行い、蹄洗場に係留して行った。係留は、馬が足の踏みかえや虫を追い払うことができるようにゆとりをもって係留した。係留から必要量の涙液を確保するために10分程度かかった。採涙が困難だった一部の個体においては、さらに時間をかける必要があった。採涙および採血は、一部の採涙が困難であったものを除き、馬を馬房から出して10分以内での採取に努めた。

採血は採涙中に行い、それぞれの採取に伴うタイムラグを減らすよう行った。Postは運動後すぐに係留し採取した。

採取を行った時間はバイオセラピーセンターでは10時—11時の時間帯内に、また麻布大学では11時—12時の時間帯で各個体の血液と涙液を採取した。2つの施設で採取の時間が異なるのは、それぞれの施設によって朝の給餌時間が1時間半ほど異なるためである。採餌によるコルチゾール濃度の変化に影響されないよう、麻布大でのサンプルの採取は時間を遅らせて行った。

血液は頸静脈に穿刺し、18ゲージの注射針（テルモ株式会社、東京）を用いて10mlシリンジ（テルモ株式会社、東京）に5ml採取した。採取後すぐにEDTA入り真空採血管（テルモ株式会社、東京）に移し、冷却遠心機で4℃3000回転、10分間で血漿を分離した。血漿はエッペンチューブ（BM機器株式会社、東京）に移し、解析まで-80℃で保存した。

涙液の採取には、グラスファイバーフィルター（ADVANTEC社、東京）を用いた。グラスファイバーフィルターを1/8サイズに切り、シルマー方式により馬の両眼の下瞼及び瞬膜に挟み込み涙液を採取した。1回の採取で両眼併せて約200 μ l得るため、平均約5分要した。涙液を含んだろ紙は、セントリカット超ミニ膜口径（膜口径0.45 μ 、倉敷紡績株式会社、岡山）に入れ、4℃6000回転、10分間に設定し分離を行った。得られた涙液はエッペンチューブ（BM機器株式会社、東京）にて保存した。涙液は、測定まで-80℃にて保存した。

コルチゾールの解析には、EQUINE CORTISOL ELISA TEST KIT (Endocrine Technologies, Inc. U.S.A) を用いた。冷凍保存した血漿を 100 μ l 用いた。涙液のアッセイは 100 μ l 以上の必要量を確保できないことがまれにあったため、デュプリケートを優先するために涙液を 50 μ l 用いて希釈をせずに行った。解析には 1 サンプル 2 連で行い、平均値を用いた。プレートリーダーはマイクロプレートリーダーパワースキャン MX BT-SMATBL (株式会社ベイ・バイオ・イメージング。神奈川) を用いた。血漿サンプルのイントラアッセイの変動値は 6.0%cv, 涙液のイントラアッセイの変動値は 4.6%cv であった。

(3) 心拍測定

馬の心拍は心拍計ホルター POLAR RS800 (Polar[®] Electro Oy, Kempele, Finland) を用いて測定を行った。心拍計を馬の胴胸部に巻き、無口頭絡の頸に受信機を取り付けて心拍数及び R-R 間隔を計測した。得られた R-R 間隔から自律神経変動を求めた。変換には、Polar Pro Trainer 5 software (Polar Electro OY, Kempele, Finland) 及び Kubios HRV (version 2.0, University of Kuopio, Finland) を用いた。高周波域は 0.1~0.5 Hz, 低周波域は 0.01~0.1 Hz に設定し、外れ値を除いて変換を行った。

実験は、Pre の安静時 5 分、運動 20 分、Post 安静 5 分間の計 30 分を行った。運動は、安静時の心拍 (20~40 bpm) に対して、3 倍の運動強度の心拍 120 bpm 以上になるよう、速歩及び駆歩での調馬策運動を 20 分間行った。

実験は日を変え、複数回行った。

(4) 統計解析

得られたデータの解析には、運動前後でのコルチゾール濃度は関連二群 t 検定を用いて行い、血漿中コルチゾール濃度と涙液中コルチゾール濃度の関係はスピアマンの順位相関係数検定によって統計処理を行った。心拍数の解析には、外れ値や計測不可能であったデータを除いて運動前と運動中の値を、関連二群 t 検定を用いて検定を行った。

3. 結 果

本研究により、ろ紙を下瞼及び瞬膜に挿入してから約 5 分の採取で両眼併せて 200 μ l の涙液の採取が可能であった。また、涙液の分泌が少ない馬は、時間をかけることで必要量の採取が可能であった。採涙が難しく、最低限の量の確保に時間がかかった涙液のコルチゾールの濃度も本研究におけるストレスの評価材料としては問題がなかった。

コルチゾールの解析の結果、血漿 (n=36, 34.53 \pm 16.98 ng/ml) 及び涙液 (n=36, 17.97 \pm 6.72 ng/ml) からコルチゾールが十分に検出された (表 2)。得られた濃度をもとに、スピアマンの相関係数によって検定をした結果、血漿中コルチゾール濃度に対して、涙液中コルチゾール濃度は、有意な正の相関が得られた (rs=0.5, P<0.01) (図 1)。

心拍数の変化は、運動前 (31.71 \pm 10.73 bpm) に対して、運動中 (150.71 \pm 22.44 bpm) が有意に高い結果となり、目的とした運動強度を満たした (図 3)。

表 2 血漿及び涙液のコルチゾールの濃度

Cortisol	Plasma (ng/ml)	Tear (ng/ml)
n	36	36
Min	6.36	2.79
Max	51.38	26.39
Mean(\pm SD)	34.53(\pm 16.98)	17.97(\pm 6.72)

(\pm SD)

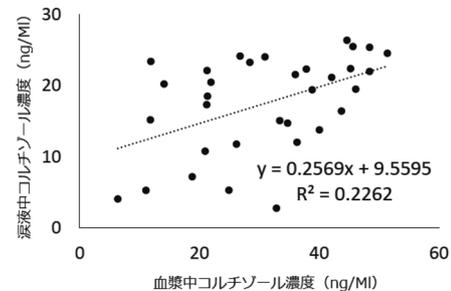


図 1 血漿中コルチゾール濃度と涙液中コルチゾール濃度の相関 スピアマンの順位相関係数 rs=0.5, P<0.01

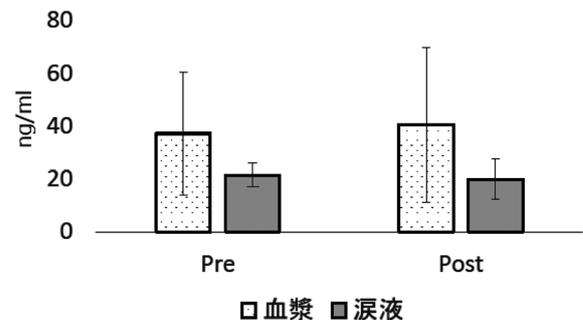


図 2 運動前後での血漿中および涙液中コルチゾールの変化

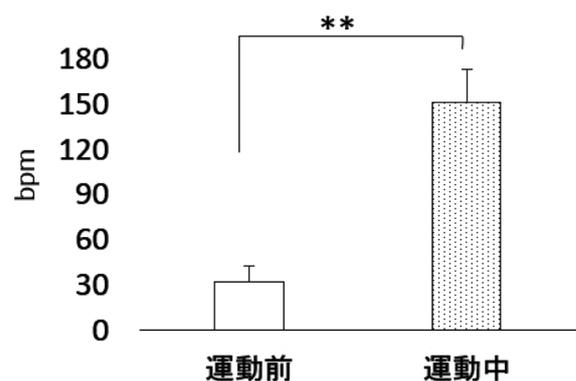


図 3 関連二群 t 検定による運動前 (31.71 bpm \pm 10.73) と運動中 (150.71 \pm 22.44 bpm) の心拍の変化。運動前に比べ、運動中は有意に高い結果となった。(mean \pm SD, **P<0.01)

運動の前後での変化を関連二群の T 検定によって検定を行った結果、血漿中及び涙液中コルチゾールの値は有意な変化は得られなかった (図 2)。年齢の違いによる変化を求めたが、高齢馬 (20 歳以上) のコルチゾール濃度 (18.55 \pm 5.86 ng/mL) に対して牡馬 (10 歳以上 20 歳未満) のコルチゾール濃度 (22.42 \pm 2.81 ng/ml) との間に統計的に

有意な差は得られなかった。また、R-R 間隔から得られた自律神経変動にも、有意な変化は得られなかった。

4. 考 察

涙液を希釈せず、血液と同一の工程でアッセイを行った結果、涙液からも同様な結果が得られた。涙液中コルチゾール濃度と血漿中コルチゾール濃度との間に、有意な正の相関が得られたことから、涙液中のコルチゾールによりストレスの評価が可能であると考えられる。この結果は、過去に報告²⁴⁾があった研究と同様、涙液中と血液中のコルチゾールには正の相関関係にあると言える。

さらに、日内変動や給餌の影響を考慮しても、涙液中コルチゾールと血漿中コルチゾールは十分な相関関係を示していた。運動前後の変化に関しても、涙液と血漿ともに有意な変化は得られなかったことから、このレベルの運動では「ストレス」をもたらすほどのものではないことが示唆された。これは、調馬策運動が日ごろからおこなわれている基礎調教であること、騎乗に比べると物理的負荷が少なかったことが影響しているのではないかと推察した。

また、運動強度と持続時間により、コルチゾールの増加に違いがあったとの報告²⁶⁾から、騎乗者のいない調馬策運動は、対象馬にとってストレスの少ない運動であったと考えられる。運動内容による反応の違いとして、騎乗による運動とホースセラピーの活動では、コルチゾール値の変化に有意な違いはなかったという報告もある⁵⁾。しかし、ストレッサーの強度と期間によってはコルチゾールの動態は変化することが予想されていること²⁷⁾から、ホースセラピーなどにおいて、コルチゾールを評価することが重要である。また、コルチゾールは年齢による個体差は影響しないといった報告もあり²⁸⁾、本研究の結果においても年齢による影響はなかったと考えられる。

競走馬のトレーニングでは、心拍が200 bpm まで上昇すると言われており、本研究では安静時(20~40 bpm)の約3倍以上である120~180 bpm まで上げるよう統制したが、コルチゾールへの反応を促すほどではなかった。また、負荷を与える時間との関係に関して、運動開始5分がピークになり15分にかけて有意に高い結果となるという報告もある¹⁹⁾が、本研究での運動負荷(時間20分)では、馬に対してコルチゾールの上昇をもたらすほどではなかった。

しかし本研究の最大の目的である血漿中コルチゾール濃度と涙液中コルチゾール濃度の変化では、双方とも運動前後での統計的有意差はなかったことから、涙液中のコルチゾール濃度の変化は、血漿中コルチゾール濃度との関係性が十分にあると考えられる。

現在、馬の涙液を用いた評価には病理目的のものがほとんどであり、ホースセラピーや障がい者乗馬に使われる馬の生理的な指標には、血液や尿に頼るものがほとんどである。しかし、尿や唾液によって行う評価には、様々な留意点がある。尿の場合は、クレアチニンによる補正が必要となることや、細かな採取が困難なこと、採取までに時間がかかることが課題となっている。唾液中と血液中の関係性を調べた研究においては、密接な関係があることを述べた

研究と⁴²⁾、個体によって正の相関が得られなかった研究の双方が存在している⁴³⁾。このように、馬においてコルチゾール測定に唾液を用いることは有用だとは認められているものの、依然として課題は存在している。糞を用いた場合は、腸内通過時間によるタイムラグが1日程度あることが確認されている⁴¹⁾。これらのことから、即時的な評価を行いたい研究にはこれらのサンプルは課題が多い。

しかし、本研究の涙液を用いたコルチゾールの測定では、血漿中コルチゾール濃度との変化には時間差はなく、さらに十分な関係性があり、即時的な評価を行うには有用であると考えられる。また涙液は尿や糞よりリアルタイムな測定が可能であったことが報告されている²⁴⁾。

これらのことから、ストレスの評価を目的としたバイオマーカーとしての涙液は有用であるといえる。臉にろ紙を挟むシルマー法による採涙は、比較的容易であること、50 µl でアッセイが十分に行えたこと、原液のままで検出できたことなど、今後の応用において、有用な成果が得られたといえる。非侵襲的に採取できる涙液を用いることで、今後セラピーホースや障害者乗馬の健康評価やストレス評価が可能であり、その必要性が高まることが期待される。

馬のこれまでの健康管理は、「血液」の採取が不可欠であった。十分に馴致すれば、馬の採血は比較的容易であるが、一日に何回も採血すると、ほとんどの馬が明らかな忌避行動を示す。しかし、涙液の採取であれば、短時間に数回採取しても、忌避行動を示すことはほとんどない。本研究において馴致に要した回数は1回でほぼ完了し、多くて3回程度だった。馴致の内容は目を掌でなで、臉を引き下げたことを繰り返して行った。また、各工程を受け入れるたびに報酬を与え、条件づけることで馴致を行った。この方法で研究に使用した全ての馬は採取が可能であった。

これらのことから、様々な生理的パラメータの測定に涙液は有用であると考えられる。さらに、涙は常に少量ずつ分泌されており、瞬目のたびに新しい涙液が分泌されるため、唾液や尿といったサンプルよりはさらに信頼性も高いと考えられる。

今後は、カテコールアミンやオキシトシンなどの神経伝達物質およびコルチゾール以外のホルモンなどの測定が涙液で可能か検証することが求められる。

馬と同様に他の動物での応用性もある。野生のアザラシから涙液・唾液・血液を採取し、コルチゾールの検出を行った結果、血清と涙液に相関が得られたとの報告もある²⁹⁾。馬と同じような大型家畜には牛や豚といった動物が一般的に挙げられる。かねてより牛は季節により採餌量や乳量に変化をきたすが、これは気温の変化に伴うものとされている³¹⁾。気温や飼育状況のストレス評価には、糞や血液、乳牛の場合は乳汁から生理的測定を行っている。豚の場合、輸送ストレスの評価に呼吸数や体温の他にも採血によって評価しているものもある³²⁾。また、飼料と酸化ストレスの評価に関して、血清を用いて評価している論文も見受けられる³³⁾。しかし、乳牛の場合、生理的指標を乳汁から評価できるが、乾乳牛や肉牛といった場合、血液や尿、唾液に頼らざるを得ない。さらに豚は肉資源としての利用が主で

あり、血液に頼る研究がほとんどである。したがって非侵襲でとれるサンプルは牛同様、尿や唾液によって評価することになる。しかし、これらのサンプルの場合、前述したように採取方法や処理に様々な課題を抱える。また、アザラシのような野生動物の生態調査においても、感染リスクのある血液に頼らず、涙液を用いることで、より安全にかつ非侵襲にサンプルの採取が可能になると考える。

5. 結 論

本研究は、馬の生理的指標の新たなサンプルとして涙の有用性を示し、さらにストレス評価としての十分な有用性も新たに示した。血漿中と涙液中のコルチゾール濃度の変化が相関関係を示したことから、涙液中のコルチゾール濃度の信頼性は高い。これらにより、馬の生理的パラメータに関して、より非侵襲的な採取と検体への負担を減らすことにより、正確な評価が可能となる。また、コルチゾール以外の液性物質の検証も可能であることから、新たな研究成果を生み出すことが期待される。

参考文献

- 1) WHALEN CN, CASE-SMITH J (2012) Therapeutic effects of horseback riding therapy on gross motor function in children with cerebral palsy : a systematic review. *Physical & Occupational Therapy in Pediatrics* 32 : 229-42.
- 2) BASS MM, DUCHOWNY CA, LLABRE MM (2009) The effect of therapeutic horseback riding on social functioning in children with autism. *Journal of Autism and Developmental Disorders*, 39 (9) : 1261-1267.
- 3) 川又正智 (2005) 馬の家畜化をめぐる研究動向. 国士館大学文学部人文学会紀要, 37 : 141-153.
- 4) The nature of horses (1997) Stephan Budiansky. "Chapter7 Horse Sense" pp. 165 Simon and Schuster INC, U.S.A
- 5) KAISER L, HELESKI C RSiegford J, SMITH, KA (2006) Stress-related behaviors among horses used in a therapeutic riding program. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 228 (1) : 39-45.
- 6) VON LEWINSKI M, BLAU S, ERBER R, ILLE N, AURICH J, FAURE JM, AURICH C (2013) Cortisol release, heart rate and heart rate variability in the horse and its rider : different responses to training and performance. *The Veterinary Journal*, 197 (2) : 229-232.
- 7) 植竹勝治ほか9名 (2007) 特別養護老人ホームでの動物介在活動に繰り返し参加した飼い犬のストレス反応. 日本家畜管理学会誌・応用動物行動学会誌, 43 (4) : 192-198.
- 8) LANSADE L, BOUISSOU MF, ERHARD HW (2008) Fearfulness in horses : A temperament trait stable across time and situations. *Applied Animal Behaviour Science*, 115 (3) : 182-200.
- 9) MOMOZAWA Y, ONO T, SATO F, KIKUSUI T, TAKEUCHI Y, MORI Y, KUSUNOSE R (2003) Assessment of equine temperament by a questionnaire survey to caretakers and evaluation of its reliability by simultaneous behavior test. *Applied Animal Behaviour Science*, 84 (2) : 127-138.
- 10) LANSADE L, SIMON F (2010) Horses' learning performances are under the influence of several temperamental dimensions. *Applied Animal Behaviour Science*, 125 (1) : 30-37.
- 11) VON BORSTEL UK, EUENT S, GRAF P, KÖNIG S, GAULY M (2011) Equine behaviour and heart rate in temperament tests with or without rider or handler. *Physiology & Behavior*, 104 (3) : 454-463
- 12) 桃沢幸秀 (2007) ウマの気質に関する行動遺伝学的研究 (Doctoral dissertation, 東京大学).
- 13) OHTANI N, KITAGAWA K, MIKAMI K, KITAWAKI K, AKIYAMA J, FUCHIKAMI M, OHTA M (2017) Horseback riding improves the ability to cause the appropriate action (go reaction) and the appropriate self-control (no-go reaction) in children. *Frontiers in Public Health*, 5.
- 14) 田中喜秀・脇田慎一 (2010) 薬学領域におけるストレス研究の最前線. ライフサポート, 22 (3) : 90-95.
- 15) URHAUSEN A, GABRIEL H, KINDERMANN W (1995) Blood hormones as markers of training stress and overtraining. *Sports Medicine*, 20 (4) : 251-276.
- 16) YAMAGUCHI T, SHIOJI I, SUGIMOTO A, YAMAOKA M (2002) Psychological stress increases bilirubin metabolites in human urine. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 293 (1) : 517-520.
- 17) VAN STEGEREN A, ROHLEDER N, EVERAERD W, WOLF OT (2006) Salivary alpha amylase as marker for adrenergic activity during stress : effect of betablockade. *Psychoneuroendocrinology*, 31 (1) : 137-141.
- 18) NACHREINER R Schott H, REFSAL KR, ZANELLA AJ (2001) Salivary and plasma concentration of cortisol in normal horses and horses with Cushing's disease. *Equine Veterinary Journal*, 33 (2) : 211-213.
- 19) SCHMIDT A, AURICH J, MÖSTL E, MÜLLER J, AURICH C (2010) Changes in cortisol release and heart rate and heart rate variability during the initial training of 3-year-old sport horses. *Hormones and Behavior*, 58 (4) : 628-636.
- 20) 田中喜秀・脇田慎一 (2011) ストレスと疲労のバイオマーカー. 日本薬理学雑誌, 137 (4) : 185-188.
- 21) 福田康一郎 (監修) 小澤滯司 (2014/4/9) "第13章 視覚" 標準生理学. 医学書院, 東京, pp 266.
- 22) 佐々木昌志・大木与志雄 (1988) ハタネズミ (*Microtus arvalis*) における涙液蛋白質の特性. *Experimental Animals*, 37 (1) : 97-99.
- 23) SACCHETTI M, MICERA A, LAMBIASE A, SPERANZA S, MANTELLI F, PETRACHI G, BONINI S (2011) Tear levels of neuropeptides increase afterspecific allergen challenge in allergic conjunctivitis. *Molecular Vision*, 17 : 47-52
- 24) MONK CS, HART KA, BERGHAUS RD, NORTON NA, MOORE PA, MYRNA KE (2014) Detection of endogenous cortisol in equine tears and blood at rest and aftersimulated stress. *Veterinary Ophthalmology*, 17 (s1) : 53-60.
- 25) HART KA, KITCHINGS KM, KIMURA S, NORTON NA, MYRNA KE (2016) Measurement of cortisol concentration in the tears of horses and ponies with pituitary pars intermedia dysfunction. *American Journal of Veterinary Research*, 77 (11) : 1236-1244.
- 26) FREESTONE JF, WOLFSHEIMER KJ, KAMERLING SG, CHURCH G, HAMRA J, BAGWELL C (1991) Exercise induced hormonal and metabolic changes in Thoroughbred horses : effects of conditioning and acepromazine. *Equine Veterinary Journal*, 23 (3) : 219-223.
- 27) 井澤修平・城月健太郎・菅谷 渚・小川奈美子・鈴木克彦・野村 忍 (2007) 唾液を用いたストレス評価. 日本補完代替医療学会誌, 4 (3) : 91-101.
- 28) HART KA, KITCHINGS KM, KIMURA S, NORTON NA, MYRNA KE (2016) Measurement of cortisol concentration in the tears of horses and ponies with pituitary pars intermedia dysfunction. *American Journal of Veterinary Research*, 77 (11) : 1236-1244.
- 29) GUNDLACH NH, PIECHOTTA M, SIEBERT U (2014) Is Lachrymal

- Fluid a Potential Method for Cortisol Measurement in Wild Harbourseals? : A Pilot Study. *International Journal of Veterinary Medicine : Research & Reports*. DOI : 10.5171/2014.967043
- 30) 柴田正貴・向居彰夫 (1981) 乳牛の熱発生量, 各種生理反応および乳生産に及ぼす季節の影響. *家畜の管理*, **17** (2) : 43-50.
 - 31) 吉岡 豪・今枝紀明・鳥本安男・水野 拓 (2001) 夏季高温時のトラック輸送が豚ストレス感受性遺伝子ヘテロ接合体保有豚と正常豚の直腸温度, 呼吸数, 血清中成分に及ぼす影響. *日本養豚学会誌*, **38** (1) : 4-11.
 - 32) 松本光史・井上寛暁・山崎 信・村上 齊・梶 雄次 (2012) 人工消化による赤米および紫黒米の抗酸化能評価と種雌豚への短期給与が酸化ストレス指標に及ぼす影響. *日本養豚学会誌*, **49** (3) : 109-116.
 - 33) ROSE R J, ARNOLD K S, CHURCH S, PARIS R (1980) Plasma and sweat electrolyte concentrations in the horse during long distance exercise. *Equine Veterinary Journal*, **12** (1) : 19-22.
 - 34) MCCUTCHEON L J, GEOR R J, HARE M J, KINGSTON J K, STAEMPLI H R (1995) Sweat composition : comparison of collection methods and effects of exercise intensity. *Equine Veterinary Journal*, **27** (S18) : 279-284.
 - 35) 長谷川康弘ほか4名 (1999) 旭川市における障害者の乗馬 : 旭川アルム作業所の乗馬活動を通して障害者は何を得たか. *情緒障害教育研究紀要*, **18** : 183-194.
 - 36) 竹田謙一ほか4名 (2003) 「木曾馬乗馬体験会 in 信州大学」の実施報告. *信州大学 AFC 報告*, **1** : 101-105.
 - 37) 瀨上真帆・川嶋 舟・内山秀彦 (2012) 初心者の乗馬における精神的・生理的变化に関する研究. *東京農業大学農学集報*, **57** (3) : 160-166.
 - 38) 局博一 (2002) 乗馬による共生社会の実現. *学術の動向*, **7** (10) : 37-43.
 - 39) 津田 望・塚田光子 (2011) のぞみ牧場学園の乗馬セラピー (特集 馬の活用—乗馬の楽しみとホースセラピーに目を向けて). *畜産の研究*, **65** (1) : 98-102.
 - 40) 要 武志・村田英一・太田光明 (2004) 重複障害児への馬を用いた動物介在活動の試み. *麻布大学雑誌*, **7** : 79.
 - 41) SCHMIDT A, MÖSTL E, WEHNERT C, AURICH J, MÜLLER J, AURICH C (2010) Cortisol release and heart rate variability in horses during road transport. *Hormones and Behavior*, **57** (2) : 209-215.
 - 42) SCHMIDT A, HÖDL S, MÖSTL E, AURICH J, MÜLLER J, AURICH C (2010) Cortisol release, heart rate, and heart rate variability in transport-naive horses during repeated road transport. *Domestic Animal Endocrinology*, **39** (3) : 205-213.
 - 43) PELL S M, MCGREEVY P D (1999) A study of cortisol and beta-endorphin levels in stereotypic and normal Thoroughbreds. *Applied Animal Behaviour Science*, **64** (2) : 81-90.

Measurement of Cortisol in Horses Tears

By

Maho FUCHIKAMI*[†], Hidehiko UCHIYAMA** and Mitsuaki OHTA*

(Received June 1, 2017/Accepted October 23, 2017)

Summary : Regarding the effects brought about by horses and/or riding, there are many studies of factors viewed from the human side, such as horse swing and matching, whereas the factors from the horse side have not been elucidated. As a method of sampling for physiological evaluations like stress reactions, blood is often used, in which sampling is accompanied by pain. Therefore, it is important to consider the usefulness of non-invasive sampling, in order to reduce the load on horses and to gain more physiological information about horses. Tears are produced from blood and contain proteins and electrolytes. In this study, we aimed to measure the concentration of cortisol in tears and to clarify the usefulness of tear sampling. The significant positive correlation of cortisol concentrations was obtained in blood sampling by puncture and in tears fluid by Schirmer method ($r_s=0.5$, $P<0.01$), suggesting that tears fluid was fully available in horses. By using tears collected non-invasively, the physiological evaluations of horses would be possible in horse-facilitated activity and therapy in the future.

Key words : Horse, Tears, Plasma, Cortisol

* Department of Human and Animal-Plant Relationships Graduate School of Agriculture Tokyo University of Agriculture

** Department of Human and Animal-Plant Relationships Faculty of Agriculture Tokyo University of Agriculture

[†] Corresponding author (E-mail : 43814001@nodai.ac.jp)