

令和元年6月17日現在

機関番号：12201

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2018

課題番号：15K14875

研究課題名(和文)嘔吐をしないヤギを用いた鋭敏・正確・普遍的で非侵襲的な悪心の生理的マーカーの探索

研究課題名(英文) The attempt to find exact, incisive and noninvasive physiological markers for nausea using goats, non-emetic species

研究代表者

青山 真人 (AOYAMA, MASATO)

宇都宮大学・農学部・准教授

研究者番号：90282384

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：催吐剤「シスプラチン」投与の影響：ヤギに催吐剤であるシスプラチン(CisP)を投与すると、およそ120分後に伏臥位姿勢を取って動きが少なくなり、また、顕著な血中コルチゾル濃度の増加を伴うことが分かった。このCisPの効果は、オンダンセトロンにより軽減された。輸送の影響とジフェンヒドラミンの効果：ヤギに1時間のトラック輸送を与えると、血中のコルチゾル濃度が顕著に増加した。一方、輸送により血中の甲状腺ホルモン濃度、およびオキシトシン濃度は変化しなかった。また、通常飼育時にジフェンヒドラミンを投与した場合、ヤギの反芻が有意に短くなったが、他の行動、血中成分に明確な変化は確認できなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

「悪心」(おしん)(吐き気、気分が悪いという感覚)は、これまでは主に「嘔吐」によってのみ評価されて来たが、それゆえに、「悪心」を評価する生理学的指標については、まだ、明確なものは見つかっていない。一方、嘔吐をしない動物も存在し、ヤギはそのうちの一種である。本研究の結果、ヤギは嘔吐をしないが、悪心を感じていると思われる状況があることが、本研究によって分かった。嘔吐をしないヤギを用いれば、純粹に吐き気によって起こる生理学的反応を見つけることができる可能性がある。また、将来的、ヤギでみつかった指標はヒトにおいても適用できるかも知れない。

研究成果の概要(英文)：The effects of emetic agent “Cisplatin” on goats: The administration of Cisplatin (CisP) to goats induced the remarkable decrease in activity and increase in blood cortisol level. This effects of CisP were relieved by pre-administration of Ondansetron, which is the drug for relieving the nausea induced by CisP.. The effects of road transportation and “Diphenhydramine” : One hour road transportation increased blood cortisol level remarkably in goats, but it failed to change blood levels of the thyroid hormone (triiodothyronine and thyroxine) nor oxytocin. Pre-administration of Diphenhydramine, which is one of the anti-motion sickness medication, did not induce any remarkable behavioral changes in transported goats, but reduced the period spent in rumination in usual housed goats.

研究分野：動物行動学

キーワード：悪心 ヤギ 輸送 シスプラチン ジフェンヒドラミン ストレス 生理的マーカー

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

「悪心」(吐き気・気分が悪いこと)は、毒物の摂取や動揺病(乗り物酔い)等によって起こる。その軽減を目指して、悪心の研究は世界中で多く行われている。悪心の結果起こる反応で、最も明確なものは嘔吐であるため、これまでの悪心の研究は、嘔吐を指標として用いた研究が多い。しかし、悪心経験時に特異的に起こる生理学的反応、特に、血液中や唾液中に現れる成分については、未だ不明な点が多い。その主な理由として、嘔吐を悪心の指標とした研究では、純粋に悪心を感じている結果起こる生理学的反応と、嘔吐の結果起こるそれとの区別が、事実上不可能であるためであると思われる。

一方で、嘔吐が認められない動物種(ラット、マウス、ウサギ、ウマ、反芻動物等)も存在する(AndrewsとHorn 2006)。しかし齧歯目では、嘔吐をせずとも、悪心を感じている可能性が指摘されている(Takedaら 1993)。反芻動物であるヤギも非嘔吐動物であるが、青山は家畜の輸送ストレスを、ヤギを用いて研究してきた経験から、輸送ストレスの一要因は動揺病である、すなわち、ヤギが輸送により悪心を感じているのではないかと考えるに至った。これまでの研究から、それを肯定する結果を得ている。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、主にヤギを反芻家畜のモデルとして用い、非嘔吐動物であるヤギにおいても悪心を経験することを証明することである。また、その生理的マーカーを探索することである。加えて、ヤギと同じく非嘔吐動物であるウマについて、発汗が悪心の指標となる可能性を考え、発汗の測定法の検討を行なうことである。

大別し、以下の3つの研究を進めた。

(1) 催吐剤シスプラチン投与の影響：シスプラチン(CisP)は抗癌剤であるが、副作用として強い悪心とそれに伴う嘔吐を引き起こす。このことから、悪心の研究材料としてよく用いられる。ヤギにCisPを投与し、生理学的・行動学的反応を観察することによって、ヤギが悪心を感じるか否かを検討した。

(2) 輸送と酔い止め薬「ジフェンヒドラミン」の影響：ヤギを1時間輸送し、行動学的・生理学的反応を検討した。血漿中の様々な成分を、オミクス解析等によって網羅的に検討した。さらに、動揺病を軽減する効果のあるジフェンヒドラミン(DH)の効果も検討した。

(3) 皮膚電気抵抗値を指標としたウマの発汗の評価法の検討：ヒトでは、悪心によって起こる生理学的反応の一つに発汗がある。ウマはヤギと同じく非嘔吐動物であり、悪心を経験するか否かはやはり明らかになっていない。ウマは家畜にしては珍しく発汗する動物であるので、もし悪心を経験するならば、これによって発汗は促されるかも知れない。将来的にウマの悪心の指標の一つとして発汗が使える可能性を考え、ウマの発汗を簡便に測定する方法として、皮膚の2点間の電気抵抗値(ERV)の有効性を検討した。

### 3. 研究の方法

(1) 催吐剤シスプラチン投与の影響：ヤギにCisPを投与し、その1時間後に給餌した。投与から4時間のヤギの行動を観察した。また、投与30分前、直前、投与60分後、120分後、180分後、240分後に頸静脈より血液を採取した。ストレスマーカーとなるコルチゾル(Cor)の血中濃度をラジオイムノアッセイ法により測定した。また、血漿中に含まれるタンパク質について、オミクス解析(二次元電気泳動)により解析した。

CisPによって発生する悪心を緩和する薬剤であるオンダンセトロン(Ond)の効果についても検討した。Ondの投与は、CisPの投与の30分前と直前の2回、行なった。CisPとOndのいずれについても対照区には生理食塩水(Sal)を使用することとし、Sal-Sal区、Ond-Sal区、Sal-CisP区、Ond-CisP区の4つの実験を実施し、各実験区間の比較を行った。

(2) 輸送とジフェンヒドラミンの影響：9:00~10:00の60分間、ヤギを軽トラックで輸送した。Salを投与して通常飼育(CS区)、DHを投与して通常飼育(CD区)、Salを投与して輸送(TS区)、DHを投与して輸送(TD区)の4つの処置を行ない、比較した。DHの投与は、輸送開始15分前(8:45)とした。9:00~10:00の間に反芻に費やしていた時間および伏臥位姿勢であった時間を計測し、比較した。また、8:30(輸送30分前)、9:00(輸送開始直前)、輸送開始から15分毎(9:15、9:30、9:45、10:00)、輸送終了後30分後(10:30)と60分後(11:00)の計8回、頸静脈より血液を採取した。ストレスのマーカーであるCorの濃度を測定した。また、先行研究において輸送との関連が報告されている甲状腺ホルモン(トリヨードチロニン：T3、チロキシン：T4)および非嘔吐動物であるラットにおいて、悪心との関連が示唆されているオキシトシン(Oxt)の各濃度も測定した。さらに、血漿からアルブミンを除去した後、二次元電気泳動を行い、輸送による血中成分の変化を網羅的に解析することを試みた。

(3) ウマの皮膚電気抵抗値の検討：サラブレッド種7頭について、栃木県内の乗馬クラブに協力頂き、ウマのERVを測定した。頸部、腰部、臀部の3部位について、5cm離れた2点間の皮膚ERVを測定した。通常実施している30~40分間の運動の前後について比較し、また、各個体、各部位、各条件(運動の前か後か)について、そのときの気温との相関を算出した。

#### 4. 研究成果

(1) 催吐剤シスプラチン投与の影響：Sal-CisP 区において、CisP 投与後 60 分後は特に明確な行動的变化は確認されず、給餌直後には Sal-Sal 区と同じように摂食を始めた。しかし、投与 120 分後にヤギは摂食を止め、伏臥位姿勢になり、動きが少ない状態になった(図 1 左)。また、CisP を投与しても 1 時間後には特に血中 Cor 濃度の変化はなかったが、行動の変化が現れ始めた 120 分後には血中 Cor 濃度は有意に増加した(図 1 右)。イヌ等の嘔吐動物においては、CisP 投与から嘔吐が起こるまでは 30 分~2 時間程度を要することが、報告されている(Kenward ら 2014)。ヤギにおける上述の反応も、その発生までには投与から 120 分程度を要し、嘔吐動物を使った先行研究と類似した結果となった。CisP が起こす行動学的反応および血中 Cor 濃度の増加は、CisP によって起こる悪心を軽減する効果がある Ond の投与によって有意に緩和された(少なくとも、発生が遅れた)(図 1)。このことから、CisP によってヤギに起こる反応は嘔吐動物に起こる悪心と類似した薬理学的メカニズムで起こることが示唆された。二次元電気泳動の結果、ウシの血漿と類似した電気泳動像が得られた。CisP を投与した実験区において、他の実験区よりもアルブミンの分画が濃い印象を受けたが、今回は明確な違いは確認できなかった。

(2) 輸送およびジフェンヒドラミンの効果：通常飼育時には反芻が観察されたが、輸送中は TS 区、TD 区いずれにおいても反芻は全く観察されなかった(表 1)。輸送中に反芻に費やした時間は、通常飼育時(CS 区および CD 区)のそれと比較し、有意に短かった。反芻は、動物がストレスを受けている状況下では起こり難いことが報告されており(Herskin ら 2004)。輸送によるストレスによって反芻が抑制されたものと考えられた。一方、通常飼育条件下と比較すると、CD 区においては CS 区よりも有意に反芻時間が少なく、DH は反芻を抑制する効果があることが示された。伏臥位姿勢を取っていた時間について、統計的に有意な差ではなかったが、輸送中は通常飼育時よりも伏臥位姿勢が増加する傾向にあった。通常、伏臥位姿勢は休息中によく観察されるため、通常飼育であった CS 区および CD 区において観察された伏臥位姿勢については、休息行動の一環と考えられたが、輸送時に観察された伏臥位姿勢については、通常飼育時とは異なる機能を持つものと考えられた。おそらく輸送時に伏臥位姿勢を取るのには、不規則な揺れに対してバランスを崩さない対応のためと考えられた(佐怒賀ら 2016)。一方、CS 区、CD 区の間伏臥位姿勢を取っていた時間に違いはなかった。

血中 Cor 濃度は、TC 区、TD 区のいずれにおいても輸送によって顕著に増加した。このことから、輸送はやはりヤギにとって強いストレスになることが示唆された。一方、TD 区と TC 区間の血中 Cor 濃度に統計的な有意差はなかった。今回、輸送によってヤギが動揺病を発症したか否かは定かではないが、仮に DH によって動揺病が幾分か軽減されたとしても、輸送によるストレス刺激はそれだけでは考え難く、他の要因に起因するストレスにより TD 区においても血中 Cor 濃度が顕著に増加したのかも知れない。CD 区と CS 区間の血中 Cor 濃度は、投与前と比べ顕著な変化はなく、DH は反芻の抑制をもたらしたが、ストレスとはならなうことが考えられた。

血中の甲状腺ホルモン濃度は、T3、T4 とともに、いずれの実験区においても顕著な変動はなく、また、実験区間に明確な差はなかった。ウシにおいては、輸送により T3 のみが増加し、T4 は影響が薄かったことが報告されている(Fazio ら 2005)。一方、Tajiki ら(2016)はカシミアヤギにおいて、輸送により T3、T4 いずれも増減がな

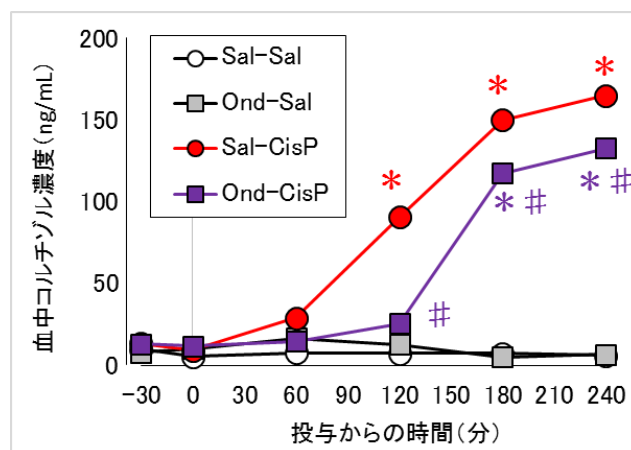
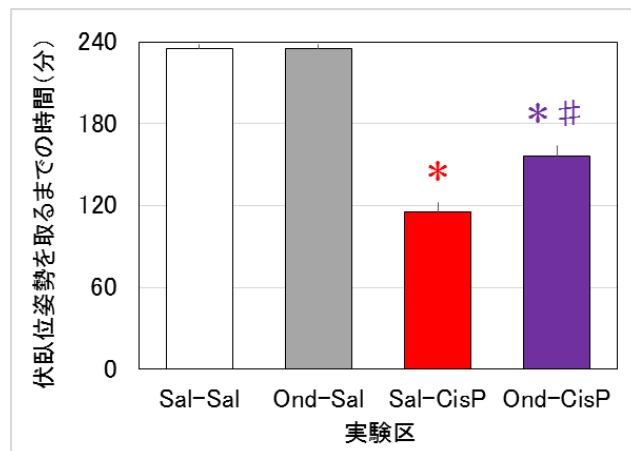


図1 シスプラチンの投与がヤギの伏臥位行動(左)および血中コルチゾール濃度(右)に及ぼす影響。CisP: シスプラチン、Ond: オンダンセトロン、Sal: 生理食給水を投与した実験区。\*: CisP の代替に Sal を投与した実験区との間に有意差あり、 #: Sal-CisP 区との間に有意差あり。

表1 輸送中のヤギの反芻および伏臥位姿勢と、ジフェンヒドラミン投与の影響

	処置			
	CS	CD	TS	TD
反芻に費やした時間(分)	19.9 ± 6.2	7.1 ± 4.4 <sup>†</sup>	0.0 ± 0.0*	0.0 ± 0.0*
伏臥位姿勢であった時間(分)	6.9 ± 6.9	0.9 ± 0.9	13.5 ± 10.0 <sup>#</sup>	8.5 ± 4.7 <sup>#</sup>

輸送時間は 60 分であった。CS: 生理食塩水投与 + 通常飼育、CD: ジフェンヒドラミン投与 + 通常飼育、TS: 生理食塩水投与 + 輸送、TD: ジフェンヒドラミン投与 + 輸送。

\*、<sup>#</sup>: 各投与区内で通常飼育との間に有意差あり (\* : P < 0.05、<sup>#</sup> : P = 0.07)、<sup>†</sup>通常飼育区内で生理食塩水投与区との間に有意差あり (P < 0.05)。

かったと報告している。今回、我々はシバヤギで初めて輸送による血中甲状腺ホルモン濃度の影響を検討したが、ヤギで検討した Tajiki ら (2016) の報告に類似したものとなった。

血中 Oxt 濃度については、実験区間に明確な差はなかった。これまで著者が知る限りでは、輸送に伴う血中 Oxt 濃度の動態を検討した報告はない。イヌなど嘔吐動物においては、血中のアルギニンバソプレシン (AVP) 濃度が嘔吐に伴って増加することから、これが悪心の生理的マーカーになる可能性が指摘されている。しかし、非嘔吐動物であるラットにおいては、悪心を引き起こす刺激を与えても血中 AVP 濃度は増加せず、代わりに Oxt 濃度が増加することが報告されており、ラットでは血中の Oxt 濃度が悪心の生理的マーカーになる可能性が示唆されている (Verbalis ら 1986)。しかし、少なくともトラック輸送によってはヤギの Oxt は影響を受けないことが示唆された。

ヤギの血漿をアルブミン除去し、二次元電気泳動を行った。例として 1 個体の各実験区の泳動結果を図 2 に示す。複数のスポットが確認できたが、その数は少なく、実験区間で明確な違いも確認できなかった。現在、感度を上げて、さらに研究を進めている。

(3) ウマの発汗の評価法の検討: 4~8 月について、得られた 42 個 (7 個体 × 3 部位 × 運動の前後の 2 回) の気温と皮膚 ERV との相関係数を求めた。そのうちの 38 個は負の相関であった。また、38 個の負の相関のうち、11 個が統計的に有意 (P < 0.05) あるいは有意に近かった (P < 0.1)。正の相関は、最大でも 0.22 で有意ではなかった。例として、供試したウマのうちの 1 頭 (10 歳、ぜん馬、運動前) について、気温と皮膚 ERV 値との相関を示す (図 3 左)。気温と皮膚 ERV との間の負の相関は、電導性の高い汗の皮膚上の量を反映していると考えられる。

また、7 月に採取した 7 頭ぶんの皮膚 ERV について、運動の前後の相違、部位ごとの相違を検討した。その結果を図 3 右に示す。いずれの部位においても運動後は運動前に比較して、顕著に皮膚 ERV が減少した。これは、運動による発汗が大きな要因と考えられる。また、部位間について検討すると、頸部は、腰部や臀部に比べ、皮膚 ERV が有意に低かった。発汗量は部位によって異なり、頸部は他の部位と比較して多量の発汗があることが報告されており (Matsui ら 2002) 部位間における皮膚 ERV の差は、発汗の程度の差を反映している可能性が示唆された。このことから、ウマの ERV の変動は、発汗を反映しており、ERV がウマの発汗の良い指標となる可能性が示唆された。

一方、結果は示さないが、10 月~翌 3 月については、4~8 月と同様の傾向であったが、比較的顕著ではなかった。これは、気温が低いことに加え、この時期はウマの体毛が冬毛であったことが大きな原因と考えられた

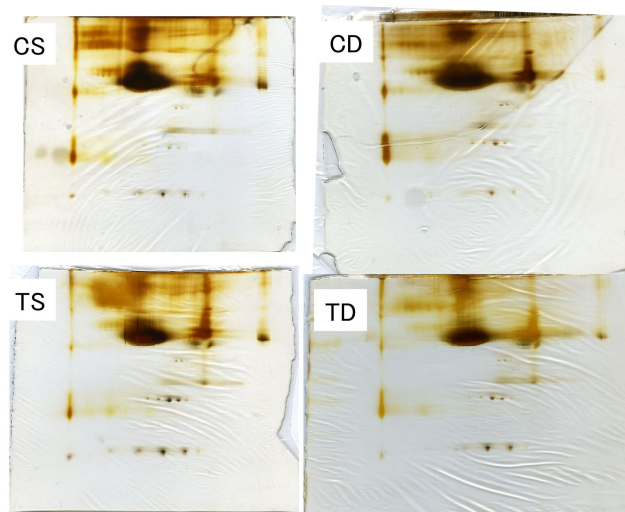


図 2 ヤギの血漿の二次元電気泳動像の一例 (オス、2 歳)。CS: 生理食塩水投与 + 通常飼育、CD: ジフェンヒドラミン投与 + 通常飼育、TS: 生理食塩水投与 + 輸送、TD: ジフェンヒドラミン投与 + 輸送。

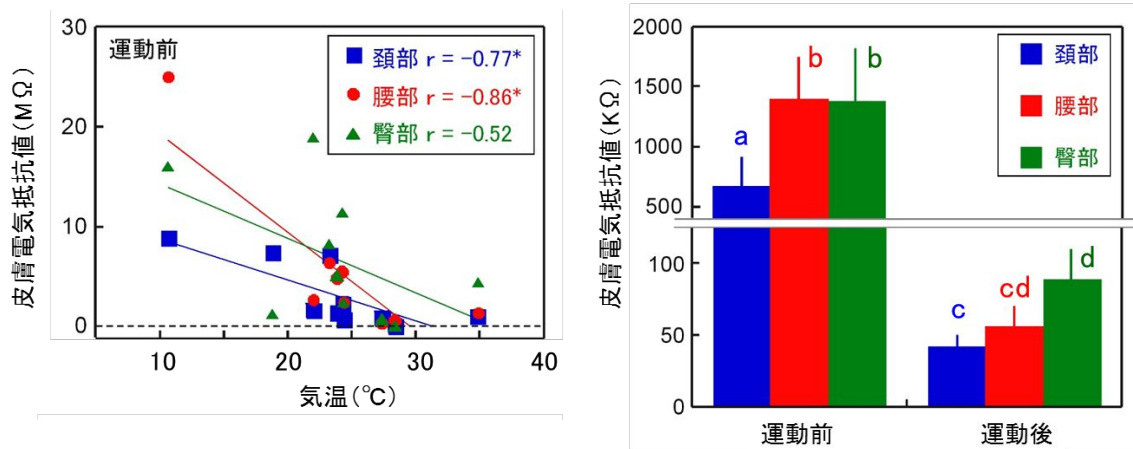


図3 左:気温とウマの皮膚電気抵抗値との相関。右:ウマの皮膚の各部位における皮膚電気抵抗値と、それに及ぼす運動の効果。

a~d:同じ文字を持たないデータとの間に有意差あり。

#### 引用文献

- Andrews PLR. and Horn CC. *Auton. Neurosci.* 125: 100-115, 2006.  
 Fazio E., et al. *Vet Res Commun.* 29:713-719, 2005.  
 Herskin, MS, et al. *Physiol Behav.* 83:411-420, 2004.  
 Kenward, H., et al. *Exp. Brain Res.* 232:2685-2697, 2014.  
 Matsui A., et al. *J.Equine Sci.* 13:113-116, 2002.  
 佐怒賀 琴美・他. *Anim Behav Manage.* 52:123-133, 2016.  
 Tajiki J., et al. *Veterinarski Arhiv* 86:795-804, 2016.  
 Takeda N., et al., *Pharmacol. Biochem. Behav.* 45: 817-821, 1993.  
 Verbalis JG., et al. *Behav Neurosci.* 100:466-475, 1986.

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計2件)

- 1) Aoyama M, Motegi T, Sugita S. Effects of apomorphine administration on the behavior in goats. *Anim. Behav. Mange.* 52: 180-186. 2016. (査読有)
- 2) 佐怒賀 琴美・青山 真人・杉田 昭栄.トラック輸送の経験がヤギの輸送に対する反応に及ぼす影響. *Anim. Behav. Mange.* 52:123-133. 2016. (査読有)

[学会発表](計6件)

- 1) 青山 真人. (シンポジウム講演)トラック輸送に伴うヤギの行動学的・生理学的反応 ～特に「乗り物酔い」の可能性について～、行動2017(日本動物心理学会・日本動物行動学会・応用動物行動学会・日本家畜管理学会・日本行動神経内分泌研究会 合同大会) 2017.
- 2) 青山 真人・田尻 龍平・他2名.ウマの皮膚電気抵抗値は「発汗」を反映する? 第160回日本獣医学会学術集会、2016.
- 3) 青山 真人・茂木 巧・杉田 昭栄.酔い止め薬「ジフェンヒドラミン」がヤギの行動に及ぼす影響、日本畜産学会第123回大会、2016.
- 4) Ryuhei Tajiri, Masato Aoyama, 他2名. The electrical resistance value of the skin surface can be an indicator of the sweating rate in horses、第17回アジア大洋州畜産学会、2016.
- 5) 田尻 龍平・青山 真人・他2名.皮膚電気抵抗値を指標としたウマの発汗の測定方法の検討、日本家畜管理学会・応用動物行動学会 2016年度春季合同研究発表会、2016.
- 6) Masato Aoyama, Kotomi Sanuka, 他2名. The effects of anti-motion sickness medication on the responses to road transportation in goats、第49回国際応用動物行動学会、2015.

[図書](計1件)

- 1) 青山 真人. 環境と動物. In「動物の飼育管理」(鎌田 壽彦 他 編). p11~25. 文永堂. 2017. (家畜の輸送環境について、一部本研究で得られた知見を含めた)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕  
特になし

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：蕪山 由己人

ローマ字氏名：KABUYAMA, Yukihiro

所属研究機関名：宇都宮大学

部局名：農学部

職名：教授

研究者番号 (8 桁): 20285042

### (2) 研究協力者

特になし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。