

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 2 日現在

機関番号：12201

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2014

課題番号：23580365

研究課題名(和文) 動揺病の制御により家畜の輸送ストレスを軽減する試み

研究課題名(英文) The attempt to relieve transportation stress by controlling motion sickness in domestic animals

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) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：ヤギを用い、反芻家畜が動揺病を経験する、すなわち悪心(吐き気)を経験する可能性について検討した。 の実験では、トラック輸送に対するヤギの脳幹の反応を検討した。輸送により、弧束核が反応することが分かった。 の実験では、ヒトに悪心と嘔吐をもたらす催吐剤シスプラチン(以下CisP)の効果を検討した。CisP投与により、約100分後にヤギは、伏臥位姿勢を取り、ヒトが採血のために体に触れても立ち上がらない状態となった。この反応は、顕著な血中コルチゾール濃度の増加を伴い、強いストレスを伴うことが分かった。これらのことから、ヤギは輸送やCisP投与によって悪心を経験している可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：This study investigates the existence of motion sickness, in other word, the sense of nausea, in goats. In the first experiment, the effect of the load transportation on the c-Fos protein (as a marker for the activation of the neurons) expression in the caprine brain stem was examined. Transportation increased the number of c-Fos reactive neurons in the nucleus solitary tract (NST), which is involved in the nausea and emesis in other animals. In the second experiment, the effects of administration of cisplatin (CisP: one of the anti-cancer drugs but induce strong nausea and emesis in humans and dogs) on goats were examined. The administration of CisP induced the 'specific lying posture', which defined as the lowered head and little movements. This behavioral response was accompanied by the remarkable increase in blood cortisol level, which indicates the strong stress. These results indicate that goats might experience nausea when they were transported or administrated with CisP.

研究分野：家畜行動学

キーワード：動揺病 悪心 ヤギ 輸送ストレス シスプラチン 嘔吐

1. 研究開始当初の背景

家畜の輸送ストレス

家畜は様々な理由で、別の場所へ生きたまま輸送される。しかしながら、輸送は家畜にとって重大なストレスとなることが以前から知られている。世界動物保健機関 (OIE) は、2005 年にアニマルウェルフェアについて 4 つのガイドラインを制定したが、そのうちの 2 つは「海上輸送」と「陸上輸送」であった。このことから、輸送ストレスの深刻さが分かる。しかし、未だ有効かつ実用的な輸送ストレス軽減法は見つかっていない。

乗り物酔い(動揺病)

ヒトやイヌにおいて、不規則な揺れによって気分が悪くなる(「悪心」を感じる)現象、「動揺病」(いわゆる乗り物酔いである)が知られている。動揺病発生のメカニズムはイヌ、フェレット、スナクなど、嘔吐ができる動物を用いて研究が進んでいる。

一方で、ラットやマウスなどの齧歯目は嘔吐をしないが、悪心は感じるものと考えられている。齧歯目では「異味症」(カオリンという瀬戸物の原料を摂食する異常行動)という行動が、嘔吐に代わる悪心の指標となると考えられている。齧歯目と同様、反芻動物にも嘔吐反射がない。それゆえ、これまで、輸送によって反芻家畜が動揺病になるとは考えられていなかった。申請者は 2008 年度より、ヤギを実験動物として用い、反芻家畜においてトラック輸送により動揺病を発症している可能性について検討している。これまで、トラック輸送中のシバヤギに動揺病軽減効果のあるジフェンヒドรามミン(市販のヒト用酔い止め薬)を投与すると、輸送中の行動が変化することを確認している。このことは、ヤギにおいても輸送中に動揺病を起こしている可能性を示唆している。反芻家畜においても輸送により動揺病を起こすことが明らかとなれば、これまで明確な改善法が分からなかった輸送ストレスの軽減法において、動揺病を軽減する方向に改善するという、明確な一つの方向性を提案することができる。

2. 研究の目的

当初想定していた研究の目的は、1) ヤギが悪心を経験していることを示す生理的指標の発見、2) ヤギの動揺病の軽減法、3) ウシ等における動揺病発症の可能性、であった。しかし実際には、ヤギが動揺病になる、すなわち輸送により悪心を経験する、という可能性をさらに証明することを第一の目的とし、また、嘔吐をしないヤギにおいて悪心を感じることを示す生理的指標を探索することを目的とした。

3. 研究の方法

研究は、以下に示す①～③の 3 つに大きく

分けて検討した。

①輸送に伴う脳幹、特に延髄弧束核の反応の検討：動揺病、あるいは悪心の発生には、脳幹における各神経核が、主要な役割を果たす。特に延髄の弧束核を含む領域は「嘔吐中枢」と呼ばれ、動揺病を含めたあらゆる原因の悪心に関わるとされている。輸送がヤギの脳幹、特に延髄における反応に及ぼす影響と、それに及ぼす酔い止め薬ジフェンヒドรามミン(以下 DH) の効果を検討した。

①-1 ヤギの脳幹、特に延髄のアトラス作成：シバヤギの脳幹のアトラスは未だ作成されていないので、まず、それを作成した。オスシバヤギ 2 頭について、安楽殺後に頭部を灌流固定し、厚さ 50 μm の前額凍結切片を作成した後、10 枚毎にニッスル染色およびクリューバ・バレラ染色を施した。ラットの脳アトラスを参考に、延髄を中心とした脳幹の神経核を同定した。

①-2 トラック輸送によりヤギの脳幹に発現する c-Fos タンパク質の分布：成シバヤギ 4 頭(オス 2 頭、メス 2 頭)を使用した。雌雄各 1 頭ずつに 1 時間のトラック輸送を負荷し(輸送区)、他の雌雄各 1 頭には、トラックの荷台には載せるが走行をしないという処置を施した(対照区)。その後、脳幹における c-Fos タンパク質(神経細胞における転写因子の一つで、神経細胞の活動のマーカーとなる：以下 Fos) の発現を免疫組織化学法により検討した。

①-3 輸送によりヤギの弧束核に発現する c-Fos タンパク質の分布様式にジフェンヒドรามミンが及ぼす影響：これまでの研究において、ヤギの輸送中の行動は、動揺病軽減効果がある DH の投与により変化することが明らかになっている。この実験では、輸送により脳幹、特に弧束核において、輸送により発現する Fos の分布に DH がどのような影響をもたらすかを検討した。成シバヤギ 6 頭(雌雄と去勢オス各 2 頭ずつ)を使用した。各性のヤギ 1 頭ずつに生理食塩水を投与して輸送を(対照区)、残る 1 頭ずつには DH を投与して輸送(DH 区)を負荷した。①-2 に示した同じ手順で、脳幹、特に弧束核に発現する Fos の分布を検討した。

②催吐剤シスプラチンの投与によるヤギの行動学的・生理学的反応：悪心の生理学的メカニズムの研究には、シスプラチン(以下 CisP) という催吐剤がよく使用される。CisP は抗癌剤の一つであるが、副作用として強い悪心をもたらすことが分かっている。また、以前の研究より、これをヤギに投与すると、伏臥位姿勢をとり、実験者が体に触れても立ち上がろうとしない、あたかも悪心を感じているような状態になることが分かっている(これを便宜的に「悪心様状態」と呼ぶ)。CisP 投与によるこの反応が、悪心を経験している結果である可能性を検討した。

②-1 CisP 投与に対するヤギの行動学的・生理学的変化の検討：成シバヤギ 5 頭（オス 2 頭、メス 3 頭）を使用した。CisP を静脈内注射し、ヤギの行動学的変化を 4 時間観察した。また、投与後 1 時間ごとに血液を採取し、ストレスの生理学的指標となるコルチゾル（以下 Cor）の血中濃度を測定した。さらに、イヌにおいて悪心や嘔吐との関与が報告されているアルギニンバソプレッシン（AVP）、コレシストキニン（CCK）、ペプチド YY（PYY）の濃度も測定した。別の日に同じヤギに同量の生理食塩水を投与し、これを対照区とした。

②-2 シスプラチン投与に対する心電図の変化：催吐剤による悪心の発生から嘔吐に至るまでには段階的な自律神経系の活動の推移があることがヒトで報告されている。4 頭のシバヤギ（雌雄各 2 頭ずつ）に CisP を投与し、心電図の記録・解析を行うことによって、その自律神経系の状態を検討した。②-1 と同様、生理食塩水投与を対照区とした。

②-3 シスプラチン投与による行動学的変化に制吐剤オンダンセトロン投与が及ぼす影響：イヌやフェレットにおいて、CisP 投与により惹起される悪心や嘔吐は、オンダンセトロン（以下 On）という制吐剤により軽減される。CisP 投与によりヤギに観察された行動学的変化に対する On 投与の効果を検討した。4 頭のシバヤギ（雌雄各 1 頭ずつ）を使用した。On 投与は CisP 投与の 1 時間前に行った。それぞれの薬剤の対照として生理食塩水（以下 Sa）を用い、On-CisP 区、On-Sa 区、Sa-CisP 区、Sa-Sa 区の 4 通りの実験を実施した。

③輸送を繰り返し経験することによる影響：動物の管理の仕方によっては、特定の個体は生涯のうちに複数回トラック輸送を経験する。刺激を繰り返し負荷すると、刺激に対する反応の程度や質が変化することがある（反応が減弱する「慣れ」、あるいは逆に増強する「鋭敏化」）。この実験では特に動揺病にこだわらず、トラック輸送を繰り返し経験することによる行動学的・生理学的変化を検討した。輸送を経験したことの無い成シバヤギ 6 頭（オス 3 頭、メス 1 頭、去勢オス 2 頭）を使用した。1 時間の輸送を、2～7 日間の間隔を空けて 8 回繰り返した。輸送中の行動を観察し、また、輸送中から輸送終了後に至る時間帯について、経時的に採血を行い、血中の Cor 濃度を測定した。

4. 研究成果

①-1 ヤギの脳幹、特に延髄のアトラス作成：本実験においてアトラス作成の対象となった領域は、門を基準（0 mm）とし、吻側に 7.5 mm、尾側に 1.5 mm の間であった。主にラットの脳アトラスを参考に、前庭神経外側核、前庭神経内側核、小細胞性網様体核、縫線淡蒼核、迷走神経背側運動核、孤束核など

を特定できた。また、孤束核については、その神経細胞の形態的特徴や神経線維の分布様式等により分類し、さらに 16 の領域（亜核）に分類した。16 領域のうちの 1 つは弧束と呼ばれる領域であり、残る 15 の亜核については便宜的に A～O とした。

①-2 トラック輸送によりヤギの脳幹に発現する c-Fos タンパク質の分布：対照区、輸送区の両方において、外側網状巨大細胞旁核、前庭神経外側核、前庭神経内側核、小細胞性網様体核、縫線淡蒼核、三叉神経脊髄路核、迷走神経背側運動核、孤束核に Fos 陽性細胞が観察された。その中で、対照区と比較して輸送区の Fos 陽性細胞数が顕著に多かったのは、前庭神経外側核、前庭神経内側核および孤束核であった（図 1A、B）。動揺病は、不自然な動揺が内耳の半規管で感知され、その刺激が前庭神経を介して前庭神経核に入力され、さらにそれが孤束核に作用して悪心を引き起こす神経メカニズムが提唱されている。今回の結果より、トラック輸送によりヤギの脳幹における、動揺病に関わる部位は反応していることが明らかとなった。

一方、孤束核の亜核ごとに Fos 陽性細胞数を比較すると、その発現数が、輸送区において特に対照区よりも多かった領域は A、B、D、G、I、J であった（この基準は、雌雄ごとに対照区と輸送区をペアとしたときに、いずれのペアにおいても輸送区の Fos 陽性細胞数が対照区の 3 倍以上であったこととした）。また、輸送区の方が比較的 Fos 陽性細胞数が多かった領域は、C、F、H、L、O であった（いずれかのペアにおいて輸送区は対照区の 3 倍以下であるが、平均値が 3 倍を越えていた）。E、K、M、N においては実験区による明確な違いが確認できなかった。先行研究において、unks に動揺病を負荷した際に顕著な Fos の増加が確認された部位は内側核と呼ばれる領域であり、本実験におけるヤギでは、これに該当すると考えられた部位は C と O であった。この部位の Fos 陽性細胞数は比較的増加しており、やはりトラック輸送により動揺病と似た反応が起こっている可能性がある。一方、輸送により、最も顕著に Fos 陽性細胞の増加が見られた領域の中で、A と B はそれぞれ交連核と背内側亜核に該当すると思われる、この部位は消化管からの情報が入力される部位である。消化管から迷走神経を介して発生する悪心にこれらの神経核がかかわることがラット等で報告されており、ヤギが輸送により悪心を経験しているとするならば、部分的には消化管からの刺激が関与するのかも知れない。

①-3 輸送によりヤギの弧束核に発現する c-Fos タンパク質の分布様式にジフェンヒドラミンが及ぼす影響：生理食塩水を投与した対照区、DH を投与した DH 区ともに、①-2 の結果と同様、弧束核に多くの Fos 陽性細胞が観察できた。その数は、DH 区の方が対照区に比べ少なかったが、統計的に有意ではな

かった。一方、同じ性の個体をペアとし、個体ごとに Fos 陽性細胞数をみると、オスとメスのペアにおいては、それぞれ、DH 区では対照区の 0.69 倍、0.53 倍であったのに対し、去勢オスのペアでは 1.39 倍であった(図 1C)。これは、去勢オスで対照区に用いた個体の Fos 陽性細胞数が特に少なかったためである。この個体の Fos 陽性細胞数は、①-2 における輸送区の 2 頭に比べても少なく、この個体になんらかの問題があった可能性も考えられるので、さらに検討する必要がある。

一方、弧束核における核領域ごとに検討すると、①-2 において輸送によりその Fos 陽性細胞数が増加し、さらに今回、特に DH 区における Fos 陽性細胞数が対照区におけるそれに比べ少ない傾向にあったのは、A、B、C、

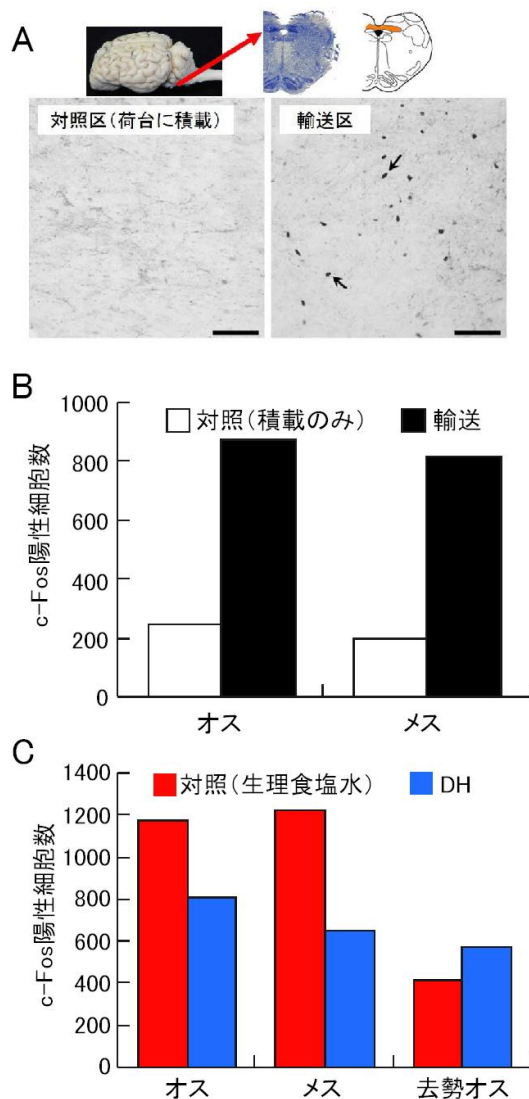


図 1 A:ヤギの弧束核に発現した c-Fos タンパク質陽性細胞(矢印で示す)。スケールバーは 100 μ m。B:弧束核における Fos 陽性細胞数に輸送が及ぼす影響。C:輸送したヤギの弧束核における Fos 陽性細胞数にジフェンヒドรามミンの投与が及ぼす影響。

D、F、G、I、L であった。C はunksにおいて動揺病に関わるとされた部位の一つ(内側核)であり、DH がここに作用した結果行動学的変化をもたらした可能性はある。

②-1 CisP 投与に対するヤギの行動学的・生理学的変化の検討: CisP 投与によって、30 分間は、生理食塩水投与をした対照区との間に明確な行動学的・生理学的変化は認められなかった。30 分後以降は、CisP 区ではいずれの個体においても反芻が観察されなかった。投与から 60 分後に給餌を行なったが、両区ともに直ちに摂食を開始した。しかし、対照区では、いずれの個体も 120 分以上摂食を続けたのに対し、CisP 区においてはいずれの個体も、投与から平均で 99 分後に、摂食を停止し、伏臥位姿勢になり、採血時に実験者が体に触れてもほとんど動きがない「悪心様状態」になった(図 2A、B)。血中 Cor 濃度は、CisP 区において、投与 60 分後には特に対照区との間に差は観られなかったが、ヤギが悪心様状態を示していた 120 分には増加し始めており、投与前、あるいは同じ時刻の対照区と同じ時刻のそれよりも有意に高い値となった。イヌ、フェレット、unksといった嘔吐する動物を用いた先行研究によると、



図 2 シスプラチン投与によりヤギにみられた「悪心様状態」。A:顔を下に向け、腹臥位姿勢を取る。B:このとき、血液採取のために体に触れても立ち上がらない。

CisP 投与が嘔吐を起こすまでは70~120分とある程度の時間を要する。CisP からの時間を考えると、悪心様状態は嘔吐と類似の神経メカニズムを介して起こった可能性がある。また、血中 Cor 濃度の増加は、悪心様状態が強いストレスを伴うことを示している。これらのことを考えると、CisP によりヤギが悪心を経験している可能性がある。

一方、イヌにおいて、CisP 投与により起こる嘔吐に伴ってその血中濃度が増加する AVP、CCK、PYY は、いずれも悪心様状態におけるヤギにおいて変化が観られなかった。これらの血中パラメータがヤギにおいて悪心様状態を示しているときにも変化がなかった原因は明らかではないが、これらの血中マーカーは少なくともヤギでは指標とはならないことが分かった。

②-2 シスプラチン投与に対する心電図の変化

②-1 の結果と同じく、CisP 投与によって約 140 分後に悪心様状態になった。さらに②-1 と同様、この状態は統計的に有意な血中 Cor 濃度の増加を伴った。例として 1 頭の行動、心拍数、コルチゾル濃度の推移を図 3 に示した。CisP 投与前から摂食までの心拍数は 80~100 bpm の値を維持していた。摂食開始によりいずれの実験区でも心拍数の増加がみられた。対照区では摂食をしている間は高い心拍数が維持されていたが、CisP 区ではまだ摂食が継続している投与後約 90 分後より漸減した。摂食が停止した時間帯の心拍数は、投与前よりもむしろ低い傾向が観られた。2 分間ごとの RR 間隔の最大値は、いずれの実験区においても、投与の前後から摂食までは 800~900 ミリ秒であり、摂食開始とともに減少した。しかしその後、対照区では低い値を維持していたのに対し、CisP 区では増加した。この反応はいずれの個体でも類似しており、摂食が停止した投与後 3 時間後には、その心拍数は投与前に比べて有意に増加した。また、同じ時間帯の対照区に比べても、有意に高かった。

RR 間隔のばらつきを示す CVRR 値は、CisP 投与 3 時間後は値の若干の低下が観られたが、投与前あるいは対照区の同じ時間帯の値と比較し、有意な差はなかった。

心拍変動の周期性について、低周波成分 (0.04-0.15 Hz) である LF 値と高周波成分 (0.15-0.40 Hz) である HF 値については、いずれも CisP 投与による統計的に有意な影響は観られなかった。一方、その割合 (LF/HF 値) は、CisP 区では 3 時間後に対照区に比べ有意に低かった。

これらの心電図解析により得られた結果から、CisP 投与による悪心様状態は、副交感神経の活動を伴うことが考えられた。ヒトの抗癌剤による治療に伴う自律神経系の動きの報告では、まだ嘔吐には至らないが悪心を感じる状態では、副交感神経が優位となり、心拍数の低下などが起こることが報告され

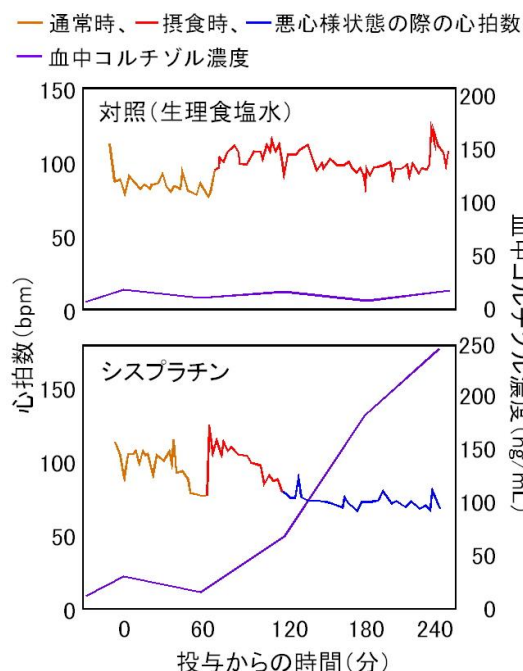


図3 シスプラチン(CisP)投与によるヤギの行動学的・生理学的反応の一例。上が対照として生理食塩水を、下が CisP を投与した結果。そのときのヤギの行動を、心拍数を示すグラフの色で示す。

ている。今回のヤギにおける心拍数の低下などは、ヒトにおける悪心経験時の状態と類似の反応かも知れない。

②-3 シスプラチン投与による行動学的変化に制吐剤オンダンセトロン投与が及ぼす影響

Sa-Sa 区、On-Sa 区では、2 回目の投与から 3 時間の間は摂食を続けていた。一方、Sa-CisP 区、On-CisP 区では、②-1、②-2 と同様、悪心様状態となった。CisP 投与から悪心様状態が観察されるまでの時間は、Sa-CisP 投与区では平均 123 分、On-CisP 投与区では平均 144 分であり、後者の方が長かったが、両区間に有意差はなかった。

血中 Cor 濃度について On-Sa 区と Sa-Sa 区では、全体を通じて顕著な変化はなかった。また、On-CisP 区においては、CisP 投与 60 分後までは、顕著な血中 Cor 濃度の変化はなかった。このことは、On 自体にはストレスを引き起こす作用はないということである。On 投与によっては行動に明確な変化が観察できなかったことも考え合わせ、On そのものには強い行動学的・生理学的作用はないように思われる。一方、4 頭全てのヤギにおいて CisP 投与から 120 分~180 分の間に血中 Cor 濃度は増加した。この増加は、②-1 および②-2 の実験と同様、悪心様状態に同調していた。On-CisP 区では、Sa-CisP 区に比べ、CisP 投与 180~240 分の間は血中 Cor 濃度の増加がわずかに緩やかである印象はあるが、両区間に有意な差はなかった。

統計的な有意差はないが、On 投与によって CisP 投与による悪心様状態が現れるまでの時間が長くなり、血中 Cor 濃度の増加が若干緩和される傾向があったため、今後、投与量や投与のタイミングの検討を含め、さらに試す必要がある。

③輸送を繰り返し経験することによる影響：輸送中のヤギの行動について、1 回目から 8 回目までを比較すると、輸送開始から伏臥位姿勢になるまでの時間は 2 回目以降から早くなった。あるいは、1 回目には伏臥位姿勢を取らなかった個体も、2 回目以降からは取るようになった。輸送開始から伏臥位になるまでの時間は、1 回目と比較して 2 回目以降が有意に早かった。一方、輸送中に伏臥位姿勢であった時間は、2 回目以降が 1 回目 비해長くなる傾向にあったが、有意な差はなかった。血中 Cor 濃度は、1 回目から 8 回目まで輸送中には顕著に増加した。輸送中の血中 Cor 濃度は、いずれの時間においても、回数間に差はなかった。しかし、輸送終了後に畜舎に戻った後には、2 回目以降は血中 Cor 濃度の減少が早くなった。輸送終了 60 分後の血中 Cor 濃度は、2 回目以降は 1 回目 비해、有意に低かった。

これらの結果から、輸送を経験することによって、ヤギはある程度輸送を学習し、輸送中のストレスが消失することはないが、行動を変化させてこれに対応し、回復を早めている可能性が示された。「繰り返し刺激を受けることによって反応の程度が減弱する」という「慣れ」の定義から考えると、ヤギや輸送に慣れるものと考えられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 6 件)

- ① 青山真人・塩屋みなみ・藤平篤志・杉田昭栄. The physiological and behavioral responses to the administration of cisplatin, an anticancer drug that induces nausea. 第 48 回国際応用動物行動学会. 2014 年 7 月. スペイン王国 ヴィトリア.
- ② 青山真人・高草木葉子・徳力格爾・塩谷みなみ・杉田昭栄. 輸送によりヤギの前庭神経核および孤束核の c-Fos タンパク質発現は増加する. 第 117 回日本畜産学会大会. 2013 年 9 月. 新潟大学.
- ③ 青山真人・高草木葉子・茂木巧・金田広樹・杉田昭栄. Motion sickness may be one of the factors of the transportation stress in goats. 第 15 回アジア大洋州畜産学会. 2012 年 11 月. タイ王国 タマサート大学.
- ④ 青山真人・茂木巧・金田広樹・杉田昭栄.

Goats might experience motion sickness during road transportation. 第 45 回国際応用動物行動学会. 2011 年 7 月. アメリカ合衆国 インディアナポリス.

[図書] (計 1 件)

- ① 青山真人. 家畜管理工学. (In 扇元敬司 他 編. 最新畜産ハンドブック). pp.326-328. 講談社 (輸送に関する記述の一部に本研究の成果を紹介).

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

- ① 宇都宮大学農学部 GUIDE2014 に研究成果の一部を紹介.

6. 研究組織

(1) 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

(2) 研究分担者

杉田 昭栄 (SUGITA SHOEI)
宇都宮大学・農学部・教授
研究者番号：50154472

(3) 連携研究者

()

研究者番号：