

気候の異なる条件下で飼育した競走馬の育成に関する研究

石丸 睦樹

気候の異なる条件下で飼育した競走馬の育成に関する研究

酪農学園大学大学院

獣医学研究科

石丸 睦樹

獣医衛生学

指導教員 教授 樋口豪紀

2022 年度

目次

緒言	1
----	---

第I章

サラブレッド種の初期育成期における出生時期と成長及び内分泌機能の発達

I-1 序文	7
I-2 材料及び方法	8
I-3 結果	23
I-4 考察	47
I-5 小括	51

第II章

サラブレッド種の中期育成期における厳冬期の放牧管理が成長及び内分泌機能に及ぼす影響

II-1 序文	53
II-2 材料及び方法	54
II-3 結果	75
II-4 考察	92
II-5 小括	99

第III章

サラブレッド種の後期育成期における気候環境が成長及び内分泌機能に及ぼす影響

III-1 序文	100
III-2 材料及び方法	101
III-3 結果	114
III-4 考察	135
III-5 小括	139

第IV章

後期育成期のサラブレッド種に対する長日処理が成長及び内分泌機能に及ぼす影響

IV-1	序文	140
IV-2	材料及び方法	141
IV-3	結果	145
IV-4	考察	178
IV-5	小括	184
総括		185
謝辞		188
引用文献		190
英文要旨		218

緒論

サラブレッドの繁殖雌馬は、春に種雄馬と交配され、受胎後は約 340 日の妊娠期間を経て、翌年春に子馬を出産する。出生した子馬は複数の親子の群れとともに放牧管理された後、約半年後の当歳（0 歳）夏～秋には、母馬を翌年の出産に備えさせることを主な目的として、子馬を人為的に離乳させる。この出生から離乳までの半年程度の期間は「初期育成期」である。離乳された子馬は、翌年秋（1 歳夏～秋）まで複数頭数の群れで放牧管理され、この約 1 年間の期間は「中期育成期」である。また、子馬はこの中期育成期に最初の冬を経験する。1 歳秋（9～11 月）になると、ヒトがウマに騎乗することを可能にするための騎乗馴致（ブレイキング）を行う。このブレイキングでは、ハミや鞍などの馬具装着に馴らすとともに、騎乗する行為を受け入れさせる。ブレイキングを境に、複数頭数での放牧は一般的に行われなくなり、放牧を行う場合は 1 頭での小パドック放牧へと切り替わる。さらに、ブレイキング後は、騎乗運動を継続しながら、段階的に競走馬としての体力やスピードを鍛えられる。やがて、2 歳春には中央競馬のトレーニング・センター（トレセン）や地方競馬場に入厩し、6 月には競走馬としてデビューする。このブレイキング開始からトレセンや地方競馬場に入厩するまでの約半年程度の期間は「後期育成期」である。サラブレッドは後期育成期に 2 回目の冬を経験することになる。サラブレッドは、「初期育成期」、「中期育成期」及び「後期育成期」からなる約 2 年間の育成期を経て競走馬になる[102,278]。

2021 年における日本のサラブレッド生産頭数は 7,733 頭で、そのうち 7,557 頭（約 98.0%）が北海道で生産された [250]。北海道における生産地別の内訳は、日高地区が 6,165 頭（約 81.6%）、胆振地区が 1,366 頭（約 18.0%）、十勝地区が 26 頭（約 0.3%）であった [250]。日本では、サラブレッドのほとんどが北海道、特に日高・胆振地区で生産され、また、そのうちの大多数が約 2 年間の育成期を北海道で過ごすことが特徴である。

サラブレッドは、他の動物と同様に夏期の暑熱環境の影響を受けやすい[35, 196]ことから、一般的に夏期の北海道の気候は、本州と比較して涼しく過ごしやすい環境であると考えられている。一方、冬期の北海道は、気温が極めて低

く、また、地面の凍結や積雪によって放牧地での採食や運動が制限されるなど、サラブレッドにとって厳しい環境と考えられている。日本の主要な馬産地である北海道において国際競争力のあるサラブレッドを生産・育成するためには、冬期におけるさまざまな課題を克服し、我国の気候に合致した技術開発や研究が課題となっている[194]

初期育成期は、馬体の成長速度が速いことが特徴である。平均的なサラブレッドにおける出生時の体重は約 50～60 kg であるが、1 ヶ月後には 2 倍の約 100 kg、6 ヶ月後には 5 倍の約 250 kg にまで急成長する[32,91,109,202,204,277]。その後、中期から後期育成期にかけて増体速度は徐々に緩やかになる。一般的に北半球のサラブレッドは、中期育成期の冬期にあたる時期には発育速度が一時的に停滞し[97,202,277]、春期に代償性の急成長が個体レベルで顕著に生じることが報告されている[32,156,277]。さらに、我国では後期育成期にあたる 2 度目の冬期においても、同様に成長が停滞した後、春期に急成長する現象が報告されている[156,201]。冬期の成長停滞の要因として、耐寒のための維持エネルギー要求量の増大などが報告されているが[46]、性腺の機能や成長に関連した周期性のホルモン動態は明らかにされていない。

サラブレッドの成長速度の指標としては、平均増体日量 (average daily gain: ADG) が一般的に用いられている[63,109,206]。サラブレッドの ADG (kg/day) は生後 3 ヶ月間が 1.1～1.3 と最も高く、12 ヶ月齢では約 0.4、24 ヶ月齢では約 0.1～0.2 と徐々に低下する[204,277]。サラブレッドの標準発育曲線は、各国の気候や飼養環境によって異なることが知られている[32]。我国でも、疾病などを発症せずに順調に発育した日本国内サラブレッドのデータを集積し標準発育曲線が作成されている[63,201,202]。また、その標準発育曲線を元にして可消化エネルギー要求量を計算した「軽種馬飼養標準 (2004)」[63]が、日本中央競馬会競走馬総合研究所によって作成されており、飼養管理の指針として広く活用されている。

初期育成期及び中期育成期の急成長する時期には、下肢部の肢軸異常、腱拘縮、クラブフット、骨端症、離断性骨軟骨症 (osteochondrosis dissecans: OCD)、軟骨下骨嚢胞、腰痠などの発育期整形外科疾患 (developmental orthopedic disease: DOD) を発症しやすいことが報告されている[57,108,147,205,255,266]。

DODの発症要因として、急成長以外にも、遺伝、栄養のアンバランス、運動不足、硬い放牧地での運動などが複雑に関与することが報告されている[74,133,278]。DODを発症したサラブレッドは、市場価値や競走能力を低下させる可能性が指摘されている[114,154,205,214,237]ことから、サラブレッドが急成長する時期には飼養管理に細心の注意を払い、成長停滞や代償性の急成長を予防するような飼養管理が望ましいとされている[63,109,202,205,256]。

サラブレッドは、体重 (body weight: BW) に占める骨格筋の割合が 52%と高いことが特徴である[81]。除脂肪体重 (fat free mass: FFM) は筋肉量を反映する指標として考えられており [1,71,120,140]、FFM や体脂肪量 (fat mass: FM) は超音波画像診断装置を用いて測定した臀部脂肪厚 (rump fat thickness: RFT) から推定式を用いて算出することが可能である[178,118,273]。競走成績の優秀な競走馬は FFM が高値であることが報告されており[71,119]、また、筋肉量が多い競走馬は競走能力も高いと考えられている[120]。サラブレッドでは、雄馬は雌馬と比べて FFM が高く [71,157]、FFM は成長[71]やトレーニング[157]によって増加することが報告されている。

日本の2歳競馬は6月に開始される。この時期においては、いわゆる「早生まれ」とよばれる1月や2月生まれのサラブレッドは、「遅生まれ」とよばれる5月や6月生まれと比べて成長面のアドバンテージが大きい。そのため、競走馬流通の中心である当歳や1歳セールにおいても、「早生まれ」は有利に取引されると一般的に考えられている。近年、繁殖雌馬に対する長日処理法の普及によって「早生まれ」のサラブレッドの生産が可能となっているが、北海道の厳寒期は青草の採食や十分な運動を行うことが困難であり、「早生まれ」はサラブレッドの健全な発育にとって必ずしも有利ではない可能性もある。したがって、出生時期の違いによる当歳馬の発育や内分泌機能の発達について明らかにするとともに、「早生まれ」のサラブレッドが初期育成期に適正な成長を促すような飼養管理法の開発が求められている。

世界の競馬先進国における主要な馬産地では、中期育成期には、季節を問わず広い放牧地において昼夜放牧による飼養管理が行われている。日本では、かつては放牧地面積の狭さや夜間の事故防止などの観点から、繁殖雌馬や子馬を朝に放牧して夕方に集牧する「昼放牧」が一般的であった[85]。近年では、昼

夜放牧の利点が生産者に啓発されてきたことから、春から秋にかけての気候の良い時期には昼夜放牧を行う牧場が増加している[50,244,278]。一方、北海道の冬期では、気温の低下や放牧地の積雪によって、繁殖雌馬や子馬が地面の牧草を採食することが困難になることや、放牧地内で自発運動量が減少することが経験的に知られている[278]。そのため、多くの日高地区の牧場では、中期育成期のサラブレッドは、冬期には昼放牧で管理されることが一般的である[278]。しかし、近年、北海道の大手牧場が中期育成期にも昼夜放牧を継続しながら良好な競走成績をあげたことを契機に、冬期における昼夜放牧が注目され始めている。一方、寒さの厳しい北海道の冬期には、成長停滞が観察されることが報告されている[97,202,277]ことから、厳寒期の子馬の生理状態や内分泌状態を明らかにするとともに、この中期育成期に適正な発育を促す放牧管理技術の開発が課題となっている。

欧州に拠点を置くドバイ、カタールなどの富裕層馬主は、競馬がシーズンオフとなる冬期に、ブレーキングが終了した1歳馬を含む所有馬を温暖な自国に輸送し、そこで後期育成及び競走馬の調教を行うことが知られている。また、米国では年間を通して競馬が開催されるが、ケンタッキーや東海岸に拠点を置く有力馬主は、冬期に所有馬を気候が温暖なフロリダ州、アーカンソー州、カリフォルニア州などの競馬場や調教場に移動して調教や競馬を行うことが一般的である。米国の2歳調教セールは、日本よりも約2ヶ月早い時期（3月）に、フロリダ州などの温暖地で開催されている。2歳調教セールに上場されるサラブレッドの多くは、ケンタッキー州の1歳セールで取引された後、フロリダ州で後期育成を実施されている。このように後期育成期に温暖な地域に移動させて調教を行う方法は「二元育成」と呼ばれている[63]が、この育成方法の検証に関する報告はない。我国に目を向けると、冬期に穏やかな気候の日本中央競馬会宮崎育成牧場（宮崎育成牧場）で後期育成を行ったサラブレッド（宮崎育成馬）と冬期に寒冷な北海道の日本中央競馬会日高育成牧場（日高育成牧場）で後期育成を行ったサラブレッド（日高育成馬）を2歳4月の同時期に比較すると、宮崎育成馬は日高育成馬と比べて身体の成長が早く、冬毛が抜けて見栄えが良いことが経験的に知られている。長日性季節繁殖動物である雌馬の発情開始は、気温や日長時間との関連があることが報告されており[80,129,197]、

また、南九州における肥育雌馬では、3月には排卵が観察される [185] ことが報告されている。宮崎育成馬の成長や見栄えの良さは冬期の温暖な気候や日長時間との関連が推察される。

1990年代に、米国2歳調教セールで購買された競走馬が日本の中央競馬で大活躍したことを背景に、日本においても同様の2歳調教セールが1997年から北海道で開催されるようになった。このセールは、約400mの距離を競馬同様の速いスピードで調教供覧を行った後に、セリ方式で売却することが特色である。2歳調教セールでは、購買者が2歳競馬における即戦力を求めることから、タイムが速いほど高価格で取引される傾向がある。このような2歳調教セールの普及によって、北海道においても早期に後期育成馬を仕上げる育成技術が要求されるようになった。北海道の調教施設面では、1993年の日高育成牧場内の育成調教総合施設の開場以降、民間においても同様な屋内調教施設が整備され、北海道の厳寒期においても十分な騎乗トレーニングを実施することが可能になった。しかし、北海道で後期育成を行う育成馬は、冬期の寒冷暴露によって成長停滞が観察される [156,202] ことから、未成熟な個体に対するスピード負荷によって筋骨格系障害 (musculo-skeletal-injury: MSI) を発症する危険性 [59,217,267] が危惧されており、2歳調教セールにおいては、本来即戦力となるべき取引馬の競馬デビューが遅れる可能性が指摘されている。したがって、北海道の厳寒期においても後期育成馬が計画的にスピード調教が実施できるよう、適正な発育を促す飼養管理技術の開発が課題となっている。

本論文は、日本の寒冷地及び温暖地で飼育・育成されたサラブレッドの体組成の変化、馬体成長及び性腺の発育を内分泌学的に解明するとともに、冬期に寒冷な北海道で飼育するサラブレッドの適切な育成方法を検討することを目的とした。具体的には、第I章では、北海道で生産されたサラブレッドにおける出生時期の違いによる成長や内分泌機能の発達について明らかにすることを目的とした。第II章では、中期育成期における冬期の放牧管理方法として、昼夜放牧を行う群と昼夜放牧と同等の運動距離を確保するために昼放牧とウォーキングマシン (walking machine: WM) 運動を組み合わせる群を比較し、2つの厳寒期管理方法が生理機能、成長及び内分泌機能に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。第III章では、南九州と北海道の冬期の気候の違いが、後期

育成期のサラブレッドの体組成、成長及び内分泌機能に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。さらに、後期育成期の若馬がトレーニング中に経験する新奇刺激や運動ストレスに対する生体反応を明らかにする目的で、実験的にサラブレッド種 4 歳雄馬を用いてトレッドミル上で情動ストレスと運動ストレスを負荷し、血中成長ホルモン及びプロラクチン濃度の変化を観察した。第IV章では、北海道で後期育成を行う雌雄サラブレッドに対して、1 歳冬から 2 歳春にかけて長日処理を実施し、体組成、成長、性腺機能、被毛の変化及び内分泌変化に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。さらに、南九州の雌雄サラブレッドに対する長日処理の効果を明らかにし、長日処理の効果を総合的に検証することを目的とした。

第I章

サラブレッド種の初期育成期における出生時期と成長及び内分泌機能の発達

I-1 序文

競馬では、主催者の規程によって開催する競馬場の日程、開催日に実施する各競走の馬場や距離、競走毎に出走することが可能なサラブレッドの年齢、出走資格などが、それぞれ定められている。北半球におけるサラブレッドの国際的な年齢表記は、出生時は当歳で、翌年1月1日に年齢が加算されて1歳となる「数え年齢方式」が採用されている。サラブレッドは、馬体の中で骨端線の閉鎖が最も遅い頸椎の化骨が完了する[37]4～5歳に馬体成長が完了すると考えられており[222,243]、競馬でのスピードやパフォーマンスのピークを迎えることが報告されている[78,242]。一方、サラブレッドは約24ヶ月齢で競馬出走が可能な程度に馬体が成熟する[153,222,281]と認識されており、日本中央競馬会が主催する競馬では、概ね24ヶ月齢を過ぎた6月第1週から2歳馬による競走が開始される。成長途上にあたるこの時期は、「早生まれ」とよばれる1月や2月生まれのサラブレッドは、「遅生まれ」とよばれる5月や6月生まれのサラブレッドと比べて成長面のアドバンテージが大きいと一般的に考えられている。そのため、「早生まれ」は、競馬で早期から能力を発揮するうえで有利であり[141,142]、フィンランドの速歩競走においては、「早生まれ」は「遅生まれ」と比べて、2歳や3歳時の初出走時における競走成績が優れていることが報告されている[224]。また、サラブレッドの1歳セールにおいて体高が高い個体は、競走期における獲得賞金や勝率が高いことが報告されており[33,234]、1歳セールでも早熟で見栄えの良い個体は高額で取引される傾向がある[34]。そのため、「早生まれ」のサラブレッドは、当歳や1歳セールの取引においても有利であると考えられている。

北半球における自然状態でのウマの繁殖期は、概ね4月から9月までと考えられている[95,177]が、サラブレッド生産においては、1月1日以降の早期出産を目指すために、繁殖雌馬に長日処理[36,92,188,193]を実施し、発情の早期化を行っている。そのため、北半球のサラブレッドの交配は2月中旬から開始さ

れ、近年では日本でも 1 月や 2 月生まれは珍しくなくない。一方、北海道の 1 月から 2 月は、海外の主要なサラブレッド生産地と比べて気温が極めて低く、また、積雪のため放牧地で青草の採食や十分な運動を行うことが困難であることから、「早生まれ」のサラブレッドに対する適切な飼養管理については課題が多い。本研究では、北海道で生まれたサラブレッドにおける出生時期の違いによる成長や内分泌機能の発達について明らかにすることを目的とした。

I-2 材料及び方法

I-2-1 供試馬

2003 年から 2013 年までの間に日高育成牧場で生まれた当歳サラブレッド 90 頭（雄 49 頭、雌 41 頭）を用いた（表I-1）。出生月毎の区分は、雄馬は 1 月生まれと 2 月生まれを「1・2 月生まれ」、5 月と 6 月生まれを「5・6 月生まれ」としてまとめ、「1・2 月生まれ」（13 頭）、「3 月生まれ」（15 頭）、「4 月生まれ」（10 頭）及び「5・6 月生まれ」（11 頭）の 4 群間で比較した。雌馬は「2 月生まれ」（11 頭）、「3 月生まれ」（12 頭）、「4 月生まれ」（10 頭）、「5 月生まれ」（8 頭）の 4 群間で比較した。

日本中央競馬会日高育成牧場の実験動物委員会の承認（日-2011-5）を得て全ての実験を実施した。

I-2-2 当歳サラブレッドの飼養管理

誕生後から 1 週齢までは、15m×15m の放牧地（図I-1-A）、1 週齢から 1 ヶ月齢までは 0.5～1ha 程度の放牧地に親子で放牧した。1 ヶ月齢以降は、複数の親子で約 2 ha の放牧地（図I-1-B）において、8 時から 15 時まで 7 時間の昼放牧を実施した。気候が穏やかになる 5 月上旬以降からは、子馬が 1.5 ヶ月齢以上になったことを目安に、13 時から翌 8 時まで 19 時間の昼夜放牧（図I-2）に移行した。昼夜放牧については、約 4.6ha の放牧地に、その年に生産した全親子を放牧した。8 月末までに全馬の離乳を完了した。その後は子馬同士で昼夜放牧を継続し、当歳馬の飼料給餌を開始した。子馬の餌として、ミネラル、ビタミン及びタンパク質の要求量を満たすランサー型配合飼料であるスタム 30（Hallway 社製, Lexington, Kentucky, USA）を基本飼料として給餌し、気温が低

下し始める10月以降は、軽種馬飼養標準（2004）[63]を参考に、エンバク等を加えて可消化エネルギーを満たすよう調整した（表I-2）。

表I-1 供試馬の内訳

Year of birth	Sex	Total	Month of Birth					
			1	2	3	4	5	6
2003	Colts	2					2	
	Fillies	0						
2004	Colts	3		2		1		
	Fillies	3		1		1	1	
2005	Colts	3			3			
	Fillies	2			2			
2006	Colts	1	1					
	Fillies	1		1				
2007	Colts	3		1				2
	Fillies	2		2				
2008	Colts	2		2				
	Fillies	2		1			1	
2009	Colts	7		3	2		2	
	Fillies	2			2			
2010	Colts	5		2	2	1		
	Fillies	3		1	1	1		
2011	Colts	3			2	1		
	Fillies	5		1	2	2		
2012	Colts	3				3		
	Fillies	5		2	1	2		
2013	Colts	4			1	2	1	
	Fillies	3				2	1	
Total	Colts	36	1	10	10	8	5	2
	Fillies	28	0	9	8	8	3	0



図I-1 日高育成牧場における 3 月 (A) と 4 月 (B) の放牧地

A; 3 月上旬における出生後 2 日目の子馬 (日高育成牧場)。生後数日～1 週間程度の期間は 15m×15m 程度の狭い放牧地 (地面は砂) 内に放牧される。日中の気温は寒冷であることから、子馬に馬服を着用している。また、放牧地には積雪が残っている。B; 4 月上旬における放牧地 (日高育成牧場)。生後数週間を経過した複数組の親子が昼放牧で管理されている。この時期に牧草の新芽が出始める。



図I-2 日高育成牧場における 5 月の放牧地

5 月下旬の放牧地（日高育成牧場）。ゴールデンウィーク明けの 5 月上旬から、子馬の月齢が 1.5 ヶ月以上経過していることを目安に、親子での昼夜放牧を開始する。

表I-2 当歳馬の1日当たり給餌量

Month	Oats (kg)	Stamm30 Pellet (kg)	Digestible Energy (DE) (Mcal)
5	0	0.25	0.7
6	0	0.5	1.4
7	0	0.75	2.1
8	0	1.0	2.8
9	0	1.0	2.8
10	0.5	1.0	4.3

5月以降の飼料給餌量を月毎に示した。

I-2-3 妊娠馬に対する長日処理

妊娠繁殖雌馬に対しては、出産後に種付けを行う必要があることから、分娩後の初回発情以降の卵巢静止を予防する目的[92,195]で、明期 14.5 時間、暗期 9.5 時間の人工的な馬房内照明による長日処理[180]を、12 月 20 日から 5 月上旬まで実施した。照明の明度は、馬の頭の高さで約 100lux であった。5 月上旬以前に出産した子馬は、長日処理を実施された母馬と同じ馬房で繋養された。

I-2-4 BW 及び ADG

BW 及び ADG の測定には、64 頭（雄 36 頭、雌 28 頭）を供試した（表I-3）。BW の測定には、体重計 (TRU-TEST S3, Datamars, Auckland, New Zealand) を用い、出生後から毎週 1 回、朝 8 時に測定した。また、4 週間毎の ADG を算出した。なお、供試馬の疾病発症などの要因により、継続して BW の測定を行うことができなかった場合は分析から除外した。

表I-3 BW 測定に供した馬の内訳

Year of birth	Sex	Total	Month of Birth					
			1	2	3	4	5	6
2003	Colts	2					2	
	Fillies	0						
2004	Colts	3		2		1		
	Fillies	3		1		1	1	
2005	Colts	3			3			
	Fillies	2			2			
2006	Colts	1	1					
	Fillies	1		1				
2007	Colts	3		1				2
	Fillies	2		2				
2008	Colts	2		2				
	Fillies	2		1			1	
2009	Colts	7		3	2		2	
	Fillies	2			2			
2010	Colts	5		2	2	1		
	Fillies	3		1	1	1		
2011	Colts	3			2	1		
	Fillies	5		1	2	2		
2012	Colts	3				3		
	Fillies	5		2	1	2		
2013	Colts	4			1	2	1	
	Fillies	3				2	1	
Total	Colts	36	1	10	10	8	5	2
	Fillies	28	0	9	8	8	3	0

I-2-5 血液の採取および処理

ホルモン測定のための血液については、出生直後から生後24週齢までの期間において、1週間に1回、午前8時にヘパリン添加採血管（10ml）を用いて頸静脈から採取した。また、遠心分離をした血漿については、各血中ホルモン濃度を測定するまで-20℃以下で保存した。

I-2-6 各種ホルモンのラジオイムノアッセイ (RIA) 法

I-2-6-1 黄体形成ホルモン及び卵胞刺激ホルモンの RIA 法

黄体形成ホルモン（luteinizing hormone: LH）及び卵胞刺激ホルモン（follicle-stimulating hormone: FSH）の測定法の概略を図I-3に示した。LH及びFSHの測定には、標準品及び第一抗体として National Hormone and Pituitary Program, National Hormone and Pituitary Program, NIDDK, NIH (Torrance, CA USA)から購入した equine LH (AFP-5130A)、equine FSH (AFP-5022B)、equine LH抗体 (AFP-2405080) 及びequine FSH抗体 (AFP-2062096) を用いた。第二抗体としては、東京農工大学農学部獣医生理学研究室で作製した抗ウサギγグロブリンヤギ血清（#42-99318）を、標識抗原にはクロラミンT法によって¹²⁵Iで標識した equine LH (AFP-2405080) 及びequine FSH (AFP-5022B) を使用した。

I-2-6-2 プロラクチンの RIA 法

プロラクチンの測定法の概略を、図I-4に示した。プロラクチンの測定には、標準品として Pituitary hormones and antisera center, Harbor-UCLA medical center (Los Angeles, California, USA) から購入した精製 equine PRL (AFP-7730B) を、第一抗体には equine PRL 抗体 (AFP-261987) を、第二抗体としては、東京農工大学獣医生理学研究室で作製した抗ラットγグロブリンヤギ血清を、標識抗原には精製 equine PRL (AFP-8794B) をクロラミンT法によって¹²⁵Iで標識して使用した。

I-2-6-3 コルチゾールの RIA 法

コルチゾールの測定法の概略を、図I-5-1 及び図I-5-2 に示した。コルチゾー

ルの測定には、標準品として SIGMA (シグマ アルドリッチ ジャパン合同会社, 東京) から購入した Cortisol (H0135) を、第一抗体には群馬大学生体調節研究所から供与された抗コルチゾール血清 (HAC-AA71-04RBP85) を使用した。第二抗体には、東京農工大学農学部獣医生理学研究室で作製した抗ウサギ γ グロブリンヤギ血清 (#42-99318) を使用した。標識抗原には、Fitzgerald (Veritas, 株式会社ベリタス, 東京) から購入した Cortisol (80-IC20) をクロラミン T 法によって ^{125}I で標識して使用した。

I-2-6-4 甲状腺ホルモン (サイロキシン) の RIA 法

サイロキシンの測定法の概略を、図I-6 に示した。サイロキシンの第一抗体には、群馬大学生体調節研究室から供与されたサイロキシン抗体 (T4 AB-3) を、第二抗体としては、東京農工大学農学部獣医生理学研究室で作製した抗ラット γ -グロブリン ヤギ血清(#42-99318)を、標識抗原には PerkinElmer (Wattham, Massachusetts, USA) から購入した ^{125}I 標識サイロキシン (NEX111X) を使用した。

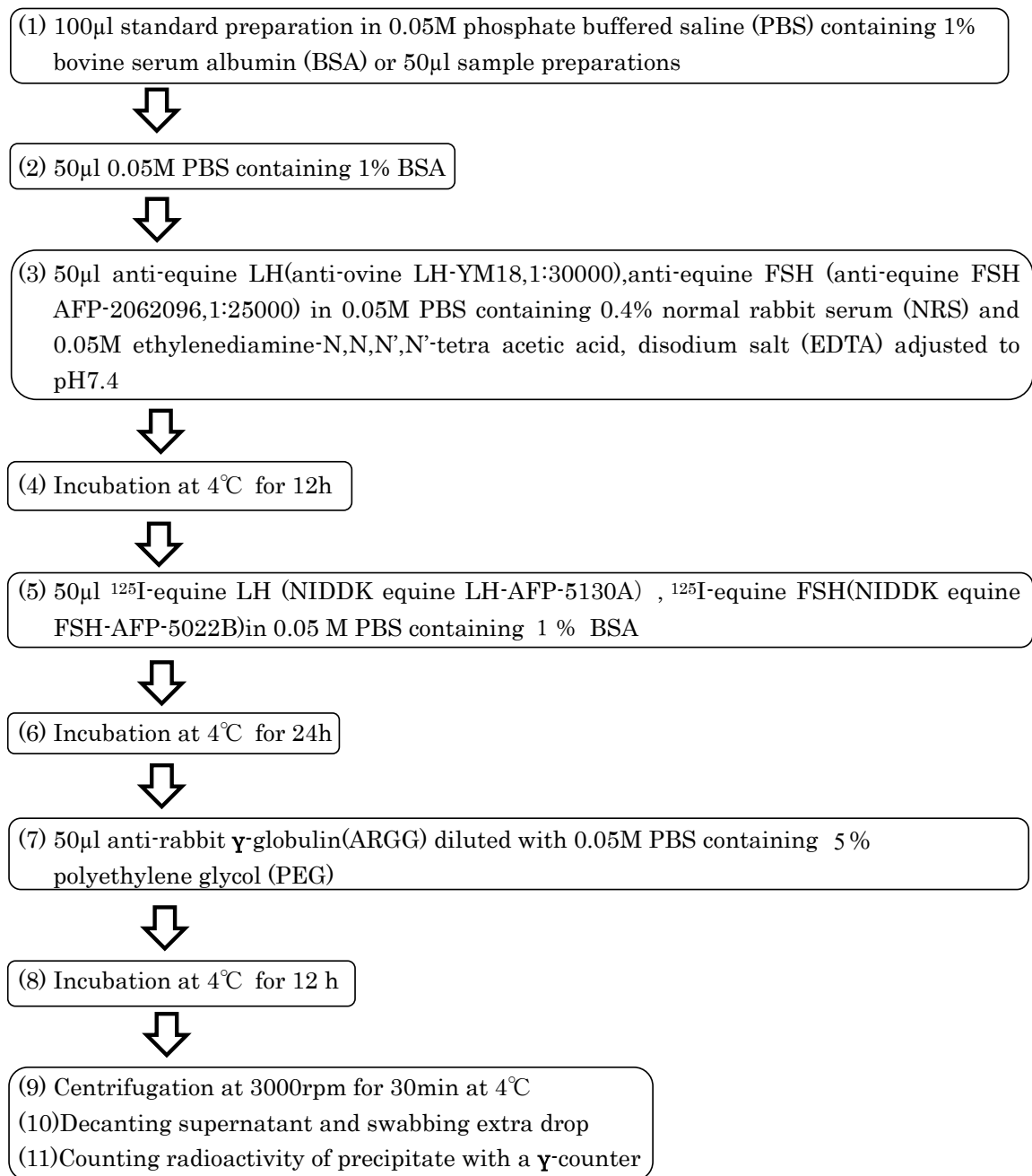
I-2-6-5 各ホルモン総分泌量 (area under the curve: AUC)

LH、FSH 及びプロラクチンの生後直後から 24 週齢までの総分泌量は AUC として算出した。

I-2-7 統計処理

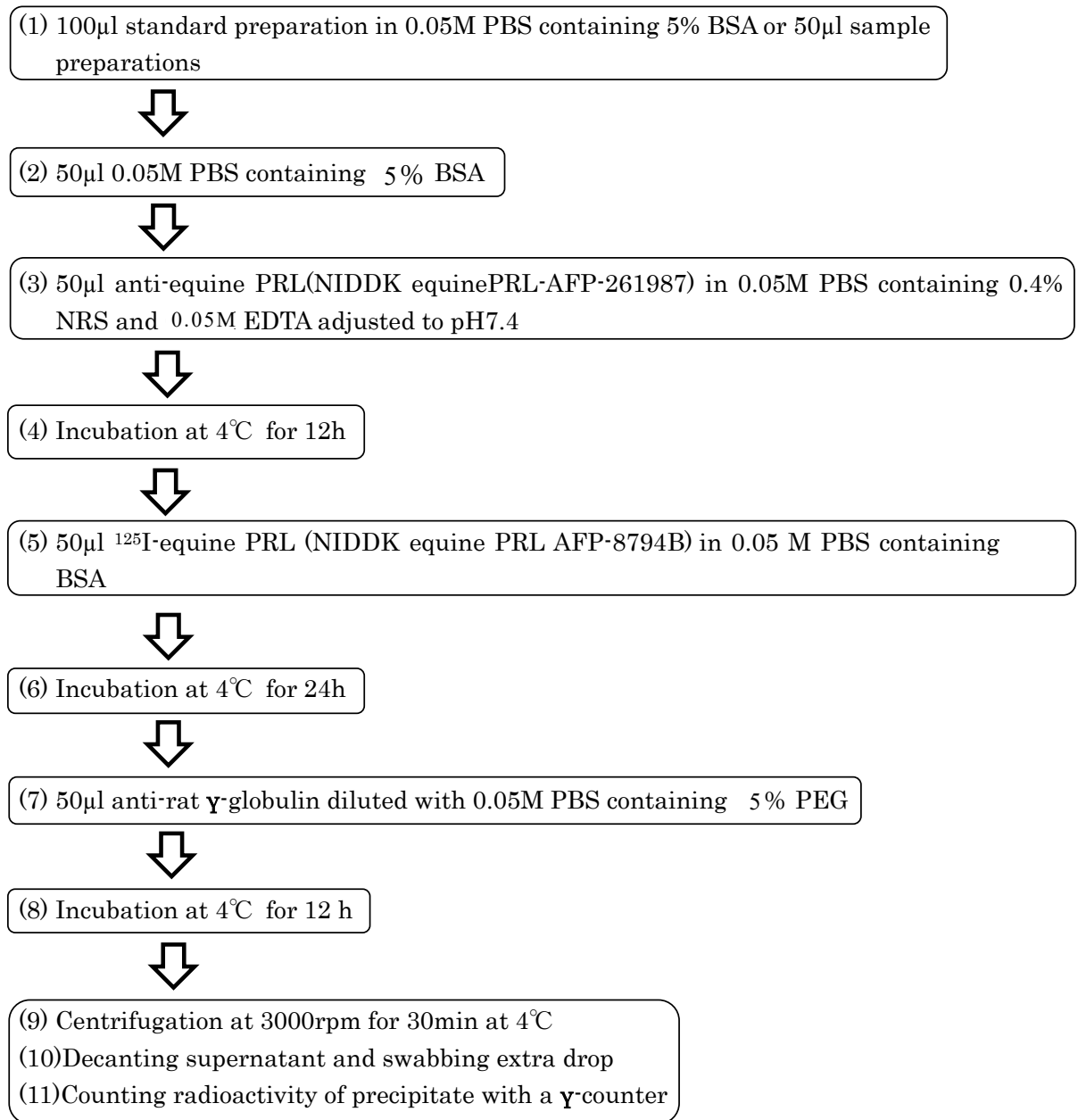
全てのデータは、平均値 \pm 標準誤差で示した。有意差の検定には、統計用ソフトウェア JMP (Ver 16.0)を用いた。3 群以上の検定を行う際には、one-way ANOVA を、関連多群間の差の検定を行う際には、two-way ANOVA を用いた。one-way ANOVA で有意差が認められた場合には Tukey-Kramer テストを用いた。また、同一性及び同一育成牧場における体組成や成長指標の 2 点間の増加率の比較には、F-test の後 Student's *t*-test を用いた。分散が均一でない場合には Welch の *t*-test を用いた。血中ホルモン濃度の比較には、two-way ANOVA の後 post-hoc テスト (Bonferroni post test) を用いた。 $P < 0.05$ で統計的に有意と判定した。

Flow chart of the RIA for equine Gonadotropins



図I-3 血漿中 LH 及び FSH の測定法

Flow chart of the RIA for equine PRL



図I-4 血漿中プロラクチンの測定法

Flow chart of the RIA for cortisol-1

1) Extraction

(1) 400 μ l standard or sample preparation in 0.05M PBS containing 5% BSA



(2) 2.0ml anhydrous ethyl ether



(3) Mixed for 3min



(4) Freezing water phase with dried ice ethanol



(5) Decanting the ether phase to another tube



(6) Drying down the ether phase at 60°C



(7) Rising the wall of tube with ether



(8) Drying down the ether phase at 60°C

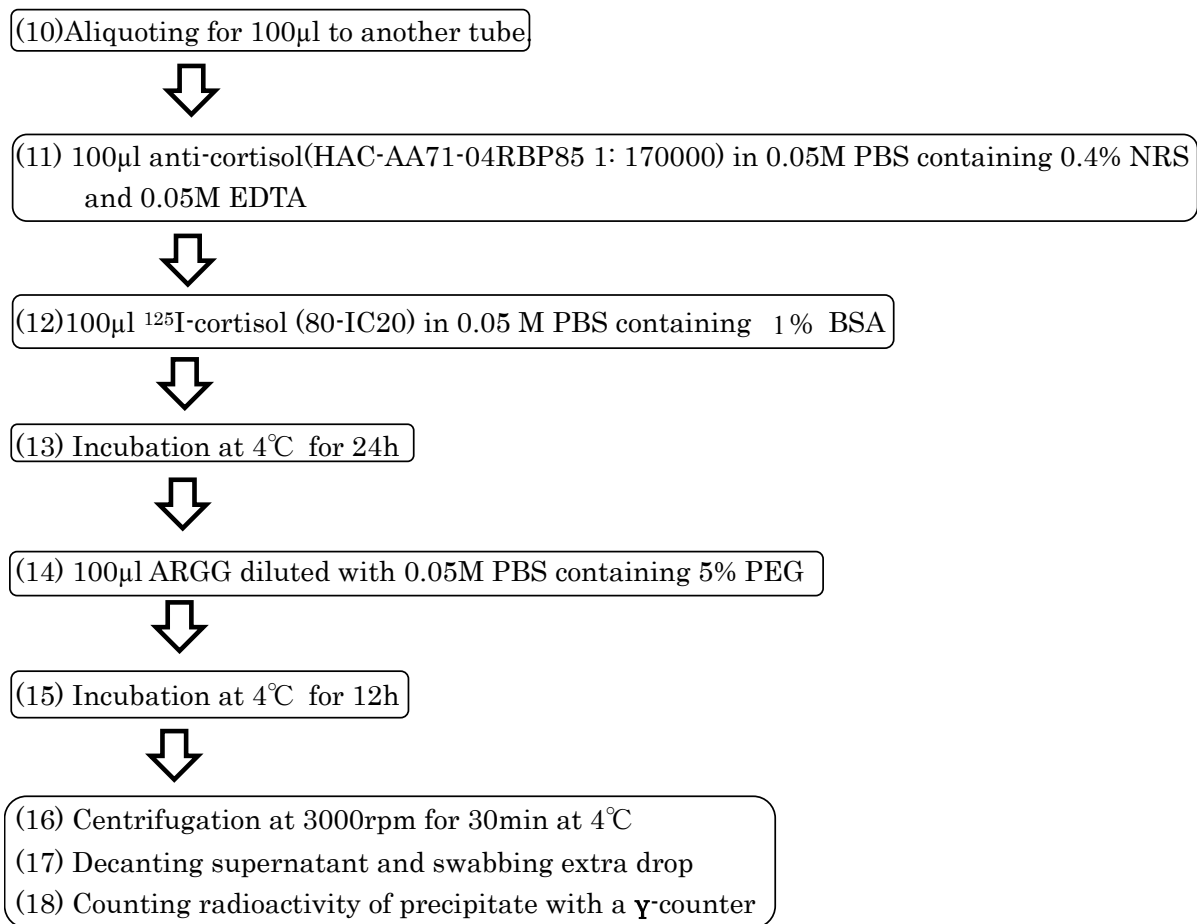


(9) 400 μ l 0.05M PBS containing 1% BSA and mixing for 3min

図I-5-1 血漿中コルチゾールの測定法 ①

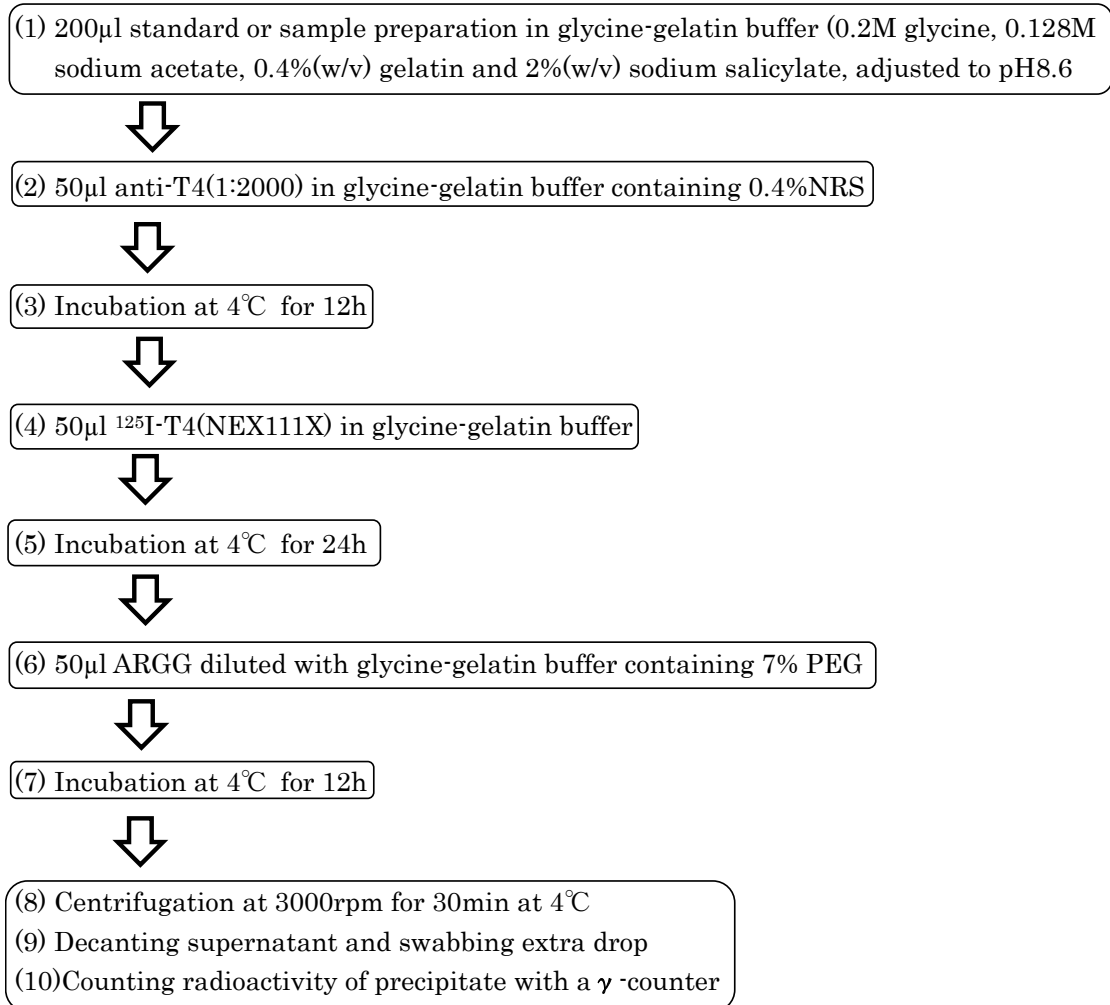
Flow chart of the RIA for cortisol-2

2) Assay procedure after extraction



図I-5-2 血漿中コルチゾールの測定法 ②

Flow chart of the RIA for T4



図I-6 血漿中サイロキシンの測定法

I-3 結果

I-3-1 BW 及び ADG

I-3-1-1 出生月の違いによる BW の比較

供試馬 64 頭（雄 36 頭、雌 28 頭）における出生後から 24 週齢まで、4 週齢毎の雄馬の平均 BW を表I-4-1、雌馬の平均 BW を表I-4-2 に示した。

雄馬では、「4 月生まれ」は「1・2 月生まれ」、「3 月生まれ」及び「5・6 月生まれ」と比べて、出生時から 24 週齢までの BW が高値である傾向が観察された。4 週齢及び 8 週齢では、「4 月生まれ」は「1・2 月生まれ」及び「3 月生まれ」と比べて有意に高値であった（ $P<0.05$ ）。12 週齢及び 16 週齢では、「4 月生まれ」は「1・2 月生まれ」、「3 月生まれ」及び「5・6 月生まれ」と比べて有意に高値であった（ $P<0.05$ ）。20 週齢においては、「4 月生まれ」は「3 月」及び「5・6 月生まれ」と比べて有意に高値であった（ $P<0.05$ ）。さらに、24 週齢において、「4 月生まれ」は「5・6 月生まれ」と比べて有意に高値であった（ $P<0.05$ ）。一方、出生後から 8 週齢までは、「1・2 月生まれ」及び「3 月生まれ」の「早生まれ」は、「4 月生まれ」及び「5・6 月生まれ」の「遅生まれ」と比べて、BW が低値である傾向が観察された（表I-4-1）。

雌馬では、いずれの時期の BW においても、出生月の違いによる差は認められなかったが、雄馬と同様に 4 週齢から 8 週齢までの BW は、「2 月生まれ」及び「3 月生まれ」の「早生まれ」は、「4 月生まれ」及び「5 月生まれ」の「遅生まれ」と比べて低値である傾向が観察された（表I-4-2）。

I-3-1-2 出生月の違いによる ADG の比較

供試馬 64 頭（雄 36 頭、雌 28 頭）の ADG を、出生後から 24 週齢まで、4 週齢毎に算出して図I-7 に示した。雄馬の結果を図I-7-A に、雌馬の結果を図I-7-B に示した。雄馬及び雌馬ともに出生後から 4 週齢までの ADG は、1.5 kg/day 以上を示し、最も高値であった。

雄馬の ADG では、出生後から 16 週齢までの期間において、出生月間で最も高値であったのは、出生後～4 週齢及び 4 週齢～8 週齢では「4 月生まれ」、8 週齢～12 週齢では「3 月生まれ」、12 週齢～16 週齢では「1・2 月生まれ」であった。出生後～4 週齢では、「4 月生まれ」は「1・2 月生まれ」及び「3 月生ま

れ」と比べて有意に高値であった ($P<0.05$)。4～8 週齢では、「4 月生まれ」は「1・2 月生まれ」、「3 月生まれ」及び「5・6 月生まれ」と比べて有意に高値であった ($P<0.05$)。8 週齢～12 週齢では、「3 月生まれ」は「1・2 月生まれ」及び「5・6 月生まれ」と比べて有意に高値であった ($P<0.05$)。また、「4 月生まれ」は「5・6 月生まれ」と比べて有意に高値であった ($P<0.05$)。12 週齢～16 週齢では、「1・2 月生まれ」は「5・6 月生まれ」と比べて有意に高値であった ($P<0.05$)。16 週齢～20 週齢では、出生月間で有意差が認められず、20 週齢～24 週齢までは、「3 月生まれ」及び「4 月生まれ」は「5・6 月生まれ」と比べて有意に高値であった ($P<0.05$; 図I-7-A)。

雌馬の ADG では、出生後から 20 週齢までの期間において、群間で最も高値であった出生月は、出生後～4 週齢では「5 月生まれ」、4～8 週齢では「4 月生まれ」、8～12 週齢では「3 月生まれ」、12～16 週齢では「3 月生まれ」、16～20 週齢では「2 月生まれ」であった。8～12 週齢では、「3 月生まれ」は「4 月生まれ」と比べて有意に高値であった ($P<0.05$)。12～16 週齢では、「2 月生まれ」及び「3 月生まれ」は「4 月生まれ」と比べて有意に高値であった ($P<0.05$)。16～20 週齢では、「2 月生まれ」は「3 月生まれ」及び「4 月生まれ」と比べて有意に高値であった ($P<0.05$)。20 週齢～24 週齢までは、「4 月生まれ」は、「2 月生まれ」と比べて有意に高値であった ($P<0.05$; 図I-7-B)。

I-3-2 日高地方の日長時間及び平均気温

供試馬の成長と気候との関連を考察することを目的として、海上保安庁の日月出没計算サービスを用い、日高育成牧場 (142°12'E-42°51'N) における 2003 年から 2013 年における日の出から日の入りまでの日長時間を図I-8-A に示した。また、気象庁浦河管区気象台のデータを用い、2003 年から 2013 年の月平均気温 (Average) 及び月平均最低気温 (Low) を図I-8-B に示した。自然環境下での馬の繁殖シーズンである 4 月から 8 月までの期間は、13 時間以上の日長時間があった。その他の月においては 13 時間未満であった。自然環境下での馬の出生時期である 4 月の最低気温は 1.6℃で、0℃を上回ったが、3 月の最低気温は -2.3℃で、0℃を下回った。また、2 月の平均気温は -2.2℃で、0℃を下回った。

表I-4-1 雄馬における出生月の違いによる BW の比較

Month of birth Weeks of age	Jan. Feb. n=11	Mar. n=10	Apr. n=8	May Jun. n=7
0	55.7±2.3	57.4±1.6	60.1±1.6	58.3±2.4
4	98.6±4.5 ^a	102.0±3.0 ^a	113.8±1.8 ^b	106.9±4.9 ^{ab}
8	133.2±4.3 ^a	137.7±4.0 ^a	154.0±2.3 ^b	141.6±5.3 ^{ab}
12	165.8±5.1 ^a	174.5±3.9 ^a	189.4±2.3 ^b	169.7±5.7 ^a
16	198.6±6.1 ^a	202.7±4.5 ^a	217.5±2.4 ^b	197.6±5.6 ^a
20	225.8±6.4 ^{ab}	227.2±4.4 ^a	240.8±3.0 ^b	221.7±3.7 ^a
24	249.1±7.6 ^{ab}	254.2±5.1 ^{ab}	266.8±3.2 ^b	242.5±3.7 ^a

Body weight (kg)

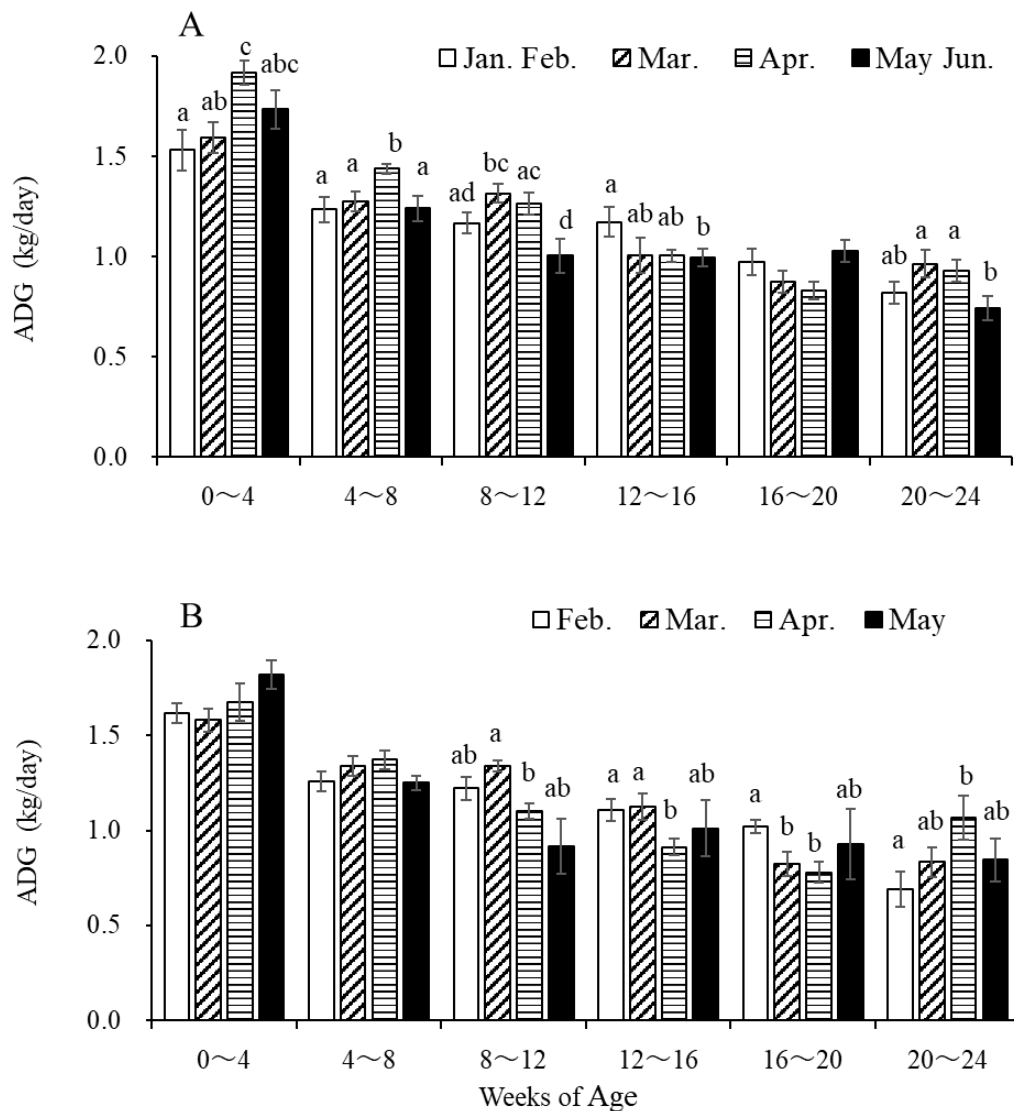
結果は平均値±標準誤差で示した。

異なるアルファベットは、同じ週齢における群間の有意差を示した
($P<0.05$)。

表I-4-2 雌馬における出生月の違いによる BW の比較

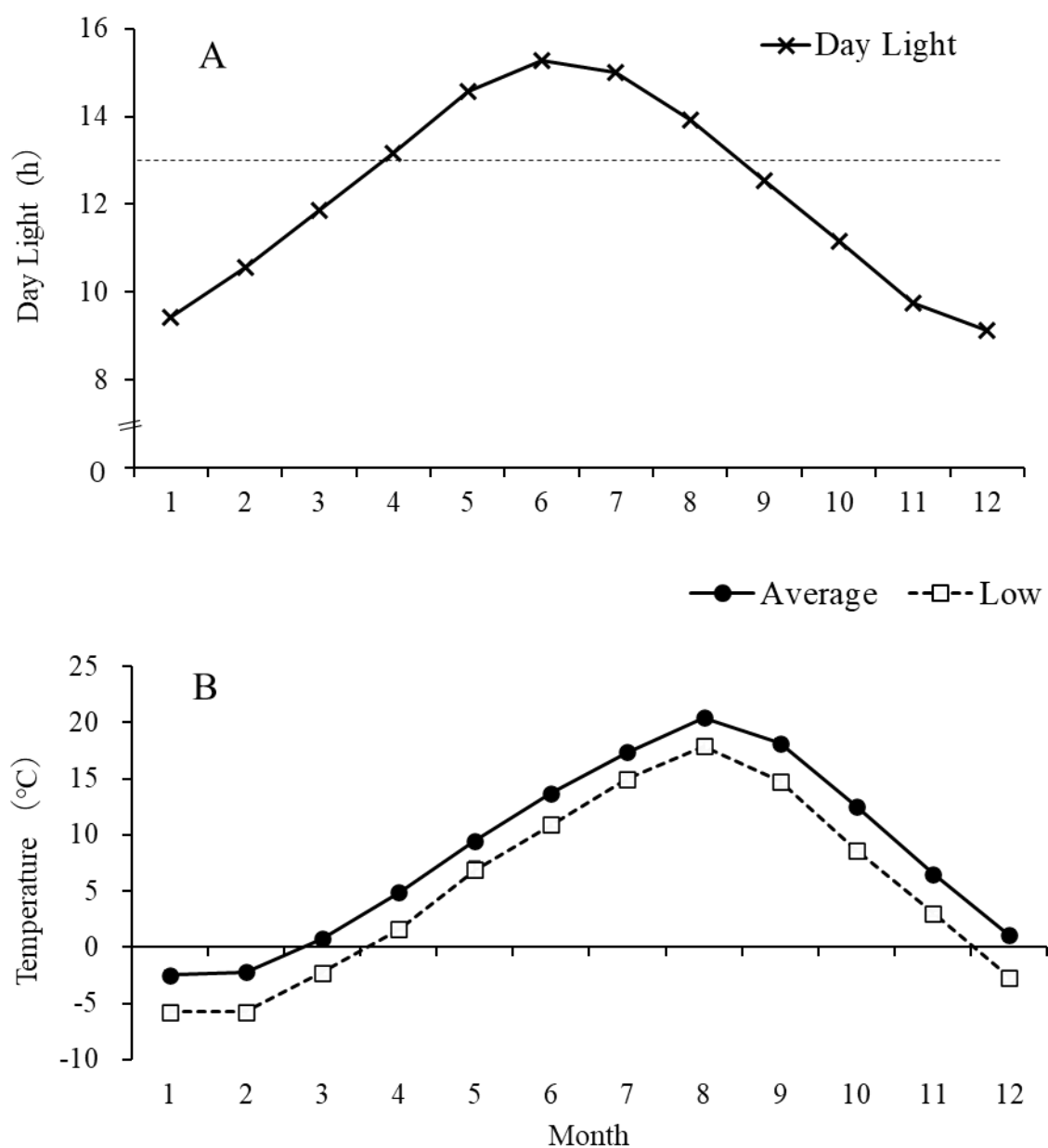
Month of birth Weeks of age	Feb. n=9	Mar. n=8	Apr. n=8	May n=3
0	54.9±2.4	56.3±1.4	55.3±1.4	55.3±1.8
4	100.1±3.1	100.5±2.5	102.2±3.6	106.3±3.3
8	135.3±3.7	138.0±3.5	140.7±4.2	141.3±2.7
12	169.6±5.0	175.5±3.5	171.4±4.4	167.0±6.7
16	200.6±4.4	207.0±3.5	197.0±5.2	195.3±5.2
20	229.1±4.4	230.0±4.8	218.8±5.5	221.3±9.9
24	249.3±4.5	253.4±4.6	248.7±5.3	245.0±6.8
Body weight (kg)				

結果は平均値±標準誤差で示した。



図I-7 出生後から 24 週齢までにおける 4 週毎の ADG の推移

A; 雄馬の出生月群は、1・2 月生まれ (Jan. Feb.; □ n=11)、3 月生まれ (Mar.; ▨ n=10)、4 月生まれ (Apr.; ▤ n=8) 及び 5・6 月生まれ (May Jun.; ■ n=7) の 4 群に分類した。B; 雌馬の出生月群は、2 月生まれ (Feb.; □ n=9)、3 月生まれ (Mar.; ▨ n=8)、4 月生まれ (Apr.; ▤ n=8) 及び 5 月生まれ (May; ■ n=3) の 4 群に分類した。結果は、平均値±標準誤差で示した。異なるアルファベットは、同じ週齢における群間の有意差 ($P<0.05$) を示した。



図I-8 日の出から日の入りまでの日長時間（A）及び月平均気温（B）

A; 日高育成牧場における 2003 年から 2013 年の日の出から日の入りまでの日長時間（Day Light ×）。B; 日高育成牧場における 2003 年から 2013 年の月平均気温（Average ●）及び月平均最低気温（Low □）。

I-3-3 各種ホルモンの血中濃度変化

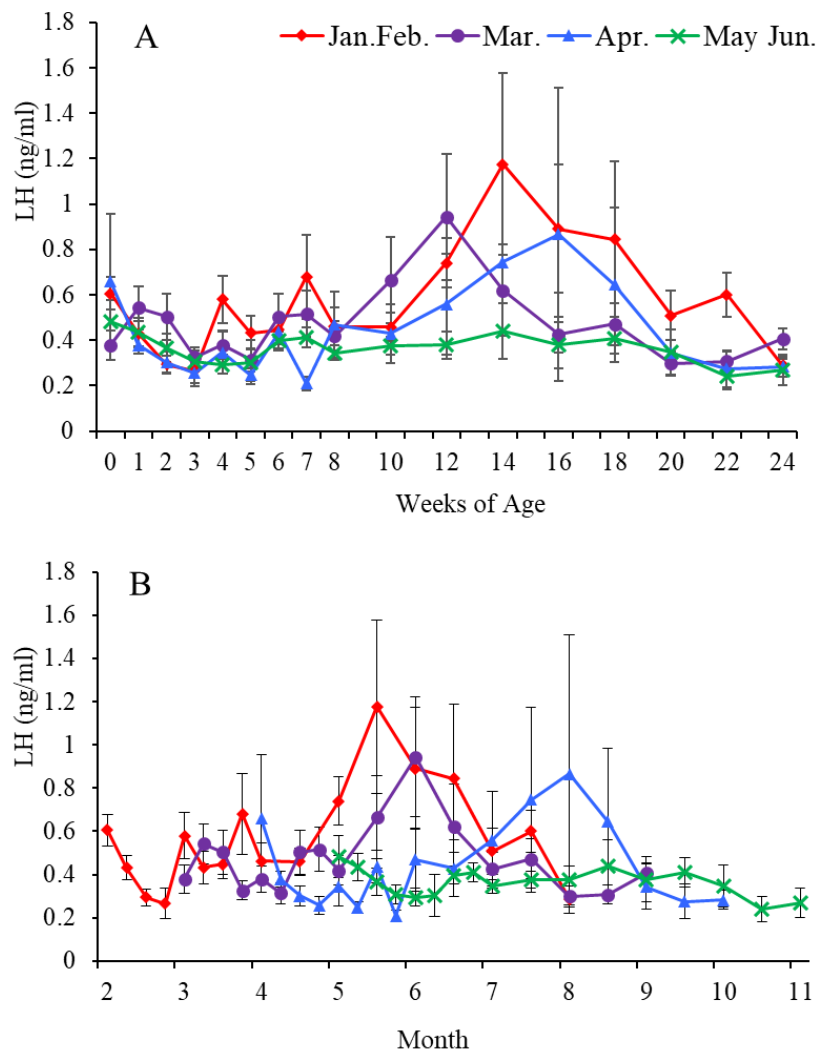
I-3-3-1 LH の血中濃度及び AUC

雄馬（49 頭）における出生直後から 24 週齢までの血中 LH 濃度の変化を図 I-9-A に、また、当歳 2 月から 11 月までの期間における雄馬の血中 LH 濃度の変化を図 I-9-B に示した。

雄馬では、「1・2 月生まれ」、「3 月生まれ」及び「4 月生まれ」は、出生直後または 1 週齢時にやや高い血中 LH 濃度を示した後、4 週齢ごろまでに一旦低下した。その後、12 週齢から 16 週齢にかけて大きく上昇し再び低下した。一方、「5・6 月生まれ」は大きな上昇を認めなかった（図 I-9-A）。「1・2 月生まれ」、「3 月生まれ」及び「4 月生まれ」の血中 LH 濃度の上昇は、日長時間の長い 5 月から 8 月に認められた。一方、「5・6 月生まれ」は、緩やかな上昇を示した後、安定して推移し 11 月に低下した（図 I-9-B）。

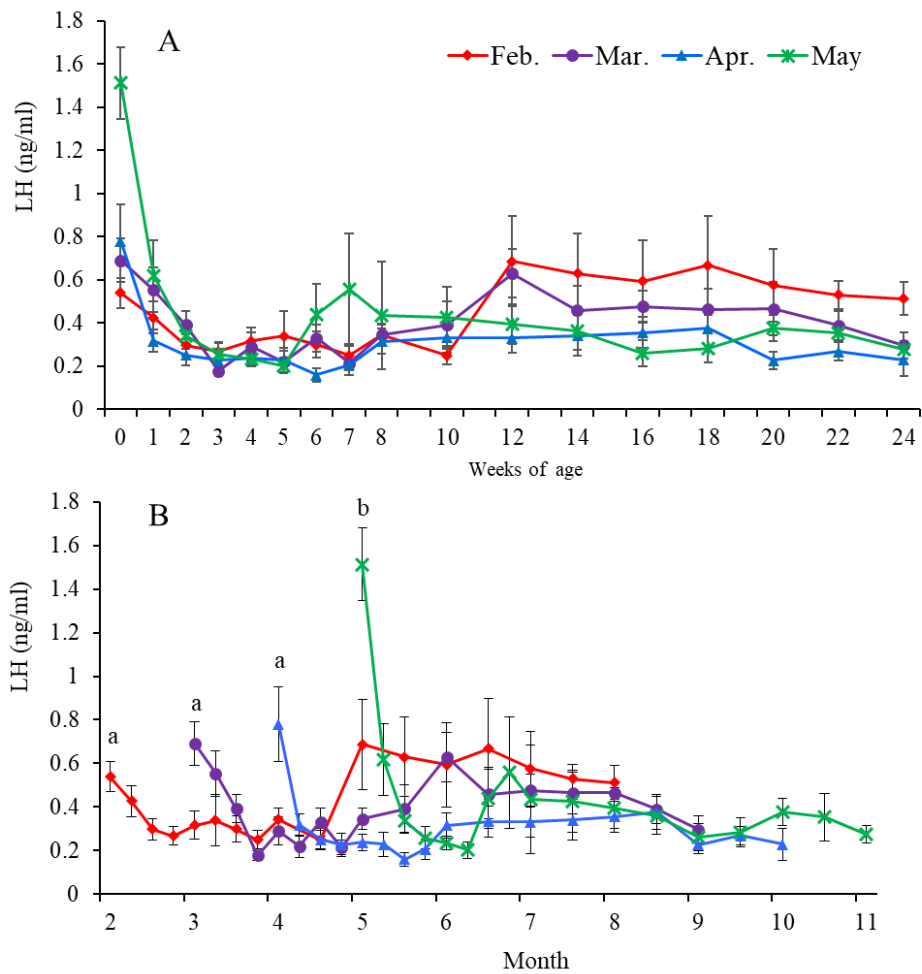
雌馬（41 頭）における出生直後から 24 週齢までの血中 LH 濃度の変化を図 I-10-A に、また、当歳 2 月から 11 月までの期間における血中 LH 濃度の変化を図 I-10-B に示した。雌馬では、出生時期に関係なく出生直後に血中 LH 濃度が高値を示し、4 週齢ごろまでに低下した。「5 月生まれ」は出生直後の血中 LH 濃度は「2 月生まれ」「3 月生まれ」及び「4 月生まれ」と比べて有意に高値であった（ $P < 0.05$ ）。その後、出生月に関係なく 7 週齢から 12 週齢にかけて LH 濃度が上昇した後、18 週齢から低下した（図 I-10-A）。また、出生月に関係なく、日長時間の長い 5 月から 7 月に血中 LH 濃度が一時的に上昇した後、緩やかに低下した（図 I-10-B）。

雄馬における出生直後から 24 週齢までの算出した LH の AUC を図 I-11-A に示した。また、雌馬における出生直後から 24 週齢までの算出した LH の AUC を図 I-11-B に示した。雄馬及び雌馬ともに「1・2 月生まれ」及び「3 月生まれ」の子馬は、「4 月生まれ」、「5・6 月生まれ」と比べて高い傾向を示し、特に雄馬では、「1・2 月生まれ」及び「3 月生まれ」は、「4 月生まれ」と比べて有意な高値を示した（ $P < 0.05$ ）。雌馬では、「2 月生まれ」及び「3 月生まれ」は、「4 月生まれ」と「5 月生まれ」と比べて高い傾向を示したが有意差は認められなかった。



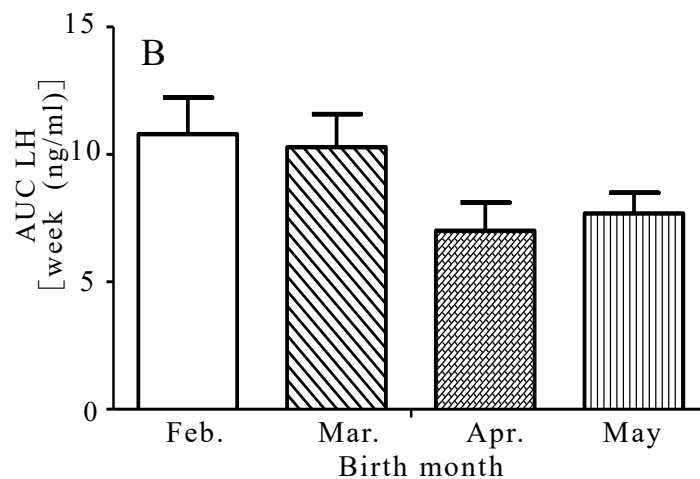
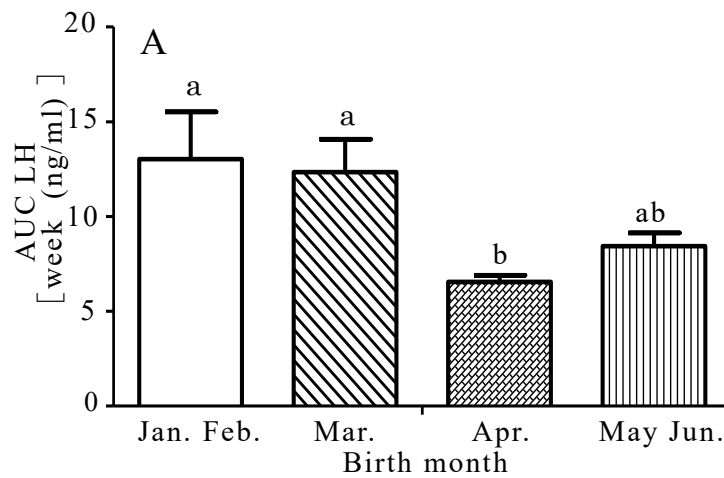
図I-9 雄馬における出生直後からの血中 LH 濃度の変化

A; 出生直後から 24 週齢までの変化。B; 2 月から 11 月までの月別変化。
 1・2 月生まれ (Jan. Feb.; ◆ n=13)、3 月生まれ (Mar.; ● n=15)、4 月生まれ
 (Apr.; ▲ n=10)、5・6 月生まれ (May Jun.; × n=11)。結果は平均値±標準誤差
 で示した。



図I-10 雌馬における出生直後からの血中 LH 濃度の変化

A; 出生直後から 24 週齢までの変化。B; 2 月から 11 月までの月別変化。
 2 月生まれ (Feb.; ◆ n=11)、3 月生まれ (Mar.; ● n=12)、4 月生まれ (Apr.; ▲ n=10)、5 月生まれ (May; ✕ n=8)。結果は平均値±標準誤差で示した。異なるアルファベット間は、出生時濃度における群間の有意差を示した ($P < 0.05$)。



図I-11 出生直後から24週齢までのLH分泌のAUC

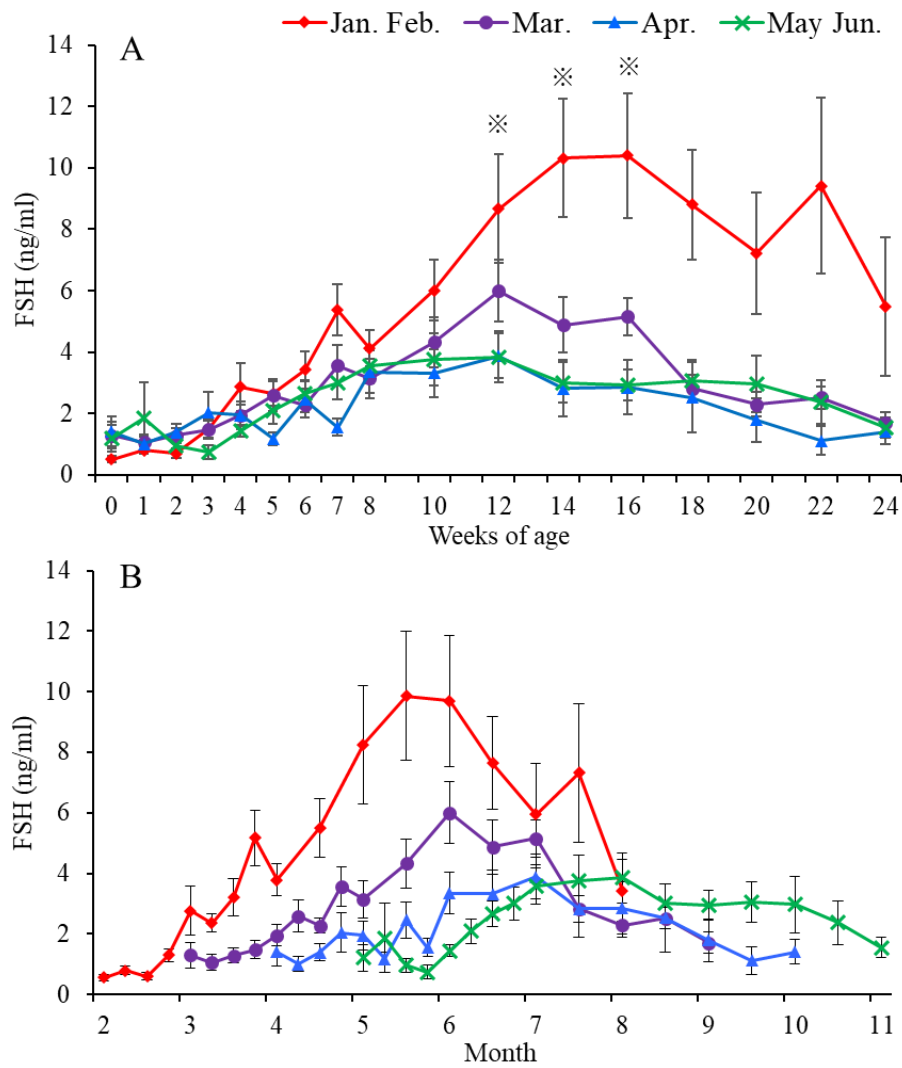
A; 雄馬：1・2月生まれ（Jan. Feb.□; n=13）、3月生まれ（Mar.▨; n=15）、4月生まれ（Apr. ▩; n=10）、5・6月生まれ（May Jun ▮; n=11）。B; 雌馬：2月生まれ（Feb.□; n=11）、3月生まれ（Mar.▨; n=12）、4月生まれ（Apr. ▩; n=10）5月生まれ（May ▮; n=8）。結果は平均値＋標準誤差で示した。異なるアルファベットは群間の有意差を示した（ $P < 0.05$ ）。

I-3-3-2 FSH の血中濃度および AUC

雄馬（49 頭）における出生直後から 24 週齢までの血中 FSH 濃度の変化を図 I-12-A に、また 2 月から 11 月までの期間における血中 FSH 濃度の変化を図 I-12-B に示した。出生時期に関係なく出生後の血中 FSH 濃度は低値であったが、徐々に上昇する傾向を示した。しかし、その濃度は成馬と比べて低値であった。12 週齢、14 週齢及び 16 週齢の血中 FSH 濃度では、「1・2 月生まれ」は「3 月生まれ」、「4 月生まれ」及び「5・6 月生まれ」と比べて、有意に高値（ $P < 0.05$ ）を示した（図 I-12-A）。また、いずれの出生月においても日長時間の長い 5 月から 8 月において高値を示した（図 I-12-B）。

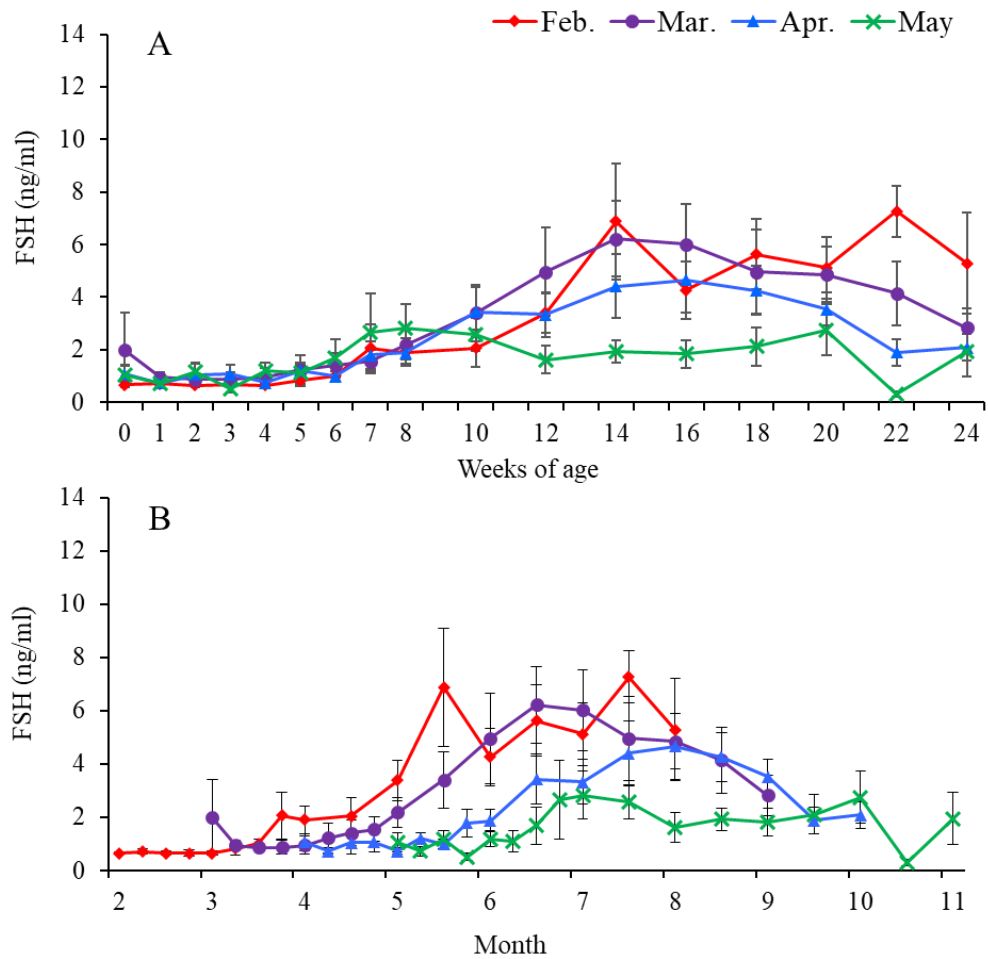
雌馬（40 頭）における出生直後から 24 週齢までの血中 FSH 濃度の変化を図 I-13-A に、また、2 月から 11 月までの期間における血中 FSH 濃度の変化を図 I-13-B に示した。出生月に関係なく出生直後の血中 FSH 濃度は低値であったが、徐々に上昇する傾向を示した。しかし、その濃度は成馬と比べて低値であった。また、「2 月生まれ」及び「3 月生まれ」は、「4 月生まれ」及び「5 月生まれ」と比べて 14 週齢以降に高値である傾向を示したが、有意差は認められなかった（図 I-12-A）。また、出生月に関係なく日長時間の長い 5 月から 8 月において高値である傾向を示した（図 I-13-B）。

雄馬における算出した FSH の AUC を図 I-14-A に示した。また、雌馬における算出した FSH の AUC を図 I-14-B に示した。雄馬では、「1・2 月生まれ」は「3 月生まれ」、「4 月生まれ」及び「5・6 月生まれ」と比べて高い傾向を示し、「1・2 月生まれ」は、「4 月生まれ」と比べて有意な高値を示した（ $P < 0.05$; 図 I-14-A）。一方、雌馬は雄馬と同様の傾向を示したが有意差は認められなかった（図 I-14-B）。



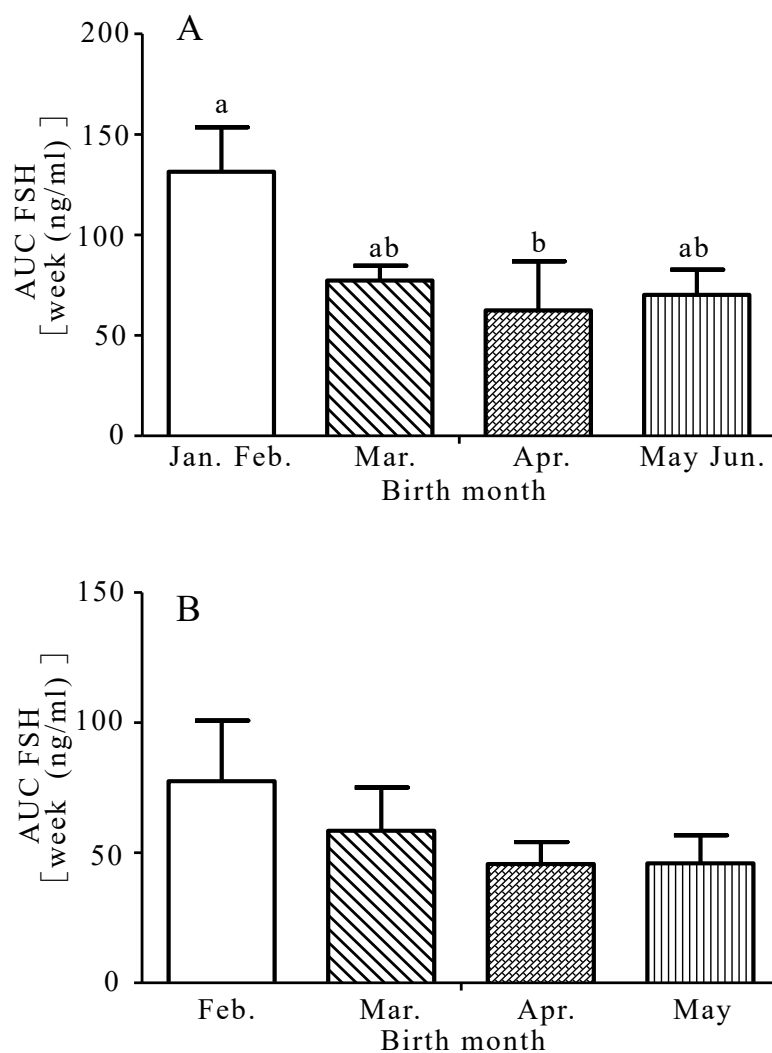
図I-12 雄馬における出生直後からの血中 FSH 濃度の変化

A; 出生直後から 24 週齢までの変化。B; 2 月から 11 月までの月別変化。1・2 月生まれ (Jan. Feb.; ◆ n=13)、3 月生まれ (Mar.; ● n=15)、4 月生まれ (Apr.; ▲ n=10)、5・6 月生まれ (May Jun.; ✕ n=11)。結果は平均値±標準誤差で示した。※同週齢における出生月間の有意差 ($P<0.05$) を示した。



図I-13 雌馬における出生直後からの血中 FSH 濃度の変化

A; 出生直後から 24 週齢までの変化。B; 2 月から 11 月までの月別変化。2 月生まれ (Feb.; ◆ n=11)、3 月生まれ (Mar.; ● n=12)、4 月生まれ (Apr.; ▲ n=10)、5 月生まれ (May; ✕ n=8)。結果は平均値±標準誤差で示した。



図I-14 出生直後から 24 週齢までの FSH 分泌の AUC

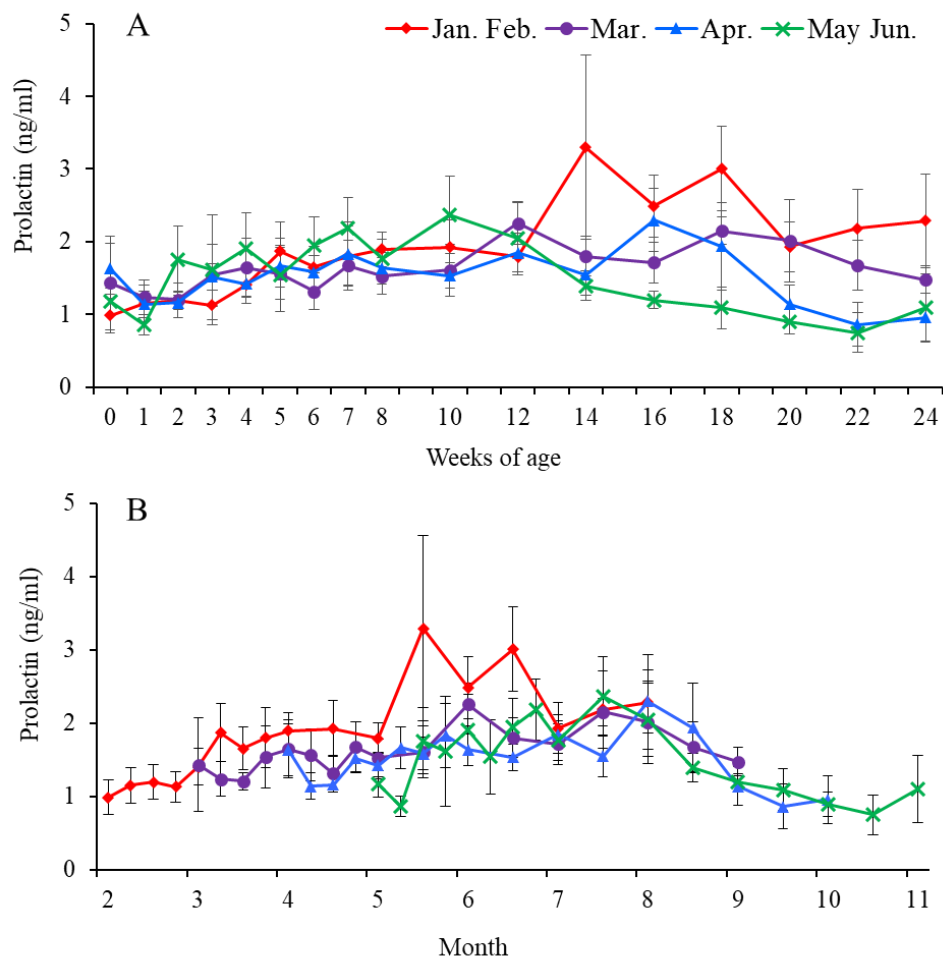
A; 雄馬：1・2 月生まれ (Jan. Feb.□; n=13)、3 月生まれ (Mar.■; n=15)、4 月生まれ (Apr. ▨; n=10)、5・6 月生まれ (May Jun. ▩; n=11)。B; 雌馬：2 月生まれ (Feb.□; n=11)、3 月生まれ (Mar.■; n=12)、4 月生まれ (Apr. ▨; n=10) 5 月生まれ (May ▩; n=8)。結果は平均値+標準誤差を示した。異なるアルファベットは群間の有意差を示した。

I-3-3-3 プロラクチンの血中濃度および AUC

雄馬（49 頭）における出生直後から 24 週齢までの血中プロラクチン濃度の変化を図I-15-A に、また、2 月から 11 月までの期間における血中プロラクチン濃度の変化を図I-15-B に示した。雄馬では、「1・2 月生まれ」は 3 週齢から血中プロラクチン濃度が上昇し、14 週齢から 18 週齢に高値を維持した後、低下したが、各群間に有意差は認められなかった（図I-15-A）。血中プロラクチン濃度は出生月に関係なく、日長時間の長い 5 月から 8 月に高値を示し 9 月以降に低下した（図I-15-B）。

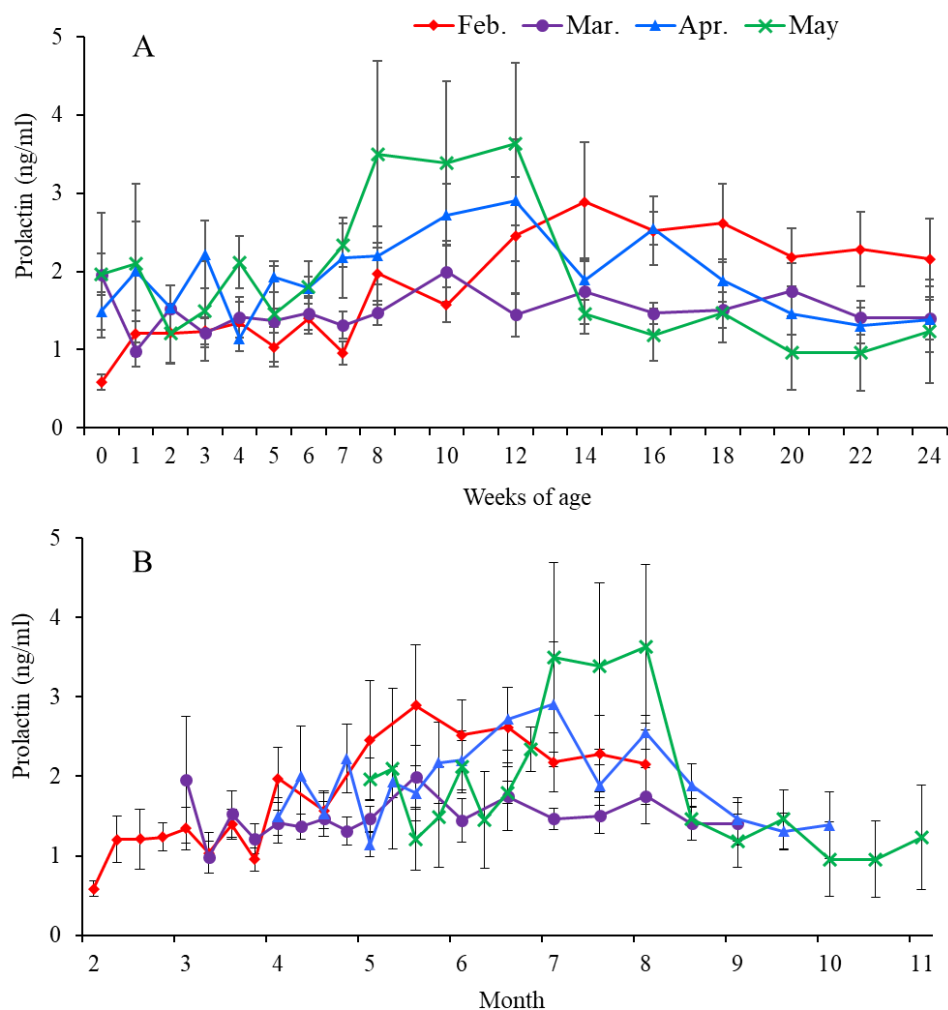
雌馬（41 頭）における出生直後から 24 週齢までの血中プロラクチン濃度の変化を図I-16-A に、また、2 月から 11 月までの期間における血中プロラクチン濃度の変化を図I-16-B に示した。雌馬においても、雄馬と同様に 5 月から 8 月に高値を示し 9 月以降に低下した（図I-16-B）。

雄馬における出生直後から 24 週齢までの算出したプロラクチンの AUC を図 I-17-A に示した。また、雌馬における出生直後から 24 週齢までの算出したプロラクチンの AUC を図I-17-B に示した。雄馬及び雌馬ともに出生月間に有意差は認められなかった。



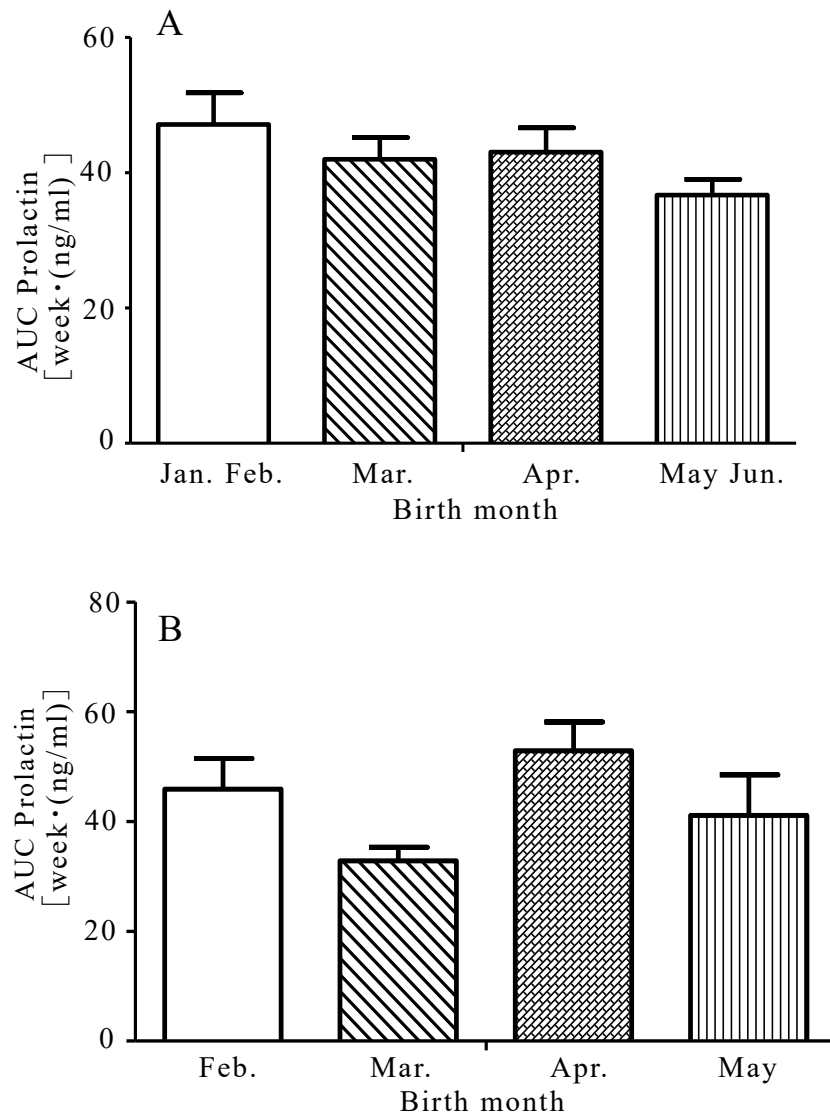
図I-15 雄馬における出生直後からの血中プロラクチン濃度の変化

A; 出生直後から 24 週齢までの変化。B; 2 月から 11 月までの月別変化。1・2 月生まれ (Jan. Feb.; ◆ n=13)、3 月生まれ (Mar.; ● n=15)、4 月生まれ (Apr.; ▲ n=10)、5・6 月生まれ (May Jun.; × n=11)。結果は平均値±標準誤差で示した。



図I-16 雌馬における出生直後からの血中プロラクチン濃度の変化

A; 出生直後から 24 週齢までの変化。B; 2 月から 11 月までの月別変化。2 月生まれ (Feb.; ◆ n=11)、3 月生まれ (Mar.; ● n=12)、4 月生まれ (Apr.; ▲ n=10)、5 月生まれ (May; ✕ n=8)。結果は平均値±標準誤差で示した。



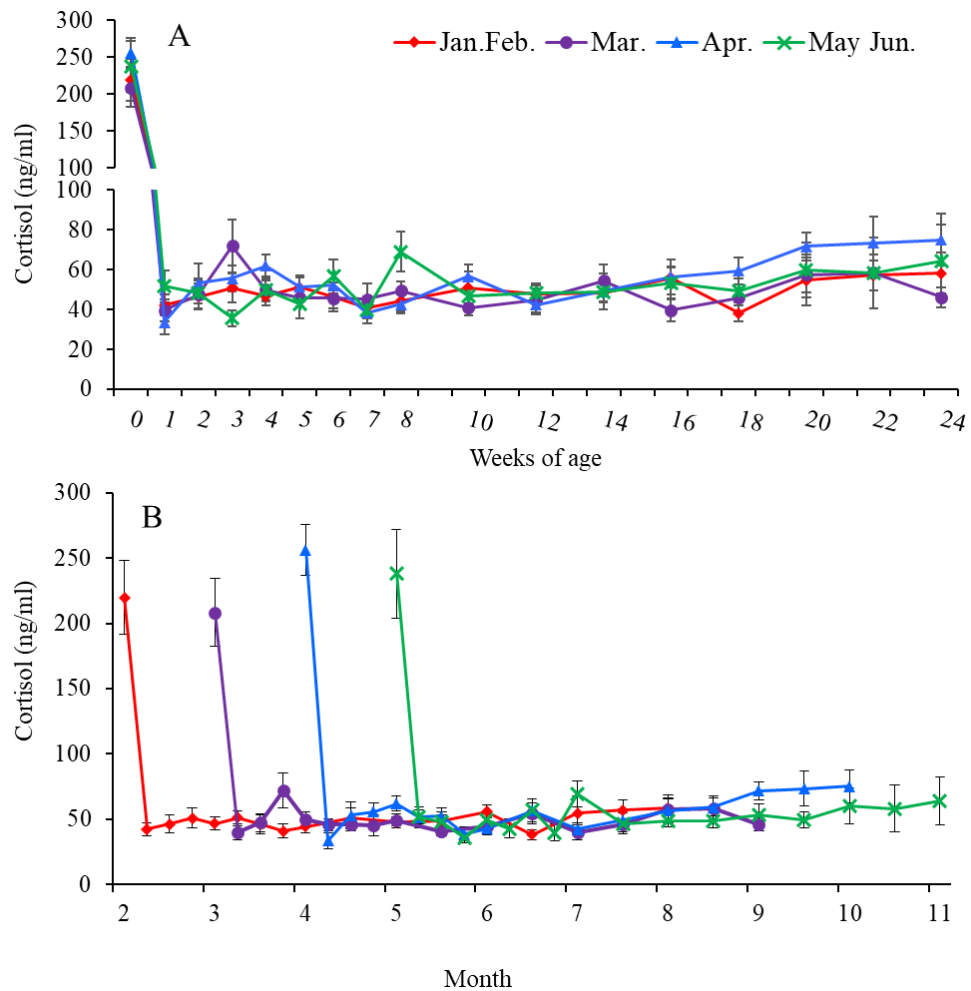
図I-17 出生直後から 24 週齢までのプロラクチン分泌の AUC

A; 雄馬：1・2 月生まれ (Jan. Feb. □; n=13)、3 月生まれ (Mar. ▨; n=15)、4 月生まれ (Apr. ▩; n=10)、5・6 月生まれ (May Jun. ▧; n=11)。B; 雌馬：2 月生まれ (Feb. □; n=11)、3 月生まれ (Mar. ▨; n=12)、4 月生まれ (Apr. ▩; n=10) 5 月生まれ (May ▧; n=8)。結果は平均値+標準誤差を示した。

I-3-3-4 コルチゾール

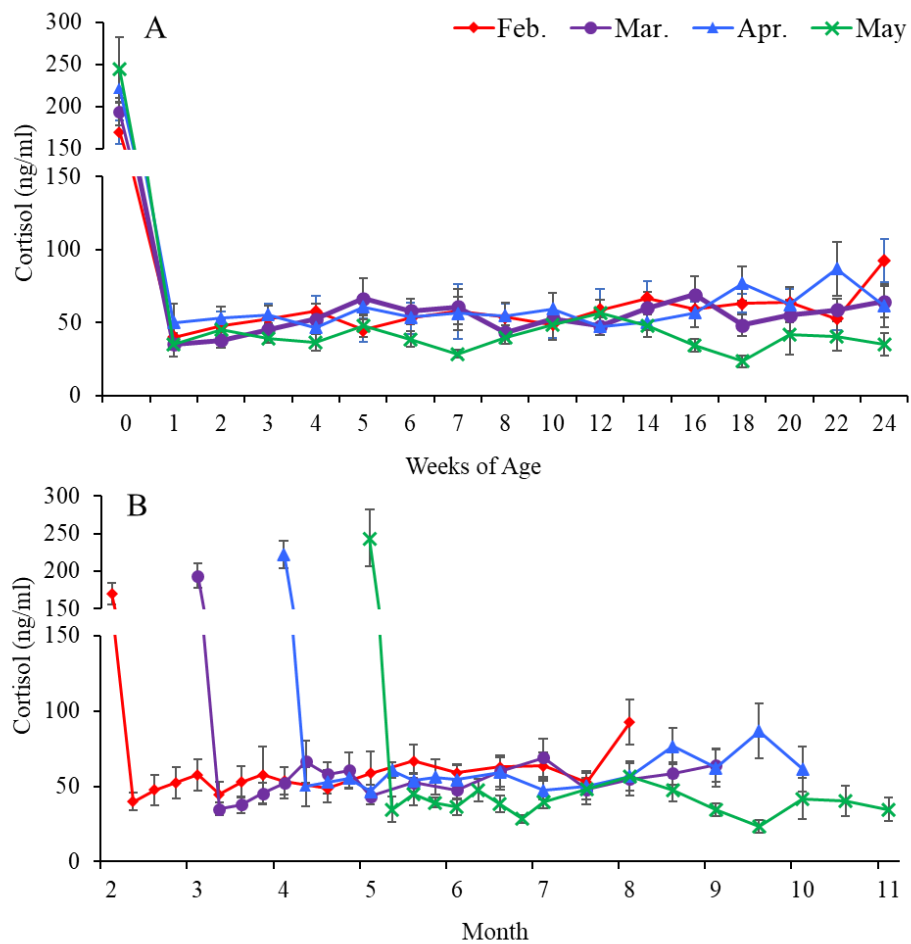
雄馬（49 頭）における出生直後から 24 週齢までの血中コルチゾール濃度の変化を図I-18-A に、また、2 月から 11 月までの期間における血中コルチゾール濃度の変化を図I-18-B に示した。出生時期に関係なく生後後に血中コルチゾール濃度が高値を示した後、1 週齢時以降は低値を示した。雄馬では出生月による差は認められなかった。

雌馬（40 頭）における出生直後から 24 週齢までの血中コルチゾール濃度の変化を図I-19-A に示した。また、2 月から 11 月までの期間における血中コルチゾール濃度の変化を図I-19-B に示した。出生時期に関係なく生後直後に血中コルチゾール濃度が高値を示した後、1 週齢時以降は低値を示した。雌馬では出生月が遅いほど出生直後の血中コルチゾール濃度が高い傾向を示したが、有意差は認められなかった。また、雌馬の 1 週齢以降の時期では、「5 月生まれ」の血中コルチゾール濃度は、「2 月生まれ」、「3 月生まれ」及び「4 月生まれ」と比べて低い傾向を示したが、有意差は認められなかった。



図I-18 雄馬における出生直後からの血中コルチゾール濃度の変化

A; 出生直後から 24 週齢までの変化。B; 2 月から 11 月までの月別変化。1・2 月生まれ (Jan. Feb.; ◆ n=13)、3 月生まれ (Mar.; ● n=15)、4 月生まれ (Apr.; ▲ n=10)、5・6 月生まれ (May Jun.; ✕ n=11)。結果は平均値±標準誤差で示した。



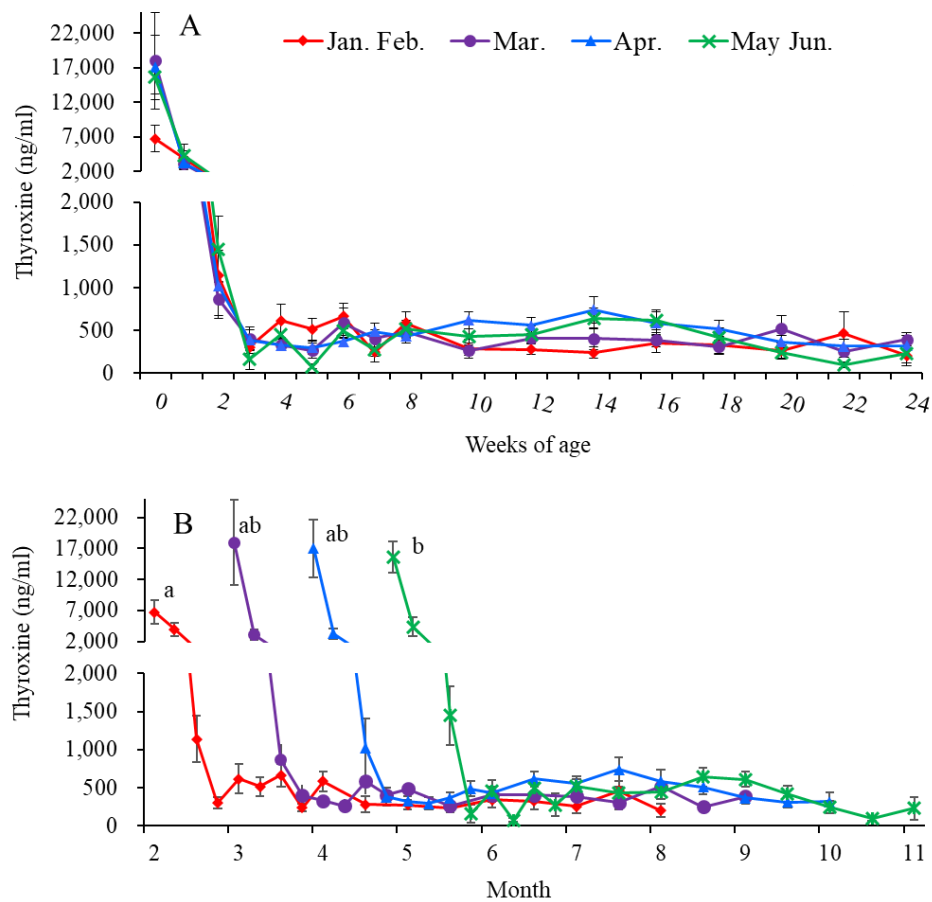
図I-19 雌馬における出生直後からの血中コルチゾール濃度の変化

A; 出生直後から 24 週齢までの変化。B; 2 月から 11 月までの変化。2 月生まれ (Feb.; ◆ n=11)、3 月生まれ (Mar.; ● n=12)、4 月生まれ (Apr.; ▲ n=10)、5 月生まれ (May; ✕ n=8)。結果は平均値±標準誤差で示した。

I-3-3-5 サイロキシン

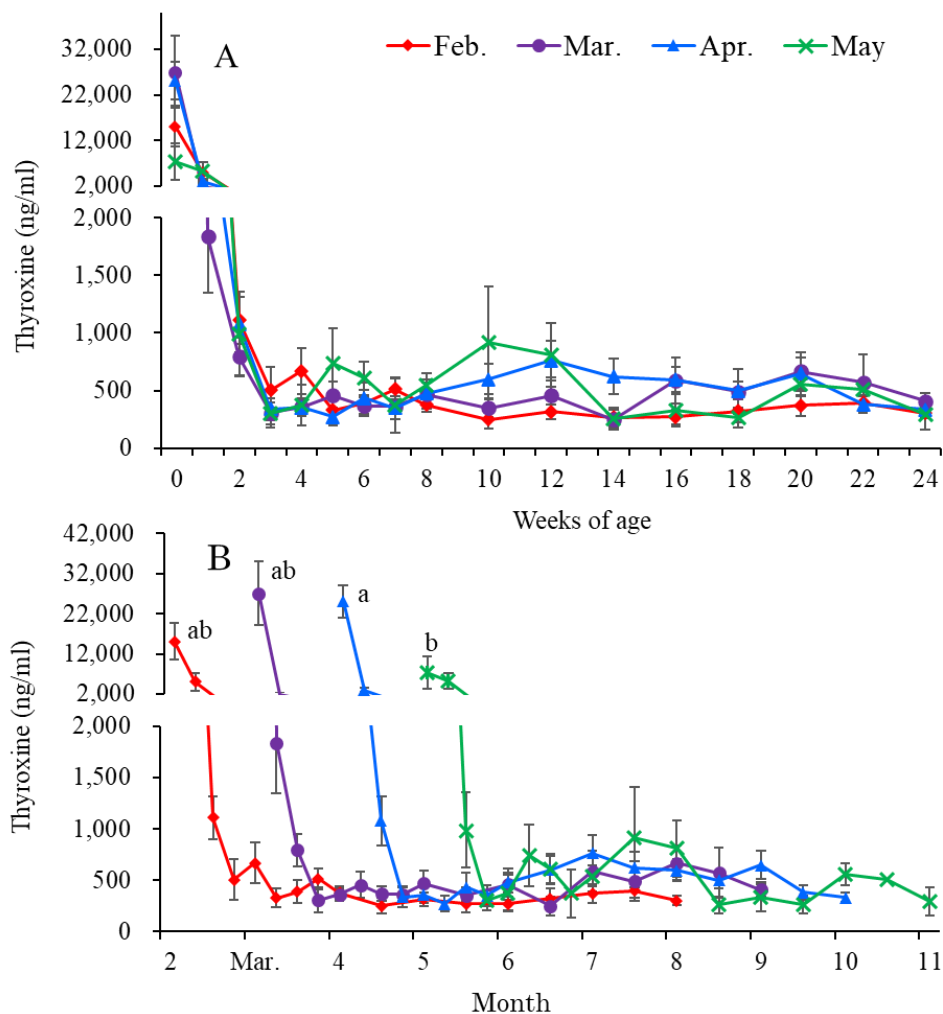
雄馬（49 頭）における出生直後から 24 週齢までの血中サイロキシン濃度の変化を図I-20-A に、また、2 月から 11 月までの期間における血中サイロキシン濃度の変化を図I-20-B に示した。雄馬では、出生時期に関係なく、血中サイロキシン濃度は、生後直後で高値を示した後、急激に低下し 3 週齢時には基底値を示した。出生直後の血中サイロキシン濃度では、「1・2 月生まれ」は「3 月生まれ」、「4 月生まれ」及び「5・6 月生まれ」と比べて低い傾向を示し、「5・6 月生まれ」との間に有意差が認められた ($P<0.05$)。

雌馬（41 頭）における出生直後から 24 週齢までの血中サイロキシン濃度を図I-21-A に、また、2 月から 11 月までの期間における血中サイロキシン濃度の変化を図I-21-B に示した。出生直後の血中サイロキシン濃度では、「5 月生まれ」は「2 月生まれ」、「3 月生まれ」及び「4 月生まれ」と比べて低い傾向を示し、「4 月生まれ」との間に有意差が認められた ($P<0.05$)。



図I-20 雄馬における出生直後からの血中サイロキシン濃度の変化

A; 出生直後から 24 週齢までの変化。B; 2 月から 11 月までの月別変化。1・2 月生まれ (Jan. Feb.; ◆ n=13)、3 月生まれ (Mar.; ● n=15)、4 月生まれ (Apr.; ▲ n=10)、5・6 月生まれ (May Jun.; ✕ n=11)。結果は平均値±標準誤差で示した。異なるアルファベット間には、出生時濃度における群間の有意差を示した ($P < 0.05$)。



図I-21 雌馬における出生直後からの血中サイロキシン濃度の変化

A; 出生直後から 24 週齢までの変化。B; 2 月から 11 月までの月別変化。2 月生まれ (Feb.; ◆ n=11)、3 月生まれ (Mar.; ● n=12)、4 月生まれ (Apr.; ▲ n=10)、5 月生まれ (May; n=8)]。結果は平均値±標準誤差で示した。異なるアルファベット間は、出生時濃度における群間の有意差を示した ($P < 0.05$)。

I-4 考察

本研究において、出生時の BW では、雌雄ともに出生月の違いによる差は認められなかったが、4週齢及び8週齢では、「1・2月生まれ」及び「3月生まれ」の「早生まれ」は、「4月生まれ」及び「5・6月生まれ」の「遅生まれ」と比べて低値である傾向が観察された。また、雄馬では、4週齢から16週齢までの期間において、「1・2月生まれ」及び「3月生まれ」は、「4月生まれ」と比べて、有意に低値であった。北半球で1月から3月に生まれた「早生まれ」のサラブレッドは、4月から5月に生まれた「遅生まれ」のサラブレッドと比べて出生時の BW が低値であることが報告されており[91,112,204,277]、この「早生まれ」の BW 低値の傾向は、概ね6ヶ月齢まで継続することが報告されている[112,204,277]。子馬の出生時における BW は、繁殖雌馬または種牡馬の体格や体高などの遺伝的影響[91,212,257,258]の他に、母馬の子宮の大きさ[10]、胎盤の重量[62]、母馬の年齢[91,277]、母馬の栄養状態[91]、妊娠馬に対する長日処理[195]などが関与することが報告されている。

本研究における ADG の生後変化では、雌雄ともに生後から8週齢までは「4月生まれ」及び「5・6月生まれ」、8週齢から12週齢では「3月生まれ」、さらに12週齢から16週齢及び16週齢から20週齢では「1・2月生まれ」が高値である傾向を示した。また、月別の変化では、雌雄ともに、出生月に関係なく日長時間の長い5月から7月に ADG が高値となることが明らかになった。平均的なサラブレッドでは、生後1ヶ月間の ADG は1.5～1.7kg/日と最も高値で、その後は経時的に徐々に低下し、7ヶ月齢では約0.7～0.8 kg/日となることが報告されている[109,205]。また「早生まれ」は、「遅生まれ」と比較して、出生後から2ヶ月齢までの期間における ADG が低値で、出生後の成長が緩やかであることが報告されている[206,224]。この理由として、Pagan ら[206]は、冬期における放牧地牧草の栄養価の低下が、母馬の養分要求量不足や泌乳量及び乳質の低下を誘発し、「早生まれ」の子馬における成長に影響を及ぼすと推察している。さらに、Pagan ら[206]は、「早生まれ」は、生後3ヶ月から4ヶ月の期間における放牧地牧草の栄養価の上昇とともに、ADGが高値となることを報告している。本研究では、5月初旬以降に、生後1.5ヶ月齢以上の子馬の親子から順に、7時間の昼放牧から20時間の昼夜放牧へと移行した。そのため、放

牧時間の変更による母馬及び子馬の採食量の増加が、この時期における ADG 増加に影響を及ぼした可能性も示唆された。

子馬の ADG が高値となる急成長期には、DOD を発症しやすいことが報告されている[57,108,147,205,255,266]。DOD の発症要因は、急成長以外にも、遺伝、栄養のアンバランス、運動不足、硬い放牧地での運動などが複雑に関与することが報告されている[73,133,278]。さらに、DOD を発症したサラブレッドは、市場価値や競走能力を低下させる可能性が指摘されている[114,154,205,214,237]ことから、子馬の急成長時期には DOD の発症に細心の注意を払い、成長停滞や急成長を予防するような飼養管理が望ましいとされている[63,109,202,205]。本研究において、「早生まれ」は「遅生まれ」と比べて 5 月以降に急成長することが明らかになったことから、北海道の積雪が残る 3 月以前の時期における「早生まれ」の発育を適切に促すような親子の飼養管理方法については、さらなる検討が必要である。

当歳サラブレッドの内分泌機能の発達について、血中 LH 濃度では、雄馬は出生後に高値を示して直ちに低下し、概ね 60 日齢から緩やかな上昇を示して 90 日齢頃から再び徐々に低下することが報告されている[53]。一方、雌馬は、雄馬と同様に出生後に高値を示して低下し、その後は低値で推移することが報告されている[179]。また、血中 LH 濃度は 1 歳春から夏にかけて、雌雄ともに著しく上昇することが報告されている[55]。血中 FSH 濃度では、雌雄ともに生後に低値を継続した後、30 日齢以降に徐々に上昇を開始し、雄馬では 90 日齢をピーク[53]、雌馬では 60 日齢をピーク[179]に徐々に低下し一定のレベルで推移することが報告されている[53,179]。血中 FSH 濃度も LH と同様に、雌雄ともに 1 歳春から夏にかけて著しく上昇することが報告されている[55]。本研究における生後 24 週齢までの血中 LH 及び FSH 濃度の推移は、出生月毎に分析すると、雄の「5・6 月生まれ」における LH を除いて、出生月に関係なく、日長時間が長い 5 月から 8 月に上昇することが明らかになった。このことは、長日期に松果体におけるメラトニン分泌が抑制され[271]、視床下部からのキスペプチン[12,149,211,218,235,261]に次いで性腺刺激ホルモン放出ホルモン (GnRH) 分泌が亢進した結果、下垂体前葉から LH 及び FSH 分泌が促進されたと推察された。子牛では、GnRH レセプター数や結合親和力は成牛と同等で

あることが報告されている[49,178]ことから、出生後間もない子馬においても成馬と同様に、GnRH レセプター数や結合親和力を有するものと推察された。さらに、5月から7月の長日期には、ADGも高値であったことから、ADGに対しても日長時間が影響を及ぼした可能性が示唆された。Stanier ら[238]は、サラブレッドにおける1ヶ月齢から16ヶ月齢までの成長において、IGF-I濃度とADGは相関があり、双方とも5月及び6月に高値となることを報告している。また、成熟雄サラブレッドでは、春から夏の繁殖季節に血中IGF-I濃度が上昇し[54]、成長ホルモンも長日期に分泌が亢進すると考えられている。これらの報告や本研究の結果から、サラブレッドは、出生後間もない時期から日長時間に反応して視床下部-下垂体軸が活性化し成長も何らかの影響を受けていると推察された。

本研究におけるLH及びFSHのAUCでは、雌雄ともに「1・2月生まれ」あるいは「3月生まれ」は、「4月生まれ」及び「5・6月生まれ」と比べて多い傾向が認められた。サラブレッドでは、性腺ホルモンである血中テストステロン、エストラジオール- 17β 及びプロジェステロン濃度は、雌雄ともに生後直後に高値を示して低下し、1歳春の性成熟まで低値が継続することが報告されている(55)。ウマを含む他動物種におけるLHやFSHは、雌馬に対しては卵巣の胞状卵胞数や大きさの増大[216]、雄馬に対してはライディッヒ細胞やセルトリ細胞の発育を促進する作用を有する[14,54]ことが報告されている。本研究の血中FSH及びLH濃度やAUCにおいて、「早生まれ」は「遅生まれ」と比べて高値であったことから、「早生まれ」の雄馬及び雌馬における性腺発育に何らかの影響を及ぼしている可能性が推察された。

本研究では、分娩後の母馬及び1月から4月に生まれた子馬は、明期14.5時間、暗期9.5時間の馬房内照明下で一緒に飼育されたため、長日処理の影響を受けたが、「5・6月生まれ」の馬はほとんど影響を受けなかった可能性が推察された。子馬や胎子に対する長日処理の影響については不明な点も多いが、Nolan ら[195]は、長日処理を妊娠牝馬に実施し誕生した子馬における被毛の長さや重量を、自然光で飼育した子馬と比較したところ、長日処理を実施した群はそれらが低値であったことを報告している。これは長日処理が胎子期からプロラクチンや性腺刺激ホルモン分泌機能に影響を及ぼす可能性を示唆している。

本研究では、子馬の被毛の比較を実施していないが、子馬に対する長日処理期間の差が「早生まれ」における血中 LH 及び FSH 濃度の上昇及び AUC 高値の要因となった可能性が推察された。

成熟雄馬や去勢馬では、血中プロラクチン濃度は長日期に上昇し[54]、当歳馬でも、同様に季節変動することが報告されている[53]。本研究では、当歳馬の血中プロラクチン濃度は、出生月とは関係なく日長時間の長い 5 月から 8 月に高値となる傾向が認められた。しかし、LH や FSH とは異なり、血中プロラクチン濃度及び AUC は出生月間で差が認められなかった。プロラクチンは、副腎からの糖質コルチコイドの分泌促進[103-107]や免疫機能の増強による胃潰瘍予防 [16]などの作用が報告されていることから、子馬が昼夜放牧などの環境に適応するうえでのアンチストレスホルモンとして[249]、重要な役割を担っていると推察される。

血中コルチゾール濃度は、雌雄ともに生後直後に高値を示した。これは出生前後に副腎皮質刺激ホルモン (ACTH) が多く産生されることによって生じることが報告されている [72,233]。コルチゾールは、子馬における糖新生、カテコールアミンの放出、血圧上昇、抗炎症作用、免疫システム等に関与しており、生命維持において極めて重要なホルモンである。早産などにより、胎子の副腎が未発達な場合は、血中 ACTH 濃度は高値を示すがコルチゾールは低値となり、新生子環境不適応症候群 (Neonatal maladjustment syndrome: NMS) などの脳神経症状を生じることが報告されている[5,77,98,223]。本研究において、出生月に関わらず出生直後に血中コルチゾール濃度の高値が認められたことから、出生月は副腎の発達に影響を及ぼさなかったと推察された。

サイロキシンは、妊娠 5 ヶ月から 11 ヶ月の時期での胎子における様々な身体発達のために血中濃度が徐々に上昇することが報告されている[6,72]。一方、甲状腺機能低下症など先天的に甲状腺に障害があると、骨や腱の形成、精神状態、運動機能などに影響を及ぼすことが報告されている[7,8]。さらに、サイロキシンは正常な脳発達において重要な調節因子であり、胎子が発育中に一定期間以上にわたってサイロキシンが不十分な状態に曝されると不可逆的な脳障害が生じることが報告されている[170,209]。そのため、妊娠 5 ヶ月から 11 ヶ月の時期での胎子において様々な身体発達のためにサイロキシンの血中濃度が

徐々に上昇し始めることから [6,72]、出生直後から高い血中濃度を示す。本研究では、個体差があるものの、出生時期に関係なく、サイロキシンは出生直後に高い血中濃度を示したことから、胎子期の甲状腺発達において、出生月による影響はなかったと推察された。一方、雄の「1・2 月生まれ」は、「5・6 月生まれ」と比べて出生直後の血中サイロキシン濃度が低値であった。本研究では母馬のホルモン動態を測定していないが、「早生まれ」の出生時の体重が低値であったこととも関連がある可能性が推察された。雌の「2 月生まれ」は、「3 月生まれ」及び「4 月生まれ」と比べて出生直後の血中サイロキシン濃度が低値であったが、有意差は認められなかった。また、雌馬の「5 月生まれ」は、「4 月生まれ」と比べて血中サイロキシン濃度が低値であった。その理由は現在のところ不明である。

本研究によって、ADG においては、雌雄ともに出生後が最も高値であるが徐々に低下し、出生月に関係なく 5 月から 7 月の長日期に相対的に高値となることが明らかになった。また、LH、FSH 及びプロラクチンにおいても長日期にあたる 5 月から 8 月に高値になることが明らかになった。さらに、LH 及び FSH においては、「1・2 月生まれ」の AUC が多いことも明らかになった。この理由として母馬に対する 5 月初旬までの長日処理が子馬に影響を及ぼした可能性が推察された。以上により、長日性季節繁殖動物動物であるウマでは、当歳時から長日刺激によって視床下部-下垂体軸が活性化されていることが推察され、成長も影響を受けているものと推察された。代謝に関わるコルチゾールやサイロキシンは季節的変動を確認されなかったが、出生月に関わらず、出生直後は高値を示すことが明らかになった。すなわち、出生時期が自然環境下と異なる早い時期であっても、子馬の副腎や甲状腺は十分に機能していると推察された。一方、本研究によって明らかになった出生時期の違いによる内分泌的変化の相違のメカニズム及びその後の成長や性腺機能への影響については、更なる研究が必要である。

I-5 小括

本研究では、出生月の違いによる成長や各種内分泌ホルモンの分泌動態が明らかになった。北海道で生産された子馬では、概ね 8 週齢までは、「早生まれ」

は「遅生まれ」と比較して ADG が低値である傾向が観察された。また、ADG は、出生月に関わらず、日長時間が長い 5 月から 7 月に高値になることが明らかになった。したがって、「早生まれ」の飼養管理においては、厳寒期は積雪や凍結のため放牧地での栄養摂取が制限されることから、子馬に乳を与える母馬に対する良質な乾草や濃厚飼料の給与など、適切に飼養管理を行うことが重要と考えられた。

北海道のサラブレッド当歳馬では、5 月から 8 月の長日期に血中 LH、FSH 及びプロラクチン濃度が上昇することから、松果体、視床下部および下垂体は、出生直後から日長時間の変化に敏感に反応する能力を有していることが判明した。さらに、性腺刺激ホルモンである LH や FSH は「早生まれ」において多く分泌されていることも明らかになった。また、代謝に関わるコルチゾールやサイロキシンは出生月に関わらず出生直後は高値を示すことが明らかになったことから、出生時期が自然環境下と異なる早い時期であっても、副腎や甲状腺は十分に機能していると推察された。気象環境が厳しい「早生まれ」の子馬に対する適切な飼養管理方法については、今後のさらなる研究が必要である。

第Ⅱ章

サラブレッド種の中期育成期における厳寒期の放牧管理が成長及び内分泌機能に及ぼす影響

Ⅱ-1 序文

当歳秋の離乳から 1 歳秋のブレイキング開始までの 1 年程度の期間である「中期育成期」は、ウマを複数頭数で放牧することによって飼養管理されることが一般的である。草食動物であるウマは、放牧地では多くの時間を牧草の採食や移動に費やす[226,244]ことから、一日の大半を放牧地で管理する「昼夜放牧」は、自然に近い飼養管理であり、ウマ同士の社会性構築や心身の健全な発達を促す観点からも、合理的な管理方法と考えられている[31,65,278]。海外の主要なサラブレッドの生産地である米国ケンタッキー、豪州ハンターバレー、愛国キルデア、英国ニューマーケット及び仏国ノルマンディーなどでは、冬期に日本ほど放牧地の積雪や凍結がないことから、中期育成期には季節を問わず昼夜放牧が行われている。かつて日本では、放牧地面積の狭さや夜間の事故防止などの観点から、年間を通してウマを朝に放牧して夕方に集牧する「昼放牧」が一般的であった[85]。近年では、昼夜放牧の利点が生産者に啓発されてきたことから、春から秋にかけての気候の良い時期に昼夜放牧を行う牧場が増加している[50,244,278]。Asai ら[17]は、サラブレッド 1 歳馬における昼夜放牧では一日の移動距離が 13～15km であるのに対して、昼放牧では 4～5km であると報告している。放牧時間の長い昼夜放牧では、このように運動量が増加することから、サラブレッド幼駒の肢骨や腱の発育を健全に促すと考えられている[69,90,116,138,215,265]。さらに、牧場経営の観点からは、昼夜放牧はウマが馬房内で過ごす時間が短縮されることから、敷料や飼料に係る経費節減や作業労力の効率化などのメリットもある[50,99,278]。一方、北海道の厳寒期における放牧管理では、気温の低下や放牧地の積雪によって、ウマが地面の牧草を採食することが困難になることや、放牧地内で自発運動量が減少することが経験的に知られている[278]。そのため、多くの日高地区の牧場では、厳寒期の中期育成馬は、昼放牧で管理されることが一般的である[278]。近年、北海道の

大手牧場において、離乳した当歳馬に対して、厳寒期においても昼夜放牧を継続しながら良好な競走成績をあげ始めたことを契機に、この管理方法が注目されている。しかし、日本の中期育成期のサラブレッドにおける冬季の昼夜放牧時の生理機能については明らかにされていない。

本研究では、中期育成期のサラブレッドにおける厳寒期の放牧管理方法として、昼夜放牧を行う群（昼夜群）と昼夜放牧と同等の運動距離を確保するために昼放牧とウォーキングマシン（WM）を組み合わせる群（昼 W 群）を比較し、2つの厳寒期管理方法が育成馬の生理機能、成長および内分泌機能に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。

II-2 材料及び方法

II-2-1 供試馬

本研究では、日高育成牧場（浦河町）で 2010 年から 2012 年に生まれたサラブレッド 24 頭（雄 10 頭、雌 14 頭）、A 牧場（浦河町）で 2011 年に生まれたサラブレッド 10 頭（雄 5 頭、雌 5 頭）、B 牧場（浦河町）で 2011 年に生まれたサラブレッド 10 頭（雄 5 頭、雌 5 頭）及び C 牧場（新冠町）で 2011 年に生まれたサラブレッド 20 頭（雄 10 頭、雌 10 頭）の合計 64 頭（雄 32 頭、雌 32 頭）を使用した（表II-1）。これら供試馬を、約 22 時間の昼夜放牧を行う 32 頭〔昼夜群（雄 15 頭、雌 17 頭）〕と、7 時間の昼放牧と WM 運動を行う 32 頭〔昼 W 群（雄 15 頭、雌 17 頭）〕の 2 群に分けて、移動距離、生理機能、内分泌機能、体組成及び成長指標について両群を比較した。なお、本実験を開始した 11 月における供試馬の月齢は概ね 6～9 ヶ月齢であった。

日高育成牧場で 2010 年から 2012 年に生まれたサラブレッドは、すべて当歳 8 月に離乳された。その後は、1 ヶ所の放牧地（約 8 ha）に雌雄 8 頭の群れで昼夜放牧管理を実施した。当歳 11 月の実験開始日に、昼 W 群と昼夜群の 2 群に分け、それぞれ新たな放牧地で研究を開始した。なお、1 歳 1 月の実験終了後も、3 月上旬まで昼 W 群は 7 時間の昼放牧と WM 運動、昼夜群は 22 時間の昼夜放牧を継続した。3 月上旬以降は、両群ともに 8 月末まで 22 時間の昼夜放牧を継続した。

日本中央競馬会日高育成牧場の実験動物委員会の承認（日-2008-3、日-2011-

1、日-2011-6) を得て、全ての実験を実施した。

表II-1 供試馬の内訳

Year of birth	Breeding farm	WM duration	22h (n=32)		7h+W (n=32)	
			Colts	Fillies	Colts	Fillies
2010	JRA Hidaka	11/22,2010～ 3/13,2011	2	2	2	2
2011	JRA Hidaka	11/21,2011～ 2/29,2012	2	2	1	3
	A Farm	11/21,2011～ 1/20, 2012	0	0	5	5
	B Farm	11/21,2011～ 1/20, 2012	0	0	5	5
	C Farm	11/21,2011～ 1/20, 2012	10	10	0	0
2012	JRA Hidaka	11/19,2012～ 2/28, 2013	1	3	2	2
Total (n=64)			15	17	15	17

WM duration は、昼 W 群（7h+W）の実験期間を示した。

II-2-2 昼夜群と昼 W 群の飼養管理

II-2-2-1 昼夜群

昼夜群は、約 4.6 ha の放牧地を使用して、10 時 30 分から翌日の 8 時 30 分まで、22 時間の放牧を実施した。図 II-1 に本研究に供した放牧地の模式図を示した。供試馬は、12 月中旬まで放牧地に生えているチモシー牧草を自由採食することが可能であった。また、12 月以降は、放牧中の風雪をしのぐ目的で設置されているシェルター[163,164]内（図 II-2-A）にロール乾草（日高育成牧場産チモシー）をほぐして設置し、自由採食や休息を行うことが可能となるようにした。また、雪の深い日は重機で除雪し供試馬が歩きやすいように通路を確保した（図 II-2-B）。供試馬に移動を促す目的で、それぞれシェルターや餌を与える場所とは離れた放牧地の隅で、アルファルファ乾草 1 kg/頭を 6 時と 20 時に 1 日 2 回与えた（図 II-1）。餌については、朝は厩舎内（8 時 30 分）、午後は放牧地（16 時）で、1 日 2 回給餌した。また、飲水が凍結しないよう温熱ヒーター付きの給水槽を使用した。放牧時および馬房内休息時には馬服を着用しなかった。

II-2-2-2 昼 W 群

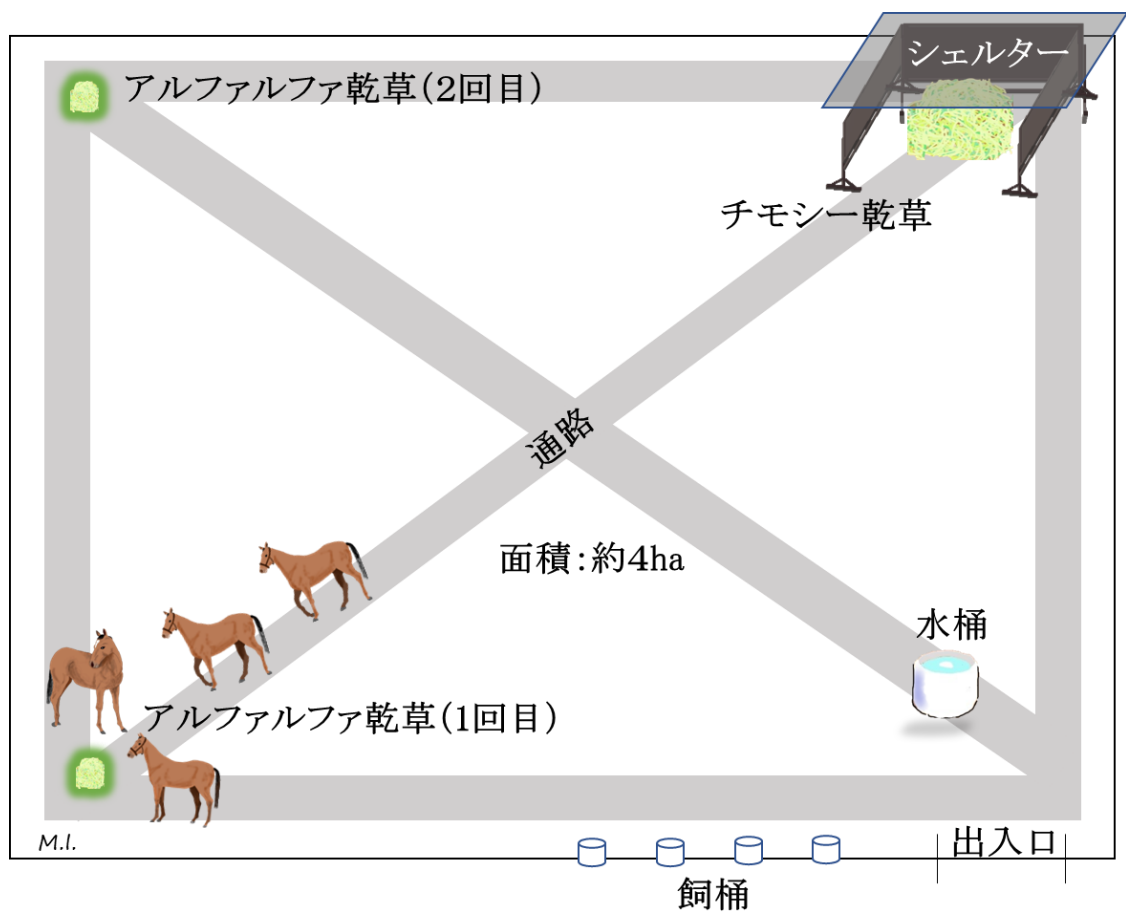
昼 W 群は、約 3.7 ha の放牧地に、8 時 00 分から 15 時 00 分までの 7 時間の放牧を実施した。昼 W 群では 15 時に集牧し、ウォーキングマシン（WM）運動を実施した。WM 運動の設定速度及び設定時間については、子馬の体力増強の観点から計画的に漸増した（表 II-2）放牧地内での管理方法は昼夜群と同様とした。アルファルファ乾草は、9 時と 13 時に 1 kg/頭を 1 日 2 回与えた。餌については、厩舎内（6 時、20 時）で 1 日 2 回給餌した。放牧時及び WM 運動時には馬服を着用しなかったが、馬房内休息時には着用した。

II-2-3 給餌

餌は、燕麦、ビートパルプ（Standlee 社製 Kimberly, Wisconsin, U.S.A.）、スタム 30（Hallway 社製 Lexington, Kentucky, U.S.A.）を基本飼料として 1 日 2 回給餌した。競走馬飼養標準 2004[63]によると、北海道で標準的に発育した 10～15 ヶ月齢のサラブレッドを放牧管理によって飼育する場合の 1 日当たりの可消

化エネルギー量 (digestible energy: DE) は 17.5～20.5 Mcal/kg とされている。本研究では、昼夜群は放牧時の外気温が－10℃程度まで低下することや昼 W 群で WM 運動を負荷することを考慮し、DE を約 25% 増加させて給餌した [46] (表II-3)。

供試馬のボディコンディションスコア (body condition score: BCS)[88]は、概ね 4.5～5.5 の間で管理された。BCS は脂肪の付き具合を数値化したもので、「脂肪がほとんど無く、削瘦している状態」のスコア 1 から、「極度の肥満」のスコア 9 までの間で評価する方法である[88]。本研究期間中の供試馬は、スコア 4 (少し痩せている)、スコア 5 (普通) 及びスコア 6 (少し肉付きがよい) の間で維持された (図II-3)。



図II-1 本研究に供した放牧地の模式図

昼夜群と昼 W 群の放牧地の模式図を示した。大雪の際は、重機を用いて除雪し供試馬の通路を確保した（灰色で示す）。



図Ⅱ-2 厳寒期における昼夜放牧

A; 風雪を凌ぐことが可能なシェルター。B; 除雪による放牧地の通路確保。

表Ⅱ-2 WM運動の実施状況

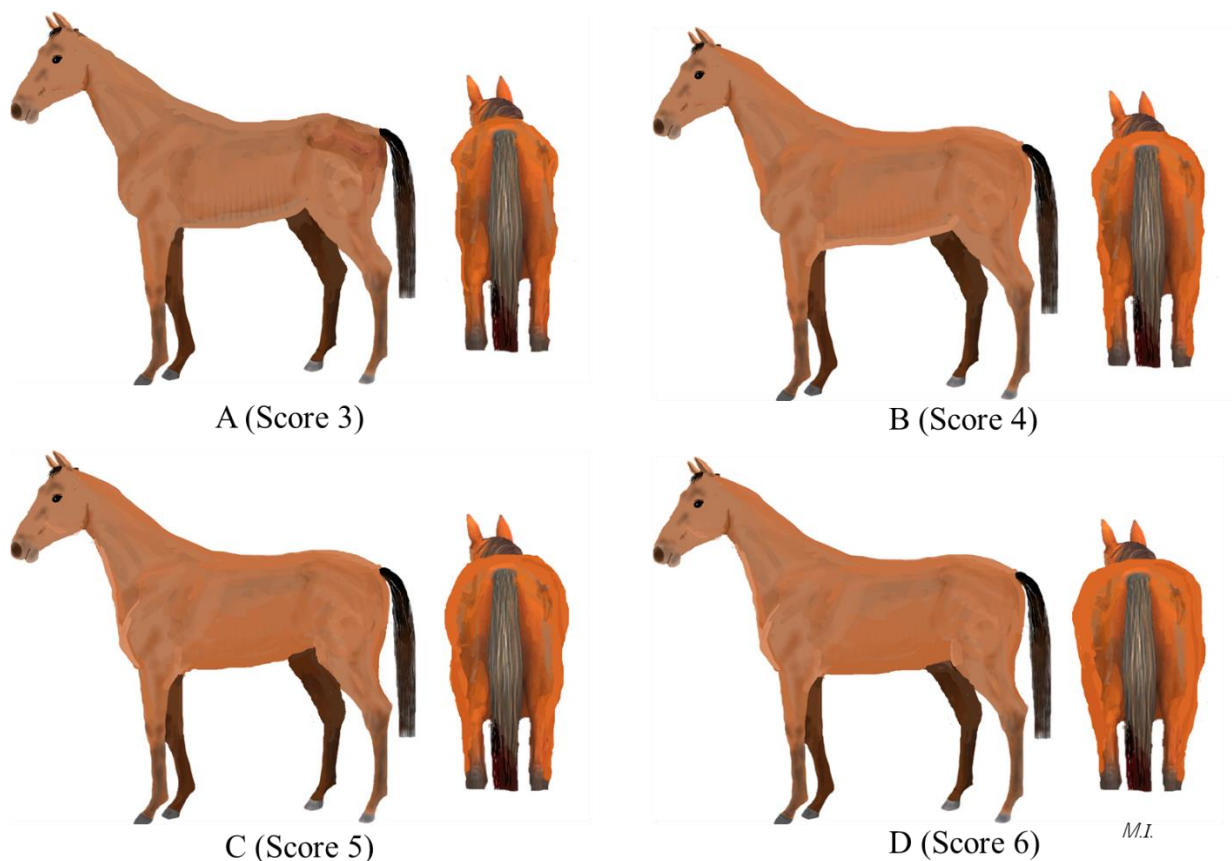
Month (age)	Week	Speed (km/h)	Walking Time (min/day)	Total Distance (km)
11 (0)	4 th week	5	30	2.5
	5 th week	5	45	3.75
12 (0)	1 st week	5.5	45	4.13
	2 nd week	5.5	45	4.13
	3 rd week	5.5	60	5.5
	4 th week	5.5	60	5.5
1 (1)	1 st week	6	60	6
	2 nd week	6	60	6
	3 rd week	6	60	6
	4 th week	6	60	6

11月以降のWM運動のスピード、運動時間及び総移動距離を月ごとに示した。

表Ⅱ-3 1日当たりの給餌量

Month (age)	Oats (kg)	Sugar-Beet Pulp (kg)	Stamm30 (kg)	Alfalfa Hay (kg)	Timothy Hay (kg)	Digestible Energy(DE) (Mcal)
11 (0)	1	0.3	1	2	5	22.12
12 (0)	1.5	0.3	1	2	5	23.58
1 (1)	2	0.3	1	2	5	25.05

11 月以降の給餌量を月毎に示した。



図II-3 BCS

軽種馬飼養標準 2004 の図[63,88]を改編。A; Score 3 は痩せている状態。肋骨をわずかな脂肪が覆う。脊椎の突起や肋骨は容易に識別できる。股関節結節は丸みを帯びるが容易に識別できる。B; Score 4 は少し痩せている状態。胸椎の棘突起を触知可能。外貌から肋骨を識別することが可能。尾根周囲には皮下脂肪を触知する。股関節結節は外貌から識別できない。C; Score 5 は普通の状態。背中央は平らで、肋骨は外貌から識別不可能であるが、触知可能。尾根周囲の皮下脂肪はスポンジ状。キ甲周囲は丸みを帯びる。D; Score 6 は少し肉付きがよい状態。背中央部にわずかな凹みがある。肋部の皮下脂肪はスポンジ状。尾根周囲の脂肪は柔軟。キ甲の周囲、肩部および頸部に皮下脂肪が蓄積し始める。

II-2-4 放牧地での移動距離

2010 年に日高育成牧場で生まれた 8 頭を供試馬として用いた。2010 年 8 月 26 日から 2011 年 1 月 31 日までの期間に、週に 2 回、携帯型 GPS データロガー (Trip Recorder 747 Pro, Transystem 社製, Hsinchu, Taiwan) を供試馬の無口頭絡に装着 (図II-4-A) し、専用のソフトによって放牧中の行動軌跡及び移動距離を測定した (図II-4-B) [226]。昼夜群 (雄 2 頭、雌 2 頭) 及び昼 W 群 (雄 2 頭、雌 2 頭) から無作為に抽出された 1~4 頭の平均測定値を、それぞれの群の移動距離とした。なお、2010 年 11 月 22 日から昼夜群と昼 W 群に分けた本実験を開始した。

II-2-5 一般生理状態 (体温、血液所見)

2010 年に日高育成牧場で生まれた 8 頭を供試馬として用いた。2010 年 11 月 1 日から 1 月 31 日まで、毎朝 9 時に体温 (直腸温) を測定し、昼夜群 (雄 2 頭、雌 2 頭) と昼 W 群 (雄 2 頭、雌 2 頭) を比較した。また、1 週間に 1 回採血を実施し、白血球数 (WBC) 及びヘマトクリット値 (Ht) を測定し両群間で比較した。なお、2010 年 11 月 22 日から昼夜群と昼 W 群に分けた本実験を開始した。

II-2-6 心拍変動解析

2010 年、2011 年及び 2012 年に日高育成牧場で生まれたサラブレッド 20 頭を供試馬として用い、その内訳を表II-4 に示した。測定は当歳 11 月から 1 歳 1 月の毎月第 3 週目に実施した。昼夜群及び昼 W 群ともに、集牧 30 分後にそれぞれの馬房での安静時に測定した。ホルター心電計を用いて AB 誘導により 60 分間記録した (図II-5)。得られた心電図は、ECC プロセッサー (ソフトロン社, 杉並区, 東京) を使用して、Kuwahara ら[139]の方法に従って解析した。

心拍変動解析は、RR 間隔の変動を複数の周波数の波動として自律神経機能に由来する周波数領域の波を分離して、この時系列データの変動量、周期性やパターンなどから自律神経機能を評価する方法である[4,207]。周波数領域は、低周波領域 (Low Frequency: LF) と高周波領域 (High Frequency: HF) に分類され、それぞれのパワー値 (Power Spectrum Density: PSD msec²) を算出することにより自律神経機能の評価を行うことが可能である[4,139]。心拍変動の高周

波成分である HF パワーは、呼吸運動に伴う副交感緊張に由来しており、副交感神経活動の定量的指標とされる[4]。一方、低周波成分である LF パワーは、Meyer 波とよばれる約 10 秒周期に生じる収縮血圧の変動に由来し、交感・副交感の両神経の活動が反映される[4]。また、LF/HF 比は自律神経活動の交感・副交感神経活動のバランスを表す指標である[139,207]。心電図から得られた心拍変動解析は、自律神経活動を評価する方法として、ヒトをはじめ、ウマや様々な動物において広く応用されている[79,101,139,143,199,200,282]。本研究では、昼夜群と昼 W 群の両群間で、心拍数 (Heart Rate: HR)、LH パワー、HF パワー及び LH/FH 比を比較した。なお、LH パワーは 0.01-0.07Hz、HF パワーは 0.07-0.60Hz の設定とした[199]。

II-2-7 体組成の測定

体組成の測定には、2011 年に日高育成牧場で出生したサラブレッド種 8 頭を用いた (表II-1)。BW を 2011 年 9 月から 2012 年 2 月まで、毎月月末に測定するとともに、超音波画像診断装置 (LOGIQB Book XP Basic, GE Health Care, Hino, Japan)を用いて RFT を測定した[102,115,118]。RFT の測定は、股関節と水平の高さで約 5 cm 尾側の部位にあたる大腿 2 頭筋と半腱半膜様筋の間の筋溝部にプローブを当て、B モードにて実施された (図II-6)。本研究では、クォーターホース当歳馬の体脂肪率を測定した Hunka ら[96]の方法を採用し、計測した RFT から、Westervelt ら[273]の式を用いて %F、FFM を算出した。1 ヶ月毎の BW、FFM、%F の変化及び各月増加率を昼夜群と昼 W 群で比較した。なお、2011 年 11 月 21 日から昼夜群と昼 W 群に分けた本実験を開始した。

$$\%F = 8.64 + 4.7 \times RFT \text{ (cm)}$$

$$FM \text{ (kg)} = BW \text{ (kg)} \times \%F$$

$$FFM \text{ (kg)} = BW \text{ (kg)} \times (1 - \%F/100)$$

II-2-8 成長指標の比較

II-2-8-1 ADG

ADG の測定には 2011 年に日高育成牧場で生まれたサラブレッド 8 頭を用い

た（表Ⅱ-1）。2011 年 10 月 25 日から 2012 年 2 月 28 日までの期間における BW を、毎朝 8 時に体重計 (TRU-TEST S3, Datamars, Auckland, New Zealand) を用いて測定した。この期間における 1 週間ごとの ADG を算出し、昼夜群と昼 W 群を比較した。

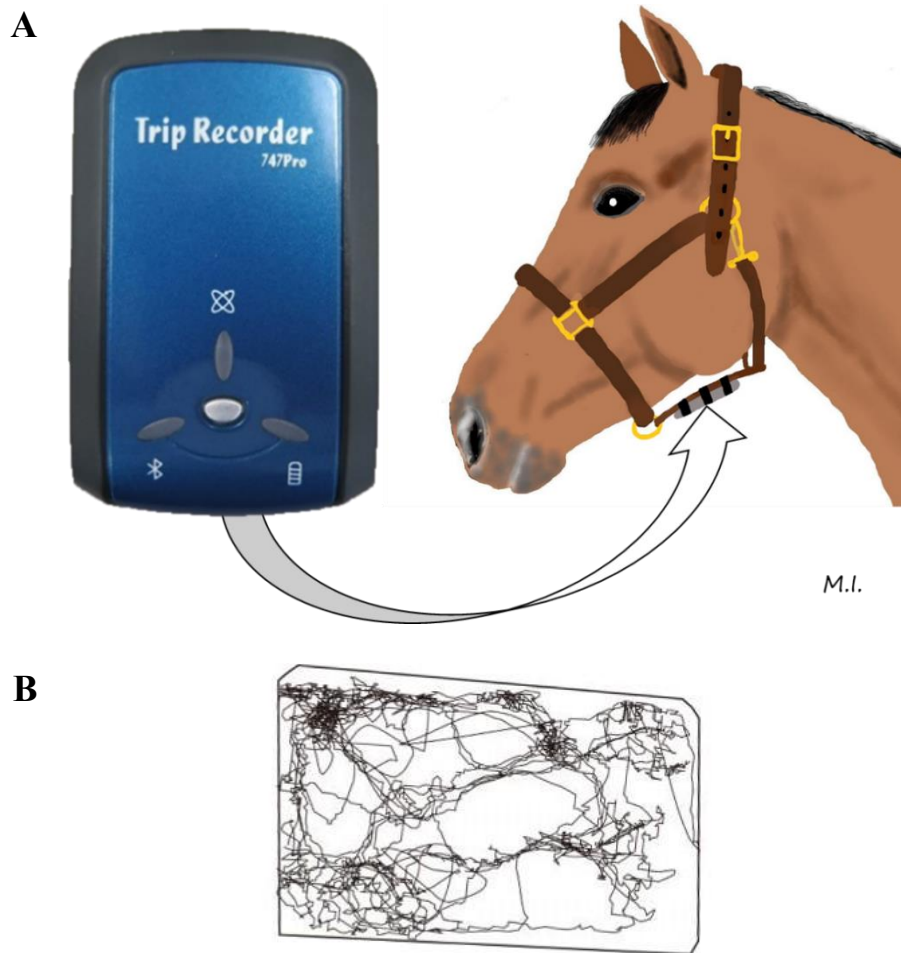
さらに、2011 年 8 月 6 日から 2012 年 7 月 9 日までの 1 週間ごとの BW の推移及び ADG を算出し、昼夜群と昼 W 群における中期育成期の成長を評価した。なお、2011 年 11 月 21 日から 2012 年 2 月 29 日まで昼夜群と昼 W 群に分けた本実験を継続した。

Ⅱ-2-8-2 成長指標の各月増加率

2010 年、2011 年及び 2012 年に日高育成牧場で生まれた 24 頭（雄 11 頭、雌 13 頭）を用いた（表Ⅱ-1）。当歳 9 月から 1 歳 3 月までの BW、体高、胸囲及び管囲を毎月月末に測定（図Ⅱ-7）し、各月増加率（前月から当該月までの増加率）を昼夜群と昼 W 群とで比較した。

表II-4 心拍変動解析の供試馬

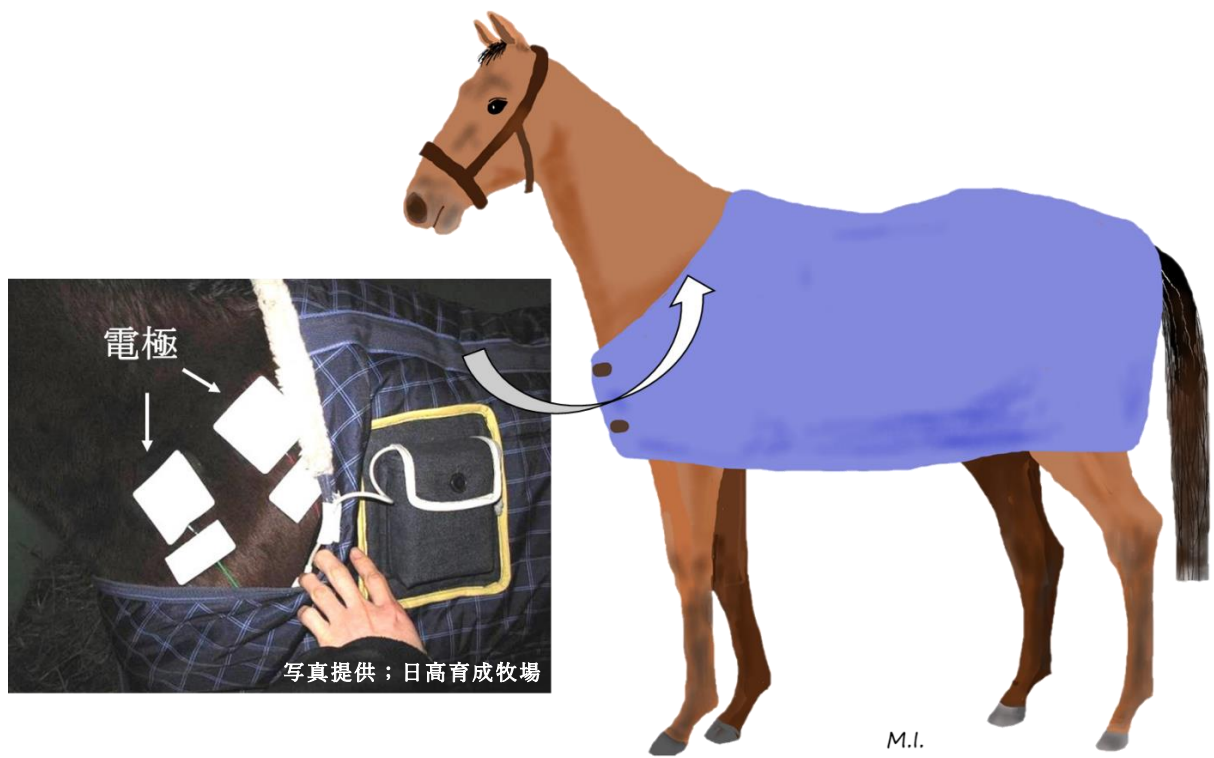
Year of birth	Breeding farm	22h (n=11)		7h+W (n=9)	
		Colts	Fillies	Colts	Fillies
2010	JRA Hidaka	2	2	2	2
2011	JRA Hidaka	1	2	0	1
2012	JRA Hidaka	1	3	2	2
Total (n=20)		4	7	4	5



図Ⅱ-4 携帯型 GPS の装着と放牧中の行動軌跡

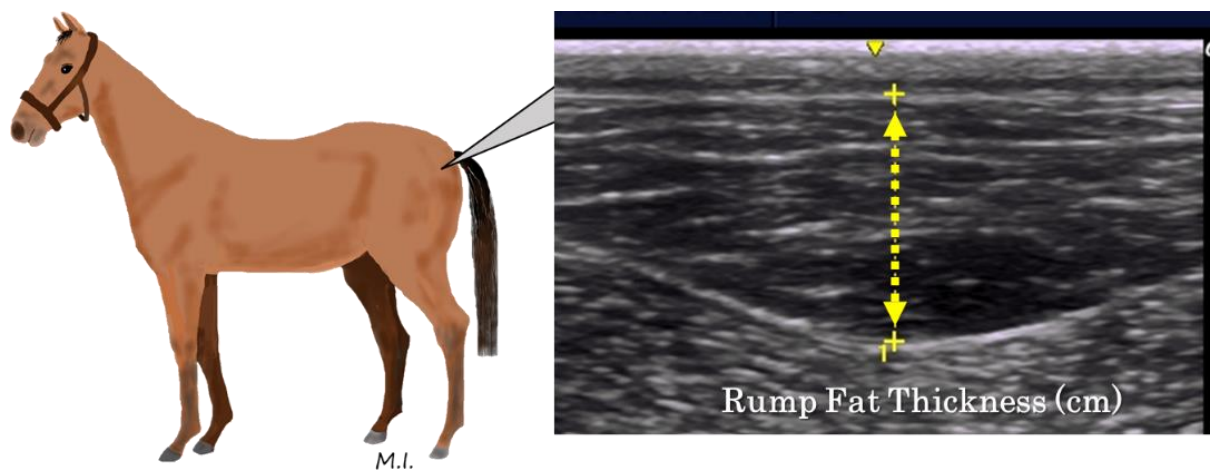
A; GPS の装着方法。無口頭絡の下部に固定した。

B; 放牧地での行動軌跡（例）。



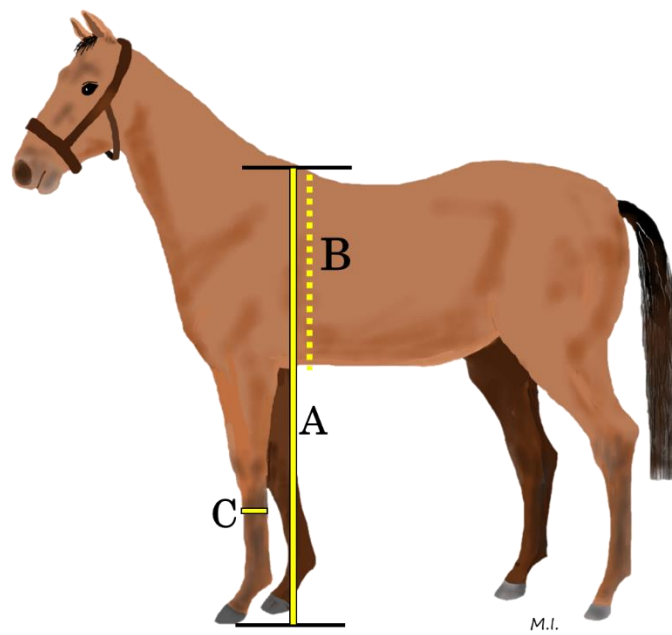
図II-5 ホルター心電計の装着

ホルター心電計を用いて AB 誘導により 60 分間記録した。



図Ⅱ-6 RFT の測定

超音波画像診断装置 (LOGIQB Book XP Basic, GE Health Care, Hino, Japan) を用いて測定した。RFT の測定は、股関節と水平の高さで約 5 cm 尾側の部位にあたる大腿 2 頭筋と半腱半膜様筋の間の筋溝部にプローブを当て、B モードで皮下の脂肪の厚さ (cm) を測定した。



図Ⅱ-7 サラブレッドの成長に関する測定項目

A; 体高、B; 胸囲、C; 管囲。

II-2-9 血液の採取およびホルモンの測定

プロラクチン、コルチゾール及び IGF-I の測定には、2011 年に日高育成牧場で生まれた 8 頭、A 牧場で生まれた 10 頭、B 牧場で生まれた 10 頭及び C 牧場で生まれた 20 頭の合計 48 頭（表II-1）を供試した。なお、供試馬の健康状態などの都合により、採材当日に採血を実施することができなかった場合はデータから除外した。サイロキシンの測定には、2011 年及び 2012 年に日高育成牧場で生まれた 16 頭（表II-1）を供試した。

内分泌ホルモン測定のための血液については、昼夜群は集牧後に、昼 W 群は WM 運動及び放牧を実施する前にあたる午前 8 時にヘパリン添加採血管（10ml）を用いて頸静脈から採取した。プロラクチンとコルチゾール測定用の採血については、11 月は月 1 回、12 月及び 1 月は 2 週間おきに各月 2 回実施した。IGF-I の採血には、11 月及び 12 月は 1 回、1 月は 2 週間おきに 2 回実施した。サイロキシンの測定用の採血については、11 月から 2 月まで、毎月 1 回実施した。また、遠心分離をした血漿については、各血中ホルモン濃度を測定するまで -20℃以下で保存した。

II-2-10 各種ホルモンの RIA

II-2-10-1 プロラクチン

プロラクチンの測定には、標準品として National Hormone and Pituitary Program, National Hormone and Pituitary Program, NIDDK, NIH (Torrance, CA USA) から購入した精製 equine Prolactin (AFP-8794B) を、第一抗体には equine Prolactin 抗体 (AFP-261987) を、第二抗体としては、東京農工大学農学部獣医生理学研究室で作製した抗ラット γ -グロブリンヤギ血清 (#42-1) を使用した。標識抗原には精製 equine Prolactin (AFP-87948) をクロラミン T 法によって ^{125}I で標識して使用した。

II-2-10-2 コルチゾール

コルチゾール測定の第一抗体には群馬大学生体調節研究所から供与された抗コルチゾール血清 (HAC-AA71-O2RBP) を使用した。第二抗体には抗ウサギ γ -グロブリンヤギ血清 (#42-1) を用いた。標識抗原には、 ^{125}I 標識コルチゾール

(07121126 MP Biomedicals. LLC, Irvine, California, USA) を使用した。

II-2-10-3 IGF-I

IGF-Iの測定法の概略を、図II-8 に示した。IGF-Iの測定は、Blum ら [26]の acid-ethanol-cryo precipitation 法を用いて抽出し、 ^{125}I 標識ホルモンを用いた二抗体法 RIA で行った。標準品として Peptotech Inc. (Rocky Hill, New Jersey, USA) から購入した精製 human IGF-I (Lot#090701)、第一抗体には NIDDK, NIH (Torrance, CA USA)から購入した human IGF-I 抗体 (892898)、第二抗体には抗ウサギγグロブリンヤギ血清 (#42-1) を用いた。標識抗原は、クロラミン T 法によって ^{125}I で標識して使用した。

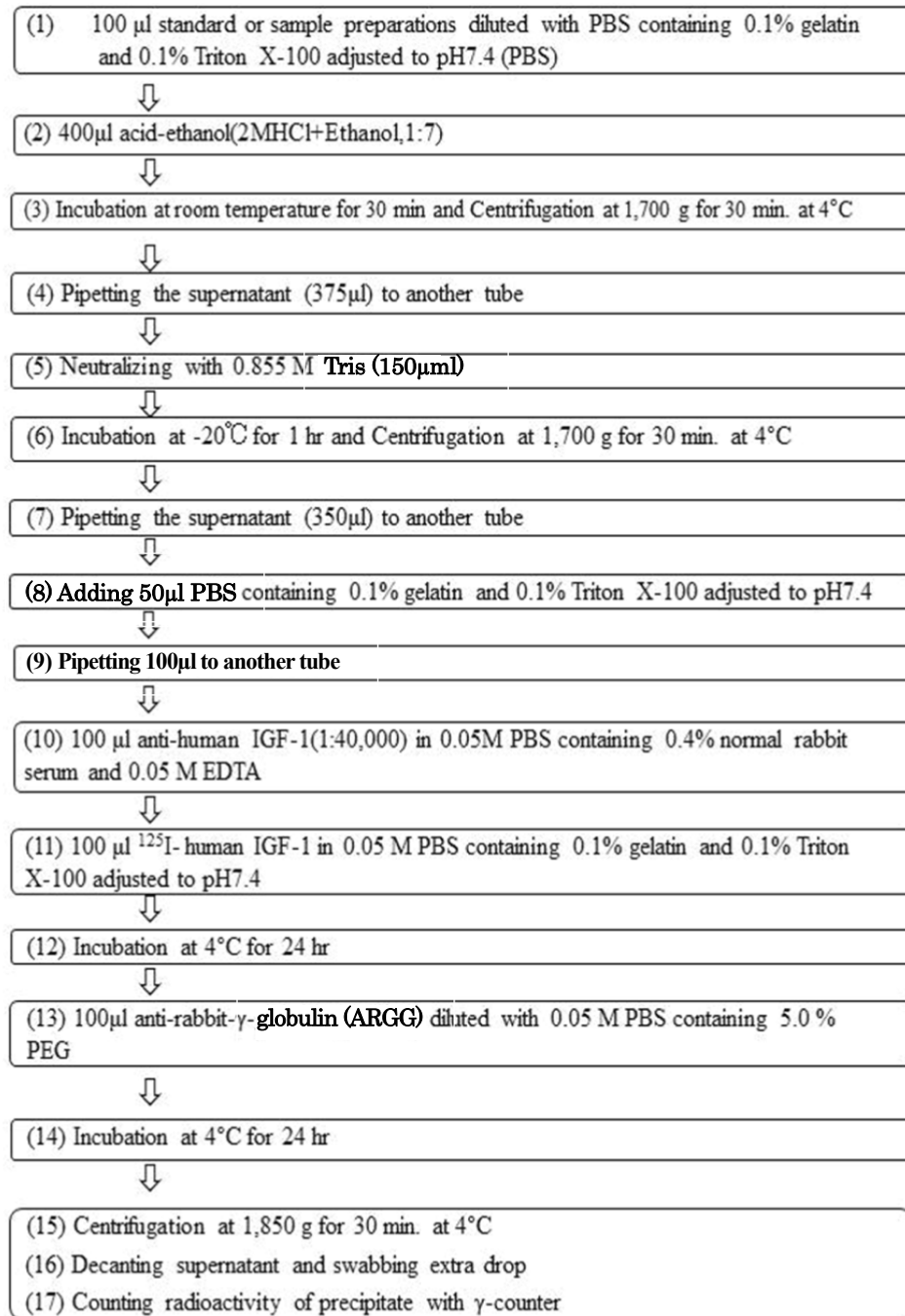
II-2-10-4 サイロキシン

PerkinElmer 社 (Waltham, Massachusetts, USA) から購入した total T4 測定キット DELFIA (Thyroxine 1244-030) を使用して測定を行った。

II-2-11 統計処理

全てのデータは、平均値±標準誤差で示した。有意差の検定には、統計用ソフトウェア JMP (Ver 16.0)を用いた。3群以上の検定を行う際には、one-way ANOVAを、関連多群間の差の検定を行う際には、two-way ANOVAを用いた。one-way ANOVA で有意差が認められた場合には Tukey-Kramer テストを用いた。また、同一性及び同一育成牧場における体組成や成長指標の2点間の増加率の比較には、*F*-test の後 Student's *t*-test を用いた。分散が均一でない場合には Welch の *t*-test を用いた。血中ホルモン濃度の比較には、two-way ANOVA の後 post-hoc テスト (Bonferroni post test) を用いた。 $P < 0.05$ で統計的に有意と判定した。

Flow chart of the RIA for IGF-I



図II-8 血漿中 IGF-Iの測定法

II-3 結果

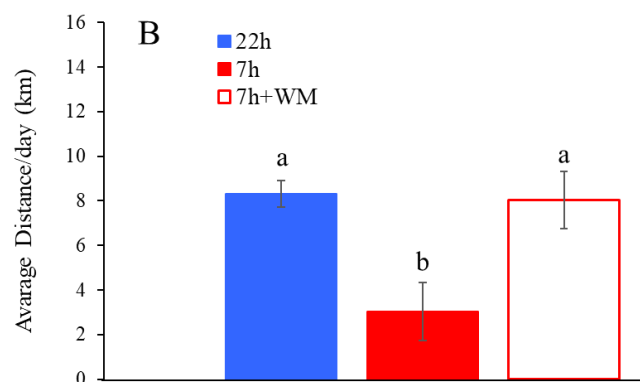
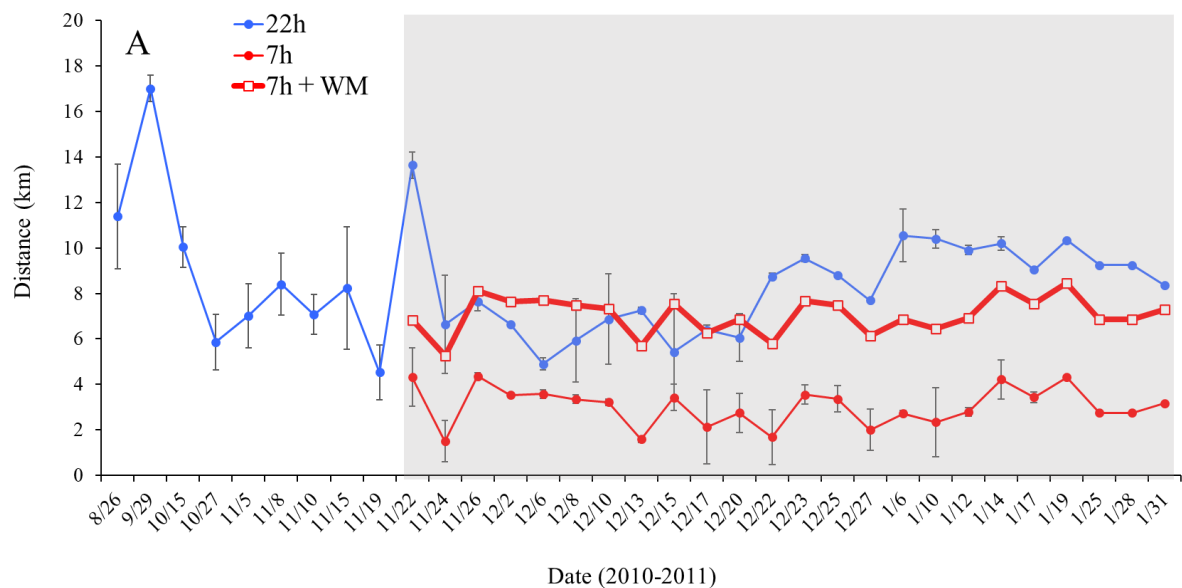
II-3-1 放牧地での移動距離

放牧地での 1 日の平均移動距離については、昼放牧のみでは 3.03 ± 0.10 km であったのに対して、昼放牧と WM 運動を組み合わせる昼 W 群は 8.03 ± 0.27 km であった。昼 W 群は、WM 運動によって昼夜群の 8.31 ± 0.16 km と概ね同等の移動距離を確保することが可能であったが、両群間に有意差は認められなかった（図 II-9-A, 図 II-9-B）。また、昼夜群及び昼 W 群は、昼放牧のみの移動距離と比べて有意に高値であった（ $P < 0.05$; 図 II-9-B）。

II-3-2 一般生理状態（体温、血液所見）

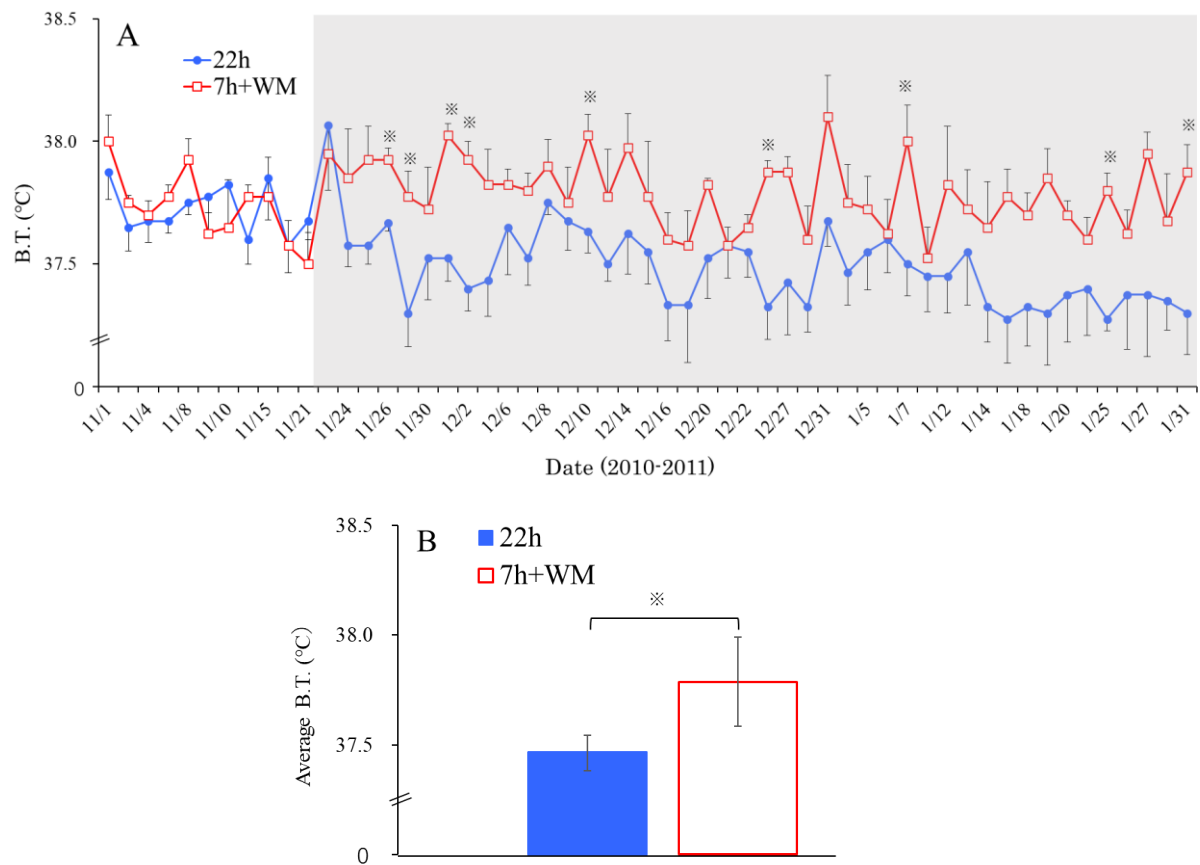
朝 8 時の平均体温（直腸温）は、実験開始 2 日目以降、昼夜群は昼 W 群と比べて低値を示した（図 II-11）。特に、11 月 26 日、11 月 29 日、12 月 1 日、12 月 2 日、12 月 10 日、12 月 24 日、1 月 7 日、1 月 25 日及び 1 月 31 日の体温は、昼夜群が昼 W 群と比べて有意に低値であった（ $P < 0.05$ ）。また、本実験期間中の平均体温を比較すると、昼夜群は $37.47 \pm 0.14^{\circ}\text{C}$ で、昼 W 群の $37.79 \pm 0.11^{\circ}\text{C}$ と比べて有意に低値であった（ $P < 0.05$; 図 II-10）。

白血球数（WBC）（図 II-11-A）およびヘマトクリット値（Ht）（図 II-11-B）は、両群間で有意差を認められなかった。



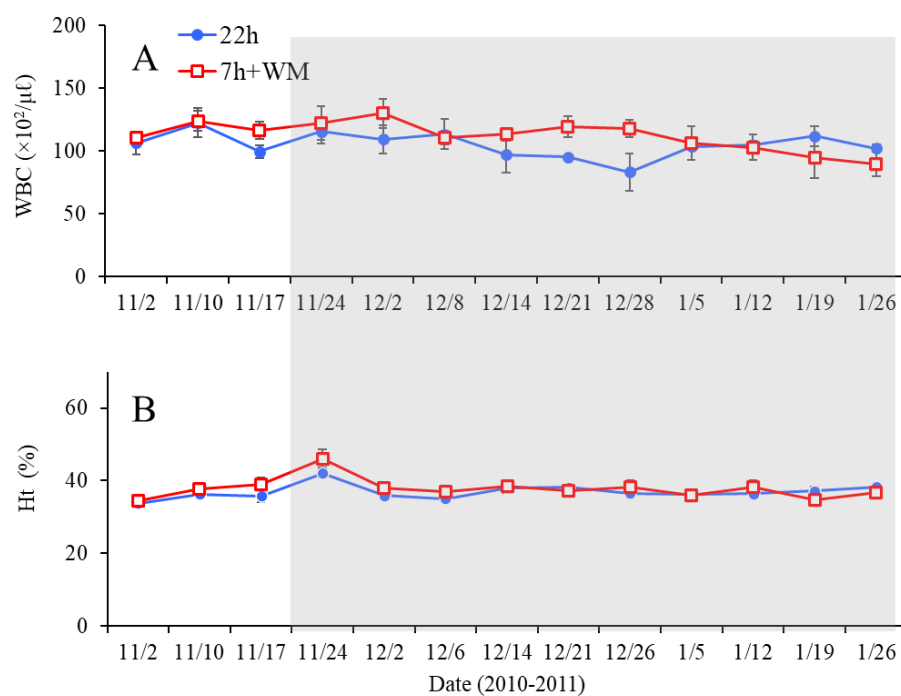
図II-9 放牧地内での移動距離

A; 昼夜群の移動距離 (●; 22h n=4) と昼放牧のみの移動距離 (●; 7h n=4) 及び昼放牧と WM 運動を加えた昼 W 群の移動距離 (□; 7h+WM n=4) の推移。結果は平均値±標準誤差で示した。網掛けは昼 W 群の実施期間を示した。縦軸ラベルの Distance は供試馬の移動距離 (km)を示した。B; 昼夜群の平均移動距離 (■; 22h n=4)、昼放牧のみの平均移動距離 (■; 7h, n=4) 及び昼 W 群の平均移動距離 (□; 7h+WM, n=4) を示した。縦軸ラベルの Average Distance は群の平均移動距離 (km)を示した。結果は平均値±標準誤差で示した。異なるアルファベットは群間の有意差を示した ($P<0.05$)。



図II-10 平均体温

A; 昼夜群 (●; 22h n=4) と昼 W 群 (□; 7h+WM n=4) における朝 8 時の平均体温の推移。結果は平均値±標準誤差で示した。網掛けは昼 W 群の実施期間。縦軸ラベルの BT は体温 (直腸温) を示した。B; 本実験期間における昼夜群 (■; 22h n=4) と昼 W 群 (□; 7h+WM n=4) の平均体温の比較。縦軸ラベルの Average BT はそれぞれの群の平均体温 (直腸温) を示した。結果は平均値±標準誤差で示した。※は群間の有意差を示した ($P<0.05$)。



図II-11 WBC 及び Ht の推移

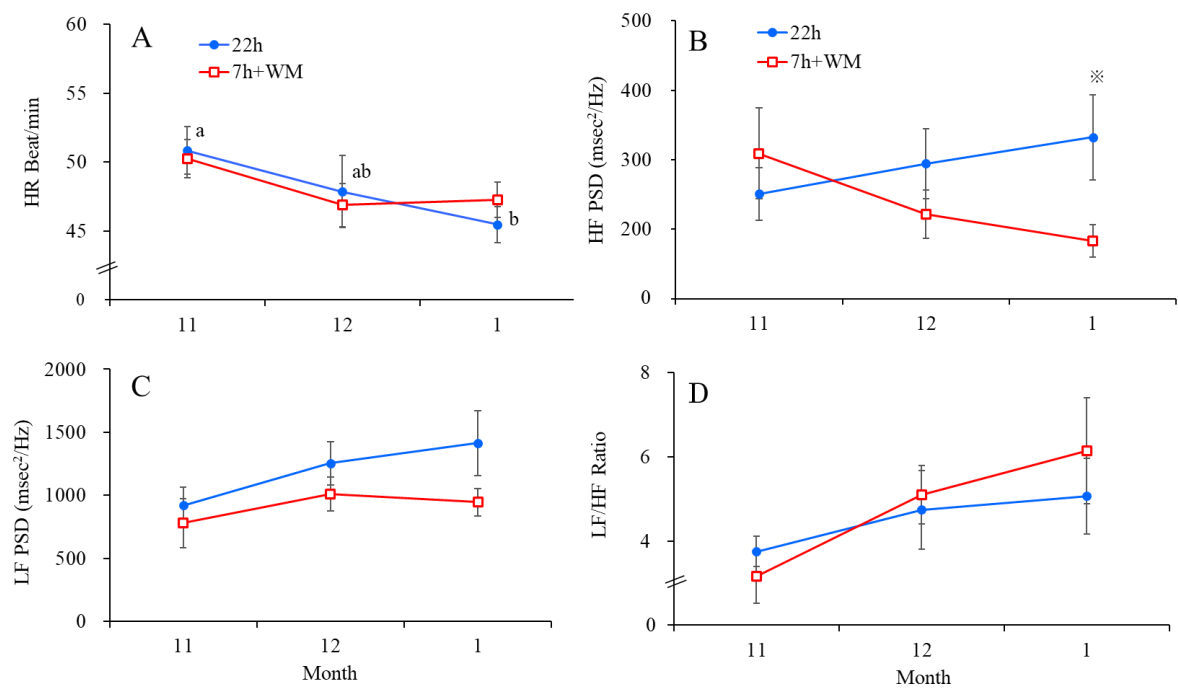
A; 昼夜群 (●; 22h n=4) と昼 W 群 (□; 7h+WM n=4) における本実験期間 (2010 年 11 月 1 日から 2011 年 1 月 31 日) の WBC の推移。結果は平均値±標準誤差で示した。B; 本実験期間における Ht の推移。結果は平均値±標準誤差で示した。網掛けは昼 W 群の実施期間。

II-3-3 心拍変動解析

昼夜群の安静時心拍数 (HR beat/min) は、11 月以降 1 月まで経時的に低下し、1 月値は 11 月値と比べて有意に低値であった ($P<0.05$; 図II-12-A)。副交感神経の活動を反映する HF パワーでは、昼夜群は経時的に上昇したのに対して、昼 W 群は経時的に低下した。また、1 月の HF パワーは、昼夜群が昼 W 群と比べて有意に高値であった ($P<0.05$; 図II-12-B)。交感・副交感の両神経活動を反映する LF パワーでは、昼夜群は 11 月以降 1 月まで経時的に上昇する傾向を示したが、昼 W 群は 11 月からほとんど変化はなかった。LF パワーは昼夜群と昼 W 群との間に有意差は認められなかった (図II-12-C)。LF/HF 比では、昼夜群及び昼 W 群ともに経時的に上昇し、1 月の LF/HF 比では昼夜群が昼 W 群と比べて低値である傾向が観察されたが、個体差が大きく両群間に有意差は認められなかった (図II-12-D)。

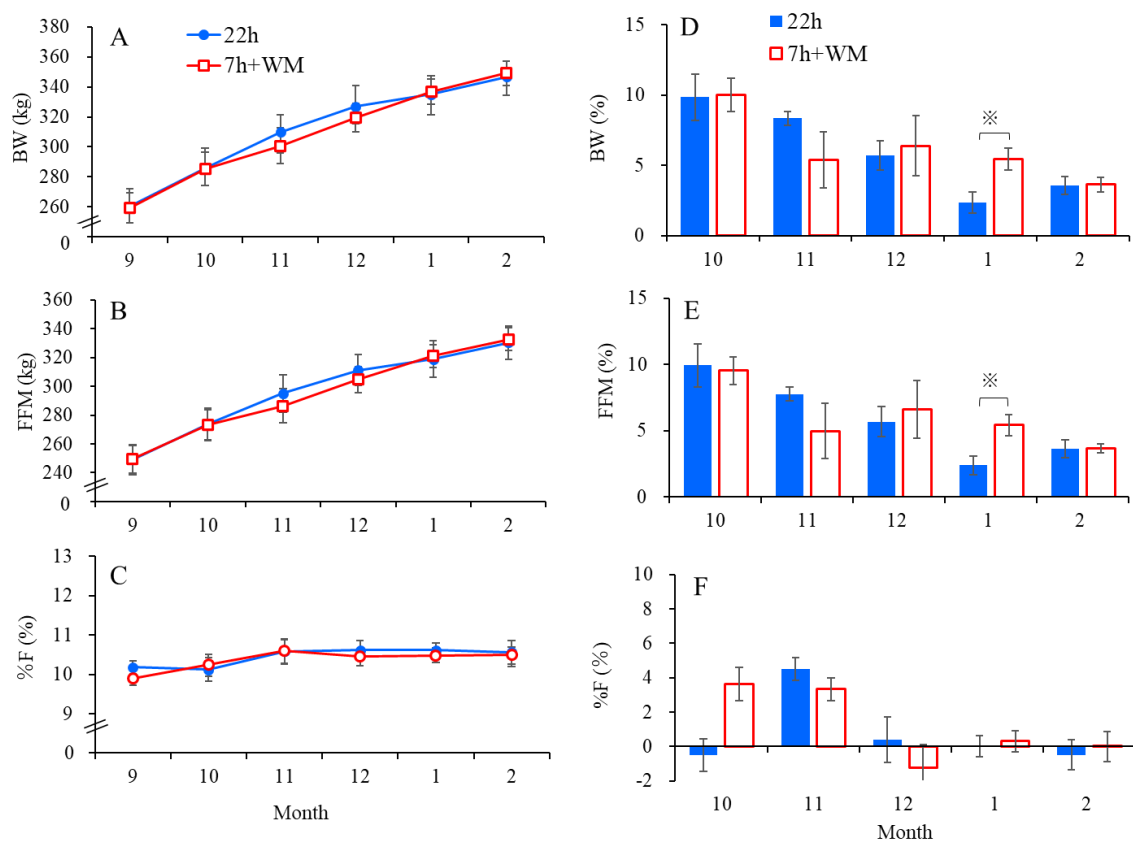
II-3-4 体組成の測定

図II-13 に、2011 年に日高育成牧場で生まれたサラブレッド 8 頭における 2011 年 9 月から 2012 年 2 月までの体組成の変化及び各月増加率を示した。BW、FFM 及び %F の変化では、いずれの月においても両群間に有意差を認めなかった (図II-13-A,B,C)。BW 及び FFM の各月増加率では、1 月において昼夜群は昼 W 群と比べて有意に低値であった ($P<0.05$; 図II-13-D, 図II-13-E)。%F の各月増加率については、12 月以降は大きな変動は少なく、昼夜群と昼 W 群との間に有意差は認められなかった (図II-13-F)。



図II-12 心拍数、HF パワー、LF パワー及び LF/HF 比の変化

昼夜群 (●; 22h, n=11) と昼 W 群 (□; 7h+WM, n=9) における当歳 11 月から 1 歳 1 月までの A; 心拍数、B; HF パワー、C; LF パワー、D; LF/HF 比の変化。結果は平均値±標準誤差で示した。※は同月における群間の有意差を示した ($P<0.05$)。異なるアルファベットは同群における有意差を示した ($P<0.05$)。



図II-13 体組成の推移及び各月増加率

昼夜群 (●; 22h, n=4) と昼 W 群 (□; 7h+WM, n=4) における 2011 年 9 月から 2012 年 2 月までの BW (A)、FFM (B) 及び %F (C) の推移および BW (D)、FFM (E) 及び %F の各月増加率 (F)。結果は平均値±標準誤差で示した。※は同月における群間の有意差を示した ($P<0.05$)。

II-3-5 成長指標の比較

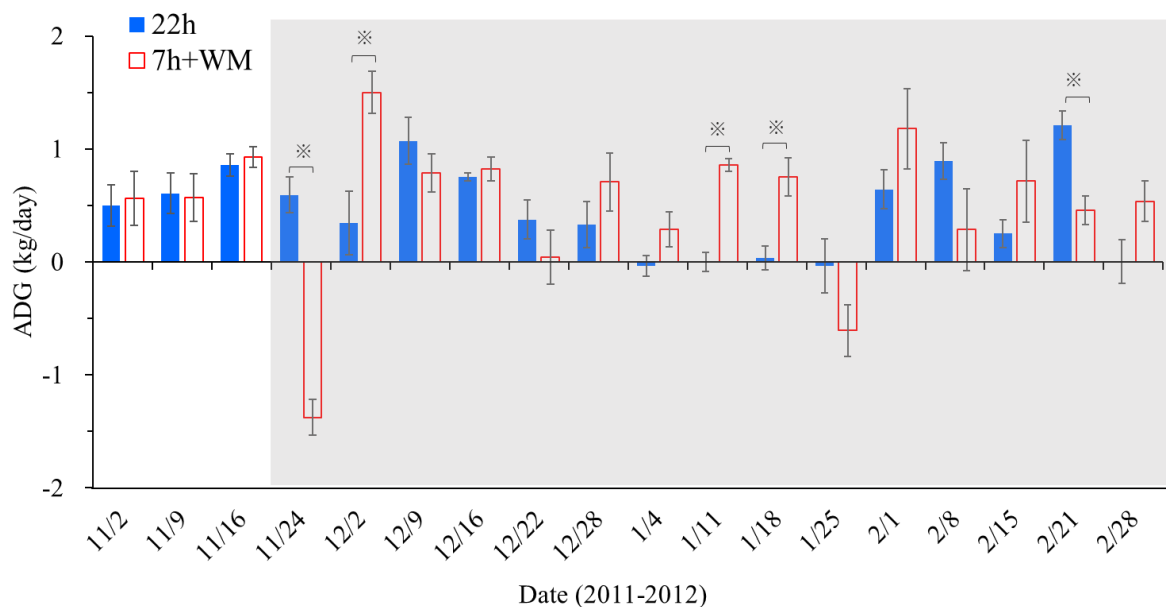
II-3-5-1 ADG

昼夜群の ADG は、1 月 4 日から 1 月 25 日にかけて、著しく低値であった。また、12 月 2 日の週、1 月 11 日の週及び 1 月 18 日の週における ADG では、昼夜群は昼 W 群と比べて有意に低値であった ($P<0.05$)。一方、11 月 24 日の週及び 2 月 21 日の週における ADG では、昼夜群は昼 W 群と比べて有意に高値であった ($P<0.05$; 図II-14)。

両群における 2011 年 8 月 6 日から 2012 年 7 月 9 日までの BW 及び ADG の推移を示した (図II-15)。本研究期間 (2011 年 11 月 21 日から 2012 年 2 月 28 日) 以外の BW 及び ADG の推移は両群ともほぼ同様の増減傾向を示し、両群間に有意差は認められなかった。両群とも 5 月 15 日から 5 月 29 日の週にかけて、代償性[201]と推察される BW および ADG の急激な増加が認められた。

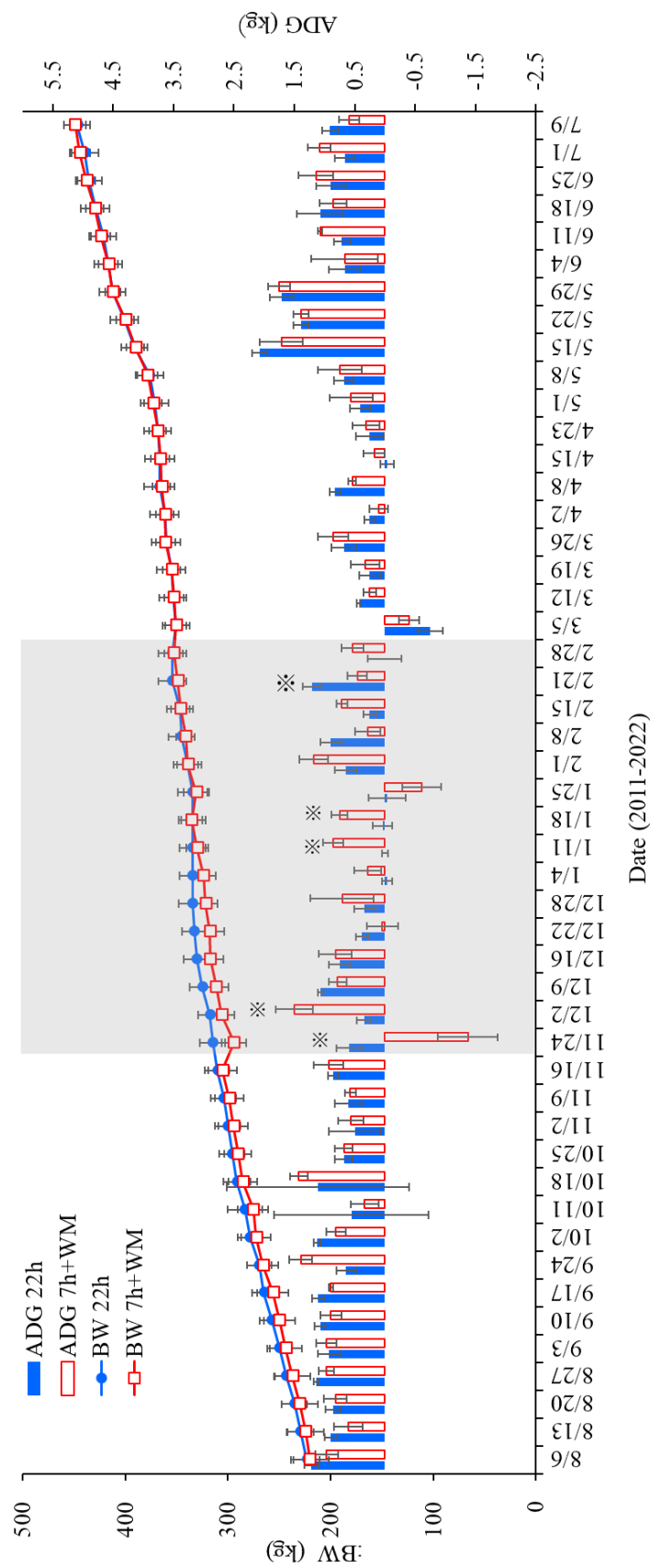
II-3-5-2 成長指標の各月増加率

2010 年、2011 年及び 2012 年に日高育成牧場で出生した 24 頭における当歳 9 月から 1 歳 3 月までの BW、体高、胸囲及び管囲の各月増加率を昼夜群と昼 W 群とで比較した (図II-16)。1 月及び 2 月の BW 増加率では、昼夜群が昼 W 群と比べて有意に低値であった ($P<0.05$; 図II-16-A)。11 月の BW 増加率及び胸囲増加率では、昼 W 群が昼夜群と比べて有意に低値であった ($P<0.05$; 図II-16-A, 図II-16-C)。体高及び管囲では、昼夜群と昼 W 群との間に有意差は認められなかった (図II-16-B, 図II-16-D)。



図II-14 昼夜群と昼W群の ADG

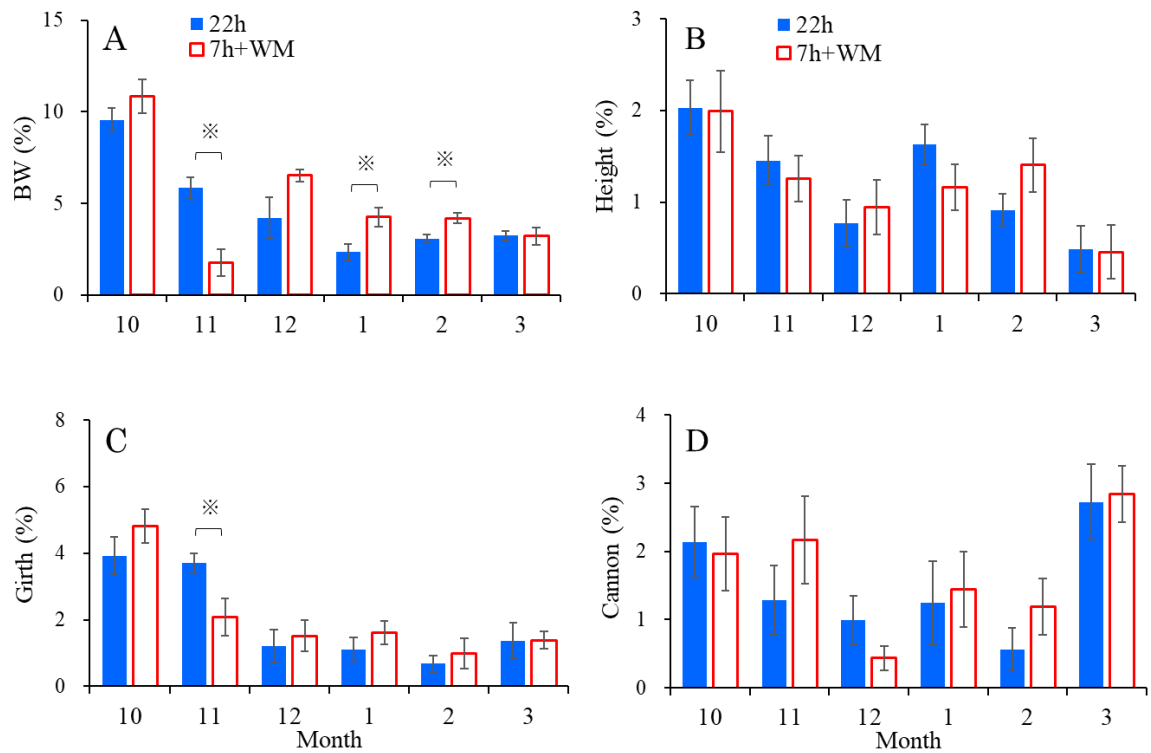
昼夜群（■；22h, n=4）と昼W群（□；7h+WM, n=4）における2011年10月25日から2012年2月28日までの1週間毎のADGの推移。結果は平均値±標準誤差で示した。※は同日における群間の有意差（ $P<0.05$ ）を示した。網掛けは昼W群の実施期間。



図II-15 昼夜群と昼W群におけるBW及びADGの推移

折れ線グラフは、昼夜群（●；22h, n=4）と昼W群（□；7h+WM, n=4）における2011年8月6日から2012年7月9日までのBWの推移。結果は平均値±標準誤差で示した。棒グラフは昼夜群（■；22h, n=4）と昼W群（□；7h+WM, n=4）における1週間毎のADG。結果は平均値±標準誤差で示した。

※は同日における群間の有意差を示した（ $P<0.05$ ）。網掛けは昼W群の実施期間。



図II-16 成長指標の各月増加率

昼夜群（■;22h, n=12）と昼 W 群（□;7h+WM, n=12）における当歳 10 月から 1 歳 3 月までの A; BW、B; 体高、C; 胸囲及び D; 管囲の各月増加率。結果は平均値±標準誤差で示した。※は同月における群間の有意差を示した ($P<0.05$)。

II-3-6 各種ホルモンの血中濃度変化

II-3-6-1 プロラクチン

血中プロラクチン濃度 (pg/ml) の変化を (図II-17-A) に示した。血中プロラクチン濃度は、実験を開始してから 12 月 12 日までは昼夜群が昼 W 群と比べて高値で推移し、12 月 12 日は昼夜群が昼 W 群と比べて有意に高値であった ($P < 0.05$)。しかし、12 月 26 日以降は昼 W 群が昼夜群と比べて高値を示し、1 月 10 日及び 1 月 23 日では、昼 W 群が昼夜群と比べて有意な高値を示した ($P < 0.05$)。

II-3-6-2 コルチゾール

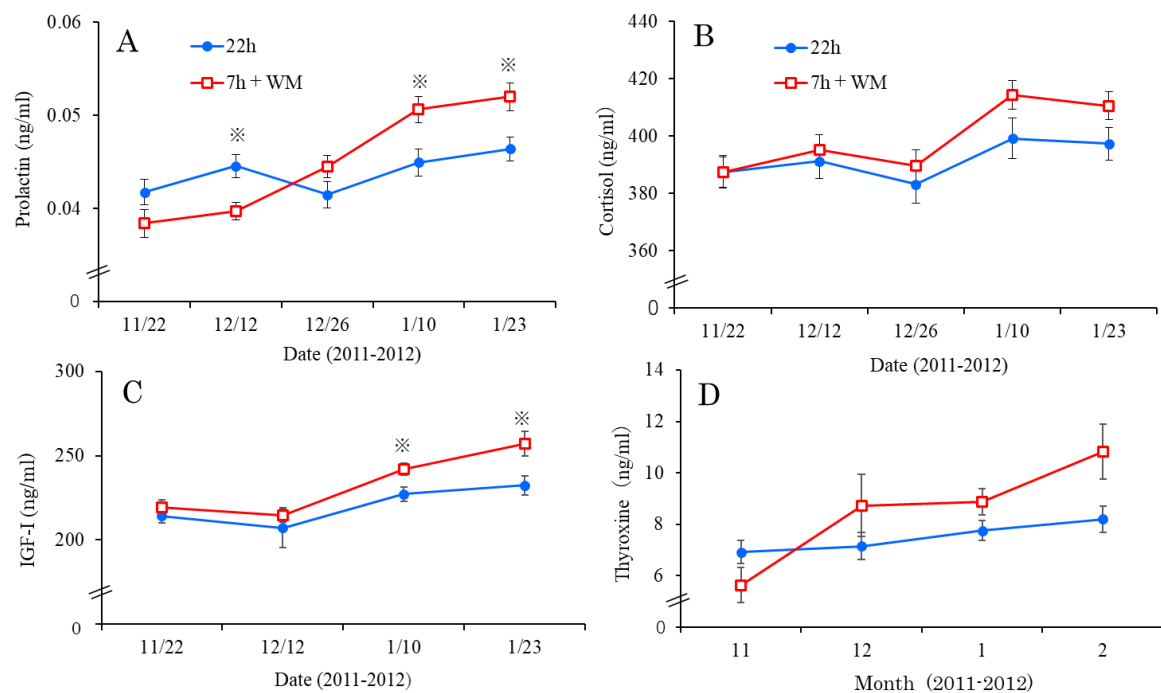
血中コルチゾール濃度 (ng/ml) の変化を (図II-17-B) に示した。血中コルチゾール濃度は、12 月 12 日以降は昼 W 群が昼夜群と比べて高い傾向が観察されたが、両群間に有意差は認められなかった。

II-3-6-3 IGF-I

血中 IGF-I 濃度 (ng/ml) の変化を (図II-17-C) に示した。1 月 10 日及び 1 月 23 日の血中 IGF-I 値は、昼 W 群が昼夜群と比べて有意に高値であった ($P < 0.05$)。

II-3-6-4 サイロキシン

毎月の血中サイロキシン濃度 (ng/ml) の変化を、(図II-17-D) に示した。12 月以降の血中サイロキシン濃度は、昼 W 群が昼夜群と比べて高い傾向が観察されたが、両群間に有意差は認められなかった。



図II-17 血中プロラクチン、コルチゾール、IGF-I及びサイロキシン濃度の変化

A; 血中プロラクチン濃度の変化。昼夜群 (●; 22h, n=16, 日高育成牧場 4 頭、C 牧場 12 頭) 及び昼 W 群 (□; 7h+WM, n=22, 日高育成牧場 4 頭、A 牧場 10 頭、B 牧場 8 頭)。B; 血中コルチゾール濃度の変化。昼夜群 (●; 22h, n=24, 日高育成牧場 4 頭、C 牧場 20 頭) 及び昼 W 群 (□; 7h+WM, n=24, 日高育成牧場 4 頭、A 牧場 10 頭、B 牧場 10 頭)。C; 血中 IGF-I 濃度の変化。昼夜群 (●; 22h, n=12, 日高育成牧場 4 頭、C 牧場 8 頭) 及び昼 W 群 (□; 7h+WM, n=12, 日高育成牧場 4 頭、A 牧場 4 頭、B 牧場 4 頭)。D; 血中サイロキシン濃度の変化。昼夜群 (●; 22h, n=12, 日高育成牧場 12 頭) 及び昼 W 群 (□; 7h+WM, n=12, 日高育成牧場 12 頭)。結果は平均値±標準誤差で示した。※は同日における群間の有意差を示した ($P<0.05$)。

Ⅱ-3-7 昼夜群と昼 W 群の被毛の外貌比較

1 歳の 2 月上旬に撮影した両群の代表的な写真を図Ⅱ-18 に示した。昼夜群は昼 W 群と比べて、被毛が密に生え、また、冬毛の長さが長くなる現象が外貌から観察された。

Ⅱ-3-8 日高地方の最深積雪量、日平均気温及び日最低気温の日別変化

供試馬の成長と気候との関連を考察することを目的として、気象庁の観測データを用いて、日高育成牧場（142°12'E-42°51'N）の存在する北海道浦河郡浦河町浦河管区気象台における 2010 年 11 月 22 日から 2011 年 2 月 28 日までの最深積雪量、日平均気温及び日最低気温の日別変化を図Ⅱ-19 に示した。1 月は日平均気温が 0℃を下回る日が多く、日最低気温が－10℃を下回る日もあった。また、放牧地は 12 月 25 日から 2 月 14 日まで積雪で覆われていた。本研究期間の平均気温は $0.56 \pm 0.60^{\circ}\text{C}$ 、平均最低気温は $-2.65 \pm 0.59^{\circ}\text{C}$ 、平均最深積雪量は $4.18 \pm 0.67\text{ cm}$ であった。

Ⅱ-3-9 昼夜群と昼 W 群の競走成績比較

本研究に供した 64 頭について、生涯総賞金及び 2 歳時総賞金における平均値と中央値を比較した（表Ⅱ-5）。中期育成後に何らかの理由で競走馬として出走できなかった馬の合計頭数は、昼夜群では 32 頭中 3 頭、昼 W 群では 32 頭中 6 頭であった。生涯総賞金の平均値では、昼夜群が $2,131.0 \pm 1,192.0$ 万円、昼 W 群が $3,162.2 \pm 1,072.5$ 万円で、昼 W 群が高値を示したが個体差が大きく両群間に有意差は認められなかった。生涯総賞金の中央値は昼夜群が 680 万円、昼 W 群が 517.6 万円で両群間に有意差は認められなかった。2 歳時総賞金の平均値の比較では、昼夜群は 394.7 ± 153.4 万円、昼 W 群が 308.7 ± 111.1 万円で、両群間に有意差は認められなかった。2 歳時総賞金の中央値では、昼夜群が 0 万円、昼 W 群が 48.6 万円であった。

A



写真提供；日高育成牧場

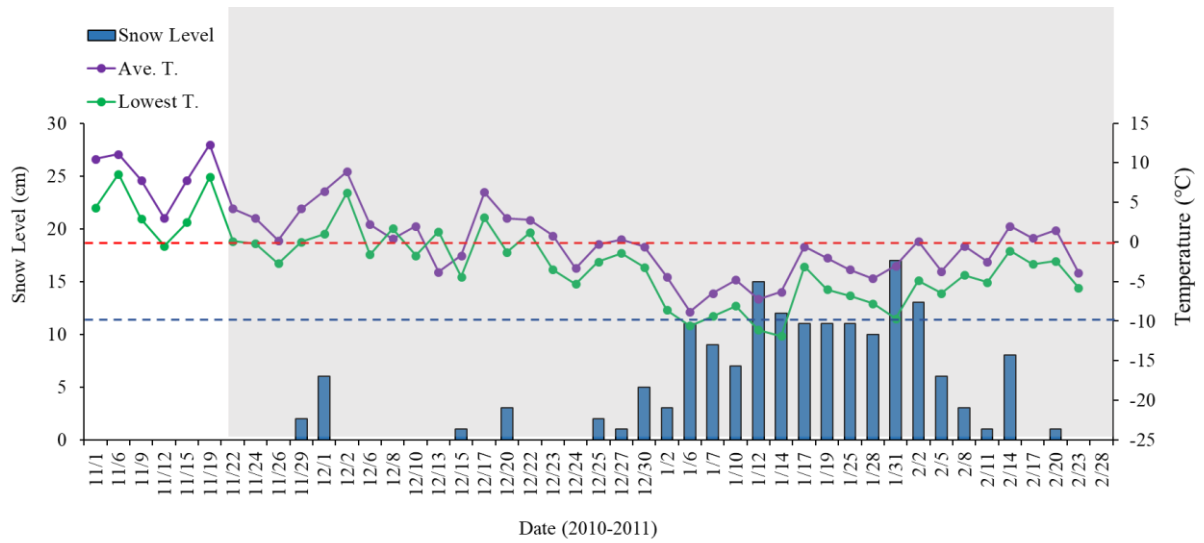
B



写真提供；日高育成牧場

図II-18 昼夜群及び昼 W 群のサラブレッドの外貌

A; 昼夜群の外貌写真（2月10日）。B; 昼 W 群の外貌写真（2月12日）。
※剃毛部は心電図電極を設置した部位。



図II-19 浦河管区気象台における気象データの日別変化

2010 年 11 月 22 日から 2011 年 2 月 28 日までの（■;日最深積雪量 Snow Level）（●;日平均気温 Ave. T.）および（●;日最低気温 Lowest T.）の日別変化。

表II-5 昼夜群と昼 W 群の競走成績の比較

	number unraced		starts	wins	life time earning (¥10K)		2-year-old earning (¥10K)	
					average	median	average	median
22h	32	3	21.7 ± 4.1	1.5 ± 0.4	2,131.0 ± 1,192.0	680	394.7 ± 153.4	0
7h+WM	32	6	35 ± 5.8	3.6 ± 0.6	3,162.2 ± 1,072.5	517.6	308.7 ± 111.1	48.6

昼夜群（22h; n=32）と昼 W 群（7h+WM; n=32）における日本中央競馬会及び地方競馬での競走成績を示した。不出走頭数（unraced）、出走数（starts）、勝利数（wins）、生涯総賞金（life time earning）の平均値（average; 万円）及び中央値（median; 万円）、2 歳時総賞金（2-year-old earning）の平均値（average; 万円）及び中央値（median; 万円）を示した。

II-4 考察

II-4-1 厳寒期の放牧管理

北海道は冬期の寒さが厳しいことから、中期育成期に放牧管理によって子馬の運動量を確保するとともに健全な発育を促すことが課題となっている。本研究では、昼夜群と昼 W 群を比較し、成長、生理機能及び内分泌機能の観点から検討した。

Tanabe ら[244]は、GPS を用いて、日高育成牧場で飼育する 5 ヶ月齢の離乳した中期育成馬における 21 時間の昼夜放牧中の移動距離を解析したところ、 9.7 ± 1.2 km であったと報告している。そのうち、地面の牧草を採食しながらの移動距離は 6.7 ± 0.8 km、単に移動した距離は 3.0 ± 0.8 km であった[244]。さらに、昼夜放牧中の行動を解析すると、地面の牧草を採食していた時間は 796 ± 40 分（約 13.25 時間）、食べずに休息していた時間は 435 ± 57 分（約 7.25 時間）と報告している[244]。したがって、放牧地の積雪や凍結のために地面に生えた牧草を採食することが困難である厳寒期の北海道では、放牧地での移動距離が少なくなることが予想された。そのため、本研究では昼夜群及び昼 W 群ともに 1 日 2 回のアルファルファ牧草給与を、放牧地の隅で場所を変更しながら与えるなど、給餌時に供試馬を移動させる工夫によって移動を促した。その結果、昼夜群は 8.31 ± 0.16 km の移動距離を得た。一方、昼 W 群は WM 運動による移動距離を加算することによって、22 時間の昼夜放牧とほぼ同等である 8.04 ± 0.27 km の移動距離を得ることが判明した。

寒冷環境下で飼育されるウマが基礎代謝を維持することができる外気温の下臨界温度 (Lower Critical Temperature: LCT) は、年齢、品種、栄養状態などによって異なる[18,164]が、 -15°C [159]あるいは -11°C [47]であったと報告されている。一方、ウマは厳寒期に放牧地で飼育された場合、被毛が密に生えるとともにその長さも伸びることから、LCT よりも低温であっても、シェルターなどの風雪を凌ぐ施設を設置することによって健康に飼育することが可能と報告されている[31,46,113,163,270]。本研究では、昼夜群は昼 W 群と比べて被毛が密に生え、また、冬毛の長さが長くなる現象が観察された。さらに、ウマは摂取した牧草の植物繊維を大腸や盲腸で消化する際に微生物の働きによって熱を発生することも、冬期に耐寒性に優れている理由の一つといわれている[46,73]。

本研究では、1月に最低気温が -10°C を下回る日があるなど、寒さが厳しい日もあったが、血中 Ht や WBC は両群ともに正常値を示したことから、昼夜群は脱水や呼吸器感染症などの臨床的な異常はなく健康に飼育されたと推察された。一方、昼 W 群は、本研究のプロトコールによる WM 運動によって、運動器疾患を発症することはなかったことから、子馬にとって安全な冬期における管理方法であると推察された。

II-4-2 厳寒期における成長と体組成

サラブレッドの ADG は、出生後間もない時期では $1.4\sim 1.6\text{ kg/日}$ と最も高く、5ヶ月齢から7ヶ月齢で $0.8\sim 0.85\text{ kg/日}$ 、7ヶ月齢から9ヶ月齢で $0.6\sim 0.8\text{ kg/日}$ 、そして9ヶ月齢から13ヶ月齢では $0.4\sim 0.6\text{ kg/日}$ 程度にまで減少することが報告されている[32,63,109,205]。昼 W 群の1月における ADG は $0.49\pm 0.05\text{ kg/日}$ で、過去の報告[32,109,277]と概ね同等だったのに対して、昼夜群は $0.12\pm 0.03\text{ kg/日}$ と低値を示した。各月の BW 及び FFM は、両群とも成長にともない経時的に増加したが、1月における各月増加率では、昼夜群は昼 W 群と比べて有意に低値を示した。当歳馬の体組成変化に関する報告は少ないが、クォーターホース種における5ヶ月齢までの %F 推移では、出生時が 9.30%、5ヶ月齢が 9.52%であったと報告されている[96]。また、Filho ら[67]は、スタンダードブレッド種における出生時の %F は 8.64%、6ヶ月齢では 11.52%であったと報告している。本研究では、上記報告と同様の方法で %F を算出したが、両群とも12月以降の %F は 10%程度で安定的に推移したことから、皮下脂肪は寒冷時の保温に一定の役割を担っている可能性が示唆された。一方、昼夜群における1月の FFM 増加率は低値であったことから、昼夜群の給餌量は、耐寒のための可消化エネルギー要求量を満たしていなかった可能性[46]が推察された。本研究では競走馬飼養標準[63]で推奨される量よりも可消化エネルギーを 25% から 42% 高くなるよう給餌した。Cymbaluk [44-47]は、平均気温が -10°C 以下の環境でウマを飼育する場合には、耐寒のための可消化エネルギー要求量を 23% ~ 64% 増加させる必要があるかもしれないと指摘していることから、北海道の厳寒期に中期育成期のサラブレッドを昼夜放牧で飼養管理する場合には、さらに可消化エネルギー量を増加することを考慮する必要性も示唆された。

本研究において、11月16日から24日の週及び2月15日から21日の週のADGにおいては、昼W群が昼夜群と比べて低値であった。11月16日から24日の週における昼W群のADGが低値であった理由として、放牧時間が22時間から7時間に短縮されたことによって放牧地での牧草採食量が減少したこと及び放牧地変更によって新規環境を認識するために、当歳馬の運動量が一時的に増加したことによると推察された。また、11月のBW及び胸囲の各月増加率では、昼W群は昼夜群と比べて有意に低値であった。ウマのBWと胸囲は直接的に相関することが報告されており[46,210]、飼育環境の変更によって、胸囲は体重減少に伴って低下したと考えられた。昼夜放牧から昼放牧に変更する際には、急激な体重減少を予防するため、段階的に放牧時間を短縮するなどの工夫が必要と考えられた。2月15日から21日の週において、昼夜群のADGが昼W群と比べて高値だった理由は不明である。その週の気温が比較的高かったことや前後に昼夜群のADGが低値を示していることから、一時的に採食量が増加した可能性が示唆された。

II-4-3 低温環境下の生理反応

本研究において、体温では、昼夜群は昼W群と比べて低値であった。また、安静時の心拍数では、昼夜群の1月値は11月値と比べて有意に低下し、心拍変動解析で得られた副交感神経活動を反映するHFパワーでは、1月において昼夜群は昼W群と比べて有意に高値であったことから、昼夜群では副交感神経活動が優勢であったと推察された。低温環境に長時間飼育されたモウコノウマで心拍変動解析をした研究[213]では、心拍数の低下及び別の副交感神経活動の指標で心拍間隔のゆらぎであるRMSSD値（root mean square successive difference；連続して隣接するRR間隔の差の2乗の平均値の平方根）が上昇したことが報告されている。

恒温動物では、日内変動あるいは季節変動する環境温度に対して深部体温を維持する調節機構を有しているが、低温環境で長時間を過ごした昼夜群は、昼W群と比べて体温が有意に低値を示した。一般的に、恒温動物が低温環境下で熱産生を行い体温を維持する反応は、以下のように解釈されている。環境の低温情報は皮膚の冷受容器から脊髄に中継された後、脳幹の外側腕傍核を介して、

体温調整中枢である視床下部の視索前野に伝達される[180-182,276]。さらに、伝達された低温情報は、視索前野から視床下部の背内側核及び交感神経の調節に関する延髄の吻側縫線核で中継され、脊髄にある交感神経の出入力ニューロンへと伝達される[183]。その結果、末梢血管が収縮することで血液量が減少し熱の放散が抑制される。また、骨格筋のふるえによる熱産生が行われ、体温の恒常性が維持される[137,184]。さらに、視床下部からの甲状腺刺激ホルモン放出ホルモン、脳下垂体前葉からの甲状腺刺激ホルモン、甲状腺からサイロキシンの分泌が促進され、基礎代謝を促進するとともに熱を産生する[30,159,203]。また、ヒトを含む恒温動物における低温環境下の適応として、褐色脂肪細胞 (Brown Adipose Tissue: BAT) からの熱産生が特に重要と考えられている[23,152,268,269]。この反応は、交感神経神経終末から放出されるノルアドレナリンが BAT で受容され、ミトコンドリア内に存在する共役蛋白質 (Uncoupling Protein 1: UCP1) を活性化することによって、熱が産生される[19,38,48,184]。また、低温環境下では褐色脂肪組織が増大するとともに、BAT における UCP1 の量が増加することが報告されている[27]。さらに、寒冷刺激によって白色脂肪組織 (White Adipose Tissue: WAT) 内の前駆細胞からベージュ脂肪細胞と呼ばれる BAT が誘導され、ベージュ脂肪細胞においても同様に熱が産生される[232,274,280]。加えて、WAT から分泌されるレプチンは、交感神経の活性化を介して BAT における UCP1 の熱産生を増大させることが報告されている[86,87]。

一方、恒温動物が低温環境で飢餓や食餌の制限下にある場合、生体は BAT のよる熱産生を減少させ体温や代謝を低下させることで、生体を低温環境に適応させることが報告されている[127]。ラットでは、飢餓の刺激によって、胃で産生されるペプチドホルモンであるグレリン[128,187,248]が血中に放出され、視床下部弓状核のニューロペプチド Y(neuropeptide Y: NPY)を発現するニューロン群を活性化することが報告されている[127]。このニューロンの軸索終末から放出された NPY は、視床下部室傍核に作用し、延髄の網様体領域に存在する GABA 作動性ニューロンを活性化し [186]、その結果、延髄縫線核の交感神経プロモーターニューロンが抑制[186]され、BAT における UCP1 の熱産生を抑制する [60,186]。この反応は、恒温動物が低温環境下で生存するために、代謝

や体温を低下させることによってエネルギー消費を節約するために行われると考えられている[186]。大型恒温動物であるヒツジ[61]、ヘラジカ[79]、アカシカ[260]、モウコノウマ[13,213]及びシェットランドポニー[28,29]では、低温環境下における食餌量の減少から生体を防御することを目的に、代謝率を低下させ、体温や心拍数を低下する反応を示すことが報告されている。

本研究における昼 W 群は、昼夜放牧から昼放牧に移行した翌日に大きく BW が減少したが、その後は BW 及び FFM が緩やかに増加した。一方、昼夜群では、同量の飼料を給餌していたにも関わらず、1 月 4 日から 1 月 25 日の週までほとんど ADG の増加が観察されなかった。また、1 月の BW 増加率や FFM 増加率において、昼夜群が昼 W 群と比べて低値であったことから、耐寒のための可消化エネルギー要求量が不足していた可能性が示唆された。そのため、低温環境下における飢餓と同様の反応が生じ、体温や代謝の低下が認められたと推察された。

一方、昼 W 群では BW や FFM が増加し馬体が増体していることから、維持エネルギー量は充足されていたものと推察された。低温環境下での食餌量不足によって、昼夜群では褐色脂肪熱産生に代表される熱産生が抑制され、サラブレッドにおいても生存のためにエネルギー消費を抑制する反応[13,28]が生じていた可能性が推察された。

II-4-4 内分泌機能の比較

血中プロラクチン、コルチゾール及び IGF-I 濃度では、1 月において、いずれも昼 W 群が昼夜群と比べて高値である傾向が観察され、プロラクチン及び IGF-I については有意差を認めた。また、血中サイロキシン濃度では、12 月以降において、昼 W 群が昼夜群と比べて高値である傾向が観察された。ウマの血中プロラクチン濃度は、長日期（夏期）に上昇し、短日期（冬期）に低下する季節性を有し[54,110]、出生後数ヶ月のウマにおいても同様の傾向を示す[55]。また、血中プロラクチン濃度は、運動負荷などのストレスによっても上昇することが報告されている[126,249,251]。本研究において昼 W 群は昼夜群と比べて 1 月の血中プロラクチン濃度が高値であった。このことは、昼夜群と昼 W 群はほぼ同様の移動距離であったにも関わらず、昼夜群の自然な移動と比べて昼

W 群の WM（時速 6km/時×60 分）による運動負荷の方がストレスが大きかったと推察された。運動負荷によって、成長ホルモン[126,249,251]やコルチゾール[135,136,150,240]も分泌されることが報告されている。IGF-Iは、成長ホルモンによって肝臓から分泌が促進される[148]が、成長組織の中でも合成され、骨の成長促進[148]や筋の肥大促進作用[2,52]を有する。また、IGF-Iは身体トレーニングによっても分泌が促進され、筋タンパクの合成を促進することが報告されている[94,229,230,236]。これらのことから、WM 運動によって成長ホルモンの次いで IGF-Iの分泌が促進された結果、昼 W 群における 1 月の FFM 及び BW 増加率が昼夜群と比べて高値であったと推察された。

本研究では、血中サイロキシン及びコルチゾール濃度において、昼夜群は昼 W 群と比べて低値である傾向が観察された。通常、低温環境において哺乳類では体温や代謝を維持するためにサイロキシン [24,42,159,245]やコルチゾール[84,158,203]の分泌が促進され、その結果、代謝率が向上し熱産生が増加する[61]。視床下部－下垂体－甲状腺軸は、個体の栄養状態や WAT から分泌されるレプチン[3,70,155]によっても制御されている。レプチンは血流を介して視床下部背内側部に作用して BAT の UCP1 から熱を産生する[86]が、生体が飢餓状態にある際にはレプチンの分泌が抑制され[3]、BAT からの熱産生を抑制するとともに、サイロキシン分泌も低下させることが報告されている[3]。このことは寒冷時に代謝を低下させることによって生体を防御することにも役立つと考えられている[25]。Brinkmann ら[30]は、シェットランドポニーでは、冬期に採食量を制限しなかったグループでは血中サイロキシン濃度は上昇したが、制限したグループでは血中サイロキシン濃度が上昇しなかったことを報告している。さらに、冬期に－40℃まで低下する厳しい寒さの中で放牧管理されているアイスランドホースでは、十分な採食と寒さをしのぐシェルターがあれば、サイロキシンの分泌は－40℃の環境下においても低下しなかったことが報告されている[163]。本研究において、1 月における昼夜群の夜間飼育環境は、昼 W 群と比べて気温が低く、厳しい環境であったと推察された。昼夜群は、昼 W 群と比べて耐寒のための維持エネルギー量が不足したことから、代謝を低下させるためにサイロキシンの分泌が低値を示したと推察された。

本研究で、昼夜群と昼 W 群の競走成績を比較したところ、生涯総賞金の平均

値では、昼夜群が $2,131.0 \pm 1,192.0$ 万円、昼 W 群が $3,162.2 \pm 1,072.5$ 万円、中央値では昼夜群が 680 万円、昼 W 群が 517.6 万円で両群間に有意差は認められなかった。1997 年から 2012 年までの期間に、日本で誕生したすべての子馬の出生年ごとの競走成績を調べた Fawcett ら [66] によると、毎年の生涯総賞金の平均では 1,288 万円から 1,532 万円、中央値では 75 万円から 130 万円であったと報告されている。本研究に供試した民間牧場に繋養する馬の資質などの要素を考慮すると、単純な比較は困難であるが、どちらの厳寒期管理方法においても競走馬として一定のパフォーマンスを発揮することができる可能性が示唆された。一方、出走することができなかった頭数の割合では、昼 W 群で 32 頭中 6 頭 (18.8%) で、昼夜群の 32 頭中 3 頭 (9.3%) に対して高い傾向が認められた。しかし、本研究において競走馬として出走することができなかった症例の明確な理由を明らかにすることはできなかった。

本研究の結果から、昼放牧に WM 運動を併用する方法は運動量を確保することができるのみならず、運動負荷によってプロラクチンや成長ホルモンの分泌を促進する [126] ことから、厳寒期に馬体の成長を促すうえで効果的な方法であることが明らかになった。一方、昼夜放牧管理は、冬期の成長抑制が強いことから、市場で馬を取引するマーケットブリーダーにとっては必ずしも推奨される方法ではない可能性が示唆された。しかし、厳寒期以降の成長曲線において、昼夜群と昼 W 群の間に差が認められず、さらに、昼夜群と昼 W 群の競走成績の比較において両群間の差は認められなかったことから、自身でサラブレッドを所有して出走させるオーナーブリーダーにとっては、必ずしも否定的にとらえなくてもよい可能性も示唆された。本研究で明らかになった厳寒期の昼夜放牧における成長抑制や生理的なデメリットを改善するためには、保温を目的とした馬服着用、代謝維持を目的とした WM の併用及び養分要求量を満たすための飼料増加などは有効かもしれない。また、当歳の 12 月から長日処理を実施することによって冬毛の換毛や性腺機能賦活が促進されることが報告されている [83] ことから、ライトマスクを装着しての昼夜放牧 [171, 197] も有効である可能性がある。厳寒期における最適な放牧管理技術の開発については、今後もさらなる研究が必要である。

Ⅱ-5 小括

本研究によって、北海道の厳寒期における中期育成期の管理方法がサラブレッドの生理機能や成長に及ぼす影響が明らかになった。昼夜放牧では、外気温の低下によって体温は低下し、また、安静時心拍数も低下し副交感神経の活動が優位となった。さらに、低温下で甲状腺ホルモンの分泌が増加しなかったことから、代謝も抑制されていたと推察された。これらのことから、サラブレッドにおいても、他の野生草食動物と同様[13,79,260]に、厳しい低温環境から生体を防御するために代謝を抑制する反応[28]が備わっていると推察された。一方、昼放牧と WM 運動を組み合わせる方法は、プロラクチン及び IGF-I の分泌が増加し、また、代謝や成長の抑制は認められなかったことから、本研究の生理学的所見からは、効果的な厳寒期の管理方法であろうと推察された。しかし、冬期以降の成長曲線や競走期の成績において、昼夜群と昼 W 群の間に差が認められなかったことから、冬期の昼夜放牧管理方法の採用は、自身でサラブレッドを所有して出走させるオーナーブリーダーにとっては、必ずしも否定的にとらえなくてもよい可能性も示唆された。今後のさらなる研究が必要である。

第Ⅲ章

サラブレッド種の後期育成期における気候環境が成長及び内分泌機能に及ぼす影響

Ⅲ-1 序文

日本で生産されるサラブレッドの約 98%は寒冷地である北海道で誕生し、そのうちの大多数が約 2 年間の育成期を北海道で過ごす。したがって、国際競争力のある強い馬づくりのためには、北海道の気候や風土に合致した生産育成技術の開発が重要である[194]。一方、冬期に温暖な気候の南九州は、かつては軽種馬の生産や育成が活発に行われてきたが、サラブレッドの生産頭数は大きく減少し、現在では毎年 50 頭程度（国内全体の約 0.7%）を生産しているに過ぎない[250]。南九州地方におけるサラブレッドの生産や育成は縮小したが、冬期に温暖なこの地域は、冬でも放牧地で青草を採食することが可能であることや、馬場が凍結することなく年間を通じて計画的に調教を継続することができることから、競走馬の休養や後期育成を実施するうえで経験的に優れていると評価されている[63,102,156]。

ウマは典型的な長日性季節繁殖動物であり、日本では春から夏に繁殖期を迎える。雄馬は精巣で精子形成が盛んになり[54,55,174]、雌馬では周期的な排卵が繰り返される[162,172]。繁殖雌馬の発情開始は日照時間[129]、気温[9,80]、栄養[63]及びボディコンディション [63,88,264]などの関与によって早期化することが報告されている。冬季に穏やかな気候の南九州における雌の肥育馬では、3 月には排卵が観察される[185]ことが報告されているが、後期育成期のサラブレッドにおける成長や内分泌機能の変化について温暖地と寒冷地を正確に比較した報告はない。

本研究では、日本で生産されたサラブレッドの後期育成期における気候が成長に及ぼす影響を明らかにする目的で、1 歳秋から 2 歳春までの 7 ヶ月間を、冬期に寒冷な日高育成牧場と冬期に穏やかな宮崎育成牧場で後期育成した若馬の体組成指標として BW、RFT、FFM 及び %F を算出し比較した。また、BW、体高、胸囲及び管囲の 4 項目を成長指標として比較し、成長を促進する主要なホルモンである IGF-I の血中濃度を測定した。さらに、性腺機能を促進する 3

種類の下垂体性性腺刺激ホルモン（プロラクチン、LH、FSH）及び性腺から分泌される 3 種類のステロイドホルモン（プロジェステロン、テストステロン、エストラジオール- 17β ）の血中濃度を測定して雌雄馬の性腺機能の発育を内分泌学的に比較した。加えて、サラブレッド種競走馬に対する情動ストレスと運動ストレスの負荷が成長ホルモン及びプロラクチン分泌に及ぼす影響を明らかにする目的で、その血中濃度を測定した。

III-2 材料及び方法

III-2-1 供試馬

本研究には、2003 年から 2011 年に出生したサラブレッド 315 頭（雄 164 頭、雌 151 頭）を用いた。供試馬は 7 月から 8 月に日本国内で開催された 1 歳セリ市場において日本中央競馬会が購買したサラブレッドであり、購買時の体高は 150 cm 以上であった。購買価格や種牡馬の割合が概ね均等になるよう、購買馬を日高育成牧場と宮崎育成牧場で飼育・調教する 2 群に分けた。セリ購買の 1 週間後に日高育成牧場または宮崎育成牧場に輸送した。日高育成牧場では 154 頭（雄 81 頭、雌 73 頭）、宮崎育成牧場では 161 頭（雄 83 頭、雌 78 頭）を飼育した。実験開始時における供試馬の年齢は、19 ヶ月齢から 22 ヶ月齢であった。

全ての実験は、日本中央競馬会日高育成牧場の実験動物委員会の承認（日-2007-5、日-2011-3）を得た後、実施された。

III-2-2 飼養管理及び調教

両育成牧場の育成条件をそろえるために、飼料と運動時間は可能な限り統一した。日高育成牧場（日高）と宮崎育成牧場（宮崎）で飼育した育成馬には、乾草、燕麦、配合飼料（エースレーションおよびパワーマックス；日本農産工業株式会社、横浜）を基本飼料として与え、軽種馬飼養標準（2004 年版）[63]に基づき可消化エネルギーを調整した（表 III-1）。飼料については、6 時、12 時、16 時及び 20 時の 4 回に分けて給餌した。両育成牧場ともに概ね 10 月末までにブレーキングを終了した。騎乗運動時間は約 1 時間で、速歩と駈歩を 30 分間程度行った。騎乗調教前には、WM による常歩運動を約 30 分間行った。調教後は、日高では小パドック（10m×10m）に 1～2 時間放牧しチモシー乾草を給餌し

(図Ⅲ-1-A)、宮崎ではイタリアンライグラスを養生した放牧地(1ha)に1～2時間放牧し、乾草や生草を自由採食させた(図Ⅲ-1-B)。日高及び宮崎ともに計画的に調教強度を漸増し、4月末には、週6日間(月～土)、600m/分～660m/分のスピードをベースに、2,000m～3,200mの距離の駈歩調教を実施した。また、4月には、ラスト400mを分速800m/分～1,000m/分程度のスピードで走行するスピード調教を週1～2回実施した(表Ⅲ-2)。日高育成牧場と宮崎育成牧場の調教施設は異なるが、両育成牧場のスピード調教時には心拍数が200回/分以上、血中乳酸濃度が4mmol/L以上となるよう運動負荷を調整した。また、両育成牧場における調教は、競走馬や乗馬に対する十分な経験があり、体重が50kg以上65kg未満の者が実施した。日高及び宮崎の育成馬における4月末のボディコンディションスコア[88]は、いずれも4.5から5.5の間であった。

表III-1 日高及び宮崎育成牧場における 1 日当たりの給餌量

Month (age)	Oats (kg)	Compound Feed (kg)	Timothy Hay (kg)	Alfalfa Hay (kg)	Digestible Energy DE (Mcal)
10 (1)	1.0	2.5	7.0	0.0	21.0
11 (1)	1.0	3.5	7.0	0.0	24.1
12 (1)	1.0	4.0	7.0	1.0	27.5
1 (2)	1.0	4.0	7.5	1.0	28.3
2 (2)	1.0	4.0	7.5	1.0	28.3
3 (2)	1.0	4.0	7.5	2.0	30.1
4 (2)	1.0	4.5	7.5	2.0	31.6

10 月以降の給餌量を月ごとに示した。

A

日高育成牧場



B

宮崎育成牧場



図III-1 日高育成牧場及び宮崎育成牧場における調教後の放牧

A; 日高育成牧場の小パドック (10m×10m)。B; 宮崎育成牧場の放牧地 (約1ha)。A、Bともに3月上旬に撮影された。

表III-2 1 歳 10 月から 2 歳 4 月までの調教量

Month (age)	Walk(m)	Trot(m)	Canter(m) : <u>Speed (m/min)</u>
10 (0)	1,400	1,000	1,600 : <u>500～600</u>
11 (1)	1,600	800	2,000～2,400 : <u>600</u>
12 (1)	2,400	800	2,000～3,200 : <u>600～660</u>
1 (2)	2,400	800	2,000～3,200 : <u>600～660</u>
2 (2)	2,400	800	2,000～3,200 : <u>600～660</u> Workdays : <u>750 (twice/week)</u>
3 (2)	2,400	800	2,000～3,200 : <u>600～660</u> Workdays : <u>800 (twice/week)</u>
4 (2)	2,400	800	2,000～3,200 : <u>600～660</u> Workdays : <u>800～1,000 (twice/week)</u>

10 月以降の調教量を月ごとに示した。

調教は月～土曜日に実施された。

Workdays（スピード調教時）時のスピードはラスト 400m のものを示した。

III-2-3 体組成の測定

体組成の測定には、2003 年から 2011 年に出生した日高育成馬 32 頭（雄 16 頭、雌 16 頭）及び宮崎育成馬 18 頭（雄 9 頭、雌 9 頭）を用いた。1 歳 10 月から 2 歳 4 月まで、毎月中旬（15 日）に体重計 (TRU-TEST S3, Datamars, Auckland, New Zealand) で供試馬の BW を測定するとともに、超音波画像診断装置 (LOGIQB Book XP Basic, GE Health Care, Hino, Japan) を用いて RFT を測定した。RFT の測定は、股関節と水平の高さで約 5 cm 尾側の部位にあたる大腿 2 頭筋と半腱半膜様筋の間の筋溝部にプローブを当て、B モードにて実施された[102,115,118]。得られた BW と RFT から、Kane ら[115]の式を用いて %F、FFM を算出し、日高育成馬と宮崎育成馬の体組成変化を比較した。

$$\%F = 2.47 + 5.47 \times RFT \text{ (cm)}$$

$$FM \text{ (kg)} = BW \text{ (kg)} \times \%F$$

$$FFM \text{ (kg)} = BW \text{ (kg)} \times (1 - \%F/100)$$

III-2-4 成長の指標

成長に関する解析には、2003 年から 2011 年に出生した日高育成牧馬 154 頭（雄 81 頭、雌 73 頭）及び宮崎育成牧馬 155 頭（雄 80 頭、雌 75 頭）を用いた。成長の指標として、BW、体高、胸囲及び管囲を用い、1 ヶ月に 1 回、月末に測定した。これらの成長指標における 1 歳 9 月から 2 歳 4 月までの増加率及び各月増加率を算出した。

III-2-5 内分泌学的解析

内分泌学的解析に関しては、2007 年に出生したサラブレッド 36 頭を用い、12 頭（雄 6 頭、雌 6 頭）を日高育成牧場で、24 頭（雄 12 頭、雌 12 頭）を宮崎育成牧場で飼育した。

1 歳 9 月から 2 歳 4 月まで、月 1 回頸静脈からヘパリン加採血管を用いて採血し、血中プロラクチン、LH、FSH、IGF-I、プロジェステロン、テストステロン及びエストラジオール-17 β 濃度を測定した[51,53,162,247]。

III-2-6 排卵日の推定

雌馬の排卵時期の解析には、2007年と2008年に出生した30頭（日高育成馬12頭、宮崎育成馬18頭）を用いた。雌馬の血中プロジェステロン濃度が、1ng/ml以上の値を示した7日前を排卵日と推定した[162,172]。

III-2-7 新奇刺激や調教負荷がプロラクチンと成長ホルモン分泌に及ぼす影響

後期育成期の若馬が騎乗馴致で経験する新奇刺激及び調教負荷のモデルとなる情動ストレス及び運動ストレスを供試馬に与え、プロラクチンと成長ホルモンの分泌に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした実験を行った。

III-2-7-1 運動ストレス及び情動ストレスの負荷実験

本実験の材料及び方法を以下に示した。供試馬として、サラブレッド種雄馬4頭（ 48.7 ± 2.4 ヶ月齢、 466 ± 6 kg）を用い、馬用トレッドミル（MUSTANG 2000, Kagra, Fahrwangen, Switzerland）で、情動ストレス及び運動ストレスを負荷した（図III-2）。供試馬に対するトレッドミル上での運動訓練を4週間実施して、事前に走行に十分慣れさせた後に実験を開始した。

III-2-7-2 運動ストレスの負荷方法

本実験では、1頭の同一馬に対して運動ストレスのみを与えたコントロール試験（運動ストレス群）と運動ストレス及び情動ストレスの両方を与えた運動+情動ストレス負荷試験（運動+情動ストレス群）の2種類を実施した。コントロール試験の1週間後に情動ストレス負荷試験を実施した。

本実験時の走行内容を（図III-3）に示した。走行内容は、（1）プレ運動期、（2）歩行運動期、（3）本運動期及び（4）クーリングダウン期の4段階に分けた。プレ運動期では、5分間の速歩と駈歩走行でのウォーミングアップ運動を実施した。歩行運動期では、6分30秒間の常歩による歩行運動を実施した。本運動期では、3分間の強運動として、急激にスピードを上げて110%VHRmax（心拍数と走行速度との相関から算出した最大心拍数の110%に相当する速度[93]）で疲労困憊になるまで駈歩で走行させた。クーリングダウン期では、10分間の常歩運動を実施した。

III-2-7-3 情動ストレスの負荷方法

情動ストレスとして、馬に不安感を与える新奇刺激を与えた。新奇刺激としては、競馬開催時のファンファーレや歓声を大音量（85db）で流した音声による刺激とスクリーンに人影を投影した映像による刺激を、歩行運動期の6分30秒間にわたって与え続けた。

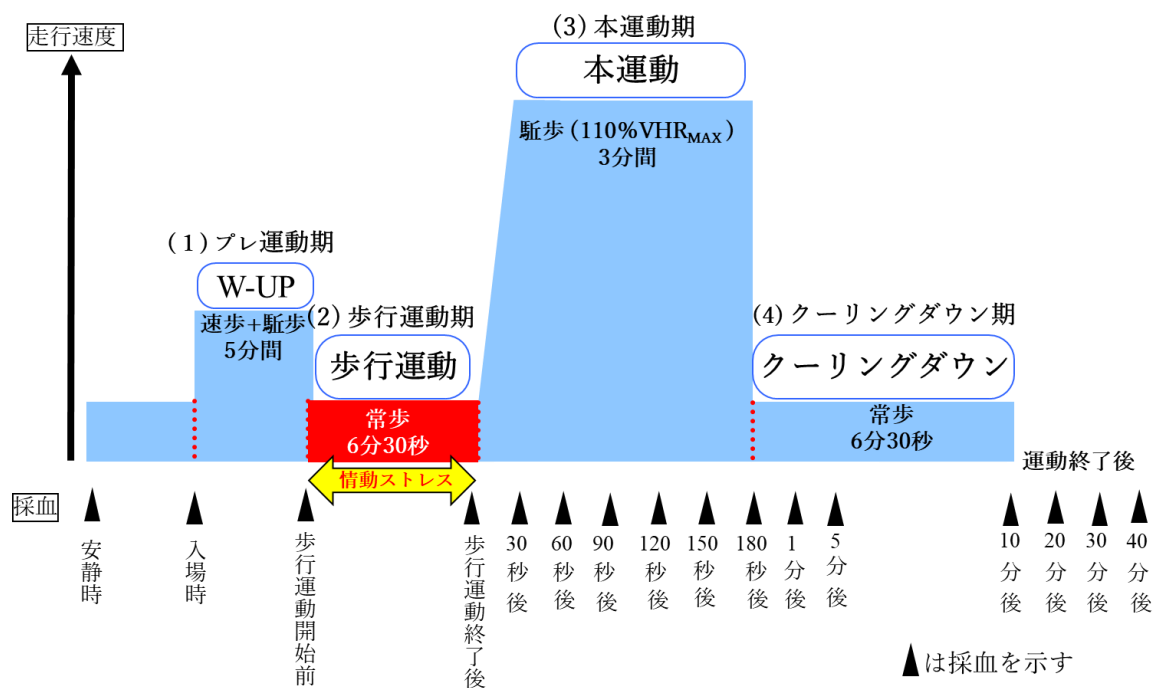
III-2-7-3 トレッドミル運動中の採血

実験では、経時的に採血を実施し、プロラクチン及び成長ホルモンを測定した。採血のタイミング（図III-3）は、安静時、トレッドミルのある部屋への入場時、歩行運動期（または情動ストレス負荷時）の前後、運動中（30、60、90、120、150、180秒）、運動後（1、5、10、20、30、40分）の16回とした。

採血は、左頸静脈に装着した留置カテーテル（14-G, Angiocath, Becton Dickinson, Sandy, Utah, USA）から行った。カテーテルの装着は、実験開始の2時間以上前に実施した。採取した血液は直ちにEDTA-2Na⁺の入ったプラスチックチューブに移され、1,700xgで15分間遠心して血漿を分離、-20℃にてホルモン測定まで保存した。なお、110%VHR_{max}の運動実施を確認するために、無線による心拍計測器（Vantage XL, Polar, Kempele, Finland）を用いて走行中の心拍数を計測し、5秒ごとに記録した。



図III-2 馬用トレッドミル



図III-3 運動ストレスおよび情動ストレス負荷実験

III-2-8 ホルモンの測定

プロラクチン、LH 及び FSH は、NIDDK,NIH (Torrance, CA USA) から提供を受け、馬用二抗体法 RIA によって測定した[55]。

III-2-8-1 プロラクチン、LH 及び FSH の測定

プロラクチンの測定には、第一抗体として抗馬プロラクチン血清 (AFP-261987)、標識用及び標準ホルモンとして精製馬プロラクチン (AFP-8794B) を用いた。LH の測定には、第一抗体として抗馬 LH 血清 (AFP-2405080)、標識用及び標準ホルモンとして精製馬 LH (AFP-50130A) を用いた。FSH の測定には、第一抗体として抗馬 FSH 血清 (AFP-2062096)、標識用及び標準ホルモンとして精製馬 FSH (AFP-5022B) を用いた。測定内及び測定間変動は、プロラクチンが 7.1% と 9.8%、LH が 12.56% と 15.06%、FSH が 4.9% と 12.2% であった。

III-2-8-2 IGF-I の測定

IGF-I は、NIDDK,NIH から提供を受けたヒト用二抗体法 RIA によって測定した[69]。第一抗体には、抗ヒト IGF-1 血清 (AP 4892898)、標識用及び標準ホルモンとして精製ヒト IGF-I (Lot#090701) を用いた。測定内及び測定間変動は 2.7% と 14.8% であった。

III-2-8-3 プロジェステロン、テストステロン及びエストラジオール-17 β の測定

プロジェステロン、テストステロン及びエストラジオール-17 β は、¹²⁵I で標識したホルモンを用いた二抗体法ラジオイムノアッセイによって測定した[247]。第一抗体としては、抗プロジェステロン血清 (GDN 337) [76]、抗テストステロン血清 (GDN 250) [75]、抗エストラジオール-17 β 血清 (GDN 244) [130]を用いた。測定内及び測定間変動は、プロジェステロンが 7.3% と 14.3%、テストステロンが 6.3% と 7.2% およびエストラジオール-17 β が 6.7% と 17.8% であった。

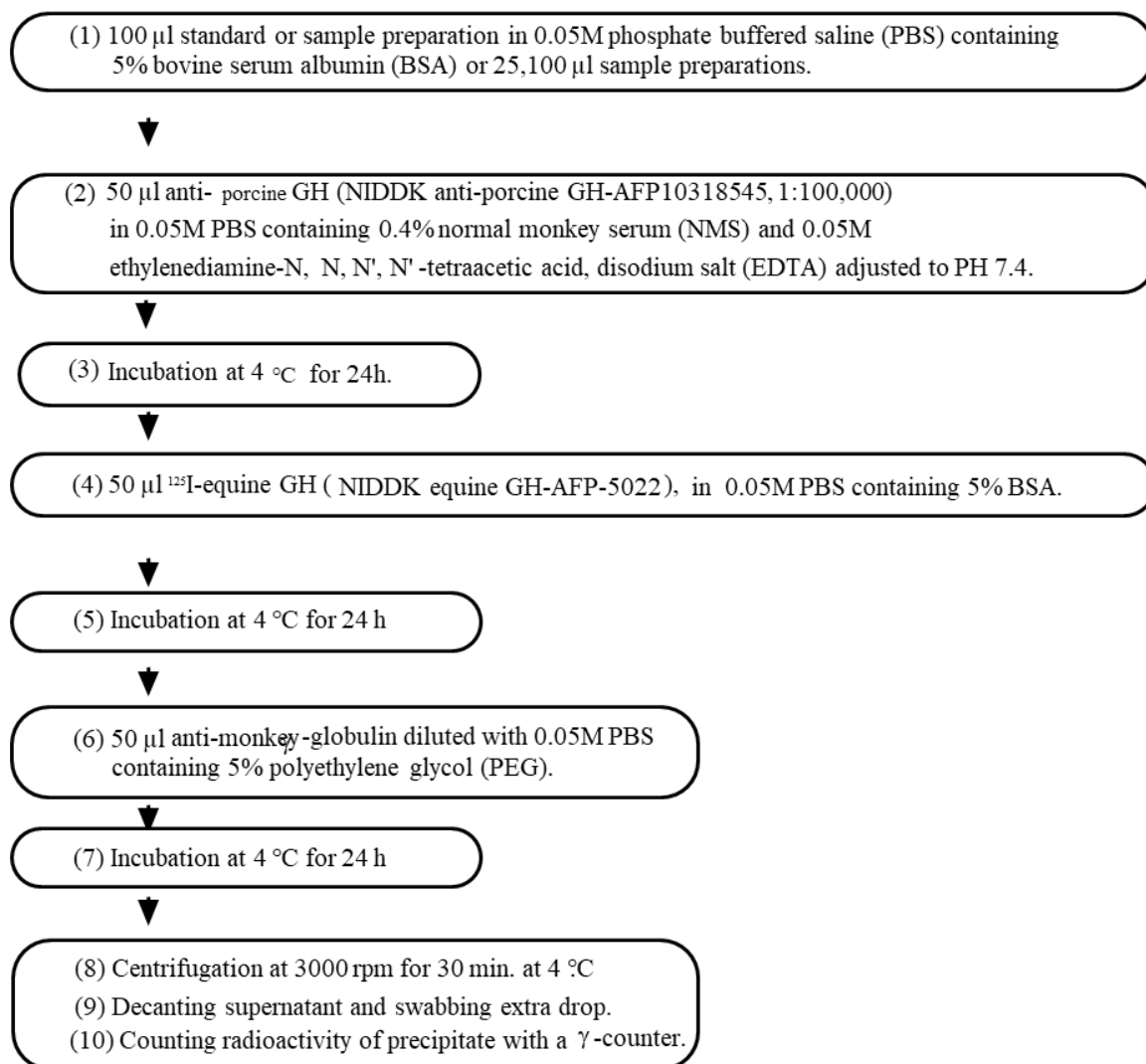
III-2-8-4 成長ホルモンのRIA法

成長ホルモンの測定法の概略を図III-4に示した。成長ホルモンは、NIDDK, NIHから提供を受けた馬GH測定キットを用いて測定した。標識抗原として、精製馬GH (NIDDK equine GH-AFP-5022) をクロラミンT法によって¹²⁵Iで標識して使用した。第一抗体 (NIDDK anti-porcine GH-AFP10318545)、第二抗体として、群馬大学生体調節研究所から提供を受けた抗サルIgGヤギ血清 (HAC-MKA2-02GTP88) を用いた。

III-2-9 統計処理

全てのデータは、平均値±標準誤差で示した。有意差の検定には、統計用ソフトウェア JMP (Ver 16.0)を用いた。3群以上の検定を行う際には、one-way ANOVAを、関連多群間の差の検定を行う際には、two-way ANOVAを用いた。one-way ANOVA で有意差が認められた場合には Tukey-Kramer テストを用いた。また、同一性及び同一育成牧場における体組成や成長指標の2点間の増加率の比較には、*F*-test の後 Student's *t*-test を用いた。分散が均一でない場合には Welch の *t*-test を用いた。血中ホルモン濃度の比較には、two-way ANOVA の後 post-hoc テスト (Bonferroni post test) を用いた。 $P < 0.05$ で統計的に有意と判定した。

Flow chart of the RIA for equine growth hormone (GH)



図III-4 血漿中成長ホルモンの測定法

III-3 結果

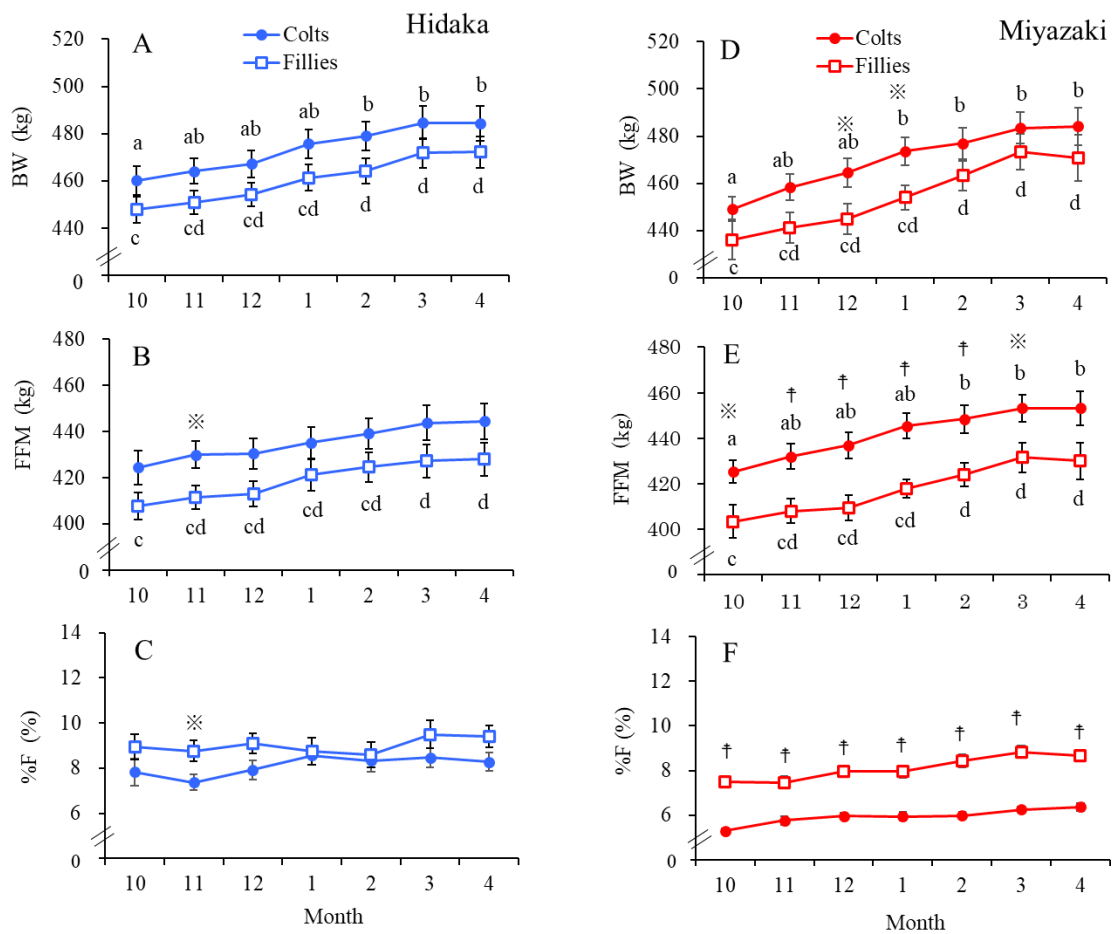
III-3-1 体組成の変化

III-3-1-1 日高育成馬及び宮崎育成馬における雌雄の比較

図III-5 に、日高育成馬及び宮崎育成馬における雌雄の体組成変化を示した。

日高育成馬において、BW では、雌雄ともに成長に伴って緩やかに増加し、2 歳 2 月から 4 月の BW は、1 歳 10 月の BW と比べて有意な高値を示した ($P < 0.05$; 図III-5-A)。BW では、1 歳 10 月から 2 歳 4 月までの全期間を通して、雄馬が雌馬と比べて高値である傾向を示したが、有意差は認められなかった。FFM では、雌雄ともに成長に伴って緩やかに増加し、雌馬の 2 歳 3 月及び 4 月における FFM は、1 歳 10 月の FFM と比べて有意な高値を示した ($P < 0.05$; 図III-5-B) が、雄馬では 1 歳 10 月の FFM と 1 歳 11 月から 2 歳 4 月の FFM の間に有意差は認められなかった。雄馬は雌馬と比べて FFM が高い傾向を示し、1 歳 11 月において有意差が認められた ($P < 0.05$; 図III-5-B)。%F では、雌雄ともにほぼ一定レベルで推移した。雌馬は雄馬と比べて %F が高い傾向を示し、1 歳 11 月において有意差が認められた ($P < 0.05$; 図III-5-C)。

宮崎育成馬において、BW では、雌雄ともに加齢に伴って増加し、雄馬では、2 歳 1 月、2 月、3 月及び 4 月における BW は、1 歳 10 月の BW と比べて有意に高値であった ($P < 0.05$; 図III-5-D)。雌馬では、2 歳 2 月、3 月及び 4 月の BW は、1 歳 10 月の BW と比べて有意に高値であった ($P < 0.05$; 図III-5-D)。BW では、雄馬が雌馬と比べて高値である傾向を示し、1 歳 12 月及び 2 歳 1 月の BW において有意差が認められた ($P < 0.05$; 図III-4-D)。FFM では、雌雄ともに加齢に伴って増加し、雄馬及び雌馬ともに、2 歳 2 月、3 月及び 4 月の FFM は、1 歳 10 月の FFM と比べて有意に高値であった ($P < 0.05$)。また、1 歳 10 月から 2 歳 3 月までの FFM は雄馬が雌馬と比べて有意に高値であった (10 月及び 3 月, $P < 0.05$; 11 月～2 月, $P < 0.01$; 図III-5-E)。%F では、雌雄ともに 1 歳 10 月から 2 歳 4 月まで、大きな変動は認められなかったが、全ての月において、雄馬は雌馬と比べて有意に低値であった ($P < 0.01$; 図III-5-F)。



図III-5 日高育成馬及び宮崎育成馬における雌雄の体組成比較

日高育成馬（A-C; 雄● n=16、雌□ n=16）と宮崎育成馬（D-F; 雄● n=9、雌□ n=9）における BW（A、D）、FFM（B、E）及び%F（C、F）の変化。結果は平均値±標準誤差で示した。異なるアルファベット間は同群間における 1 歳 12 月値との有意差を示した（ $P<0.05$ ）。※及び†は同月の雌雄間での有意差を示した（※ $P<0.05$, † $P<0.01$ ）。

III-3-1-2 雄馬及び雌馬における日高育成馬と宮崎育成馬の比較

図III-6 に、雄馬及び雌馬における両育成馬の体組成変化を示した。

雄馬において、BW では、両群ともに 1 歳 10 月から 2 歳 3 月まで加齢とともに増加したが両群間に有意差は認められなかった（図III-6-A）。FFM では、宮崎育成馬は日高育成馬と比べて加齢とともに増加し、1 歳 12 月から 2 歳 4 月まで高い傾向を示したが、両群間に有意差は認められなかった（図III-6-B）。%F では、両群ともに 1 歳 10 月から 2 歳 4 月まで概ね一定の値で推移し、すべての月において、日高育成馬は宮崎育成馬と比べて有意に高値を示した（ $P<0.01$; 図III-6-C）。

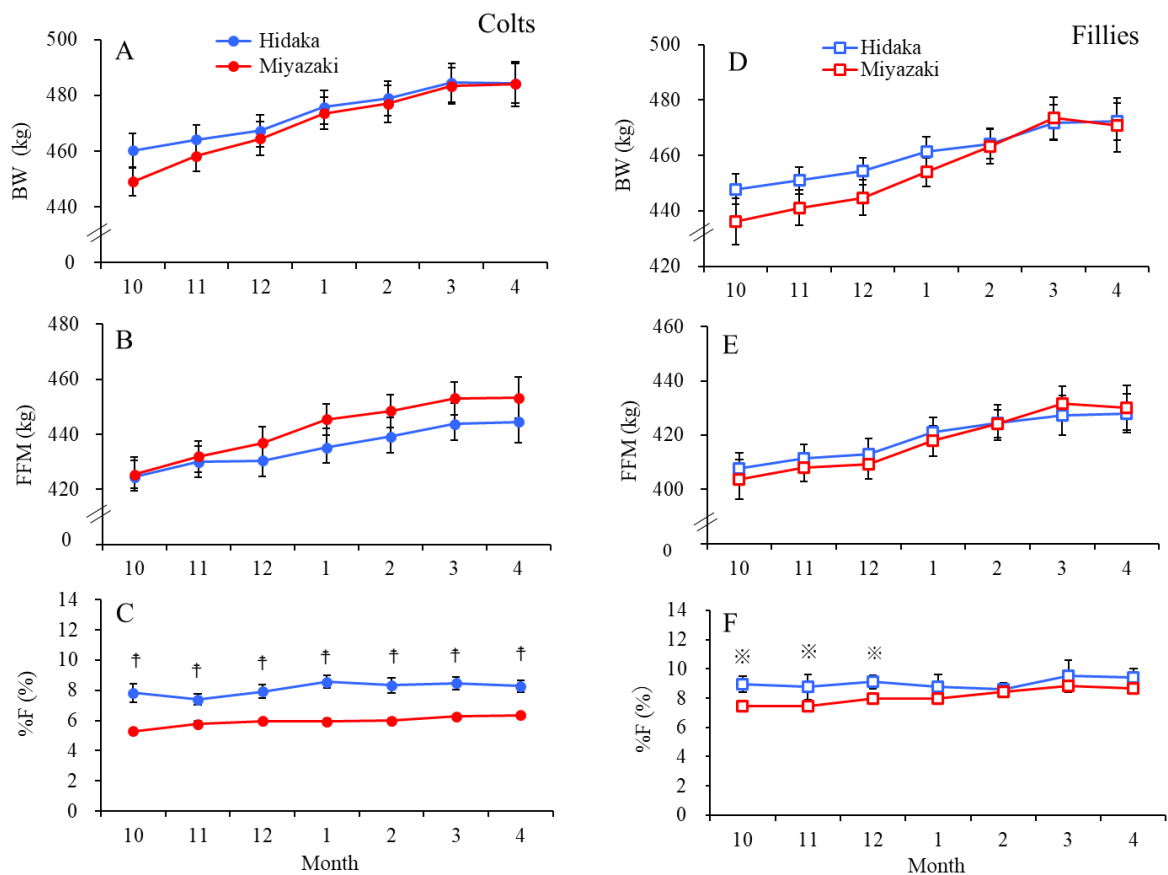
雌馬において、BW では、両群ともに 1 歳 10 月から 2 歳 3 月まで加齢とともに増加したが、両群間に有意差は認められなかった（図III-6-D）。FFM では、両群ともに 1 歳 10 月から 2 歳 3 月まで加齢とともに増加したが、両群間に有意差は認められなかった（図III-6-E）。%F では、1 歳 10 月から 12 月までにおいて、日高育成馬が宮崎育成馬と比べて有意に高値を示した（ $P<0.05$; 図III-6-F）。

図III-7-1 に、雄馬及び雌馬における日高育成馬と宮崎育成馬の 1 歳 10 月から 2 歳 4 月と 3 月まで、1 歳 12 月から 2 歳 3 月までの BW 増加率を示した。1 歳 10 月から 2 歳 4 月まででは、雌雄ともに宮崎育成馬が日高育成馬と比べて高い傾向が認められた（図III-7-1-A）。1 歳 10 月から 2 歳 3 月までの期間では、雄馬において、宮崎育成馬が日高育成馬と比べて有意な高値を示した（ $P<0.05$; 図III-7-1-B）、1 歳 12 月から 2 歳 3 月まででは、雌馬において宮崎育成馬が日高育成馬と比べて有意な高値を示した（ $P<0.05$; 図III-7-1-C）。

図III-7-2 に、雄馬及び雌馬における日高育成馬と宮崎育成馬の 1 歳 10 月から 2 歳 4 月と 2 月までの FFM 増加率を示した。1 歳 10 月から 2 歳 4 月まででは、雌雄ともに宮崎育成馬は日高育成馬と比べて高い傾向が観察され（図III-7-2-A）、雄馬では 1 歳 10 月から 2 歳 2 月までの増加率において有意差が認められた（図III-7-2-B; $P<0.05$ ）。

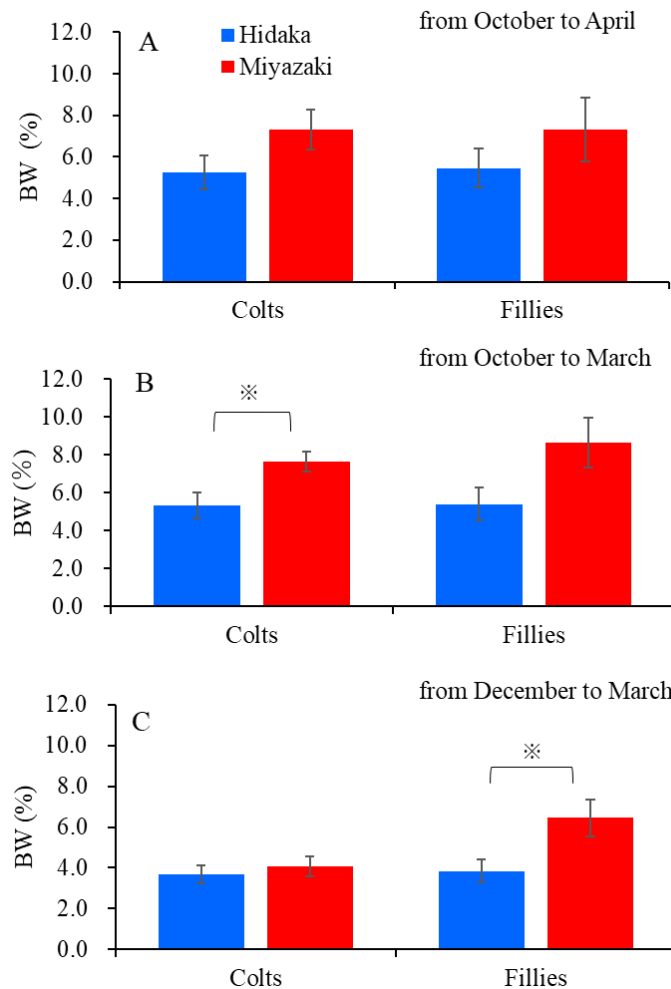
図III-8 に、日高育成馬と宮崎育成馬における 1 歳 10 月から 2 歳 4 月までの BW 及び FFM の各月増加率を雌雄別に比較した結果を示した。BW の各月増加率では、雄馬は宮崎育成馬と日高育成馬の間に有意な差が認められなかった

(図Ⅲ-8-A) が、雌馬は 2 月において宮崎育成馬が日高育成馬と比べて有意な高値を示した ($P < 0.05$; 図Ⅲ-8-B)。FFM の各月増加率では、雄馬では 12 月及び 1 月において宮崎育成馬が日高育成馬と比べて高い傾向を示したが、有意差は認められなかった (図Ⅲ-8-C)。雌馬では 3 月において宮崎育成馬が日高育成馬と比べて高い傾向を示したが、有意差は認められなかった (図Ⅲ-8-D)。



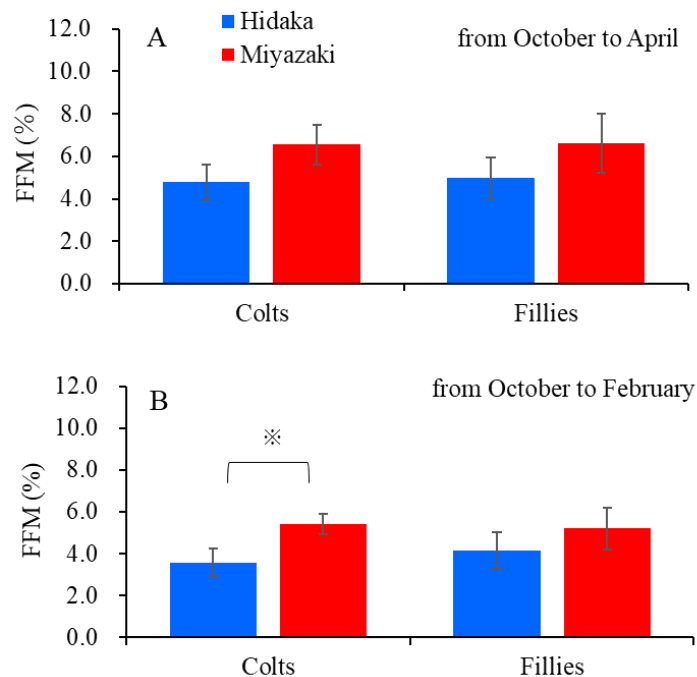
図III-6 雄馬と雌馬における両育成牧馬の体組成比較

雄馬（A-C; 日高育成馬● n=16、宮崎育成馬● n=9）と雌馬（D-F; 日高育成馬□ n=16、宮崎育成馬□ n=9）における BW（A、D）、FFM（B、E）及び%F（C、F）の比較。結果は平均値±標準誤差で示した。※および†は同月における両育成牧場間での有意差を示した（※ $P<0.05$, † $P<0.01$ ）。



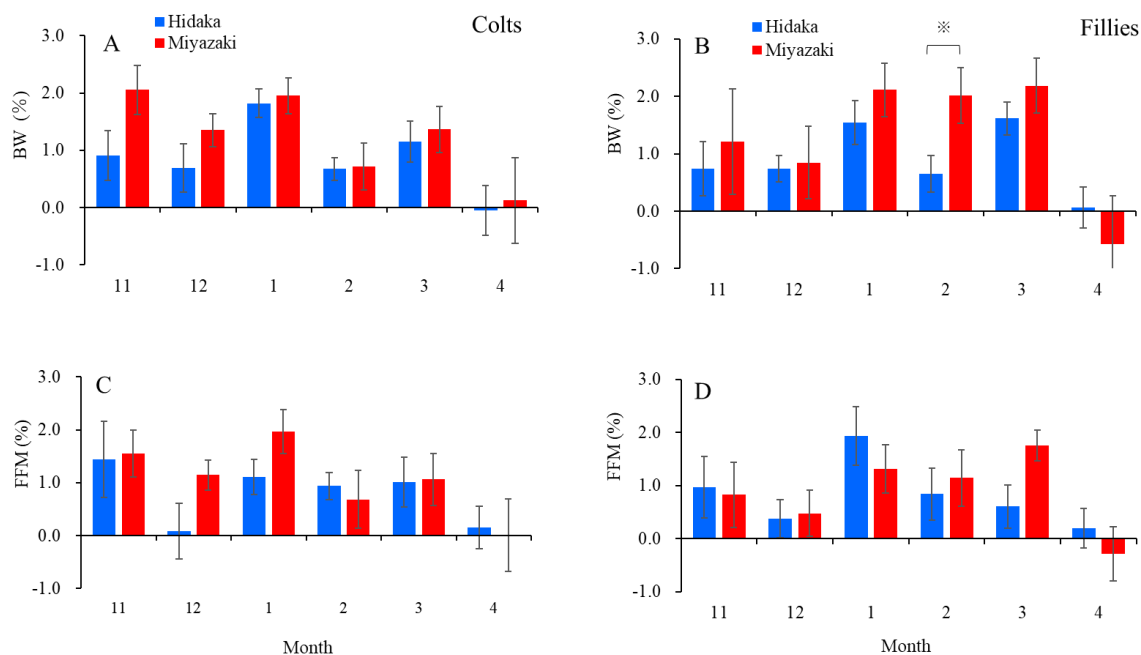
図III-7-1 雄馬と雌馬における両育成馬の BW 増加率比較

日高育成牧場と宮崎育成牧場で育成した雄馬（日高育成馬 ■ n=16、宮崎育成馬 ■ n=9）及び雌馬（日高育成馬 ■ n=16、宮崎育成馬 ■ n=9）における 1 歳 10 月から 2 歳 4 月までの BW 増加率（A）、1 歳 10 月から 2 歳 3 月までの BW 増加率（B）及び 1 歳 12 月から 2 歳 3 月までの BW 増加率の比較（C）。結果は平均値±標準誤差で示した。※は日高育成馬と宮崎育成馬間での有意差を示した（ $P < 0.05$ ）。



図III-7-2 雄馬と雌馬における両育成馬の FFM 増加率比較

日高育成牧場と宮崎育成牧場で育成した雄馬（日高育成馬 ■ n=16、宮崎育成馬 ■ n=9）及び雌馬（日高育成馬 ■ n=16、宮崎育成馬 ■ n=9）における 1 歳 10 月から 2 歳 4 月までの FFM 増加率（A）、1 歳 10 月から 2 歳 2 月までの FFM 増加率（B）。結果は平均値±標準誤差で示した。※は日高育成馬と宮崎育成馬間での有意差を示した（ $P < 0.05$ ）。



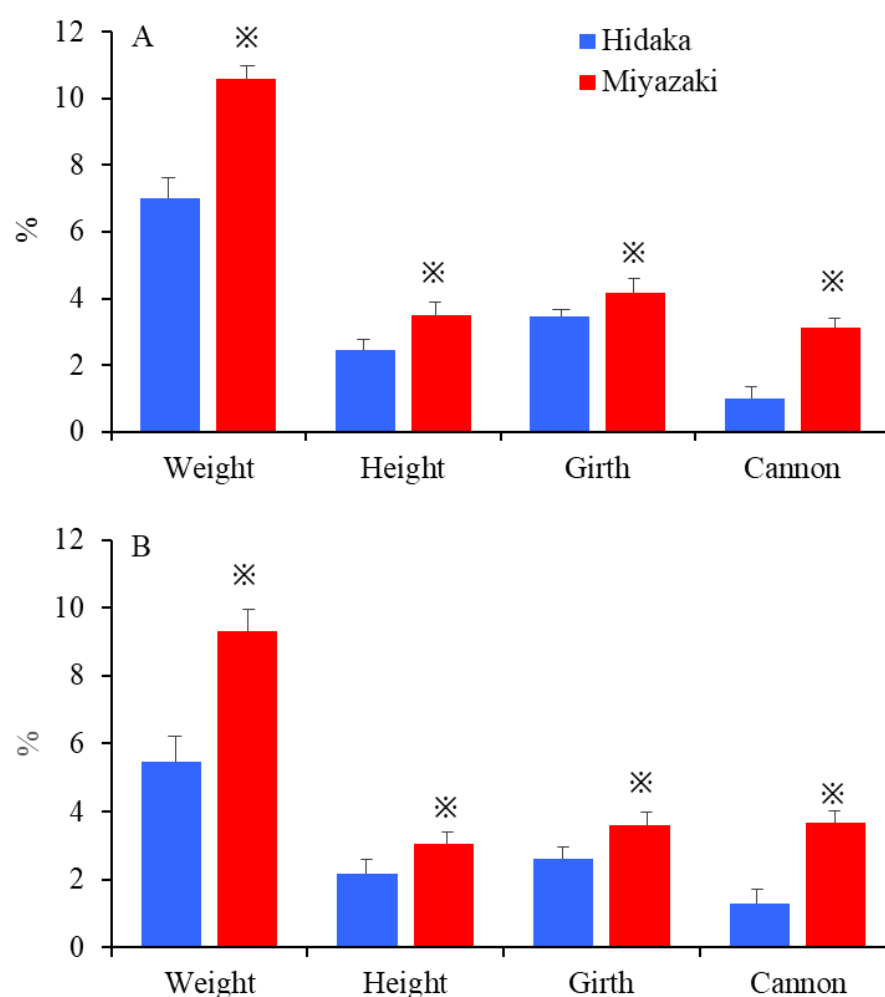
図III-8 雄馬と雌馬における両育成馬の各月 BW 増加率と各月 FFM 増加率

日高育成牧場と宮崎育成牧場で育成した雄馬（日高育成馬 ■ n=16、宮崎育成馬 ■ n=9）と雌馬（日高育成馬 ■ n=16、宮崎育成馬 ■ n=9）における各月 BW 増加率（A、B）及び各月 FFM 増加率（C、D）。結果は平均値±標準誤差で示した。※は同月における両群間での有意差を示した（ $P<0.05$ ）。

III-3-2 成長率

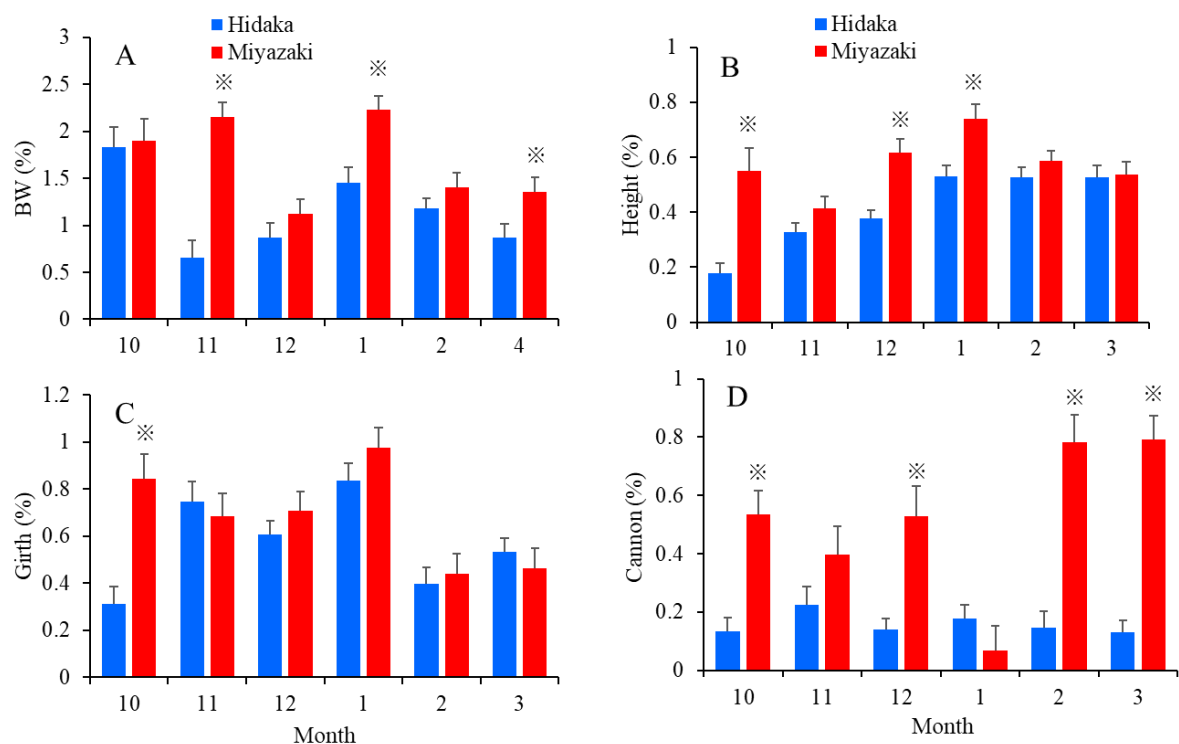
成長に関する4つの指標（BW、体高、胸囲、管囲）について、1歳9月から2歳3月までの7ヶ月間における雄馬の平均増加率を図III-9-Aに、雌馬の平均増加率を図III-9-Bに示した。7ヶ月間のBW、体高、胸囲及び管囲の平均増加率は、雌雄ともに宮崎育成馬が日高育成馬と比べて有意な高値を示した（図III-9）。

雄馬における各月平均増加率を図III-10-1に、雌馬の平均増加率を図III-10-2に示した。雄馬の各月増加率では、体重は1歳11月と2歳1月（図III-10-1-A）、体高は1歳10月と12月、2歳1月（図III-10-1-B）、胸囲は1歳10月（図III-10-1-C）、管囲は1歳10月と12月、2歳2月と3月（図III-10-1-D）において、宮崎育成馬が日高育成馬と比べて有意な高値を示した。雌馬の各月増加率では、BWでは1歳11月から2歳2月までの間（図III-10-2-A）、体高では1歳10月から2歳1月までの間（図III-10-2-B）、胸囲では1歳10月及び2歳2月（図III-9-2-C）、管囲では、1歳10月及び12月、2歳2月及び3月（図III-10-2-D）において、宮崎育成馬が日高育成馬に比べて有意な高値を示した（図III-10-2）。



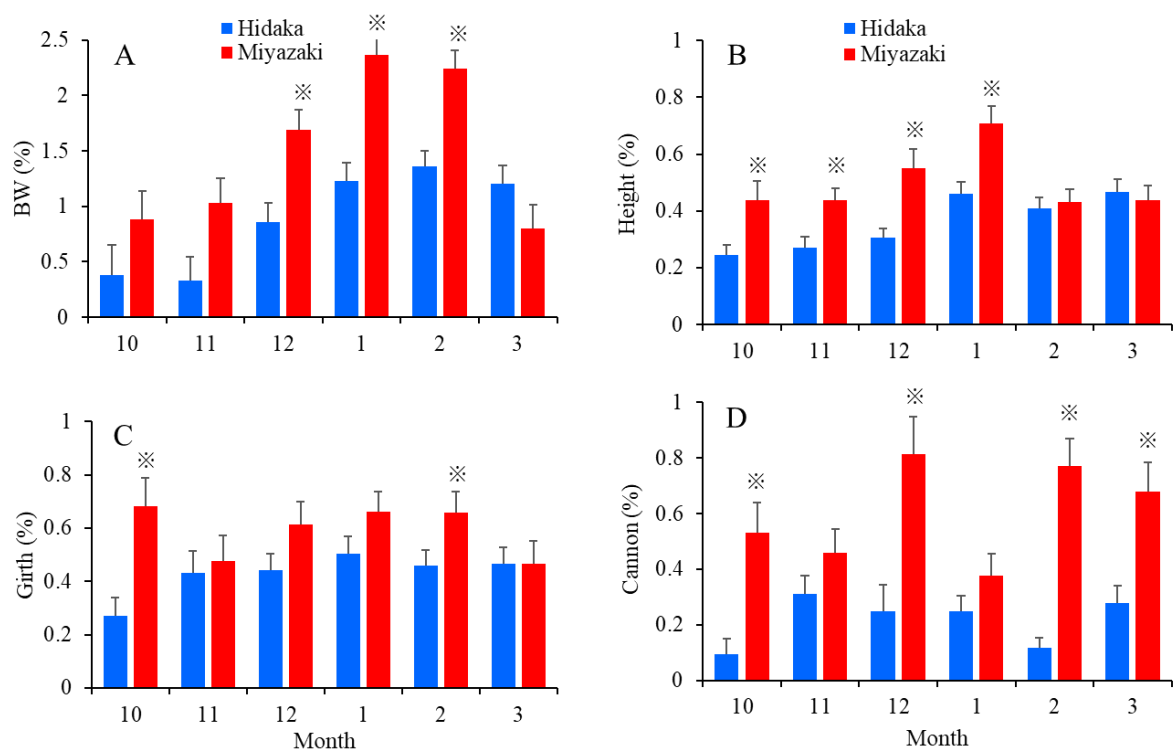
図III-9 両育成牧場の雌雄における成長指標の増加率

雄馬（A; 日高 Hidaka ■ $n=81$ 、宮崎 Miyazaki ■ $n=80$ ）と雌馬（B; 日高 Hidaka ■ $n=73$ 、宮崎 Miyazaki ■ $n=75$ ）における 1 歳 9 月から 2 歳 3 月までの BW、体高、胸囲及び管囲の増加率。結果は平均値+標準誤差で示した。※はそれぞれの成長指標における雌雄間の有意差を示した（ $P<0.05$ ）。



図III-10-1 両育成牧場の雄馬における成長指標の各月増加率

雄馬（日高 Hidaka ■ n=81、宮崎 Miyazaki ■ n=80）における 1 歳 9 月から 2 歳 3 月までの BW (A)、体高 (B)、胸囲 (C)、管囲 (D) の各月増加率。結果は平均値+標準誤差で示した。※は同月における群間の有意差を示した ($P<0.05$)。



図III-10-2 両育成牧場の雌馬における成長指標の各月増加率

雌馬（日高 Hidaka ■ n=73、宮崎 Miyazaki ■ n=75）における 1 歳 9 月から 2 歳 3 月までの BW (A)、体高 (B)、胸囲 (C)、管囲 (D) の各月増加率。結果は平均値+標準誤差で示した。※は同月における群間の有意差を示した ($P<0.05$)。

III-3-3 内分泌変化

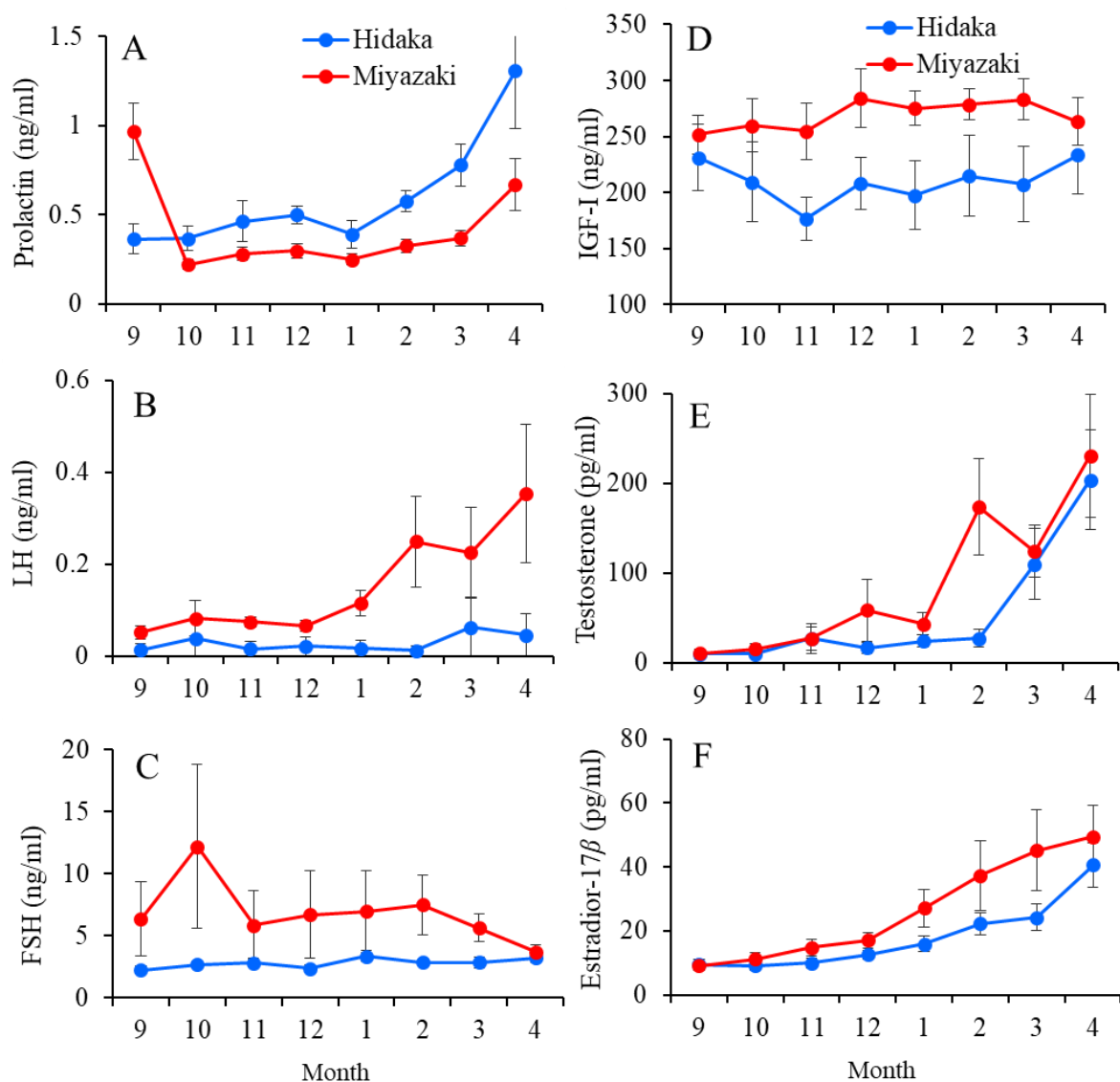
雄馬の6種類の血中ホルモン濃度の変化を図III-11-1に示した。血中プロラクチン濃度は、1歳9月では宮崎育成馬が日高育成馬と比べて高い傾向を示し、1歳10月から2歳4月までは日高育成馬が宮崎育成馬と比べて高い傾向を示したが両群間で有意差は認められなかった。1歳10月から2歳2月までは両群ともに低値で経過し、2歳3月から4月に上昇した。(図III-11-1-A)。血中LH濃度は、1歳9月から2歳1月まで両群ともに低値を示したが、宮崎育成馬では2歳2月から、日高育成馬では2歳3月から上昇した。血中LH濃度は、2歳2月以降は、宮崎育成馬が日高育成馬と比べて高い傾向を示したが有意差は認められなかった(図III-11-1-B)。血中FSH濃度は、両群ともに1歳9月から2歳4月まで一定のレベルで推移し、宮崎育成馬が日高育成馬と比べて高い傾向を示したが有意差は認められなかった(図III-11-1-C)。血中IGF-I濃度は、両群ともに1歳9月から2歳4月まで一定のレベルで推移し、宮崎育成馬が日高育成馬と比べて高い傾向を示したが有意差は認められなかった(図III-11-1-D)。血中テストステロン濃度は、宮崎育成馬では、1歳9月と10月は低値を示し、1歳11月から2歳4月まで緩やかに上昇した。日高育成馬では1歳9月から2歳2月までは低値を示したが、2歳3月から4月まで上昇した。血中テストステロン濃度は、1歳12月以降は、宮崎育成馬が日高育成馬に比べて高い傾向を示したが有意差は認められなかった(図III-11-1-E)。血中エストラジオール-17 β 濃度は、宮崎育成馬では1歳11月から2歳4月まで、日高育成馬では1歳12月から2歳4月まで緩やかに上昇した。1歳10月から2歳4月まで、宮崎育成馬が日高育成馬に比べて高い傾向を示したが、有意差は認められなかった(図III-11-1-F)。

雌馬の6種類の血中ホルモン濃度の変化を図III-11-2に示した。血中プロラクチン濃度は、1歳9月では宮崎育成馬が日高育成馬と比べて高い傾向を示したが、有意差は認められなかった。両群ともに1歳10月から2歳2月まで低値で推移した。宮崎育成馬では2歳3月から、日高育成馬では2歳2月から上昇を示し、日高育成馬が宮崎育成馬に比べて高い傾向を示したが有意差は認められなかった(図III-11-2-A)。血中LH濃度は、1歳9月では日高育成馬が宮崎育成馬に比べて高い傾向を示したが、有意差は認められなかった。両群ともに1歳

11月まで低値を示し、1歳12月から緩やかに上昇した。日高育成馬が3月と4月に高い傾向を示したが、個体差が大きく有意差は認められなかった（図Ⅲ-11-2-B）。血中FSH濃度は、両群ともに1歳12月と2歳1月で高い傾向を示したが、両群間で有意差は認められなかった（図Ⅲ-11-2-C）。血中IGF-I濃度は、両群とも1歳10月から2歳4月まで大きな変動を示さなかった。日高育成馬が宮崎育成馬に比べて高い傾向を示したが、有意差は認められなかった（図Ⅲ-11-2-D）。血中プロジェステロン濃度は、1歳9月では宮崎育成馬が日高育成馬と比べて高い傾向を示したが、有意差は認められなかった。両群ともに1歳11月から2歳3月まで低値で経過し2歳4月に上昇したが、両群間で有意差は認められなかった（図Ⅲ-11-2-E）。血中エストラジオール-17 β 濃度は、両群ともに1歳10月から2歳1月までは低値で経過したが、2歳2月から上昇した。1歳10月から2歳3月まで、宮崎育成馬が日高育成馬に比べて高い傾向を示したが両群間で有意差は認められなかった（図Ⅲ-11-2-F）。

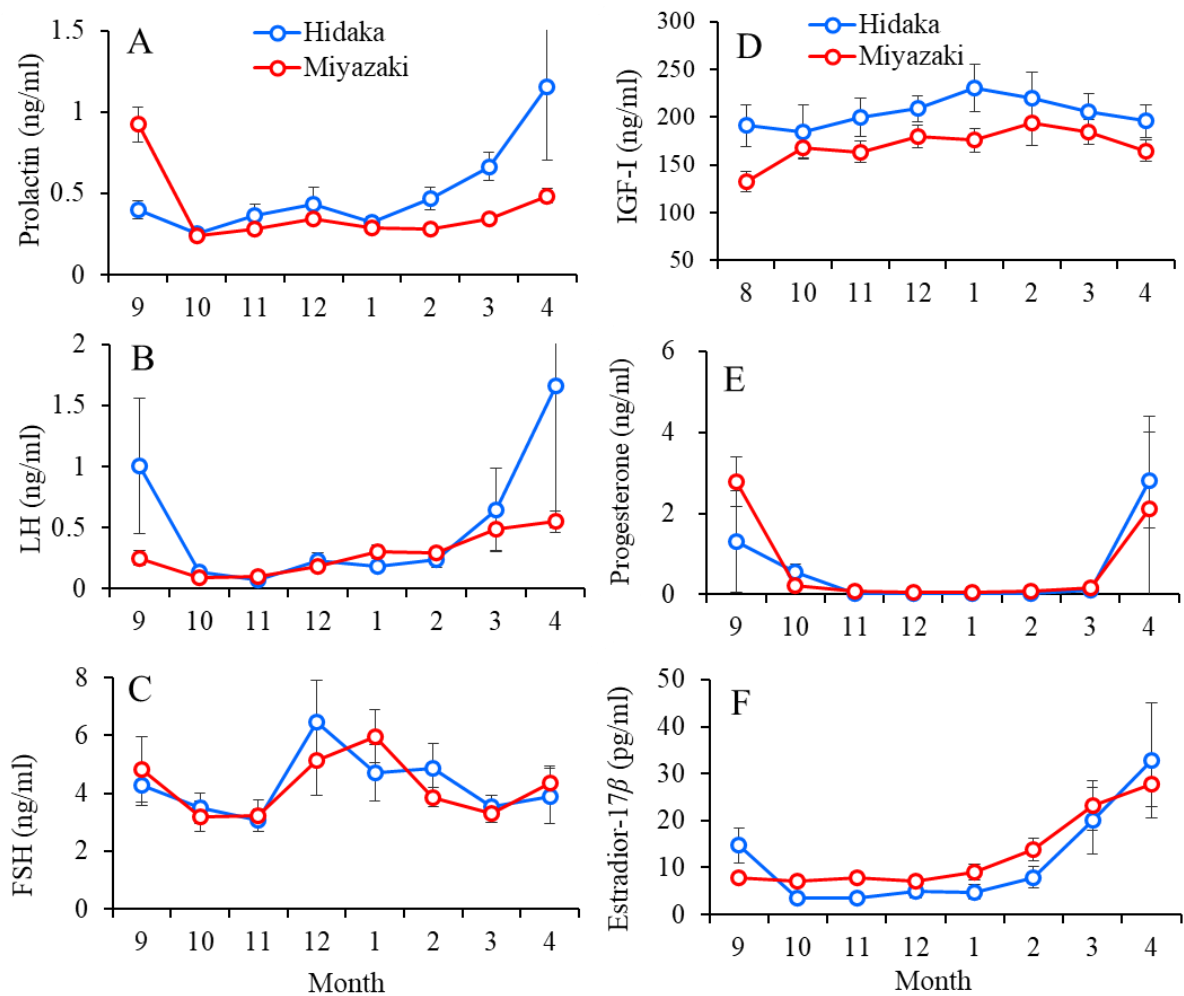
Ⅲ-3-4 排卵時期

雌馬において、血中プロジェステロン濃度が1ng/ml以上を示した個体は排卵黄体を有するものと判断し、血中プロジェステロン濃度が、1ng/ml以上を示した日の7日前を排卵日と推定した。その結果、日高育成馬では、12例中2例（16.7%）、宮崎育成馬では、18例中7例（38.9%）が4月以前に排卵したと推察された。



図III-11-1 雄馬における各内分泌ホルモンの月別変化

日高育成牧場（Hidaka; ●n=12）及び宮崎育成牧場（Miyazaki; ●n=12）で、1歳9月から2歳4月まで育成した雄馬における血中プロラクチン（Prolactin; A）、LH（LH; B）、FSH（FSH; C）、IGF-I（IGF-I; D）、テストステロン（Testosterone; E）、エストラジオール-17 β （Estradiol-17 β ; F）濃度の月別変化。結果は平均値 \pm 標準誤差で示した。



図III-11-2 雌馬における各内分泌ホルモンの月別変化

日高育成牧場(Hidaka; ○n=6)および宮崎育成牧場 (Miyazaki; ● n=12) で、1歳9月から2歳3月まで育成した雌馬における、血中プロラクチン (Prolactin; A)、LH (LH; B)、FSH (FSH; C)、IGF-I (IGF-I; D)、プロジェステロン (Progesteron; E)、エストラジオール-17β (Estradiol-17β; F) の月別変化。結果は平均±標準誤差で示した。

III-3-5 情動ストレス負荷前後の血中ホルモン濃度の変化

常歩歩行を行った 6 分 30 秒間の歩行運動期に、情動ストレスを負荷した前後の血中プロラクチンと成長ホルモン濃度を図 III-12 に示した。運動ストレス群は、運動前後において血中プロラクチン濃度に変化は認められなかった。一方、運動+情動ストレス群では、情動ストレス負荷後に血中プロラクチン濃度が上昇し、運動+情動ストレス群は運動ストレス群と比べて有意な高値を示した ($P<0.05$; 図 III-12-A)。血中成長ホルモン濃度については、運動ストレス群と運動+情動ストレス群ともに上昇したが両群間に有意差は認められなかった。(図 III-12-B)。

III-3-6 運動及び情動ストレスを負荷後の血中ホルモン濃度の経時的变化

III-3-6-1 プロラクチン

運動及び情動ストレスを負荷後の血中プロラクチン濃度の経時的变化を図 III-13-A に示した。運動ストレス群及び運動+情動ストレス群ともに、血中プロラクチン濃度は、プレ運動期から直ちに上昇し、歩行運動期でも低下することなく上昇を続けた。運動ストレス群では、本運動期の 120 秒後に、運動+情動ストレス群では、本運動期の 60 秒後にそれぞれピークに達した後、両群ともに本運動期終了後 40 分までゆっくりと低下したが、本運動期終了後 40 分でも安静時の値と比べて高値を維持した。運動+情動ストレス群では、血中プロラクチン濃度が運動ストレス群と比べて高い傾向を示した。

III-3-6-2 成長ホルモン

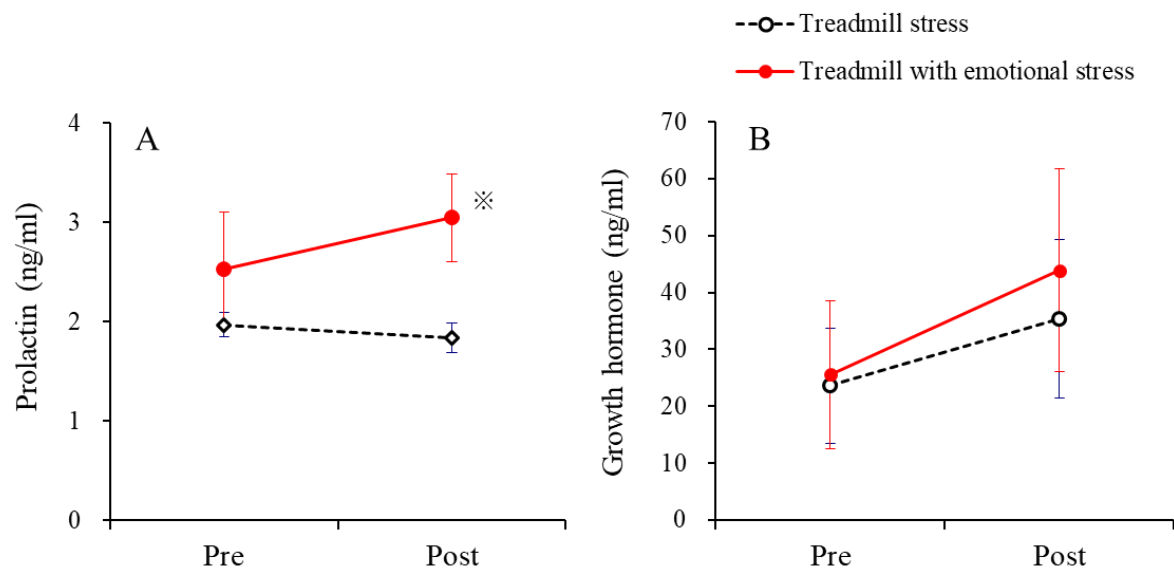
運動及び情動ストレスを負荷後の血中成長ホルモン濃度の経時的变化を図 III-13-B に示した。運動ストレス群及び運動+情動ストレス群ともに、プレ運動期、歩行運動期および本運動期を通して血中成長ホルモン濃度が上昇したが、両群間での有意差は認められなかった。血中成長ホルモン濃度のピークは、両群ともに、本運動期の 150 秒後にピークを示し、本運動期終了 40 分後まで緩やかに低下したが、本運動期終了 40 分後でも安静時の値と比べて高値を示した。運動ストレス群では、安静時の成長ホルモン濃度は、 $1.4\pm0.7\text{ng/ml}$ であるのに対して、ピーク時は $118.8\pm22.1\text{ng/ml}$ と、極めて高い値 (85 倍) を示した。

III-3-7 日高地域と宮崎地域の平均日照時間及び平均気温、最低気温

供試馬の成長と気候との関連を考察することを目的として、気象庁の観測データを用いて、日高育成牧場（142°12'E-42°51'N）の存在する北海道浦河郡浦河町浦河管区気象台と宮崎育成牧場（31°90'N, 139°42'E）の存在する宮崎県宮崎市宮崎管区気象台における 2003 年から 2013 年までの平均日照時間及び平均気温、平均最低気温を図III-14 に示した。

6 月の平均日照時間では、日高は 15.3 時間、宮崎は 14.2 時間で、日高は宮崎と比べて約 1 時間長かった。12 月の平均日照時間では、日高では 9.1 時間、宮崎では 10.1 時間で、日高は宮崎と比べて約 1 時間短かった。

8 月の平均気温では、日高は 20.4℃、宮崎は 27.7℃で、日高は宮崎と比べて約 7℃低値であった。1 月の平均気温では、日高では-2.4℃、宮崎では 7.3℃で、日高は宮崎と比べて冬期は約 10℃低値であった。さらに 1 月の平均最低気温では、日高では-5.6℃、宮崎では 2.7℃で、日高は宮崎と比べて約 9℃低値であった。



図III-12 情動ストレス負荷前後の血中ホルモン濃度の変化

運動ストレス群 (Treadmill stress; ○ n=4) と運動+情動ストレス群 (Treadmill with emotional stress; ● n=4) における情動ストレス負荷前 (Pre) と負荷後 (Post) の血中プロラクチン濃度の変化 (A) 及び成長ホルモン濃度の変化 (B)。結果は平均±標準誤差で示した。※は測定時における群間の有意差を示した ($P<0.05$)。

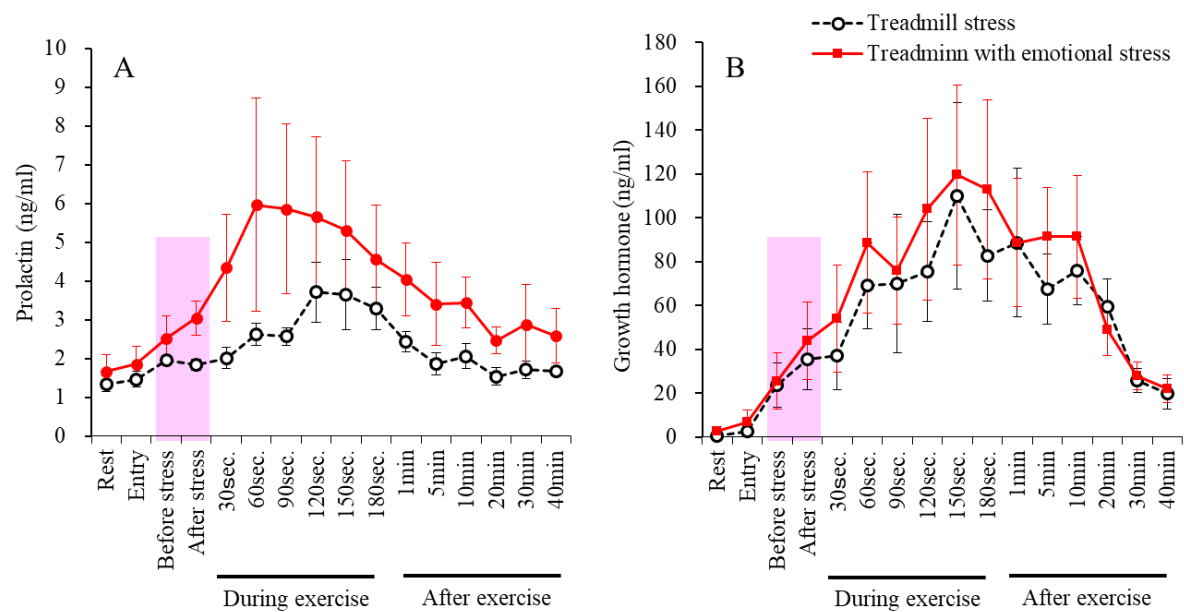
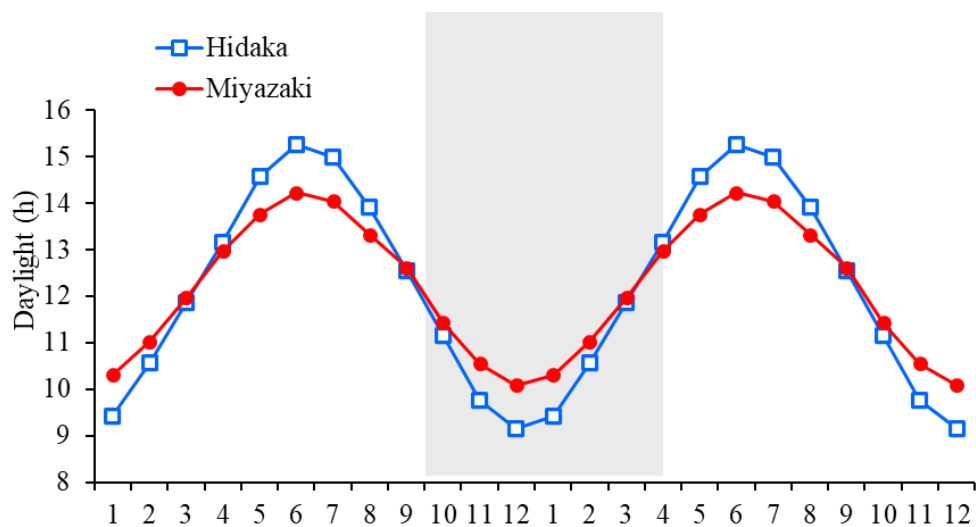


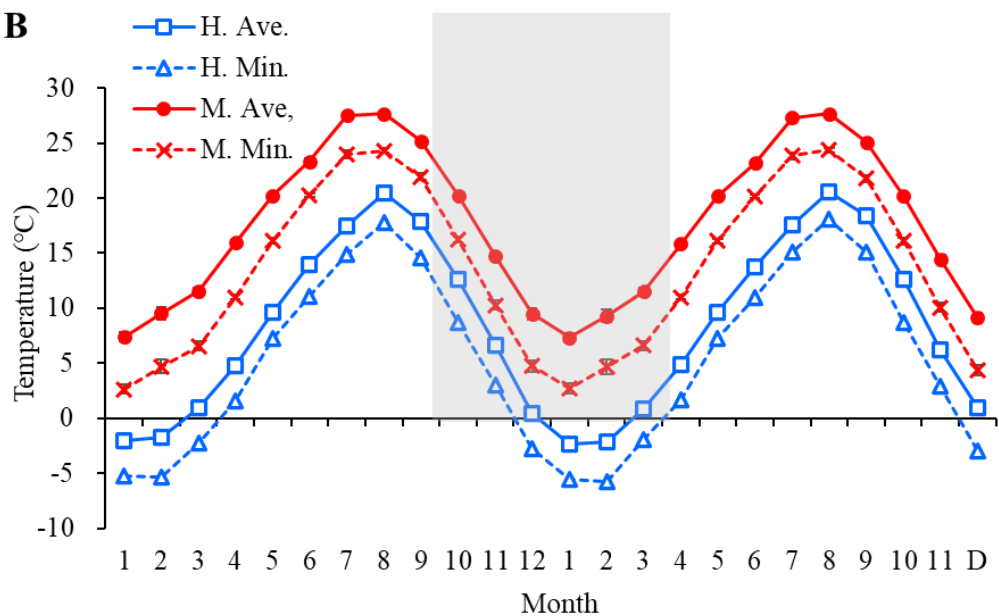
図 3-13 運動及び情動ストレス負荷後の血中ホルモン濃度の経時的変化

運動ストレス群（Treadmill stress; ○ n=4）と運動+情動ストレス群（Treadmill with emotional stress; ● n=4）における血中プロラクチン濃度の経時的変化（A）及び血中成長ホルモン濃度の経時的変化（B）。網掛けは情動ストレスを与えた歩行運動期を示す。結果は平均値±標準誤差で示した。

A



B



図III-14 日高地域と宮崎地域の平均日照時間及び平均気温、最低気温

日高地域（Hidaka; □）における月平均日照時間及び宮崎地域（Miyazaki; ●）における月平均日照時間の月別変化（Daylight; A）。日高地域における月平均気温（H. Ave.; □）、月平均最低気温（H. Min.; △）の推移及び宮崎地域における年間の月平均気温（M. Ave.; ●）、月平均最低気温（M.Min.; ×）の月別変化（Temperature; B）。網掛けは本研究の時期を示した。

III-4 考察

本研究では、南国の九州に位置する宮崎育成牧場と北国の北海道に位置する日高育成牧場で後期育成された雌雄のサラブレッドを用いて、1 歳後半から 2 歳前半までの 7 ヶ月間にわたって、体組成、成長及び性腺機能の変化について内分泌学的に解析した。

サラブレッド種やスタンダードブレッド種では、雄馬は雌馬と比べて BW が高値であること[91,206,256,257]、FFM が高値であること[71,157]及び%F や RFT が低値であること[71,118,157]など、体格や体組成における性差が報告されている。本研究においても、日高育成馬及び宮崎育成馬ともに、雄馬は雌馬と比べて BW 及び FFM が高値で、%F は低値である性差が観察され、特に、宮崎育成馬ではこの傾向が顕著であった。

成長に伴う体組成変化について、BW では、両育成牧場の雄馬及び雌馬ともに加齢に伴って増加した。FFM は、日高育成牧場の雌馬及び宮崎育成牧場の雌雄馬では加齢に伴って増加したが、日高育成牧場の雄馬では明かな増加が観察されなかった。%F は、日高及び宮崎育成馬ともに概ね一定の値で推移した。

日高育成馬と宮崎育成馬の比較において、BW では、宮崎育成馬は日高育成馬と比べて、雄馬は 1 歳 10 月から 2 歳 3 月まで、雌馬では 1 歳 12 月から 2 歳 3 月までの増加率が高値であった。FFM では、宮崎育成馬は日高育成馬と比べて、雄馬は 1 歳 10 月から 2 歳 2 月までの増加率が高値であった。%F では、宮崎育成馬は日高育成馬と比べて、雄馬は 1 歳 10 月から 2 歳 4 月までの全ての月において低値であった。

宮崎育成馬において、BW 及び FFM の増加が促進された内分泌学的理由は、血中 IGF-I 濃度において日高育成馬と宮崎育成馬で差が認められなかったことから、現在のところ明らかではない。日高育成馬および宮崎育成馬ともに、2 月以降は週 2 回のスピード調教を実施し、有酸素能力を向上することを目的に、調教中の心拍数が 200 回/分以上、調教 10 分後の血中乳酸濃度が 4 mmol/L 以上 [93]になるように同レベルの運動負荷をかけていたにもかかわらず、日高育成牧場の身体成長や筋肉量の指標である FFM の増加率が宮崎育成馬と比べて低値であったことから、飼養管理や調教以外の要因がある可能性が示唆された。

北半球における世界の主要な馬産地で飼育されるサラブレッドでは、中期育

成期（当歳夏から1歳夏）の冬期にBWの増体速度が一時的に停滞することが報告[32,97,202,278]されている。さらに、北海道で飼育するサラブレッドでは、後期育成期（1歳秋から2歳春）の2度目の冬期においても、BWの増体速度が停滞することが報告されている[156,201,245]。しかし、その理由は明らかにされていない。Tangyuenyong ら[245]は、自然光下で日高育成牧場で飼育した後期育成馬では、宮崎育成馬と比べて血中サイロキシン濃度が高値であったことを報告している。下臨界温度を下回らない寒冷環境下で飼育されている後期育成馬は、高い基礎代謝によって生体の恒常性を維持しており、耐寒のための維持エネルギー要求量が増大することも低温環境下における成長停滞の一因となることが報告されている[46,245]。本研究における体組成分析において、宮崎育成馬は日高育成馬と比べて、雌雄ともにBW増加率が高値であり、また、雄馬のFFM増加率が高値であった。さらに、成長指標の分析において、宮崎育成馬は日高育成馬と比べて、雌雄ともにBW、体高、胸囲、管囲の全ての成長指標項目において増加率が高値であることが判明した。以上のことから、冬期に穏やかな気候の宮崎では、寒冷な日高と比べて冬期の増体速度の停滞が軽度であった可能性が示唆された。しかし、冬期の成長抑制に関する内分泌的な要因は明らかになっていないことから、今後は各種成長関連ホルモンの分泌パターン等の詳細な検討が必要である。

FFMは、筋肉量を反映する指標と考えられており[1,71,120,140]、成長[157]やトレーニング[71]によって増加し、競走成績が優秀な競走馬や運動能力が高い個体はFFMが高値であることが報告されている[71,118-120,146]。また、FFMは、スタンダードブレッド種における1,600m競走タイムやトレッドミル運動負荷試験での $VO_2\max$ （最大酸素摂取量）値と正の相関があることが報告されている[118,119]、さらに、%Fはトレッドミル運動負荷試験における V_{LA4} (Velocity of a 4mmol/blood lactate concentration)と負の相関があることが報告されている[146]。したがって、宮崎育成牧場の雄馬におけるFFMの増加は、後期育成期間のトレーニングが効果的に成長に反映された結果であると推察された。

性腺機能に及ぼす効果について、雌雄ともに生殖関連ホルモン分泌は、日高育成馬と宮崎育成馬との間に有意な差は認められなかった。しかし、宮崎育成

牧場で飼育された雄馬は、日高育成牧場で飼育された雄馬と比べて精巣から分泌される血中テストステロンとエストラジオール-17 β 濃度が高く、下垂体から分泌される2種類の性腺刺激ホルモン（LHとFSH）の血中濃度も高い傾向が認められた。さらに、雌馬では宮崎育成馬は日高育成馬と比べて発育が早く、卵巢機能も促進されていることが判明した。エストラジオール-17 β は、雌馬の発情を誘起し、子宮内膜の成長、子宮腺の発達および子宮・膣の粘液分泌を促すことで受精・着床の準備を行う作用がある。卵巢機能促進に関しては、雌馬では卵巢の成熟卵胞の顆粒層細胞からエストラジオール-17 β が分泌されることから、宮崎育成馬は日高育成馬に比べて血中エストラジオール-17 β 濃度が高い傾向であることも、卵巢での卵胞発育の促進を示す結果であろうと推察された。さらに、宮崎育成馬は日高育成馬と比べて排卵時期も早期であることが明らかとなった。

ウマは長日性季節繁殖動物であることから、日照時間が長くなると視床下部－下垂体－性腺系が賦活される[54,55,95,162,172,174]。冬期の宮崎は日高と比べて日照時間は約1時間長く、また、平均気温や平均最低気温が約9～10℃高い。ウマの排卵開始は最高気温および最低気温と高い相関関係があることが報告されており[80]、この気温の違いも後期育成馬の性腺機能賦活に関与していると推察された。

本研究において、雄馬では、宮崎育成馬は日高育成馬と比べて、IGF-Iの血中濃度が高い傾向を示したことから、宮崎育成牧場の雄馬はFFM増加率が高値であったことと関連がある可能性も示唆された。成熟雄サラブレッドでは、春から夏の繁殖季節に血中IGF-I濃度が上昇することが報告されている[54]ことから、成長ホルモンは日照時間の長い長日期に分泌が亢進すると考えられている[54]。また、第I章ではIGF-Iを測定していないが、当歳馬では出生月に関係なく長日期にADGが相対的に高値になる現象が観察された。本研究における1歳から2歳の雌雄サラブレッドで測定したIGF-Iの血中濃度は、過去に成熟馬で測定した報告と同レベルの血中濃度[39,51,55]であった。IGF-Iは、成長ホルモンの刺激により主に肝臓から分泌が促進され、身体の成長を促すホルモンである[148]ことから、宮崎育成牧場で飼育した雄馬は日高育成牧場で飼育した雄馬と比べて視床下部－下垂体軸の成長ホルモン分泌活性も高い可能性が示唆

された。

血中プロラクチン濃度については、日高育成馬は宮崎育成馬と比べて高い傾向を示した。プロラクチンは、各種ストレスや運動、日照時間の延長などが刺激となって分泌されることから、日高育成馬では、寒冷環境が分泌亢進に作用したと推察された [54,126,249]。

本研究では、4 歳サラブレッド雄馬に対して運動ストレスや情動ストレスを与え、ストレス負荷によって分泌される血中プロラクチンと成長ホルモン濃度の推移を測定した。その結果、情動ストレスはプロラクチンの分泌を促すが成長ホルモンの分泌には影響を及ぼさないことが明らかになった。一方、運動ストレスのみを負荷した場合、両ホルモンともにプレ運動期の開始とともに上昇し、歩行運動期でも低下することなく、本運動期ではさらに上昇してピークに達した。本運動期終了後は緩やかに低下したが本運動期終了 40 分後にも基底値よりも高値を示した。本研究により、サラブレッドにおける運動中のプロラクチンと成長ホルモンは、運動開始すると速やかに分泌され、運動ストレスの増加に伴って分泌が著しく上昇する詳細な変化が初めて明らかになった。

プロラクチンと成長ホルモンはウォームアップ期、歩行運動期及び本運動期を通して血中濃度が上昇し本運動期にピーク値を示した。一方、Hada [82]らは、同様のトレッドミル運動負荷時に副腎髄質から分泌されるアドレナリンとノルアドレナリン濃度のピーク値は、運動強度が最も高い本運動期の後半期にピークを示すことを報告している。さらに、アドレナリンとノルアドレナリン濃度は運動終了後に直ちに低下し、クールダウン期には低値で推移することを報告している[82]。このようなプロラクチンと成長ホルモン及びアドレナリンとノルアドレナリンの分泌パターンの違いは、ウマの運動時におけるそれぞれのホルモンの生理作用の違いに起因すると推察された。ヒトや実験動物において、プロラクチンや成長ホルモンは様々なストレスに対して免疫系を刺激することが報告されている[22,56,176,272]。また、成長ホルモンは、タンパク質の同化作用を有することが報告されている [262,254,275]。すなわち、プロラクチンと成長ホルモンは、若いサラブレッドが後期育成期に騎乗馴致や騎乗調教の過程において経験する、ヒトに乗られることをはじめとした強い情動ストレスによる免疫低下から生体を防御するとともに、トレーニング負荷によって壊れ

た筋組織の修復を行い FFM 増加の役割も担っている可能性が示唆された。

本研究では、南九州で後期育成を行った宮崎育成馬は、北海道で後期育成を行った日高育成馬と比べて、雄馬における FFM の増加率が高いことから、冬期に寒冷な北海道と比べて効果的な後期育成期のトレーニングを行うことが可能であることが示唆された。サラブレッドが 2 歳競馬において早い時期から能力を発揮するためには、後期育成期に十分なトレーニングを行うことが重要 [221,246] と考えられており、冬期に温暖な南九州は成長を促しながら後期育成を行うのに適した地域であることが判明した。一方、北海道では冬期に成長が抑制されるとともに、後期育成期の FFM 増加率が宮崎と比べて低いことが明らかになった。したがって日高育成馬は宮崎育成馬と比べて未成熟と考えられることから、過度なトレーニング負荷によって MSI を発症しないよう [59,217,267]、馬体を判定しながら慎重にトレーニングを進めることが肝要と推察された。しかし、日本のサラブレッドにおける生産・育成の拠点は北海道であることから、我国における健康で走能力に優れた競走馬の育成に貢献するためには、寒冷地において適正な発育を促す馬の飼養管理技術の開発が課題と考えられた。

III-5 小括

本研究の結果を要約すると、自然光下では、冬期に温暖な南九州・宮崎でサラブレッドを後期育成する方法（二元育成）の有効性が明らかになった。この、初期及び中期育成を北海道で行い、後期育成を温暖地で実施する二元育成法では、雌雄ともに、後期育成期の身体成長と性腺機能の発育が促進されることが明らかになった。また、体組成の比較において、特に雄では FFM の増加率が高値であることから、北海道と比べて冬期に効果的にトレーニングを実施することができる可能性が示唆された。一方、日本のサラブレッドにおける生産・育成の拠点は北海道であることから、我国における健康で走能力に優れた競走馬の育成に貢献するためには、寒冷地において適正な発育を促す馬の飼養管理技術の開発が課題と考えられた。

第IV章

後期育成期のサラブレッドに対する長日処理が成長及び内分泌機能に及ぼす影響

IV-1 序文

第III章では、冬期に寒冷な北海道で後期育成したサラブレッドは、冬期に温暖な宮崎で後期育成したサラブレッドと比べて発育が遅く、生殖関連ホルモンの分泌開始時期も遅いことが明らかになった。そのため、北海道で後期育成馬に十分なトレーニングを実施するためには、厳寒期に適正な発育を促すことができるような飼養管理技術の開発が課題と考えられた。

我国の大多数のサラブレッドが育成される北海道は、冬期に低温であるとともに、積雪および馬場凍結など、自然条件が厳しいことから、かつては後期育成期に競走馬として仕上げることは困難であった。近年では、北海道においても屋内坂路馬場などの調教設備が整備され、厳寒期においても天候に左右されずに十分な騎乗トレーニングを実施する環境が整ってきている。日本中央競馬会が主催する競馬では、日本ダービー（東京優駿 GI）の翌週にあたる6月第1週から2歳戦が開始される。したがって、サラブレッド種競走馬は、2歳6月からパフォーマンスを発揮するとともに、年齢を重ねても健康を維持し、長期間にわたって活躍することが理想とされる。かつては、ダービー出走を目指すような有力馬は2歳秋にデビューすることが一般的であった。しかし、近年では、後期育成期に筋肉や骨格の健全な発育を促し、2歳早期から競馬に出走させることは、むしろ、競走馬としてのキャリアにわたるパフォーマンス向上につながると考えられている[68,151,220,246]。したがって、近年では早期にサラブレッドを競馬にデビューさせることに対して、競馬関係者は肯定的に捉えている。2歳6月に競走馬としてデビューするためには、1歳秋から2歳春までの後期育成期は、基礎体力やスピードを養成するうえで極めて重要な時期である[43,198]。一方、未成熟な個体に対する過度なトレーニング負荷をかけることは、四肢の関節炎や MSI を発症することにつながることが報告されており[59,217,267]、後期育成期における一定レベルまでの身体発育は不可欠と考え

られる。

長日性季節繁殖動物であるウマに対して、短日期に馬房内で電灯の照明時間を延長することにより長日期を人工的に作出する長日処理法[36,188,193]は、春季発情移行期における繁殖雌馬の排卵を早期化することを目的として、サラブレッドの生産現場で広く応用されている[171,190]。ウマの性成熟は一般的には約 18 ヶ月齢といわれているが、サラブレッドでは生後約 1 年後の 1 歳春から夏には、雌雄ともに性腺からステロイドホルモンの分泌が開始されることが報告されている[55]。

本研究の目的は、冬期の気候が異なる北海道及び南九州で後期育成される雌雄サラブレッドに対して、1 歳 12 月から 2 歳 4 月まで長日処理を実施し、体組成、成長、性腺機能及び被毛変化に及ぼす効果を比較し、後期育成馬に対する長日処理のメカニズムを総合的に明らかにすることである。

IV-2 材料及び方法

IV-2-1 供試馬

本研究には、北海道と青森県で 2004 年から 2011 年に出生した合計 323 頭（雄 146 頭、雌 177 頭）のサラブレッド種を用いた。供試馬は 7 月から 8 月にかけて開催された 1 歳セリ市場において日本中央競馬会が購買したサラブレッドであり、購買時の体高は 150 cm 以上であった。購買価格や種牡馬の割合が概ね均等になるよう、2 群に分けて、購買の 1 週間後に日高育成牧場または宮崎育成牧場に輸送し、後期育成を実施した。

日高育成牧場の供試馬として、サラブレッド種 232 頭（雄 116 頭、雌 116 頭）を用いた。そのうち 168 頭（雄 85 頭、雌 83 頭）は、1 歳 12 月 20 日から 2 歳 4 月までの 4 ヶ月間にわたって長日処理を実施し、残りの 64 頭（雄 31 頭、雌 33 頭）は対照群として自然光のみで飼育した。宮崎育成牧場の供試馬として 91 頭（雄 30 頭、雌 61 頭）を用いた。そのうち 67 頭（雄 18 頭、雌 49 頭）は、1 歳 12 月 20 日から 2 歳 4 月までの 4 ヶ月間にわたって長日処理を実施し、残りの 24 頭（雄 12 頭、雌 12 頭）は対照群として自然光のみで飼育した。なお、両育成牧場における実験開始時の供試馬の月齢は 19 ヶ月齢～22 ヶ月齢であった。

日本中央競馬会日高育成牧場の実験動物委員会の承認（日-2007-5、日-2011-5）を得て全ての実験を実施した。

IV-2-2 飼養管理及び調教

日高育成馬と宮崎育成馬の育成状況をそろえるために、餌と運動時間を可能な限り統一し、第Ⅲ章と同様の飼養管理および調教を実施した。

IV-2-3 長日処理(Extended Photoperiod; EP)

馬房（3.6m×3.6m）の天井に 100W 白色電球を設置し、タイマーで自動的に 5 時 30 分点灯、20 時消灯となるように調整し、1 日の照明時間を明期 14.5 時間、暗期 9.5 時間に設定した。ウマの頭の高さでの照明の明度は約 100lux であった。長日処理は冬至である 12 月 20 日から開始し 4 月中旬まで継続した。

IV-2-4 体組成の測定

日高育成馬の体組成の測定には、2004 年から 2011 年に出生した 73 頭（雄 38、雌 35）を用いた。そのうち 41 頭（雄 22 頭、雌 19 頭）は長日処理を実施し（長日処理群）、残りの 32 頭（雄 16 頭、雌 16 頭）は対照群として自然光のみで飼育した（対照群）。宮崎育成馬の体組成の測定には、36 頭（雄 18、雌 18）を用いた。そのうち、18 頭（雄 9、雌 9）を長日処理群、残りの 18 頭（雄 9、雌 9）を対照群とした。

毎月中旬に体重計 (TRU-TEST S3, Datamars, Auckland, New Zealand) で BW を測定するとともに、超音波画像診断装置 (LOGIQB Book XP Basic, GE Health Care, Hino, Japan) を用いて RFT を測定した。第 3 章と同様に Kane ら[115]の式を用いて %F、FFM を算出し、日高育成牧馬と宮崎育成牧馬の体組成変化を比較した。

$$\%F = 2.47 + 5.47 \times RFT \text{ (cm)}$$

$$FM \text{ (kg)} = BW \text{ (kg)} \times \%F$$

$$FFM \text{ (kg)} = BW \text{ (kg)} \times (1 - \%F/100)$$

IV-2-5 成長指標および性腺機能の評価

成長と性腺機能の評価に関する研究には、2007年から2008年に出生した48頭を用いた。実験に際しては、2群に分けて、24頭（雄12頭、雌12頭）を宮崎育成牧場、24頭（雄12頭、雌12頭）を日高育成牧場でそれぞれ1歳8月から2歳4月中旬までの9ヶ月間を飼育した。

日高および宮崎育成馬の成長の指標として、BW、体高、胸囲及び管囲を、1歳10月から2歳4月までの間、1ヶ月に1回、月末に測定した。また、成長を比較する目的で、4種類の指標の増加率（4月の値/12月の値×100）を算出した。

日高育成牧場および宮崎育成牧場の供試馬に対して、1歳10月から2歳4月まで月1回、月末の9時から12時までの間に、頸静脈からヘパリン加採血管を用いて約10ml採血し、血漿は測定まで-20℃で保存された。血中プロラクチン、LH、FSH、IGF-I、プロジェステロン、テストステロン及びエストラジオール-17β濃度を測定した。

IV-2-6 ホルモンの測定

IV-2-6-1 プロラクチン、LH及びFSH

プロラクチン、LH及びFSHは、馬用二抗体法RIAによって測定した[55]。プロラクチンの測定には、第一抗体として抗馬プロラクチン血清 (AFP-261987)、標識用及び標準ホルモンとして精製馬プロラクチン (AFP-8794B) を用いた。LHの測定には、第一抗体として抗馬LH血清 (AFP-2405080)、標識用及び標準ホルモンとして精製馬LH (AFP-50130A) を用いた。FSHの測定には、第一抗体として抗馬FSH血清 (AFP-2062096)、標識用及び標準ホルモンとして精製馬FSH (AFP-5022B) を用いた。測定内及び測定間変動は、プロラクチンが7.1%と9.8%、LHが12.6%と15.1%、FSHが4.9%と12.2%であった。

IV-2-6-2 IGF-I

IGF-Iは、ヒト用二抗体法RIAによって測定した[51]。第一抗体には、抗ヒトIGF-1血清 (AP 4892898)、標識用及び標準ホルモンとして精製ヒトIGF-I

(Lot#090701) を用いた。測定内及び測定間変動は、2.7% と 14.8%であった。

IV-2-6-3 プロジェステロン、テストステロン及びエストラジオール-17 β

プロジェステロン、テストステロン及びエストラジオール-17 β は、¹²⁵I で標識したホルモンを用いた二抗体法 RIA によって測定した[247]。第一抗体としては、抗プロジェステロン血清 (GDN 337) [76]、抗テストステロン血清 (GDN 250) [75]、抗エストラジオール-17 β 血清 (GDN 244) [130]を用いた。測定内及び測定間変動は、プロジェステロンが 7.3% と 14.3% テストステロンが 6.3% と 7.2% 及びエストラジオール-17 β が 6.7% と 17.8% であった。

IV-2-7 初回排卵日の決定

雌馬の初回排卵日の決定には、2008 年に出生した宮崎育成馬 12 頭（長日処理群 6 頭、対照群 6 頭）および日高育成馬 12 頭（長日処理群 6 頭、対照群 6 頭）を用いた。血中プロジェステロン濃度が初めて 1ng/ml 以上の値を示した日の 1 週間前の日を、初回排卵日と判断した[162,172]。

IV-2-8 宮崎育成馬及び日高育成馬の被毛評価

宮崎育成馬の被毛の評価に関する研究には、2007 年から 2011 年に出生した長日処理群 61 頭（雄 12 頭、雌 49 頭）及び対照群 24 頭（雄 12 頭、雌 12 頭）の合計 85 頭を用いた。日高育成馬の被毛の評価に関する研究には、2007 年から 2011 年に出生した長日処理群 97 頭（雄 48 頭、雌 49 頭）と、対照群 24 頭（雄 12 頭、雌 12 頭）の合計 121 頭を用いた。

被毛の評価は 2 歳の 3 月に行い、3 名の評価者が全ての馬を長日処理の有無を知ることなく無作為に評価した。“良い”を 3 点、“普通”を 2 点、“悪い”を 1 点とする 3 点法で採点して平均点を算出して両群を比較した。

IV-2-9 統計処理

全てのデータは、平均値 \pm 標準誤差で示した。有意差の検定には、統計用ソフトウェア JMP (Ver 16.0)を用いた。3 群以上の検定を行う際には、one-way ANOVA を、関連多群間の差の検定を行う際には、two-way ANOVA を用いた。

one-way ANOVA で有意差が認められた場合には Tukey-Kramer テストを用いた。また、同一性及び同一育成牧場における体組成や成長指標の 2 点間の増加率の比較には、*F*-test の後 Student's *t*-test を用いた。分散が均一でない場合には Welch の *t*-test を用いた。血中ホルモン濃度の比較には、two-way ANOVA の後 post-hoc テスト (Bonferroni post test) を用いた。被毛の評価点の比較は Mann-Whitney の U 検定を用いた。 $P < 0.05$ で統計的に有意と判定した。

IV-3 結果

IV-3-1 日高育成馬における体組成変化の比較

IV-3-1-1 各月の体組成変化

図IV-1 に日高育成馬における雌雄の体組成変化を示した。

雄馬の BW では、対照群は 1 歳 12 月から 2 歳 3 月まで緩やかに増加したが、1 歳 12 月の BW と 2 歳 1 月から 4 月までの BW との間に有意差は認められなかった。一方、長日処理群は 1 歳 12 月から 2 歳 4 月まで直線的に増加し、2 歳 2 月、3 月及び 4 月の BW は、1 歳 12 月と比べて有意に高値であった ($P < 0.05$; 図IV-1-A)。FFM では、対照群の増加は緩やかで 1 歳 12 月の値と 2 歳 1 月から 4 月までの値との間に有意差は認められなかった。一方、長日処理群は 1 歳 12 月から 2 歳 4 月まで直線的に増加し、2 歳 2 月、3 月及び 4 月の値は 1 歳 12 月の値と比べて有意に高値であった ($P < 0.05$; 図IV-1-B)。%F では、対照群及び長日処理群ともに大きな変化は観察されなかった。2 歳 3 月において、長日処理群は対照群と比較して低値である傾向が観察されたが、有意差は認められなかった (図IV-1-C)。

雌馬の BW では、対照群及び長日処理群ともにほぼ同様の上昇傾向を示し、2 歳 3 月及び 4 月の値は、それぞれ 1 歳 12 月の値と比べて有意に高値であった ($P < 0.05$; 図IV-1-D)。FFM では、対照群の増加は 2 歳 1 月以降 3 月まで緩やかで 1 歳 12 月の値と 2 歳 1 月から 4 月までの値との間に有意差は認められなかった。一方、長日処理群では 2 歳 1 月以降 3 月まで直線的に増加し、2 歳 3 月及び 4 月の値は 1 歳 12 月の値と比べて有意に高値であった ($P < 0.05$; 図IV-1-E)。%F では、対照群および長日処理群ともに大きな変化は観察されなかった (図IV-1-F)。

IV-3-1-2 体組成の各月増加率

図IV-2 に、雄馬及び雌馬の 1 歳 12 月から 2 歳 4 月までの各月平均増加率 (%) を示した。

雄馬の各月 BW 増加率では、2 歳 2 月 ($P<0.05$) 及び 4 月 ($P<0.01$) において、長日処理群は対照群と比べて有意に高値であった (図IV-2-A)。各月 FFM 増加率では、2 歳 3 月において、長日処理群は対照群と比べて有意に高値であった ($P<0.05$; 図IV-2-B)。各月 %F 増加率では、2 歳 3 月において、長日処理群は対照群と比べて有意に低値であった ($P<0.05$; 図IV-2-C)。

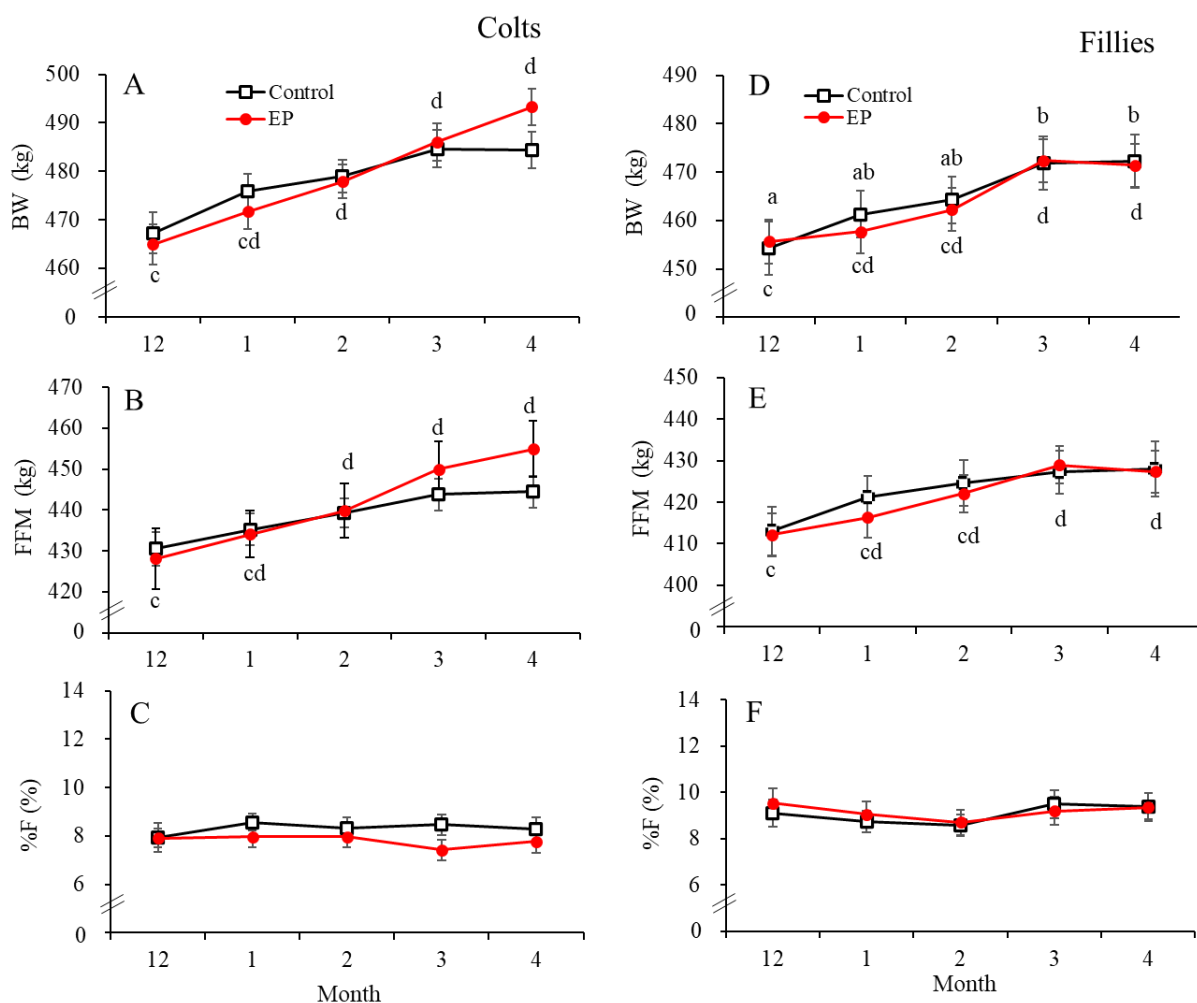
雌馬の各月 BW 増加率では、2 歳 1 月において、対照群は長日処理群と比べて有意に高値であった ($P<0.05$; 図IV-2-D)。各月 FFM 増加率では、2 歳 3 月において、長日処理群は対照群と比べて有意に高値であった ($P<0.05$; 図IV-2-E)。各月 %F 増加率では、長日処理群と対照群の間に有意差は認められなかった (図IV-2-F)。

IV-3-1-3 体組成の増加率

図IV-3 に雄馬及び雌馬における 1 歳 12 月から 2 歳 4 月までの BW 及び FFM 増加率と 2 歳 1 月から 3 月までの BW 及び FFM 増加率を示した。

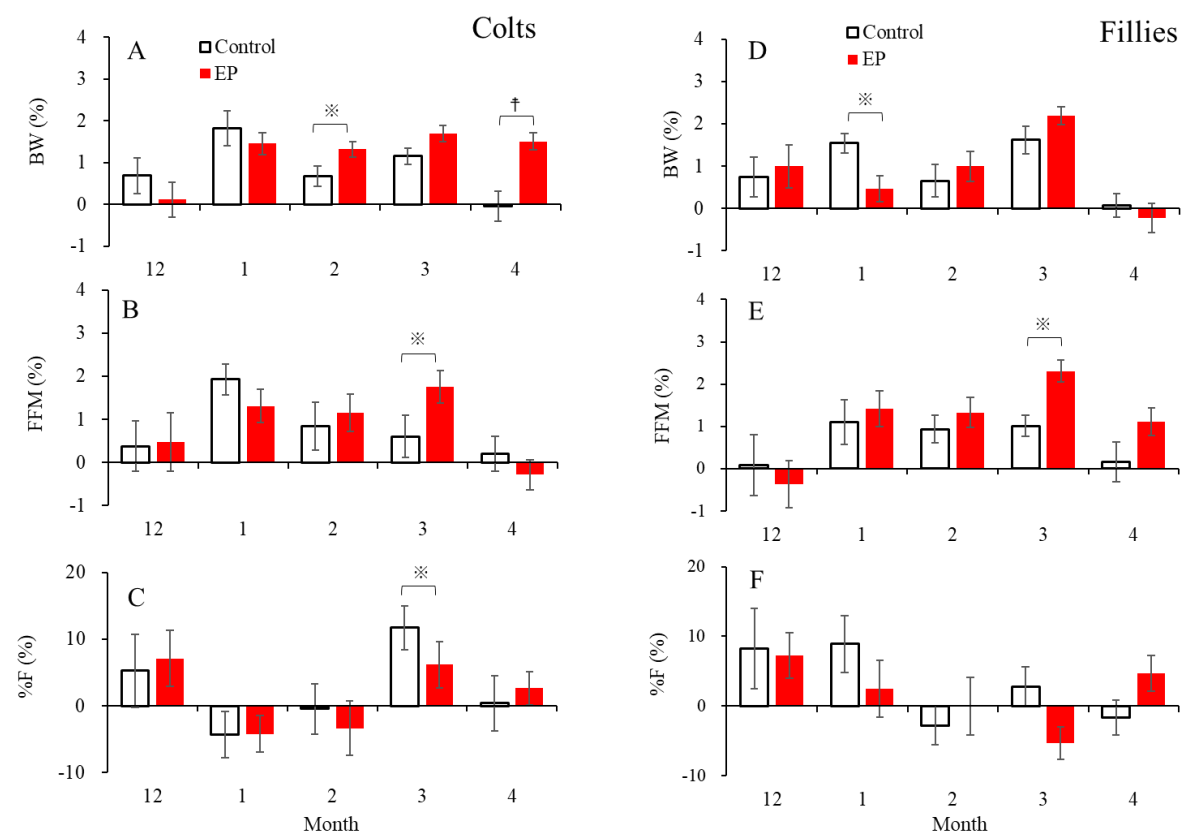
1 歳 12 月から 2 歳 4 月までの BW 及び FFM 増加率において、雌馬では長日処理群と対照群との間に有意差を認められなかったが、雄馬では、長日処理群は対照群と比べて有意に高値であった ($P<0.01$; 図IV-3-A, 図IV-3-B)。

2 歳 1 月から 2 歳 3 月までの BW 増加率において、雌馬では長日処理群と対照群との間に有意差を認められなかったが、雄馬では長日処理群は対照群と比べて有意に高値であった ($P<0.05$; 図IV-3-C)。FFM 増加率においては、雄馬及び雌馬ともに、長日処理群は対照群と比べて有意に高値であった (雄馬 $P<0.01$, 雌馬 $P<0.05$; 図IV-3-D)。



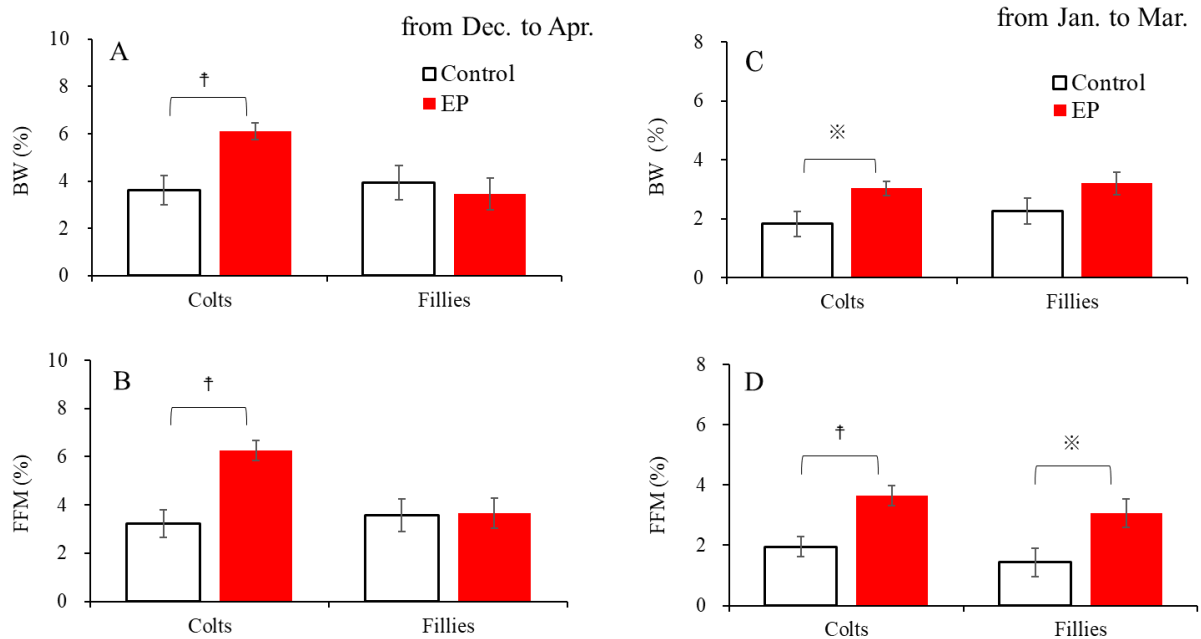
図IV-1 日高育成馬における長日処理群と対照群の体組成比較

日高育成牧場で飼育した雄馬（A-C）及び雌馬（D-F）における対照群（Control; □ Colts n=16, Fillies n=16）と長日処理群（EP; ● Colts n=22, Fillies n=19）の BW（A、D）、FFM（B、E）及び%F（C、F）の変化。結果は平均値±標準誤差で示した。異なるアルファベット間とは同群間における 1 歳 12 月値との有意差を示した（ $P<0.05$ ）。



図IV-2 日高育成馬における長日処理群と対照群の各月体組成増加率

日高育成牧場で飼育した雄馬（A-C）及び雌馬（D-F）における対照群（Control; □ Colts n=16, Fillies n=16）と長日処理群（EP; ■ Colts n=22, Fillies n=19）の BW（A、D）、FFM（B、E）及び%F（C、F）の各月増加率。※及び†は同月における両群間の有意差を示した（※ $P<0.05$ 、† $P<0.01$ ）。



図IV-3 日高育成馬における長日処理群と対照群の増加率

日高育成牧場の対照群（Control; □ Colts n=16, Fillies n=16）及び長日処理群（EP; ■ Colts n=22, Fillies n=19）における 1 歳 12 月から 2 歳 4 月までの BW（A）、FFM（B）の増加率及び 2 歳 1 月から 3 月までの BW（C）、FFM（D）の増加率。結果は平均値±標準誤差で示した。†及び※は群間の有意差を示した（† $P<0.01$ 、※ $P<0.05$ ）。

IV-3-2 宮崎育成馬における体組成変化の比較

IV-3-2-1 各月の体組成変化

図IV-4 に宮崎育成馬における雌雄の体組成変化を示した。

雄馬の BW では、対照群は 3 月まで緩やかに増加したが、1 歳 12 月の BW と 2 歳 1 月から 4 月までの BW との間に有意差は認められなかった。一方、長日処理群は 1 歳 12 月から 2 歳 3 月まで直線的に増加し、3 月及び 4 月の BW は、12 月の BW と比べて有意に高値であった ($P<0.05$; 図IV-4-A)。FFM では、対照群の増加は緩やかで 1 歳 12 月の FFM と 2 歳 1 月から 4 月までの FFM との間に有意差は認められなかった。一方、長日処理群は 2 歳 4 月まで直線的に増加し、2 歳 3 月及び 4 月の FFM は、1 歳 12 月値と比べて有意に高値であった ($P<0.05$; 図IV-4-B)。%F では、対照群では大きな変化は観察されなかったが、長日処理群では緩やかに増加し 2 歳 4 月値は 1 歳 12 月値と比べて有意に高値であった ($P<0.05$; 図IV-4-C)。

雌馬の BW では、対照群及び長日処理群ともに、2 歳 1 月以降 3 月まで同様の増加傾向を示したが、対照群では 2 歳 4 月に低下した。2 歳 3 月及び 4 月値は、長日処理群及び対照群ともに 1 歳 12 月値と比べて有意に高値であった ($P<0.05$; 図IV-4-D)。FFM では、両群ともに 1 歳 12 月から増加傾向を示したが、対照群では 2 歳 4 月に低下した。対照群では 2 歳 3 月の FFM は 1 歳 12 月の値と比べて有意に高値であった ($P<0.05$; 図IV-4-E)。長日処理群では、2 歳 3 月及び 4 月の値は 1 歳 12 月の値と比べて有意に高値であった ($P<0.05$; 図IV-4-E)。%F では、対照群では 2 歳 1 月以降緩やかに増加し、2 歳 3 月及び 4 月の値は、1 歳 12 月の値と比べて有意に高値であった ($P<0.05$; 図IV-4-F) が、長日処理群では大きな変化は認められなかった。

IV-3-2-2 体組成の各月増加率

図IV-5 に、雄馬及び雌馬の 1 歳 12 月から 2 歳 4 月までの各月増加率 (%) を示した。

雄馬では、BW 及び FFM において、2 歳 2 月、3 月及び 4 月の各月増加率は長日処理群が対照群と比べて高い傾向が観察されたが、3 項目とも長日処理群と対照群の間に有意差は認められなかった (図IV-5-A,B,C)。雌馬では、BW 及

び FFM において、2 歳 4 月の各月増加率は長日処理群が対照群と比べて高い傾向が観察されたが、3 項目とも長日処理群と対照群の間に有意差は認められなかった（図IV-5-D,E,F）。

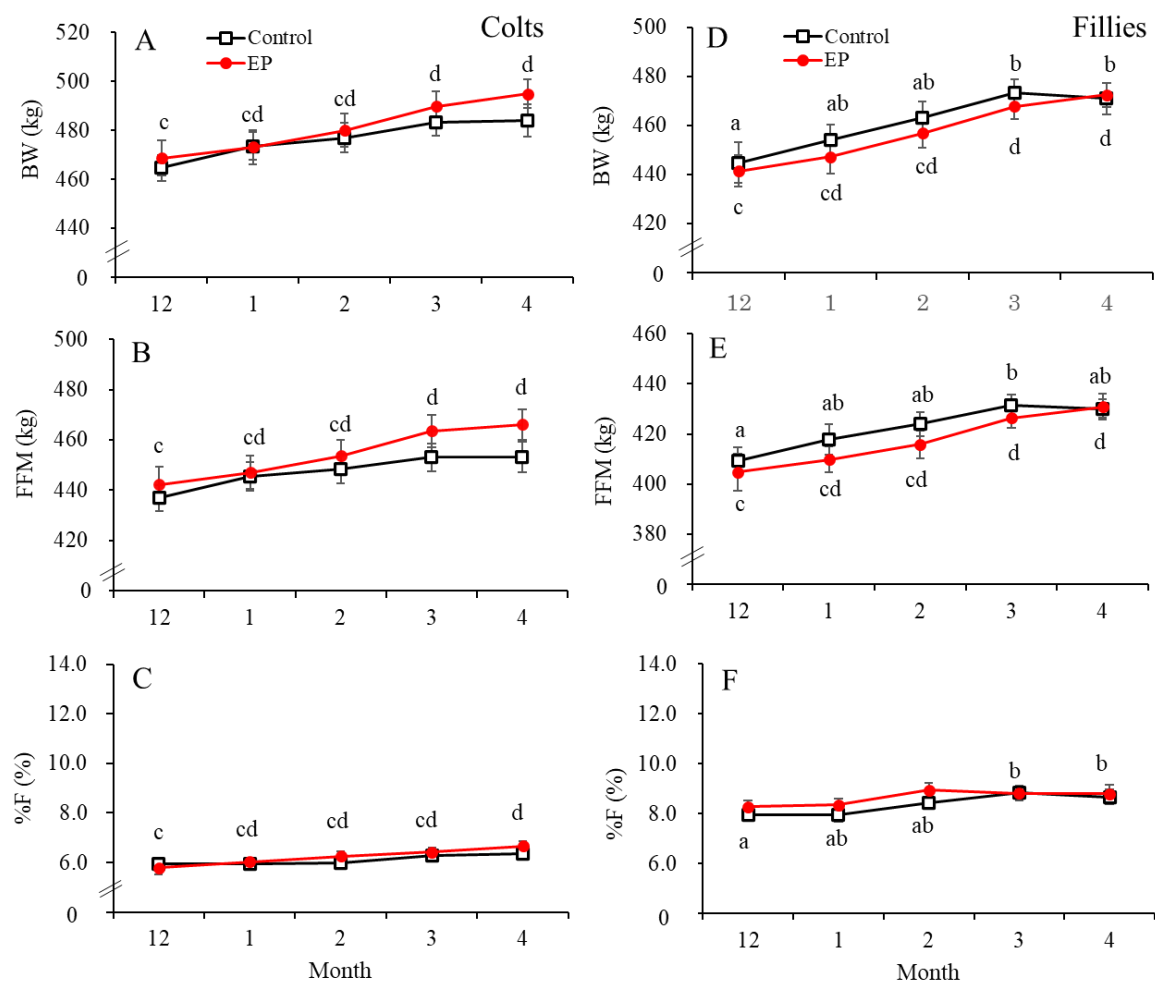
IV-3-2-3 体組成の増加率

図IV-6 に雄馬及び雌馬における 1 歳 12 月から 2 歳 4 月までの BW 及び FFM 増加率と 2 歳 1 月から 3 月までの BW 及び FFM 増加率を示した。

1 歳 12 月から 2 歳 4 月までの BW 及び FFM 増加率では、雄馬および雌馬ともに長日処理群は対照群と比べて高い傾向であったが、有意差は認められなかった（図IV-6-A,B）。2 歳 1 月から 2 歳 3 月までの BW 及び FFM 増加率において、雄馬では、長日処理群は対照群と比べて有意に高値であった（ $P<0.05$ ）が、雌馬では有意差は認められなかった（図IV-6-C,D）。

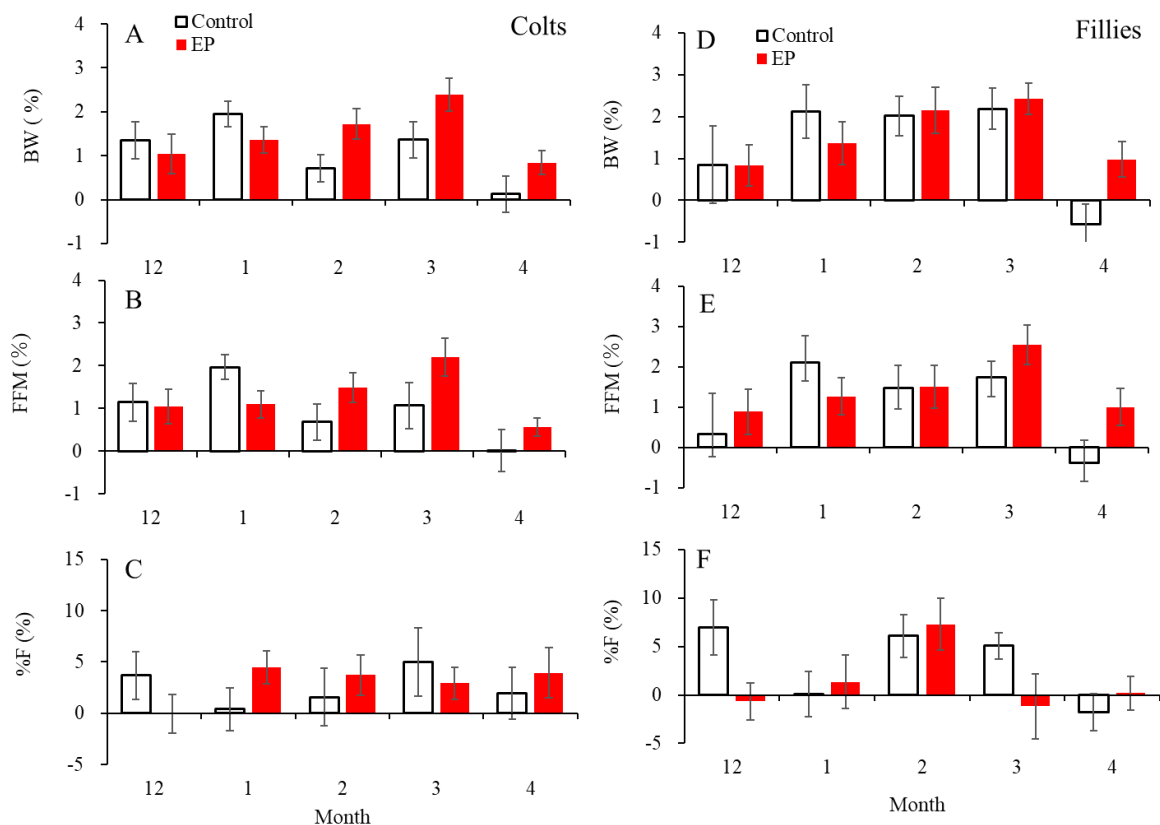
IV-3-3 長日処理下の日高育成馬と宮崎育成馬における体組成増加率

図IV-7 に長日処理群の雄馬及び雌馬における 1 歳 12 月から 2 歳 4 月までの BW 及び FFM の増加率を両育成牧場で比較した。BW（A）および FFM（B）ともに、雄馬では、日高育成馬と宮崎育成馬の間に有意差は認められなかったが、雌馬では、宮崎育成馬は日高育成馬と比べて有意に高値であった（ $P<0.01$ ；図IV-7-A, $P<0.05$ ；図IV-7-A）。



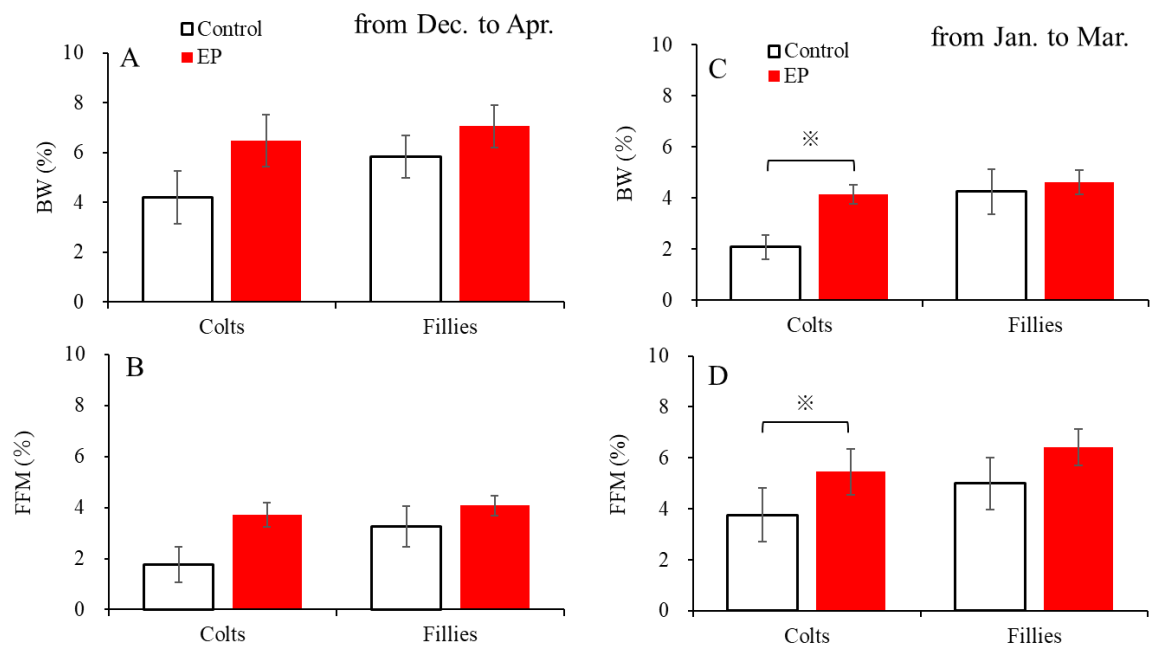
図IV-4 宮崎育成馬における長日処理群と対照群の体組成比較

宮崎育成牧場で飼育した雄馬 (A-C) 及び雌馬 (D-F) における対照群 (Control; □ Colts n=9, Fillies n=9) と長日処理群 (EP; ● Colts n=9, Fillies n=9) の BW (A、D)、FFM (B、E) 及び%F (C、F) の変化。結果は平均値 ± 標準誤差で示した。異なるアルファベット間とは同群間における 1 歳 12 月値との有意差を示した ($P < 0.05$)。



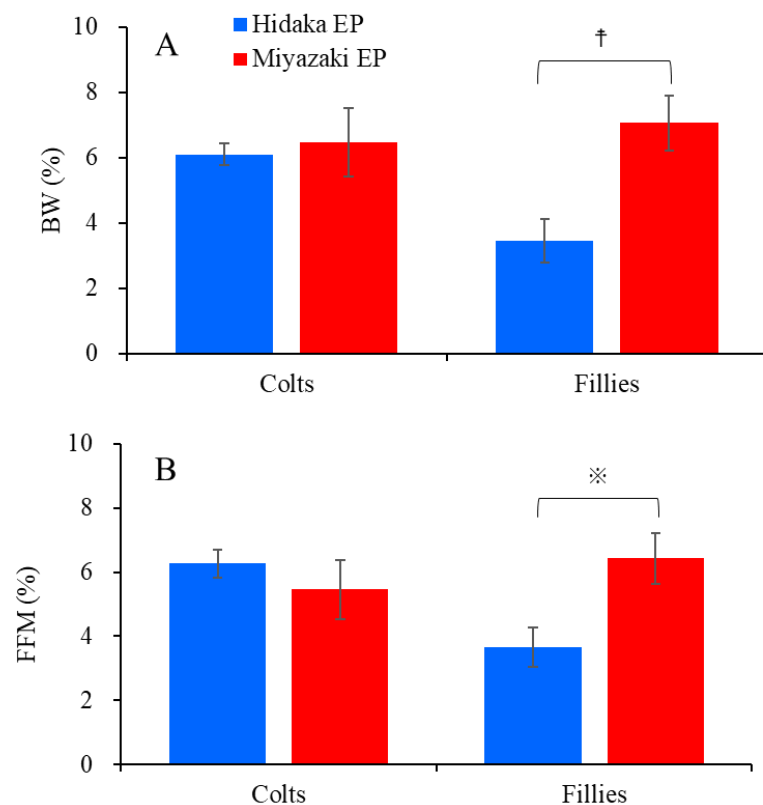
図IV-5 宮崎育成馬における長日処理群と対照群の各月体組成増加率

宮崎育成牧場で飼育した雄馬（A-C）及び雌馬（D-F）における対照群（Control; □ Colts n=9, Fillies n=9）と長日処理群（EP; ■ Colts n=9, Fillies n=9）のBW（A、D）、FFM（B、E）及び%F（C、F）の各月増加率。結果は平均値±標準誤差で示した。



図IV-6 宮崎育成馬における長日処理群と対照群の増加率

宮崎育成牧場の対照群 (Control; □ Colts n=9, Fillies n=9) 及び長日処理群 (EP; ■ Colts n=9, Fillies n=9) における 1 歳 12 月から 2 歳 4 月までの BW (A)、FFM (B) の増加率及び 2 歳 1 月から 3 月までの BW (C)、FFM (D) の増加率。結果は平均値±標準誤差で示した。※は群間の有意差を示した (※ $P<0.05$)。



図IV-7 長日処理群の日高育成馬と宮崎育成馬における体組成比較

長日処理群の日高育成馬 ■ (雄; n=22, 雌; n=19) 及び宮崎育成馬 ■ (雄; n=9, 雌; n=9) における 1 歳 12 月から 2 歳 4 月までの BW (A) 及び FFM (B) の増加率。結果は平均値±標準誤差で示した。†及び※は群間の有意差を示した († $P < 0.01$ 、※ $P < 0.05$)。

IV-3-4 成長率の比較

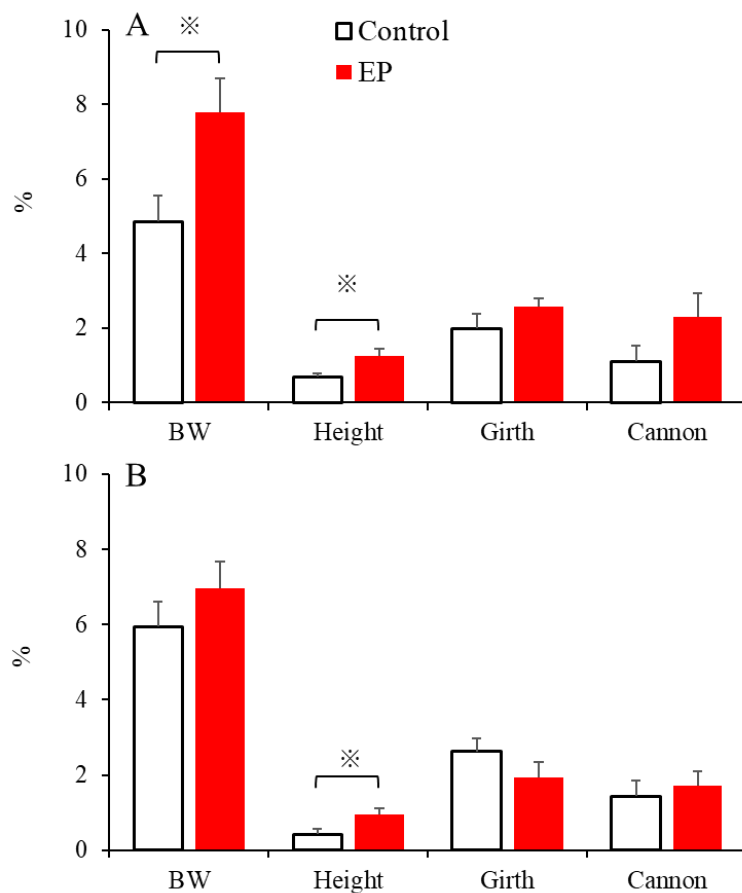
IV-3-4-1 日高育成馬の成長率

図IV-8 に日高育成牧場で飼育された雄馬及び雌馬における BW、体高、胸囲及び管囲の 1 歳 12 月から 2 歳 4 月までの増加率を示した。

日高育成牧場の雄馬では、BW 及び体高において、長日処理群は対照群と比べて有意に高値を示した ($P<0.05$; 図IV-8-A)。一方、日高育成牧場の雌馬では、体高において長日処理群は対照群と比べて有意な高値を示した ($P<0.05$; 図IV-8-B)。

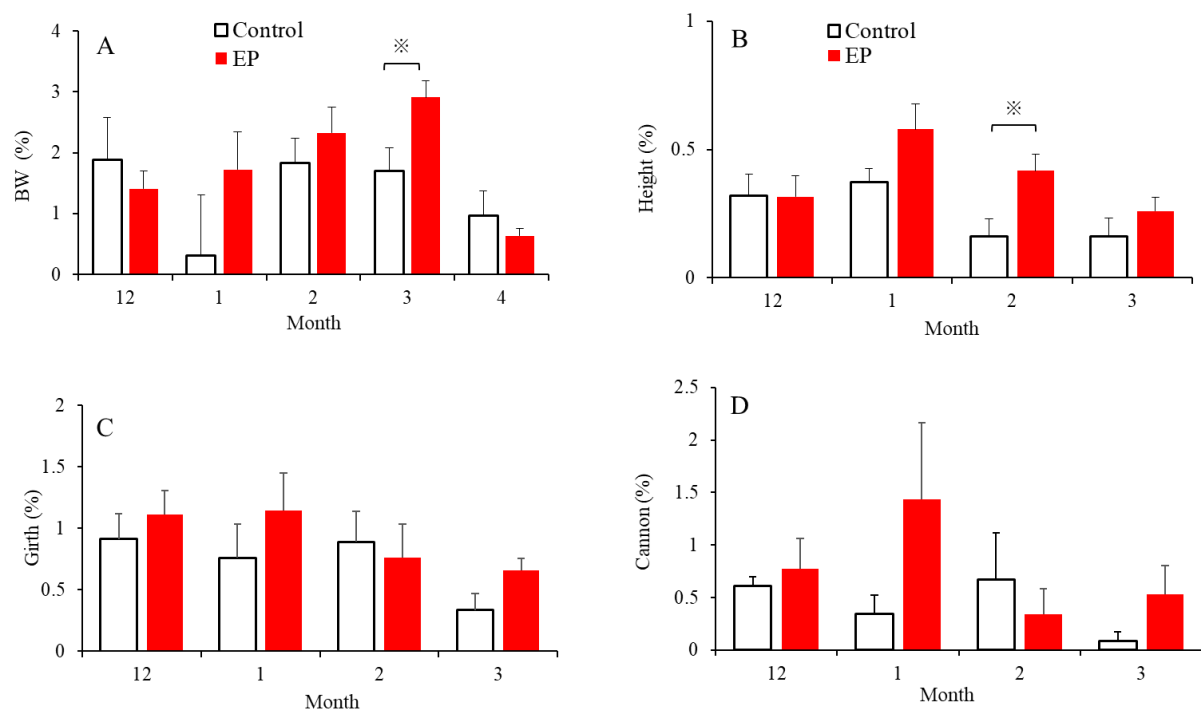
図IV-9-1 に日高育成牧場の雄馬の BW における 1 歳 12 月から 2 歳 4 月までの各月増加率及び体高、胸囲、管囲における 1 歳 12 月から 2 歳 3 月までの各月増加率を示した。胸囲と管囲では、対照群と長日処理群間に差は認められなかったが、BW では 3 月、体高では 2 月において長日処理群は対照群と比べて有意に高値であった ($P<0.05$)。

図IV-9-2 に日高育成牧場の雌馬の BW における 1 歳 12 月から 2 歳 4 月までの各月増加率及び体高、胸囲、管囲における 1 歳 12 月から 2 歳 3 月までの各月増加率を示した。BW、体高及び管囲では、対照群と長日処理群間で差は認められなかったが、胸囲では 2 月において、対照群は長日処理群と比べて有意に高値であった ($P<0.05$)。



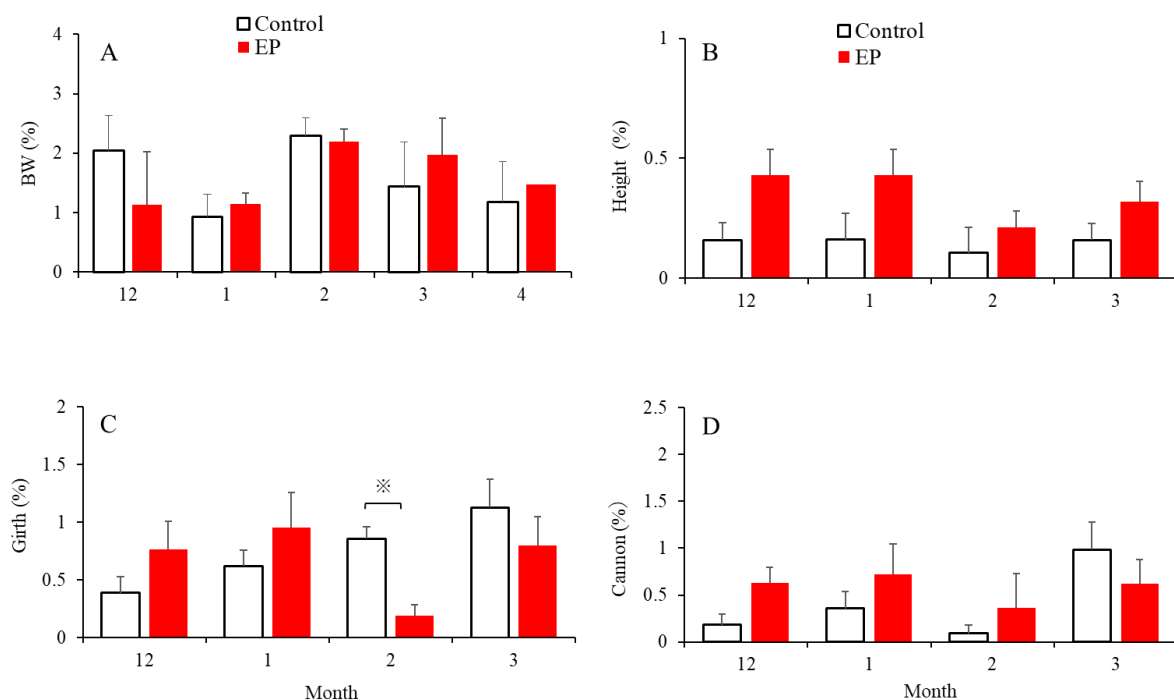
図IV-8 日高育成馬の BW、体高、胸囲及び管囲の増加率

日高育成牧場で1歳12月から2歳4月まで飼育した雄馬（A; 対照群 Control □ n=6, 長日処理群 EP ■ n=6）及び雌馬（B; 対照群 Control □ n=6, 長日処理群 EP ■ n=6）における BW、体高、胸囲、管囲の増加率。結果は平均値+標準誤差で示した。※は群間の有意差を示した（※ $P<0.05$ ）。



図IV-9-1 日高育成牧場の雄馬における成長指標の各月増加率

日高育成馬の雄馬（対照群; Control □ $n=6$ 、長日処理群; EP ■ $n=6$ ）における1歳12月から2歳4月までのBWの増加率（A）及び1歳12月から2歳3月までの体高（B）、胸囲（C）及び管囲（D）の増加率。結果は平均値+標準誤差で示した。※は同月における群間の有意差を示した（※ $P < 0.05$ ）。



図IV-9-2 日高育成牧場の雌馬における成長指標の各月増加率

日高育成牧場の雌馬（対照群; Control □ n=6、長日処理群; EP ■ n=6）における 1 歳 12 月から 2 歳 4 月までの BW の増加率 (A) 及び 1 歳 12 月から 2 歳 3 月までの体高 (B)、胸囲 (C) 及び管囲 (D) の増加率。結果は平均値+標準誤差で示した。

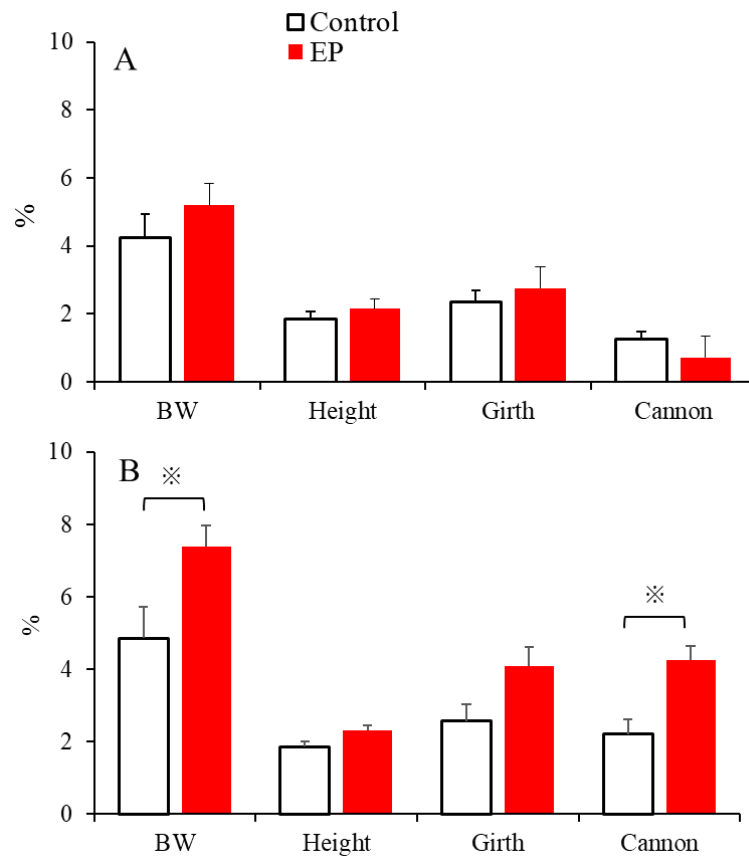
IV-3-4-2 宮崎育成馬の成長率

図IV-10 に宮崎育成牧場で飼育された雄馬及び雌馬における BW、体高、胸囲及び管囲の 1 歳 12 月から 2 歳 4 月までの増加率を示した。

宮崎育成牧場の雄馬では、BW、体高、胸囲及び管囲のいずれの増加率も、長日処理群と対照群間で有意差は認められなかった（図IV-10-A）。一方、雌馬では、BW と管囲において、長日処理群の増加率は対照群と比べて有意な高値を示した（ $P<0.05$; 図IV-10-B）。

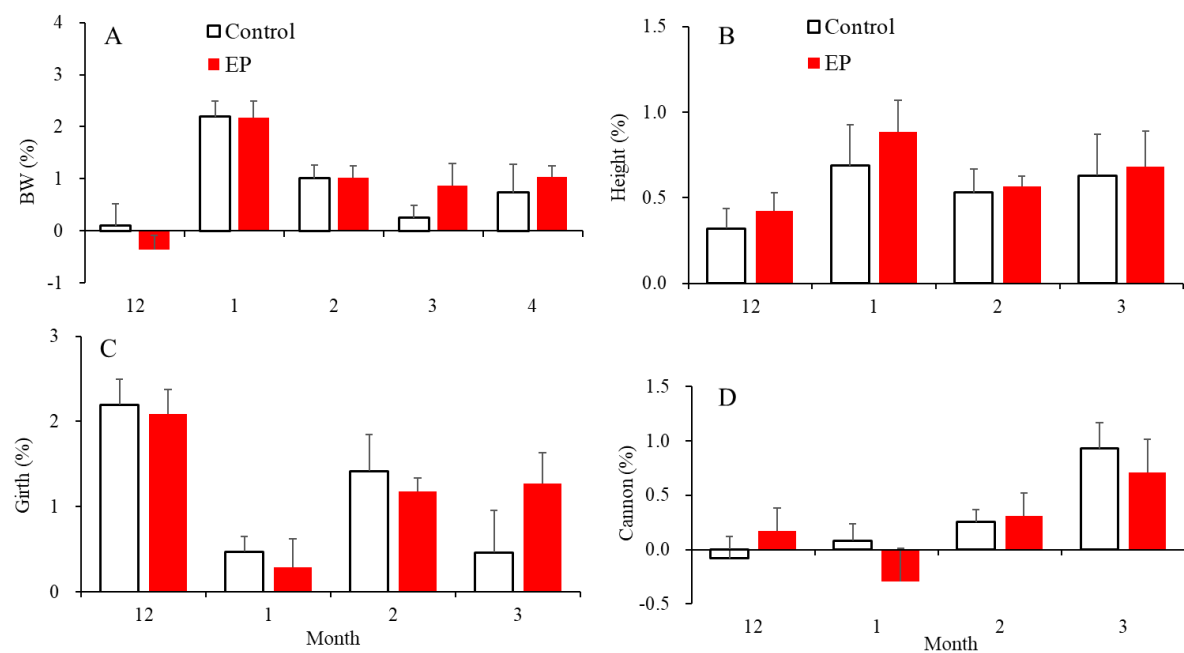
図IV-11-1 に宮崎育成牧場の雄馬の BW における 1 歳 12 月から 2 歳 4 月までの各月増加率及び体高、胸囲、管囲における 1 歳 12 月から 2 歳 3 月までの各月増加率を示した。雄馬においては BW、体高、胸囲及び管囲において長日処理群と対照群との間に有意差は認められなかった（図IV-11-1）。

図IV-11-2 に宮崎育成牧場の雌馬の BW における 1 歳 12 月から 2 歳 4 月までの各月増加率及び体高、胸囲、管囲における 1 歳 12 月から 2 歳 3 月までの各月増加率を示した。BW では 2 月、胸囲では 2 月、管囲では 1 月及び 2 月において長日処理群が対照群と比べて有意な高値を示した（ $P<0.05$; 図IV-11-2）。



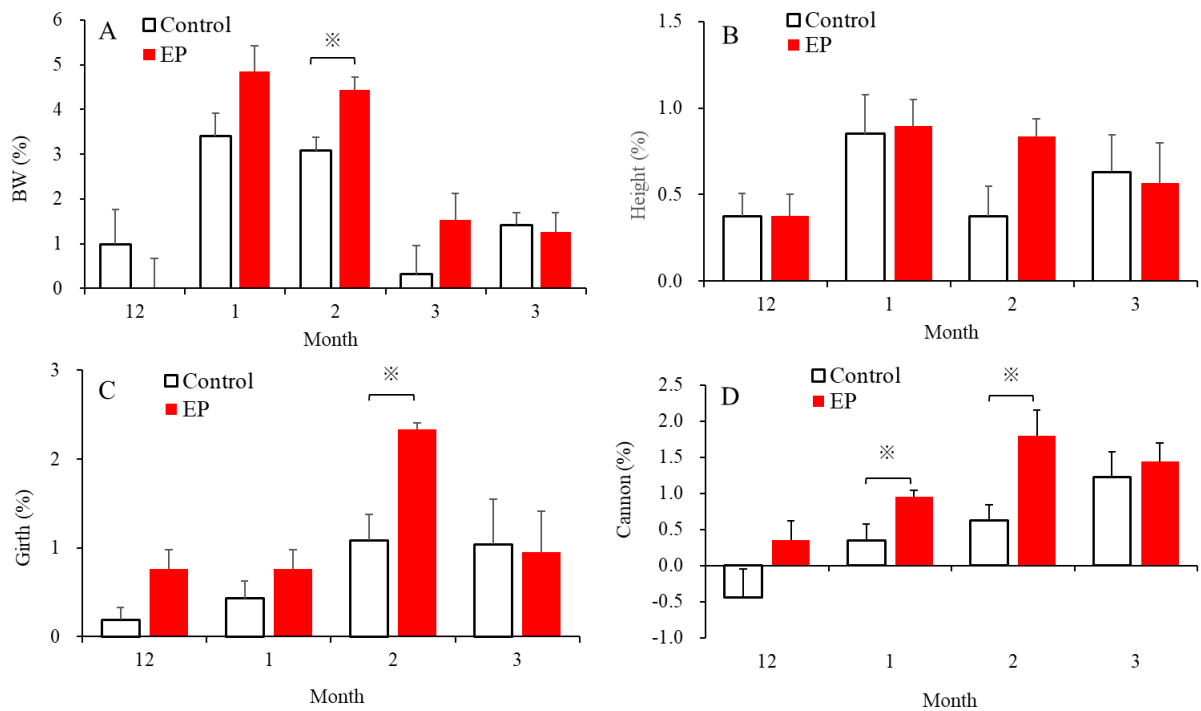
図IV-10 宮崎育成馬の BW、体高、胸囲及び管囲の増加率

宮崎育成牧場で1歳12月から2歳4月までの飼育した雄馬（A; 対照群 Control □ n=6, 長日処理群 EP ■ n=6）及び雌馬（B; 対照群 Control □ n=6, 長日処理群 EP ■ n=6）における BW、体高、胸囲及び管囲の増加率。結果は平均値＋標準誤差で示した。※は群間の有意差を示した（※ $P<0.05$ ）。



図IV-11-1 宮崎育成牧場の雄馬における成長指標の各月増加率

宮崎育成牧場の雄馬における対照群 (Control; □ n=6) 及び長日処理群 (EP; ● n=6) の 1 歳 12 月から 2 歳 4 月までの BW の増加率 (A) 及び 1 歳 12 月から 2 歳 3 月までの体高 (B)、胸囲 (C) 及び管囲 (D) の増加率。結果は平均値+標準誤差で示した。



図IV-11-2 宮崎育成牧場の雌馬における成長指標の各月増加率

宮崎育成牧場の雌馬における対照群（Control; □ n=6）及び長日処理群（EP; ● n=6）の1歳12月から2歳4月までのBWの増加率（A）及び1歳12月から2歳3月までの体高（B）、胸囲（C）及び管囲（D）の増加率。結果は平均値+標準誤差で示した。※は同月における群間の有意差を示した（※ $P<0.05$ ）。

IV-3-5 日高育成馬（雄馬）の内分泌変化

図IV-12-1 に、日高育成牧場で飼育した雄馬における 1 歳 11 月から 2 歳 4 月までのプロラクチン、LH、FSH、IGF-I、テストステロン及びエストラジオール-17 β の血中濃度の変化を示した。

血中プロラクチン濃度は、長日処理群では 1 月から上昇し始め、1 月と 2 月には対照群と比較して有意な高値を示した ($P<0.05$; 図IV-12-1-A)。血中 LH 濃度は、長日処理群では 1 月から上昇が認められ、対照群と比べて高い傾向を示したが、両群間に有意差は認められなかった (図IV-12-1-B)。血中 FSH 濃度は、対照群と比べて長日処理群が高い傾向を示したが、両群間に有意差は認められなかった (図IV-12-1-C)。血中 IGF-I 濃度は、長日処理群では 2 月に上昇し対照群と比べて高い傾向が認められたが、両群間で有意差は認められなかった (図IV-12-1-D)。血中テストステロン濃度は、長日処理群では 1 月から急上昇して 4 月まで高値を維持したが、個体差が大きく対照群との間に有意差は認められなかった (図IV-12-1-E)。血中エストラジオール-17 β 濃度は、長日処理群では 1 月から上昇し始め 4 月まで高値を維持した。長日処理群は 3 月には対照群と比べて有意な高値を示した ($P<0.05$; 図IV-12-1-F)。

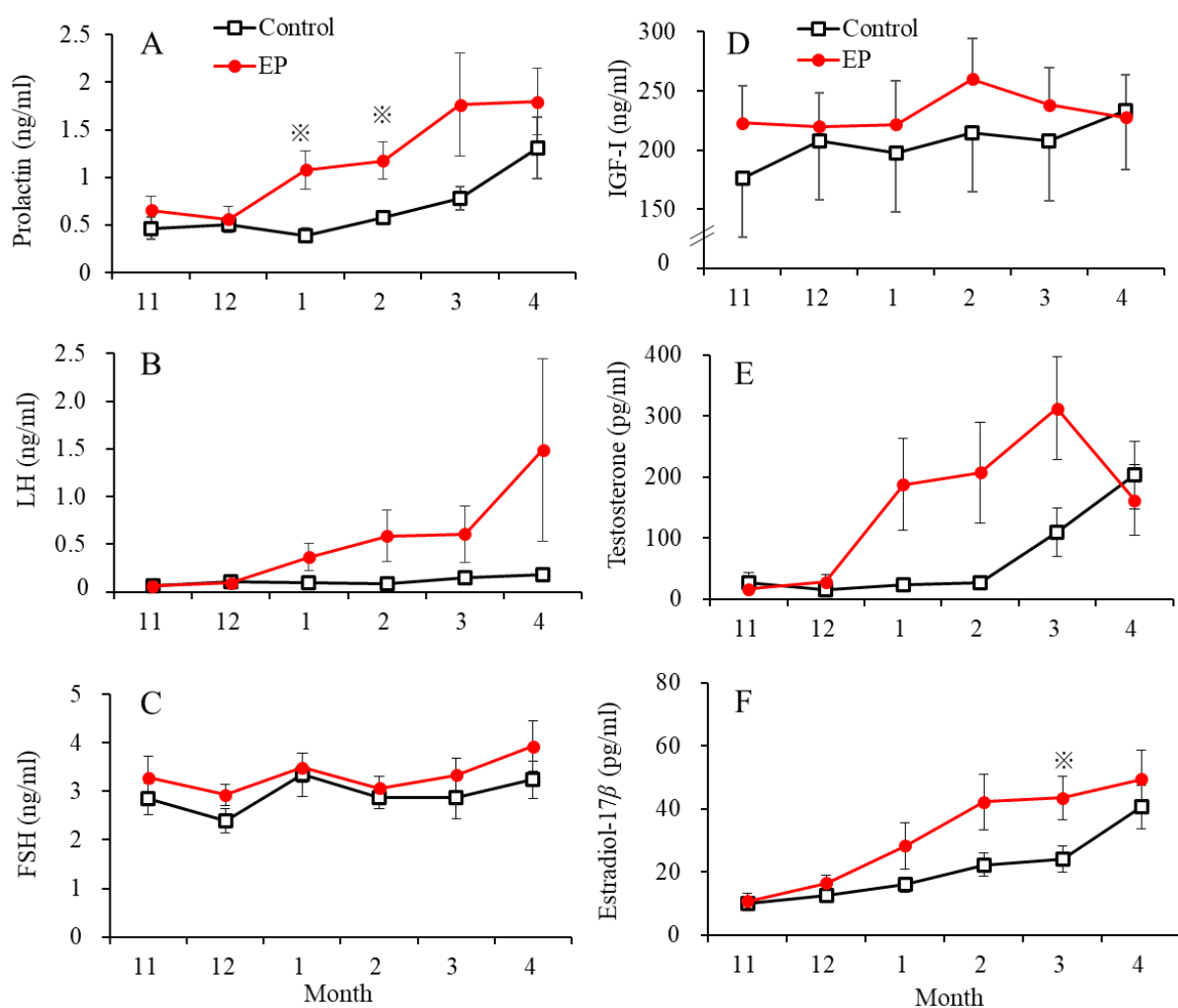
IV-3-6 日高育成馬（雌馬）の内分泌変化

図IV-12-2 に、日高育成牧場で飼育した雌馬における 1 歳 11 月から 2 歳 4 月までのプロラクチン、LH、FSH、IGF-I、プロジェステロン、エストラジオール-17 β の血中濃度の変化を示した。

血中プロラクチン濃度は、長日処理群は 1 月から上昇し始め、1 月と 2 月には対照群と比較して有意な高値を示した ($P<0.05$; 図IV-12-2-A)。血中 LH 濃度は、長日処理群は 2 月から上昇が認められ、長日処理群が対照群と比べて高い傾向を示したが、個体差が大きく両群間に有意差は認められなかった (図IV-12-2-B)。長日処理群の血中 FSH 濃度は、長日処理群は 2 月に上昇し 3 月には対照群と比べて有意な高値を示した ($P<0.05$; 図IV-12-2-C)。血中 IGF-1 濃度は、雌雄ともに両群間で有意差は認められなかった (図IV-12-2-D)。血中プロジェステロン濃度は、対照群では 3 月まで低値を示して 4 月に上昇を示した。長日処理群では 2 月から上昇を始め、4 月には更に上昇を示したが、個体差が

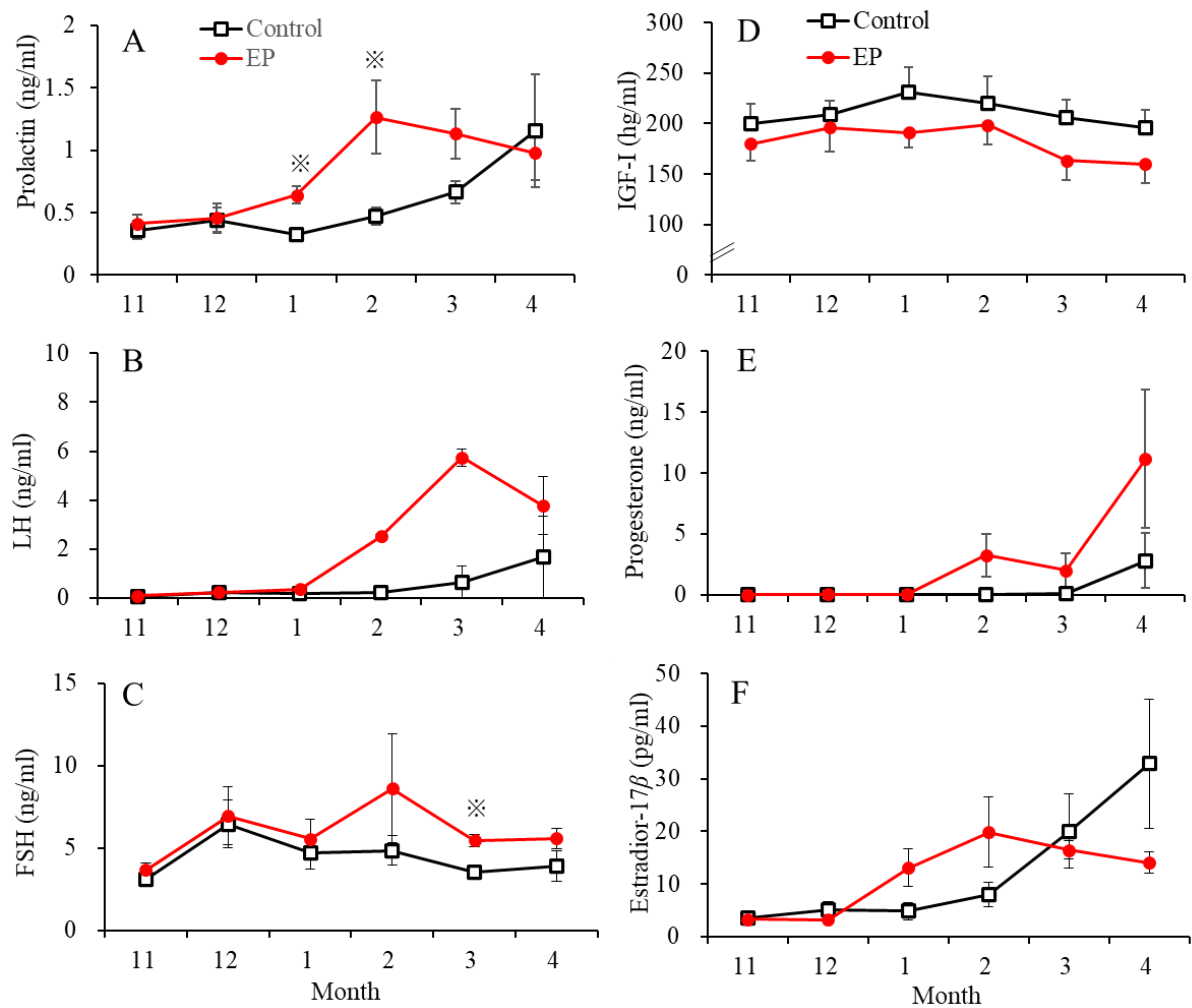
大きく両群間に有意差は認められなかった（図IV-12-2-E）。血中エストラジオール- 17β 濃度は、対照群では2月から4月に上昇を示した。長日処理群では1月から上昇し始め4月まで高値を維持したが、両群間に有意差は認められなかった。（図IV-12-2-F）。

初回排卵の時期については、対照群では6頭中2頭（33.3%）が4月以前に排卵した（図IV-13-A）が、長日処理群では2月から排卵し、6頭全頭（100%）が4月以前に排卵した（図IV-13-B）。



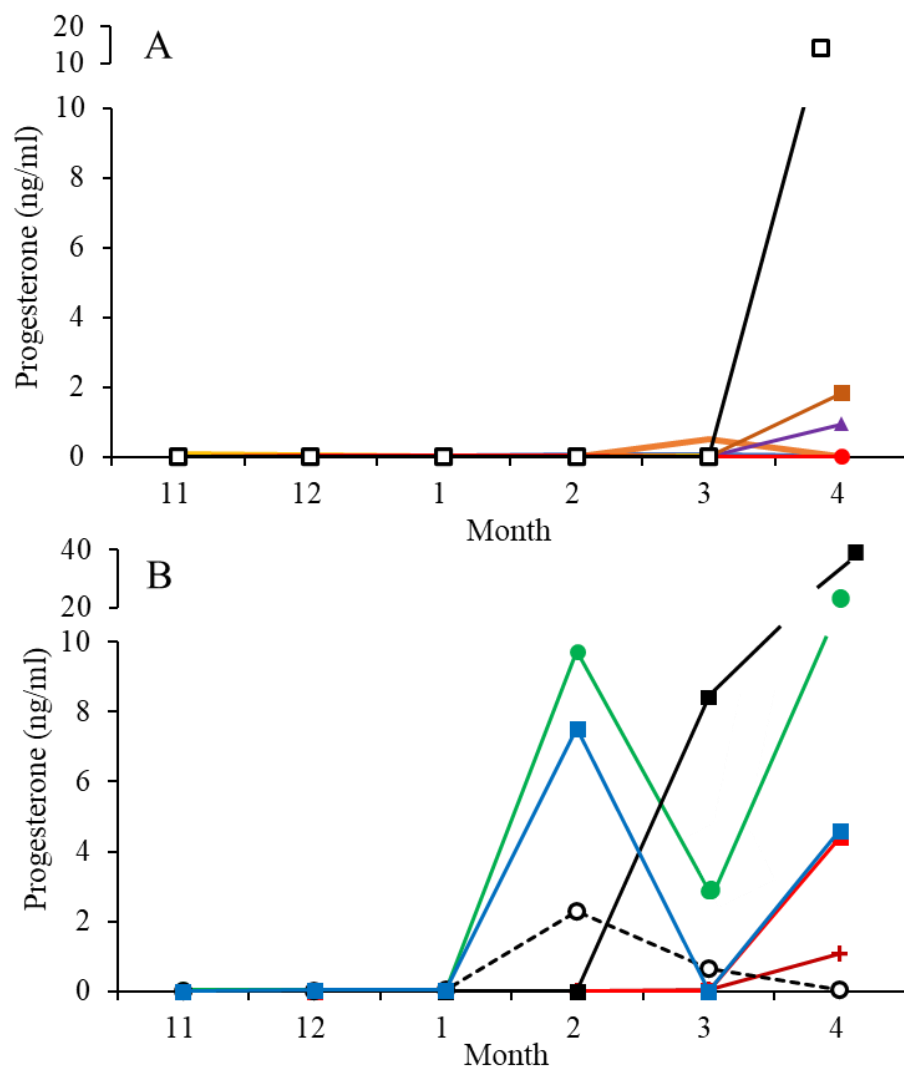
図IV-12-1 日高育成牧場の雄馬における血中ホルモン濃度の変化

雄馬の対照群 (Control; □ n=6) 及び長日処理群 (EP; ● n=6) における 1 歳 11 月から 2 歳 4 月までの血中プロラクチン (A)、LH (B)、FSH (C)、IGF-I (D)、テストステロン (E) 及びエストラジオール-17 β (F) 濃度の変化。結果は、平均値 \pm 標準誤差で示した。※は同月における群間の有意差を示した ($P<0.05$)。



図IV-12-2 日高育成牧場の雌馬における血中ホルモン濃度の変化

雌馬の対照群（Control; □ n=6）及び長日処理群（EP; ● n=6）における 1 歳 11 月から 2 歳 4 月までの血中プロラクチン（A）、LH（B）、FSH（C）、IGF-I（D）、テストステロン（E）及びエストラジオール-17 β （F）濃度の変化。結果は、平均値 \pm 標準誤差で示した。※は同月における群間の有意差を示した（ $P<0.05$ ）。



図IV-13 日高育成牧場の雌馬における血中プロジェステロン濃度の変化

対照群（A; Control n=6）と長日処理群（B; EP n=6）を示した。

IV-3-7 宮崎育成馬（雄馬）の内分泌変化

図IV-14-1 に、宮崎育成牧場で飼育した雄馬における 1 歳 11 月から 2 歳 4 月におけるプロラクチン、LH、FSH、IGF-I、テストステロン及びエストラジオール-17 β の血中濃度の変化を示した。

血中プロラクチン濃度は、長日処理群では 12 月から上昇を開始し、2 月に急上昇して、4 月まで高値を維持した。血中プロラクチン濃度は、12 月から 4 月まで長日処理群が対照群と比較して有意な高値を示した ($P<0.05$; 図IV-14-1-A)。血中 LH 濃度は、長日処理群では、11 月から 4 月まで基底値 (0.16~0.54ng/ml) のままで推移した。対照群では、1 月以降上昇したが両群間に有意差は認められなかった (図IV-14-1-B)。血中 FSH (図IV-14-1-C) 濃度は、長日処理群では 1 歳 11 月から 2 歳 2 月まで緩やかに上昇して 4 月まで同レベルの値を維持した。対照群では 2 歳 3 月から上昇して 4 月には長日処理群よりも有意な高値を示した ($P<0.05$)。他の月では両群間に有意差は認められなかった (図IV-14-1-C)。血中 IGF-1 濃度は、1 歳 11 月から 2 歳 4 月まで、対照群が高い傾向を示したが、両群間に有意差は認められなかった (図IV-14-1-D)。

血中テストステロン濃度は、長日処理群では 1 歳 11 月から 2 歳 2 月まで上昇して 4 月まで同レベルの値を維持した。対照群では 2 歳 3 月から上昇して 4 月には長日処理群よりも有意な高値を示した ($P<0.05$) が、他の月では両群間に有意差は認められなかった (図IV-14-1-E)。血中エストラジオール-17 β 濃度は、長日処理群と対照群ともに 1 歳 11 月から 2 歳 4 月まで緩やかに上昇し、2 月から 4 月まで対照群が高い傾向を示したが、両群間に有意差は認められなかった (図IV-14-1-F)。

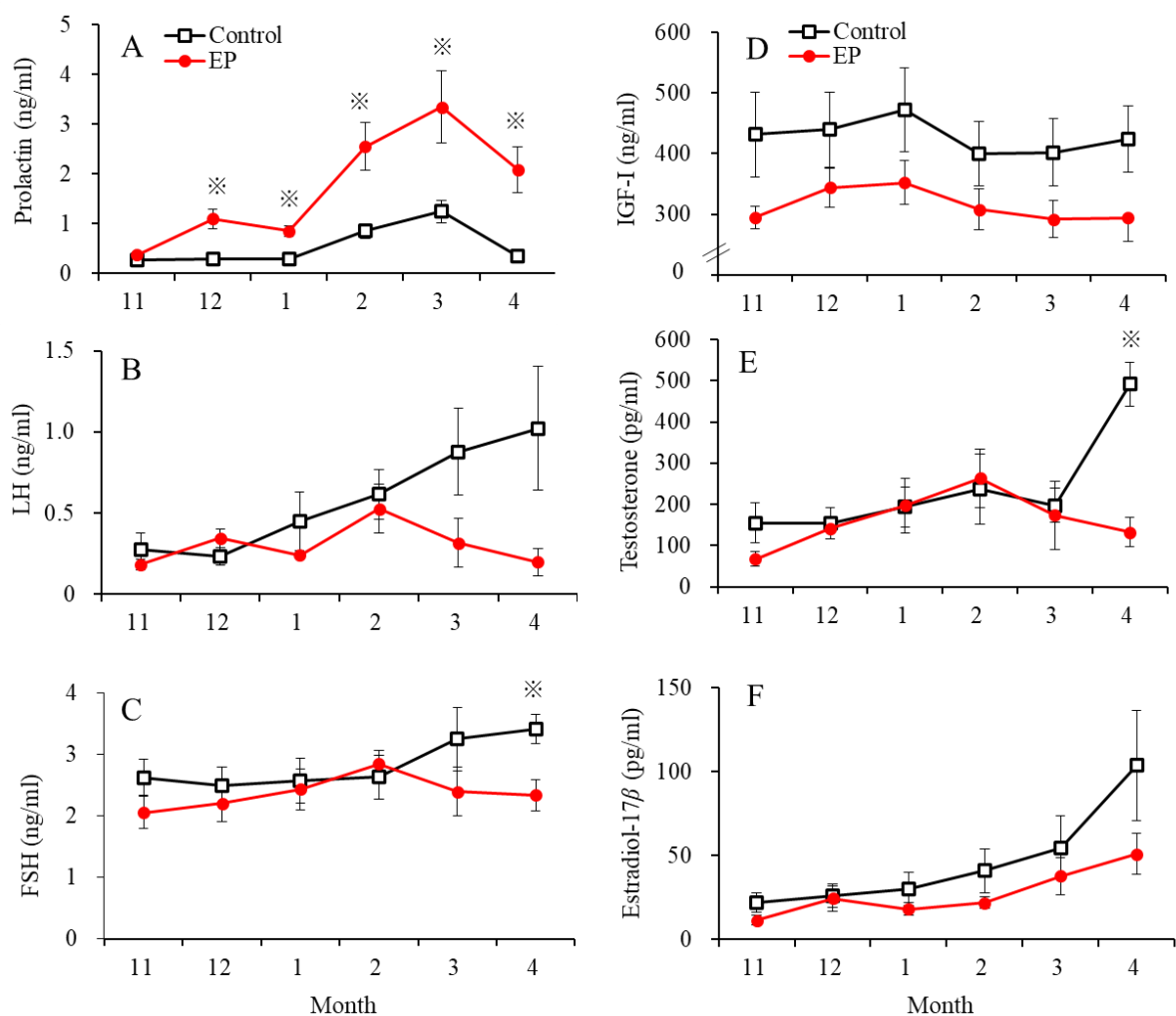
IV-3-8 宮崎育成馬（雌馬）の内分泌変化

宮崎育成牧場で飼育した雌馬における長日処理群と対照群の 1 歳 11 月から 2 歳 4 月までのプロラクチン、LH、FSH、IGF-I、プロジェステロン及びエストラジオール-17 β の血中濃度の変化を、(図IV-14-2) に示した。

血中プロラクチン濃度は、対照群では 2 歳 2 月以降上昇を示した。長日処理群では 2 歳 1 月と 2 月に高値を示し、3 月には下降した。2 歳 1 月と 2 月には、長日処理群が対照群と比べて有意な高値を示した ($P<0.05$) が、4 月には対照

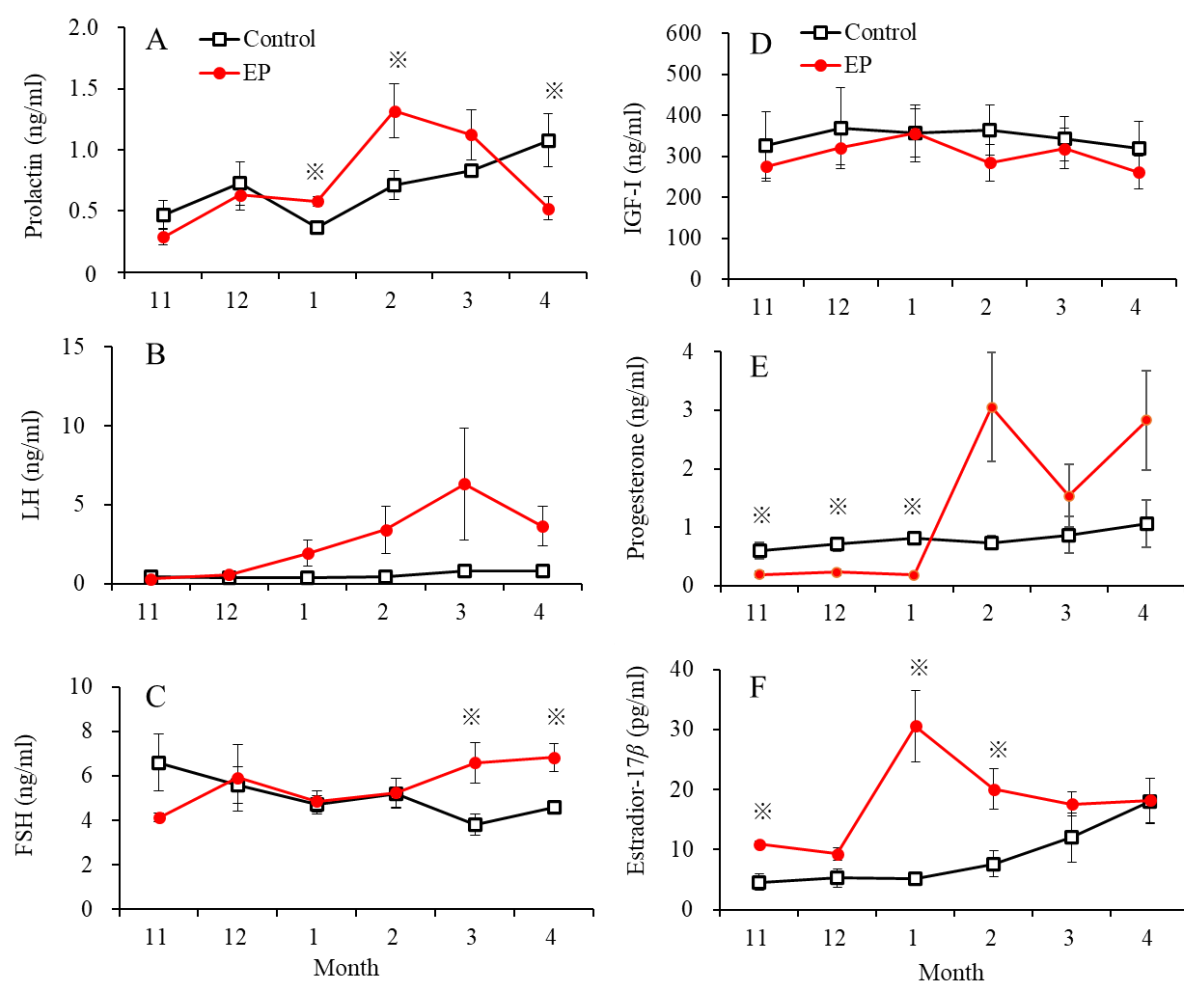
群が長日処理群と比べて有意な高値を示した ($P<0.05$; 図IV-14-2-A)。血中 LH 濃度は、対照群では 2 歳 4 月まで基底値で推移したが、長日処理群では 2 歳 1 月から上昇が認められた。2 歳 2 月以降は長日処理群が高い値を示したが、個体差が大きく両群間に有意差は認められなかった (図IV-14-1-B)。血中 FSH 濃度は、両群ともに 1 歳 11 月から 2 歳 4 月まで大きな変化は認められなかったが、2 歳 3 月と 4 月に長日処理群が対照群と比べて有意に高値を示した ($P<0.05$; 図IV-14-2-C)。血中 IGF-I 濃度は、両群ともに 1 歳 11 月から 2 歳 4 月まで大きな変化はなく両群間で有意差は認められなかった (図IV-14-2-D)。血中 プロジェステロン 濃度は、両群ともに 1 歳 11 月から 2 歳 1 月まで基底値を示したが、対照群が長日処理群と比べて有意に高値を示した ($P<0.05$)。2 歳 2 月には、長日処理群の数頭で血中 プロジェステロン 濃度が上昇し、2 歳 3 月と 4 月にも高値を示したが、対照群は 2 歳 4 月まで基底値のままであった。2 歳 2 月以降、長日処理群の血中 プロジェステロン 濃度が対照群よりも明らかな高値を示したが、個体差が大きく有意差は認められなかった (図IV-14-2-E)。血中 エストラジオール- 17β 濃度は、対照群では 2 歳 2 月から上昇を示したが、長日処理群では 2 歳 1 月には高値を示し、4 月まで高値を維持した。1 歳 11 月、2 歳 1 月及び 2 月には、長日処理群が対照群と比べて有意な高値を示した ($P<0.05$; 図IV-14-F)。

初回排卵の時期については、対照群では 6 頭中 2 頭 (33.3%) のみが 4 月以前に排卵したが (図IV-15-A)、長日処理群では 6 頭中 5 頭 (83.3%) が 4 月以前に排卵した (図IV-15-B)。



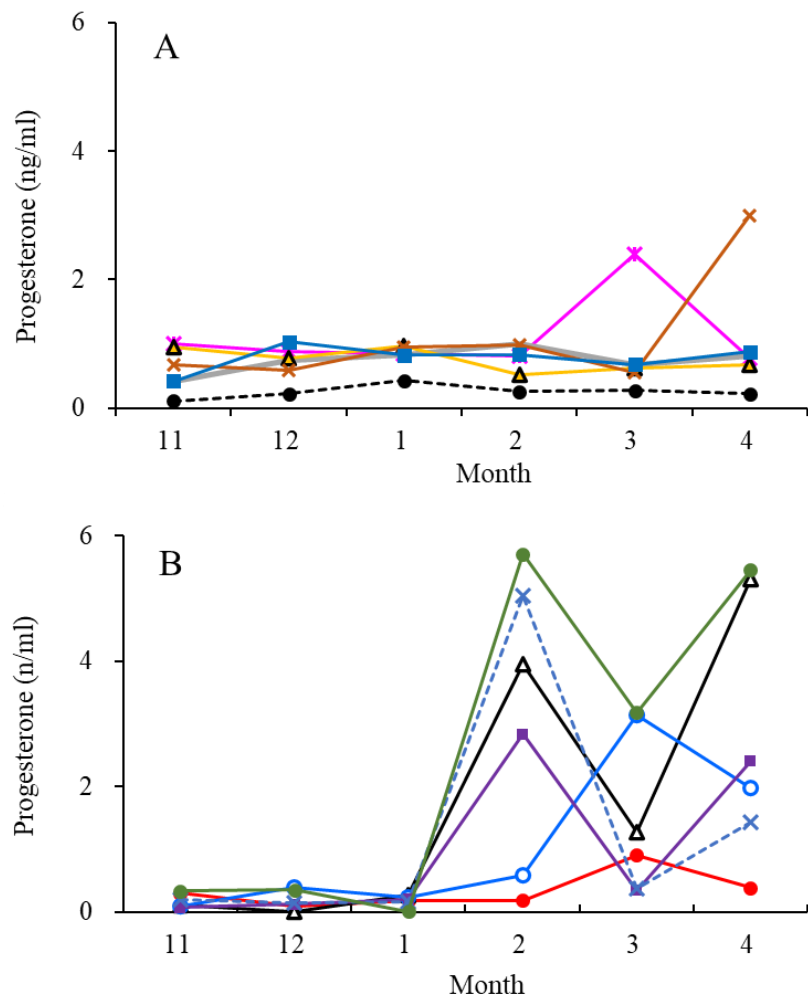
図IV-14-1 宮崎育成牧場の雄馬における血中ホルモン濃度の変化

雄馬の対照群 (Control; □ n=6) 及び長日処理群 (EP; ● n=6) における血中プロラクチン (A)、LH (B)、FSH (C)、IGF-I (D)、テストステロン (E) 及びエストラジオール-17β (F) 濃度の変化。結果は、平均値±標準誤差で示した。※は同月における群間の有意差を示した ($P<0.05$)。



図IV-14-2 宮崎育成牧場の雌馬における血中ホルモン濃度の変化

雌馬の対照群 (Control; □ n=6) 及び長日処理群 (EP; ● n=6) における血中プロラクチン (A)、LH (B)、FSH (C)、IGF-I (D)、テストステロン (E) 及びエストラジオール-17β (F) 濃度の変化。結果は、平均値±標準誤差で示した。※は同月における群間の有意差を示した ($P<0.05$)。



図IV-15 宮崎育成牧場の雌馬における血中プロジェステロン濃度の変化

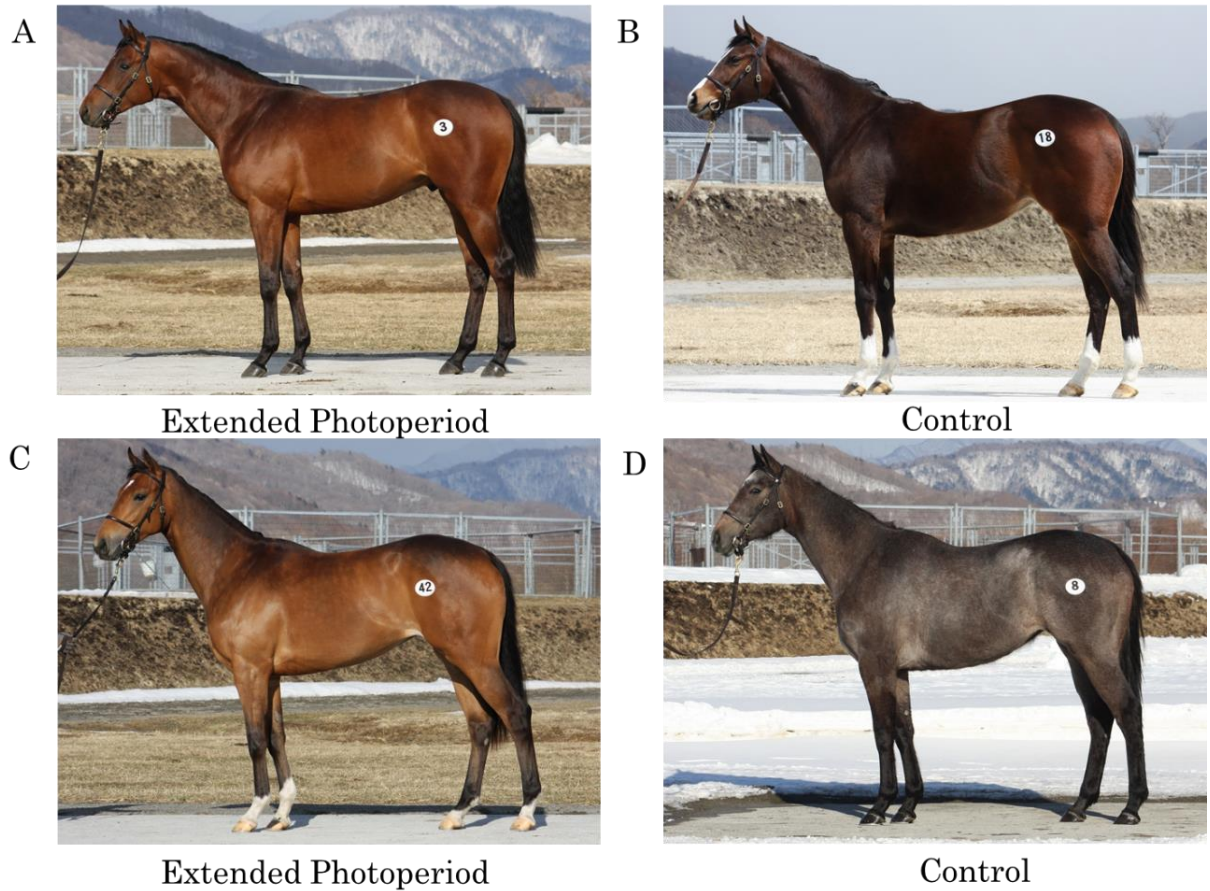
対照群（A; Control n=6）と長日処理群（B; EP n=6）を示した。

IV-3-9 日高育成馬における被毛の変化

日高育成馬における 2 歳 3 月初旬から中旬（長日処理開始後概ね 2 ヶ月半）に撮影した両群の代表的な写真を図IV-16 に示した。また、各群の被毛の評価点の平均値を、図IV-18 に示した。長日処理群（雄；図IV-16-A，雌；図IV-16-C）では冬毛の換毛が進行していたが、対照群（雄；図IV-16-B，雌；図IV-16-D）では冬毛が残っていた。日高育成馬の被毛の評価点は、雄馬及び雌馬ともに長日処理群は対照群と比較して有意な高値を示した（ $P<0.05$ ；図IV-18-A,B）。

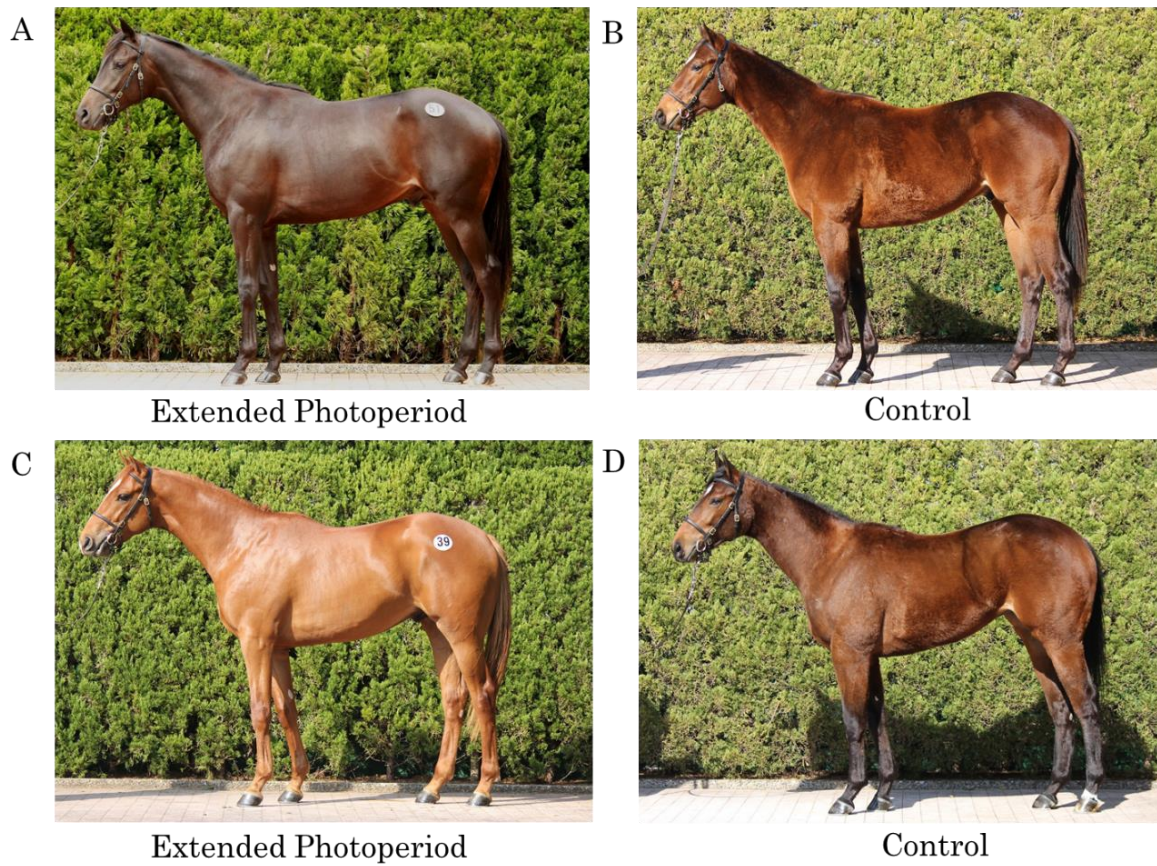
IV-3-10 宮崎育成馬における被毛の変化

宮崎育成馬における 2 歳の 3 月初旬から中旬（長日処理開始後概ね 2 ヶ月半）に撮影した両群の代表的な写真を図IV-17 に示した。また、各群の被毛の評価点の平均値を、図IV-18 に示した。長日処理群（雄；図IV-17-A，雌；図IV-17-C）では冬毛の換毛が進行していたが、対照群（雄；図IV-17-B，雌；図IV-17-D）では冬毛が残っていた。宮崎育成馬の被毛の評価点は、雌雄ともに長日処理群は対照群と比較して有意な高値を示した（ $P<0.05$ ）。



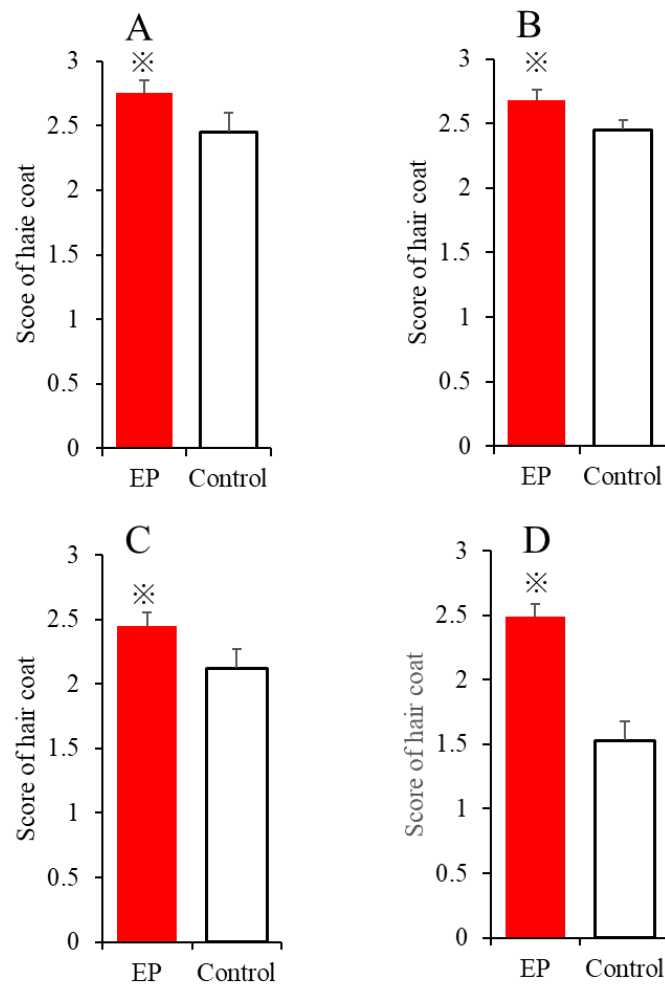
図IV-16 日高育成馬における2歳3月時点の全身像

長日処理群（Extended Photoperiod; A、C）および対照群（Control; B、D）における代表的な雄馬（A、B）と雌馬（C、D）の被毛状態の比較。



図IV-17 宮崎育成馬における 2 歳 3 月時点の全身像

長日処理群（Extended Photoperiod; A、C）と対照群（Control; B、D）の代表的な雄（A、B）と雌（C、D）の被毛状態の比較。



図IV-18 日高育成馬と宮崎育成馬における被毛評価点の比較

日高育成牧場の雄馬における長日処理群 (EP; ■ n=48) と対照群(Control; □ n=12)の被毛評価点の比較 (A)、日高育成牧場の雌馬における長日処理群 (EP; ■ n=49) と対照群 (Control; □ n=12) の被毛評価点の比較 (B)。宮崎育成牧場の雄馬における長日処理群 (EP; ■ n=12) と対照群 (Control; □ n=12) の被毛評価点の比較 (C)。宮崎育成牧場の雌馬における長日処理群 (EP; ■ n=49) と対照群(Control; □ n=12)の被毛評価点の比較 (D)。結果は、平均値+標準誤差で示した。※は群間の有意差を示した ($P<0.05$)。

IV-4 考察

IV-4-1 長日処理が日高育成馬及び宮崎育成馬に及ぼす影響

本研究では、冬期に寒冷で日照時間が短い北海道の日高と、冬期に温暖で日照時間が長い南九州の宮崎で飼育された後期育成期のサラブレッドに対して、12月20日から4月中旬まで長日処理を実施し、体組成、成長、内分泌機能及び被毛の変化を比較するとともに、その効果を総合的に考察した。

北海道で飼育する後期育成期のサラブレッドに長日処理を応用することによって、繁殖雌馬に対する長日処理の効果[36,188,193]と同様に、雌雄ともに、下垂体前葉から分泌される性腺刺激ホルモン（LH、FSH）及びプロラクチンの血中濃度が早期に上昇し、精巣または卵巣からステロイドホルモンの分泌が促進されることが、本研究によって初めて明らかになった。また、長日処理法の応用によって、日高育成牧場で飼育した雄馬及び雌馬ともに、冬毛から夏毛への換毛が促進された。冬毛の換毛は、長日処理[36,129,189,193]、プロラクチンの投与[252,253]、ドパミン拮抗薬であるスルピリドの投与[58,131,190,252,253]により促進されることが報告されている。本研究の結果及びこれまでに報告された研究成果から、長日処理による後期育成馬の換毛促進には分泌が亢進したプロラクチンの関与が推察された。また、本研究では、長日処理によって、日高育成牧場で飼育する雌雄のFFMや成長指標であるBW及び体高が増加することが判明した。FFMは筋肉量を反映する指標である[1,71,120,140]ことから、本研究で得られた長日処理によるFFMの増加は、トレーニングによって筋肉量が増加したと解釈された。すなわち、冬期の北海道では、長日処理法の応用によって冬期の成長抑制[156,201,245]を軽減するとともに成熟が促され、後期育成期の未熟な若馬に発生しやすいMSI[59,217,267]を予防し、効果的な後期育成期のトレーニングを実施することができる可能性が示唆された。

本研究では、12月20日から長日処理を開始したが、日高育成牧場で飼育した雄馬における12月の各月FFM増加率は低値であった。長日処理開始時期の違いによる冬毛の換毛効果を調査した報告[197]によると、冬至（12月22日頃）の1ヶ月前からの長日処理開始では換毛を促進するが、冬至の1ヶ月後の開始では換毛促進効果がなかったと報告している。12月のFFM低値を改善するた

めには、長日処理開始日を本研究の 12 月 20 日より約 1 ヶ月早期化させることで、日高育成牧場の雄馬において、さらなる 12 月のスムーズな成長や FFM 増加を促すことができる可能性が示唆された。長日処理開始時期の早期化については今後の課題である。

本研究では、南九州の宮崎育成牧場で飼育するサラブレッドに対して長日処理を初めて実施した[241]。その結果、内分泌機能では、雄馬及び雌馬ともに、プロラクチン分泌の早期化及び分泌量の増加が誘導された。雌馬では下垂体前葉から性腺刺激ホルモン（LH と FSH）の分泌が促進されたが、雄馬では長日処理による性腺機能促進効果は明らかではなかった。また、体組成に及ぼす効果では、その効果は日高育成馬ほど明らかではなかった。一方、成長に及ぼす影響では、宮崎育成牧場の雌馬では BW、胸囲及び管囲の増加率において効果が認められたが、雄馬では長日処理の効果は明らかではなかった。しかし、長日処理による冬毛の換毛効果は、宮崎育成牧場で飼育された雄馬及び雌馬においても認められた。

IV-4-2 長日処理が成長に及ぼす影響

長日処理が成長に及ぼす影響では、日高育成牧場で飼育した雄馬では、体重及び体高が増加したのに対して、宮崎育成牧場で飼育した雄馬では成長促進効果が明らかではなかった。本研究における日高育成牧場で飼育した雄馬の血中 IGF-I 濃度では、長日処理群は対照群と比較して高値である傾向が観察された。Tangyuenyong ら[245]は、日高育成牧場で飼育した後期育成馬に対して長日処理を実施した研究において、雄馬の長日処理群における血中 IGF-I 濃度は対照群と比較して有意に高値であったが、日高育成馬の雌馬では両群間に差がなかったことを報告している。本研究においても、日高育成牧場の雄馬では、長日処理によって成長が促進されたと推察された。宮崎育成牧場の雄馬で長日処理による成長促進効果が観察されなかった理由は明らかではないが、宮崎育成牧場で飼育した雄馬の血中 IGF-I 濃度は、長日処理群及び対照群ともに、日高育成牧場で飼育した雌雄馬と比べて高値である傾向が観察された。すなわち、自然光下での宮崎育成牧場の雄馬では、日高育成牧場の雄馬と比べて冬期の成長抑制が少ない[102,156,167]と考えられ、長日処理を実施してもそれ以上の成長

効果が明らかではなかったと推察された[241,245]。一方、本研究における日高育成牧場の雌馬では体高の増加が、宮崎育成牧場の雌馬では BW、胸囲及び管囲の増加が長日処理群で観察された。血中 IGF-I濃度に関しては、日高及び宮崎育成牧場で飼育した雌馬における長日処理群と対照群の間に差が認められなかったことから、長日処理が雌馬の成長促進に影響を及ぼした理由については現在のところ明らかではない。

IV-4-3 長日処理が体組成に及ぼす影響

日高育成牧場で育成した雄馬では、長日処理群が対照群と比べて、1 歳 12 月から 2 歳 4 月までの FFM 増加率及び 3 月の各月 FFM 増加率が有意に高値で、3 月の%F 増加率は有意に低値であった。また、長日処理を実施した日高育成牧場の雄馬では、血中テストステロン濃度が 1 月から上昇する傾向が観察され、また、エストラジール-17 β は 3 月において長日処理群が対照群と比べて有意に高値であった。Kunii ら[134]は、雌雄 62 頭の日高育成馬を使用して長日処理が内分泌機能及び被毛に及ぼす影響を調べた同様の先行研究において、長日処理群の雄ではテストステロン濃度が有意に上昇することを報告している。本研究では、個体差が大きかったことから、テストステロン濃度において長日処理群と対照群の間に有意差は認められなかったが、FFM の上昇にテストステロンが関与した可能性が推察された。テストステロンは、脂肪異化を促しトリグリセリドの蓄積を阻害する作用があり、体脂肪を減少させると報告されている[15]。テストステロンは、蛋白質同化作用を有しており、筋肉量を増加させる効果を有する[64,175]。エストラジオール-17 β は、骨成熟を促し骨密度の増加を促進する [263]ことが報告されている。さらに、長日処理群の雄で血中濃度が高い傾向にあった IGF-Iも筋肉量増加に関与した可能性が推察された。IGF-Iは筋肉細胞にも直接作用し、セリン/スレオニンキナーゼとして知られる Akt および mTORC1 を介してタンパク質合成を促進するとともに[229,230,231]、タンパク質分解を促進するフォークヘッド蛋白 (Forkhead box-containing protein: FoxO) の不活性化を介して筋肉の肥大を誘導する[117,219]。さらに、第Ⅲ章で明らかにしたように、雄サラブレッドでは、強い運動負荷によって成長ホルモンも分泌され[126]、損傷した筋肉の修復や増強の役割を担う効果も報告されている

[132,262,275]。これらの結果から、長日処理を実施した雄の日高育成馬では IGF-I 及びテストステロンの分泌が亢進され、筋肉量が増加するとともに脂肪代謝が亢進した可能性が推察された。

日高育成牧場の雌馬では、雄馬ほど長日処理の効果が明らかではなかったが、長日処理群の 2 歳 1 月から 3 月における FFM 増加率及び 2 歳 3 月の各月 FFM 増加率は高値であった。本研究において、長日処理を実施した日高育成牧場の雌馬の血中エストラジオール- 17β 濃度は 2 歳 1 月から 2 月にかけて上昇することが明らかになった。また、Kunii ら[134]は、日高育成牧場で後期育成した雌馬に対する長日処理によって、エストラジオール- 17β は 2 歳 1 月から 3 月にかけて大きく上昇したことを報告している。雌マウスではエストロジェンが骨格筋の維持に重要な役割を持っていることが報告されている[125,227,228]が、ウマではその作用は明らかではない。本研究において、日高育成牧場の長日処理群の血中 IGF-I 濃度は対照群と比べて低値であったことから、日高育成牧場の長日処理群の雌馬で一定の FFM 効果が得られた理由は現在のところ不明である。さらなる研究が必要である。

宮崎育成牧場の雄馬及び雌馬では、長日処理による FFM の明らかな増加は認められなかった。第 III 章において、冬期に穏やかな宮崎育成牧場の雄馬及び雌馬では、冬期に寒冷な日高育成牧場の雄馬及び雌馬と比べて、FFM 増加率が高値であった[102]ことから、宮崎育成牧場の雄馬及び雌馬では、自然光下での後期育成によって、すでに一定の FFM 増加効果が得られていたものと推察された。

近年、骨格筋の成長を抑制する因子であるミオスタチン[160,161]の機能制御に関わる遺伝子[144,145]が、サラブレッドの筋肉量及び距離適性に関与することが報告されている[89]。この遺伝子であるミオスタチン型 (MSTN 型) は、筋肉量が多い C/C、筋肉量が中間の C/T 及び筋肉量が少ない T/T の 3 型に分類され、競馬のレースにおいて、C/C 型は短距離、C/T 型は中距離、T/T 型は長距離に適性があることが報告されている[89,259]。本研究では、MSTN 型は同定されていないことから、本研究で明らかにした長日処理による FFM 増加促進と MSTN 型との関係については今後のさらなる研究が必要である。

IV-4-4 長日処理が性腺刺激ホルモン（LH 及び FSH）分泌に及ぼす影響

日高育成牧場及び宮崎育成牧場で飼育された後期育成期の雌馬では、長日処理によって下垂体前葉から LH と FSH の分泌が促進されることが明らかになった。その結果、卵巣からエストラジオール- 17β 及びプロジェステロンの分泌が増加したと推察された[134,241]。また、このエストラジオール- 17β は成熟卵胞の顆粒層細胞から分泌され、プロジェステロンは黄体から分泌される[162,172]ことから、長日処理によって卵胞の成熟が促進され、その結果として排卵時期が早期化されたと解釈された[134,241]。

また、日高育成牧場で飼育された後期育成期の雄馬では、雌馬と同様に長日処理によって LH と FSH の分泌が促進されることが明らかになった[134,241]。その結果、精巣のライディッヒ細胞とセルトリ細胞からテストステロン及びエストラジオール- 17β の分泌が増加した[173,174,176]と解釈された。一方、宮崎育成牧場で飼育した雄馬において長日処理による性腺機能促進効果が得られなかった理由は、現在のところ明らかではないため、さらなる研究が必要である。

本研究において、日高育成牧場で飼育した雌雄馬及び宮崎育成牧場で飼育した雌馬ともに、下垂体前葉からの LH と FSH は、長日処理開始後約 1 ヶ月にあたる 1 月後半から分泌が増加したことから、視床下部－下垂体軸に対する長日処理の効果が発揮されるまでに約 1 ヶ月が必要であることが明らかとなった。

IV-4-5 長日処理がプロラクチン分泌に及ぼす影響

本研究では、長日処理によって日高及び宮崎育成牧場の雌雄において血中プロラクチン濃度が上昇することが明らかになった。

ウマでは、性別や年齢とは無関係に繁殖季節である長日期にプロラクチン分泌が亢進[111,245]し、非繁殖期である短日期にプロラクチン分泌が低下する[54,55,110]。この血中プロラクチン濃度の季節変動は、脳下垂体隆起葉で読みとられた日長情報が分泌シグナルを介して、直接、脳下垂体前葉に作用する結果、プロラクチンの分泌が促進されると考えられている [168,169,279]。このプロラクチン濃度の季節変動は、雄では精巣機能の賦活化や繁殖季節の開始と関係し[29]、血中テストステロン濃度のピークに先行して起こる。したがって、

プロラクチンは視床下部－下垂体－性腺軸の制御及び精巣機能の季節的变化に直接または間接的に重要な生理作用を有すると推察されている[20,21,225]。

一方、雌馬では、プロラクチンが卵胞液内に存在し、卵胞の成熟に伴って増加することが報告されている[122]。また、ウマの黄体組織に卵胞組織と同程度の pre-プロラクチン mRNA の発現が認められることも報告されている[123]。したがって、プロラクチンは顆粒層細胞と黄体細胞の両方で産生されていると推察されている[121]。ウマの発情周期中における血中プロラクチン濃度の上昇は、排卵時期[122]及び黄体退行時期に 2 回認められることが報告されている[124]。したがって、プロラクチンは雌馬の卵巢機能調整においても重要な生理学的役割を担っており [124,191]、長日処理によるプロラクチン濃度の上昇が、日高育成牧場及び宮崎育成牧場で育成した雌馬の排卵を促進する要因の一つになったと推察された。

哺乳類では、生体が様々なストレスを感じた際に、プロラクチンが副腎からの糖質コルチコイドの分泌を促進する [103-107]ことが報告されている。サラブレッドでは、トレッドミルによる運動や競馬を連想させるようなファンファーレ音などによる情動刺激によってもプロラクチンが分泌される[126]。さらに、プロラクチンのレセプターは、骨端の成長板に発現しており、プロラクチンは授乳中のラットの脛骨を伸長させることが報告されている[208,239]。また、プロラクチンは腸からのカルシウム吸収を促進させることも報告されている[40,41,239]。一方、サラブレッドにおける脛骨などの長骨の成長は、1 歳末にはほぼプラトーに達し、その後の成長はわずかであると報告されていることから[11,256]、1 歳 12 月以降にプロラクチンがウマの長骨骨端の成長板に及ぼす影響については、不明な点が多い。しかし、本研究において日高育成牧場及び宮崎育成牧場の雌雄ともに、長日処理によって亢進されたプロラクチン分泌と性腺刺激ホルモンとの共同作用によって性腺機能が賦活化された結果、性ホルモンが分泌され、骨格筋、脂肪及び骨などの体組成が影響を受け、間接的に成長に影響を及ぼした可能性が推察された。

IV-5 小括

北海道の日高育成牧場と南九州の宮崎育成牧場において 1 歳 12 月から 2 歳 4 月まで長日処理を実施し、体組成、成長、内分泌機能及び被毛に及ぼす影響について、それぞれ長日処理群と対照群を比較した。FFM 増加率の比較において、日高育成牧場の雄馬では、長日処理群は対照群と比べて増加率が高値であることが判明した。一方、日高育成牧場の雌馬においても FFM 増加効果が認められたが、雄馬ほどの効果は認められなかった。また、宮崎育成牧場の雄馬及び雌馬においても、長日処理による増加効果は明らかではなかった。成長率の比較において、日高育成牧場の雌雄馬及び宮崎育成牧場の雌馬では、長日処理によって BW、体高、胸囲及び管囲における成長指標が増加することが判明したが、宮崎育成牧場の雄馬では、その効果は認められなかった。血中 IGF-I 濃度の比較において、日高育成牧場の雄馬では、長日処理群は対照群と比べて高値である傾向が観察された。生殖関連ホルモンの比較において、日高及び宮崎育成牧場の雌馬では、長日処理によって下垂体前葉から性腺刺激ホルモン（LH と FSH）の分泌が促進され、エストラジオール- 17β 及びプロジェステロンの分泌が増加することが明らかになった。また、日高育成牧場の雄馬では、長日処理によって LH と FSH の分泌が促進されテストステロン及びエストラジオール- 17β の分泌が増加することが明らかになったが、宮崎育成牧場の雄馬では、性腺機能の促進効果が得られなかった。さらに、日高及び宮崎育成牧場の雄馬及び雌馬では、長日処理によってプロラクチン分泌の早期化及び分泌量の増加が誘導され、冬毛の換毛が促進された。本研究において、日高の雌雄馬及び宮崎の雌馬ともに、下垂体前葉からの LH と FSH は、長日処理開始後約 1 ヶ月にあたる 1 月後半から分泌が増加したことから、日高の雌雄馬及び宮崎の雌馬の視床下部－下垂体軸に対する長日処理の効果が発揮されるまでに約 1 ヶ月が必要であることが明らかとなった。

総括

本研究では、冬期に寒冷な北海道で飼育するサラブレッドの適切な育成方法を検討することを目的として、気候の異なる条件下で育成されたサラブレッドの体組成、成長及び性腺機能について内分泌学的に解明を試みた。

第Ⅰ章の初期育成期においては、北海道で出生したサラブレッドにおける出生時期の違いが初期育成期の成長や内分泌機能に及ぼす影響を解析した。第Ⅱ章の中期育成期においては、冬期の異なる気候が後期育成期の体組成、成長及び性腺機能に及ぼす影響を解析した。第Ⅲ章の後期育成期においては、冬期の異なる気候が後期育成期の体組成、成長及び性腺機能に及ぼす影響を解析した。さらに、後期育成期の若馬が経験する新奇刺激や運動負荷による生体反応を明らかにする目的で、サラブレッド種 4 歳雄馬を用いて運動ストレスと情動ストレス負荷時の血中成長ホルモン及びプロラクチン濃度を経時的に測定した。第Ⅳ章では、異なる気候下で実施した長日処理が後期育成期の体組成、成長、性腺機能及び被毛に及ぼす影響を解析した。これらの研究から、以下の結果を得た。

Ⅰ 初期育成期における出生時期と成長及び内分泌機能の発達

北海道で生産された当歳馬において、「1 月から 3 月までの早生まれ」は「4 月から 6 月までの遅生まれ」と比較して、概ね 8 週齢までは ADG が低値である傾向が観察された。初期育成期の ADG は、出生月に関わらず、5 月から 7 月の長日期に相対的に高値となることが明らかになった。また、血中 LH、FSH 及びプロラクチン濃度の変化については、出生月に関わらず、5 月から 8 月の長日期に上昇することが明らかになったことから、子馬は出生直後から長日刺激に反応し、視床下部－下垂体－成長ホルモン軸が活性化される可能性が示唆された。一方、代謝に関わるコルチゾールやサイロキシンは出生月に関わらず出生直後は血中濃度が高値を示すことが明らかになったことから、自然状態とは異なる寒冷な時期に出生した「早生まれ」の子馬においても、甲状腺と副腎は十分に機能していることが推察された。

II 中期育成期における厳寒期の放牧管理が成長及び内分泌機能に及ぼす影響

昼放牧に WM 運動を課すことで、昼夜放牧と同等の移動距離を確保することが可能であった。昼夜群は、体温低下、心拍数減少、HF パワー上昇など副交感神経活動が優勢となり、成長が停滞することが明らかになったことから、サラブレッドにおいても、他の野生草食動物と同様に、厳しい低温環境から生体を防御するために代謝を抑制する反応が備わっていることが推察された。一方、昼 W 群は代謝が維持され、血中 IGF-I やプロラクチン濃度が上昇することが明らかになった。また、1 月の FFM 増加率や ADG も維持されたことから、昼放牧と WM の併用は、厳寒期に代謝や成長を促す有効な管理方法であることが示された。

III 後期育成期における気候環境が成長及び内分泌機能に及ぼす影響

1 歳 10 月から 2 歳 2 月までの FFM 増加率において、雄馬では宮崎育成馬は日高育成馬と比べて高値であったが、雌馬では差が認められなかった。また、1 歳 10 月から 2 歳 4 月までの全ての成長指標（BW、体高、胸囲、管囲）の増加率において、雌雄ともに、宮崎育成馬は日高育成馬と比べて高値であったことから、宮崎は日高と比べて成長が早く、特に雄では冬期に効率的なトレーニング効果が得られる可能性が示唆された。生殖関連ホルモンの比較において、雄馬では、宮崎育成馬は日高育成馬と比べて性腺刺激ホルモン（LH と FSH）が早期に分泌される傾向が認められ、血中テストステロン及びエストラジオール- 17β 濃度が早期に上昇する傾向が認められた。また、雌馬では、宮崎育成馬は日高育成馬と比べて血中エストラジオール- 17β 濃度が高値である傾向及び 4 月までに排卵する割合が高い傾向が観察されたことから、宮崎は日高と比べて視床下部－下垂体－性腺軸が早期に賦活されることが示唆された。

サラブレッド 4 歳雄馬に対する実験的な運動負荷によるプロラクチンと成長ホルモンの反応では、運動負荷によって、血中プロラクチン濃度及び成長ホルモンともに上昇し、駆歩調教時に濃度がピークに達した後、徐々に低下することが初めて明らかになった。プロラクチンと成長ホルモンは運動負荷に対する免疫増強や運動後の筋修復及び増強の役割を担っている可能性が示唆された。

IV 後期育成期の長日処理が成長及び内分泌機能に及ぼす影響

北海道の日高育成牧場と南九州の宮崎育成牧場において 1 歳 12 月から 2 歳 4 月まで長日処理を実施し、体組成、成長、内分泌機能及び被毛に及ぼす影響について、それぞれ長日処理群と対照群を比較した。日高育成牧場の雌雄馬では、長日処理によって FFM 及び成長指標が増加した。また、下垂体前葉から LH と FSH が早期に分泌され、性腺からエストラジオール- 17β 、テストステロンやプロジェステロンの分泌が増加することが明らかになった。さらに、プロラクチンも早期に分泌され、冬毛の換毛が促進された。長日処理を北海道の後期育成馬に応用することで、成長停滞の軽減や FFM 増加などが得られ、冬期に効果的なトレーニングを実施することができる可能性が示唆された。宮崎育成牧場の雌馬では、長日処理によって成長指標及び性腺機能の促進効果が得られたが、雄馬では効果が認められなかった。しかし、プロラクチンは雌雄ともに早期に分泌され、冬毛の換毛が促進された。宮崎育成牧場の雄馬において、換毛以外の長日処理による効果が明らかではなかった理由は、本研究の成績から、自然光下で冬期の成長停滞や性腺機能抑制が軽度であったためと推察された。また、日高育成牧場の雌雄馬及び宮崎育成牧場の雌馬ともに、下垂体前葉からの性腺刺激ホルモンは、長日処理開始後約 1 ヶ月にあたる 1 月後半から分泌が増加したことから、長日処理の効果が発揮されるまでに約 1 ヶ月が必要であることが明らかとなった。

以上の研究により、育成期の課題であった厳寒期の成長や性腺機能発達の特徴を明らかにし、中期育成期における WM 運動及び後期育成期における長日処理法の応用等、我国の気候に合致した新しい育成期の飼養管理方法を提示することができた。

謝辞

本論文の執筆にあたり、多大なる御指導と御協力を賜った酪農学園大学獣医学類長の獣医衛生学ユニット樋口豪紀教授に深く感謝するとともに、本研究に際し貴重なる御意見、御助言の上、御審査いただきましたことに対して心より厚く御礼申し上げます。また、本論文をご審査いただき貴重なご助言と御高閲を賜った酪農学園大学獣医麻酔学ユニット山下和人教授、酪農学園大学獣医生理学ユニット翁長武紀教授、獣医臨床病理学ユニット鈴木一由教授ならびに帯広畜産大学臨床獣医学研究部門 診断治療学分野 南保泰雄教授に心より感謝いたします。そして、本論文執筆にあたり、御多忙の中、公私ともに多大なる御指導、御鞭撻及び御高閲を賜りました田谷一善 東京農工大学名誉教授に心より厚く感謝を申し上げます。さらに、博士論文執筆の貴重な機会を与えてくださった学校法人酪農学園理事長の谷山弘行先生、大学院獣医学研究科長の獣医ウイルス学ユニット桐澤力雄教授に厚く御礼申し上げます。本研究における各種ホルモンの測定及び本論文執筆にあたり多大なる御協力をいただきました東京農工大学農学部獣医学科獣医生理学研究室の渡辺元 東京農工大学名誉教授及び永岡謙太郎教授に深謝するとともに厚く御礼申し上げます。さらに、本研究時に東京農工大学農学部獣医学科獣医生理学研究室に在籍し、各種ホルモンの測定や本論文執筆にあたり多大なる御協力をいただきました鈴木毅氏、杉山英視氏、北浦智規氏、原田健弘氏、藤井一希氏、児玉留美氏、日本中央競馬会栗東トレーニング・センターの国井博和氏、日本中央競馬会宮崎育成牧場の水上寛健氏及び日本中央競馬会日高育成牧場の久米紘一氏に深謝いたします。

本研究にあたり、実験当時に日本中央競馬会日高育成牧場生産育成研究室長であった現帯広畜産大学の南保泰雄教授には、本論文の審査以外にも本研究の遂行ならびに本論文執筆にあたり多大なる御理解とご協力を賜り深謝いたします。また、本研究の遂行にあたり、研究当時の日高育成牧場場長として様々な御尽力と御協力を賜りました朝井洋 JRA ファシリティーズ株式会社参与、山野辺啓 公益財団法人馬事文化財団常務理事及び日本中央競馬会の平賀敦参与に深謝いたします。

馬プロラクチン、LH、FSH、IGF-I測定用キットを提供して頂いた The

National Hormone and Pituitary Program, NIDDK, NIH, (Torrance, CA, USA)と Dr. A. F. Parlow、プロジェステロン (GDN 337)、テストステロン (GDN 250) 及びエストラジオール- 17β (GDN 244) の抗体を提供して頂いた Dr.G.D. Niswender, Animal Reproduction and Biotechnology Laboratory, Colorado State University (Fort Collins, CO, USA) に謝意を表します。

本論文の執筆にあたり、研究の遂行、データ集積をはじめ様々なご協力を賜りました日本中央競馬会の松井朗 日高育成牧場上席研究役、吉田年伸 競走馬総合研究所次長、富田篤志 馬事部 馬事振興室調査役、内藤裕司 馬事部長補佐、羽田哲朗 栗東トレーニング・センター 競走馬診療所上席臨床獣医役、大村一美 浦トレーニング・センター 競走馬診療所上席臨床獣医役、頃末憲治 日高育成牧場 副場長、佐藤文夫 馬事部上席調査役 (日本装蹄蹄協会)、冨成雅尚 馬事部 生産育成対策室上席調査役、秋山健太郎 馬事部生産育成対策室上席調査役、遠藤祥郎 日高育成牧場 専門役、村瀬晴崇 日高育成牧場 生産育成研究室研究役、岡野篤 競馬学校 診療所長、宮田健二 馬事公苑 診療所長、関一洋 日高育成牧場 生産育成研究室長及びノーザンファーム天栄の土屋武獣医師に心より感謝申し上げます。さらには、本研究の遂行ならびに論文執筆にあたり、様々な便宜を図っていただきました日本中央競馬会の菊田淳 馬事担当理事、伊藤幹 馬事部長及び松田芳和 馬事部 生産育成対策室長に深謝いたします。

日頃から馬の調教や管理に携わり研究をサポートしてくださった日高育成牧場、宮崎育成牧の職員の皆さまと本研究の為にサンプルを提供してくれた JRA 育成馬たちに心からお礼申し上げます。日高育成牧場および宮崎育成牧場の育成馬たちの健やかな成長と活躍、そして幸せな馬生を送ることができることを祈念いたします。

最後に、本論文執筆にあたり、日高育成牧場の大先輩であり、私にサラブレッド育成の基礎となる知識、技術そして精神を惜しみなく教えてくださった故坂本浩治氏に心から感謝申し上げるとともに、2016年に不幸にも若くして命を亡くされたことに対しまして、心より哀悼の意を表します。

引用文献

1. Abe T, Kearns CF, Fukunaga T. 2003. Sex differences in whole body skeletal muscle mass measured by magnetic resonance imaging and its distribution in young Japanese adults. *Br J Sports Med* **37**: 436-440.
2. Adams GR. 2002. Invited review: Autocrine/paracrine IGF-I and skeletal muscle adaptation. *J Appl Physiol* **93**: 1159-1167.
3. Ahima RS, Prabakaran D, Mantzoros C, Qu D, Lowell B, Maratos-Flier E, Flier JS. 1996. Role of leptin in the neuroendocrine response to fasting. *Nature* **382**: 250-252.
4. Akselrod S, Gordon D, Ubel FA, Shannon DC, Barger AC, Cohen RJ. 1981. Power spectrum analysis of heart rate fluctuation: A quantitative probe of beat to beat cardiovascular control. *Science* **213**: 220-222.
5. Aleman M, McCue PM, Chigerwe M, Madigan JE. 2019. Plasma concentrations of steroid precursors, steroids, neuroactive steroids, and neurosteroids in healthy neonatal foals from birth to 7 days of age. *J Vet Intern Med* **33**: 2286-2293.
6. Allen AL, Doige CE, Haas SD, Card CE, Fretz PB. 1995. Concentrations of triiodothyronine and thyroxine in equine fetal serum during gestation. *Biol Reprod* **1**: 9-52.
7. Allen AL, Townsend HG, Doige CE, Fretz PB. 1996. A case-control study of the congenital hypothyroidism and dysmaturity syndrome of foals. *Can Vet J* **37**: 354-358.
8. Allen AL, Fretz PB, Card CE, Doig CE. 1998. The effects of partial thyroidectomy on the development of the equine fetus. *Equine Vet J* **30**: 53-59.
9. Allen WR. 1987. Endogenous hormonal control of the mare's estrous cycle. In: Proceedings from Brain-Fallon Memorial Lecture. 2-13.
10. Allen WR, Wilsher S, Turnbull C, Stewart F, Ousey J, Rossdale P, Fowden A. 2002. Influence of maternal size on placental, fetal and postnatal growth in the horse. I. Development in utero. *Reproduction* **123**: 445-453.

11. Anderson TM, McIlwraith CW. 2004. Longitudinal development of equine conformation from weanling to age 3 years in the Thoroughbred. *Equine Vet J* **36**: 563-570.
12. Ansel L, Bolborea M, Bentsen AH, Klosen P, Mikkelsen JD, Simonneaux V. 2010. Differential regulation of kiss 1 expression by melatonin and gonadal hormones in male and female syrian hamsters. *J Biol Rhythms* **25**: 81-91.
13. Arnold W, Ruff T, Kuntz R. 2006. Seasonal adjustment of energy budget in a large wild mammal, the Przewalski horse (*Equus ferus przewalski*) II. Energy expenditure. *J Exp Biol* **209**: 4566-4573.
14. Arslan M, Weinbauer GF, Schlatt S, Shahab M, Nieschlag E. 1993. FSH and testosterone, alone or in combination, initiate testicular growth and increase the number of spermatogonia and Sertoli cells in a juvenile non-human primate (*Macaca mulatta*). *J Endocrinol* **36**: 235-242.
15. Arslanian S, Suprasongsin C. 1997. Testosterone treatment in adolescents with delayed puberty: changes in body composition, protein, fat, and glucose metabolism. *J Clin Endocrinol Metab* **82**: 3213-3220.
16. Asai S, Ohta R, Fujikawa T, Sakai RR, Shirota M, Ogata M, Watanabe G, Taya K. 2006. Gastric ulceration and expression of prolactin receptor in the brain in Hatano high- and low-avoidance rats. *Endocrine* **30**: 161-166.
17. Asai Y, Matsui A, Osawa T, Kawai M, Kondo M. 1999. Digestible energy expenditure in grazing activity of growing horses. *Equine Vet J Suppl* **30**: 490-49.
18. Autio E. 2008. Loose house of horses in cold climate: Effects in behavior, nutrition, growth and cold resistance. PhD Thesis. Department of Bioscience at the University of Kuopio, Finland.
19. Azzu V, Brand M. 2010. The on-off switches of the mitochondrial uncoupling proteins. *Trends Biochem Sci* **35**: 298-307.
20. Bartke A. 1980. Role of prolactin in reproduction in male mammals. *Fed Proc* **39**: 2577-2581.
21. Bartke A. 2004. Prolactin in the male: 25 years later. *J Androl* **25**: 661-666.

- 22.Berton EW, Meltzer MS, Holladay JW. 1998. Suppression of macrophage activation and T-lymphocyte function in hypoprolactinemic mice. *Science* **239**: 401-404.
- 23.Betz MJ, Enerbäck S. 2015. Human brown adipose tissue: What we have learned so far. *Diabetes* **64**: 2352-2360.
- 24.Bird JA, Clarke L, Symonds ME. 1998. Influence of thyrotropin-releasing hormone on thermoregulation in newborn lambs. *Biol Neonate* **73**: 52-59.
- 25.Blake NG, Eckland DJ, Foster OJ, Lightman SL. 1991. Inhabitation of hypothalamic thyrotropin-releasing hormone messenger ribonucleic acid during food deprivation. *Endocrinology* **129**: 2714-2718.
- 26.Blum WF, Breier BH. 1994. Radioimmunoassays for IGFs and IGFBPs. *Growth Regul* **1**: 11-19.
- 27.Braun K, Oeckl J, Westermeier J, Li Y, Klingenspor. 2018. Non adrenergic control of lipolysis and thermogenesis in adipose tissue. *J Exp Biol* **221**: 1-14.
- 28.Brinkmann L, Gerken M, Riek A. 2011. Adaptation strategies to seasonal changes in environmental conditions of a domesticated horse breed, the Shetland pony (*Equus ferus caballus*). *J Exp Biol* **215**: 1061-1068.
- 29.Brinkmann L, Gerken M, Hambly C, Speakman JR, Riek A. 2014. Saving energy during hard times: energetic adaptations of Shetland pony mares. *J Exp Biol* **217**: 4320-4327.
- 30.Brinkmann L, Gerken M, Hambly C, Speakman JR, Riek A. 2016. Thyroid hormones correlate with field metabolic rate in ponies, *Equus ferus caballus*. *J Exp Biol* **219**: 2559-2566.
- 31.Britton V. 1995. Keeping a horse at grass. The Crowood Press. Ramsbury, Marlborough, UK.
- 32.Brown-Douglas CG, Pagan JD. 2006. Body weight, wither height and growth rates in thoroughbred raised in America, England, Australia, New Zealand and India. In: Advances in Equine nutrition Vol.IV. 213-220.
- 33.Brown-Douglas CG, Pagan JD, Stromberg AJ. 2006. Thoroughbred growth and future racing performance. In: Proceedings of the Kentucky Equine Research

- Conference. **15**: 125-139.
34. Brown-Douglas CG, Pagan JD, Koch A, Caddel S, Huntington PJ. 2008. The relationship between size at yearling sale, sale price, and future racing performance in Kentucky Thoroughbreds. In: Proceedings of Australian Equine Science Symposium. **2**: 24.
 35. Brownlow MA, Dart AJ, Jeffcott LB. 2016. Exertional heat illness: a review of the syndrome affecting racing Thoroughbred in hot and humid climate. *Aust Vet J* **94**: 240-247.
 36. Burkhardt J. 1947. Transition from anoestrus in the mare and effects of artificial lighting. *J Agri Sci* **37**: 64-68.
 37. Butler JA, Colles CM, Dyson SJ, Kold SE, Poulos PW. 1993. The spine. In: Clinical Radiology of the horse. Blackwell Scientific. 355-398. Oxford. UK.
 38. Cannon B, Nedergaard J. 2012. Cell biology: Neither brown nor white. *Nature* **488**: 286-287.
 39. Champion ZJ, Breier BH, Ewen WE, Tobin TT, Casey PJ. 2002. Blood plasma concentrations of insulin-like growth factor-I (IGF-I) in resting standardbred horses. *Vet J* **163**: 45-50.
 40. Charoenphandhu N, Nakkrasae LI, Kraidth K, Teerapornpuntakit J, Thongchote K, Thongon N, Krishnamra N. 2009. Two-step stimulation of intestinal Ca(2+) absorption during lactation by long-term prolactin exposure and suckling-induced prolactin surge. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **297**: E609-E619.
 41. Charoenphandhu N, Wongdee K, Krishnamra N. 2010. Is prolactin the cardinal calciotropic maternal hormone? *Trends Endocrinol Metab* **21**: 395-401.
 42. Chen CI, Riley AM. 1981. Serum thyroxine and triiodothyronine concentration in neonatal foals and mature horses. *Am J Vet Res* **42**: 1415-1417.
 43. Coldrey C, Coldrey V. 1994. Breaking and training young horses. The Crowood Press, Marlborough, Wiltshire, UK.
 44. Cymbaluk NF, Christison, G.I. 1989. Effect of diet and climate on growing horses. *J Anim Sci* **67**: 48-59.

- 45.Cymbaluk NF, Christiso GI, Leach DH. 1989. Energy uptake and utilization by limit -and ad libitum-fed growing horses. *J Anim Sci* **67**: 403.
- 46.Cymbaluk NF. 1990. Cold housing effects on growth and nutrient demand of young horses. *J Anim Sci* **64**: 48-59.
- 47.Cymbaluk NF. 1994. Thermoregulation of horses in cold, winter weather; A review. *Livestock Production Science* **40**: 65-71.
- 48.Dalgaard LT, Pedersen O. 2001. Uncoupling proteins: Functional characteristics and role in the pathogenesis of obesity and Type II diabetes. *Diabetologia* **44**: 946-965.
- 49.Day ML, Imakawa K, Wolfe PL, Kittok RJ, Kinder JE. 1987. Endocrine mechanisms of puberty in heifers. Role of hypothalamo-pituitary estradiol receptors in the negative feedback of estradiol on luteinizing hormone secretion. *Biol Reprod* **37**: 1054-1065.
- 50.出村忠章, 木戸口友美子. 2000. 生産地日高における昼夜放牧導入実態について. 馬の科学. **37**: 142-152.
- 51.Derar R, Haramaki S, Hoque S, Hashizume T, Osawa T, Taya K, Watanabe G, Miyake Y. 2006. Immunoreactive Insulin-like growth factor in plasma during pre-and post-partum periods of thoroughbred mares pattern, physiological function and relation to other hormones. *J Equine Sci* **17**: 75-79.
- 52.De Vol DL, Rotwein P, Sadow JL, Novakofski L, Bechtll PJ. 1990. Activation of insulin-like growth factor gene expression during work-induced skeletal muscle growth. *Am J Physiol* **259**: E89-95.
- 53.Dhakal P, Tsunoda N, Nakai R, Nagaoka K, Nambo Y, Sato F, Taniyama H, Watanabe G, Taya K. 2011. Post-natal dynamic changes in circulating follicle-stimulating hormone, luteinizing hormone, immnoreactive inhibin, progesterone, testosterone and estraduol-17 β in Thoroughbred colts until 6 months of age. *J Equine Sci* **22**: 9-15.
- 54.Dhakal P, Tsunoda N, Nakai R, Ito M, Nagaoka K, Toishi Y, Taniyama H, Watanabe G, Taya K. 2011. Annual changes in day-length, temperature, and circulating reproductive hormones in Thoroughbred stallions. *J Equine Sci* **22**:

- 29-34.
- 55.Dhakal P, Hirama A, Nambo Y, Harada T, Sato F, Nagaoka K, Watanabe G, Taya K. 2012. Circulating pituitary and gonadal hormones in spring-born Thoroughbred fillies and colts from birth to puberty. *J Reprod Dev* **58**: 522-530.
 - 56.Dohi K, William JK, Andrea MM. 2003. Excise increases prolactin-receptor expression on human lymphocytes. *J Appl Physiol* **94**: 518-524.
 - 57.Donabédiana M, Fleurancec BG, Peronad G, Roberte C, Lepagef O, Trillaud-Geylc C, Legerg S, Ricardh A, Bergerod D, Martin-Rosseta W. 2006. Effect of fast vs. moderate growth rate related to nutrient intake on developmental orthopaedic disease in the horse. *Anim Res* **55**: 471-486.
 - 58.Donadeu FX, Thompson DLJr. 2002. Administration of sulpiride to anovulatory mares in winter: effects on prolactin and gonadotropin concentrations, ovarian activity, ovulation and hair shedding. *Theriogenology* **57**: 963-76.
 - 59.Dyson PK, Jackson BF, Pfeiffer DU, Price JS. 2008. Days lost from training by two-and three-year-old Thoroughbred horses: A survey of seven UK training yards. *Equine Vet J* **40**: 650-657.
 - 60.Egawa M, Yoshimatsu H, Bray GA. 1989. Effects of 2-deoxy-D-glucose on sympathetic nerve activity to interscapular brown adipose tissue. *Am J Physiol* **257**: R1377-R1385.
 - 61.Ekpe E, Christopherson RJ. 2000. Metabolic and endocrine responses to cold and feed restriction in ruminants. *Can J Anim Sci* **80**: 87-95.
 - 62.Elliot C, Marton J, Chopin J. 2009. Factors affecting foal birth weight in Thoroughbred horses. *Theriogenology* **71**: 683-689.
 - 63.Equine Research Institute, Japan Racing Association.2004. Japanese Feeding Standard for Horses. pp. 71-73. Animal Medea Co, Tokyo.
 - 64.Evans NA. 2004. Current concept in anabolic-androgenic steroids. *Am J Sports Med* **32**: 524-542.
 - 65.Fagen RM, George TK. 1977. Play behavior and exercise in young ponies.

- Behav Ecol Sociobiol* **2**: 267-269.
- 66.Fawcett JA, Innan H, Tsuchiya T, Sato F. 2021. Effect of advancing age on the reproductive performance of Japanese Thoroughbred broodmares. *J Equine Sci* **32**: 31-37.
 - 67.Filho M, McKeever KH, Gordon ME, Manso HE, Lagakos WS, Wu G, Watford M. 2009. Developmental changes in the concentrations of glutamine and other amino acid in plasma and skeletal muscle of the standardbred foal. *J Anim Sci* **43**: 781-785.
 - 68.Firth EC, Rogers CW, Perkins NR, Anderson BH, Grace ND. 2004. Musculoskeletal responses of 2-year-old Thoroughbred horses to early training. 1. Study design, and clinical, nutritional, radiological and histological observations. *N Z Vet J* **52**: 261-271.
 - 69.Firth EC. 2006. The response of bone, articular cartilage and tendon to exercise in the horse. *J Anat* **208**: 513-526.
 - 70.Flier JS. 1998. Clinical Review 94: what's in a name? In search of leptin's physiologic roll. *J. Clin Endocrinol Metab* **83**: 1407-1413.
 - 71.Fonseca RG, Kenny DA, Hill EW, Katz LM. 2013. The relationship between body composition, training and race performance in a group of Thoroughbred flat racehorses. *Equine Vet J* **45**: 552-557.
 - 72.Fowden AL, Silver M. 1995. Comparative development of the pituitary-adrenal axis in the fetal foal and lamb. *Reprod Domest Anim* **30**: 70-177.
 - 73.Frape DL. 1986. Equine nutrition and feeding. Longman Scientific & Technical, Harlow, UK.
 - 74.Frape DL. 1989. Nutrition and the growth and racing performance of Thoroughbred horse. In: Proceedings of the Nutrition Society. **48**:141-152.
 - 75.Gay V, Kerlan J. 1978. Serum LH and FSH following passive immunization against circulating testosterone in the intact male rat and in orchidectomized rats bearing subcutaneous silastic implants of testosterone. *Arch Androl* **1**:257-266.
 - 76.Gibori G, Abtczak E, Rothchild I. 1977. The role of estrogen in the regulation

- of luteal progesterone secretion in the rat after day 12 of pregnancy. *Endocrinology* **100**:1483-1495.
77. Gold JR, Divers TJ, Barton MH, Lamb SV, Place NJ, Mohammed HO, Brain FT. 2007. Plasma adrenocorticotropin, cortisol and adrenocorticotropin/cortisol ratios in septic and normal-term foals. *J Vet Intern Med* **21**: 791-796.
 78. Gramm M, Marksteiner R. 2010. The effect of age on Thoroughbred racing performance. *J Equine Sci* **21**: 73-78.
 79. Græsli AR, Thiel A, Fuchs B, Singh NJ, Stenbacka F, Ericsson G., Neumann W, Arnemo JM, Evans AL. 2020. Seasonal hypometabolism in female moose. *Front Ecol Evol* **8**: 107.
 80. Guerin MV, Wang XJ. 1994. Environmental temperature has an influence on timing of the first ovulation of seasonal estrus in the mare. *Theriogenology* **42**: 1053-1060.
 81. Gunn HM. 1987. Muscle bone and fat proportions and muscles distribution of Thoroughbreds and other horses. In: Equine exercise physiology: Proceedings of the second International conference on equine exercise physiology; August 7-11 1986, San Diego.
 82. Hada T, Onaka T, Takahashi T, Hiraga A, Yagi K. 2003. Effects of novelty stress on neuroendocrine activities and running performance in Thoroughbred horses. *J. Neuroendocrinol* **15**: 638–648.
 83. Harada T, Nambo Y, Ishimaru M, Sato F, Nagaoka K, Watanabe G, Taya K. 2015. Promoting effects of an extended photoperiod treatment on the condition of hair coats and gonadal function in Thoroughbred weanling. *J Equine Sci* **26**: 147–150.
 84. Hart KA, Wochele DM, Norton NA, McFarlane D, Wooldridge AA, Frank N. 2016. Effect of age, season, body condition, and endocrine status on serum free cortisol fraction and insulin concentration in horses. *J Vet Intern Med* **30**: 653-663.
 85. Hayakawa Y. 1991. Grazing management for yearling of race horses. 1. Night grazing. 日本草地学会誌. **37**: 330-336.

- 86.Haynes WG, Morgan DA, Walsh SA, Mark AL, Sivitz WL. 1997. Receptor-mediated regional sympathetic nerve activity by leptin. *J Clin Investig* **100**: 270-278.
- 87.Haynes WG, Morgan DA, Djalali A, Sivitz WL, Mark AL.1999. Interactions between the melanocortin system and leptin in control of sympathetic nerve traffic. *Hypertension* **33**: 542-547.
- 88.Henneke DR, Potter GD, Kreider JL. 1984. Body condition during pregnancy and lactation and reproductive efficiency of mares. *Theriogenology* **21**: 897-909.
- 89.Hill EW, Gu J, Eivers SS, Fonseca RG, McGivney BA, Govindarajan P, Orr N, Katz LM, MacHugh DE. 2010. A sequence polymorphism in MSTN predicts sprinting ability and racing stamina in Thoroughbred horses. *PLoS One* **5**. e8645.
- 90.Hiney KM, Nielsen BD, Rosenstein D. 2004. Short-duration exercise and confinement alters bone mineral content and shape in weanling horses. *J Anim Sci* **82**: 2313-2320.
- 91.Hintz HF, Hintz RL, Van Vleck LD. 1979. Growth rate of Thoroughbreds, effect of age of dam, year and month of birth, and sex of foal. *J Anim Sci* **48**: 480-487.
- 92.Hodge SL, Kreider JL, Potter GD, Harms PD, Fleeger JL. 1982. Influence of photoperiod on the pregnant and postpartum mare. *Am J Vet Res* **43**: 1752-1855.
- 93.Hodgson DR, Rose RJ. 1994. The athletic horse. W. B. Saunders Co. Philadelphia, PA, USA.
- 94.Hodson N, West DWD, Philip A, Burd NA, Moor DR. 2019. Molecular regulation of human skeletal muscle protein synthesis in response to exercise and nutrients: a compass for overcoming age-related anabolic resistance. *Am J Physiol Cell Physiol* **317**: C1061-C1978.
- 95.Hughes J, Stabefelldt G, Evans J. 1975. The oestrous cycle of the mare. *J Am Vet Med Assoc* **23**: 161-165.
- 96.Hunka MM, da Costa Cordeiro Manso HEC, Bwrnardo RB, da Silva E, Ferreira

- LMC, Filho HCM. 2014. Development and body composition of quarter horse foals during nursing. *Open J Vet Med* **4**: 275-280.
97. Huntington PJ, Brown-Douglas CG, Pagan JD. 2020. Growth and development of Thoroughbred horses. *Anim Prod Sci* **60**: 2093-2102.
98. Hurcombe SD, Toribio RE, Slovis N, Kohn CW, Refsal K, Saville W, Mudge MC. 2008. Blood arginine vasopressin, adrenocorticotropin hormone, and cortisol concentrations at admission in septic and critically ill foals and their association with survival. *J Vet Intern Med* **22**: 639-647.
99. Ikeda K, Fukujyu N, Higashiyama Y, Komatsu T, Fukazawa M. 2018. Current studies and problems of winter season grazing. *日本草地学会誌*. **63**: 223-228.
100. Ishii K, Kuwahara M, Tsubone H, Sugano S. 1996. Autonomic nervous function in mice and voles (*Microtus arvalis*): investigation by power spectral analysis of heart rate variability. *Lab Anim* **30**: 359-364.
101. Ishii K, Kuwahara M, Tsubone H, Sugano S. 1996. The telemetric monitoring of heart rate, locomotor activity, and body temperature in mice and voles (*Microtus arvalis*) during ambient temperature changes. *Lab Anim* **30**: 7-12.
102. Ishimaru M, Matsui A, Seki K, Korosue K, Akiyama K, Mizukami H, Yoshida T, Taya K. 2022. Effects of different winter climates in Japan on body composition of young Thoroughbreds in training. *J Vet Med Sci* **84**: 1585–1594.
103. Jaroenporn S, Furuta C, Nagaoka K, Watanabe G, Taya K. 2008. Comparative effects of prolactin versus ACTH, estradiol, progesterone, testosterone, and dihydrotestosterone on cortisol release and proliferation of the adrenocortical carcinoma cell line H295R. *Endocrine* **33**: 205–209.
104. Jaroenporn S, Nagaoka K, Kasahara C, Ohta R, Watanabe G, Taya K. 2007. Physiological roles of prolactin in the adrenocortical response to acute restraint stress. *Endocr J* **54**: 703–711.
105. Jaroenporn S, Nagaoka K, Ohta R, Watanabe G, Taya K. 2007. Direct effects of prolactin on adrenal steroid release in male Hatano high-avoidance (HAA) rats may be mediated through Janus kinase 2 (Jak2) activity. *J Reprod Dev* **53**: 887–893.

- 106.Jaroenporn S, Nagaoka K, Ohta R, Shirota M, Watanabe G, Taya K. 2009. Differences in adrenocortical secretory and gene expression responses to stimulation in vitro by ACTH or prolactin between high- and low-avoidance Hatano rats. *Stress* **12**: 22–29.
- 107.Jaroenporn S, Nagaoka K, Ohta R, Watanabe G, Taya K. 2009. Prolactin induces phosphorylation of the STAT5 in adrenal glands of Hatano rats during stress. *Life Sci* **85**: 172–177.
- 108.Jeffcott LB. Osteochondrosis in the horse-searching for the key to pathogenesis. 1991. *Equine Vet J* **23**: 331-338.
- 109.Jelan ZA, Jeffcott LB, Lundeheim N, Osborne M. 1996. Growth rate in Thoroughbred foals. *Pferdeheikunde* **12**: 291-296.
- 110.Johnson AL. 1986. Serum concentrations of prolactin, thyroxine and triiodothyronine relative to season and estrous cycle in the mare. *J Anim Sci* **62**: 1012-1020.
- 111.Johnson AL. 1987. Seasonal and photoperiod-induced changes in serum prolactin and pituitary responsiveness to thyrotropin releasing hormone in the mare. *Proc Soc Exp Biol Med* **184**: 118-122.
- 112.Jones L, Hollands T. 2005. Estimation of growth rates in UK Thoroughbreds. *Pferdeheikunde* **21**: 121-123.
- 113.Junkkari R, Simojoki H, Heiskanen ML, Pelkonen S, Sankari S, Tulamo RM, Mykkänen A. 2017. A comparison of unheated loose housing with stables on the respiratory health of weaned-foals in cold winter conditions: an observational field-study. *Acta Vet Scand* **59**: 73.
- 114.Kane AJ, Park RD, McIlwraith CW, Rantanen NW, Morehead JP, Bramlage LR. 2003. Radiographic changes in Thoroughbred yearlings. Part 2: Associations with racing performance. *Equine Vet J* **35**: 366-374.
- 115.Kane RA, Fisher M, Parrett D, Lawrence LM. 1987. Estimating fatness in horses. In: Proceedings of the 10th Equine nutrition and physiology symposium. 127- 131. Fort Collins. CO.
- 116.Kasashima Y, Smith RKW, Birch HL, Takahashi T, Kusano K, Goodship AE.

2002. Exercise induced tendon hypertrophy: cross-sectional area changes during growth are influenced by exercise. *Equine Vet J Suppl* **34**: 264-268.
- 117.Kawabata K, Imi Y, Yoshioka Y, Shibata K, Terao J. 2021. Molecular mechanisms involved in skeletal muscle homeostasis. *Konan Woman's University Researches*. **15**: 65-71.
- 118.Kearns CF, McKeever KH, Kumagai K, Abe T. 2002. Fat-free Mass is related to one-mile race performance in elite standardbred horses. *Vet J* **163**: 260-266.
- 119.Kearns CF, McKeever KH, Alder HJ, Abe T, Brechue WF. 2002. Relationship between body composition, blood volume and maximal oxygen uptake. *Equine Vet J Suppl* **34**: 485-490.
- 120.Kearns CF, McKeever KH, Abe T. 2002. Overview of horse body composition and muscle architecture: Implications of performance. *Vet J* **164**: 224-234.
- 121.King SS, Campbell AG, Dille EA, Roser JF, Jones KL. 2005. Dopamine receptors in equine ovarian tissues. *Domest Anim Endocrinol* **28**:405-415.
- 122.King SS, Roser JF, Jones KL. 2008. Follicular fluid prolactin and the periovulatory prolactin surge in the mare. *J Equine Vet Sci* **28**: 468-472.
- 123.King SS, Dille EA, Marlo T, Roser JF, Jones KL. 2010. Ovarian prolactin activity: evidence of local action and production. *Anim Reprod Sci* **121**: S51-S53.
- 124.King SS, Oberhaus EL, Welsh CM, Heath D, Jones KL. 2014. Evidence for local neuroendocrine signaling in ovarian prolactin regulation. *J Equine Vet Sci* **34**: 107-108.
- 125.Kitajima Y, Ono Y, 2016. Estrogens maintain skeletal muscle and satellite cell functions. *J Endocrinol* **229**: 267–275.
- 126.Kitaura T, Sato F, Hada T, Ishimaru M, Kodama R, Nambo Y, Watanabe G, Taya K. 2021. Influence of exercise and emotional stresses on secretion of prolactin and growth hormone in Thoroughbred horses. *J Equine Sci* **32**: 49–53.
- 127.Kohno D, Gao HZ, Muroya S, Kikuyama S, Yada T. 2003. Ghrelin directly interacts with neuropeptide-Y-containing neurons in the rat arcuate nucleus :

- Ca²⁺ signaling via protein kinase A and N-type channel-dependent mechanism and cross-talk with leptin and orexin. *Diabetes* **52**: 948-956.
- 128.Kojima M, Hosoda H, Date Y, Nakazato M, Matsuo H, Kangawa K. 1999. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature* **402**: 656-60
- 129.Kooistra LH, Ginther OJ. 1975. Effect of photoperiod on reproductive activity and hair in mares. *Am J Vet Res* **36**: 1413-1419.
- 130.Korenman SG, Sevens RH, Carpenter LA, Robb M, Niswender GD, Sherman BM. 1974. Estradiol radioimmunoassay without chromatography: procedure, validation and normal values. *J Clin Endocrinol Metab* **38**: 718-720.
- 131.Korosue K, Murase H, Sato F, Ishimaru M, Harada T, Watanabe G, Taya K, Nambo S. 2012. Successful induction of lactation in a barren Thoroughbred mare: Growth of a foal raised on induced lactation and the corresponding maternal hormone profiles. *J Vet Med Sci* **74**: 995–1002.
- 132.Kraemer WJ, Gordon SE, Fleck SJ, Marchitelli LJ, Mello R, Dziados JE, Friedle K, Harman E, Maresh C, Fry AC. 1991. Endogenous anabolic hormonal and growth factor responses to heavy-resistance exercise in males and females. *Int J Sports Med* **12**: 228-235.
- 133.Kronfeld DS, Meacham TN, Donoghue S. 1990. Dietary aspects of developmental orthopedic disease in young horses. *Vet Clin North Am Equine Pract* **6**: 451-465.
- 134.Kunii H, Nambo Y, Okano A, Matsui A, Ishimaru M, Asai Y, Sato F, Fujii K, Nagaoka K, Watanabe G, Taya K. 2015. Effects of an extended photoperiod on gonadal function and condition of hair coats in Thoroughbred colts and fillies. *J Equine Sci* **26**: 57-66.
- 135.Kurosawa M, Nagata S, Takeda F, Mima K, Hiraga A, Kai M, Taya K. Plasma catecholamine, adrenocorticotropin and cortisol responses to exhaustive incremental treadmill exercise of the Thoroughbred horse. *J Equine Sci* **9**: 9-18.
- 136.Kurosawa M, Nagata S, Takeda F, Mima K, Hiraga A, Kai M, Taya K. 1998.

- Effects of caffeine on performance, cardiorespiratory function and plasma hormonal responses during exhaustive treadmill exercise in the Thoroughbred horse. *J Equine Sci* **9**: 33-43.
- 137.Kuroshima A. 1996. Harmonious acclimation to cold. 臨床環境医学. **5**: 55-60.
- 138.Kusunose R, Hatakeyama R, Kubo K, Kiguchi A, Asai Y, Fujii Y, Ito K. 1985. Behavioral studies on yearling horses in field environment. 1.Effects of the field size on the behavior of horses. *Bull Equine Res Inst* **22**: 1-7.
- 139.Kuwahara M, Hashimoto S, Ishii K, Yagi Y, Hada T, Hiraga A, Kai M, Kubo K, Oki H, Tsubone H, Sugano S. 1996. Assessment of autonomic nervous function by power spectral analysis of heart rate variability in the horse. *J Auton Nerv Syst* **60**: 43-48.
- 140.Kyle UG, Genton L, Hans D, Karsegard L, Slosman DO, Pichard C. 2001. Age-related differences in fat-free mass, skeletal muscle. Body cell mass between 18 and 94 years. *Eur J Clin Nutr* **55**: 663-672.
- 141.Langlois B, Blouin C. 1997. Effect of a horse's month of birth on future sport performance. I. Effect on annual phenotypic indices. *Ann. Zootech* **46**: 393-398.
- 142.Langlois B, Blouin C. 1998. Effect of a horse's month of birth on future sport performance. II. Effect on annual earnings and annual earnings per start. *Ann Zootech* **47**: 67-74.
- 143.Le Jeune SS, Williams CA, Pypendop BH, Ohmura H, Jones JH. 2014. Does acupuncture acutely affect heart rate variability in horse? *J Equine Vet Sci* **34**: 1084-1090.
- 144.Lee SJ. 2004. Regulation of muscle mass by myostatin. *Annu Rev Cell Dev Biol* **20**: 61-86.
- 145.Lee SJ, McPherron AC. 2001. Regulation of myostatin activity and muscle growth. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**: 9306-9311.
- 146.Leleu C, Cotrel C. 2006. Body composition in young standardbreds in training: relationship to body condition score, physiological and locomotor

- variables during exercise. *Equine Vet J Suppl* **36**: 98-101.
147. Lepeule J, Bareille N, Valette JP, Seegers H, Jacquet S, Denoix J, Robert C. 2008. Developmental orthopaedic disease in limbs of foals: between-breed variations in the prevalence, location and severity at weaning. *Animal* **2**: 284-291.
 148. Le Roith D, Bondy C, Yakar S, Liu JL, Butler A. 2001. The somatomedin hypothesis: 2001. *Endocr Rev* **22**: 53-74.
 149. Li SN, Xue HL, Zhang Q, Xu JH, Wang S, Chen L. 2015. Photoperiod regulates the differential expression of KISS-1 and GPR54 in various tissues and sexes of striped hamster. *Genet Mol. Res* **14**: 13894-13905.
 150. Linden A, Art T, Amory H, Desmecht D, Lekeux P. 1991. Effect of 5 different type of exercise, transportation and ACTH administration on Plasma Cortisol Concentration in sport horses. *Equine Exercise Physiology* **3**: 391-396.
 151. Logan AA, Nielsen B. 2021. Training young horses: The science behind the benefits. *Animals (Basel)* **11**: 1-13.
 152. Lowell BB, Spiegelman BM. 2000. Towards a molecular understanding of adaptive thermogenesis. *Nature* **22**: 49-54.
 153. Luszczynski J, Pieszka M, Kosiniak-Kamysz K. 2011. Effect of horse breed and sex on growth rate and radiographic closure time of distal radial metaphyseal growth plate. *Livest Sci* **141**: 252-258.
 154. Maeda M, Sato F. 2017. Retrospective study of clinical history of influence of developmental orthopedic diseases on racing performance of Japanese Thoroughbreds. *J Jpn. Vet. Med* **70**: 297-302.
 155. Mantzoros CS. 1999. The role of leptin in human obesity and disease: a review of current evidence. *Ann Intern Med* **130**: 871-881.
 156. Matsui A, Inoue Y, Asai Y, Yamanobe A. 2005. Effect of the geographic breeding region on digestible energy intake and growth rate of Thoroughbred yearling horses: A comparison of the Hidaka and Miyazaki regions of Japan. *J Equine Sci* **16**: 19-26.
 157. Matsui A, Ohmura H, Akiyama K, Korosue K, Ishimaru M, Yamanobe A. 2006.

- Gender-related changes in body composition associated with growth in thoroughbred. In: Proceeding of the 12th AAAP Animal Science Congress, Busan, Korea, 2006.
158. Mazzola SM, Colombani C, Pizzamiglio G, Cannas S, Palestini C, Costa ED, Gazzonis AL, Bionda A, Crepaldi P. 2021. Do you think I am living well? A four-season hair cortisol analysis on leisure horses in different housing and management conditions. *Animals (Basel)* **11**: 2141.
 159. McBride GE, Christopherson RJ, Sauer W. 1985. Metabolic rate and plasma thyroid hormone concentrations of mature horses in response to changes in ambient temperature. *Can J Anim Sci* **65**: 375-382.
 160. McPherron AC, Lawler AM, Lee SJ. 1997. Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF-beta superfamily member. *Nature* **387**: 83-90.
 161. McPherron AC, Lee SJ. 2002. Suppression of body fat accumulation in myostatin-deficient mice. *J Clin Invest* **109**: 595-601.
 162. Medan MS, Nambo Y, Nagamine N, Shinbo H, Watanabe G, Groome N, Taya K. 2004. Plasma concentrations of ir-inhibin, inhibin A, inhibin pro- α C, FSH, and estradiol-17 β during estrous cycle in mares and their relationship with follicular growth. *Endocrine* **25**: 7-14.
 163. Mejdell CM, Bøe KE. 2005. Responses to climatic variables of horses housed outdoors under Nordic winter conditions. *Can J Anim Sci* **85**: 301-308.
 164. Mejdell CM, Bøe KE, Jørgensen GHM. 2020. Caring for the horse in a cold climate-Reviewing principles for thermoregulation and horse preferences. *Appl Anim Behav Sci* **231**: 105071.
 165. Miller KF, Berg SL, Sharp DC, Ginther OJ. 1980. Concentrations of circulating gonadotropins during various reproductive states in mares. *Biol Reprod* **22**: 744-750.
 166. Miller WL, Eberhardt NL. 1983. Structure and evolution of the growth hormone gene family. *Endocr Rev* **4**: 97-130.
 167. Mizukami H, Suzuki T, Nambo Y, Ishimaru M, Naito H, Korosue K, Akiyama K, Miyata K, Yamanobe A, Nagaoka K, Watanabe G, Taya K. 2015.

- Comparison of growth and endocrine changes in Thoroughbred colts and fillies reared under different climate conditions. *J Equine Sci* **26**: 49-56.
- 168.Morgan PJ, Williams LM. 1996. The pars tuberalis of the pituitary: A gateway for neuroendocrine output. *Rev Reprod* **1**: 153-161.
- 169.Morgan PJ, Webster CA, Mercer JG, Ross AW, Hazlerig DG, MacLean A, Barret P. 1996. The ovine pars tuberalis secretes a factor(s) that regulates gene expression in both lactotropic and nonlactotropic pituitary cells. *Endocrinology* **137**: 4018-4026.
- 170.Morreala EG, Obregon MJ, Escobar RF. 2004. Role of thyroid hormone during early brain development. *Eur J Endocrinol* **151**: suppl 3. U25-37.
- 171.Murphy BA, Walsh CM, Woodward EM, Prendergast RL, Ryle JP, Fallon LH, Troedsson MHT. 2014. Blue light from individual light masks directed at a single eye advances the breeding season in mares. *Equine Vet J* **46**: 601-605.
- 172.Nagamine N, Nambo Y, Nagata S, Nagaoka K, Tsunoda N, Taniyama H, Tanaka Y, Tohei A, Watanabe G, Taya K. 1998. Inhibin secretion in the mare: localization of inhibin alpha, betaA and betaB subunits in the ovary. *Biol Reprod* **59**: 1392-1398.
- 173.Nagata S, Miyake YI, Nambo Y, Nagamine N, Watanabe G, Tsunod N, Taniyama H, Hondo E, Yamada J, Taya K. 1998. Inhibin secretion in the stallion. *Equine Vet J* **30**: 98-103.
- 174.Nagata S, Tsunoda N, Nagamine N, Tanaka Y, Taniyama H, Nambo Y, Watanabe G, TayaK. 1998. Testicular inhibin in the stallion: cellular source and seasonal changes in its secretion. *Biol Reprod* **59**: 62-68.
- 175.Nagata S, Kurosawa M, Mima K, Nambo Y, Fujii Y, Watanabe G, Taya K. 1999. Effects of anabolic steroid (19-nortestosterone) on the secretion of testicular hormone in the stallion. *J Reprod Fertil* **113**: 373-379.
- 176.Nagy E, Berczi I, Friesen HG. 1983. Regulation of immunity in rats by lactogenic and growth hormones. *Acta Endocrinol (Copenh)* **102**: 351-357.
- 177.Nagy P, Guillaume D, Dael P. 2000. Seasonality in mares. *Anim Reprod Sci* **60-61**: 245-262.

178. Nakada K, Isikawa Y, Nakao T, Amukai YS. 2002. Changes in responses to GnRH on luteinizing hormone and follicle stimulating hormone secretion in prepubertal heifers. *J. Reprod Dev* **48**: 545-551.
179. Nakai R, Weng Q, Tanaka Y, Tsunoda N, Taniyama H, Haramaki S, Nambo Y, Watanabe G, Taya K. 2007. Change in circulating follicle-stimulating hormone, luteinizing hormone, immunoreactive inhibin, progesterone, testosterone and estradiol-17 β in fillies from birth to 6 months of age. *J Equine Sci* **18**: 85-91.
180. Nakamura K, Morrison SF. 2008. A thermosensory pathway that controls body temperature. *Nat Neurosci* **11**. 62-71.
181. Nakamura K, Morrison SF. 2008. Preoptic mechanism for cold-defensive responses to skin cooling. *J Physiol* **586**: 2611-2620.
182. Nakamura K, Morrison SF. 2010. A thermosensory pathway mediating heat-defense responses. *Proc Natl Acad Sci USA* **107**: 8848-8853.
183. Nakamura K, Morrison SF. 2011. Central efficient pathways for cold - defensive and febrile shivering. *J Physiol* **589**: 3641-3658.
184. Nakamura K. 2016. Development of “Thermal Biology” based on the regulation of body temperature and metabolism. 生物物理. **56**: 149-153.
185. Nakamura Y, Kamimura S, Ando T, Hamana K. 2002. Seasonal variations of sex steroid hormones in plasma and ovarian follicular morphologies of mares in southern Kyushu. 日本畜産学会報. **73**: 389-396.
186. Nakamura Y, Yanagawa Y, Morison SF, Nakamura K. 2017. Medullary reticular neurons mediate neuropeptide Y-induced metabolic inhibin and mastication. *Cell Metab* **25**: 322-334.
187. Nakazato M, Murakami N, Date Y, Kojima M, Matsuo H, Kangawa K, Matsukura S. 2001. A role for ghrelin in the central regulation of feeding. *Nature* **409**: 194-198
188. Nambo Y, Asai Y, Ito K, Okada S, Hashikura S, Gojo R, Iwata K. 2006. Establishing a method of using light control to induce ovulation during early transitional period in mare of Hokkaido. *J Equine sci* **17**: 94.
189. Nambo Y, Okano A, Kunii H, Harada T, Dhakal P, Matsui A, Korosue K,

- Yamanobe A, Nagata S, Watanabe G, Taya K. 2010. Effect of extended photoperiod on reproductive endocrinology and body composition in thoroughbred yearlings and weanlings. *Anim Reprod Sci* **121**: 35 -37.
- 190.Nambo Y. 2016. Regulatory Mechanism and control of ovarian activity in mares. 日獣会誌. **69**: 589-596.
- 191.Nequin LG, King SS, Jonson AL, Gow GM, Ferreira-Dias GM. 1993. Prolactin may play a role in stimulating the equine ovary during the spring reproductive transition. *J Equine Vet Sci* **13**: 631-635.
- 192.Nicks KM, Fowler TW, Gaddy D. 2010. Reproductive hormones and bone. *Curr Osteoporos Rep* **8**: 60-67.
- 193.西川義正. 1959. 光線処理による卵巣機能の季節的変動, 馬の繁殖に関する研究. Studies on reproduction in horses. Singularity and artificial control in reproductive phenomena.34-38. 日本中央競馬会.東京.
- 194.日本中央競馬会. 2010. 馬事部生産育成対策室. 軽種馬生産育成のあり方に関する検討会報告書.13. 日本中央競馬会.東京.
- 195.Nolan MB, Walsh CM, Duff N, McCrarren C, Prendergast RL, Murphy BA. 2017. Artificially extended photoperiod administered to pre-partum via blue light to a single eye: Observations on gestation length, foal birth weight and foal hair coat at birth. *Theriogenology* **100**: 126-133.
- 196.Nomura N, Shiose T, Ishikawa Y, Mizobe F, Sakai S, Kusano K. 2019. Prevalance of post-race exertional heat illness in Thoroughbred racehorses and climate conditions at racecourses in Japan. *J Equine Sci* **30**: 17-23.
- 197.O'Brien C, Darcy-Dunne MR, Murphy BA. 2020. The effects of extended photoperiod and warmth on hair growth in ponies and horses at different times of year. *PLoS One* **15**: e0227115.
- 198.O'Gorman B. 2000. Racing Horses: About my father's business. Romney Publications. Newmarket, Suffolk, UK.
- 199.Ohmura H, Jones JH. 2017. Changes in heart rate and heart rate variability as a function of age in Thoroughbred horses. *J Equine Sci* **28**: 99-103.
- 200.Ohmura H, Hiraga A. 2022. Effect of restraint inside the transport vehicle on

- heart rate and heart rate variability in Thoroughbred horses. *J Equine Sci* **33**: 329-412.
201. Onoda T, Yamamoto R, Sawamura K, Inoue Y, Murase H, Nambo Y, Tozaki T, Matsui A, Hirai N. 2011. Empirical growth curve estimation considering multiple seasonal compensatory growths of body weights in Japanese Thoroughbred colts and fillies. *J Anim Sci* **91**: 5599-5604.
202. Onoda T, Yamamoto R, Sawamura K, Murase H, Nambo Y, Inoue Y, Matsui A, Moyake T, Hirai N. 2014. An approach of estimating individual growth curves for young thoroughbred horses based on their birthdays. *J Equine Sci* **25**: 29-35.
203. Pääkkönen T, Leppäluoto J. 2000. Cold exposure and hormonal secretion: A review. *Int J Circumpolar Health* **61**: 265-276.
204. Pagan JD. 1998. A summary of growth rates of Thoroughbred horses in Kentucky. *Advances in Equine Nutrition Volume I*. Kentucky Equine Research Inc. Versailles, Kentucky, USA. 449-456.
205. Pagan JD. 1998. The incidence of developmental orthopedic disease(DOD) on a Kentucky Thoroughbred farm. *Advances in Equine Nutrition Volume I*. Kentucky Equine Research Inc. Versailles, Kentucky, USA. 469-476.
206. Pagan JD, Brown-Douglas CG, Caddel S. 2006. Body weight and condition of Kentucky Thoroughbred mares and their foals as influenced by month of foaling, season, and gender. *Body weight and condition. Advances in Equine nutrition Volume 1*. Kentucky equine research Inc. Versailles, Kentucky, USA. 61-69.
207. Pagani M, Lombardi F, Guzzetti S, Rimoldi O, Malfatto G, Dell'Orto S, Piccaluga E. 1986. Power spectral analysis of heart rate and arterial pressure variabilities as a marker of sympatho-vagal interaction in man and conscious dog. *Circ Res* **59**: 178-193.
208. Pellicer-Rubio MT, Boissard K, Fogerit Y, Pougnaud JJ, Bonné JL, Leboeuf B. 2016. Evaluation of hormone-free protocols based on the “male effect” for artificial insemination in lactating goats during seasonal anestrus.

- Theriogenology* **80**: 1523-1631.
- 209.Pereira DN, Procianoy RS. 2003.Effect of perinatal asphyxia on thyroid-stimulating hormone and thyroid hormone levels. *Acta Paediatr* **92**: 339-345.
 - 210.Persson SGB, Ullberg LF. 1981. Blood volume and rate of growth in Standardbred foals. *Equine Vet J* **13**: 254.
 - 211.Piekarski DJ, Jarjisian SG, Pere L, Ahmad H, Dhawan N, Zucker I, Kriegsfeld LJ. 2014. Effects of pinealec.tomy and short day length on reproduction and neuronal RFRP-3, kisspeptine, and GnRH in female turkish hamsters. *J Biol Rhythms* **29**: 181-191.
 - 212.Platt H. 1984. Growth of the equine foetus. *Equine Vet J* **16**: 247-252.
 - 213.Pohlin F, Brabender K, Fluch G, Stalde G, Petit T, Walzer C. 2017. Seasonal Variations in Heart Rate Variability as an indicator of stress in free-ranging pregnant Przewalski's Horse (*E.ferus przewalskii*) within the Hortobágy National Park in Hungary. *Front Physiol* **8**:664.
 - 214.Preston SA, Brown MP, Tumble TN, Chmielewski TL, Zimmer DN, Hernandez JA. 2012. Effects of various presale radiographic finding for yearling Thoroughbreds on 2-year-old racing performance. *J Am Vet Med Assoc* **241**: 1505-1513.
 - 215.Raub RH, Jackson SG, Baker JP. 1989. The effect of exercise on bone growth and development in weanling horses. *J Anim Sci* **67**: 2508-2514.
 - 216.Rawlings NG, Evans AG, Honaramooz A, Bartlewski PM. 2003. Antral follicle growth and endocrine changers in prepubertal cattle,sheep and goats. *Anim Reprod Sci* **78**: 259-270.
 - 217.Reed SR, Jackson BF, Wood LN, Price JS, Verheyen KLP. 2012. Exercise affects joint risk in Thoroughbreds in training. *Vet. J.* **196**: 339-344.
 - 218.Revel FG, Saboureau M, Pévet P, Simonneaux V, Mikkelsen JD. 2008. RFamide-related peptide gene is a melatonin-driven photoperiodic gene. *Endocrinology* **149**: 902-912.
 - 219.Rodriguez J, Vernus B, Chelh I, Cassar-Malek I, Gabillard JC, Hadj Sassi A, Seiliez I, Picar B, Bonnieu A. 2014. Myostatin and the skeletal muscle atrophy

- and hypertrophy signaling pathways. *Cell Mol Life Sci* **71**: 4361-4371.
- 220.Rogers CW, Firth EC, McIlwraith CW, Barneveld A, Goodship AE, Kawcak CE, Smith RKW, Van Weeren RR. 2008. Evaluation of a new strategy to modulate skeletal development in racehorses by imposing track-based exercise during growth: The effects on 2-and 3-year-old racing careers. *Equine Vet J* **40**: 119-127.
- 221.Rogers CW, Bolwell CF, Gee EK, Rosanowski SM. 2020. Equine musculoskeletal development and performance: impact of the production system and early training. *Anim Prod Sci* **60**: 2069-2079.
- 222.Rogers CW, Gee EK, Dittmer KE. 2021. Growth and bone development in the horse: When is a horse skeletally mature? *Animals (Basel)* **11**. 3402.
- 223.Rosdale PD, Ousey JC, McGladdery AJ, Prandi S, Holdstock N, Grainger L, Houghton E. 1995. A retrospective study of increased plasma progestogen concentrations in compromised neonatal foals. *Reprod Fertil Dev* **7**: 567-575.
- 224.Saastamoinen MT, Ojala MJ. 1991. Influence of birth-month on age at first start and racing performance in young trotters. *Acta Agri Scan* **41**: 437-445.
- 225.Sanford LM, Dickson KA. 2008. Prolactin regulation of testicular development and sexual behavior in yearling Suffolk rams. *Society for Reprod and Ferti* **77**: 1-10.
- 226.Sato F, Tanabe T, Murase H, Tominari M, Kawai M. 2017. Application of a wearable GPS unit for examining interindividual distances in a herd of Thoroughbred dams and their foals. *J Equine Sci* **28**:13-17.
- 227.Schuster C, Gauer F, Malan A, Recio J, Pévet P, Masson-Pévet M. 2001. The circadian clock, light/dark cycle and melatonin are differentially involved in the expression of daily and photoperiodic variations in mtl melatonin receptors in the Siberian and Syrian hamsters. *Neuroendocrinology* **74**: 55-68.
- 228.Seko D, Fujita R, Kitajima Y, Nakamura K, Imai Y, Ono Y. 2020. Estrogen Receptor β Controls Muscle Growth and Regeneration in Young Female Mice. *Stem Cell Rep* **15**: 577-586.
- 229.Sengupta S, Peterson TR, Laplante M, Oh S, Sabatini DM. 2010. MTORC1

- controls fasting-induced ketogenesis and its modulation by aging. *Nature* **468**: 1100-1104.
- 230.Sengupta S, Peterson TR, Sabatini DM. 2010. Regulation of the mTOR complex 1 pathway by nutrients, growth factors, and stress. *Mol Cell* **40**: 310-322.
- 231.Shimobayashi M, Hall MN. 2016. Multiple amino acid sensing inputs to mTORC1. *Cell Res* **26**: 7-20.
- 232.Sidossis L, Kajimura S. 2015. Brown and beige fat in humans: thermogenic adipocytes that control energy and glucose homeostasis. *J Clin Invest* **125**: 478-486.
- 233.Silvr M, Ousey JC, Dudan FE, Fowde AI, Kox J, Cas RS, Rossdable PD. 1995. Studies on equine prematurity 2:Postnatal adrenocortical activity in relation to plasma adrenocorticotrophic hormone and catecholamine levels in term and premature foals. *Equine Vet J* **75**:285-307.
- 234.Smith AM, Stania WB, Splan RK. 2006. Association between yearling body measurement and career racing performance in Thoroughbred racehorses. *J Equine Vet Sci* **26**: 212-214.
- 235.Smith JT, Coolen LM, Kriegsfeld LJ, Sari IP, Jaafarzadehshiraz MR, Maltby M, Bateman K, Goodman RL, Tibbrook AJ, Ubuka T, Bentley G, Clarke IJ, Lehman MN. 2008. Variation in kisspeptin and RFamide-related peptide (RFRP) expression and terminal connections to gonadotropin-releasing hormone neurons in the brain: A novel medium for seasonal breeding in the sheep. *Endocrinology* **149**: 5770-5782.
- 236.Solsona R, Pavlin L, Bernadi H, Sanchez AMJ. 2021. Molecular regulation of skeletal muscle growth and organelle biosynthesis: Practical recommendations for exercise training. *Int J Mol Sci* **22**: 2741.
- 237.Spike-Pierce DL, Bramlage LR. 2003. Correlation of racing performance with radiographic changes in the proximal sesamoid bones of 487 Thoroughbred yearlings. *Equine Vet J* **35**: 350-353.
- 238.Staniar WB, Kronfeld DS, Aker RM, Harris PA. 2007. Insulin-like growth

- factor I in growing thoroughbreds. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)* **91**: 390-399.
- 239.Suntornsaratoon P, Wongdee K, Krishnamra N, Charoenphandhu N. 2010. Possible chondroregulatory role of prolactin on the tibial growth plate of lactating rats. *Histochem Cell Biol* **134**: 483–491.
- 240.Sutton JR, Young JD, Lazarus L, Hockie JB, Maksvytis J. 1969. The hormonal response to physical exercise. *Australas Ann. Med* **18**: 84-90.
- 241.Suzuki T, Mizukami H, Nambo Y, Ishimaru M, Miyata K, Akiyama K, Korosue K, Naito H, Nagaoka K, Watanabe G, Taya K. 2015. Different effects of an extended photoperiod treatment on growth, gonadal function, and condition of hair coats in Thoroughbred yearlings reared under different climate conditions. *J Equine Sci* **26**: 113-124.
- 242.Takahashi T. 2015. The effect of age on the racing speed of Thoroughbred racehorses. *J Equine Sci* **26**: 43-48.
- 243.Takahashi Y, Takahashi T. 2017. Seasonal fluctuations in body weight during growth of Thoroughbred racehorses during their athletic career. *BMC Vet Res* **13**:257-264.
- 244.Tanabe T, Mitani T, Ueda K, Matsui A, Kawai M. 2020. The changes of grazing behavior and locomotion activity per day for stocked Thoroughbred foals with growth. *Animal Behaviour and Management. 動物の行動と管理学会誌*. **56**: 55-62.
- 245.Tangyuenyong S, Sato F, Nambo Y, Murase H, Eudo Y, Tanaka T, Nagaoka K, Watanabe G. 2017. Comparison of physical body growth and metabolic and reproductive endocrine functions between north and south climates of Japan in trained Thoroughbred yearling horses. *J Equine Sci* **28**. 77-86.
- 246.Tanner JC, Rogers CW, Firth EC. 2013. The association of 2-year-old training milestones with career length and racing success in a sample of Thoroughbred horses in New Zealand. *Equine Vet J* **45**: 20-24.
- 247.Taya K, Watanabe G, Sasamoto S. 1985. Radioimmunoassay for progesterone, testosterone and estradiol-17 β ¹²⁵I-iodohistamine radioligands. *Jpn J Anim*

- Reprod* **31**:186-197.
- 248.Taya K. 2003. ホルモンと生体機能の仕組み – 今、世界で最も注目されているホルモン「グレリン」 – . *CAP*. **173**: 77.
- 249.Taya K. 2011.Stress and prolactin. *Hormone Frontier in Gynecology*. **18**: 275-283.
- 250.The Japan Bloodhorse Breeder's Association, Japan Association for International Racing and Stud Book. 公益社団法人日本軽種馬協会, 公益社団法人ジャパン・ブラッドストック・インターナショナル. 2021, Bloodhorse statistics 2020.軽種馬統計 2020. 56-57.
- 251.Thompson DLJr, Depew CL, Ortiz A, Sticker LS, Rahmanian MS. 1994. Growth hormone and prolactin concentrations in plasma of horses: sex differences and the effects of acute exercise and administration of growth hormone-releasing hormone. *J Anim Sci* **72**: 2911-2918.
- 252.Thompson DLJr, Hoffman R, DePew CL. 1997. Prolactin administration to seasonally anestrous mares: reproductive, metabolic, and hair-shedding responses. *J Anim Sci* **75**: 1092-1099.
- 253.Thompson DLJr, DePew CL. 1997. Prolactin, gonadotropin, and hair shedding responses to daily sulpiride administration in geldings in winter. *J Anim Sci* **75**: 1087-1091.
- 254.Thompson DLJr, Oberhaus EL. 2015. Prolactin in the horse: Historical perspective, actions and reactions, and its role in reproduction. *J Equine Vet Sci* **35**: 343-353.
- 255.Thompson KN, Jackson SG, Rooney JR. 1988. The effect of above average weight gains on the incidence of radiographic bone aberrations and epiphysitis in growing horses. *J Equine Vet Sci* **8**: 383-385.
- 256.Thompson KN. 1995. Skeletal growth-rates of weanling and yearling Thoroughbred horses. *J Anim Sc* **73**: 2513-2517.
- 257.Tozaki T, Sato F, Hill EW, Miyake T, Endo Y, Kakoi H, Gawahara H, Hirota K, Nakano Y, Nambo Y, Kurosawa M. 2011. Sequence variants at the myostatin gene locus influence the body composition of Thoroughbred horses. *J Vet Med*

- Sci.* **73**: 1617-1624.
258. Tozaki T, Sato F, Ishimar M, Kikuchi M, Kakoi H, Hirota K, Nagata S. 2016. Sequence variants of BIEC2-808543 near LCORL are associated with body composition in Thoroughbreds under training. *J Equine Sci* **27**: 107-114.
259. Tozaki T, Kikuchi M, Kakoi H, Hirota K, Nagata S. 2017. A genome-wide association study for body weight in Japanese Thoroughbred racehorses clarifies candidate regions on chromosomes 3, 9, 15, and 18. *J Equine Sci* **28**: 127-134.
260. Turbill C, Ruff T, Mang T, Arnold W. 2010. Regulation of heart rate and rumen temperature in red deer: effects of season and food intake. *J Exp Biol* **214**: 963-970.
261. Ubuta T, Inoue K, Fukuda Y, Mizuno T, Ukena K, Kriegsfeld LJ, Tsutsui K. 2012. Identification, expression, and physiological functions of Siberian hamster gonadotropin-inhibitory hormone. *Endocrinology* **153**: 373-385.
262. Urban RJ. 2011. Growth hormone and testosterone: anabolic effects on muscle. *Horm Res Paediatr* **76**: 81-83.
263. Vanderschueren D, Laurent MR, Claessens F, Gielen E, Lagerquist MK, Vandenput L, Börjesson AE, Ohlsson C. 2014. Sex steroid actions in male bone. *Endocr. Rev.* **35**: 906-960.
264. Van Niekerk CH, Van Heerden JS. 1972. Nutrition and ovarian activity of mares early in the breeding season. *J S Afr Vet Med Assoc* **43**: 351-360.
265. Van Weeren PR, Barneveld A. 1999. Introductions: Study design to evaluate the influence of exercise on the development of the musculoskeletal system of foals up to age 11 months. *Equine Vet. J Suppl* **31**: 4-8.
266. Van Weeren PR, Marianne MS, Van Oldruitenborgh-Oosterbaan S, Barneveld A. 2010. The influence of birth weight, rate of weight gain and final achieved height and sex on the development of osteochondrotic lesions in a population of genetically predisposed Warmblood foals. *Equine Vet J Suppl* **31**: 26-30.
267. Verheyen KLP, Henley WE, Price JS, Wood JLN. 2005. Training -related factors associated with dorsometacarpal disease in young Thoroughbred

- racehorses in the U.K. *Equine Vet J* **37**: 442-448.
268. Virtanen K, Lidell ME, Orava J, Heglind M, Westergren R, Niemi T, Taittonen M, Laine J, Savisto N, Enerbäck S, Nuutila P. 2009. Functional brown adipose tissue in healthy adults. *N Engl J Med* **360**: 1518-1525.
269. Virtanen K, Nuutila P. 2011. Brown adipose tissue in humans. *Curr Opin Lipidol* **22**: 49-54.
270. Wallsten H, Olsson K, Dahlborn K. 2012. Temperature regulation in horses during exercise and recovery in a cool environment. *Acta Vet Scand* **54**:42.
271. Walsh CM, Prendergast RL, Sherindan JT, Murphy BA. 2013. Blue light from light emitting diodes at a single eye elicits a dose-dependent suppression of melatonin in horses. *Vet J* **196**: 231-235.
272. Weigent DA. 1996. Immunoregulatory properties of growth hormone and prolactin. *Pharmacol Ther* **69**: 237-257.
273. Westervelt RG, Stouffer JR, Hintz HF, Schryver HF. 1976. Estimating fatness in horses and ponies. *J Anim Sci* **43**: 781-785.
274. Whitehead A, Krause FN, Moran A, MacCannell ADV, Scragg J, McNally BD, Boateng EB, Mufit SA, Virtue S, Wright J, Garnham J, Dabies GR, Dodgson J, Schneide JE, Murray AJ, Church C, Vidal-Puig A, Witte KK, Griffein JL, Roberts LD. 2021. Brown and beige adipose tissue regulate systemic metabolism through a metabolite interorgan signaling axis. *Nat Commun.* **12**: 1905.
275. William FG, 星 猛, 河原 克雅, 熊田 衛, 岡田 泰伸, 菅野 富夫. 2000. 医科生理学展望 19 版. 丸善株式会社.
276. Yahiro T, Kataoka N, Nakamura Y, Nakamura K. 2017. The lateral parabrachial nucleus, but not the thalamus, mediates thermosensory pathways for behavioural thermoregulation. *Sci Rep* **7**: 5031.
277. Yamamoto S, Asai Y, Kusunose R. 1993. Effects of sex, birth month, parity, weight of dam and farm on the growth of Thoroughbred foals and yearlings. *Anim Sci J* **64**: 491-498.
278. Yamanobe A, Ishimaru M, Korosue K, Sakamoto K. Japanese Society of

- Equine Science. 2013. In: The Racehorse Handbook. 299-301. Maruzen Publishing Co. Ltd, Tokyo.
- 279.Yasuo S, Togo Y, Otsuka T, Goto M, Furuse M. 2011. Molecular neuroendocrinology of photoperiodism and seasonal nutrition system. 栄養生理研究会報. **55**: 87-94.
- 280.Yoneshiro T, Kajimura S. 2017. Brown and beige adipocyte homeostasis: From mechanisms to clinical relevance. 生化学. **89**: 917-920.
- 281.Yoshida K, Ueda Y, Masumitsu H. 1982. Radiographical studies on ossification in the Thoroughbred 2. Closure process in the distal epiphyseal lines of the radius and 3rd metacarpal bone and the proximal epiphyseal line of the proximal phalanx, and an assessment system of bone maturity. *Bull Equine Res Inst* **19**:18-29.
- 282.Younes M, Robert C, Barrey E, Cottin F. 2016. Effects of age, exercise duration, and test conditions on heart rate variability in young endurance horses. *Front Physiol* **7**: 155. 1-11.

Studies on rearing racehorses under different climatic conditions in Japan

Mutsuki Ishimaru

Laboratory of Animal Health, Department of Animal Health
Faculty of Veterinary Medicine, Rakuno Gakuen University

The purpose of this study was to endocrinologically elucidate changes in body composition, growth, and gonadal functions of young Thoroughbreds from birth to pre-training stage, and to develop climate-matched rearing and pre-training methods with scientific basis in Hidaka, Hokkaido, Japan during extremely cold in winter.

In Chapter I, development of the growth and endocrine function of horses with different birth month groups were compared during the foal stage. A comparison of average daily gain (ADG) over time revealed that ADG of "early-birth" foals were generally lower than "late-birth" foals up to 8 weeks of age. However, ADG in the foal stage was found to be relatively high from May to July, which is long-day period, regardless of the month of birth. Furthermore, circulating luteinizing hormone (LH), follicle-stimulating hormone (FSH), and prolactin were also found to be high during the long-day period, regardless of the month of birth, indicating that Thoroughbred foals have been shown to have activated endocrine function in the hypothalamus-pituitary system immediately after birth in response to prolonged day-length. On the other hand, blood levels of cortisol and thyroid hormone (thyroxine), which are involved in metabolism, were high immediately after birth regardless of the month of birth, indicating that the adrenal and thyroid glands are fully functional in response to cold stress even if the foal is born early in the cold January-March period.

In Chapter II, effects of rearing methods on growth and endocrine function in Thoroughbreds during the weanling and yearling stage in the severe cold season were investigated. Two types of rearing groups, "day-night group" that 22 hours outside in the paddock and "day-W group" that combined 7 hours outside in the paddock with 1 hour of walking machine (WM) exercise were compared during the severe cold season in the Hidaka region of Hokkaido, Japan. The "day-W group" was found to be able to

travel approximately the same distance as "day-night group". Compared to the "day-W group", the "day-night group" exhibited a predominance of parasympathetic nervous system activity by the heart rate variability analysis, including a decrease in body temperature and heart rate to adapt to the harsh cold environment, and a biological response that suppresses metabolism. On the other hand, the "day-W group" showed increased secretion of prolactin and insulin-like growth factor (IGF-I), as well as increased cortisol and thyroxine secretion. This suggested that metabolism and growth were less inhibited than in the "day-night group", and it was inferred that combining WM with 7 hours outside in the paddock would be an effective way to manage the winter season in Hokkaido.

In Chapter III, the effects of different winter climates in Japan on body composition, growth, and endocrine function of young Thoroughbreds in training were investigated. Thoroughbred colts and fillies were raised and trained for 7 months from October at the 1 year of age to April at the 2 years of age at the Hidaka Training and Research Center, Hokkaido, which is extremely cold in winter, and at the Miyazaki Yearling Training Farm, Kyushu, which is mildly cold in winter. In a comparison of the rate of increase in fat-free mass (FFM) in the colts, Miyazaki trained-horses had higher values than Hidaka-trained horses, suggesting that Miyazaki climate may have been able to provide effective training during the winter months. Miyazaki-trained horses had higher percentages of increase in body weight, height, chest and cannon circumference for both sexes compared to Hidaka-trained horses. In a comparison of reproductive hormone secretion, Miyazaki-trained horses showed an earlier increase in circulating testosterone and estradiol-17 β secreted from the gonads in both sexes compared to Hidaka-trained horses. Furthermore, experimental emotional and exercise stress tests on adult Thoroughbreds revealed that exercise stimulates the secretion of growth hormone and prolactin. Thus, the importance of exercise for proper development during the rearing and pre-training stage was suggested.

In Chapter IV, the effects of an extended photoperiod (EP) treatment (14.5 hour light, 9.5 hour dark) during the pre-training stage on body composition, growth, endocrine, gonadal activation, and hair coat conditions of Thoroughbreds were examined in both

Hidaka and Miyazaki. Application of the EP treatment to the colts and fillies in Hidaka was shown to increase in FFM, promote growth and gonadal function in both sexes. Therefore, the results suggest that the application of EP treatment can provide effective training results while promoting growth during the winter months for Thoroughbreds in Hokkaido. On the other hand, application of EP treatment to Miyazaki-trained horses showed that the method was effective in promoting growth and gonadal activation in fillies, but the effect was not clear in colts. The reason for this was presumably due to the fact that the Miyazaki-trained horses already had their gonadal activation and growth have been accelerated under natural light condition. It was also found that EP treatment resulted in earlier prolactin secretion and accelerated winter shedding in both the Hidaka and Miyazaki-trained horses.

In conclusion, the present study based on changes in endocrine function revealed that the characteristics of growth and gonadal function development of Thoroughbred reared and pre-trained in Hokkaido, Japan in winter were clarified. The present study also presented new rearing methods of Thoroughbreds for the cold season in Hokkaido, such as WM exercise for weanling to yearling stage and EP treatment for pre-training stage.