

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 15 日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26450433

研究課題名(和文)母性因子による仔イヌのストレス応答性発達メカニズムの解明

研究課題名(英文)The influence of maternal factors on the development of stress reactivity in dogs.

研究代表者

永澤 美保 (Nagasawa, Miho)

自治医科大学・医学部・ポスト・ドクター

研究者番号：70533082

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではイヌの幼少期環境が成長後のストレス応答性及び行動特性に与える影響を調べた。日本盲導犬協会で出産した母子を対象とし、出産前後の母イヌの尿中コルチゾールおよび養育行動を測定し、母性因子の定量化を行った。仔イヌは軽い分離ストレスを時の尿中コルチゾール値を測定し、ストレス応答の指標とした。仔イヌがパピーウォーカーを経て、訓練所に入所した際の尿中コルチゾールを測定し、新奇環境ストレスの指標とした。また訓練士による気質評価を行った。その結果、母イヌの養育行動は幼少時のストレス応答を解して、成長後の新奇環境への適応力に影響を及ぼし、訓練性や優位性など、成長後の気質にも関連することを見出した。

研究成果の概要(英文)：We investigated the influence of maternal factors on stress reactivity and behavioral characteristics after growth in dogs. Mother dogs and their puppies who gave birth at the Japan Guide Dog Association were subjected. Urinary cortisol and maternal behavior of mother dogs were measured in order to quantify the maternal factors. Puppies' urinary cortisol levels were measured under mild isolation stress as an index of stress reactivity. Urinary cortisol was also measured when puppies entered the training center after coming back from puppy raisers, which was used as an index of stress reactivity to novel environment. We also conducted dog's behavior and temperament assessment by trainers. As the results, we found that the maternal behavior from the mother dogs affected the puppies' adaptability to the novel environment after growing up via the stress reactivity at the developmental periods, and also related to the temperament such as training ability and superiority after growth.

研究分野：動物行動学

キーワード：イヌ 発達 ストレス応答 母性因子 コルチゾール

### 1. 研究開始当初の背景

霊長類やげっ歯類など多くの哺乳類において母親の存在や幼少期環境がストレス応答性の発達と成長後の行動に影響を及ぼすことはよく知られており、イヌにおいても同様のメカニズムが存在することが考えられる。このことから、発達期から成長後まで、イヌのストレス応答性の発達を明らかにすることは、イヌが人間社会へより順応し、共存関係を構築していくために重要といえる。これまで私たちは、イヌの内分泌的ストレス応答が生後5週齢から発達することを明らかにしてきた。しかし、発達期のストレス応答性と成長後のストレス応答性との間、あるいは行動特性との間に関連があるかどうかは明らかになっていない。また、母イヌが仔のストレス応答性の発達に及ぼす影響も不明である。ストレス応答性に影響を及ぼす因子を明らかにすることはイヌの生育環境の改善や成長後の問題行動が原因の遺棄・殺処分減少のみならず、飼い主のQOLの工場にもつながると考えられる。

### 2. 研究の目的

本研究では母子間行動と発達後の行動内分泌学的特徴の関連性を明らかにすることを目的とし、以下2点を調査した。ストレス応答性及び行動特性について発達期と成長後の関連性を調査した。発達期の尿中コルチゾール値と行動、成長後の尿中コルチゾール値と行動の計4つの指標を用い、それぞれの相関解析を行った。母イヌが及ぼす仔のストレス応答性及び行動特性への影響を調査した。発達期の母性行動と母イヌの出産前後の尿中コルチゾール値の関連性を調べ、さらに発達期の母性行動及び母イヌの出産前後の尿中コルチゾール値と成長後の行動との関連性を調査した。

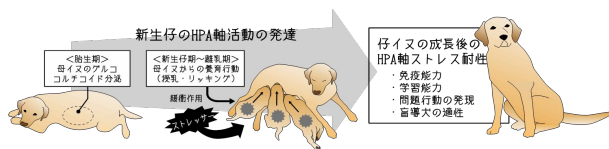


図1 幼少期環境が成長後の気質に与える影響の概念図

### 3. 研究の方法

本研究は2009年に開始し、(公財)日本盲導犬協会の協力のもと、400頭近い仔イヌへ実験を行った。最終的な解析には2010年から2015年に日本盲導犬協会富士ハーネスで生まれ、産子数が5~9頭であった母イヌの仔、144頭を用いた。

実験1では、母性行動との関連性を調査するため、母イヌの養育行動の様子をビデオ録画し、解析を行った。解析項目は、接触(過半数以上の仔が母イヌに接触)、授乳、舐め(母イヌが仔を舐める)、授乳&舐め(授乳しながら仔を舐める)をそれぞれ示した時間を測定した。生後1,2,4,6日目の解析結果の平均値を

1週目の母性行動とし、7日目以降は1週間置きに、仔が5週齢になるまで解析を行った。また、出産予定日3週前から出産の6週間まで毎週採尿し尿中コルチゾールを測定し、ストレスの指標とした。

実験2では、仔イヌの内分泌発達を調査するため、ストレス内分泌応答性が発達し始める5週齢時、または発達した後の7週齢時に、5分間クレートの中に1頭で過ごす分離実験を行った。分離前後の尿中コルチゾール値をRIA法により測定し、各個体における発達期の内分泌的ストレス応答性の指標とした。また、分離中のクンクンと鼻を鳴らすように鳴く「whining」とギャンギャンと吠える「yelping」を示した時間を測定し、行動的ストレス応答性の指標とした。

実験3では、自律歩行が可能になる4週齢以降毎週、母イヌ不在時にイヌ用玩具を用いて同胎の仔イヌ同士の遊び行動中の他個体と遊ぶ、同調する、接する等の親和的行動と他個体への攻撃、玩具への専有性等を観察。仔イヌの親和性の指標とした。

実験4では、仔イヌの成長後のストレス応答性の定量化を行った。これらの仔イヌは8週齢から1歳齢まで一般家庭で過ごした後、盲導犬訓練施設へ入所した。成長後の内分泌的ストレス応答性の指標は、一般家庭から訓練施設へと飼育環境が変化し、新奇環境ストレスを受けると考えられる入所後2週間の尿中コルチゾール値とした。入所後の尿中コルチゾール値は因子分析することで、入所後3,4,5日目と8,9,12,13日目の2因子に分けることができた。このことから、それぞれの因子の平均尿中コルチゾール値を「前半値」「後半値」とし、さらに「順応率」(前半値-後半値)/前半値)を求めた。成長後の行動特性の指標には、盲導犬訓練中の稟性評価を用いた。18項目で構成されていた稟性評価は、因子分析により「感受性」「警戒性」「訓練性」「優位性」の4因子に分けられ、解析には因子スコアを用いた。

実験1~4で得られたデータを用いて、相関解析および共分散構造分析を用いて、幼少期環境が成長後のストレス応答性や気質に与える影響を調べた。

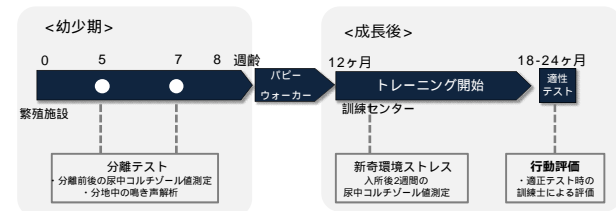


図2 研究の全体像

### 4. 研究成果

実験で得られた発達期のストレス応答性、成長後のストレス応答性、成長後の行動特性における全ての指標、および体重データについて相関解析を行った。その結果、発達期に関しては、7週齢における分離実験時の尿中コ

ルチゾール値と yelping に正の相関が見られた。成長後に関しては入所後尿中コルチゾール値と警戒性、優位性に正の相関、訓練性と負の相関が見られた。また、5 週齢・7 週齢における尿中コルチゾール値と成長後における尿中コルチゾール値に正の相関、7 週齢時の yelping と警戒性に正の相関、5 週齢・7 週齢における尿中コルチゾール値と警戒性に負の相関が見られた。さらに、生後 1 日~7 週齢までの体重は、それぞれいくつかの項目と相関関係を示したが、相関係数が 0.4 以上であった項目は 5 週齢時の尿中コルチゾール値との正の相関、5 週齢時の whining との負の相関、yelping との正の相関のみであった。この解析から、発達期と成長後のストレス応答性及び成長後のストレス応答性には関連性が存在することが明らかになった。また、体重との相関も見られ、体成長と内分泌応答さらには行動の発達が関連することが示された。

これらの結果をもとに、次に、成長後の内分泌的ストレス応答性と成長後の行動特性が母性行動、体重、7 週齢時のストレス応答性の影響をどの程度受けているか、その因果関係について調べた。因子分析を行った後に、得られた因子スコアを用いて、共分散構造分析を行った。その結果、1 週目の母性行動が 7 週齢のコルチゾール値に正の影響を及ぼすこと、7 週齢のコルチゾール値が成長後のコルチゾール値に正の影響を及ぼすこと、4 週目の母性行動が訓練性を正の影響を及ぼすことが明らかとなった。

また、1 週目の母性行動は 7 週齢までの体重、7 週齢時のコルチゾール値を介して成長後尿中コルチゾール値および優位性に影響を及ぼすことが示された(図 3)。また、4 週目の母性行動は成長後の訓練性に直接影響した(図 4)。上記の幼少期要因によって成長後の新奇環境下のコルチゾール値の 77%、行動特性因子の訓練性を 43%、優位性を 44% 説明することができた。

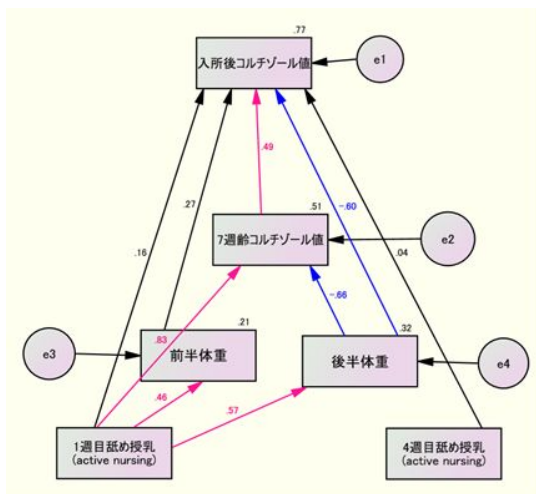


図 3 幼少期環境が成長後の新奇環境下でのストレス応答に与える影響

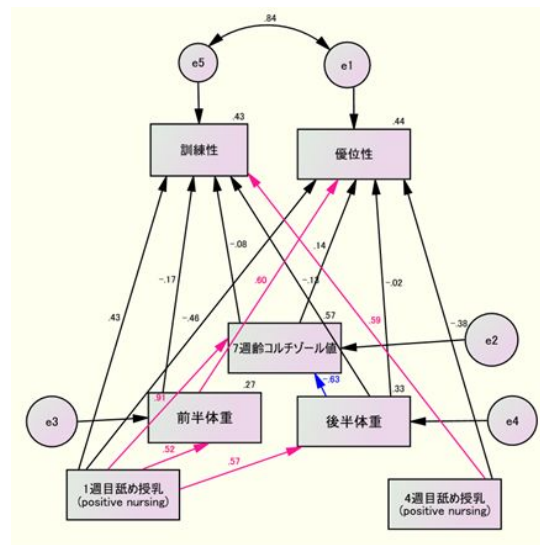


図 4 幼少期環境が成長後の行動特性に与える影響

以上のことから、1 週目の母性行動の影響を受け、7 週齢時のストレス応答性が形成され、それは成長後も一貫した傾向を維持すること。さらに 4 週目の母性行動が成長後の訓練性を規定することが明らかになった。本研究で得られた結果より、母性行動を始めとする発達期に形成されたストレス応答性が、成長後のストレス応答性と行動特性を一部予測できることが示された。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 18 件)

- Okabe S, Tsuneoka Y, Takahashi A, Oyama R, Watarai A, Maeda S, Honda Y, Nagasawa M, Mogi K, Nishimori K, Kuroda M, Koide T, Kikusui T. Pup exposure facilitates retrieving behavior via the oxytocin neural system in female mice. *Psychoneuroendocrinology* (2017) 79: 20-30
- Mogi K, Takakuda A, Tsukamoto C, Oyama R, Okabe S, Koshida N, Nagasawa M, Kikusui T. Mutual mother-infant recognition in mice: the role of pup ultrasonic vocalizations. *Behavioral Brain Research* (2017) 325:138-146
- Kikusui T, Ishio Y, Nagasawa M, Mogil J, Mogi K. Early weaning impairs a social contagion of pain-related stretching behavior in mice. *Developmental Psychobiology* (2016.12) 58(8): 1101-1107.
- Katayama M, Kubo T, Mogi K, Ikeda K, Nagasawa M, Kikusui T. Heart rate variability predicts the emotional state in dogs. *Behavioral Processes*, (2016.7) 128: 108-112.
- Mogi K, Ishida Y, Nagasawa M, Kikusui T. Early weaning impairs fear extinction and decreases brain-derived neurotrophic factor expression in the prefrontal cortex of adult male C57BL/6 mice. *Developmental Psychobiology* (2016.12) 58(8): 1101-1107.

6. Ohkita M, Nagasawa M, Mogi K, Kikusui T. Owners' direct gazes increase dogs' attention-getting behaviors. *Behavioral Processes*. (2016.4) 125: 96-100
7. Yamaguchi H, Wada K, Nagasawa M, Kikusui T, Sakai H, Mizobuchi M, Yoshimoto S, Nakao H. Very Low Birth Weight Monochorionic Diamniotic Twins as a Risk Factor for Symptomatic Patent Ductus Arteriosus. *Neonatology* (2016.3) 109(3): 228-234
8. Nagasawa M, Mogi K, Serpell J, Kikusui T. Comparison of behavioral characteristics of dogs in the United States and Japan. *J Vet Med Sci*, (2016)78(2): 231-238.
9. Tonoike A, Nagasawa M, Mogi K, Serpell J, Ohtsuki H, Kikusui T. Comparison of owner-reported behavioral characteristics among genetically clustered breeds of dog (*Canis familiaris*). *Scientific Reports* (2015)5: 17710
10. Tonoike A, Hori Y, Inoue-Murayama M, Konno A, Fujita K, Miyado M, Fukami M, Nagasawa M, Mogi K, Kikusui T. Copy number variations in the amylase gene in Japanese native dog breeds. *Anim Genet*. (2015.10) 46(5):580-583.
11. Nagasawa M, Mitsui S, En S, Ohtani N, Ohta M, Sakuma Y, Onaka T, Mogi K, \*Kikusui T. Oxytocin-gaze positive loop and the coevolution of human-dog bonds. *Science* (2015.4) 348 (6232): 333-336.
12. Romero T, Nagasawa M, Mogi K, Hasegawa T, Kikusui T. Intranasal administration of oxytocin promotes social play in domestic dogs. *Communicative & Integrative Biology* (2015) 8 (3): e1017157.
13. Tonoike A, Terauchi G, Inoue-Murayama M, Nagasawa M, Mogi K, Kikusui T. The Frequency Variations of the Oxytocin Receptor Gene Polymorphisms among Dog Breeds. *麻布大学雑誌* (in press)
14. Mogi K, Takanashi H, Nagasawa M, Kikusui T. Sex differences in spatiotemporal expression of AR, ER $\alpha$ , and ER $\beta$  mRNA in the perinatal mouse brain. *Neurosci Lett*. (2015.1) 584: 88-92.
15. Hattori T, Kanno K, Nagasawa M, Nishimori K, Mogi K, Kikusui T. Impairment of interstrain social recognition during territorial aggressive behavior in oxytocinreceptor-null mice. *Neurosci Res*. (2015.1) 90: 90-4.
16. Saito A, Hamada H, Kikusui T, Mogi K, Nagasawa M, Mitsui S, Higuchi T, Hasegawa T, Hiraki K. Urinary oxytocin positively correlates with performance in facial visual search in unmarried males, without specific reaction to infant face. *Frontiers in Neuroscience* (2014.7) 29: 217.
17. Romero T, Nagasawa M, Mogi K, Hasegawa T, Kikusui T. Oxytocin promotes social bonding in dogs. *Proc Natl Acad Sci U S A*. (2014.6) 111(25): 9085-9090.
18. Mogi K, Oyama R, Nagasawa M, Kikusui T. Effects of neonatal oxytocin manipulation on development of social behaviors in mice. *Physiol Behav*. (2014.6) 133: 68-75.

〔学会発表〕(計 6件)

1. 永澤美保 ヒトとイヌとの絆形成におけるイヌの視線利用と関連遺伝子探索について」日本動物学会沖縄大会 ニューロエソロジー-談話会 シンポジウム-脊椎動物と無脊椎動物の社会基盤の比較 2016.11.17(沖縄コンベンションセンター、沖縄県宜野湾市)
2. Nagasawa M, Mogi K, Kikusui T. Majority synching bias toward humans in dogs. The 75th JSAP Annual Meeting 2015.9.11 (Japan Women's University, Bunkyo, Tokyo)
3. 永澤美保 ヒトとイヌとの絆形成におけるイヌの視線利用について。日本心理学会第79回大会 公募シンポジウム「異種間で伝達される社会的シグナルの探求—種を超えて結ばれる絆の形成メカニズムの解明に向けて—」,愛知, 2015年9月。
4. 永澤美保 収斂進化がもたらしたヒト-イヌ間の絆形成とオキシトシンの役割 包括脳冬のシンポジウム「共感性」「自己制御精神」領域合同若手育成シンポジウム(招待講演) 2014.12.13(東京医科歯科大学、東京都)
5. 柴田 曜、永澤美保、茂木一孝、菊水健史 イヌにおけるストレス内分泌の発達特性と行動との関連 第157回日本獣医学会学術集会 2014.9.8-12(北海道大学、北海道札幌市)
6. Nagasawa M, Shibata Y, Yonezawa A, Morita T, Kanai M, Mogi K, Kikusui T. The development of endocrine stress response in early socialization period is associated with that in adulthood in dogs. 日本動物心理学会第74回大会 2014.7.19-21(犬山国際観光センターフロイデ、愛知県犬山市)

〔図書〕(計 1件)

1. 菊水 健史,永澤美保,外池 亜紀子,黒井 眞器:日本の犬-人とともに生きる.東京大学出版会,2015年12月

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

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

取得状況(計 0件)

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

〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

永澤 美保 (NAGASAWA, Miho)  
自治医科大学・医学部・ポスト・ドクター  
研究者番号：70533082

(2) 研究協力者

柴田 曜 (SHIBATA, You)  
麻布大学・獣医学部