

機関番号：32701

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2009～2010

課題番号：21880046

研究課題名（和文） 母性因子による仔イヌの神経内分泌学的発達メカニズムの解明

研究課題名（英文） The developmental characteristics of neuroendocrine response to stress in dogs

研究代表者

永澤 美保 (NAGASAWA MIHO)

麻布大学・獣医学部・特任助教

研究者番号：70533082

研究成果の概要（和文）：

新奇環境・刺激へのストレス適応能力は、胎生期の母親からの影響や新生仔期の授乳を含めた母親の養育行動の良し悪しと関連することが、マウスやラットなどの動物実験によって明らかにされてきた。一方、イヌにおいても母仔分離時期などがその後のイヌの問題行動の発現と関連していることがアンケート調査などによって示唆されているものの、その背景となる神経内分泌学的機序は明らかにされていない。そこで本研究では、イヌの発達段階に伴う母仔の行動・神経内分泌変化を評価し、胎生期を含んだ母仔関係と成犬時の新奇刺激及び環境への適応性の関係を明らかにすることを目的とした。イヌの母性因子の定量化を目的とした実験1より、母イヌの養育行動に費やす時間の推移が個体によって異なることが明らかとなり、イヌの内分泌発達の過程を調査した実験2の結果から、仔イヌのストレス不応期は4週齢前後であること、7週齢までにはHPA軸がほぼ成熟することがほぼ特定された。さらに、離乳期におけるストレス応答性と成長後の応答性には関連がみられ、いくつかのパターンに分類することができ、胎によって傾向が異なる可能性も示唆された。また、実験1、2より、母犬の授乳及び舐め行動の持続時間と子犬のストレス応答性の間に何らかの関連がみられることが示唆された。以上のことから、イヌにおいてもげっ歯類と同様に具体的な母犬の養育行動の質がその後の気質の形成に影響をあたえることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Dogs' adaptability to stress is an important factor for socialization to human society. However, the developmental characteristics of neuroendocrine responses to stress have not been fully clarified in dogs. In the present study, we investigated dogs' neuroendocrine responses to stress in both socialization and peripubertal periods, and conducted a correlation analysis of them between the two periods. Subjects were Labrador Retrievers in the Japan guide dog center. At first, we applied a brief stress to pups at 4, 5, 6 or 7 weeks after birth by 5-min maternal separation and evaluated the stress response by an elevation of urinary cortisol levels. The pups were then raised by puppy raisers until the age of 1 year. The adaptability to stress in the peripubertal period was then assessed by urinary cortisol levels during 2 weeks after transfer into the training center from the puppy raisers' houses. As results, urinary cortisol levels were not increased by maternal separation in almost all pups at 4 weeks of age. Thereafter, significant stress responses were observed with individual variation. Interestingly, littermates showed the same tendency of urinary cortisol dynamics against stress in their peripubertal period. Further, we found a significant negative correlation of stress responses between socialization and peripubertal periods; when the stress response following maternal separation was high at 7 weeks of age, the increased urinary cortisol levels after transfer to the training center tended to decrease quickly. These findings suggest that the stress hyporesponsive period terminated at around 4 weeks of age in dogs, and the adaptability to stress in peripubertal period

was influenced by the maternal environment and partly programmed until 7 weeks of age. The ability to predict the dog's adaptability to stress at an early age would be of great value in planning future training programs or selecting candidates as working dogs.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,110,000	333,000	1,443,000
2010年度	1,010,000	303,000	1,313,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,120,000	636,000	2,756,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学、基礎獣医学・基礎畜産

キーワード：イヌ、母子関係、発達、ストレス応答、コルチゾール

### 1. 研究開始当初の背景

仔の生育の過程において、母子間を中心とした社会環境は非常に重要であり、不適切な環境は成長抑制や免疫機能低下などの生理学的変化に加え、過剰な情動反応や社会性の低下など、子の成長後にまで永続的な影響を及ぼす。このような生育環境の中で、母性因子の意義が特に大きいことがマウスやラット、アカゲザルなどの動物実験で明らかにされている。

母性因子が仔に与える影響は大きく胎生期と授乳期の2つに分けられる。胎生期における母への過剰なストレスは、仔の成長後の情動ストレス反応性や社会性を不適切化させ、さらに不安傾向やうつ様症状を示すことが認められている。この現象はヒトの臨床でも確認されており、妊娠中の母親が近親者の死亡などの精神的ストレスを経験することによって子の精神疾患罹患のリスクが高まる(Khashan et al., 2008)。授乳期の母子関係の粗悪化も仔の成長後の不安や攻撃行動を発現させることが明らかとなっている。例えば、マウスやラットの仔を通常よりも早く離乳させることによって、成長後の不安行動の上昇、ストレス反応性の亢進、攻撃性の上昇が認められている(Kikusui et al., 2004)。同様に、マウスやラットでは、授乳期に受ける母親からのグルーミングの頻度が低下することで、成長後の不安傾向や攻撃性が上昇し(Caldji et al., 1998)、また仔ラットの学習認知機能も低下する(Liu et al., 2000)。さらに、里子実験によって、このような母子間の良好と成長後の行動の関係は、遺伝的伝播によるものではないことも示されている(Francis et al., 1999)。生育環境の粗悪化に

よる影響はイヌにおいても報告されており、社会化期に他のイヌやヒトとの接触がほとんどない環境で育てられた仔イヌは、成長後に他のイヌやヒトに対して社会的恐怖行動を示し、その行動の改善が困難であることが示されている(Scott & Fuller, 1974)。また、大規模なアンケート調査により6週齢までに母仔分離したイヌの問題行動発生率が高いことも示されつつある(Serpell, 私信)。このような行動様式の変容の神経内分泌学的メカニズムは動物実験において明らかにされつつある。ストレス下にある妊娠中のメス動物は高いグルココルチコイド(GC)値を示す。母へGCを投与することで仔の成長後の不適切な行動様式が再現され、また阻害薬の投与によって改善が認められる(Kofman, 2002)。早期離乳マウスでは、通常離乳された個体と比べて離乳後のGC分泌が長期的に上昇し、並行して海馬におけるGC受容体の発現が減少することも報告されている(Kikusui et al., 2006)。さらにこの離乳後のGCを人為的に低下させることで、成長後の不安行動が改善された。興味深いことに早期離乳されたマウスやグルーミングをあまり受けなかった仔マウスのGC受容体のメチル化が変化することも見出されてきた。このことから、中枢神経系のストレス情動制御機構である視床下部・下垂体-副腎軸(HPA軸)の発達は、様々な母性因子によるエピジェネティックな制御メカニズムを介してプログラミングされ、永続的な変化が形成されることが示されつつある。これらのメカニズムを解明することは繁殖・育成環境が人為的に管理される伴侶動物や家畜における、ストレス応答や情動行動における障害を大きく改善

することが期待できよう。

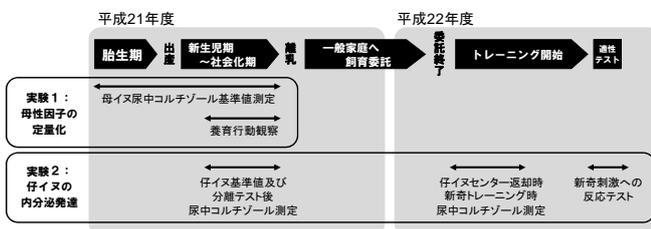
申請者はこれまでヒトとイヌの関係、特に社会刺激と神経内分泌応答の生物学的意義の解明に向けて研究を遂行してきた。その間に延べ300頭以上の一般家庭犬を対象に行動及び気質調査を行った結果、イヌの行動や気質の要因が犬種差だけではなく、母仔分離時期などの初期飼育環境の影響を強く受けている可能性が示唆された。上記に示した神経内分泌メカニズムはイヌにおいても存在し、胎生期から授乳期における母性因子がGC分泌を介して中枢の発達に変化をもたらすと考えられる。そこで申請者は、粗悪な母仔間環境によって発達期における仔イヌのGCの過剰な分泌が起こり、その結果として仔イヌの成長後の不適切な行動が発現すると仮説を立てた。

## 2. 研究の目的

本研究では、母イヌの内分泌状態の把握、養育行動などの母性因子の定量的評価、それと並行した成長過程における仔イヌのストレス応答性を行動学及び内分泌学的に長期追跡調査を行い、胎生期を含んだ母仔関係と仔の成犬時の新奇刺激及び環境への適応性の関係を明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

日本盲導犬協会の協力を得て、協会施設にて出産した母仔の行動及び内分泌の変化・発達を経時的に追った。実験1では、母性因子としてのGCと母性行動の評価を目的とし、妊娠中の母イヌの尿中コルチゾール濃度を測定し、出産後は養育行動の定量的測定を行った。実験2では、仔のHPA軸の発達変化の追跡を目的に、分離ストレス及び新奇刺激暴露時の尿中コルチゾールを用いて仔イヌのストレス内分泌応答の発達過程を調べた。これらのデータをもとにHPA軸活性の発達を介した母性因子と仔イヌの成長後ストレス応答性との関連を検証した。



### <平成21年度>

実験1：胎生期の母イヌのGC分泌状態を調査するために、出産予定日の3週間前にボランティア宅から日本盲導犬協会繁殖施設へ移動した母イヌの採尿を移動直後から離乳まで定期的に実施、尿中コルチゾール濃度を測定した。出産後は週齢毎に24時間の母仔間行動の観察を行い、母イヌの養育行動及

び仔イヌの愛着行動を定量化した。

実験2：仔イヌのストレス応答性を測定するために、4週齢以降の個体に対して5分間の分離テストを実施する。分離中の仔イヌの行動観察と分離前後の尿中コルチゾール濃度測定を行い、発達に伴う分離ストレスに対する反応の変化を調査した。なお、分離テストは繰り返しによる慣れの影響を避けるために、1頭につき4～6週齢時の内の1回と7週齢時(全頭共通)の合計2回のみ実施した(仔イヌは8週齢時前後にパピーウォーカーの各家庭に委託される)。

### <平成22年度>

実験1：前年度と同様に22年度出産の母仔の調査を引き続き行い、母性因子が仔イヌの行動内分泌的機能の発達に与える影響を調べた。

実験2：平成21年度に母仔間行動観察及び分離テストを実施した仔イヌを対象に、パピーウォーカーへの委託終了により日本盲導犬協会の施設に返却された日(約1歳齢)から3日間の採尿を行い、新奇環境のストレスへの応答性を尿中コルチゾールを用いて評価した。さらに、盲導犬の導入訓練開始時や盲導犬としての適性を評価するための稟性テスト時の新奇刺激に対する行動評価を行った。

## 4. 研究成果

(平成21年度)申請時の計画通り、イヌの母性因子の定量化を目的とした実験1においては妊娠期から離乳までの母イヌの採尿、および出産直後からの養育行動の記録を実施した。出産後から1週間毎の記録では、母イヌの養育行動に費やす時間の推移が個体によって異なることがわかってきた。一方、仔イヌの内分泌発達の過程を調査する実験2では118頭の離乳期における分離テストおよび尿中コルチゾールの測定が終了し、20年度にすでに分離テストを行っていた仔イヌ達の成長後の新奇刺激暴露時の尿中コルチゾールの測定も実施した。その結果、現在のところ、仔イヌのストレス不応期は4週齢前後であること、7週齢までにはHPA軸がほぼ成熟すること、成長後のストレス応答性は胎によって傾向がみられることが示された。

平成21年度の成果から、マウスやラットなど実験動物において示されているストレス不応期がイヌにも存在することが示され、さらにHPA軸成熟の時期がほぼ特定された。これによって従来行動でのみ評価されてきた仔イヌの発達の内分泌学的側面からの裏付けができたと考えられる。さらに実験を継続し、母性因子とストレス応答性との関連を見出すことによって、いままであまり配慮され

てこなかったイヌの初期生育環境の重要性を示すことが可能となることは、イヌの福祉向上においても極めて大きな成果であるといえる。

(平成22年度)イヌの母性因子の定量化を目的とした実験1においては妊娠期から離乳までの母イヌの採尿、および出産直後からの養育行動の記録を実施した。出産後から一週間毎の記録では、母イヌの養育行動に費やす時間の推移が個体によって異なることが明らかとなり、また授乳及び舐め行動の持続時間と子犬のストレス応答性の間に何らかの関連がみられることが示唆された。一方、仔イヌの内分分泌達の過程を調査する実験2では合計で180頭の離乳期における分離テストおよび尿中コルチゾールの測定が終了し、そのうち合計で120頭の仔犬の成長後の新奇環境暴露時の尿中コルチゾールを測定した。その結果、離乳期におけるストレス応答性と成長後の応答性には関連がみられ4パターンに分類することができ、さらに胎によって傾向が異なる可能性も示唆された。実験1の母犬の母性行動と幼少期のストレス応答性との関連とあわせると、イヌにおいてもげっ歯類と同様に具体的な母犬の養育行動の質がその後の気質の形成に影響をあたえることが示唆された。

以上より、本研究においてイヌのストレス不応期の存在及びHPA軸成熟の時期がほぼ特定された。さらに母犬の養育行動における個体差と、それが仔のストレス応答性と関連していることが示唆された。母性因子とストレス応答性との関連を見出すことによって、いままであまり配慮されてこなかったイヌの初期生育環境の重要性を示すことができ、イヌの福祉向上においても極めて大きな成果であるといえる。



## 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9件)

- ① 茂木一孝, 永澤美保, 菊水健史, イヌの社会性解明へ向けた発達行動学的アプローチ, 動物心理学研究, 査読有, 59巻, 2009, 25-36.
- ② Nagasawa, M., Mogi, K., Kikusui, T. Attachment between humans and

dogs, Japanese Psychological Research, 査読有, 51, 2009, 209-221.

- ③ Nagasawa, M., Kikusui, T., Onaka, T., Ohta, M., Dog's Gaze at its Owner Increases Owner's Urinary Oxytocin During Social Interaction, Hormones and behavior, 査読有, 55, 2009, 434-441.
- ④ Nagasawa, M., Ohta, M., The influence of dog ownership in childhood on the sociality of elderly Japanese men, Japanese Society of Animal Science, 査読有, 81, 2010, 377-38.
- ⑤ Okabe, S., Nagasawa, M., Kihara, T., Kato, M., Harada, T., Koshida, N., Mogi, K., Kikusui, T., The Effects of Social Experience and Gonadal Hormones on Retrieving Behavior of Mice and their Responses to Pup Ultrasonic Vocalizations, Zool Sci., 査読有, 27, 2010, 790-795.
- ⑥ Kikusui, T., Nakanishi, K., Nakagawa, R., Nagasawa, M., Mogi, K., Okanoya, K., Cross fostering experiments suggest that mice songs are innate, PLoS ONE, 査読有, 6, 2011, e17721.
- ⑦ Nagasawa, M., Tsujimura, A., Tateishi, K., Mogi, K., Ohta, M., Serpell, J.A., Kikusui, T., Assessment of the factorial structures of the C-BARQ in Japan, JVMS, 査読有, in press.
- ⑧ Nagasawa, M., Murai, K., Mogi, K., Kikusui, T., Dogs can discriminate human smiling faces from blank expressions, Anim. Cogn., 査読有, in press.
- ⑨ Mogi, K., Nagasawa, M., Kikusui, T. Developmental Consequences and Biological Significance of Mother-infant Bonding. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psych., 査読有, 35, 2011, 1232-1241.

[学会発表] (計1件)

- ① Mogi, K., Nagasawa, M., Kikusui, T., The developmental characteristics of neuroendocrine response to stress in dogs, 2010, Canine Science Forum.

[図書] (計1件)

- ① Nagasawa, M., Mogi, K., Kikusui, T., Chapter3: Importance of the developmental-behavioral approach to clarify the mechanism underlying sociality in dogs. In Neuroendocrinology Research

〔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 (MIHO NAGASAWA)

研究者番号：70533082

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：

