

フェロモンを介した情動伝達機構に関する研究

平成14年度入学

東京大学大学院農学生命科学科
獣医学専攻 博士課程

清川 泰志

基礎となる学術論文

- (1) Kiyokawa, Y., Kikusui, T., Takeuchi, Y. and Mori, Y. (2004)
Modulatory role of testosterone in alarm pheromone release by male rats.
Hormones and Behavior, 45, 122-127

- (2) Kiyokawa, Y., Kikusui, T., Takeuchi, Y. and Mori, Y. (2004)
Alarm pheromones with different functions are released from different regions
of the body surface of male rats.
Chemical Senses, 29, 35-40

- (3) Kiyokawa, Y., Kikusui, T., Takeuchi, Y. and Mori, Y. (2005)
Mapping the neural circuit activated by alarm pheromone perception by c-Fos
immunohistochemistry.
Brain Research, 1043, 145-154

- (4) Kiyokawa, Y., Kikusui, T., Takeuchi, Y. and Mori, Y. (2005)
Alarm pheromone that aggravates stress-induced hyperthermia is soluble in
water.
Chemical Senses, 30, 513-519

- (5) Kiyokawa, Y., Shimozuru, M., Kikusui, T., Takeuchi, Y. and Mori, Y. (2006)
Alarm pheromone increases defensive and risk assessment behaviors in male
rats.
Physiology & Behavior, 87, 383-387

参考論文

- Kiyokawa, Y., Kikusui, T., Takeuchi, Y. and Mori, Y. (2004)
Partner's stress status influences social buffering effects in rats.
Behavioral Neuroscience, 118, 798-804

目次

第 1 章 総合緒言	3
1-1 緒言.....	4
1-2 警報フェロモン	5
1-3 フェロモンの分類.....	7
1-4 嗅覚系	9
1-5 STRESS-INDUCED HYPERTHERMIA.....	10
1-6 本研究の目的	11
 第 2 章 警報フェロモン産生・放出における TESTOSTERONE の役割... 24	
2-1 緒言.....	25
2-2 材料と方法	25
2-3 結果.....	29
2-4 考察.....	30
2-5 小括.....	32
 第 3 章 警報フェロモン放出部位の検討..... 41	
3-1 緒言.....	42
3-2 材料と方法	43
3-3 結果.....	45
3-4 考察.....	46
3-5 小括.....	48
 第 4 章 警報フェロモン受容に関わる脳内領域の解析..... 57	
4-1 緒言.....	58
4-2 材料と方法	59
4-3 結果.....	61
4-4 考察.....	62
4-5 小括.....	67

第 5 章 水を警報フェロモン吸着剤として使用する可能性の検討	74
5-1 緒言	75
5-2 材料と方法	75
5-3 結果	78
5-4 考察	79
5-5 小括	81
 第 6 章 警報フェロモンの作用の検討	 90
6-1 緒言	91
6-2 材料と方法	92
6-3 結果	95
6-4 考察	95
6-5 小括	96
 第 7 章 総合考察	 102
7-1 結果の要約	103
7-2 警報フェロモンの分類	105
7-3 警報フェロモンの受容系	106
7-4 警報フェロモン情報の脳内伝達機構	107
7-5 今後の研究	108
 要約	 112
 参考文献	 118

第 1 章

総合緒言

1-1 緒言

情動とは、恐怖、驚き、怒り、悲しみや喜びといった感情として表現される主観的な心的過程であるため（第 1 章末尾補注 1 参照）、情動を経験している個体がそれを外部に伝達をしない限り、他個体内に存在している情動を外部より窺い知ることは不可能である。そのため、情動の研究を行うためには自分の感情を他者に伝達可能である人間を対象とする以外、研究方法はないと考えられる（第 1 章末尾補注 2 参照）。

しかしながら人間社会を考えた場合、個体間の情動伝達なくして高度な社会生活は不可能であるため、明確に言語によって情動を伝達されていなくとも、日常的に他者の情動を窺い知ることができている。それは、例えば表情、姿勢、口調といった様々な側面に本人の情動が反映されており(Ekman, 2003a)、それらの手がかりを用いて他者の情動状態を類推しているからである。人間と同様に、動物の心的状態も例えばその動物の姿態や表情、音やにおいといった、その動物が発する様々な信号に反映され得ると、古くはダーウィン以来考えられている(Ekman, 2003b)。ここで述べておかななくてはならないが、人間以外の動物に情動が存在するかという問題には、上述の理由により回答不能であるものの、本論文においては存在し得るという立場をとることとする（第 1 章末尾補注 3 参照）。心的状態の副産物であると考えられるこれらの信号は、他個体に対してその行動を決定するための情報を伝える役割も担う場合もある。例えばラットにおいても、他者への情報伝達という側面においてはさらなる研究を待たなければならないものの、楽しい状況では笑い声をあげたり(Panksepp, 2005; Panksepp & Burgdorf, 2003)、安心した状況では「ほっ」と一息ついたり(Soltysik & Jelen, 2005)しているように窺えることが近年明らかとなった。これらの信号に加えて、例えば葛藤状態の際に放出するにおい(R. R. Morrison & Ludvigson, 1970)や、毒物摂取(Stierhoff & Lavin, 1982)や寄生虫感染に

よる体調不良を伝えるにおい(Kavaliers *et al.*, 2004)、社会的優位な個体が放出するフェロモン(Krames *et al.*, 1969)が存在する等、嗅覚が発達したラットではフェロモンを含む嗅覚信号が主に用いられていることが知られている。そして、ラットが危機状況において放出するにおいも、これら嗅覚信号の 1 つであると考えられる。

1-2 警報フェロモン

フェロモン(pheromone)とは 1959 年に Karlson と Lüscher によって、ギリシャ語で運ぶという意味の単語 *pherein* と、興奮させるという *hormōn* という単語より作られたものであり、「ある個体より体外に放出され、それを受容した同種他個体にある特異的な反応を引き起こす物質」と定義できる(Karlson & Lüscher, 1959)。そのため、暴露された個体の反応を観察することにより危険の存在を知らせていると推察される嗅覚信号は、警報フェロモンと定義することができよう。

警報フェロモンは 1938 年に Von Frisch らの研究によりヨーロッパ淡水魚アブラハヤ(*Phoxinus laevis*)において初めてその存在を示された。その後の研究により、警報フェロモンは表皮にある大型の警報システム細胞に含まれており、肉体的傷害により細胞が破裂することによって体外に放出されることが明らかとなった(Frisch, 1938; Pfeiffer, 1963)。

ラットにおいては、ストレス臭もしくは警報フェロモンの存在が 1960 年代後半より報告され始めた。1968 年に Valenta と Rigby は、雄ラットはストレスを受けていないラットのにおいと、foot shock によりストレスを受けているラットのにおいを識別できることを明らかにした(Valenta & Rigby, 1968)。また同年 Courtney らは、猫のにおいや同種他個体のストレス臭の存在下では、制限給水したラットが水に近寄るまでの潜時が長くなるということを報告した(Courtney *et al.*, 1968)。これらの報告以後、いくつかのグループが散発的に

研究は行ったものの、警報フェロモンに対する理解はほとんど進まなかった (Dua & Dobson, 1974; Hornbuckle & Beall, 1974; King, 1969; King *et al.*, 1975)。比較的系統立った研究の結果、警報フェロモン源は血液であると 2 つの研究グループが結論づけたが (Mackay-Sim & Laing, 1980, 1981a, 1981b; Stevens & Gerzog-Thomas, 1977; Stevens & Koster, 1972; Stevens & Saplikoski, 1973)、血液は種非特異的に恐怖反応を引き起こす点や (Hornbuckle & Beall, 1974)、そのグループが出した以前の結論と矛盾することから (Mackay-Sim & Laing, 1981a, 1981b)、信頼性が高いとはいえない。

しかしながら 90 年代に入るとラット警報フェロモンの理解が急速に進んだ。1990 年に、Abel と Bilitzke は強制水泳試験において警報フェロモンの効果を観察できることを報告した (Abel & Bilitzke, 1990)。すなわち、ラットは水の中に入れられた後しばらくすると頭を水面より上に維持するために必要最低限の動きしかとらなくなるが、以前に他のラットが泳いだ水を用いると、この不動化の時間が著しく短くなることが明らかとなった。その後 Abel とその協同者はこの単純な実験系を用いて、警報フェロモンは糞尿には含まれないこと (Abel & Bilitzke, 1990)、その効果は種および系統特異的であること (Abel, 1991a, 1992)、またその反応の個体発生を明らかとした (Abel, 1993)。フェロモン産生機構に関しては、その産生に Adrenocorticotrophic hormone が関わっているものの Corticosterone 及び Prolactin は関わっていないということを明らかにした (Abel, 1994; Abel & Bilitzke, 1992; Abel & Subramanian, 1991)。

その他の哺乳類において、警報フェロモンの存在はマウス (W. J. Carr *et al.*, 1970; W. J. Carr *et al.*, 1971; Rottman & Snowdon, 1972; Sprott, 1969)、ブタ (Vieuille-Thomas & Signoret, 1992)、ウシ (Boissy *et al.*, 1998) および人間 (Ackerl *et al.*, 2002; Chen & Haviland-Jones, 2000) において報告されているものの、その理解はほとんど進んでいない。

1-3 フェロモンの分類

フェロモンの分類は当初、昆虫におけるフェロモン効果に基づいて定義され、その効果に基づいてプライマーフェロモンとリリーサーフェロモンとに分類された(Wilson & Bossert, 1963)。しかし、フェロモン研究が進むにつれて、それらの定義に当てはまらないフェロモン、例えば情報を伝達するが必ずしも反応を引き起こさないフェロモンが哺乳類に発見され、これらを分類するために様々な分類方法が提唱された。本論文ではプライマーフェロモン、リリーサーフェロモン、シグナリングフェロモンおよびモジュレーターフェロモンの 4 種類に分類することとする(McClintock, 2002)。

1-3-1 プライマーフェロモン

プライマーフェロモンとは、受容個体に長期にわたる内分泌反応や発達期における神経内分泌的变化を引き起こすものである(Wilson & Bossert, 1963)。このフェロモンは、個体発生の様々な時期においての卵巣機能の制御に関わっていることが知られており、例えば、雌フェロモンの存在による春機発動の遅延および非発情期の延長 (Lee-Boot 効果) (Van Der Lee & Boot, 1955)、雄のにおいによる性成熟の促進 (Vandenbergh 効果) (Vandenbergh, 1969)と発情抑制された雌への発情誘起 (Whitten 効果) (Whitten, 1956)、および雄フェロモンによる妊娠阻害 (Bruce 効果) (Bruce, 1960)などが報告されている。

1-3-2 リリーサーフェロモン

リリーサーフェロモンとは 1963 年に Wilson と Bossert により定義され (Wilson & Bossert, 1963)、数秒から数分の間に効果を現して典型的な行動反応もしくは一連の行動を引き起こすものである。例えば、雄ブタの唾液中に含まれる 5α -androst-16-en-3-one は発情雌ブタに不動化を引き起こし雄ブタ

の交尾を可能とさせ(Melrose *et al.*, 1971; Reed *et al.*, 1974)、ウサギの乳腺より放出される 2-methylbut-2-enal は仔に吸乳反応を引き起こすことが知られている(Schaal *et al.*, 2003)。

1-3-3 シグナリングフェロモン

シグナリングフェロモンとは、自己の存在、性別、繁殖状態または社会階級を知らせるフェロモンというように、様々な情報を伝達するフェロモンである(McClintock, 2002)。そのため、これらのフェロモンは受容個体の行動に影響を与えるが、特定の反応と関連するかはむしろ他の刺激、社会的状況、動機や経験に依存する。例えば、雌のハムスターは通常は単独で生活しており、縄張りに他の雄が侵入した場合は攻撃をして追い出す。しかし発情期になると、雌は多量の膺分泌物をもちいて縄張りの周りににおい付けを行い、雄に対して“現在は性的受容期であり攻撃をする時期ではない”という情報を伝えることが知られている(Johnston, 1975)。また最近報告された、雄マウスの涙腺から雄特異的に放出され、雌の鋤鼻器にて受容される ESP1 という蛋白質も、雄であるという情報を伝えていと推察される(Kimoto *et al.*, 2005)。しかし、これらのフェロモンが情報を伝達したために行動反応が発現したのか、フェロモンが直接的に行動反応を引き起こしたのかを外部より判定するのは困難であるため、プライマーフェロモン以外のフェロモンをリリーサーフェロモンも含めて全てシグナリングフェロモンと分類することもある(Vandenbergh, 1983)。

1-3-4 モジュレーターフェロモン

近年の人間を対象とした研究によって、モジュレーターフェロモンという新しいフェロモンの存在が提唱された(McClintock, 2002)。すなわち、それ自身が特定の行動や思考を引き起こすことなく、受容個体の心的状態を変化させる作用を持つフェロモンである。そのためフェロモン効果は、ある刺激に対する反応の変化として観察される。例えば、ステロイドの 1 種である $\Delta 4,16-$

androstadien-3-one および 1,3,5,(10),16-estratetraen-3-ol はその存在を知覚していなくとも、女性の前向きな気分を促進する一方で男性には対照的な効果を持ち(Jacob & McClintock, 2000)、また自律機能反応の指標となる掌の温度や皮膚導電率にも男女間で反対の作用を持つ(Jacob *et al.*, 2001)。このように、モジュレーターフェロモンは特定の反応を引き起こすのではなく心的状態を変化させる作用を持つため、観察できる効果は必然的に試験の文脈に依存する(Jacob *et al.*, 2001)。

1-4 嗅覚系

多くの哺乳類は主嗅覚系と鋤鼻系という、2 つの独立した嗅覚系をもっている(図 1-1)。主嗅覚系は多種多様なにおい物質を受容することができ、それぞれに応じた反応と結びつけている。主嗅覚系において、嗅上皮に存在する嗅神経細胞はにおい受容体を発現し、その受容体を受容したにおい情報を主嗅球へと伝達している。主嗅球からの投射は、梨状皮質、眼窩前頭皮質、扁桃体、海馬、視床下部および線条体へという様に広範囲に及んでおり、そのため高次脳機能によるにおい情報の統合が可能である(Brennan & Keverne, 2004; Wysocki, 1979)。

一方で鋤鼻系は、特定の反応を引き起こす比較的狭い範囲の物質に反応することが知られている。鋤鼻器は鼻腔正中底部に 1 対存在する盲端筒状の器官であり、鼻中隔と鋤鼻軟骨とに包まれている。鋤鼻器は鼻腔と接続しており、またいくつかの種では切歯管を介することで口腔とも接続し(Wysocki, 1979)、鋤鼻ポンプ機能を用いてフェロモン分子を取り込むと考えられている(Meredith, 1994)。鋤鼻上皮に存在する鋤鼻神経細胞は鋤鼻受容体を発現し、その受容体を受容した情報を副嗅球へと伝達している。副嗅球からは副嗅索床核、扁桃体内側核、扁桃体後内側皮質核および分界条床核へと情報が伝達され(図 1-2)、その後視床の広範囲へと情報が伝えられる(Fernandez-Fewell &

Meredith, 1994; Martinez-Marcos & Halpern, 1999; von Campenhausen & Mori, 2000)。

鋤鼻系は多くのフェロモン効果を伝達しているが、全てのフェロモン情報は鋤鼻系により受容されているわけではない(Baxi *et al.*, 2006)。例えば、上記の Lee-Boot 効果(Reynolds & Keverne, 1979)、Vandenbergh 効果(Kaneko *et al.*, 1980)、および Bruce 効果(Lloyd-Thomas & Keverne, 1982)において鋤鼻系は重要な役割を果たしていることが知られている。しかし一方で鋤鼻系を破壊した後も、仔ウサギが母ウサギの乳首を探し当てるのを助けるフェロモンに対する反応や(Hudson & Distel, 1986)、雌ブタにおける性フェロモンに対する反応(Dorries *et al.*, 1997)は影響がないことも知られている。これらの報告は、主嗅覚系もフェロモン情報を受容し伝達することが可能であることを示唆している。

1-5 Stress-induced hyperthermia

群れ飼いのマウスを 1 分間に 1 頭ずつ Home cage から取り出して体温を順に測っていくと、最後のマウスは最初のマウスと比較して高い体温を示すことが知られている (図 1-3) (Borsini *et al.*, 1989)。この現象は Stress-induced hyperthermia (SIH)として知られており、様々な抗不安薬の投与により抑制されることが知られている。例えば、GABA-ベンゾジアゼピンレセプターに作用する薬物である Diazepam、Chlordiazepoxide、Oxazepam、セロトニン系に作用する薬物で、5-HT_{1A} レセプターアゴニストとして働く Flesinoxan、8-OH-DPAT、ドーパミン系に作用する薬物である Haloperidol 等の投与は、SIH を抑制する(Olivier *et al.*, 2003; Zethof *et al.*, 1995)。これらの結果より、SIH は将来起こりうる嫌悪刺激に対する不安によって引き起こされていると考えられている。

ストレス、特に身体的ストレスに対する SIH の生理学的機構はほぼ明らかに

されている。動物はストレスを受けると青斑核が興奮し、ノルアドレナリン神経を介して視索前野(POA)が活性化する(Beckman, 1970; Soszynski *et al.*, 1996)。また、内毒素投与などのストレスの場合、単球やマクロファージに作用して Interleukin-1(IL-1)を産生し、IL-1はPOAを活性化させる(Kozak *et al.*, 1998)。それらの刺激により、POAにおいて Prostaglandin E₂(PGE₂)が産生され、やはり POA 領域に存在する体温調節中枢に PGE₂ が働きかけることにより SIH が引き起こされることが知られている(Morimoto *et al.*, 1991; Singer *et al.*, 1986)。

しかしながら、未来に対する不安による SIH は Acetylsalicylic acid 等の Cyclooxygenase 阻害薬投与によって緩和されないこと(Olivier *et al.*, 2003) や、Prostaglandin E レセプターノックアウトマウスにおいても SIH が観察されること(Oka *et al.*, 2003)から、上記の経路とは異なる機構の存在が示唆されているものの、その詳細は不明である。

1-6 本研究の目的

本研究の目的は、ラットが foot shock を負荷された時に放出する警報フェロモンを研究モデルに用いて、フェロモンを介して情動を他個体に伝達する機構を解明することである。小さな実験箱内で他の雄ラットより放出された警報フェロモンに暴露されると、雄ラットは匂いをかぐ行動 (Sniffing)、呼吸行動以外の不動化 (Freezing)、後肢を踏み換えた回数 (Walking) の増加および休息行動 (Resting) の減少といった行動反応と、SIH の増強といった自律機能反応を示すことを (図 1-4)、当研究室にて明らかとした。また同時に副嗅球の僧帽傍細胞層において、神経活動量の指標となりうる Fos 蛋白質の発現 (Kovacs, 1998)が増加したことより、警報フェロモン受容における鋤鼻系の関与も示唆された(Kikusui *et al.*, 2001)。

この実験系を用いて、以下の第 2 章では、フェロモンを放出させるためのド

ナーとして、無処置雄、去勢雄および去勢後 Testosterone 処置をした雄ラットを用いることで、警報フェロモン産生・放出における Testosterone の役割を検討した。第 3 章では、ドナーに麻酔下雄ラットを用いて、体表の様々な部位を局部電気刺激することにより、部位特異的なにおいの放出を促すことで、警報フェロモン放出源を検討した。第 4 章では、自律機能反応を引き起こす警報フェロモンに着目し、その受容に関わる脳内神経機構を検討した。第 5 章では、今後の実験に利用するための前段階として、フェロモンを水中に捕捉する可能性を検討した。第 6 章では、第 5 章により作製された警報フェロモン含有水と、変形オープンフィールド試験を用いて、警報フェロモンの作用を検討した。

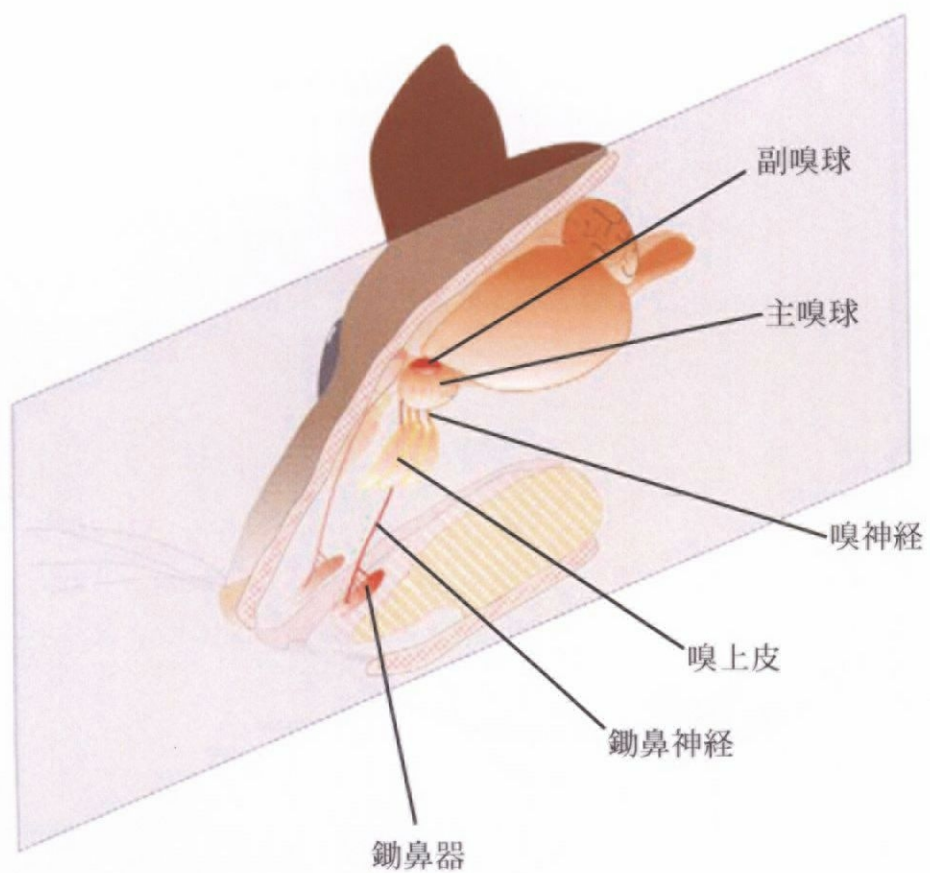


図 1-1 : 口吻部の傍正中矢状断面図による、主嗅覚系と鋤鼻系の模式図 (Baxi *et al.*, 2006 を改変)

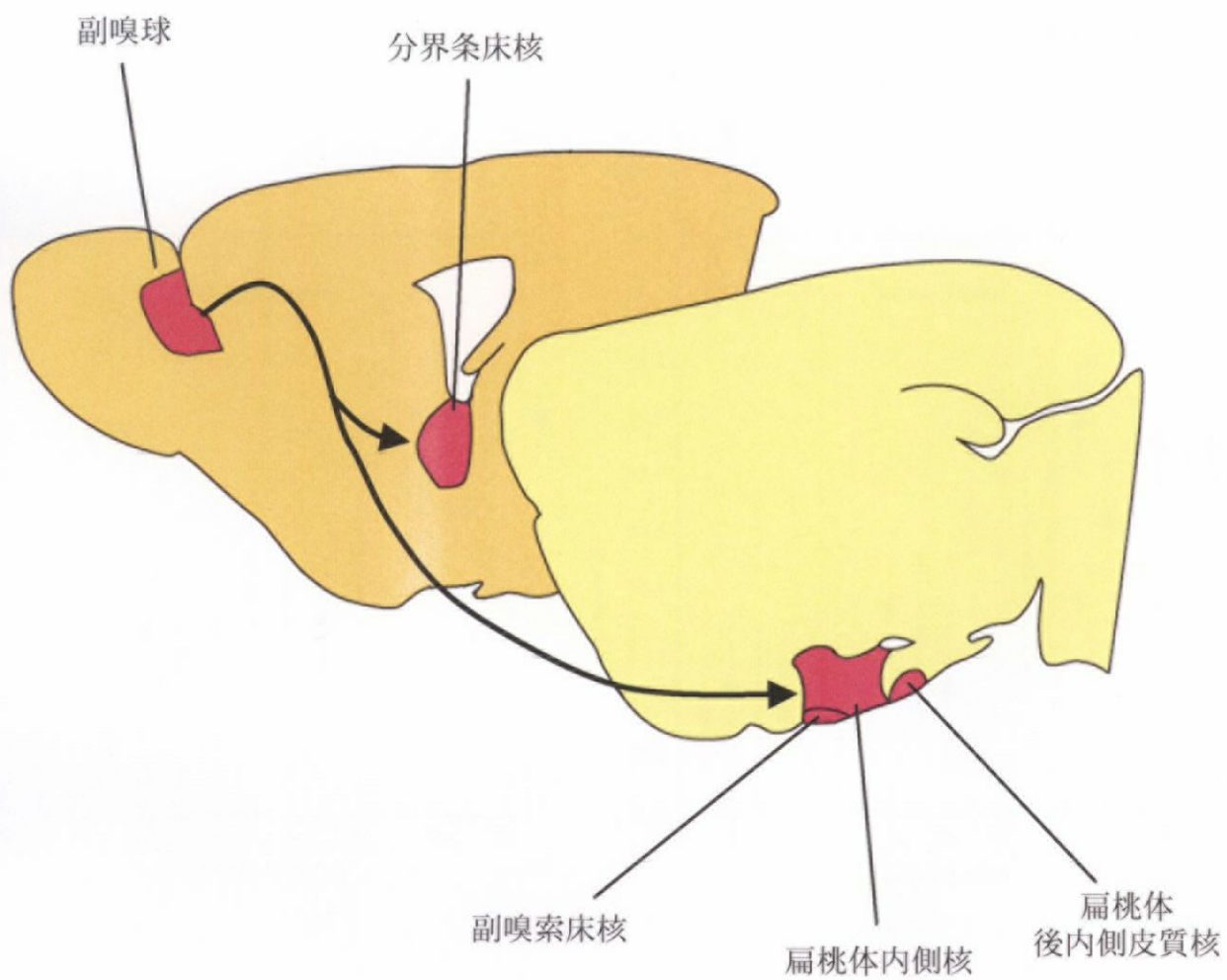


図 1-2 : 矢状断面図による鋤鼻系の神経投射 (Brennan & Keverne, 2004 を
改変)

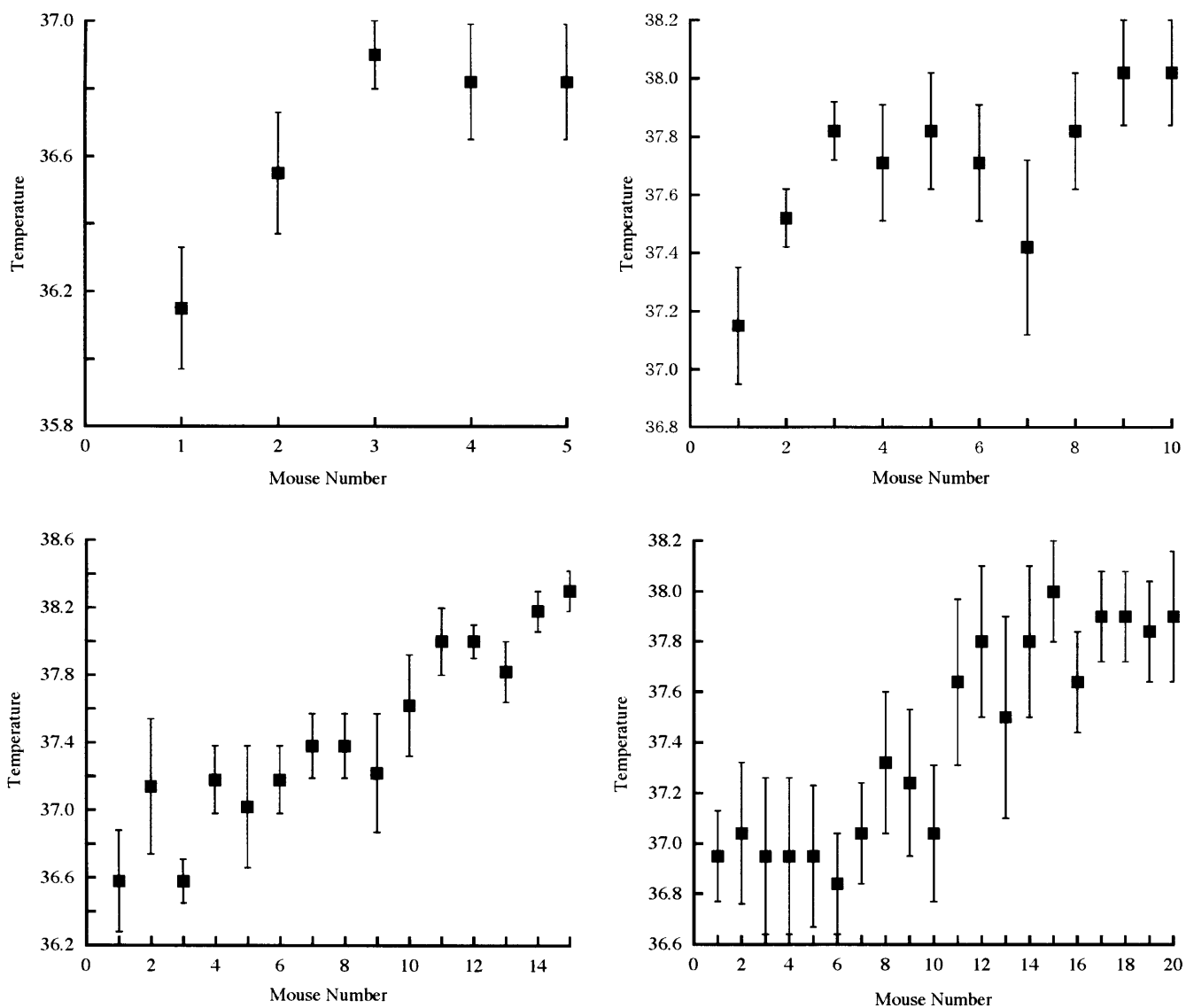
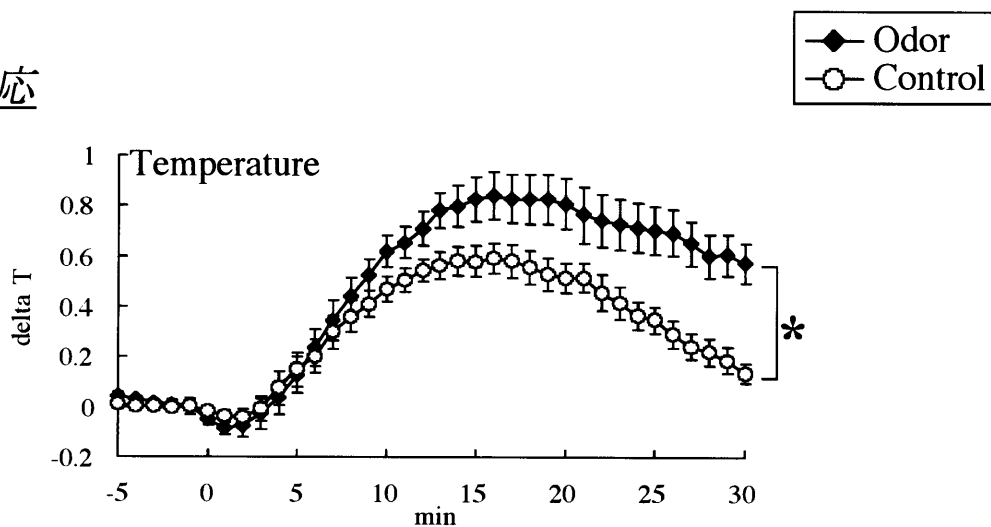


図 1-3 : 1 ケージ 5 頭 (左上)、10 頭 (右上)、15 頭 (左下) および 20 頭 (右下) 飼育マウスにおける Stress-induced hyperthermia の例。ケージから取り出されたマウスは、取り出された時間依存性に高体温を示す (Borsini *et al.*, 1989 を改変)

自律機能反応



行動反応

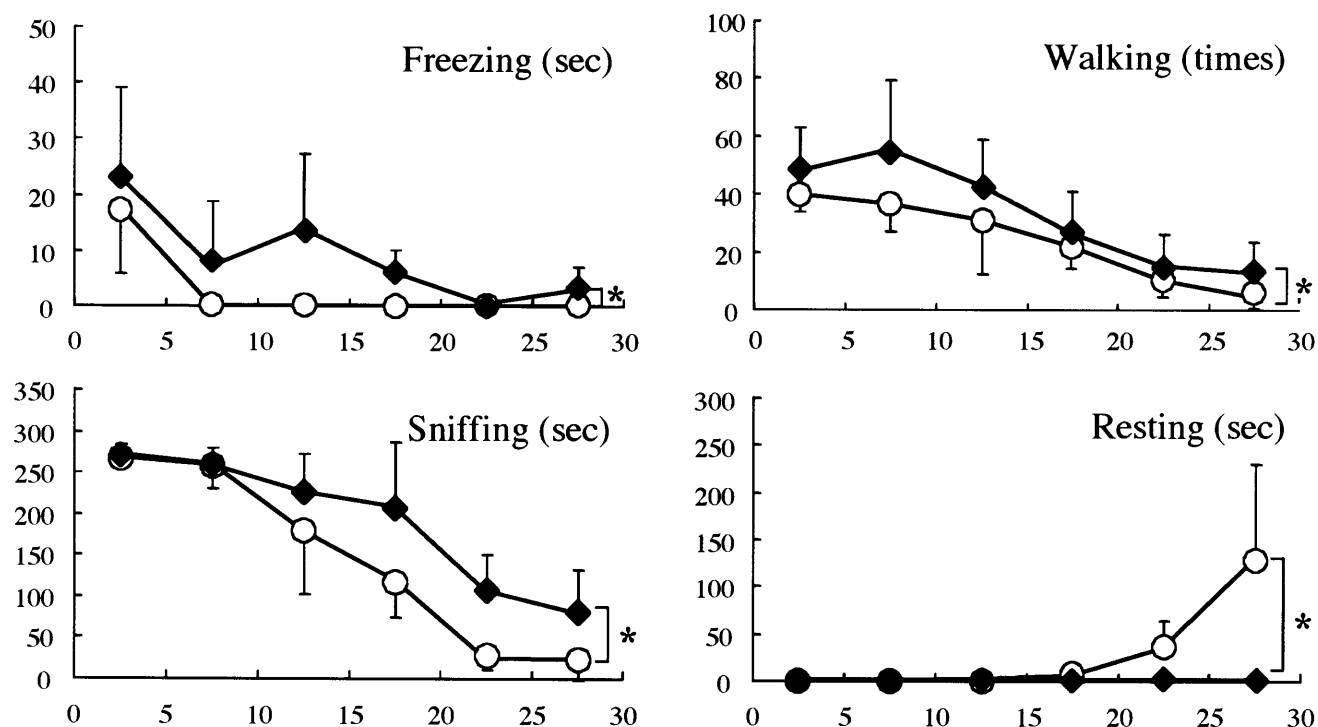


図 1-4：警報フェロモン暴露による自律機能反応および行動反応の例。警報フェロモン暴露群（Odor）は対照群（Control）と比較して、体温上昇反応の増強を示すと同時に、Freezing、Walking および Sniffing の増加と Resting の減少を示す（Kikusui *et al.*, 2001 を改変）

補注

補注 1

情動とは古来より認知、衝動とともに心を構成する 1 要素として考えられてきたものであり (Hilgard, 1980)、そしておそらく誰もが体験している主観的な心的過程の 1 つであるにもかかわらず、ほとんど理解されていないものである (Fehr & Russell, 1984)。

情動に対する近代的な研究は、James が、「常識的には、財産を失えば悲しくなって泣く、クマに会えば驚いて逃げる、競争相手に侮蔑されると怒って殴りかかるといわれている。しかしこの順番は正しくなく、もっと合理的な説明によれば、われわれは泣くから悲しいのであり、殴るから怒りを感じるのであり、震えるから恐ろしいのである。」と提唱したことから始まった (James, 1884)。すなわち、ある刺激はまずある特定の身体反応を誘起し、そのために生じた様々な行動や身体状態の変化が情動という主観的体験を与えるというものであった。そしてこの仮説は、1927 年に Cannon が以下の理由に基づいて疑問を投げかけるまでは、心理学において広く受け入れられた説であった。Cannon は、1) 知覚神経を切断することにより身体と脳を分離させた動物でも情動行動は変化無く観察される、2) 異なる情動下でも同一の身体反応が観察される、3) ある刺激に対して身体反応が起こるのは時間がかかりすぎるため情動の源にはなり得ない、4) 人工的に身体反応を引き起こしても必ずしも情動は発生しない、などの理由から James の説に異論を唱えた。そして、脳を損傷した人間や大脳皮質を除去した動物、麻酔導入下の人間の観察結果から、情動は視床下部より発生すると提唱した (Cannon, 1927)。

Cannon の反論以降、Watson が提唱した行動主義の影響をうけて、情動という主観的体験は科学の対象とはみなされなくなった。まずドイツで、行動実験の結果を記述し報告する場合に、主観的な意味を内包する“見る”や“探索する”といった用語は避けて客観的な用語を用いるべきだと提唱され始めた。そして 1913 年にアメリカで、動物の意識の内容は科学的研究の範囲外にあるものであり、行動は行動それ自体として研究する価値があるものであるという行動主義を Watson が提唱した。すなわち、内観法によって得られる主観的データに基づいて議論をしても、それらを客観的に証明することも反証することもできないので、今から 200 年後も同じ議論が行われているだろうと主張した (Boakes, 1984)。そして、そこに意識の存在を仮定しなくても動物の行動をそれまでと同様に説明できることが判明し、またそれと同時に以前の他の理論が提供し得なかった心理学の科学的信頼性を提供できることが明らかとなったため、行動主義は世界中で受け入れられるようになった。

しかし心理学に対する行動主義の強固な抑制はコンピューターの開発によって起こったいわゆる“認知革命”以降変化の兆しをみせ、1960 年代になると再び情動についての研究が始ま

った。しかし行動主義の影響を受け、それまでのように内観法によって得られたデータに基づくのではなく、実験データに基づいて論議されるようになった。1962年にSchachterとSingerは、Epinephrine投与によって被験者は同一の生理的反応を示すものの、その反応を解釈できる手がかりに依存して幸せを感じたり、怒りを感じたり、何の感情も感じなかったりしたという実験結果から、情動が発生するためには認知的解釈が主要な要因であると提唱した(Schachter & Singer, 1962)。すなわち、ある刺激によって引き起こされた生理的反応によって喚起状態にあると自覚し、現在の社会的状況や物理的状況といった外的要因に対する解釈に基づいて喚起状態の原因となる情動を特定できた時に、初めて情動が発生するということである。

この後、情動における認知の役割はさらに重要視されるようになり、“ある刺激によって引き起こされる生理的反応は、刺激に対する認知的評価の結果として起こるものである”ということが提唱され、認知科学の成功を受けてこの概念は広く受け入れられるようになった。例えばLazarusは、被験者は同じ刺激を提示されるものの、刺激の解釈方法によって被験者が体験する情動は大きく影響を受けることを報告し、認知の重要性を示すとともに、認知は情動の必要十分条件であって、認知と情動は独立したものではないと提唱した(Lazarus, 1984)。しかしZajoncは、このように情動に対する認知的研究が主流を占めていた頃に、以前に見たことがある対象を新奇な対象より好むという単純提示効果を用いて、認識と情動との関連について研究を行った。その結果、被験者は以前に提示されたことのある対象を、それを見たことがあると主観的に認識していなくても、新奇の対象より好むことが明らかとなった。この結果より、情動は認知に対して優位な独立した存在であることを提唱し、そのため、情動の発生には刺激の無意識的処理が関わっていると考えた(Zajonc, 1980)。この論文は、情動は単なる認知ではないという衝撃を与え、情動を理解するための認知的研究というものを失速させた。

近年では、脳に疾患を患った患者達の観察をもとに、情動に関して新たな説をDamasioが提唱している。この説では、情動とは個体維持のために自動的に引き起こされる身体反応すべてを指しており、例えばゾウリムシが鋭利な物体や高低温から逃げる行動も情動とした。そして感情という心的体験は、島皮質を中心とした体性感覚皮質に現在の身体状態がマッピングされる際の副産物として発生するものであり、個体維持のための様々な情動を方向付ける働きを持つとした。この説は、身体反応が感情に先立つという点ではJamesの説と同じであるが、感情は身体状態そのものではなくそれが脳に形成された身体マップより発生するものとしたため、刺激に対して瞬時に感情を感じることを説明できると同時に、身体マップを変化させ得る薬物投与や神経疾患による感情変化も説明することができた(Damasio, 2003)。

このように情動に関して様々な説が提唱されているものの、未だその本質は解明されてはい

ない。また、この問題をさらに難解なものとしている要因として、情動および感情という語が様々な用法で使用されていることが挙げられる。例えば情動という語が感情の集合体を指している場合もあれば、様々な感情の中で特にその心の変動が大きいものを指している場合もある。また、情動という語は“果物”や“野菜”のように心的過程の概念でありそれ自体は何も指していないとする場合や、ある刺激によって自動的に引き起こされる個体維持に必要な身体反応すべてを指し、そこに心的変化である感情を含まない場合もある(Damasio, 2003; Dawkins, 1993; Fehr & Russell, 1984; Griffin, 1992)。そこで本論文では情動という語を、主体がある状況や対象に対する態度あるいは価値付けをする主観的な心的過程に対して用いることとし、感情とは情動が言語によって分類されたものというように用いることとする(Ledoux, 1996)。そのため、情動は人間以外にも存在し得るが感情は人間にしか存在し得ず、そして人間における感情は全て情動といえるが全ての情動が感情とはいえない。

また、ある心的過程は意識されない限り存在し得ないので、情動が存在するためには必然的に意識が存在しなくてはならない(Damasio, 2003; Ledoux, 2002)。そのため、次に意識という語の用法を述べる必要がある。意識の基本的な概念は、“対象と事物について考えること”といえるが(Dawkins, 1993; Griffin, 1992)、その思考は整然とした同質の存在ではなく種類も程度も様々である。そのため意識という語は、例えば仲間意識、罪の意識、勝ちを意識する、自意識、意識を取り戻すというように、様々な状況において曖昧に使用されている(Natsoulas, 1978)。しかし、意識という語が科学的に使用される場合は、その用法は比較的統一されており、単に何かを知覚しているだけではなく“思考する主体が自己の行為もしくは心的状態に気づいている”という、いわゆる内省的意識と呼ぶものに対して用いられている(Griffin, 1992)。そこで本論文においても、意識という語をこの内省的意識に対して用いることとする。

一方、無意識という語は、心の中に単なる注意や努力によってはその内容を意識することができない領域というように、意識を否定する語ではなく意識とは別の領域に対して用いる(Griffin, 1992)。無意識の存在を初めて提唱したのは Freud であり、心を意識、前意識、無意識という3段階に分類し、欲動は無意識の中に抑圧されているとした。ただし Freud は主に欲動に対して論議をしていたため、情動に関しての見解を詳しく提唱はしていないが、その時代に広く受け入れられていた James の仮説を「不可解であって、論ずる価値のないもの」と述べていた(Freud, 1917)。

このように“情動とは何か”という問題は未だ解明されておらず、またさらに、情動の存在の前提となる意識に関しても、それは物質世界に存在するものなのか、それとも物質世界とは独立した世界に存在するものなのかというような、基本的なことすら解明されていない(Carter, 2002)。そのため、現時点では情動をどのようなものと捉えるかにおいて本人の主観以上の根

抛は存在せず、また情動を研究するためにその定義を試みることは、逆に研究を停止させてしまうものである(Fehr & Russell, 1984)。このような状況の下で科学的に情動を研究するには、その本質を定義できなくとも解明可能なことから研究を進めていくという方法が最良だと思われる。例えば遺伝学は当初、一部の形質は単一遺伝することや、染色体の交差を類推させる連鎖の存在などの実験結果に基づいて“遺伝物質”という理論上の概念を仮定して研究が進められ、その本体が DNA や RNA で構成されていることが解明されたのはずっと後になってからというように、“遺伝物質”の本質が分からないまま進歩していったのである。そして、このような方法で情動に関する知見を積み重ねることにより、情動とは何かということが明らかになってくるであろう。

補注 2

日常生活において我々は、内的世界の存在も含めて他人は自分と似た存在であるという前提のもと、自分の経験、自分と相手との違いおよび相手の平常時との違いを勘案することで相手の内的世界を類推している。そして多くの場合その類推が正しいように思っているため、厳密に言えば科学的に証明不可能ではあるものの、自分以外の人間にも情動が存在しているという概念は広く受け入れられている(Dawkins, 1993; Hebb, 1946)。そのため、人間を研究対象として用いると、被験者は言語を用いて自分の感情を表現することができるため、情動を直接的に研究することができる。しかし、この最大の利点は同時に次の様な問題点も含んでしまうことを述べておかなくてはならない。

まず、実験によって得られた結果の信頼性が挙げられる(Ledoux, 2002)。例えば、人間で感情が研究される主な方法は自己評価法であるが、ある情動の存在はそれを体験している本人よりも観察者達の方がよく認識している場合がある(Hebb, 1946)。また、被験者に以前の感情体験を想起させる方法を用いた場合は、記憶というものは実際の経験が歪曲されている場合が多いため(Loftus & Hoffman, 1989)、研究が特に不正確になりがちである。そして、内観法によって得られた主観的データが科学的議論に耐えなかったため、行動主義が提唱されたのである(Boakes, 1984)。

次に、そして最大の問題点として、倫理的な問題のため人間の脳を直接的に操作できないということが挙げられる(Ledoux, 2002)。情動は無意識的処理によって発生するものと考えられるため(Damasio, 2003; Zajonc, 1980)、それを意識下の方法である言語を用いて報告することは不可能であることから、情動を理解するためにはそれを体験している時の脳神経活動を研究する必要性が生まれてくる(Ledoux, 2002)。近年の科学技術の進歩により、ある感情体験と同時期に発生している神経活動を機能的磁気共鳴映像法 (fMRI) や陽電子放射断層撮影法 (PET)

等を用いることで観察できるようになったものの、これらの手技によって得られる結果はあくまで間接的な結果にすぎないため、その因果関係も含めて、脳のある領域が感情の発生に対してどれだけの影響を与えているかということを知ることは困難である。また、脳の様々な領域に損傷を受けた患者の感情を研究することも広く行われているが(Damasio, 2003)、損傷部位が特定の神経核に局限されていることはまれであるため、やはり結果の原因を直接的に特定することは困難である。

しかしこの問題点を解決するために脳を操作することが倫理的に許されている動物を用いて情動研究を行うと、今度は“動物において意識および情動は存在するか”という解決不能な大きな問題が発生してくる(Ledoux, 2002)。ダーウィン主義が広く一般に受け入れられた 19 世紀末頃には動物に意識が存在するという立場が公的に存在しており、人間の心を理解するために人間と進化的に連続している動物の心を研究するという比較心理学が存在していた(Boakes, 1984)。しかし行動主義の台頭と、“賢馬ハンス”の過ちをきっかけとして、動物に意識が存在することを公的に認めることは非科学的であるという多大な非難を受けるようになり、それに伴い動物の意識および情動も研究されることはなくなった。それは、他人の情動の存在を類推するのと同じ方法で動物の意識や情動の存在を類推しようと試みても、その動物と自分との類似および差違の程度が不明であるため、単なる主観的な“擬人化”の結論となってしまう場合がほとんどだからである(Dawkins, 1993)。また、“情動的興奮下では動物も人間も同様な行動をとるため同様な主観的状态を経験しているに違いない”という前提で研究を試みたとしても、被験動物種を熟知していない場合にはその前提が正しくないということが知られている。例えばチンパンジーでは、金切り声を発するのは餌を見て喜んでいるのであって必ずしもそれを持った人間には向けられていなかったり、唇でブツブツという音を出すのは嘲笑しているのではなく親愛の印であり、毛繕い行動に伴って発せられたりするものである(Hebb, 1946)。

さらに、仮に前提が正しく、それに基づいて動物の行動的反応を情動の指標として実験を行ったとしても、研究者が実際に測定するもの（行動）は研究対象（情動）と異なるため、結果の信頼性が高いとは言えない(Ledoux, 2002)。このことは、例えば次の実験結果によって示されている。この実験において被験者は、生理的食塩水もしくは Morphine のどちらかは知らされないまま投与され、その後にボタンを多数回押すことで再び同じ投与を受けることができた。またこの行動反応と同時に、投与によって感じた主観的な気分を報告することを求められた。その結果、高濃度の Morphine が投与された場合、被験者はボタンを多数回押すと共に気分が良いと報告した。生理的食塩水が投与された場合はほとんどボタンを押さず、また何も感じないと報告した。しかし、低濃度の Morphine を投与された場合、被験者はボタンを多数回押すものの何も感じないと報告した(Lamb *et al.*, 1991)。この結果は、行動反応は必ずしも主観的

な情動を反映していないということを示している。

このように動物を用いて情動を研究しようと試みても、まず動物における情動の存在自体が証明できない問題であり、また仮に存在したとしても動物は言語を持たないために自分の情動を実験者に伝達することはできず、さらに実験者が測定できる動物の反応は研究対象である情動を必ずしも正しく反映していないため、科学的に情動を研究することは不可能である。そのため、情動を直接的に研究する場合には、信頼性の問題は存在するものの、情動が存在すると考えられており、そしてそれを言語によって実験者に伝達することができる、人間を対象とする他ないと考えられる。

補注 3

現時点では動物における情動を直接的に観察する方法が存在しないため、“動物において意識および情動は存在するか”という問題は、未だ解明されていない問題である。そのため、今日では動物を用いて情動を研究する際、動物における意識の存在に関して大きく分けて 3 つの立場が存在している。

まず 1 つめとして、動物には意識および情動が存在するという立場である。この立場で研究を行った場合には、動物の心的能力は“賢馬ハンス”の誤りのようにきわめて過剰な解釈の影響を受けやすい研究対象であるため、得られた結果を擬人化して解釈してしまう危険性が極めて高いといえよう(Dawkins, 1993)。また、動物における意識および情動の存在を客観的に実証できない限り、いくら日常生活においてそれらの存在を感じていようとも、この立場は科学的観点からすると明らかに誤りであるということは、広く一致した見解である(Dawkins, 1993; Griffin, 1992)。

2 つめは急進的行動主義であり、その存在が証明できない限り動物には意識は存在しないとする立場である。そしてこのように、動物から主観的な精神世界をすべて排除し、心を情報に対する処理機械として扱うことで、認知科学の分野で成功を収めた。この立場は、人間は獣と異なり特別な存在であるとしていたキリスト教的思想がダーウィン革命によって碎かれた反動と、“賢馬ハンス”の誤りに対する反動に支えられ、哲学や心理学において依然として主流を占めている(Boakes, 1984; Griffin, 1992)。しかしこの立場は同時に、他人における意識の存在を認めないか、もしくは動物と同様に実証不可能にもかかわらず他人における意識の存在を認めるという矛盾を含んでいるように思われる。

最後の 1 つは方法論的行動主義であり、動物における意識や情動の存在を否定しないが、主観的体験は研究対象とはなり得ないので、あくまで研究対象はそれらの処理方法というような測定可能なものにするべきである、という立場である(Ledoux, 2002)。この立場は情動自体を

研究するのではなく、ある刺激の情動的重要性はどのように処理されているかということを研究するため、情動の本質が明らかとなっていなくても科学的信頼性が高い研究を行うことができた。そしてこの立場に基づいた研究により、foot shock と条件付けされた条件刺激（音）が情動反応（Freezing）を引き起こす際に関わる脳内神経機構が、その分子レベルに至るまで解明された(Ledoux, 1996)。その結果として、動物は条件刺激に対して恐怖をおそらく感じているだろうというように、不安と同様にその実体は解明されていないものの、動物においても恐怖という情動の存在が受け入れられるものとなった。

このように動物における情動の存在に対する見解およびそれぞれの研究方法について述べたが、現代科学では動物における情動を直接的に観察する方法が未だ無いため、その存在をどのように捉えるかは本人の好み以上の根拠はないといえよう。そのため本論文では、動物に情動が存在する可能性を視野に入れつつ、その存在を常に疑いながら客観的なデータを蓄積、検証し、意識や情動の存在を仮定した方が明らかに適切な状況になった場合に初めてそれを受け入れる(Griffin, 1992)というように、動物には情動が存在し得るという立場をとることとする。

第2章

警報フェロモン産生・放出機構における Testosterone の役割

2-1 緒言

Testosterone は雄において性フェロモン、縄張りフェロモンや社会的優勢フェロモンといった、様々なフェロモンの産生・放出に関与していることが報告されている(Gawienowski *et al.*, 1976; Gawienowski *et al.*, 1975; Iwata *et al.*, 2000; Johnson, 1976)。Testosterone はまた、視床下部-下垂体-副腎軸の形成や、ストレスに対する同軸の反応性に多大な影響を与えることも知られている(Nappi *et al.*, 1997; Primus & Kellogg, 1991; Viau & Meaney, 1991)。このようにフェロモン産生とストレス反応との両者に深く関わっている Testosterone は、ストレス下において放出される警報フェロモンの産生・放出にも関わっていることが予想される。さらに、オスにおける移所運動量も Testosterone 依存性に増加することが知られており(Roy & Wade, 1975)、動物の活動量が増加する事になれば、その個体が危険に遭遇する確率も高まると考えられるため、Testosterone が“危険を知らせるフェロモン”に与える影響について興味を持たれる。そこで本章では、フェロモンを放出するドナーラットにおける Testosterone の役割を検討した。ドナーとして無処置雄ラット、去勢雄ラットおよび去勢した後に Testosterone propionate を皮下移植したラットを用意し、フェロモン受容ラットであるレシピエントの行動反応及び自律機能反応を生物指標として用いることで、各ドナーのフェロモン放出能力を評価した。

2-2 材料と方法

2-2-1 実験動物

実験には Wistar 系雄ラット（日本クレア株式会社）を使用した。動物は温度（ $24\pm 1^{\circ}\text{C}$ ）、相対湿度（ $45\pm 5\%$ ）と明暗周期（8 時～20 時：明期）が管理された部屋において 1 ケージ 3～4 頭で飼育し、導入後 1 週間以上の馴化期間

をおいた後、9～10 週齢で実験に供試した。実験期間中は、固形飼料（ラボ MR ブリーダー、日本農産工業株式会社）を給餌し、水は自由摂取とした。すべての実験は 9 時から 18 時の間に行った。

2-2-2 フェロモン受容ラット（レシピエント）の作製

実験開始 10 日または 11 日前にペントバルビタールナトリウム (50mg/kg、i.p.ネンブタール、アボットラボラトリーズ、North Chicago、IL) 麻酔下で腹腔内にテレメトリーシステムの送信機 (TA11CTA-F40、Data Sciences International、St. Paul、MN) の埋め込み手術を行った。その後、実験時に使用する防音箱（後述）内に設置された受信ボード (RLA1020 RPC-1、Data Sciences International) 上にて飼育し、実験環境への馴化を行った。実験開始 6 日前から 1 日 5 分間のハンドリングを行い、さらに実験開始 3 日前または 4 日前から 1 日 10 分間においを暴露する実験箱に馴化させた。

2-2-3 フェロモン放出ラット（ドナー）の作製

ドナーとして、成熟無処置雄ラット (Intact)、去勢雄ラット (Castration)、去勢後 Testosterone を皮下移植した雄ラット (T-implant) を用いた。去勢手術は実験開始 7 日以上前にエーテル麻酔下で実施した。Testosterone 処置ラットは、エーテル麻酔下での去勢後 2 週間以上経過した後に Testosterone propionate (和光純薬工業株式会社) で満たされた 14mm もしくは 22mm のシリコンチューブ（内径 1.57mm、外径 3.18mm）を実験開始 7 日前に背部に皮下移植することで作出した。シリコンチューブは皮下移植前日より生理的食塩水に浸漬した。T-implant 群以外のドナーは時に繰り返し使用したが、foot shock を負荷された動物の繰り返し使用は行わなかった。

2-2-4 実験手順と装置

ドナーから 2 頭を foot shock 負荷用のグリッドが装着されたアクリル製の

実験箱（27.5×20×27cm）に導入し、foot shock（125V、1 秒）を 1 分間に 1 回、15 分間与えた。そのため、実験箱内には警報フェロモンが放出されたと想定される。同様に 2 頭を 15 分間箱に導入するものの foot shock を与えずに放置した箱を、対照箱として用いた。それぞれの箱からドナーを取りだした後、実験箱は別室に存在する防音箱（36×54×35cm、室町機械株式会社）の中に設置した。実験開始直前 5 分間の体温が 37.0℃～37.5℃で、心拍数が 400bpm 以下のレシピエントを、実験箱に導入した。レシピエントは、実験に用いたドナー（Intact、Castration および T-implant）と警報フェロモンの有無（Foot shocked donor および Control donor）の組み合わせに基づき、無作為に 6 群を用意した。すなわち、Intact-Foot shocked donor 群（IF、n=8）、Intact-Control donor 群（IC、n=7）、Castration-Foot shocked donor 群（CF、n=7）、Castration-Control donor 群（CC、n=7）、T-implant-Foot shocked donor 群（TF、n=8）および T-implant-Control donor 群（TC、n=9）である。それぞれの箱に導入後 45 分間にわたって実験箱内の行動をデジタルビデオカメラ（DCR-TRV9、SONY）で録画し、さらに心拍数と体温は送信機からの信号を受信ボード（RLA1020 RPC-1、Data Sciences International）を通して記録・解析を行った（Dataquest LabPRO 3.10、Data Sciences International）。実験箱は、使用後毎回洗剤を用いて洗浄し、においの残留による次の実験への影響を排除した。

2-2-5 血漿 Testosterone 濃度測定

実験に供試したドナーは、その翌日にエーテル麻酔下においてヘパリンナトリウム入りのシリンジを用いて心臓採血を行った。血液は採取後直ちに 4℃にて遠心分離し、ホルモン測定を行うまで血漿分画を-20℃にて保存した。

抽出した Testosterone 濃度の測定は、エンザイムイムノアッセイ（EIA）にて行った(Miyamoto *et al.*, 1992)。標識ホルモンには、帯広畜産大学宮本明夫教授より供与いただいた Horseradish-peroxidase 標識 Testosterone を使

用し、標準ホルモンは Sigma 社製 Testosterone を使用した。また、使用した抗 Testosterone 抗体 (FKA104, コスモバイオ社) の交差反応は、5 α -dihydrotestosterone (5.8%)、4-androstenedione (0.8%)、Androsterone (0.18%) および他のステロイド (<0.05%) であった。Testosterone の検出限界は 4.9pg/well であり、inter-assay coefficient of variation は 13.7%、intra-assay coefficient of variation は 11% であった。

2-2-6 解析および統計処理

すべての統計処理は Stat View J 4.51.1 (Abacus Concepts, Berkeley, CA) を用いて行い、有意水準は 5% とした。

行動解析にはイベントレコーダーを用い、匂いをかぐ行動 (Sniffing)、呼吸行動以外の不動化 (Freezing)、休息行動 (Resting)、後肢のみでの立ち上がり (Rearing)、毛繕い行動 (Grooming)、そして後肢を踏み換えた回数 (Walking) の発現時間及び回数を集計した (図 2-1)。Grooming については Oral Grooming と Scratch Grooming をあわせて計測した。各群の行動反応の比較は multiple analysis of variation (MANOVA) を用いて行い、解析を行い、post hoc テストには Fisher の PLSD 検定を用いた。

自律機能の変化は 1 分ごとに記録した。実験開始前 5 分間の Home cage にいる間の値の平均を基準値にして、そこからの変化量を算出し、area under the curves (AUC) を用いて示した。心拍数、体温の比較は two-way analysis of variation (ANOVA) を用いて解析を行い、post hoc テストには Fisher の PLSD 検定を用いた。

血漿 Testosterone 濃度は EIA により 1 個体につき 2 回、または 3 回測定しそれらの平均をその個体の固有値とした。Intact 群との比較には Mann-Whitney の U 検定を用いた。

2-3 結果

Intact 群 (n=10)、Castration 群 (n=7) および T-implant 群 (n=15) における血中 Testosterone 濃度を測定した。Intact 群血中 Testosterone 濃度 (3.00 ± 0.47 ng/ml) は去勢により劇的に低下し (0.12 ± 0.02 ng/ml, $p < 0.01$)、Testosterone propionate を皮下移植することによって Intact 群よりも高値にまで上昇した (25.27 ± 1.45 ng/ml, $p < 0.01$)。レシピエントにおいて、ドナーに移植されたシリコンチューブの長さ (14mm 及び 22mm) の違いによる影響は観察されなかったため、2 種類のドナーをまとめて T-implant 群とした。

Intact 群のドナーより放出された警報フェロモンは、レシピエントに Freezing をのぞく全ての行動反応を引き起こした (図 2-2)。レシピエントに行動反応を引き起こすフェロモンを放出する能力は去勢により著しく減少し (図 2-3)、Testosterone 処置により回復が見られた (図 2-4)。統計解析の結果、警報フェロモンの存在 ($F_{(6,35)}=13.5$, $p < 0.01$) 及びドナーの Testosterone ($F_{(12,68)}=5.91$, $p < 0.01$) はレシピエントの行動反応に影響を与えたことが判明し、また 2 つの要因に相互作用が存在する事が明らかとなった ($F_{(12,68)}=3.67$, $p < 0.001$)。Post hoc テストの結果、Intact 群より放出された警報フェロモンへ暴露されると、レシピエントは Sniffing ($p < 0.01$)、Rearing ($p < 0.01$)、Walking ($p < 0.05$) の増加とともに、Grooming の減少 ($p < 0.05$) を示すことが明らかとなった。これらの行動反応を引き起こすフェロモンを放出する能力は去勢により著しく減少し (Sniffing: $p=0.346$, Rearing: $p=0.376$, Walking: $p=0.789$, Grooming: $p=0.411$)、Testosterone 処置により完全に回復した (Sniffing: $p < 0.01$, Rearing: $p < 0.01$, Walking: $p < 0.01$, Grooming: $p < 0.05$) (図 2-5)。その他の行動反応について述べると、全ての群より放出された警報フェロモンは、Resting を減少させたが Freezing には影響を与えなかった (Resting, IC, 616 ± 77 ; IF, 185 ± 54 ; CC, 912 ± 118 ; CF, 571 ± 83 ; TC, 370 ± 97 ; TF, 62.4 ± 16.1 ; Freezing, IC, 23.7 ± 9.5 ; IF, 27.9 ± 7.3 ; CC, 8.87 ± 3.13 ;

CF、 19.9 ± 5.0 ; TC、 28.3 ± 5.5 ; TF、 32.5 ± 6.8 sec) (mean \pm S.E.M)。

実験箱は新奇環境ストレスとして働くため、全てのレシピエントにおいて心拍数及び体温上昇が観察された。実験機器の不具合により心拍数を計測出来なかったレシピエントは、心拍数解析から除外した (IF、n=1; CC、n=1; CF、n=1; TC、n=2)。また全てのレシピエントにおける心拍数及び体温の基準値に相違は見られなかった。Intact 群のドナーより放出された警報フェロモンは、レシピエントに SIH の増強といった自律機能反応を引き起こした。レシピエントに自律機能反応を引き起こすフェロモンを放出する能力は、去勢や Testosterone 処置による影響を受けなかった (図 2-6)。統計解析の結果、警報フェロモンの存在 ($F_{(1,40)}=41.3$, $p<0.01$) 及びドナーの Testosterone ($F_{(2,40)}=10.7$, $p<0.01$) はレシピエントの SIH のみに影響を与えたことが判明した。また、心拍反応においてのみこれらの 2 要因の相互作用が有意に観察された ($F_{(2,35)}=3.91$, $p<0.05$)。Post hoc テストの結果、ドナーの Testosterone の有無にかかわらず、警報フェロモンはレシピエントの SIH を増強した (Intact、 $p<0.01$; Castrated、 $p<0.05$; T-implant、 $p<0.01$)。一方、T-implant 群より放出された警報フェロモンのみ、レシピエントにおける心拍反応を緩和した ($p<0.05$) (図 2-7)。

2-4 考察

本章において、Intact 群及び T-implant 群より放出された警報フェロモンに暴露されたレシピエントは、以前当研究室より報告されたように (Kikusui *et al.*, 2001) 行動反応及び SIH の増強を示した。一方、Castration 群より放出されたフェロモンに暴露されたレシピエントは、SIH の増強のみを示した。以上の結果より、レシピエントに行動反応を引き起こすフェロモンを放出するためにはドナーに Testosterone が必要である一方、自律機能反応を引き起こすフェロモンを放出する能力は Testosterone の有無に左右されないことが示唆された。

本章の結果より、foot shock 負荷により雄ラットが放出する警報フェロモンは 2 つのカテゴリーに分類できることが考えられた。すなわち、1 つは Testosterone 非依存性に自律機能反応を引き起こすものであり、もう 1 つは Testosterone 依存性に行動反応を引き起こすものという仮説である。本仮説は、におい物質に対する自律機能反応に行動反応は必ずしも伴わないという当研究室 Akutsu らの研究結果(Akutsu *et al.*, 2002)からも支持される。

危険を群れの仲間知らせることの重要性は雄に特異的なものではないと思われることから、レシピエントに自律機能反応を引き起こすフェロモンの方が警報フェロモンとしての普遍性がより高いと推察される。この考えは、去勢雄や雌マウスも危険情報を仲間に伝達することができるという報告(Rottman & Snowdon, 1972)からも支持される。この警報フェロモンの放出が Testosterone 非依存性であることを考えると、肛門周囲腺、手足の裏にある汗腺や呼吸上皮といった、その器官形成や活動性に Testosterone の影響が少ない器官において産生されていることが予測されるが、このフェロモンの性質や産生部位の特定にはさらなる研究が必要とされる。

本章におけるもう 1 つの重要な発見は、Testosterone 依存性に放出されてレシピエントに行動反応を引き起こすフェロモンの存在である。本章で用いたドナーは foot shock 負荷時に攻撃行動を示したが、このことは例えば foot shock 負荷といった避けられないストレスを負荷されるとラットは攻撃行動をとるという報告と一致する(Zhukov & Vinogradova, 1998)。齧歯類を含めた多くの種において攻撃行動の際ににおい放出行動が増えることが知られている(Doty, 1986)ことから、本章におけるドナーも攻撃行動由来のにおい、例えば威嚇臭を foot shock 負荷時に放出したことが推察される。このにおいによってレシピエントの覚醒状態が高まったことにより、対照群と比較して様々な行動反応が観察されたということは十分に考え得ることであろう。

ここでドナーが排泄した糞尿について触れておきたい。糞尿、特に尿は雄特異的なフェロモン源として知られており(Brown, 1977; Harvey *et al.*, 1989;

Ingersoll *et al.*, 1986)、事実ドナーラットは foot shock 負荷時に多くの糞尿を排泄したため、これらの雄特異的フェロモンの存在によって行動反応が観察されたという解釈も考えられる。しかしながら、ラットやマウスにおける警報フェロモンに対する反応は、ストレス負荷時に排泄された糞尿とは無関係であることが報告されていることから (Abel & Bilitzke, 1990; Mackay-Sim & Laing, 1980, 1981b)、本章で観察された行動反応は糞尿に含まれる雄特異的フェロモンによるものではなく、攻撃行動時に放出された警報フェロモンによるものであらうと考えられる。

本章の結果より 2 種類の警報フェロモンの存在を仮定したが、そうではなく自律機能反応及び行動反応はいずれも 1 つのフェロモンによって引き起こされており、フェロモンに対する自律機能反応の閾値が、行動反応のそれと比較して低いため、前者はいずれのドナー由来のフェロモンに対しても観察されたが、後者はフェロモン量が少なくなったと推察される去勢雄由来の警報フェロモンに対しては観察されなかったという仮説も排除できない。そのため、次章ではこの点を明らかにすると共に、警報フェロモンの放出源を探ることを目的とした実験を行うこととした。

2-5 小括

警報フェロモンの放出における Testosterone の役割について検討した。警報フェロモンに暴露されたラットが示す行動反応及び自律機能反応を生物指標として用いて、無処置雄ラット、去勢雄ラットおよび去勢した後に Testosterone propionate を皮下移植したラットという 3 種類のドナーについて、それぞれのフェロモン放出能力を評価した。レシピエントに自律機能反応を引き起こすフェロモンを放出する能力は Testosterone の有無に影響を受けない一方で、行動反応を引き起こすフェロモンを放出する能力は去勢により著しく減少し、Testosterone 処置により完全に回復した。以上の結果より、雄ラットが放出

する警報フェロモンは、その放出の Testosterone 依存性によって 2 つのカテゴリーに分類できることが示唆された。

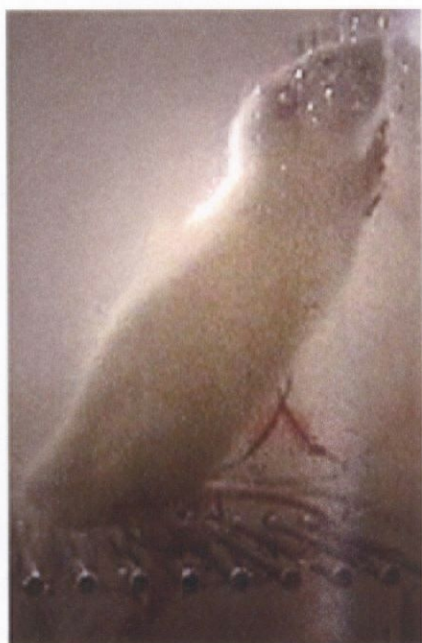
Freezing



Grooming



Rearing



Resting



図 2-1：解析を行った各行動反応

ドナー: Intact群

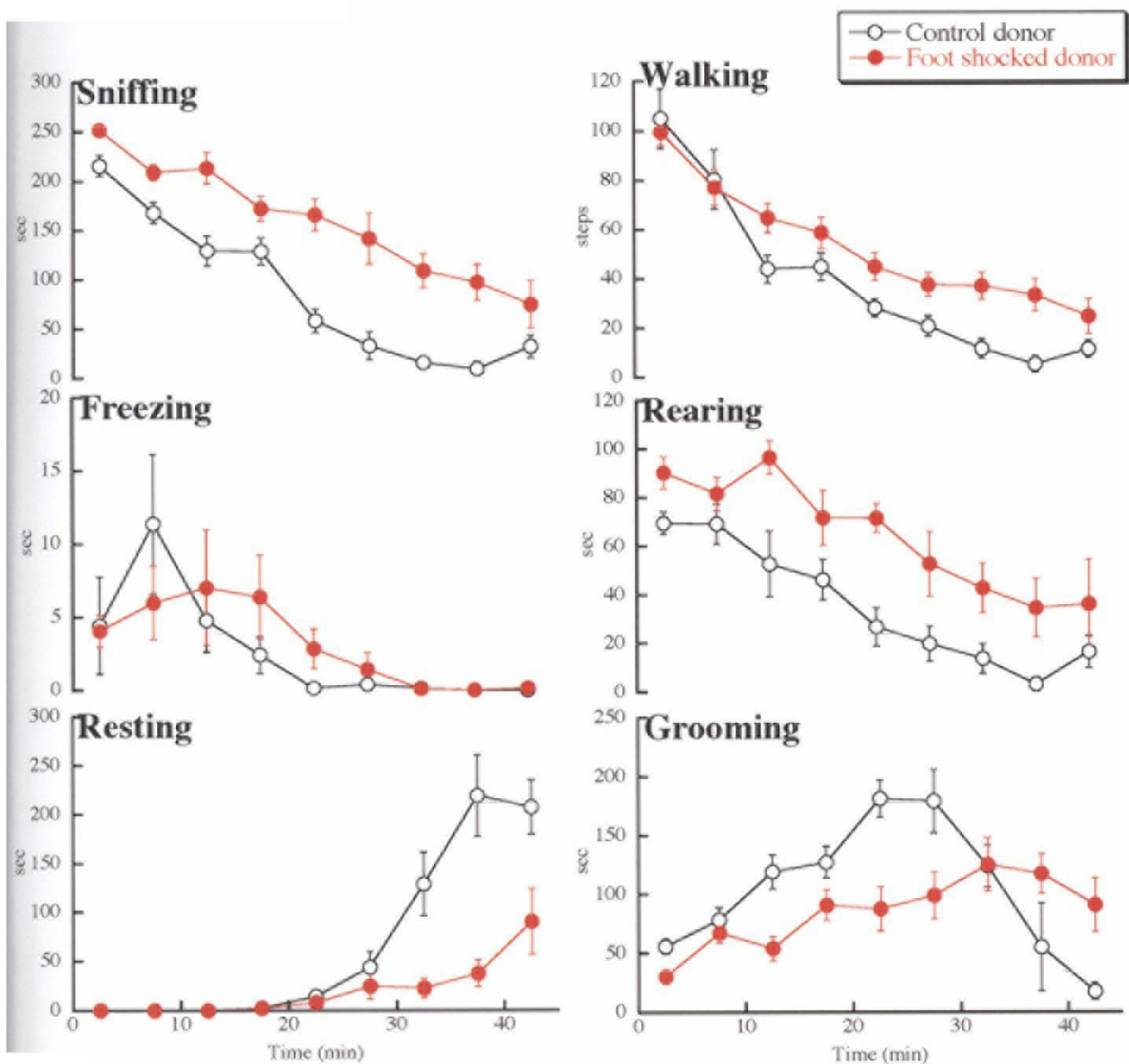


図 2-2 : Intact 群由来の警報フェロモンが存在する箱 (Foot shocked donor) もしくは対照箱 (Control donor) に導入されたレシピエントの経時的行動変化

ドナー:Castration群

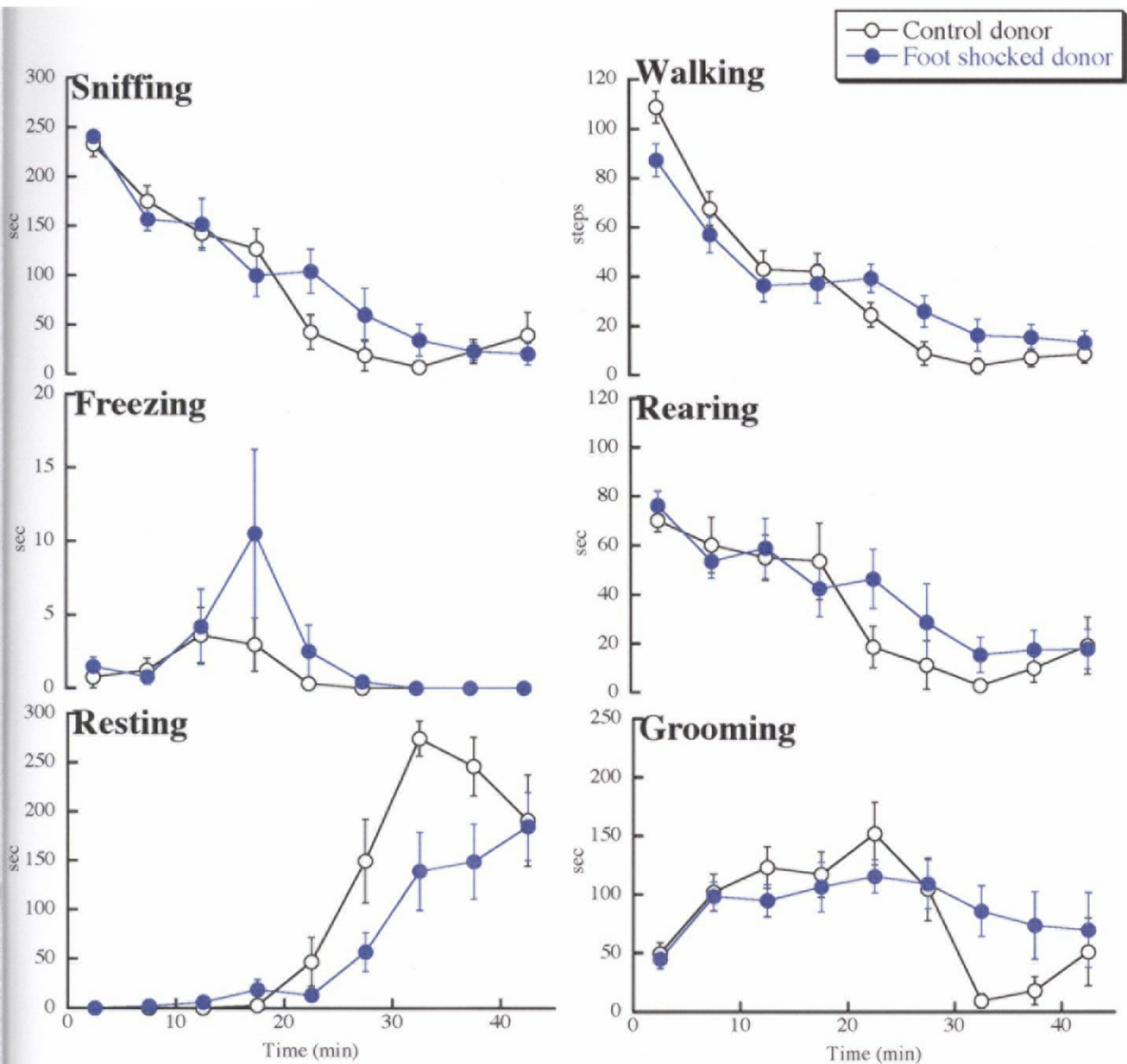


図 2-3 : Castration 群由来の警報フェロモンが存在する箱 (Foot shocked donor) もしくは対照箱 (Control donor) に導入されたレシピエントの経時的行動変化

ドナー:T-implant群

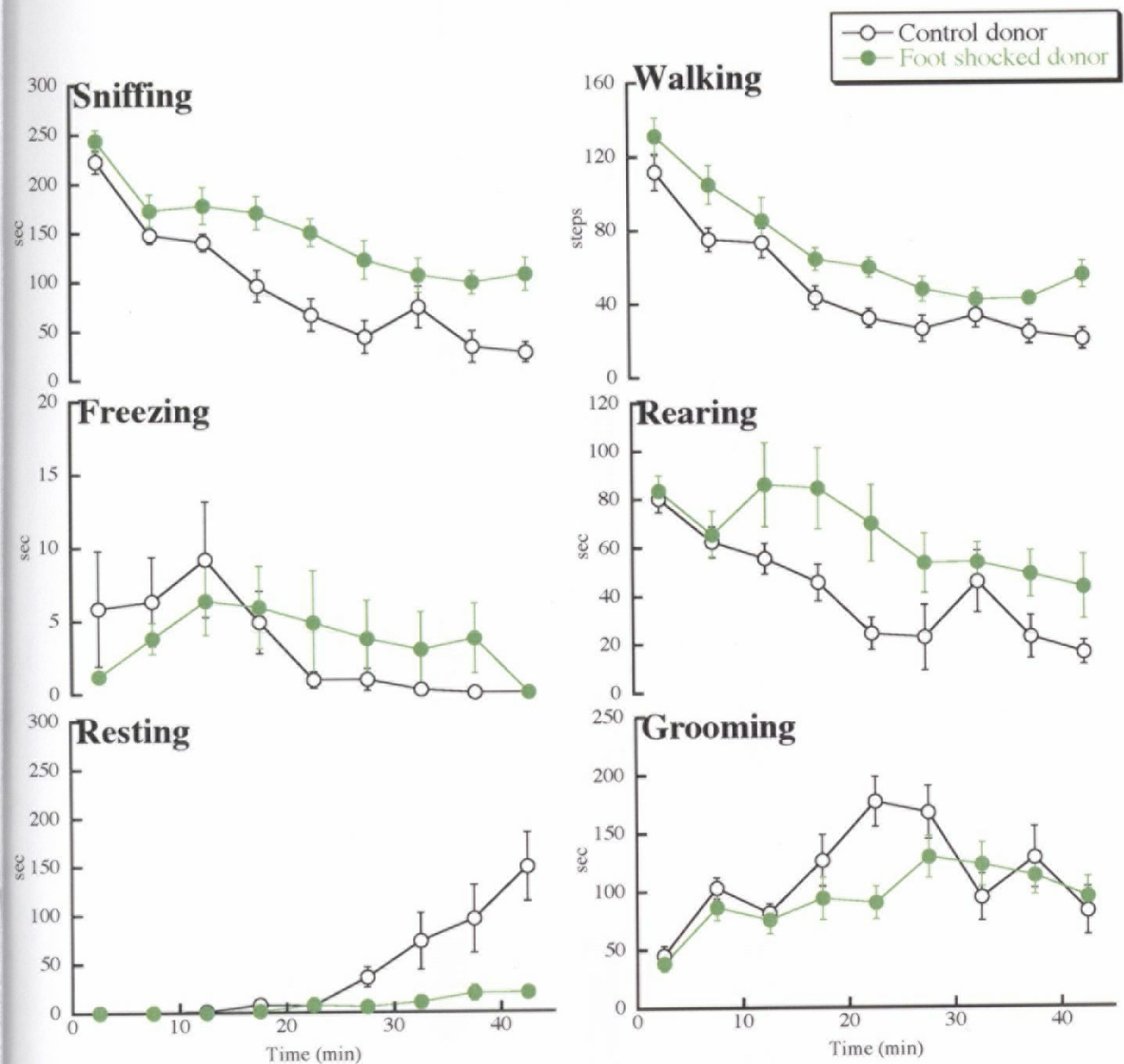


図 2-4 : T-implant 群由来の警報フェロモンが存在する箱 (Foot shocked donor) もしくは対照箱 (Control donor) に導入されたレシピエントの経時的行動変化

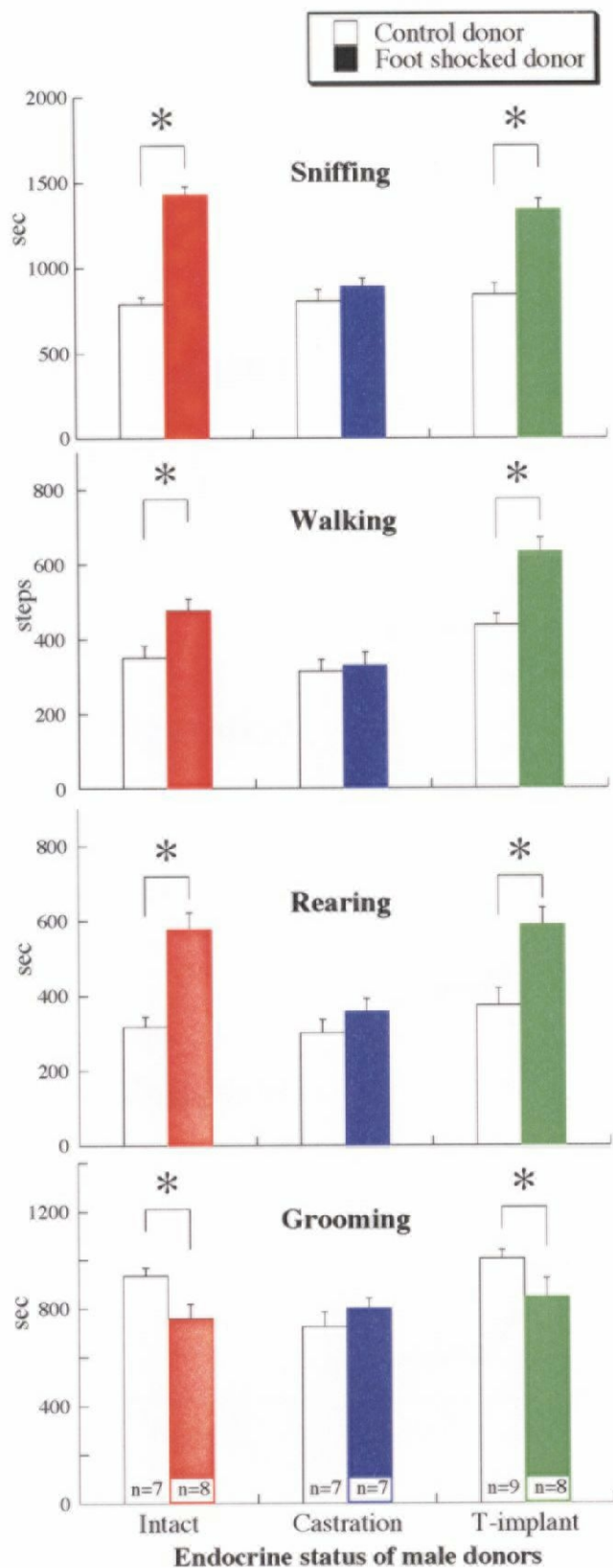


図 2-5：無処置雄 (Intact)、去勢雄 (Castration) および Testosterone 処置去勢雄 (T-implant) 由来の警報フェロモンが存在する箱 (Foot shocked donor) もしくは対照箱 (Control donor) に導入されたレシピエントの行動反応。* $p < 0.05$ (MANOVA followed by Fisher's PLSD post hoc test)

Heart Rate

Temperature

○ Control donor
● Foot shocked donor

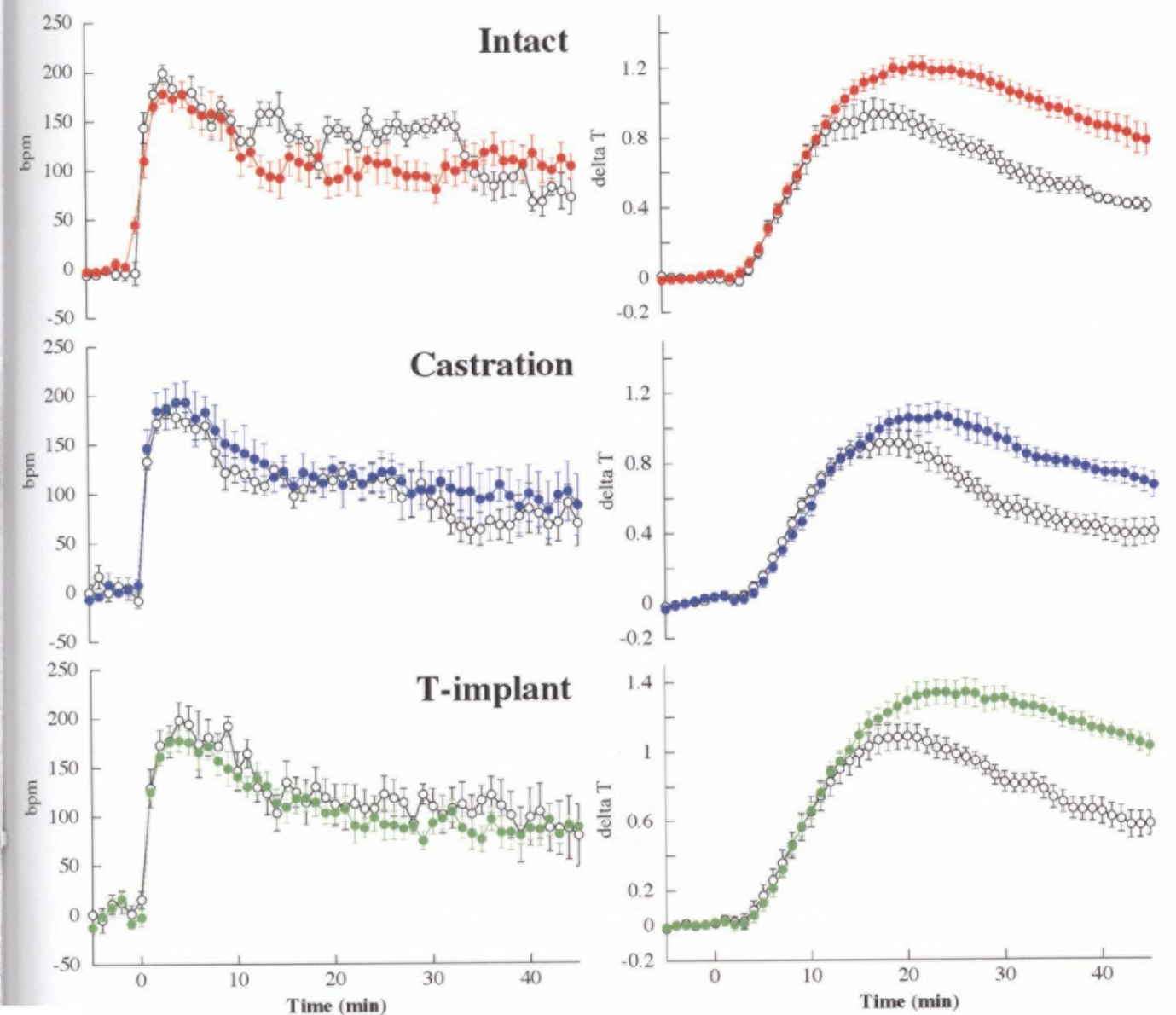


図 2-6 : 無処置雄 (Intact)、去勢雄 (Castration) および Testosterone 処置雄 (T-implant) 由来の警報フェロモンが存在する箱 (Foot shocked donor) もしくは対照箱 (Control donor) に導入されたレシピエントにおける自律機能の経時的推移

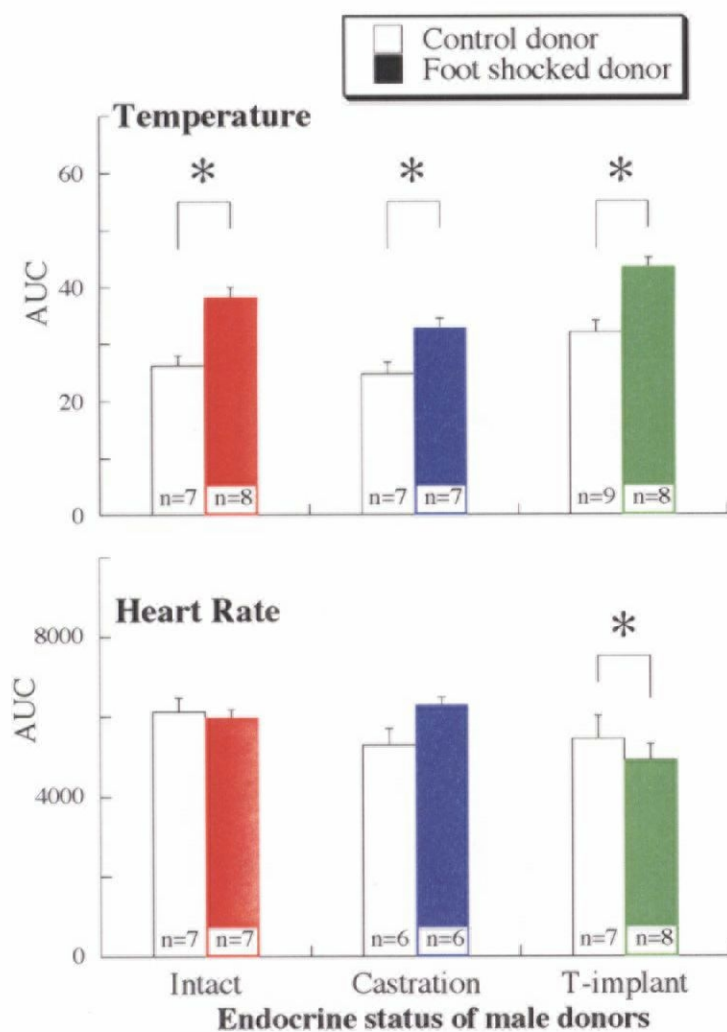


図 2-7：無処置雄（Intact）、去勢雄（Castration）および Testosterone 処置去勢雄（T-implant）由来の警報フェロモンが存在する箱（Foot shocked donor）もしくは対照箱（Control donor）に導入されたレシピエントの自律機能反応。* $p < 0.05$ （ANOVA followed by Fisher's PLSD post hoc test）

第3章

警報フェロモン放出部位の検討

3-1 緒言

動物は脅威にさらされたり、ストレスを負荷されたりした時に種特異的な防御反応を示すことが知られており、その中でも立毛は齧歯類を含め多くの種においてみられる反応である(Dettling *et al.*, 1998; Fernandez-Espejo & Mir, 1990; Levine *et al.*, 1990; Li *et al.*, 1997)。例えば、ラットは foot shock を負荷された時に立毛を示すことが知られている(Ichimarū & Gomita, 1987)。立毛は毛胞に関連する筋肉の収縮によって起き、この筋収縮により同時に毛胞や周囲に存在する皮脂腺内容物が放出されるため、立毛はにのいの放出を伴う(Flood, 1985)。さらに、立毛の結果皮膚表面の空気循環が良くなるためににのい放出がさらに効果的に行われる(Flood, 1985)。もう一つのよく知られている防御反応は、にのい物質を作ることに特化した腺である肛門周囲腺の内容物の放出である。この腺はラットを含めて多くの種で肛門上皮の直下にある(Crump, 1980; Montagna & Noback, 1947; Montagna & Parks, 1948; Zhang *et al.*, 2002)、例えばスカンクや狐など、その分泌物は防御や警報の目的で使われていることが逸話的に知られている(Albone & Fox, 1971; Blackman, 1911; Donovan, 1967)。以上のことから、ストレス負荷時における警報フェロモン放出は、同じくストレス負荷時に観察される立毛と肛門周囲腺内容物の放出といった2つの防御反応と大いに関わりがあると推察される。

本章では、警報フェロモンの放出部位を検討するために2つの警報フェロモンをそれぞれ1つずつ放出させることを試みるとともに、警報フェロモンは2つのカテゴリーに分類出来るという前章で立てた仮説について検証した。麻酔したドナーを実験箱に導入し、その頬部、頸部及び腰部の体表に局部電気刺激を負荷することで人工的に立毛をおこし、それに伴うにのい放出を促した。また、肛門周囲腺内容物の放出を促すために肛門周囲部にも局部電気刺激を加えた。その後、ドナーを取り出してレシピエントを導入し、レシピエントの行動反応及び自律機能反応を観察することで、実験箱中のフェロモン活性を評価し

た。

3-2 材料と方法

3-2-1 実験動物

実験には第 2 章と同じく、Wistar 系雄ラット（日本クレア株式会社）を使用した。動物は温度（ $24 \pm 1^\circ\text{C}$ ）相対湿度（ $45 \pm 5\%$ ）と明暗周期（8 時～20 時：明期）が管理された部屋において 1 ケージ 3～4 頭で飼育し、導入後 1 週間以上の馴化期間をおいた後、9～10 週齢で実験に供試した。実験期間中は、固形飼料（ラボ MR ブリーダー、日本農産工業株式会社）を給餌し、水は自由摂取とした。すべての実験は 9 時から 18 時の間に行った。

3-2-2 フェロモン受容ラット（レシピエント）の作製

送信機を体温のみを測定するものへと変更し（TA11TA-F40、Data Sciences International）、それに伴い埋め込み手術の際使用する麻酔をエーテルへと変更した以外は、第 2 章の方法に従った。

3-2-3 実験手順と装置

基本的に第 2 章の方法に準じた。1 頭のレシピエントに対して 3 頭の雄ラットをドナーとして用いた。第 2 章の実験でみられた、警報フェロモンは一般的なラット臭と共に存在するという状況を模倣するため、最初に 2 頭の覚醒状態にある雄ラットを実験箱に導入することで一般的なラット臭を放出させ、その後ペンタバルビタールナトリウム麻酔下のドナー（50mg/kg、i.p.ネンブタール、アボットラボラトリーズ）を導入して、それぞれの部位に対して局部刺激を負荷することで、部位特異的なにおいを放出させた。すなわち、2 頭の雄ラットを実験箱に 7 分間導入した後に取り除き、次に頬部（Whisker）、頸部（Neck）、腰部（Rump）もしくは肛門周囲部（Anal）の表皮に、局部刺激を

行うための 2 本の針 (27G) を刺された麻酔下のドナーを 8 分間導入した (図 3-1)。肛門周囲腺は肛門を囲む多数の粒のように存在するため、肛門周囲部の針はドナーの肛門を挟むように両脇に刺した。この 8 分間の間に、ドナーは 8 回の電気刺激 (10V、1 秒) を 1 分間隔で負荷された。この刺激の強度は予備観察に基づいて決定しており、皮膚に傷害を与えることなく、実験者が感じ取れるほどのにおいの放出を促すものである。刺針や電気刺激は出血や目に見える傷害を皮膚に与えず、針を抜いた後は刺激を負荷した領域を肉眼で特定するのは不可能であった。麻酔下のドナーを導入するものの刺激を加えなかった箱を対照箱として用いた。

電気刺激の後、実験箱は別室に存在する防音箱の中に設置した。実験開始直前 5 分間の体温が 37.0℃～37.5℃のレシピエントを供試し、それぞれの実験箱に 45 分間導入した。レシピエントはドナーの刺激部位に基づいて無作為に 5 群を用意した、すなわち、Whisker 群 (n=6)、Neck 群 (n=7)、Rump 群 (n=7)、Anal 群 (n=7)、および Control 群 (n=7) である。それぞれの箱に導入後 45 分間にわたって実験箱内の行動をデジタルビデオカメラ (DCR-TRV18, SONY) で録画し、さらに体温は送信機からの信号を受信ボード (RLA1020 RPC-1, Data Sciences International) を通して記録・解析を行った (Dataquest LabPRO 3.10, Data Sciences International)。実験箱は、使用後毎回洗剤にて洗浄し、次の実験へのにおいの残留の影響を排除した。レシピエントは 1 回のみ使用したが、ドナーは時に 3、4 回、最低限 1 週間の間隔をおいて繰り返し使用した。

3-2-4 解析および統計処理

すべての統計処理は Stat View J 4.51.1 (Abacus Concepts) を用いて行い、有意水準は 5%とした。行動及び自律機能反応の解析は第 2 章の方法に準じた。

行動反応は、Sniffing、Freezing、Resting、Rearing、Grooming 及び Walking を指標として用い、Walking はその頻度を、それ以外の 5 つの行動は合計発現

時間を示した。各群の行動の比較は MANOVA を用いて行い、post hoc テストには Dunnett の検定を用いて Control 群と比較した。

体温の変化は 1 分ごとに記録した。実験開始前 5 分間の Home cage にいる間の値の平均を基準値にして、そこからの変化量を算出し、AUC を用いて示した。体温の比較は ANOVA を用いて解析を行い、post hoc テストには Dunnett の検定を用いて Control 群と比較した。

3-3 結果

実験箱が新奇環境として働くため、全てのレシピエントにおいて自律機能反応が観察された。電気刺激に伴って放出された 4 種類のにおいのうち、肛門周囲部由来のにおいのみ、レシピエントの SIH を増強した (図 3-2)。統計解析の結果、自律機能反応はドナーの刺激部位により有意に変化し ($F_{(4,29)}=3.84$, $p<0.05$)、肛門周囲より放出されたにおいのみ、対照群と比較して有意に SIH を増強した ($p<0.05$) (図 3-3)。

自律機能反応と共にレシピエントの行動反応もまた、電気刺激に伴ってドナーから放出されたにおいに影響を受け、頬部由来のにおいの存在はレシピエントに行動反応を引き起こす (図 3-4) 一方で、頸部 (図 3-5)、腰部 (図 3-6) および肛門周囲部 (図 3-7) 由来のにおいの存在は行動反応に影響を与えなかった。統計解析の結果、レシピエントの行動反応はドナーの刺激部位により有意な影響を受けることが明らかとなった ($F_{(24,90)}=3.73$, $p<0.01$)。Post hoc テストの結果、自律機能反応とは異なり、頬部より放出されたにおいのみ有意にレシピエントの行動反応を引き起こすことが明らかとなった。すなわち、Sniffing ($p<0.05$) と Rearing ($p<0.05$) の持続時間を増加させ、Walking ($p<0.05$) を増加させると共に、Resting ($p<0.05$) の持続時間を減少させた (図 3-8)。Grooming と Freezing の持続時間においては、ドナーから放出されたにおいの影響は観察されなかった (Grooming: Whisker, 1034 ± 132 ;

Neck、 918 ± 90 ; Rump、 989 ± 66 ; Anal、 827 ± 62 ; Control、 858 ± 134 ;
Freezing: Whisker、 10.6 ± 3.0 ; Neck、 24.1 ± 9.2 ; Rump、 8.4 ± 3.1 ; Anal、 17.3 ± 5.6 ; Control、 10.3 ± 2.1 sec) (Mean \pm S.E.M.)。

3-4 考察

本章の結果より、局部電気刺激により麻酔下ドナーラットの頬部より放出されたにおいてはレシピエントに行動反応を引き起こす一方で、肛門周囲部より放出されたにおいては自律機能反応を引き起こすことが明らかとなった。また、頸部や腰部より放出されたにおいてはそのどちらの反応にも影響を与えないことが明らかとなった。局部刺激によって放出された、頬部および肛門周囲部のにおいてそれぞれ引き起こされた行動反応および自律機能反応の強度および経時的变化は、覚醒下のドナーより放出された警報フェロモンによって引き起こされた反応と類似するものであった。これらの結果より、頬部および肛門周囲部よりそれぞれ放出されたにおいては、第 2 章においてその存在を示唆されていた、自律機能反応および行動反応をそれぞれ引き起こす 2 種類の警報フェロモンであるということが示唆された。これらの結果は、警報フェロモンは体表より放出されているであろうとするこれまでの報告と一致するものである (Abel, 1991b, 1992; Abel & Bilitzke, 1990; Hornbuckle & Beall, 1974; Mackay-Sim & Laing, 1980; Rottman & Snowdon, 1972)。

行動反応を引き起こすフェロモンは、皮脂腺より Testosterone 依存性に放出されることが考えられる。Testosterone は皮脂腺の生理的活動を維持するのに不可欠なホルモンである事が知られており (Lecaque & Secchi, 1982)、いくつかの雄フェロモンは Testosterone 依存性に放出されることが示されている (Gawienowski *et al.*, 1976; Novotny *et al.*, 1990)。第 2 章の結果より行動反応を引き起こす警報フェロモンも Testosterone 依存性であることが示されたことより、行動反応を引き起こす警報フェロモンは皮脂腺で生産されている

と考えられる。

またこのフェロモンは頬部の皮脂腺特異的に産生され、立毛にともなって放出されることが考えられる。この仮説は、皮脂腺より生産される性フェロモンはやギにおいて体の部位特異的に産生されるという報告(Iwata *et al.*, 2000; Wakabayashi *et al.*, 2000)や、捕食者や攻撃的な同種他個体に遭遇した時にヤマアラシは警報臭を立毛にともなって放出するという報告(Li *et al.*, 1997)によっても支持される。ラットにおいて、皮脂腺は頬部を含めた体表に存在し(Fundin *et al.*, 1997; Rice *et al.*, 1993)、また立毛は防御反応の一つであることが知られている(Fernandez-Espejo & Mir, 1990)。これらの報告を考え合わせると、行動反応を引き起こす警報フェロモンは、頬部の皮脂腺特異的に産生され、防御行動を示したラットの立毛にともなって放出されることが考えられる。

もう一つの警報フェロモン、すなわちレシピエントに自律機能反応を引き起こすフェロモンは、肛門周囲部、おそらく肛門周囲腺より Testosterone 非依存性に放出されることが考えられる。肛門周囲腺は雌雄において大きな違いはなく(Montagna & Noback, 1947)、また他の分泌腺と比較して内因性 Testosterone の影響を受けにくい腺であることが知られている(Jannett, 1978)。さらに第 2 章において、去勢雄より放出された警報フェロモンはレシピエントに自律機能反応のみを引き起こすことを示した。様々な種において肛門周囲腺内容物の化学的組成を検討した報告は存在するものの(Albone & Fox, 1971; Aldrich, 1896; Andersen & Bernstein, 1975; Crump, 1980; Zhang *et al.*, 2002)、その生物学的意義を検証した報告はほとんど無い(Zhang *et al.*, 2003)。Donovan は以前の研究において、恐怖を感じた犬より自発的に放出された肛門周囲腺内容物は成熟犬に対して忌避作用を持つものの、人工的に絞り出されたものは性的誘因性を持つことを報告している(Donovan, 1967, 1969)。さらに、仔犬は自発的に放出された肛門周囲腺内容物に対して忌避反応を示さないことも報告している(Donovan, 1967, 1969)。仔ラットは強制水泳試験において警報フェ

ロモンに対して 26 日齢まで反応を示さない(Abel, 1993)という、反応の個体発生を考えあわせると、ラットにおいて肛門周囲腺内容物が自律機能反応を引き起こす警報フェロモン源であると考えられる。

3-5 小括

雄ラットが放出する警報フェロモンの放出部位を検討するとともに、“警報フェロモンが 2 つのカテゴリーに分類できる”という前章で立てた仮説について検証した。実験箱内にて麻酔したドナーの頬部、頸部、腰部もしくは肛門周囲部に対して局部電気刺激を行うことで部位特異的なにおいを放出させた。その後、実験箱に導入されたレシピエントの行動反応および自律機能反応を生物指標として用いて、それぞれのにおいのフェロモン活性を判定した。肛門周囲部への電気刺激に伴って放出されたにおいはレシピエントに SIH の増強を引き起こし、一方、頬部への電気刺激に伴って放出されたにおいは、レシピエントに Sniffing、Rearing、Walking の増加と Resting の減少といった行動反応を引き起こすことが明らかとなった。以上の結果より、第 2 章で立てた仮説通り、雄ラットが放出する警報フェロモンは 2 種類に分類することができ、レシピエントに行動反応を引き起こすものは頬部より、自律機能反応を引き起こすものは肛門周囲部より、それぞれ放出されることが示唆された。

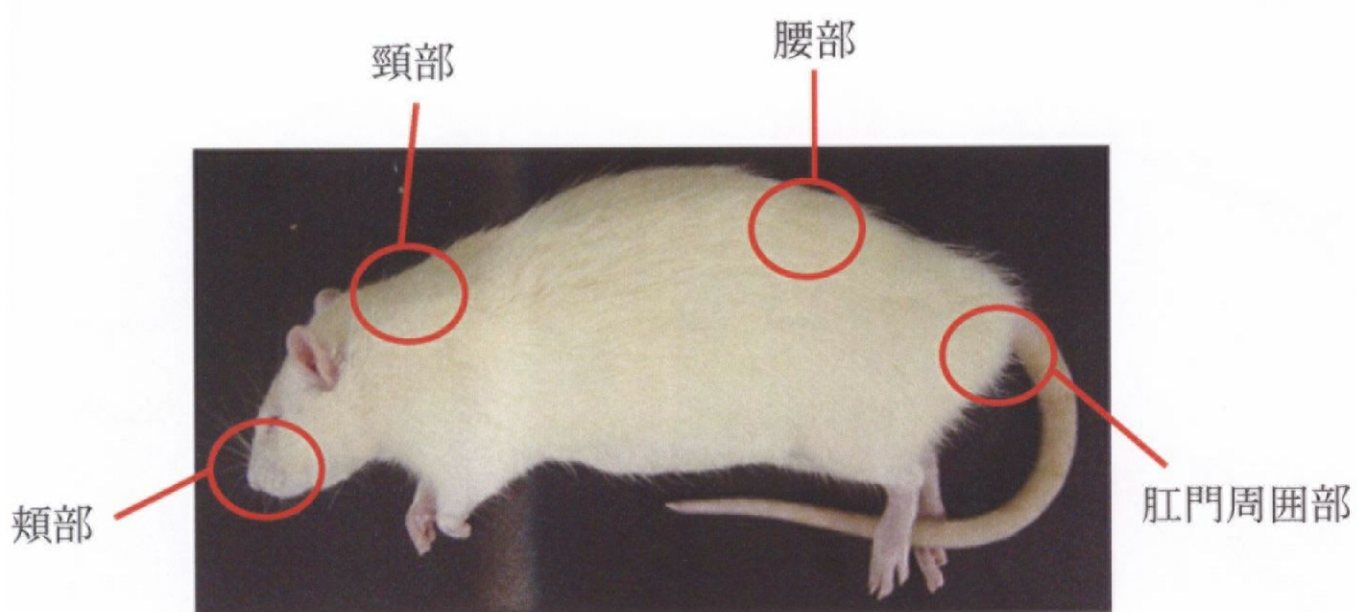


図 3-1 : 麻酔下ドナーに対して負荷した局部電気刺激の部位

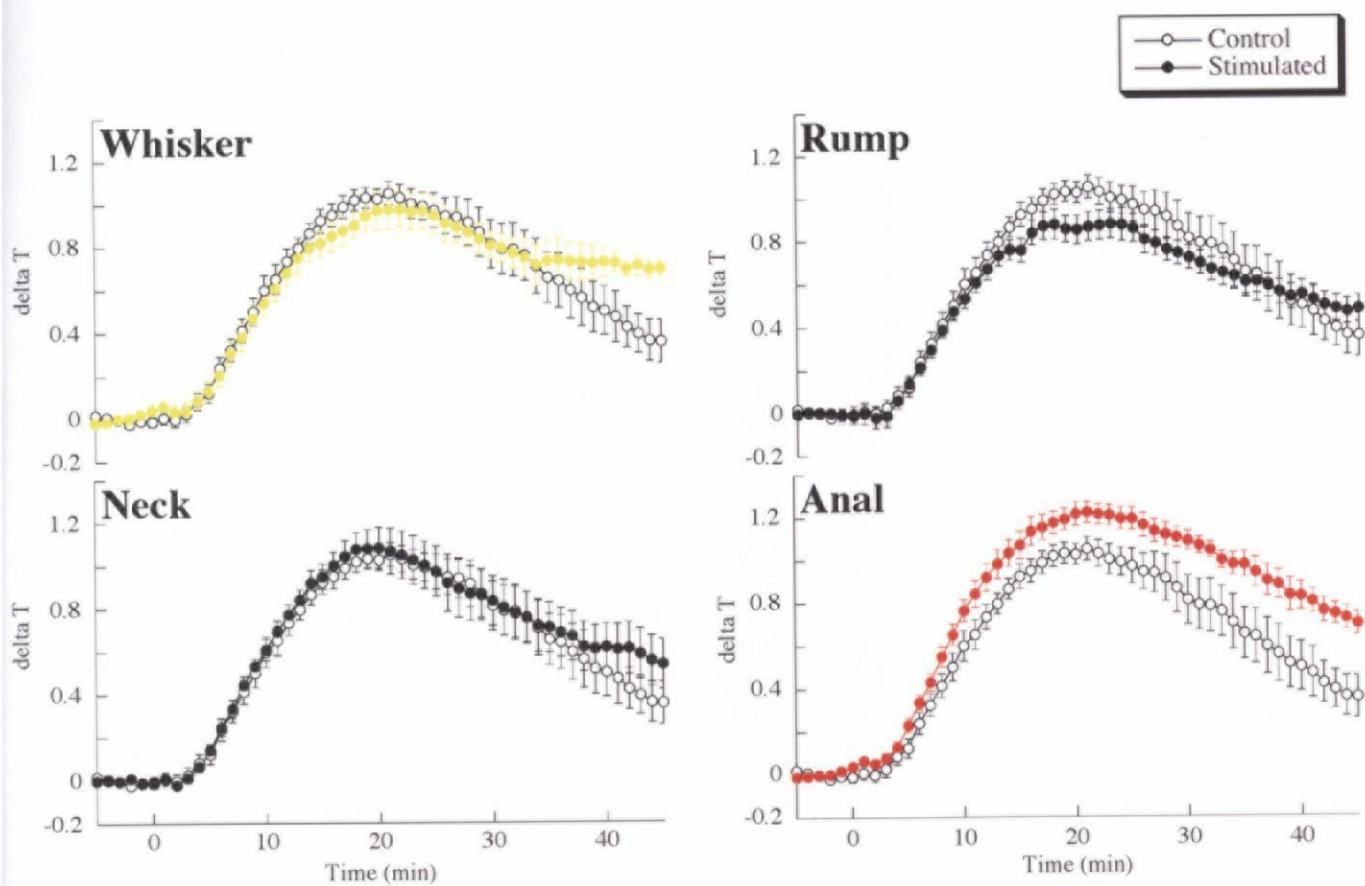


図 3-2 : 麻酔下ドナーの頬部 (Whisker)、頸部 (Neck)、腰部 (Rump) および肛門周囲部 (Anal) 由来のにおいが存在する箱 (Stimulated) もしくは対照箱 (Control) に導入されたレシピエントの経時的体温変化

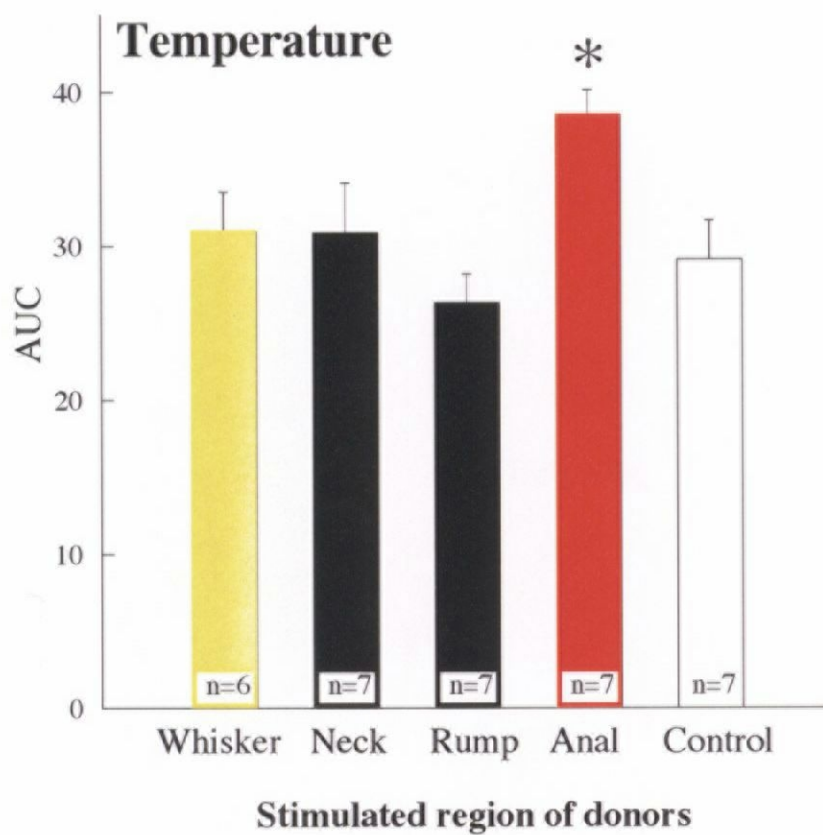


図 3-3：麻酔下ドナーの頬部（Whisker）、頸部（Neck）、腰部（Rump）および肛門周囲部（Anal）由来のにおいが存在する箱（Stimulated）もしくは対照箱（Control）に導入されたレシピエントの体温反応。Area under the curves（AUC）を用いて示した。* $p < 0.05$ （ANOVA followed by Dunnett's post hoc test）

刺激部位：頬部 (Whisker)

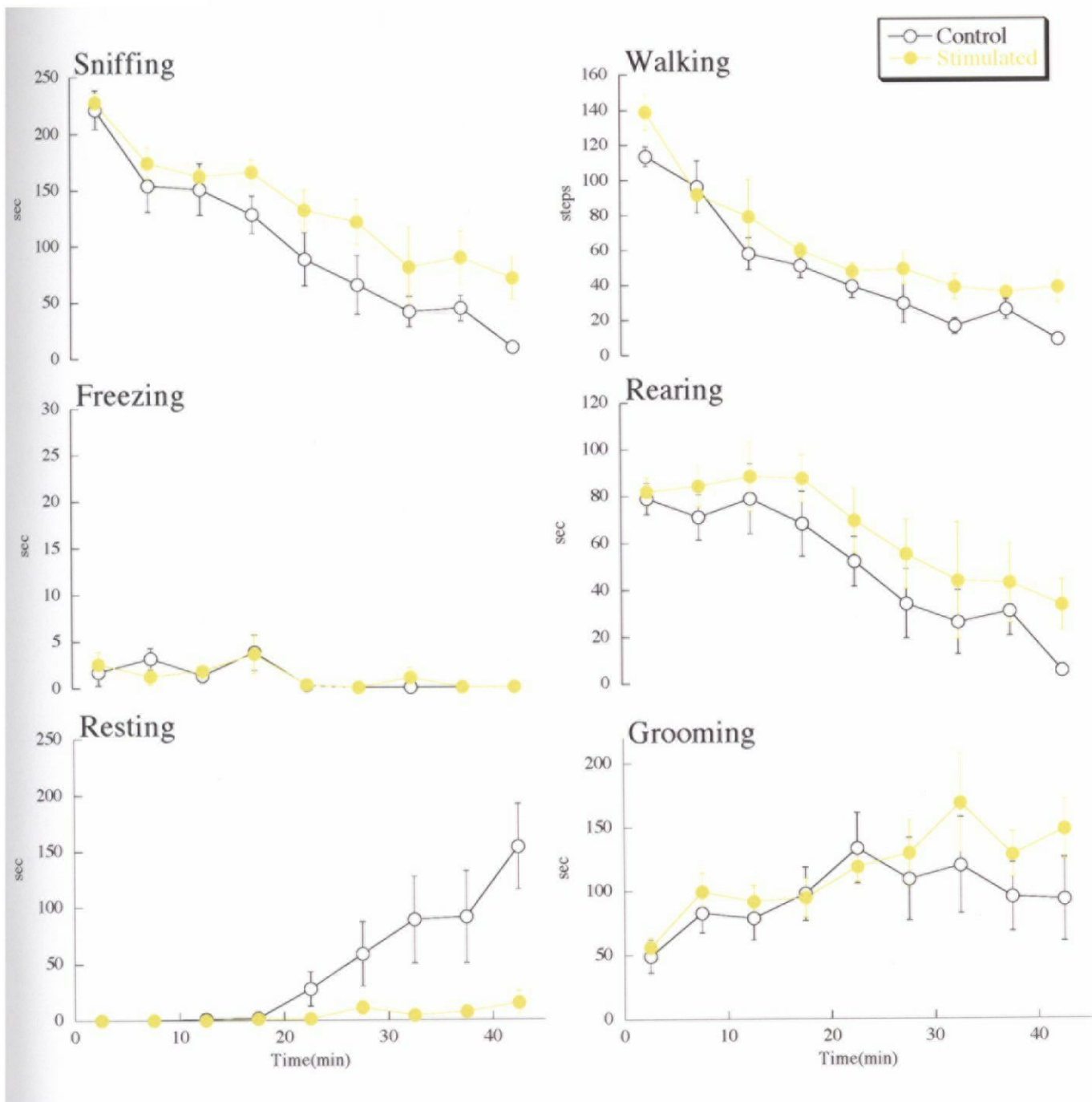


図 3-4：麻酔下ドナーの頬部由来のにおいが存在する箱 (Stimulated) もしくは対照箱 (Control) に導入されたレシピエントの経時的行動変化

刺激部位：頸部 (Neck)

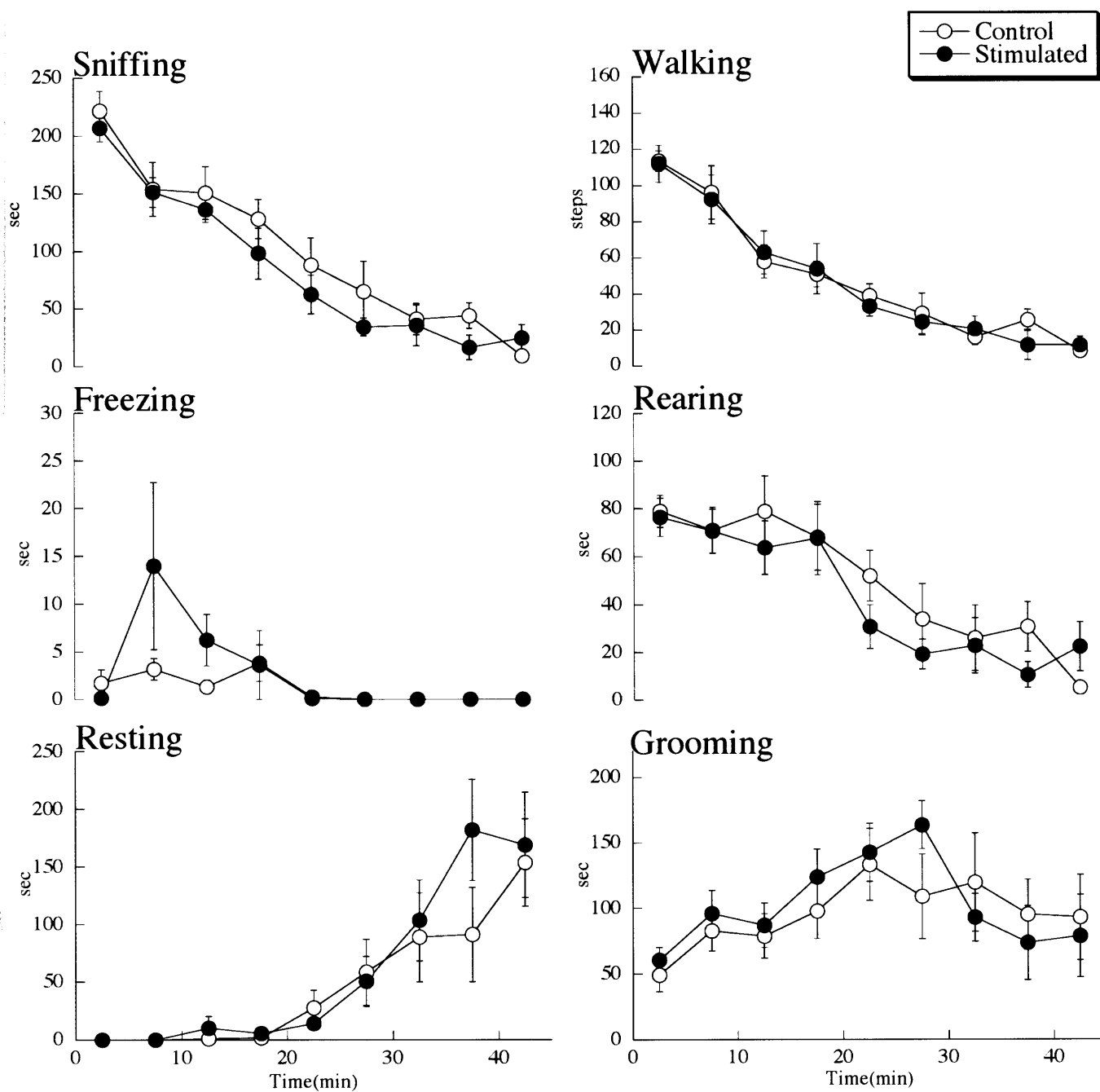


図 3-5：麻酔下ドナーの頸部由来のにおいが存在する箱 (Stimulated) もしくは対照箱 (Control) に導入されたレシピエントの経時的行動変化

刺激部位：腰部 (Rump)

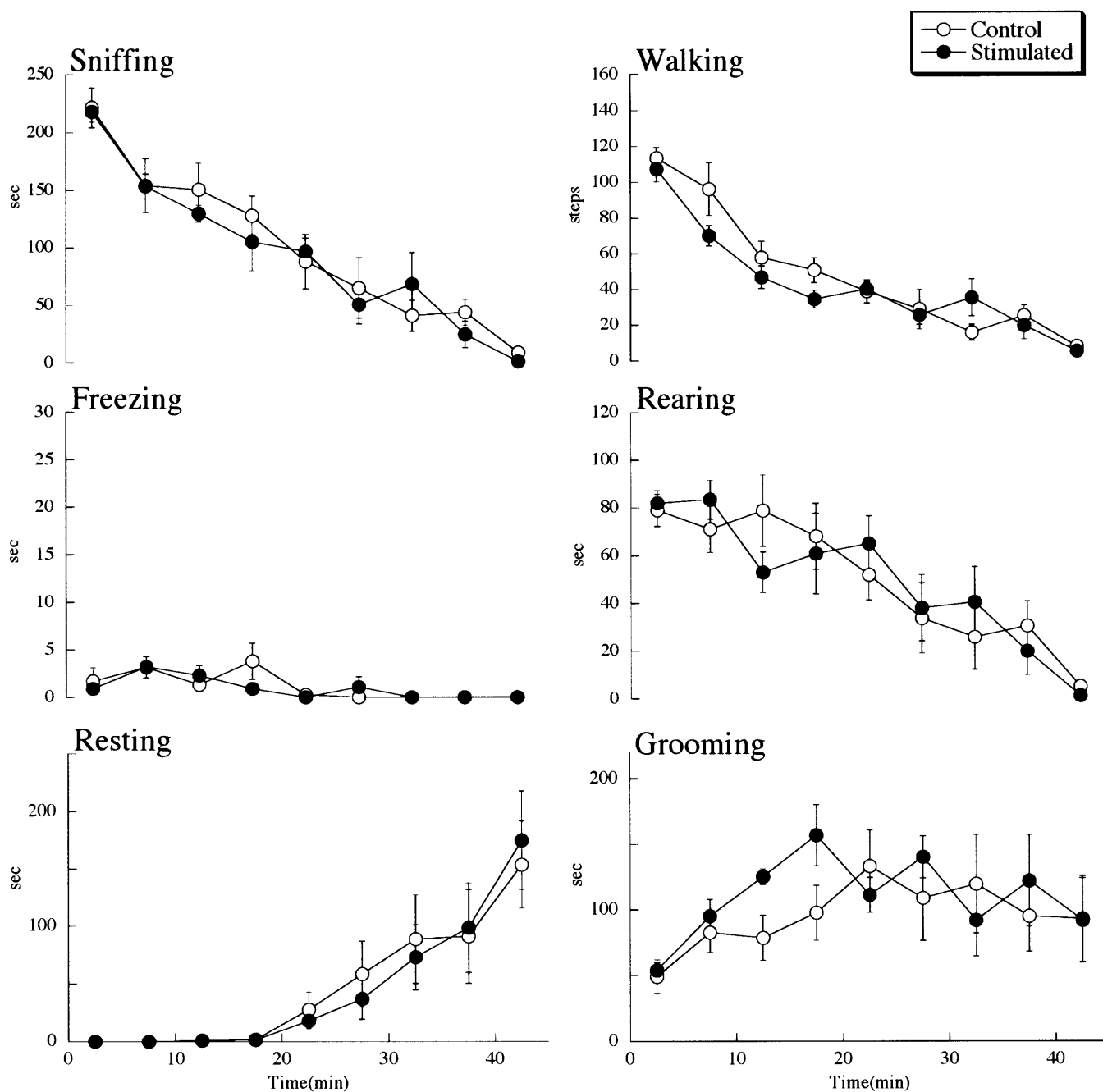


図 3-6：麻酔下ドナーの腰部由来のにおいが存在する箱 (Stimulated) もしくは対照箱 (Control) に導入されたレシピエントの経時的行動変化

刺激部位：肛門周囲部 (Anal)

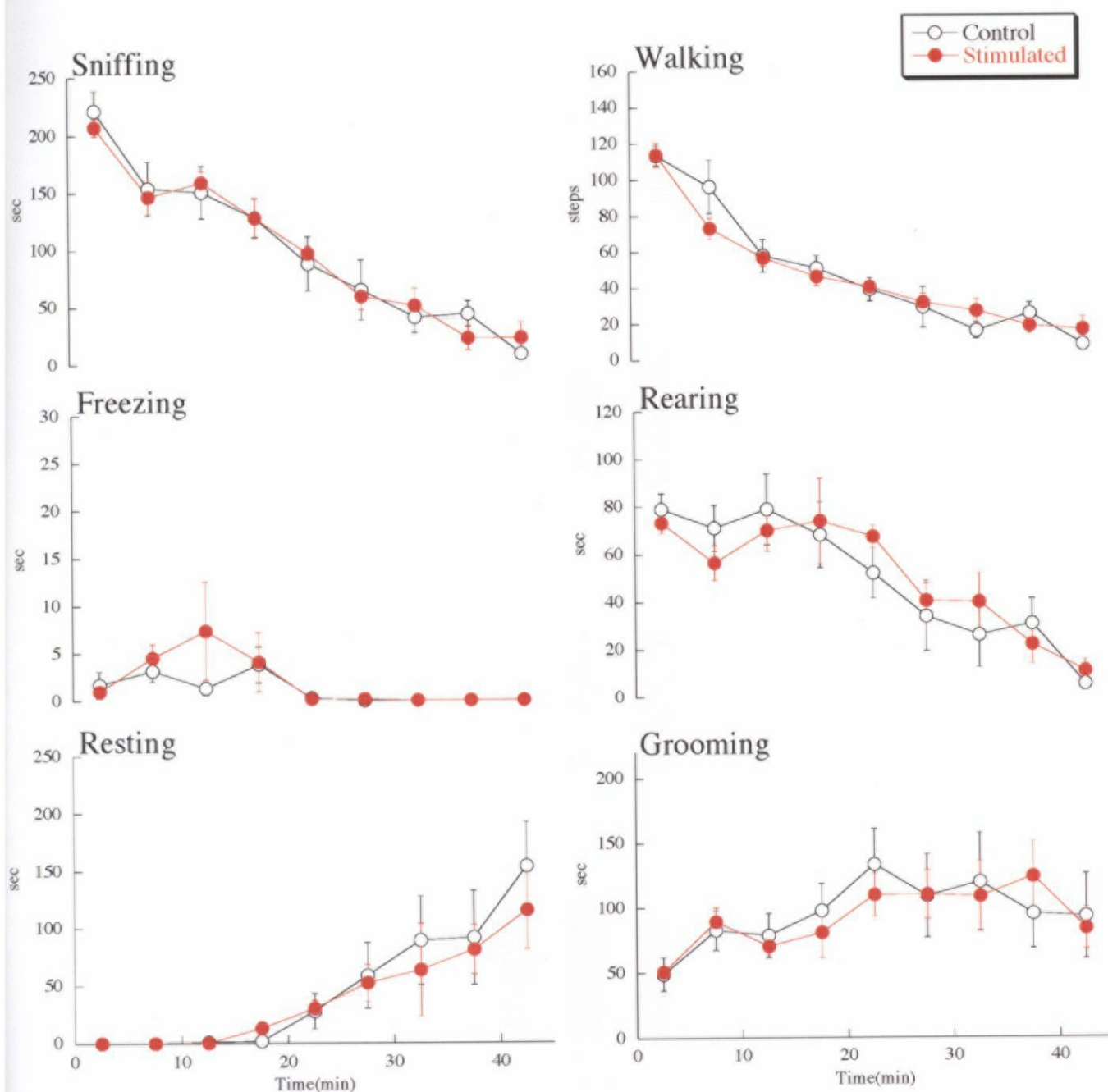


図 3-7：麻酔下ドナーの肛門周囲部由来のにおいが存在する箱 (Stimulated) もしくは対照箱 (Control) に導入されたレシピエントの経時的行動変化

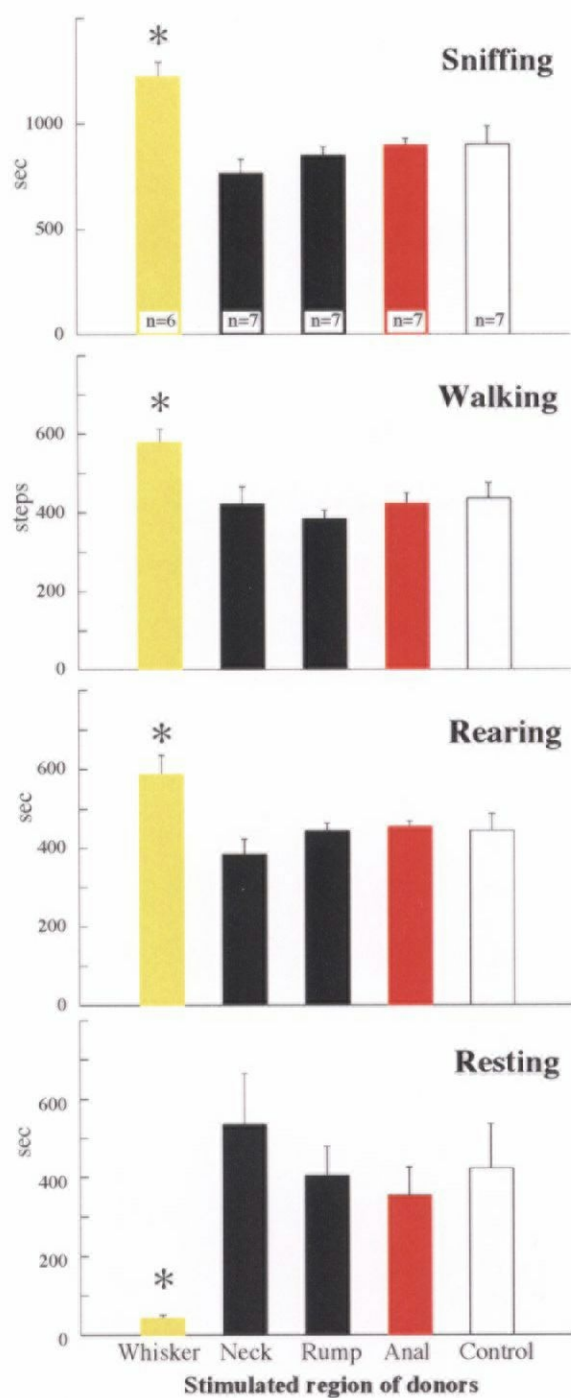


図 3-8 : 麻酔下ドナーの頬部 (Whisker)、頸部 (Neck)、腰部 (Rump) および肛門周囲部 (Anal) 由来のにおいが存在する箱 (Stimulated) もしくは対照箱 (Control) に導入されたレシピエントの行動反応。* $p < 0.05$ (MANOVA followed by Dunnett's post hoc test)