

第4章

フェロモン受容に関わる脳内領域の解析

4-1 緒言

第2章および第3章の結果より、ストレスを受けた雄ラットが放出する警報フェロモンは2種に分類できることが明らかとなった。群れの仲間に危険を知らせることの必要性は雄に限定されることなく、またSIHの強度はその動物の不安状態を反映しているということ(Lecci *et al.*, 1990; Olivier *et al.*, 2003)を考えると、Testosterone 非依存性にレシピエントにおいてSIHの増強を引き起こすフェロモンの方が、生物学的により重要であると思われるため、以後の研究ではこのフェロモンに注目することとした。

実験動物において脳内神経機構を広範囲にわたって解析する場合、Fos 蛋白質に対する免疫組織化学的手法は広く用いられており(Bisler *et al.*, 2002; Kovacs, 1998; Sagar *et al.*, 1988)、その手法を用いることで、恐怖や不安により引き起こされる反応に重要な働きをしている脳内のいくつかの領域が示唆されている。前章までにおいて、警報フェロモンに対する行動反応及び自律機能反応は示されたものの、その背景に存在する神経機構は未だ不明である。恐怖や不安反応は同種間の化学情報伝達だけではなく、異種間の化学情報伝達、例えば捕食者のにおいへの暴露等によっても引き起こされる。例えば、ラットは猫のにおいに暴露されると生得的に恐怖反応や危険評価行動を示すことが知られている(R. J. Blanchard & Blanchard, 1989; McGregor *et al.*, 2002)。近年 Fos 蛋白質に対する免疫組織化学的手法を用いて、猫のにおいに暴露されたラットの脳の解析が広範囲にわたって行われた(Dielenberg, Hunt *et al.*, 2001; McGregor *et al.*, 2004)。そのため、同種間化学情報伝達（警報フェロモン）によって活性化される脳の領域と、異種間化学情報伝達（猫のにおい）によって活性化される領域とを比較することは、興味深く思われる。

本章では警報フェロモンに60分間暴露した後に、脳内の26領域におけるFos蛋白質の発現を観察し、対照臭へ暴露した個体との比較を行うことにより、警報フェロモン受容に関わる脳内領域を検討した。

4-2 材料と方法

4-2-1 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（F-1、株式会社船橋農場、千葉）を給餌し、水は自由摂取とした。レシピエントの作製は第 3 章の方法を用いた。

4-2-2 実験手順と装置

基本的に第 3 章の方法に準じた。ペント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）を実験箱に 15 分間導入して、その間に頸部もしくは肛門周囲部それぞれの部位に対して 15 回（10V、1 秒）の局部刺激を負荷した。前章までの結果に基づき、肛門周囲部への局部刺激は警報フェロモンの放出を促すために行い、また頸部への刺激は、肛門周囲部への局部刺激に伴って放出されるにおいとほぼ同量であるが、レシピエントの行動反応や自律機能反応に影響を与えないにおいを放出させるために行った。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、レシピエントをそれぞれの実験箱に 60 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 2 群を用意した、すなわち、Alarm pheromone 群（n=7）、および Control 群（n=8）である。それぞれの箱に導入後 60 分間にわたっての体温変化および活動量は、送信機からの信号を受信ボード（RLA1020 RPC-1, Data Sciences International）で受信することで記録した（Dataquest LabPRO 3.10, Data Sciences International）（Clement *et al.*, 1989）。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。

4-2-3 免疫染色

60 分間の実験箱への導入後、ペントバルビタール（ネンブタール，アボットラボラトリーズ）による深麻酔下にて、生理的食塩水に続き 4%パラホルムアルデヒド・リン酸緩衝溶液を用いてレシピエントの全身灌流固定を行った。採材した脳を上述の固定液に 1 晩浸漬固定した後、30%スクロース・リン酸溶液に浸漬した。その後脳を凍結させ、クライオスタットを用いて副嗅球を含む厚さ $30\mu\text{m}$ の切片を 6 枚作製した。それらのうち、2 枚目と 5 枚目の切片は神経核の位置を確認するために Cresyl Violet にて染色した。残りの切片はメタノールに希釈した 3%過酸化水素水と 15 分間反応させることで内因性ペルオキシターゼを失活させた後、30 分間ブロッキング後、7500 倍に希釈した Fos 蛋白質に対する 1 次抗体（Ab-5, Calbiochem, La Jolla, CA）と 65 時間反応させた。その後、二次抗体であるビオチン化抗ウサギ IgG 抗体（VECTASTAIN elite ABC kit, Vector Laboratories, Burlingame, CA）とアビジン-ビオチン化複合体とそれぞれ 2 時間反応させた後、3,3'ジアミノベンジン（DAB）を用いて発色させた。染色した切片はスライドガラスに貼り付けた後に脱水封入した。

4-2-4Fos 蛋白質の発現解析

本章の実験では、Fos 蛋白質の発現を 26 の領域で観察した。Cresyl Violet で染色した隣接切片およびアトラス(Paxinos & Watson, 1998)と比較することで、観察領域を確認した。レシピエント 1 頭につき 4 枚の切片を光学顕微鏡に設置されたデジタルカメラ（DP-12, オリンパス株式会社, 東京）を用いて撮影し、NIH image 1.63 を用いて 0.5mm 角内の免疫陽性細胞数を計測した。副嗅球は僧帽房飾（M/T）細胞層と顆粒（GR）細胞層とに分類し、それぞれの層の中央における免疫陽性細胞数を計測した。また主嗅球においては M/T

細胞層と GR 細胞層との境界が不明瞭なため、主嗅球の吻背側部にて両層をまとめた領域において免疫陽性細胞数を計測した。また、0.5mm 角より小さい観察領域の場合には、その領域内の免疫陽性細胞数のみを計測した。図 4-1 に解析を行った領域を示した。

4-2-5 解析及び統計処理

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。

体温の変化は 1 分ごとに記録し、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た。また、活動量も同時に 1 分ごとに記録した。SIH および活動量の比較は repeated two-way ANOVA を用いて解析を行った。

免疫染色の結果に関しては、4 枚の切片より得られた免疫陽性細胞数の平均値をその個体の固有値とし、ANOVA を用いて解析を行った。

4-3 結果

4-3-1 警報フェロモンが自律機能及び行動反応に与える影響

警報フェロモンに暴露により、レシピエントの SIH は有意に増強された ($F_{(1,13)}=16.7$, $p<0.01$)。体温はまた時間によっても有意に変動し ($F_{(65,845)}=52.4$, $p<0.01$)、2 つの要因間に相互作用も観察された ($F_{(65,845)}=6.04$, $p<0.01$)。自律機能反応に与える影響とは対照的に、警報フェロモンは活動量には影響を与えなかった。また、活動量は時間によって有意に変動したが ($F_{(65,845)}=9.58$, $p<0.01$)、2 つの要因間に相互作用は観察されなかった。

4-3-2 警報フェロモンが Fos 蛋白質発現に与える影響

脳内 26 領域における免疫陽性細胞数の平均値を表 4-1 に示した。嗅球では、

2 群間に有意な差は観察されなかった。前脳と視床下部では、分界条床核吻側部内側 ($F_{(1,13)}=6.39$, $p<0.05$) および外側 ($F_{(1,13)}=44.5$, $p<0.01$)、視床下部室傍核 ($F_{(1,13)}=23.2$, $p<0.01$) および視床下部背内側核 ($F_{(1,13)}=17.0$, $p<0.01$) において、警報フェロモン暴露による Fos 蛋白質発現の増加が観察された。免疫陽性細胞数の増加は扁桃体においても観察され、扁桃体内側核吻側部背側 ($F_{(1,13)}=11.0$, $p<0.01$)、扁桃体外側核 ($F_{(1,13)}=14.7$, $p<0.01$) および扁桃体外側基底核 ($F_{(1,13)}=29.0$, $p<0.01$) において、2 群間に有意な差が観察された。脳幹では、中脳水道周囲灰白質外腹側部 ($F_{(1,13)}=29.6$, $p<0.01$)、被蓋核背外側核 ($F_{(1,13)}=40.7$, $p<0.01$) および青斑核 ($F_{(1,13)}=17.0$, $p<0.01$) において、警報フェロモン暴露による Fos 蛋白質発現の増加が観察された。その他の領域においては群間における有意な差は検出されなかったものの、5 つの領域、すなわち視床下部外側域 ($F_{(1,13)}=3.41$, $p=0.0876$)、扁桃体中心核 ($F_{(1,13)}=3.71$, $p=0.0762$)、扁桃体内側核尾側部腹側 ($F_{(1,13)}=3.54$, $p=0.0824$)、中脳水道周囲灰白質外背側部 ($F_{(1,13)}=3.70$, $p=0.0768$) および傍小脳脚核外側部 ($F_{(1,13)}=3.86$, $p=0.0723$) において、警報フェロモン暴露は Fos 蛋白質発現細胞数を増加させる傾向が観察された。

4-4 考察

本章の結果より、麻酔下ドナーの肛門周囲部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を引き起こしたものの、行動反応には影響を与えなかった。これらの結果は前章の結果と一致するものであるため、Fos 蛋白質発現を指標として観察した脳内領域の活性化は、警報フェロモンの影響によるものと考えられる。

嗅球における Fos 蛋白質発現

齧歯類では、多くのフェロモンは鋤鼻器と副嗅球 (AOB) を含む鋤鼻系で受

容されることが知られている(Keverne, 1999; Mori *et al.*, 1999)。本章の結果では、主嗅球及び AOB における Fos 蛋白質発現の差は観察されなかったが、この結果は警報フェロモン暴露により AOB の M/T 細胞層において Fos 蛋白質発現の増加が観察された以前の研究(Kikusui *et al.*, 2001)と異なるものであった。その理由として、実験手順の違い、すなわち脳を採材した時間の違いが挙げられるだろう。本章では、フェロモン暴露 60 分後に脳を採材したが、これは以前の研究(Kikusui *et al.*, 2001)と比較すると 2 倍長い時間であった。Fos 蛋白質発現は刺激後 1~3 時間で発現量が最大となり、4~6 時間後にかけて徐々に消失するものであるため(Kovacs, 1998)、本章の手技では新奇環境による影響がフェロモンによる影響よりも大きくなってしまったことが考えられる。そのため、もし異なる時間で脳を採材すればおそらく AOB における Fos 蛋白質発現の変化を観察することができたであろう。

前脳及び視床下部における Fos 蛋白質発現

破壊実験及び刺激実験によって、分界条床核 (BNST) は不安やストレス反応に関わっていることが知られている(Casada & Dafny, 1991; Schulz & Canbeyli, 2000; Walker *et al.*, 2003; Zhu *et al.*, 2001)。その吻側部はさらに内側 (BNSTam) と外側 (BNSTal) という様に 2 つの領域に分類することができ、2 つの領域はストレス反応において異なる働きをしていると考えられている(Dunn, 1987)。BNSTal は扁桃体中心核および外側基底核 (BLA) と強く接続している一方で、BNSTam は扁桃体内側核 (Me) から弱い投射を受けている(Dong *et al.*, 2000; Dong, Petrovich, & Swanson, 2001; Dong, Petrovich, Watts *et al.*, 2001)。BNSTam において、警報フェロモン暴露によって Fos 蛋白質発現が増加したことは、Me からのフェロモン情報入力を受け、レシピエントの覚醒状態が上昇したことを示唆している(Kollack-Walker & Newman, 1995)。本章の結果では、警報フェロモン暴露の影響は BNSTal において顕著に観察された。この領域は、中脳水道周囲灰白質外腹側部 (VLPAG)

へと強い投射をすると共に視床下部室傍核 (PVN) へと弱い投射をしていることが知られている(Dong *et al.*, 2000; Dong, Petrovich, Watts *et al.*, 2001)。後述するように、これらの領域においても警報フェロモン暴露が Fos 蛋白質発現を増加させていることから、警報フェロモンによって伝えられた情報は、扁桃体から BNST、特に BNSTal を経て、不安やストレス反応を司る間脳へと伝えられたと考えられる。

視床下部背内側核 (DMH) および PVN において、警報フェロモン暴露によって Fos 蛋白質発現が上昇したことは、DMH は PVN へと強い投射をしているという報告(Champagne *et al.*, 1998)と一致する。さらに、DMH は褐色脂肪組織における熱産生にも重要な働きをしており(S. F. Morrison, 2004; Zaretskaia *et al.*, 2002)、DMH 自身もストレス反応や不安を調節していることも知られている(DiMicco *et al.*, 1996; Inglefield *et al.*, 1994)。

上記 3 領域 (BNST、DMH および PVN) における Fos 蛋白質発現の増加というのは、広範なストレッサーに対する反応として観察されることより(Briski & Gillen, 2001; K. D. Carr *et al.*, 1998; Martinez *et al.*, 1998; Palmer & Printz, 1999; Passerin *et al.*, 2000)、警報フェロモン暴露はストレッサーとして働いたことが示唆される。

扁桃体における Fos 蛋白質発現

警報フェロモン暴露は、扁桃体内側核吻側部背側 (MeAD) での Fos 蛋白質発現を増加させた。この結果は、警報フェロモンは鋤鼻系を介して伝達されているという仮説を支持するものである。他の領域と共に、MeAD は AOB より直接投射を受け(von Campenhausen & Mori, 2000)、性フェロモン情報伝達に重要な役割を果たしている(Paredes *et al.*, 1998)。しかしながら、Me は視床下部-下垂体-副腎軸の活性化と機能的に関連があるため(Dayas *et al.*, 1999)、今回の結果は単にストレス反応であったという可能性も存在している。

扁桃体外側核 (La) および BLA において、警報フェロモン暴露によって Fos

蛋白質発現の増加が観察された。これらの領域は条件刺激（CS）と無条件刺激（US）を関連づける際に重要な役割を担っているため(Fendt & Fanselow, 1999)、警報フェロモンへの反応に学習が関与している可能性が挙げられる。においては恐怖条件付け実験において CS として用いることができ(Richardson *et al.*, 1999)、その際にも BLA が CS と US の関連づけに重要な役割を果たしている(Cousens & Otto, 1998)。Fos 蛋白質発現に関しては、報酬と関連づけられたにおいては BLA で Fos 蛋白質発現を増加させることが報告されている(Tronel & Sara, 2002)。学習の関与の可能性はまた、雌マウスが雄の性フェロモンに誘引されるためには事前に繰り返して暴露される必要がある、すなわち生後より雄と隔離して飼育された雌マウスは雄が放出する性フェロモンの揮発性成分に対しての嗜好性を示さないという報告(Moncho-Bogani *et al.*, 2002)からも支持されよう。しかしながら、警報フェロモンによって引き起こされる反応に学習が関与しているかについては、さらなる研究が必要である。

脳幹における Fos 蛋白質発現

中脳水道周囲灰白質（PAG）は防御行動の統合に重要な領域であることが知られている(Farook *et al.*, 2004)。さらに VLPAG では、嫌悪的 US と関連づけられた CS に反応して Fos 蛋白質発現が増加することも知られている(Carrive *et al.*, 1997)。恐怖反応における役割の他に、VLPAG は不可避のストレッサーに対する情動反応を調節していると考えられている(Keay & Bandler, 2001)。実験箱内という逃げることのできない状況で、警報フェロモン暴露によって不安の指標となり得る SIH が増強したという本章の結果は、その仮説と一致するものである。

青斑核（LC）は脳内ノルアドレナリン神経系の主要な供給源であり、広範なストレッサーに対して活性化することが知られている(Singewald *et al.*, 1999)。ストレスによって活性化された LC の神経は、ストレス反応と関連のある様々な脳内領域を活性化する(Passerin *et al.*, 2000)。本章では警報フェロモン暴露

により LC における Fos 蛋白質発現の増加が観察されたが、こうした反応は広範なストレッサーに対しても観察されるものである (Martinez *et al.*, 1998; Palmer & Printz, 1999; Passerin *et al.*, 2000)。

猫のにおいとの比較

本章の結果と、猫のにおいへの暴露によって引き起こされる Fos 蛋白質発現様式 (Dielenberg, Hunt *et al.*, 2001; McGregor *et al.*, 2004) とを比較することにより、同種間および異種間での不安情報伝達に関わる脳内領域の違いを推測できる。両方の嗅覚刺激によって活性化される領域は、不安及びストレス反応自体に関わっていると考えられる (例えば、BNSTam、PVN、DMH、VLPAG および LC)。警報フェロモンと猫のにおいの両者が Me における Fos 蛋白質発現を引き起こすことは、Me はストレス反応とともに鋤鼻系での情報伝達に重要な役割を果たしているという報告 (Dayas *et al.*, 1999; von Campenhausen & Mori, 2000) と一致している。しかし、警報フェロモン暴露ではその吻側部背側に Fos 蛋白質発現を引き起こしたのに対し、猫のにおい暴露では尾側部腹側に引き起こすことが報告されている。そのため、Me のそれぞれの領域は、同種間および異種間の嗅覚信号伝達において異なる役割を果たしている可能性が考えられる。

警報フェロモンが BNSTal、La および BLA に Fos 蛋白質発現を引き起こすのに対し、猫のにおいは外側中隔、内側及び外側視索前野、視床下部腹内側核、および中脳水道周囲灰白質内背側部および内背側部で Fos 蛋白質発現を増加させた。これらの結果は、同種間不安伝達と異種間不安伝達とでは異なる神経機構が関わっていることが示唆される。例えば、扁桃体が警報フェロモン情報の伝達に深く関わる一方で、猫のにおいは視床下部と関わっていると考えられる。上記の神経機構の違いおよび違うことの意味を解明するにはさらなる研究が必要である。

4-5 小括

本章では、ドナーの肛門周囲部より放出される警報フェロモンに着目し、その受容に関わる脳内領域の解析を行った。実験箱内にて麻酔したドナーの頸部あるいは肛門周囲部を局部電気刺激することにより、頸部由来のにおい及び警報フェロモンの放出をそれぞれ促した箱を作製した。その後、それぞれの箱にレシピエントを導入することで対照臭もしくは警報フェロモンに 60 分間暴露し、その後の脳内 26 領域における Fos 蛋白質の発現を観察した。その結果、分界条床核吻側部内側および外側、視床下部室傍核、視床下部背内側核、扁桃体内側核吻側部背側、扁桃体外側核、扁桃体外側基底核、中脳水道周囲灰白質外腹側部、被蓋核背外側核および青斑核において、警報フェロモン暴露による Fos 蛋白質発現の増加が観察された。以上の結果より、警報フェロモン受容には、扁桃体、視床下部および脳幹といった、ストレス反応に関わる領域が関与していることが示唆された。

表4-1:警報フェロモンもしくは対照臭に暴露されたレシピエントの様々な脳内領域における
Fos蛋白質免疫陽性細胞数/0.25mm²

Region	Control (n=8)	Alarm pheromone (n=7)	
Olfactory bulb			
1. Accessory olfactory bulb (mitral/tufted cell layer)	30.4 ± 0.8	30.8 ± 1.4	
2. Accessory olfactory bulb (granule cell layer)	57.4 ± 4.0	69.4 ± 6.0	
3. Main olfactory bulb	64.1 ± 5.5	57.8 ± 3.6	
Forebrain and Hypothalamus			
4. Bed nucleus of the stria terminalis, anterior division medial group	14.5 ± 1.1	19.6 ± 1.8	*
5. Bed nucleus of the stria terminalis, anterior division lateral group	26.4 ± 2.3	52.1 ± 3.2	*
6. Lateral septal nucleus (ventral)	15.9 ± 1.6	20.2 ± 2.0	
7. Medial preoptic area	11.3 ± 0.9	12.6 ± 1.0	
8. Lateral preoptic area	24.5 ± 3.0	28.8 ± 3.4	
9. Paraventricular nucleus	57.6 ± 3.0	84.8 ± 5.0	*
10. Lateral hypothalamic area	22.7 ± 1.8	28.3 ± 2.5	
11. Dorsomedial hypothalamic nucleus	34.0 ± 2.6	46.3 ± 1.1	*
12. Ventromedial hypothalamic nucleus	8.8 ± 1.3	9.8 ± 2.1	
Amygdaloid nuclei			
13. Bed nucleus of the accessory olfactory tract	29.8 ± 3.5	39.0 ± 4.2	
14. Cortical amygdaloid nucleus (anterior)	53.2 ± 4.8	61.7 ± 4.6	
15. Medial amygdaloid nucleus (anterodorsal)	25.0 ± 1.9	33.3 ± 1.5	*
16. Central amygdaloid nucleus	19.4 ± 3.6	34.4 ± 7.3	
17. Lateral amygdaloid nucleus	14.4 ± 1.0	22.9 ± 2.0	*
18. Basolateral amygdaloid nucleus	21.2 ± 1.6	37.1 ± 2.5	*
19. Medial amygdaloid nucleus (posterodorsal)	19.6 ± 2.6	23.3 ± 3.0	
20. Medial amygdaloid nucleus (posteroventral)	37.3 ± 3.8	46.6 ± 3.1	
Brainstem			
21. Dorsomedial periaqueductal gray	10.7 ± 1.3	13.1 ± 2.0	
22. Dorsolateral periaqueductal gray	8.5 ± 1.6	13.1 ± 1.8	
23. Ventrolateral periaqueductal gray	15.4 ± 0.6	29.5 ± 2.7	*
24. Lateral parabrachial nucleus	25.6 ± 2.8	33.4 ± 2.8	
25. Laterodorsal tegmental nucleus	12.5 ± 0.9	22.4 ± 1.3	*
26. Locus coeruleus	4.4 ± 0.3	6.8 ± 0.5	*

結果は平均値±標準誤差で表した。*P<0.05 (ANOVA)

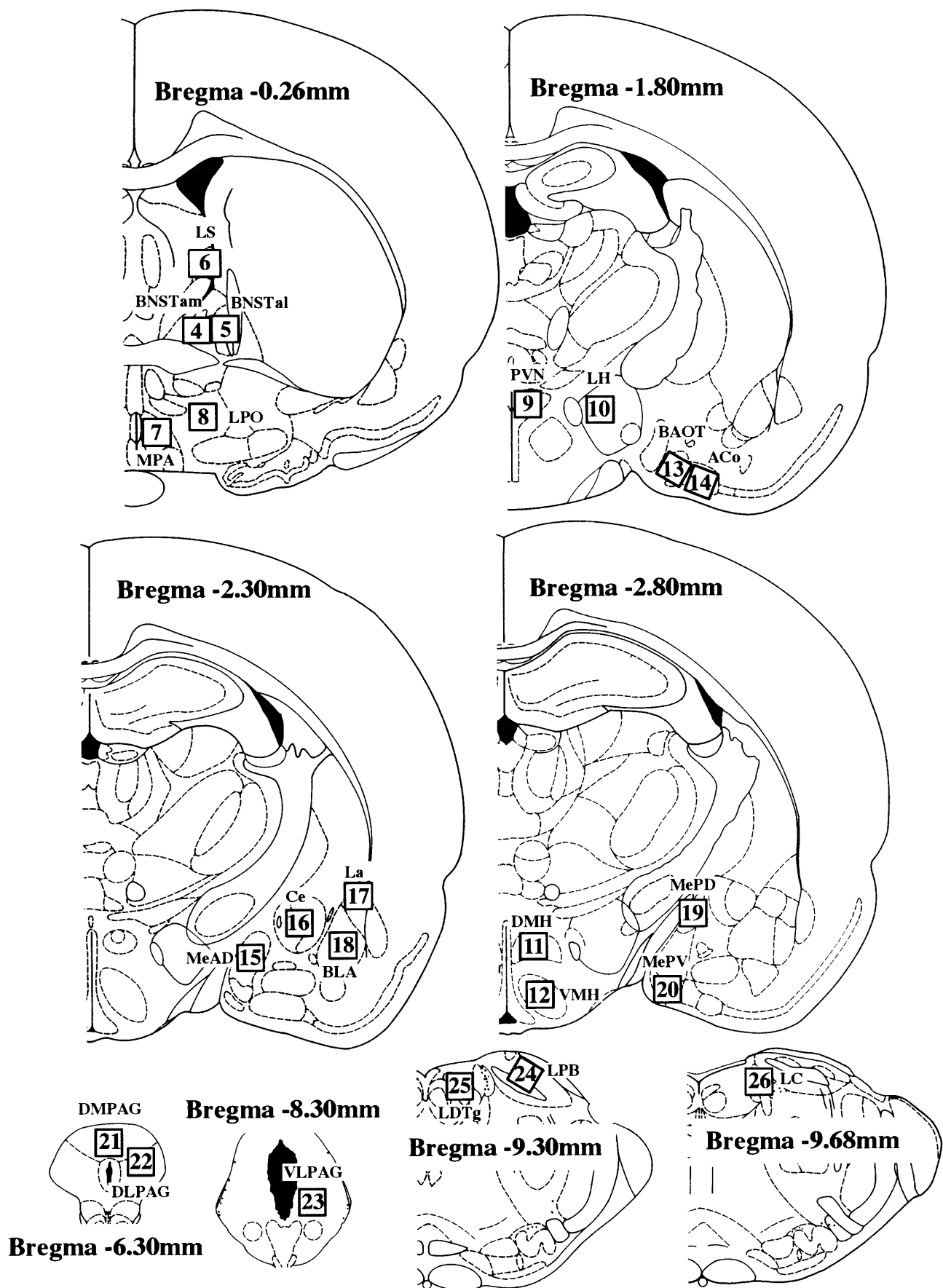


図 4-1 : Fos 蛋白質発現を解析した領域の概略図 (Paxinos & Watson, 1998 を改変)。領域名は表 4-1 の当該番号に示した。

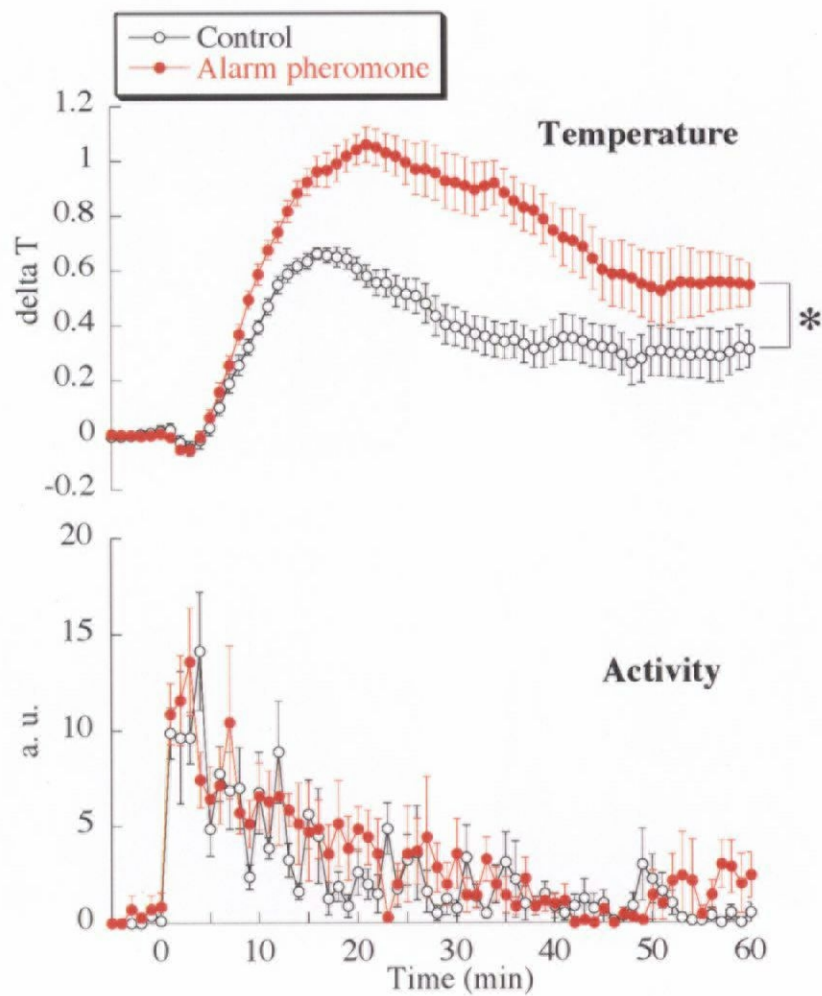


図 4-2：警報フェロモン（Alarm pheromone）もしくは頸部由来のにおい（Control）が存在する箱に導入されたレシピエントの体温変化（Temperature）および活動量（Activity）。活動量は activity unit (a.u.) で示した。* $p < 0.05$ (ANOVA)

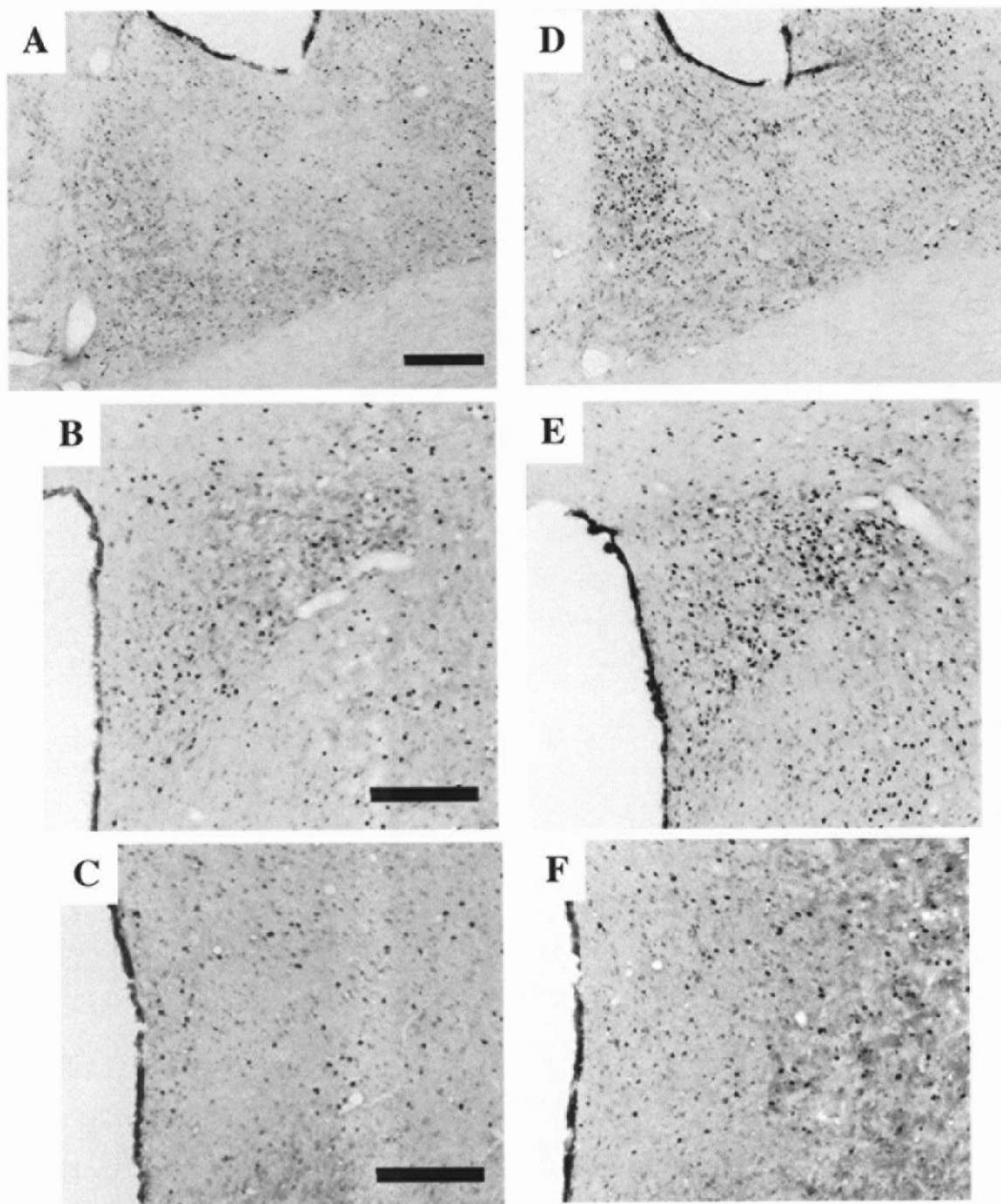


図 4-3：頸部由来のにおい（A-C）もしくは警報フェロモン（D-F）が存在する箱に導入されたレシピエントの分界条床核（A および D）、視床下部室傍核（B および E）および視床下部背内側部（C および F）における Fos 蛋白質免疫陽性細胞の発現。（Bar=200 μ m）

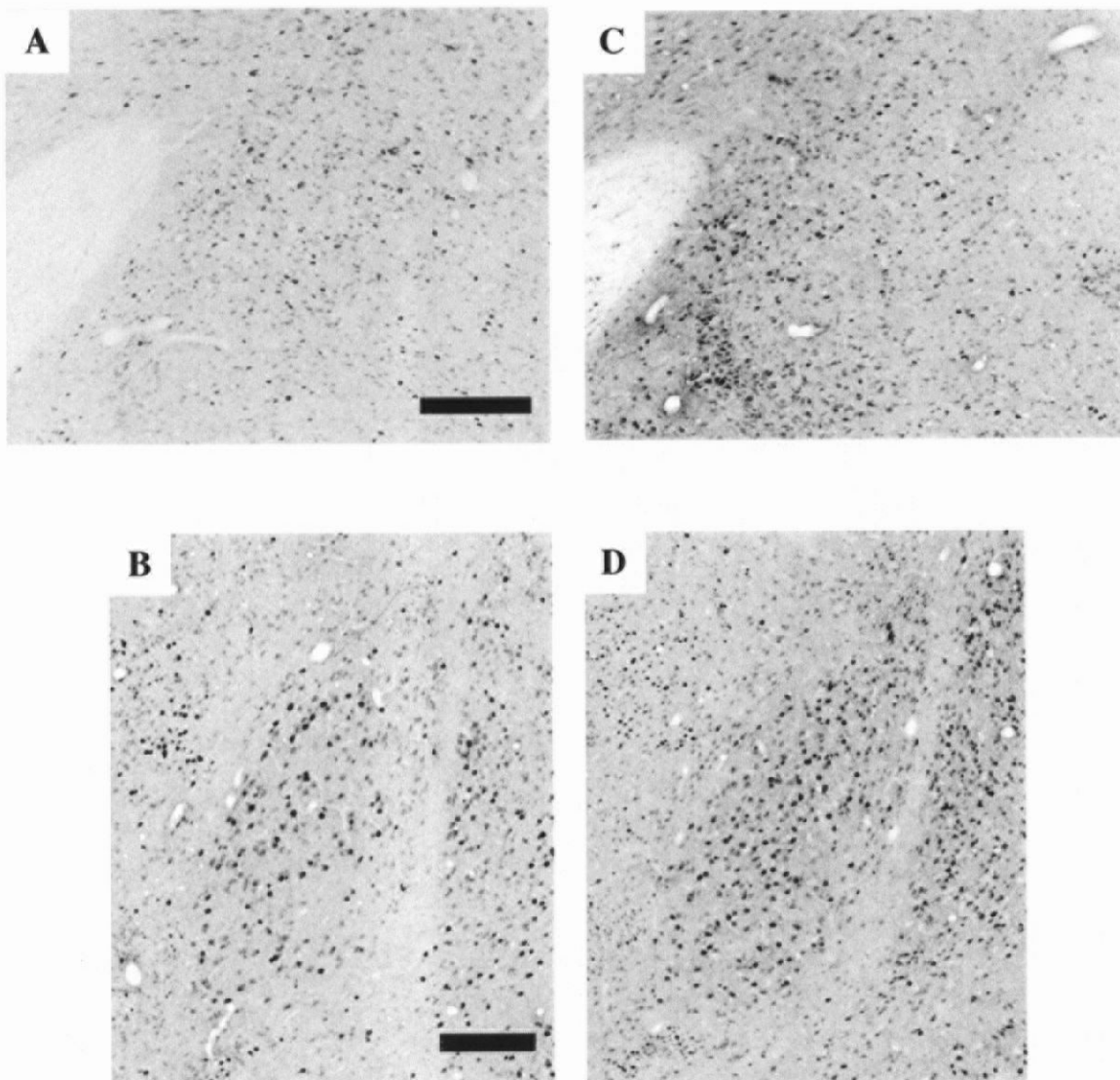


図 4-4：頸部由来のにおい（A および B）もしくは警報フェロモン（C および D）が存在する箱に導入されたレシピエントの扁桃体内側核吻側部背側（A および C）と扁桃体外側核および外側基底核（B および D）における Fos 蛋白質免疫陽性細胞の発現。（Bar=200μm）

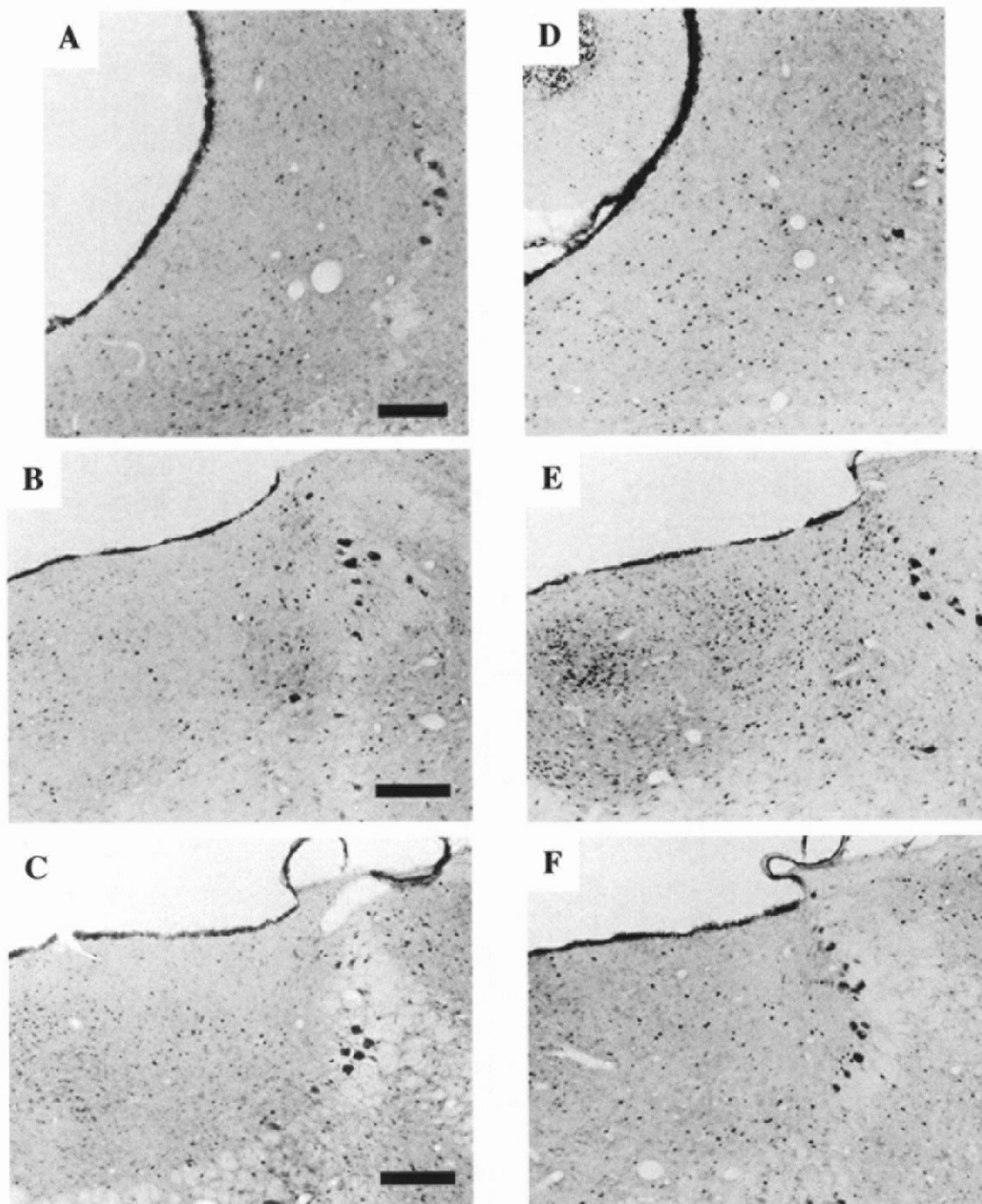


図 4-5：頸部由来のにおい (A-C) もしくは警報フェロモン (D-F) が存在する箱に導入されたレシピエントの中脳水道周囲灰白質外腹側部 (A および D)、被蓋核背外側核 (B および E) および青斑核 (C および F) における Fos 蛋白質免疫陽性細胞の発現。(Bar=200 μ m)

第5章

水を警報フェロモンの吸着剤として使用する可能性の検討

5-1 緒言

前章までの結果より、ストレスを受けた雄ラットが放出する警報フェロモンは 2 種に分類できることが明らかとなった。しかし、今後警報フェロモンを介した情報伝達機構についてさらに研究を進めるためには、フェロモンを何らかの吸着剤の中に捕捉することが必要である。強制水泳試験においても警報フェロモンの影響が報告されている(Abel & Bilitzke, 1990)ことから、警報フェロモンは水溶性の物質であるという仮説が成り立つ。そしてもし仮説が正しければ、フェロモン吸着剤として水を用いることができると考えられる。

本章ではこの仮説を検証するため、警報フェロモン、頸部由来のにおいまたはにおいを含んでいない箱を準備し、それぞれの箱の天井より回収した 3 種類の水サンプルを用意した。濾紙を用いてそれぞれの水サンプルをレシピエントに Home cage 内にて提示し、その後の行動反応、自律機能反応および Fos 蛋白質の発現を嗅球にて観察することで、サンプルのフェロモン活性を判定した。

5-2 材料と方法

5-2-1 実験動物

実験には前章までと同じく、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（F-1、株式会社船橋農場、千葉）を給餌し、水は自由摂取とした。レシピエントの作製は第 2 章の方法を用いた。また、飼育ケージをそれぞれのレシピエントにとっての Home cage とさせるため、手術後は床敷きを換えなかった。

5-2-2 水サンプル作製

雄の Wistar ラットをフェロモンドナーとして用い、水サンプル作製用に小さなアクリル製の箱（20×20×10cm）を準備した。実験当日の朝に用意した純水約 5ml を箱の天井に吹き付け、その中に頸部もしくは肛門周囲部の局部刺激用に針（27G）を留置したペントバルビタールナトリウム麻酔下（50mg/kg、i.p.ネンブタール、アボットラボラトリーズ）のドナーラットを 15 分間導入した。その間、15 回の電気刺激を 1 分間隔にて頸部もしくは肛門周囲部に負荷することで、対照臭もしくは警報フェロモンの放出を促した。刺激後ドナーを箱から取り出し、天井の水滴をピンセットと 2 枚の濾紙を用いて（5×5cm）回収した。その際、例えばドナーの体や、電気刺激のコード、実験者の手といったものが直接水滴に触れないように注意した。また、ドナーを導入しなかった箱から同様に回収した水サンプルを溶媒対照として用いた。水サンプル作製の箱は、使用後に洗剤を用いて洗浄し、ペーパータオルにて拭いた。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。

5-2-3 サンプル提示法

水サンプル作製後、3 種類のサンプルのうち 1 種類をレシピエントが飼育されている部屋へと持って行き、第 2 章と同様に安定した体温及び心拍数を示しているレシピエントに提示した。レシピエントの Home cage を防音箱よりとりだし、その金属製の蓋を穴の空いたアクリル板に取り換えると同時に水サンプルを含んだ 2 枚の濾紙を壁にそれぞれ貼り付け、防音箱内に再び戻し、30 分間テレメトリーシステムの受信ボードの上に設置した（図 5-1）。レシピエントは提示される水サンプルに基づいて無作為に 3 群用意した。すなわち、Alarm pheromone 群（n=8）、Neck odor 群（n=9）そして Control 群（n=8）である。水サンプル提示後 30 分間にわたってレシピエントの行動をデジタルビデオカメラ（DCR-TRV18、SONY）で録画し、さらに体温及び心拍数は送信機

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)。すべてのサンプル提示は 9 時から 18 時の間に行われた。

5-2-4 免疫染色

30 分間の水サンプル提示後、レシピエントをペントバルビタール (ネンブタール, アボットラボラトリーズ) によって深麻酔し、生理的食塩水につづき 4% パラホルムアルデヒドリン酸緩衝溶液を用いて全身灌流固定を行った。免疫染色の手順は第 4 章で用いた方法に準じた。

5-2-5 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前章に準じた。

行動反応は、Sniffing, Freezing, Resting, Rearing, Grooming, Digging, Contact 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。Digging はラットが前肢や鼻を使って床敷きやその中を掘る行動と定義し、Contact は濾紙の場所にかかわらずラットが濾紙を直接触れて嗅いだり噛んだりしている行動と定義した。各群の行動の比較は MANOVA を用いて行った。

体温と心拍数の変化は 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、two-way repeated 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。また、より詳細な解析のために心拍数は個々の時間において 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。

Fos 蛋白質の発現解析は第 4 章の方法に準じた。副嗅球は僧帽房飾 (M/T) 細胞層と顆粒 (GR) 細胞層とに分類し、それぞれの層における免疫陽性細胞

数と面積を計測した。また主嗅球においては M/T 細胞層と GR 細胞層との境界が不明瞭なため、主嗅球の吻背側部にて両層をまとめた領域において免疫陽性細胞数と面積を計測した。4 枚の切片より得られた免疫陽性細胞数密度の平均値をその個体の固有値とし、ANOVA と post hoc テストとして Dunnett の検定を用いて Control 群と比較した。

5-3 結果

Home cage を防音箱から取り出し、その蓋を取り替えるという作業がストレスラーとして働いたため、全てのレシピエントは行動反応を示した (図 5-2)。しかしながら、それらの行動反応は 3 群間において有意な差は検出されなかった。表 5-1 に行動データを示した。

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 (Neck odor: $n=1$, Alarm pheromone: $n=2$)。それぞれの群における心拍数の基準値はほぼ同様であり (Alarm pheromone: 320 ± 8 ; Neck odor: 317 ± 6 ; Control: 319 ± 6 bpm)、時間によって有意に変動した ($F_{(35,665)}=48.1$, $p<0.01$)。心拍数に群間の差は見られなかったが ($F_{(2,665)}=1.31$, $p=0.293$)、群と時間との相互作用は有意であった ($F_{(70,665)}=1.76$, $p<0.01$)。それぞれの時間における心拍数解析の結果、実験開始後 2 分から 4 分の間で 3 群間に有意差が検出され (2 min: $F_{(2,19)}=7.51$, $p<0.01$; 3 min: $F_{(2,19)}=10.4$, $p<0.01$; 4 min: $F_{(2,19)}=4.93$, $p<0.05$)、post hoc テストの結果、実験開始後 3 分および 4 分後において Neck odor 群は Control 群と比較して有意に低い心拍数を示したことが明らかとなった (図 5-3)。

体温の基準値も 3 群において違いは観察されなかったが (Alarm pheromone: 37.253 ± 0.041 ; Neck odor: 37.192 ± 0.037 ; Control: 37.206 ± 0.058 °C)、SIH は群間において有意差が観察された ($F_{(2,770)}=12.8$, $p<0.01$)。体温はまた時間によって有意に変動し ($F_{(35,770)}=75.7$, $p<0.01$)、群と時間との相互作用も

観察された ($F_{(70,770)}=6.91$, $p<0.01$)。post hoc テストの結果、Alarm pheromone 群において Control 群と比較して SIH の増強が観察された ($p<0.05$) (図 5-4)。

副嗅球において Fos 蛋白免疫陽性細胞は全ての群において観察された (図 5-5)。M/T 細胞層と GR 細胞層における免疫陽性細胞数密度は群間において有意に異なっていた (M/T 細胞層: $F_{(2,22)}=6.28$, $p<0.01$ 、GR 細胞層: $F_{(2,22)}=4.13$, $p<0.05$)。post hoc テストの結果、Alarm pheromone 群と Neck odor 群では Control 群と比較して M/T 細胞層において免疫細胞数密度の有意な増加が観察された (Alarm pheromone vs. Control: $p<0.05$; Neck odor vs. Control: $p<0.05$)。一方 GR 細胞層では、Alarm pheromone 群のみが免疫陽性細胞数密度の増加を示した (Alarm pheromone vs. Control: $p<0.05$) (図 5-6)。副嗅球とは対照的に、主嗅球における免疫陽性細胞数密度には群間における差は認められなかった (Alarm pheromone: 282 ± 25 ; Neck odor: 272 ± 15 ; Control: $246 \pm 11/\text{mm}^2$, $F_{(2,22)}=1.05$, $p=0.366$)。

5-4 考察

警報フェロモンを含んだ箱から回収された水サンプルは、溶媒対照と比較して自律機能反応 (SIH の増強) と副嗅球における Fos 蛋白質発現の増加を引き起こす一方で、心拍数、行動反応および主嗅球における免疫陽性細胞数においては影響を与えなかった。これらの反応は、前章までにおいて警報フェロモンに直接暴露されたレシピエントに観察されたものと同様であった。以上の結果より、警報フェロモンは水溶性の物質であり、自律機能反応を引き起こすのに十分量の警報フェロモンが水滴の中に捕捉されたことが明らかとなった。それに加えて、レシピエントは鋤鼻系を介して水に溶解した警報フェロモンを受容していることも示唆された。

もう一つの重要であるが予想外だった発見は、頸部由来のにおいを含んだ箱から回収した水が、おそらく鋤鼻系で受容されて、心拍数の上昇を緩和する効

果を示したことである。この結果は、成熟した同性他個体からのにおいが鋤鼻系を介してストレス反応を緩和するという現象を初めて示唆したものである。同種他個体の体表から放出されたにおいが鋤鼻系により受容されるということは、マウスにおいて麻酔下の同種他個体の頭部や顔を探索している間に、その副嗅球神経細胞において発火が見られたという以前の報告(Luo *et al.*, 2003)とも一致するものである。ストレス反応を緩和するこの“安寧フェロモン”は、ストレス下のラットにおいてみられる群集性や、同種他個体の存在がストレス反応を緩和するという social buffering と呼ばれている作用に関わっていると思われる。ラットはオープンフィールド試験や大きな音によってストレスを受けると群集性を示したり、T-maze において同種他個体とのふれあいを好んだりすることが知られている(Latane, 1969; Taylor, 1981)。さらに、同種他個体の存在がストレスに対する行動的、自律機能的、神経科学的あるいは内分泌的な反応を緩和することが知られている(Hennessy *et al.*, 2002; Kiyokawa *et al.*, 2004; Stanton *et al.*, 1985; Thorsteinsson *et al.*, 1998)。

警報フェロモンおよび安寧フェロモンはいずれも鋤鼻系を介して受容されると思われるが、警報フェロモンのみが副嗅球の GR 細胞層における Fos 蛋白質発現を増加させた。この結果の解釈として、警報フェロモンは脳内ノルアドレナリン系を活性化した可能性が考えられる。青斑核は脳内ノルアドレナリンの主要な供給源であり、この神経核に起始するノルアドレナリン神経の約 40%は副嗅球の GR 細胞層を含む嗅球内に投射することが知られている(McLean *et al.*, 1989; Shipley *et al.*, 1985)。それ故、警報フェロモン暴露によるノルアドレナリン系の活性化を介して、副嗅球の GR 細胞層が活性化されたと考えられる。警報フェロモン暴露により青斑核での Fos 蛋白発現が増加したという第 4 章の結果や、ノルアドレナリン系の活性化は体温上昇を引き起こすという報告(Beckman, 1970)は、この解釈を支持するものである。またこれとは反対に、もし安寧フェロモン暴露がレシピエントのノルアドレナリン系を抑制する効果を持つとしたら、そのことによって副嗅球の GR 細胞層での Fos 蛋白発現が

影響を受けると考えられる。これらの点に関してはさらなる研究が必要である。

警報フェロモンが水溶性であるという仮説は、警報フェロモンの影響が強制水泳試験においても報告されている(Abel & Bilitzke, 1990)ことから支持される。ラットを水の中に浸けると、最初は激しく泳ぐもののしばらくすると頭を水面上に維持するのに必要最小限の動きのみをとって動かなくなる(Borsini & Meli, 1988)。強制水泳試験はこの不動時間を指標として用いるもので、不動時間が短くなるほど動物は恐怖や不安を感じていると考えられている(Abel & Bilitzke, 1990; Hawkins *et al.*, 1978; O'Neill & Valentino, 1982)。ラットは泳いでいる間に警報フェロモンを水中に放出し、それにより次に泳ぐラットの不動時間が短くなることが知られている(Abel, 1991b)。警報フェロモンは不安に関連した様々な反応を引き起こすということを考えると（例えば本章における SIH であり、強制水泳試験における不動時間の短縮）、その作用は特定の反応を引き起こすというのではなく、レシピエントの不安を増強するフェロモンであるということが考えられる。そのため、次章ではこの点を検討することとした。

5-5 小括

第5章では、“警報フェロモンは水溶性の物質である”という仮説を立て、これを検討した。前章までの実験箱とは異なる小さな箱を用意し、麻酔したドナーの頸部あるいは肛門周囲部を局部電気刺激することにより、頸部由来のにおい及び警報フェロモンの放出をそれぞれ促した。その後、それぞれの天井より水滴を回収することで、中にドナーを導入しない対照箱からのサンプルと合わせて計3種類の水サンプルを用意した。それぞれの水サンプルを Home cage 内にて濾紙に染み込ませてレシピエントに提示し、その後の行動反応、自律機能反応および嗅球における Fos 蛋白質の発現を観察することで、各サンプルのフェロモン活性を評価した。その結果、警報フェロモンを放出させた箱から回

回収した水サンプルを提示すると、レシピエントは SIH の増強を示すとともに副嗅球における Fos 蛋白質発現の増加を示した。この様に、前章までに観察された反応を、警報フェロモンを放出させた箱から回収した水サンプルを提示することにより再現できたことから、警報フェロモンは水溶性であり、水をフェロモン吸着剤として使用可能であることが示唆された。

表5-1:レシピエントの行動反応

Behavior	Control (<i>n</i> =8)	Neck odor (<i>n</i> =9)	Alarm pheromone (<i>n</i> =8)
Grooming	460 ± 54	436 ± 35	467 ± 63
Digging	73.6 ± 38.9	66.5 ± 27.3	115 ± 63
Rearing	323 ± 21	321 ± 32	330 ± 30
Walking	169 ± 13	188 ± 19	179 ± 12
Sniffing	437 ± 25	441 ± 37	462 ± 38
Freezing	1.64 ± 1.06	0.43 ± 0.33	0.85 ± 1
Resting	368 ± 108	314 ± 125	317 ± 98
Contact	196 ± 35	211 ± 41	228 ± 52

結果は平均値±標準誤差で表した。

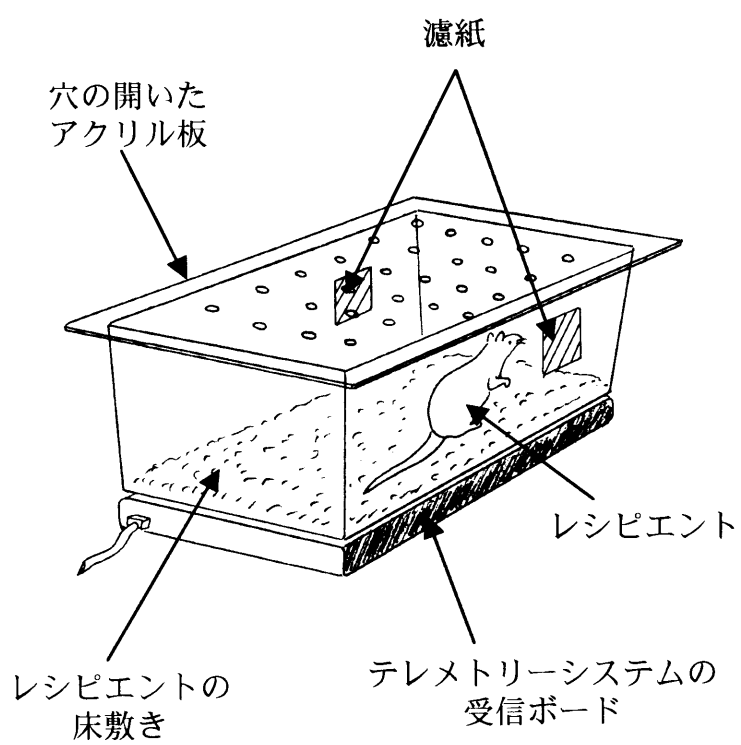


図 5-1：レシピエントへのサンプル提示法の模式図

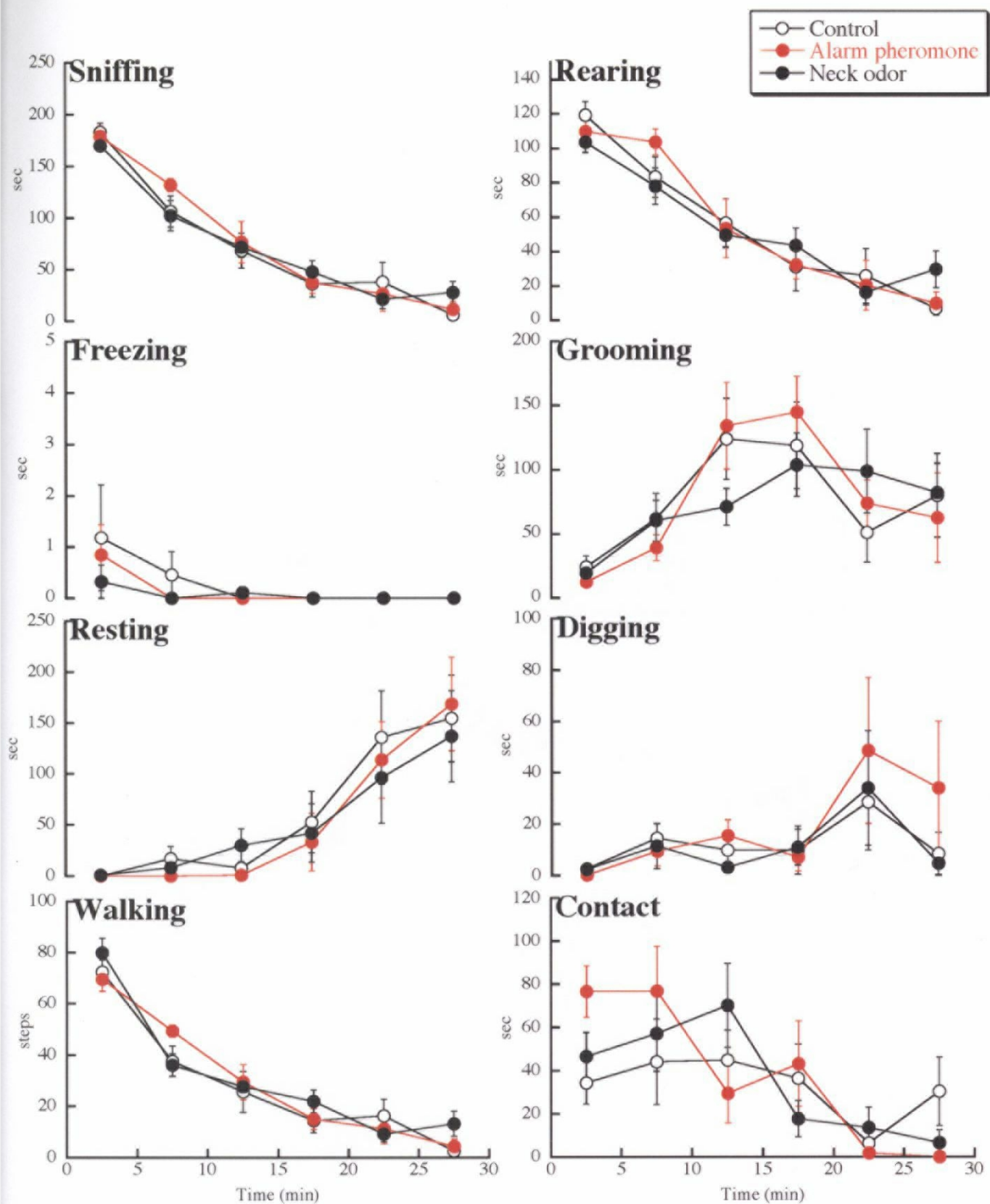


図 5-2 : 警報フェロモン (Alarm pheromone) および頸部由来のにおい (Neck odor) が存在する箱、もしくはにおいの存在しない箱 (Control) から回収した水サンプルを提示されたレシピエントの経時的行動変化

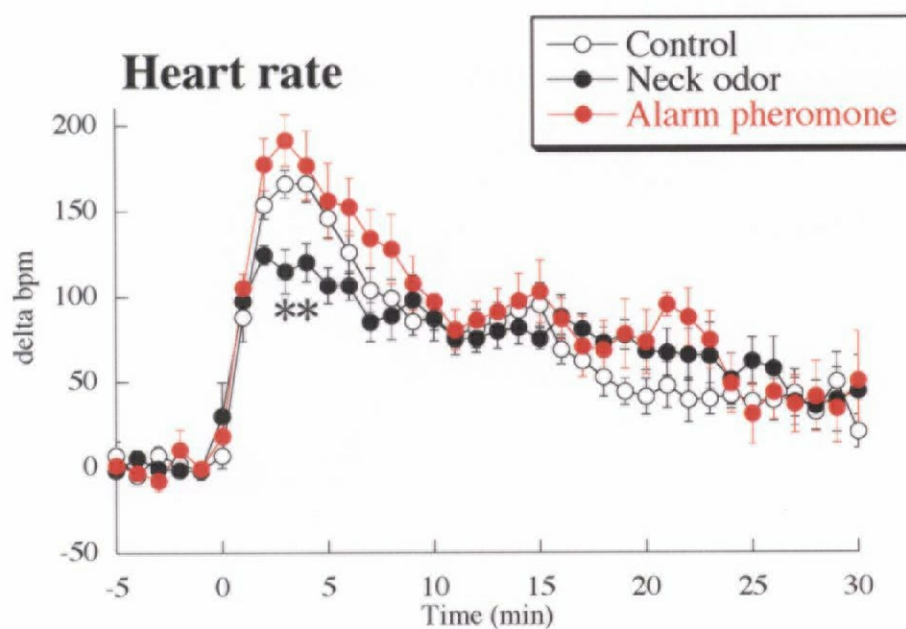


図 5-3：警報フェロモン (Alarm pheromone) および頸部由来のにおい (Neck odor) が存在する箱、もしくはにおいの存在しない箱 (Control) から回収した水サンプルを提示されたレシピエントの心拍反応。* $p < 0.05$ (ANOVA followed by Dunnett's post hoc test)

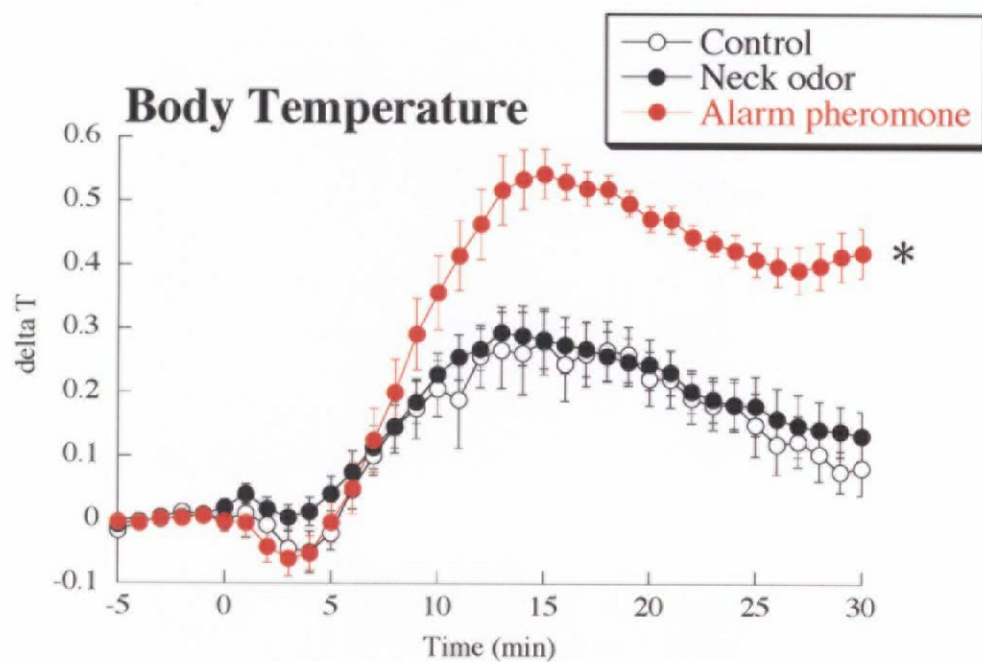


図 5-4：警報フェロモン (Alarm pheromone) および頸部由来のにおい (Neck odor) が存在する箱、もしくはにおいの存在しない箱 (Control) から回収した水サンプルを提示されたレシピエントの体温反応。* $p < 0.05$ (ANOVA followed by Dunnett's post hoc test)

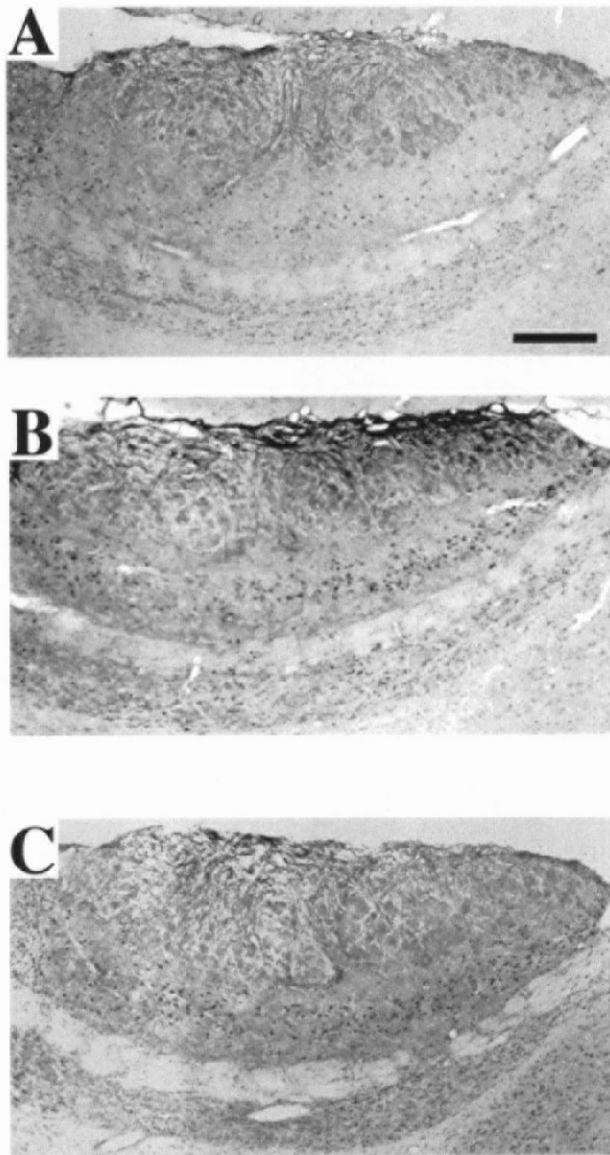


図 5-5：においの存在しない箱 (A)、もしくは頸部由来のにおい (B) および警報フェロモン (C) が存在する箱から回収した水サンプルを提示されたレシピエントの副嗅球における Fos 蛋白質免疫陽性細胞の発現。(Bar=200 μ m)

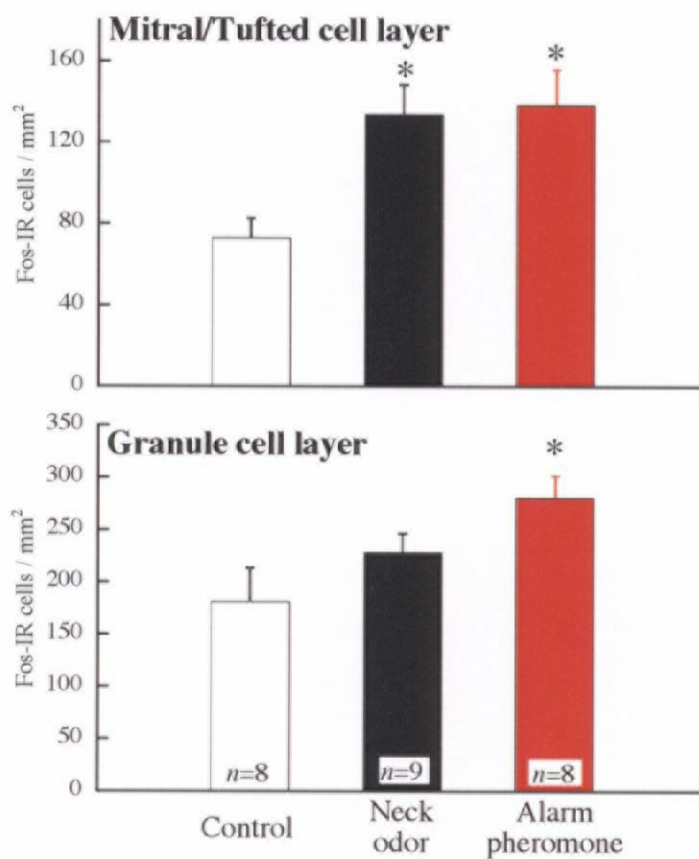


図 5-6：においの存在しない箱 (A)、もしくは頸部由来のにおい (B) および警報フェロモン (C) が存在する箱から回収した水サンプルを提示されたレシピエントの副嗅球における Fos 蛋白質免疫陽性細胞数。* $p < 0.05$ (ANOVA followed by Dunnett's post hoc test)

第 6 章

警報フェロモン作用の検討

6-1 緒言

前章までの結果より、肛門周囲部より放出される警報フェロモンは水溶性であり、レシピエントに自律機能反応を引き起こすことが明らかとなった。この反応は、警報フェロモンは警報の意味を持つためにフェロモン暴露によってレシピエントの不安が上昇した結果であると解釈される。しかし一方で、このフェロモンは単に受容個体の体温を上昇させるフェロモンであるという可能性も否定できない。その理由の 1 つとして、前章までの自律機能反応を観察する実験系では、レシピエントの行動反応が制限されていたということが挙げられる。

第 4 章でも述べたとおり、同種間化学情報伝達のみならず、捕食者のにおいへの暴露といった、異種間化学情報伝達もまた不安や恐怖を引き起こすことが知られている。逃げ込める安全な場所がある装置において猫のにおいに暴露されたラットは、防御行動（巣穴や小さな隠れ箱に逃げ込む）や危険評価行動（体を伸ばして対象に近づくという Flat back approach や、後肢を安全な場所においたまま頭を外に出して様子をうかがう Head out）を示すことが知られている(R. J. Blanchard & Blanchard, 1989; Dielenberg, Carrive *et al.*, 2001)。これらの行動反応は、GABA-ベンゾジアゼピンレセプターに作用する薬物である Midazolam、Diazepam、Ethanol といった様々な抗不安薬や、ニューロステロイドの 1 種である 3α -hydroxy-4-pregnen-20-one (3α HP)、NMDA アнтаゴニストである MK-801 の投与によって抑制できることから、猫のにおい暴露により不安が上昇した結果引き起こされた行動反応であると考えられている(D. C. Blanchard *et al.*, 1992; R. J. Blanchard *et al.*, 1990; Dielenberg *et al.*, 1999; Gallate *et al.*, 2003; Kavaliers *et al.*, 1994; McGregor *et al.*, 2004)。前章までは、ラットが逃げることでできない小さい箱の中でしか実験を行えなかったが、前章の警報フェロモンを水の中に捕捉できるという発見によって、より行動学的解析が可能な装置によって警報フェロモンの行動面への影響を観察することが可能となった。

本章では、警報フェロモンは警報の意味を持ち、フェロモン暴露による自律機能反応は不安が上昇した結果であるという仮説を立て、これを検証した。この仮説を検証するために、Dielenberg らの研究(Dielenberg *et al.*, 1999)を元にした変形オープンフィールド試験にて警報フェロモン暴露による行動反応を観察した。この装置では、レシピエントは試験物質にさらされたオープンアリーナに滞在するか、試験物質と対角線上におかれた小さな箱 (Hiding box) に隠れるかを選択することができるものである。もし上記の仮説が正しければ、警報フェロモンはレシピエントに防御行動や危険評価行動を引き起こすことが予想される。

6-2 材料と方法

6-2-1 供試動物

前章までと同じく、実験には 8 週齢の 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 2 頭で飼育し、実験期間中は、固形飼料（F-1、株式会社船橋農場）を給餌し、水は自由摂取とした。

6-2-2 水サンプルの作製

第 5 章と同様の方法で、警報フェロモン含有水および溶媒対照水を作製した。変更点は、濾紙を用いて天井の水滴を回収するのではなく、ガラス棒とパスツールピペットを用いてポリプロピレンチューブに回収した点である。水サンプルは回収後、使用するまで 4°C にて 3～6 時間保存した。

6-2-3 実験方法

実験はプラスチック製のオープンフィールド（ $64.3\times 44.7\times 23\text{cm}$ ）にて行われ、実験室は点灯しており、フィールドの中央は約 115lux で照らされてい

た。フェロモン含有水もしくは溶媒対象水を濾紙 2 枚にそれぞれ 750 μ l 滴下し、オープンフィールドの一角の壁に貼り付けた後、レスピエントをオープンフィールドの中央に置き、5 分間環境に馴化させた。この間、全てのレスピエントはオープンフィールドを探索し濾紙と接触した。馴化させた後、ステンレスの網を天井としたポリカーボネート製の箱（Hiding box: 17.5 \times 24.5 \times 12.5cm）を、濾紙を取り付けた角と対角線上の角に設置し、その後 10 分間の行動をビデオカメラ（SE-2000NV、株式会社ダイワインダストリ）にて録画した（図 6-1）。Hiding box の一つの壁にはレスピエントが中に入れるように直径 7.5cm の穴が空けてあり、また前日より Home cage 内に設置することでレスピエントをあらかじめ Hiding box に対して馴化させておいた（図 6-2）。レスピエントは暴露された水サンプルによって Alarm pheromone 群（n=10）および Control 群（n=10）の 2 群に分けられた。同じ Home cage 内に飼育されている 2 頭のレスピエントに対して同じ Hiding box を使用するため、その 2 頭を同群に割り当てることで Hiding box を介しての試験サンプルの混入を避けた。また、実験前と、1 頭目の実験終了後に Hiding box 内に排泄物があった場合には、ペーパータオルにて清掃した。実験終了後、排泄された糞の数を計測した後、エタノールとペーパータオルを用いてオープンフィールドを清掃した。日周リズムの影響を緩和するため、全ての実験は 15 時半から 17 時半の間に行った。

6-2-4 血漿 Corticosterone 濃度測定

試験終了後、レスピエントの尾に小さな傷を付け、ヘパリンを添加されたヘマトクリット管（Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt, Germany）を用いて、試験後 3 分以内にその血液を採材した。採材後 4℃にて血漿を遠心分離し、解析まで -20℃にて保存した。Corticosterone に対する EIA は、Horseradish-peroxidase 標識 Corticosterone（FKA419、コスモ・バイオ株式会社）と抗 Corticosterone 抗体（FKA420E、コスモ・バイオ株式会社）を

用いて1枚のプレートで全てのサンプルを解析した(Yamaguchi *et al.*, 2005)。抗 Corticosterone 抗体の交差反応は Deoxycorticosterone (8%)、Progesterone (2.1%)、11-dehydrocorticosterone (0.23%)、Cortisol (0.2%) および他のステロイド (<0.05%) であった。Corticosterone の検出限界は 9.9 pg/well であり、intra-assay coefficient of variation は 11.6% であった。

6-2-5 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。

レシピエントの行動は Microsoft Excel を元にした Visual Basic ソフトウェアを用いて解析を行った。計測を行った行動指標は以前の研究に準じた (Dielenberg, Carrive *et al.*, 2001)。オープンアリーナでの歩数 (Walking)、および Outside、Head out、Conceal、Rearing、Grooming、Near the stimuli および Flat back approach の発現時間を計測した。図 6-3 に示した様に Outside とはラットがオープンアリーナで過ごした時間、Head out とはラットがその後肢を Hiding box 内に留めたままで頭及び肩まで外に出した状態、Conceal とは Hiding box 内にラットが全身入っている状態、Near the stimuli とは濾紙を提示した一角から 10cm 角内で過ごした時間、Flat back approach とはラットが背を平らにして濾紙に近づいていく状態、とそれぞれ定義した。Rearing と Grooming はオープンアリーナ内でその発現が見られた場合にのみその持続時間を計測した。Near the stimuli、Rearing、Grooming の発現時間は、それぞれの動物においてオープンアリーナでの滞在時間 (Outside) との比 (%) を算出した。2 群の行動の比較は ANOVA を用いて行い、post hoc テストには Fisher の PLSD 検定を用いた。Outside、Head out、Conceal は同時に計測されることはなく、また Flat back approach は観察されなかったために統計解析からは除外した。排泄した糞の数と血漿 Corticosterone 濃度

の比較には、Mann-Whitney の U 検定を用いた。

6-3 結果

全てのレシピエントはためらうことなく Hiding box に入り、また試験終了後に実験者がレシピエントを持とうとした際に逃げ込んだことから、レシピエントは Hiding box を安全な場所として認識していたことがうかがえる。警報フェロモンの存在により Head out ($F(1,18)=9.77$, $p<0.01$)、Conceal ($F(1,18)=6.31$, $p<0.05$) が増加する一方で、Outside ($F(1,18)=10.5$, $p<0.01$) と Grooming ($F(1,18)=4.61$, $p<0.05$) は減少した。警報フェロモンの存在は Walking を減少させる傾向があったものの ($F(1,18)=4.38$, $p=0.0507$)、他の行動には影響を与えなかった (Rearing; $F(1,18)=0.851$, $p=0.368$, Near the stimuli; $F(1,18)=1.14$, $p=0.301$) (図 6-4)。また、ここには示さなかったものの、同 Home cage より供試したレシピエントの試験順序は、行動反応に影響を与えなかった。

行動反応に対する影響とは対照的に、警報フェロモンは排泄された糞の数 (Alarm pheromone: 1.2 ± 0.5 ; Control: 1.5 ± 0.6) および血漿 Corticosterone 濃度 (Alarm pheromone: 374 ± 30 ; Control: 393 ± 31 ng/ml) に対しては影響を与えなかった。

6-4 考察

本章の結果より、変形オープンフィールド試験において警報フェロモンに暴露されたレシピエントは、防御行動および危険評価行動の増加を示すとともに探索行動の減少を示した。猫のにおいに暴露されたラットも同様な行動を示すことから (R. J. Blanchard & Blanchard, 1989; Dielenberg, Carrive *et al.*, 2001)、警報フェロモンは明らかに警報の意味を持っていることが示された。

現時点では、これらの行動反応が警報フェロモンによって引き起こされたのではなく他のラットや濾紙自体からの新奇なにおいの存在によって引き起こされたという可能性を否定できないが、以下の理由によりその可能性は低いと思われる。第 5 章において、頸部への電気刺激により放出されたにおいを含んでいる濾紙は、ストレスに対する心拍反応を抑制することを示した。これは、他のラットのにおいは不安を惹起するよりもむしろ不安反応を軽減する作用があることを示唆している。また、野生ラットとは異なり実験動物のラットは新奇物に対して興味や注意を払うことが知られており(Barnett, 1963)、この傾向は例えば Habituation/dishabituation 試験といった認知行動試験に利用されている(Johnston *et al.*, 1993)。

本実験では、警報フェロモンへの暴露はレシピエントの Corticosterone 濃度や自律機能反応の指標と考えられる糞の数には影響を与えなかった。以前の研究において、猫のにおいに暴露されたラットは 35 分後に Corticosterone 濃度の上昇を示していることから(File *et al.*, 1993)、今回採血を行った試験開始後 15 分後という時間は内分泌反応を観察するのに不適切だったという可能性が挙げられるが、他の可能性として、レシピエントは自分のストレスレベルを Hiding box に逃げ込むことで調節していたことも考えられる。すなわち、警報フェロモン暴露によりレシピエントのストレスレベルは上昇したものの、それに伴い Conceal が上昇することで対照群と同程度のストレスレベルにまで減少したという解釈である。視床下部-下垂体-副腎軸に対する警報フェロモンの影響の解明にはさらなる研究が必要と思われる。

6-5 小括

“警報フェロモンは警報の意味を持ち、フェロモン暴露による自律機能反応は不安が上昇した結果である”という仮説を立て、変形オープンフィールド試験を用いてこの仮説を検証した。警報フェロモン含有水もしくは溶媒対象水を

濾紙 2 枚にそれぞれ 750 μ l 滴下し、オープンフィールドの一角の壁に貼り付けた後、雄ラットを導入し 5 分間環境に馴化させた。その後、Hiding box を設置し、行動反応を 10 分間観察した。警報フェロモン暴露により、防御行動や危険評価行動が増加する一方で、Grooming と探索行動が減少することが明らかとなった。以上の結果より、警報フェロモンが警報の意味を持っていることが示唆された。

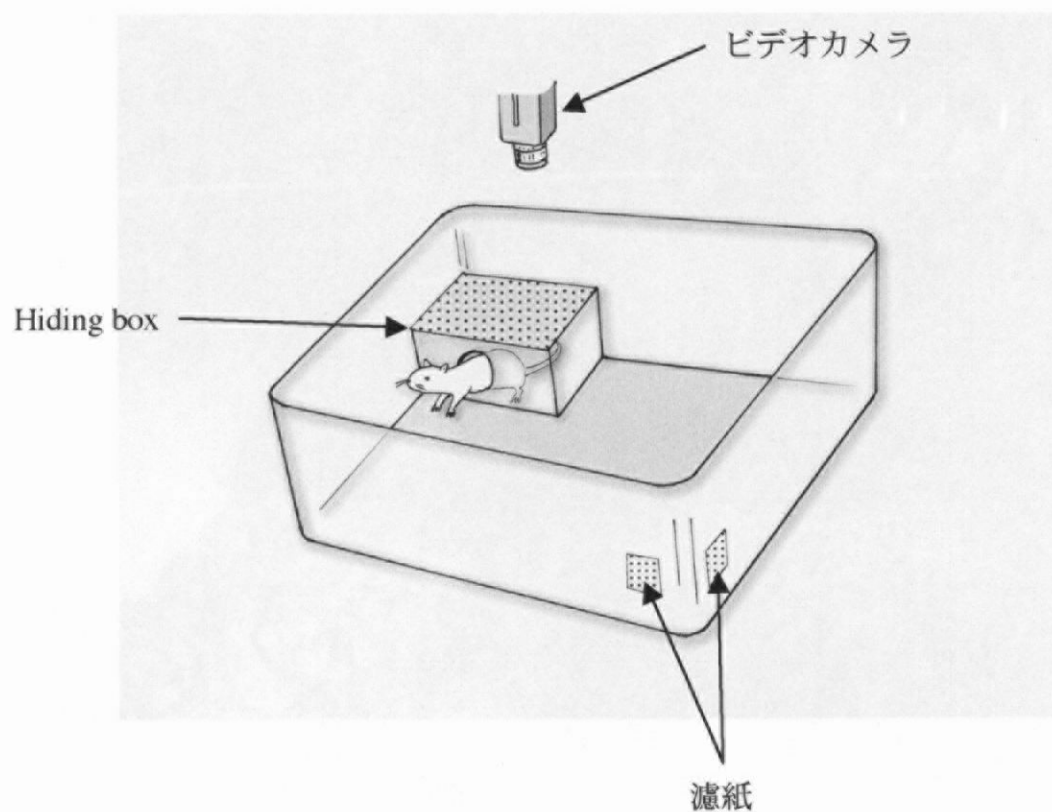


図 6-1 : 変形オープンフィールド試験の概要



図 6-2 : Hiding box への馴化の様子

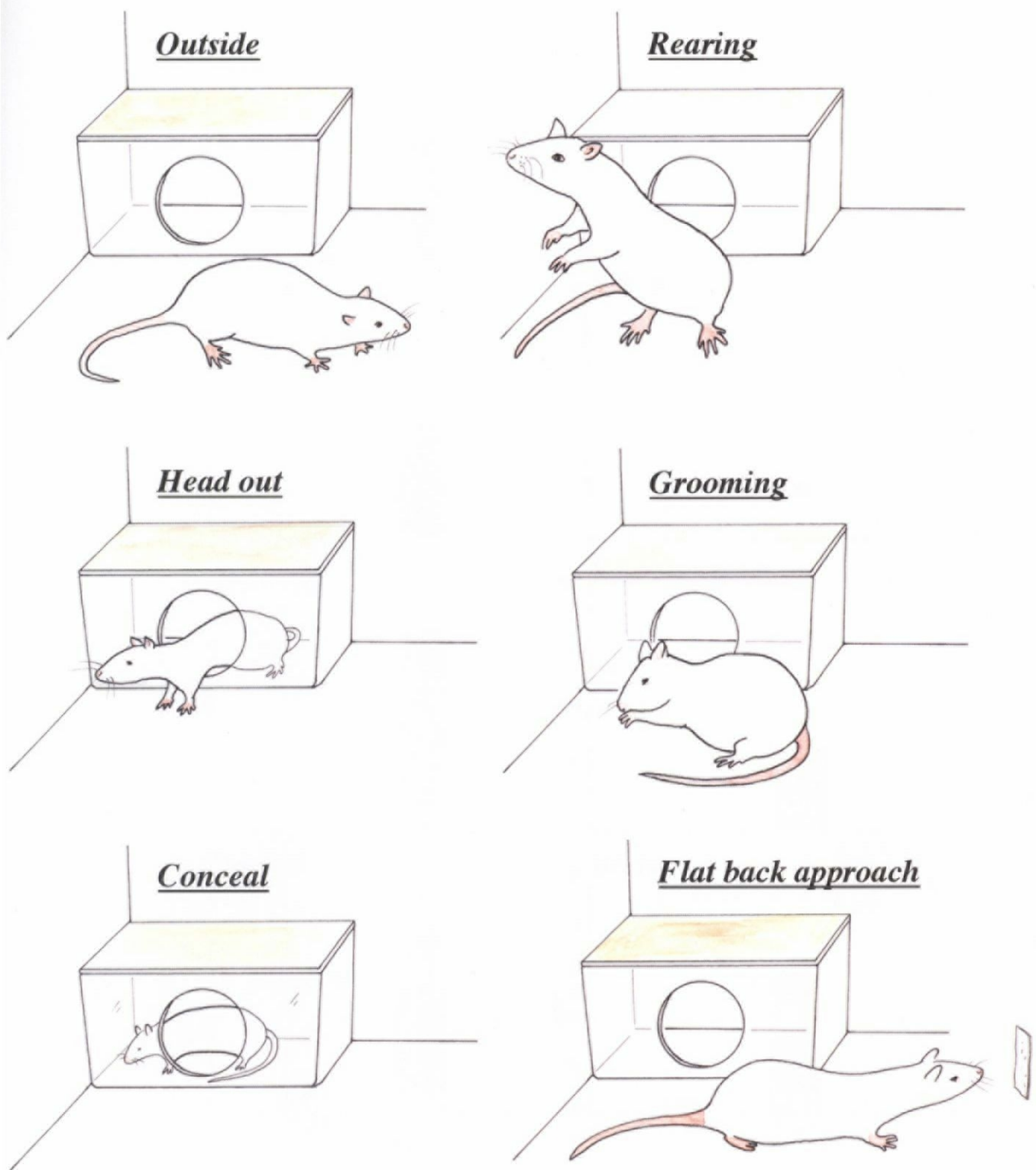


図 6-3 : 解析を行った各行動反応

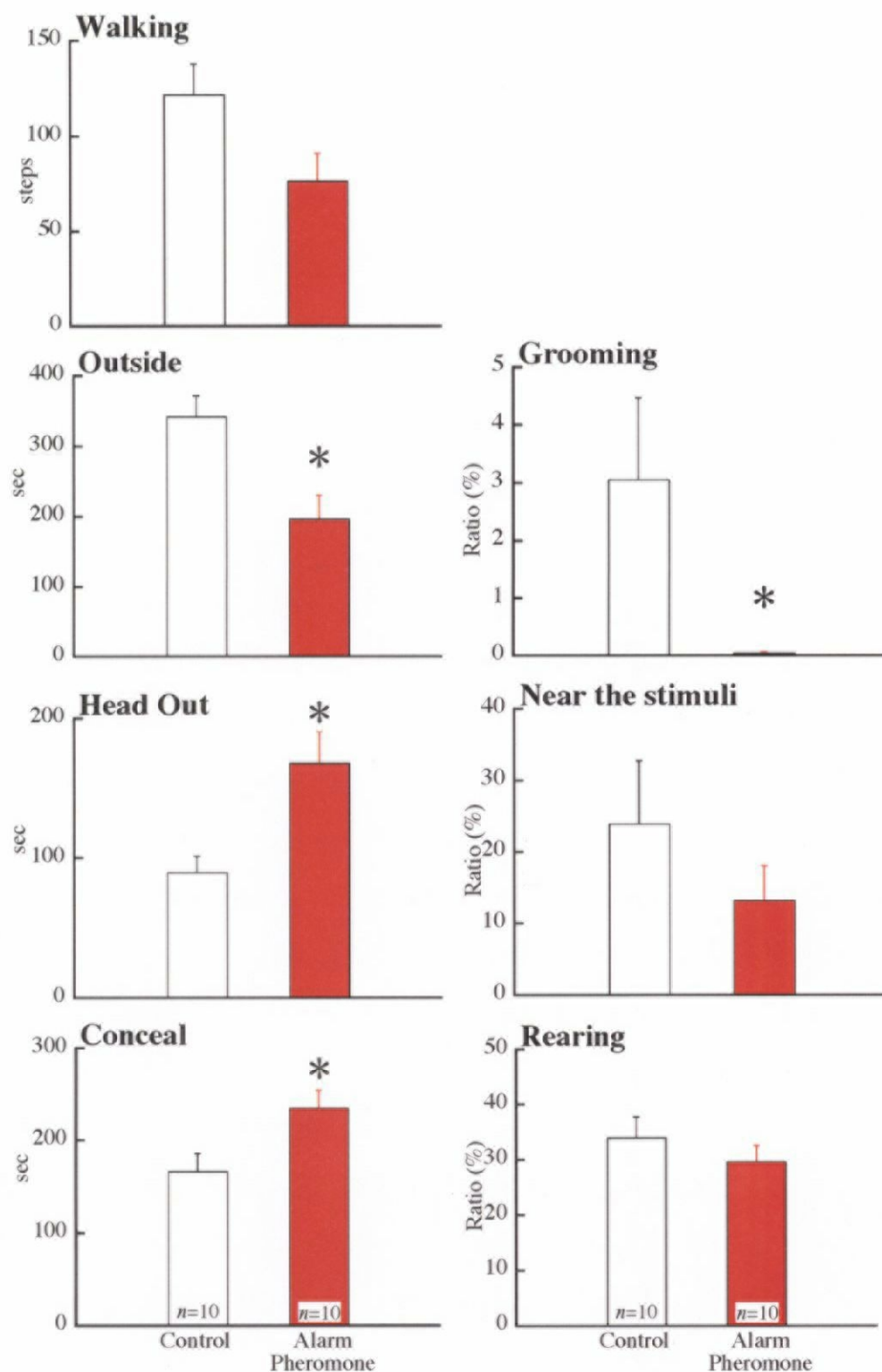


図 6-4: 溶媒対照 (Control) もしくは警報フェロモンを含む水サンプル (Alarm pheromone) を提示されたレシピエントの行動反応。* $p < 0.05$ (ANOVA)