

人と犬のより良き関係に関する生理学的研究
～相互コミュニケーションにおけるオキシトシンの役割～

麻布大学大学院獣医学研究科

動物応用科学専攻 博士後期課程 動物共生科学分野 介在動物学

DA0702 三井正平

人と犬のより良き関係に関する生理学的研究
～相互コミュニケーションにおけるオキシトシンの役割～

麻布大学大学院獣医学研究科

動物応用科学専攻 博士後期課程 動物共生科学分野 介在動物学

DA 0702 三井正平

目次

要約	・・・・・・・・・ 1
序論	・・・・・・・・・ 6
第 1 章. 血中 OT の尿中への排泄ならびにコルチゾールとの関係について	
緒論	・・・・・・・・・ 11
方法	・・・・・・・・・ 15
結果	・・・・・・・・・ 21
考察	・・・・・・・・・ 23
結論	・・・・・・・・・ 26
第 2 章. 日常的な刺激による犬の OT 分泌	
緒論	・・・・・・・・・ 27
方法	・・・・・・・・・ 31
結果	・・・・・・・・・ 34
考察	・・・・・・・・・ 36
結論	・・・・・・・・・ 40
第 3 章. 人・犬間の相互コミュニケーションによる OT 変化	
緒論	・・・・・・・・・ 41
方法	・・・・・・・・・ 45
結果	・・・・・・・・・ 50

考察	・ ・ ・ ・ ・ 64
結論	・ ・ ・ ・ ・ 70
総合考察	・ ・ ・ ・ ・ 71
謝辞	・ ・ ・ ・ ・ 76
参考文献	・ ・ ・ ・ ・ 77

要約

イヌ (*Canis familiaris*) はオオカミから家畜化され、長きにわたり人にとって最も身近な動物として飼育されている。現在日本では 1232 万頭の犬が飼育されているといわれ、核家族化が進む現代社会において、情緒的なつながりを求める人の伴侶として不可欠な存在となっている。人はその友である犬について様々な角度から研究してきた。なかでも、彼らの心理状態を把握するために行動学的、または生理学的なアプローチを試み、彼らを理解しようと努めている。

一方、近年人においてパートナーや配偶者との接触により血中オキシトシン (Oxytocin : 以下 OT) が増加することや、マッサージ後の陽性感情に応じて血漿中 OT が増加すること、人において OT が幸福を感じる時に増加するといったこと報告され、リラックスおよび陽性感情といった心理上のメカニズムに関係があることが示唆されている。また、犬と人の positive interaction (発話や接触を伴った交流) 後に犬の血漿中 OT が増加するとの研究報告があることから、OT は人を含めた動物の心理状態を客観的に評価するのに適していると考えられる。さらに、近年のマウスやラット、サル、人の研究から OT がつがいの形成や社会的認識、信頼、愛着、親和性行動、といった社会行動やいわゆる「絆」の形成に関与していることが明らかとなり、他個体との関わりに大きく影響することが明らかとなっている。そこで本研究では、行動や気質に関係する OT 分泌について調査することで、犬の陽性感情について生理学的なアプローチを試みるとともに、人を対象とした異種間コミュニケーションにおける犬の OT 分泌と行動の関わりを明らかにすることを目的とし研究を行った。

第 1 章. 血中 OT の尿中への排泄ならびにコルチゾールとの関係について

第 1 章ではサンプル採取時の個体への負担を考慮し、非侵襲的に採取が可能である犬の

尿中 OT 測定に適否を検討することを目的とし、血中 OT の尿中への排泄時間を調査した。実験は犬の血中へ OT を投与し尿中への排泄時間を調査した。本実験は頻回採尿のため、トイレトレーニングを施された未去勢のラブラドルレトリバー (n = 6) を用いた。血液と尿は投与 30 分前より採取し、投与直前、投与直後、投与終了後 15 分、以後 30 分毎に計 4 時間にわたり採取した。OT 測定は福井大学統合生理学教室の協力を得て、Higuchi らの研究 (1984) を参考に RIA 法による測定を行った。

その結果、OT 投与開始直前の平常時血中濃度は 65.55 ± 17.20 pg / ml であり、血中のピークは投与終了直後であった。血漿中 OT は、平常時に 4.70pg / ml と非常に低い個体が存在し RIA 法においても、これ以上血漿中濃度が低下すれば検出が困難になると考えられた。尿中 OT のピークは血中への投与開始から 1 時間後であった。また、尿サンプルにおける実測値の最低濃度は 49.50pg / ml と十分に測定範囲内であり、尿による OT 測定は血液採取時の種々の問題を克服し、個体の生理的状況をより正確に表すものであると考えられた。また、OT 測定時の尿中コルチゾールを測定したところ、コルチゾールほとんど変化しなかったことから、外因性 OT の血中投与は犬の尿中コルチゾールには影響しないことが明らかとなった。これらのことより以後、尿採取は実験開始から 1 時間後とした。

第 2 章. 日常的な刺激による犬の OT 分泌

犬の情動変化は行動観察やコルチゾールなどの測定によるストレス評価が主であり、陽性感情やリラックス状態を客観的に評価する生理的指標は確立されていない。第 2 章では日常的な犬の陽性感情を誘起させる刺激によって OT 分泌とコルチゾール分泌がどのように変化するか検討した。刺激は過去にラットや人において血中 OT 濃度を増加させることが明らかな摂食と運動、マッサージとした。摂食や運動、なでるといった行為は、トレーニングにおいても強化子として用いられることから、陽性感情を誘起させる重要な要素であると考えられる。なかでも、なでる行為は人が犬に与える社会的報酬として作用し、心拍

数を減少させ、犬をリラックスさせる効果があることが報告されている。対照実験として OT 増加の報告がない水を与えたときの変化についても検討をおこなった。犬はトイレトレーニングを施された 9 頭を用いた。

その結果、摂食、運動、マッサージは有意に犬の尿中 OT 濃度を増加させた(摂食： $p < 0.05$ 、運動： $p < 0.05$ 、マッサージ： $p < 0.01$)。対照的に飲水は尿中 OT 濃度に影響を与えなかった。これらのことから、RIA 法を用いて尿中 OT の測定は、非侵襲的に刺激による OT 分泌の変動をとらえられることを可能にすることが明らかとなった。一方、各刺激前後における尿中コルチゾール濃度は摂食のよってのみ有意に増加した。従って、犬の陽性感情の評価には、尿中 OT 濃度による評価が適切であると考えられ、非侵襲的に犬の陽性感情やリラックスを把握するバイオマーカーとしての尿中 OT 濃度測定の有用性が示唆された。

第 3 章. 人・犬間の相互コミュニケーションによる OT 変化

第 3 章では人と犬の相互コミュニケーション時における両者の行動分析と交流前後の尿中 OT 濃度の変動を調査することで、異種間の親和行動やコミュニケーションにおける OT の役割を明らかにすることを目的とした。実験は 30 組の犬とその飼い主を対象に行い、①安静 (20 分)、②飼い主と犬の交流 (30 分) および③安静 (30 分) で構成した。①の安静時に飼い主は実験室で過ごし、犬は別室で待機させた。①の安静時に飼い主には犬に対する愛着を測る Lexington Attachment to Pets Scale (LAPS) に解答してもらった。人および犬の尿サンプルは①および③終了時に採取した。

両者の行動を元に、階層的クラスター分析を行った結果、被験者と犬の組み合わせはコミュニケーション時間が長く、頻度が多い HC グループと、コミュニケーション時間が短く、頻度の少ない LC グループに分けられることが明らかとなった。また、グループ毎の尿中 OT 濃度を交流前後で比較すると、HC グループにおいて犬、人ともに尿中 OT 濃度が上昇することが明らかとなり、LC グループでは犬において有意に低下し、人では変化しな

った。主成分分析と重回帰分析の結果から、犬においては「飼い主から犬への接触に関わる要因」が犬の尿中 OT 濃度を上昇させる重要な要素であることが明らかとなり ($F_{(3,24)} = 3.78, p < 0.05$, 決定係数 $R^2 = 0.32$)、人においては「犬から飼い主への注視に関わる要因」 ($p < 0.01$)、「LAPS」 ($p < 0.05$)、「飼い主から犬への声をかける回数」 ($p < 0.05$) が尿中 OT を上昇させる要素であることが明らかとなった ($F_{(3,24)} = 4.00, p < 0.01$, 決定係数 $R^2 = 0.41$)。また、犬の注視と飼い主からの接触時間および接触回数に相関が見られたことから、人の母子間と同様に、人・犬間においても犬の注視が愛着行動として作用していると考えられた。これらのことから、人の OT を分泌させる犬の注視は人の接触を増加させ、人の接触は犬の注視を増加するという相乗効果を生むと考えられ、両者のコミュニケーションがスムーズに成立すると考えられた。また、単一の刺激だけでなく、異種間コミュニケーションにおいても尿中 OT を測定することでより詳細な両者の関係性が評価できると考えられる。

本研究により社会行動や陽性感情などに関係する犬の OT を非侵襲的に評価ができることが可能となり、犬の注視が人の尿中 OT 濃度を上昇させる要因であることが明らかとなった。犬の注視は生理学的に人に対する社会的な合図として成立していることが示唆され、犬の注視を発端としたコミュニケーションが人の親子間と同様に愛着行動として作用していると考えられることから、人と犬が似たような社会認知機構を持つ収斂進化仮説を裏付ける結果となった。また、人から提供される食物や遊びを含めた運動、身体的接触などの行為は犬に陽性感情を抱かせドーパミン作動性の脳内報酬系回路にも作用するとともに、社会認知機能や愛着形成に関わる OT が分泌されると考えられ、人と犬の社会的な結び付きが促進されると考えられる。犬と人の関わりにおいて視線や身体的な接触と言った共通のコミュニケーションを発端とし、両者の OT が分泌されると考えられることから、人・犬間の絆の形成には OT 神経系を介した生物学的絆形成メカニズムが存在する可能性が示唆された。本研究は人と犬の相互コミュニケーションにおける OT の役割を明らかにし、人と犬

のより良き関係の構築に貢献するものである。

序論

イヌ (*Canis familiaris*) はオオカミから家畜化され、約 1 万 4 千年前の犬の骨がドイツの Oberkassel の洞窟において発見されていること (Nobis, 1979) から、他の家畜と比べても古く、長きにわたり人にとって最も身近な動物として飼育されてきている。また、北イスラエルの Ein Mallaha 遺跡 (約 1 万 2 千年前) からは、老人が子犬を抱くように埋葬された骨格が発掘されている (Davis and Valla, 1978)。このように犬は 1 万数千年以上前から人の「伴侶」としての役割を果たしてきたことを物語っている。その後、人によって現存するものだけでも 400 種以上もの犬種が作出、改良され、狩猟や牧畜、護衛、愛玩など多岐にわたる目的で飼育されてきた。しかしながら、現代社会において狩猟や牧畜、護衛といった使役目的の役割は減少し、飼育スタイルも屋外から屋内飼育へと変化することで、犬と人との物理的、精神的距離が縮まり、社会生活を共に送る家族の一員として飼育されるようになってきている (環境省, 2009)。日本においては 1232 万頭の犬が飼育されているといわれており (2009 年ペットフード協会調べ)、核家族化などにより人同士の関係が希薄になりつつある現代社会において、犬はより一層情緒的な繋がりを求める人の伴侶として不可欠な存在となっている。

人は家畜化の過程において犬の社会性を利用してきた。犬が最も古く家畜化され、現代社会においても人の伴侶として共生している一つの理由として、人も犬も互いに集団を形成して共同生活を営む社会性を持つ、つまりコミュニケーションを図ろうとする動物であることがあげられる。犬は Lorenz の表情モデル (Lorenz, 1940, 1943) に代表されるように尻尾や口、目そして耳などの体の各部位を使用した様々なボディーランゲージを示す。また、そのコミュニケーションの対象は同種間だけでなく、異種である人に対しても尻尾を振る、手や顔をなめようとするなど、多彩な愛情表現を示すことから、人にとって最も親しい「友」として永続的な「絆」を結ぶことができる (Lorenz, 1966; Serpell, 1986) と

されている。

人はその友である犬について様々な角度から研究を行ってきた。なかでも、彼らが「今何を感じているのか?」といった心理状態を推察するために、行動学的 (Abrantes, 1987; Quaranta et al., 2007)、または生理学的 (Beerda et al., 2003; King et al., 2003; Menor-Campos et al., 2011) なアプローチが試みられ、言葉の話せない犬を理解しようと努めている。最も一般的なものは、多くの書籍などで語られているボディーランゲージである。これは、尾の位置や振り方、耳の位置など行動学的側面から判断することであるが、観察者に高い観察技術が要求される場合があるなど、客観的な判断とは言い難い部分が多い。また、生理学的アプローチから犬の心理状態を推察する研究も存在するものの、ほとんどは「うれしい」といった陽性感情ではなく、動物介在介入や問題行動、社会化、訓練性能などの否定的な側面において、カテコールアミンやコルチゾールのようなストレスパラメーターを測定することに焦点を置き、ストレスを受けていない、つまり「嫌ではない」ことを把握する手法 (Hennessy et al., 1998, 2006; Coppola et al., 2006; Haubenhofner and Kirchengast, 2007; Menor-Campos et al., 2011) が主である。

一方、近年人においてパートナーや配偶者との接触により血中オキシトシン (Oxytocin : 以下 OT) が増加すること (Grewen et al., 2005) や、マッサージ後の陽性感情に応じて血漿中 OT が増加すること (Turner et al., 1999; Uvnäs-Moberg et al., 2004; Bello et al., 2008)、OT は幸福を感じる時に増加する (Turner et al., 1999) といったことが明らかにされてきており、リラックスおよび陽性感情といった心理上のメカニズムと OT が密接な関係にあることが示唆されている (Carter, 2003; Uvnäs-Moberg et al., 2005; Miller et al., 2009; Ishak et al., 2011) ため、「うれしい」といった動物の陽性感情を客観的に評価するのに適している可能性があると考えられる。

9 つのアミノ酸で構成されている OT は視床下部室傍核 (PVN) や視索上核 (SON) で合成され、下垂体神経葉から血中に分泌されるペプチドホルモンであり、末梢組織におけ

るホルモンとしての作用と、中枢神経における神経ペプチド (du Vigneaud, 1956; Cazalis et al., 1985, 1987; Nordmann and Dayanithi, 1988; Richard et al., 1991) としての 2 つの役割がある。末梢組織では主に平滑筋の収縮に関与し、古くから分娩時の子宮収縮や、乳頭が刺激されることで分泌が増加し、乳腺腺胞周囲の星状筋上皮細胞を収縮させて乳汁分泌を促すなどの働きを持つこと (Richard et al., 1991; Ludwig, 1998; Russell and Leng, 1998) が知られている。また、授乳中のマウスにおいて OT は ACTH 反応を抑制すること (Altemus et al., 1995)、人において授乳が OT の分泌を促し、下垂体からの ACTH 分泌を抑制することから、結果としてストレス反応である視床下部-下垂体-副腎皮質系の活動亢進による副腎皮質ステロイド反応 (HPA 軸反応) の抑制がおこること (Neumann et al., 2000; Neumann, 2002; DeVries et al., 2003)、男性において外因性 OT 処置により血漿中 ACTH 濃度と血漿中コルチゾール濃度が減少すること (Legros et al., 1987, 1988)、人において OT の鼻腔内投与が Trier Social Stress Test における不安レベルを減少させる (Heinrichs et al., 2003) といったことなどが報告されていることから、PVN や SON で合成された OT は下垂体神経葉へと送られ血中に放出されることで HPA 軸反応に影響を与え、ストレス緩和や抑制作用を示すことが示唆されている。また、下垂体を経ずに視床下部から直接神経線維を通じ神経系に運ばれ神経伝達物質として自律神経系に関与する脳の領域に影響を与えることから OT は脳の様々な部位に作用し、身体機能を調節していると考えられている。

さらに、ラットやマウスにおける研究から、OT 受容体ノックアウトマウスにおいて一般的な学習や記憶能力は正常であるにもかかわらず、他個体の匂いが記憶できないと言った社会的健忘症を示すこと (Ferguson et al., 2000, 2002; Winslow and Insel, 2002, 2004) や、ラットやアカゲザルにおいて脳脊髄液中の OT 濃度の上昇とともに社会行動が増加すること (Haller et al., 1996)、血漿 OT 濃度の上昇によりハタネズミの親和行動が増加すること (Gingrich et al., 1997)、ラットにおいて中枢への OT 投与により社会行動が増加すること

(Witt et al., 1992)、ボンネットモンキーにおいて社会的な個体の脳脊髄液中の OT 濃度は攻撃的な個体と比べ高いとの報告 (Rosenblum et al., 2002) があり、OT がげっ歯類におけるつがいの形成 (Lim and Young, 2006) やオスの攻撃性や子供の認知といった社会認知機能の調節 (Nishimori et al., 1996; Takayanagi et al., 2005; Ross and Young, 2009; Rimmele et al., 2009; Strathearn et al., 2009)、人における他者への信頼 (Kosfeld et al., 2005; Zak et al., 2007, 2008; Hurlemann et al., 2010)、哺乳動物における愛着の形成 (Panksepp, 1992; Carter et al., 1992; Carter, 1998; Buchheim et al., 2009) や親和性行動の発現 (Feldman et al., 2007; Ditzen et al., 2009) といった様々な社会行動に関与し、人を含めた哺乳動物の行動や気質に影響を与えていることが明らかとなってきた。また、エネルギー代謝にも関与しており、摂食や運動によって OT の分泌が促されること (Landgraf et al., 1982; Lang et al., 1983; Verbalis et al., 1986; Kasting et al., 1988; Takayanagi et al., 2008) も明らかになってきた。

人と犬の関係に関する研究においては、愛犬家と犬が発話やなでることなどの接触を伴った相互作用の後に、人および犬の血漿中 OT 濃度が増加したという報告 (Odendaal and Meintjes, 2003; Miller et al., 2010; Handlin et al., 2011) や、犬との交流時に飼い主に対する犬から注視が長いグループでは、注視の頻度と飼い主の尿中 OT 濃度に強い相関関係がみられた (Nagasawa et al., 2009) といった報告がある。しかしながら、双方の OT の作用機序や注視や接触などの社会行動との関わり、あるいは犬の陽性感情との関わりについては不明なままである。霊長類と比べて、犬はより優れた社会認知能力を有していると考えられており (Hare and Tomasello, 2005)、人に最も身近な動物として飼育されてきた長い歴史や、精神的な繋がりを求められてきたコンパニオンアニマルとしての背景、犬の社会性の高さを考慮すると、犬の OT 神経系を介したメカニズムが飼い主への愛着や、日々の関わり、トレーニングなどを含めたコミュニケーションにおいて、社会認知機能や社会行動の発現に関与し、飼い主とのいわゆる「絆」の形成を含めた良好な関係の構築や、問題

行動の発現などに関わっている可能性が考えられる。

そこで本研究では行動や気質に密接に関係する OT 分泌について調査することによって、犬の陽性感情について生理学的なアプローチを試みるとともに、人を対象とした異種間コミュニケーションにおける犬の OT 分泌と行動の関わりを明らかにすることを目的とし実験を行った。第 1 章では非侵襲的にサンプル採取が可能である犬の尿中 OT 測定方法を確立することを目的とし、第 2 章では日常生活刺激による犬の尿中 OT の変動とリラックスおよび陽性感情といった心理状態を客観的に評価する非侵襲的なバイオマーカーとしての尿中 OT 濃度変動の有用性を検討することを、第 3 章では犬と飼い主の双方の行動分析と尿中 OT を測定することによって、異種間の親和行動やコミュニケーションにおける OT の役割を明らかにすることを目的として実験を行った。

第1章. 血中 OT の尿中への排泄ならびにコルチゾールとの関係について

緒論

OT の作用について、近年、人において OT の鼻腔内投与によるストレス緩和作用 (Heinrichs et al., 2003) や、幸福感を感じる時に OT が増加すること (Turner et al., 1999) が明らかとなっている。一方、OT と愛着や親和行動との関係を調べた実験から、OT 受容体ノックアウトマウスにおいて他個体の匂いが記憶できないといった社会的健忘症を示すこと (Ferguson et al., 2000, 2002; Winslow and Insel, 2002, 2004) や、ラットにおいて脳脊髄液中の OT 濃度の上昇とともに社会行動が増加すること (Haller et al., 2003)、人の親子において母親からの Social vocalization が娘の OT の分泌を促す (Seltzer et al., 2010) といった報告がされている。その他にも人において不安の軽減や表情認知に関与し他者への信頼の形成に影響を与えることや、哺乳動物における仲間の認知、げっ歯類におけるつがいの形成や、親和行動の発現といった様々な社会行動に関与し、個体の気質や行動に影響を与えていること (Insel, 1997; Uvnäs-Moberg, 1997; Lim and Young, 2006; Bales et al., 2007; Grippo et al., 2009) が明らかとなっている。

人と犬の関わりにおいても、愛犬家が犬との発話やなでることなどの接触を伴った相互作用を行ったのちに、両者の血漿中 OT の分泌が促進されるとの報告 (Odendaal and Meintjes, 2003) や、犬との交流時に犬からの飼い主に対する注視が長い群では、注視の頻度と飼い主の尿中 OT 濃度が強い相関関係を示す (Nagasawa et al., 2009) ことなどが明らかとなっている。これらの研究から OT が人犬間の異種間のコミュニケーションに関与し、いわゆる「絆」の形成や円滑な関係の構築に寄与している可能性が考えられ、両者の OT 濃度を測定し、行動との関わりを明らかにすることは人・犬間の社会行動に関する研究の一助となると考えられる。

しかしながら、これら研究の大多数が脳脊髄液中もしくは血漿中の OT 濃度の測定を行っ

ている (Winslow et al., 2003; Devarajan and Rusak, 2004; Young, 2007; Maestripieri et al., 2009) ため、対象動物はサンプル採取による「苦痛を感じる」、「拘束ストレスを伴う」、「無麻酔下で行うことは困難である」などの肉体的、精神的負担に関する問題点もあげられる。また、人以外を対象とした研究のいくつかのケースでは、動物を殺すことで脳脊髄液中の OT 濃度の測定を行っているが、このような手法は福祉的な理由はもちろんのこと、飼育されている犬の大多数を占める一般家庭犬で行うことはできず、実用的ではない。中枢と末梢の OT の関係や分泌メカニズムは完全に解明されている訳ではないものの、マイクロダイアリシスを使用したマウスにおける研究においては、末梢血中の OT 濃度と中枢の OT 濃度に相関が見られる (Landgraf and Neumann, 2004) ことや、自身の子供の表情を視覚刺激として提示されたときの人の母親において、functional-MRI における反応と血漿中 OT 濃度に関連があったこと (Strathearn et al., 2009)、ハタネズミやアカゲザルおよび人において母性行動や養育行動と末梢血中の OT 濃度に関連が見られること (Wotjak et al., 1998; Carter et al., 2008; Maestripieri et al., 2009; Ross and Young, 2009; Feldman et al., 2010) などから、末梢における OT 濃度の測定は動物の行動と内分泌の関わりを明らかにするうえで非常に有用であると考えられる。

犬における OT に関する研究は妊娠期間中や分娩前後、陣痛時、授乳時などの血中 OT 濃度の変動に関するもの (Olsson et al., 2003; Klarenbeek et al., 2007; Bergstro et al., 2010) や獣医療に関するものがほとんどであり、社会行動とは無関係な研究が主である。Odendaalらは人になでられたり、話かけられたり、簡単な遊びを含んだ相互作用後に犬の血漿中 OT の分泌が促進されるとの報告 (Odendaal and Meintjes, 2003) をしている。また、Handlinら (2011) は Odendaal らの研究を元により細かくサンプル採取を行い、犬の OT 濃度の測定を行っているが、いずれもサンプルは血液である。実験動物以外の家庭犬において OT 濃度測定を行うこと考慮すると、非侵襲的かつ簡便にサンプル採取が可能である方法が望ましい。

末梢における OT 濃度の測定は血漿中 OT の他に、人において非侵襲的なサンプル採取が可能である唾液や尿中での測定が行われている (Heinrichs et al., 2009; Bick and Dozier, 2010)。一般的に、唾液中の生理指標は血中濃度の 5~10%といわれており (Malamud et al., 1993)、Odendaal らの研究において犬の血清中 OT 濃度が 100~500pg / L 前後と報告されていることを考えると、犬においては唾液中 OT 濃度が非常に低いと思われる。また、唾液中のタンパク質分解酵素が抗原抗体反応に影響し、酵素免疫測定法による測定が困難であると報告される (Horvat-Gordon et al., 2005) など、唾液中 OT 濃度測定の信頼性については今なお議論されているのが現状であり、本研究においては適切でないと考えられた。濃度に関する問題についてはサンプルを多量に採取し、抽出および濃縮することで回避している研究もある (White-Traut et al., 2009) が、犬においてチワワなど超小型犬からの唾液採取は容易ではなく、採取できるサンプル量は限られてくる。一方、人やコモンマーモセットにおける研究 (Amico et al., 1987; Seltzer, et al., 2007) では、尿中 OT の測定が行われている。犬の尿採取は、家庭犬においても一般的なしつけとして、いわゆる「トイレトレーニング」が浸透しており、特別なトレーニングを施されていない一般家庭犬からも簡単にサンプル採取が可能である。これらのことから犬の OT 濃度測定は尿サンプルを用いることが最も適切であると考えられる。

マウスやラット、サルなどの脳脊髄液中 OT 濃度や人の血漿中 OT 濃度は主に高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 法 (Holm et al., 2005; Chaibva and Walker, 2006; Lazari et al., 2006; Goda and Sudo, 2007) や enzyme immunoassay (EIA) 法 (Prakash et al., 1998; Pequeux et al., 2001; Sarkar and Prakash, 2006)、radioimmunoassay (RIA) 法 (Higuchi et al., 1984; Verbalis et al., 1986; Wotjak et al., 1998; Ueta et al., 2000) といった方法により測定が行われている。しかしながら、HPLC 法および EIA 法はともにアッセイ間誤差、アッセイ内誤差の可変性が高く、測定感度においても十分な感度を持ち合わせていないとの報告 (Anderson et al., 2006; Taylor et al., 2010) もあるため、本研究では適切でないと

考えられた。一方、RIA 法は血液中のインシュリン測定に用いられて以来、微量生体成分の測定法として生物学、医学などの分野で幅広く利用されており、尿のように種々の成分が多量に含まれている生体試料中に存在する、ごく微量なホルモンなどの特定物質の定量に適している。また、高い特異性および検出感度をもつことから、犬の尿中 OT 濃度測定において、最も適切であると考えられる。

そこで第 1 章では RIA 法を用いて非侵襲的かつ簡便にサンプル採取が可能である犬の尿中 OT 測定の適否の検討と、測定法の確立を目的とした。実験は人における尿中 OT 濃度の測定を行った Amico らの研究 (1987) をもとに、犬の静脈血中に外因性 OT を投与することで、犬における血中内 OT の尿中への排泄時間を調査した。また、末梢血中へ継続的に OT を投与した実験はマウスやラットにおいては行われていないが、人の男性において、副腎皮質刺激ホルモン (以下、ACTH) と血漿中コルチゾールが減少すること (Legros et al., 1987, 1988) が明らかとなっていることから、犬における外因性 OT 投与による尿中コルチゾールへの影響を検討することを第 2 の目的とした。

方法

供試動物

供試動物は、一般家庭犬 1 頭および村瀬ドッグトレーニングセンター（神奈川県）で飼育されている犬 5 頭の計 6 頭を使用した。本章では人からの声符で排尿するようトレーニングされ、かつ採血馴致を施されたラブラドル・レトリバーを用い、頻回採尿であるため全て未去勢の雄犬を用いて行った。犬の年齢は 5.3 ± 1.0 歳（mean \pm S.D.）であり、健康的な問題を抱えてはいなかった。詳細は Table 1 に示す。

Table 1 犬の犬種、性別および年齢について

個体	犬種	性別	年齢(歳)
A	ラブラドル・レトリバー	オス	6.8
B	ラブラドル・レトリバー	オス	4.7
C	ラブラドル・レトリバー	オス	4.8
D	ラブラドル・レトリバー	オス	4.1
E	ラブラドル・レトリバー	オス	5.3
F	ラブラドル・レトリバー	オス	6.0

オキシトシン投与

犬の伏在静脈より血中へ OT を投与し、人為的に血中濃度を上昇させることで尿中への排泄時間を調査した。投与する OT の濃度は、人において血中に OT 投与を行い、血漿および尿中 OT 濃度を測定した Amico らの研究（1987）を参考にした。投与量は人とラブラドル・レトリバーの平均的な体重の比より算出し、OT は富士製薬工業のオキシトシン注射液 5 単位「F」（富士製薬工業株式会社，日本）を生理食塩水で $500\text{pg} / \text{ml}$ に希釈し用いた。外因性 OT は血中投与後に急速に体内で代謝され、血中 OT の測定が困難になる可能性が考

えられたため 5 分毎に 0.25ml (125pg) ずつ計 4 回、総量 1ml (500pg) 投与した。なお、投与は個体への負担を考え留置針を用いて行った。

採血および採尿

血液および尿は OT 投与 30 分前より採取し、1 回目投与直前、4 回目投与直後、4 回目投与終了 15 分後、以後 30 分毎に計 4 時間、全 11 回にわたり採取した。採血は OT 投与と同様に個体への負担を考慮し留置針を用いて 1 回あたり約 1ml 採取した。なお、1 回目投与直前に得られたサンプルを平常時のものとして扱った。採血および採尿期間に犬は安静にしており、暴れることはなかった。実験の手順は Fig.1 に示す。

血液は採取後すみやかに EDTA 入り真空採血管 (VP-DK052K, ベノジェクト II 真空採血管, TERUMO, 日本) へ移し抗凝固処理を施した。尿は市販の計量カップで採取し遠心分離までコーニングチューブに入れ保存した。血液、尿ともに 4°C・1600g・15 分間の遠心分離後、血漿および尿の上清を得て 1.5ml チューブに分注し、測定まで -80°C で凍結保存した。

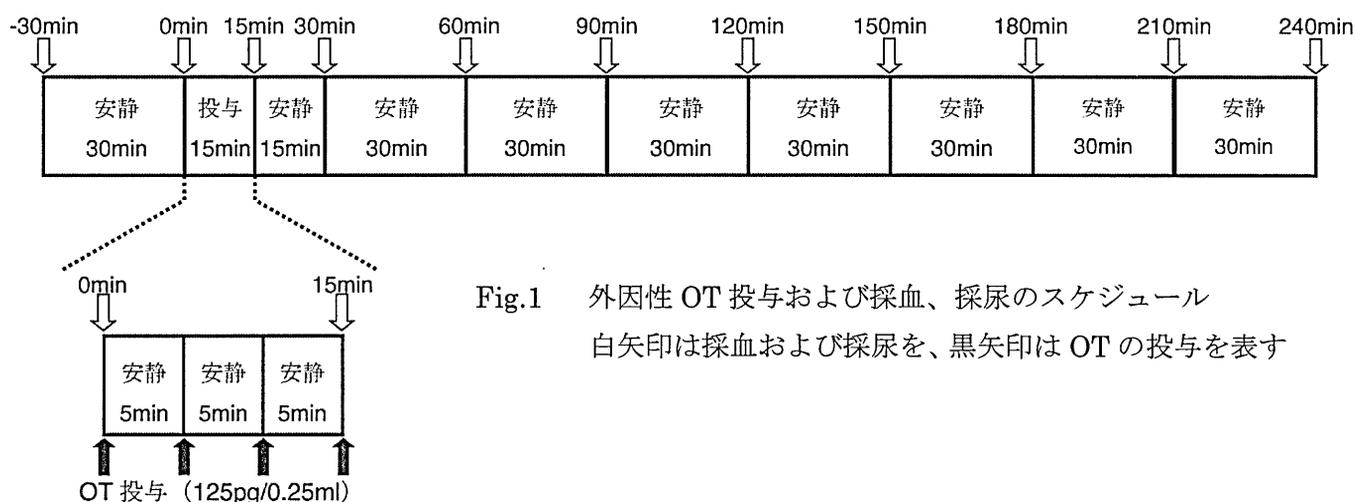


Fig.1 外因性 OT 投与および採血、採尿のスケジュール
白矢印は採血および採尿を、黒矢印は OT の投与を表す

血中および尿中オキシトシンの測定

血中および尿中 OT の測定は、RIA 法を用いラット血漿中 OT を測定した Higuchi らの研究 (1984) を参考に行った。また、尿サンプルは標準溶液や血漿サンプルと比べ、第二抗体による沈殿が形成されづらく、サンプルの pH などが抗原抗体反応に影響した可能性が考えられたため、抽出を行い使用することとした。

抽出には C18 Sep カラム (WAT020515, Sep-Pak® Plus C18 cartridge, Waters Corporation, USA) に 5ml シリンジ (SS-05SZ, テルモ株式会社, 日本) を装着し行った。コンディショニングのためにカラムにはメタノール 5ml を 2 回、蒸留水 5ml を 4 回通液し平衡にした。コンディショニング後、尿サンプル 400 μ l と 0.1N HCl を 400 μ l 通液し、4% 酢酸を 10ml 加え洗浄後、プランジャーによりシリンジに空気を送りこみ、水分除去後にメタノール 1.5ml を加え溶出した。溶出液は Vortex-Evaporator (Buchler GmbH, Germany) を用い、窒素ガスを吹きかけて蒸発乾固し測定まで -80°C で保存した。蒸発乾固した尿サンプルは測定時に 1%ウシ血清アルブミン入りリン酸緩衝液 200 μ l を加え、ボルテックスミキサーを使用し、20 分間断続攪拌することで溶解し使用した。

Radioimmunoassay 法

標準溶液としてペプチド研究所製 Oxytocin (4084-v, ペプチド研究所, 日本) を 1%ウシ血清アルブミン入りリン酸緩衝液 (1%BSA 0.01M PBS, pH7.5) で 3.9 ~ 4000pg / ml の濃度に等倍希釈 (計 9 段階) し使用した。BSA は Sigma-Aldrich Corporation 製 (A-8022, USA) であった。抗原として ^{125}I -Oxytocin (NEX187, Oxytocin, [^{125}I]Tyr 2 -, 370kBq, PerkinElmer Life & Analytical Sciences, USA) を 1%BSA 0.01M PBS で約 10000c.p.m. に希釈し使用した。第一抗体として福井大学医学部統合生理学教室から提供された抗オキシトシン家兔血清を 0.5%家兔血清入りリン酸緩衝生理食塩水 (0.5% NRS 0.01M PBS) で 80000 倍希釈して使用した。NRS は和光純薬工業株式会社製 (140-06571, 日本) を用いた。第二抗体とし

てヒツジ抗ウサギ IgG (PA1-85601, Anti-IgG, Rabbit, Sheep-Poly, Thermo Fisher Scientific, USA) を 1%BSA 0.01M PBS で 20 倍希釈し用いた。なお、1%BSA 0.01M PBS および 0.5% NRS 0.01M PBS は防腐剤として NaN_3 (195-11092, アジ化ナトリウム, 和光純薬工業株式会社, 日本) を 1L あたり 1g 添加した。

Radioimmunoassay 法は 100 μl の 1%BSA 0.01M PBS、50 μl の OT 標準溶液またはサンプル、50 μl の第一抗体、50 μl の抗原を Disposable Culture Tubes (10 \times 75mm, 9830-1007, 旭硝子株式会社, 日本) で混和し、4 $^{\circ}\text{C}$ で 72 時間インキュベートした。抽出および乾固した尿サンプルは 1%BSA 0.01M PBS 200 μl を加え、ダイレクトミックス (サーマル化学産業製, 日本) で断続攪拌、溶解し 50 μl 使用した。インキュベート後、第二抗体を加え、混和後に再び 4 $^{\circ}\text{C}$ で 72 時間インキュベートした。インキュベート後 4 $^{\circ}\text{C}$ ・1300g・20 分間遠心分離し、抗体と結合した OT からフリーOT を分離し、上澄みを吸引後、沈殿物の放射線活性を γ カウンター (ARC-370M, アロカ株式会社, 日本) で測定した。測定は 1 サンプルにつき 3 重測定を行った。また、アッセイ間誤差を算出するため測定毎に同一の尿サンプルを抽出・溶解し測定を行った。

尿中コルチゾール濃度の測定

Enzyme Immunoassay

尿中コルチゾールは 96 穴マイクロプレート (EIA / RIA Plate, 96 well, No Lid, Flat Bottom, Certified High Binding, Non-Sterile, Polystyrene: Corning Incorporated, USA) を使った EIA 法を使用し 1 サンプルにつき 2 重測定を行った。

プレートには第二抗体として用いた AffiniPure Goat Anti Rabbit IgG (H+L) (111-005-0045, Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., USA) を 400 倍希釈し、コーティング処理を施した。分析には標準溶液として hydrocortisone standard (CODE No.: 086-08241, 和光純薬工業株式会社, 日本) を 0.1%ウシ血清アルブミン入りリン酸緩衝液

(0.1%BSA 0.04 M PBS pH 7.2) で 0.39~400ng / ml の濃度に等倍希釈 (計 11 段階) し、標識ホルモンとして Cortisol-3-CMO-HRP (FKA 403, コスモバイオ株式会社, 日本) を、第一抗体として Cortisol-3-CMO-BSA IgG (FKA 404-E, コスモバイオ株式会社, 日本) を使用した。BSA は Sigma-Aldrich Corporation 製 (A7030, USA) を用い、尿サンプルを 0.1%BSA 0.04 M PBS で 5 倍希釈した。分析では標準溶液およびサンプルは 15 μ l を、第一抗体は 0.1%BSA 0.04 M PBS で 40000 倍希釈し 100 μ l を、標識ホルモンは 0.1%BSA M PBS で 300000 倍希釈し 100 μ l を使用し、各ウェルで混和した。その後、遮光し 4 $^{\circ}$ C で 18 時間インキュベートした後、プレートに 0.05% Tween 80 溶液で洗浄した。洗浄後、溶液 A (0.1% urea hydrogen peroxide, 0.1M sodium dihydrogenphosphate, 0.05M citric acid) と溶液 B (0.05% 3, 3', 5, 5'-tetramethylbenzidine, 4% dimethyl sulfoxide, 0.05M citric acid) を 1:1 の割合で混合した substrate buffer を各ウェルに 150 μ l 入れ、室温で 20 分間インキュベートし、4N H₂SO₄ 溶液を 50 μ l 加え、反応を止めた後、吸光度 (450nm) をマイクロプレートリーダー (Model 680: Bio-Rad Laboratories, CA, USA) を用いて測定した。また、アッセイ間誤差を算出するため、測定毎に同一の尿サンプル測定を行った。

尿中クレアチニン測定

尿中クレアチニン測定には 96 穴マイクロプレート (EIA / RIA Plate, 96 well, No Lid, Flat Bottom, Certified High Binding, Non-Sterile, Polystyrene: Corning Incorporated, USA) を使用したヤッフエ法を用いた。クレアチニン標準液はクレアチニン (和光純薬工業株式会社, 日本) 100mg を 0.1M 塩酸溶液 (和光純薬工業株式会社, 日本) で溶解し、100ml になるように定容し、1.0 mg / ml クレアチニン標準液として使用時まで 4 $^{\circ}$ C で保存した。測定時にはさらに 100 倍希釈し用いた。その他の試薬としてピクリン酸 (和光純薬工業株式会社, 日本) 1g に約 80ml の蒸留水を加えて加熱しながら溶解し 100ml に定容した 1.0 g / dl ピクリン酸 (2, 4, 6-Trinitrophenol; TNP)、水酸化ナトリウム (和光純薬工業株式会社,

日本) 2g を約 40ml の蒸留水に溶解し、50ml に定容した 1M 水酸化ナトリウム (NaOH) を用いた。

測定は 10 μ g / ml クレアチニン標準液、100 倍希釈尿および蒸留水をそれぞれスタンダード (STD)、サンプルおよびブランク (BLK) とし、各 2 穴に 150 μ l ずつ添加した。次に、1.0 g / dl TNP および 1M NaOH を 50 μ l / well 加え攪拌した。室温で 20 分間静置した後、吸光度 (490nm) をマイクロプレートリーダー (Model 680: Bio-Rad Laboratories, CA, USA) を用いて測定した。尿中クレアチニンは尿中 OT および尿中コルチゾールのクレアチニン補正に用いた。尿中クレアチニン濃度 (mg / dl) は以下の式により求めた。また、アッセイ間誤差を算出するため、測定毎に同一の尿サンプル測定を行った。

クレアチニン濃度 (mg / dl)

$$= (\text{サンプルの吸光度} - \text{BLK の吸光度}) / (\text{STD の吸光度} - \text{BLK の吸光度}) \times 100$$

なお、本実験は麻布大学実験動物倫理委員会の承認を受けている (承認番号: #10-33)。

結果

血中および尿中 OT 濃度について

RIA 法による OT 測定の最低測定感度は 4.50pg/ml であった。アッセイ内誤差は 4.65% であり、アッセイ間誤差は 9.50% であった。

Fig.2 に OT 投与開始 30 分前から投与後 4 時間における犬の血中 OT 濃度および尿中 OT 濃度の変動を示した。OT 投与開始直前の平常時 (0min) において、血中濃度は 65.55 ± 17.20 pg/ml であった。血中 OT 濃度のピークは投与終了直後 (15min) であり、その濃度は 1492.23 ± 422.37 pg/ml あった。投与終了 15 分後 (30min) の血中 OT 濃度は 166.60 ± 39.04 pg/ml であり、血中 OT はピーク後速やかに代謝された。投与開始直前 (0min) の平常時尿中 OT 濃度は 70.71 ± 13.11 pg/mg creatinine であった。尿中 OT 濃度がピークを示したのは血中への投与開始から 1 時間後 (60min) であり、 225.96 ± 61.06 pg/mg creatinine であった。その後尿中 OT 濃度は血中 OT 濃度と比べ緩やかにベースラインへと戻った。

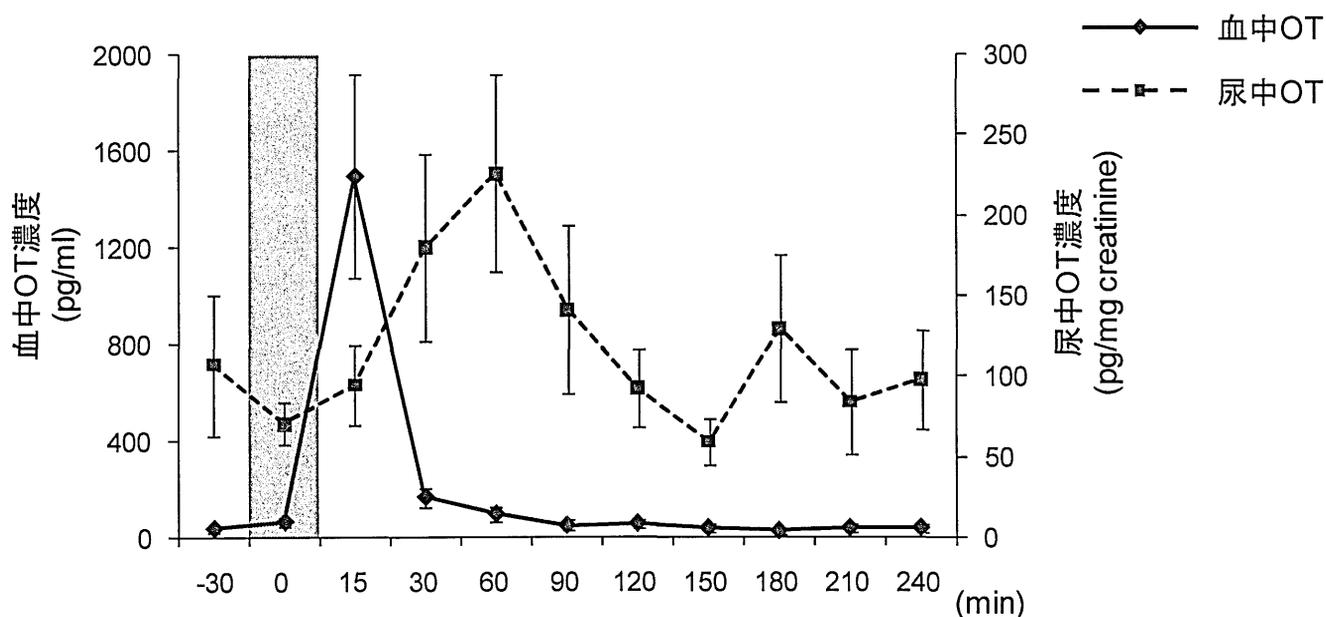


Fig.2 OT 投与 30 分前から 4 時間後における犬の平均血中 OT 濃度および尿中 OT 濃度の変動 (mean \pm S.E.) 灰色部は OT 投与期間を示す。実線は血中 OT 濃度を、点線は尿中 OT 濃度を表している。

尿中コルチゾール濃度について

EIA 法による尿中コルチゾール測定においてアッセイ内誤差は 3.0%、アッセイ間誤差は 0.6%であり、最低感度は 140 ng / dL であった。

Fig.3 に OT 投与開始 30 分前から投与後 4 時間における犬の尿中コルチゾール濃度の変動を示した。コルチゾールは平常時 (0min) において 11.97 ± 3.10 ng / mg creatinine であった。本実験期間中、尿中コルチゾール濃度は、ほとんど変化しなかった。

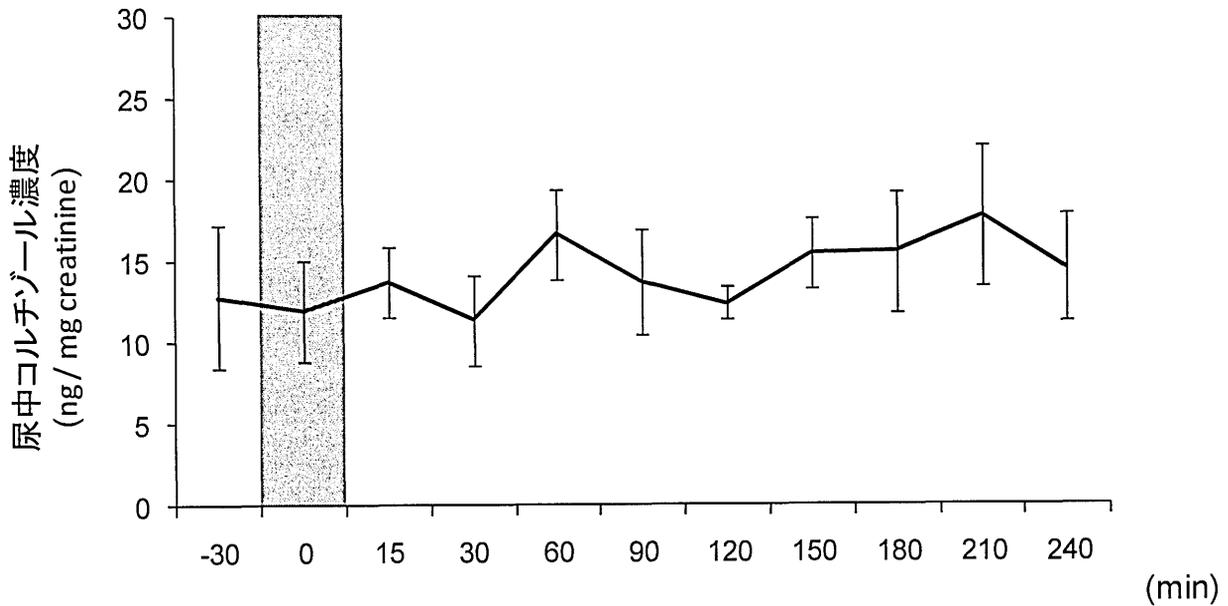


Fig.3 OT 投与 30 分前から 4 時間後における犬の平均尿中コルチゾール濃度の変動 (mean \pm S.E.) 灰色部は OT 投与期間を示す。

考察

本章では特別なトレーニングを施されていない一般家庭犬においても、簡便かつ非侵襲的に採取が可能である尿サンプル中の OT 濃度を測定することを目的とし実験を行った。また、過去の研究から HPLC 法や EIA 法などによる OT 測定はアッセイ間誤差、アッセイ内誤差が高く、十分な感度を持たない可能性が示唆 (Anderson et al., 2006; Taylor et al., 2010) されていたため、より微細な変化を正確に捉えることができる RIA 法による測定法の確立を目指した。さらに、尿中 OT 濃度の測定はコモンマーモセット、マウス、人においていくつか報告がある (Polito et al., 2006; Seltzer et al., 2006; Bick and Dozier, 2010; Seltzer et al., 2010) もの、犬における測定は行われておらず、尿中 OT 濃度を犬の心理状態を客観的に評価する非侵襲的なバイオマーカーとするためには循環血中の OT が尿へ排泄される時間を検討する必要がある。

RIA による OT 濃度測定について

本実験の OT 濃度測定におけるアッセイ内誤差およびアッセイ間誤差変動は過去の EIA 法や HPLC 法を用いた研究よりも低く、他の方法と比べ最低測定感度にも優れていた。尿サンプルにおいては原尿を使用すると第二抗体による沈殿が形成されづらく、C-18 カラムを用いて抽出を行うことで第二抗体による沈殿はスムーズに形成された。これらのことより、犬の尿サンプルにおいても OT 濃度の測定が正確に行えることが明らかとなった。投与開始直前の平常時血漿中 OT 濃度は $4.70 \sim 121.79 \text{ pg/ml}$ と個体により大きく異なることが明らかとなり、平常時に 4.70 pg/ml の個体が存在することから RIA 法においてもこれ以上血漿中濃度が低下すれば検出が困難になると考えられる。また、投与終了直後の血中 OT 濃度は $1492.23 \pm 422.37 \text{ pg/ml}$ であり、投与量を考えると非常に高い濃度となった。これは、本実験で投与に用いた OT は純度が $85 \sim 120\%$ と製品内でもばらつきがあったことから、

実際には 500pg / ml 以上投与されていた可能性や、血液サンプルは抽出を行っていないため、投与した OT の添加物として製品に入っていたクロロブタノールや pH 調整剤が抗原抗体反応に影響を与え高濃度となった可能性も考えられた。さらに、OT 投与により犬の OT 分泌が促進した可能性も考えられた。一方、尿サンプルにおける平常時値は 29.02～84.78 pg / mg creatinine で、実測値の最低濃度は 49.50pg / ml と十分に測定範囲内であった。OT 濃度の変化を犬の心理状態を表すバイオマーカーとするためには、サンプル採取に伴う痛みや保定による拘束ストレスといった福祉的な課題、採血にならすための長い馴致期間といった時間的問題、サンプルの量的問題以外に測定感度も血漿中 OT 濃度より尿中 OT 濃度の方が種々の問題を克服し個体の状況をより正確に表すものと考えられた。

血中 OT の尿中への排泄時間について

刺激提示前後の尿中 OT を測定した研究は人において行われており、尿採取は実験刺激開始から 30～50 分後に実施されていたが、実験対象者が子供であることなどの理由から、採取時間はあまり考慮されておらず (Fries et al., 2005)、尿中 OT 濃度を測定するための適切なサンプリング時間の検討は行われていない。また、犬においては尿中 OT 濃度の測定は全く行われておらず、循環血中に放出された OT の尿中への排泄時間は不明であった。そこで本実験では OT を犬に投与し、人為的に血中 OT 濃度を上昇させ、尿中への排泄時間の検討を行った。その結果、血中 OT 濃度は投与終了直後に最も高くなり、尿中 OT 濃度は投与開始から 1 時間後に最も高い値を示した。動物種の違いはあるものの、過去に行われた人やコモンマーモセットにおける OT 投与実験 (Amico et al., 1987; Seltzer et al., 2007) によると、静脈への OT 投与後 30 分から 60 分において尿中 OT 濃度は平常時より高値を示し、本研究もほぼ同様の結果を示していることから犬の尿中 OT 濃度の変動をとらえることは可能であると考えられ、尿中 OT が最高濃度を示した血中投与開始から 1 時間後を犬の血中 OT の尿中への排泄時間とし、第 2 章以降、実験開始から 1 時間後に採尿を行うこと

とした。

OT 投与による尿中コルチゾール濃度への影響について

本実験において尿中コルチゾール濃度はほとんど変化しなかった。Legros ら (1987,1988) の研究によると、人の男性の静脈へ OT を投与することにより血漿コルチゾール濃度が減少することが明らかとなっている。しかしながら、Legros らの研究の対象者 1 名は、他の対象者と異なり血漿 ACTH 濃度および血漿コルチゾール濃度は減少しなかったと報告されている。また、OT の血中投与が HPA 活動に影響を与えない (Lewis and Sherman, 1985)、または ACTH の分泌を促進する (Muir and Pfister, 1988) といった、全く逆の研究報告がある。本研究においては血中 OT 投与によりコルチゾールはほとんど変化しなかったことから、分泌を減少させることも増加させることもなかったと考えられる。また、Legros ら (1987, 1988) は血管留置カテーテルを用い、多量 (64pg / min、総量 3840pg) の外因性 OT を 1 時間にわたり連続投与していた。本研究では少量 (総量 500pg) の外因性 OT を 4 回に分け、15 分間断続的に投与した。投与終了後、血中 OT が急激に代謝され、15 分後にほぼベースラインに戻ったことを考慮すると、投与した OT は急速に代謝されることで HPA 活動に影響を与えず、尿中コルチゾールにも影響を与えなかったと推察される。加えて、供試動物は実験期間中に暴れることなくリラックスしており、コルチゾール濃度は実験期間中常に低いままであった。これらのことから、人において確認されている外因性 OT の血中投与による血漿コルチゾール減少効果は尿中で確認することはできず、犬においてはその効果はないと考えられる。

結論

本章では、一般家庭犬を用いて、簡便かつ非侵襲的に採取が可能である尿サンプル中の OT を測定するため、犬の血中に OT を投与し循環血中 OT の尿中への排泄される時間を検討した。その結果、尿は C-18 カラムを用いて抽出を行うこと、および OT 濃度測定には RIA 法を用いることで犬の尿中 OT 濃度を測定することが可能であり、非侵襲的に OT の変化を評価できることが明らかとなった。また、尿中 OT 濃度は OT 投与開始から 1 時間後にピークを示した。このことから犬の血中に投与された OT の尿中への排泄時間は投与開始から 1 時間後であることが明らかとなり、第 2 章以降、実験開始から 1 時間後に採尿を行うこととした。

第2章. 日常的な刺激による犬の OT 分泌

緒論

近年、人と犬の関係における、特に犬が人の精神的、身体的健康に与える、いわゆる「よい影響」について多くの研究がなされている。その一方で、人が犬の情動に与える影響はカテコールアミンやコルチゾールなどのストレス反応物質を測定し、評価することが一般的である (Hennessy et al., 1998, 2006; Coppola et al., 2006; Haubenhofner and Kirchengast, 2007; Menor-Campos et al., 2011)。これらの評価は生理活性物質を測定することで動物の内的状態を客観的に評価するものであるが、個体のストレスの有無を評価するものであり、「うれしい」といった陽性感情は評価することができない。犬のリラックスや安堵、うれしさといった陽性感情を評価する場合、彼らの尾の位置や高さ、および振り方、耳の位置や向き (Abrantes, 1987; Quaranta et al., 2007) などのいわゆるボディールanguageを行動観察により見極め、推測することが一般的であり、客観的な評価法は確立されていないのが現状である。また、犬の行動観察には高い観察能力が要求される場合もあり、生理学的なパラメーターを用いた客観的評価法の確立が必要であると考えられる。

OT は下垂体後葉から循環血中に分泌されるペプチドホルモンであり (du Vigneaud, 1956; Cazalis et al., 1985, 1987; Nordmann and Dayanithi, 1988; Richard et al., 1991)、人においてパートナーや配偶者との接触により血漿中 OT が増加すること (Grewen et al., 2005) や、マッサージ後の陽性感情に応じて血漿中 OT が増加する (Turner et al., 1999; Uvnäs-Moberg et al., 2004; Bello et al., 2008) こと、ラットにおいては5分間の40回 / 分のなでる行為が OT を分泌させる (Agren et al., 1995; Uvnäs-Moberg et al., 1996) といった報告があり、接触やぬくもりによって OT 分泌が促進される (Matthiesen et al., 2001; Morhenna et al., 2008) と考えられている。また、リラックスおよび陽性感情といった心

理上のメカニズムに関係があることが示唆されていること (Carter, 2003; Uvnäs-Moberg et al., 2005; Miller et al., 2009; Ishak et al., 2011) から、末梢器官において動物の心理状態を客観的に評価するのに適していると考えられる。

しかしながら、犬の OT 濃度に関する研究は、獣医療における血中 OT 濃度の測定 (Olsson et al., 2003; Klarenbeek et al., 2007; Bergstro et al., 2010) が主であり、平常時の血中 OT 測定を行った研究すらほとんどないのが現状である。本研究第 1 章においても、血中に OT を投与し、人為的に血中 OT 濃度を増加させたうえでの測定であるため、尿中 OT 濃度を犬の心理状態を客観的に評価する非侵襲的なバイオマーカーとするためには、一般的に犬が陽性感情を抱くような刺激やリラックスを促す刺激が犬の尿中 OT 分泌に与える影響を調査し、測定する必要がある。

過去の研究では先に述べた接触やマッサージなどの触覚以外にも、OT は人やラットにおいてエネルギー代謝に関係しており、消化管ホルモンであるコレシストキニン投与により迷走神経を活性化することで分泌が誘発されることから、食物摂取によって血漿 OT が増加すること (Verbalis et al., 1986) や、人やラットにおいて走運動や水泳により血漿 OT の分泌が促進される (Landgraf et al., 1982; Lang et al., 1983; Kasting et al., 1988) ことも知られており、消化管や筋肉などへの刺激が遠心性迷走神経活動の亢進を引き起こし、結果として OT が分泌される (Araki et al., 1984; Stock and Uvnäs-Moberg, 1988) と考えられている。また、犬をなでることを含んだ人と犬の相互作用後に、人と犬の両者の血漿中 OT 濃度が増加したこと (Odendaal and Meintjes, 2003; Handlin et al., 2011) から、異種間による触覚刺激を伴ったコミュニケーションに対しても呼応すると考えられる。

これらの摂食や運動、なでるといった刺激は一般的な家庭犬の飼育において給餌や散歩、日々のコミュニケーションとして日常的に飼い主をはじめとした人から提供される行為であり、犬のトレーニングにおいても強化子としてしばしば用いられることから、犬の陽性感情を誘起させる重要な要素であると考えられる。なかでも、なでる行為は人が犬に与え

る社会的報酬として学習効率に影響するとともに、心拍数や血圧を減少させ犬をリラックスさせる効果があることが報告 (Fonberg et al., 1981; Kostarczyk and Fonberg, 1982; Okamoto et al., 2009) されている。また、OTは他者への信頼の形成、つがいの形成、愛着、仲間の認知といった社会行動に関与し、個体の気質や行動に影響を与えていること (Insel, 1997; Uvnäs-Moberg, 1997; Lim and Young, 2006; Bales et al., 2007; Grippo et al., 2009) が知られていことから、人から提供される食餌や運動、接触により犬の OT 分泌が促進されることで、人との円滑なコミュニケーションに関与し、しいては人と犬のいわゆる「絆」の形成に寄与している可能性も考えられる。これまでの OT と陽性感情の関係を調査した研究では、血液サンプルによる OT 濃度の測定が主であった。しかしながら、本研究第 1 章において、RIA 法を用いることで犬の尿中 OT の測定が可能であり、また血中 OT の尿中への排出時間は刺激開始から 1 時間であることが明らかとなったことから、犬の陽性感情と尿中 OT の関係性を調査することで、非侵襲的かつ客観的に心理状態を評価することが可能であると考えられた。

一方で、視床下部や末梢における OT の増加は、ストレス反応である HPA 軸の活動を抑制すること (Neumann et al., 2000; Neumann, 2002; DeVries et al., 2003; Gibbs, 2003) が報告されている。泌乳動物においては、子どもの吸引刺激によって母親の中脳および末梢の OT が増加することにより血中コルチゾール濃度が下がること (Chiodera et al., 1991; Amico et al., 1994; Heinrichs et al., 2001; Russell et al., 2001) が知られ、ラットにおいては、授乳により OT 分泌が促進されることで騒音 (Windle et al., 1997) や強制的な水泳 (Walker et al., 1995)、低温暴露 (Adels et al., 1986) といった様々なストレス刺激における HPA 軸活動を鈍らせることが明らかになっており、人において授乳後に運動を行った研究では、授乳により分泌された OT が運動による血中 ACTH とコルチゾールの増加作用を減弱させるといった報告 (Altemus et al., 1995) がある。これらの研究は、触覚刺激により OT 分泌が促進されることで HPA 軸活動を抑制または減弱させ、種々のストレス反応を抑

制または改善する効果があることを示している。

そこで本章では、ラットや人において OT 分泌の報告があり、犬の陽性感情を誘起させるために重要な刺激である「摂食」、「運動」、「なでる」行為が、犬においても OT 分泌を促すかどうか明らかにすることを第 1 の目的とした。また、現在犬の研究において客観的に個体の状態を判断するために測定されているストレスマーカーであるコルチゾールとの関係性を調査することで、犬のリラックスおよび陽性感情といった心理状態を客観的に評価する非侵襲的なバイオマーカーとしての尿中 OT 濃度測定の有用性を検討することを第 2 の目的として実験を行った。

方法

供試動物

供試動物は一歳以上の成犬であり、一般家庭犬 5 頭および麻布大学介在動物学研究室で飼育されている犬 4 頭の計 9 頭を使用した。犬の年齢は 3.2 ± 2.1 歳 (mean \pm S.D.) であり、健康的な問題を抱えてはいなかった。全ての犬は人からの声符で排尿するようトレーニングされていた。供試犬の詳細は Table 2 に示す。

Table 2 供試動物の詳細 (犬種, 性別, 年齢) について

犬種	性別	年齢
ゴールデン・レトリバー	去勢オス	1.3
柴犬	避妊メス	3.6
ジャック・ラッセル・テリア	去勢オス	3.4
ジャーマン・シェパード・ドッグ	去勢オス	4.3
スタンダード・プードル	メス	1.3
スタンダード・プードル	去勢オス	1.1
フラットコーテッド・レトリバー	避妊メス	6.0
ミニチュア・シュナウザー	避妊メス	1.1
ラブラドル・レトリバー	オス	6.5

実験手順

日常生活の刺激が犬の尿中 OT に与える影響を評価するため、人やラットなどで血漿中 OT 増加の報告がある「摂食」、「運動」、「マッサージ」を実施した。これらの刺激は OT 増加の報告がある刺激であるとともに、トレーニングにおいても一般的に強化子として使用されることから、犬が本能的に陽性感情やリラックス、安心を抱くと考えられる。また、コントロール実験として OT 増加の報告がない飲水を行った。

全ての実験は飼い主以外の女性 2 名、男性 1 名の実験者のうちいずれか 1 名により行った。実験者は各供試個体のことをよく知る人物であったが、飼い主や、犬の世話をする人

物ではなかった。運動は 15 分間の走運動とし、個体ごとに運動量に差が生じないように、常に速歩で走ることを要求した。このとき実験者は犬に触れることはなく、最低限の声符のみで速歩するように指示した。摂食は普段給餌しているドライフードを一日の必要摂取量の半分与えた。実験は犬のペースでフードを食べるように行い、実験者が犬をせかす等の行為は一切行わなかった。また、運動刺激と同様に犬に触れることはなかった。摂食実験において全ての犬はフードを残すことはなかった。マッサージは犬を仰向けにし、犬のトレーニングにおいてリラックスを目的として行われる、いわゆる「ホールディング」の状態にした上で腹部を 15 分間なでた。このとき社会的な強化子の要因を取り除くため、実験者からアイコンタクトや声符は一切行わなかった。飲水は最低 50ml の水を飲むことを要求した。刺激を与えた後、犬は直ちに安静にするため犬舎に入れた。これらの実験は犬が刺激を連想し OT が分泌されることを避けるため、日常に行う散歩や給餌、運動の時間を避けて行った。また、ドライフードのにおいや食器の音など刺激を連想させるものの準備は別室で行い、陽性感情を誘起させないよう細心の注意を払った。

採尿

第 1 章の結果に基づき実験開始 2 時間前までに犬に 1 度排尿させ、その後実験開始まで犬舎内で安静にした。刺激実施直前に再度排尿させサンプルを採取し (Pre)、刺激開始から 1 時間後採尿を行い、サンプルを得た (Post)。尿サンプルは 4°C、3000 回転 / 分にて 15 分間遠心分離し、尿をチューブに分注し、分析まで -80°C 以下で保存した。

尿中オキシトシン、尿中コルチゾール、尿中クレアチニンの測定

尿中オキシトシン、尿中コルチゾール、尿中クレアチニンの測定は第 1 章と同様の手順で行った。尿中 OT および尿中コルチゾールはクレアチニン補正を用い表記した。また、アッセイ間誤差を算出するため測定毎に同一尿サンプルの測定を行った。

統計解析

各刺激の尿中 OT およびコルチゾールへの影響を考察するため Wilcoxon signed-ranks test を用い Pre および Post の統計解析を行った。

なお、本実験は麻布大学実験動物倫理委員会の承認を受けている（承認番号：#10-33）。

結果

尿中 OT 濃度について

Fig.4 に各刺激前後における尿中 OT 濃度を示した。飲水による尿中 OT への影響は見られなかった ($p = 0.31$)。対照的に、摂食、運動、マッサージは有意に犬の尿中 OT 濃度を増加させた (摂食 $p < 0.05$; 運動 $p < 0.05$; マッサージ $p < 0.01$)

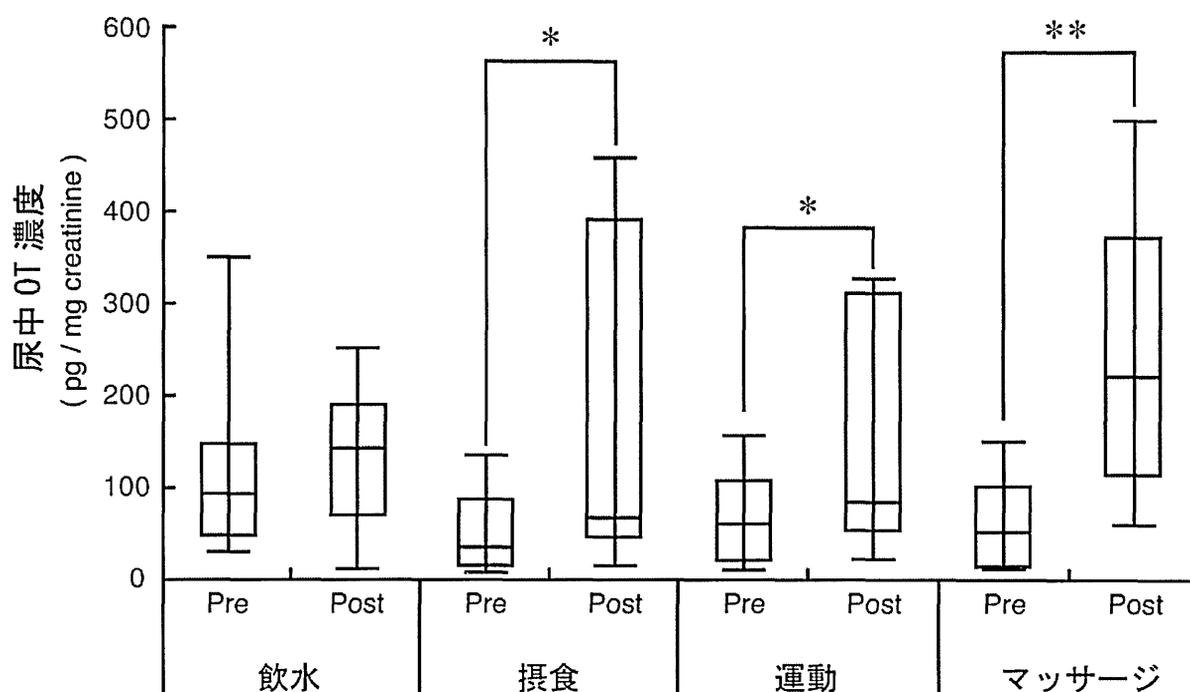


Fig.4 飲水、摂食、運動、マッサージ前後における犬の尿中 OT 濃度
各バーは下から最小値、第 1 四分位、中央値、第 3 四分位、および最大値を表している。
Wilcoxon signed-ranks test, Pre vs. Post, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$

尿中コルチゾール濃度について

Fig.5 に各刺激前後における尿中コルチゾール濃度を示した。飲水、運動、マッサージによる尿中コルチゾール濃度への影響は見られなかった（運動 $p = 0.38$ ；飲水 $p = 0.08$ ；マッサージ $p = 0.42$ ）が、摂食は有意に犬の尿中コルチゾール濃度を上昇させた（ $p < 0.01$ ）。

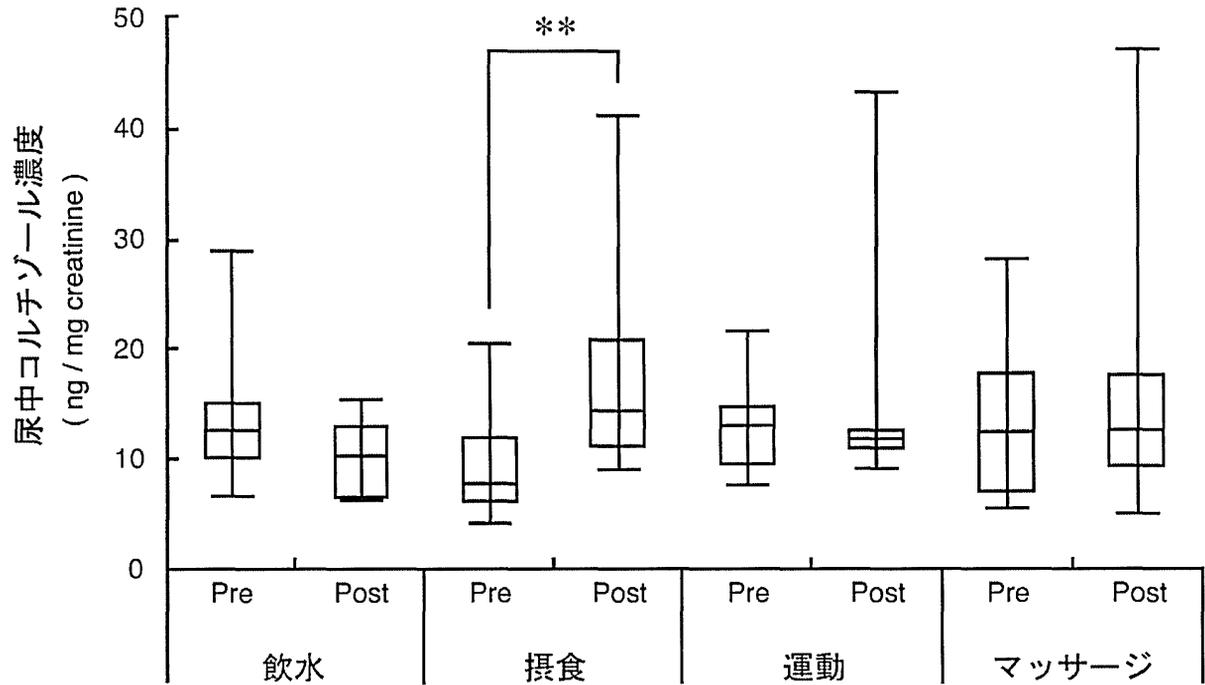


Fig.5 飲水、摂食、運動、マッサージ前後における犬の尿中コルチゾール濃度
各バーは下から最小値、第1四分位、中央値、第3四分位、および最大値を表している。
Wilcoxon signed-ranks test, Pre vs. Post, ** $p < 0.01$

考察

本研究第 1 章では OT を犬の静脈に投与し、人為的に血中 OT 濃度を上昇させたうえでの尿中 OT 濃度がどのように変化するかについて検討した。第 2 章では日常生活の中で起こりうる状況においても犬の尿中 OT 濃度が上昇し、その変動が RIA 法によって測定可能であるかどうか検討することを第 1 の目的とした。また、現在犬の情動を客観的に把握するために行われているコルチゾール濃度測定も合わせて実施し、尿中 OT 濃度測定の変化との関係性を調査することで、犬の心理状態を客観的に評価する非侵襲的なバイオマーカーとしての尿中 OT 濃度の変化の有用性を検討することを第 2 の目的とし、「摂食」、「運動」、「マッサージ」を行い、各刺激前後における犬の尿中 OT 濃度の変動を測定した。

各刺激による尿中 OT 濃度の変化

摂食、運動、およびマッサージは犬の尿中 OT 濃度を刺激前の濃度と比べて有意に増加させた。これまで OT 増加の報告がない飲水は、本実験においても尿中 OT 濃度に影響を与えなかった。これらのことから、日常的な刺激による OT 分泌は、RIA 法を用いた尿中 OT 濃度測定を行うことで、非侵襲的にその変動をとらえられることが可能であった。また、摂食、運動、マッサージによる OT 濃度の増加は、各刺激前後に人やラットの血中 OT の測定を行った研究（Landgraf et al., 1982; Verbalis et al., 1986; Kasting et al., 1988; Turner et al., 1999; Carter, 2003; Miller et al., 2009）ときわめて類似した結果であり、犬においても摂食、運動、マッサージの各刺激は OT の分泌を促進する刺激であることが明らかとなった。

摂食および運動は犬の陽性強化法を用いたトレーニングにおいて、報酬としてごく一般的に用いられ、陽性感情を誘起させる強化子として使用されている。また、マッサージなどのなでる行為は犬のトレーニングにおいて学習効率を改善させることから、社会的な報

酬として機能し犬に陽性感情を抱かせることはもちろん、心拍数や血圧を減少させ犬をリラックスさせる効果があることが報告 (Fonberg et al., 1981; Kostarczyk and Fonberg, 1982; Okamoto et al., 2009) されている。過去の人における研究では、OT はリラックスや安堵、陽性感情に関係していると示唆 (Carter, 2003; Uvnäs-Moberg et al., 2005; Miller et al., 2009; Ishak et al., 2011) されており、Turner ら (1999) は人の女性において陽性感情に応じて OT が分泌されたことを報告していることから、本研究においても「摂食」、「運動」、「マッサージ」は犬にリラックスや安堵、陽性感情を誘起させる刺激であったと思われる、各刺激に応じて犬の尿中 OT が有意に増加したことから、尿中 OT は犬の陽性感情を評価する非侵襲的なバイオマーカーとして有効である可能性が示唆された。

各刺激による尿中コルチゾール濃度の変化

本実験において各刺激前後における尿中コルチゾール濃度は摂食のみで有意に増加することが明らかとなった。一般的に摂食と運動は必要なエネルギーを供給するために糖新生を増加させることから、結果的にコルチゾール濃度を増加させる刺激であること (Hartley et al., 1972; Davies and Few, 1973; Kato et al., 1980, 1984) が知られている。しかしながら、本研究において運動刺激によって尿中コルチゾール濃度は上昇しなかった。この原因として犬に与えた運動強度が関係している可能性が考えられた。Rojas Vega ら (2007) は人において、低強度の運動では血中コルチゾール濃度に変化がないことを報告している。このことから、本章で犬に与えた運動強度が犬のコルチゾールを分泌させるに至らなかった可能性が考えられる。また、Rudolph ら (1998) は人において、30 分の走運動後に測定されたコルチゾール濃度と運動中の快・不快の感情を評価する Feeling Scale scores (very bad -5 ポイント～ very good +5 ポイントの範囲で評価) に負の相関関係があったことを報告している。つまり、肉体的な負荷がコルチゾール分泌に影響を与えるだけでなく、運動そのものに対する感情もコルチゾール濃度に影響を与える一つの要因であるということ

ある。本章で行った実験において、運動は強制的な走運動ではなく散歩や報酬としての遊びを想定しており、犬が不快な感情を抱くような刺激とならないように設定しているため、運動刺激前後の尿中コルチゾール濃度に差が見られなかったとも考えられた。

尿中 OT と尿中コルチゾールの関連性および尿中 OT 濃度測定の有用性について

人やラットに OT を投与すると、血漿中 ACTH やコルチコステロン、コルチゾール濃度は減少すること (Legros et al., 1987, 1988; Petersson et al., 1999) が知られ、授乳時の OT 分泌と HPA 軸活動の関連を調査した研究においては、新生児の吸引刺激によって OT 分泌が促進されると、血中 ACTH や血漿コルチゾール濃度が減少することから、OT は HPA 軸系のストレス反応を抑制する可能性が示唆されている (Adels et al., 1986; Chiodera et al., 1991; Amico et al., 1994; Altemus et al., 1995; Walker et al., 1995; Nissen et al., 1996; Windle et al., 1997; Heinrichs et al., 2001; Russell et al., 2001)。本章では運動刺激により犬の尿中 OT 濃度が増加していることから、OT 分泌が促進されることにより HPA 軸活動に影響を与え、運動時のコルチゾール分泌を抑制した可能性も考えられた。

一方で、摂食においては尿中コルチゾール濃度が増加していた。人やマウス、ラットの研究報告においては、OT 分泌が促進されることにより HPA 軸反応が抑制することが知られているが、人と犬の相互作用後に犬の血中 OT および血中コルチゾール濃度を測定した研究 (においては、犬の血中 OT 濃度が増加しているにもかかわらず血中コルチゾール濃度が増加する傾向があり (Odendaal and Meintjes, 2003)、Handlin らの研究 (2011) において犬の血中 OT 濃度、血中コルチゾール濃度ともに有意に増加したと報告されている。これらの研究や本研究の摂食刺激においても前述の OT 分泌による HPA 軸反応の減弱効果があった可能性も考えられることから、犬の陽性感情を評価する場合、コルチゾール濃度測定単体での評価は難しいと考えられる。

これらのことから、犬の陽性感情を評価するには、従来行われてきたストレス反応物質

であるコルチゾール単体の測定よりも、尿中 OT 濃度による評価の方が適切であると考えられ、特に、HPA 軸反応を伴わない、非ストレス下における評価においては尿中 OT が有効であることが明らかとなり、非侵襲的な犬の陽性感情を把握するバイオマーカーとしての有用性が示唆された。

結論

本章では犬の陽性感情を誘起する刺激による OT 分泌への影響を調査した。その結果、人から提供される日常的な刺激であり、トレーニングにおいて強化子として使用される「摂食」、「運動」、「なでる行為」は犬の尿中 OT 濃度を有意に上昇させることが明らかとなった。また、「摂食」、「運動」、「なでる行為」による尿中コルチゾール濃度は刺激により異なった反応を示した。これらのことから、犬の陽性感情を評価する場合、従来行われてきたコルチゾール濃度による評価ではなく、尿中 OT 濃度による評価が適切であると考えられ、犬の心理状態を客観的に評価する非侵襲的なバイオマーカーとしての尿中 OT 濃度測定の有用性が示唆された。

第3章. 人・犬間の相互コミュニケーションによる OT 変化

緒論

人と動物の関わりにおいて、心臓疾患入院患者の退院 1 年後の生存率はペットの飼い主が非飼い主と比べ高いこと (Friedmann et al., 1980)、犬を飼うことによって、高齢者の病院への通院回数が明らかに減少すること (Siegel, 1990)、ペットを飼育することは人の健康に関する問題を減少および改善させること (Serpell, 1991) など、様々な研究により動物が人に有益な効果をもたらすことが明らかにされてきた。これらの人が動物から受ける恩恵は疫学的な調査が多く、評価は心理尺度によるもの (Gilbey et al., 2007; Souter and Miller, 2007) が主である。また、生理指標を用いた客観的な評価でもカテコールアミンやコルチゾールなどによるストレスの程度が軽減されたかどうかを判断する手法 (Barker et al., 2005; Viau et al., 2010) が主である。一部には、ペットの所有が血圧や心拍数などの心血管系に影響を与えるといった生理学的な側面に焦点を当て報告している研究 (Allen et al., 2001, 2002) もあるが、十分とは言い難い。

また、犬の気質や情動の評価は、攻撃性や恐怖反応、新規刺激に対する反応など、人にとって好ましくない反応を示す犬を選抜するために行われている (Beerda et al., 2003; King et al., 2003) 場合が多く、その評価法は行動テスト (Bosch et al., 2009; Ott et al., 2009) やボディーランゲージなどの行動観察 (Abrantes, 1987; Quaranta et al., 2007) による評価が一般的である。これは人が犬に与える影響、つまり、人と犬のトレーニングや日々のコミュニケーション等の関わりにおいても同様で、行動評価 (Haverbeke et al., 2008) の他に飼い主へのアンケート (Hsu and Serpell, 2003) によるものが実施されているが、アンケートの場合、飼い主が質問に対し正確に回答することが大前提であるため、両者の関係がうまくいっていないことを他人に知られることを嫌がり、正確な評価ができない場合

もあるといった問題点が挙げられる (Segurson et al., 2005)。また、生理指標を用いた研究においても人の場合と同じくストレス反応物質を測定することによる評価法 (Hennessy et al., 1998, 2006; Coppola et al., 2006; Haubenhofner and Kirchengast, 2007; Menor-Campos et al., 2011) が主に用いられている。しかしながら、両者の良好な関係性を評価する場合など、非ストレス状況下における評価をストレス反応物質によって判断することは適切ではなく、新たな評価法の確立が望まれている。

本研究第 2 章より、人と同様犬においても陽性感情に応じて OT が増加すること明らかとなった。このことから、人と犬の関わりにおいても両者の陽性感情を評価するうえで尿中 OT が非侵襲的なバイオマーカーとして有効であると考えられ、両者の交流前後の尿中 OT 濃度の変化が人と犬の良好な関係を評価する一助になると思われる。

その一方で、近年のマウスやラットの研究から中枢への OT 投与は社会行動を増加させ (Witt et al., 1992)、親和行動は血漿中 OT 濃度が増加するとともに増加すること (Gingrich et al., 1997)、ラットやアカゲザルにおいて脳脊髄液中の OT 濃度と社会行動が正の相関を示す (Wotjak et al., 1998; Carter et al., 2008; Maestripieri et al., 2009; Maestripieri et al., 2009; Ross and Young, 2009; Feldman et al., 2010) ことなどから、リラックスやストレス軽減以外にも、げっ歯類におけるつがいの形成 (Lim and Young, 2006) や哺乳動物の親子間や仲間の社会的認識 (Nishimori et al., 1996; Takayanagi et al., 2005; Ross and Young, 2009; Rimmele et al., 2009; Strathearn et al., 2009)、人において社会認知に関与し信頼の形成に影響を与える (Kosfeld et al., 2005; Zak et al., 2007, 2008; Hurlemann et al., 2010)、哺乳動物の母子間の愛着の形成 (Carter et al., 1992; Panksepp, 1992; Carter, 1998; Buchheim et al., 2009)、親和性行動の発現 (Feldman et al., 2007; Ditzen et al., 2009) といった社会行動の発現やいわゆる「絆」の形成に関与していることが明らかとなり、他個体との関わりに密接に関係するホルモンであることが明らかとなっている。

人においてはパートナーや配偶者との接触により血中 OT が増加すること (Grewen et al., 2005) や、接触やぬくもりといった触覚刺激により分泌が促されること (Matthiesen et al., 2001; Morhenna et al., 2008) が明らかにされ、Holt-Lunstad らの研究 (2008) によると、人においてスキンシップを意図的に増加させた群とそうでない群を比較すると、スキンシップ増加群の OT 濃度が有意に上昇し、コルチゾール濃度が低下していることを報告している。Carter (1998) や、Uvnäs-Moberg ら (1998, 2003) は OT がリラクセスや安堵に関係すると述べているため、Holt-Lunstad らは OT 分泌の促進により HPA 軸反応の抑制や、安堵やリラクセスを促すことで、結果的に自律神経活動に影響を与え、ストレス反応を抑制し、心臓保護作用を持つとしている (Holt-Lunstad et al., 2008)。人と犬の関わりにおいては、詳細な行動解析は行っていないものの、愛犬家が犬との相互コミュニケーションを行った後では、両者の血漿中 OT 濃度が有意に増加した報告 (Odendaal and Meintjes, 2003) があることから、OT によるストレス抑制効果は人が動物から受ける身体的および精神的恩恵を説明する一助となる可能性がある。

また触覚刺激以外にも、山羊においては臭覚刺激により OT の分泌が促されること (Hernandez et al., 2002) や、人の親子においては Social vocalization (Seltzer et al., 2010) や、自身の子供を視覚刺激として提示された時に血漿中 OT が分泌されたこと (Strathearn et al., 2009) などから、OT の分泌は様々な社会性の刺激により促進されることがわかっている。また、Nagasawa ら (2009) は、犬との交流時に犬から飼い主への注視が長い群では、注視の頻度と飼い主の尿中 OT 濃度が強い相関関係を示すと報告している。OT は相互作用行動や愛着を促進させること (Carter, 1998) から、犬からの視覚刺激が人の OT 分泌に影響を与え、異種間の親和行動やコミュニケーションにおいても作用し、双方の社会行動を発現することで円滑な関係の構築に重要な役割を果たしていると考えられる。

これら触覚および視覚刺激は、人と犬のコミュニケーションにおいても社会性の刺激として、ごく日常的に双方から発せられるものであり、人と犬の関わりにおける双方の触覚

刺激や視覚刺激などによる OT 分泌を明らかにすることは、動物が他個体から受ける身体的および精神的な恩恵を明らかにするとともに、異種間コミュニケーションの解明の一助となると考えられる。

そこで本章では、人と犬の自由な交流における双方の行動と、交流前後の尿中 OT を評価し、犬の陽性感情を評価するうえで、人と犬の関係の評価にも OT が非侵襲的なバイオマーカーとして有用であるか検討することを第 1 の目的とし、さらに異種間コミュニケーションによる OT の役割を明らかにすることを第 2 の目的とした。

方法

供試動物および対象者

一般家庭犬 25 頭、および麻布大学介在動物学研究室で飼育されている犬 5 頭の計 30 頭（雄：2 頭、去勢雄：13 頭、雌：4 頭、避妊雌：11 頭）と、その飼い主または主に犬を世話する者 30 名（男性：6 名、女性：24 名）を対象として実験を行った。犬の年齢は 4.7 ± 2.7 歳（mean \pm S.D.）であり、人の年齢は 36.6 ± 13.7 歳（mean \pm S.D.）であった。人および犬に健康的な問題を抱えているものはいなかった。

実験準備

被験者は実験当日にお茶やコーヒーなどのカフェインを含んだ製品の摂取は控えてもらい、喫煙も禁止した。本章では第 1 章および第 2 章の結果を踏まえ、犬、人ともに飲食を 2 時間前より禁止とした。人は実験開始 1 時間前までに排尿し、その後は安静にしてもらった。犬は頻回採尿であるため実験開始 2 時間前までに排尿させ安静にした。

実験手順

実験は麻布大学 7 号館 306 教室で行った。実験室内には、椅子 1 脚、記録用のビデオカメラ 1 台を設置した。実験は 20 分間の安静①、30 分間のイヌとの交流、30 分間の安静②で構成され、被験者は実験室に到着後、安静①の間にアンケートおよび犬に対する愛着を測る Lexington Attachment to Pets Scale (LAPS) と飼い主の気分、感情を測定する Profile of Mood States (POMS) 短縮版の 2 種の心理指標に回答した。両尺度ともに詳細は下記に示す。安静②の間、犬は別室で安静にし、待機させた。交流は 30 分間とし、飼い主は実験室中央付近に置かれた椅子に座り、立ち上がることを禁止された。犬は実験室内に放し、飼い主と犬が全く交流をしないという事態を避けるため、5 分毎に「スワレ」の指示を出し

てもらった。また、抱きかかえるなど物理的に犬を拘束する行為は禁止した。それ以外の犬に話しかける、指示を出す、なでるなどの行為は飼い主の自由にした。交流時の両者の行動記録はビデオ（gigashot R60 GSC-R60, TOSHIBA CORPORATION, 日本）を用いて記録した。交流後の安静時に飼い主には再び POMS 短縮版に回答してもらった。

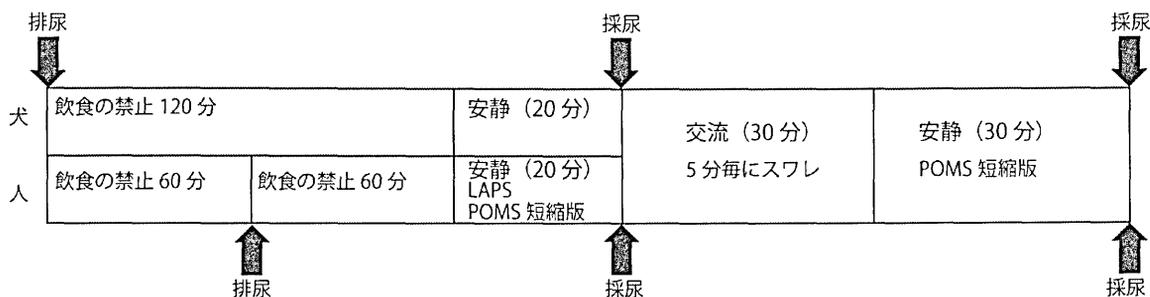


Fig.6 実験の流れとサンプル採取について

Lexington Attachment to Pets Scale: LAPS

LAPSはJonsonら(1992)によって1992年に開発されたペットに対する愛着を測定する心理尺度である。LAPSは全23項目の質問で構成され、「まったくそう思わない」「あまりそう思わない」「ややそう思う」「たいへんそう思う」の4段階で評価する。得点範囲は0点から69点であり、合計得点が高いほどペットへの愛着が強いことを示す。

Profile of Mood States (POMS) 短縮版

POMS短縮版は30項目からなる気分、および感情の変化を測定する尺度であり、65項目から成るPOMSと同様の測定結果が得ることができる。短時間で変化する気分、感情の変化を測定することが可能であり、65項目版と比較してもより簡便に対象者の変化を的確に把握し、介入効果を損なうことなく測定できることが特徴である。POMS短縮版は、各5項目ずつから成る「緊張—不安 (Tension・Anxiety)」、「抑うつ—落込み (Depression・Dejection)」、「怒り—敵意 (Anger・Hostility)」、「活気 (Vigor)」、「疲労 (Fatigue)」、「混

乱 (Confusion)」の 6 つの下位尺度から構成され、対象者は「まったくなかった」、「すこしあった」、「まあまああった」、「かなりあった」、「非常にあった」の 5 段階 (0~4 点) からひとつを選択する。6 つの気分尺度ごとに得点を合計し、評価に用いる。

POMS短縮版30項目と下位尺度

下位尺度	質問項目
緊張-不安	気がはりつめる 落ち着かない 不安だ 緊張する あれこれ心配だ
抑うつ-落ち込み	悲しい 自分がほめられるに値しないと感 じることがつかりしてやる気をなくす 孤独で寂しい 気持ちが沈んで暗い
怒り-敵意	怒る ふきげんだ めいわくをかけられて困る はげしい怒りを感じる すぐかっとなる
活気	生き生きする 積極的な気分だ 精力がみなぎる 元気がいっぱいだ 活気がわいてくる
疲労	ぐったりする 疲れた へとへとだ だるい うんざりだ
混乱	頭が混乱する 考えがまとまらない 途方に暮れる 物事がてきぱきする気がする どうも忘れっぽい

行動解析

両者の行動は30分間ビデオ録画されていたが、実験後半において、多数の犬が「横たわる」、「寝る」などの休息行動を示し、飼い主との交流は見られなかった。これは、実験設定の参考にした Nagasawa らの研究 (2009) と同様であり、犬と飼い主のコミュニケーション行動が実験開始5分間に限られていたことから、交流開始から5分間の人からの発話回数、人から犬への接触時間および回数、犬から人への注視時間および回数を測定し、解析に用いた。

尿サンプルの採取

両者の尿サンプルは安静①の直後および安静②の直後に行った。採取した尿は第1章および第2章と同様に4℃・1600g・15分間の遠心分離後、尿の上澄みを得て1.5mlチューブに分注し、測定まで-80℃で凍結保存した。

尿中 OT 濃度測定

尿サンプルは第1章および第2章と同様の方法を用い抽出した。第3章では抽出後、真空ポンプを用い、真空状態で遠心することで蒸発乾固しサンプルを得た。その他の手順は第1章および第2章と同様である。

統計解析

本章では交流前後の犬および人の尿中 OT 濃度、および尿中コルチゾール濃度、交流中の犬と人の行動、LAPS、POMS 短縮版の分析のために、Smirnov-Grubbs' test、Two-factor repeated measure ANOVA、Bonferroni 補正、Ward 法を用いた階層的クラスター分析、Mann-Whitney's U-test、Spearman's rank correlation coefficient、Wilcoxon signed-ranks test、主成分分析、強制投入法を用いた重回帰分析を行った。統計ソフトは

OMS Statcel 2 (オーエムエス出版, 日本) および、SPSS 14.0 for Windows (SPSS Inc., Illinois) を用いて行った。

なお、本実験は麻布大学実験動物倫理委員会の承認を受けている (承認番号: #10-33)。

結果

RIA 法による OT 濃度測定 of 最低測定感度は第 1 章および第 2 章と同様に 4.50pg / ml であった。アッセイ内誤差は 5.23%であった。EIA 法による尿中コルチゾール濃度測定 of 最低感度は 138ng / dL であり、アッセイ内誤差は 3.41%、アッセイ間誤差は 3.11%であった。

尿中 OT 濃度の性差について

交流前後における犬および人の尿中 OT を Two-factor repeated measure ANOVA および Wilcoxon signed-ranks test、Bonferroni 補正を用いて比較検討を行った。なお、対象犬 2 頭および対象者 1 名は、尿中 OT 濃度が他個体よりも高く、Smirnov-Grubbs' test により外れ値と判定されたため除外した。その結果、犬 ($F_{(1,26)} = 0.53, p = 0.47$)、人 ($F_{(1,27)} = 1.80, p = 0.19$) とともに性別による濃度の違いは見られなかった。これらのことより以後、統計処理に性別の要素は考慮しないこととした。

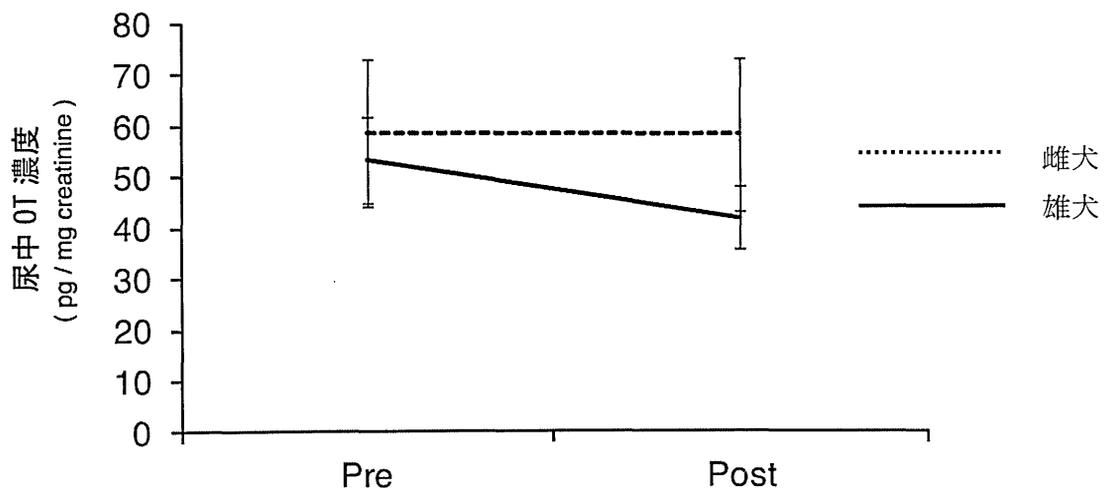


Fig.7 交流前後における犬の尿中 OT 濃度の変化 (mean ± S.E.)

Two-factor repeated measure ANOVA、Wilcoxon signed-ranks test、および Bonferroni 補正 $F_{(1,26)} = 0.53$ $p = 0.47$

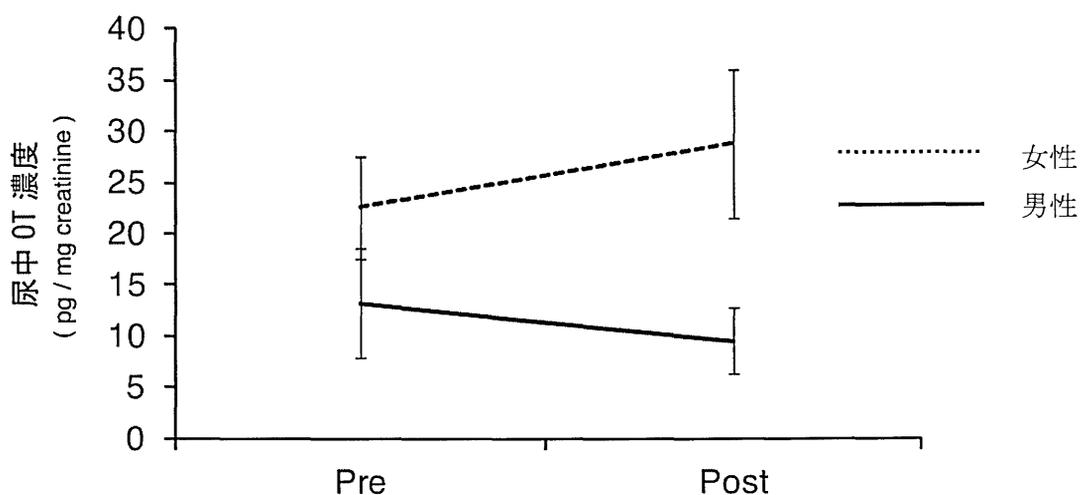


Fig.8 交流前後における人の尿中 OT 濃度の変化 (mean ± S.E.)
 Two-factor repeated measure ANOVA、Wilcoxon signed-ranks test、および Bonferroni 補正 $F(1,27) = 1.80$ $p = 0.19$

犬の注視時間と人からの接触時間によるクラスター分析

対象犬の飼い主に対する注視時間をヒストグラムにしたところ Nagasawa らの研究 (2009) と同様に 100 秒前後を境に 2つのピークに分けられることが明らかとなった。

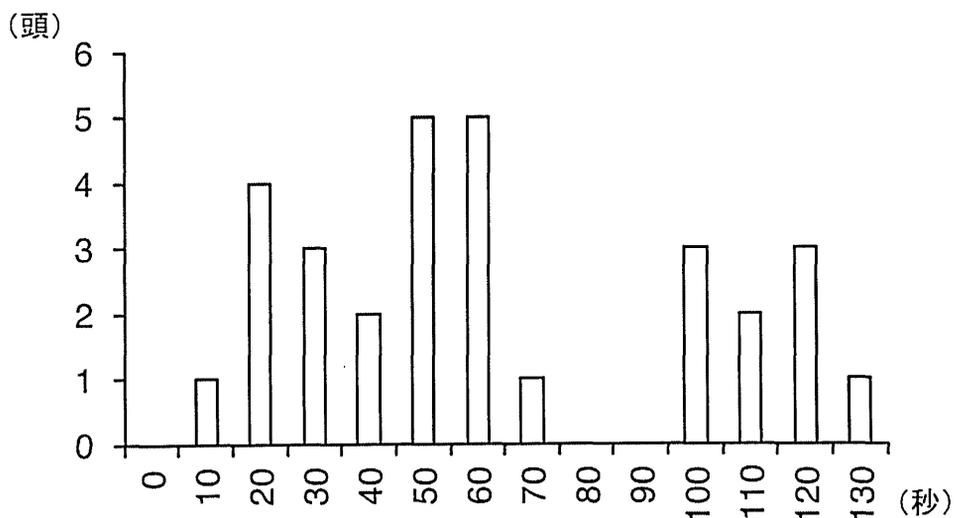


Fig.9 交流時開始 5 分間における犬の飼い主に対する注視時間

また、犬とその飼い主の愛着の形成と維持は相互のコミュニケーション行動と関連があ

ると考えられていること (Voith, 1985; Albert and Bulcroft, 1987) から、人から犬へのコミュニケーション行動として「飼い主から犬への接触時間」を抽出し、犬からの注視時間とともに Ward 法を用いた階層的クラスタ分析を行った。その結果、対象者と対象犬の組み合わせは、グループ 1 (n = 21, 雄 2 頭、去勢雄 9 頭、雌 4 頭、避妊雌 7 頭、年齢 4.1 ± 0.6 歳、人：男性 5 名、女性 16 名、年齢 36.6 ± 3.3 歳) とグループ 2 (n = 9, 犬：去勢雄 5 頭、避妊雌 4 頭、年齢：5.9 ± 0.7 歳、人：男性 1 名、女性 8 名、年齢 36.6 ± 4.0 歳) の大きく 2 つのグループに分けられることが明らかとなった。この 2 つのグループの年齢は犬、人ともに有意な差はなかった。

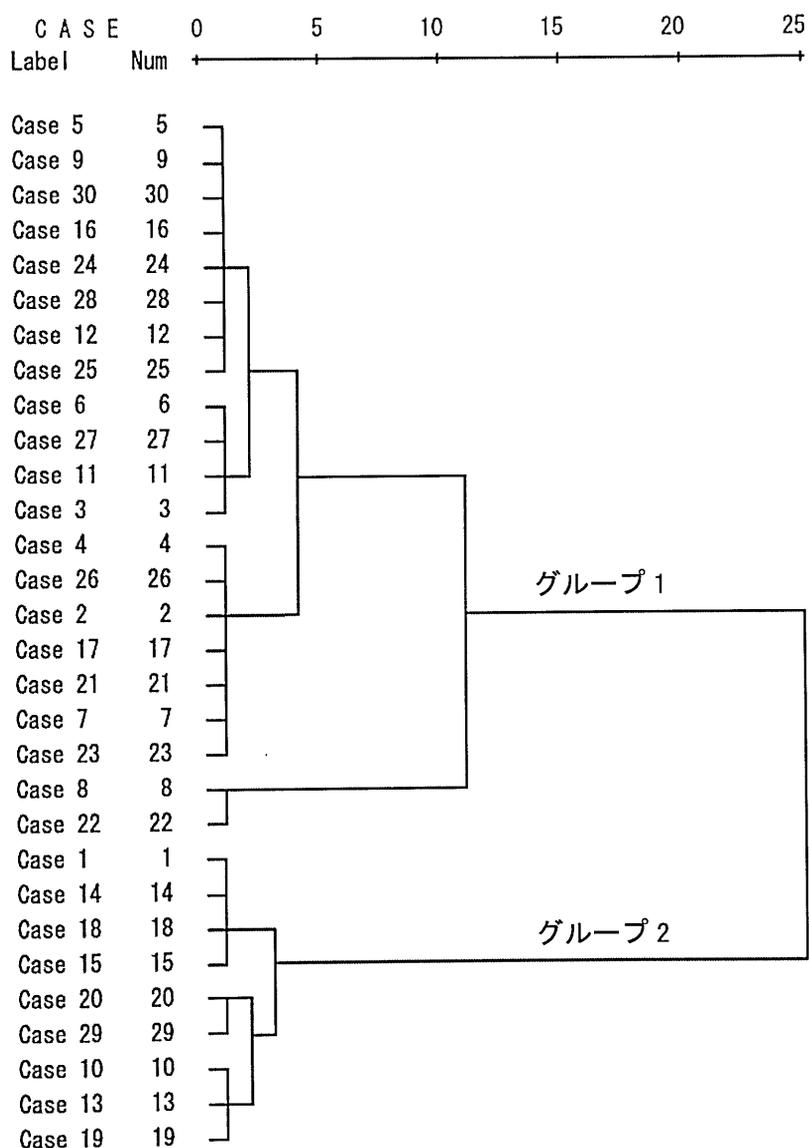


Fig.10 階層的クラスタ分析による「犬の飼い主に対する注視時間」と「人から犬への接触時間」のデンドログラム

階層的クラスター分析の結果をもとに、Mann-Whitney's U-test を用いて両グループの行動の比較を行った。その結果、「犬から飼い主への注視時間」はグループ 2 が有意に長いことが明らかとなった ($p < 0.01$)。また、両グループの「飼い主から犬への接触時間」においてもグループ 2 が有意に長く、グループ 2 は人、犬ともに相手に対しコミュニケーション行動を長くとることが明らかとなった ($p < 0.01$)。これらのことから、グループ 1 を低コミュニケーショングループ (Low Communication Group : 以下 LC)、グループ 2 を高コミュニケーショングループ (High Communication Group : 以下 HC) とした。

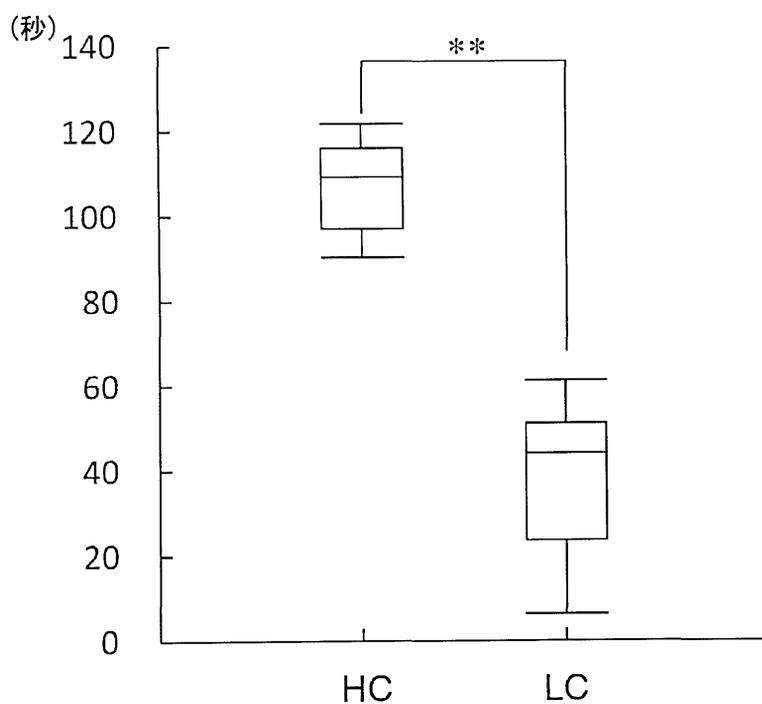


Fig.11 HCグループとLCグループの交流時「犬から飼い主への注視時間」の比較
各バーは下から最小値、第1四分位、中央値、第3四分位、および最大値を表している。

Mann-Whitney's U-test ** $p < 0.01$

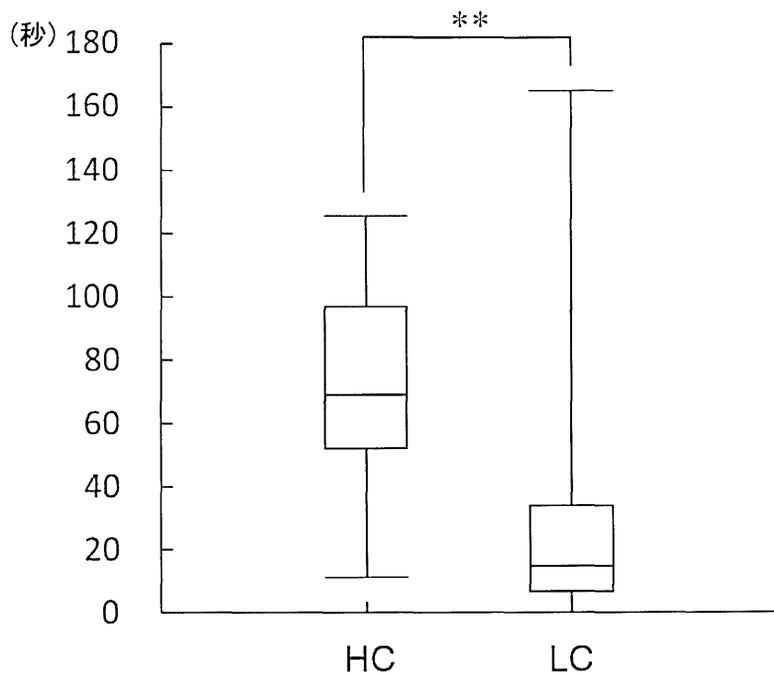


Fig.12 HCグループとLCグループの交流時「飼い主から犬への接触時間」の比較
各バーは下から最小値、第1四分位、中央値、第3四分位、および最大値を表している。

Mann-Whitney's U-test ** $p < 0.01$

各グループの行動について

HCグループおよびLCグループの両グループ間において、「犬から飼い主への注視回数」、「飼い主から犬への声をかける回数」、「飼い主から犬への接触回数」の比較をMann-Whitney's U-testを用いて行った。その結果、「犬から飼い主への注視回数」および「飼い主から犬への声をかける回数」、「飼い主から犬への接触回数」はHCグループが有意に多いことが明らかとなり、HCグループはLCグループと比べコミュニケーション行動の頻度も多いことが明らかとなった ($p < 0.01$ 、 $p < 0.05$ 、 $p < 0.05$)。

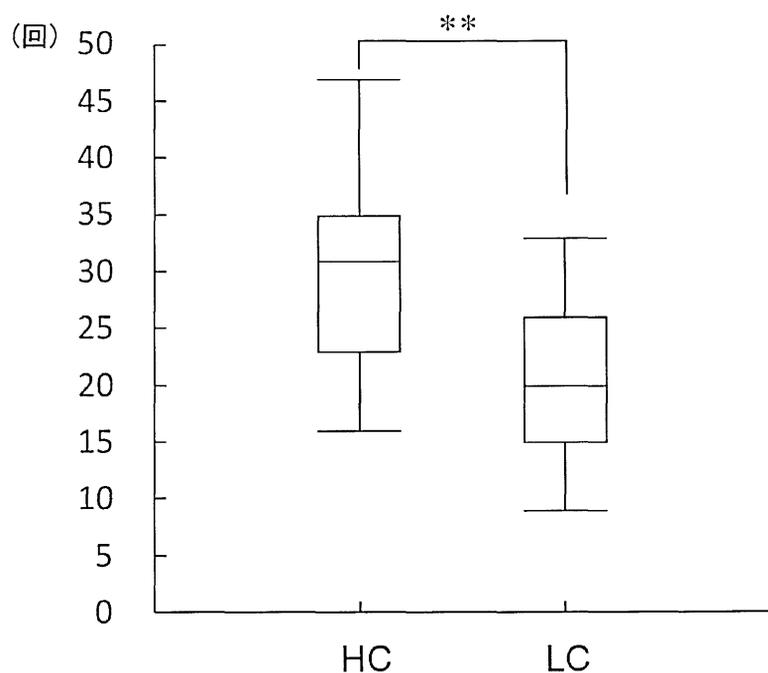


Fig.13 HCグループとLCグループの交流時「犬から飼い主への注視回数」の比較
 各バーは下から最小値、第1四分位、中央値、第3四分位、および最大値を表している。
 Mann-Whitney's U-test ** p < 0.01

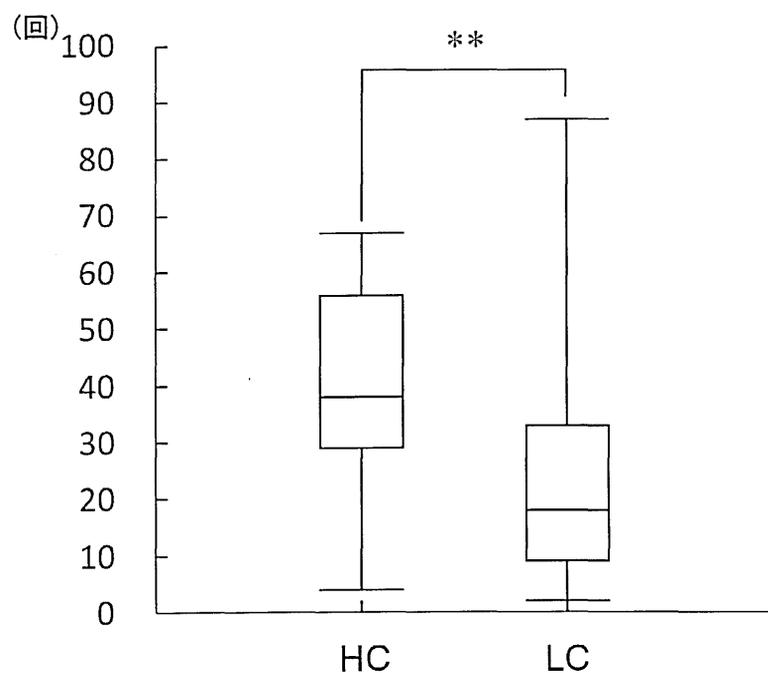


Fig.14 HCグループとLCグループの交流時「飼い主から犬への声をかける回数」の比較
 各バーは下から最小値、第1四分位、中央値、第3四分位、および最大値を表している。
 Mann-Whitney's U-test ** p < 0.01

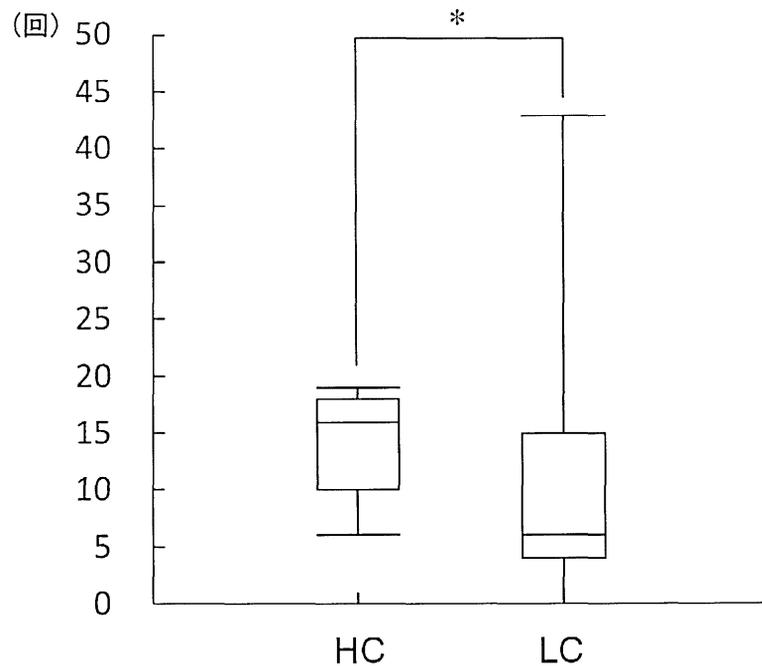


Fig.15 HCグループとLCグループの交流時「飼い主から犬への接触回数」の比較
各バーは下から最小値、第1四分位、中央値、第3四分位、および最大値を表している。

Mann-Whitney's U-test * $p < 0.05$

交流時行動および尿中 OT 濃度の相関について

Table 3 に交流時の人および犬の行動と尿中 OT の交流前後の変化率の相関関係を示した。尿中 OT 濃度は (post / pre) を算出し、変化率として使用した。人の尿中 OT 変化率において、犬の尿中 OT 変化率および犬からの注視時間と正の相関が見られた。また、飼い主から犬へ声をかける回数は飼い主から犬への接触回数と、犬から飼い主への注視時間は犬から飼い主への注視回数、飼い主からの接触時間、飼い主からの接触回数と、犬から飼い主への注視回数は飼い主からの接触回数と、飼い主からの接触時間は飼い主からの接触回数と正の相関を示すことが明らかとなった。

Table 3 交流時の行動および尿中 OT 濃度の相関

Spearman's rank correlation coefficient NS = No Significant

		尿中OT (人) 変化率	尿中OT (犬) 変化率	声かけ	犬の注視 時間	犬の注視 回数	人からの 接触時間	人からの 接触回数						
尿中OT(犬) 変化率	Correlation	0.42	/											
	Sig.	p<0.05												
声かけ	Correlation	NS							NS					
	Sig.													
犬からの 注視時間	Correlation	0.39							0.38	NS				
	Sig.	p<0.05							p<0.05					
犬の注視 回数	Correlation	NS							NS	NS	0.70			
	Sig.										p<0.01			
人からの 接触時間	Correlation	NS							NS	NS	0.53	NS		
	Sig.										p<0.01			
人からの 接触回数	Correlation	NS							NS	0.40	0.38	0.39	0.70	
	Sig.									p<0.05	p<0.05	p<0.05	p<0.01	
LAPS	Correlation	NS							NS	NS	NS	NS	NS	NS
	Sig.													

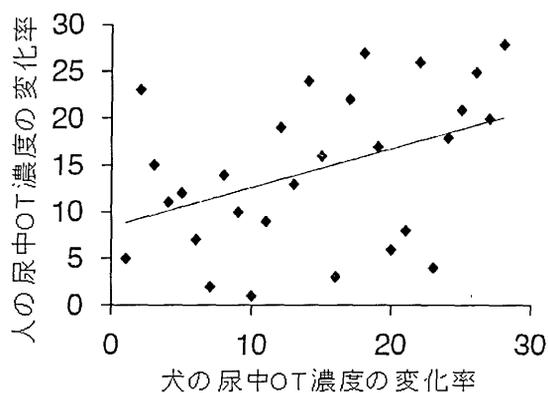


Fig.16 犬の尿中 OT 濃度の変化率と人の尿中 OT 濃度変化率の相関
rs = 0.42, p < 0.05

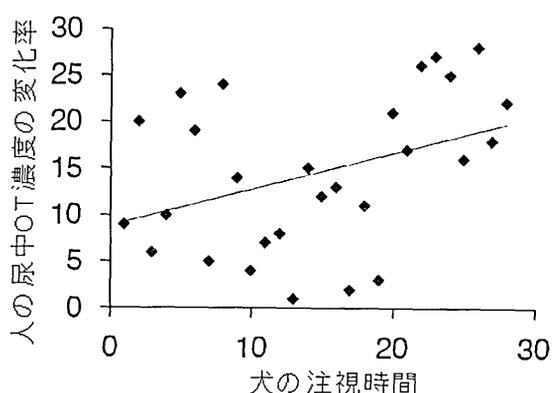


Fig.17 犬からの注視時間と人の尿中 OT 濃度変化率の相関
rs = 0.39, p < 0.05

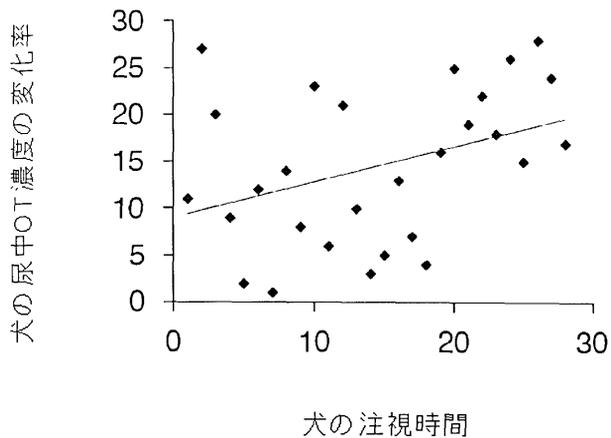


Fig.18 犬からの注視時間と犬の尿中 OT 濃度変化率の相関
 $r_s = 0.38, p < 0.05$

両グループの尿中 OT 濃度について

交流前後における両グループの尿中 OT 濃度について比較を行ったところ、HC グループでは犬、人ともに交流後の尿中 OT 濃度が有意に高い値を示した。 $(p < 0.05, p < 0.01)$ 。
 LC グループでは人の尿中 OT 濃度に変化は見られなかったが、犬の尿中 OT 濃度は有意に低下していた $(p < 0.05)$ 。

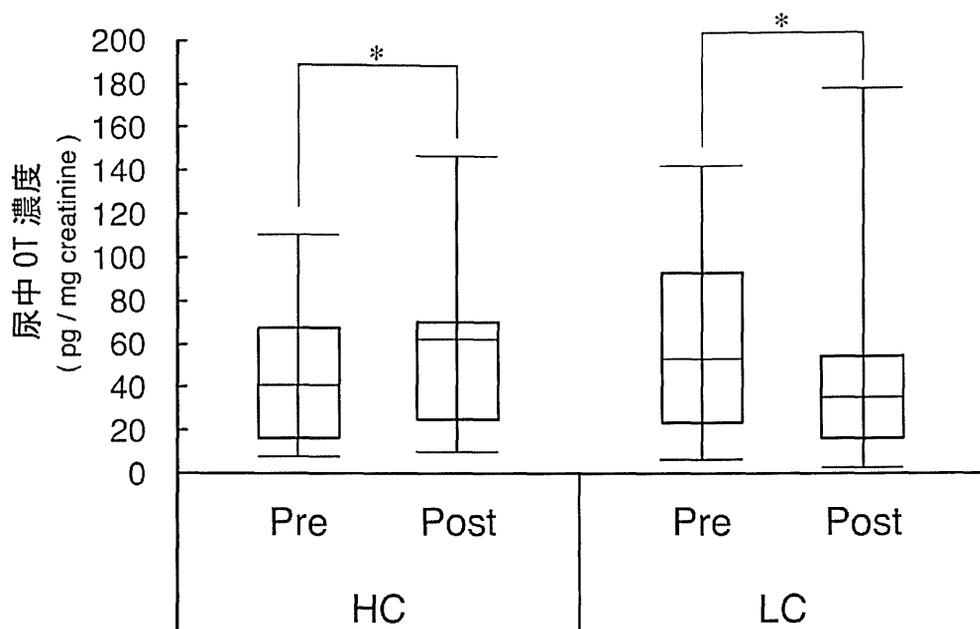


Fig.19 HCグループとLCグループの交流前後の犬の尿中OT濃度の比較
 各バーは下から最小値、第1四分位、中央値、第3四分位、および最大値を表している。
 HCグループにおいて有意な上昇が見られ、LCグループでは有意な低下が見られた。
 Wilcoxon signed-ranks test * $p < 0.05$

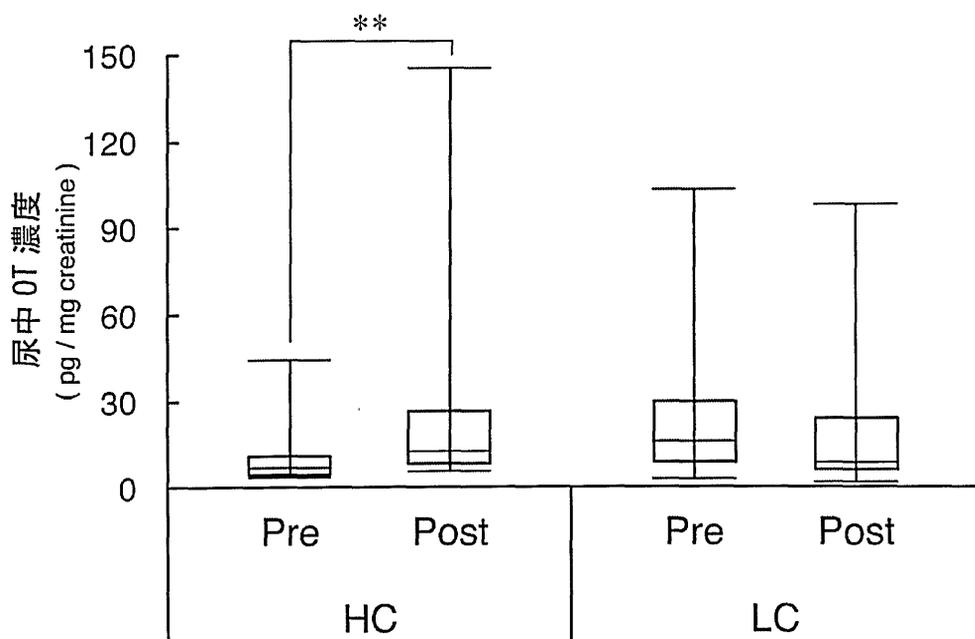


Fig.20 HCグループとLCグループの交流前後の人の尿中OT濃度の比較
 各バーは下から最小値、第1四分位、中央値、第3四分位、および最大値を表している。
 HCグループにおいて有意な上昇が見られた。
 Wilcoxon signed-ranks test ** $p < 0.01$

両グループの尿中コルチゾールについて

交流前後における両グループの尿中コルチゾールについて比較を行ったところ、人においては両グループともに交流後に低下することが明らかとなった (HC: $p < 0.05$ 、LC: $p < 0.01$)。犬においては両グループともに交流前後に違いは見られなかった。

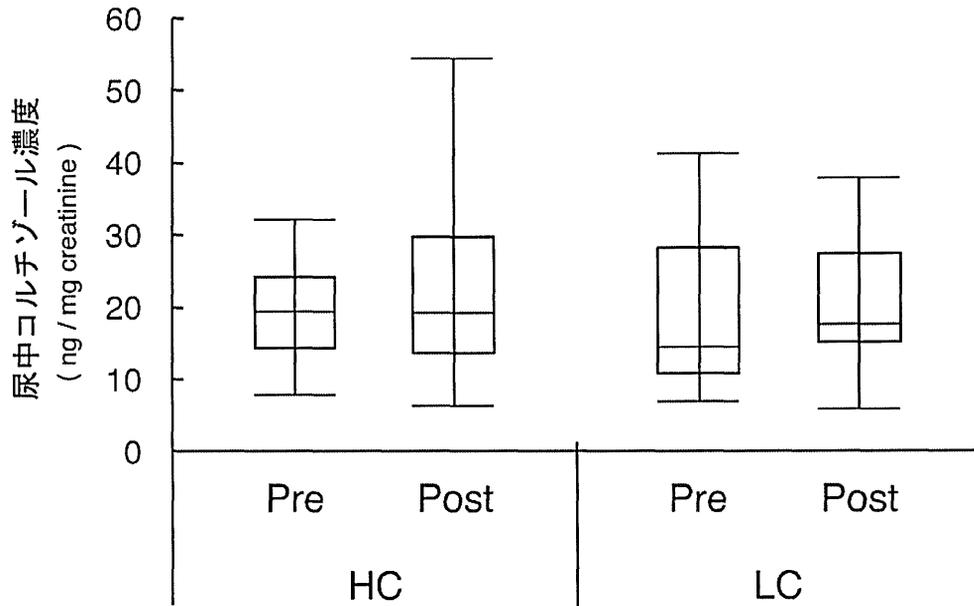


Fig.21 HCグループとLCグループの交流前後の犬の尿中コルチゾール濃度の比較
各バーは下から最小値、第1四分位、中央値、第3四分位、および最大値を表している。
両グループとも変化はなかった。Wilcoxon signed-ranks test

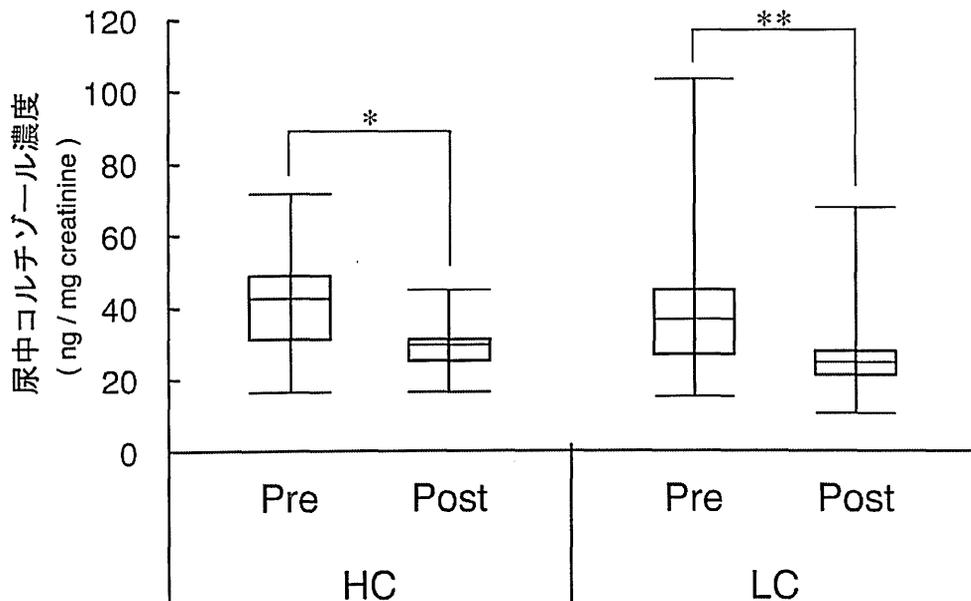


Fig.22 HCグループとLCグループの交流前後の人の尿中コルチゾール濃度の比較
各バーは下から最小値、第1四分位、中央値、第3四分位、および最大値を表している。
Wilcoxon signed-ranks test * $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$

POMS 短縮版 LAPS およびについて

Table 4 に両グループの POMS 短縮版の結果を示した。HC グループは交流前後における緊張・不安が、LC グループは緊張・不安がおよび混乱の項目において有意に低下していた。なお、活気の項目において Two-factor repeated measure ANOVA および Wilcoxon signed-ranks test、Bonferroni 補正を用いて比較検討を行ったところ、交流前後において HC グループは交流前、交流後ともに LC グループと比べ有意に高い値を示していた。

Table 4 交流前後における両グループの POMS 短縮版の比較

Wilcoxon signed-ranks test * p < 0.05、** p < 0.01

	HC			LC	
	Pre	Post		Pre	Post
緊張	3.0 (0.0-9.0)	1.0(0.0-5.0) *	4.0(0.0-13.0)	1.0(0.0-14.0) **	
抑鬱	2.0(0.0-7.0)	0.0(0.0-4.0)	1.0(0.0-9.0)	0.0(0.0-6.0)	
怒り	0.0(0.0-3.0)	0.0(0.0-1.0)	0.0(0.0-4.0)	0.0(0.0-6.0)	
活気	10.0(3.0-19.0)	10.0(4.0-19.0)	5.0(0.0-16.0)	4.0(0.0-13.0)	
疲労	4.0(0.0-15.0)	1.0(0.0-9.0)	2.0(0.0-16.0)	0.0(0.0-12.0)	
混乱	5.0(2.0-8.0)	3.0(1.0-6.0)	3.0(0.0-14.0)	1.0(0.0-7.0) **	

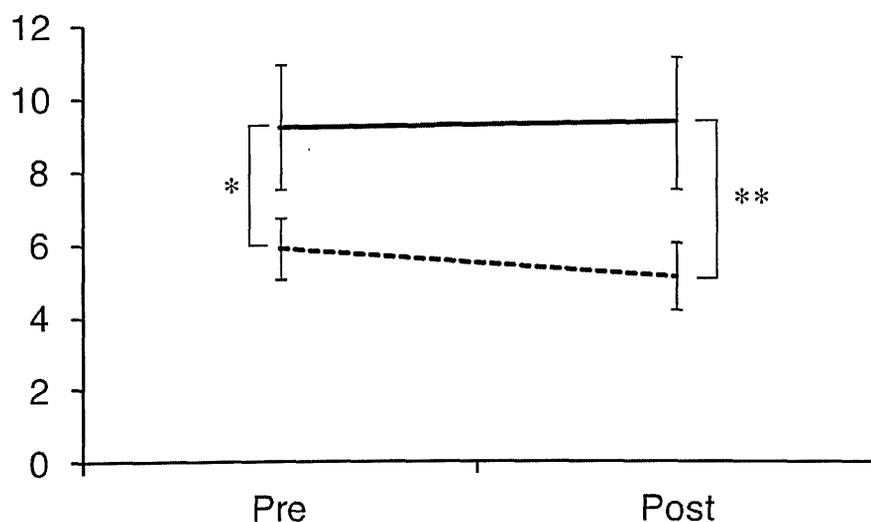


Fig.23 HC グループと LC グループの交流前後の POMS 短縮版の活気項目の比較

Wilcoxon signed-ranks test * p < 0.05、** p < 0.01

尿中 OT 濃度の変化率と行動の関わりについて

交流時の両者の行動が犬の尿中 OT 濃度に与える影響を明らかにするため、犬の尿中 OT 変化率と、交流時の犬および人の行動間で強制投入法を用いた重回帰分析を行った。なお、犬から飼い主への注視時間は犬から飼い主への注視回数と、飼い主からの接触時間は飼い主からの接触回数と多重共線性が認められたため、事前に主成分分析を用いて合成変数を求めた。主成分分析の結果、注視に関わる要因および接触に関わる要因ともに第一主成分のみで累積寄与率が 80%を超えたことから、第一主成分のみを使用した。その結果、「接触に関わる要因」が抽出された。重相関係数は 0.57 であり、決定係数 R^2 は 0.32 であった。分散分析表および、変数については Table 5 に示す。

Table 5 犬の OT 変化率を目的変数とした重回帰分析の結果

	偏相関係数
注視に関わる要因	0.34
接触に関わる要因	0.44 *
人から犬への声かけ回数	-0.28
重相関係数 R	0.57 *
決定係数 R^2	0.32 *

* $p < 0.05$

$F(3.24)=3.78, p < 0.05$

交流時の行動が人の尿中 OT 濃度に与える影響を明らかにするため、人の尿中 OT 変化率と、交流時の犬および人の行動および事前のアンケートの結果 (LAPS) を用いて強制投入法を用いた重回帰分析を行った。接触に関わる要因、注視に関わる要因は犬の OT 変化率を目的変数とした重回帰分析と同様の合成変数を使用した。その結果、注視に関わる要因、人から犬への声かけ回数、LAPS、が抽出された。重相関係数は 0.64 であり、決定係数 R^2 は 0.41 であった。分散分析表および、変数については Table 6 に示す。

Table 6 人のOT変化率を目的変数とした重回帰分析の結果

	偏相関係数
人から犬への声かけ回数	-0.38 *
LAPS	0.38 *
注視に関わる要因	0.48 **
接触に関わる要因	0.28
重相関係数R	0.64 **
決定係数R ²	0.41 **

* p < 0.05, ** p < 0.01

F(3.24)=4.00, p < 0.01

考察

本章では、人と犬の交流時の行動と、双方の交流前後の尿中 OT の変動を評価することで、両者が良好な関係であるかどうかを客観的に評価し、人と犬の相互コミュニケーションにおける OT の役割を明らかにすることを目的とし実験を行った。

尿中 OT の性差について

本研究では交流前後における尿中 OT 濃度に、犬、および人の双方において性差は見られなかった。犬との交流前後の人の血漿中 OT 濃度を測定した Miller らの研究 (2009) では女性の OT 濃度は上昇し、男性は減少するため、性差が存在すると報告しているが、個々のデータを見ると、女性においても減少している人や、男性においても上昇している人がいる。また、人および犬の行動解析を行っていないため、双方の接触などのコミュニケーションによる影響が考慮されていなかった。一方、Odendaal らの研究 (2003) において、被験者は男性、女性の双方おり、犬も雌雄が実験に使用されているが、性差については報告されていない。Nagasawa らの研究 (2009) においても性差は報告されておらず、犬からの飼い主に対する注視が長いグループにおいて、注視の頻度と飼い主の尿中 OT 濃度が強い相関関係を示していることから、本研究においても尿中 OT の変動は性別による差ではなく、交流時の双方の行動が影響している可能性が考えられた。

交流時の行動について

Nagasawa らの研究 (2009) と同様に「交流時開始 5 分間における犬の飼い主に対する注視時間」を元にヒストグラムを作成すると 100 秒前後を境に大きく 2 つのグループに分けることができた。また、犬と飼い主の愛着形成とその維持には相互コミュニケーションと関係があることが示唆されているため (Voith, 1985; Albert and Bulcroft, 1987)、「人か

ら犬への接触時間」と「犬の飼い主に対する注視時間」を抽出し、階層的クラスター分析を行った。その結果、被験者と犬の組み合わせは大きく 2 つのグループに分けられることが明らかとなった。このグループ間の行動を比較検討すると「犬の飼い主に対する注視時間」、「飼い主から犬への接触時間」、「犬の飼い主に対する注視回数」、「飼い主から犬への声をかける回数」、「飼い主から犬への接触回数」がいずれも有意に多く、コミュニケーション時間が長く、頻度が多い HC グループと、コミュニケーション時間が短く、頻度の少ない LC グループに分けられることが明らかとなった。グループ毎の尿中 OT 濃度を交流前後で比較すると、HC グループにおいて犬、人ともに上昇することが明らかとなり、対して、LC グループでは犬の OT 濃度が有意に低下していた。これらのことから、両グループの交流時の行動の違いが OT 分泌に影響を与えた可能性が考えられた。人の母子間において、注視は愛着における重要な要素であり (Dickstein et al., 1984)、養育者の関心を引くための愛着行動である。また、養育者は子供の注視を自身への合図と解釈し、子供へ接近しようと試みる (Meins, 1997) とされている。本研究においても、犬の注視回数と飼い主からの接触時間および接触回数に相関が見られたことから、人・犬間においても犬の注視が愛着行動として作用していると考えられた。

犬の尿中 OT と行動の関わり

犬の尿中 OT の変化率と交流時行動およびの重回帰分析の結果から、犬においては「飼い主の接触に関わる要因」が犬の尿中 OT 濃度を上昇させる重要な要素であることが明らかとなった。グループ別に見ると、HC グループは LC グループと比べ有意に人からの接触時間が長く、接触回数も多かった。本研究第 2 章においてマッサージが犬の尿中 OT 濃度を上昇させたことや、過去の研究では、人においてパートナーや配偶者との接触により血中 OT が増加すること (Grewen et al., 2005)、接触やぬくもりといった触覚刺激により OT 分泌が促されること (Matthiesen et al., 2001; Morhenna et al., 2008) が報告されていること

から、交流時の人の接触が犬の OT 分泌を促進させた可能性が示唆された。また、ラットにおいて脳脊髄液中の OT 濃度上昇とともに社会行動が増加する (Haller et al., 1996)、血漿 OT 濃度の上昇によりハタネズミの親和行動が増加する (Gingrich et al., 1997)、ラットの中脳への OT 投与は社会行動を増加させること (Witt et al., 1992) が明らかとなっており、OT が近接や接触行動に影響を与え (Gordon et al., 2011)、social attachment を含めた社会行動を促進するとされている (Carter, 1998)。さらに、OT を鼻腔内投与すると注視の持続時間が長くなったり、回数が増加するとの報告 (Guastella et al., 2008) もあり、人との接触により上昇した犬の OT が、再び人への注視や近接を促すと考えられた。また、学習の面においても、飼い主を注視することによって得られた人からの接触が、犬の陽性感情を誘起し、報酬として働く (Fonberg et al., 1981; Kostarczyk and Fonberg, 1982; Okamoto et al., 2009) ことにより、さらに近接や人への注視を強化すると考えられ、OT 分泌が促進されることで、両者の行動がポジティブ・フィードバックとして作用していると考えられた。さらに、異種間コミュニケーションにより犬の OT の分泌が促進されたことから、人・犬間において円滑にコミュニケーションを成立させるためには、犬の OT 分泌の促進が必要不可欠であると考えられた。

人の尿中 OT と行動の関わり

尿中 OT の変化率と交流時行動およびアンケート間の重回帰分析の結果から、人においては「犬から飼い主への注視に関わる要因」、「LAPS」、「飼い主から犬への声をかける回数」が尿中 OT を上昇させる要素であることが明らかとなった。Nagasawa ら (2009) は犬の注視が飼い主との社会的な絆を形成する上で重要な要素であるとしており、人においても母親に自身の子供の顔を提示すると、視床下部の OT 関連領域が活性化し、末梢に OT が分泌されることで愛着形成に関わることが明らかとなっている (Strathearn et al., 2009)。さらに、OT は母子間の近接や接触行動に影響を与えることで子育てを促進させ (Gordon et

al., 2011) たり、副交感神経系活動を亢進し、社会的な結び付きを促進する (Bos et al., 2011) ことから、実験前後で尿中 OT が有意に増加した HC グループでは、犬に対する接触が多かったと考えられる。また、この OT 分泌システムとドーパミン作動性の脳内報酬系回路が関連していることが示唆されていること (Strathearn et al., 2009) から、人・犬間において、犬の注視が人の報酬系回路を活性化させ、犬に対する接触行動を発現させる動機付けの重要な要因となったと考えられた。

さらに、人においては LAPS の結果が尿中 OT に影響を与えていることから、犬に対する愛着の度合いも関連することが明らかとなった。Garrity ら (1989) や、Boldt ら (1992) は動物を飼育することで得られる心理社会的効果や健康面の効果は、動物との間に形成された絆の程度に影響するとしており、この愛着の度合いが人の OT 分泌に影響を与えたと考えられた。一方、「飼い主から犬への声をかける回数」は OT と負の相関関係にあった。これは本章の実験環境が影響したものと考えられる。交流時に人は椅子に座ったままであり、犬へ近づくことができないため、飼い主は犬の注意を引くためには声をかけるしか手段がなかった。この発声に対し、犬が反応することで、注視や接近および飼い主からの接触があれば、行動連鎖により注視、接触が増加すると考えられるが、犬が反応しないと OT を増加させる要素である注視や接触の機会が奪われるだけでなく、何度も犬を呼ぶなど悪循環に陥ってしまうためだと考えられた。また今回、行動観察において「言葉の意味」や「指示の成功率」は考慮しなかった。これは、犬の学習が、人のからかけられた言葉に対しどの程度成立しているかが不明確であることと、映像からの行動観察で言葉の意味を理解しているかどうか判断ができないためである。例えば、ある言葉を人が犬にかけるとき、人は犬が指示や言葉の意味を理解していると思っている。しかしながら、犬がかけられた言葉を学習しておらず、コミュニケーションが成立しない場合、人は犬に対しさらに言葉をかけることになる。このような声かけの増加が悪循環を生む要因であった可能性も考えられた。また、犬と同様人においても異種間コミュニケーションにおいて OT の分泌が促進さ

れたことから、人・犬間の絆の形成には OT 神経系を介した生物学的絆形成メカニズムが存在する可能性が示唆され、人・犬間における円滑なコミュニケーションの成立には、双方の OT 分泌の促進が必要不可欠であると考えられた。

犬および人の尿中コルチゾールについて

尿中コルチゾールは犬においては両グループとも変化が見られず、OT が上昇していた HC グループにおいてもコルチゾール濃度が減少することがなかった。加えて、実験に参加した犬は、実験前の安静時に落ち着いており、暴れることはなかった。このことから、Pre のコルチゾール濃度は非ストレス状況下を表すものであり、犬においては OT がコルチゾールのベースラインを下げることはないと考えられた。

人においては両グループともに尿中コルチゾールの有意な低下が見られた。過去の研究では犬とのふれあいが、人のコルチゾールを減少すること (Odendaal and Meintjes, 2003; Barker et al., 2005; Handlin et al., 2011) が報告されている。また、POMS 短縮版は緊張・不安の項目は両グループとも、混乱の項目は LC グループにおいて低下していたことから、犬とのふれあいが一定の安心やリラックスをもたらす精神的な恩恵をもたらしたと考えられる。しかしながら、実験前の飼い主の尿中コルチゾール濃度が高かった要因として、実験という設定自体が人の精神的な負荷となりコルチゾール濃度に影響を与えている可能性が考えられた。また、飼い主には事前に交流時の指示の成功率は実験に関係がないことを伝えていたが、飼い主と犬が全く交流をしないという事態を避けるため、5分毎に「スワレ」の指示を出してもらっていた。これが、実験前の緊張とつながり、その緊張から解放されることで POMS の緊張・不安の項目が両グループで低下した可能性が考えられた。これらのことから、非ストレス状況下ではコルチゾール単体での関係性の評価では不完全であると考えられた。

非侵襲的なバイオマーカーとしての尿中 OT

犬において、尿中コルチゾールは両グループとも変化がなかった。これは、本実験は飼い主との交流であるため、犬にとって過度のストレス刺激ではないと考えられる。しかしながら、第2章で陽性感情と関連のあった OT が LC グループにおいては変化しなかったことから、本章における飼い主との交流は快刺激でも、不快刺激でもなかったと考えられた。一方、飼い主との交流が LC グループと比べ有意に多かった HC グループでは尿中 OT が有意に増加していたことから、飼い主とのコミュニケーションにより陽性感情を抱くことで OT が分泌されたと考えられた。これらのことから、人と犬の交流時に、人および犬の陽性感情を評価する上で、コルチゾール単体では不十分であり、併せて尿中 OT を測定することでより詳細な両者の関係性が評価できると考えられ、尿中 OT が非侵襲的なバイオマーカーとして有用であることが明らかとなった。

結論

犬と人のコミュニケーションにおいて、犬からの注視が愛着行動として作用し、両者の OT 分泌を促すことで、コミュニケーションをより一層促進するものであることが明らかとなった。また、犬と飼い主の関係性をおよび陽性感情を評価するうえで、従来行われてきたストレス反応物質の測定ではなく、双方の尿中 OT を測定することが有効であることが明らかとなり、尿中 OT の非侵襲的なバイオマーカーとしての有用性が明らかとなった。

総合考察

本研究では様々な動物種において社会行動や陽性感情に関係することが明らかとなっている OT 分泌を犬において調査することで、犬の陽性感情について生理学的なアプローチを試みるとともに、最も古く家畜化され、「人の最良のパートナーである」といわれる犬と人の異種間コミュニケーションにおける OT の役割を明らかにすることを目的として実験を行った。

これまで、犬の心理状態を把握するためには、犬の行動から推察する、もしくはストレス反応物質の測定から彼らの心理状態を推察することが主であった。これらの手法は行動観察に高い洞察力が必要であったり、非ストレス状況下においては評価が難しい等の問題点が挙げられている。犬の OT 測定は、血漿を用いた測定が報告されているのみだが、サンプル採取の負担を考慮すると適切な方法であるとは言えない。一般的な犬の飼育において、しつけの一環としてトイレトレーニングが浸透しており、尿採取はほとんどの個体でそれほど困難ではないため、OT を家庭犬を含めた犬の情動指標として適応する場合、尿による測定が最もふさわしいと考えられた。

尿中 OT 測定

本研究では OT を犬の血中に投与し、尿への排泄時間の検討を併せて行うことで、犬の尿中 OT 濃度の測定を試みた。OT 測定は主に HPLC、EIA あるいは RIA 等の方法で行われている。本研究でも事前実験として市販の EIA kit を用い OT 測定を行ったところ、血中 OT が投与量と比較し約 4 倍もの測定値が得られたことや、同一サンプルを同条件下で測定したにも関わらず、測定値にかなり開きがあったことから、EIA では正確な測定ができていないと考えられた。ラット血漿中 OT 濃度を測定した Higuchi らの RIA 測定法 (1982) を用いることで、血漿中 OT においては理想的な測定値がえられた。しかしながら、尿中

OT は第 2 抗体による沈殿の形成がスムーズにされず、正確な測定には至らなかった。尿はタンパク質や塩素、ナトリウム、カリウム、マグネシウム、リン酸などの様々な成分が含まれ、これら尿中成分が影響し、抗原抗体反応が正常に起こらなかったと考えられた。そこで C18 カラムを用い抽出することで、この問題を回避し測定を可能にした。この手法は第 3 章における人尿中 OT 濃度の測定にも有効であった。また、犬の血中 OT の尿への排泄時間は刺激から 1 時間後であることが明らかとなったことから、本研究により社会行動や陽性感情などと関係する犬の OT を非侵襲的に評価ができることが明らかとなった。尿中 OT 測定は動物を殺すことなくサンプルを得られるため、長期にわたる継続的なサンプル採取が可能であり、犬以外の動物でも有効であると考えられる。

様々な状況への応用

第 2 章では陽性感情の指標として尿中 OT 濃度を用いることが可能であるか検討するため、一般的に犬が陽性感情を抱く「摂食」、「運動」、「マッサージ」を刺激として与え、犬の尿中 OT 濃度に与える影響を調査した。その結果、人やその他の動物で血中 OT 濃度を測定した研究ときわめて類似した結果を示すことが明らかとなった。このことから、犬の陽性感情を評価する上で、尿中 OT 濃度の変動が有効なバイオマーカーであることが明らかとなり、従来のストレス反応物質を測定することでは判断の難しかった非ストレス状況下において、犬のリラックスや安堵などの陽性感情を客観的に評価することを可能にした。これらのことから、動物の心理状態を把握するために行われてきたコルチゾール測定などと併せて、尿中 OT 濃度による評価を用いることでより正確かつ客観的に犬の心理状態を推察することが可能となった。また、第 3 章においては両者の相互作用の多かった HC グループにおいて尿中 OT 濃度が有意に増加していたことから、社会性の刺激による OT の分泌は尿中 OT 濃度を測定することで評価が可能であり、同種間コミュニケーションや異種間コミュニケーションにおいても適応が可能であると考えられ、非侵襲的に種間コミュニケーション

ン解明する一助となると考えられた。

異種間コミュニケーションと絆の形成

人と犬の交流時の行動分析と尿中 OT 濃度測定から、犬とその飼い主の OT 分泌には「犬からの人に対する注視」が重要な要素であることが明らかとなった。人の母子間において、子供の注視は養育者の関心を引くための愛着行動であり、養育者は子供の注視を自身への合図と解釈し、子供へ接近や接触を試みるとされている。第 3 章において、犬の注視回数と人からの接触時間および接触回数に相関が見られたことから、犬と人の異種間コミュニケーションにおいても犬の注視が愛着行動として機能していると考えられた。Bowlby は「特定の他者（養育者など）との接近や接触を求め、それを維持しようとする強い傾向がある」、Triebenbacher は「人間は生得的に生物学に基盤を持つ社会的交わりに対する欲求を有しており、この交わりは特定の対象へと集中するようになる。後を追ひ、微笑みかけ、抱きしめ、ふれあうといった行動は愛着対象との間の相互関係に明らかに見て取れる」としている。つまり人は自身に愛着行動を示す愛着対象に対し、社会的な交わりを求めるのである。犬から発せられた注視は、人への合図となり、双方の交流が開始される。犬の注視の長かった HC グループは注視の短かった LC グループと比べ、犬への接触、つまり他者へ向けた行動が多く観察され、社会行動と関連のある OT が実験前後において変化していた。過去の研究から OT を服用することにより注視の時間が長くなったり、頻度が高くなることや、接触は OT 分泌を促す刺激であることがわかっていることから、犬の注視は人の接触を増加させ、人の接触は犬の注視を増加するという相乗効果を生むと考えられ、両者のコミュニケーションがスムーズに成立すると考えられた。

また、近年の研究から犬は人の様々なポインティングを理解し、人間の凝視に対しても非常に敏感であることが明らかとなっており (Miklósi et al., 1998; Soproni et al., 2002)、人の社会的な合図を認識する能力は霊長類より優れていると考えられている。さらに、犬

は隠された物を捜すときに人に対して視線を送り、社会的な合図として使用するなど (Hare et al., 2002) そのコミュニケーション方法も人と類似しており (Soproni et al., 2001)、最も早くから家畜化され人と生活をともにすることで、犬と人が似たような認知機能を獲得した、つまり、収斂進化を遂げた動物であると考えられている (Miklósi et al., 2007; Monique et al., 2008)。本実験においても犬の注視が人の尿中 OT を上昇させる要因であることが明らかとなったことから、犬の注視は生理学的にも人に対する社会的な合図として成立していることが示唆され、犬の注視を発端としたコミュニケーションが人の親子間と同様に愛着行動として作用していると考えられることから、人と犬が似たような社会認知機構を持つ収斂進化仮説を裏付ける結果となった。

さらに、犬は成犬になっても垂れ耳の個体が存在し、先祖のオオカミと比べ歯牙が小さいこと、短く丸い顔を持つことなど形態的に幼形成熟を示す動物である。これは行動においても同様で、成犬になっても吠える、見知らぬ人に対し挨拶行動をとるなど、人なつこい行動を示し積極的に遊技行動をとるといった幼獣の特徴を色濃く残す動物である。犬は親である飼い主に対し注視や吠えといった社会的な合図を用いた愛着行動を示すことで自身の要求を人に伝え、これに対し人は食物を与える、遊ぶ、散歩へいく、なでるといった行動を提供する。人から提供される食物や遊びを含めた運動、身体的接触などの行為は犬に陽性感情を抱かせドーパミン作動性の脳内報酬系回路にも作用するとともに、本研究第 2 章の結果から、社会認知機能や愛着形成に関わる OT が分泌されと考えられ、人と犬の社会的な結び付きが促進されと考えられる。このように視線や身体的な接触と言った共通のコミュニケーションを発端とし、両者の OT が分泌されと考えられることから、人・犬間の絆の形成には OT 神経系を介した生物学的絆形成メカニズムが存在する可能性が示唆された。

犬が人の心身に与える影響

第3章の HC および LC 両グループの人の尿中コルチゾールが低下していたこと、POMS 短縮版に改善が見られたことから、人は犬とふれあうことで身体的および精神的な恩恵を受けていることが明らかとなった。これは、動物とふれあうことによって人の心身に与える影響を調査している研究と同様で、飼い主とそのペットとの関係性や、愛着の度合いに関わらず、心理尺度に改善が見られたり、唾液中コルチゾールの減少がみられるなどの一定の効果をもたらすことが知られている。一方で、人の尿中 OT を増加させる要因としてペットとの愛着の度合いを測る尺度である「LAPS」が関係していることが明らかとなった。また、相互コミュニケーションの多かった HC グループは尿中 OT が実験後に有意に増加していた。OT は副交感神経を亢進させることや、ストレス反応を抑制することから結果として心臓保護作用を持つとされている。犬との愛着は、犬と人が一緒に過ごす時間が増えるほど、両者の愛着が深まること (Hart, 1999; Marinelli et al., 2007)、犬の世話をすることと情緒的な関係との間に相関があること (Melson, 1988)、ペットから受ける効果は飼育している動物に対し強い愛着を持っていることで、最も大きくなると報告 (Garrity et al., 1989) されていることから、より良い関係を構築するためには、日頃から積極的に世話や接触する機会を持ち、情緒的結びつきを形成することが重要であると考えられる。

謝辞

本研究の実施にあたり、終始懇切な御指導と御鞭撻を賜りました麻布大学獣医学研究科 介在動物学分野 太田光明教授に本学位論文の提出にあたりまして、ここに深くお礼申し上げます。

また、学位審査の副査をお引き受けいただきました麻布大学獣医学部獣医学科 山本雅子教授ならびに麻布大学獣医学部動物応用科学科 菊水健史教授に深く感謝いたします。

本研究の実施にあたり、様々なご支援をいただきました大谷伸代講師、茂木一孝講師、永澤美保特任助教、福井大学医学部樋口隆教授ならびに村田拓也准教授に深く感謝いたします。また、供試個体を提供していただいた、村瀬ドッグトレーニングセンターの皆様、ならびに飼い主の皆様に深く感謝いたします。

最後に、麻布大学獣医学部動物応用科学科介在動物学研究室の多くの方々の支えとご助力を頂き、論文を完成するに至ることが出来ました。ここに深く皆様への感謝の意を表します。

参考文献

1. Abrantes, R.A.B., 1987. The expression of emotions in man and canid. *J. Small Anim. Pract.* 28, 1030-1036.
2. Albert, A., Bulcroft, K., 1987. Pets and Urban Life. *Anthrozoos* 1, 9-25.
3. Allen, K., 2002. Cardiovascular Reactivity and the Presence of Pets, Friends, and Spouses: The Truth About Cats and Dogs. *Psychosom. Med.* 64, 727-739.
4. Allen, K., Shykoff, B.E., Izzo, J.L., Jr, 2001. Pet ownership, but not ace inhibitor therapy, blunts home blood pressure responses to mental stress. *Hypertension* 38, 815-820.
5. Amico, J.A., Ulbrecht, J.S., Robinson, A.G., 1987. Clearance Studies of Oxytocin in Humans Using Radioimmunoassay Measurements of the Hormone in Plasma and Urine. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 64, 340-345.
6. Amico, J.A., Johnston, J.M., Vagnucci, A.H., 1994. Suckling-Induced Attenuation of Plasma Cortisol Concentrations in Postpartum Lactating Women. *Endocr. Res.* 20, 79-87.

7. Barker, S.B., Knisely, J.S., McCain, N.L., Best, A.M., 2005. Measuring stress and immune response in healthcare professionals following interaction with a therapy dog: a pilot study. *Psychol. Rep.* 96, 713-729.
8. Beerda, B., 1998. Behavioural, saliva cortisol and heart rate responses to different types of stimuli in dogs. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 58, 365-381.
9. Bello, D., White-Traut, R., Schwertz, D., Pournajafi-Nazarloo, H., Carter, C.S., 2008. An exploratory study of neurohormonal responses of healthy men to massage. *J. Altern. Complement. Med.* 14, 387-394.
10. Bick, J., Dozier, M., 2010. Mothers' and Children's Concentrations of Oxytocin Following Close, Physical Interactions with Biological and Non-biological Children. *Dev. Psychobiol.* 52, 100-107.
11. Boldt, M.A., Dellmann-Jenkins, M., 1992. The Impact of Companion Animals in Later Life and Considerations for Practice. *J. of Appl. Geront.* 11, 228-239.
12. Bos, P.A., Panksepp, J., Bluthe, R.M., Honk, J.V., 2011. Acute Effects of Steroid Hormones and Neuropeptides on Human Social-Emotional Behavior: A Review of Single Administration Studies. *Front. Neuroendocrinol.*

13. Bosch, G., Beerda, B., van de Hoek, E., Hesta, M., van der Poel, A.F.B., Janssens, G.P.J., Hendriks, W.H., 2009. Effect of dietary fibre type on physical activity and behaviour in kennelled dogs. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 121, 32-41.
14. Buchheim, A., Heinrichs, M., George, C., Pokorny, D., Koops, E., Henningsen, P., O'Connor, M.F., Gundel, H., 2009. Oxytocin enhances the experience of attachment security. *Psychoneuroendocrinology* 34, 1417-1422.
15. Buijs, R.M., De Vries, G.J., Van Leeuwen, F.W., Swaab, D.F., 1983. Vasopressin and oxytocin: distribution and putative functions in the brain. *Prog. Brain Res.* 60, 115-122.
16. Carter, C.S., Williams, J.R., Witt, D.M., Insel, T.R., 1992. Oxytocin and Social Bonding. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 652, 204-211.
17. Carter, C.S., 1998. Neuroendocrine perspectives on social attachment and love. *Psychoneuroendocrinology* 23, 779-818.
18. Carter, C.S., 2003. Developmental consequences of oxytocin. *Physiol. Behav.* 79, 383-397.
19. Carter, C.S., Grippo, A.J., Pournajafi-Nazarloo, H., Ruscio, M.G., Porges, S.W., 2008. Oxytocin, vasopressin and sociality . *Prog. Brain Res.* 170, 331-336.

20. Cazalis, M., Dayanithi, G., Nordmann, J.J., 1987. Hormone release from isolated nerve endings of the rat neurohypophysis. *J. Physiol.* 390, 55-70.
21. Chaibva, F.A., Walker, R.B., 2007. Development and validation of a stability-indicating analytical method for the quantitation of oxytocin in pharmaceutical dosage forms. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 43, 179-185.
22. Chiodera, P., Salvarani, C., Bacchi-Modena, A., Spallanzani, R., Cigarini, C., Alboni, A., Gardini, E., Coiro, V., 1991. Relationship between plasma profiles of oxytocin and adrenocorticotrophic hormone during suckling or breast stimulation in women. *Horm. Res.* 35, 119-123.
23. Crista L. Coppola, Temple Grandin, R. Mark Enns, 2006. Human interaction and cortisol: Can human contact reduce stress for shelter dogs? *Physiology & Behavior* 87, 537-541.
24. Davies, C.T., Few, J.D., 1973. Effects of exercise on adrenocortical function. *J. Appl. Physiol.* 35, 887-891.
25. Davis, S.J.M., Valla, F.R., 1978. Evidence for domestication of the dog 12,000 years ago in the Natufian of Israel. *Nature* 276, 608-610.

26. Devarajan, K., Rusak, B., 2004. Oxytocin levels in the plasma and cerebrospinal fluid of male rats: effects of circadian phase, light and stress. *Neurosci. Lett.* 367, 144-147.
27. DeVries, A., Glasper, E., Detillion, C., 2003. Social modulation of stress responses. *Physiol. Behav.* 79, 399-407.
28. Dickstein, S., Thompson, R., Estes, D., Malkin, C., Lamb, M., 1984. Social referencing and the security of attachment. *Infant Behavior and Development* 7, 507-516.
29. Ditzen, B., Schaer, M., Gabriel, B., Bodenmann, G., Ehlert, U., Heinrichs, M., 2009. Intranasal oxytocin increases positive communication and reduces cortisol levels during couple conflict. *Biol. Psychiatry* 65, 728-731.
30. du Vigneaud, V., 1956. Trail of sulfur research: from insulin to oxytocin. *Science* 123, 967-974.
31. Feldman, R., Weller, A., Zagoory-Sharon, O., Levine, A., 2007. Evidence for a neuroendocrinological foundation of human affiliation: plasma oxytocin levels across pregnancy and the postpartum period predict mother-infant bonding. *Psychol. Sci.* 18, 965-970.

32. Fonberg, E., Kostarczyk, E., Prechtl, J., 1981. Training of instrumental responses in dogs socially reinforced by humans. *Pavlov. J. Biol. Sci.* 16, 183-193.
33. Friedmann, E., Katcher, A.H., Lynch, J.J., Thomas, S.A., 1980. Animal companions and one-year survival of patients after discharge from a coronary care unit. *Public Health Rep.* 95, 307-312.
34. Garrity, T.F., Stallones, L., Marx, M.B., Johnson, T.P., 1989. Pet Ownership and Attachment as Supportive Factors in the Health of the Elderly. *Anthrozoos* 3, 35-44.
35. Gibbs, D.M., 1985. Immunoneutralization of oxytocin attenuates stress-induced corticotropin secretion in the rat. *Regul. Pept.* 12, 273-277.
36. Gilbey, A., McNicholas, J., Collis, G.M., 2007. A Longitudinal Test of the Belief that Companion Animal Ownership Can Help Reduce Loneliness. *Anthrozoos* 20, 345-353.
37. Gingrich, B.S., Hout, R.L., Wang, Z., Insel, T.R., 1997. Differential Fos Expression Following Microinjection of Oxytocin or Vasopressin in the Prairie Vole Brain. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 807, 504-505.

38. Goda, R., Sudo, K., 2007; 2007. Highly sensitive and quantitative analysis of polypeptides using a new gradient system based on an abrupt change in adsorption of polypeptide to the reversed-phase column packing. *Biomedical Chromatography* 21, 1005-1015.
39. Gordon, I., Zagoory-Sharon, O., Leckman, J.F., Feldman, R., 2010. Oxytocin, cortisol, and triadic family interactions. *Physiol. Behav.* 101, 679-684.
40. Grewen, K.M., Girdler, S.S., Amico, J., Light, K.C., 2005. Effects of partner support on resting oxytocin, cortisol, norepinephrine, and blood pressure before and after warm partner contact. *Psychosom. Med.* 67, 531-538.
41. Guastella, A.J., Mitchell, P.B., Dadds, M.R., 2008. Oxytocin increases gaze to the eye region of human faces. *Biol. Psychiatry* 63, 3-5.
42. Haller, J., Makara, G.B., Barna, I., Kovács, K., Nagy, J., Vecsernyés, M., 2003. Compression of the Pituitary Stalk Elicits Chronic Increases in CSF Vasopressin, Oxytocin as well as in Social Investigation and Aggressiveness. *J. Neuroendocrinol.* 8, 361-365.
43. Handlin, L., Hydbring-Sandberg, E., Nilsson, A., Ejdebäck, M., Jansson, A., Uvnäs-Moberg, K., 2011. Short-Term Interaction between Dogs and Their Owners: Effects on Oxytocin, Cortisol, Insulin and Heart Rate—An Exploratory Study. *Anthrozoos* 24, 301-315.

44. Hartley, L.H., Mason, J.W., Hogan, R.P., Jones, L.G., Kotchen, T.A., Mougey, E.H., Wherry, F.E., Pennington, L.L., Ricketts, P.T., 1972. Multiple hormonal responses to graded exercise in relation to physical training. *J. Appl. Physiol.* 33, 602-606.
45. Haubenhofer, D.K., Kirchengast, S., 2007. 'Dog Handlers' and Dogs' Emotional and Cortisol Secretion Responses Associated with Animal-Assisted Therapy Sessions. *Society and Animals* 15, 127-150.
46. Haverbeke, A., Laporte, B., Depiereux, E., Giffroy, J., Diederich, C., 2008. Training methods of military dog handlers and their effects on the team's performances. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 113, 110-122.
47. Heinrichs, M., Meinlschmidt, G., Neumann, I., Wagner, S., Kirschbaum, C., Ehlert, U., Hellhammer, D.H., 2001. Effects of suckling on hypothalamic-pituitary-adrenal axis responses to psychosocial stress in postpartum lactating women. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 86, 4798-4804.
48. Heinrichs, M., von Dawans, B., Domes, G., 2009. Oxytocin, vasopressin, and human social behavior. *Front. Neuroendocrinol.* 30, 548-557.
49. Hennessy, M., Michael T. Williams, Deborah D Millerb, Chet W Douglas, Victoria L Voith, 1998. Influence of male and female petters on plasma cortisol and behaviour: can human interaction reduce the stress of dogs in a public animal shelter? *Appl. Anim. Behav. Sci.* 61, 63-77.

50. Hennessy, M., Morris, A., Linden, F., 2006. Evaluation of the effects of a socialization program in a prison on behavior and pituitary–adrenal hormone levels of shelter dogs. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 99, 157-171.
51. Hernandez, H., Serafin N, Terrazas AM, Marnet PG, Kann G, Delgadillo JA, Poindron P., 2002. Maternal Olfaction Differentially Modulates Oxytocin and Prolactin Release during Suckling in Goats. *Horm. Behav.* 42, 232-244.
52. Higuchi, T., Honda, K., Fukuoka, T., Negoro, H., Wakabayashi, K., 1985. Release of oxytocin during suckling and parturition in the rat. *J. Endocrinol.* 105, 339-346.
53. Holm, A., Storbraten, E., Mihailova, A., Karaszewski, B., Lundanes, E., Greibrokk, T., 2005. Combined solid-phase extraction and 2D LC-MS for characterization of the neuropeptides in rat-brain tissue. *Anal. Bioanal Chem.* 382, 751-759.
54. Holt-Lunstad, J., Birmingham, W.A., Light, K.C., 2008. Influence of a "warm touch" support enhancement intervention among married couples on ambulatory blood pressure, oxytocin, alpha amylase, and cortisol. *Psychosom. Med.* 70, 976-985.
55. Hsu, Y., Serpell, J.A., 2003. Development and validation of a questionnaire for measuring behavior and temperament traits in pet dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 223, 1293-1300.

56. Hurlemann, R., Patin, A., Onur, O.A., Cohen, M.X., Baumgartner, T., Metzler, S., Dziobek, I., Gallinat, J., Wagner, M., Maier, W., Kendrick, K.M., 2010. Oxytocin Enhances Amygdala-Dependent, Socially Reinforced Learning and Emotional Empathy in Humans. *J Neurosci.* 30, 4999-5007.
57. Ishak, W.W., Kahloon, M., Fakhry, H., 2011. Oxytocin role in enhancing well-being: a literature review. *J. Affect. Disord.* 130, 1-9.
58. Kasting, N.W., 1988. Simultaneous and independent release of vasopressin and oxytocin in the rat. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 66, 22-26.
59. Kato, H., Saito, M., Shimazu, T., 1984. Attenuated blood corticosterone rhythm in rats with jejunal resection. *Life Sci.* 34, 331-335.
60. Kato, H., Saito, M., Suda, M., 1980. Effect of starvation on the circadian adrenocortical rhythm in rats. *Endocrinology* 106, 918-921.
61. King, T., 2003. Fear of novel and startling stimuli in domestic dogs. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 82, 45-64.
62. Klarenbeek, M., Okkens, A.C., Kooistra, H.S., Mol, J.A., M, M.B., Taverne, M.A., 2007. Plasma oxytocin concentrations during late pregnancy and parturition in the dog. *Theriogenology* 68, 1169-1176.

63. Kosfeld, M., Heinrichs, M., Zak, P.J., Fischbacher, U., Fehr, E., 2005. Oxytocin increases trust in humans. *Nature* 435, 673-676.
64. Kostarczyk, E., Fonberg, E., 1982. Heart rate mechanisms in instrumental conditioning reinforced by petting in dogs. *Physiol. Behav.* 28, 27-30.
65. Kurosawa, M., 1995. Massage-like stroking of the abdomen lowers blood pressure in anesthetized rats: influence of oxytocin. *J. Auton. Nerv. Syst.* 56, 26-30.
66. Landgraf, R., Hacker, R., Buhl, H., 1982. Plasma vasopressin and oxytocin in response to exercise and during a day-night cycle in man. *Endokrinologie* 79, 281-291.
67. Lazari, M.F., Alponi, R.F., Freitas, T.A., Breno, M.C., da Conceicao, I.M., Silveira, P.F., 2006. Absence of oxytocin in the central nervous system of the snake *Bothrops jararaca*. *J. Comp. Physiol. B.* 176, 821-830.
68. Legros, J.J., Chiodera, P., Geenen, V., 1988. Inhibitory Action of Exogenous Oxytocin on Plasma Cortisol in Normal Human Subjects: Evidence of Action at the Adrenal Level. *Neuroendocrinology* 48, 204-206.
69. Legros, J.J., Chiodera, P., Geenen, V., von Frenckell, R., 1987. Confirmation of the inhibitory influence of exogenous oxytocin on cortisol and ACTH in man: Evidence of reproducibility. *Eur J Endocrinol.* 114, 345-349.

70. Lewis, D.A., Sherman, B.M., 1985. Oxytocin does not influence adrenocorticotropin secretion in man. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 60, 53-56.
71. Lim, M.M., Young, L.J., 2006. Neuropeptidergic regulation of affiliative behavior and social bonding in animals. *Horm. Behav.* 50, 506-517.
72. Lim, M.M., Wang, Z., Olazábal, D.E., Ren, X., Terwilliger, E.F., Young, L.J., 2004. Enhanced partner preference in a promiscuous species by manipulating the expression of a single gene. *Nature* 429, 754-757.
73. Lorenz, K., 1940. Durch domestikation verursachte störungen arteigenen verhaltens. *Zeitschrift für Angewandte Psychologie und Charakterkunde* 59, 2-81.
74. Lorenz, K., 1943. Die angeborenen for men möglicher erfahrung. *Tiepsychologie* 5, 235-409.
75. Ludwig, M., 1998. Dendritic release of vasopressin and oxytocin. *J. Neuroendocrinol.* 10, 881-895.
76. Maestripieri, D., Hoffman, C.L., Anderson, G.M., Carter, C.S., Higley, J.D., 2009. Mother-infant interactions in free-ranging rhesus macaques: relationships between physiological and behavioral variables. *Physiol. Behav.* 96, 613-619.

77. Mathew, S.J., Coplan, J.D., Smith, E.L., Scharf, B.A., Owens, M.J., Nemeroff, C.B., Mann, J.J., Gorman, J.M., Rosenblum, L.A., 2002. Cerebrospinal fluid concentrations of biogenic amines and corticotropin-releasing factor in adolescent non-human primates as a function of the timing of adverse early rearing. *Stress* 5, 185-193.
78. Matthiesen, A.S., Ransjö-Arvidson, A.B., Nissen, E., Uvnäs-Moberg, K., 2001. Postpartum maternal oxytocin release by newborns: effects of infant hand massage and sucking. *Birth* 28, 13-19.
79. Meins, E., 1997. Security of attachment and the social development of cognition. Psychology Press, Hove.
80. Melson, G.F., 1988. Availability of and Involvement with Pets by Children: Determinants and Correlate. *Anthrozoos* 2011, 45-52(8).
81. Menor-Campos, D.J., Molleda-Carbonell, J.M., Lopez-Rodriguez, R., 2011. Effects of exercise and human contact on animal welfare in a dog shelter. *Vet. Rec.* 169, 388.
82. Michelini, L.C., 2001. Oxytocin in the NTS. A new modulator of cardiovascular control during exercise. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 940, 206-220.
83. Miklósi, Á., Topál, J., Csányi, V., 2007. Big thoughts in small brains? Dogs as a model for understanding human social cognition. *Neuroreport* 18, 467-471.

84. Miklósi, Á., Polgárdi, R., Topál, J., Csányi, V., 1998. Use of experimenter-given cues in dogs. *Animal Cognition* 1, 113-121.
85. Miller, S.C., Kennedy, C., DeVoe, D., Hickey, M., Nelson, T., Kogan, L., 2009. An Examination of Changes in Oxytocin Levels in Men and Women Before and After Interaction with a Bonded Dog. *Anthrozoos* 22, 31-42.
86. Mogi, K., Ito, S., Matsuyama, S., Ohara, H., Sakumoto, R., Yayou, K., Ohkura, S., Sutoh, M., Mori, Y., Okamura, H., 2008. Central administration of neuropeptide B, but not prolactin-releasing peptide, stimulates cortisol secretion in sheep. *J. Reprod. Dev.* 54, 138-141.
87. Morhenn, V., Park, J., Piper, E., Zak, P., 2008. Monetary sacrifice among strangers is mediated by endogenous oxytocin release after physical contact. *Evolution and Human Behavior* 29, 375-383.
88. Muir, J.L., Pfister, H.P., 1988. Influence of exogenously administered oxytocin on the corticosterone and prolactin response to psychological stress. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 29, 699-703.
89. Nagasawa, M., Kikusui, T., Onaka, T., Ohta, M., 2009. Dog's gaze at its owner increases owner's urinary oxytocin during social interaction. *Horm. Behav.* 55, 434-441.

90. Neumann, I., 2000. Brain oxytocin inhibits the (re)activity of the hypothalamo–pituitary–adrenal axis in male rats: involvement of hypothalamic and limbic brain regions. *Regul. Pept.* 96, 31-38.
91. Nishimori, K., Young, L.J., Guo, Q., Wang, Z., Insel, T.R., Matzuk, M.M., 1996. Oxytocin is required for nursing but is not essential for parturition or reproductive behavior. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 11699-11704.
92. Nissen, E., Uvnäs-Moberg, K., Svensson, K., Stock, S., Widstrom, A.M., Winberg, J., 1996. Different patterns of oxytocin, prolactin but not cortisol release during breastfeeding in women delivered by caesarean section or by the vaginal route. *Early Hum. Dev.* 45, 103-118.
93. Nobis, G., 1979. Der älteste haushund lebte vor 14,000 jahren. *Umschau.* 19, 610.
94. Nordmann, J.J., Dayanithi, G., 1988. Release of neuropeptides does not only occur at nerve terminals. *Biosci. Rep.* 8, 471-483.
95. Odendaal, J., Meintjes, R.A., 2003. Neurophysiological Correlates of Affiliative Behaviour between Humans and Dogs. *Vet J.* 165, 296-301.
96. Okamoto, Y., Ohtani, N., Uchiyama, H., Ohta, M., 2009. The feeding behavior of dogs correlates with their responses to commands. *J. Vet. Med. Sci.* 71, 1617-1621.

97. Olsson, K., Bergstrom, A., Kindahl, H., Lagerstedt, A.S., 2003. Increased plasma concentrations of vasopressin, oxytocin, cortisol and the prostaglandin F₂alpha metabolite during labour in the dog. *Acta Physiol. Scand.* 179, 281-287.
98. Ott S, Schalke E, Hirschfeld J, Hackbarth H., 2009. Assessment of a Bullterrier bloodline in the temperament test of Lower Saxony-comparison with six dog breeds affected by breed specific legislation and a control group of Golden Retrievers. *Dtsch Tierarztl Wochenschr*, 132-7.
99. Panksepp, J., 1992. Oxytocin Effects on Emotional Processes: Separation Distress, Social Bonding, and Relationships to Psychiatric Disorders. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 652, 243-252.
100. Pedersen, C.A., Caldwell, J.D., Drago, F., Noonan, L.R., Peterson, G., Hood, L.E., Prange, A.J., 1988. Grooming Behavioral Effects of Oxytocin. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 525, 245-256.
101. Pequeux, C., Hendrick, J.C., Hagelstein, M.T., Geenen, V., Legros, J.J., 2001. Novel plasma extraction procedure and development of a specific enzyme-immunoassay of oxytocin: application to clinical and biological investigations of small cell carcinoma of the lung. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 61, 407-415.
102. Petersson, M., Hulting, A.L., Uvnäs-Moberg, K., 1999. Oxytocin causes a sustained decrease in plasma levels of corticosterone in rats. *Neurosci. Lett.* 264, 41-44.

103. Pfister, H.P., Muir, J.L., 1989. Influence of exogenously administered oxytocin on central noradrenaline, dopamine and serotonin levels following psychological stress in nulliparous female rats (*Rattus norvegicus*). *Int. J. Neurosci.* 45, 221-229.
104. Polito, A.B., 3rd, Goldstein, D.L., Sanchez, L., Cool, D.R., Morris, M., 2006. Urinary oxytocin as a non-invasive biomarker for neurohypophyseal hormone secretion. *Peptides* 27, 2877-2884.
105. Prakash, B., 1998. Development of a sensitive enzymeimmunoassay for oxytocin determination in bovine plasma. *Anim. Reprod. Sci.* 51, 185-194.
106. Quaranta, A., Siniscalchi, M., Vallortigara, G., 2007. Asymmetric tail-wagging responses by dogs to different emotive stimuli. *Curr. Biol.* 17, 199-201.
107. Richard, P., Moos, F., Freund-Mercier, M.J., 1991. Central effects of oxytocin. *Physiol. Rev.* 71, 331-370.
108. Rimmele, U., Hediger, K., Heinrichs, M., Klaver, P., 2009. Oxytocin makes a face in memory familiar. *J. Neurosci.* 29, 38-42.
109. Rojas Vega, S., Struder, H.K., Vera Wahrmann, B., Schmidt, A., Bloch, W., Hollmann, W., 2006. Acute BDNF and cortisol response to low intensity exercise and following ramp incremental exercise to exhaustion in humans. *Brain Res.* 1121, 59-65.

110. Rosenblum, L.A., Smith, E.L., Altemus, M., Scharf, B.A., Owens, M.J., Nemeroff, C.B., Gorman, J.M., Coplan, J.D., 2002. Differing concentrations of corticotropin-releasing factor and oxytocin in the cerebrospinal fluid of bonnet and pigtail macaques. *Psychoneuroendocrinology* 27, 651-660.
111. Ross, H.E., Young, L.J., 2009. Oxytocin and the neural mechanisms regulating social cognition and affiliative behavior. *Front. Neuroendocrinol.* 30, 534-547.
112. Rudolph, D.L., McAuley, E., 1998. Cortisol and affective responses to exercise. *J. Sports Sci.* 16, 121-128.
113. Russell, J., 1998. Sex, parturition and motherhood without oxytocin? *J. Endocrinol.* 157, 343-359.
114. Russell, J.A., Douglas, A.J., Ingram, C.D., 2001. Brain preparations for maternity--adaptive changes in behavioral and neuroendocrine systems during pregnancy and lactation. An overview. *Prog. Brain Res.* 133, 1-38.
115. Saphire-Bernstein, S., Seeman, T., 2010. Are Plasma Oxytocin in Women and Plasma Vasopressin in Men Biomarkers of Distressed Pair-Bond Relationships? *Psychol Sci.* 21, 3-7.

- 116.Sarkar, M., Prakash, B.S., 2006. Application of sensitive enzymeimmunoassays for oxytocin and prolactin determination in blood plasma of yaks (*Capra falgariferus*) during milk let down and cyclicity. *Theriogenology* 65, 499-516.
- 117.Segurson, S.A., Serpell, J.A., Hart, B.L., 2005. Evaluation of a behavioral assessment questionnaire for use in the characterization of behavioral problems of dogs relinquished to animal shelters. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 227, 1755-1761.
- 118.Seltzer, L.J., Ziegler, T.E., 2007. Non-invasive measurement of small peptides in the common marmoset (*Callithrix jacchus*): a radiolabeled clearance study and endogenous excretion under varying social conditions. *Horm. Behav.* 51, 436-442.
- 119.Seltzer, L.J., Ziegler, T.E., Pollak, S.D., 2010. Social vocalizations can release oxytocin in humans. *Proc. Biol. Sci.* 277, 2661-2666.
- 120.Serpell, J., 1991. Beneficial effects of pet ownership on some aspects of human health and behaviour. *J. R. Soc. Med.* 84, 717-720.
- 121.Siegel, J.M., 1990. Stressful life events and use of physician services among the elderly: the moderating role of pet ownership. *J. Pers. Soc. Psychol.* 58, 1081-1086.
- 122.Soproni, K., Miklósi, A., Topál, J., Csányi, V., 2001. Comprehension of human communicative signs in pet dogs (*Canis familiaris*). *Journal of Comparative Psychology* 115, 122-126.

- 123.Souter, M.A., Miller, M.D., 2007. Do Animal-Assisted Activities Effectively Treat Depression? A Meta-Analysis. *Anthrozoos* 20, 167-180.
- 124.Stock, S., Uvnäs-Moberg, K., 1988. Increased plasma levels of oxytocin in response to afferent electrical stimulation of the sciatic and vagal nerves and in response to touch and pinch in anaesthetized rats. *Acta Physiol. Scand.* 132, 29-34.
- 125.Strathearn, L., Fonagy, P., Amico, J., Montague, P.R., 2009. Adult attachment predicts maternal brain and oxytocin response to infant cues. *Neuropsychopharmacology* 34, 2655-2666.
- 126.Takayanagi, Y., Yoshida, M., Bielsky, I.F., Ross, H.E., Kawamata, M., Onaka, T., Yanagisawa, T., Kimura, T., Matzuk, M.M., Young, L.J., Nishimori, K., 2005. Pervasive social deficits, but normal parturition, in oxytocin receptor-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 16096-16101.
- 127.Takayanagi, Y., Kasahara, Y., Onaka, T., Takahashi, N., Kawada, T., Nishimori, K., 2008. Oxytocin receptor-deficient mice developed late-onset obesity. *Neuroreport* 19, 951-955.
- 128.Turner, R.A., Altemus, M., Enos, T., Cooper, B., McGuinness, T., 1999. Preliminary research on plasma oxytocin in normal cycling women: investigating emotion and interpersonal distress. *Psychiatry* 62, 97-113.

129. Udell, M.A.R., Wynne, C.D.L., 2008. A Review of Domestic Dogs' (Canis Familiaris) Human-Like Behaviors: Or Why Behavior Analysts Should Stop Worrying and Love Their Dogs. *J. Exp. Anal. Behav.* 89, 247-261.
130. Ueta, Y., 2000. Activation of gastric afferents increases noradrenaline release in the paraventricular nucleus and plasma oxytocin level. *J. Auton. Nerv. Syst.* 78, 69-76.
131. Uvnäs-Moberg, K., 1997. Physiological and Endocrine Effects of Social Contact. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 807, 146-163.
132. Uvnäs-Moberg, K., 1998. Antistress Pattern Induced by Oxytocin. *News Physiol. Sci.* 13, 22-25.
133. Uvnäs-Moberg, K., 1998. Oxytocin may mediate the benefits of positive social interaction and emotions. *Psychoneuroendocrinology* 23, 819-835.
134. Verbalis, J., McCann, M., McHale, C., Stricker, E., 1986. Oxytocin secretion in response to cholecystokinin and food: differentiation of nausea from satiety. *Science* 232, 1417-1419.
135. Verbalis, J.G., McHale, C.M., Gardiner, T.W., Stricker, E.M., 1986. Oxytocin and vasopressin secretion in response to stimuli producing learned taste aversions in rats. *Behav. Neurosci.* 100, 466-475.

136. Viau, R., Arsenault-Lapierre, G., Fecteau, S., Champagne, N., Walker, C.D., Lupien, S., 2010. Effect of service dogs on salivary cortisol secretion in autistic children. *Psychoneuroendocrinology*.
137. Voith, V.L., 1985. Attachment of people to companion animals. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.* 15, 289-295.
138. Winslow, J., Insel, T., 2002. The social deficits of the oxytocin knockout mouse. *Neuropeptides* 36, 221-229.
139. Winslow, J.T., Noble, P.L., Lyons, C.K., Sterk, S.M., Insel, T.R., 2003. Rearing effects on cerebrospinal fluid oxytocin concentration and social buffering in rhesus monkeys. *Neuropsychopharmacology* 28, 910-918.
140. Witt, D., Winslow, J., Insel, T., 1992. Enhanced social interactions in rats following chronic, centrally infused oxytocin. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 43, 855-861.
141. Wotjak, C., Ganster, J., Kohl, G., Holsboer, F., Landgraf, R., Engelmann, M., 1998. Dissociated central and peripheral release of vasopressin, but not oxytocin, in response to repeated swim stress: New insights into the secretory capacities of peptidergic neurons. *Neuroscience* 85, 1209-1222.
142. Young, L.J., 2007. Regulating the social brain: a new role for CD38. *Neuron* 54, 353-356.

143.Zak, P.J., Stanton, A.A., Ahmadi, S., 2007. Oxytocin increases generosity in humans.

PLoS One 2(11): e1128. 1-5.

144.Zak, P.J., Kurzban, R., Matzner, W.T., 2004. The Neurobiology of Trust. Ann. N. Y.

Acad. Sci. 1032, 224-227.

145.Lorenz, K. 1966, 「人イヌにあう」 小原秀雄訳, 至誠堂.

146.環境省, 2009, 住宅密集地における犬猫の適正飼養ガイドライン