

ヒト-イヌ間の絆形成における
イヌの涙の機能に関する研究

Research on the function of dog tears
in the formation of bonds between human and dog.

2021年3月

麻布大学大学院 獣医学研究科
獣医学専攻 博士課程
応用動物科学

DV1506 村田 香織

要 約

イヌは最も早く家畜化された動物であり、ヒトとの共生の歴史が長い。その歴史の中でイヌはヒトに対する共感性を含め、卓越したコミュニケーション能力を身に付けてきた。ヒトとイヌの共生や絆の背景には、快情動の共感性の存在があると考えられる。またヒトの親子間で見られるような絆があるとすれば、分離がストレスになり、再会が喜びであると想像される。逸話的にはイヌは飼い主との再会で非常に喜ぶとされているが、その行動生理学的な研究は限られている。今回、我々は飼い主とイヌの再会場面に着目し、その時のイヌの変化を、行動生理学的に調べた。

2章ではイヌの情動の変化に付随して涙の分泌量が増えるのかを確認するために、日常的な飼い主との分離再会場面を用いて実験を行った。またイヌとヒトとの交流場面でイヌのオキシトシンも上昇すること (Odendaal & Meintjes, 2003; Handlin et al., 2011; Nagasawa et al., 2015)、オキシトシンが、涙液を増やす副交感神経系を賦活化させること (Norman et al., 2011; Romero et al., 2014) から、情動の涙にもオキシトシンが関与していると仮説を立て、オキシトシン点眼後の涙液量を測定した。その結果、涙液の増加は他人との再会では認められず、飼い主との再会時のみ認められた。さらにオキシトシンの点眼によって涙液量の増加が認められた。このことは、飼い主との再会場面において、イヌが飼い主とのふれあいを介してオキシトシンを分泌し、そのオキシトシンが涙腺のオキシトシン受容体細胞に作用することで涙液量を増加させたと考え、オキシトシンの測定が必要と考えた。

脳内のオキシトシンの活性は測定することが困難なことから、脳下垂体から分泌されたオキシトシンを抹消にて計測することで、脳内オキシトシンの活性を捉える手法が一般的である。抹消では血中オキシトシンに加え、尿中、唾液中のオキシトシンが測定されるが、まだ安定した測定系は少ないのが現状である。

3章では本研究室で新たに作成したウサギ抗オキシトシンポリクローナル抗体の有用性とその測定の信頼性を検証した。その結果、高い感度と特異性、さらに添加回収試験でも高い相関性が見いだされ、また旧測定法との比較でもほぼ同等の測定結果が出るなど、新たなオキシトシン抗体の作成とそれを用いたオキシトシン ELISA 法を確立できた。一方、これまで困難と言われてきた血中のオキシトシンに関しては、従来の RIA 法と比較し、相関が得られなかった。このことは、おそらく血中のオキシトシンが結合タンパク質に付着しており、抽出方法や抽出後におけるオキシトシンの立体構造の変化など、未だ明らかにされていないオキシトシンの分子特性によるものと思われる。血中動態を知ることが困難と判断し、次章の飼い主との再会場面におけるイヌのオキシトシン分泌変化に関しては、従来の RIA 法によって、測定することとした。

4章では第2章と同様に、イヌは飼い主との再会場面において涙液量が増加することがわかった。それは見知らぬ人と比較しても高かった。しかしながらその場面におけるオキシトシンの増加は認められなかった。オキシトシンは分泌されてから3分で半分が消えるため、

今後は、オキシトシンなどの血中ホルモンを、短い時間軸で計測できる技術の開発が待たれる。またオキシトシンと涙液量の変化に関しては、今後中枢でのオキシトシン変動あるいは、血中の詳細なサンプリングによる、さらなる検証が必要と考えられた。

5章では、イヌが涙を呈することによる、社会的な効果、特にヒトへの作用を調べるため、イヌに人工涙液を点眼して顔写真を撮影し、イヌの写真を見たヒトがどのような印象を持つかを調査した。同一犬で人工涙液点眼前と点眼後の2種の写真間において、Wilcoxon signed rank テストを実施し、写真間でヒトの評価が異なるかどうかを検定した。その結果、13枚の写真のペアで実験を行ったうち、7ペアで涙によって印象が有意にポジティブとなり、1ペアでのみネガティブとなり、涙の存在によるイヌのポジティブな印象が上昇することが示唆された。

飼い主との分離後の再会時において、イヌの涙液量の増加が認められた。このことは、イヌが情動性の涙、それも飼い主との再会という快情動場面での涙を呈することが示された。動物における情動性の涙の存在を示した最初の成果となった。

また涙液の増加は他人との再会時には認められず、飼い主との分離後の再会時にのみ涙液量の有意な増加が見られた。涙液の増加はイヌと特別な関係性のある飼い主との分離後の再会のようにイヌの情動が激しく変化する場面において認められることが分かった。

さらに、オキシトシンは飼い主とイヌを含む特別な関係を築く上で、重要なホルモンであると考えられているが、オキシトシンの点眼によって涙液量の増加が認められたことで、飼い主との分離後の再会によるイヌのオキシトシン分泌が上昇したことで、涙液量が増加した可能性が示された。

第4章では飼い主との再会場面におけるイヌのオキシトシン上昇、オキシトシンと涙液量の関係性は明らかにできなかった。この研究はさらに精度を高めて実施する必要がある。

また、人工涙液による目の変化がヒトにポジティブな印象を与えることが明らかとなった。イヌが情動性の涙を呈することは、オオカミでの情動性の涙の存在の確認など追加の検討が必要であるものの、ヒトとの共生において有利に働き、その過程で獲得された機能である可能性が示された。視線を用いたヒトとのコミュニケーション能力を高度に進化させてきたイヌの涙にも飼い主の保護行動や養育行動を引き起こすような機能があるのかもしれない。

今後、行動遺伝学的研究の発展と組み合わせることで、さらにイヌとヒトの共生の歴史が紐解かれるかもしれない。

また本来の涙の役割はげっ歯類ではフェロモンであり、ヒトでもフェロモンとして機能していることが分かっている。イヌもフェロモンとしての機能を持っている可能性があり、今後イヌの涙がもつ同種間の機能の解明が必要であろう

Dogs were the first animals to be domesticated. They have a long history of coexisting with humans. During that time, dogs have developed human-like communication skills, including the ability to empathize with humans. It is thought that empathy of pleasant emotions lies behind the symbiotic and bonding relationship between humans and dogs. Furthermore, if there were a bond similar to that between human parents and children, then it could be expected that separation would be a source of stress and reunions would be joyful. Interestingly, dogs are reported to be extremely happy to see their owners again, but there is only limited research on the behavioral physiology of this response. In this study, we focused on the contexts where dogs were reunited with their owners and investigated the behavioral physiological changes in the dog that occurs at that time.

In Chapter 2, we conducted the experiment where dogs are separated and reunited with their owners on a daily basis to check whether there are changes in the amount of tear secretion associated with the change in the dog's behavior. Given that oxytocin levels increase in dogs in the contexts involving interactions between them and humans and that oxytocin increases tear secretion and activates the parasympathetic nervous system, we hypothesized that oxytocin is also involved in the production of emotional tears and measured the tear volume after administration of oxytocin eye drops. The results revealed that there was no increase in tear volume during reunions with strangers, but only during reunions with the dog's owner. Furthermore, there was an increase in tear volume due to the administration of oxytocin eye drops. This finding suggests that dogs secrete oxytocin through contact with their owners when reunited with their owners. It is thought that this oxytocin acts on oxytocin receptor cells in the lacrimal glands, which increases tear volume, so we considered it necessary to measure the serum oxytocin levels.

In Chapter 3, we verified the efficacy of rabbit anti-oxytocin polyclonal antibodies newly created in this laboratory and the reliability of the measurements. The results showed high sensitivity and specificity against to oxytocin, and there were high degree of correlations in the dilution test and spike recovery test. We obtained equivalent measurement results compared with the standard measurement method, indicating the establishing a oxytocin ELISA methods using a newly generated oxytocin antibody. However, we did not obtain any correlation with oxytocin in blood, which has been problematic to date, compared with the conventional RIA technique. This may be due to unknown molecular characteristics of oxytocin, such as changes to the three-dimensional structure of oxytocin caused by the extraction method and after extraction because oxytocin in the blood adheres to binding proteins. Although efforts have been made so far, it was deemed difficult to ascertain the blood kinetics, so it was decided to measure changes in oxytocin secretion by dogs that were reunited with their owners (covered in the next chapter) using the conventional RIA technique.

In Chapter 4, we found that the amount of tear volume increased when dogs were reunited with their owners, as seen in Chapter 2. The volume was higher than when the dogs encountered a stranger. However, there was no increase in oxytocin in that experimental settings. The oxytocin

reduces by half within 3 minutes after secretion, so we are awaiting future development of technology that would enable it to measure the levels of hormones like oxytocin in the blood within a short time. Further verification of the changes in oxytocin and tear volume is required, either through fluctuations of oxytocin levels in the central nervous system or detailed sampling of oxytocin in the blood.

In Chapter 5, we instilled artificial tears in dogs' eyes, took photographs of the dogs' faces, and examined the impression humans had when viewing the photographs of the dogs to investigate the social effect of dogs shedding tears, focusing on the effect on humans' feelings. We conducted a Wilcoxon signed rank-sum test comparing two types of photographs, one taken before the instillation of artificial tears and the other taken after, both involving the same dog, to determine if human evaluation differed with the photographs. The results indicated that, of the experiments conducted with thirteen pairs of photographs, the impression was significantly positive due to the presence of tears in seven pairs and negative with only one pair, suggesting that the presence of tears improved the positive impression of dogs.

Dogs had increased tear volume when reunited with their owners after a period of separation. This suggests that dogs exhibit emotional tears and manifest those tears with positive emotion (when reunited with their owners). This is the first time the presence of emotional tears in animals has been demonstrated.

Furthermore, dogs showed no increase in tear volume when reunited with a stranger, and there was a significant increase in tear volume only when they reunited with their owners after a period of separation. Thus, it was found that the increase in tear volume occurs when dogs experience dramatic emotional changes such as reuniting with their owners with whom they have a special relationship after a period of separation.

Moreover, oxytocin is an important hormone for building special relationships, and as tear volume increased with the administration of oxytocin eye drops, this suggests that the tear volume might have increased due to the increase in oxytocin secretion in dogs when reunited with their owners after a period of separation. Unfortunately, in Chapter 4, we were unable to clarify the correlation between elevated serum oxytocin levels in dogs reunited with their owners after a period of separation and oxytocin and tear volume. This research needs to be conducted with a higher level of accuracy.

It was also clarified that changes in eye appearance with the instillation of artificial tears had a positive impact on humans. Dogs shedding emotional tears need to be further investigated by studies such as ones that seek to confirm the presence of emotional tears in wolves, but this finding suggests that these tears may be a function dogs acquired through the process of coexisting with humans, as it worked to their advantage. Dogs have highly evolved communication skills with humans by using their eyes, so tears may also perform the function of triggering protective and caring behavior in the dog's owners.

It might be possible to further unravel the history of symbiosis between dogs and humans in

the future by combining these findings with the development of behavioral genetic studies.

It is also known that the original role of tears in rodents is like a pheromone, and tears also function like a pheromone in humans. Tears may also function as a pheromone in dogs, so it will be necessary to clarify the function of dog tears within the same species.

目次

要約	2
第1章 緒言 ヒトとイヌの関係の成り立ち	8
イヌとヒトの歴史	8
イヌのヒトに対する社会的認知能力	9
ヒトとイヌの絆	10
ヒトとイヌの共感研究	10
本研究の目的	11
第2章 飼い主との再会場面におけるイヌの涙液量変化	12
緒言	12
材料と方法	13
結果	15
考察	17
第3章 オキシトシン系の確立	20
緒言	20
手法と結果	21
考察	27
第4章 飼い主との再会場面におけるイヌのオキシトシン分泌変化	28
緒言	28
材料と方法	29
結果	30
考察	31
第5章 涙液の増加したイヌの眼がヒトに与える影響	33
緒言	33
材料と方法	33
結果	34
考察	36
第6章 総合考察	37
謝辞	39
引用文献	40

第1章 緒言 ヒトとイヌの関係の成り立ち

イヌとヒトの歴史

イヌ (*Canis familiaris*) とヒトの関係は、他のどの動物よりも深い。現在、日本における飼育頭数は1100万頭にも達し、実に15%の世帯でイヌが飼育され、数字上は6世帯に1世帯が飼育していることになる(平成25年度ペットフード工業会調査)。少子多犬化といわれるようになった現在、イヌの存在が与える人間社会への影響の大きさは計り知れないと言ってもいいだろう。イヌは最も古くに家畜化された動物であり、その起源は考古学的・遺伝学的知見により、1万5千年前から3万3千年前と言われている。また、イヌの祖先の候補としては、形態、行動、生態と考古学的知見より、オオカミ (*Canis lupus*)、コヨーテ (*Canis latrans*)、ジャッカル (*Canis aureus*) が挙げられていたが、最近の遺伝学的知見により、オオカミであることが明らかとなった (Vila et al., 1997)。しかしながら、オオカミからイヌへと家畜化されたプロセスについては、未だ不明な点が多く明らかになっていない。イヌの家畜化プロセスに関する研究として、ロシアで実施されたイヌ科動物であるアカギツネ (*Vulpes vulpes*) の家畜化実験が挙げられる。実験では、ヒトへの攻撃性が低く、恐れずにヒトに近づくアカギツネ個体が選択的に繁殖されていった。その結果、40世代程度で、イヌに似た行動的特徴を持つキツネの集団が確立された (Trut, 1999)。イヌに似た行動的特徴とは、ヒトとの触れ合いを求める、くんくんと鳴く、尾を振る、ヒトを舐める等である。さらに、キツネの中には、たれ耳、まだらな毛色、まるまったしっぽ等を持つ個体が見られ、形態的にもイヌに似たキツネの集団となった。また、ストレス反応を司る視床下部-下垂体-副腎 (HPA) 軸の変化や発達速度の変化が見られた。キツネをヒトへの攻撃性の低さや親和性の高さを指標に選択的に交配していくことでイヌと似た特徴を持つ集団となったことより、イヌの家畜化でもヒトへの親和性による選択圧がかかっていたのではないかと推測された。

イヌのヒトに対する社会的認知能力

しかし、私たちはこの「人間の最良の友」に関して、さほど多くのことを理解しているわけではない。2000年代に入り、イヌの認知科学や行動学が世界的にも脚光を浴び、その卓越した社会認知能力、社会的知性が明らかになってきている。特に金字塔となった発見は、2002年のイヌによる指さし理解の研究である (Hare et al., 2002)。この研究では、イヌがヒトの指さしを理解し、正解の選択肢を選ぶこと、その正答数はヒトにもっとも近縁な動物種であるチンパンジー (*Pan troglodytes*) にも勝ることが明らかとなった。イヌとヒトは遺伝的には距離があるものの、濃密なコミュニケーションが成立する、まさに「最も近い友人」同士であると言えるかもしれない。ヒトとイヌの長い共生の過程において、お互いの情報を共有し、相手個体の意図を理解することは、共同生活を送るための大切な要素であつたろう。

さらにイヌは、ヒトの情動の変化を読み取って行動を選択することも身につけたと想像できる。例えば飼い主が怒っている時には距離をとって安全を確保し、喜んでいる時にはそばに近づくことで、正の報酬を受け取るチャンスを増大させたかもしれない。イヌはその能力を進化と家畜化の過程で獲得してきたのだと思われる。このことから、イヌのヒトに対する共感性を考える際には、イヌの進化と家畜化の過程、特に選択圧の対象となった行動や認知機能を、オオカミとの比較研究や遺伝的推移などを通して振り返り、その認知機能を介した情報の共有や、ヒトの情動の伝達が機能しうるかを調査する必要があると思われる。

オオカミとイヌとの行動や認知能力の比較についても様々な研究が行われている。子オオカミと子イヌを生後 4-6 日の早い時期に母子分離し、24 時間ヒトと一緒に過ごす環境で同じように育て、オオカミとイヌとの比較を行った研究がある。様々な成長段階で行動テストを行ったところ、イヌの方が多く声を発し、ヒトによく近づき、尾をよく振り、ヒトの顔をよく見、ヒトへの親和性が高いことが明らかとなった (Kubinyi et al., 2007)。また、オオカミの方がイヌよりも同種への社会的嗜好性が強く、オオカミでも飼い主に対しての接近行動や親和的行動は観察されたものの、分離時の不安や後追い行動が顕著でなかったことから、愛着とまでは言えないと考察された。他の研究グループもイヌとオオカミの差異を報告している。ヒトのジェスチャーに従って物体を選択する能力はイヌの方が高いこと (Hare et al., 2002)、また、解決不可能な課題が出されたときにイヌの方がヒトをよく見ることが明らかとなった (Miklósi et al., 2003)。このジェスチャーの理解力については、ヒトへの攻撃性の弱さや親和性の高さに基づいて選択的に交配された先述のキツネの集団の方が、もとのキツネの集団よりも高いことが明らかとなっており (Hare et al., 2005)、イヌが持つ、ヒトの出す社会的手がかりの利用能力の高さは、その家畜化の過程に関連があることが予想される。

おそらく、このような長期にわたる親和的なヒトとイヌの共生の歴史において、両者の関係性は、イヌがヒトの情動を読み取り、その情報を活用することを通じて育まれてきたと考えられる。イヌがヒトの情動を読み取る能力はヒトに対するイヌの共感性ともいえる能力であろう (本論文で取り上げる共感性の定義は次の項で説明する)。また、ヒトの情動を認知し、自身の行動を変化させることは、ヒトとの共生場面における行動の同期化の場面においても、協力的な行動を発達させる際にも重要である。

ヒトとイヌの絆

先述の飼い主と見知らぬヒトという関係性を基にした、情動表出に対する反応性の違いは、飼い主とイヌの絆形成の有無によるものかもしれない。共感の表出には個体間の親和関係が影響するとされており (de Waal & Preston, 2017)、ヒトとイヌとの共感性を探る手がかりの一つとして、両種間の絆の形成の可能性を調べる必要があるだろう。絆の形成の有無を調べる方法はいくつか提唱されているが、動物の場合 1) 特定他個体に対する情動や行動での応答があること、2) 分離時にストレス応答が、再会時にストレス軽減あるいは喜びのよ

うな行動が発現すること、と定義されている (DeVries, 2002)。特に顕著に観察されるのは母子間の関係性であり、絆形成を介して個体間は距離を縮め、接触頻度が上昇する。その後、後追いなどの同調行動が観察される (Ainsworth et al., 1978)。トリを用いた研究では、母子間に代表される絆形成が情動伝染を高めることも知られている (Edgar et al., 2011)。また群れを形成する動物では、群れの仲間の他個体の存在が、不安行動やストレス応答を軽減させることが知られており、社会的緩衝作用と呼ばれるが、絆を結んだ個体間でもっとも社会緩衝効果が高い (Kikusui et al., 2006)。このことは、絆形成のような個体間関係性が、お互いの距離感を縮め、情動応答や行動を同期化させる基盤となっていることを示唆する。これまでのいくつかのイヌの研究でも、飼い主との間に絆の存在を示唆する研究が存在する。Topál et al. (1998) は、ストレンジ・シチュエーション法 (Ainsworth et al., 1978) を用いて、新奇環境下では、飼い主が存在する場合は見知らぬ人だけの時に比べてイヌの探索行動や遊び行動が増加すること、また飼い主が退室する際には見知らぬ人の退室時に比べて後追い行動が増加することなど、イヌが飼い主に対して見知らぬ人とは明らかに異なる行動を示し、ヒトの母子間のように飼い主を安全基地として利用している可能性を示している。一方、イヌと共通の祖先を持つオオカミでは同様の実験設定で飼い主と見知らぬ人への後追い行動に差がみられず、飼い主と見知らぬ人との遊び行動にも違いがみられなかった (Topál et al., 2005)。永澤らは、イヌにとって新奇な場所でイヌの注視によって始まるやりとりが多い飼い主ほど、イヌとの交流後に尿中オキシトシン濃度が上昇することを示した (Nagasawa et al., 2009)。ヒトの母子間では、子からの注視は母親の養護的感情および行動を誘発し、子自身が安全であるという感覚を確保することにつながる (数井 & 遠藤, 2005)。オキシトシンは養育行動の発現を制御することから (Nagasawa et al., 2012)、イヌからの注視が飼い主のオキシトシン分泌を促進させることは、すなわちヒト母子間と同様にイヌからの注視が飼い主の養護的行動を引き出している可能性が考えられ、従来逸話的に語られてきたヒトとイヌとの絆形成の生物学的理解の糸口となるものであろう。さらに、永澤らは、ヒト-イヌ間には、視線コミュニケーションを起点としたオキシトシン神経系を介した絆形成のポジティブ・ループがあり、オオカミとその飼い主のそれとは異質なこの関係性が、イヌがヒトに似た視覚的コミュニケーション・スキルを、進化の過程で特異的に獲得した原因ではないかと示唆している (Nagasawa et al., 2015)。オキシトシンを介した絆形成は母子間に代表される共感性の根源的現象であり、イヌの視線利用は共感の芽生えとして今後も深めていくべき課題である。

ヒトとイヌの共感研究

共感とは何かについては、さまざまな考え方があある。一般的には他個体の情動が観察個体に同じように喚起される情動伝染 (emotional contagion)、自他の情動状態の区別をした上で、それに応じた行動 (情動) 変化を喚起する狭義の意味での共感 (empathy)、認知的に自己と他者の立場にたち、他者の心的状態を理解した上で、行動 (情動) の変化を示す同情 (sympathy)

に区別されるが、Preston & de Waal (2002) は、その総説論文の中で、認知的共感 (cognitive empathy) をさらに加えている。この認知的共感は、主体が対象の状態をトップダウン的に表象することであり、情動状態の一致はなく、「真の共感 (true empathy)」と呼ばれることもあると述べている。共感の定義としては未だに結論が得られておらず、その機能的分類には、進化的ならびに神経科学的な知見が必要であるものの、本論では、これらすべてを共感性としてまとめ、広く「他者の情動の理解とそれに応じた行動や情動の喚起」と捉える。その上で、関連する行動を幅広く俯瞰し、共感性を通してみたイヌの特性を明らかにすることから、共感性の進化を論じたい。

共感性の進化を考える上で、イヌのそれは特殊な位置づけを与えられる。野生動物では、その社会の構造や社会的交渉の特性が、特定の性質を持った共感性を進化させる選択圧として機能すると考えられるが、イヌにおいてそれを同定することは容易なことではない。同種間で生じうる共感性について言えば、イヌも例外ではない。しかし、ヒトに対するイヌの共感性は、その獲得に至った主要因が同定されている。それはヒトというパートナーとの共生を促進することである。強力に作用したであろうこの人為的選抜が、イヌの共感性をいかなる性質のものにしたのかを明らかにすることを通じて、他の動物たちが潜在的に形成しうる共感性を同定し、それを種のニッチや社会的特性と関連づけて論じることが可能になるであろう。

本研究の目的

ヒトとイヌの共生や絆の背景には、快情動としての共感性の存在があるだろう。特にヒトとの間に絆があるとすれば、ヒトとの分離がストレスになり、再会が喜びであると想像される。逸話的にはイヌは飼い主との再会で非常に喜ぶとされているが、その行動生理学な研究は限られている。今回、飼い主とイヌの再会場面に着目し、その時のイヌの変化を、行動生理学的に調べ、その関係性の背景にある生理変化を明らかにすることを目的とした。

第2章 飼い主との再会場面におけるイヌの涙液量変化

緒言

ヒトでは情動が激しく変化するような場面でしばしば涙液の増加が認められ、涙として観察されることがある。涙は、眼球の外上側にある涙腺で作られ、瞬きで目の表面に行き渡る。大半は、目頭にある「涙点」から鼻涙管を通して鼻の奥に排出され、一部は目の表面から蒸発する。涙は持続的に微量分泌されているもの（基礎分泌）と刺激物に対する防御反射として分泌されるもの（反応性の涙）がある。これらの涙の役割は角膜や結膜への栄養補給、潤滑材、防御壁、消毒などである（Pflugfelder & Stern, 2020）。さらにはヒトにおいては心を揺り動かされる体験により分泌される情動性の涙もある。激しい情動による涙は涙点経由の排出では間に合わず、涙が目の外へ流出する。前頭前野の情動を司る部位が興奮し、その信号が脳幹の上唾液核に入力され、副交感神経の活動亢進により涙腺から大量の涙を分泌させ、目からあふれる。情動性の涙の役割は明確ではないが、号泣は交感神経緊張状態を、覚醒状態にありながら、積極的に副交感神経優位の状態を発現させて、ストレス緩和に寄与すると考えられている（有田, 2007）。また涙は非言語コミュニケーションツールとしての役割も有し、乳幼児が空腹感や痛み、不快感などを親に伝える際にも使われている（Bell & Ainsworth, 1972）。涙の社会シグナルとしての機能はマウスでも認められ、性の情報伝達に使われる（Kimoto et al., 2005）。ヒトでも同様に女性の涙が男性の性欲に作用することなどが報告されている（Gelstein et al., 2011）。

イヌの情動性の涙に関する報告はないが、イヌの注視により飼い主のオキシトシンが上昇するように、イヌの目を見ることが飼い主に変化をもたらすとすれば、イヌの目にヒトにおける情動性の涙のような視覚的な変化が起きている可能性があると考えられる。

イヌは飼い主との分離後の再会時に、飼い主を注視する、尾を振る、飛びつく、顔を舐めるなどの快情動を示唆する親和的行動を見せると同時に、心拍変動にも変化が認められることが分かっている（Katayama et al, 2016）。飼い主との分離後の再会時にイヌの情動に変化があるとすれば、この際のイヌの涙液量にも変化が起きる可能性がある。

そこで今回我々はイヌの情動の変化に付随して涙の分泌量が増えるのかを確認するために、日常的な飼い主との分離再会場面を用いて実験を行った。

また、イヌと飼い主という絆形成関係はオキシトシンによって制御されていると考えられる。イヌとヒトとの交流場面でイヌのオキシトシンも上昇すること（Odendaal et al., 2003; Handlin et al., 2011; Nagasawa et al., 2015）、オキシトシンが、涙液を増やす副交感神経系を賦活化させること（Norman et al., 2011; Romero et al., 2014）から、情動の涙にもオキシトシンが関与していると仮説を立てた。

材料と方法

本研究には、家庭で飼育されている健康で、分離不安症状を持たないイヌとその飼い主が参加した。

実験 1) 自宅での分離と再会時による涙液量の変化

イヌが普段生活している場所において、飼い主との分離後の再会時に涙液量が増加するかを調べた。

供試動物および被験者

18頭のイヌ（2-13歳、平均 \pm SD=7.78 \pm 4.69歳齢、雌が15頭（うち13頭が不妊済み）、雄が3頭（すべて去勢済み））と、その飼い主7名（20代～50代、男性1名、女性6名）が参加した。すべて獣医療に関わっており、動物の取り扱いに熟練していた。涙液量測定は飼い主またはそれに準ずる者（日常的にイヌの世話をしている者）が行った。

実験場所

実験は供試動物および被験者の自宅または日常的に生活している場所で行った。

実験方法

涙液量の測定はシルマー涙液試験（以下 STT）のシルマー 1 試験を用いた。シルマー 1 試験は点眼麻酔していない目における水性涙液の産生量を測定するもので、涙液の基礎産生量と反射産生量を測定するものである。規格化した濾紙片である涙液量検査試験紙（シルマー試験紙 SPAH、株式会社インターベット）のノッチのある部分を折り曲げ、下眼瞼外側の結膜嚢に置き、下眼瞼と角膜の間に密着させ、1分間あたりの涙液の産生量を測定する。犬の正常値は12～27mmである（Petersen & Crispin, 2002）。

イヌと飼い主が自宅またはそれに準ずる場所で十分リラックスして一緒に過ごしている時間帯に、STTの再検査時に必要とされる2時間以上の間隔を空けて2回測定したものを平均し、Basal levelとした。さらに別の日にイヌを5時間以上留守番させた後、飼い主が帰宅してイヌとふれあい、5分以内に測定した。

実験 2) 飼い主と他人との再会時の涙液量の比較

飼い主の再会が特異的に涙液量を増加させたかについて調べた。

供試動物および被験者

20頭のイヌ（1-13歳、平均 \pm SD=6.35 \pm 3.94）、このうち雌が12頭（うち11頭が不妊済

み)、雄が 8 頭 (すべて去勢済み) と、17 名の飼い主 (20 代~50 代、男性 3 名、女性 14 名) が参加した。これらのイヌは留守中の預かりや社会化などを目的にデイケアに定期的に預けられており、実験場所や他のイヌおよびスタッフに十分慣れていた。涙液量測定はイヌが慣れている獣医師または動物看護師が行い、保定はデイケアの専任スタッフ (以下、スタッフ) が行った。

実験場所

デイケア会場である動物病院 2 階多目的ルーム (3.1m×5.2m) およびしつけ教室多目的ルーム (6.4m×9.8m) で行った。いずれも複数頭のイヌが親和的に過ごしており、イヌとスタッフとの交流も頻繁に行われていた。

実験方法

涙液量の測定は実験 1 と同じくシルマー 1 試験を用いた。測定の際に無理な保定などによる情動の変化を起こさないよう、事前に測定行為への順化を行った。実験時には軽い保定で嫌がらずに測定できるようになっていた。

実験当日、イヌはデイケア会場に飼い主と訪れ、飼い主が去った後に、他のイヌやスタッフと自由に交流するなど慣れた環境下で涙液量を測定した。STT の再測定に必要とされる 2 時間以上の間隔をおいて飼い主と再会させた。再会後は 1 分間程度ふれあってもらった後に涙液量を測定し、分離中と再会後の涙液量を比較した。対照として、他の日に、スタッフに同様の時間をおいて再会させ、涙液量を測定した。再会したスタッフはそれぞれのイヌと顔見知りではあるものの、特別に親和的な関係性のない者とした。飼い主とスタッフの呈示は別の日に行い、呈示順はカウンターバランスをとった。

実験 3) オキシトシン点眼時と合成ペプチド点眼時の涙液量の比較

実験 1 および実験 2 における涙液量の変化にオキシトシンが関わっているかについて調べた。

供試動物および被験者

22 頭のイヌを対象とした (1-13 歳、平均±SD=7.32±3.66) 歳齢、雌が 13 頭 (うち 11 頭が不妊済み)、雄が 9 頭 (すべて去勢済み)。涙液量測定はイヌの慣れた獣医師または動物看護師が行い、保定はスタッフが行った。

実験場所

供試動物が普段通いなれているデイケア会場である動物病院 2 階多目的ルーム (3.1m×5.2m) およびしつけ教室多目的ルーム (6.4m×9.8m) で行った。

実験方法

涙液量の測定は実験 1、2 と同じ方法でシルマー 1 試験を用いた。飼い主から午前中にイヌを預かり、他のイヌや日頃から世話をしているスタッフと自由に交流するなど慣れた環境下で過ごさせた。午後に無処置で STT を実施し、2 時間後に 1 頭につき 20IU のオキシトシン (oxytocin、株式会社ペプチド研究所、大阪、以下 OT) または合成ペプチド (OT と同様の分子量を持つ液体である分子量理論値 1010.18 ペプチドシーケンス NPCQCYGIL 残基数 9A.A.SIGMA-ALDRICH Japan, Tokyo、以下 OS) をイヌの左右の目に点眼した。

OT と OS はそれぞれ生理的食塩水で溶解し、20IU/80 μ l の濃度に調整してマイクロチューブに入れて-20°Cで冷凍保存し、使用時に解凍した。左右の目に点眼するのに十分な液量とするため、解凍後に注射用蒸留水を 3mL のシリンジから 1 滴加えて攪拌した。攪拌した液体を再度 25G の針を付けて吸引し、針を取ってシリンジから直接点眼した。OT または OS を点眼して 5 分後に STT を実施した。1 頭に付き OT と OS の両方を別の日に点眼した。2 度目の点眼は 24 時間以上間隔を空けて行った。22 頭中、11 頭は OT 点眼を先に実施し、残りの 11 頭は OS 点眼を先に実施し、点眼順のカウンターバランスをとった。

統計解析

混合モデル分析を用いて性別間および場面間あるいは処理間で涙液量を比較した。Post-hoc には Bonferroni 法を用いた。結果は平均値 \pm 標準偏差で示した。解析ソフトは SPSS V.24.0 (IBM SPSS,東京) を用いた。

結果

実験 1)

涙液量を従属変数とし、性別、涙液採取タイミングの 2 要因を用いて混合モデル分析を行った。年齢を変量効果として用いた。その結果、涙液採取タイミングに有意な主効果が見られた ($F(1,16) = 8.54, p = 0.01$)。Post-hoc の結果、Reunion 時に有意に上昇していることが分かった ($p = 0.01$) (Fig. 2-1)。

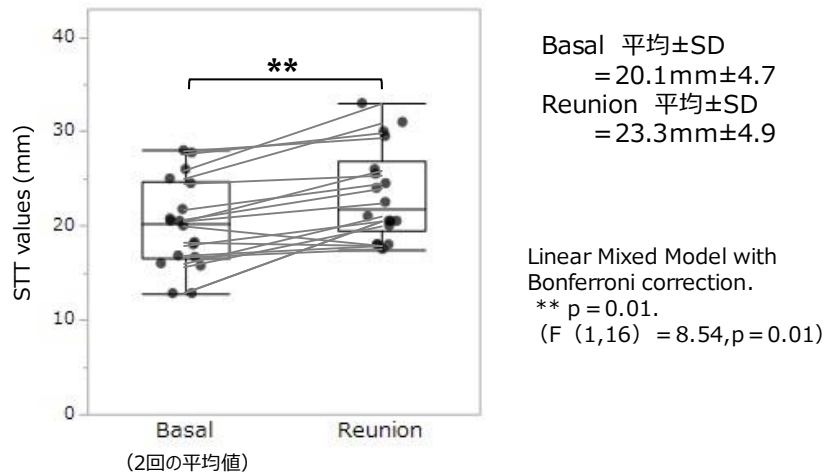


Fig. 2-1. 日常的な場面における飼い主との分離再会場面での涙液量測定
飼い主との再会時 (Reunion) の方が、有意に涙液量が増加した。

実験 2)

涙液量を従属変数とし、性別、再会した人 (Owner、Familiar person)、涙液採取タイミングの3要因を用いて混合モデル分析を行った。年齢を変量効果として用いた。その結果、再会した人、涙液採取タイミングの2要因の間に有意な交互作用が見られた ($F(1,54) = 4.355, p = 0.042$)。Post-hocの結果、Ownerとの再会時に有意な涙液量の上昇が見られた ($p = 0.007$) (Fig. 2-2)。

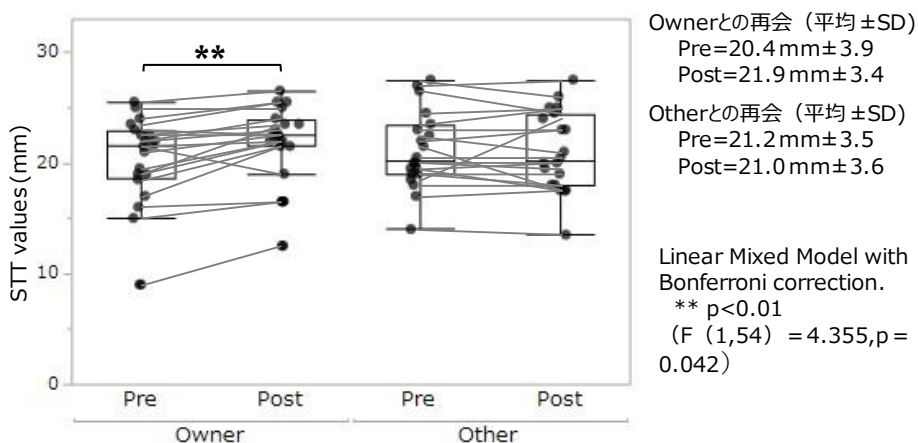


Fig. 2-2. 慣れた場所での飼い主と非飼い主それぞれとの再会場面での涙液量測定
飼い主 (Owner) との再会時のみ、涙液量が有意に増加した。

実験 3)

涙液量を従属変数とし、性別、点眼した液体 (OT、OS)、涙液採取タイミングの 3 要因を用いて混合モデル分析を行った。年齢を変量効果として用いた。その結果、点眼した液体 (OT、OS)、涙液採取タイミングの 2 要因の間に有意な交互作用が見られた ($F(1,60) = 6.574$, $p = 0.013$)。Post-hoc の結果、OT 点眼時に涙液量の有意な上昇が見られた ($p = 0.042$) (Fig. 2-3)。

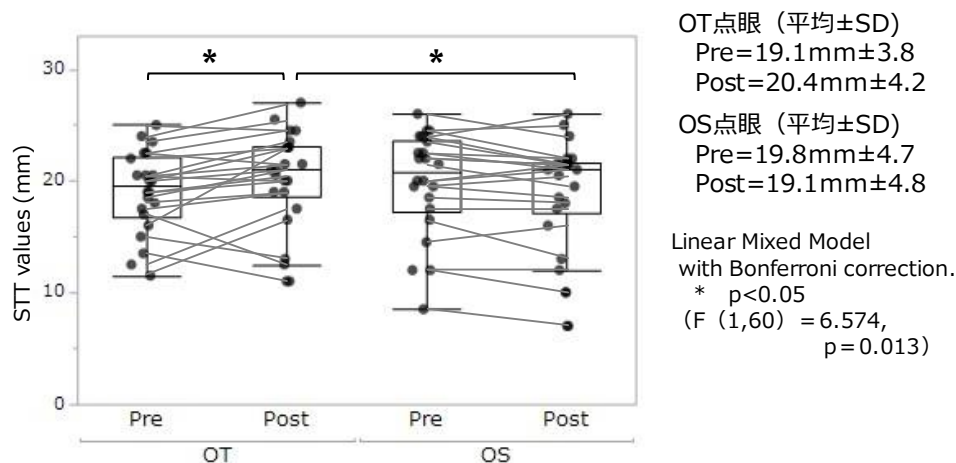


Fig. 2-3. 再会時の涙液量増加とオキシトシンの関連性オキシトシン (OT) を投与した後で、涙液量が有意に増加した。

考察

今回我々の実験では、涙液の増加は他人との再会では認められず、飼い主との再会時のみ認められたことから、飼い主との分離後の再会時のようにイヌの情動が激しく変化する場面において、イヌの涙液の増加が認められることが分かった。またオキシトシンは飼い主とイヌを含む、特別な関係を築く上で、重要なホルモンであると考えられているが、オキシトシンの点眼によって涙液量の増加が認められたことで、飼い主との分離後の再会によるイヌのオキシトシン分泌が上昇したことで涙液量が増加した可能性が示唆された。

実験 1 で Basal の平均 (20.1mm) と Reunion の平均 (23.3mm) では涙液量に 3.2mm の差が認められたが、実験 2 では飼い主との再開場面における Pre の平均 (20.4mm) と Post の平均 (21.9mm) の涙液量の差は有意であったものの 1.5mm と実験 1 に比較して少なく、また、Post における Owner と Familiar person との再会時の涙液量に統計的に有意な差はみられなかった。これは、イヌが飼い主との分離後に自宅で留守番する場合に比較して、デイケアで顔見知りのヒトやイヌと一緒に過ごすことで、飼い主との分離による不快情動が軽

減されたためと考えられる。

ヒトの母子間では乳児が社会的合図として注視を用いることが知られている。乳児が母親を注視する行動は愛着行動であり、母親からの保護行動や養育行動を引き出す効果がある (Bowlby, 1969; Batki et al., 2000)。イヌはヒトとのコミュニケーションにおいて他の動物種に類を見ない進化を遂げた動物であるとされている。ヒトに最も近縁とされるチンパンジーなどの霊長類と比較して、イヌはヒトの視線や指さしなどの社会シグナルを理解する能力がすぐれている。これはイヌがヒトとニッチを共有することで社会的認知能力が高まり、ヒトとのコミュニケーションが可能になったのではないかと考えられている。さらに自力で解決不可能な問題に直面した際にヒトに視線を向けるといった行動をみせる (Hare et al., 2002; Hare & Tomasello, 2005)。また、イヌの注視により飼い主とイヌの交流が始まり、交流後の飼い主の尿中オキシトシンが上昇することも明らかになっている (Nagasawa et al., 2009; Nagasawa et al., 2015)。これらのことから視線はヒト-イヌ間におけるコミュニケーションや絆の形成に重要な役割を持っていると考えられる。イヌはヒトとの共生の歴史が最も長い動物種であり、ヒトと共生する上でより効果的なコミュニケーションをとる必要性があった。ヒト-ヒト間コミュニケーションにおいて何かを要求する場合、要求者の表情や声のトーンは受け手側の反応に影響を与える。コミュニケーションシグナルに発信者の情動状態を示す情報が含まれている場合には、受け手側の情動に影響を与え、望ましい反応を引き出すことが可能となると考えられる。(Hendriks et al., 2008)。本来イヌにとって重要な社会シグナルである嗅覚はヒトでは退化しているうえ、イヌはヒトで特異的に進化した言語を持たないことから、視線を用いたコミュニケーションをヒトに対して特異的に活用する必要性があったのだろう。

情動は原始的な感情でヒト以外の動物にもあり、喜び・悲しみ・怒り・恐怖・驚き・嫌悪などの基本的な情動はヒトと同様にイヌにも存在する。進化生物学の基礎を築いたチャールズ・ダーウィンは「人および動物の表情について (1872年)」で「感情は行動学的に明瞭な形で伝えられ、種の壁を越えてヒトにもイヌの情動が推測できる。これは、こうした行動が進化の過程で自然淘汰を経て保存されてきた生物学的に重要な形質であり、ヒトと動物の連続性を示唆するものである。」と述べているように、ヒト-イヌ間には情動表現における共通点が多く見いだせる。動物において情動に関連した涙の存在は明らかにされていないが、飼い主との別れや再開の場面ではイヌの情動に変化が認められ (Katayama et al., 2016)、またイヌからの注視は飼い主の内分泌を変化させることから (Nagasawa et al., 2015)、飼い主は何らかの情動的シグナルをイヌの視線から受け取っていると考えられる。

ヒトでは情動性の涙は交感神経の緊張を軽減するほか、非言語コミュニケーションツールとしての役割を持つと考えられている。ヒトの社会生活において涙は敵対する相手の寛容性を引き出したり、仲間の援助を求めたりする際に有効であるとされている (Balsters et al., 2013)。また乳幼児が空腹感や痛み、不快感などを親に伝える際にも使われている (Bell & Ainsworth, 1972)。視線を用いたヒトとのコミュニケーション能力を高度に進化させてき

たイヌの涙にも飼い主の保護行動や養育行動を引き起こすような機能があるのかもしれない。

第3章 オキシトシン測定系の確立

緒言

飼い主とイヌは、視線とオキシトシンを介したポジティブループが存在し、それによって絆の形成と維持が促されていると考えられている。オキシトシンは脳下垂体から分泌された後、血液循環を介して標的細胞で作用するが、その後腎臓から排出される。脳内のオキシトシンの活性を測定することが困難なことから、脳下垂体から分泌されたオキシトシンを、抹消にて計測することで、脳内オキシトシンの活性を捉える手法が一般的である。抹消では、血中オキシトシンに加えて、尿中、あるいは唾液中のオキシトシンが測定されるが、実はこのオキシトシン測定 of 正確性や一貫性には大きな疑念が残されており、未だ安定した測定系は少ないのが現状である。これまでイヌやオオカミを対象にした研究では、尿と唾液中のオキシトシン濃度が測定されてきた (Nagasawa et al., 2015; MacLean et al., 2018)。まず、多くの哺乳類の種では、血液サンプルを採取するためには動物を拘束する必要があるものの、尿サンプルは非侵襲的に採取できること、第二に、分泌から代謝までの時間が数分であるオキシトシンは、血液濃度では、その上昇下降が激しいものの、尿中オキシトシン濃度は統合的な値として評価できることが挙げられる。尿中、あるいは血中、唾液中のオキシトシンには、結合タンパク質があることが知られており、一般的にはサンプルから樹脂を用いた抽出操作が必要と言われているものの、抗体によってはその操作なしでも計測ができるものもある。これまでのところ、いくつかの方法論的比較研究では、抽出操作の有無にかかわらず、OT レベルが一致しないことを報告している (Robinson et al., 2014; Szeto et al., 2011; 唾液については、MacLean et al., 2017 を参照のこと; ヒト血漿を用いた異なる抽出方法およびアッセイシステムの比較については、Brandtzaeg et al., 2016 を参照のこと)。このことは、オキシトシンの安定した測定系が確立されていないことを意味する。

これまで本研究室では、福井大学の樋口博士が作成したオキシトシン抗体を用い、RIA 法にて計測を行ってきた。この抗体のオキシトシン感度と特異性は非常に高く、尿や唾液では抽出なしでも計測できること、またラットの血中のオキシトシンでも、抽出後の測定値と未抽出での測定値との間の相関が 0.88 あり、非常に有用な抗体であった。しかし、抗体が枯渇し、これ以上のオキシトシン測定が困難になった。

第2章では、飼い主との再会場面で、イヌの涙液の量が増えることを見出した。またオキシトシンの点眼によっても、涙液量が増加した。このことは、飼い主との再会場面において、イヌが飼い主とのふれあいを介してオキシトシンを分泌し、そのオキシトシンが涙腺のオキシトシン受容体細胞に作用するところで涙液量を増加させたと考えた。そのためには、まず、オキシトシンの安定した測定系が必須となる。そこで本章では本研究室で新たに作成したウサギ抗オキシトシンポリクローナル抗体の有用性とその測定の信頼性を検証した。

手法と結果

抗体の選定

ウサギ抗オキシトシンポリクローナル抗体の作成は株式会社蛋白精製工業に依頼した。作成方法は樋口ら (Higuchi et al., 1985) の方法に準じた。通常の抗体作成と異なり、6ヶ月間の免疫期間を設けた。作成後、通常の IgG カラムでの精製を行った。抗体力価の変化は Fig. 3-1 の通りの報告を受けた。6ヶ月の免疫で高い抗体濃度 (#1, 0.294 mg/mL; #2, 0.314mg/mL; #3, 0.372 mg/mL) を得ることができた。得られた抗体を自治医科大学の神経生理学研究室尾仲達史先生に送付し、RIA による力価を、これまでの抗体と比較してもらい、Fig. 3-2 の結果を得た。

その結果、抗体 #2 はそもそもオキシトシンと結合していないことがわかった。#1 の抗体が最も結合し、樋口博士の抗体に似た変動を示していた。また外注で、オキシトシンとヴァソプレシンの Western Blotting の評価をお願いしたところ、オキシトシンには結合するものの、ヴァソプレシンには結合し無いことが示され、ホルモン特異性も確認された。よって以後は#1 の抗体を用いて検討を実施した。

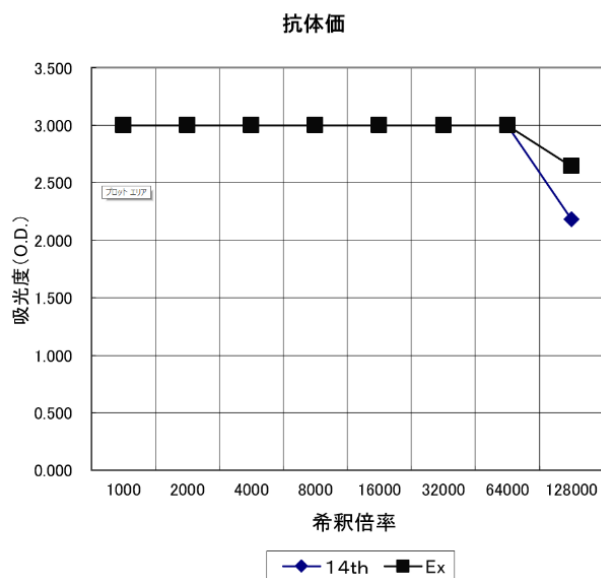


Fig. 3-1. オキシトシン抗体の抗体価検査 (#3 の最終試験)。6ヶ月の免疫後の血中抗体価を吸光度で測定。未抽出 (14th) と抽出後 (Ex)、いずれもで、血漿の 128000 倍希釈まで高い OD 値が得られ、高い抗体濃度であることが分かった。

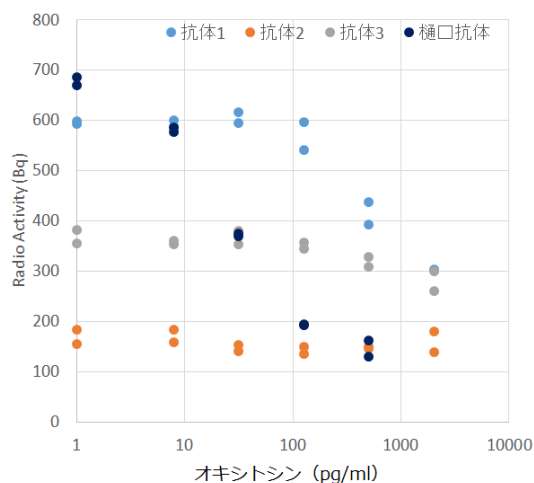


Fig. 3-2. オキシトシン抗体の結合力検査。RIA を用いた競合法を実施した。これまで用いていた樋口博士らの作った抗体では、添加オキシトシンの濃度依存的に放射線量が直線的に低下している。

新抗体を用いた ELISA 法の確立

ELISA 法の確立に関しては、外部企業（株式会社エアープランツ・バイオ、東京都）に受託し、下記の条件で安定した標準曲線を得ることができた。

オキシトシン ELISA（固相法）

【Plate coating】

1. oxytocin (100 μ g/mL) を 1 \times PBS にて 0.1 μ g/mL に希釈
2. 上記 100 μ L のうち、50 μ L をピペット（低吸着）で吸い、そのまま取っておく
3. 遠沈管に残った oxytocin (0.1 μ g/ml) に 1 \times PBS 10ml を加え、よく攪拌する
4. 遠沈管の内容液を捨て、1 \times PBS 10ml とピペットにとっておいた oxytocin (100 μ g/ml) 50 μ L を入れ混和し、最終濃度を 5ng/mL とする
5. プレートに 100 μ L/well で分注
6. 1 時間以上攪拌した後、4 $^{\circ}$ Cにて保管。1 overnight

【Assay day1】

<Blocking>

1. blocking buffer の作成 PBS に tween20 を 1%、skim milk を 5% 添加
2. プレート内の液を捨て 3 回洗浄する。(Plate washer P06/M8)
3. blocking buffer を 200 μ L/well にて分注

- incubation 室温 1 時間以上 (shaking)

<premix reaction for standard/sample>

- 2×anti-OT antibody soln (1/14000) 作成
 - 20%BSA 溶液作成 (PBST10mL, BSA2g)
 - 2×anti-OT antibody を PBS にて 10 倍希釈する (1/10 2×antiOT)
 - ①と②を混和して 2×α-OT soln (1/14000) 作成
- OT 標準液作成 (Oxytocin (100µg/mL) 1µl, PBST500µL, 2×α-OT soln (1/14000) 500µL)
- 希釈用液 (1×α-OT soln) の作成 (これが標準液の MAX/S7 とする)
- スタンダードの作成

OT soln と 1×α-OT soln を使い段階希釈にて standard1~7 を作成
- sample の希釈。 *イヌ尿の場合 DW にて 20 倍希釈

Table 1. Standard の段階希釈

	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7(MAX)
濃度	2000pg/ml	500pg/ml	125pg/ml	31.2pg/ml	7.8pg/ml	1.95pg/ml	0pg/ml
OT soln	6µl						
mixture		75µl	75µl	75µl	75µl	75µl	
1×α-OT	294µl	225µl	225µl	225µl	225µl	225µl	200µl
total	300µl	300µl	300µl	300µl	300µl	300µl	

<分注>

- プレート内の液を捨て 3 回洗浄する。(Plate washer P06/M8)
- スタンダード S1~7 を 100µl/well ずつ分注
- サンプルを 50µl/well ずつ分注
- サンプルを入れた well に 2×α-OT soln を 50µl/well ずつ分注
- NSB に 20%BSA soln 50µl/well + PBST 50µl/well (=10%BSA soln)
- プレートシールにて内容液がこぼれないようにしてアルミホイルに包み overnight incubation

【Assay day2】

1. プレート内の液を捨て 4 回洗浄する。(Plate washer P07/M8)
2. 2nd antibody を 1/3000 に希釈する
3. 100 μ L/well ずつ分注
4. 1 時間 incubation (室温)
5. TMB soln の準備
6. 100 μ L/well ずつ分注
7. incubation 室温 15~20 分
*季節・気温・湿度によって incubation 時間が変化するので注意
8. 反応停止。4N H₂SO₄ を 100 μ L/well ずつ分注し反応 stop (青→黄色に変化)
9. 測定。反応停止後すぐに 450nm のフィルターで測定

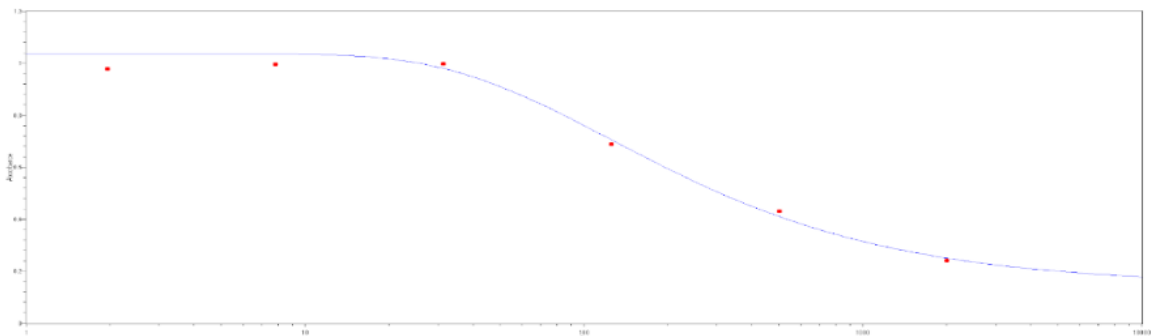


Fig. 3-3. 新オキシトシン抗体を用いた固相 ELISA 法による標準曲線。縦軸が OD 値、横軸がオキシトシン濃度 (Log)。本手法を用いることで、30-2000pg/mL のオキシトシンの測定が可能となった。

本固相法によって、下記の標準曲線が得られた。測定限界は 30pg/mL でこれまでの方法と同等の値となった。次に希釈比率試験と添加回収試験を実施した。希釈比率試験ではイヌ尿を段階希釈し、その理論値と実測値を比較した (Fig. 3-4)。添加回収試験では、希釈した尿に標準オキシトシンを添加し、その理論値と実測値を比較した (Fig. 3-5)。

希釈比率試験

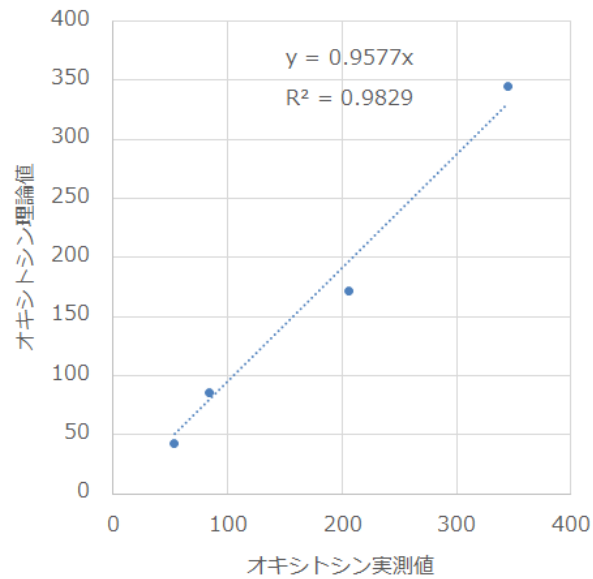


Fig. 3-4. 新オキシトシン抗体を用いた固相 ELISA 法による希釈比率試験。イヌ尿を段階希釈し、その実測値（横軸）と縦軸（理論値）の相関。非常に高い相関が得られた ($y=0.9577x$, $R^2=0.9829$)。

添加回収試験

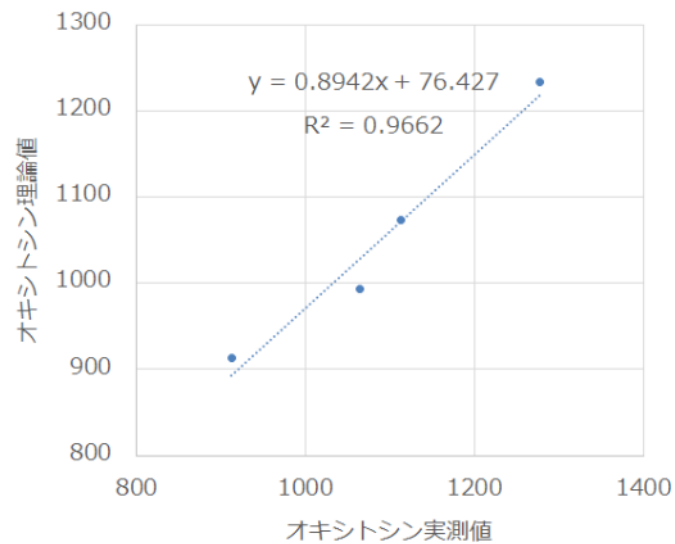


Fig. 3-5. 新オキシトシン抗体を用いた固相 ELISA 法による添加回収試験。希釈したイヌ尿に標準オキシトシンを添加し、その実測値（横軸）と縦軸（理論値）の相関。非常に高い相関が得られた ($y=0.8942x+76.427$,

R²=0.9662)。

その結果、いずれの試験においても理論値と実測値の間に高い相関が認められた。最後に本新規オキシトシン ELISA 法を用いて、これまでの測定法との比較を実施した。サンプルにはイヌの尿を用いた (Fig. 3-6)。

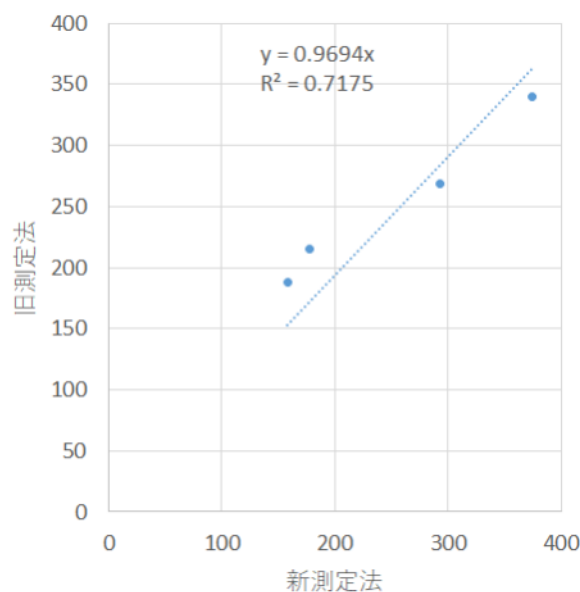


Fig. 3-6. 新オキシトシン固相 ELISA 法と旧 RIA 法による尿サンプルの比較。4つのサンプルを比較したが、非常に高い相関性を得ることができた。

その結果、非常に相関の高い結果 ($y=0.9694x$, $R^2=0.7175$) を得ることができ、少なくともイヌの尿でのオキシトシン測定が可能となった。これらの結果から、有用なオキシトシン ELISA 測定系が確立されたといえよう。

これまでもいくつかの市販のオキシトシン ELISA キットで、尿中のオキシトシンの測定は成功しており、問題は結合タンパク質が多い血中のオキシトシンの測定である。これまでの樋口博士の作られた抗体を用いた RIA では、血中のオキシトシンが安定して測定できることがメリットであり、今回の新 ELISA 法でも同じように血中オキシトシンが測定できた。

しかしながら新オキシトシン固相 ELISA 法と旧 RIA 法による血漿サンプルの比較では相関性を得ることができなかった (Fig. 3-7)。

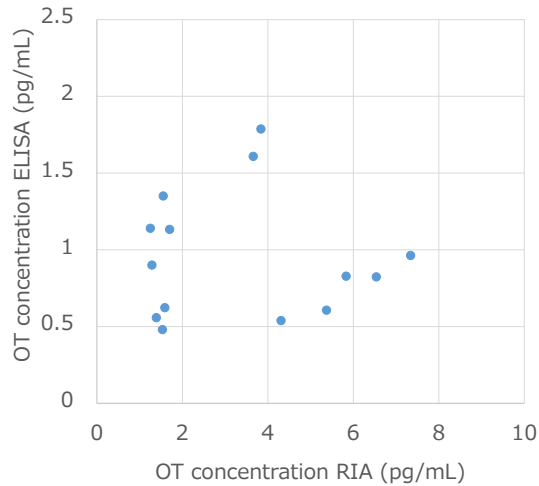


Fig. 3-7. 新オキシトシン固相 ELISA 法と旧 RIA 法による血漿サンプルの比較。相関性を得ることができなかった。

考察

これまで、オキシトシンの測定系はかなり限られており、測定が困難、あるいは測定系によって大きく結果が異なると言われてきた。今回、新たに樋口ら (Higuchi et al., 1985) の手法に準じて抗体を作成し、その抗体の特性を調べた。その結果、高い感度と特異性、さらに添加回収試験でも高い相関性が見いだされ、また旧測定法との比較でもほぼ同等の測定結果が出るなど、新たなオキシトシン抗体の作成とそれを用いたオキシトシン ELISA 法を確立できた。一方、これまで困難と言われてきた血中のオキシトシンに関しては、従来の RIA 法と比較し、相関が得られなかった。このことは、おそらく血中のオキシトシンが結合タンパク質に付着しており、抽出方法や抽出後におけるオキシトシンの立体構造の変化など、未だ明らかにされていないオキシトシンの分子特性によるものと思われる。ここまで努力したものの、血中動態を知ることが困難と判断し、次章の飼い主との再会場面におけるイヌのオキシトシン分泌変化に関しては、従来の RIA 法によって、測定することとした。

第4章 飼い主との再会場面におけるイヌのオキシトシン分泌変化

緒言

げっ歯類の母個体において仔との触れ合いによって得られる接触シグナルは養育行動の維持に最も重要なシグナルである。分娩後に仔を隔離し、母個体と直接接触できないようにしておくことと仔に対する反応性が1週間程度で減少していくことが報告されており、養育行動の維持には、母仔が接触する必要があると示唆されている (Orpen & Fleming, 1987)。とくに乳房への吸入シグナルは乳汁射出を刺激するためにオキシトシンの分泌を増加させるが、このとき分泌されたオキシトシンが中枢神経系に作用し、同時に養育行動の発現も促すことが示唆されている (Neumann et al., 1993)。また、授乳とは直接的な関係はないが、毛づくろいやマッサージなどの接触シグナルでもオキシトシンの分泌が生じることから (Uvnas-Moberg et al., 1993; Agren et al., 1995)、オキシトシンが母仔の接触と高レベルの養育行動の維持を仲介している可能性がある。

興味深いことに、仔が示す愛着行動にもオキシトシンが機能することが示唆されている。たとえば、オキシトシンをラットの幼若個体に投与すると母個体から分離されたときに発声する超音波の発生回数が減少することが報告されており、母個体との接触によるオキシトシンの分泌上昇が仔に安心効果をもたらしているようである (Insel & Winslow, 1991)。このようにオキシトシンは母個体の養育行動と仔の愛着行動の両方を制御することで、状況に応じた母仔の適切な行動発現を調整し、より強固な生物学的絆を形成する要として機能していると考えられる。

このようにオキシトシンは、母性行動の発現と社会認知の双方にとって極めて重要であることが示されてきた。社会認知と絆形成におけるオキシトシンの役割を分離することは困難であるが、オキシトシンの作用によって、母子や雌雄間のパートナーが認識し合い、お互いを結びつけているというのは妥当な解釈であろう。この古い神経ペプチドは、ヒトを含む多様な脊椎動物種に広く保存されている。それゆえ、個体レベルの行動の理解のみならず、進化や動物行動学の観点から絆の形成の生物学的意義を理解するうえで、オキシトシンは極めて興味深く、重要な分子である。

オキシトシンは様々な社会的場面で分泌されることが知られている。例えばヒトの母子のふれあい、父子のふれあい場面で、乳幼児の唾液中オキシトシンが上昇する (Feldman et al., 2010)。イヌでも飼い主がイヌの腹部をゆっくりマッサージするとイヌの尿中オキシトシンが上昇した (Odendaal & Meintjes, 2003)。ラットやマウスでも皮膚接触や子から吸柔刺激など、アタッチメント行動によって母動物のオキシトシン神経系が活性化される。このオキシトシン神経系の活性化は、中枢では庇護行動や母性行動を促す。抹消ではコルチゾールの分泌を抑制し、副交感神経系を活性化させるなど、心身の機能を変化させる。特に抹消での作用の一つとして、涙腺に存在するオキシトシン受容体に作用し、涙液の分布が明らかとなっている (Hawley et al., 2018)。

これらのことから、第2章では、イヌが飼い主と再会する場面において、涙液の上昇を見出した。またオキシトシンの点眼後、イヌの涙液量の増加が会ったこと、先行する Nagasawa et al. (2015) の研究で、飼い主とイヌのふれあいにはオキシトシンを介したポジティブ・ループが存在することから、飼い主との再会場面ではイヌのオキシトシンが上昇し、その結果イヌの涙液量が増加すると仮説を立てた。

材料と方法

動物

5頭のスタンダードプードル（雄3頭雌2頭、9歳±3歳）と1頭のサルーンキ（雌3歳）を使用した。

手順

イヌは飼い主より預かって、実験会場に入室し15分間安静にしたのち最初の涙液量（Tear①）を計測した。さらに5分後に採血（Blood①）し、同時に涙液量（Tear②）を計測した。その後5分して飼い主（Owner）または他人（Other）と再会させ、5分後に採血（Blood②）および涙液量（Tear③）を計測した。その5分後（採血（Blood③）および涙液量（Tear④）を、さらに15分後に採血（Blood④）および涙液量（Tear⑤）を計測した。血液は後肢サフェナ静脈または前肢橈側皮静脈より採血し、採血直後に血液サンプルをアプロチニン入真空管に移し氷冷した。すべてのサンプルを採取後-20°C3500回転15分遠心分離し、分析するまで-80°Cで保存した。

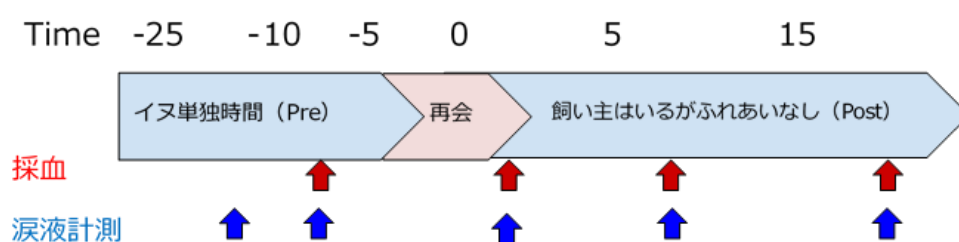


Fig. 4-1. 飼い主との再会場面におけるオキシトシンの変化と涙液の変化測定の実験手順。

涙液測定とオキシトシン測定

涙液の測定には、フェノールレッド系（ゾークイック、昭和薬品化工）を用い、両側の眼窩から測定後、その平均値を用いた。

オキシトシンの測定は、採血管に採取後、3500rpm, 15分で遠心し、血清を自治医科大学神経生理学研究室の尾仲教授へ送付し、RIA法にて測定を依頼した。

結果

涙液量の変化

涙液量には個体差が大きかったため、Preの2ポイントの平均値を基礎分泌量として、再開後の変化の比率を計算した。再会から25分後のTime50ではまったく差が認められなかったため、それを除外し、再会后5分ならびに10分後のデータを、飼い主と見知らぬ人で比較した。一般線形混合モデルで、条件（飼い主、見知らぬ人）、時間を独立変数とし、涙液量の変化を従属変数とした。その結果、条件の主効果が認められた ($F(1,25)=6.008, p<0.05$) (Fig. 4-2)。時間の主効果は有意に至らなかった ($F(1,25)=3.265, p=0.055$)。交互作用も認められなかった。また後検定の結果、再会后10分には、飼い主と見知らぬ人の間で有意差が認められた ($p<0.05$)。

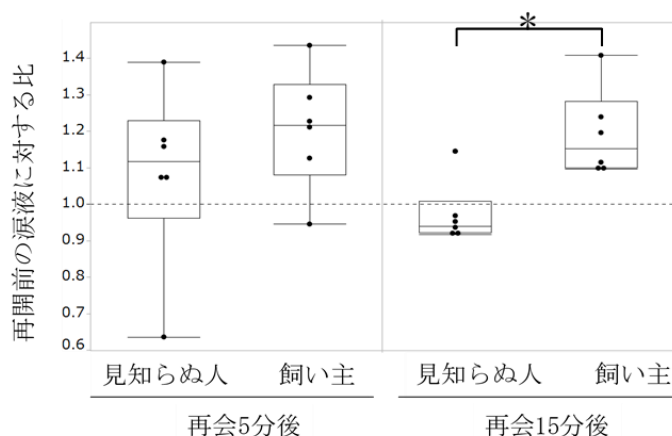


Fig. 4-2. 飼い主との再会后における涙液の変化。飼い主と (fami:青点と実線) と再会すると、見知らぬ人 (unfami:赤点と破線) と比較して涙液量が増加した ($p<0.05$)。

次に血中オキシトシン濃度を比較した。オキシトシン分泌も個体差が大きかったため、再開前の値をPreとしてそこからの比率を計算した。しかし、飼い主と見知らぬ人の条件の効果は認められなかった。また時間の主効果も認められなかった (Fig. 4-3)。

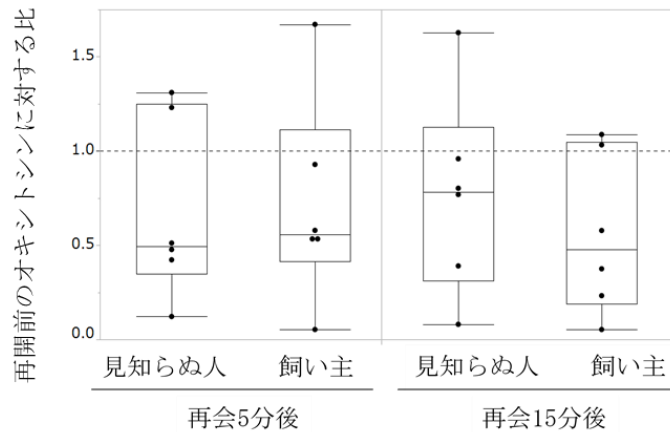


Fig. 4-3. 飼い主との再会場面におけるオキシトシンの変化。飼い主と再会すると、見知らぬ人と比較してオキシトシン分泌に差がなかった。

最後に、オキシトシン値と涙液量の相関を調べた。オキシトシン分泌が多いほど、涙液量が多くなるという正の相関を想定したが、そのような関連性は認められなかった (Fig. 4-4)。

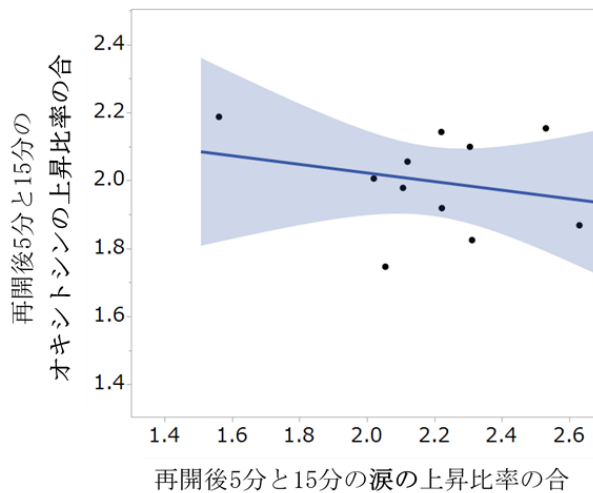


Fig. 4-4. 飼い主との再会場面におけるオキシトシンの変化と涙液量の変化の相関図。飼い主との再会、見知らぬ人とのかかわり、いずれの条件においても相関が得られなかった。比較してオキシトシン分泌に差がなかった。

考察

第2章と同様に、イヌは飼い主との再会場面において涙液量が増加することが分かった。それは見知らぬ人と比較しても高かった。本章では、その場面におけるオキシトシンの増加

の検出を試みたが、残念ながら、そのような結果を得ることができなかった。どちらかというところ、飼い主との再会場面で低下する傾向が見いだされている。この結果からいくつか考察してみる。

まず、今回の涙液量の増加が血中オキシトシンとは無関係に生じたという可能性である。涙液量は涙腺に存在するオキシトシン受容体を介する経路のみならず、副交感神経系や中枢のオキシトシンによって制御されていることが知られている (Dartt, 1994)。今回の飼い主との再会場面では、血中オキシトシンが涙腺に作用する経路とは異なる経路を介しているとしたら、このような結果になったと解釈可能である。そうであったとしても、飼い主との再会場面で、オキシトシンが関与しないかどうかは分からない。オキシトシンの涙液量増加の経路は、中枢の上唾液核に存在するオキシトシン受容体神経細胞によっても、制御される。上唾液核は、唾液腺（顎下腺、舌下腺）を支配する副交感神経の中枢であり、ここから涙腺に投射する副交感神経がオキシトシンの支配を受けている。例えば、上唾液核にオキシトシンを投与すると、涙液量が数時間に及び上昇することが明らかとなっている（私信、未発表データ）。つまり、中枢のオキシトシンの上昇、特に視床下部から上唾液核に至る回路が活性化すれば、血中のオキシトシンを介さずとも涙液量が増加することになる。近年、オキシトシン神経細胞は中枢への投射と脳下垂体からの分泌は異なる細胞が関わることも知られてきたことから（私信、未発表データ）、イヌではこのような回路を検証することは困難であるものの、中枢オキシトシンの作用を介した飼い主との再会場面における涙液量増加のメカニズム解明が待たれる。

またオキシトシン以外にもアセチルコリンなどを副交感神経系の活性化が生じれば、涙液量が増加する (Dartt, 1994)。今回、イヌの自律神経系がどのように変化していたかは不明であるが、オキシトシンを介さない自律神経系の変化を介して涙液量が増加した可能性がある。実際に飼い主とのふれあいでイヌの自律神経系が変化することが知られており (Handlin et al., 2011)、これを介して涙液量が増えたかもしれない。

この先行論文では、飼い主との再会場面において、血中オキシトシンも計測している (Handlin et al., 2011)。それによると、飼い主との再会場面で、イヌの血中オキシトシン濃度はふれあい開始から3分で上昇し、5分後には基礎値に戻っている。このことを考えると、今回の採血がふれあい開始5分後と10分後であったため、血中のオキシトシン上昇を捉えられなかった可能性がある。オキシトシンは脳下垂体から分泌され、全身の血液循環に入るが、半減期が数分であることから、その動態を正確に捉えることが困難である。このことから、より時間分解能を高めた実験を実施することで実際のオキシトシン動態を捉えることができたかもしれない。

今回の実験結果から、明瞭な涙液量増加とオキシトシンの関連性は見いだせなかった。オキシトシンと涙液量の変化に関しては、今後中枢でのオキシトシン変動あるいは、血中の詳細なサンプリングによる、さらなる検証が必要であろう。

第5章 涙液の増加したイヌの眼がヒトに与える影響

緒言

情動性の涙は、その個体内における交感神経の緊張軽減に関わることが知られているが、涙の有無は他個体に対する非言語コミュニケーションの刺激としても働く。例えば涙は敵対する相手の寛容性を引き出したり、仲間の援助を求めたりする際に有効であるとされている (Balsters et al., 2013)。また乳幼児が空腹感や痛み、不快感などを親に伝達する際にも使われる (Bell & Ainsworth, 1972)。

先行研究から、イヌがヒトとのコミュニケーションの際に視線を利用することが明らかとなっている (Miklósi et al., 2003)。またイヌとその飼い主ペアを対象にした研究では、視線を介した交流時間が長いペアで交流後にイヌと飼い主共に尿中オキシトシン濃度が上昇することが報告された (Nagasawa et al., 2015)。これらの知見から、イヌにおいても情動の変化に付随して涙液量などの眼の状態やヒトに向ける視線に何らかの変化が起こる可能性、そしてその変化がヒトへの何らかの情動的シグナルとしての役割を果たしている可能性が考えられる。

そこで本研究では、イヌが涙を呈することによる、社会的な効果、特にヒトへの作用を調べるため、イヌに人工涙液を点眼して顔写真を撮影し、イヌの写真を見たヒトがどのような印象を持つかを調査した。

材料と方法

一般家庭で飼育されている 10 頭の犬を用い写真撮影を行い、74 人のヒト (犬好き) に提示した。イヌたちはあらかじめ人工涙液の点眼に馴化し、不快情動を示さずに点眼を受け入れる個体のみを用いた。

10 頭の犬はそれぞれ日常的に過ごす慣れた場所で、リラックスしている状態で写真撮影を行った。座位にてアイコンタクトを取り写真撮影したもの (涙液なし) とその後人工涙液を左右の目に点眼し同様の姿勢で撮影したもの (涙液あり) を 1 ペアとした (photo 5-1)。7 頭のイヌで 1 ペア、3 頭のイヌで 2 ペアの写真撮影を行い、合計 13 ペアの写真を用意した。75 名の研究参加ボランティアの方々に対して、モニタ上でイヌと無関係なヒトにこれらの写真を提示し、それぞれの写真に対するポジティブ/ネガティブの印象を、以下のような 5 択から選んでもらった。

5 : ポジティブ	かまってほしそう	よろこんでいる
4 :	少しかまってほしそう	少しよろこんでいる
3 : ニュートラル	ふつう	わからない
2 :	少し怖がっている	少し緊張している
1 : ネガティブ	怖がっている	緊張している

(無処置)



(人工涙液点眼後)



(無処置)



(人工涙液点眼後)



Photo 5-1.無処置と人工涙液点眼後の写真

結果

同一犬の2種の写真間において、Wilcoxon signed rank テストを実施し、写真間でヒトの評価が異なるかどうかを検定した。その結果、13枚の写真のペアで実験を行ったうち、7ペアで涙によって印象が有意に ($P < 0.05$) ポジティブとなり、1ペアでネガティブとなり、多くの場合、涙の存在によりイヌのポジティブな印象が上昇することが示唆された。



Fig. 5-1. 涙液の増加したイヌの眼がヒトに与える影響 (n=74)

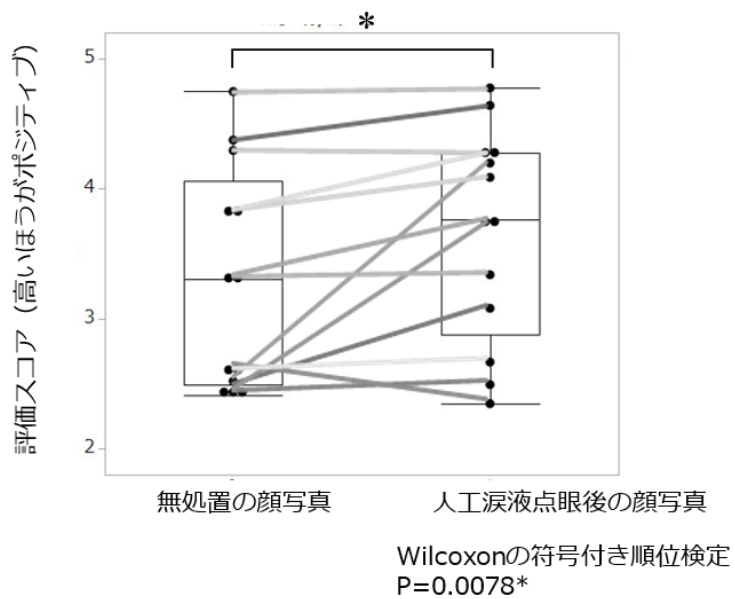


Fig.5-2. 涙液の増加したイヌの眼がヒトに与える影響 (n=74)

考察

人工涙液による目の状態変化がヒトにポジティブな印象を与えることが明らかとなった。このことは、イヌの涙がヒトにとっては、関わりを得る要因となっている可能性を示している。イヌがヒトと出会った場面で、涙を呈すると、ヒトから餌や庇護を得ることができるとすれば、それはイヌがヒト社会に受け入れられる要因となったかもしれない。イヌとオオカミの比較で、眉の内側にある筋に差があり、イヌで特異的に発達していることが知られている (Kaminski et al., 2019)。この部分の筋肉を収縮させると、イヌがヒトを見上げるような様相になり、そのような目の動かし方をするイヌはシェルターでよく譲渡されることから、この筋肉の発達はいヌの家畜化で生じた身体変化の一つであると言われている (Waller et al., 2013)。今回、オオカミでヒトとの再会場面で涙液量が増加するかどうかは不明であるが、オオカミでは認められず、イヌでのみ変化するとすれば、それは家畜化の中で獲得された身体機能と言えるかもしれない。第 4 章ではオキシトシンの涙液量変化に関する検証で仮説に合う結果が得られなかったものの、視線を介したヒトとのやり取りでは、イヌでオキシトシンの上昇が認められたこと、オオカミでは変化がなかったことと合わせると、涙液量の変化もイヌが家畜化の中で獲得した可能性が高いと考える。

ヒトのコミュニケーションにおいても、涙液量が多いことによる効果が知られている。涙液量が多いヒトは瞳の輝きが増え、それがアイコンタクトにもつながることが知られている (Labott et al., 1991)。ヒトは情動の変化により涙液量が増加するが、おそらくこれは視線を用いたヒト-ヒト間のコミュニケーション、特に親和性や協力、慰め行動につながる機能を有していると考えられる。このヒトが獲得してきた視線の機能、特に瞳の輝きを、イヌも同様に示すことで、ヒト-イヌ間の、親和的コミュニケーションが増強したかもしれない。今後、オオカミでの調査、さらには再会場面以外でのイヌの涙液量の計測が実施されることで、イヌがどのように情動変化に伴う涙液量の変化を獲得してきたかが、明らかになると期待される。

第6章 総合考察

第2章では、飼い主との分離後の再会時において、イヌの涙液量の増加が認められた。このことは、イヌが情動性の涙、それも飼い主との再会という快情動場面での涙を呈することが示された。動物における情動性の涙の存在を示した最初の成果となった。

また涙液の増加は他人との再会時には認められず、飼い主との分離後の再会時にのみ涙液量の有意な増加が見られた。涙液の増加はイヌと特別な関係性のある飼い主との分離後の再会のようにイヌの情動が激しく変化する場面において認められることが分かった。

さらにオキシトシンは飼い主とイヌを含む、特別な関係を築く上で、重要なホルモンであると考えられているが (Nagasawa et al., 2012)、オキシトシンの点眼によって涙液量の増加が認められたことから、飼い主との分離後の再会によりイヌのオキシトシン分泌が上昇したことで涙液量が増加した可能性が示された。しかしながら、飼い主との再会場面におけるイヌのオキシトシン上昇、オキシトシンと涙液量の関係性は明らかにできなかった。この研究は、さらにオキシトシン測定精度を高めて実施する必要があると思われた。

第4章では第2章と同様に、イヌは飼い主との再会場面において涙液量が増加することが分かった。それは見知らぬ人と比較しても高かった。しかしながらその場面におけるオキシトシンの増加は認められなかった。オキシトシンは分泌されてから3分で半分が消えるため (Saameli, 1963)、今後は、オキシトシンなどの血中ホルモンを、短い時間軸で計測できる技術の開発が待たれる。またオキシトシンと涙液量の変化に関しては、今後中枢でのオキシトシン変動あるいは、血中の詳細なサンプリングによる、さらなる検証が必要と考えられた。

第5章では、イヌが涙を呈することによる、社会的な効果、特にヒトへの作用を調べるため、イヌに人工涙液を点眼して顔写真を撮影し、イヌの写真を見たヒトがどのような印象を持つかを調査した。同一犬で人工涙液点眼前と点眼後の2種の写真間において、Wilcoxon signed rank テストを実施し、写真間でヒトの評価が異なるかどうかを検定した。その結果、13枚の写真のペアで実験を行ったうち、7ペアで涙によって印象が有意にポジティブとなり、1ペアのみでネガティブとなり、涙の存在によるイヌのポジティブな印象が上昇することが示唆された。

また、人工涙液による目の変化がヒトにポジティブな印象を与えることが明らかとなった。イヌが情動性の涙を呈することは、オオカミでの情動性の涙の存在の確認など追加の検討が必要であるものの、ヒトとの共生において有利に働き、その過程で獲得された機能である可能性が示された。視線を用いたヒトとのコミュニケーション能力を高度に進化させてきたイヌの涙にも飼い主の保護行動や養育行動を引き起こすような機能があるのかもしれない。今後、行動遺伝学的研究と組み合わせることで、さらにイヌとヒトの共生の歴史が紐解かれるかもしれない。

また本来の涙の役割はげっ歯類ではフェロモンであり、ヒトでもフェロモンとして機能

していることが分かっている (Gelstein et al., 2011)。イヌもフェロモンとしての機能を持っている可能性があり、今後イヌの涙がもつ同種間の機能の解明が必要であろう。

本論文の一部は、以下に公表した。

Murata, K., Nagasawa, M., Onaka, T., Takeyama, K., Kikusui, T. Validation of a newly generated oxytocin antibody for enzyme-linked immunosorbent assays. *Journal of Veterinary Medical Science*, 2021 (in press). Doi.org/10.1292/jvms.20-0723.

謝 辞

本研究の実施にあたりご指導とご鞭撻を賜りました介在動物学研究室、菊水健史教授、永澤美保講師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動物行動管理学研究室の植竹勝治教授、伴侶動物学研究室の茂木一孝教授に深く感謝いたします。

引用文献

- Agren, G., Lundeberg, T., Uvnäs-Moberg, K., & Sato, A. (1995). The oxytocin antagonist 1-deamino-2-D-Tyr-(Oet)-4-Thr-8-Orn-oxytocin reverses the increase in the withdrawal response latency to thermal, but not mechanical nociceptive stimuli following oxytocin administration or massage-like stroking in rats. *Neuroscience Letters*, *187*(1), 49–52.
- Ainsworth, M. D. S., Blehar, M., Waters, E., & Wall, S. (1978). *Patterns of attachment*. Hillsdale, NJ: Erlbaum.
- Balsters, M. J. H., Krahmer, E. J., Swerts, M. G. J., & Vingerhoets, A. J. (2013). Emotional tears facilitate the recognition of sadness and the perceived need for social support. *Evolutionary Psychology: An International Journal of Evolutionary Approaches to Psychology and Behavior*, *11*(1), 48–58.
- Batki, A., Baron-Cohen, S., Wheelwright, S., Connellan, J., & Ahluwalia, J. (2000). Is there an innate gaze module? Evidence from human neonates. *Infant Behavior & Development*, *23*(2), 223–229.
- Bell, S. M., & Ainsworth, M. D. (1972). Infant crying and maternal responsiveness. *Child Development*, *43*, 1171–1190.
- Bowlby, J. (1969). *Attachment and loss. Vol. 1, Attachment*. Hogarth London:
- Brandtzaeg, O. K., Johnsen, E., Roberg-Larsen, H., Seip, K. F., MacLean, E. L., Gesquiere, L. R., Leknes, S., Lundanes, E., & Wilson, S. R. (2016). Proteomics tools reveal startlingly high amounts of oxytocin in plasma and serum. *Scientific Reports*, *6*, 31693.
- Dartt, D. A. (1994). Regulation of tear secretion. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, *350*, 1–9.
- DeVries, A. C. (2002). Interaction among social environment, the hypothalamic-pituitary-adrenal axis, and behavior. *Hormones and Behavior*, *41*, 405–413.
- de Waal, F. B. M., & Preston, S. D. (2017). Mammalian empathy: behavioural manifestations and neural basis. *Nature Reviews. Neuroscience*, *18*(8), 498–509.
- Edgar, J. L., Lowe, J. C., Paul, E. S., & Nicol, C. J. (2011). Avian maternal response to chick distress. *Proceedings. Biological Sciences / The Royal Society*, *278*(1721), 3129–3134.

- Feldman, R., Gordon, I., & Zagoory-Sharon, O. (2010). The cross-generation transmission of oxytocin in humans. *Hormones and Behavior*, *58*(4), 669–676.
- Gelstein, S., Yeshurun, Y., Rozenkrantz, L., Shushan, S., Frumin, I., Roth, Y., & Sobel, N. (2011). Human tears contain a chemosignal. *Science*, *331*(6014), 226–230.
- 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. *Anthrozoös*, *24*(3), 301–315.
- Hare, B., Brown, M., Williamson, C., & Tomasello, M. (2002). The domestication of social cognition in dogs. *Science*, *298*(5598), 1634–1636.
- Hare, B., Plyusnina, I., Ignacio, N., Schepina, O., Stepika, A., Wrangham, R., & Trut, L. (2005). Social cognitive evolution in captive foxes is a correlated by-product of experimental domestication. *Current Biology*, *15*(3), 226–230.
- Hare, B., & Tomasello, M. (2005). Human-like social skills in dogs? *Trends in Cognitive Sciences*, *9*(9), 439–444.
- Hawley, D., Tang, X., Zyrianova, T., Shah, M., Janga, S., Letourneau, A., Schicht, M., Paulsen, F., Hamm-Alvarez, S., Makarenkova, H. P., & Zoukhri, D. (2018). Myoepithelial cell-driven acini contraction in response to oxytocin receptor stimulation is impaired in lacrimal glands of Sjögren's syndrome animal models. *Scientific Reports*, *8*, 9919.
- Hendriks, M. C. P., Croon, M. A., & Vingerhoets, A. J. J. M. (2008). Social reactions to adult crying: the help-soliciting function of tears. *The Journal of Social Psychology*, *148*(1), 22–41.
- Higuchi, T., Honda, K., Fukuoka, T., Negoro, H., & Wakabayashi, K. (1985). Release of oxytocin during suckling and parturition in the rat. *The Journal of Endocrinology*, *105*(3), 339–346.
- Insel, T. R., & Winslow, J. T. (1991). Central administration of oxytocin modulates the infant rats response to social isolation. *European Journal of Pharmacology*, *203*(1), 149–152.
- Kaminski, J., Waller, B. M., Diogo, R., Hartstone-Rose, A., & Burrows, A. M. (2019). Evolution of facial muscle anatomy in dogs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *116*(29), 14677–14681.
- Katayama, M., Kubo, T., Mogi, K., Ikeda, K., Nagasawa, M., & Kikusui, T. (2016). Heart rate variability predicts the emotional state in dogs. *Behavioural Processes*, *128*, 108–112.

- Kikusui, T., Winslow, J. T., & Mori, Y. (2006). Social buffering: relief from stress and anxiety. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 361(1476), 2215–2228.
- Kimoto, H., Haga, S., Sato, K., & Touhara, K. (2005). Sex-specific peptides from exocrine glands stimulate mouse vomeronasal sensory neurons. *Nature*, 437(706), 898–901.
- Kubinyi, E., Viranyi, Z., & Miklósi, A. (2007). Comparative social cognition: From wolf and dog to humans. *Comparative Cognition & Behavior Reviews*, 2, pp. 26-46.
- Labott, S. M., Martin, R. B., Eason, P. S., & Berkey, E. Y. (1991). Social reactions to the expression of emotion. *Cognition and Emotion*, 5(5-6), 397–417.
- MacLean, E. L., Gesquiere, L. R., Gee, N., Levy, K., Martin, W. L., & Carter, C. S. (2018). Validation of salivary oxytocin and vasopressin as biomarkers in domestic dogs. *Journal of Neuroscience Methods*, 293, 67–76.
- MacLean, E. L., Gesquiere, L. R., Gee, N. R., Levy, K., Martin, W. L., & Carter, C. S. (2017). Effects of Affiliative Human–Animal Interaction on Dog Salivary and Plasma Oxytocin and Vasopressin. *Frontiers in Psychology*, 8, 1606.
- Miklósi, Á., Kubinyi, E., Topál, J., Gácsi, M., Virányi, Z., & Csányi, V. (2003). A simple reason for a big difference: wolves do not look back at humans, but dogs do. *Current Biology: CB*, 13(9), 763–766.
- Murata, K., Nagasawa, M., Onaka, T., Takeyama, K.-I., & Kikusui, T. (2021). Validation of a newly generated oxytocin antibody for enzyme-linked immunosorbent assays. *The Journal of Veterinary Medical Science / the Japanese Society of Veterinary Science* (in press). <https://doi.org/10.1292/jvms.20-0723>
- Nagasawa, M., Kikusui, T., Onaka, T., & Ohta, M. (2009). Dog's gaze at its owner increases owner's urinary oxytocin during social interaction. *Hormones and Behavior*, 55(3), 434–441.
- Nagasawa, M., Mitsui, S., En, S., Ohtani, N., Ohta, M., Sakuma, Y., Onaka, T., Mogi, K., & Kikusui, T. (2015). Social evolution. Oxytocin-gaze positive loop and the coevolution of human-dog bonds. *Science*, 348(6232), 333–336.
- Nagasawa, M., Okabe, S., Mogi, K., & Kikusui, T. (2012). Oxytocin and mutual communication in mother-infant bonding. *Frontiers in Human Neuroscience*, 6, 31.

- Neumann, I., Russell, J. A., & Landgraf, R. (1993). Oxytocin and vasopressin release within the supraoptic and paraventricular nuclei of pregnant, parturient and lactating rats: a microdialysis study. *Neuroscience*, *53*(1), 65–75.
- Norman, G. J., Cacioppo, J. T., Morris, J. S., Malarkey, W. B., Berntson, G. G., & DeVries, A. C. (2011). Oxytocin increases autonomic cardiac control: moderation by loneliness. *Biological Psychology*, *86*(3), 174–180.
- Odendaal, J. S. J., & Meintjes, R. A. (2003). Neurophysiological correlates of affiliative behaviour between humans and dogs. *Veterinary Journal*, *165*(3), 296–301.
- Orpen, B. G., Gail Orpen, B., & Fleming, A. S. (1987). Experience with pups sustains maternal responding in postpartum rats. In *Physiology & Behavior*, *40*(1), 47–54.
- Peterson-Jones, S. M., & Crispin, S. M. (2002). *BSAVA Manual of Small Animal Ophthalmology*. Wiley.
- Pflugfelder, S. C., & Stern, M. E. (2020). Biological functions of tear film. *Experimental Eye Research*, *197*, 108115.
- Preston, S. D., & de Waal, F. B. (2002). Empathy: Its ultimate and proximate bases. *The Behavioral and Brain Sciences*, *25*(1), 1–71.
- Robinson, K. J., Hazon, N., Lonergan, M., & Pomeroy, P. P. (2014). Validation of an enzyme-linked immunoassay (ELISA) for plasma oxytocin in a novel mammal species reveals potential errors induced by sampling procedure. *Journal of Neuroscience Methods*, *226*, 73–79.
- Romero, T., Nagasawa, M., Mogi, K., Hasegawa, T., & Kikusui, T. (2014). Oxytocin promotes social bonding in dogs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *111*(25), 9085–9090.
- Saameli, K. (1963). An indirect method for the estimation of oxytocin blood concentration and half-life in pregnant women near term. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, *85*, 186–192.
- Szeto, A., McCabe, P. M., Nation, D. A., Tabak, B. A., Rossetti, M. A., McCullough, M. E., Schneiderman, N., & Mendez, A. J. (2011). Evaluation of enzyme immunoassay and radioimmunoassay methods for the measurement of plasma oxytocin. *Psychosomatic Medicine*, *73*(5), 393–400.

- Topál, J., Gácsi, M., Miklósi, Á., Virányi, Z., Kubinyi, E., & Csányi, V. (2005). Attachment to humans: a comparative study on hand-reared wolves and differently socialized dog puppies. *Animal Behaviour*, *70*(6), 1367–1375.
- Topál, J., Miklósi, A., Csányi, V., & Dóka, A. (1998). Attachment behavior in dogs (*Canis familiaris*): a new application of Ainsworth's (1969) Strange Situation Test. *Journal of Comparative Psychology*, *112*(3), 219–229.
- Trut, L. N. (1999). Early Canid Domestication: The Farm-Fox Experiment: Foxes bred for tamability in a 40-year experiment exhibit remarkable transformations that suggest an interplay between behavioral genetics and development. *American Scientist*, *87*(2), 160–169.
- Vilà, C., Savolainen, P., Maldonado, J. E., Amorim, I. R., Rice, J. E., Honeycutt, R. L., Crandall, K. A., Lundeberg, J., & Wayne, R. K. (1997). Multiple and ancient origins of the domestic dog. *Science*, *276*(5319), 1687–1689.
- Waller, B. M., Peirce, K., Caeiro, C. C., Scheider, L., Burrows, A. M., McCune, S., & Kaminski, J. (2013). Paedomorphic facial expressions give dogs a selective advantage. *PloS One*, *8*(12), e82686.
- チャールズ・ダーウィン. (1872). 人及び動物の表情について. 浜中浜太郎訳. 岩波文庫 1931.
- 数井みゆき, & 遠藤利彦. (2005). アタッチメント: 生涯にわたる絆. ミネルヴァ書房.
- 有田秀穂. (2007). 涙とストレス緩和. *日本薬理学雑誌*, *129*(2), 99–103.