

早期離乳ストレスによる動物の異常行動のプロラクチンによる 予防および矯正効果の検討

— 伴侶動物の問題行動の予防と治療への応用を目的として —

Sudies on the effect of prolactin on protection and remedy of unusual behavior
of animals by early weaning stress -Aiming at application to companion animals-

日本獣医生命科学大学応用生命科学部動物科学科 田中 実

Minoru Tanaka, Nippon Veterinary and Life Science University,

Faculty of Applied Life Science, Department of Animal Science

キーワード: プロラクチン、早期離乳、ストレス、異常行動

Keywords : prolactin, early weaning, stress, unusual behavior

1. 目的

高齢化社会となりつつある我が国においては今後ますます犬、猫を初めとする伴侶動物の需要が増加すると考えられる。こうした状況下において、ブリーダーによる早期離乳や飼い主による不適切な扱い等によるストレスのため異常行動をきたす伴侶動物も増加し、その対処法が問題になってきている。しかし、訓練等による動物の異常行動の矯正はきわめて難しく、また、内科治療で用いられる向神経薬は種々の神経作用を引き起こすリスクが高く、依存症が生じやすいため動物福祉の観点から最善の治療法ではない。

動物の行動は神経系だけでなく内分泌系すなわちホルモンによっても制御されている。その中で乳汁分泌促進ホルモンとして知られるプロラクチンは脳神経系にも作用し、母性行動の誘導、ストレス耐性の増強にも働く。この作用はメスだけでなくオスにおいても生じる^{1,2)}。また、プロラクチンは脳下垂体で合成され血液中に分泌された後、乳腺や神経細胞等の標的細胞に存在する受容体を介して遺伝子に作用するため、効果が急激に現れるものではなく、作用を

コントロールすることが容易である。プロラクチンの分泌は授乳期のみならずストレス負荷によっても増大し、分泌量が多いほどストレス耐性が強くなる³⁾。したがってプロラクチンを動物の問題行動の予防および矯正に応用できる可能性が大きい。

本研究ではプロラクチンの脳神経系への作用に着目し、実験動物のラットを用いて、早期離乳ストレスにより引き起こされる成体期の情緒安定性およびストレス耐性の低下に対するプロラクチン投与の予防効果と軽減効果を調べ、伴侶動物の問題行動の予防および矯正へのプロラクチン療法を確立するための基礎知見を得ることを目的とする。

2. ウィスターイマミチラットの行動学的特性の検討

ウィスターイマミチラットは日本獣医畜産大学(現日本獣医生命科学大学)の今道らによって、性質が温順であること、メスの性周期が4日で安定し多産であること等、実験動物として優れた特性を有する系統として、ウィスターラットから選抜して確立された。そこでウィスタ

ウイスターイマミチラットの温順性を行動学的に解析するため、ウイスターラットとウイスターイマミチラットのオープンフィールドにおける移動活動量を比較解析した。オープンフィールド試験は、新奇環境での活動量の評価法として代表的な試験である。写真1にしめしたオープンフィールドのセンターにラットを置き、他区画への移動量を測定したところ、元来の特性としての温順な性質を反映し、ウイスターイマミチラットの活動量はウイスターラットより低かった(図1)。

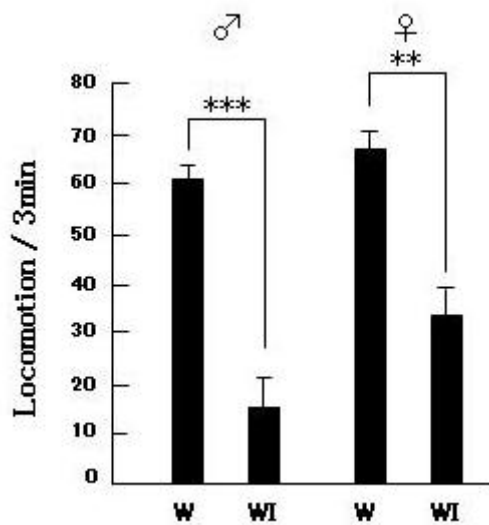


図1 ウイスターイマミチラットのオープンフィールド試験における行動特性 (ウイスターラットとの比較解析)

オープンフィールドでの3分間の移動区画数の平均値で比較 8週齢 N=5 雌は膣垢検査により発情休止期に試験

** : P<0.01 *** : P<0.001 W : ウイスターラット, WI : ウイスターイマミチラット



写真1 オープンフィールド試験装置

3. ウイスターイマミチラットの脳におけるプロラクチン応答性の検討

脳下垂体前葉で産生され血液中に分泌されたプロラクチンは脳の母性行動中枢およびストレス中枢の神経細胞に作用して、母性行動やストレス耐性の誘導にも働く。この時、血中のプロラクチンは脳・血液関門を通過できないため、脳内脈絡叢の上皮細胞に存在するプロラクチン受容体を介して脳脊髄液中に取り込まれた後、脳内の神経細胞に作用する。すなわち脈絡叢におけるプロラクチン受容体の存在量が、脳におけるプロラクチンの感受性に影響する。そこで、ウイスターイマミチラットの脈絡叢におけるプロラクチン受容体遺伝子の発育時期および授乳期における発現量をウイスターラットと比較解析した。受容体遺伝子の発現量すなわち mRNA の産生量はリアルタイム PCR により定量した。

2、4、8週齢の成長段階での脈絡叢における受容体 mRNA 量は、ウイスターイマミチラットではオス、メスともに成長とともに増加し、ウイスターラットでは2週齢に較べて4週齢と8週齢ではやや増加が認められた(図2)。

また、4週齢と8週齢のメスにおける発現量は、ウイスターイマミチラットのほうがウイスターラットよりも約3倍程高い値を示した。一方、成体期における発情休止期と授乳3日目における受容体 mRNA 量は、ウイスターラットでは変化がみられなかったが、ウイスターイマミチラットでは授乳期で増加する傾向が見られ、発現量がいずれの時期においてもウイスターラットよりも数倍高かった(図3)。

したがってウイスターイマミチは脳のプロラクチン感受性が高く、本研究に適した実験動物と考えられる。

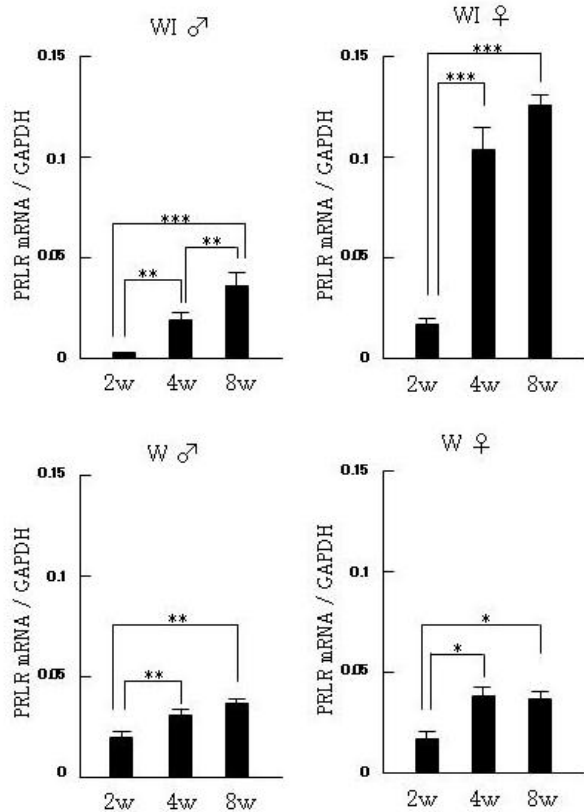


図2 ウィスターイマミチ (WI) とウィスター (W) の脈絡叢におけるプロラクチン受容体 (PRLR) mRNA 発現量の成長に伴う変動

PRLR mRNA 量はクリセルアルデヒド3リン酸脱水素酵素 (GAPDH) mRNA に対する相対値で示した。

* : $P < 0.05$, ** : $P < 0.01$, *** : $P < 0.001$

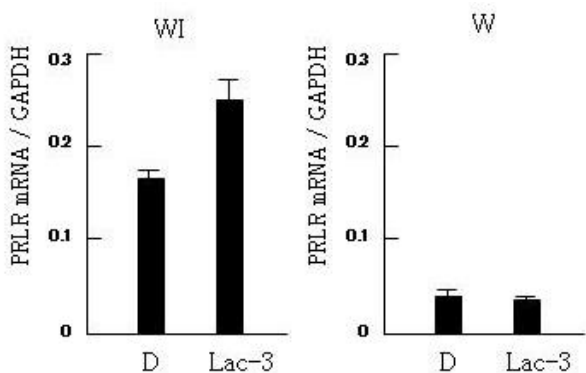


図3 ウィスターイマミチ (WI) とウィスター (W) の脈絡叢におけるプロラクチン受容体 (PRLR) mRNA の発情休止期 (D) と授乳3日間 (Lac-3) における発現量

PRLR mRNA 量はクリセルアルデヒド3リン酸脱水素酵素 (GAPDH) mRNA に対する相対値で示した。

4. 早期離乳が子ラットの成長と成体期の情緒安定性に及ぼす影響

4-1. 早期離乳方法

3匹の母ラットそれぞれに、オスの乳子を8ないし9匹あてがい育てさせた。出生日を0日齢とし、17日齢で各母親より半数の子を離乳し、早期離乳群とした。残る半数は30日齢で離乳し、対照離乳群とした。離乳後は各群ともに単独飼育とし、飼育ケースに設置する給水筒は、長尺の吸い口 (写真2下) を使用し自由給水とした。また、給餌容器を (写真3) を用い、細かく砕いた固形飼料を入れ自由給餌とした。



写真2 早期離乳ラット飼育用 給水筒長尺吸い口 (下)



写真3 早期離乳ラット飼育用 給餌器

4-2. 成長への影響

早期離乳群と対照離乳群の17日齢以後の体重を比較すると、早期離乳群では離乳後2日目と3日目にいったん体重減少が見られるが、その後は対照離乳群と同様に増加し、早期に母乳を断つことによる発育不全など、成長への身体的な影響は見られなかった(図4)。

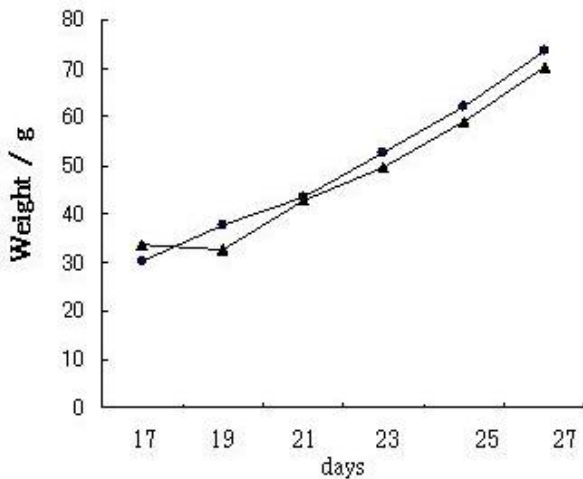


図4 ウィスターイマミチラットの成長過程における体重増加に対する早期離乳の影響

早期離乳群 ▲ N=13, 通常離乳群 ● N=12 の平均値

4-3. 早期離乳が成体期の情緒安定性に及ぼす影響

成長後の早期離乳群において、金属製ケージ蓋に刺した給水筒を引き抜く際の摩擦音に反応し、硬直する現象が見られた。そこで8週齢時において、音を聞かせた後の身体を硬直させている時間を測定した。硬直状態の定義は、頭・身体・四肢等を動かさず、硬直している状態とした。その結果、早期離乳群において13匹中12匹に硬直が見られたのに対し、対通常離乳群では12匹中4匹であった。また、早期離乳群の硬直時間は対照離乳群より数倍長かった(図5)。しかし、ネズミ用音波防除器(株式会社コンパル社製 周波数: 30kHz-65kHz)の音には反応を示さなかった。したがって、早期離乳スト

レスは特定の外部音に対する恐怖心を増大させていると思われる。

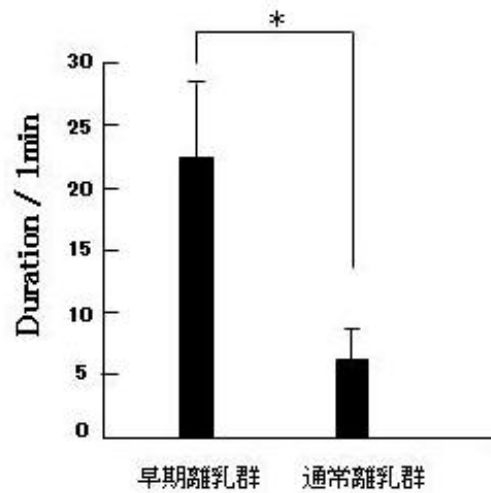


図5 ウィスターイマミチラットの音に対する応答特性

金属製給水筒とケージの摩擦音に対する反応を1分間観察して硬直していた時間を平均値で比較 早期離乳群 N=13, 通常離乳群 N=12

*: P < 0.05

4-4. 高架式十字迷路試験

早期離乳の情緒安定性に及ぼす影響を調べるため、8週齢の両群ラットに対し高架式十字迷路試験を行った。高架式十字迷路試験は、写真4のような高架(高さ60cm)の十字板の一方にガードをとりつけ、中央に置いたラットがガードのないアームあるいはガードのあるアームに移動する回数および滞在時間を測定する試験である。ラット等の動物が本質的に有している探索行動(好奇心)と不安や恐怖が動因となる



写真4 高架式十字迷路試験装置

回避行動の均衡状態を調べる試験であり、不安度が大きいほど安全なガードのあるアームに頻繁にいき、長くとどまる傾向がみられる。図6に示したように、オープンアームへの進入回数には両群に差は認められなかったが、ガードのあるアームへの進入回数は早期離乳群のほうが少なかった。ウイスターラットにおいてはストレス負荷により不安度が増し、ガードのあるアームへの進入回数が増えることが報告されているが⁴⁾、ウイスターイマミチラットでは逆の結果となった。これはウイスターイマミチの低活動性が早期離乳ストレスにより強まったためと考えられる。今後、拘束ストレスを両群ラットに負荷し、ストレス応答性をコルチコステロンとプロラクチンの血液中濃度を指標に調べる予定である。

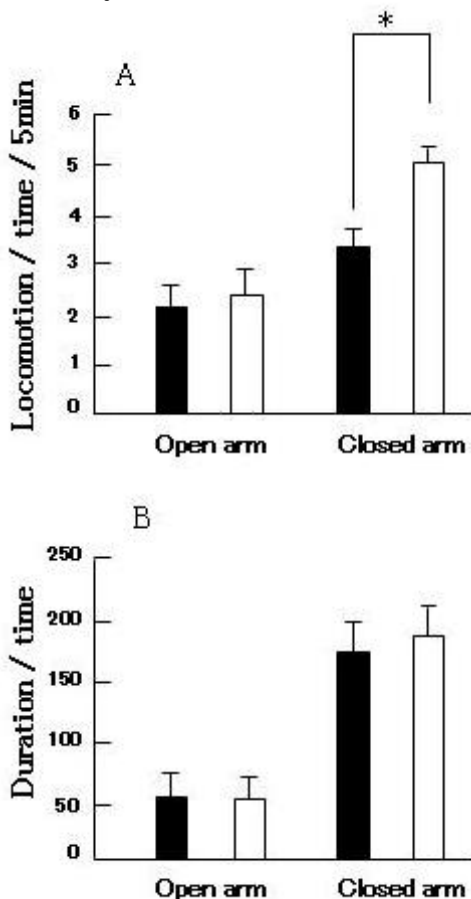


図6 ウイスターイマミチラットの高架式十字迷路試験における早期離乳の影響

8週齢での高架式十字迷路での行動を5分間観察。A: オープンアーム、クローズドアームへの侵入回数 B: オープンアーム、クローズドアームでの滞在時間。■ 早期離乳群 N=13 □ 通常離乳群 N=12 * : P < 0.05

5. これまでの研究の総括と今後の課題

本研究の最終目的は早期母子分離等のストレスによる伴侶動物の問題行動の予防と治療へのプロラクチンの応用の可能性を実験動物で検証することである。犬をはじめとする伴侶動物は気質の温かな種類が選ばれてきており、本研究で用いる実験動物として、性質が温和であり、かつ脳へのプロラクチンの感受性が高いウイスターイマミチラットが適していると考えられる。本実験で行なった早期離乳条件では、離乳直後に一時的な体重増加の減少はみられたもののすぐに回復し、体格の成長には影響がみられなかった。したがって離乳による栄養不良の要因を排除できる離乳方法を確立することが出来た。

早期離乳ストレスにおける行動への影響を調べるための高架式十字迷路試験では、予想とは異なる結果となったが、早期離乳群では音に対して著しく敏感になるという新しい知見が得られた。予定していた、拘束ストレスに対する応答性を、ストレス応答ホルモンであるコルチコステロンとプロラクチンの血液中の分泌量を指標として解析する実験については、すでに早期離乳群と対照離乳群に拘束ストレスを負荷し、血液サンプルを採取済みであり、現在、両ホルモン濃度を測定するための予備試験を行なっているところである。その結果をふまえてさらに目的を達成すべく研究を展開してゆきたい。

6. 参考文献

1. Sakaguchi K, Tanaka M, Ohkubo T, Doh-ura K, Fujikawa T, Sudo S, Nakashima K. Induction of brain prolactin receptor

long-form mRNA expression and maternal behavior in pup-contacted male rats: promotion by prolactin administration and suppression by female contact.

Neuroendocrinology 63, 559-568 (1996).

2. 田中 実、藤川隆彦 中島邦夫 プロラクチンによる哺育行動誘導およびストレス性胃潰瘍予防作用の分子基盤 蛋白質・核酸・酵素 45, 346-354 (2000).

3. Fujikawa T, Soya H, Yoshizato H, Sakaguchi K, Doh-Ura K, Tanaka M, Nakashima K. Restraint stress enhances the gene expression of prolactin receptor long form at the choroid plexus. Endocrinology 136, 5608-5613 (1995).

4. Ito A, Kikusui T, Takeuchi Y, Mori Y. Effects of early weaning on anxiety and autonomic responses to stress in rats. Behav. Brain Res. 171, 87-93 (2006).