— 特 集 —

忌避剤

オオカミ尿由来の恐怖のにおい P-mix が引き起こす エゾシカの忌避・恐怖行動

柏柳 誠, 長田 和実, 宮園 貞治

ニホンオオカミが絶滅してから, 100 年以上が経過している。最後にニホンオオカミが目撃された場所は, 紀伊半島であった。その後, 福岡で目撃情報があったが, 群れをつくるオオカミが単独で行動することが考えられないために野犬ではないかと結論づけられた。本小論は, 絶滅以来 100 年を経過しているためにオオカミに対する怖さを体験していないエゾシカがオオカミ尿由来物質 (P-mix) を忌避するとともに恐怖関連行動を示した研究成果を中心に紹介する。

はじめに

ヒトを含めて, 生物は生まれ持った恐怖の記憶が存在する。たとえば, 多くのヒトはヘビを見るとうす気味悪くなり, 本能的にヘビを避ける行動をとる。幼児に攻撃的なヘビの写真を見せると, 攻撃的な姿勢にないヘビに比べて身構えるように長い時間注視する¹⁾。また, ヒトの幼児は, レモンのような酸味が強い食べ物, あるいは薬のような苦味を有するものを食べることを本能的に避ける²⁾。このような事象は, 攻撃性を有するヘビに噛まれると時として生命の危機につながることで, 酸味がある食べ物は腐った食べ物が乳酸発酵により酸味を呈することや毒性を発揮する物質は苦味を呈することを学習する以前に遺伝的な生得の知識として持っていることを示している。においも同様に本能的な生得の恐怖を引き起こす。我々は, オオカミの尿の中に, シカのような大動物に本能的な恐怖を引き起こす物質 (P-mix) が存在することを見いだした。

1. 害獣による被害と対策

日本ではシカ, イノシシやサルなどの害獣による被害が問題となっている。野生のイノシシやサルが生息していない北海道では, エゾシカによる農林業の被害や JR や道路での事故が深刻な問題となっている。北海道の農林被害額の 90% 以上は, エゾシカに起因している。図 1 は, エゾシカの生息数や各種被害を北海道が発表したデータをもとにまとめたものである。図では示されていないが, 平成 12 年度には 33 万頭だったエゾシカは,

平成 22 年度には 63 万頭にほぼ倍増した。平成 23 年度以降は, 捕獲数が増えたことも要因となり, 推定生息数は減少している。これにともない, 農林被害額は平成 22 年度の 59 億円から減少しているが, それでも平成 26 年度は 45 億円と農林水産業に従事している人々の大きな負担となっている。エゾシカは, 本州以南に生息しているシカと比べて 1.6 倍くらい体重が重く, 体が大きい。このため, JR の列車と衝突すると運行に遅れを生じさせる。また, 自家用車と衝突すると, 時として車を全損させるほどの被害を引き起こす。まれではあるが, 空港に侵入した場合には, 滑走路が閉鎖されるなどの航空機の運航に大きな支障をきたす。平成 22 年度以降に生息数が減っているにもかかわらず, JR や交通事故の発生件数に明確な減少は認められない。平成 25 年 11 月 8 日付けの北海道新聞では, 札幌が含まれる道央地域でのエゾシカとの衝突事故が急増していて, 平均修理額が 40 万円ほどになると紹介していた。

シカの被害を軽減するために, 駆除, 電気柵の設置, 忌避剤の使用などの対策がとられてきた。シカの忌避剤としては様々なものが流通している。腐った全卵を粉あるいは液体に加工したもの, 肉粉とトウガラシを混ぜたもの, 血液を加工したものが用いられてきた³⁾。また, オオカミのような肉食獣の尿が忌避剤として用いられている。平成 25 年 6 月 15 日付けの北海道新聞では, 北海道内の高速道路を管理している東日本高速道路北海道支社のエゾシカの道路侵入に対する取り組みが紹介された。支社では年間数百万円をかけてオオカミ尿を購入し, エゾシカの侵入を予防する目的でオオカミ尿が入ったポ

柏柳 誠 (かしわやなぎ まこと)¹⁾, 長田 和実 (おさだ かずみ)²⁾, 宮園 貞治 (みやぞの さだはる)¹⁾

¹⁾ 旭川医科大学生理学講座神経機能分野 〒078-8510 旭川市緑が丘東 2 条 1-1-1 E-mail : yanagi@asahikawa-med.ac.jp

²⁾ 北海道医療大学歯学部口腔生物学系生理解分野 〒061-0293 北海道石狩郡当別町金沢 1757

図-1 北海道におけるエゾシカの生息状況と被害

北海道発表のデータを使用.

トルを高速道路の柵につり下げられている。次に、オオカミのにおいが忌避剤として注目されるようになった背景を紹介する。

2. オオカミとシカ

オオカミをシカが恐れていることは、生態学者により初めに科学的に示された。オオカミは、それぞれの群れがテリトリーを持って活動している。オオカミが生息している地域では、シカが多く目撃できる場所は、オオカミのテリトリーとテリトリーの境界の領域だった⁴⁾。シカはオオカミを含めてコヨーテやキツネなどの捕食動物の尿や糞のにおいが存在すると好物の葉を食べなくなる⁵⁾。ただし、多くの動物の尿に存在しているアンモニアは効果がなかったので、一般的な尿のにおいならば何でもいいのかではなく、特別なにおいが効果を持っていることが示唆された。

捕食動物が発する被食に恐怖を引き起こすにおいては、被食動物の生存に有益な場合には、カイロモン (kairomone) と呼ばれている⁶⁾。したがって、オオカミの尿の中にシカに恐怖を引き起こすカイロモンが含まれているといえる。同様に、クズリやオオヤマネコの尿もシカに忌避行動を引き起こすことから、オオカミの尿と同様にこれらの尿の中にカイロモンが含まれている⁵⁾。

オオカミの尿は野ウサギの食害を低下させるとともに⁷⁾、ビーバーの通り道の通行を抑制し⁸⁾、ラットの防御行動を引き起こす⁹⁾。あるいは、オオカミの尿と糞は

ウシの警戒を上昇させるために、食料を探す行動を低下させる¹⁰⁾。イエローストーン国立公園に生息するオオカミは、冬の間には子ウシとともにメスウシやオスウシが弱るのでエサとしている。他の季節ではヘラジカ、シカ、枝角カモシカやバイソンとともに齧歯類もエサとしている¹¹⁾。したがって、オオカミ尿に含まれるカイロモンは様々な被食動物に影響をあたえると考えられる。このような捕食動物が被食動物に警戒行動を引き起こす事例は、先述のオオカミ、コヨーテ、キツネ、クズリやオオヤマネコの他にも知られている。たとえば、ディンゴの尿と糞はカンガルーの恐怖行動を引き起こし、餌を探す行動を抑制する¹²⁾。

今までに、オオカミの尿中に含まれる物質の中で、どのような物質がシカに恐怖を引き起こすかについて研究されてきた。3-methyl-3-butenyl sulfide (MBMS) や 3-Isopentenyl methyl sulfide は候補として同定されたが、シカには顕著な効果がみられなかった¹³⁾。また、有効成分が di- (N-alkyl) sulfide である合成 wolf predator odor の wolfin はシカも有効ではなかった¹⁴⁾。オオカミではないが、クーガーの糞に存在し、オコジョやフェレットの肛門線から分泌される p-propyl-1,2-dithiolane (PDT) もシカに効果が見られなかった¹³⁾。小動物に対しては、カイロモンとして機能する物質が見つかった。オコジョやフェレットの肛門線から分泌される 2-propylthietane (PT) と PDT やキツネの尿中に存在する 2,5-dihydro-2,4,5-trimethylthiazole (TMT) は、ハタネズミの忌

避効果を反映するヒトによる捕獲数を減少させる¹³⁾。オコジョやミンクの肛門線から分泌される 2,2-dimethylthietane (DMT) と PDT はスノーシューノウサギの食害を減少させる¹³⁾。

3. 日本のオオカミ

日本のオオカミの絶滅に関しては、Walker により詳しく記述されている¹⁵⁾。日本には、北海道にホッカイドウオオカミと本州、四国および九州にニホンオオカミが生息していた。日本で最後にオオカミが確認されているのは、1905 年に奈良県高見川流域の東吉野で猟師によって殺害されたオスオオカミであった。近年でも日本にオオカミが生息している可能性も報告されている。たとえば、2000 年に北九州市で舌を垂らした中型犬の大きさのオオカミらしい写真が撮影されている。我々が、P-mix の効果を確認した北海道の先住民であるアイヌの人々は、オオカミと神々が祖先と信じていた。アイヌの人々が伝承してきた詩では、オオカミを神とあがめている。

1882 年には北海道開拓使の職員が興味深い報告をしている（図-2）。現在は北見市と合併している常呂で、当時のアイヌの人々はオオカミを飼育していて、エゾシカを狩る時に連れて行っていた。さらに、アイヌの人々は、自分たちが飼育していたアイヌケン（現在はホッカイドウケンと呼ばれている）とオオカミを意図的に交配して自然に繁殖させ、エゾシカの狩猟に用いていた。この報告は、今でもエゾシカがオオカミを恐れている理由を解き明かすことに役立つと思われる。ちなみに、北海道大学の博物館には、ホッカイドウオオカミの剥製が日本で唯一現存している。日本で一般的に飼育されているシバイヌは、アキタイヌと同様に遺伝的にオオカミに近い。オオカミと 85 種の犬種の違いをマイクロサテライト

ト遺伝子座の解析から、シバイヌやアキタイヌは外見がオオカミに近いシベリアンハスキーやアラスカンマラミュートよりもオオカミに近いと報告されている¹⁶⁾。

4. オオカミ尿に含まれる生得的な恐怖誘起物質 P-mix の同定と作用

4.1 P-mix 同定のきっかけ

筆者はフィールドでの研究を専門としていないので、オオカミの尿が忌避効果を有するかどうかを調べるためには、一般的な生理学で使われる実験室での実験が可能な系を確立することが必要となる。そこで、まず、マウスがモデル動物として活用できるかどうかを調べた。予備実験として、紙製の床敷きにオオカミ尿を噴霧したケージとマウス尿を噴霧したケージを準備して、5 匹のマウスをそれぞれのケージに入れてマウスの行動を観察した。すると、オオカミ尿を噴霧したケージでは、マウスは怯えたように中央に身を寄せ合って動かなかった。一方、マウスの尿を塗布したケージでは、いつもと同じように自由に動き回っていた。

当時は身を寄せ合うことだけに注目していたが、後にマウスが動かなかった行動は不動と呼ばれる恐怖により引き起こされることがわかった。また、予備実験だったために 5 匹を一つのケージに入れて観察したが、ラットで見つけられているような警報フェロモンをマウスも放出しているために、より顕著な効果が見られたことも考慮する必要があることもわかった。ただし、警報フェロモンを分泌したにしても、そのきっかけとなる恐怖をオオカミ尿により感じたことは間違いない。

恐怖誘起効果を持つにおいては、主嗅覚系と鋤鼻系を活性化する。主嗅覚系を介するにおいの場合には、一次中枢である嗅球の中でにおい地図の中の限られた領域の神

図-2 P-mix の実験に関わる北海道内の位置

図-3 強いカイロモン作用を有するオオカミ尿に含まれているピラジン誘導体

経しか活性化しない可能性が考えられた。一方、鋤鼻系の一次中枢は副嗅球で主嗅球と比べて大きさが小さいので解析することが容易である。そこで、これも予備実験として、鋤鼻系に注目して実験を行った。先述のオオカミ尿を暴露したマウスの脳を摘出して、鋤鼻系の一次中枢である副嗅球での神経興奮の指標となる c-Fos の発現を免疫組織化学的に解析した。すると、コントロールとしてマウスの尿を暴露したときと比べて、顕著な c-Fos の発現を認めた。この結果は、オオカミ尿の中に鋤鼻系の神経経路を介してオオカミ尿に由来する恐怖情報が伝達されることを示した。また、マウスがオオカミ尿に含まれる恐怖誘起物質を同定する上で、優れたモデル動物となることがわかった。

4.2 P-mix の同定

オオカミ尿は市販されているが、害獣の忌避に有効であるという評価と効果が見られないという評価が併存している。オオカミ尿は、ロットごとに色やにおいがかなり異なる。あるロットでは透き通っていてにおいが弱い、他のロットでは黒く濁っていてタマネギのようなにおいが強いような違いがある。そこで、入手時期が異なる3つのロットのオオカミ尿サンプルのマウスに対する作用の違いを検討した¹⁷⁾。採取した日が2009年12月、2010年2月、2010年4月と異なる3つのロットの尿をそれぞれA、B、Cと命名し、Y字迷路で忌避誘起作用を調べた。その結果、サンプルAとBに比べてサンプルCは強い忌避を引き起こした。また、恐怖作用の不動時間を調べたところ、サンプルCが長い時間不動を引き起こした。さらに、副嗅球の神経興奮を調べたところ、同様にサンプルCが強い鋤鼻系の興奮誘起作用を有していた。

3つのサンプルに含まれる成分をGC-MSを用いて分析した結果、サンプルCにはピラジン誘導体である(2,6-dimethyl pyrazine; DMP, trimethyl pyrazine; TMP, 3-ethyl-2,5-dimethyl pyrazine; EDMP)が高濃度で含有されていることが判明した(図-3)。その後の

解析により、5-methyl-2,3-diethyl pyrazine も高濃度で含まれていることがわかった(未発表)。

筆者らは、工業的に合成されたDMP、TMPおよびEDMPの3種のピラジン誘導体の混合液をオオカミ尿(Wolf Pee)とピラジン(Pyrazine)誘導体のPに由来するP-mixと名付けた。P-mixは、カイロモン的一种である。マウスはP-mixに対して、忌避行動を示す。また、P-mixはオオカミ尿と同様に不動を引き起こすとともに鋤鼻系の一次中枢の副嗅球でも神経の興奮を引き起こす。マウスにP-mixを構成するピラジン誘導体を個別に呈示すると、忌避や不動を引き起こしたが、P-mixの方がより強い恐怖誘起効果を有していた。

先に述べたように、ラットではオオカミ尿が防御反応を引き起こすことが知られていた⁹⁾。P-mixは、マウスよりも体が20倍近く大きいラットにも忌避と不動を引き起こす(未発表)。同時に、恐怖の脳内伝導経路として知られている、副嗅球、扁桃体内側核および視床下部腹内側核の神経の興奮を引き起こす(未発表)。

5. P-mix に対するエゾシカ忌避および恐怖関連行動

P-mixのエゾシカへの効果の検証を行った西興部村は、旭川から120kmの距離で、車で2時間ほど行くことができる(図-2)。村の周りには山に囲まれていて、実験場所のエゾシカの牧場の周りにも野生のエゾシカを多く見ることができる。西興部村では、1990年に西興部村養鹿研究会が発足して、エゾシカを村おこしに役立てようと活動を続けてきた。P-mixのエゾシカに対する作用の検証は、養鹿研究会の承認をうけ、研究会の田尾忠夫さんの協力のもとに行った¹⁸⁾。

30頭を超えるエゾシカは、9haにおよぶ十分に自由な行動が確保されているエゾシカ牧場で飼育されている。通常は自生している草木を摂取しているが、栄養不足を予防する目的で乾燥トウモロコシなどの飼料も必要に応じて与えられている。そのため、エゾシカは実験に用いた乾燥トウモロコシに慣れているだけではなく、乾燥トウモロコシを好んで食べる傾向が見られる。フィールドでにおいに関する実験を行うときには、風が吹いていると不都合である。そこで、実験は快晴で無風の日を選び、8月と9月にエゾシカ牧場内草地で行った。

1.8m四方の4枚のビニールシートを3mおきに設置し、それぞれのシートの中央に乾燥トウモロコシを置いた(図-4)。におい棒は直径2.5cm、長さ25cmの両端に蓋をした金属製で、P-mixのにおい成分が拡散するように穴を空けた。2枚のシートの四隅には2mlのP-mixを入れたにおい棒を、2枚のシートにはP-mixを入れないにおい棒を置き、エゾシカの行動をビデオカメラで記録し、解析した。その結果、図のようにP-mixが存在

しない中央の2枚のシートにはエゾシカが多く集まり、乾燥トウモロコシを食べていた。一方、両端のP-mixが存在するシートには、好物の乾燥トウモロコシが存在するにもかかわらずエゾシカはあまり近づかなかった。ビデオを定量的に解析したところ、P-mixを設置したシートでトウモロコシを食べているエゾシカの数、設置していないシートと比べて統計的に有意に少なかった。また、個々のエゾシカの行動を解析したところ、エゾシカがP-mixを設置したシートに接近する頻度は低く、接近している時間も短かった。これらの結果は、エゾシカが何らかの理由でP-mixを忌避することを示した。

エゾシカがP-mixを忌避した原因が、オオカミに対する恐怖を覚えて忌避したのではなく、嗅いだ経験がないP-mixのにおいに対して単に警戒したことが原因である可能性が考えられた。たとえば、ラットにキツネ由来のTMTと不快臭を有する酪酸を呈示するとどちらに対しても忌避行動を引き起こす。しかしながら、TMTは不動を引き起こすが、酪酸は不動を引き起こさない¹⁹⁾。

図-4 西興部村で行われたP-mixのエゾシカへの効果の検証

そこで、シカで知られている天敵が誘起する恐怖関連行動が、P-mixにより引き起こされるか否かを検討した(図-5)。

Flag-tailと呼ばれるシカの尾立て(図-5A)は、仲間に視覚的に危険を知らせる行動であるとされている。P-mixを設置したシートに近づいたエゾシカは、設置していないシートと比べて、尾立てを示す個体がオスでもメスでも多く存在した。また、シカがシートに近づくと即座に頭を翻してシートから立ち去る行動(図-5B)は、メスでもオスでもP-mixを設置したシートでは多く見られた。ただし、メスの方がより顕著に観察された。シート付近で飛び跳ねる行動(図-5C)は、オスではあまり見られなかった。しかし、メスでは、P-mixを設置したシートでは、P-mixを設置していないシートよりも回数が顕著に多かった。これらの結果は、エゾシカがP-mixを忌避したのは、シカにとって未知のにおいが存在していたためだけではなく、恐怖を誘発するにおいが存在していたためであることを示した。また、P-mixに対する恐怖関連行動が、オスよりもメスでより顕著であることも示された。

本実験は、同じエゾシカの集団を対象として、8月と9月に2回行った。害獣対策に捕食動物の糞尿が忌避剤として用いられているが、慣れが生じるために効果が持続しないことが問題となっている。8月に行った実験では、一匹あたりのシートへの侵入時間は、オス・メスともP-mixが存在するシートでは短くなった(図-6)。9月に行った実験でも8月に行った実験と同様に、P-mixが存在するシートへの侵入時間が短かった。侵入回数も8月と9月でオス・メスを問わず、P-mixが存在するシートでは少なくなっていた。統計的に解析を行ったところ、侵入時間および侵入回数のどちらも8月と9月で有意な

図-5 P-mix がエゾシカに引き起こした恐怖行動

白いカラム：P-mix 無し，黒いカラム：P-mix 有り

図-6 P-mix がエゾシカに引き起こした再現性のあるカイロモン効果

白いカラム：P-mix 無し，黒いカラム：P-mix 有り

違いが認められなかった。図には示していないが、尾立て、逃避行動および飛び跳ね行動などの恐怖関連行動でも、8月と9月で違いが認められなかった。このように、一度 P-mix を嗅いだエゾシカが P-mix のにおいに慣れてしまうことはなく、一ヶ月後にもう一度嗅いだときにも忌避および恐怖関連行動を示した。

現在、マウスやラットを用いて P-mix に対する忌避や恐怖行動の慣れをさらに詳細に検討している。マウスやラットでは、毎日 P-mix を呈示しても、あるいは、毎週 P-mix を呈示しても忌避や恐怖行動を引き起こすことを示す結果が得られている（未発表）。

今までに報告されているカイロモンの作用では、慣れが報告されている。たとえば、TMT によるラットの血漿中のコルチコステロン濃度の上昇や前頭前皮質と扁桃体のドーパミン代謝の亢進が、2 日後に TMT で再刺激しても見られない²⁰⁾。また、ネコのにおいに対しても連日暴露されると、ラットが怖がって物陰に隠れる行動が見られなくなる²¹⁾。また、ビーバーは PT と PDT を忌避するが、すぐにこれらのにおいに慣れてしまう¹³⁾。従って、以前に報告されていたカイロモンと比べて、P-mix が引き起こす忌避および恐怖誘起効果には慣れが生じにくい可能性が考えられる。

終わりに

オオカミ尿に含まれる恐怖誘発物質に関する研究は、2009 年に始まった。筆頭著者が、旭川で日本味と匂学会を開催したときに特別講演をお願いした旭山動物園の板東元園長の内容がきっかけとなった。園長は、オオカミ尿が北米ではシカなどの害獣の忌避剤として使われていることを話してくれた。大会後、即座にオオカミ尿を購入し、数匹のマウスにオオカミ尿を呈示したところ、マウスは恐怖でケージの中央で身を寄せ合って動かなくなった。さらに、恐怖情報の伝導路の一つである副嗅球において神経が興奮することを確認した。そこで、生理活性を有するにおい成分の分析のエキスパートである共

同著者の長田和実先生と共同研究を開始し、P-mix が強い恐怖誘発効果を有することを見いだした。さらに、P-mix のエゾシカへの効果の検証には宮園貞治助教が加わり、彼の丹念なビデオ解析から P-mix がエゾシカに恐怖関連行動を引き起こすことを明らかにした。エゾシカに対する効果を検証した西興部村は、オホーツク海にほど近く、開拓使の職員がアイヌの人々がエゾシカ狩りにオオカミを伴っていたことを目撃した常呂とはさほど離れていない（図-2）。北海道では、駆除したエゾシカをジビエの食材として有効に活用している。西興部村のレストラン森夢でも、エゾシカ料理を楽しむことができる。

キーワード：恐怖、オオカミ、エゾシカ、忌避剤、P-mix

参考文献

- 1) N. Masataka, S. Hayakawa, and N. Kawai: Human young children as well as adults demonstrate 'superior' rapid snake detection when typical striking posture is displayed by the snake. *PLoS. ONE.*, **5** (11), e15122, (2010).
- 2) A. A. Bachmanov and G. K. Beauchamp: Taste receptor genes. *Annu. Rev. Nutr.*, **27**, 389-414, (2007).
- 3) Nuisance wildlife repellent handbook. http://files.dnr.state.mn.us/assistance/backyard/livingwith_wildlife/repellent_handbook.pdf. 2013.
- 4) L. L. Rogers, L. D. Mech, D. K. Dawson, J. M. Peek, and M. Korb: Deer distribution in relation to wolf pack territory edges. Anonymous. Anonymous, *J. Wild Manage.*, **41**, 253-258, (1980).
- 5) T. P. Sullivan, L. O. Nordstrom, and D. S. Sullivan. Use of predator odors as repellents to reduce feeding damage by herbivores. II. Black-tailed deer (*Odocoileus hemionus columbianus*), *J. Chem. Ecol.*, **11**, 921-935, (1985).
- 6) K. Osada, S. Miyazono, and M. Kashiwayanagi: The scent of wolves: pyrazine analogs induce avoidance and vigilance behaviors in prey, *Front. Neurosci.*, **9**, 363, (2015).
- 7) T. P. Sullivan, L. O. Nordstrom, and D. S. Sullivan: Use of predator odors as repellents to reduce feeding damage by herbivores. I. Snowshoe Hares (*Lepus americanus*), *J. Chem. Ecol.*, **11**, 903-919, (1985).
- 8) W. J. Severud, J. L. Belant, J. G. Bruggink, and S. K. Windels: Predator cues reduce American beaver use of foraging trails, *Human-Wildlife Interaction*, **5**, 296-305, (2011).
- 9) M. Fendt: Exposure to urine of canids and felids, but not of herbivores, induces defensive behavior in laboratory rats, *J. Chem. Ecol.*, **32** (12), 2617-2627, (2006).
- 10) B. M. Kluever, L. D. Howery, S. W. Breck, and D. L. Bergman: Predator and heterospecific stimuli alter behaviour in cattle, *Behav. Processes*, **81** (1), 85-91, (2009).
- 11) D. R. Stahler, D. W. Smith, and D. S. Guernsey: Foraging and feeding ecology of the gray wolf (*Canis lupus*):

- lessons from Yellowstone National Park, Wyoming, USA., *J. Nutr.*, **136** (7 Suppl), 1923S-1926S, (2006).
- 12) M. H. Parsons and D. T. Blumstein: Familiarity breeds contempt : kangaroos persistently avoid areas with experimentally deployed dingo scents, *PLoS. ONE.*, **5** (5), e10403, (2010).
 - 13) P. M. F. Lindgren, T. P. Sullivan, and D. R. Crump: (1995), Review of synthetic predator odor semiochemicals as repellents for wildlife management in the Pacific Northwest. In: USDA National Wildlife Research Center Repellents Conference 1995, edited by J. R. Mason, p 217-230.
 - 14) D. L. Nolte, L. A. Shipley, and K. K. Wagner: Efficacy of wolfin to repel Black-tailed deer. *West. J. Appl. For.*, **16**, 182-186, (2001).
 - 15) B. L. Walker: *The lost wolves of Japan*, Seattle: University of Washington Press, (2005).
 - 16) H. G. Parker, L. V. Kim, N. B. Sutter, S. Carlson, T. D. Lorentzen, T. B. Malek, G. S. Johnson, H. B. DeFrance, E. A. Ostrander, and L. Kruglyak: Genetic structure of the purebred domestic dog, *Science*, **304** (5674): 1160-1164, (2004).
 - 17) K. Osada, K. Kurihara, H. Izumi, and M. Kashiwayanagi: Pyrazine analogues are active components of wolf urine that induce avoidance and freezing behaviours in mice, *PLoS. ONE.*, **8** (4), e61753, (2013).
 - 18) K. Osada, S. Miyazono, and M. Kashiwayanagi: Pyrazine analogs are active components of wolf urine that induce avoidance and fear-related behaviors in deer, *Front. Behav. Neurosci.*, **8**, 276, (2014).
 - 19) T. Endres and M. Fendt: Aversion- vs fear-inducing properties of 2,4,5-trimethyl-3-thiazoline, a component of fox odor, in comparison with those of butyric acid, *J. Exp. Biol.*, **212** (Pt 15), 2324-2327, (2009).
 - 20) B. A. Morrow, R. H. Roth, and J. D. Elsworth: TMT, a predator odor, elevates mesoprefrontal dopamine metabolic activity and disrupts short-term working memory in the rat, *Brain Res. Bull.*, **52** (6), 519-523, (2000).
 - 21) R. A. Dielenberg and I. S. McGregor: Habituation of the hiding response to cat odor in rats (*Rattus norvegicus*), *J. Comp. Psychol.*, **113** (4): 376-387, (1999).

P-mix originated from wolf urine induced avoidance and fear-related behaviors in Hokkaido deer

Makoto KASHIWAYANAGI¹⁾, Kazumi OSADA²⁾ and Sadaharu MIYAZONO¹⁾

¹⁾ Department of Sensory Physiology, Asahikawa Medical University,
Asahikawa, Hokkaido, 078-8510, Japan

²⁾ Division of Physiology, Department of Oral Biology, School of Dentistry, Health Sciences University of Hokkaido,
Ishikari-Tobetsu, Hokkaido, 061-0293, Japan

Abstract The final confirmation of Japanese wolf was in 1905 at Nara prefecture. We explored the effects of the cocktail of pyrazine analogues (P-mix), originated from wolf urine, on Hokkaido deer in field bioassays at a deer park in Nishiokoppe, Hokkaido, Japan. P-mix odour effectively suppressed the approach of the deer to the feeding area. In addition, P-mix odour provoked fearful behaviours, such as 'flight' and 'jump' actions, of the deer around the feeding area in a sex-specific manner. These results suggest that P-mix odor induces innate fear in deer. Our study is the first experimental demonstration that the pyrazine analogues in wolf urine have robust and continual aversive effects on ungulates. P-mix might be suitable for a repellent reducing damage to forests and agricultural crops by deer.

Key words : fear, wolf, deer, repellent, P-mix