

平成 30 年 5 月 25 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K14567

研究課題名(和文)動物搭載型採血口ガーを用いたアザラシの水中代謝調節機構の解明

研究課題名(英文)An animal-borne blood sampler to understand endocrinal mechanism of dive response in submerged phocid seals

研究代表者

鈴木 一平 (SUZUKI, Ippei)

北海道大学・北方生物圏フィールド科学センター・学術研究員

研究者番号：50727097

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文):本研究では、新たに開発した動物搭載型採血装置を用いることで、アザラシの水中代謝調節機構を解明することを目的とした。セントアンドリュース大学(スコットランド)の海棲哺乳類研究部門にて飼育されているアザラシを用いて実験を行い、陸上および水中にて得られた血液サンプルから循環および代謝調節ホルモンの動態を比較した。その結果、アザラシは陸生哺乳類と鯨類の中間となる反応を示し、水中での捕食では血圧調整に関与するホルモンの変動が見られなかった。潜水動物は、保有酸素を水中で効率よく使用するための生理反応を持つと考えられていたが、本研究では、その機構となるホルモン分泌量の定量化を世界で初めて可能にした。

研究成果の概要(英文):This research aimed to understand the endocrinal mechanism of dive response in submerged phocid seals using a newly developed animal-borne blood sampling device. Pool experiments were conducted using captive seals at the Sea Mammal Research Units (Scotland). Blood samples were obtained during conditions when animals were both on land and underwater. Effects of buoyant support and underwater feeding on cardiovascular hormones were compared between the conditions on land and in water, and the conditions with and without feeding, respectively. The response to buoyant support showed similar hormonal changes to decrease blood pressure as same as terrestrial mammals, but the degree of the changes was less. However, feeding in the water did not affect hormone secretions to change blood pressure unlike terrestrial mammals, which suggested phocid seals delayed the digestion to save oxygen in the water. These were the first findings to show quantitative hormonal data from free-swimming animals.

研究分野：動物生理学

キーワード：動物生理学 アザラシ 潜水生理学 潜水動物 循環調節ホルモン 代謝調節ホルモン 鰭脚類 バイオロギング

1. 研究開始当初の背景

既往研究によって、潜水動物は、体内の限られた保有酸素を水中で効率よく使用するために、遊泳時に必要な器官以外への血流を制限し、心拍数を低下させる潜水反射と呼ばれる生理反応を持つことが確認されてきた (Kerem and Elsner 1973, Zapol *et al.* 1979)。生理現象を制御するためには、ホルモンを分泌していることが予想されるが、水中で自由に振る舞う動物から任意のタイミングで血液サンプルを取得することは困難であり、これまで潜水反射を制御する内分泌学的な機構は未知の分野とされてきた。私たちの研究グループは、動物に記録計を取付けるバイオリギング手法の技術と生理学分野における採血手法とホルモン定量化の技術を組み合わせることで、これまで未開拓であった潜水生理学における内分泌学的な機構を解明できると考えた。

2. 研究の目的

本研究では、新たに開発した動物搭載型採血装置(以下、採血口ガー)を用いることで、アザラシの水中代謝調節機構を解明することを目的とした。従来の手法では、人間が動物に触れることで血液サンプルを取得していたため、人為的な接触のない状態での採血が困難であり、訓練された動物であってもストレスホルモンの上昇を避けられなかった。ストレスホルモンの上昇は、心拍数の増加に伴って代謝速度を上昇させるため、潜水反射に関与する循環および代謝調節ホルモンを適切に定量化するためには、ストレスホルモンの分泌が軽減された状態での血液サンプルの取得が必須となる。本研究では、採血口ガーを用いることでストレスホルモンの分泌量が軽減されるかを検証し、陸上と水中における循環および代謝調節ホルモンの分泌動態と、水中における採餌の有無に伴う同ホルモンの分泌動態を定量化し、既往研究における陸生哺乳類および鯨類の分泌動態と比較することでアザラシにおける水中代謝調節機構を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

全ての実験は、研究目的でアザラシを飼育するセントアンドリュース大学(スコットランド)の海棲哺乳類研究部門が所有する実験プール(40×6×2m)にて国際共同研究として実施した(図1)。麻酔によって不動化させたアザラシの静脈洞にカテーテルを挿入し、カテーテルと接続させた採血口ガー(18×8.6 cm、水中重量 160 g)を動物の背中に装着した。麻酔後、十分に覚醒したアザラシを実験区画に移動し、任意のタイミングで採血口ガーを作動させて血液サンプルを取得した。ストレスホルモンの減少を比較する際には、陸上で機器取付のためにアザラシを捕獲した際に取得した従来式のサンプルと、

陸上で採血口ガーにて取得したサンプルとを比較した。また、循環および代謝調節ホルモンの動態比較では、(1)陸上と水中、(2)水中での採餌の有無のそれぞれで取得したサンプルを比較した。

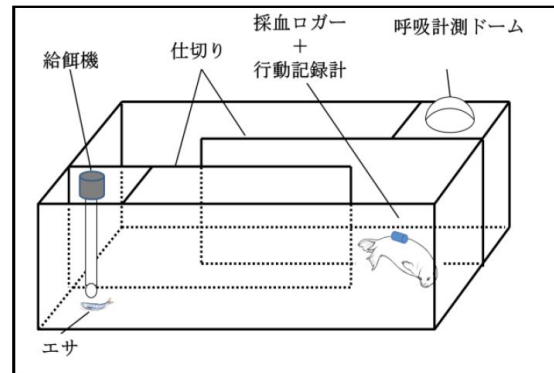


図1. 実験施設の概略図。

取得した血液サンプルは、遠心分離機(12,000 rpm, 5分間)を用いて血漿を回収し、凍結乾燥した状態のサンプルを日本に持ち帰り、東京大学大気海洋研究所にてホルモンの測定を行った。ストレスホルモンの測定では、市販のエンザイムイムノアッセイを用いてコルチゾルと副腎皮質刺激ホルモンの血漿中の濃度を測定した。循環および代謝調節ホルモンにおいては、連携研究者である竹井祥郎博士の研究室にてラジオイムノアッセイ法を用いた測定系が確立されている3種類のホルモン(ANP: 心房性ナトリウム利尿ペプチド、AVP: バソプレシン、ANGII: アンジオテンシン)を測定項目として血漿中の濃度を測定した。

4. 研究成果

従来式の捕獲時に血液を取得した状態と採血口ガーを用いて取得した状態を比較した結果、採血口ガーを使用することでストレスホルモンであるコルチゾルの分泌量を制御する副腎皮質刺激ホルモン(ACTH)における有意な減少を確認した(図2)。一方、コルチゾルにおいては、採血口ガーを用いることで減少傾向は見られたが、有意差は確認できなかった。その理由としては、コルチゾルの分泌はACTHによって制御されているため、採血時にはACTHの分泌量の低下に伴う反応がまだ起きていなかったと考えられる。

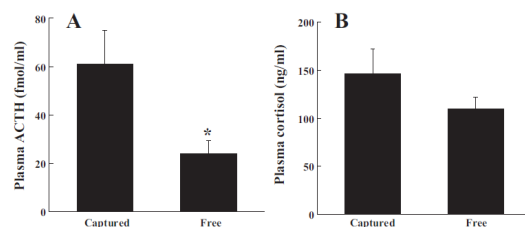


図2. 従来手法による捕獲時(Captured)と採血口ガー(Free)を用いて取得した血液サンプルにおける血漿中

の A) 副腎皮質刺激ホルモン (ACTH) と B) コルチゾルの濃度の比較。エラーバーは標準誤差を示し、アスタリスク (*) は統計的に有意差を示す (Student の *t* 検定, $P < 0.05$)。

陸上と水中における 3 種の循環調節ホルモンの分泌量では、有意差はなかったが ANP と AVP において陸生哺乳類と同様に血圧を低下させるホルモンの分泌動態が見られた (図 3)。陸生哺乳類では、水中では浮力補助によって血液を心臓に戻すための負担が軽減されるため、血圧を低下させる生理反応が見られる。一方、飼育個体のイルカを用いた既往研究では、同ホルモン 3 種の分泌量を陸上と水中の 2 つの間で比較しても全く差がなかった (Naka *et al.* 2007)。鯨類とアザラシは共に海棲哺乳類に分類され、陸に上がった哺乳類が水中生活に適応したという共通の進化的な背景を持つ。しかし、一生を通して水中で生活する鯨類においては、常に水中で浮力補助があるため、浮力補助の無い状態におけるホルモン調整が不要なのに対して、陸上で繁殖、子育て、休息を行い、狩りのために水中へ潜るといった水陸両用の生活史を持つアザラシでは、浮力補助の有無に伴うホルモンの調整機能を保持する必要があったと考えられる。

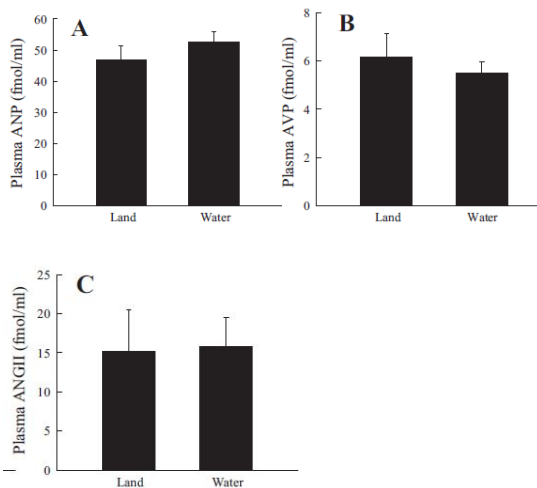


図 3. 陸上 (Land) と水中 (Water) において採血ロガーを用いて取得した血液サンプル中の循環および代謝調節ホルモンの比較。血漿中の A) ANP : 心房性ナトリウム利尿ペプチド、B) AVP : バソプレシン、C) ANGH : アンジオテンシンの濃度を示す。

水中における捕食の有無による 3 種のホルモンの分泌動態の比較では、捕食の無い潜水と捕食のあった潜水の間で顕著な差は見られなかった (図 4)。陸生哺乳類では、捕食時に血圧調節に参与するホルモンの変動が顕著に見られるのに対して、アザラシではその変動が見られなかった。陸生哺乳類においては、捕食後の消化のために血圧が上昇することが知られているが、この結果は、水中で

の捕食に伴う血圧調整がアザラシにおいては起きていないことを示唆した。肺呼吸動物であるアザラシは、エサを捕るために潜る水中では保有酸素量が制限される。そのため、遊泳に不要となる消化活動を遅らせることで酸素消費量を節約する生理反応も潜水代謝として持っていると考えられる。

本研究では、これまで現象として捉えられていた潜水反射に対して、その機構となるホルモン分泌量の定量化を世界で初めて可能にした。研究成果としてアメリカの生理学分野における科学雑誌 (American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology) に受理された論文は、編集者たちの推薦論文として取り上げられ、直ちにホットトピックとして紹介論文 (Ponganis 2016) が出されたことから、潜水生理学分野に限らず、生理学分野全体に対しても大きなインパクトを与える成果になったと思われる。

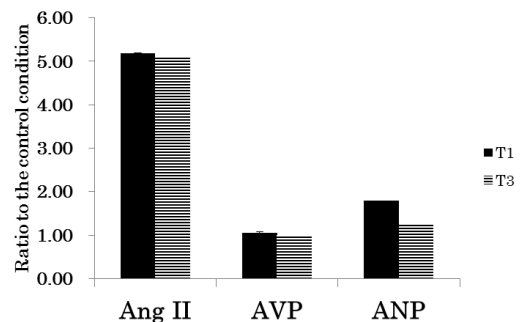


図 4. 遊泳時における捕食の有無 (T1:有、T3:無) に対する血液サンプル中の循環および代謝調節ホルモンの比較。血漿中の A) ANP : 心房性ナトリウム利尿ペプチド、B) AVP : バソプレシン、C) ANGH : アンジオテンシンの濃度をコントロール状態の濃度に対する割合で示した。

< 引用文献 >

- Kerem D, Elsner R. Cerebral tolerance to asphyxial hypoxia in the harbor seal. *Respiration Physiology* 19 巻、1973、188-200
- Naka T, Katsumata E, Sasaki K, Minamino N, Yoshioka M, Takei Y. Natriuretic peptides in cetaceans: identification, molecular characterization and changes in plasma concentration after landing. *Zoological Science* 24 巻、2007、577-587
- Ponganis P. *Advances in Technology: Blood-sampling at depth. Focus on "Development of an animal-borne blood sample collection device and its deployment for the determination of cardiovascular and stress hormones in submerged phocid seals"*. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 311 巻、2016、917-918
- Zapol WM, Liggins GC, Schneider RC, Qvist J, Snider MT, Creasy RK, Hochachka PW. Regional blood flow during simulated diving in the conscious Weddell seal. *Journal of Applied*

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Yoshio Takei, Ippei Suzuki (equal contribution), Marty K. S. Wong, Ryan Milne, Simon Moss, Katsufumi Sato and Ailsa Hall. Development of an animal-borne blood sample collection device and its deployment for the determination of cardiovascular and stress hormones in phocid seals. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* (査読有) 311.4 巻、2016 年、788-796 DOI: 10.1152/ajpregu.00211.2016

〔学会発表〕(計 8 件)

Ippei Suzuki, Yoshio Takei, Marty K. S. Wong, Katsufumi Sato and Ailsa Hall. An animal-borne blood sampler for endocrinal study in submerged phocid seals. *The 22nd Biennial Conference on the Biology of Marine Mammals*, 2017 年 (ポスター発表).

Ippei Suzuki, Yoshio Takei, Marty K. S. Wong, Ryan Milne, Simon Moss, Katsufumi Sato and Ailsa Hall. An animal-borne blood sampler to understand the endocrinal response in submerged phocid seals. *The sixth International Science Symposium on Biologging*, 2017 年 (口頭発表).

鈴木一平, 竹井祥郎, Ailsa Hall, 佐藤克文. 動物搭載型採血装置を用いた鳍脚類における内分泌学的研究. 第 64 回日本生態学会大会, 2017 年 (ポスター発表).

Ippei Suzuki, Marty KS Wong, Ailsa Hall, Katsufumi Sato and Yoshio Takei. Development of an animal-borne blood sampler to study physiological adaptation of submerged phocid seals. *The 5th Design Symposium on Conservation of Ecosystems*, 2016 年 (ポスター発表).

Ippei Suzuki, Marty KS Wong, Ailsa Hall, Katsufumi Sato and Yoshio Takei. An Animal-borne Blood Sampler to Study Physiological Adaptation of Submerged Phocid Seals. *Joint symposium of the 22nd International Congress of Zoology and the 87th Annual Meeting of the Zoological Society of Japan*, 2016 年 (ポスター発表).

Yoshio Takei, Ippei Suzuki, Marty Wong, Ailsa Hall and Katsufumi Sato. Changes in cardiovascular hormones after water immersion in seals using automated blood sampler. *The 8th Congress of Asia and*

Oceania Society for Comparative Endocrinology, 2016 年 (口頭発表).

鈴木一平, 竹井祥郎, 佐藤克文. 動物搭載型採血装置による潜水動物における内分泌学的研究. 平成 28 年度日本水産学会春季大会, 2016 年 (ポスター発表).

Ippei Suzuki, Joanna Kershaw, Ailsa Hall, Katsufumi Sato and Yoshio Takei. Hormonal responses to stress and gravity in seals using an animal-borne blood sampler. *The 21st Biennial Conference on the Biology of Marine Mammals*, 2015 年 (ポスター発表).

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 一平 (SUZUKI, Ippei)

北海道大学・北方生物圏フィールド科学センター・学術研究員

研究者番号: 5 0 7 2 7 0 9 7

(2) 連携研究者

竹井 祥郎 (TAKEI, Yoshio)

東京大学・大気海洋研究所・名誉教授

研究者番号: 1 0 1 2 9 2 4 9

(3) 研究協力者

Ailsa Hall

セントアンドリュース大学・スコットランド海洋研究所・所長 (教授)

佐藤 克文 (SATO, Katsufumi)

東京大学・大気海洋研究所・教授

Marty KS Wong

東京大学・大気海洋研究所・特任研究員

Simon Moss

セントアンドリュース大学・スコットランド海洋研究所・技術職員

Ryan Milne

セントアンドリュース大学・スコットランド海洋研究所・技術職員