

令和元年6月3日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K18482

研究課題名(和文) オランウータンにおける近赤外分光法を用いた迅速な糞中発情ホルモン濃度測定法の確立

研究課題名(英文) Rapid assay of fecal estrogen in orangutans using near infrared spectroscopy

研究代表者

木下 こづえ (KINOSHITA, Kodzue)

京都大学・野生動物研究センター・助教

研究者番号：50724233

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：希少種の繁殖を成功させるためには、雌の最適交配期を迅速に予測することが重要である。本研究では、ボルネオオランウータン(Pongo pygmaeus)に着目し、飼育下や野生下において交配時期を迅速かつ容易に特定する方法の確立を目的として研究を行った。また、排泄物を分析に用いることで、動物に対して非侵襲的/間接的に分析できる方法を検討した。最終的には、近赤外分光法に加えてイムノクロマト法を応用することで、より簡便で迅速なホルモン分析手法の確立に至った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本手法はオランウータンだけでなく、動物園で飼育されている数多くの動物の日々のホルモン検査に役立つことが期待される。近赤外分光法およびイムノクロマト法は、いずれも小型機器での分析が可能であり、簡便に操作できる。そのため、飼育下では展示場など屋外での測定も可能となり、飼育係などの非専門家でも日々の測定が容易になる。また、屋外でホルモン検査が可能となるため、飼育下だけでなく野生個体にも応用可能であり、野生個体のホルモン動態や繁殖状況の把握など、多くの研究分野への展開が期待できる。

研究成果の概要(英文)：To breed captive animals successfully, it is important to determine the optimal timing for breeding. In this study, we focused on Borneo orangutan (Pongo pygmaeus) and conducted research to establish a method to rapidly and easily identify the optimal timing for breeding in captivity and the wild. In addition, by using excrement for analysis, we established methods that can be used non-invasively / indirectly on animals. Finally, application of immunochromatography in addition to near-infrared spectroscopy has led to the establishment of a simpler and more rapid hormone analysis method.

研究分野：動物保全生理学

キーワード：迅速アッセイ 繁殖 野生動物 ステロイドホルモン 内分泌 排泄物

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

現在、哺乳類では現存種の約 20% が絶滅の危機に瀕しており、その原因は生息地の破壊によるところが大きい。そのため、生息地外にある動物園や水族館などで個体数を維持させ、絶滅を回避するための補完措置が世界的に求められている。しかし、国内では 150 を超える動物園・水族館が存在するが、例年その個体数は減少し、希少種の繁殖に成功しているとは言い難い。

希少種の繁殖を成功させるためには、雌の交配適期を迅速に予測することが特に重要である。本研究では、アジア唯一の大型類人猿であり、生息地で著しく個体数が減少しているボルネオオランウータン (*Pongo pygmaeus*) に着目して、「飼育現場および生息地の野外で交配適期を迅速かつ簡便に特定する手法の確立」を行う。本種は、過去の研究から、申請者がすでに飼育下および野生下の両面で十分に内分泌学的知見を得ている動物種である。雌の交配適期は、発情ホルモン濃度のピーク日から約 1 日足らずで終了する (図 1)。しかし、従来から一般的とされているホルモン濃度測定法 (酵素免疫測定法) は、測定に約 1 日の時間を要し、ホルモン濃度結果を得た時点で交配適期を逃してしまう可能性が大きい。また、複数の高価な冷蔵試薬を使用するため、野外ではもちろん、十分な電力を確保できる飼育下でも利用されていないのが現状である。それ故に、多くの動物では行動などの変化から交配適期の予測が試みられているが、変化が明瞭でなく観察者による主観的な違いが生じたりするため、的確に予測することが困難な場合が多い。

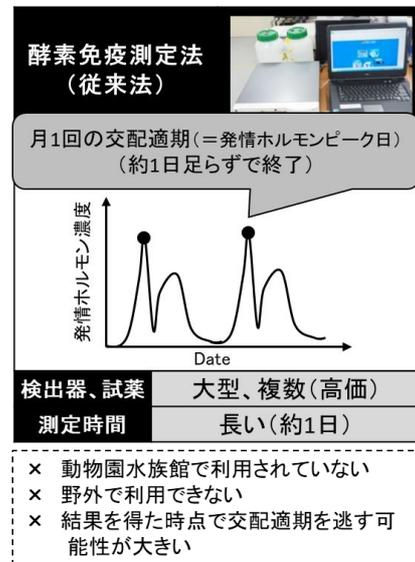


図 1. 酵素免疫測定法 (従来法) の短所

2. 研究の目的

希少種の繁殖を成功させるためには、雌の交配適期を迅速に予測することが重要である。本研究ではボルネオオランウータンに着目して、飼育現場および生息地の野外で迅速かつ簡便に交配適期を特定する手法の確立について、近赤外分光法を用いて試みた。具体的な研究目的は以下の通りである。これまで尿を用いて報告してきた近赤外分光法による発情ホルモン濃度測定法 (Kinoshita et al., 2013) を採取が容易な糞に応用し、糞を用いても迅速な濃度測定が可能かどうかを検討する。糞は夾雑物を多く含むため、特定のホルモンを結合させる「ラテックス抗体」を用いることで、近赤外分光法による発情ホルモン濃度測定の精度が向上するかどうかを検討する。加えて、近赤外分光法だけに限らず、簡易分析が可能なイムノクロマト法によるホルモン濃度測定についても検討する。

3. 研究の方法

【近赤外分光法】近赤外線を糞に直接照射 (直接法) または糞中のラテックス凝集部 (ホルモン抗体をラテックスに固着させ、糞サンプルを添加した懸濁液) に照射 (ラテックス凝集法) し、拡散反射法により近赤外スペクトルを得た。次に、Kinoshita ら (2009) の方法に準じて、酵素免疫測定法を用いて糞中発情ホルモン測定値を得た。酵素免疫測定法によって得たホルモン測定値を参照データとして、近赤外スペクトルに対して PLS 回帰分析を行い、最適な発情ホルモン濃度測定用の PLS 回帰モデルの構築を試みた。

【イムノクロマト法】はじめに、大型機械を用いずに、かつ多くの国で入手が容易なエタノールを用いた簡易ホルモン抽出法 (Field-friendly 法) を検討した。一定量の糞を計量して 80% エタノールを加え、用手法により 2 分間攪拌してホルモンを抽出した。攪拌後、静置し、上清を回収した。回収したサンプルは、シリカゲル入りプラスチック容器内で乾固させ保存した。測定の際に上記の乾固させたサンプルに 80% エタノールを加え、再懸濁して測定に供した。また、比較のため、同一糞を使用して従来法によるホルモン抽出も行った (コントロール)。従来法によるホルモン抽出では、新鮮糞を真空凍結乾燥し、一定量の乾燥糞に 80% メタノールを加えて、ボルテックスミキサーで 30 分間攪拌した。攪拌後、遠心分離した上清を回収し、マイクロチューブに入れて測定時まで凍結保存した。上記で抽出したサンプルから迅速に採糞現場でホルモン濃度を測定するため、イムノクロマト法を応用した簡易測定キットの開発を試みた。抗原溶液をメンブレンにライン状に塗布し、抗体には金コロイドを標識した。金コロイド標識抗体は 1.5 ml マイクロチューブに一定量分注して凍結乾燥し保存した。また、既知濃度の標準物を用いて、イムノクロマト法による濃度測定の精度を検討した。測定時に、上記の乾燥金コロイド標識抗体にサンプルを加えて再溶解し、懸濁液を抗原塗布メンブレンに供することで、競合反応を起こさせる。そして、発色反応をイムノクロマトリーダーで定量することにより濃度を測定した。

4. 研究成果

糞に直接近赤外線を照射して測定する方法 (直接法) を検討した結果、近赤外線は散乱を

起こし、スペクトルが複雑化した。これまでの研究で用いてきた尿とは異なり、糞は多くの夾雑物を含むため、直接近赤外線を照射する方法は不適と判断した。そこで、特定のホルモンを結合させるラテックス抗体を用いて測定する方法（ラテックス凝集法）を検討し測定精度の向上を図った。しかし、ラテックスの径が大きかったためか、良好な結果は得られなかった。一方で、近赤外分光法よりも温度に対して安定して操作が可能なイムノクロマト法の応用を試みた。まず、Field-friendly 法によるホルモン抽出に関して、従来法によって抽出したサンプルの糞中コルチゾール、エストラジオール-17 およびプロゲステロン濃度との重相関係数を調べた結果、 $R^2=0.88$ （エストラジオール-17） 0.51 （プロゲステロン）および 0.74 （コルチゾール）と良好な結果が得られた。概ね良好な結果ではあったが、いずれも R^2 が 0.9 を超えることはなく、さらなる方法の検討が必要であると考えられた。次に、既知濃度のコルチゾール標準物（ $3.9\sim 5,000$ ng/ml）を用いて、イムノクロマト法による濃度測定の精度を検討した。その結果、高い精度（ $R^2=0.997$ ）で濃度測定が可能であることが示された。今後は、糞抽出物でも同精度でコルチゾール濃度測定ができるように検討するとともに、他のホルモン（エストラジオール 17 など）の濃度測定への応用も試みる予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 14 件)

木下こづえ. 霊長類におけるホルモン分析の現在, 霊長類研究, 34(1), pp. 5-15, 2018年6月. (査読あり) doi.org/10.2354/psj.34.008.

Takeshita RSC, Bercovitch FB, Kinoshita K, Huffman MA. Beneficial effect of hot spring bathing on stress levels in Japanese macaques, *Primates*, 59(3), pp. 215-225, 2018. (査読あり) doi: 10.1007/s10329-018-0655-x

Takeshita RSC, Huffman MA, Kinoshita K, Bercovitch FB. Effect of castration on social behavior and hormones in male Japanese macaques (*Macaca fuscata*), *Physiology & Behavior*, 181, pp. 43-50, 2017. (査読あり) doi: 10.1016/j.physbeh.2017.09.006.

Kinoshita K, Sano Y, Takai A, 他 8 名. Urinary sex steroid hormone and placental leucine aminopeptidase concentration differences between live births and stillbirth of Bornean orangutans (*Pongo pygmaeus*), *Journal of Medical Primatology*, 46(1), pp. 3-8, 2017. (査読あり) doi: 10.1111/jmp.12249.

Mendonça RS, Takeshita RSC, Kanamori T, Kuze N, Hayashi M, Kinoshita K, 他 2 名. Behavioral and physiological changes in a juvenile Bornean orangutan after a wildlife rescue. *Global Ecology and Conservation*, 8, pp. 116-122, 2016. (査読あり) doi.org/10.1016/j.gecco.2016.08.004.

Yamanashi Y, Teramoto M, Morimura N, Hirata S, Suzuki J, Hayashi M, Kinoshita K, 他 2 名. Analysis of hair cortisol levels in captive chimpanzees: Effect of various methods on cortisol stability and variability, *MethodsX*, 3, pp. 110-117, 2016. (査読あり) doi: 10.1016/j.mex.2016.01.004.

Vance CK, Tolleson DR, Kinoshita K, 他 2 名. Near infrared spectroscopy in wildlife and biodiversity, *Journal of Near Infrared Spectroscopy*, 24, pp. 1-25, 2016. (査読あり) doi.org/10.1255/jnirs.1199.

Kinoshita K, Kuze N, Kobayashi T, 他 5 名. Detection of urinary estrogen conjugates and creatinine using near infrared spectroscopy in Bornean Orangutans (*Pongo Pygmaeus*), *Primates*, 57(1), pp. 51-59, 2016. (査読あり) doi: 10.1007/s10329-015-0501-3.

〔学会発表〕(計 60 件)

木下こづえ, 菊地デイル万次郎, 大西敏文, 秋山多江, Suraiya Leuche, Koustubh Sharma, Kubanchbek Zhumabai uulu, Field-friendly 法を用いた野生動物の迅速ホルモン分析手法の開発, 第 66 回日本生態学会大会, A03-08, 神戸, 2019年3月.

Kinoshita K, Development of a field-friendly method for steroid hormone analysis of wild animals, Symposium of Intergrative Biology -Biodiversity in Asia-, Kyoto, February, 2019.

Kinoshita K, Challenge of conservative physiology in snow leopards: from captive to wild animals, The 7th International Workshop on Tropical Biodiversity Conservation Focusing on Large Animal Studies, Kotakinabalu, Theme 3, October, 2018.

Kuze N, Kanamori T, Mendonca R, Yamazaki S, Tajima T, Tsutaya T, Bernard H, Malim P, Kinoshita K, Kohshima S, The relationship between pregnancy of wild Borneo Orangutan and fruit availability, The 7th International Workshop on Tropical Biodiversity Conservation Focusing on Large Animal Studies, Kotakinabalu, Theme 3, October, 2018.

久世濃子, 金森朝子, 山崎彩夏, 田島知之, 蔦谷 匠, Renata Mendonça, Henry Bernard, Peter T. Malim, 木下こづえ, 野生ボルネオ・オランウータン (*Pongo pygmaeus morio*) の雌の妊娠と一斉結実との関係 - 13 年間の記録 -, 日本哺乳類学会 2018 年度大会, 上伊那郡, 2018年9月.

Kinoshita K, Kikuchi DM, Luecke S, Zhumabai uulu K, Sharma K, Challenge of conservative physiology in snow leopards with collaboration of noninvasive methods, Conservation Asia 2018, S-Kodzue session, Bishkek, August, 2018.

Kinoshita K, Application possibility of non-invasive hormonal analysis for the estimation of wildlife physiological state, The 6th International Symposium on Tropical Biodiversity in Large Animal, Bogor, Session 2, October, 2017.

木下こづえ, 中村智行, 木村幸一, 清水美香, 久世濃子, 尾崎康彦, 雌オランウータンにおける尿中性ステロイドホルモン濃度動態と生殖器計測結果について, 第1回野生動物保全繁殖研究会, P-05, 神戸, 2017年9月.

木下こづえ, 自由集会「霊長類学における行動・生態研究手法の現在」において講演, ホルモン分析を用いた生理生態研究, 第33回日本霊長類学会, p.18, 福島, 2017年7月.

Kuze N, Kanamori T, Mendoca R, Yamazaki S, Tajima T, Tsutaya T, Bernard H, Malim P, Kinoshita K, The relationship between pregnancy of wild Borneo Orangutan and fruit productivity, The 6th International Seminar on Biodiversity and Evolution-Wildlife Science by New Biologging studies-, Kyoto, May 2017.

木下こづえ, 中村智行, 久世濃子, 尾崎康彦, 雌オランウータンにおける生殖器の状態と尿中性ステロイドホルモン濃度の関係性について, 「ず～ぞなもし。」動物園大学7inとべ, 伊予, 2017年3月.

Kinoshita K, Reproductive monitoring of captive Bornean orangutans (*Pongo pygmaeus*) in Japanese zoos, 2016 Wildlife Medicine Clinical Technique Training Course, Kota Kinabalu September, 2016.

Kinoshita K, Kuze K, Miyakawa E, Kobayashi T, Nakamura T, Ogata M, Ozaki Y, Liquid storage of captive Bornean orangutan (*Pongo Pygmaeus*) sperm collected without anesthesia, Joint meeting of the International Primatological Society and the American Society of Primatologists, Chicago, #6659, August, 2016.

久世濃子, 金森朝子, 山崎彩夏, 田島知之, Renata Mendoca, Peter T. Malim, Henry Bernard, 木下こづえ, 野生ボルネオ・オランウータンの尿中 C-peptide 濃度と繁殖および果実生産量の関係, 第33回日本霊長類学会大会, 福島, 2016年7月.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年:
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年:
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

個人ウェブサイト: <https://www.kodzue-kinoshita.com/>

6. 研究組織

(1)研究分担者 なし

研究分担者氏名:

ローマ字氏名:

所属研究機関名:

部局名:

職名:

研究者番号(8桁):

(2)研究協力者 なし

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。