

令和 5 年 5 月 19 日現在

機関番号：14101

研究種目：挑戦的研究（開拓）

研究期間：2018～2022

課題番号：18H05362・20K20373

研究課題名（和文）鯨類の繁殖に果たす脂肪組織の役割の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the role of adipose tissue in cetacean reproduction

研究代表者

吉岡 基（Yoshioka, Motoi）

三重大学・生物資源学研究所・教授

研究者番号：30262992

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 18,800,000円

研究成果の概要（和文）：鯨類に特徴的な組織である脂皮と呼ばれる厚い皮下脂肪組織の繁殖機能における生理学的関与について、飼育下のハンドウイルカを対象に定期採血と新規開発した生検採取器具による脂皮採取を行い、ホルモン濃度測定、遺伝子解析、脂肪成分分析を行った。その結果、脂肪組成は表皮と皮下脂肪（3層）で大きく異なること、皮下脂肪では約40種の生理活性物質がレプチンと同等以上に発現していること、中性脂肪に結合する脂肪酸の組成には寒冷適応を示唆する特徴がみられたこと、血中コルチゾール濃度は寒冷期に上昇することなどが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ある水族館で繁殖しないイルカを、温度帯が異なる別の水族館に移動させた途端に繁殖に成功した例が複数ある。これはその繁殖に水温が深く影響していることを示唆している。そこで、鯨類には哺乳類には例をみない脂皮と呼ばれる厚い脂肪組織が全身を覆うことに着目し、脂皮中の脂肪組織と繁殖との関わりをホルモン・遺伝子・脂肪の3つの異なる視点での分析により調べた。その結果、これまでまったく知見のなかった脂肪組織から産生される約40を超える生理活性物質やホルモン、水温変化と繁殖との生理学的関係が明らかになるとともに、鯨類における脂皮が果たす新たな生理学的機能と飼育環境における水温管理の重要性を指摘することができた。

研究成果の概要（英文）：Regarding the physiological involvement of the thick subcutaneous adipose tissue called blubber, which is a characteristic tissue of cetaceans, in the reproductive function, we conducted biweekly blood sampling and seasonal collection of blubber tissue using a newly developed biopsy device from captive sexually mature and immature common bottlenose dolphins. Using these samples, we performed hormone concentration measurement, genetic analysis, and fat analysis. As a result, the following points were clarified; 1) Fat composition differed greatly between epidermis and subcutaneous fat (three layers); 2) Approximately 40 physiologically active substances were expressed in subcutaneous fat at levels equal to or higher than those of leptin; 3) Composition of fatty acids bound to neutral lipids showed characteristics suggestive of cold adaptation; and 4) Circulating cortisol levels increased during the cold season.

研究分野：鯨類の繁殖生理学

キーワード：イルカ 脂皮 脂肪 ホルモン 繁殖 水温 性ステロイド 生検

## 1. 研究開始当初の背景

「鯨類において、陸生哺乳類にはない特殊に発達する脂肪組織が、彼らの繁殖の制御に深く関わり、繁殖成功の鍵を握っているのではないか？」

これが本研究課題の中核をなす研究開始当初の学術的問いである。

日本には現在約 40 の水族館等で、鯨類約 90 種のうちの 1/5 にあたる 20 種弱の小型の鯨類（いわゆるイルカ）が飼育されているが、飼育下において、同一の水族館でも種によって繁殖率が異なることは、飼育現場ではよく知られている。また、ある水族館で繁殖しない種を、設備や技術の程度が同じで、温度帯が異なる水族館に移動させた途端に繁殖に成功した例も複数みられている。具体的に言えば、国内で最も飼育個体数の多いハンドウイルカは広い温度帯で繁殖例があるが、カマイルカでは寒冷な場所、マダライルカでは温暖な場所ではしか繁殖がうまくいっていない。このことは、鯨類の繁殖に水温が深く影響していることを示唆している。一方、動物は一定の体サイズに達しないと成熟を開始せず、春機発動にはある程度の脂肪蓄積が必要であることから明らかなように、成長と成熟には密接な関連がある。また近年、脂肪細胞が種々の物質を産生分泌し、代謝などを制御する重要な内分泌器官として働くのみならず、生殖系器官にも働きかけて、春機発動や繁殖期、胎児の成長に重要な役割を果たすことが報告されはじめている。

こうした状況とは別に、国内の鯨類飼育に大きな課題を投げかける出来事が起こった。すなわち、2015年5月、「イルカ追い込み漁で捕獲されたイルカ類の搬入を今後は行わない」という決定を日本動物園水族館協会（JAZA）が行ったことにより、JAZA 加盟園館への野生個体の供給が困難となった。そのため、国内の鯨類飼育施設では、現有個体で繁殖を進め、飼育展示用の個体を確保する必要性に迫られ、その解決は喫緊の研究課題となった。しかし、現状では飼育している種や雌雄別飼育頭数、成熟個体の保有数、飼育施設、飼育管理に係る人員体制、経営体制等々の条件が施設によってさまざまに異なることから、その結果として繁殖率も異なっている。

こうした社会的背景もあるなか、本研究は「種によって、繁殖にも適正水温が異なるらしい」という経験則に科学的な解釈を与え、人工繁殖以外の技術による飼育下でのイルカ類の繁殖促進にも寄与するため、脂肪組織を介した繁殖の制御の有無とその実態を検証することとした。

繁殖促進をも目指した飼育下のイルカの繁殖生理学においては、これまでの一般的アプローチとしては、専ら性ステロイドの変動を追跡することに主眼がおかれ、その上流にある制御機構までは手が及ばなかった。繁殖に限らず、哺乳類にとって生息に適した温度帯があることは普通のことであり、同様のことが繁殖にも適用されることは考えてみれば当たり前のことではある。しかし、飼育施設では、異なる生息帯から導入した複数種を混合飼育していたり、水質管理の面から飼育対象種の生息域水温に適合した水温環境を必ずしも保証できていないという現実があり、その水温管理が適切であることの科学的裏付けは必ずしもとれていない。

本研究では、脂肪組織を介した繁殖の制御の有無とその実態を検証するために、鯨類において、体熱発散防止のための断熱材や栄養源としての脂肪の貯蔵庫としての機能をもつ鯨類特有の厚い脂肪層“脂皮”(blubber, プラバー; 右図)が、生息適正水温との関係から、さらに繁殖にも深い関係があるのではないかと考え、繁殖における脂肪細胞の役割を最新の科学的なアプローチにより明らかにしたいと考えた。この鯨類の脂皮は、表皮直下に形成され、その厚みは数 cm ~ 数十 cm に達する。脂皮の厚さや構成成分は、鯨類の栄養状態や授乳の有無、季節等により変動することが報告されているが、他の哺乳類では例を見ないほどに厚く蓄積され、個体の代謝の制御に深く関わり、彼らの繁殖を制御しているとしても不思議ではない。しかし、鯨類の繁殖機能における脂肪組織である脂皮の生理学的関与については全く研究が進んでいない。ここでは、これまで鯨類の繁殖生理学の研究で主として行われてきた血中性ステロイドの変動に焦点を当てた研究手法から脱却し、新たな立脚点として「脂肪組織を介した器官間のクロストークが鯨類の繁殖を制御する」という仮説を立て、これを検証することを目指した。



## 2. 研究の目的

本研究では、鯨類における脂皮と繁殖との関連の有無を解明するため、以下を目的とした。

- 1) 脂皮の状態が、繁殖期やその長さと同調して変化しているのかを調べるため、通年で採血し、性ステロイド濃度を測定して個体の繁殖段階を把握した上で、季節ごとに生検で得た脂肪組織を用いて、(a)脂肪成分の分析(液体クロマトグラフ-飛行時間型質量分析計)、(b)遺伝子発現解析による産生物質の特定(RNAseq)を通して、脂皮における生理活性物質産生および代謝状態と繁殖との関係を解明する。
- 2) 季節や水温に応じて脂皮の状態を上流で制御する器官の有無について、甲状腺を主たる制御器官と推定し、甲状腺ホルモンの血中濃度の変化と 1)の産生物質との関係を明らかにす

る。

### 3. 研究の方法

脂皮と繁殖との関連の有無およびその実態を調査するため、( )水温および他の環境要因がイルカの繁殖に与える影響について、全国の水族館に対し、飼育個体の繁殖状況と飼育環境に関するアンケートを行い、( )脂皮の状態が繁殖期と同調して変化しているのかを季節や水温との関連をみながら、性ホルモンや甲状腺ホルモンの動態と脂皮由来の物質と生殖腺との関連の有無を以下の方法により解析した。

#### ）環境および繁殖との関連の水族館に対するアンケート - 実験対象個体の選定

全国の17の水族館等で飼育されているハンドウイルカとカマイルカを対象に、プールのサイズ、雌雄の個体数、環境水温、日長などの飼育管理に関するデータ収集と、それらの繁殖の有無(ここでは出産の有無を指標とする)についてアンケートを行い、以後の血液および脂皮試料を収集するために適切な個体の選定を行った。

#### ）繁殖期に伴う脂肪の変化の有無の確認

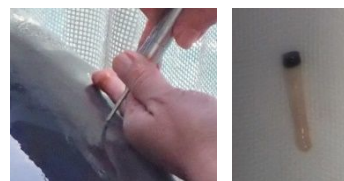
( )の結果をもとに、繁殖実績がある個体(3施設の4頭)と繁殖経験がない未成熟個体(3施設の5頭)を対象に以下の実験を行った。

##### -1) 体内環境の調査

通年で定期的な採血(原則、毎月2回)を行い、検査機関に依頼して、LC-MS/MS(液体クロマトグラフィー質量分析)法により7種の性ステロイドの血中濃度の測定を行うとともに、市販の甲状腺ホルモン測定キットを使用して、血中の2種の甲状腺ホルモン(total T<sub>4</sub>, Total T<sub>3</sub>)濃度を測定した。さらに時間分解蛍光免疫測定法(TR-FIA)を用いて血中コルチゾール濃度を測定した。また、LC-TOFMS(液体クロマトグラフ-飛行時間型質量分析計)による脂肪成分分析を行った。

##### -2) 脂肪組織の状態の調査

季節ごとに脂肪の組成や物質生産を調べるため、3ヶ月に1回、民間業者と開発(改良)したイルカ脂皮生検試料採取器具(以下、パンチャー)を用いた生針により表皮から筋肉直上までの組織を採取し(図参照:採取の様子(左)と得られた試料(右))、得られた組織のRNAseq(遺伝子発現解析)と脂肪分析により産生物質の解析を行った。



#### ）生検の個体への影響評価

上記実験における生検実施のため、パンチャーで採取した試料の遺伝子解析、代謝物質分析、組織学検査への有用性、および生検前後の対象個体の血液性状や治癒経過の評価を行うため、以下の記録およびデータを収集した。すなわち、生検実施日前後における採血(前日、翌日と1週間後に実施)と血液検査、体温測定(採取前日から採取1週間後まで毎日)、採取部位の写真撮影(採取直後から1週間後まで毎日)である。血液試料については、白血球数、白血球分類、赤血球数、Ht, HGB, LDH, CPK, GOT, FIB, IgA, IgG, IgMを各水族館、一部は検査機関に依頼して測定を行った。

### 4. 研究成果

ハンドウイルカを飼育している17の水族館に対するアンケートの集計結果から、飼育環境、緯度体をも考慮し、西日本地区にある3つの水族館を選定し、そこで飼育されている成熟メス4頭(期間途中から3頭)、未成熟雌5頭を対象に試料採取とそれらの分析を行った結果、以下の成果(概要)が得られた。

#### 4-1. 皮膚生検組織を用いた解析の結果

##### (1) ペプチド系生理活性物質の発現パターン分析

###### 発現量の多い物質

皮下脂肪で発現する遺伝子のうち、代表的なアディポカインであるレプチンよりも多く発現する生理活性物質(ペプチド系ホルモン様物質/サイトカイン/分泌タンパク質)が42物質検出された。全体として、糖や脂質の代謝(=エネルギー代謝調節)に関与する因子、血管調整に関与する因子、免疫(炎症)に関与する因子の発現が多かった。

最も発現量が多いのは、代表的なアディポカインであるアディポネクチン(ADIPOQ)であ

った。ついで、脂質や糖代謝を調整するアンジオポイエチン様タンパク質 4 (ANGPTL4)、成長促進作用や抗炎症作用をもつインスリン様成長因子 2 (IGF2)、脂肪細胞の分化や増殖を誘導するフェニキシンの前駆体 (SMIM20)、エネルギー代謝調節に関与する COPI Coat Complex Subunit Alpha (COPA) の順に発現が多かった。

肥満やインシュリン抵抗性に関わるレジスチンの発現量は少なく、レプチンの 1/3 程度であった。炎症発生に関わる分子の発現もみられたが、それを抑制するアディポカインや IGF2 の発現量が多かったことは、それらの分子が膨大量の脂肪を溜め込む脂皮で炎症が起きているのを防いでいることを想起させた。

#### 生殖と関わりのある物質

上記 43 物質のうち、生殖に関与することが報告されている物質としては、IGF2 (卵胞形成、顆粒膜細胞増殖、P4 分泌)、SMIM20 (フェニキシン前駆体; GnRH の制御、LH 放出促進、卵胞成長、E2 産生促進)、抗ミュラー管ホルモン (AMH、生殖腺発生、卵胞形成、卵細胞の成熟制御)、ニューロペプチド FF (NPFF: 精巣の発達や機能の調整に関与か)、レプチン (着床誘起、FSH や LH の分泌促進) が挙げられた。

また、43 物質のうち、未成熟個体と成熟個体で平均値の差を t-test (等分散) ないしは Welch の検定 (非等分散) で検定したところ、成熟個体で有意に多かった物質はレプチンと IL15 のみであった。このことから、イルカにおいて皮下脂肪で作られる物質のうち、繁殖の調節に直接関わる可能性の高い因子はレプチンであると推測された。一方、未成熟で有意に多く発現している物質は IGF2 であった。IGF2 は卵巣の発達に関与するため、発育途中の個体の卵巣形成に関わる可能性が考えられた。

## (2) 脂肪組成分析

### 脂肪群の組成

生検で採取した組織を「表皮+真皮」と皮下脂肪の 3 層「表層」「中層」「深層」に分けて脂肪の組成を高感度 LC-MS/MS で解析した。その結果、大きくは「表皮+真皮」と「皮下脂肪」の間で組成が異なること、ならびに皮下脂肪の 3 層でも異なることが示された。

「表皮+真皮」、皮下脂肪ともに、トリグリセロール (TG) が最も多く、前者で 74%、後者で 90%以上を占めていた。「表皮+真皮」では、皮下脂肪に比べて脂肪組成に多様性があることがわかった。これは細胞膜成分や保湿を担う脂肪が相対的に多く含まれているためであると考えられた。

### トリグリセロールに結合する脂肪酸の組成

TG に結合する脂質について、結合部位ごとに調べたところ、興味深いことに sn-1 に吉草酸 (おそらくイソ吉草酸; C5:0) が最も多く結合していた。イルカの脂肪組織 (メロン、皮下脂肪、下顎脂肪) にイソ吉草酸が多く含まれていることは複数の論文で報告されている。音響を早く伝達するために必要であるのではないか等の考察がなされているが、皮下脂肪にも多く含まれ、かつ TG の sn-1 の部位に結合していることを報告した知見はない。

イソ吉草酸は魚類には含まれていないことから、イルカが体内で生合成している可能性が高い。ヒトにおいて、血中にイソ吉草酸が多量に出てくる「イソ吉草酸血症」という疾患がある。これは、ロイシン代謝の途中の酵素 (イソバレリル CoA 脱水素酵素, IVD) が変異し、働かないことでイソバレリル CoA がメチルクロトニル CoA に変換されずにイソ吉草酸へと変化するために起きる疾病である。この疾病と同様のことがイルカの皮下脂肪で起きていると考え、RNA-seq のデータからロイシン代謝に関わる酵素の発現量を分析した。その結果、ロイシンをイソバレリル CoA にまで代謝するために必要な酵素 (BCAT, BCKDK) と比較して、IVD の相対発現量が極めて少ないことが判明した。イソ吉草酸の融点は極めて低く (-29 )、これを TG に組み込むことで、冷たい水中でも TG から脂肪酸を動員できる流動性を確保している可能性を考えられた。イソ吉草酸は高い揮発性を持つことから、産生後すぐに TG に組み込む仕組みがあると考えられる。これを確かめるための代謝実験を今後行う必要がある。

## 4 - 2 . 血液試料を用いた解析の結果

### (1) 甲状腺ホルモン濃度の変動

8 頭から 2021 年 1 月から 2022 年 1 月にかけて採取した血漿試料を用いて、ELISA 法により甲状腺ホルモン (total T3, total T4) の濃度を測定したところ、明瞭な年間変動は認められなかった。T3 については、成熟個体よりも未成熟個体で有意に高い平均値を示した。これは成長を支えるために代謝要求が高くなっている、もしくは体が小さいため、体積に対する表面積が大きく、体温を保つために代謝を高くしているなどの理由が考えられた。

### (2) コルチゾール濃度の変動

(1) と同試料を用いて TR-FIA 法により血中コルチゾール濃度を測定したところ、1 月から 4 月の寒い時期に高い濃度を示した。そこで水温とコルチゾール濃度との相関をとったところ、20 を下回るとコルチゾール濃度が上昇した。プロットに最も適合する近似曲線は「 $Y = -0.0081 X^3 + 0.6824 X^2 - 18.738 X + 185.27$ 」(  $X$  = 水温,  $Y$  = コルチゾール濃度) で表され



る3次式曲線であった。Suzuki et al. (2003)において、シャチで冬にコルチゾール濃度が高くなることが報告されており、この相関関係は、寒冷に対する生理的ストレス応答である可能性が考えられた。このことから、水温が20℃を下回ると個体が生理学的に反応するものと推測された。

### (3) 性ステロイド濃度の変動

同様に、8頭から2020年10月から2022年1月にかけて採取した血漿試料を用いて、血中プロゲステロン(P4)およびエストラジオール(E2)濃度の測定を行った。その結果、未成熟個体と考えていた1個体が成熟個体あるいは期間中に成熟したことがわかったほか、実験期間中の成熟個体の黄体活動が確認できた。

また、5頭から得られた血漿試料を用いて、検査機関に依頼して、LC-MS/MS法によりステロイド28種の濃度を測定した。その結果、ほとんどの試料で18種のステロイドが検出限界以下となり、10種において血中での存在を確認した。

この予備実験の結果を基に、6頭から2021年2月から2022年1月にかけて採取した血漿試料を用いて、7種のステロイド、すなわちP4、プレグネノロン(P5)、アロプレグネノロン(AP)、17-ヒドロキシプロゲステロン、17-ヒドロキシプレグネノロン、アンドロステンジオン、E2の濃度を測定した。その結果、P4、P5、AP間にはそれぞれ有意な正の相関があり、特にP4とAPの相関係数が高いことがわかった。血中のAPは鯨類では検出されなかった例がないが、LHやGnRHの分泌を誘発することが示唆されていることから、鯨類においても繁殖に関わるステロイドである可能性が考えられた。

## 4-3. 生検器具の開発と生検による生体への影響の評価

4-1で使用した脂皮組織を採取するため、当初は、市販の採取器具を使用していた。しかしながら、対象個体の表皮から筋肉層にいたるまで脂皮を貫通した組織を採取することができなかった。そこで業者と協力して、刃先の長さなど、採取器具の改良を行った。これにより、厚さ3cm程度あるハンドウイルカの脂皮を、表皮から筋肉層まで途切れることなく採取することが可能となり、採取した脂肪組織は、遺伝子解析、脂肪成分解析、さらに組織学的解析にも十分使用することができるようになった(本器具の開発については、現在、特許出願中)。

また、外科的生検は、健康な個体から少量の試料を得て、各種検査、実験に利用する手法ではあるが、対象個体には、程度は小さいものの侵襲的側面が強い。そこで、脂皮試料を採取した一連の採取過程で、傷の治癒経過の観察記録に加え、血液検査と体温測定を生検前後に実施し、生検操作による動物体への影響を調べた。その結果、傷は早ければ1日で埋まり、5~11日以内に表皮が完全に覆われることがわかった。血液検査では、生検後にリンパ球とフィブリノーゲンが大幅に上昇し、免疫反応と組織修復が進行していることを示唆していた。本研究で用いた方法と使用した開発器具(生検パンチャー)は、イルカ類の生体からの脂肪組織の安全かつ簡単な採取法として、生体に大きな影響を与えることなく利用できるものであることを示すことができた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 パンチャーの開発	発明者 森本俊樹, 山本浩司	権利者 船坂徳子, 吉岡基, 鈴木美和
産業財産権の種類、番号 特許、特願2022-191166	出願年 2022年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	鈴木 美和  (Suzuki Miwa)  (70409069)	日本大学・生物資源科学部・教授   (32665)	
研究分担者	船坂 徳子  (Funasaka Noriko)  (50616175)	三重大学・生物資源学研究所・准教授   (14101)	

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	杉浦 悠毅  (Sugiura Yuki)  (30590202)	京都大学・医学研究科・特定准教授   (14301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------