

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 9 日現在

機関番号： 13701
 研究種目： 若手研究(A)
 研究期間： 2009～2012
 課題番号： 21681029

研究課題名（和文）

希少食肉目動物の実践的保全にむけた繁殖生理の解明と繁殖生態調査法の確立

研究課題名（英文） Clarifying reproductive physiology and establishing reproductive status survey method for the conservation of endangered carnivores

研究代表者

楠田 哲士 (KUSUDA SATOSHI)
 岐阜大学・応用生物科学部・助教
 研究者番号：20507628

研究成果の概要（和文）：希少食肉目動物の保全にむけて、動物園飼育下の希少クマ科およびネコ科動物を対象に、繁殖生理の内分泌学的解明と繁殖生態調査法の確立に関する研究を行った。その結果、①チーターやホッキョクグマ等において糞を用いた生殖腺活動の非侵襲的内分泌モニタリング法を確立できた。②アムールトラやマレーグマ等の排卵様式等が明らかになった。③糞中の性ステロイドホルモンの濃度分布からアムールトラの性別と生理状態を推定でき、野外調査に応用できる可能性があることが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：Reproductive physiology and analysis method for reproductive status survey were studied for the conservation of endangered carnivores such as bear and felid species. As a result, non-invasive endocrine monitoring method using feces were established for assessing the gonadal activity in cheetah, polar bear and others. Using the monitoring method reproductive physiology such as ovulation pattern was clarified in Siberian tiger, sun bear and others. Concentration distribution of fecal sex steroid hormones was studied in Siberian tigers in zoo captivity. The distribution patterns may be able to reveal the sexes and reproductive status in free-ranging tigers.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	12,200,000	3,660,000	15,860,000
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2012年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
総計	16,400,000	4,920,000	21,320,000

研究分野：動物保全繁殖学

科研費の分科・細目：資源保全学・資源保全学

キーワード：糞中ホルモン，食肉目，絶滅危惧種，繁殖，動物園，ホルモン，繁殖生理，保全

1. 研究開始当初の背景

野生生物の危機的な状況を背景に、環境省が1995年に「生物多様性国家戦略」を策定した。この中で、希少野生動物の保全は、生息環境で行う生息域内保全の他に、動物園等の本来の生息地以外の場所で緊急避難的に

行う生息域外保全が重要であると明記された。加えて、生物多様性保全に関わる初の「生物多様性基本法」が2008年に施行された。こうした野生生物保全に対する取組において、世界の希少種を多く飼育している日本の役割は大きい。世界中で絶滅の危機に瀕して

いる野生動物の保護は、国際的な緊急の課題である。しかし、保護対策の基盤となる野外の生態調査は、これまで主に目視、カメラトラップ、ラジオトラッキング等による追跡調査で行われてきたため、情報の種類に限られ、生息域全体の繁殖状況や繁殖生態に関する確かな情報の把握は困難であった。また、野生動物の生息域内と域外での研究や保全活動は通常別々に実施されており、また重要な保全研究機関である動物園での調査結果が十分活用されていない現状にある。

2. 研究の目的

現状の希少種保全における課題を解決しうる調査システムを確立することを目的とした。世界に広く分布する生態系頂点の肉食動物、クマ科とネコ科の希少種を対象に、排泄物（糞）の生物科学的分析を主体とする2つの調査・解析方法を確立する。

① 繁殖生理の解析法の確立：動物園飼育個体の糞中のホルモン測定から繁殖生理を内分泌学的・生物化学的に解明する手法を確立する。これにより、動物園等での繁殖計画を促進し、生息域外保全に貢献する。

② 繁殖生態調査法の確立：野外から採取した糞の排泄個体情報を特定する分析手法を確立する。同時に、糞中ホルモン値を、飼育下での蓄積データと比較し、野生下での繁殖状況に関する生態調査を可能にする。これにより、生息域内での保全活動に貢献する。

3. 研究の方法

(1) 飼育個体からの研究材料の採取：動物園のクマ科とネコ科の希少種11種から排泄糞を定期的に採取した。補強サンプルとして、可能な個体は血液の採取を行い、また繁殖に関わる行動観察を行った。

(2) 糞中ステロイドホルモン代謝物の同定：採取した糞を乾燥させ、ステロイドホルモン代謝物を抽出して、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）と酵素免疫測定法（EIA）を併用して、代謝物の同定を行った。

(3) 糞中ホルモン量のモニタリングによる繁殖生理の解明：EIA法により、雌では卵巣黄体ホルモンの代謝物と卵胞ホルモンの代謝物など、雄では雄性ホルモンの代謝物などの動態を長期にモニタリングし、各動物種の繁殖季節や排卵様式等の基礎的な繁殖生理特性を明らかにした。採血可能な個体では、血液中のホルモン濃度の変動と、排泄された糞中での濃度変動とを比較した。また行動等の変化とも比較し、発情兆候を明らかにした。

(4) 排泄者情報の同定に要する分子生物学的・内分泌学的手法の確立：排泄者が既知の飼育個体の糞を使い、DNAを抽出、PCR増幅

した後、電気泳動法により、動物種と雌雄に特異なDNA断片を検出した。また、雌雄共通に数種の性ステロイドホルモンを測定し、これらの濃度分布傾向や比率から性別の指標値を検討した。

(5) 糞の分析限界条件の検討：野生個体の排泄糞を用いて繁殖生態または繁殖状況の調査が可能かどうかを明らかにするため、飼育下個体の排泄直後の糞を用いて、環境温度条件下での経過時間ごとの糞中ホルモン代謝物量の変化を追跡した。

(6) 生息域外・域内での実践：飼育下個体の排卵確認および妊娠診断を適切なタイミングで実施し、動物園での繁殖計画に役立てた。ロシアの生息地において採取された野生アムールトラ（シベリアトラ）の糞の分析により繁殖状況の調査を試みた。

4. 研究成果

(1) 糞中の性ステロイドホルモン代謝物の同定：チーターとツシマヤマネコにおいて、HPLC-EIA法により、糞中の性ステロイドホルモン代謝物の同定を行った。チーターの妊娠期の糞中には、数種のプロゲステロン（P）抗体免疫反応性ピークが検出され、このうちの3種を5 α -pregnan-3 α /B-ol-20-one、5 α -pregnan-3,20-dioneと同定し、他に5B-pregnan-3 α /B-ol-20-oneのわずかな免疫反応性を認めた。妊娠の前・中・後期の間で、これらの糞中プレグナンの構成に明らかな違いは認められなかった。また、ツシマヤマネコの妊娠期の糞中にも同様に、5 α -pregnan-3 α /B-ol-20-oneと5 α -pregnan-3,20-dioneが検出された。両種の糞中には、非代謝型のPはほとんど存在しなかった。両種の糞中エストロゲン（E）として、主に3種の物質が検出でき、このうち2種はestradiol-17B（E₂）とestrone（E₁）であり、E₂が主要排泄型であることが明らかとなった。

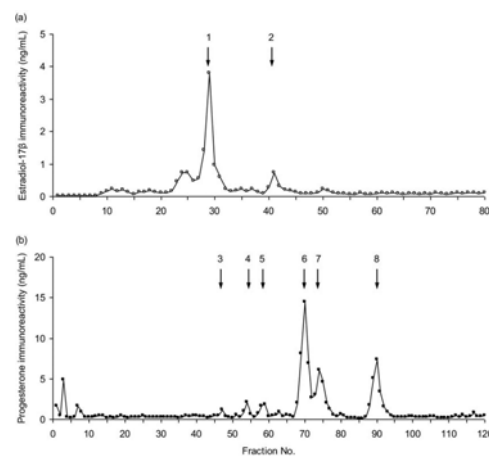


図1 雌ツシマヤマネコにおける糞中エストロゲン代謝物（上）とプロゲステロン代謝物（下）のHPLC-EIA

法による同定

1: estradiol-17 β , 2: estrone, 3: progesterone, 4: 5 β -pregnan-3 α -ol-20-one, 5: 5 β -pregnan-3 β -ol-20-one, 6: 5 α -pregnan-3 β -ol-20-one, 7: 5 α -pregnan-3 α -ol-20-one, 8: 5 α -pregnan-3, 20-dione.

チーターとツシマヤマネコの糞を用いた非侵襲的内分泌モニタリングにおいて、卵胞活動を調べる場合には糞中 E₂ の定量, 卵巣黄体活動や妊娠のモニタリングには, 5 α 系のプレグナンと高い交叉性を示す抗体を用いた定量法が有効であることが明らかとなった。

次に, ホッキョクグマの糞中の性ステロイドホルモン代謝物の同定を行った。雄個体の糞中から, androstenedione (AD), epiandrosterone および androsterone が同定でき, またテストステロン (T) や 5 α -dihydrotestosterone は非常に僅かであるか, 含まれていないことが判明した。雄ホッキョクグマの精巣活動の調査には, これらのアンドロジェンと高い交叉性を示す抗体を用いた定量法が有効であることが明らかとなった。

(2) 血中と糞中のホルモン動態

採血の機会が得られ, 血清サンプルを入手できた, チーターおよびアムールトラにおいて, 血中と糞中における P 値間の相関を調べた結果, 相対的な高低関係は血中と糞中とで矛盾はなかった (相関係数を求めるまでの血液サンプル数を集めることができなかったため動態のみ比較)。すなわち, 糞中 P の動態は, 体内 (血中) での動態をほぼ反映していることが判明した。

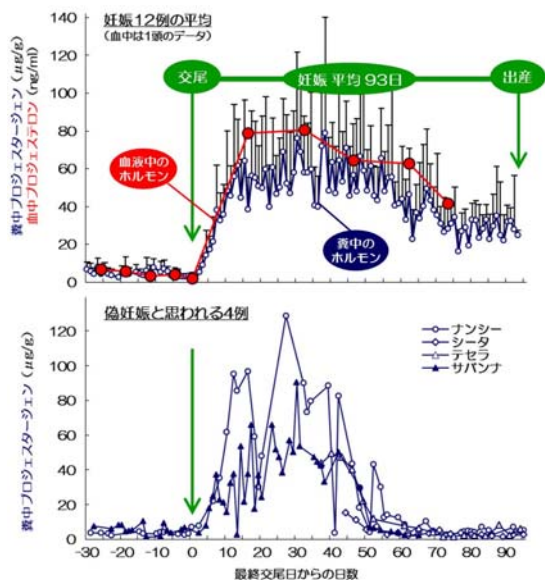


図 2 チーターの妊娠期 (上) および偽妊娠期 (下) の糞中プロゲステロン代謝物の動態 (妊娠期は血中プロゲステロン濃度の動態と比較)

(3) 繁殖生理の様式

P と AD 抗体を用いて, 糞中の代謝物を定量する EIA 法を確立した。サーバルにおいて, マウントまたは交尾行動がみられた個体では, その最終観察日の平均 2.4 日後から P 値が急激に上昇した。これらの行動がみられなかった個体の P は基底値を維持した。ローリングや, 顎や体の擦付けなどの行動変化が頻繁に観察された時期には, AD 値の明確な上昇が認められ, 発情 (卵胞発育) を反映しているものと考えられた。すなわち, サーバルは交尾排卵動物である可能性が高く, また発情に関連したいくつかの行動様式が明らかとなった。

チーター, アムールトラおよびマレーグマの雌個体について, 黄体活動の指標として P, 卵胞活動の指標として E₂ または AD を継続的に測定し, 行動等の記録との関連性を調べた。その結果, いずれの種も明確な繁殖の季節性を持たず, 基本的に交尾排卵様式で, 種や個体により程度の差はあるが, 稀に自然排卵が起こっている可能性が明らかになった。

雄ツシマヤマネコの糞中 T 含量は 1 歳未満の個体で低値を示したが, 2~10 歳までの個体では 2 倍以上有意に高く, 冬季 (12 月, 1 月, 2 月) に高値を示す個体が多く認められた。飼育下における雄の性成熟は 2 歳頃であると推定され, 2 年目の冬から繁殖期にむけて精巣活動が活発になっていくものと考えられた。

これらの知見を基に, チーター, アムールトラ, ツシマヤマネコ, サーバル, マレーグマでは, 飼育下個体の排卵状況を非侵襲的に捉えることができるようになった。さらにこの手法は, チーターやアムールトラといった大型ネコ科動物の妊娠診断に利用でき, 希少種の飼育下繁殖計画に実践的に役立てられるようになった。

(4) 排泄後のホルモン変化: 飼育下のアムールトラとチーターにおいて排泄直後に糞を採取し, 経過時間ごとの糞中 P 値を調べた。その結果, 両種とも少なくとも排泄直後 60 時間後までは, 排泄直後の数値とほぼ変わらないことが明らかとなった。

(5) 性別判別指標: 動物園飼育下のアムールトラにおいて, 妊娠期, 黄体期およびそれ以外の時期の雌と雄の各ホルモン測定値を比較検討した。雌雄の P-T 値間および P-AD 値間において, 顕著な分布傾向の違いが認められた。さらに, 雌雄間で P/T 比および P/AD 比の平均値を算出したところ, 「妊娠期・黄体期の雌 > その他の時期の雌 > 雄」の順に顕著な差が認められ, 糞中ホルモン値の分布傾向から性別判別ができる可能性が示唆された。

(6) 野生個体の繁殖生理状態の調査：野生アムールトラの糞（糞中 DNA から性判別）を用いて、糞中の性ステロイドホルモン代謝物含量を測定し、飼育下個体から得た基盤データ（前述(5)）と比較することにより、野生個体の繁殖生理状態を評価することを試みた。アムールトラでは、野生雄の糞 51 サンプルは飼育下雄のサンプルの濃度分布に一致し、また野生雌の糞 18 サンプルは飼育下雌の分布傾向と比較して黄体期や妊娠期のものは含まれていないと推定された。

5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計 6 件）

- ① 楠田哲士. 2013. 動物園と大学の共同研究における現状の体制と課題～動物園動物の繁殖生理学研究の場合～. 動物園研究 13/14: 8-16. (査読無)
- ② 楠田哲士, 足立 樹, 吉崎友紀, 下川優紀, 土井 守. 2012. ツシマヤマネコを含むネコ科動物の繁殖生理に関する研究. JVM 獣医畜産新報 65 (3): 199-203. (査読無)
- ③ 下川優紀, 菅原 愛, 荒木仁美, 山本幸介, 佐々木真一, 熊谷 岳, 楠田哲士, 羽山伸一, 小林和夫. 2012. ツシマヤマネコの繁殖にむけた動物園での性ホルモン測定の利用. JVM 獣医畜産新報 65 (3): 204-208. (査読無)
- ④ Adachi I, Kusuda S, Kawai H, Ohazama M, Taniguchi A, Kondo N, Yoshihara M, Okuda R, Ishikawa T, Kanda I, Doi O. 2011. Fecal progestagens to detect and monitor pregnancy in captive female cheetahs (*Acinonix jubatus*). J Reprod Dev 57(2): 262-266. (査読有) DOI : <http://dx.doi.org/10.1262/jrd.10-057T>
- ⑤ Adachi I, Kusuda S, Nagao E, Taira Y, Asano M, Tsubota T, Doi O. 2010. Fecal steroid metabolites and reproductive monitoring in a female Tsushima leopard cat (*Prionailurus bengalensis euptilurus*). Theriogenology 74: 1499-1503. (査読有) DOI : <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.04.031>
- ⑥ Kusuda S, Hosono O, Nakaya Y, Ogura G, Oshiro S, Takara J, Matsuda A, Doi O, Nagamine T, Murata K. 2010. Induced estrus in female small Asian mongooses (*Herpestes javanicus*) for the purpose of controlling invasive alien species in Okinawa Island. Mammal Study 35: 217-219. (査読有)

〔学会発表〕（計 40 件）

- ① Adachi I, Kusuda S, Mase C, Yoshizaki Y, Nagao E, Matsuyama K, Matsui K, Kotouge T, Akiba Y, Doi O. Pregnancy detection and endocrinological regulation of parturition in Tsushima leopard cat (*Prionailurus bengalensis euptilurus*). The Conference on "Non-invasive Monitoring of Hormones" (3rd Annual International Society of Wildlife Endocrinology Meeting) (Sep 23-26, 2012, Vienna, Austria).
- ② 足立 樹, 楠田哲士, 間瀬知弥美, 吉崎友紀, 永尾英史, 吉柳善弘, 松山 薫, 松井桐人, 小峠拓也, 秋葉由紀, 土井 守. 2012. 糞中のプロゲステラジェンおよびプロスタグランジン F2 α 代謝物の測定によるツシマヤマネコの妊娠判定法. 第 18 回日本野生動物医学会大会 (2012/8/23-26, 青森).
- ③ 深澤夏奈, 楠田哲士, 中村あゆみ, 足立 樹, 野田瑞穂, 齋藤圭史, 濱田美咲, 佐藤康弘, 佐野祐介, 土井 守. 糞中の性ステロイドホルモン代謝物を指標としたマレーグマとメガネグマの卵胞活動, 排卵および妊娠のモニタリング. 第 20 回希少動物人工繁殖研究会 (2012/7/2-3, 姫路).
- ④ 吉崎友紀, 楠田哲士, 相原亜希子, 足立 樹, 永尾英史, 吉柳善弘, 松山 薫, 松井桐人, 小峠拓也, 秋葉由紀, 前田亮平, 村山友美, 土井 守. 飼育下の雄ツシマヤマネコにおける年齢および季節に伴う生殖内分泌の変化. 第 20 回希少動物人工繁殖研究会 (2012/7/2-3, 姫路).
- ⑤ 楠田哲士, 足立 樹, 下川優紀, 吉崎友紀, 土井 守. ツシマヤマネコを含むネコ科動物の繁殖生理に関する研究. 公開シンポジウム「ツシマヤマネコにおける域外保全の科学」(2011/11/26, 東京).
- ⑥ 下川優紀, 荒木仁美, 山本幸介, 佐々木真一, 熊谷 岳, 楠田哲士, 羽山伸一, 小林和夫. ツシマヤマネコの繁殖にむけた動物園での性ホルモン測定の利用. 公開シンポジウム「ツシマヤマネコにおける域外保全の科学」(2011/11/26, 東京).
- ⑦ 野田瑞穂, 齋藤圭史, 中村あゆみ, 小島義則, 齋藤麻里子, 宮田桂子, 吉田哲也, 山本達也, 野島大貴, 寺田光宏, 楠田哲士, 堀 秀正. マレーグマにおける発情に伴う行動パターンの変化と糞中ホルモン動態との関係. 第 17 回日本野生動物医学会大会 (2011/10/1-2, 東京).
- ⑧ 足立 樹, 間瀬知弥美, 楠田哲士, 唐沢瑞樹, 谷口 敦, 近藤奈津子, 下川優紀, 大峽 芽, 川上茂久, 土井 守. リラキシン及びプロスタグランジン F2 α 分泌を指標としたチーターの正確な内分泌学的妊娠

判定法. 第 17 回日本野生動物医学会大会 (2011/10/1-2, 東京).

- ⑨楠田哲士, 村澤亨樹, 足立 樹, 土井 守, 福井大祐, 林 輝昭. 雌雄ホッキョクグマの国内飼育下における繁殖生理状態に関する調査研究. 第 19 回希少動物人工繁殖研究会 (2011/7/6-7, 姫路).
- ⑩楠田哲士, 中村あゆみ, 野田瑞穂, 齋藤圭士, 濱田美咲, 古川善正, 土井 守. 糞中の性ステロイドホルモン動態からみた雌マレーグマの発情周期について. 第 19 回希少動物人工繁殖研究会 (2011/7/6-7, 姫路).
- ⑪足立 樹, 楠田哲士, 皆川 至, 川上茂久, 大狭 芽, 高坂哲也, 土井 守. チーターの妊娠判定のための血中リラキシン測定の有効性. 第 151 回日本獣医学会学術集会 (2011/3/30-4/1, 東京).
- ⑫吉崎友紀, 足立 樹, 楠田哲士, 富岡由香里, 松井桐人, 小峠拓也, 秋葉由紀, 永尾英史, 長野理史, 川口 誠, 神宮有梨奈, 山本英恵, 佐藤英雄, 坪田敏男, 土井 守. 飼育下ツシマヤマネコの雌雄における糞中の性ステロイドホルモン代謝物の動態からみた繁殖生理状態について. 第 16 回野生生物保護学会・日本哺乳類学会 2010 年度合同大会 (2010/9/18-20, 岐阜).
- ⑬片山恵理子, 横山卓志, 楠田哲士, 清水泰輔, 近藤奈津子, 野本寛二, 谷口 敦, 唐沢瑞樹, 下川優紀, 橋川 央, 土井 守. サバルの排卵様式と発情行動について. 第 18 回希少動物人工繁殖研究会 (2010/6/10-11, 静岡).
- ⑭楠田哲士, 松田朋香, 足立 樹, 土井 守. 非侵襲的内分泌モニタリング法を用いたトラの排卵様式の解明と妊娠判定の有効性. 第 102 回日本繁殖生物学会大会 (2009/9/10-11, 奈良).
- ⑮足立 樹, 楠田哲士, 永尾英史, 平良由美子, 浅野 玄, 坪田敏男, 土井 守. ツシマヤマネコ (*Prionailurus bengalensis euphilurus*) の繁殖内分泌モニタリングのための糞中性ステロイドホルモン代謝物の定量と定性. 第 102 回日本繁殖生物学会大会 (2009/9/10-11, 奈良).

他 25 件

[その他] (計 2 件)

- ①どうぶつのくに Web サイト: 楠田博士の「月刊 どうぶつ繁殖日誌」 URL : <http://www.doubutsu-no-kuni.net/?cat=52>
- ②野田瑞穂, 齋藤圭史, 中村あゆみ, 楠田哲士. 2011. マレーグマの繁殖「クマたちの丘」で“ウメキチ”成長中. どうぶつと動物園 63(1): 16-21.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

楠田 哲士 (KUSUDA SATOSHI)
岐阜大学・応用生物科学部・助教
研究者番号: 20507628