

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2014

課題番号：23405042

研究課題名(和文) 韓国に生息するキバノロの生体及び生理機構の網羅的解明と潜在的感染症の疫学的調査

研究課題名(英文) Studies on the comparative morphology and physiology and survey of the infectious diseases in Water deer.

研究代表者

保田 昌宏 (Yasuda, Mashairo)

宮崎大学・農学部・准教授

研究者番号：10336290

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,400,000円

研究成果の概要(和文)：キバノロは、朝鮮半島および中国東北部に生息するシカ科に属する原始的な反芻動物であり、国際自然保護連合による評価では絶滅危惧種に指定されている。しかしながら、本種の生体および生理機構はほとんど明らかになっていないため、本研究で解析を実施した。その結果、本種における、他の反芻亜目の動物種と類似および相違点が明らかに成り、生物多様性の観点からとても興味深い知見が数多く得られた。

研究成果の概要(英文)：Water deer is the primitive ruminant belonging to the deer family, which lives in Korean Peninsula and Chinese northeast area, and is designated as endangered species by the international union for conservation and natural resources. However, the morphological and physiological characteristics in this animal have not been studied. As a result of this project, resemblance and difference points of this animal were clear. These results were very interesting according to the biodiversity.

研究分野：獣医学

キーワード：反芻亜目 キバノロ 生体機構 生理機構 感染症

1. 研究開始当初の背景

キバノロは、朝鮮半島および中国東北部に生息するシカ科に属する原始的な反芻動物であり、国際自然保護連合による評価では絶滅危惧種に指定されている。しかしながら、キバノロの生体および生理機構についてはほとんど明らかになっていない。これまでに本研究の代表者および分担研究者らによって、反芻亜目に属する多くの動物種(ウシ、ヒツジ、ヤギ、約、シカ、マメジカなど)の生体および生理機構を比較研究してきた実績がある。そこで本研究では、キバノロの生理生体機構に関する研究を実施する。さらに、他の反芻亜目の動物種と比較解析することによって、獣医・畜産領域のみならず、生物学や生態学、さらには生物多様性の観点からも意義がある情報が得られる。また本種が罹患している寄生虫などの感染症についても合わせて検査を実施し、潜在的な人獣共通感染症の有無を解析することが本研究開始当初の背景である。

2. 研究の目的

本研究では、下記に列記した三つの研究大項目について研究を行い、キバノロの生体および生理機構について明らかにし、他の反芻亜目の動物との比較解析を実施する。合わせて、他の反芻亜目の動物種で不明な点がある場合にはそれらの研究を実施し、キバノロの結果と比較解析する。

- (1) 形態学的な観察：キバノロの骨格、筋、内臓諸器官の解剖学的かつ組織学的な観察を実施し、他の反芻亜目の動物と比較解析する。
- (2) キバノロの潜在的感染症の探索：消化管寄生虫などを始めとする感染症を検索し、これまでに分類されてきた種と比較解析する。その中で未知の潜在的な人獣共通感染症の有無などを探索する。
- (3) 生理機構の解析：これまでにシカ科の動物の中では、大型のアカシカが冬期越冬戦略として、日内休眠様作用を用いて厳冬期の餌が乏しい時期の生存に役立っていることが報告されている。しかしながら、冬が厳しい韓国で生息するキバノロはシカ科であっても小型反芻動物である。これまでに、小型反芻動物が日内休眠様作用を用いているという報告は見られない。そこで、キバノロが冬期越冬戦略に日内休眠を使っているかどうかを明らかにする。

3. 研究の方法

各研究項目に分けて方法を列記する。

- (1) 形態学的な観察：韓国国内で採取されたロードキルおよび救護後に安楽殺されたキバノロ成獣個体とメスの子宮内にいた胎子個体のホルマリン

固定あるいはブアン固定標本を用いた。肉眼的に観察を行った後、組織を切り出した、組織は常法に従って試料作製を行ない、光学顕微鏡および走査型電子顕微鏡を用いて観察した。さらに、頭骨などの骨格標本も作製し、雌雄差や地域による差を比較解析した。主に観察した部位は、舌、咬筋、雌性生殖器、リンパ器官、腕神経叢、内分泌器官、外分泌器官などである。ホルマリンで固定された器官や組織片に関しては、正式な通関手続きを得て国内に持ち込み国内の大学で研究を実施した。

- (2) 韓国国内で採取されたキバノロ24個体の腸管の一部を2つに分け、それらをアルコール固定およびホルマリン固定した標本を用いた。アルコール固定した標本からDNAの抽出を行い、*Eimeria* ITS-1領域のプライマーを用いてPCRにより増幅し、塩基配列を決定した。さらにBlast検索で上位に上がったGenBank登録配列とのアラインメントを行い、系統樹を作成した。また、ホルマリン固定した標本を用いて、パラフィン切片を作製し、組織学的観察も行った。アルコール固定した標本からのDNA抽出やPCRに関しては、海外共同研究者であるソウル国立大学の木村順平教授の関係研究室で実施した。
- (3) キバノロの越冬戦略として日内休眠を使っているかどうかを明らかにするために、ソウル動物園で飼育展示されているキバノロを用いて実験を行った。実験は厳冬期(1月~2月)を選んで2回実施した。

頸部から背部の皮下に体温測定用のデータロガーを埋没させ冬期の体温を測定する。同時に環境温度も測定し、それぞれの温度推移を比較解析する。

の結果から、日内休眠様作用が得られた。そこで次に、深部体温を測定するためにメスの膈内にデータロガーを留置して約1ヶ月間体温の推移を観察し、環境温度との推移を比較解析する。実験に供したキバノロはソウル動物園で屋外に飼育展示されている個体を用いた。ソウル動物園においてキバノロを実験動物として用いる許諾を受けた後実験を行った。

4. 研究成果

各研究項目に分けて研究成果を列記する。

- (1) キバノロ成獣の舌は長さが約 11cm、幅が約 2cm で全体的にやや厚みがある

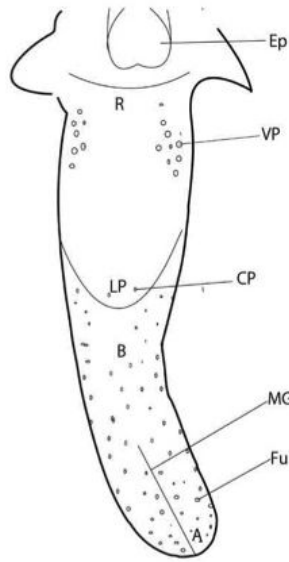


図1. キバノロ舌表面構造の模式図
Ep:喉頭蓋、R:舌根、B:舌体、A:舌尖、Fu:茸状乳頭、MG:舌正中溝、LP:舌隆起、CP:円錐乳頭、VP:有郭乳頭

舌尖から約 3cm 程度の舌正中溝が明瞭に観察された。舌乳頭は糸状乳頭、茸状乳頭、有郭乳頭および円錐乳頭が観察された。有郭乳頭は、舌根部に 20~30 個観察された。味蕾は成獣において 28%の茸状乳頭の背側面と有郭乳頭の側面に観察され、有郭乳頭の下部の固有舌筋間には舌腺が発達していた。胎子ではほぼ全ての茸状乳頭に味蕾が観察された。大型の円錐乳頭が舌隆起部で多く観察された。キバノロの舌は舌乳頭の分布や舌隆起の発達などの点において、他の反芻動物と類似していた。キバノロの生体防御を担うリンパ器官を形態学的に観察した。幼若な反芻動物では腸管に B 細胞が分化成熟する一次リンパ器官である回腸パイエル板と腸管の局所免疫を担う空腸パイエル板の形態的かつ機能的に異なる二種類のパイエル板が存在する事が知られている。本研究によって、幼若なキバノロにも二種類のパイエル板が存在する事が明らかになった。キバノロ咬筋の層板状構造を明らかにした。キバノロ頭蓋骨を構成する骨の癒合時期について、雌雄差や地域性の有無に関して比較検討した。キバノロ腕神経叢の解剖学的な破格を明らかにした。キバノロの腕神経叢にも筋皮神経ワナが存在することが明らかになった。キバノ

口腭臓に走行する動脈の破格について観察を行った。キバノロの雌性生殖器の特徴を他の反芻動物と比較解析した。

- (2) キバノロ 24 個体の腸管サンプルのうち、3 個体から PCR 産物が得られた。Blast 検索では牛の *Eimeria* 種が上位に上がった。*Eimeria tenella* をアウトグループに置いた系統樹解析では、キバノロ 1 個体のものは *E. wyomingensis* に近縁であることがわかったが、残りの 2 個体のものは牛の *Eimeria* 種とは遺伝的にやや離れていることがわかった(図 2)。後者

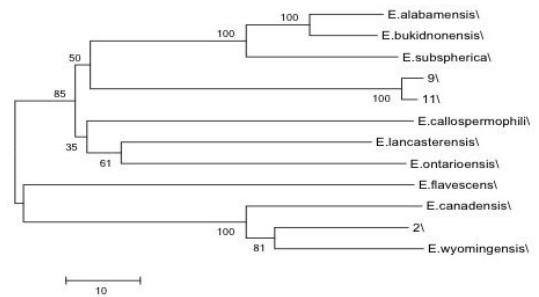


図2. キバノロ24個体のアルコール固定した腸管サンプルのうち、3個体からPCR産物が得られた。すなわち、約13%のキバノロが感染していることが明らかになった。3個体のPCR産物の塩基配列を確認すると、2種類のEimeria ITS-1遺伝子が確認された。これらの塩基配列をもとに、比較的相同性の高い種類のEimeria属コクシジウムのITS-1遺伝子とともに系統樹を作成すると、図のようになった。なお、サンプルは2、9、および11を示した。

の組織標本には、腸管の管腔側に、円形から楕円形のメロゾイトを含有する成熟シゾンや、宿主細胞の核の偏在化や巨大化を伴う未熟シゾン、およびガメートサイトやチゴートを確認した。つまりキバノロの約 12.5%にコクシジウム感染があることが明らかになった。さらに本研究で発見されたコクシジウムは、これまでに報告されていない種である可能性も有るため、今後規模を拡大してさらに調査する必要がある。

- (3) キバノロの越冬戦略として日内休眼様作用が観察されるかを 体温デー

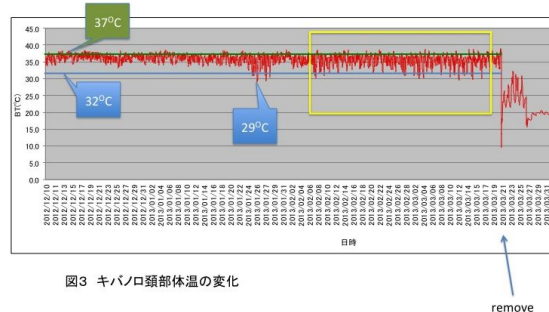


図3 キバノロ頸部体温の変化

タロガーを頸部皮下に埋没して観察した(図3)。同時に、外気温も測定した(図4)。気温は1月下旬にマナス 20 を計測し、2月中旬にかけて

マイナス 10 からマイナス 15 の低温状態を維持し、2 月下旬には徐々に気温が上昇していった。いっぽう、キバノロの体温は 2 月初旬より時折 30 以下になる日が続いた。30 以下になる時間は 24 時間以内で有り、その後体温は 37 度以上に回復するこ

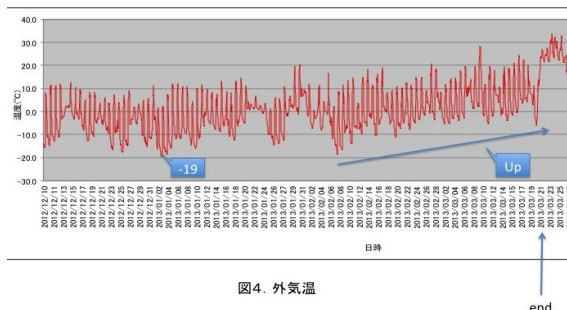


図4. 外気温

とを繰り返した。さらに、気温が上昇し始める 2 月下旬から 3 月上旬にかけても、30 以下となり、同様の傾向が観察された。つまりこの結果から小型反芻動物であるキバノロも越冬戦略として日内休眠様作用を用いていると思われた。次に深部体温の推移を計測するために、キバノロメスを留置して臍内に体温データロガーを留置し得られた 2 月上旬から 3 月初旬までの期間体温を測定した。外気温も同様に測定した。その結果、当該年は外気温がマイナス 5 程度にしか低下せず、キバノロの体温も 37 以上を維持していた。つまり、外気温があまり下がらなかったため、日内休眠様作用が観察されなかったと思われた。外気温に左右される日内休眠作用を確認するために今後さらに研究を続けていく必要がある。

(4) 謝辞

本研究は次の方々の多大なる協力によって実施することが出来たことをここに深謝する。ソウル国立大学獣医学部 木村順平教授、忠南野生動物救護センター キム ヨンジョン 獣医師、Seoul Zoo Animal Research Division, Dr E0, Kyung Yeon.

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. J. Oh, D. Koyabu, Y.K. Kim, M. Yasuda, J. Kimura. Cranial Structure Closure sequence of water deer. *Mammalian Biology*, 2014, 79S: 14. 査読無

2. W. Zhang, T. Nasu, M. Yasuda. A Mechanism for selective lymphocyte homing in bovine hemal nodes. *Vet Immunol Immunopathol*, 2013, 156: 211-214. 査読有

3. J. H. Sohn, M. Sasaki, M. Yasuda, Y. J. Kim, N.-S. Shin, J. Kimura. Immunolocalization of Cytoskeletal Proteins in the Testes of Two Asian Cervids: Water Deer (*Hydropotes inermis*) and Reeves' Muntjac (*Muntiacus reevesi*). *J Vet Med Sci*, 2013, 75: 1071-1075. 査読有

4. M. Sasaki, J. Kimura, J. H. Sohn, T. Nasu, N. Kitamura, M. Yasuda. The lamination of the masseter muscle in the water deer (*Hydropotes inermis*). *Mammal Study*, 2013, 38: 91-95. 査読有

5. M. Yasuda, R. Kikukawa, T. Nasu, J. Kimura. Gross Anatomical characterization of jejunal and ileal Peyer's patches in Japanese Black Calves. *Asian J Anim Vet Adv* 2013, 8: 135-138. 査読有

6. R. Kikukawa, J. Kimura, T. Nasu, M. Sasaki, K. Fukuta, M. Yasuda. Anatomical and histological characterization of ileal and jejunal Peyer's patch in lesser mouse deer. *Vet Immunol Immunopathol* 2012, 149: 103-107. 査読有

[学会発表](計 7 件)

1. S. Yamane, J.H. Sohn, K. Kusakabe, K. Kano, M. Yasuda, J Kimura, Y. Kiso. Morphology of the Korean water deer, *Hydropotes intermis argyropus*, placenta. 7th International Conference on Conservation Medicine. 2014.10.14-17. Vietnam National University of Agriculture. Hanoi (Vietnam).

2. 伊藤綾夏、保田昌宏 ほか .キバノロ腸管寄生コクシジウムの特徴 .第 157 回日本獣医学会 . 2014 年 9 月 9 日~12 日、北海道大学 (札幌市)

3. 伊藤綾夏、保田昌宏 ほか .キバノロ腸管寄生コクシジウムの特徴 .第 19 回日本野生動物医学会 2013 年 8 月 29 日~9 月 1 日、京都大学 (京都市).

4. 伊藤綾夏、保田昌宏 ほか . キバノ口の舌表面構造の観察 . 第 154 回日本獣医学会 . 2012 年 9 月 14～16 日 . 岩手大学(盛岡市) .
5. J. H. Shon, M. Sasaki, M. Yasuda et.al. Immunolocalization of cytoskeletal proteins in the testis of two Asian cervids: Korean water deer and Reeves' muntjac. 第 18 回日本野生動物医学会. 2012 年 8 月 23～26 日 . 北里大学 (十和田市) .
6. 伊藤綾夏、保田昌宏 ほか . キバノ口における舌および舌乳頭の形態学的観察 . 第 18 回日本野生動物医学会. 2012 年 8 月 23～26 日 . 北里大学 (十和田市) .
7. 保田昌宏 ほか . キバノ口の腸管関連リンパ組織の形態学的観察 . 第 18 回日本野生動物医学会. 2012 年 8 月 23～26 日 . 北里大学 (十和田市) .

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<https://srhumb.miyazaki-u.ac.jp/webopen/search?method=view&id=596>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

保田 昌宏 (YASUDA, Masahiro)

宮崎大学・農学部・獣医学科・准教授

研究者番号 : 10336290

(2)研究分担者

末吉 益雄 (SUEYOSHI, Masuo)

宮崎大学・農学部・獣医学科・教授

研究者番号 : 10305063

那須 哲夫 (NASU, Tetsuo)

宮崎大学・農学部・獣医学科・教授

研究者番号 : 40108725

佐々木 基樹 (SASAKI, Motoki)

帯広畜産大学・畜産学部・教授

研究者番号 : 50332482

森田 哲夫 (MORITA, Tetsuo)

宮崎大学・農学部・畜産草地科学科・教授
研究者番号 : 90301382

上村 涼子 (UEMURA, Ryoko)

宮崎大学・農学部・獣医学科・助教

研究者番号 : 90529190

(3)連携研究者

なし