

ライチョウの生息域外保全に向けた
繁殖生理の解明と性判別法の確立
に関する研究

2016 年

岐阜大学大学院連合農学研究科
生物生産科学
(岐阜大学)

山 本 彩 織

ライチョウの生息域外保全に向けた
繁殖生理の解明と性判別法の確立
に関する研究

山 本 彩 織

目 次

序 論	1
1 ライチョウについて	1
2 ニホンライチョウと保全の状況	1
3 鳥類の光周性と内分泌	6
4 繁殖生理のモニタリング調査方法と非侵襲的な調査試料	8
5 野生鳥類の性判別方法	9
6 研究の目的	11
実験材料および共通する実験方法	13
1 供試動物	13
2 糞中のステロイドホルモン代謝物の抽出	13
3 酵素免疫測定(EIA)法	13
3-1 試料類の調製	14
3-2 プレートコーティング	15
4 酵素免疫測定法による血中または糞中のステロイドホルモン代謝物の測定.....	16
(図表)	17
第 1 章 飼育下スバルバルライチョウの内分泌動態のモニタリング材料の検討	25
1-1 緒言	25
1-2 材料と方法	26
1-2-1 腸糞, 盲腸糞および血液の採取	26
1-2-2 糞中の性ステロイドホルモン代謝物の抽出と定量	27
1-2-3 血中の性ステロイドホルモンの抽出と定量	27
1-2-4 統計分析	27
1-3 結果	28
1-3-1 盲腸糞と腸糞のホルモン動態の比較	28
1-3-2 血中と糞中のホルモン動態の比較	28
1-4 考察	29
1-4-1 盲腸糞と腸糞のホルモン動態	29

1-4-2 血中と糞中のホルモン動態	30
1-5 まとめ	31
(第1章の図表)	33
第2章 飼育下スバルバルライチョウの繁殖生理の解明	43
2-1 緒言	43
2-1-1 スバルバルライチョウについて	43
2-1-2 スバルバルライチョウの繁殖 (行動的知見・生殖内分泌の研究・ 光との関係)	43
2-1-3 二次形質としての肉冠	45
2-1-4 換羽 (外観観察による知見・換羽の進行に関与するホルモン・換羽 とコルチコステロン)	46
2-1-5 ライチョウの体重・採食・脂肪蓄積の季節変化	47
2-1-6 本研究の目的	49
2-2 材料および方法	49
2-2-1 供試動物と飼育環境	49
2-2-2 糞の採取方法	50
2-2-3 糞中の性ステロイドホルモン代謝物の抽出と測定	50
2-2-4 気温と湿度の測定	51
2-2-5 外観の観察と記録	51
2-2-5-1 換羽量と体色の観察	51
2-2-5-2 採食量と体重の計測	51
2-2-5-3 眼窩上肉冠の観察	52
2-2-6 統計分析	52
2-3 結果	52
2-3-1 雌雄スバルバルライチョウにおける内分泌動態の長期モニタリング と性行動	52
2-3-1-1 東京都恩賜上野動物園での糞中のステロイドホルモン代謝物含量 の動態	52
2-3-1-2 富山市ファミリーパークでの糞中のステロイドホルモン代謝物含量 の動態	59

2-3-1-3 横浜市繁殖センターでの糞中のステロイドホルモン代謝物含量の 動態	72
2-3-1-4 長野市茶臼山動物園での糞中のステロイドホルモン代謝物含量の 動態	73
2-3-2 雄の眼窩上肉冠と糞中アンドロジェン含量の変化	75
2-4 考察	76
2-4-1 内分泌動態の長期モニタリングと性行動	76
2-4-1-1 雌スバルバルライチョウの繁殖生理	76
2-4-1-2 雄スバルバルライチョウの繁殖生理	78
2-4-1-3 コルチコステロンの季節変化	78
2-4-1-4 光感受性と光不応の成立—スバルバルライチョウの光周期 ...	79
2-4-1-5 照明条件の違いが内分泌に与える影響	80
2-4-1-6 光以外の調節因子—気温による内分泌調節	82
2-4-2 眼窩上肉冠とアンドロジェンの関係	84
2-4-3 換羽と内分泌	86
2-4-3-1 夏羽への換羽と内分泌	86
2-4-3-2 冬羽への換羽と内分泌	88
2-4-3-3 自然光と換羽	89
2-4-4 体重と採食量の変化と内分泌	90
2-4-4-1 照明時間と繁殖サイクルが体重および採食量に与える影響	90
2-4-4-2 甲状腺ホルモンおよび成長ホルモンによる体重および採食量の調 節	93
2-4-4-3 体重および採食量の推移への気温の影響	94
2-5 国内飼育下スバルバルライチョウの繁殖特性とニホンライチョウ飼育へ の役割	95
2-6 まとめ	97
(第2章の図表)	99
第3章 ライチョウにおける非侵襲的な性判別方法の確立	135
3-1 緒言	135
3-1-1 野生生物の生態調査のためのDNA性判別	135

3-1-2 鳥類における PCR 法を用いた DNA 性判別	135
3-1-3 本研究の目的	137
3-2 材料および方法	138
3-2-1 ニホンライチョウの糞の採取	138
3-2-2 糞由来 DNA の抽出	138
3-2-2-1 試料の調製	138
3-2-2-2 糞検体からの DNA 抽出	139
3-2-3 ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)法	140
3-2-3-1 試薬および試薬の調製	140
3-2-3-2 性染色体上の特異配列の増幅	141
3-2-3-3 アガロースゲル電気泳動法	142
3-2-4 ライチョウ CHD 領域のシーケンスとライチョウ用プライマーの設計	142
3-2-4-1 プライマー2550F/2718Rを用いた標的配列の増幅	142
3-2-4-2 雌特異バンドの精製	142
3-2-4-3 雌雄共通バンドの精製	143
3-2-4-4 プライマー2550F/2718R により増幅された配列のシーケンス ..	143
3-2-5 ライチョウ用プライマーの設計	143
3-2-6 性別決定の方法と Z 染色体由来バンドの出現率	144
3-3 結果	144
3-3-1 スパールバルライチョウ性別既知個体血液由来 DNA を用いたプライ マーの選択	144
3-3-2 ニホンライチョウ糞由来 DNA におけるプライマー2550F/2718R を用い た PCR 性判別	145
3-3-3 ニホンライチョウ糞由来 DNA における新規作成プライマー Lm-F/Lm-R を用いた PCR 性判別	146
3-3-4 Z 染色体由来増幅産物の出現率とその月別出現割合	146
3-4 考察	147
3-4-1 プライマーの選択	147
3-4-2 プライマー2550F/2718R を用いた PCR による性判別	148
3-4-3 新たなプライマーの設計による性判別率の改善	148

3-4-4 一部の糞検体で性判別ができなかった原因	150
3-5 まとめ	152
(第3章の図表)	154
第4章 野生ニホンライチョウの内分泌動態の調査	164
4-1 緒言	164
4-1-1 ニホンライチョウの現状	164
4-1-2 ニホンライチョウの繁殖行動	164
4-1-3 鳥類の糞中ホルモン測定	165
4-1-4 本研究の目的	165
4-2 材料および方法	166
4-2-1 ニホンライチョウにおける糞の採取と記録	166
4-2-2 PCR 法による性判別および性別の決定	166
4-2-3 糞中の性ステロイドホルモン代謝物の抽出と測定	167
4-2-4 統計分析	167
4-3 結果	167
4-3-1 PCR 性判別による糞検体の性別の決定	167
4-3-2 糞中のステロイドホルモン代謝物含量の雌雄差	168
4-3-3 雌ニホンライチョウにおける糞中ステロイドホルモン代謝物含量の月 間比較	168
4-3-4 雄ニホンライチョウにおける糞中ステロイドホルモン代謝物含量の月 間比較	168
4-3-5 つがい形成の有無による糞中ステロイドホルモン値の比較	169
4-4 考察	169
4-5 まとめ	172
(第4章の図表)	174
総 括	179
英文要約	182
謝 辞	186
引用文献	188

序 論

1 ライチョウについて

ライチョウ科は8属20種からなり、キジ目に属する (del Hoyo and Collar, 2014)。ライチョウ類は北半球に分布し、冬羽を持つものは ptarmigan, 持たないものは grouse と呼ばれている (中村, 2007a)。ライチョウ科の系統樹の解析はミトコンドリア遺伝子 (Gutiérrez et al., 2000; Lucchini et al., 2001; Dimcheff et al., 2002) や超保存エレメント (Persons et al., 2016) を用いて研究がなされている。ライチョウ科は低い外気温, 冬の短日や夏の白夜などの厳しい環境に適応するための進化を遂げてきた。これらの環境因子により脂肪蓄積 (Grammeltvedt and Steen, 1978), 体重 (Lindgard and Stokkan, 1989; Stokkan et al., 1995), 採食, 繁殖 (Silverin et al., 2008) がコントロールされることが報告されている。ライチョウ種 (*Lagopus muta*) の中でも最南端に生息するのが日本のニホンライチョウ (*Lagopus muta japonicas*) である (中村, 2007a)。

2 ニホンライチョウと保全の状況

ニホンライチョウは、ライチョウの一亜種であり、本州中部の標高 2400m 以上の山岳地帯に生息している。日本は山岳信仰文化が根強くあったが、1872 年に修験道が廃止され、本亜種を始めとする野生動物の乱獲が増加した (中村, 2013a)。ニホンライチョウは、1910 年には狩猟法の保護鳥, 1923 年には史蹟名勝天然紀念物保存法の天然紀念物に指定されたが、登山者の増加による高山環境の破壊とライチョウへの加害が目立つようになったことから 1955 年には国の特別天然紀念物に指定された (中村, 2013a)。また、岐阜県, 長野県および富山県では県を代表するシンボル鳥として「県鳥」に選定されている。

これまでのニホンライチョウの研究により、ライフサイクル (中村, 2006a), 食性 (石澤, 1928 ; 石澤, 1929 ; 千羽, 1965 ; 小林・中村, 2011), 感染症 (山口ら, 200 ; Hagihara et al., 2004; Ishihara et al., 2006; Murata et al., 2007), 遺伝的多様性 (Baba et al., 2001), 生息状況と個体数の推定 (丸山ら, 1971 ; 羽田ら, 1985 ; 堀田ら, 2008 ; 上馬・佐川, 2011) が

明らかにされている。

夏季の繁殖期を中心とした調査から、本亜種の繁殖生態が明らかにされつつある。ニホンライチョウの繁殖季節は雄のなわばり争いとともに始まる（中村，2007a）。雪解けが始まる4月になわばりを作り，5月に一夫一妻のペアが形成される（中村，2007a）。雌は通常約6個の卵を6月に産み，約21日間抱卵を行う一方で，雄はなわばりを見張り，雌を守る（中村，2006a）。卵から孵化した雛は雌により育雛され，早成熟性という特徴を持つ（中村，2007a）。9月には，雛は親鳥と同様の大きさまで成長し，10月に入る頃に親鳥と雛の家族集団は解消する（中村，2007a）。冬季は翌年の繁殖準備期間として雌雄で異なる標高での越冬がなされ，森林限界付近である標高2400～2600 mで雄が，2200～2400 mで雌がそれぞれ越冬する（中村，2013b）。

食性については，高山帯の積雪の状態，植物の成長状態および標高により採食する種や量に季節変化が見られている（小林・中村，2011；平林，1992）。冬季は高山帯の植生の多くが雪に埋もれるため，2600 m以下の森林限界付近で越冬するためダケカンバ（*Betula ermanii*）の冬芽を餌としているが，4月には繁殖地である高山帯の雪の下から出てきたガンコウラン（*Empetrum nigrum* var. *japonicum*）などの矮生常緑低木，夏季には草本植物の葉や花が中心となり，昆虫も採食も確認されている（千羽，1965；小林・中村，2011）。

疫学に関する研究においては，ニホンライチョウの糞中から細菌分離および重金属や薬剤耐性大腸菌の検出から，入山者を介した山岳の微生物汚染の状況が明らかにされている（山口ら，2000）。また，血液の塗抹観察により住血原虫であるロイコチトゾーン（*Leucocytozoon lovati*）感染が確認されている（Hagihara et al., 2004）。山岳ごとの感染率の差や夏に感染率が上昇する傾向が確認され，ブユ（*Simulium* spp.）などの媒介節足動物の分布や活動期間との関連が示唆されている（Murata et al., 2007）。排泄糞を用いたコクシジウム（*Eimeria* spp.）感染検査により，*E. uekii* および先行報告のないコクシジウム属原虫の接合子嚢が発見され，ロイコチトゾーンと同様に高い感染率が確認されている（Ishihara et al., 2006）。これらの原虫感染がニホンライチョウに与える影響については明らかではないが，*Leucocytozoon* 属の別種がニワトリに対して病原性を示すことや，コクシジウム原虫が

免疫力の低い幼若個体へ強い病原性を示すことから、本亜種の生存に影響することが懸念されている（佐藤，2008）。

遺伝子解析の研究では、ミトコンドリア DNA とマイクロサテライト DNA の解析がなされている。ミトコンドリア DNA のコントロール領域におけるハプロタイプの解析から、これまでに 6 つのハプロタイプが検出されており、山岳ごとに違いが見られている（Baba et al., 2001 ; 中村，2013c）。マイクロサテライト DNA の解析から、火打山・焼山，北アルプス，乗鞍岳・御岳，南アルプスの 4 つの遺伝的クラスターに分けられることが報告されている（Nishiumi et al., 2012）。これらの遺伝子情報から、ニホンライチョウは頸城山塊，北アルプス，乗鞍岳，御嶽山および南アルプスの 5 つの個体群に分けられると考えられており（環境省長野自然環境事務所，2014），生息山岳ごとの集団によりそれぞれの山域に移った時期が異なることに加え，山岳ごとの個体交流のない分化により，このような遺伝子分布になったと考えられている。また，ニホンライチョウとエゾライチョウ（*Tetrastes bonasia*）での同じコントロール領域におけるハプロタイプ数の比較から，ニホンライチョウは遺伝的多様性が低いことが明らかになり，本亜種の主な生息場所である高山帯における常緑針葉樹のハイマツ（*Pinus pumila*）帯が温暖なヒブシサーマル期（6000～9000 年前）に減少したために，ボトルネックが起こったことが原因として考えられている（Baba et al., 2001）。また，乗鞍岳におけるニホンライチョウの調査では，発見された巣の全てがハイマツ帯に営巣されており，本亜種の繁殖にハイマツが重要であることが明らかになっている（Sawa et al., 2011）。

個体数の調査に関して，1980 年代に羽田らによりなわばり調査から個体数は約 3000 羽と推定されたが（羽田ら，1985），2000 年代に中村らにより同方法で行われたなわばり調査の結果からは，生息個体数は 1700 羽と推定され，個体数が減少していることが明らかとなった（中村，2014）。ニホンライチョウは，2012 年に発表された環境省第 4 次レッドリストにおいて，野生での絶滅の危険性が高いとされる絶滅危惧 I B 類にランクが引き上げられている（環境省，2012）。個体数減少の原因として，ツーリズムの増加，地球温暖化，捕食動物の増加および非高山帯動物の生活の変化が挙げられている。登山客の増加に伴い，

山岳環境の汚染や感染症原因菌の持ち込みが懸念されている（山口ら，2000）。地球温暖化は，森林限界の上昇をもたらし，ニホンライチョウの生息に欠かせないハイマツ帯域の縮小による生息地の消失が懸念される。さらに，地球温暖化はニホンライチョウを取り巻く捕食圧や生息地である高山帯環境の変化といった生態系にも影響を与える。捕食者としては，哺乳類ではホンドテン (*Martes melampus melampus*)，ホンドオコジョ (*Mustela erminea nippon*)，ホンドキツネ (*Vulpes vulpes japonica*)，鳥類ではハシブトガラス (*Corvus macrorhynchos*)，チョウゲンボウ (*Falco tinnunculus*) などが挙げられ，近年ではチョウゲンボウの生息数の増加（中村，2013d），ハシブトガラスの目撃される山岳地帯の増加が報告されている（小林・中村，2006）。また，生息地に影響を与える問題として，ニホンジカ (*Cervus nippon*)，ニホンザル (*Macaca fuscata*)，ニホンイノシシ (*Sus scrofa leucomystax*) などの低山帯生息動物が高山帯に出現したことが挙げられる（中村，2006b）。これらの動物による高山植物の過剰な採食が，高山植生の破壊につながるものが懸念されている（中村，2006b）。さらに，2015 年には，ニホンザルによるニホンライチョウ雛の捕食が確認されている（中村・小林，2015）。このように，これらの低山帯生息動物は，間接的な影響にとどまらず，直接的にもニホンライチョウの生存を脅かすことが懸念される。

直面する絶滅からニホンライチョウを守るために，現在，生息域内と生息域外で本亜種の保全に向けた取り組みが進められている。2012 年には，絶滅のおそれのある野生動植物の種の保存に関する法律（種の保存法）に基づき，ライチョウ保護増殖事業計画が策定された（文部科学省・農林水産省・環境省，2012）。生息域内保全のために，個体数と生態についての継続的な調査や研究が行われている。近年では，雛の生存率が継続的に調査され，捕食と梅雨期に伴う悪天候のために孵化後 1 ヶ月齢に達するまでの死亡率が高いことが明らかにされている（Kobayashi and Nakamura, 2013）。これを受け，雛と母鳥を捕食や悪天候から守るためのケージを生息域内に設け，雛の死亡率が高いとされる孵化後 1 ヶ月間，雛と母鳥をケージ内外で飼育する方法が確立された。

一方で，生息域内保全と並行して，健全な野生個体群が存在する現段階から，野生個体群の急減に備えて，飼育や繁殖技術の確立および飼育下における科学的知見の集積を目的

とした生息域外保全にむけた活動が行われている。これらの取り組みにおいて、生理、成長、病理などのより詳細な生体情報の蓄積が期待できる。生息域外保全の歴史として、1963年より大町山岳博物館で本来の生息地よりも低地でのニホンライチョウの飼育が開始された（海川・宮野，1992）。低地での飼育には様々な問題が存在し、最大の問題はサルモネラ菌、トリアデノウイルス、寄生虫のコクシジウムなどによる感染症であった（中村，2013e）。しかし、これらを克服することができず、安定した飼育方法の確立ができぬまま 2004 年に最後の飼育個体が亡くなり、飼育が中断された（中村，2013e）。その後、ニホンライチョウの生息域外保全を行うには少なくとも飼育技術の向上が必要であるため、まず、海外で飼育方法が確立されている別亜種を用いて国内で飼育および繁殖の技術を確立した後、ニホンライチョウへ飼育を移行するという計画が立てられた（大町市ライチョウ保護事業計画策定委員会，2005；中村，2013a）。この計画により、動物園では、2008 年からライチョウの亜種であるスバルバルライチョウ（*L. m. hyperboreus*）の飼育が開始され、飼育下繁殖に向けた生物学的データの収集がなされた（高橋ら，2012）。2014 年 4 月には、ニホンライチョウの保護増殖事業の中・長期目標について、第一期ライチョウ生息域外保全実施計画が策定された（環境省長野自然環境事務所，2014）。同年 5 月に環境省と公益社団法人日本動物園水族館協会の間で生物多様性保全の推進に関する基本協定書が締結され、協会の事業として実施されることとなった（環境省長野自然環境事務所，2014）。2015 年の夏には、スバルバルライチョウの飼育で蓄積した技術を生かし、ニホンライチョウの飼育が開始された（渡部・高橋，2015）。生息域外保全においては、①個体数の安定している乗鞍岳からのファウンダー確保および飼育技術の確立、②近い将来に存続が困難になる危険性のある個体群の保険個体群の確立、③野生復帰させ得る個体の創出および確保、という段階的な進め方を目指している（環境省長野自然環境事務所，2014）。現在では、飼育下スバルバルライチョウと野生ニホンライチョウの盲腸内常在細菌叢の調査と比較が行われ（Ushida et al., 2016）、野生復帰に向けた課題の解明も開始されている。

このように、生息域内と生息域内の 2 つの側面からニホンライチョウの保全が進められている。

3 鳥類の光周性と内分泌

鳥類の生態や生活史を理解するためには、複合的に関係している要因を理解する必要がある、内分泌系の生理現象を解明することは生活史を理解する上で重要である(堀江, 2014)。鳥類は生殖腺を繁殖期にのみ発達させる適応戦略をとっている。日長は生殖腺活動に影響を与える大きな要因の一つであり、特に、生殖腺発達は日長に誘起される (Follett et al., 1974)。繁殖の開始は、一年の日長変化に関係しており、光の長さに反応する性質を光周性という (Rowan, 1925)。鳥類は、網膜以外にも松果体や脳深部に光受機能を持つが、光周性に関わるのは脳深部の光受容体であることが明らかにされている (Oliver and Baylé, 1982)。近年の研究から、光受容タンパク質であるオプシン 5 が発現している視床下部室傍器官の脳脊髄液接触ニューロンが光受容体であることが明らかとなった (Nakane et al., 2014)。

光周性が成立するためには、日長の読み取りが必要であり、生体時計機構がそれに利用されている (海老原ら, 2005)。概日時計は約 24 時間の周期でリズムを刻む自律振動態である。光周性は哺乳類と鳥類で類似したメカニズムであるが、異なる介在物により制御されている。哺乳類では、光情報は目の網膜で受容、視交叉上核を介して松果体へ伝達され、松果体で合成されるメラトニンが視床下部内側基底部 (MBH) の隆起部のメラトニンレセプターに伝達される (Rani and Kumar, 2014)。メラトニンは暗期情報を担っており、生殖腺刺激ホルモン放出ホルモン (GnRH) 分泌に向けた *Dio2* 遺伝子の発現を抑制するように働く (Watanabe et al., 2004)。このように、哺乳類においてはメラトニンの分泌亢進時間の長さが季節繁殖の開始に重要である。鳥類でも同様にメラトニンは松果体より分泌されるが、繁殖のタイミングを決める光周性には直接関与していない (Dawson et al., 2001)。ウズラ (*Coturnix japonica*) において概日時計遺伝子が MBH に存在することが明らかにされ、鳥類ではこの部位により日長時間測定が行われていることが明らかになった (Yasuo et al., 2003)。また、MBH における甲状腺ホルモンの濃度変化が光周性を調節することが明らかになっている。長日により、MBH で甲状腺ホルモン活性化酵素である 2 型脱ヨウ素酵素

(DIO2) をコードする遺伝子 *Dio2* の発現が誘導され、DIO2 により MBH でチロキシン (T₄) が生理活性の高いトリヨードサイロニン (T₃) に代謝され、GnRH の分泌が誘導される (Yoshimura et al., 2003)。甲状腺刺激ホルモンは日長刺激によって下垂体隆起葉において発現誘導を受けている (Nakao et al., 2008)。GnRH は視交叉前野に分布する神経細胞体で合成され、T₃ による正中隆起外部領域の形態変化が起こることで神経内分泌末端から分泌される (Yamamura et al., 2006)。

GnRH は下垂体前葉を刺激し、卵胞刺激ホルモン (FSH) と黄体形成ホルモン (LH) が分泌される。雌では、FSH 受容体は顆粒層細胞にのみ存在し、顆粒層細胞の増殖と LH 受容体の増加を起こす (横山, 2007)。LH 受容体は顆粒層細胞と卵胞膜に存在し、莢膜細胞では LH 作用によりコレステロールからアンドロステンジオン (AD) が生成され、AD は FSH により芳香化されてエストロジェンとなる (佐久間, 2006)。エストロジェンは肝臓に作用して卵黄前駆物質を産生し (今井, 2003)、血液中に放出された卵黄前駆物質が下垂体からの FSH によって卵細胞内への移行により蓄積され、卵胞の急成長が起こる (田中, 2007)。排卵には、LH の一過性の大量放出とプロジェステロン (P₄) 分泌の高まりが必須であり、卵胞膜に P₄ が働き、タンパク質分解酵素の合成を促進し、この酵素により卵胞壁の細胞間結合が緩まることで卵胞破裂が起こり、またプロスタグランジンやバゾトシンなどが卵管に順次作用することで放卵が起こる (今井, 2003)。

雄では、FSH 受容体は、精細管内のセルトリ細胞に存在し、アンドロジェン結合タンパク質の産生を刺激し、テストステロン (T) と結合して濃度を安定化させ、適切な量の精子形成を確保する (Reece, 2011a)。LH は精細管内のライディッヒ細胞に作用して間質の分化を刺激し、ライディッヒ細胞の発達と T の分泌を促す (Brown et al., 1975; Reece, 2011a)。LH がライディッヒ細胞膜の受容体に結合すると、細胞メッセンジャーとして働くサイクリック AMP の生産を活性化する (Schillo, 2011)。cAMP はミトコンドリアへのコレステロール輸送を促進するために細胞内の変化を誘導し、コレステロールはミトコンドリア内でデスモラーゼという酵素によってホルモンの律速前駆体であるプレグネノロンに変換される (Schillo, 2011)。LH はステロイド合成急性制御タンパク質の生産を増加させることで、

ミトコンドリア膜を通過して行われるコレステロール輸送を促進させる (Schillo, 2011)。このように LH は cAMP を介してアンドロジェンの産生を促進する。アンドロジェンの代表である T は間質細胞から精細管に拡散し、精細管内で、T は生殖細胞の減数分裂過程を補助することで、精子形成を維持している (Reece, 2011a)。

生殖腺刺激ホルモン分泌と生殖行動はニューロペプチドである生殖腺刺激ホルモン抑制ホルモン (GnIH) により抑制される。GnIH は、視索前野に存在するアロマターゼ細胞の GnIH レセプターに結合し、アロマターゼ細胞を脱リン酸化することで活性を誘起する (Ubuka et al., 2014)。脳内で T が酵素により芳香化され、ニューロエストロジェン (エストラジオール-17 β : E₂) に変換されることで生殖行動が抑制される (Dickens et al., 2014; Ubuka et al., 2014)。

このように、繁殖は視床下部一下垂体一生殖腺軸によりコントロールされている。

4 繁殖生理のモニタリング調査方法と非侵襲的な調査試料

繁殖に関わる現象はホルモンによりコントロールされており、視床下部一下垂体一生殖腺軸の機能状態を知るために、ホルモン動態をモニタリングすることは効果的である。ステロイドホルモンは内分泌器官から標的組織へ輸送されるため、循環血液中のホルモンレベルはもっとも即座の内分泌状況の情報を提供する。ライチョウ科のホルモンに関する先行研究 (Stokkan et al., 1986b; Hannon and wingfield, 1990; Hissa et al., 1983) においても、生体または死体から集められた血液が測定に使われていた。しかし、生体からの採血時には、個体の保定や、場合によっては麻酔が必要となる。これらの過程は個体へストレスとなることが懸念される。また、野生個体では、同一個体の繰り返しの捕獲は困難である。そのため、血液を用いるホルモン研究の実行可能性は、採血頻度と得られる血液量により制限されることとなる (Goymann, 2005)。

鳥類においてはウズラで、血清中と糞中の T 濃度の比較が行われ、これらの T 濃度は同時期に増加することが確認された (Ishii et al., 1994)。排泄糞の採取は生体への侵襲性がなく、糞は血液の代替となる材料であり、繰り返しの採取が容易である。このように、糞中

ステロイドホルモン代謝物含量の分析は長期的な研究に適しており、行動や換羽といった他のパラメータと組み合わせることで内分泌生理機能の正確な見通しが可能になる (Schwarzenberger, 2007)。

ライチョウにおいて糞中ホルモン測定を行い、行動や体の変化、飼育環境の変化等とともに評価することは、生殖腺活動や飼育環境の影響の詳細を明らかにすることを可能にし、飼育下管理戦略を促進させることが期待できる。

5 野生鳥類の性判別方法

鳥類のホルモンモニタリングを行うには、試料の由来、特に性別情報を把握することが前提となる。従来の性判別方法としては、腹腔鏡検査、総排泄腔検査 (Cerit and Avanus, 2007)、超音波検査 (Hildebrandt et al., 1995)、核型解析 (Cerit and Avanus, 2007) が挙げられる。腹腔鏡検査は腹部をわずかに切開し腹腔鏡や耳鏡を用いて生殖腺を観察する方法である。生殖腺を可視化できるため確実な方法である。しかし、麻酔や切開は個体に侵襲的であり、熟練した獣医学的技術が必要である。また、例えばペンギン類では、臓器器官や気嚢膜が脂肪に囲まれているため、生殖腺を可視化できない可能性があることも指摘されている (Costantini et al., 2008)。総排泄腔検査は個体の総排泄腔において雄の生殖突起の有無を見る方法である。尿生殖道の構造をサイズで区別できるほどに成熟した個体の場合には有効であるが、性成熟を迎えていない幼鳥への適応には技術を要する (Costantini et al., 2008)。超音波検査はドップラー現象を利用して腹部に超音波をあてて反射した超音波を画像データとして受信し、腹部の内部を観察する方法である。気嚢の位置と超音波で読み込むことのできる範囲の関係により性判別ができない場合がある (Jensen and Durrant, 2006)。核型解析では、羽や血液から得られた細胞を培養し、顕微鏡下で Z 染色体や W 染色体を確認する方法である。核型解析には細胞分裂中期の細胞を使用するため、特殊な培養技術が必要である (Cerit and Avanus, 2007)。また、染色体の凝集度合いによっては染色体の見分けが困難な場合がある。

より非侵襲的な方法として、体の外部形態や行動の違いによって性判別を行う方法 (Swengel, 1978) や、糞中の性ステロイドホルモン含量の測定による判別方法が挙げられる (Stavy et al., 1978)。これらの方法は、生殖腺が未発達な幼鳥に対しての適用は不十分である。また、成鳥であっても繁殖期などの限られた期間に見られる性差は、他の時期に性判別指標として適用できない。糞中の性ステロイドホルモン含量での性判別には E_2 と T の比 (E/T) が用いられ、雌で雄よりも大きな値を示すことが様々な鳥類で認められている (Czekala and Lasley, 1977; Bercovitz et al., 1978; Stavy et al., 1978)。雌雄の E/T 比は種により異なり、正確な性判別には種ごとに性別既知個体の試料を含めた E/T 比の指標が必要であり、単一個体の性判別の場合には値の解釈が困難である。また、 E/T 比による性判別効率は 90%以上であるが (Stavy et al., 1978)、指標よりも高い値を示す雄や低い値を示す雌もいたことが報告されており (Bercovitz et al., 1978)、そのような個体では性別を誤って評価してしまうことになる。

近年では DNA を用いた Polymerase Chain Reaction (PCR) 法による性判別法が実用化されている。鳥類の性染色体は雄が Z 染色体を 2 本持つホモ型、雌は Z 染色体と W 染色体を 1 本ずつ持つヘテロ型である。chromo-herlicase-DNA-binding protein (CHD) 遺伝子という高度に保存された配列が W 染色体上に発見され (CHD-W: Ellegren, 1996; Griffiths et al., 1996)、のちに相同な配列が Z 染色体上に発見された (CHD-Z: Griffiths and Korn, 1997)。CHD-Z ではグルタミン酸とリシンに富んだ 88 個のアミノ酸からなる親水性ドメインを持つ特徴がある (Griffiths and Korn, 1997)。CHD 遺伝子は高度に保存されているが、CHD-W と CHD-Z は異なる遺伝子座であるため異なる分子進化を遂げてきたと考えられている (Fridolfsson and Ellegren, 2000)。CHD 遺伝子の配列からプライマーが設計され、CHD-W と CHD-Z のイントロンの長さの違いから PCR 反応による増幅断片のサイズの違いを利用した性判別が行われ、走鳥類以外の様々な種に適用できることが報告されている (Griffiths et al., 1998; Kahn et al., 1998; Fridolfsson and Ellegren, 1999; Segelbacher and Steinbrück, 2001)。これらのプライマーは、CHD 遺伝子のイントロンを含む遺伝子配列に隣接した領域に設計されている (Dubiec and Zafalska-Neubauer, 2006)。しかし、モリフクロウ (*Strix aluco*) (Griffiths

et al., 1998) やワシタカ科のいくつかの種 (Ito et al., 2003) などでは、イントロンの長さに違いが少ないため、CHD 遺伝子による性判別が困難な場合があることが報告されている。性判別に使用することが可能である他の配列として W 染色体上の 0.6 kbEcoR I 断片 (EE0.6) の配列が挙げられ (Ogawa et al., 1997), 相同な配列が Z 染色体上に存在する (Itoh et al., 2001)。EE0.6 プライマーと Z 染色体と W 染色体に共通する Spindlin 遺伝子配列から作成したコントロールプライマーを組み合わせることで深胸類において広く性判別に活用できることが報告されている (Itoh et al., 2001)。走鳥類においては Z 染色体と W 染色体の相同性が高く、CHD 遺伝子や EE0.6 配列を用いた判別が利用できないことから (Itoh et al., 2001), kW1 配列を用いた性判別法が報告されている (Huynen et al., 2002 ; 尾形ら, 2006 ; 海老原ら, 2008)。

これらの手法において、分析に使用する DNA 資源として、血液、唾液などの採取時に侵襲性のあるものや、羽軸根、孵化後の卵殻膜、排泄された糞などの非侵襲的な試料が用いられてきた (Bush et al., 2005; Muksh et al., 2011)。特に、希少種や捕獲が困難な種の場合において、個体を捕獲することなく DNA 資源を得ることができるこれらの試料を性判別に用いることに関心が寄せられている (Taberlet and Luikart, 1999)。

このように、性判別を行う際の非侵襲的な試料としても排泄糞は注目されている。ニホンライチョウは性的二形を示すため外観での性判別が可能であるが、生活痕として発見された糞については雌雄いずれが排泄したものかは不明である。野生個体の糞を用いてホルモン測定を行い、野外における繁殖特性を把握するためには、糞が雌雄いずれのものかを把握することが課題である。糞から DNA を得て性判別を行うことは、本亜種の雌雄における繁殖の生態生理を解明する上で必須である。

6 本研究の目的

ニホンライチョウの生理の詳細を解明することは、本亜種の保全を進める上で重要であり、生殖内分泌についての情報は、特に飼育下繁殖を進める上で重要である。本研究では、個体にストレスを与えない試料として糞を用い、スバルライチョウにおいて本種の

繁殖特性を解明する。また、希少種であるニホンライチョウの内分泌動態の調査を試みた。

まず、第1章において、飼育下スバールバルライチョウの糞試料を用いて、糞中のステロイドホルモン動態のモニタリング法の確立を行った。第2章では、同一個体の内分泌動態を長期的にモニタリングすることで、本亜種の内分泌の年変動を明らかにした。また、肉冠や換羽、採食量の変化といった外的変化と内分泌変化の関係、日長が繁殖に与える影響について合わせて評価した。第3章では、野生のニホンライチョウの糞中のステロイドホルモン含量の測定を行うにあたり、性別情報を把握するために、糞より DNA を得て、性判別を行う性判別方法の確立を行った。第4章では、野生のニホンライチョウの糞を用いてステロイドホルモン含量を測定し、本亜種の内分泌動態の調査を行った。

実験材料および共通する実験方法

1 供試動物

国内の動物園で飼育されているスバルバルライチョウおよび野生のニホンライチョウを研究対象種とした。スバルバルライチョウの供試個体情報について表 1、ニホンライチョウの糞のサンプリング状況について表 2 に示した。糞は、ペレット状のものを腸糞、泥状のものを盲腸糞として外見上から区別して採取した（図 1）。野生下のニホンライチョウにおいては、主に乗鞍岳を中心に、火打山、陰火打、焼山、御嶽山、仙丈岳、白根三山、荒川岳および聖岳で糞の採取を行った（図 2）。個体の生活痕として発見された糞、または個体の排泄を確認した糞を採取した（図 3）。個体の排泄を確認した糞については、排泄個体の足環の色と性別情報を記録した。

2 糞中のステロイドホルモン代謝物の抽出

凍結状態の糞をそれぞれアルミカップ（6 号）に入れたものを恒温乾燥機に並べ、100℃下で約 2 時間熱乾燥させた。乾燥させた糞試料は室温に戻した後、チャック付きポリ袋（サンジップ 窓付き A-4）に入れ、抽出操作まで-20℃下で冷凍保存した。乾燥させた糞試料を、袋の上から手で細かく解し、可能な限り羽毛や餌などの未消化部分を除き、0.100 g を正確に秤量した。秤量した各試料をガラス製試験管（16×100mm）に入れ、80%メタノールを 5 ml 加えた。これをミキサー（Thermo-Mixer TM-127, サーモニクス）で 30 分間攪拌し、4℃下で一晩静置した。その後、4℃下 2500 rpm で 10 分間遠心分離を行い、メタノール層と試料層に分離し、メタノール層の上清をマイクロチューブに分取し、測定時まで-20℃下で保存した。

3 酵素免疫測定（EIA）法

P₄, E₂, T, AD およびコルチコステロン（B）濃度は、EIA 法により次の通り測定した。

3-1 試薬類の調製

- 1) EIA buffer : リン酸水素二ナトリウム二水和物 (MERCK) 7.12 g と塩化ナトリウム (和光純薬工業) 8.50 g を純水 1,000 ml に溶解し (調整前 pH 9.0 程度), pH 7.2 に調整した。その後, 脂肪酸不含ウシ血清由来アルブミン (A7030, Sigma-Aldrich) 1 g を加え, 使用時まで 4℃ 下で保存した。アルブミン添加後は 2 週間以内に使用した。
- 2) Washing buffer : 純水 2,000 ml に Tween80 (Sigma-Aldrich) 900 μ l をスターラーで撹拌しながら少量ずつ滴下した。さらに 30 分間撹拌した後, 使用時まで 4℃ 下で保存した。
- 3) Coating buffer : 炭酸ナトリウム十水和物 (和光純薬工業) 2.574 g および炭酸水素ナトリウム (和光純薬工業) 1.758 g を, 純水 600 ml に溶解し (調整前 pH 9.7 程度), pH 9.6 に調整した。使用時まで 4℃ 下で保存した。
- 4) ヤギ抗ウサギ IgG 抗体 (二次抗体) : ヤギ抗ウサギ IgG 抗体 (Jackson Immuno Research Laboratories) 150 μ l に Coating buffer 204 ml を加え, 1,360 倍希釈抗体液を作製した (プレート 20+ α 枚分のコーティング用)。
- 5) ステロイドホルモン標準液 (スタンダード) : 各ステロイドホルモンの純品 (和光純薬工業または Sigma-Aldrich) 10 mg をエタノール (試薬特級, 和光純薬工業) 10 ml に溶解した (1 mg/ml)。この溶液 1 ml に純水 9 ml を加え 10 倍希釈し (100 μ g/ml), このうち 1 ml に EIA buffer 9 ml を加えてさらに 10 倍希釈した (10 μ g/ml)。その後は, 同様に EIA buffer で 10 倍ずつ希釈し, 100 ng/ml の保存用標準液を調製した。この標準液を 300 μ l ずつ分注し -20℃ 下で保存した。使用時には, EIA buffer を用いて 2 倍希釈を繰り返す, 各濃度の標準液各 200 μ l を作製した (表 3)。
- 6) ステロイドホルモン抗体 (一次抗体) : ウサギ抗ステロイドホルモン血清の凍結乾燥品 (あすか製薬メディカルまたはコスモバイオ) を純水 10 ml で溶解した。測定するステロイドホルモンの種類や各々の抗体の力価に応じて, EIA buffer を用いて適切な濃度まで希釈し, その抗体希釈液を 800 μ l ずつ分注し (プレート 1 枚分), 使用時まで -20℃ 下で凍結保存した。使用時には, EIA buffer を加えて希釈し, 表 3 に示した最終希釈倍率とした。なお, 各抗体における各種ステロイドホルモンとの交叉率は, 表 4 の通りであ

る。

- 7) ステロイドホルモン標識物 (Horseradish peroxidase (HRP) 標識抗原): HRP 標識ステロイドホルモン 1 ml/vial (コスモバイオ) を HRP 酵素活性維持保存液 (Guardian™ Peroxidase Conjugate Stabilizer / Diluent, Pierce) を用いて希釈し 4℃下で保存した。使用時には、このうち 80 µl を EIA buffer 8.0 ml で約 100 倍希釈し (プレート 1 枚分), 表 3 に示した最終希釈倍率とした。

8) 発色液

<基質液 A> 過酸化尿素 (Sigma-Aldrich) 0.5 g, リン酸水素二ナトリウム二水和物 (Merck) 9.0 g およびクエン酸一水和物 (Sigma-Aldrich) 5.15 g を, 純水 500 ml に溶解した。使用時まで 4℃下で遮光保存した。

<基質液 B> 3,3',5,5'-テトラメチルベンチジン (Sigma-Aldrich) 0.25 g (0.002M), ジメチルスルホキシド (Sigma-Aldrich) 20 ml (4%) およびクエン酸一水和物 (Sigma-Aldrich) 5.15 g (0.05M) を, 純水 480 ml に溶解した。使用時まで 4℃下で遮光保存した。

<発色液> 基質液 A および B を各 5 ml (プレート 1 枚分) ずつ使用直前に遮光状態で混合し攪拌した。

- 9) 発色停止液 (1N 硫酸): 濃硫酸 (和光純薬工業) 20 ml を氷水冷下で 700 ml の純水に少量ずつ加えて 1N とし, 使用時まで 4℃下で保存した。

3-2 プレートコーティング

Coating buffer で希釈したヤギ抗ウサギ IgG 抗体をスターラーで攪拌しながら, 96 穴マイクロプレート (Nunc イムノプレート, 製品番号 442404, Nunc) の各ウェルに 100 µl ずつ分注した。20℃に設定した低温恒温器内で 2 時間インキュベートし, 二次抗体をウェルに固着化した。ウェル内の Coating buffer を完全に除去し, プレート保存液として EIA buffer を各ウェル 200 µl ずつ加え, プレートフィルムでプレートをシールし, 20℃に設定した恒温器内で 30 分間インキュベートを行った。使用時まで 4℃下で保存した。

4 酵素免疫測定法による血中または糞中のステロイドホルモン代謝物の測定

IgG 抗体を固層化したマイクロプレート内のプレート保存液 (EIA buffer) をアッセイ直前に除去し, Washing buffer を各ウェルに 300 μ l ずつ加えウェル内を洗浄した (プレートリンス)。プレートリンスを 2 回行った後, Washing buffer を完全に取り除いた。各ウェルに試料または標準液を 20 μ l 入れ, 一次抗体, HRP 標識抗原の順に各ウェルに 100 μ l 分注した (表 5)。その後, プレートフィルムでプレートをシールし, 4°C 下で 24 時間インキュベートを行った。インキュベート後, ウェル内の溶液を除去し, Washing buffer 300 μ l を用いて, プレートリンスを計 4 回行った。Washing buffer を完全に取り除いた後, 発色液を各ウェルに 100 μ l 分注した (表 5)。プレートフィルムでプレートをシールし, 37°C に設定した恒温器内で 60 分間インキュベートを行った。インキュベート後すぐに発色停止液を各ウェルに 100 μ l 加え, 発色を停止させた (表 5)。吸光マイクロプレートリーダー (iMark, バイオ・ラッドラボラトリーズ) により, 波長 450 nm における吸光度を測定し, 専用測定解析ソフトウェア (マイクロプレートマネージャー 6.0, バイオ・ラッドラボラトリーズ) を用いて標準曲線を作成し, 各試料中のホルモン濃度を計算した。

表 1 実験に供試したスバルバルライチョウの個体情報

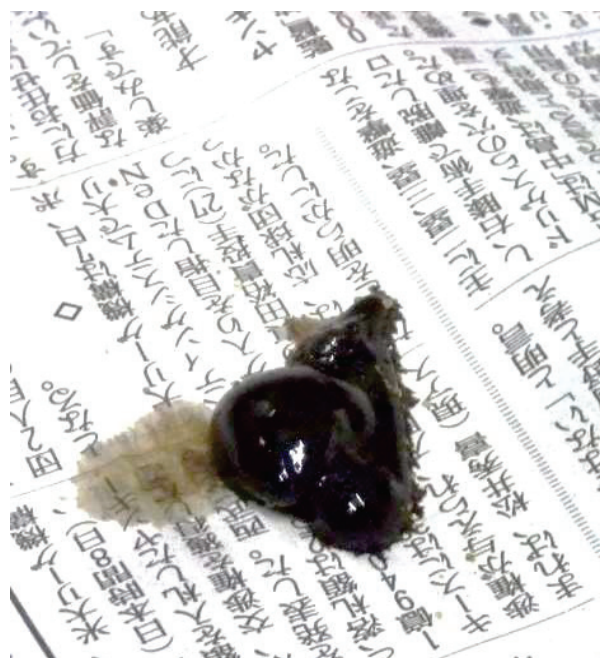
国内血統 登録番号	個体名	性別	飼育施設	出生年月日	備考
S10	4943	雌	東京都恩賜上野動物園	2009 年 7 月 16 日	2012 年 8 月 13 日死亡
S32	8513	雌		2009 年 7 月 16 日	2012 年 7 月 23 日死亡
S48	7591	雌		2009 年 7 月 16 日	
S98	4242	雌		2011 年 7 月 5 日	2012 年 10 月 18 日死亡
S120	8065	雌		2011 年 7 月 19 日	
S135	1418	雌		2012 年 7 月 3 日	
S258	1719	雌		2014 年 7 月 11 日	
S13	9337	雄		2009 年 7 月 16 日	2013 年 12 月 27 日死亡
S38	0865	雄		2009 年 7 月 16 日	2014 年 8 月 3 日死亡
S118	8528	雄		2011 年 7 月 19 日	2014 年 6 月 19 日死亡
S195	2013	雄		2013 年 7 月 3 日	
S257	1298	雄		2014 年 7 月 11 日	
S66	66-32	雌	富山市ファミリー パーク	2010 年 8 月 1 日	
S127	6228-03	雌		2011 年 7 月 25 日	
S137	上-08	雌		2012 年 7 月 5 日	
S152	6228-15	雌		2012 年 7 月 12 日	2013 年 10 月 24 日死亡
S225	6228-1513	雌		2013 年 7 月 17 日	2014 年 5 月 5 日死亡
S53	キタロウ	雄		2009 年 7 月 17 日	2014 年 4 月 2 日死亡
S65	65-27	雄		2010 年 8 月 1 日	2012 年 6 月 28 日死亡
S85	72-11	雄		2010 年 8 月 2 日	2014 年 8 月 11 日死亡
S130	6228-06	雄		2011 年 7 月 31 日	
S136	6632-12	雄		2012 年 7 月 5 日	2013 年 10 月 22 日死亡
S148	6228-11	雄		2012 年 7 月 12 日	
S198	28-17	雄		2013 年 7 月 3 日	
S150	No.6	雌	長野市茶臼山動物園	2012 年 7 月 12 日	
S237	No.7	雌		2013 年 7 月 22 日	
S60	No.5	雄		2010 年 7 月 6 日	
S272	No.9	雄		2014 年 8 月 9 日	
S208	No.4	雌	横浜市繁殖センター	2013 年 7 月 5 日	
S239	No.8	雄		2013 年 7 月 22 日	2014 年 9 月 4 日死亡
S176	02-09	雌	いしかわ動物園	2012 年 7 月 23 日	
S142	02-05	雄		2012 年 7 月 7 日	

表2 ニホンライチョウの糞試料の採取状況

	採取地	合計
2013 年	乗鞍岳	95
	白根三山	
2014 年	乗鞍岳	86
	火打山	
	陰火打山	
	焼山	
	仙丈岳	
	白根三山	
	荒川岳	
2016 年	聖岳	8
	御嶽山	
合計		189



腸糞



盲腸糞

図1 スパールバルライチョウの腸糞と盲腸糞の外観

生活痕として発見された糞



個体の排泄を確認した糞



図3 野生下のニホンライチョウからの排泄糞の採取

表3 酵素免疫測定法において使用した各ステロイドホルモンの標準物質、抗体および HRP 標識物とそれらの使用時濃度

標準物質 標準曲線の濃度範囲	抗体(一次抗体) HRP 標識物	使用時の 最終希釈倍率
プロゲステロン pregn-4-ene-3,20-dione (161-14531, 和光純薬工業) 0.049 (St.1) ~ 50 ng/ml (St.11)	anti progesterone-3-CMO-BSA (LC-28, あすか製薬メディカル) または anti progesterone-3(E)-CMO-BSA (FKA302-E, コスモバイオ)	100 万倍
	progesterone-3-CMO-HRP (FKA301, コスモバイオ)	100 万倍
エストラジオール-17 β estra-1,3,5(10)-triene-3,17 β -diol (052-04041, 和光純薬工業) 0.024 (St.1) ~ 25 ng/ml (St.11)	anti estradiol-3-CME-BSA (FKA236-E, コスモバイオ)	150 万倍
	estradiol-3-CPE-HRP (FKA235, コスモバイオ)	300 万倍
テストステロン 17 β -hydroxyandrost-4-en-3-one (208-08341, 和光純薬工業) 0.098 (St.1) ~ 100 ng/ml (St.11)	anti testosterone-11 α -succinate-BSA (ED-131, あすか製薬メディカル) または FKA104-E, コスモバイオ)	100 万倍
	testosterone-11 α -succinate-HRP (FKA103, コスモバイオ)	20 万倍
アンドロステンジオン 4-androstene-3,17-dione (A9630, Sigma-Aldrich) 0.012 (St.1) ~ 12.5 ng/ml (St.11)	anti 4-androstene-3,17-dione-3-CMO-BSA (FKA138-E, コスモバイオ)	4000 万倍
	4-androstene-3,17-dione-3-CMO-HRP (FKA137, コスモバイオ)	100 万倍
コルチコステロン 11 β ,21-dihydroxypregn-4-ene-3,20-dione (037-17583, 和光純薬工業) 0.024 (St.1) ~ 25 ng/ml (St.11)	anti corticosterone-3-CMO-BSA (FKA420-E, コスモバイオ)	50 万倍
	corticosterone-3-CMO-HRP (FKA419, コスモバイオ)	20 万倍

表4 ステロイドホルモンの各抗体における各種ステロイドとの交叉率

(a) プロジェステロン抗体
(LC-28, あすか製薬メディカル)

ステロイド	交叉率 (%)
progesterone	100
5 α -pregnanedione	62.2
pregnenolone	6.26
11-deoxycorticosterone	3.88
17 α -hydroxyprogesterone	2.25
11 α -hydroxyprogesterone	1.23
20 α -hydroxyprogesterone	0.51
testosterone	0.18
11-deoxycortisol	0.14
androstenedione	0.12
5 α -dihydrotestosterone	0.12
corticosterone	0.07
17 α -hydroxypregnenolone	0.05
dehydroepiandrosterone	0.04
cortisol	0.01
cortisone	0.01
aldosterone	0.01
estrone	0.01
estradiol-17 β	0.01
estriol	0.01
androsterone	0.01

(a') プロジェステロン抗体
(FKA302-E, コスモバイオ)

ステロイド	交叉率 (%)
progesterone	100
5 α -pregnanedione	12.50
11 α -OH-Progesterone	5.30
20 α -OH-Progesterone	0.20
Pregnenolone	2.00
DOC	0.01
17 α -OH-progesterone	0.01
corticosterone	0.01
cortisol	0.01
aldosterone	0.01

(b) エストラジオール-17 β 抗体
(FKA236-E, コスモバイオ)

ステロイド	交叉率 (%)
estradiol-17 β	100
estradiol-3-glucuronide	56.3
estradiol-3-sulfate	26.8
estrone-3-glucuronide	1.20
estrone-3-sulfate	0.86
estrone	0.80
estriol	0.50
testosterone	0.05
pregnenolone	0
progesterone	0
cortisol	0
cortisone	0
testosterone	0
4-androstenedione	0
dehydroepiandrosterone	0
dihydrotestosterone	0

(c) テストステロン抗体
(ED-131, あすか製薬メディカル)

ステロイド	交叉率 (%)
testosterone	100
5 α -dihydrotestosterone	41.3
androstenedione	2.07
epitestosterone	0.80
androsterone	0.07
deoxycorticosterone	0.04
dehydroepiandrosterone	0.02
progesterone	0.02
etiocholanolone	< 0.01
17 α -hydroxyprogesterone	< 0.01
cortisol	< 0.01
corticosterone	< 0.01
cortisone	< 0.01

(c') テストステロン抗体
(FKA104-E, コスモバイオ)

ステロイド	交叉率 (%)
testosterone	100
5 α -dihydrotestosterone	10.0
4-androstenedione	0.5
androsterone	0.2
5-androstene-3 β ,17 β -diol	0.1
5 α -androstane-3 α ,17 β -diol	0.2
5 β -androstane-3 α ,17 β -diol	0.07
cortisol	0.02
corticosterone	0.01
pregnenolone	0.03
progesterone	0.01
17 α -hydroxypregnenolone	< 0.01
aldosterone	< 0.01
11-oxo-testosterone	0
dehydroepiandrosterone	< 0.01
estradiol	< 0.01

表4 ステロイドホルモンの各抗体における各種ステロイドとの交叉率

(d) アンドロステンジオン抗体 (FKA138-E, コスモバイオ)		(e) コルチコステロン抗体 (FKA420-E, コスモバイオ)	
ステロイド	交叉率 (%)	ステロイド	交叉率 (%)
4-androstenedione	100	corticosterone	100
5 α -androstenedione	35.0	deoxycorticosterone	8.0
dehydroepiandrosterone	4.5	progesterone	2.1
androstenedione	1.5	11-dehydrocorticosterone	0.23
progesterone	1.2	cortisol	0.2
testosterone	6.0	4-androstenedione	0.05
cortisol	0.32	cortisone	0.05
corticosterone	0.20	17 α -hydroxy-11-deoxy-corticosterone	0.05
estradiol	0.01	17 α -hydroxy-progesterone	0.04

表5 酵素免疫測定法において用いた試料量および各試薬量

	EIA Buffer (μ l)	標準液 または試料 (μ l)	一次抗体 (μ l)	HRP 標識抗原 (μ l)	発色液 (μ l)	発色 停止液 (μ l)
NSB (non-specific binding) 値	120	—	—	100	100	100
Bo (maximum binding) 値	20	—	100	100	100	100
標準液	—	20	100	100	100	100
測定試料	—	20	100	100	100	100

第1章 飼育下スバールバルライチョウの内分泌動態のモニタリング材料の検討

1-1 緒言

生物の内分泌状態を知るために、血液を用いることでサンプリング時の生体状況を把握することができる。鳥類においても、様々な種で血液を用いた内分泌動態のモニタリング研究が行われている。また、スバールバルライチョウでは、狩猟により得られた死体からの血液を用いることで、野生での生殖腺活動や内分泌変動がモニタリングされている (Stokkan et al., 1986b)。また、いくつかのライチョウ科の種では飼育方法が確立されており、飼育下個体の血液を用いることで、光周性の研究が進められてきた (Sharp and Moss, 1977; 1981; Stokkan and Sharp, 1980a; 1980b; 1980c; 1984; Stokkan et al., 1982; 1988)。しかし、採血には技術を要し、また、個体への侵襲性が高いため、高頻度のサンプリングは困難となる。一方、動物園動物や野生動物の繁殖生理状態を知るための方法の一つとして、排泄物を用いたホルモン代謝物含量の測定による内分泌動態のモニタリングが脊椎動物の様々な種で広く取り入れられている (Schwarzenberger, 1996; Schwarzenberger and Brown, 2013)。一般的に、鳥類においては血液から糞へ性ステロイドホルモンが移行することが知られており (Klasing, 2005)、これまでにライチョウ科の鳥では、エリマキライチョウ (*Bonasa umbellus*) (Zimmerman et al., 2013)、ヨーロッパオオライチョウ (*Tetrao urogallus*) (Thiel et al., 2005)、キジオライチョウ (*Centrocercus urophasianus*) (Blickley et al., 2012) でストレス評価のための糞を用いた B 含量の測定が報告されている。

また、スバールバルライチョウでは、ペレット状の腸糞と泥状の盲腸糞の二種類の糞が排泄される。スバールバルライチョウをはじめ、キジ目の鳥類は発達した盲腸を持つ (Clench, 1999)。鳥類の盲腸には、消化と発酵、栄養吸収、免疫グロブリンと抗体の生産、有益な微生物活動、水分の利用と吸収、尿酸のアミノ酸代謝といった機能がある (Clench, 1999)。微細な消化断片や可溶性物質が盲腸に入りこのような作用を受ける一方で、大きな消化断片は盲腸に入ることなく排泄される (Björnhag, 1989; Remington, 1989)。盲腸への取り込みは、結腸の蠕動運動による尿や消化断片の逆流により行われる (Björnhag, 1989)。

盲腸内での微生物発酵により得られた短鎖脂肪酸を吸収および異化することでエネルギー源として利用される (McWhorter et al., 2009)。排泄経路の違いやこれらの盲腸機能により、盲腸糞と腸糞とでは含まれるホルモン量が異なることが予想されている (Klasing, 2005)。そのため、盲腸糞と腸糞のホルモン動態の特性を明らかにし、いずれの糞をホルモン含量の測定に用いるのが適切であるかについても明らかにする必要がある。また、鳥類においても、ホルモン動態のモニタリングに糞が血液の代替として利用できることが報告されているが、ライチョウにおけるこれまでの糞中のホルモン含量の測定は、B 含量を測定したもののみであり、性ホルモンについては、血中のホルモン濃度を反映しているかは明らかではない。また、血液を用いた場合の測定値は、採血時における体内のホルモン濃度の値を表すのに対し、糞を用いた場合の測定値は、微生物による代謝を受け排泄まで一定期間の蓄積をされたホルモンの代謝物含量値を表す (Goymann, 2005)。Goymann (2012) は、季節による気温や餌の種類および量の変化、個体の代謝速度や能力、腸内微生物構成の変化は、糞中のホルモン代謝物の種類と量に影響し、糞中のホルモン代謝物含量値の解釈には注意が必要であると述べている。

本研究では、個体へストレスを与えることなく、内分泌動態を把握するために、非侵襲的な材料である糞を用いた内分泌動態のモニタリング方法の確立を目的とした。まず、スバルバルライチョウは、腸糞と盲腸糞の2種類を排泄するため、いずれを内分泌動態のモニタリングの材料として用いるのが適切かを両者の糞中ホルモン動態を比較することで検討した。これを確かめた上で、サンプリング方法を統一し、血中と糞中のホルモン動態の比較を行った。これらの実験から、スバルバルライチョウの内分泌動態をモニタリングするにあたり、排泄糞を用いることの妥当性を評価した。

1-2 材料と方法

1-2-1 腸糞および盲腸糞と血液の採取

糞の採取頻度は個体や時期によって異なったが、おおよそ週 1~4 回であった。チャック付きのポリ袋に入れ、-20℃下で分析まで冷凍保存した。ペレット状のものを腸糞、泥

状のものを盲腸糞として外見上から区別して採取した。糞の採取状況と個体の情報を表 1-1 に示す。採血当日の午前、午後、採血翌日の午前、午後に糞の採取を行った。血液は、翼静脈または中足静脈から採取し、血清または血漿に分離させた後、 -20°C 下で冷凍保存した。血液採取個体の情報を表 1-2 に示す。

1-2-2 糞中の性ステロイドホルモン代謝物の抽出と定量

腸糞中および盲腸糞中のステロイドホルモンの抽出はメタノール抽出法（実験材料および共通する実験方法；2 糞中のステロイドホルモン代謝物の抽出）により行った。糞中 E_2 および P_4 含量の測定には、分取したメタノール抽出液を EIA buffer にて 10 倍希釈したものを測定試料とした。糞中 T および AD 含量の測定には、分取したメタノール抽出液を EIA buffer で 5 倍希釈したものを測定試料とした。この測定試料を用いて、雌では糞中 E_2 および P_4 含量、雄では糞中 T および AD 含量をそれぞれ EIA 法にて測定した。

1-2-3 血中の性ステロイドホルモンの抽出と定量

血中のステロイドホルモンの抽出はエーテル抽出法により行った。すなわち、凍結保存した全血、血清または血漿を抽出前に 4°C 下で融解し、シリコンコーティングされたガラス製試験管に $100\ \mu\text{l}$ を分取した。ジエチルエーテル（和光純薬工業）を $600\ \mu\text{l}$ 加えて攪拌し、 -60°C のディープフリーザー内で水層を凍結させ、別のシリコンコーティングされたガラス製試験管にエーテル層のみを傾斜して移し、この操作を 3 回繰り返した。得られたエーテル層を 45°C に加温したウォーターバスを用いて、ジエチルエーテルを完全に気化させた。抽出に用いた血漿または血清と等量の EIA buffer $100\ \mu\text{l}$ を各試験管に分取し、再溶解したものを測定試料とした。この測定試料を用いて、雌では血中 E_2 および P_4 濃度、雄では血中 T 濃度をそれぞれ EIA 法にて測定した。

1-2-4 統計分析

腸糞中と盲腸糞中の各ホルモン値の相関はピアソンの積率相関係数を算出し、相関の有

意差検定を行った。また、スチューデントの t 検定により有意差検定を行った。血中および糞中の各ホルモン値の相関についてもピアソンの積率相関係数を算出し、相関の有意差検定を行った。

1-3 結 果

1-3-1 盲腸糞中と腸糞中のホルモン動態の比較

腸糞中および盲腸糞中のホルモン動態について、雌の E_2 、 P_4 含量および雄の T 含量をそれぞれ図 1-1~3 に示した。また、腸糞中および盲腸糞中のホルモン値の相関を図 1-4、ホルモン含量の比較を図 1-5 に示した。雌の腸糞中および盲腸糞中の E_2 含量の変動は類似したパターンを示し (図 1-1)、同日に採取した腸糞中と盲腸糞中の E_2 値間には有意な正の相関が見られた ($n = 567$, $r = 0.63$, $p < 0.01$, 図 1-4a)。 E_2 含量の変動範囲は、腸糞中で $0.01 \sim 3.12 \mu\text{g/g}$ 、盲腸糞中で $0.13 \sim 10.57 \mu\text{g/g}$ であり、盲腸糞中では腸糞中の平均 5.36 倍有意に高い値を示した ($p < 0.01$, 図 1-5)。腸糞中および盲腸糞中の P_4 含量の変動は類似したパターンを示し (図 1-2)、腸糞中と盲腸糞中の P_4 値間には有意な正の相関が見られた ($n = 567$, $r = 0.23$, $p < 0.01$, 図 1-4b)。 P_4 含量の変動範囲は、腸糞中で $0.10 \sim 1.50 \mu\text{g/g}$ 、盲腸糞中で $0.74 \sim 4.64 \mu\text{g/g}$ であり、盲腸糞中で平均 4.54 倍有意に高い値を示した ($p < 0.01$, 図 1-5)。雄の腸糞中および盲腸糞中の T 含量の変動は類似したパターンを示し (図 1-3)、腸糞中と盲腸糞中との T 値間には有意な正の相関が見られた ($n = 550$, $r = 0.61$, $p < 0.01$, 図 1-4c)。 T 含量の変動範囲は、腸糞中で $0.02 \sim 1.91 \mu\text{g/g}$ 、盲腸糞中で $0.13 \sim 11.93 \mu\text{g/g}$ であり、盲腸糞中で平均 10.80 倍有意に高い値を示した ($p < 0.01$, 図 1-5)。

1-3-2 血中と糞中のホルモン動態の比較

同一個体において採血および腸糞の採取を行い、ホルモン値を比較した。糞は採血当日の午前および午後と採血翌日の午前および午後に採取を行った。雌における血中と糞中の E_2 値は、血中と採血当日午前、当日午後、翌日午前および翌日午後に採取した糞中において、それぞれ相関係数 $r = 0.64$, 0.75 , 0.66 , 0.61 となり、全て有意な正の相関関係が認め

られた（表 1-3）。P₄値においては、血中と採取したいずれの時期の糞中においても、有意な相関関係は認められなかった（表 1-3）。雄における血中と糞中の T 値は、血中と採血当日午後、翌日午前および翌日午後に採取した糞中において、それぞれ相関係数 $r = 0.27, 0.33, 0.74$ の正の相関関係が見られた（表 1-3）。血中 T 濃度と糞中 AD 含量においては、血中と採血当日午前、当日午後、翌日午前および翌日午後に採取した糞中において、それぞれ相関係数 $r = 0.51, 0.70, 0.54, 0.65$ となり、全て有意な正の相関関係が見られた（表 1-3）。血中ホルモン濃度が高値を示した際、糞中ホルモン含量も高い傾向が認められた（図 1-6,7）。

1-4 考 察

1-4-1 盲腸糞中と腸糞中のホルモン動態

雌の E₂ および P₄ 含量と雄の T 含量は盲腸糞において腸糞より有意に高い値を示した。スバルバルライチョウでは、腸糞は頻繁に排泄されるが、盲腸糞の排泄回数は少なく、1 日に 1~4 回である（東京都恩賜上野動物園、私信）。盲腸糞の体内での保持時間は長く（岡本, 2001）、ニワトリ（*G. g. domesticus*）では、盲腸に入る消化物は盲腸を経由しない消化物の 3 倍の保持時間となることが報告されている（Klasing, 2005）。このことから、盲腸糞ではホルモン代謝物が蓄積され、腸糞より高濃度のホルモン値が検出されたと考えられた。腸糞中と盲腸糞中の E₂, P₄ および T 含量を比較した報告は見当たらないが、ニシアメリカフクロウの一亜種（*Strix occidentalis occidentalis*）において、両糞中での B 含量が比較された結果、盲腸糞中で腸糞中に比べて約 1.7 倍高い値が検出されたことが報告されている（Tempel and Gutiérrez, 2004）。一方、レア（*Rhea americana*）では、腸糞中のグルココルチコイド代謝物の動態が血中 B 濃度の動態と類似したことが確認されているが、盲腸糞中に比べ腸糞中で高い濃度が検出されている（Lèche et al., 2011）。この報告ではレアの盲腸糞量が多いためにホルモン濃度が希釈されたためであると考察している。したがって腸糞中と盲腸糞中のホルモン含量は、種やホルモンの種類により異なる可能性がある。スバルバルライチョウにおける糞中の性ステロイドホルモン代謝物含量は、盲腸糞中と腸糞中とで正の相関が見られ（E₂ : $n = 567, r = 0.63, p < 0.01$, P₄ : $n = 567, r = 0.23, p < 0.01$, T :

$n = 550$, $r = 0.61$, $p < 0.01$), 類似した動態を示した。このことから, 継続的に内分泌動態をモニタリングする場合には, 分析に用いる糞は腸糞または盲腸糞のいずれかに採取を統一しなければならないことを明らかとなった。スパールバルライチョウにおいては盲腸糞中の性ステロイドホルモン代謝物含量が顕著に高いことから, 腸糞への盲腸糞のコンタミネーションは, 得られた測定値を過大評価することになるため, 糞の種類を確実に区別して採取する必要がある。腸糞は排泄頻度が高く, 採取が容易であり, 外観による判断で盲腸糞の混入を避けることができるため, 以降の実験には腸糞を用いることとした。

1-4-2 血中と糞中のホルモン動態

糞は非侵襲的な材料であるが, 血液に替わるホルモンモニタリングの試料として有効であるかを調べる必要がある。本実験では, 一年を通して血中と糞中のホルモン値を比較することで, 糞中のホルモン代謝物含量の動態が血中のホルモン濃度の変化を反映しているかを確かめた。雌の E_2 , 雄の T および AD において, 血中と糞中のホルモン値に正の相関が認められた。特に, 血液と採血翌日の午前および午後に採取した糞中のホルモン代謝物含量に高い正の相関が見られた。雄ガチョウ (*Anser domestics*) において, 糞中 T 代謝物含量の動態が血漿中 T 濃度の変化を反映していることが報告されている (Hirschenhauser et al., 2000)。また, 雄ガチョウに $GnRH$ を投与すると, T 値のピークは血中で投与 90 分後, 糞中で投与 2~6 時間後に見られたことが報告されている (Hirschenhauser et al., 2000)。カナダヅルの一亜種である *Grus canadensis pratensis* の雌雄に副腎皮質刺激ホルモン ($ACTH$) を投与すると, B のピークが血中で投与 1 時間後に, 血中ピーク後 2 時間以内に糞中でのピークが見られ, 血中の B 濃度の変化は投与 5 時間以内の糞中で捉えられたと結論付けている (Ludders et al., 2001)。そのため, 本研究においては, 採血時のホルモン濃度は採血後 5 時間以内, すなわち採血後となる採血当日の午後の糞検体に最も反映されることが予想された。血液と採血当日の午後の糞中で E_2 および AD では最も高い相関係数が確認され, 血中ホルモン濃度と有意な相関関係が見られたが, P_4 および T では相関関係が認められなかった。野生のアデリーペンギン (*Pygoscelis adeliae*) における血中と糞中のホルモン値の

比較では、Bにおいて雄では弱い相関、雌では相関関係がなかったことが（雄：n=71, $r=0.297$, $P=0.012$, 雌：n=50, $r=-0.166$, $P=0.0248$ ）、Tにおいて雄では中程度、雌では弱い相関（雄：n=71, $r=0.531$, $P<0.001$, 雌：n=50, $r=0.294$, $P=0.039$ ）が見られたことが報告されている（Ninnes et al., 2010）。本研究では血中と採血翌日の午後の糞中において強い正の相関が見られた（ E_2 : n=46, $r=0.61$, T: n=56, $r=0.74$, AD: n=51, $r=0.65$ ）。Ninnes ら（2010）は高い相関が得られなかった要因として、血液は即自的な内分泌動態を示すため、糞より変動が大きい点を挙げている。一般的に血液の測定値は、採血時のホルモン状態の値を表すのに対し、糞の測定値は、排泄まで一定期間の蓄積をされたホルモンの代謝物含量値を表す（Goymann, 2005）。また、本研究で血液と採血翌日の午後の糞において E_2 , T および AD で有意な正の相関が見られたことから、本亜種の糞中ホルモン代謝物含量値からは、数時間から約 24 時間前の血中ホルモン動態を総合的に捉えることができ、季節的な内分泌変化を把握する目的においては、有用な血液の代替材料であると考えられた。

1-5 まとめ

鳥類においては、一部の種で糞を用いた内分泌モニタリングの結果が報告されている。ライチョウにおいては、盲腸糞と腸糞という排泄頻度や排泄経路の異なる 2 種類の糞が存在する。これらの糞中のホルモン含量およびその動態に差異があるかは定かでない。また、スバルライチョウにおいて、糞が血中ホルモン動態を反映しているか確かめる必要がある。そのため、鳥類の内分泌動態とモニタリングするにあたっての材料の検討を行った。雌の E_2 および P_4 含量と雄の T 含量の動態は、両糞中で類似し、それぞれ $r=0.63$, 0.24 , 0.61 で表される正の相関がみられたが、盲腸糞中では腸糞中に比べそれぞれ平均 5.36, 4.54, 10.80 倍有意に高い値を示した。排泄頻度が多く、コンタミネーションの判断が容易であることから、以降の実験には腸糞を用いることが適切と判断した。血液と腸糞のホルモン動態には、 E_2 , T および AD で正の相関関係が見られた。このため、季節的な内分泌変化を把握する目的において腸糞を材料として用いることは、ホルモン動態のモニタリングを行

う上で有用であると考えられた。

表 1-1 スパールバルライチョウの腸糞および盲腸糞の採取個体と採取期間

血統登録番号	個体名	性別	飼育施設	採取期間	備考
S10	4943	雌	東京都 恩賜上野動物園	2012 年 1 月 27 日～8 月 7 日	2012 年 8 月 13 日死亡
S32	8513	雌		2012 年 1 月 27 日～7 月 12 日	2012 年 7 月 23 日死亡
S48	7591	雌		2012 年 9 月 2 日～2013 年 7 月 9 日	
S98	4242	雌		2012 年 9 月 2 日～10 月 5 日	2012 年 10 月 18 日死亡
S13	9337	雄		2012 年 1 月 27 日～11 月 30 日	
S38	0865	雄		2012 年 1 月 27 日～11 月 30 日	
S66	66-32	雌	富山市 ファミリーパーク	2012 年 1 月 3 日～2013 年 3 月 11 日	
S127	6228-03	雌		2012 年 1 月 3 日～2013 年 3 月 11 日	
S53	キタロウ	雄		2012 年 1 月 3 日～2013 年 3 月 11 日	
S65	65-27	雄		2012 年 1 月 3 日～6 月 25 日	2012 年 6 月 28 日死亡
S130	6228-06	雄		2012 年 7 月 11 日～2013 年 3 月 11 日	

表 1-2 スパールバルライチョウの血液採取個体と採取期間

血統登録番号	個体名	性別	飼育施設	採取期間	備考
S135	1418	雌	東京都 恩賜上野動物園	2016 年 4 月 7 日～2017 年 3 月 9 日	
S258	1719	雌		2015 年 3 月 12 日～2016 年 10 月 4 日	
S195	2013	雄		2016 年 4 月 7 日～2017 年 3 月 9 日	
S257	1298	雄		2015 年 1 月 5 日～2017 年 3 月 9 日	
S237	No.7	雌	長野市茶臼山動物園	2015 年 6 月 25 日～2017 年 1 月 23 日	
S272	No.9	雄		2015 年 5 月 11 日～2016 年 7 月 25 日	
S208	No.4	雌	横浜市繁殖センター	2014 年 4 月 9 日～6 月 25 日	
S239	No.8	雄		2014 年 4 月 9 日～6 月 25 日	2014 年 9 月 4 日死亡
S176	02-09	雌	いしかわ動物園	2015 年 5 月 5 日～10 月 10 日	
S142	02-05	雄		2015 年 5 月 5 日～12 月 29 日	

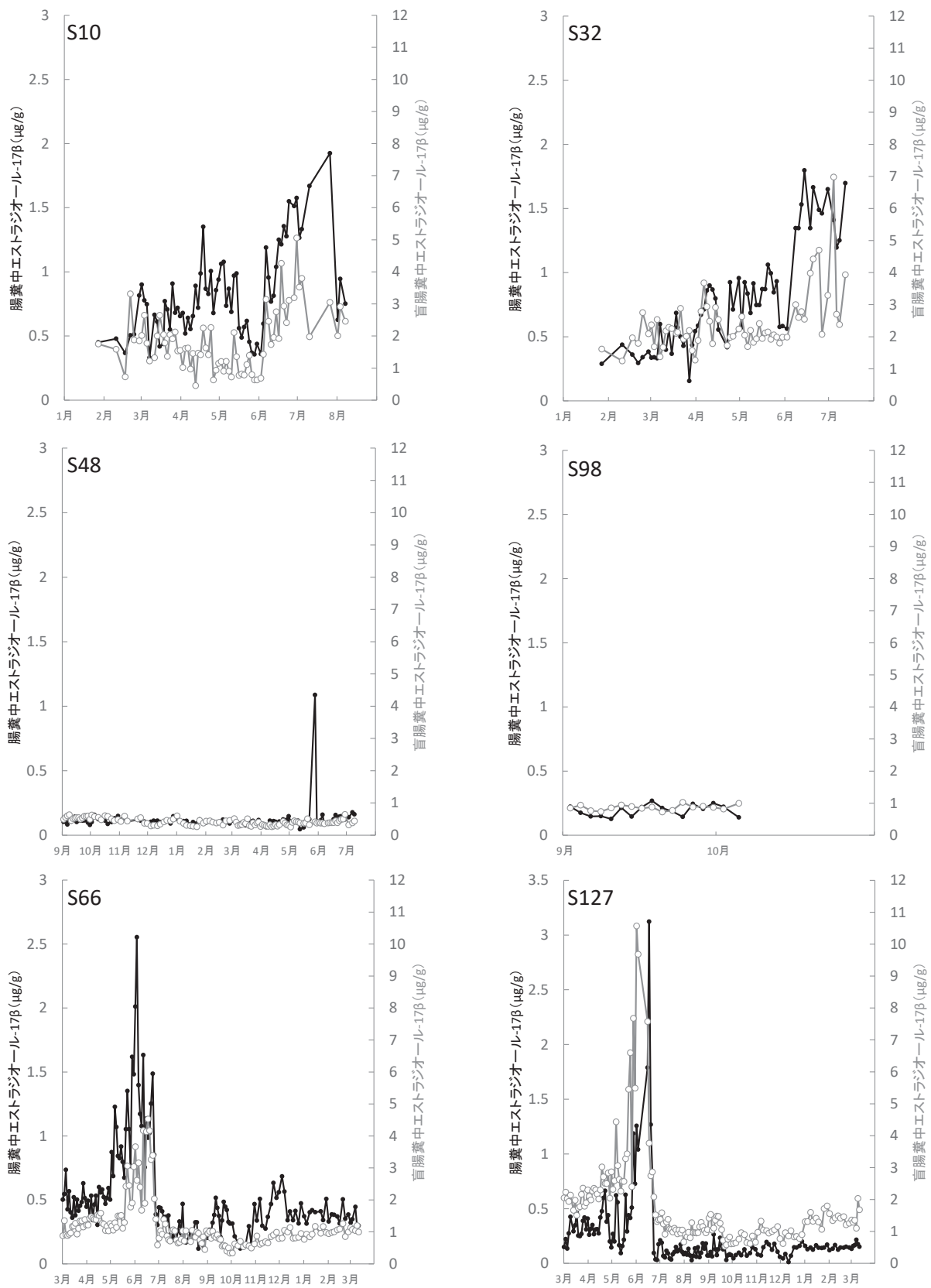


図 1-1 雌スパールバルライチョウ 6 羽 (S10, S32, S48, S98, S66, S127) における腸糞中および盲腸糞中のエストラジオール-17β 動態の比較
 —●—は腸糞中, —○—は盲腸糞中のホルモン値を示す。

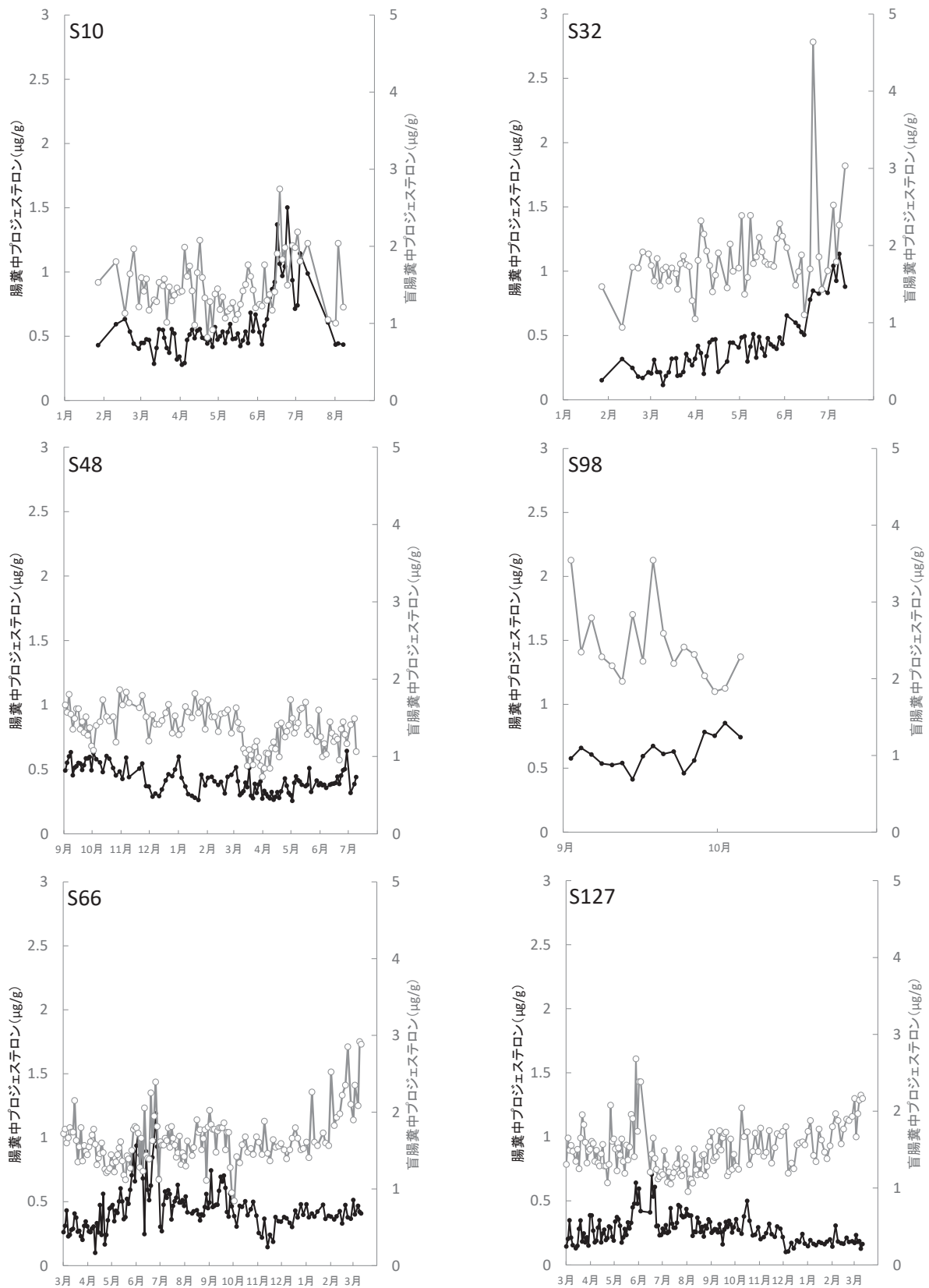


図 1-2 雌スパールバルライチョウ 6 羽 (S10, S32, S48, S98, S66, S127) における腸糞中および盲腸糞中のプロジェステロン動態の比較
 —●—は腸糞中, —○—は盲腸糞中のホルモン値を示す。

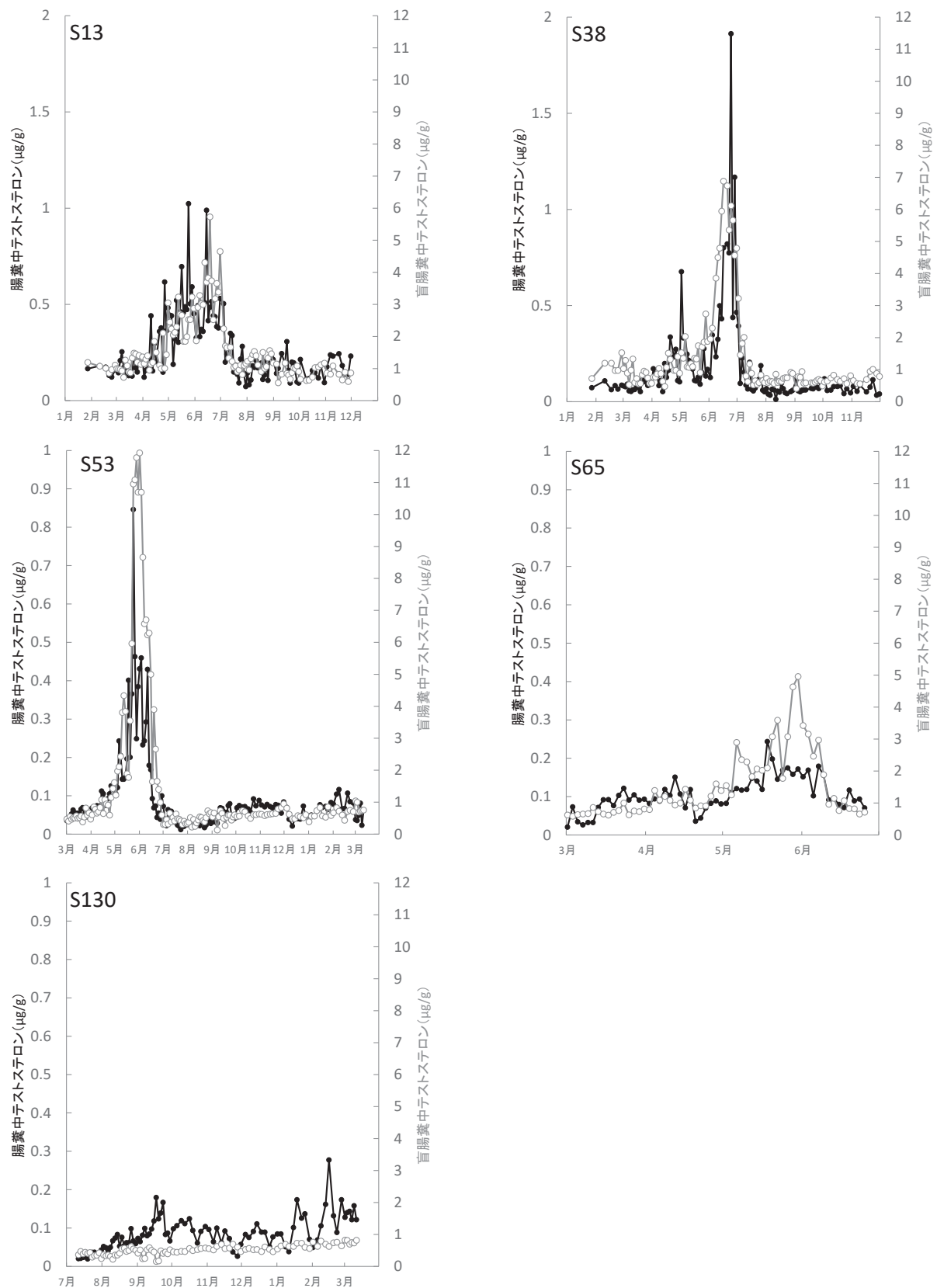


図 1-3 雄スパールバルライチョウ 5 羽 (S13, S38, S53, S65, S130) における腸糞中および盲腸糞中のテストステロン動態の比較
 —●—は腸糞中, —○—は盲腸糞中のホルモン値を示す。

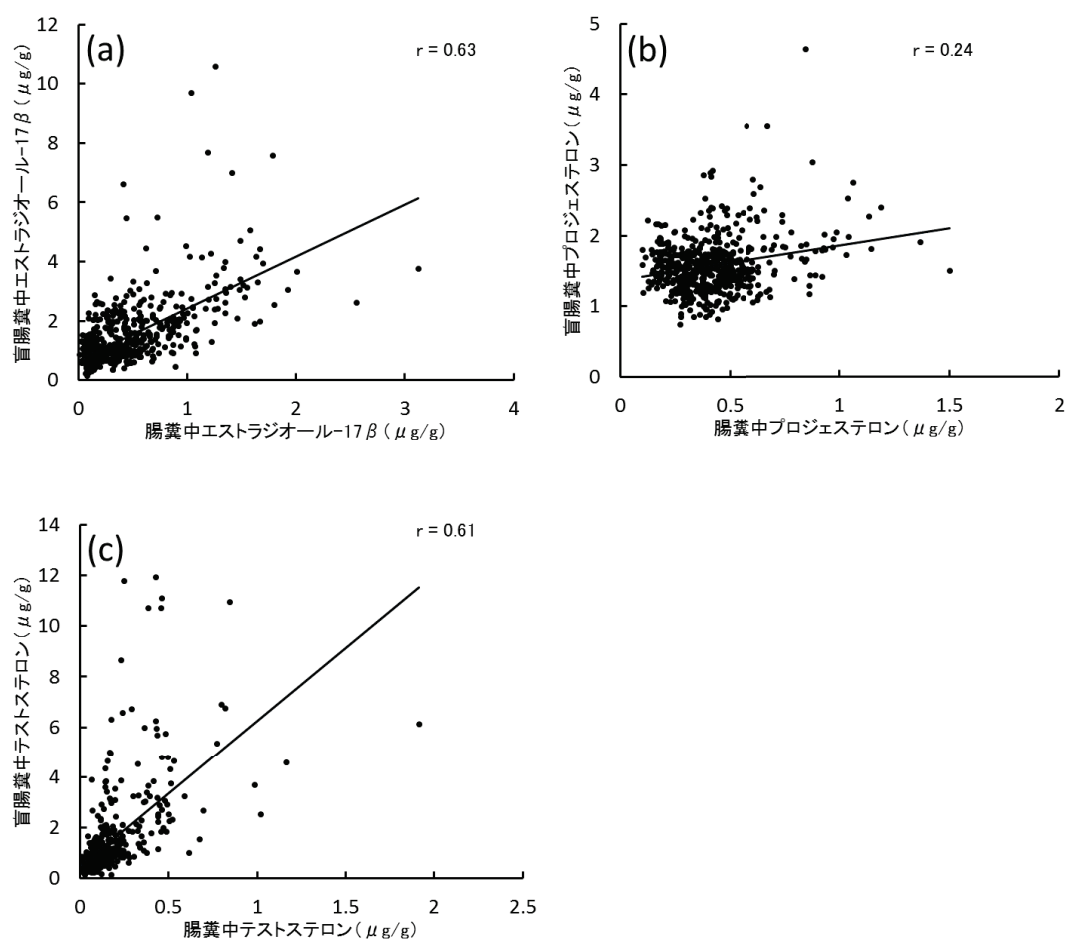


図 1-4 雌雄スバルバルライチョウにおける腸糞中および盲腸糞中の性ステロイドホルモン値の相関
 (a) 雌 6 羽のエストラジオール-17β, (b) 雌 6 羽のプロジェステロン, (c) 雄 5 羽のテストステロン

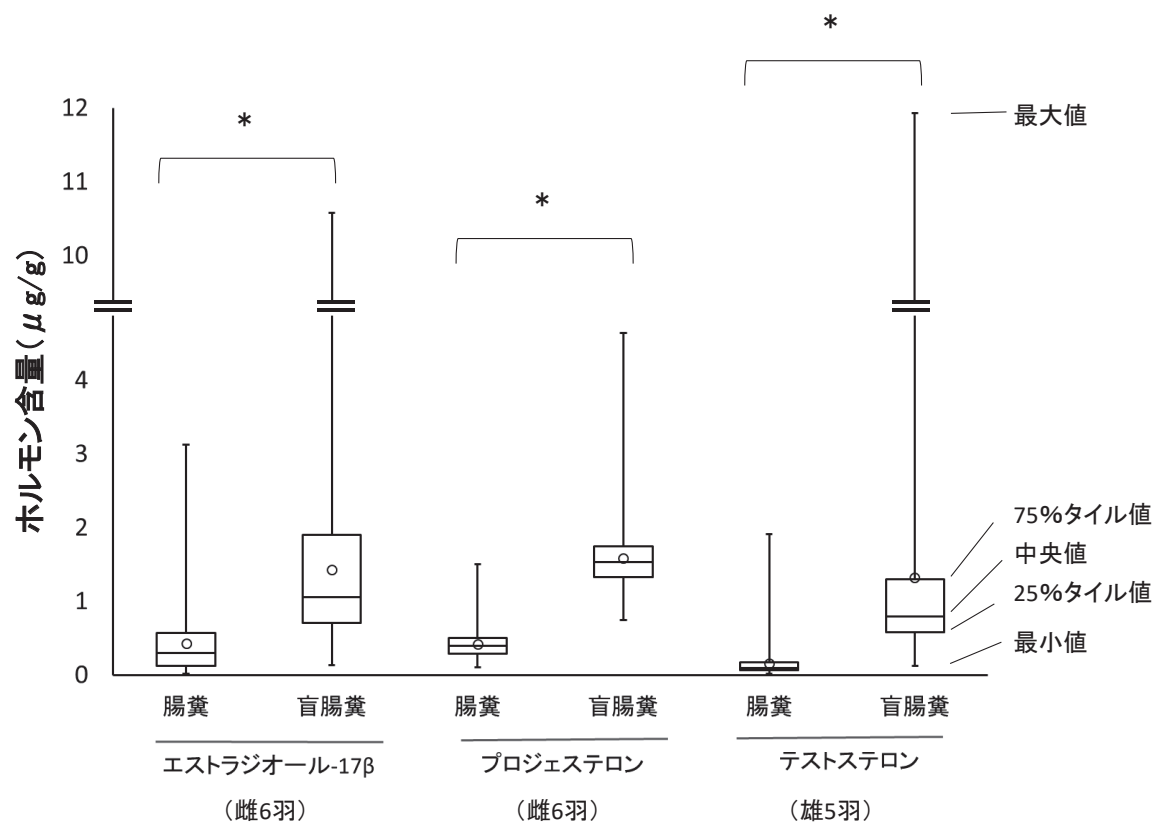


図 1-5 雌雄スバルバルライチョウにおける腸糞中および盲腸糞中の性ステロイドホルモン値の比較
○は平均値を示し、*は平均値間に有意差があったことを示す ($p < 0.01$)。

表 1-3 雌雄スバルバルライチョウにおける糞中の性ステロイドホルモン含量に対する血中濃度との相関

性ステロイドホルモン	糞の採取時間帯			
	採血当日		採血翌日	
	午前	午後	午前	午後
エストラジオール-17 β (雌)	0.64 (38) *	0.75 (45) *	0.66 (44) *	0.61 (46) *
プロジェステロン (雌)	-0.20 (39)	-0.19 (46)	-0.14 (45)	-0.13 (47)
テストステロン (雄)	0.22 (50)	0.27 (57) **	0.33 (59) *	0.74 (56) *
アンドロステンジオン (雄)	0.51 (46) *	0.70 (52) *	0.54 (51) *	0.65 (51) *

採血当日の午前および午後，採血翌日の午前および午後に採取した糞と血中のエストラジオール-17 β ，プロジェステロン，テストステロンおよびアンドロステンジオン値の相関係数を示す。糞中アンドロステンジオンについては，血中テストステロン濃度との相関係数を示す。括弧内はサンプル数を示す。*は $p < 0.01$ ，**は $p < 0.05$ の有意差があったことを示す。

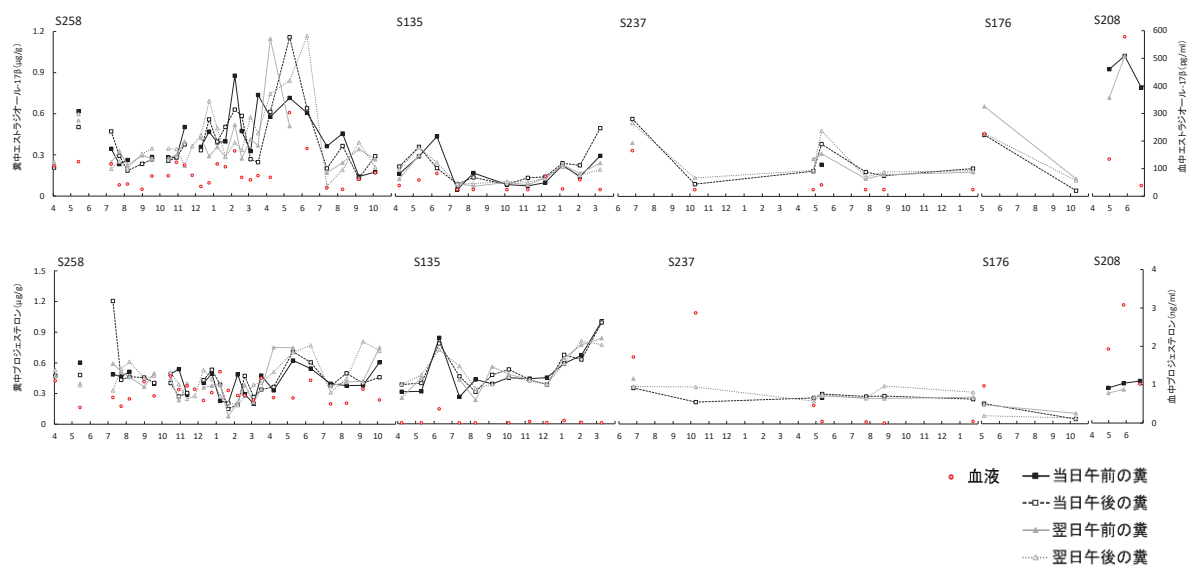


図 1-6 雌スバールバルライチョウ 5 羽 (S258, S135, S237, S176, S208) における血中と糞中のエストラジオール-17 β およびプロジェステロン値の比較
糞の採取は、採血の当日午前、当日午後、翌日午前および翌日午後に行われた。

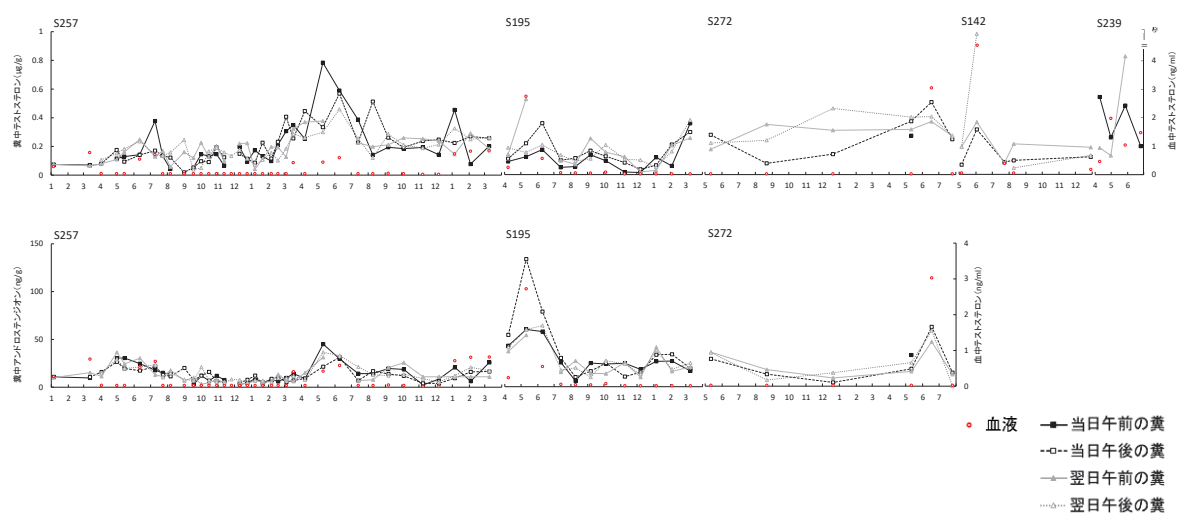


図 1-7 雄スパールバルライチョウ 5 羽 (S257, S195, S272, S142, S239) における血中テストステロン濃度および糞中のテストステロンおよびアンドロステンジオン含量の比較
 糞の採取は、採血の当日午前、当日午後、翌日午前および翌日午後に行われた。

第2章 飼育下スバルバルライチョウの繁殖生理の解明

2-1 緒言

2-1-1 スバルバルライチョウについて

スバルバルライチョウはキジ目ライチョウ科ライチョウの1亜種である (del Hoyo and Collar, 2014)。日本国内の動物園などの飼育施設では、別亜種であるニホンライチョウの生息域外保全のパイロットプランとして、繁殖技術の確立などを目的に、スバルバルライチョウの飼育が行われている (ライチョウ域外保全プロジェクトチーム, 2015)。

スバルバルライチョウは、ノルウェーのスバルバル諸島 (74-81°N, 10-30°E) に生息する唯一の非移住性の鳥類である (Løvenskiold, 1954)。その生息環境は、気温と日照の極端な季節変化が特徴的であり、4月から8月に1日中日が沈まない白夜、逆に11月から1月は日照がない極夜となる (Pedersen et al., 2005)。本亜種は厳しい生息環境に対して、換羽、繁殖、体重、採食などを適応させている。

2-1-2 スバルバルライチョウの繁殖

1) 行動学的知見

スバルバルライチョウは季節繁殖性の鳥類である。3月上旬に繁殖地に雄が集まり始め、縄張り行動がみられるようになり、3月下旬から4月上旬にはなわばりが確定する (Unander and Steen, 1985)。雌は4月上旬に繁殖地に現れ始め、一夫一妻のつがいが形成され、この頃には生息地は白夜となっており、雄の縄張り行動は24時間行われるようになる (Unander and Steen, 1985)。6月上旬には産卵が見られ、この頃には氷点より上回る気温となり、営巣や育雛に幾分適した季節となる (Steen and Unander, 1985)。一腹卵数は1歳齢の雌では8~9個、成熟雌では9~11個であり、成熟雌で多くなる傾向があることが報告されている (Pedersen et al., 2005)。抱卵は雌のみが行い、雌が採食に出る際は雄による雌の護衛が行われる (Unander and Steen, 1985)。雛が孵化すると雌は雛を連れて縄張りを離れ育雛を行い、9~10月には雌雄および雛を交えた群れになり、越冬地へ移動を開始する (Unander and Steen, 1985)。詳細な繁殖開始時期の決定には、繁殖場所や年による外気温

や残雪量の違いといった環境要因が関与しているとされる (Steen and Unander, 1985)。

2) 生殖内分泌の研究

スバールバルライチョウの野生個体における生殖腺の季節変化が Stokkan ら (1986b) により報告されており、狩猟により得られた野生個体をもとに日照時間や気温の変化と LH 濃度の変化、卵管重量や精巣での精子形成の関係が明らかにされている。スバールバル諸島では4月より白夜となり、雄では日長の増加に伴う精巣重量および血中 LH 濃度の増加が見られ、これらは6月に最大となる (Stokkan et al., 1986b)。一方、産卵は6月に起こり、この頃に卵巣重量および血中 LH 濃度が最高値を示す (Stokkan et al., 1986b)。これらのことから、本亜種においては、日長の増加により生殖腺活動が活性化されることが明らかになっている。

3) 光との関係

鳥類の繁殖は、視床下部－下垂体－生殖腺軸に制御されている。視床下部からの GnRH は下垂体前葉を刺激し、下垂体前葉より生殖腺刺激ホルモンである LH および FSH が分泌され、生殖腺の活動を誘起する (Ubuka and Bentley, 2011)。日長は繁殖をコントロールする主な因子であり、急激な日長の増加は換羽、体重、採食などの変化の引き金となる。

ライチョウ科においては、Stokkan と Sharp (1980a) が雄カラフトライチョウ (*L. lagopus*) を異なる照明条件下で飼育し、その血中ホルモンの動態から、下垂体－生殖腺系が完全に日長に依存することを報告している。繁殖開始に必要な LH の分泌には、視床下部－下垂体系への日長の直接作用、および視床下部－下垂体系へのステロイドホルモンによる負のフィードバック感受性の季節変化が関与しており、これにより季節的な繁殖が起こる (Sharp and Moss, 1977; Stokkan and Sharp, 1980b)。

一定の長日刺激期間の後、光に反応しなくなる光不応期が成立し、繁殖が終了する。光不応期は、精巣からの負のフィードバックにより血中の LH 濃度が低レベルで維持されている (Sharp and Moss, 1977; Stokkan and Sharp, 1980b)。長日下飼育の去勢雄カラフトライチ

ヨウにおいても光不応期が見られたことから、性ホルモン以外に光不応期成立に関わるホルモンがあることが示唆され、コルチコステロンを主とする副腎ホルモンの関与が示唆されている (Stokkan and Sharp, 1980b)。また、光不応期成立には、LH の減少と同時に血中 T_3 濃度の増加が見られている (Klandorf et al., 1982)。光不応期成立には、生殖腺と神経内分泌、概日リズムの相互作用の存在が示唆されている (Stokkan and Sharp, 1984)。

2-1-3 二次形質としての肉冠

鳥類の肉冠は二次形質の一つであり、雄-雄間の競争時や雌による配偶相手の選択に重要なシグナルとして働くことが知られている (Owens and Short, 1995)。雄の肉冠の色、長さ、サイズなどと T の関係についてはセキショクヤケイ (*Gallus gallus*) や家禽で研究されてきた (Ligon et al., 1990; Zuk et al., 1995; Verhulst et al., 1999)。また、 T の肉冠成長への影響は体調や免疫力の状態に依存することが示唆されている (Parker and Ligon, 2007)。このことは、免疫競争ハンディキャップ論 (Folstad and Karter, 1992) で示される。すなわち、 T は、免疫系へのコストと形質発現による交尾成功などの利益をもたらす、両者はトレードオフ関係にある。 T による免疫系の機能低下を被っても生存できる雄のみが、誇張した性的な形質を発現させることができる。雌は、生存に対する有益な遺伝子をもつと解釈するため性的な形質を著しく発現した雄を好む (Hamilton and Zuk, 1982)。こうして、雄の肉冠は繁殖能力と免疫状態を示す指標となると考えられている。

ライチョウは眼窩上肉冠を持ち、 T 濃度と肉冠の関係はライチョウ科の鳥においても報告されている。飼育下の雄カラフトライチョウにおいて、 T 投与処理は短日条件下であっても肉冠の成長を誘起し (Stokkan, 1979a)、この肉冠成長は T に直接的に反応する一方で、日長に間接的に依存することが示唆されている (Stokkan, 1979b)。また、野生個体では交尾が成立した雄は、成立させることができなかった雄に比べ、大きな肉冠を持っていたことが報告されている (Hannon and Eason, 1995)。さらに、 T 処理は肉冠の発達および縄張りやペア形成といった繁殖に正の効果をもたらす一方で、体重の減少や寄生虫保有数の増加、免疫グロブリンの減少などの生存に不利益になるような効果をもたらすことが雄アカライ

チョウ (*L. l. scoticus*) での研究で確認されている (Mougeot et al., 2006)。

このように肉冠は生殖内分泌状態や体調を反映した性的な形質であり、主に個別飼育を行う飼育下においては、繁殖期に雌雄をペアリングする際の指標とできることが期待される。

2-1-4 換羽

1) 外観観察による知見

換羽は、古い羽が抜け落ち、新しい羽が生えそろうまでの経過をいう。古い羽は新しく作られた羽鞘に押し出されることで抜け、このとき古い羽の羽軸根と結合していた羽鞘先端部が破壊され、新しい羽の出現を助ける (Watson, 1963)。スバーバルライチョウは、夏季の茶色い夏羽と冬季の白い冬羽への2回の換羽を経験する。雌は4月末から5月に夏羽姿となるが、雄は7月頃より換羽を開始し、8月後半に夏羽姿となる (Steen and Unander, 1985)。冬羽への換羽は、雌雄とも9月中旬頃に開始する (Stokkan et al., 1986b)。

2) 換羽の進行に関与するホルモン

換羽には多くの代謝エネルギーを必要とすることから、甲状腺ホルモンの関与が示唆されている。甲状腺ホルモンは、視床下部-下垂体-甲状腺軸で制御されている。T₄は甲状腺で生産され、末梢組織で脱ヨード化を受けて活性型の T₃ または不活型のリバーズ T₃ となり、成長や分化の促進、物質代謝に関与する (菊山, 2007)。換羽においては、T₄ は羽の成長刺激、T₃ は羽の脱落による体温維持のための代謝刺激に働くことが示唆されている (Groscolas and Leloup, 1986)。換羽の開始や進行速度は、甲状腺ホルモンと生殖腺ホルモンとの拮抗作用により調節される。生殖腺ホルモンは、甲状腺ホルモン結合タンパク質の産生を抑制し、甲状腺ホルモンの増加を抑制することで、甲状腺機能を抑制する (Sharp and Klandorf, 1985)。一方、LH が急減した光不応成立時には、T₃ の増加が見られることから、甲状腺ホルモンが生殖腺活動を抑制していることが示唆されている (Sharp and Klandorf, 1985)。

3) 換羽とコルチコステロン

コルチコステロン (B) は糖質コルチコイドの一種であり、その季節変化は、視床下部－下垂体－副腎軸で制御されている。視床下部からの副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモンの作用で、下垂体の副腎皮質刺激ホルモンが分泌され、副腎からの B 分泌が調節される (長濱, 2007)。B を含む糖質コルチコイドは、タンパク質や脂質の分解促進、血糖値の上昇、抗炎症作用、ストレス適応等の作用を持つ (長濱, 2007)。季節繁殖を行う鳥種では換羽期に視床下部－下垂体－副腎皮質系は強い抑制を受けている (Cornelius et al., 2011)。B は、外因ストレスにより上昇するものであるが、換羽期においては B の反応が弱くなる (Romero et al., 2006; Done et al., 2011)。換羽期も外因性ストレスに対応することは必要であるが、副腎皮質反応を抑えることで適切に換羽を進め、捕食のリスクに曝される期間を短くし、換羽を適切な時期に終わらせるといった利益をもたらすと考えられている (Done et al., 2011)。

2-1-5 ライチョウの体重・採食・脂肪蓄積の季節変化

スバルライチョウは厳しい環境に対し、体重、採食、脂肪蓄積を変化させることで適応し、繁殖や越冬を可能にしている。スバルライチョウの体重は一年を通して大きく変動する。雄では繁殖地に到着する 3 月には約 700 g あるが、繁殖期を通して体重は 550 g まで減少し、8 月下旬から体重は増加がみられ、10 月には約 1000 g に到達する (Steen and Unander, 1985)。一方、雌には一年のうちに 2 回の体重増加時期がある。繁殖地に到着する 4 月には体重は約 600 g あるが、その後産卵に向けて体重の増加が起こり、約 700 g にまでなる (Steen and Unander, 1985)。産卵後は、体重の低下がみられるが、秋には冬季に向けた脂肪蓄積により、雄と同様の体重増加が見られ、900 g にまでなる (Steen and Unander, 1985)。

スバルライチョウの解剖学的研究より、体重増減のほとんどが脂肪量の増減によるものであることが明らかにされ、蓄積脂肪は秋で春より多くなることが報告されている (Grammeltvedt and Steen, 1978)。脂肪量は 10 月には約 250 g であり、体重の約 32% を占め

るのに対し、3月には消耗している (Mortensen et al., 1983)。蓄積脂肪は、冬季において断熱機能を果たし (Mortensen and Blix, 1986)、また、冬季の採食難に対応するためのエネルギー源として利用されるため (Mortensen and Blix, 1989)、秋の脂肪蓄積は重要である。

脂肪蓄積とそれに伴う体重の季節変化を調節するものとして、採食量の変化が関連している。本亜種は一年を通してその時に得ることができる栄養価の高い餌を選択する (Unander et al., 1985)。採食量の変化は体重変化と逆の季節変化を見せる (Stokkan et al., 1986a; Lindogård and Stokkan 1989; Lindogård et al., 1995)。8~11月は体重が増加するのに対して採食量が減少し、11~6月は体重が減少するのに対して採食量が増加する (Stokkan et al., 1986a)。採食は、春や秋の明暗のある期間には、明期に行われる (Reierth and Stokkan, 1998a)。夏の白夜期には24時間の断続的な採食が行われ、冬の極夜においても一日を通して採食がみられるが、採食強度は夏季に比べて低い (Stokkan et al., 1986a)。本亜種において、採食活動は、日長変化と同様に一年の活動リズムに影響を与える (Reierth and Stokkan, 1998a; Reierth and Stokkan, 1998b)。

スバルライチョウにおいては、採食は体重の調節因子であるが (Lindogård et al., 1995)、体重の増減は、採食量の変化だけでなく、採食活動による自発運動量の変化も関連している (Stokkan et al., 1986a)。自発運動量は日長により変化し、長日への移行で自発運動量が増加するとともに体重の減少が見られ、自発運動量と代謝量に相関関係が認められている (Lindogård et al., 1995)。秋の脂肪蓄積を促進するために自発運動量を減らすことで一日のエネルギー支出を減らしていることが報告されており (Lindogård et al., 1995)、飼育下においても絶食試験時には、同様に餌の探索を含む行動量の著しい減少が見られている (Reierth and Stokkan, 1998b)。また、エネルギー摂取量は秋に高く (Lindogård et al., 1995)、冬季における安静時の代謝量は低くなることが明らかになっている (Mortensen and Blix 1986)。これにより、一日当たりのエネルギー支出量は、餌が少なく、エネルギーの節約が最も重要な冬季に低く保たれると報告されている (Mortensen and Blix 1989)。

このように、自発運動量、採食量、脂肪蓄積が変化することで体重の変化が起こり、一年を通してスバルライチョウ諸島に定住する本亜種が厳しい環境に適応することを可能にし、

冬季の生存に重要な役割を果たしている。

2-1-6 本研究の目的

糞を用いた非侵襲的な内分泌動態のモニタリングにより，同一個体での長期的な内分泌評価が可能になる。本研究では，次の2つを目的とする。すなわち，1) 照明条件や気温などの外的環境の変化に対するスバルバルライチョウの生殖腺活動の変化，2) 内分泌動態の変化が繁殖行動や眼窩上肉冠，換羽や採食行動および体重の変化に与える影響について明らかにしようとした。様々な照明条件下でスバルバルライチョウを飼育し，内分泌動態のモニタリングを行うことで外界因子の生殖腺活動への影響を評価した。また，ホルモン値を繁殖状況や換羽状況，採食量や体重の経過と合わせて評価することで，内分泌変動のライフイベントへの影響を評価した。生殖腺活動を把握するために，雌において卵巢活動の指標として，卵黄蓄積に関与する E_2 および卵胞からの排卵に関与する P_4 を測定した。雄においては精巣活動の指標として精子形成に関与する T および AD を測定した。さらに，換羽およびストレス反応の指標として副腎ホルモンである B の測定を行った。

2-2 材料および方法

2-2-1 供試動物と飼育環境

国内施設で飼育されているスバルバルライチョウを供試個体とした（表 2-1）。飼育施設は現地の日長に近づけるために基本的に常明期を設ける照明コントロールが行われ，本研究では4つの照明区を設けた。東京都恩賜上野動物園（東京都台東区上野公園）および2011年における富山市ファミリーパーク（富山県富山市古沢）の照明コントロールをA区，2012年以降の富山市ファミリーパークおよび横浜市繁殖センター（神奈川県横浜市旭区上白根町）の照明コントロールをB区，長野市茶臼山動物園（長野県長野市篠ノ井有旅）の自然光と照明コントロールの混合をC区，富山市ファミリーパークの自然光をD区とした。各園館の照明コントロール時間を図 2-1 および表 2-2 に示す。A区（東京都恩賜上野動物園，富山市ファミリーパーク（2011年））では，明期の最短は12～1月の11時間，最長は

6～7月の24時間とし、最短および最長への移行期間は約30日ごとに照明時間を短縮または延長された。B区は、飼育場所により照明時間に違いがあった。B1区（富山市ファミリーパーク非展示施設（2012年～）、横浜市繁殖センター）では、明期の最短は、12～1月に8時間、明期の最長は5月15日～7月31日の24時間とし、最短および最長への移行期間は約14日ごとに照明時間を短縮または延長された。B2区（富山市ファミリーパーク展示施設）では12月下旬～2月下旬に照明時間が8時間以下となり、明期の最短は1月下旬には7時間15分であった。明期の最長は5月15日～7月31日の24時間とし、最短および最長への移行期間は約14日ごとに照明時間を短縮または延長された。C区では、5～8月を24時間照明とし、それ以外の期間は自然光への飼育とした。D区では、照明コントロールを行わず、自然光での飼育を行う区を設けた。

各飼育施設内は、空調管理がなされていた。飼料は主に小松菜（*Brassica rapa* var. *perviridis*）とウサギ用ペレット（RM-4（船橋農場）、ラビットダイエット（Mazuri）、ベッツセクションウサギ用MSダイエット（イースター）、バニーセクショングロース、メンテナンス（イースター）など）が不断給餌され、自由飲水の下、原則として個別に飼育されていた。

2-2-2 糞の採取方法

飼育下スバルバルライチョウの糞の採取頻度は個体や時期によって異なったが、およそ週1～4回であった。各個体から糞を採取し、チャック付きのポリ袋に入れ、採取後すぐに-20℃下で凍結保存した。

2-2-3 糞中の性ステロイドホルモン代謝物の抽出と測定

ステロイドホルモンの抽出はメタノール抽出法により行った。P₄とE₂含量の測定には、分取したメタノール抽出液をEIA bufferにて10倍希釈したものを測定試料とした。T、ADおよびB含量の測定には、分取したメタノール抽出液をEIA bufferで5倍希釈したものを測定試料とした。この測定試料を用いて、雌ではP₄、E₂およびB含量、雄ではT、ADお

よび B 含量を EIA 法にて測定した。

2-2-4 気温と湿度の測定

最低気温と最高気温，最低湿度と最高湿度は，各飼育施設で毎日記録された。最低気温と最高気温から平均気温，最低湿度と最高湿度から平均湿度を算出し，平均気温と平均湿度をホルモン動態との比較に用いた。

2-2-5 外観の観察と記録

換羽量，体色変化（体全体の羽色），採食量，体重，雄の眼窩上肉冠の変化が各施設の飼育担当者により記録され，それらを糞中の性ステロイドホルモン代謝物含量の動態と比較した。雌雄の同居日，交尾日，人工授精日，有精卵および無精卵の産卵日を糞中の性ステロイドホルモン代謝物含量の動態と比較した。各個体と記録項目を表 2-1 に示す。

2-2-5-1 換羽量と体色の観察

換羽の進行および体色変化については，原則として，おおよそ毎月 1 日と 15 日の月 2 回の評価を行った。一部の個体では，月 2 回以上評価を行った。の朝に落ちている羽を回収し，その枚数を落下羽スコアとして 5 段階で評価した。また，東京都恩賜上野動物園では 2013 年より評価方法を変更し，4 段階で評価した。スコアと評価基準については表 2-3 に示した。また，体色については体の部位ごとに記録した。記録した部位は，頭，首，胸，背，腹，脚の 6 部位とした（図 2-2）。それぞれの部位において体色の濃さをスコア 0～4 で評価した。6 部位の各スコアの合計から体全体の体色を 0～24 の体色スコアとした。換羽量と体色の評価基準を表 2-3 に示した。

2-2-5-2 採食量と体重の計測

採食量は，24 時間の採食量を測定した。原則として，毎月 1～5 日および 15～20 日のうちそれぞれ 1 日の 24 時間の採食量の計測値を用いた。体重測定は，園館により頻度が異な

ったが、個体ごとに少なくとも月に 1 回行われた。採食量と体重計測のいずれにおいても、一部の個体では月 2 回以上評価を行った。

2-2-5-3 眼窩上肉冠の観察

雄の眼窩上肉冠について、おおよそ毎月 1 日と 15 日の月 2 回、そのサイズと色について観察した。目視によりサイズのスコア化を行い、サイズは大を 3、中を 2、小を 1 として記録した。色は「薄い」または「濃い」で記録した。

2-2-6 統計分析

眼窩上肉冠と糞中 T 含量の比較の際には、糞中 T 含量を平均±標準偏差 (SE) で示し、スチューデントの *t* 検定により平均値間の有意差検定を行った。糞中 T 含量は、各月の 1～15 日と 16 日～月末の各平均値を算出し、眼窩上肉冠の変化と比較した。

平均気温と採食量および体重の比較の際には、ピアソンの積率相関係数を算出し、相関の有意差検定を行った。

2-3 結 果

2-3-1 雌雄スバルバルライチョウにおける内分泌動態の長期モニタリングと性行動

2-3-1-1 東京都恩賜上野動物園での糞中のステロイドホルモン代謝物含量の動態

東京都恩賜上野動物園の照明コントロールの A 区では 12～1 月に最短の 11 時間、6～7 月に最長の 24 時間であり、最短および最長への移行期間は約 30 日ごとに照明時間を短縮または延長された。飼育施設内の平均気温および平均湿度は、図 2-3a～12a に示した。平均気温は、6～10 月に 20℃を上回る日が多く観測され、12～2 月には 10℃を下回る日が多く観測された。2014 年および 2015 年には 5 月にも 20℃を上回る日が多く観測された。平均湿度は、平均気温に比べ日毎の変動が大きかった。7 月を中心に 6～10 月に 70%を上回る日が観測され、12～4 月には 50%を下回る日が多く観測された。また、2015 年には夏季であっても湿度 70%を上回る日は少なく、著しい湿度の季節変化は見られなかった。

(a) 雌個体 S10

雌個体 S10 では、糞中のステロイドホルモン含量の測定期間は、2011 年 10 月 7 日～2012 年 8 月 11 日であり、本個体は 2012 年 8 月 13 日に死亡した。糞中 E₂ 含量は、3 月から増加を開始し、4 月中旬～5 月中旬に高くなった、5 月下旬には減少が見られた。24 時間照明となった 6 月上旬より再び増加し、7 月まで高値を示した (図 2-3b)。糞中 P₄ 含量は、5 月下旬より増加が見られ、6 月中旬から 7 月上旬まで高値を示した (図 2-3b)。糞中 P₄ 含量が 7 月中旬、糞中 E₂ 含量が 7 月下旬に減少を開始し、いずれも 8 月には基底値となった (図 2-3b)。人工授精は、2012 年 6 月 12 日～6 月 29 日に行われ、産卵は、2012 年 6 月 13 日～7 月 18 日に見られ、これは糞中の性ステロイドホルモン含量が高値を示した期間内であった (図 2-3b)。糞中 B 含量は 4 月より、8 月に向けて増加を開始した (図 2-3c)。

換羽については、落下羽スコアは、2 月中旬にスコア 1、4 月中旬にスコア 2、5 月からスコア 3 が見られるようになった (図 2-3d)。体色スコアは、これに伴い 4 月中旬から増加し、6 月上旬には体色スコアが最大となり夏羽姿となった (図 2-3d)。

採食量と体重については、採食量は、計測開始 10 月の高値から減少し、1 月上旬～3 月上旬に低値を示したが、照明時間の延長と共に増減が見られた (図 2-3e)。5 月に採食量が高値を示したが、その後は再び減少し、7 月中旬に再度増加した (図 2-3e)。体重は、計測開始の 10 月から増加し、1 月上旬に最大 (1020 g) となり、照明時間の延長と共に減少した (図 2-3e)。6 月中旬には一時的な体重の増加が見られたが、7 月以降には体重は減少していた (図 2-3e)。

(b) 雌個体 S32

雌個体 S32 では、糞中のステロイドホルモン含量の測定期間は、2011 年 10 月 7 日～2012 年 7 月 20 日であり、本個体は 2012 年 7 月 23 日に死亡した。糞中 E₂ 含量は、4 月上旬から増加を開始し、5 月に増減が見られ、24 時間照明となった 6 月上旬より再び増加し、7 月まで高値を示した (図 2-4b)。糞中 P₄ 含量は、5 月下旬より増加が見られ、6 月中旬から 7 月まで高値を示した (図 2-4b)。人工授精は、2012 年 6 月 17 日に行われ、交尾は 2012

年6月15日～7月3日に4回確認された(図2-4b)。産卵は、6月14日～7月16日に見られ、これは糞中の性ステロイドホルモン含量が高値を示した期間内であった(図2-4b)。

換羽については、落下羽スコアは、2月中旬にスコア1、4月中旬にスコア2、5月中旬からスコア3が見られるようになった(図2-4c)。体色スコアは、落これに伴い4月中旬から増加し、6月上旬には体色スコアが最大となり夏羽姿となった(図2-4c)。

採食量と体重については、採食量は、計測開始10月の高値から減少し、2月に低値を示したが、照明時間の延長と共に増加する傾向が見られた(図2-4d)。6月上旬に採食量が高値を示したが、その後は再び減少し、7月中旬に再度高値を示した(図2-4d)。体重は、計測開始の10月から増加し、1～2月に最大(1090 g)となり、照明時間の延長と共に減少した(図2-4d)。6月中旬には一時的な体重の増加が見られたが、7月には体重は減少していた(図2-4d)。また、平均気温と採食量との間には正の相関が認められ($n = 20$, $r = 0.50$, $p < 0.05$, 図2-4a,d)、体重との間には負の相関が認められた($n = 15$, $r = -0.60$, $p < 0.02$, 図2-4a,d)。

(c) 雌個体 S48

雌個体 S48 では、糞中のステロイドホルモン含量の測定期間は、2012年9月2日～2015年3月31日であった。糞中 E_2 含量は、2013年5月28日に高値を示したが、測定期間を通して低値で推移した(図2-5b)。糞中 P_4 含量は、2015年1月に増減する変動が見られたが、測定期間を通して低値で推移した(図2-5b)。測定期間を通じて他の雌のような糞中 E_2 および P_4 含量の変動は見られなかった(図2-5b)。

換羽については、落下羽スコアは、2013年2月下旬および2014年3月下旬にスコア2が見られ始め、2013年3月下旬～10月上旬および2014年3月下旬～9月下旬にスコア3が見られた(図2-5c)。1～2月および11～12月には換羽スコア0となる日が多く観測された(図2-5c)。

体重については、2013年12月下旬(720 g)、2014年1月上旬(736 g)に最大となり、照明時間の延長と共に減少した。24時間照明中には体重が減少し、いずれの年も7月に体

重は最小（2013 年：608 g，2014 年：548 g）となり，その後は照明時間の短縮と共に体重の増加が見られ，冬季に高い体重が維持された（図 2-5d）。体重の増減は他個体で見られたような著しい増減は見られなかった（図 2-5d）。また，平均気温と体重との間には有意な負の相関が認められた（ $n = 189$ ， $r = -0.45$ ， $p < 0.01$ ，図 2-5a,d）。

(d) 雌個体 S98

雌個体 S98 では，糞中のステロイドホルモン含量の測定期間は，2012 年 9 月 2 日～10 月 9 日であり，本個体は 2012 年 10 月 18 日に死亡した。測定期間が短く，変動を捉えることができなかったが，糞中 E_2 および P_4 含量は低値であった（図 2-6b）。

(e) 雌個体 S120

雌個体 S120 では，糞中のステロイドホルモン含量の測定期間は，2014 年 1 月 3 日～2015 年 3 月 31 日であった。糞中 E_2 および P_4 含量は，5 月中旬から増加を開始し，6 月下旬頃まで高値を示した（図 2-7b）。いずれのホルモンも 6 月下旬に減少を開始し，7 月には基底値となった（図 2-7b）。産卵は，5 月 25 日～6 月 14 日に見られ，これは糞中の性ステロイドホルモン含量が高値を示した期間内であった（図 2-7b）。糞中 B 含量は 4 月から 6 月および 7 月から 8 月中旬に向けて増加傾向が見られ，12～3 月にも高値が見られた（図 2-7c）。

換羽については，落下羽スコアは，2013 年 4 月上旬および 2014 年 4 月中旬にスコア 2 が見られ始め，2013 年 4 月下旬～9 月下旬および 2014 年 4 月下旬～9 月下旬にスコア 3 が見られた（図 2-7d）。1～2 月および 12 月には換羽スコア 0 となる日が多く観測された（図 2-7d）。

体重については，2013 年 12 月下旬（730 g），2014 年 1 月下旬（728 g）に最大となり，照明時間の延長と共に減少した（図 2-7e）。24 時間照明中には体重が著しく減少し，2013 年 7 月中旬（480 g），2014 年 6 月下旬（498 g）に体重は最小となり，その後は照明時間の短縮と共に体重の増加が見られ，冬季に高い体重が維持された（図 2-7e）。また，平均気温と体重との間には有意な負の相関が認められた（ $n = 198$ ， $r = -0.82$ ， $p < 0.01$ ，図 2-7a,e）。

(f) 雌個体 S135

雌個体 S135 では、糞中のステロイドホルモン含量の測定期間は、2014 年 1 月 3 日～2015 年 3 月 31 日であった。糞中 E₂ 含量は 3 月、糞中 P₄ 含量は 5 月中旬から増加を開始し、6 月下旬頃まで高値を示した (図 2-8b)。いずれのホルモンも 6 月下旬に減少を開始し、7 月には基底値となった (図 2-8b)。産卵は、5 月 20 日～6 月 26 日に見られ、これは糞中の性ステロイドホルモン含量が高値を示した期間内であった (図 2-8b)。糞中 B 含量は 4 月下旬に増加を開始し、5 月中旬～6 月中旬に高値を示した (図 2-8c)。

換羽については、落下羽スコアは、4 月中旬～9 月上旬にスコア 3 が見られた (図 2-8d)。1～2 月および 11～12 月には換羽スコア 0 となる日が多く観測された (図 2-8d)。

体重については、いずれの年においても 12 月下旬に高値 (2013 年 : 718 g, 2014 年 : 780 g) となり、冬季に高い値が見られたが、照明時間の延長と共に減少した (図 2-8e)。2014 年 5 月中旬には一時的な体重の増加が見られた (図 2-8e)。24 時間照明中には体重が著しく減少し、2013 年 7 月上旬 (542 g), 2014 年 6 月下旬 (540 g) に体重は最小となり、その後は照明時間の短縮と共に体重の増加が見られた (図 2-8e)。

(g) 雄個体 S13

雄個体 S13 では、糞中のステロイドホルモン含量の測定期間は、2011 年 10 月 7 日～2012 年 11 月 30 日であった。糞中 T 含量は、3 月から増加を開始し、5 月下旬と 6 月中旬に著しい糞中 T 含量のピークが見られた (図 2-9b)。7 月には糞中 T 含量が減少を開始し、7 月中旬に基底値となった (図 2-9b)。交尾は、2012 年 5 月 21 日～6 月 23 日に 3 回確認され、これは糞中 T 含量が著しい高値を示した期間内であった (図 2-9b)。糞中 B 含量は 4 月に増加を開始し、5 月以降は一定の値を推移した (図 2-9c)。

換羽については、2012 年において、落下羽スコアは、2 月中旬にスコア 1 となり、24 時間照明の移行後の 6 月中旬より落下羽スコアが急増し、7 月中旬からスコア 4 が見られるようになった (図 2-9d)。体色スコアは、これに伴い 5 月上旬から増加し、8 月中旬には体色スコアが最大となり、夏羽姿となった (図 2-9d)。その後、落下羽スコアは高値を維

持したまま、体色スコアが減少し、9月中旬以降に一定の低値となったことより、冬羽への換羽が行われた(図 2-9d)。2013 年からは、落下羽を 3 段階のスコアで評価した。4月中旬に落下羽スコア 2 が見られ始め、5月上旬～9月下旬にスコア 3 が見られた(図 2-9d)。1～2 月、12 月には換羽スコア 0 となる日が多く観測された(図 2-9d)。

採食量と体重については、採食量は、計測開始の 10 月に高値を示していたが、その後に減少し、4 月に一時的な増加が見られたが、照明時間の延長に伴い減少した(図 2-9e)。24 時間照明時には著しい採食量の減少が見られ、7 月に最小となり、その後は照明時間の短縮に伴い増加した(図 2-9e)。体重は、2011 年および 2012 年の 12 月上旬および 1 月上旬(1180 g)、2013 年 2 月中旬(876 g)に最大となり、照明時間の延長と共に減少した(図 2-9e)。24 時間照明中には体重が著しく減少し、いずれの年においても 9 月には体重が最小(2012 年：650 g、2013 年：570 g)となり、その後は照明時間の短縮および採食量の増加と共に体重の増加が見られ、冬季に高い体重が維持された(図 2-9e)。また、平均気温と体重との間には有意な負の相関が認められた($n=143$, $r=-0.63$, $p<0.01$, 図 2-9a,e)。

(h) 雄個体 S38

雄個体 S38 では、糞中のステロイドホルモン含量の測定期間は、2011 年 10 月 7 日～2012 年 11 月 30 日および 2014 年 1 月 3 日～8 月 1 日であり、本個体は 2014 年 8 月 3 日に死亡した。2012 年において、糞中 T 含量は、3 月から増加を開始し、5 月上旬に高値を示したが、その後は減少が見られ、24 時間照明となった 6 月上旬より再び増加し、6 月中に高値を示した(図 2-10b)。7 月には糞中 T 含量が減少を開始し、7 月中旬に基底値となった(図 2-10b)。糞中 B 含量は、5 月下旬より 8 月に向けて減少が見られた(図 2-10c)。交尾は、2012 年 6 月 15 日～7 月 7 日に 10 回確認され、これは糞中 T 含量が著しい高値を示した期間内であった(図 2-10b)。2014 年の測定では糞中 T 含量の大きな変動が見られなかったが、日照時間の増加に伴い増加する傾向が見られた(図 2-10b)。糞中 B 含量は、4 月に増加が見られ、5 月に高値を示した(図 2-10c)。

換羽については、2012 年において、落下羽スコアは、2 月中旬にスコア 1 となり、24 時

間照明の移行後の6月中旬から落下羽スコアが急増し、7月上旬にからスコア4が見られるようになった(図2-10d)。体色スコアは、これに伴い5月上旬から増加し、8月中旬には体色スコアが最大となり、夏羽姿となった(図2-10d)。その後、落下羽スコアは高値を維持したまま、体色スコアが減少し、9月中旬以降に一定の低値となったことより、冬羽への換羽が行われた(図2-10d)。2013年からは、落下羽を3段階のスコアで評価した。2013年4月中旬および2014年3月上旬にスコア2が見られ始め、2013年5月上旬～9月中旬および2014年4月中旬～測定期間終了時の8月上旬にスコア3が見られた(図2-10d)。1～2月および10～12月には換羽スコア0となる日が多く観測された(図2-10d)。

採食量と体重については、採食量は、計測開始の10月に高値を示していたが、その後に減少し、4月に向けて増加が見られたが、照明時間の延長に伴い再び減少した(図2-10e)。24時間照明時には著しい採食量の減少が見られ、7月に最小となり、その後は照明時間の短縮に伴い増加した(図2-10e)。体重は、2012年1月(1200 g)、2013年2月下旬(862 g)および2014年4月上旬に(865 g)最大となり、照明時間の延長と共に減少した(図2-10e)。24時間照明中には体重が著しく減少し、2012年8月上旬(640 g)、2013年および2014年には7月に体重が最小(2013年: 604 g、2014年: 522 g)となり、その後は照明時間の短縮および採食量の増加と共に体重の増加が見られ、冬季に高い体重が維持された(図2-10e)。また、平均気温と採食量との間には正の相関が認められ($n=28$, $r=0.49$, $p<0.02$, 図2-10a,e), 体重との間には有意な負の相関が認められた($n=204$, $r=-0.67$, $p<0.01$, 図2-10a,e)。

(i) 雄個体 S118

雄個体 S118 では、糞中のステロイドホルモン含量の測定期間は、2014年1月3日～6月14日であり、本個体は2014年6月19日に死亡した。

糞中 T 含量は、照明時間の延長に伴い増加する傾向が見られ、4月に高値を示した(図2-11b)。糞中 B 含量は、4月より6月に向けて増加する傾向が見られた(図2-11c)。

換羽については、落下羽スコアは、1月下旬にスコア1、4月中旬にスコア2、5月上旬からスコア3が見られるようになった(図2-11d)。

体重については、2013 年 3 月中旬 (820 g)、2014 年 1 月中旬 (772 g) に最大となり、体重は照明時間の延長と共に減少した (図 2-11e)。24 時間照明中には体重が著しく減少し、2013 年 7～8 月 (530 g)、2014 年 6 月中旬 (532 g) に体重は最小となり、その後は照明時間の延長と共に体重に増加が見られ、冬季に高い体重が維持された (図 2-11e)。また、平均気温と体重との間には有意な負の相関が認められた ($n = 192$, $r = -0.79$, $p < 0.01$, 図 2-11a,e)。

(j) 雄個体 S195

雄個体 S195 では、糞中のステロイドホルモン含量の測定期間は、2014 年 9 月 5 日～2015 年 3 月 31 日であった。糞中 T 含量の大きな変動が見られなかった (図 2-12b)。糞中 B 含量は 12 月中旬に高くなる傾向が見られた。(図 2-12c)。

体重については、2014 年 12 月下旬に高値を示し、2014 年 1 月においても高値が見られ、照明時間の延長と共に減少した (図 2-12d)。24 時間照明中には体重が著しく減少し、7 月中旬に体重が最小 (476 g) となった (図 2-12d)。その後は照明時間の延長と共に体重の増加が見られた (図 2-12d)。また、平均気温と体重との間には有意な負の相関が認められた ($n = 67$, $r = -0.78$, $p < 0.01$, 図 2-12a,d)。

2-3-1-2 富山市ファミリーパークでの糞中のステロイドホルモン代謝物含量の動態

富山市ファミリーパークの照明コントロールは 2011 年において A 区の条件であり、2012 年からは B1 または B2 区となった。最短照明時間は B1 区では 12～1 月に 8 時間、B2 区では 1 月下旬に 7 時間 15 分であった。最長照明時間はいずれの区でも 5 月 15 日～7 月 31 日に最長の 24 時間であり、最短および最長への移行期間は約 14 日ごとに照明時間を短縮または延長された。自然光の D 区での日照は、12～1 月は日照時間が 10 時間以下であり、12 月中旬に最短の 9 時間 40 分となった。5 月中旬～8 月上旬は日照時間が 14 時間以上であり、6 月中旬に最長の 14 時間 39 分となった。飼育施設内の平均気温および平均湿度を図 2-13a～23a に示した。平均気温は、いずれの照明区およびいずれの年においても 7 月と

8月を中心に20℃を上回る日が多く観測され、12月から2月または3月には10℃を下回る日が多く観測された。平均湿度は、平均気温に比べ日毎の変動が大きく、著しい季節変化は見られなかった。B1区においては一年を通して平均湿度は高く、50%以下となる日は少なかった。B2区においては一年を通して平均湿度50%以下となる日が多く、とりわけ3月および4月に低湿度となる日が多く観測された。自然光のD区においては5月に高湿度となる傾向が見られた。

(a) 雌個体 S66

雌個体 S66 では、糞中のステロイドホルモン含量の測定期間は、2011 年 12 月 20 日～2015 年 4 月 3 日であった。測定開始時は照明コントロールの A 区であったが、2012 年より B1 区で飼育がなされた。2014 年 3 月 10 日～4 月 15 日は B2 区、2014 年 4 月 15 日～5 月 8 日は B1 区、2014 年 5 月 8 日～2015 年 4 月 1 日は自然光の D 区で飼育がなされた。2012 年において、糞中 E₂ 含量は、5 月上旬に増加を開始し、6 月下旬まで高値を示した(図 2-13b)。糞中 P₄ 含量は 4 月中旬から増加を開始し、6 月下旬頃まで高値を示し、いずれのホルモンも 6 月下旬に減少を開始し、7 月には基底値となった(図 2-13b)。2012 年 5 月 20 日～6 月 24 日に行われた同居時に 6 回の交尾が確認され、産卵は、5 月 29 日～6 月 25 日に見られ、これは糞中の性ステロイドホルモン含量が高値を示した期間内であった(図 2-13b)。糞中 B 含量は、4 月下旬に増加を開始し、5 月上旬～中旬に高値を示し、8 月から冬季に向けて再び増加する傾向が見られた(図 2-13c)。2013 年において、糞中 E₂ 含量は、4 月中旬に増加を開始し、5 月下旬から 6 月中旬に高値を示した(図 2-13b)。糞中 P₄ 含量は 5 月上旬から増加を開始し、6 月下旬頃まで高値を示した(図 2-13b)。いずれのホルモンも 6 月下旬に減少を開始し、7 月には基底値となった(図 2-13b)。2013 年 4 月 27 日～6 月 8 日に行われた同居時に 12 回の交尾が確認され、5 月 30 日～6 月 20 日には 13 回の発情が観察された(図 2-13b)。産卵は、6 月 4 日～6 月 20 日に見られ、これは糞中の性ステロイドホルモン含量が高値を示した期間内であった(図 2-13b)。糞中 B 含量は、6 月上旬に高値を示した(図 2-13c)。その後は減少傾向が見られ、10 月に低値を示したが、冬季に向けて増加した(図 2-13c)。2014 年において、本個体は 5 月 8 日に B1 区から D 区へ移動した。4 月上旬

の糞中 E₂ および P₄ 含量は、照明時間の延長に伴い増加を示していたが D 区移行後は、これらの糞中の性ステロイドホルモン含量に著しい変動は見られなかった（図 2-13b）。糞中 B 含量は、D 区移行前に高値を示していたが、移行に伴い著しく減少し、また、冬季に増加する傾向が見られた（図 2-13c）。

換羽については、2012 年において、落下羽スコアは、4 月中旬から増加が見られ、照明時間の延長と共に急増した（図 2-13d）。体色スコアは、これに伴い 5 月中旬から増加し、6 月中旬～7 月中旬に最大となり、夏羽姿となった（図 2-13d）。その後、落下羽スコアは高値を維持したまま、体色スコアが減少し、10 月上旬には落下羽スコアおよび体色スコアがスコア 0 となったことから、冬羽への換羽が行われた（図 2-13d）。2013 年において、落下羽スコアは、2 月中旬からスコア 1、5 月にはスコア 4 が見られた（図 2-13d）。体色スコアは、これに伴い 5 月中旬から増加し、6 月上旬～7 月上旬に最大となり、夏羽姿となった（図 2-13d）。その後、落下羽スコアの増加と共に体色スコアが減少し、10 月上旬には体色スコア 0 となったことから、冬羽への換羽が完了した（図 2-13d）。2014 年は、B1 区時には照明時間の増加と共に落下羽スコアの増加が見られたが、5 月 15 日の D 区へ移動後は、照明コントロール区のような換羽スコアおよび体色スコアの増加は見られず、換羽スコアおよび体色スコアは低値であった（図 2-13d）。完全な夏羽への換羽はなされず、冬季において体色スコアがわずかに見られ、完全な冬羽への換羽もなされなかった（図 2-13d）。B1、B2 区および D 区における換羽変化の一例を図 2-29 に示す。

採食量と体重については、採食量および体重は、2012 年および 2013 年において、同様の変動が見られた。採食量は、10 月に高値を示しており、24 時間照明に移行する 5 月中旬まで減少した（図 2-13e）。6 月には一時的な採食量の増加が見られるが、7 月には再び減少した（図 2-13e）。その後は照明時間の減少に伴い採食量は増加した（図 2-13e）。体重は、測定を行ったいずれの年も 1 月上旬に最大（2012 年：1027 g、2013 年：992 g、2014 年 977 g）となり、照明時間の延長と共に減少した（図 2-13e）。2012 年および 2013 年は 7 月上旬に体重が最小（2012 年：541 g、2013 年：454 g）となり（図 2-13e）、その後は照明時間の短縮および採食量の増加と共に体重の増加が見られ、冬季に高い体重が維持された（図

2-13e)。2014 年においては、照明コントロール下では、2012 年および 2013 年と同様の採食量の減少傾向が見られたが、5 月 15 日の D 区へ移動後は、採食量の増加が見られた (図 2-13e)。9 月に採食量が低値を示し、その後増加が見られたが、照明コントロール区時のような著しい増加は見られなかった (図 2-13e)。体重は、6 月上旬に減少 (710 g) したが、照明コントロール区時のような著しい減少および冬季に向けての増加も見られず、冬季は体重の減少が見られた (図 2-13e)。全期間を通して、平均気温と採食量との間には正の相関が認められた ($n = 76$, $r = 0.30$, $p < 0.02$, 図 2-13a,e), 体重との間には有意な負の相関が認められた ($n = 37$, $r = -0.75$, $p < 0.01$, 図 2-13a,e)。

(b) 雌個体 S127

雌個体 S127 では、糞中のステロイドホルモン含量の測定期間は、2012 年 1 月 3 日～2014 年 3 月 28 日であった。測定期間を通して照明コントロールの B1 区で飼育がなされた。2012 年において、糞中 E_2 含量は、4 月中旬に増加を開始し、6 月中旬に高値を示した (図 2-14b)。糞中 P_4 含量は 5 月中旬から増加を開始し、5 月下旬～6 月中旬に高値を示した (図 2-14b)。いずれのホルモンも 6 月下旬に減少し、基底値となった (図 2-14b)。2012 年 5 月 22 日～6 月 3 日に行われた同居時に 4 回の交尾が確認され、5 月下旬および 6 月上旬に発情が観察された (図 2-14b)。産卵は、5 月 24 日～6 月 19 日に見られ、これは糞中の性ステロイドホルモン含量が高値を示した期間内であった (図 2-14b)。糞中 B 含量は、1～3 月に比べ、4 月に高値を示したが、明確な変動は見られなかった (図 2-14c)。2013 年において、糞中 E_2 含量は、4 月下旬に増加を開始し、5 月下旬～6 月中旬に高値を示した (図 2-14b)。 P_4 含量は 4 月中旬から増加を開始し、6 月下旬まで高値を示した (図 2-14b)。いずれのホルモンも 6 月下旬に減少を開始し、7 月には基底値となった (図 2-14b)。2013 年 5 月 22 日～6 月 8 日に行われた同居時に 6 回の交尾が確認され、5 月中旬および 6 月中旬に発情が観察された (図 2-14b)。産卵は、5 月 21 日～7 月 6 日に見られ、これは糞中の性ステロイドホルモン含量が高値を示した期間内であった (図 2-14b)。糞中 B 含量は 4 月より増加が見られ、5 月下旬に高値を示し、10～1 月にかけても高値が見られた (図 2-14c)。

換羽については、2012 年において、落下羽スコアは、3 月上旬からスコアが見られ始め、5 月上旬にはスコア 4 が見られるようになった。体色スコアは、これに伴い 5 月中旬から増加し、6 月上旬に高値を示し、夏羽姿となった（図 2-14d）。その後、高値の落下羽スコアと共に体色スコアが減少し、10 月上旬には落下羽スコアおよび体色スコアがスコア 0 となったことから、冬羽への換羽が完了した（図 2-14d）。2013 年において、落下羽スコアは、3 月上旬から見られ、5 月にはスコア 4 が見られるようになった（図 2-14d）。体色スコアは、これに伴い 5 月中旬から増加し、6 月上旬～8 月上旬に最大となり、夏羽姿となった（図 2-14d）。その後、体色スコアの減少と落下羽スコアが見られ、10 月上旬には体色スコア 0 となったことから、冬羽への換羽が完了した（図 2-14d）。2014 年において、落下羽スコアは、4 月上旬からスコア 1、5 月にはスコア 4 が見られるようになった（図 2-14d）。体色スコアは、これに伴い 5 月中旬から増加し、6 月には最大となり夏羽姿となった（図 2-14d）。その後、高値の落下羽スコアと共に、体色スコアが減少し、11 月上旬には体色スコア 0 となったことから、冬羽への換羽が完了した（図 2-14d）。

採食量と体重については、2012 年において、採食量は、1～2 月上旬に高く、5 月中旬に低値が見られた（図 2-14e）。体重は、4 月上旬に最大（860 g）となり、照明時間の延長と共に減少し、8 月に最小（510 g）となった（図 2-14e）。その後は照明時間の短縮および採食量の増加と共に体重の増加が見られ、冬季に高い体重が維持された（図 2-14e）。2013 年において、採食量は、照明時間の延長と共に減少し、3 月下旬～5 月に低値を示した（図 2-14e）。体重は、3 月上旬に最大（1013 g）となり、照明時間の延長と共に減少し、8 月に最小（610 g）となった（図 2-14e）。その後は照明時間の短縮および採食量の増加と共に体重の増加が見られ、冬季に高い値となった（図 2-14e）。2014 年において、採食量は、照明時間の延長と共に減少し、4 月下旬から 5 月上旬に低値を示した（図 2-14e）。体重は、3 月上旬に最大（1056 g）であり、照明時間の延長と共に減少したが、2012 年および 2013 年のような著しい減少は見られなかった（図 2-14e）。また、冬季に向けての採食量の増加および体重の増加は見られなかった（図 2-14e）。全期間を通して、平均気温と体重との間には有意な負の相関が認められた（ $n=41$, $r = -0.64$, $p < 0.01$, 図 2-14a,e）。

(c) 雌個体 S137

雌個体 S137 では、糞中のステロイドホルモン含量の測定期間は、2013 年 5 月 17 日～2015 年 8 月 28 日であった。2013 年 5 月 15 日に照明コントロールの B1 区より移動がなされ、2013 年 5 月 15 日～2014 年 4 月 1 日は自然光の D 区で飼育がなされた。2014 年 4 月 1 日～2015 年 8 月 28 日は B1 区で飼育がなされた。

2013 年において、本個体は 5 月 15 日に B1 区から D 区へ移動した。糞中 E₂ および P₄ 含量に著しい変動は見られなかった (図 2-15b)。糞中 B 含量は、5 月中旬の測定開始時から冬季に向けて著しい増加が見られた (図 2-15c)。2014 年において、糞中 E₂ 含量は、2 月上旬より増加を開始し、5 月下旬～6 月下旬に高値を示した (図 2-15b)。糞中 P₄ 含量は、4 月上旬から増加を開始し、高値となり 5 月下旬～6 月下旬に特に高値を示した (図 2-15b)。いずれのホルモンも 6 月下旬に減少を開始し、7 月には基底値となった (図 2-15b)。6 月上旬には発情が観察され、産卵は 5 月 23 日～7 月 1 日に見られ、これは糞中の性ステロイドホルモン含量が高値を示した期間内であった (図 2-15b)。糞中 B 含量は、4 月より増加が見られ、6～7 月に高値を示した。その後は減少したが、10～1 月にかけても高値が見られた (図 2-15c)。2015 年において、糞中 E₂ 含量は、4 月に増加を開始し、5 月下旬～6 月上旬に高値を示した (図 2-15b)。糞中 P₄ 含量は 3 月中旬から増加を開始し、6 月に高値を示した (図 2-15b)。いずれのホルモンも 8 月には減少していた (図 2-15b)。2015 年 6 月 8 日～6 月 18 日に行われた同居時に 3 回の交尾が確認され、6 月上旬および 6 月中旬に発情が観察された (図 2-15b)。産卵は、6 月 3 日～7 月 3 日に見られ、これは糞中の性ステロイドホルモン含量が高値を示した期間内であった (図 2-15b)。糞中 B 含量は 4 月より増加が見られ、6 月に高値を示した (図 2-15c)。

換羽については、2013 年は、B1 区時には照明時間の増加と共に落下羽スコアの増加と体色スコアの増加が見られたが、5 月 15 日の D 区へ移動後は、落下羽スコアはスコア 1 以上にはならなかった (図 2-15d)。体色スコアは、移動後も増加し、6 月中旬最大となったが、照明コントロール区よりもスコアが低く、減少開始が早かった (図 2-15d)。体色スコアは 10 月にスコア 0 となったことから冬羽への換羽がなされた (図 2-15d)。2014 年に

において、落下羽スコアは、4月上旬からスコアが増加し、4月中旬にはスコア4が見られるようになった(図 2-15d)。体色スコアは、これに伴い5月中旬～8月中旬に高値を示し、夏羽姿となった(図 2-15d)。その後、高値の落下羽スコアと共に、体色スコアが減少し、10月上旬には落下羽スコアおよび体色スコアがスコア0となったことから、冬羽への換羽が完了した(図 2-15d)。2015年において、落下羽スコアは3月中旬からスコア1、5月にはスコア4が見られるようになった(図 2-15d)。体色スコアは、これに伴い5月中旬から増加し、6月上旬～8月中旬に最大となり、夏羽姿となった(図 2-15d)。

採食量と体重については、2013年において、照明コントロール下では、2011年11月から採食量の減少傾向が見られたが、5月15日のD区へ移動後は、採食量の増加が見られた(図 2-15e)。体重は、照明コントロール下の2011年12月～2012年3月に高い値(830～849 g)が維持されており、照明時間の延長と共に減少が見られ、D区へ移動後の7月に最小(680 g)となったが、照明コントロール区時のような著しい体重の減少は見られなかった(図 2-15e)。また、冬季に向けての採食量の増加は見られず、体重の増加も著しくはなかった(図 2-15e)。2014年において、採食量は、4月以降に一定の値を維持した(図 2-15e)。体重は、2013年12月の最大時(838 g)から照明時間の延長と共に減少し、7月に最小(515 g)となった(図 2-15e)。その後は照明時間の短縮に伴い体重の増加が見られ、冬季に高い値となった(図 2-15e)。2015年において、採食量は、2014年12月より減少する傾向が見られたが、著しい減少は見られず、4月下旬からは一定の値を維持した。体重は、1月に最大(910 g)となり、照明時間の延長と共に減少し、6～8月に最小(510～518 g)となった(図 2-15e)。その後は照明時間の短縮に伴い体重の増加が見られた(図 2-15e)。全期間を通して、平均気温と採食量との間には有意な正の相関が認められた($n = 70$, $r = 0.47$, $p < 0.01$, 図 2-15a,e), 体重との間には有意な負の相関が認められ($n = 27$, $r = -0.74$, $p < 0.01$, 図 2-15a,e)。

(d) 雌個体 S152

雌個体 S152 では、糞中のステロイドホルモン含量の測定期間は、2013年4月2日～10

月 20 日であり、本個体は 2013 年 10 月 24 日に死亡した。測定期間を通して、照明コントロールの B2 区で飼育がなされた。糞中 E₂ 含量は、4 月下旬と 6 月下旬に高値を示した（図 2-16b）。糞中 P₄ 含量は、5 月中旬から増加を開始し、高値となり 6 月下旬に高値を示した（図 2-16b）。いずれのホルモンも 6 月下旬に減少を開始し、7 月には基底値となった（図 2-16b）。2013 年 4 月 27 日～6 月 10 日に同居が行われ、産卵は 6 月 3 日～6 月 26 日に見られ、これは糞中の性ステロイドホルモン含量が高値を示した期間内であった（図 2-16b）。

換羽については、落下羽スコアは、3 月中旬からスコア 1、5 月上旬にはスコア 3 がみられるようになった。体色スコアは、これに伴い 5 月中旬から増加し、6 月上旬～8 月中旬に最大となり、夏羽姿となった（図 2-16c）。その後、体色スコアが減少し、10 月上旬には体色スコアがスコア 0 となったことから、冬羽への換羽が完了した（図 2-16c）。

採食量と体重については、採食量は、照明時間の延長に伴い増加し、7 月に低値を示し、その後は照明時間の短縮と共に増加が見られた（図 2-16d）。体重は、測定は 3 回のみであったが、採食量の冬季に向けた増加に伴い増加する傾向が見られた（図 2-16d）。

(e) 雌個体 S225

雌個体 S225 では、糞中のステロイドホルモン含量の測定期間は、2014 年 4 月 1 日～5 月 2 日であり、本個体は 2014 年 5 月 5 日に死亡した。2014 年 4 月 1 日に照明コントロールの B1 区より移動がなされ、測定期間を通して自然光の D 区で飼育がなされた。測定期間は短期間であったが、4 月中旬に糞中 E₂ よび P₄ 含量のピークが見られた（図 2-17b）。

(f) 雄個体 S53

雄個体 S53 では、糞中のステロイドホルモン含量の測定期間は、2012 年 1 月 3 日～2014 年 4 月 1 日であり、本個体は 2014 年 4 月 2 日に死亡した。測定開始時は照明コントロールの A 区であったが、2012 年より B1 区で飼育がなされた。2014 年 3 月 10 日～2014 年 4 月 1 日は B2 区で飼育がなされた。2012 年において、糞中 T および AD 含量は、4 月中旬から増加を開始し、5 月中旬～6 月中旬に高値を示した（図 2-18b）。いずれのホルモンも 6

月下旬には減少を開始し、7月上旬には基底値となった（図 2-18b）。2012 年 5 月 20 日～6 月 24 日に行われた同居時に 15 回の交尾が確認され、これは糞中の性ステロイドホルモン含量が著しい高値を示した期間内であった（図 2-18b）。糞中 B 含量は、1～3 月に比べ、4 月に高値を示し、6 月にも高値が見られた（図 2-18c）。2013 年において、糞中 T および AD 含量は、4 月下旬から増加を開始し、5 月下旬～6 月中旬に高値を示した（図 2-18b）。これらのホルモンは 6 月下旬には減少を開始し、7月上旬には基底値となった（図 2-18b）。2013 年 4 月 27 日～6 月 8 日に行われた同居時には 5 月 16 以降に 15 回の交尾が確認され、これは糞中の性ステロイドホルモン含量が著しい高値を示した期間内であった（図 2-18b）。糞中 B 含量は、1～3 月上旬に高値を示した後に減少し、4 月中旬～5 月上旬に再び高値が見られた。6 月以降は低値を示したが、10 月より再び増加が見られた（図 2-18c）。

換羽については、2012 年において、落下羽スコアは、1 月上中旬からスコア 1、5 月中旬からスコア 4 が見られるようになった（図 2-18d）。体色スコアは、これに伴い 6 月上旬から増加し、7 月上旬～8 月中旬に最大となり、夏羽姿となった（図 2-18d）。その後、体落下羽スコアは高値を維持したまま、体色スコアが減少し、10 月上旬には体色スコア 0 となったことから、冬羽への換羽が完了した（図 2-18d）。2013 年において、落下羽スコアは、3 月上中旬からスコア 1、24 時間照明時移行後の 6～7 月にスコアの増加が見られるようになった（図 2-18d）。体色スコアは、これに伴い 6 月上旬から増加し、7 月中旬～8 月中旬に最大となり、夏羽姿となった（図 2-18d）。その後、落下羽スコアは高値を維持したまま、体色スコアが減少し、10 月上旬には体色スコア 0 となったことから、冬羽への換羽が完了した（図 2-18d）。

採食量および体重は、各年で同様の変動が見られた。採食量は、10～11 月の高値から減少が見られ、5～6 月にはとりわけ低い値となった（図 2-18e）。その後は照明時間の減少に伴い採食量は増加した（図 2-18e）。体重は、1～4 月に高い値で維持されており（2012 年：1037～1087 g, 2013 年：1058～1093 g）、照明時間の延長と共に体重は減少し、7 月に最小（2012 年：555 g, 2013 年：537 g）となった（図 2-18e）。その後は照明時間の減少および採食量の増加と共に体重の増加が見られ、冬季に高い体重が維持された（図 2-18e）。全期

間を通して、平均気温と採食量との間には正の相関が認められ ($n=59$, $r=0.29$, $p<0.05$, 図 2-18a,e), 体重との間には有意な負の相関が認められた ($n=38$, $r=-0.85$, $p<0.01$, 図 2-18a,e)。

(g) 雄個体 S65

雄個体 S65 では、糞中のステロイドホルモン含量の測定期間は、2011 年 12 月 20 日～6 月 25 日であり、本個体は 2012 年 6 月 28 日に死亡した。測定開始時は照明コントロールの A 区であったが、2012 年より B1 区で飼育がなされた。糞中 T 含量は、4 月中旬から増加を開始し、5 月中旬～6 月上旬に高値を示し、その後は減少傾向が見られた (図 2-19b)。2012 年 5 月 25 日～6 月 24 日に行われた同居時に 13 回の交尾が確認され、これは糞中 T 含量が高値を示した期間内であった (図 2-19b)。

換羽については、落下羽スコアは、3 月中旬からスコア 1、5 月中旬にはスコア 4 が見られるようになった (図 2-19c)。体色スコアは、これに伴い 6 月中旬から見られた (図 2-19c)。

採食量と体重については、採食量は、10～12 月上旬の高値から減少が見られ、6 月にはとりわけ低い値が見られた (図 2-19d)。体重は、1～2 月に高い値 (1140～1106 g) で維持されており、照明時間の延長と共に減少した (図 2-19d)。全期間を通して、平均気温と体重との間には負の相関が認められた ($n=9$, $r=-0.73$, $p<0.05$, 図 2-19a,e)。

(h) 雄個体 S130

雄個体 S130 では、糞中のステロイドホルモン含量の測定期間は、2012 年 7 月 11 日～2014 年 3 月 28 日であった。測定期間を通して照明コントロールの B1 区で飼育がなされた。糞中 T および AD 含量は、4 月下旬から増加を開始し、5 月中旬～6 月上旬に高値を示した (図 2-20b)。その後は減少し、7 月上旬には基底値となり、低値で推移した (図 2-20b)。2013 年 5 月 22 日～6 月 8 日に行われた同居時に 9 回の交尾が確認され、これは糞中の性ステロイドホルモン含量が著しい高値を示した期間内であった (図 2-20b)。糞中 B 含量は、3～5 月に高値を示した後に減少したが、12 月には一時的な高値が見られた (図 2-20c)。

換羽については、2012 年において、落下羽スコアは、7 月にスコア 4 であり、体色スコアは、7 月下旬に高値を示し、夏羽姿となった（図 2-20d）。落下羽スコアは高値を維持したまま、体色スコアは減少し、9 月中旬には体色スコア 0 となったことから、冬羽への換羽が完了した（図 2-20d）。2013 年において、落下羽スコアは、3 月上旬からスコアが見られ、照明時間の延長と共にスコアは増加した（図 2-20d）。体色スコアは、これに伴い 6 月上旬から増加し、7 月上旬～8 月上旬に最大となり、夏羽姿となった（図 2-20d）。その後、高値の落下羽スコアと共に体色スコアが減少し、9 月中旬には体色スコア 0 となったことから、冬羽への換羽が完了した（図 2-20d）。2014 年において、落下羽スコアは、4 月上旬からスコアが見られ、照明時間の延長と共にスコアは増加した（図 2-20d）。体色スコアは、6 月上旬から増加し、8 月に最大となり夏羽姿となった（図 2-20d）。その後、高値の落下羽スコアと共に体色スコアが減少し、10 月上旬には体色スコア 0 となったことから、冬羽への換羽が完了した（図 2-20d）。

採食量および体重については、各年で同様の変動が見られた。採食量は、9～11 月の高値から減少が見られ、2013 年は 5～6 月上旬、2014 年は 6～7 月上旬にとりわけ低い値が見られた（図 2-20e）。その後は照明時間の短縮に伴い採食量は増加した（図 2-20e）。体重は、12～4 月に高い値（2013 年：927～968 g, 2014 年：1001～1028 g）で維持されており、照明時間の延長と共に減少し、8 月に最小となった（2013 年：609 g, 2014 年：584 g）（図 2-20e）。その後は照明時間の短縮および採食量の増加と共に体重の増加が見られ、冬季に高い体重が維持された（図 2-20e）。全期間を通して、平均気温と体重との間には有意な負の相関が認められた（ $n=33$, $r=-0.77$, $p<0.01$, 図 2-20a,e）。

(i) 雄個体 S136

雄個体 S136 では、糞中のステロイドホルモン含量の測定期間は、2013 年 4 月 2 日～10 月 18 日であり、本個体は 2013 年 10 月 22 日に死亡した。測定期間を通して、照明コントロールの B2 区で飼育がなされた。糞中 T 含量は、測定開始時の 4 月から増加し、5 月下旬～6 月下旬に高値を示した（図 2-21b）。7 月上旬に糞中 T 含量は減少を開始した（図 2-21b）。

2013 年 4 月 27 日～6 月 10 日に行われた同居が行われたが、交尾は観察されなかった（図 2-21b）。

換羽については、落下羽スコアは、3 月上旬からスコアが見られ、照明時間の延長と共にスコアは増加した（図 2-21c）。体色スコアは、これに伴い 6 月下旬から増加し、9 月上旬には最大となった（図 2-21c）。その後、落下羽スコアは高値を維持したまま、体色スコアが減少し、10 月には体色スコア 0 となったことから、冬羽への換羽が完了した（図 2-21c）。

採食量と体重については、採食量は、11 月の高値から減少が見られ、7 月上旬から照明時間の短縮と共に増加した（図 2-21d）。体重は、3 月に最大（768 g）であり、照明時間の延長と共に減少し、7 月に最小（486 g）となった（図 2-21d）。その後は照明時間の短縮および採食量の増加と共に体重の増加が見られた（図 2-21d）。全期間を通して、平均気温と体重との間には有意な負の相関が認められた（ $n = 10$, $r = -0.66$, $p < 0.05$, 図 2-21a,d）。

(j) 雄個体 S148

雄個体 S148 では、糞中のステロイドホルモン含量の測定期間は、2013 年 5 月 17 日～2015 年 3 月 31 日であった。2013 年 5 月 15 日に照明コントロールの B1 区より移動がなされ、2013 年 5 月 15 日～2014 年 4 月 1 日は自然光の D 区で飼育がなされた。2014 年 4 月 1 日～2015 年 3 月 31 日は B1 区で飼育がなされた。

2013 年において、本個体は 5 月 15 日に B1 区から D 区へ移動した。糞中 T および AD 含量は、他個体のような変動が見られなかった（図 2-22b）。糞中 B 含量は、冬季に上昇する傾向が見られた（図 2-22c）。2014 年において、4 月 1 日より照明コントロール B1 区での飼育となり、糞中 T 含量は 5 月に向けた増加が見られたが、6 月は低値となり、7 月下旬に再び増加が見られたが、他個体のような著しい変動は見られなかった（図 2-22b）。糞中 AD 含量は、4 月上旬より増加し、4 月中旬から 5 月中旬にピークとなったが、他個体の糞中 AD 含量値に比べ低値であった（図 2-22b）。糞中 B 含量は、6 月に向け減少し、冬季に高値が見られた（図 2-22c）。

換羽については、2013 年において、5 月 15 日に D 区へ移動したが、10 月を除く移動の

前後の観測で落下羽スコアはスコア 1 以上にはならなかった (図 2-22d)。体色スコアは、6 月中旬～8 月上旬にわずかにスコアが見られたが、夏羽換羽には至らなかった (図 2-22d)。2014 年において、落下羽スコアは、4 月上旬からスコア 1 が見られ始め、照明時間の延長と共にスコアは増加した (図 2-22d)。体色スコアは、これに伴い 5 月中旬から増加し、7～8 月中旬には最大となり、夏羽姿となった (図 2-22d)。その後、落下羽スコアは高値を維持したまま、体色スコアが減少し、9 月中旬には体色スコア 0 となったことから、冬羽への換羽が完了した (図 2-22d)。

採食量と体重については、2013 年において、照明コントロール下では採食量の著しい変動は見られず、5 月 15 日の D 区へ移動後は、5 月中旬に低値を示し、6～7 月に増加する様子が見られた (図 2-22e)。体重は、D 区へ移動直前に最小 (609 g) であり、移行後は緩やかに増加が見られ、12～3 月に高い値 (830～854 g) で維持された (図 2-22e)。照明コントロール区のような冬季に向けての採食量の増加は見られなかった (図 2-22e)。2014 年は 6 月までは採食量の変動は見られず、6 月中旬より採食量の増加が見られた (図 2-22e)。体重は、照明時間の延長と共に減少し、8 月下旬に最小 (526 g) となった (図 2-2e)。その後は照明時間の短縮および採食量の増加と共に体重の増加が見られ、12 月に最大 (1027 g) となった (図 2-22e)。全期間を通して、平均気温と採食量との間には有意な正の相関が認められた ($n=46$, $r=0.55$, $p<0.01$, 図 2-22a,e)。

(k) 雄個体 S198

雄個体 S198 では、糞中のステロイドホルモン含量の測定期間は、2014 年 4 月 1 日～2015 年 3 月 31 日であった。2014 年 4 月 1 日に照明コントロールの B1 区より移動がなされ、測定期間を通して自然光の D 区で飼育がなされた。糞中 T 含量は 6 月下旬～8 月上旬に高値を示す場合があったが、他個体のような変動は見られなかった (図 2-23b)。糞中 B 含量は測定開始の 4 月から緩やかに減少する傾向が見られた (図 2-23c)。

換羽については、落下羽スコアは、4 月 1 日の D 区へ移動後、4 月中旬からスコア 1 が見られ始めたが、スコア 1 以上にはならなかった (図 2-23d)。体色スコアは、一年を通し

て変化が見られなかった（図 2-23d）。

採食量と体重については、採食量は、一年を通して増減は見られず、一定の値を推移していた（図 2-23e）。体重は、日照時間が最長となる 6 月に最小（690 g）となり、その後は日照時間の減少と共に増加し、12 月に最大（892 g）となった（図 2-23e）。照明コントロール区のような著しい採食量および体重の増減は見られなかった。

2-3-1-3 横浜市繁殖センターでの糞中のステロイドホルモン代謝物含量の動態

横浜市繁殖センターにおける照明コントロールは富山市ファミリーパークと同一の照明コントロールの B1 区条件であった。飼育施設内の平均気温および平均湿度は、図 2-24a, 25a に示した。平均気温は、5～9 月に 20℃を上回る日が多く観測され、測定期間を通して 10℃を下回る日は少なかった。平均湿度は、平均気温に比べ日毎の変動が大きかった。測定期間を通して平均湿度は 60%以上である日が多く観測された。

(a) 雌個体 S208

雌個体 S208 では、糞中のステロイドホルモン含量の測定期間は、2014 年 3 月 23 日～11 月 3 日であった。糞中 E₂および P₄含量は、4 月中旬より変動が見られ、5 月中旬より増加し、5 月下旬に高値となった後、減少した（図 2-24b）。7 月より再び増加し、糞中 E₂含量は 7 月中旬および 8 月中旬、糞中 P₄含量は 8 月中旬から下旬に高値となった（図 2-24b）。その後はいずれのホルモンも減少し、9 月には基底値となった（図 2-24b）。産卵は、5 月 22 日～6 月 9 日と 8 月 8 日～8 月 24 日の 2 つの期間に見られ、いずれも糞中ホルモン含量が高値となっている期間内であった（図 2-24b）。2014 年 5 月 25 日～6 月 2 日に同居が行われ、5 月 26 日～6 月 6 日に 3 回の発情が観察された（図 2-24b）。8 月 10 日にも発情が観察されたため、別の雄個体と同居が行われた（図 2-24b）。

換羽については、落下羽スコアは、3 月下旬からスコア 1 が見られ始め、5 月中旬にスコアが最大となった。体色スコアは、落下羽スコアの増加に伴い 5 月中旬より増加し、夏羽姿となり、7 月中旬まで高値が維持された（図 2-24c）。その後は照明時間の短縮と共に落下羽スコアおよび体色スコアの減少が見られ、9 月には体色スコアは低値を示し、冬羽

への換羽の進行が見られた（図 2-24c）。しかし、再び落下羽スコアとこれに伴う体色スコアの増加があり、夏羽様の換羽が 9 月下旬まで進行した（図 2-24c）。11 月には体色スコア 0 となり、冬羽への換羽が完了した（図 2-24c）。

体重については、4 月の最大値（665 g）から照明時間の延長と共に減少が見られ、24 時間照明中には体重が著しく減少し、7 月下旬には最小（446 g）となった（図 2-24e）。その後は照明時間の短縮と共に体重の増加が見られた（図 2-24e）。平均気温と体重との間には正の相関が認められた（ $n=6$, $r=-0.82$, $p<0.05$, 図 2-24a,d）。

(b) 雄個体 S239

雄個体 S239 では、糞中のステロイドホルモン含量の測定期間は、2014 年 3 月 17 日～9 月 4 日であり、本個体は 2014 年 9 月 4 日に死亡した。糞中 T 含量は、4 月より変動が見られ、5 月下旬に著しく増加し、6 月中旬まで高い値が見られた（図 2-25b）。その後は減少し、7 月には基底値となった（図 2-25b）。

換羽については、落下羽スコアは、4 月中旬からスコア 1 が見られ始め、7 月下旬にスコア 4 を示した。体色スコアは、6 月上旬に増加が見られ始め、8 月下旬に最大となり、夏羽への換羽が完了した。その後は体色スコアが減少したことから、冬羽への換羽が進行していた（図 2-25c）。

体重については、3 回のみ測定なのであったが、6 月下旬に低い値（477 g）を示した（図 2-25e）。

2-3-1-4 長野市茶臼山動物園での糞中のステロイドホルモン代謝物含量の動態

長野市茶臼山動物園の自然光と照明コントロールの混合した C 区では、5～8 月のみ照明時間 24 時間の照明コントロールを行ない、5～8 月以外の期間は自然光下での飼育を行った。自然光飼育下での日照は 12～1 月は日照時間が 10 時間以下であった。24 時間照明開始前の 4 月は 12 時間 30 分、24 時間照明終了後の 9 月は 13 時間の日照時間であった。飼育施設内の平均気温および平均湿度は、図 2-26a, 27a に示した。平均気温は、7～8 月に

20℃を上回る日が多く観測され、測定期間の3月および12月には10℃を下回る日が多く観測された。平均湿度は、平均気温に比べ日毎の変動が大きかった。平均湿度は3月および11～12月に70%を上回る日が多く観測され、5～9月には50%を下回る日が多く観測された。

(a) 雌個体 S150

雌個体 S150 では、糞中のステロイドホルモン含量の測定期間は、2014 年 3 月 17 日～12 月 29 日であった。糞中 E₂ および P₄ 含量は、5 月中旬から増加を開始し、6 月上旬～7 月中旬まで高い値が見られた (図 2-26b)。その後は減少し、7 月下旬に基底値となった (図 2-26b)。産卵は、2014 年 6 月 4 日～7 月 15 日に見られ、これは糞中ホルモン含量が高値となっている期間内であった (図 2-26b)。糞中 B 含量は、測定開始の 3 月下旬から増加が見られ、6 月中旬に高値を示し、その後は減少する傾向が見られた (図 2-26c)。

換羽については、落下羽スコアは、自然光下ではスコア 0 であった (図 2-26d)。24 時間照明の移行後は体色スコアの増加と落下羽スコアの増加が見られた (図 2-26d)。体色スコアは、6 月中旬には高値を示し、夏羽への換羽が完了し、体色スコアは 8 月まで高値を示した (図 2-26d)。その後は体色スコアが減少し、9 月中旬以降に落下羽スコアおよび体色スコアがスコア 0 となったことから冬羽への換羽が完了した (図 2-26d)。

採食量と体重については、採食量は、測定開始の 3 月から増加し、5 月には増減が見られたが、6 月～7 月上旬は高値を示した (図 2-26e)。7 月中旬～8 月には低値となったが、その後増加し、自然光への移行後は一定となった (図 2-26e)。体重は、6 月の最大値 (813 g) から減少が見られ、8 月上旬には最小 (557 g) となった (図 2-26e)。その後は採食量の増加と共に体重の増加が見られ、12 月まで増加傾向が続いた (図 2-26e)。また、平均気温と採食量との間には正の相関が認められた ($n = 306$, $r = 0.51$, $p < 0.01$, 図 2-26a,e)。

(b) 雄個体 S60

雄個体 S60 では、糞中のステロイドホルモン含量の測定期間は、2014 年 3 月 17 日～12 月 29 日であった。糞中 T 含量は、5 月下旬から増加を開始し、6 月上旬に高値をとった (図 2-27b)。その後は減少し、8 月には基底値となった (図 2-27b)。糞中 B 含量は、測定

開始の3月中旬から増加を開始し、6月下旬まで高値が見られた(図 2-27c)。7月は低値となったが、その後は大きく変動しながら減少する傾向が見られた(図 2-27c)。

換羽については、落下羽スコアは、自然光下では3月中旬にスコア1が見られたが、スコア0が多く観測された(図 2-27d)。24時間照明の移行後は落下羽スコア1が観測され、6月上旬にはスコア3が見られた(図 2-27d)。体色スコアは落下羽スコアの増加に伴い6月中旬より増加が見られ、8月上旬には体色スコアが最大となり、夏羽への換羽が完了した(図 2-27d)。その後は体色スコアが減少し、9月中旬以降に落下羽スコアおよび体色スコアがスコア0となったことから冬羽への換羽が完了した(図 2-27d)。

採食量と体重については、採食量は、測定開始の3月から減少し、5月中旬に最小となった(図 2-27e)。その後は増加が見られ、8月中旬～下旬には高値を示した後、自然光に移行してからは減少が見られ、10月以降は一定となった(図 2-27e)。体重は、4月の最大値(1020 g)から減少が見られ、7月上旬には最小(624 g)となった(図 2-27e)。採食量の増加と共に体重の増加が見られ、12月まで増加傾向が続いた(図 2-27e)。また、平均気温と体重との間には有意な負の相関が認められた($n=9$, $r=-0.88$, $p<0.01$, 図 2-27a,e)。

2-3-2 雄の眼窩上肉冠と糞中アンドロジェン含量の変化

眼窩上肉冠の色とサイズの変化は、糞中TまたはAD含量の増加と共に起こった(図 2-28a~h)。東京都恩賜上野動物園のA区および富山市ファミリーパークのB1区の雄スバルバルライチョウにおける眼窩上肉冠サイズ変化の開始は個体により2月中旬から6月上旬に確認され、5月中旬から6月中旬には最大スコア3となった(図 2-28a~h)。眼窩上肉冠の色は3月中旬から6月上旬には淡い色から濃い色へと変化しているのが確認された(図 2-28c~h)。東京都恩賜上野動物園の雄個体では、色の変化は確認されなかったが(図 2-28a,b)、サイズスコア増加後に色の変化が確認される傾向が見えられた(図 2-28c~f)。糞中T含量は4月に上昇を開始し、ピークは5月から7月に見られ、7月から8月に基底値となった(図 2-28a~g)。雄個体S53, S130およびS148における糞中AD含量も同様の変動傾向を示した(図 2-28c,f,h)。雄個体S148においては、他個体で見られたような糞中T

含量のピークが見られなかった（図 2-28h）。色の退色は、6 月上旬から 8 月上旬に見られ（図 2-28c~h）、サイズの退縮が 7 月中旬から 8 月上旬までには確認された（図 2-28a~h）。糞中 T または AD 含量の減少が開始する頃に眼窩上肉冠の退色、次いでサイズスコアの減少という様相が見られた。雄個体 S65 では、他の個体よりも眼窩上肉冠の赤さの維持期間は短く、退色は早かった。糞中 T 含量の変化は他個体のような著しい変化はなかった（図 2-28d）。

富山市ファミリーパークの自然光の D 区において、雄個体 S148 および雄個体 S198 では糞中 T 含量の著しい変動は見られなかった（図 2-28h,i）。雄個体 S148 ではサイズスコア 3 とスコア 1 の変動を繰り返す様相が見られ、10 月中旬以降はスコア 1 に安定し、眼窩上肉冠の肥大期間は照明コントロール下の個体に比べ長期間であった（図 2-28h）。雄個体 S198 では、サイズに変化は見られなかった（図 2-28i）。

2-4 考 察

2-4-1 内分泌動態の長期モニタリングと性行動

本研究において、飼育下スパールバルライチョウの排泄された腸糞を用いて糞中のステロイドホルモン含量を測定した。糞と尿の代謝経路は異なるが、草食性のガチョウでは、糞と尿の排泄速度に差がなかったことが報告されており（Hirschenhauser et al.,2000）、これまでに鳥類の糞中のステロイドホルモンの測定の際に、糞との尿を分けずに用いられてきた。（Penfold et al., 2013）。そのため、本研究においても糞と尿を分けずに使用した。糞（尿を含む）を用いることで、長期的なモニタリングが可能となり、飼育環境が内分泌に与える影響および内分泌がライチョウの行動や外観に与える影響を明らかにすることができた。

2-4-1-1 雌スパールバルライチョウの繁殖生理

繁殖を促進させるために、繁殖生理、特に鳥類では産卵生理を把握しておくことは有用である。しかし、雌ライチョウにおけるの生殖内分泌動態について調べた報告は雄に比べて少ない。鳥類では、排卵に向けて卵胞の急速成長のために肝臓における卵黄前駆物質の

生産のための E₂ 分泌と、それに続く高濃度の P₄ 分泌によるタンパク質分解酵素活性の高まりが起こる (今井, 2003)。そのため、本研究ではこれらの性ステロイドホルモンに着目し、雌の卵巢活動の指標として測定した。照明コントロール下における雌スバーバルライチョウの糞中 E₂ 含量は、多くの場合に、照明時間が徐々に長くなり始める 3~5 月に増加を開始し、糞中 P₄ 含量は 4~5 月に増加を開始した。照明時間の延長に伴い、糞中 E₂ 含量とそれに続く P₄ 含量の著しい増加が見られ、5~7 月に高い値が見られた。その後はいずれのホルモンも減少し、7~8 月には基底値となった。産卵の開始は、多くの個体で 5 月中旬から 6 月中旬であり、産卵は糞中の性ステロイドホルモン含量が高値を示した期間内に見られた。また、産卵前や産卵時には、発情が見られた場合があった。最終産卵は、6 月中旬から 7 月中旬に見られ、この頃に糞中 E₂ および P₄ 含量の著しい減少が見られた。照明時間の延長に伴い糞中 E₂ および P₄ 含量が増加し、産卵期にこれらの糞中の性ステロイドホルモン含量が高値となったことから、これらの糞中の性ステロイドホルモン含量の変動は、雌の卵巢においての産卵に向けた E₂ 分泌の増加と、それに続く放卵のための P₄ 分泌を捉えたものと考えられた。また、産卵終了に伴うこれらの性ステロイドホルモン含量の減少は、産卵終了に伴う卵巢活動の低下を反映したものとみなされた。野生の雌スバーバルライチョウ (Stokkan et al., 1986b) およびカラフトライチョウ (Hannon and Wingfield, 1990) では、産卵期に最も高い血中ホルモン濃度を示し、この頃には卵巢重量が最大となって成長した卵を保持しており、産卵期以降には血中ホルモン濃度の減少と卵巢重量の減少が見られている。本研究における糞中 E₂ および P₄ 含量の動態も産卵の伴う卵巢活動の様子を反映していたといえる。

鳥類の雌には、精子貯蔵腺が存在し、この腺内での精子の受精能維持期間は、ニワトリでおおよそ 7~14 日である (Reece, 2011b)。本研究の雌個体においても、人工授精日または交尾日の後にも有精卵の産卵が見られた。雌個体 S10 では最終人工授精日から 19 日後、雌個体 S127 では最終交尾から 8 日後、雌個体 S152 では交尾行動は確認されていないが、最終同居の 5 日後にそれぞれ有精卵の産卵が確認された。このことから、スバーバルライチョウの雌においても貯精機能を有しており、雌の卵管内で精子は少なくとも 18 日間生

存が可能であることが示唆された。

2-4-1-2 雄スバールバルライチョウの繁殖生理

季節繁殖性の鳥類の精巣は、非繁殖期に比べ、繁殖期には 10~100 倍の大きさにまで発達する。T の増加に伴う精巣重量の増加や精子形成の進行が様々な鳥類種において確認されている（小川ら，1989；Kouatcho et al., 2015）。

照明コントロール下における雄スバールバルライチョウの糞中 T および AD 含量は、多くの場合に、照明時間の延長に伴い増加を開始し、4~5 月に著しく増加し、5~6 月中旬まで高い値が見られた。また、24 時間照明時に雌雄を同居させた場合に、交尾行動が観測され、雄の糞中 T 含量が高値を示した期間内に見られた。その後、糞中 T および AD 含量は減少し、7 月には基底値となった。照明時間の延長に伴い糞中 T および AD 含量が増加し、交尾が確認された時期にこれらの糞中の性ステロイドホルモン含量が高値を示していたことから、これらの糞中の性ステロイドホルモン含量の変動は、雄の精子形成に向けた T 分泌を捉えたものと考えられた。野生のスバールライチョウでの先行研究では、日照時間の増加と共に血中 LH 濃度の上昇および精巣重量の増加が見られ、いずれも 6 月にピークを迎えている（Stokkan et al., 1986b）。精巣内では、血中 LH 濃度の上昇時には一次精母細胞や二次精母細胞、血中 LH 濃度のピーク時には精子の存在が確認されている（Stokkan et al., 1986b）。これらのことから、本研究において、糞中 T および AD 含量が高濃度を示す際に、交尾が見られ、雌で産卵が見られたことから、糞中 T および AD 含量は活発化した精巣活動を捉えていると考えられた。また、雄個体 S195 では、測定期間を通して低値が観測されたが、本個体の測定期間が繁殖期ではなかったため、精巣活動が休止した期間のホルモン動態を捉えたものと考えられた。

2-4-1-3 コルチコステロンの季節変化

B の季節変化は、視床下部-下垂体-副腎系の複数の部位で制御されている（Romero et al., 1998）。また、野生のウミネコ（*Larus crassirostris*）の糞中 T 含量と糞中 B 含量の変動

には相関が見られ、繁殖期の初期に高い値が観測されている（佐藤ら，2008）。野生の雄カラフトライチョウでは繁殖地への到着時と雌の護衛が活発な縄張り期の後期に（Hannon and Wingfield, 1990），ミヤマシトド（*Zonotrichia leucophrys gambelii*）では繁殖期初期に（Romero et al., 1997）それぞれ高い血中 B 濃度がみられている。そのため，本研究においても，繁殖時に高い糞中 B 含量を示し，換羽時に糞中 B 含量が低く維持されることが予想された。本研究の結果，雌個体においては，照明時間の延長に伴う著しい糞中 E₂ および P₄ 含量の増加および繁殖後の減少に伴う糞中 B 含量の増加傾向および減少傾向の両方または片方が見られた。雄においては，照明時間の延長に伴う著しい糞中 T 含量の増加および繁殖後の減少に伴う糞中 B 含量の増加傾向および減少傾向の両方または片方が見られた。また，富山市ファミリーパークの照明コントロール B 区の個体では，雌雄ともに冬季にも高い糞中 B 含量が見られる傾向があった。本研究の結果は，佐藤ら（2008）の報告と同様に，繁殖期の初期に高くなる傾向と一致した。また，雌の B についてはニワトリにおいて，血中 B 濃度は抱卵に向けて上昇し，抱卵直後に最高値を示すことが報告されている（桑山ら，2005）。そのため，本研究の産卵開始の前後に糞中 B 含量が高値になるという傾向は，放卵に伴う B 変化を反映したものと考えられた。しかし，雌雄ともに多くの個体で変動は小さく，糞中 B 含量は低値であったため，十分な評価はできなかった。ツメナガホオジロ（*Calcarius lapponicus*）においては，飼育下個体では野生個体に見られたストレス反応性の血中 B 濃度の季節変化がみられず，その原因として飼育下は野生下と異なり，隠れ家や餌が十分であるため B による調節をする必要がなかったことが考えられている（Romero et al., 1998）。そのため，本研究においても，飼育下であったために多くの個体で糞中 B 含量値が低値であった可能性が考えられた。また，糞中の性ステロイドホルモン含量の上昇時以外にも変動が見られたため，繁殖期以外の時期にも B に影響を与える要因があることが示唆された。

2-4-1-4 光感受性と光不応の成立—スバルバルライチョウの光周期

繁殖を開始するためには生殖腺活動を活発化させる必要があり，これは日照時間の増加

により誘導される。ライチョウにおいても光による下垂体を通した性行動の誘起が見られている (Clark et al., 1937)。また、一定の期間を長日下で飼育すると長日刺激下にも関わらず、生殖腺ホルモンの減少、すなわち生殖腺の退行が見られる。この現象を光不応といい、光不応期の成立により繁殖が終了する。光不応期の成立には、視床下部での性ステロイドホルモンのネガティブフィードバックによる感受性の著しい増加が必要であり、長日に曝すことで光不応期となることから、この感受性も長日によって誘起されるものと考えられている (Stokkan and Sharp, 1980b)。本研究において、照明コントロール下の個体は雌雄ともに照明時間の延長と共に糞中の性ステロイドホルモン含量の増加が見られ、24 時間照明時には著しい増加が見られた。また、24 時間照明期間中に減少を開始し、基底値を示した。そのため、24 時間照明期間中に光不応期が成立したことが示唆された。雌の最終産卵日は6 月中旬から7 月中旬に見られ、同時期に糞中 E_2 および P_4 含量が減少し、その後に基底値となった変動は、卵巣の退行の様子を反映したものと言える。また、雌雄の同居は永続的ではなく、人為的に行われ、雄の最終交尾行動が確認されたのは、6 月上旬から7 月上旬であり、同時期に雄の糞中 T 含量の減少が見られ始めた。これは精巣の退行の様子を反映したものと考えられた。雌雄を同一照明条件下で比較すると、雄で雌より早く糞中ホルモン含量が減少を開始する傾向が見られた。そのため、雄で雌より先行して光不応期となることが示唆された。糞中の性ステロイドホルモン含量の減少時期を基にすると、照明コントロール条件や個体により差はあるが、雌では6 月下旬から7 月中旬、雄では6 月中旬から7 月上旬に光不応期が成立したことが示唆された。

2-4-1-5 照明条件の違いが内分泌に与える影響

本研究において、大きく分けて4つの照明プログラムを設定した。東京都恩賜上野動物園の照明コントロールA区、富山市ファミリーパークおよび横浜市繁殖センターの照明コントロールB区では、照明時間の延長に伴う糞中の性ステロイドホルモン含量の増加が見られ、これらに加え長野市茶臼山動物園の自然光と照明コントロールの混合C区でも、24時間照明時に著しい糞中の性ステロイドホルモン含量の急増が見られた。富山市ファミリ

ーパークの照明コントロール B 区は、展示施設と非展示施設により B1 区および B2 区が存在したが、糞中ホルモン含量の変動に明確な差は見られなかった。また、いずれにおいても 24 時間照明時には、交尾行動や雌の産卵が確認された。

東京都恩賜上野動物園の照明コントロール A 区では 6 月より 24 時間照明となり、照明時間の延長は約 30 日毎になされ、24 時間照明への移行時は 5 月の 17 時間照明から 6 月の 24 時間照明へ急増がなされた。富山市ファミリーパークの照明コントロール B1 および B2 区では 5 月 15 日より 24 時間照明となり、照明時間の延長量は約 14 日毎になされ、5 月 1 日の 19 時間 30 分から 5 月 15 日の 24 時間照明へと移行した。東京都恩賜上野動物園の照明コントロール A 区では、雌個体 S120 および雌個体 S135 で 5 月下旬に産卵が見られ、高い糞中 E_2 および P_4 含量が見られ、雄個体 S13 においても 5 月下旬に雌との同居時に交尾が確認され、高い糞中 T 含量が見られた。この頃の照明時間は 17 時間であったことから、17 時間の照明により産卵や交尾に適した生殖腺成熟を誘起していたことが示唆された。また、東京都恩賜上野動物園での雄個体において、4 月中旬に糞中 T 含量の高値が見られ始め、雌個体 S10 および雌個体 S32 で 4 月中旬に糞中 E_2 含量、5 月下旬に P_4 含量に変化が見られ始めた。一方、富山市ファミリーパークの照明コントロール B1 区では、雄個体 S53 と雌個体 S66 の同居が 2013 年 4 月 27 日～5 月 18 日に 15 回行われた。2013 年 4 月 27 日～5 月 14 日の同居では交尾が確認されず、この期間の糞中の性ステロイドホルモン含量はいずれも上昇途中であった。5 月 16 日以降の同居では、交尾が確認された。また、雄個体 S136 と雌個体 S152 においては、雄個体との同居が 2013 年 4 月 27 日～6 月 10 日に 45 回行われたが、産卵が開始されたのは 6 月 3 日からであった。同居開始時は、糞中の性ステロイドホルモン含量は上昇途中であり、産卵が見られ始めた頃には糞中の性ステロイドホルモン含量が高値を示していた。これらのことから、2 つの照明コントロールの違いは個体の生殖腺活動の誘起や繁殖行動の開始時期に影響していると考えられた。

東京都恩賜上野動物園の照明コントロール A 区では、最短照明時間は 12～1 月の 11 時間であり、照明時間は 2 月に 12 時間となり、2 月以降は 12 時間以上の長日となる。一方、富山市ファミリーパークの照明コントロール B1 区では最短照明時間は 12～1 月の 8 時間、

B2 区では 1 月の 7 時間 15 分であり、いずれも 4 月上旬に初めて 12 時間を超える照明条件となる。そのため、東京都恩賜上野動物園の照明コントロール A 区では、富山市ファミリーパークの照明コントロール B 区よりも早期に飼育下個体は長日刺激の条件下に入る。これらの照明コントロールの違いは、短日期間での感光性の回復と長日期間での光刺激への生殖腺の感受性に影響し、糞中の性ステロイドホルモン含量の動態の差として現われたものと考えられた。

一方、富山市ファミリーパークの自然光 D 区では、雌雄ともに糞中の性ステロイドホルモン含量に変動が見られず、低値を推移した。雌個体 S66 においては、照明コントロール B1 区から自然光 D 区への移動が 5 月 8 日に行われ、照明刺激により増加を開始していた糞中の性ステロイドホルモン含量が区間移動後に著しく減少する様相が認められた。このことから、日本の自然光における日照時間はスバルバルライチョウの繁殖を誘起するには不十分であったことが明らかとなった。

長野市茶臼山動物園の自然光と照明コントロールの混合 C 区では、自然光 D 区と異なり、24 時間照明の刺激により、糞中の性ステロイドホルモン含量の増加および、産卵が見られた。24 時間照明への移行前の 4 月における自然光下の日長は約 12 時間 30 分であった。しかし、照明コントロール A 区や B 区で見られたような 24 時間照明移行の直後の著しい糞中の性ステロイドホルモン含量の増加が見られなかった。これは、24 時間照明移行時には長日刺激による生殖腺の成熟誘起が不十分であり、成熟を誘起するまでに時間を要したものと考えられた。

2-4-1-6 光以外の調節因子—気温による内分泌調節

光は鳥類の繁殖を進める上で最も重要な因子であり、光周期の認識により生殖腺活動が誘起される。Stokkan ら (1986b) の報告では、79°N の野生の繁殖地が白夜を迎えるのは 4 月であるが、繁殖を開始するのは気温が 0°C を上回るようになる 6 月であると述べており、この頃に血中 LH 濃度が高値を示し、精巣重と卵巣重のピークが見られている。一方、本研究では、多くの個体で照明コントロールによる 24 時間照明を迎えると同時に繁殖の開始

が見られた。雄における野生個体の先行研究 (Stokkan et al., 1986b) と飼育下個体である本研究結果の比較を図 2-30 に示した。Stokkan ら (1986b) の報告と本研究における日照または照明時間に対する繁殖開始時期の違いは、産卵時期の差は光ではない因子、とりわけ気温による影響が考えられた。野生のスバルバルライチョウの繁殖開始に関わる要因として、残雪量が上げられている。すなわち、残雪が多い場合は、産卵にむけた栄養の確保が十分にできないことや、営巣や孵化後のエサの確保に適していない環境のため、繁殖が開始されないと考察している (Stokkan et al., 1986b)。Unander と Steen (1985) による野生スバルバルライチョウでの調査研究では、雪解けの進んだ場所でつがい形成率が高いことが報告されている。また、イワライチョウ (*L. muta*) やオジロライチョウ (*L. leucura*) では春の気温の上昇により産卵日が早まる傾向が報告されている (Wilson and Martin, 2010)。雪解けの時期は餌の質に影響し、ピレネーイワライチョウ (*L. m. pyrenaica*) の繁殖成功に影響していたことも報告されている (García-González et al., 2016)。イワライチョウでは地表を覆う雪が 50%以下となり、日中の最低気温が 0℃を上回る頃に産卵が開始される (Cotter, 1999)。このように、気温とそれに伴う残雪量はライチョウの繁殖の開始時期や繁殖成功に大きく影響する。スバルバル諸島では常明となる 4 月の気温は -16~-8℃で、産卵が見られる 6 月に氷点より上回るのに対し、本研究の飼育下照明では、常明および産卵開始時期の気温はいずれの飼育環境でも約 20℃であった。年や照明コントロールによる差はあるが、東京都恩賜上野動物園および富山市ファミリーパークでは 6~10 月、横浜市繁殖センターでは 5~9 月、長野市茶臼山動物園では 7 月と 8 月に 20℃を上回る日が多く観測されていた。また、飼育下であるために残雪はなく、年間を通じて十分な飼料が与えられる環境であった。そのため、24 時間照明移行時は、野生下の白夜開始時と異なり、産卵や育雛を行うのに十分な環境がそろっていた。気温の繁殖への関与については、Wingfield ら (2003) の飼育下ミヤマシトドの研究においても報告されており、長日刺激による生殖腺発達低温下では遅延し、高温下では促進されたことから、気温が長日下において生殖腺発達に影響を及ぼすことが示唆されている。これらのことから、スバルバルライチョウにおいて、気温は繁殖地環境と大きく関連する外界情報であり、光以外の繁殖開始に関

与する因子であることが示唆された。本飼育下の照明コントロールによる 24 時間照明時には、繁殖開始に十分な気温であったため、野生下のような気温による繁殖抑制はなされず、個体は長日刺激に対して即座に反応し、繁殖を開始できたものと考えられた。

2-4-2 眼窩上肉冠とアンドロジェンの関係

性選択に関連する形質として眼窩上肉冠と血中 T 濃度の関係はライチョウ科で研究されてきた (Rintamäki et al., 2000; Yang et al., 2013)。交尾できた雄クロライチョウ (*T. tetrix*) では、眼窩上肉冠のサイズと交尾の成功に相関があり、眼窩上肉冠サイズは T レベルと相関が認められている (Rintamäki et al., 2000)。交尾のできたチュウゴクライチョウ (*Tetrastes sewerzowi*) では交尾のできなかつた雄よりも赤く、大きな眼窩上肉冠を持つ傾向にあったことが報告されている (Yang et al., 2013)。飼育下カラフトライチョウでの研究では、十分な光刺激がある条件下であっても去勢雄では、眼窩上肉冠の成長は起こらず (Stokkan, 1979b), 一方で、短日条件下であっても T 投与により眼窩上肉冠成長が見られている (Stokkan, 1979a)。このように、ライチョウ科の鳥の眼窩上肉冠の発現は、精巣ホルモンの制御を受けている。本研究の東京都恩賜上野動物園の照明コントロール A 区および富山市ファミリーパークと横浜市繁殖センター B 区の雄スバルバルライチョウでは、眼窩上肉冠のサイズ変化の開始は個体により異なるが、2 月上旬から 6 月上旬に確認された。また、最大スコア 3 には、5 月中旬から 6 月中旬に変化した。色の変化は、雄個体 S85 ではサイズ変化から 2 ヶ月以上を要したが、多くの個体ではサイズ変化の開始と同時期または 1 ヶ月以内に見られた。これらのことから、眼窩上肉冠の変化は、サイズ増加の開始、色の増強、サイズの最大化という順で起こる主な様相を捉えることができた。糞中 T および AD 含量は肉冠のサイズ増加や色の増強時には高い値を示す傾向にあった。糞中 T および AD 含量の変動より、眼窩上肉冠の変化は精巣活動を反映しているものと考えられた。また、照明時間の短縮の開始はいずれの施設も 8 月 1 日であり、8 月上旬の観察時には眼窩上肉冠の退縮、退色が見られた。糞中 T および AD 含量は 24 時間照明中に減少が見られ、8 月には基底値に達していた。これは、個体が光不応となり、視床下部からの LH 分泌が

精巣からの T のネガティブフィードバックにより抑えられ、精巣活動の低下による T 分泌の減少を眼窩上肉冠が反映しているものと考ええる。

雄個体 S65 においては、眼窩上肉冠のサイズ維持期間や濃い色を示した期間が他の個体よりも短かった。雄個体 S65 は実験期間中に死亡したため、死因となった要因の効果が眼窩上肉冠変化に現われた可能性が考えられた。肉冠発現には、カロテノイドの働きが関係している。性形質の発現と免疫にはトレードオフがあり、T の性形質刺激と免疫抑制作用およびそれに伴う、カロテノイドの色素沈着または免疫細胞への抗酸化作用が関連している (Peters, 2007)。T は二次形質の発現刺激 (Ligon et al., 1990; Zuk et al., 1995) および免疫抑制作用 (Alonso-Alvarez et al., 2007) を持ち、T はカロテノイドキャリアである血中のリポタンパク質を増加させ、カロテノイド利用を高める (McGraw et al., 2006)。カロテノイドは、形質への着色作用 (Peters, 2007) と抗酸化作用による T 仲介免疫抑制緩和および免疫系の強化作用を持つ (McGraw and Ardia, 2007)。このように、カロテノイドは T によりもたらされた免疫系抑制作用や酸化ストレスを補完する。体調や遺伝的な質が良いが良好である雄は、免疫反応強化抑制に対応でき、肉冠を大きく発現できる (Mougeot et al., 2004)。そのため、肉冠は相互するメカニズムを通して雄の体調を正直に反映する指標であると考えられる。雄個体 S65 での眼窩上肉冠の変化から、本個体においてカロテノイドは眼窩上肉冠の発現よりも免疫ホメオスタシスに使われたと考える。

自然光下で飼育した場合には、雄個体 S198 では眼窩上肉冠に変化は見られず、糞中 T 含量の変動も見られなかった。このことから、自然光の日照時間が精巣活動を引き起こすには不十分であり、それを反映しているため眼窩上肉冠の変化が見られなかったものと考えられた。一方で、雄個体 S148 は自然光下飼育時に糞中 T および AD 含量に変動は見られなかったが、眼窩上肉冠に変化が見られた。本個体は照明コントロール下で飼育されていたが、自然光飼育への移行が 2013 年 5 月 15 日になされた。5 月上旬における富山市ファミリーパークの照明時間は、19 時間 30 分であり、移行後の日照時間は 14.時間 7 分であった。そのため、肉冠の変化は、自然光移行前の照明コントロールに刺激を受けたものと考ええる。

目視による眼窩上肉冠の評価と糞中 T および AD 含量の変化から、精巣活動の非侵襲的な外的指標として眼窩上肉冠の有用性の評価を行った結果、雄スバルバルライチョウにおいて眼窩上肉冠の外観は精巣状態と体調の指標となると考えられた。すなわち、眼窩上肉冠はアンドロジェンと体調に発現が左右されるため、眼窩上肉冠の外観から個体の体調の把握と繁殖能力の予想が可能と示唆された。

2-4-3 換羽と内分泌

2-4-3-1 夏羽への換羽と内分泌

換羽はライフサイクルのリセット、光刺激に反応するための神経系の再構築に重要な役割を果たす (Kuenzel, 2003)。野生下のスバルバルライチョウでは夏羽への換羽は雌では4月末に始まり6月上旬に完了し、雄は5月下旬に開始し8月完了する (Stokkan et al., 1986b)。冬羽への換羽は雌雄とも9月に開始することが知られている (Pedersen et al., 2005)。本研究において、照明コントロール下で飼育を行った個体の場合、雌では、多くの個体で4~5月に照明時間の延長と共に著しく落下羽量が増え、これに伴い体は茶色い夏羽姿へと換羽が進行した。6~7月には夏羽への換羽が完了し、8月中旬頃まで夏羽姿が見られた。その後、落下羽量の再増加と共に体色が変化し、10~11月頃に冬羽姿となった。雄では、多くの個体で24時間照明期間移行後の5月から7月に著しく落下羽量が増え、これに伴い体は茶色い夏羽姿へと換羽が進行した。7~8月に夏羽への換羽が完了し、夏羽姿である期間は、雌に比べ短かった。その後は落下羽量が多いまま、体色が変化し、10~11月頃に冬羽姿となった。また、東京都恩賜上野動物園においては2013年以降に落下羽量のみをスコア0~3で評価した。落下羽スコアが最大となったのは、雌では個体により3月下旬から4月中旬であったのに対し、雄では5月中旬からであった。しかし、落下羽スコアの減少が開始したのは、雌雄ともに9月中旬または下旬であった。これらのことから本研究においても、夏換羽開始は雌で先行し、雌雄で開始時期がずれていることおよび冬羽換羽は同時に起こることが伺えた。

雌では夏羽への換羽が糞中 E_2 および P_4 含量の増加と共に進行し、これらの糞中の性ス

テロイドホルモン含量が高値となり、産卵が見られる頃には夏羽姿になっていた。また、雌個体 S208 では、2 回の産卵期間が見られ、1 度目の産卵時には、他個体と同様の夏羽および冬羽への換羽が見られた。2 度目の産卵時は照明時間の短縮が開始している 8 月であったが、糞中 E_2 および P_4 含量の増加とこれに伴う夏羽が体表に現れた。Owens と Short (1995) は茶色い夏羽の出現はエストロジェンによるものと示唆している。そのため、産卵に伴う E_2 および P_4 の増加は夏羽換羽の誘起に関与している可能性が示唆された。雌の夏羽への換羽は、卵巢活動の増加と共に見られるため、換羽の進行が雌の卵巢活動の開始の指標になることが示唆された。一般的に鳥類では、繁殖と換羽はいずれもエネルギーが必要なライフイベントであるためにこれらは同時に起こらない。しかし、スバルバルライチョウの雌においては野生 (Stokkan et al., 1986b) および本研究の飼育下のいずれにおいても、性ホルモンの増加と共にこれらは同時に進行した。この背景として雌のみが育雛を行うことが挙げられ、育雛期でのエネルギーが必要となるために、孵化前に換羽を終了させる必要があるものと考えられた。

一方、雄では落下羽スコアおよび体色スコアは T 含量がピークとなる頃より増加し始め、糞中 T 含量の減少の開始と共に体色スコアが増加し始めた。T 含量が増加および高値を示す際には冬羽のままであり、T 含量が減少し、繁殖活動が終了に向かう頃に夏羽への換羽が開始した。Stokkan ら (1986b) は、換羽開始時期の雌雄差には、T が影響していると示唆している。去勢したホシムクドリ (*Sturnus vulgaris*) (Dawson, 1994) やアオガラ (*Cyanistes caeruleus*) (Kurvers et al., 2008) への T 移植の研究において、換羽開始や換羽進行の遅れが見られており、換羽期の高濃度 T は換羽の開始阻害や遅れの原因と考えられている。野生カラフトライチョウにおいては、血中 LH および T 濃度と夏羽への換羽進度に負の相関関係が見られ、換羽中に T を低く保つことは、換羽を促進すると示唆されている (Hannon and Wingfield, 1990)。このことから、本研究においても、雌雄の換羽開始のずれは T が原因であることが示唆され、雄において高濃度の T は換羽を抑制していたと考えられた。また、繁殖活動の終了に伴い、T 分泌の低下が換羽の開始に関与していたと考えられた。雄の夏羽への換羽は精巣活動の低下と共に見られるため、換羽の開始が雄の精巣活動の終了を把

握するための指標となることが示唆された。

糖質コルチコイドの一種である B は、糖代謝に対する作用を持ち、肝臓においてタンパク質からの糖新生を促すことから（小林，1988a），羽の主成分であるケラチンタンパク質の合成を阻害し，換羽を抑制することが報告されている（Romero et al., 2003）。これまでに，Romero ら（1998）は，野生のツメナガホオジロにおいて繁殖期よりも換羽期に B 放出の最大濃度が低く抑えられていることを報告している。また，Romero ら（2005）は，ホシムクドリおよびミヤマシトドへ B 移植すると羽の成長阻害が見られたことを報告している。そのため，換羽中の羽の成長阻害を最小にするためには，B を抑制する必要がある。これらのことから，本研究においても換羽中の糞中 B 含量は低く抑えられていることが予想された。しかし，本研究の糞中 B 含量の変動は著しくはなかったが，雌雄ともに糞中の性ステロイドホルモン含量の増減に伴う糞中 B 含量の増減傾向が見られた。雌では糞中 B 含量測定を行った多くの個体で，夏羽への換羽開始時に高い値を示し，夏羽換羽中または完了した後に減少する傾向が見られた。糞中 B 含量測定を行った雄では，夏羽換羽開始時に，糞中 B 含量の減少が見られたが，個体で明瞭な関連は見られなかった。また，雌雄ともに糞中 B 含量と冬羽への換羽との関連は見られなかった。本研究の結果から，糞中 B 含量の変化は換羽よりも，性ステロイドホルモンとの関連が強いことが示唆された。

2-4-3-2 冬羽への換羽と内分泌

先行研究では，野生スバルバルライチョウの冬羽への換羽は，雄では9月下旬～10月上旬にかけて，雌では9月中旬に開始し，10月下旬までに行われることが報告されている（Stokkan et al., 1986b）。本研究においても，照明時間の短縮と共に体色スコアは減少し，雌雄における冬羽への換羽の開始時期に差は見られなかった。また，カラフトライチョウでの研究により，TやLHも羽への色素沈着に関与していることが明らかになった（Stokkan, 1979b）。日長もまた，LHの増加および生殖腺の発達をもたらすため間接的に羽の色素沈着に関与しているといえる（Stokkan, 1979b）。これらのことから，夏羽への換羽は照明刺激とそれに伴うホルモンによる色素沈着があるため，茶色い夏羽が見られ，高濃度のTの

有無で換羽開始に雌雄差があるが、冬羽への換羽は照明時間が減少し、雌雄ともに T 濃度が低くなるので、白い冬羽への換羽が同時に起こるものと考えられる。

換羽の開始や進行には甲状腺ホルモンが関与しており、 T_4 が新しい羽の成長を刺激し、 T_3 が断熱効果の減少に対応するため代謝を促進することで体温の維持を行う (Hoshino et al., 1988)。野生の雌雄スバルバルライチョウにおいても夏羽換羽および冬羽換羽の際に血中 T_3 濃度が高値を示す動態が報告されている (Stokkan et al., 1985)。産卵鶏において強制換羽を行った場合に甲状腺ホルモンの増加および性ホルモン値は低下が見られている (Hoshino et al., 1988)。カラフトライチョウでは LH が減少し、換羽をもたらす血中 T_3 濃度の増加が見られることから T_3 が光不応期成立との関与が示唆されている (Klandorf et al., 1982)。また、血中 T_3 濃度の増加は、生殖腺ステロイドホルモンの減少が原因と考えられている (Sharp and Klandorf, 1985)。このように甲状腺ホルモンと性ホルモンには拮抗作用があることが示唆される。本研究においては、甲状腺ホルモンのモニタリングは行わなかったが、冬羽換羽開始が繁殖終了とともにあることから、生殖腺ホルモンの減少に伴う、甲状腺ホルモンの増加があったものと考えられた。

2-4-3-3 自然光と換羽

本亜種を日本の自然光条件下で飼育した場合、雌雄とも適切な換羽が見られなかった。体色は、日長の増加に伴い、わずかに夏羽が出始めるが、14 時間 40 分以上の明期はないため、完全な夏羽にはならなかった。また、日照時間が最も長くなる 6 月以降に日照時間は減少していくが、冬羽への換羽は見られなかった。Lindgård と Stokkan (1989) は、短日下 (4L : 20D) でスバルバルライチョウを飼育し続けた場合に、夏羽への換羽は見られず、ずっと冬羽のままであったことを報告しており、一定以上の日照時間が換羽の進行には必要であることが示唆されている。本研究の日照時間 14 時間 40 分は本亜種の換羽を遂行するには不十分であったことが伺える。完全な夏羽への換羽が起こらなかったが、Lindgård と Stokkan (1989) の先行研究と異なり、本研究の個体には夏羽がまばらに見られた。これは、Lindgård と Stokkan (1989) の先行研究では 4 時間という固定された日照時間

であったのに対し、本研究では14時間40分を最大とする一年を通した日照時間の増減があったため、日照時間の増減に伴い、わずかに換羽が起こったものと考えられる。また、雌個体 S137 および雄個体 S148 は2013年5月15日、雄個体 S198 は2014年4月1日、雌個体 S66 は2014年5月8日にそれぞれ自然光飼育へ移行された。これらの個体は自然光飼育となる以前は、照明コントロール下で飼育されていた。そのため、自然光飼育への移行が遅かったものほど、照明コントロールによる長日効果を受けており、移行後に夏羽への変化が見られる傾向にあった。しかし、移行後の日照時間では完全な換羽を遂行するには長日刺激が不十分であったため、照明コントロール下の個体様の換羽は進行しなかったと考えられた。また、LH や T (Stokkan, 1979a), エストロジェン (Owen and Short, 1995) が羽への色素沈着に関与しており、一年を通して低い糞中性ステロイドホルモン含量が見られたことから、羽への色素沈着が十分になされず、完全な夏羽姿にならなかったものと考えられた。

2-4-4 体重と採食量の変化と内分泌

2-4-4-1 照明時間と繁殖サイクルが体重および採食量に与える影響

野生のスバルバルライチョウの体重は一年を通して大きく変動する。繁殖地に着いた頃の雄の体重は680~700gであり、繁殖期を通して490~610gにまで減少するが、その後、体重は増加し、10月には1000~1200gに至る (Pedersen et al., 2005)。一方、雌には一年の内に2回の体重増加時期がある。1回目は5月の産卵に向けた体重の増加であり、630~780gにまで増加するが、抱卵期の採食回数の減少に伴い、490gまでに減少する (Pedersen et al., 2005)。2回目は雄と同様の繁殖期後の体重増加であり、880~980gに至る (Pedersen et al., 2005)。本研究の照明コントロール下で飼育を行った個体の場合、雄では、多くの個体で12~1月または3~4月に最大となる傾向があり、照明時間の延長と共に減少した。雌では、多くの個体で12~1月または3~4月に最大となる傾向があり、照明時間の延長と共に減少した。また、6月には一時的な体重の増加が見られる個体があった。雌雄ともに7~8月には体重は最小となり、照明時間の短縮および採食量の増加と共に体重は増加し、冬季は高

い値で維持された。雄における体重の増減の季節性は野生個体と同一の変動パターンを示した。雌では、野生個体で見られる2回の体重増加が雌個体 S10、雌個体 S32 および雌個体 S135 で見られた。体重は雌雄ともに照明時間が24時間となるころに見られる繁殖期に著しく減少し、低値となった。

採食量については、雌雄ともに多くの個体で10~11月頃に多く、照明時間の延長と共に減少した。雌においては4月下旬~7月に一時的な採食量の増加が見られた。雄では、24時間照明となった5~7月は特に採食量が著しい低値を示した。雌雄ともに照明時間の短縮と共に冬季に向けて採食量の増加が見られた。雌雄によるこの違いは、雌の産卵と関係しているものと考えられた。すなわち、雌の5~6月頃に見られた採食量の増加は、産卵に向けたエネルギーを補うためのものであると考えられる。また、雌においては体重の減少が著しかった時期は、糞中の E_2 および P_4 含量が高く、産卵が見られた時期と一致していたため、この時期の体重の減少は先行研究と同様に産卵によるものと考えられる。先行研究において、野生の育雛期における雌アオリイチョウ (*Dendragapus obscurus*) の体重測定では、繁殖が成功した雌の体重は繁殖に失敗した雌に比べ軽かったことが報告されている (Redfield, 1973)。本研究においても、産卵が見られなかった照明コントロール A 区の雌個体 S48 や自然光飼育下の雌個体では、体重の変動は産卵が見られた雌より緩やかであった。

雄では、産卵は起こらないが、雌と同様に繁殖期に体重の著しい増減が見られた。野生下のスバルバルライチョウは白夜となった繁殖期には昼夜を問わず縄張り行動が行われ、つがいになってからは、雌の防衛に多くの時間を費やす (Unander and Steen, 1985)。体重の変化は自発運動量に依存し、採食が唯一の調節因子であるとされている (Lindgård et al., 1995)。そのため、野生下ではこれらの行動により、採食時間の減少、エネルギー消費の増加が示唆され、体重の減少が見られると考えられる。また、ニホンウズラでは、長日刺激およびそれに伴う T の増加により自発運動量が増えることが報告されており (Wada, 1981)、 T の E_2 への芳香化により自発運動が発現し、攻撃や探索を含む縄張り行動と関係が示唆されている (Wada, 1982)。また、飼育下ユキヒメドリ (*Junco hyemalis*) において T

の増加により、自発運動量の増加と休息の減少が見られている (Lynn et al., 2000)。先行研究の飼育下スバルバルライチョウでは体重の減少は日照時間が増加し始める 2 月頃より観測され、この頃から 4 月に向け、自発運動量が 3 倍以上に増えており、エネルギー支出の増加に伴った著しい体重の減少が見られていることから (Lindogård et al., 1995)、本研究においても繁殖期前の体重の減少は、照明時間の延長に伴う活動量の増加によるものと考えられる。本研究の照明コントロール A 区および B 区、自然光と照明コントロールの混合 C 区の雄個体は、個別の飼育であったが、照明時間の延長と共に糞中 T 含量は増加し、増加が著しかった時期は採食量が低くなり、体重の減少が著しい時期と一致していた。そのため、長日刺激および T の増加は、個体の行動時間の増加と休息の減少およびこれらの伴う代謝の増加に関与しており、体重の減少が見られたものと考えられた。

自然光条件で飼育した場合、雌雄とも体重は夏季に低値、冬季に高値を示したが、照明コントロール下の個体に比べ、年間の増減差は小さく、著しい変動は見られなかった。また、採食量は一年を通して一定となる傾向を示した。Lindogård と Stokkan (1989) は、飼育下スバルバルライチョウを照明時間 4 時間の短日条件で飼育を続けた場合に採食量と体重は変動が見られず、低値を維持したことを報告している。本研究の自然光 D 区では、一年の日照時間の最長および最短時間に約 5 時間の日照差があった。Lindogård と Stokkan (1989) の報告と異なり、本研究の自然光 D 区個体の体重は変動が見られたことから、この体重変動は自然光の日照時間の増減に反応した結果と考えられる。

冬季においては体重の増加が見られたが、自然光 D 区の個体の体重は、照明コントロール B 区の冬季の体重より低値であった。自然光 D 区での最小日照時間は、12 月の 9 時間 40 分であった。一方、照明コントロール B 区での最小照明時間は、B1 区で 12~1 月の 8 時間、B2 区で 1 月の 7 時間 15 分であった。照明時間が短いことは、個体の活動時間を制限し、代謝を抑えていることが考えられる (Mortensen and Blix, 1989)。12 月における日長は照明コントロール B 区よりも自然光 D 区で長くなっており、活動できる時間が自然光 D 区で長くなっていることが示唆された。そのため、自然光 D 区は冬季において照明コントロール B 区よりも、代謝能力が高くなっている可能性が考えられた。このため、冬季の体

重が自然光 D 区で軽くなる傾向が見られたのではないかと考える。また、12 月の自然光の日照時間は 9 時間 40 分であり、この日照時間の長さは照明コントロール B1 および B2 区の照射時間での 10 月の 11 時間、11 月の 8 時間 45 分の間際に当たる。自然光 D 区での飼育経験のある個体 4 羽（雌個体 S66, 雌個体 S137, 雄個体 S148, 雄個体 S198）において、自然光飼育時と照明コントロール飼育時を比較すると、雌個体 S137, 雄個体 S148 および雄個体 S198 における自然光 D 区の 12 月の体重は、照明コントロール B 区時の 10 月と 11 月の体重値の間に位置した。雌個体 S66 では、自然光 D 区 12 月の体重は、照明コントロール B 区時の 10 月および 11 月の体重値よりも軽かった。これらのことから、日長が個体の活動時間に影響し、それに伴う代謝時間に影響していることが示唆された。

2-4-4-2 甲状腺ホルモンおよび成長ホルモンによる体重および採食量の調節

スパールバルライチョウの体重の季節変動は脂肪量の変動により左右される (Mortensen et al., 1983)。脂肪蓄積には甲状腺ホルモンおよび成長ホルモン (GH) が関与している (Stokkan et al., 1985)。甲状腺ホルモンである T_3 は肝臓のグリコーゲン分解を促進することから、糖代謝に関与している (小林, 1988b)。採食は一般的に明期に見られることと、 T_3 は明期に高く、暗期に低くなることから、 T_3 の変化は採食と関連があるとされている (Harvey et al., 1980)。GH は脂肪組織の分解を刺激する作用があり、鳥類において GH は蓄積脂肪の動員作用や糖の放出促進の役割を果たし、エネルギー代謝のために入手可能な基質を増やす (Harvey et al., 1977)。野生のスパールバルライチョウにおいて GH は、採食量が低い時期である冬季に高い値を示しており、これは冬季のエネルギー源として蓄積脂肪の利用を促進していたためと考えられている (Stokkan et al., 1985)。飼育下スパールバルライチョウでは、採食量の季節変動に伴った T_3 の増減が見られ、 T_3 が採食に関与することが示唆されており、冬季にはエネルギー源を採食から蓄積脂肪の利用へシフトすることから、冬季には T_3 の減少と GH の増加が見られている (Stokkan et al., 1985)。また、甲状腺ホルモンと生殖線ホルモン、特に T との相互作用について、詳細は明らかとされていないが、これらのホルモンの拮抗的な作用関係が示唆されている (Péczy et al., 1979)。スパー

ルバルライチョウにおいても、 T_3 の増加はLHおよびTの減少開始と同時期に見られ、光不応期になるころに最大値となることから、甲状腺ホルモンが生殖腺活動を抑制することが示唆されている (Stokkan et al., 1988)。本研究の雄において、糞中T含量が高値となるときに採食量は低値を示し、糞中T含量が減少して基底値に戻る頃から採食量の増加が見られた。これらのことより、本研究では測定を実施しなかったが、雄においてTの増加に伴う T_3 の減少およびTの減少に伴う T_3 の増加があったことが予想される。

2-4-4-3 体重および採食量の推移への気温の影響

スバルバルライチョウにおいて、体重と採食量は日長にコントロールされており、秋の日長減少は体重の増加および採食の減少、春の日長増加は体重の減少および採食量の増加を加速させる (Lindogård and Stokkan, 1989)。79°Nにおける屋外気温の飼育下で飼育したスバルバルライチョウでは8~11月は体重が増加するのに対して採食量が減少し、12~6月は体重が減少するのに対して採食量が増加することが報告されており (Stokkan et al., 1986a)、これまでに採食量と体重の変動は逆の関係を示す様相が捉えられている (Stokkan et al., 1986a; Lindogård and Stokkan, 1989)。野生のスバルバルライチョウでは、冬季に餌を得ることが困難となるため、これを補うために8~10月に脂肪の蓄積が起これと考えられている (Mortensen et al., 1983)。本研究においても、照明コントロールを行った個体では体重が高値となる時に採食量が低く維持され、体重が低値となるころに採食量が高くなる傾向が見られた (図 2-31)。Stokkan ら (1986a) の先行研究では、日照の減少と共に秋に採食量が減少することが報告されていたが、本研究個体においては、秋の照明時間の短縮と共に採食量の増加が見られた (図 2-31)。また、体重の減少の開始は先行研究 (Stokkan et al., 1986a) よりも遅く、減少の速度は緩やかであった。一方、69°Nにおいて、外気温が5~10月に氷点下を下回る屋外でスバルバルライチョウを飼育した場合には体重が12月をピークに減少するのに対し、一年を通して5°Cを下回ることのない屋内で飼育した場合には、体重は冬季の間に高値を維持し、日照時間の増加とともに体重が減少する様相が捉えられている (Stokkan et al., 1995)。同様に屋内で飼育した場合に、採食量は体重の増加と

ともに増加し、10月から冬季の間は採食量が減少する様相が捉えられている (Lindogård et al., 1995)。本研究個体の体重変動の様相は Stokkan ら (1995) の屋内飼育時の変動と類似していた (図 2-32)。また、採食量においても秋に増加が見られたことは Lindogård ら (1995) の屋内飼育時の変動と類似していた (図 2-33)。本研究における飼育下での気温は、冬季に氷点下を下回ることは稀であり、69°N や野生下の冬季外気温よりはるかに暖かく、Stokkan ら (1995) の屋内飼育温度に近いものであった。また、本研究の多くの個体で平均気温と体重との間には負の相関、採食量との間には正の相関関係が認められた。これらのことから、体重と採食量の増減は日長にコントロールされるが、繁殖の開始に気温が影響するのと同様に、気温は脂肪蓄積や脂肪利用を通して体重や採食量に対しても影響していることが示唆された。

2-5 国内飼育下スバルバルライチョウの繁殖特性とニホンライチョウ飼育への役割

本研究での照明コントロールを行った A, B および C 区では、いずれの区でも夏季に 24 時間照明となる期間を設け、早い個体では 17 時間、多くの個体では 24 時間照明時に高濃度の糞中の性ステロイドホルモン含量と共に繁殖行動が確認された。一方、日本の自然光で飼育した場合の明期時間の最長は 14 時間 39 分であり、糞中の性ステロイドホルモン含量の動態より生殖腺活動の変化は認められなかった。先行研究および本研究の結果から、本亜種の繁殖開始には光刺激が重要であると言える。また、飼育下においては野生下のような低気温による繁殖の抑制の影響は見られなかった。これらの研究結果から、本亜種を日本の飼育下で繁殖させるためには、光刺激が 14 時間 39 分では不十分であり、17~24 時間の明期が必要であると結論付けることができる。照明コントロールを行った A, B および C 区は、冬季の最短明期時間や照明時間の増減や移行日数に違いがあったため、それらの繁殖開始への詳細な影響については本研究で明らかにすることはできなかった。本亜種の繁殖開始に関わる光条件の詳細を明らかにするためには、最短明期時間や照明時間の増減や移行日数などの条件について、一つについて複数の条件区を設け、その他の条件を統一した上で検討していく必要があると考える。

これまでのライチョウ科での研究において、種により繁殖の開始、換羽の開始、光不応期の開始に必要な光刺激などの条件が異なることが報告されている。これは、種が生息する環境、すなわち生息緯度による光条件や気温によるものと考えられている。明期 8 時間から照明時間を延長させた照明コントロール飼育下では、雄の眼窩上肉冠のが最大となる照明時間および雌の繁殖の開始時は、それぞれアカライチョウで 13 時間および 15 時間、カラフトライチョウでは 16 時間および 19 時間であり、種による光刺激への反応開始時期の違いが見られている (Sharp and Moss, 1981)。また、70°N を参考にした照明コントロール下では、光刺激に対する生殖腺機能の反応はカラフトライチョウでスバルバルライチョウより先行して見られた (Stokkan et al., 1988)。Sharp and Moss (1981) および Stokkan ら (1988) が研究を行った種の生息緯度はアカライチョウが 57°N、カラフトライチョウが 70°N、スバルバルライチョウが 80°N であり、これらの先行研究から高緯度の種になるほど生殖腺活動の誘起に長い明期時間が必要であり、繁殖開始が遅くなることが伺える。また、シジュウカラ (*Parus major*) においては、気温の違いから高緯度において、低緯度の個体より繁殖の開始が遅く、光不応期の開始が早くなる傾向が見られている (Silverin et al., 2008)。これらのことから、スバルバルライチョウとニホンライチョウにおいては、繁殖活動を誘起する条件は異なることが示唆される。実際に、ニホンライチョウは生息地、すなわち日本の自然光条件で繁殖を行う一方で、スバルバルライチョウでは 17~24 時間の光刺激が必要である。スバルバルライチョウは、ニホンライチョウの飼育下繁殖にあたりパイロット種として飼育が開始された背景があるが (ライチョウ域外保全プロジェクトチーム, 2015)、ニホンライチョウの繁殖活動の誘起に関する光条件の解明を目的とする場合には、ニホンライチョウまたは低緯度に生息するライチョウの種を用いることがより有用であると考えられる。ニホンライチョウの繁殖に必要な光条件を検討するにあたり、スバルバルライチョウでの繁殖に必要な光条件をそのまま採用することは適切でないが、本亜種の研究の結果から、眼窩上肉冠のサイズや色の変化、換羽進行、採食量および体重の変化と内分泌動態との関係性を見出すことができた。ニホンライチョウにおいてもこれらの変化と生殖腺活動と関連があることが期待できる。

2-6 まとめ

スパーバルライチョウはキジ目ライチョウ科ライチョウの一亜種であり、国内ではニホンライチョウの保全に向けた飼育がなされている。海外においては、採血や解剖的研究から本亜種の内分泌動態がこれまでになされている。糞をモニタリング材料とすることは血液を用いる場合に比べ、採取が容易で個体への侵襲がないことから、同一個体での長期的なモニタリングが可能となる。本研究では、照明条件などの環境からの刺激がスパーバルライチョウの内分泌活動へ与える影響および内分泌変化が繁殖行動、眼窩上肉冠、換羽といった外観および体重と採食量の変化との関連について明らかにした。生息地環境を再現した照明コントロールを行う2区、自然光と照明コントロールの混合区、自然光区の計4つの飼育条件区で本亜種の飼育を行った。照明コントロール区および自然光と照明コントロールの混合区では、明期時間の増加と共に糞中の性ステロイドホルモン含量の増加が見られた。自然光と照明コントロールの混合区でも、24時間照明時に同様の変動が見られた。またこれらの区ではホルモン含量が高値となった時に、交尾や産卵が見られた。糞中B含量は、変動が見られない個体もいたが、性ステロイドホルモン含量の増減に伴い、増減する傾向が見られた。自然光区では著しいホルモン含量の変化が見られず、本来高緯度の生息する本亜種にとって、日本の自然光における日照時間変化は生殖腺活動を誘起するには不十分であったことが明らかとなった。雄の眼窩上肉冠については、糞中T含量の増減に伴う変化が見られた。糞中T含量の増加により肉冠のサイズ、色の順で変化が起こり、光不応期成立には、糞中T含量の減少に伴い肉冠の色、サイズの順で退行が見られた。これにより肉冠は雄の精巣活動の指標となることが示唆された。雌雄の夏羽への換羽換羽については開始にずれが見られ、雌で先行した。雄の換羽開始は、糞中T含量が減少を開始した頃であったのに対し、雌では糞中E₂およびP₄含量が増加し、高値を示している頃であった。これにはTによる換羽阻害作用が関与していると考えられた。また、これらのことから、夏羽換羽の開始や進行は雌においては卵巣活動の活発化の指標、雄においては精巣活動の退行の指標となることが示唆された。体重と糞中の性ステロイドホルモン含量は逆の増減変動を示した。採食量も明期の増加と共に減少する傾向が見られ、ホ

ルモン値が高値となるときには低値であった。しかし、雌においては、産卵に備えたエネルギー要求に対応するための採食量の一時的な増加が見られた場合があった。糞中ホルモン含量の減少と共に、採食量の増加および体重の増加が見られたことから、生殖腺活動の退行と体重および採食量に関連があることが示唆された。また、先行研究での野生個体との比較から、気温は繁殖の開始や代謝系に影響し、ライフサイクルに大きく関与する光以外の因子の一つであることが示唆された。繁殖行動や眼窩上肉冠、換羽や採食行動および体重の変化は生殖腺活動との関連が示唆されたため、これらの変化が生殖腺活動の外観的指標となることが考えられた。

表 2-1 スーパーバルライチョウの糞の採取状況および記録項目

血統登録番号	個体名	性別	飼育施設	糞の採取期間	繁殖記録	眼窩上肉冠	体色	換羽	採食	体重	備考
S10	4943	雌	東京都恩賜上野動物園	2011 年 10 月 7 日～2012 年 8 月 11 日	○		○	○	○	○	2012 年 8 月 13 日死亡
S32	8513	雌		2011 年 10 月 7 日～2012 年 7 月 20 日	○		○	○	○	○	2012 年 7 月 23 日死亡
S48	7591	雌		2011 年 9 月 2 日～2015 年 3 月 31 日				○		○	
S98	4242	雌		2011 年 9 月 2 日～2012 年 10 月 9 日							2012 年 10 月 18 日死亡
S120	8065	雌		2014 年 1 月 3 日～2015 年 3 月 31 日	○			○		○	
S135	1418	雌		2014 年 1 月 3 日～2015 年 3 月 31 日	○			○		○	
S13	9337	雄		2011 年 10 月 7 日～2012 年 11 月 30 日	○	○	○	○	○	○	2013 年 12 月 27 日死亡
S38	0865	雄		2011 年 10 月 7 日～2012 年 11 月 30 日	○	○	○	○	○	○	2014 年 8 月 3 日死亡
S118	8528	雄		2014 年 1 月 3 日～8 月 1 日			○			○	2014 年 6 月 19 日死亡
S195	2013	雄		2014 年 1 月 3 日～6 月 14 日				○		○	2015 年 4 月 28 日死亡
				2014 年 9 月 5 日～2015 年 3 月 31 日				○		○	
S66	66-32	雌	富山市ファミリーパーク	2011 年 12 月 20 日～2015 年 4 月 3 日	○		○	○	○	○	
S127	6228-03	雌		2012 年 1 月 3 日～2014 年 3 月 28 日	○		○	○	○	○	
S137	上-08	雌		2013 年 5 月 17 日～2015 年 8 月 28 日	○		○	○	○	○	
S152	6228-15	雌		2013 年 4 月 2 日～10 月 20 日	○		○	○	○	○	2013 年 10 月 24 日死亡
S225	6228-1513	雌		2014 年 4 月 1 日～5 月 2 日							2014 年 5 月 5 日死亡
S53	キタロウ	雄		2012 年 1 月 3 日～2014 年 4 月 1 日	○	○	○	○	○	○	2014 年 4 月 2 日死亡
S65	65-27	雄		2011 年 12 月 20 日～2012 年 6 月 25 日	○	○	○	○	○	○	2012 年 6 月 28 日死亡
S85	72-11	雄		—		○					2014 年 8 月 11 日死亡
S130	6228-06	雄		2012 年 7 月 11 日～2014 年 3 月 28 日	○	○	○	○	○	○	
S136	6632-12	雄		2012 年 4 月 2 日～2013 年 10 月 18 日		○	○	○	○	○	2013 年 10 月 22 日死亡
S148	6228-11	雄		2012 年 5 月 17 日～2015 年 3 月 31 日		○	○	○	○	○	
S198	28-17	雄		2014 年 4 月 1 日～2015 年 3 月 31 日		○	○	○	○	○	
S208	No.4	雌	横浜市繁殖センター	2014 年 3 月 23 日～11 月 3 日			○	○		○	
S239	No.8	雄		2014 年 3 月 31 日～9 月 4 日			○	○		○	2014 年 9 月 4 日死亡
S150	No.6	雌	長野市茶臼山動物園	2014 年 3 月 17 日～12 月 29 日	○		○	○	○	○	
S60	No.5	雄		2014 年 3 月 17 日～12 月 29 日			○	○	○	○	

表 2-2 スーパーバルライチョウ飼育における照明時間または日照時間

A 区：東京都恩賜上野動物園および富山市ファミリーパーク（2011 年）における照明時間

	点灯時刻	消灯時刻	点灯時間
1 月	7:00	18:00	11:00
2 月	6:30	18:30	12:00
3 月	6:00	19:00	13:00
4 月	5:00	20:00	15:00
5 月	4:00	21:00	17:00
6 月	24 時間点灯		24:00
7 月			24:00
8 月	4:00	21:00	17:00
9 月	5:00	20:00	15:00
10 月	6:00	19:00	13:00
11 月	6:30	18:30	12:00
12 月	7:00	18:00	11:00

B 区：富山市ファミリーパーク（B1, B2）（2012 年～）および横浜市繁殖センター（B1）における照明時間

		B1			B2		
		点灯時刻	消灯時刻	点灯時間	点灯時刻	消灯時刻	点灯時間
1 月	1 日	8:45	16:45	8:00	8:45	16:15	7:30
	15 日	8:45	16:45	8:00	8:45	16:00	7:15
2 月	1 日	8:45	17:00	8:15	8:45	16:15	7:30
	15 日	8:45	17:15	8:30	8:45	16:30	7:45
3 月	1 日	7:45	17:30	9:45	7:45	17:30	9:45
	15 日	6:45	18:30	11:45	6:45	18:30	11:45
4 月	1 日	6:15	20:45	14:30	6:15	20:45	14:30
	15 日	5:15	21:45	16:30	5:15	21:45	16:30
5 月	1 日	3:45	23:15	19:30	3:45	23:15	19:30
	15 日	24 時間点灯		24:00	24 時間点灯		24:00
6 月	1 日			24:00			24:00
	15 日			24:00			24:00
7 月	1 日			24:00			24:00
	15 日			24:00			24:00
8 月	1 日	2:45	0:00	21:15	2:45	0:00	21:15
	15 日	4:30	22:45	18:15	4:30	22:45	18:15
9 月	1 日	5:45	21:00	15:15	5:45	21:00	15:15
	15 日	6:45	20:00	13:15	6:45	20:00	13:15
10 月	1 日	7:45	18:45	11:00	7:45	18:45	11:00
	15 日	8:45	17:30	8:45	8:45	17:30	8:45
11 月	1 日	8:45	17:30	8:45	8:45	17:30	8:45
	15 日	8:45	17:15	8:30	8:45	17:00	8:15
12 月	1 日	8:45	16:45	8:00	8:45	16:45	8:00
	15 日	8:45	16:45	8:00	8:45	16:30	7:45

表 2-2 (続き)

C 区：長野市茶臼山動物園における照明および日照時間

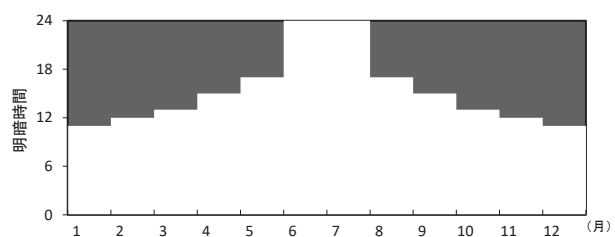
	日の出	日の入	日照/点灯時間
1 月	7:00	18:20	9:45
2 月	6:45	18:00	10:30
3 月	6:15	17:36	11:30
4 月	5:30	17:16	12:30
5 月	24 時間点灯		24:00
6 月			24:00
7 月			24:00
8 月			24:00
9 月	5:15	18:15	13
10 月	5:45	17:30	11:45
11 月	6:15	17:00	10:45
12 月	6:30	16:30	10:00

■の期間は、照明コントロールを行っていたことを示す。

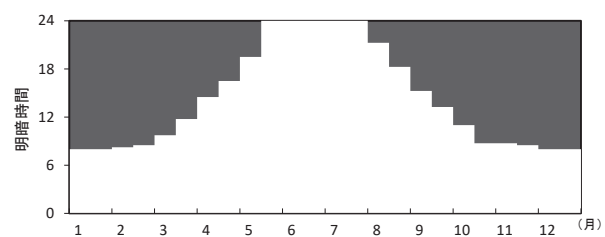
D 区：富山市ファミリーパークにおける日照時間

		日の出	日の入	日照時間
1 月	1 日	7:03	16:46	9:43
	15 日	7:03	16:58	9:55
2 月	1 日	6:54	17:16	10:22
	15 日	6:40	17:31	10:51
3 月	1 日	6:23	17:45	11:22
	15 日	6:03	17:58	11:55
4 月	1 日	5:38	18:13	12:35
	15 日	5:18	18:25	13:07
5 月	1 日	4:58	18:39	13:41
	15 日	4:44	18:51	14:07
6 月	1 日	4:34	19:04	14:30
	15 日	4:32	19:11	14:39
7 月	1 日	4:36	19:14	14:38
	15 日	4:44	19:10	14:26
8 月	1 日	4:56	18:58	14:02
	15 日	5:08	18:43	13:35
9 月	1 日	5:22	18:20	12:58
	15 日	5:33	18:00	12:27
10 月	1 日	5:46	17:36	11:50
	15 日	5:58	17:16	11:18
11 月	1 日	6:14	16:55	10:41
	15 日	6:28	16:43	10:15
12 月	1 日	6:44	16:36	9:52
	15 日	6:56	16:36	9:40

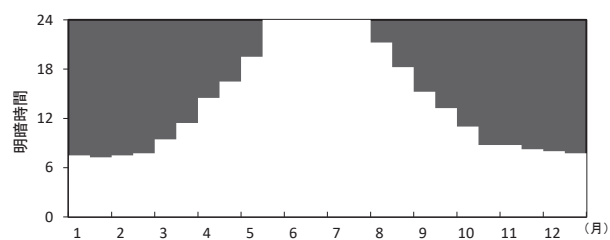
A 区：東京都恩賜上野動物園，
富山市ファミリーパーク（2011）



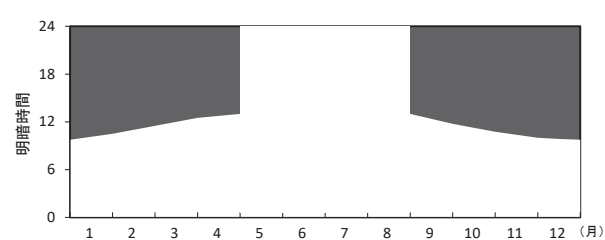
B1 区：富山市ファミリーパーク（非展示施設 2012 年～），
横浜市繁殖センター



B2 区：富山市ファミリーパーク（展示施設）



C 区：長野市茶臼山動物園



D 区：富山市ファミリーパーク

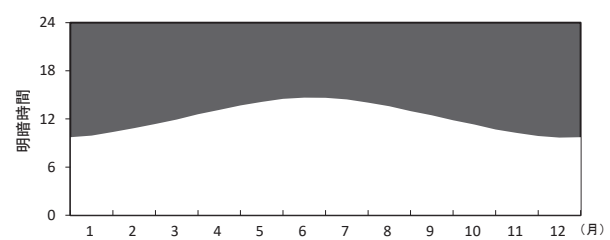


図 2-1 スパールバルライチョウ飼育における照明時間または日照時間の変化

表 2-3 スバルバルライチョウ落下羽および体色変化の点数と評価

スコア	落下羽の量		体色
0	全く落ちていない	(全く落ちていない)	冬羽 90～100%
1	10 枚以下	(1～5 枚)	冬羽が多い
2	11～20 枚	(6～10 枚)	冬羽と夏羽が 50%ずつ
3	21～30 枚	(11 枚以上)	夏羽が多い
4	31 枚以上	(－)	夏羽 90～100%

* () 内は東京都恩賜上野動物園の 2013 年以降の記録方法

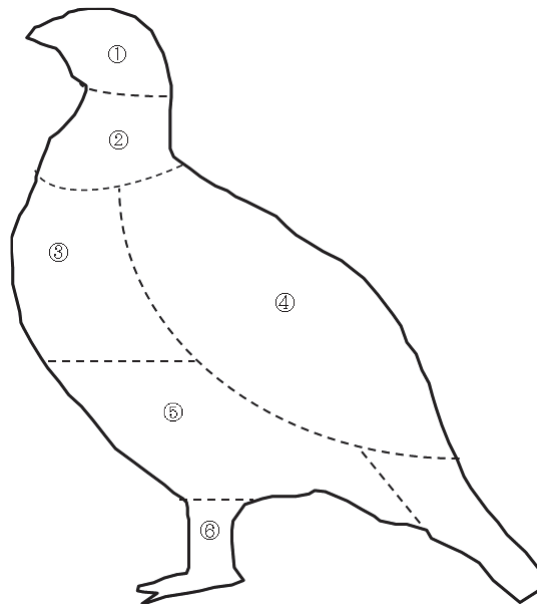


図 2-2 スバルバルライチョウの体色スコアの評価部位
① 頭, ②首, ③胸, ④背, ⑤腹, ⑥脚

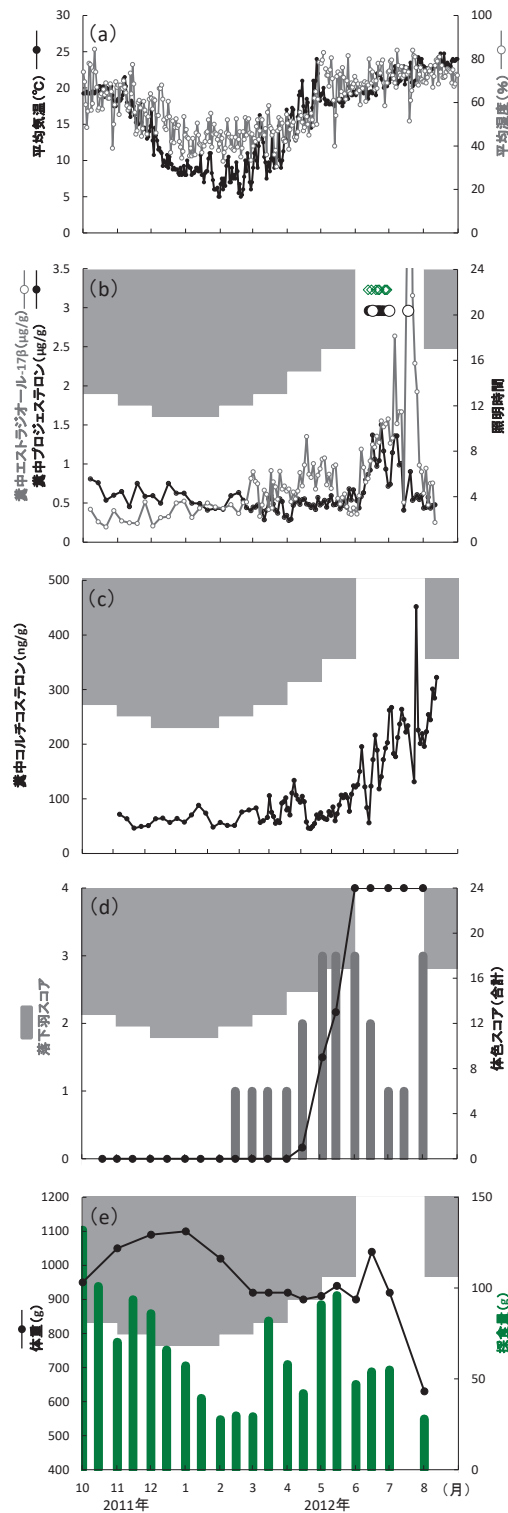


図 2-3 雌スパールバルライチョウ S10 における飼育環境温度および湿度，糞中エストラジオール-17 β およびプロジェステロン含量の動態，糞中コルチコステロン含量の動態，落下羽および体色スコアの変化，採食量と体重の変化（東京都恩賜上野動物園）
 図 (b) 内の◇は人工授精，○は有精卵の産卵，●は無精卵の産卵を示す。落下羽の測定期間は2011年10月19日～2012年8月1日，採食量の測定期間は2011年10月上旬～2012年8月上旬であった。

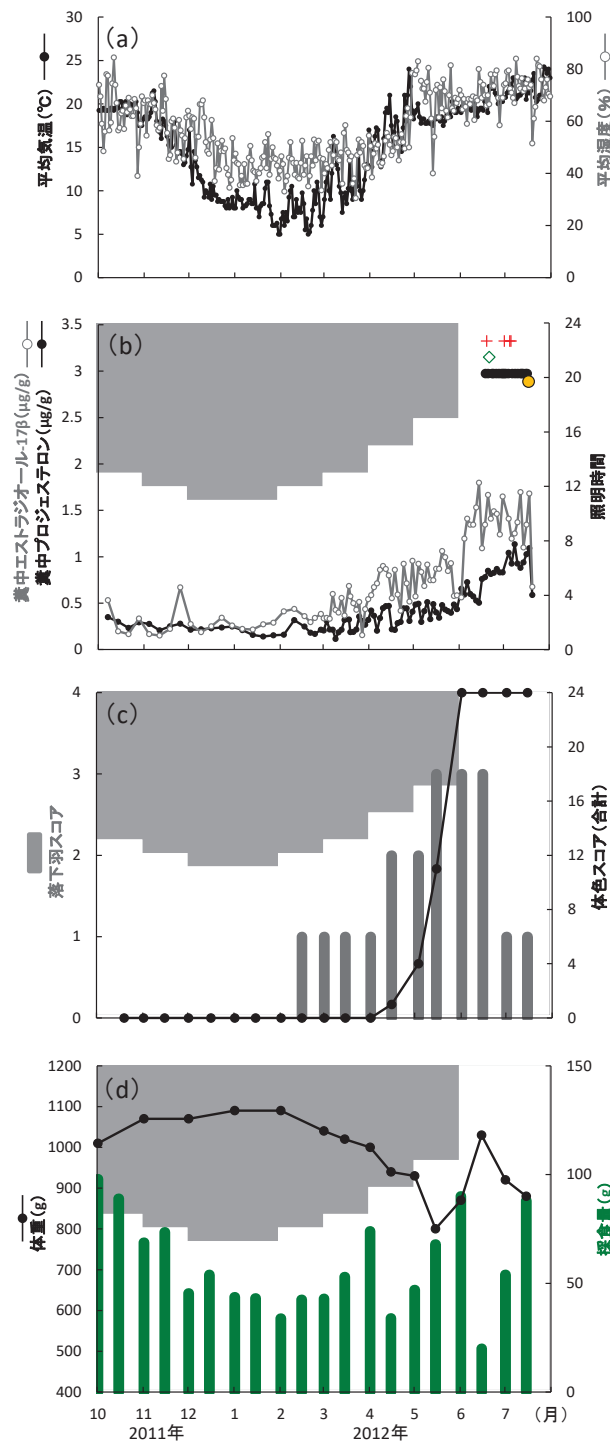


図 2-4 雌スパーバルライチョウ S32 における飼育環境温度および湿度, 糞中エストラジオール-17 β およびプロジェステロン含量の動態, 落下羽および体色スコアの変化, 採食量と体重の変化 (東京都恩賜上野動物園)

図 (b) 内の+は交尾, ◇は人工授精, ●は無精卵の産卵, ●は破卵や軟卵を含む有精・無精の不明卵の産卵を示す。落下羽の測定期間は 2011 年 10 月 19 日～2012 年 7 月 15 日, 採食量の測定期間は 2011 年 10 月上旬～2012 年 7 月中旬であった。

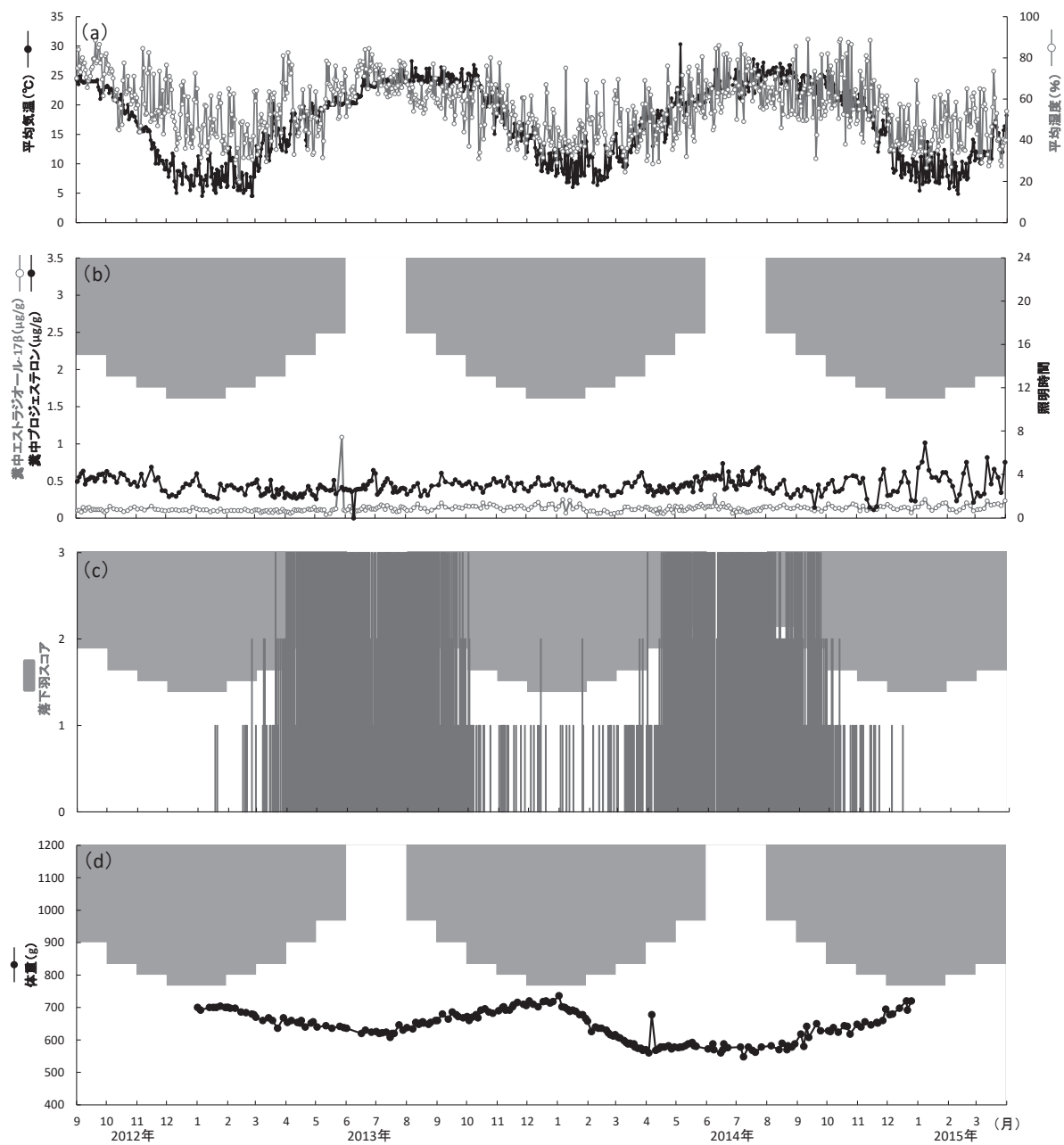


図 2-5 雌スバルバルライチョウ S48 における飼育環境温度および湿度, 糞中エストラジオール-17 β およびプロジェステロン含量の動態, 落下羽および体色スコアの変化, 採食量と体重の変化 (東京都恩賜上野動物園)
落下羽の測定期間は 2013 年 1 月 1 日～2014 年 12 月 31 日であった。

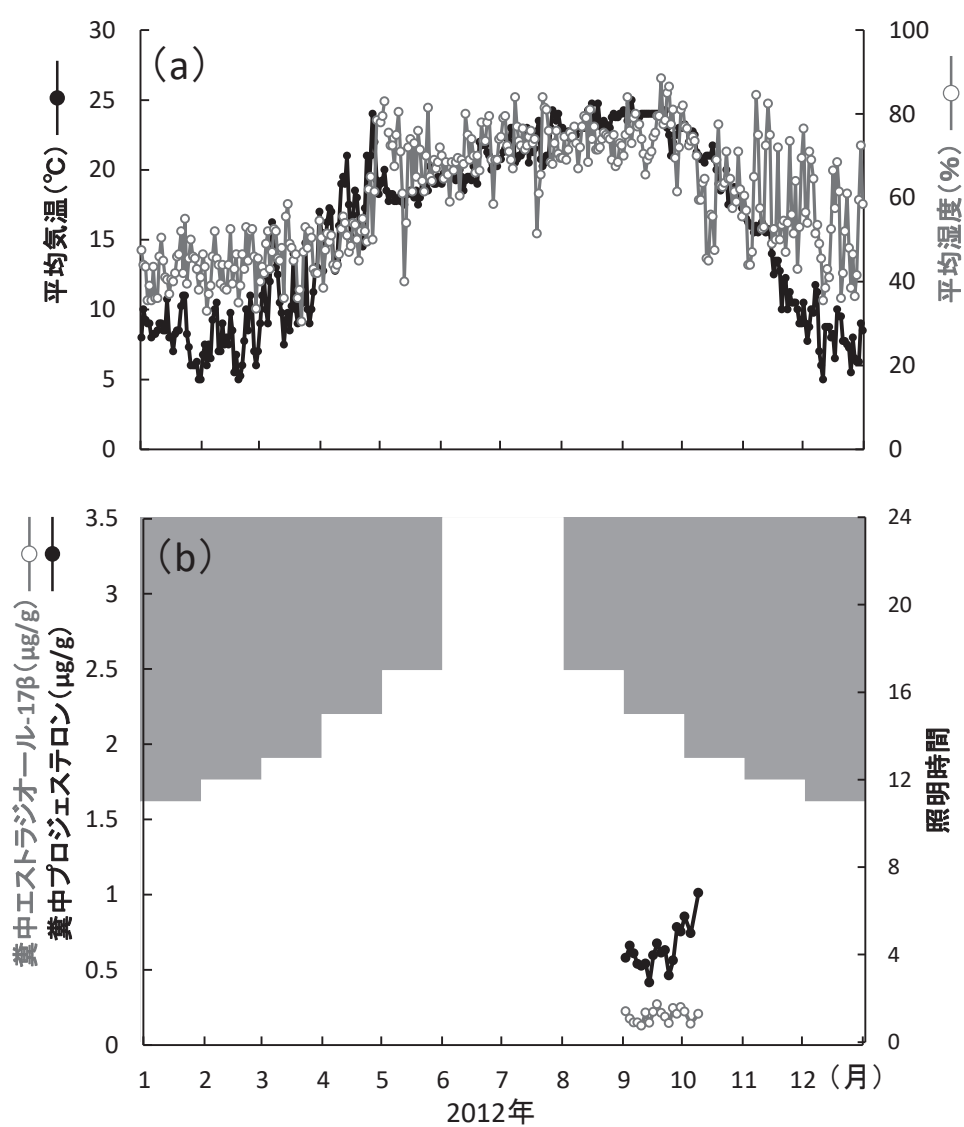


図 2-6 雌スパールバルライチョウ S98 における飼育環境温度および湿度, 糞中エストラジオール-17 β およびプロジェステロン含量の動態 (東京都恩賜上野動物園)

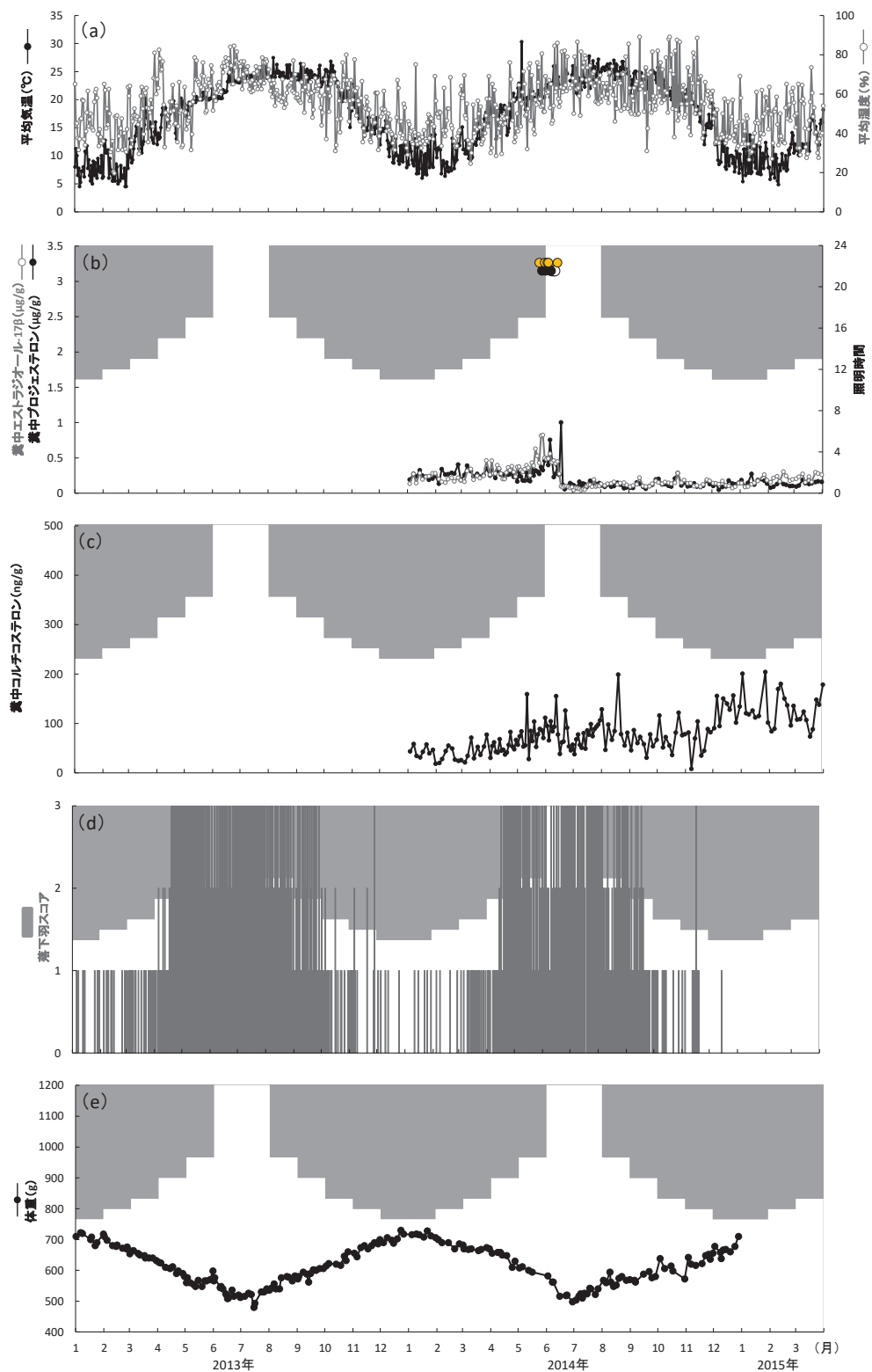


図 2-7 雌スパーバルライチョウ S120 における飼育環境温度および湿度，糞中エストラジオール-17 β およびプロジェステロン含量の動態，糞中コルチコステロン含量の動態，落下羽および体色スコアの変化，採食量と体重の変化（東京都恩賜上野動物園）
 図（b）内の○は有精卵の産卵，●は無精卵の産卵，◐は破卵や軟卵を含む有精・無精の不明卵の産卵を示す。落下羽の測定期間は2013年1月1日～2014年12月31日であった。

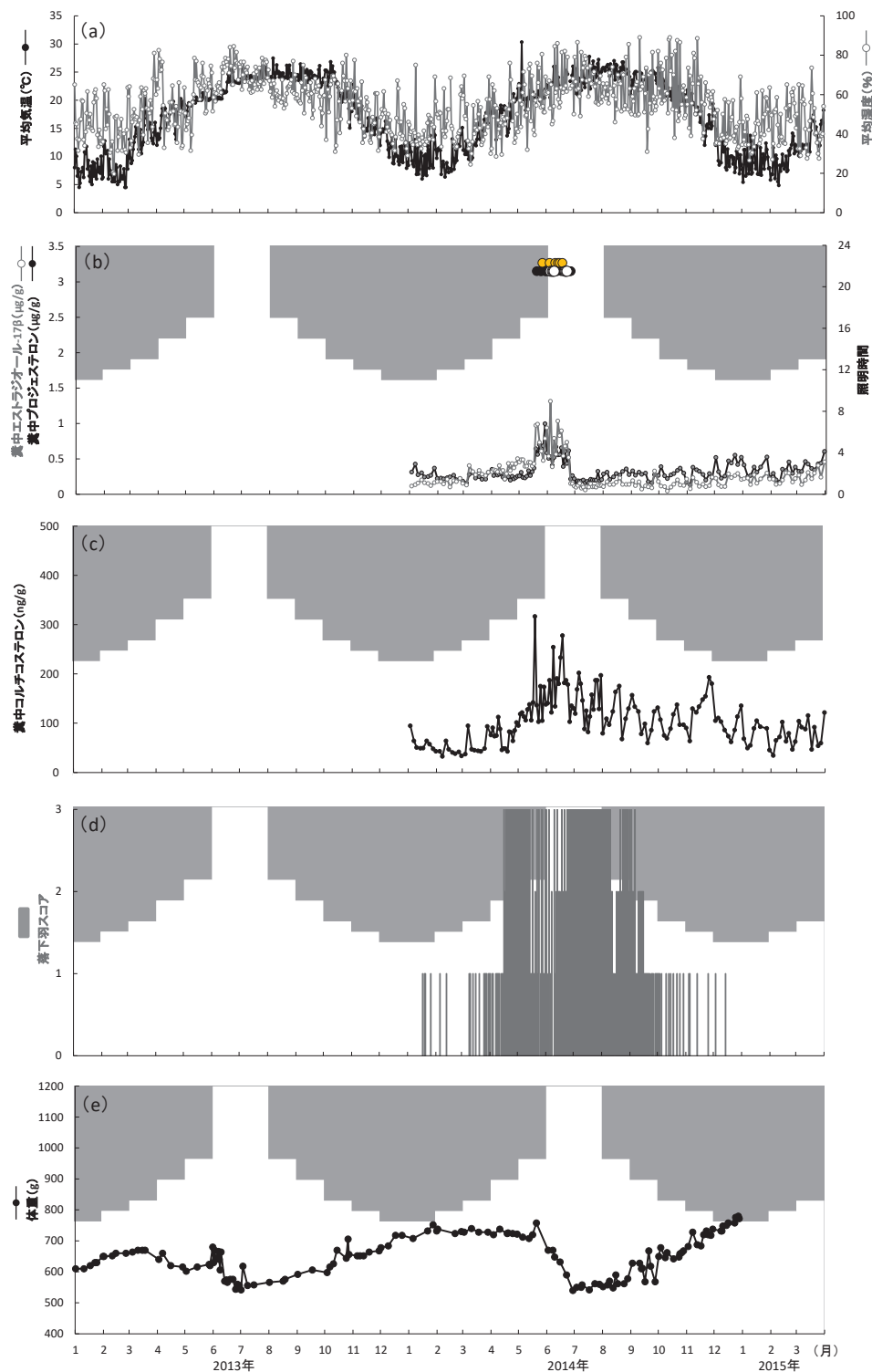


図 2-8 雌スパーバルライチョウ S135 における飼育環境温度および湿度，糞中エストラジオール-17 β およびプロジェステロン含量の動態，糞中コルチコステロン含量の動態，落下羽および体色スコアの変化，採食量と体重の変化（東京都恩賜上野動物園）
 図（b）内の○は有精卵の産卵，●は無精卵の産卵，●は破卵や軟卵を含む有精・無精の不明卵の産卵を示す。落下羽の測定期間は2014年1月1日～2014年12月31日であった。

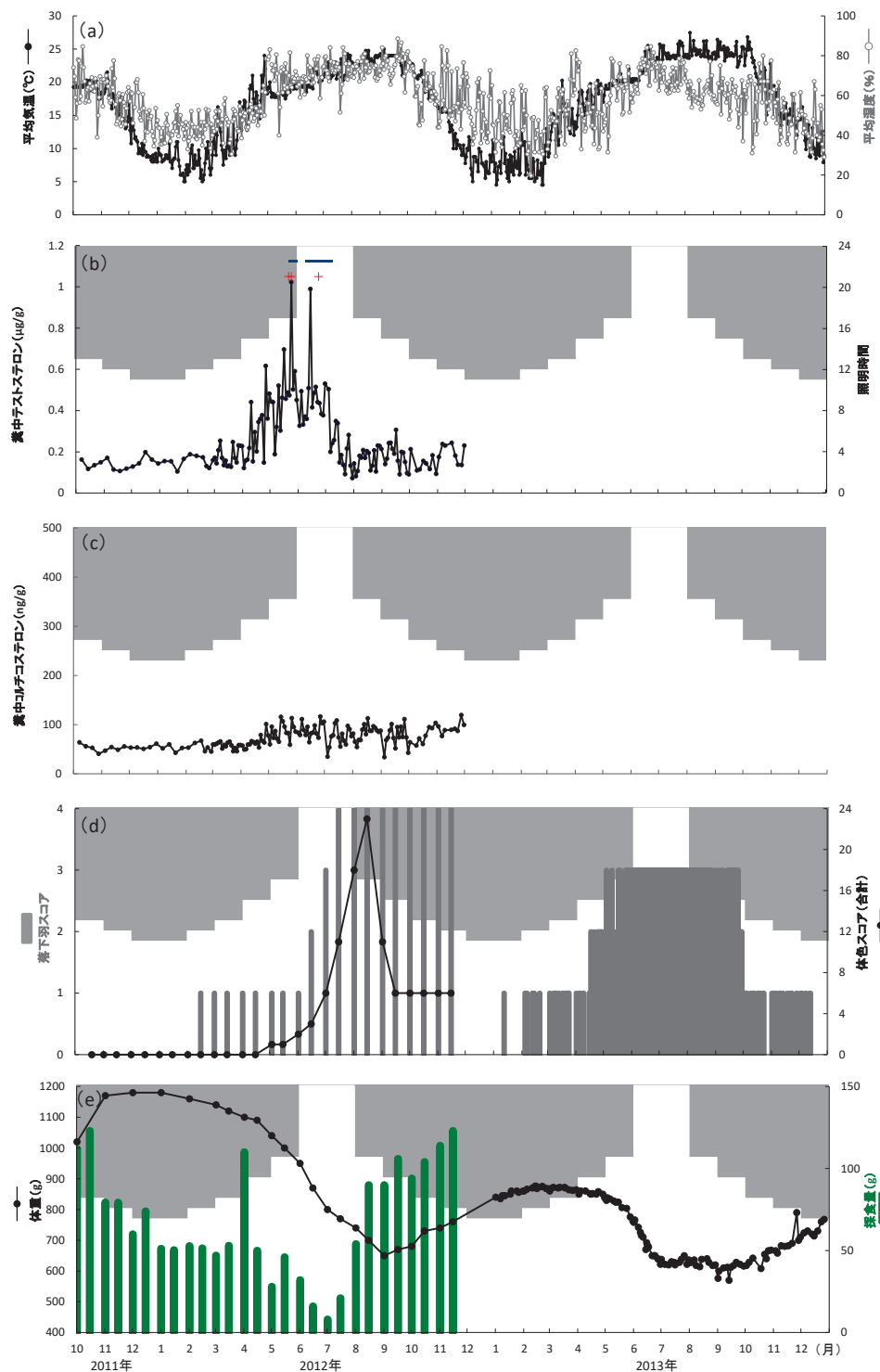


図 2-9 雄スバルバルライチョウ S13 における飼育環境温度および湿度, 糞中テストステロンの動態, 糞中コルチコステロン含量の動態, 落下羽および体色スコアの変化, 採食量と体重の変化 (東京都恩賜上野動物園)

図 (b) 内の一は雌との同居, +は交尾を示す。落下羽の測定期間は 2011 年 10 月 19 日～2011 年 11 月 15 日 (スコア 0～4 での評価) および 2013 年 1 月 1 日～2013 年 12 月 27 日 (スコア 0～3 での評価), 採食量の測定期間は 2011 年 10 月上旬～2012 年 11 月中旬であった。

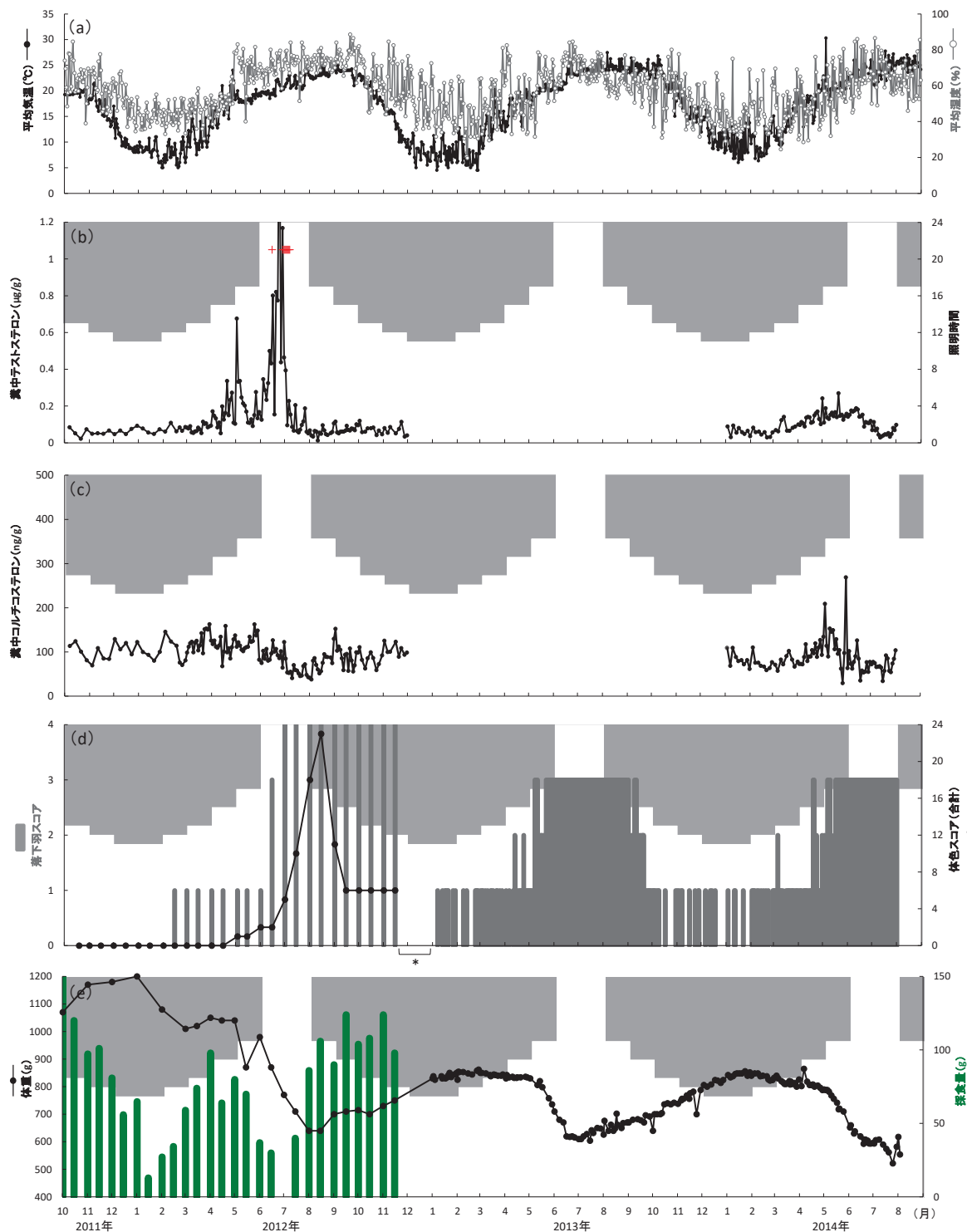


図 2-10 雄スパーバルライチョウ S38 における飼育環境温度および湿度，糞中テストステロンの動態，糞中コルチコステロン含量の動態，落下羽および体色スコアの変化，採食量と体重の変化（東京都恩賜上野動物園）

図 (b) 内の—は雌との同居，+は交尾を示す。落下羽の測定期間は 2011 年 10 月 19 日～2011 年 11 月 15 日（スコア 0～4 での評価）および 2013 年 1 月 1 日～2014 年 8 月 2 日（スコア 0～3 での評価）であり，*は測定期間外を示す。採食量の測定期間は 2011 年 10 月上旬～2012 年 11 月中旬であった。

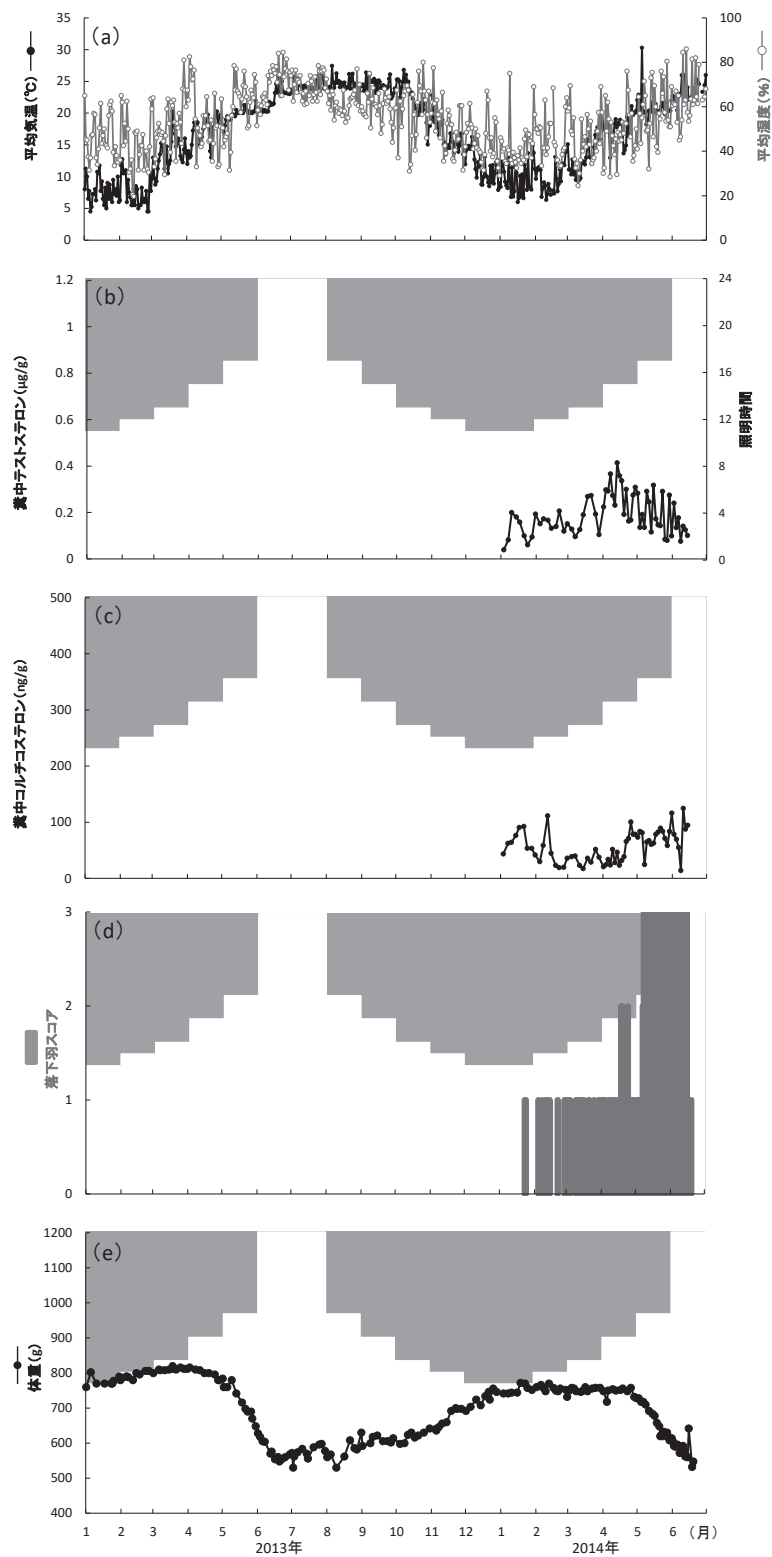


図 2-11 雄スパールバルライチョウ S118 における飼育環境温度および湿度，糞中テストステロンの動態，糞中コルチコステロン含量の動態，落下羽および体色スコアの変化，採食量と体重の変化（東京都恩賜上野動物園）
落下羽の測定期間は 2014 年 1 月 1 日～2014 年 6 月 9 日であった。

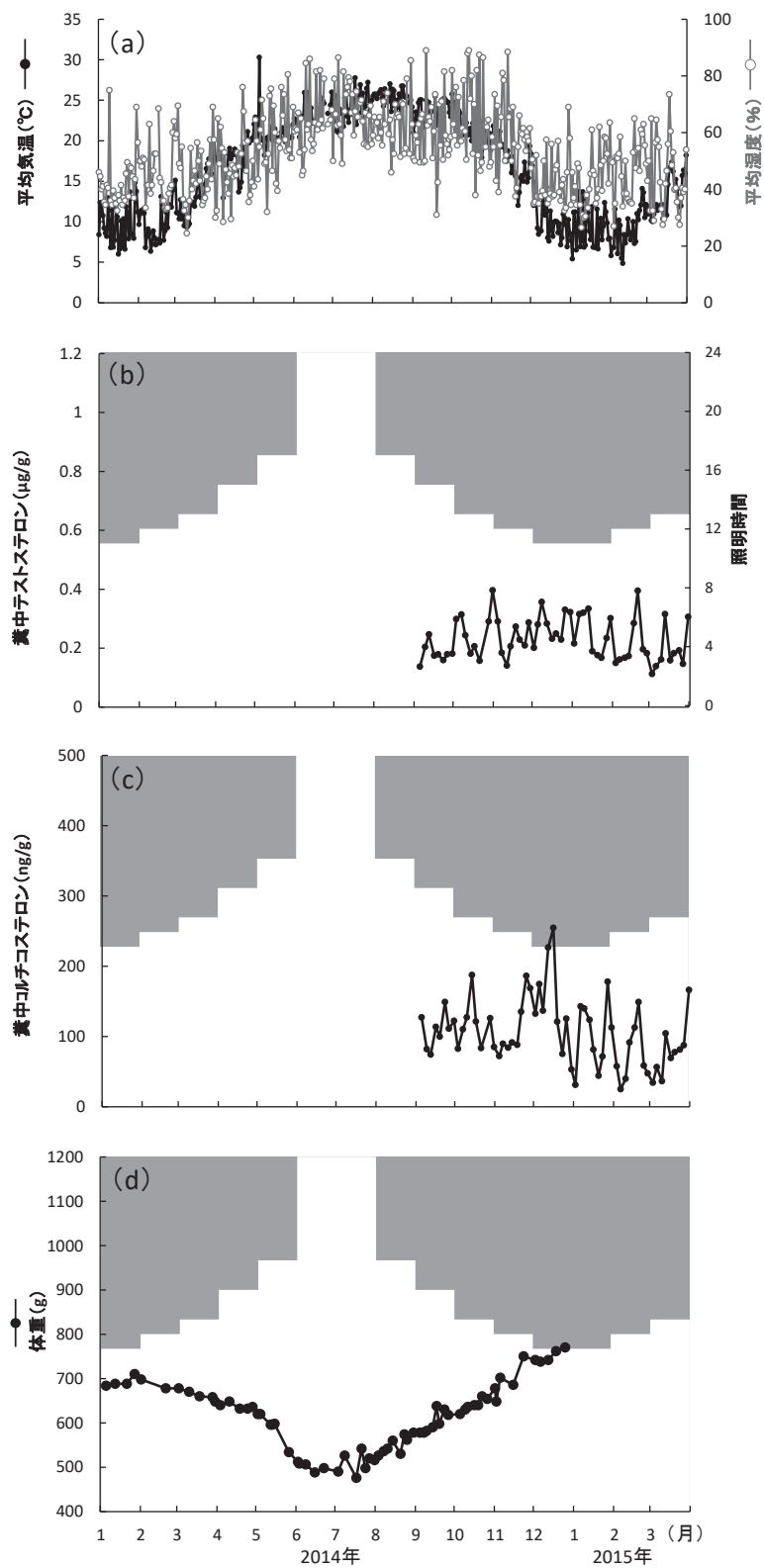


図 2-12 雄スバルバルライチョウ S195 における飼育環境温度および湿度，糞中テストステロンの動態，糞中コルチコステロン含量の動態，落下羽および体色スコアの変化，採食量と体重の変化（東京都恩賜上野動物園）

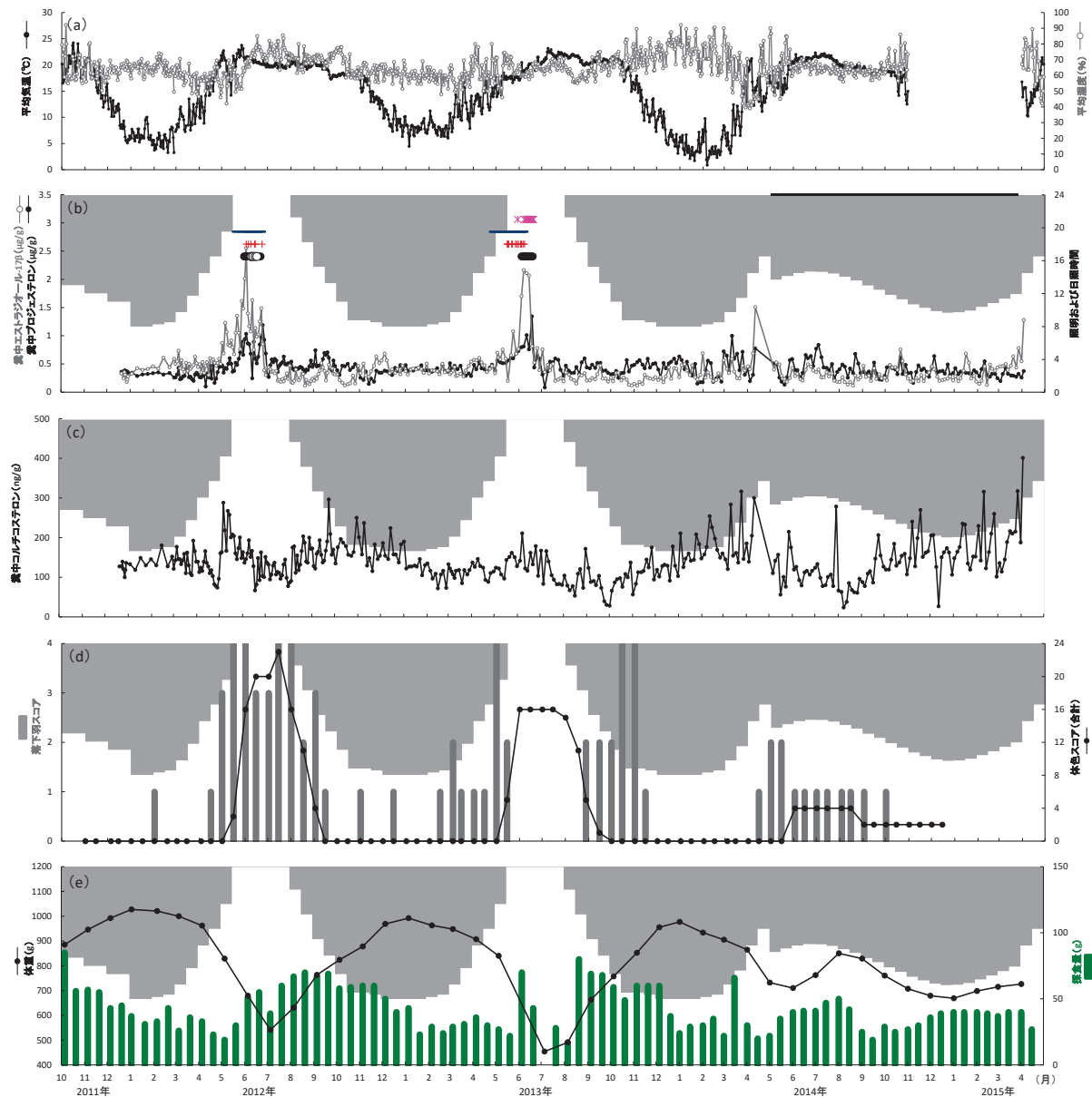


図 2-13 雌スバルバルライチョウ S66 における飼育環境温度および湿度，糞中エストラジオール-17 β およびプロジェステロン含量の動態，糞中コルチコステロン含量の動態，落下羽および体色スコアの変化，採食量と体重の変化（富山市ファミリーパーク）

図 (b) 内の * は発情，— は雄との同居，+ は交尾，○ は有精卵の産卵，● は無精卵の産卵，● は破卵や軟卵を含む有精・無精の不明卵の産卵を示す。—— は自然光 D 区での飼育期間を示す。落下羽の測定期間は 2011 年 11 月 1 日～2014 年 12 月 15 日，採食量の測定期間は 2011 年 10 月上旬～2015 年 4 月中旬であった。

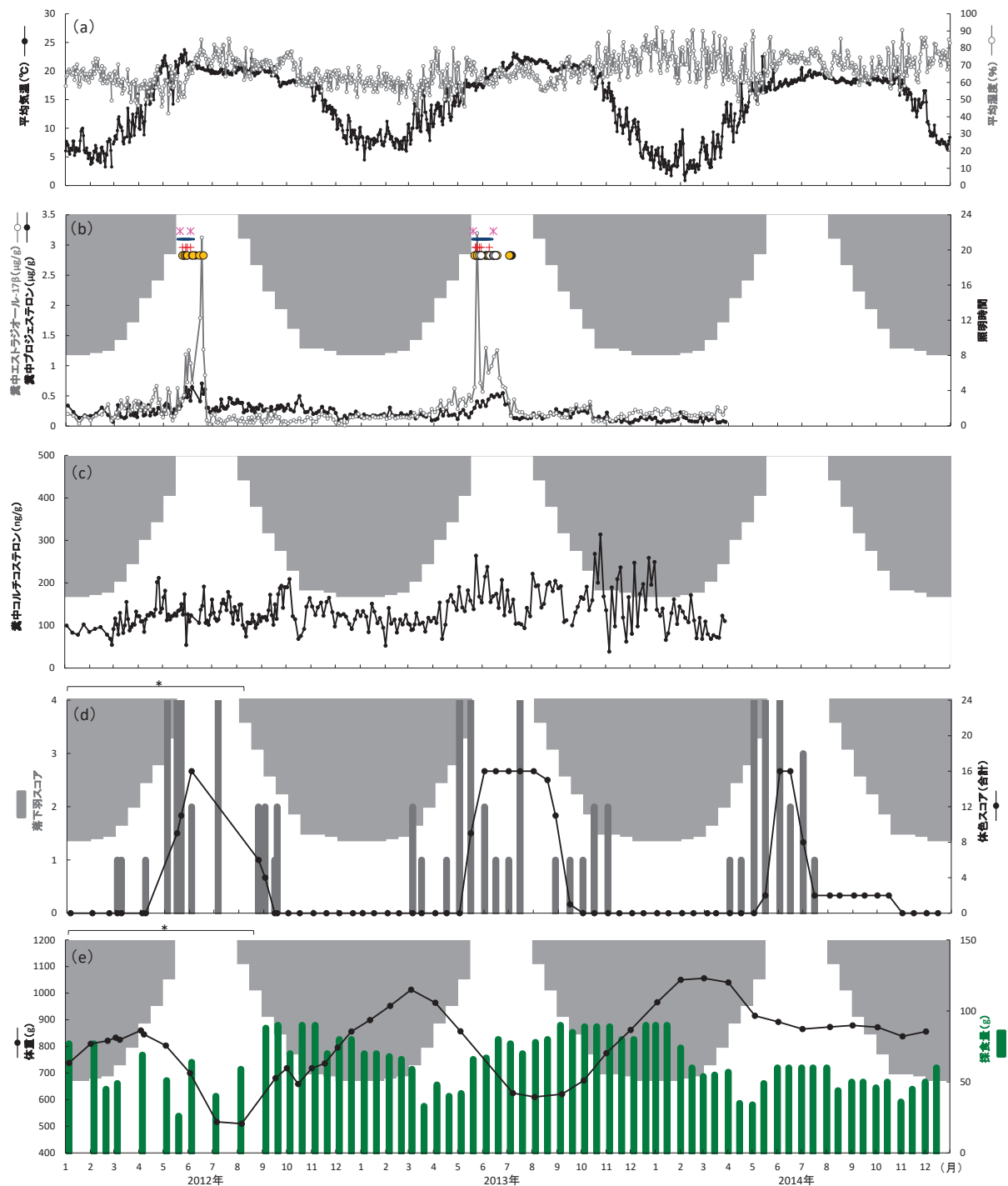


図 2-14 雌スバールバルライチョウ S127 における飼育環境温度および湿度，糞中エストラジオール-17 β およびプロジェステロン含量の動態，糞中コルチコステロン含量の動態，落下羽および体色スコアの変化，採食量と体重の変化（富山市ファミリーパーク）
 図（b）内の＊は発情，－は雄との同居，＋は交尾，○は有精卵の産卵，●は無精卵の産卵，●は破卵や軟卵を含む有精・無精の不明卵の産卵を示す。落下羽の測定期間は2012年1月5日～2014年12月15日，採食量の測定期間は2012年1月上旬～2014年12月中旬であった。＊の期間は落下羽スコアおよび採食量の測定頻度が月2回未満の期間を含む。

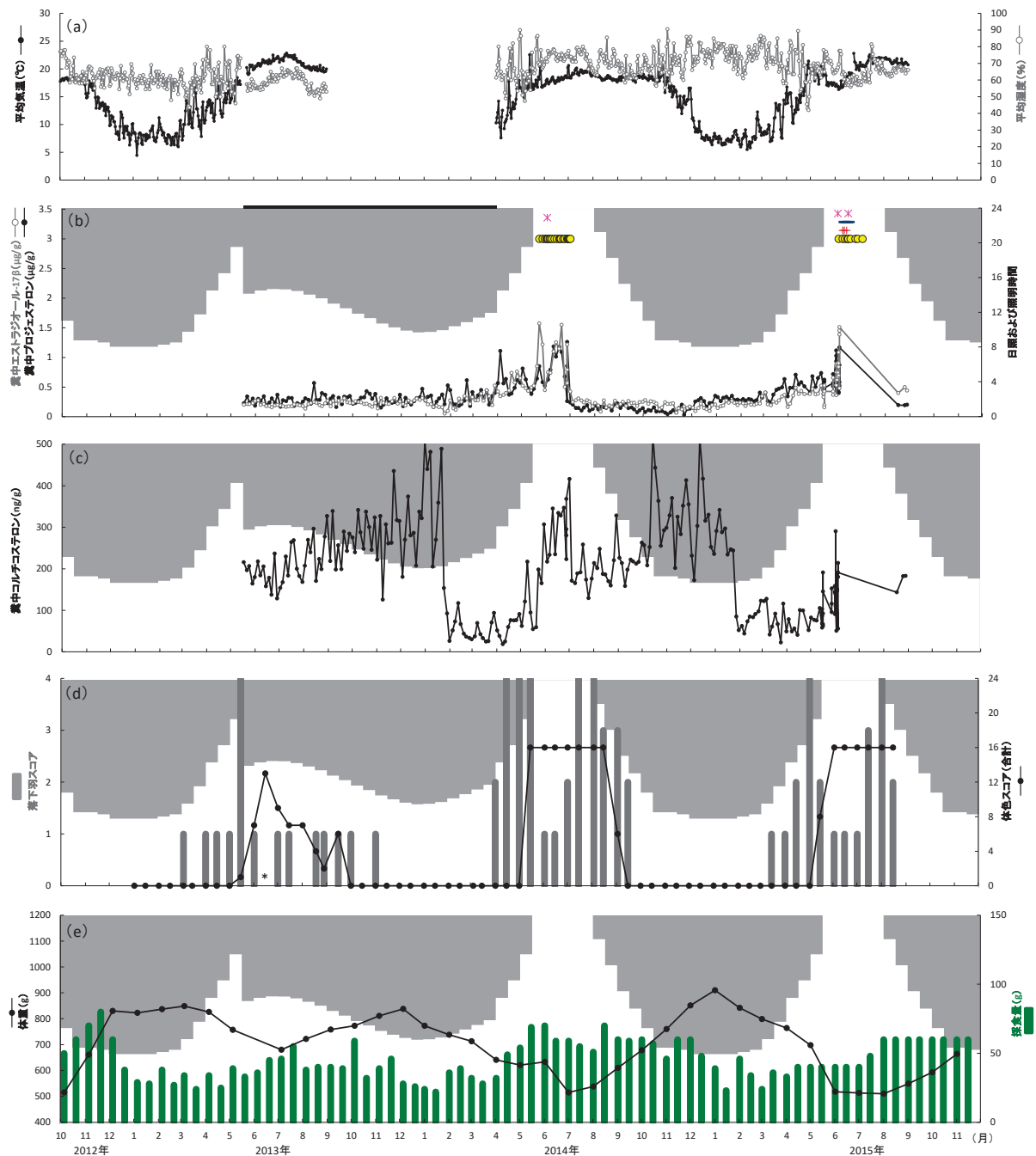


図 2-15 雌スパーバルライチョウ S137 における飼育環境温度および湿度，糞中エストラジオール-17 β およびプロジェステロン含量の動態，糞中コルチコステロン含量の動態，落下羽および体色スコアの変化，採食量と体重の変化（富山市ファミリーパーク）
 図 (b) 内の * は発情，— は雄との同居，+ は交尾，● は破卵や軟卵を含む有精・無精の不明卵の産卵を示す。—— は自然光 D 区での飼育期間を示す。図 (d) 内の * は落下羽スコアの測定頻度が月 2 回未満の期間を示す。落下羽の測定期間は 2013 年 1 月 1 日～2015 年 8 月 15 日，採食量の測定期間は 2012 年 10 月上旬～2015 年 11 月中旬であった。

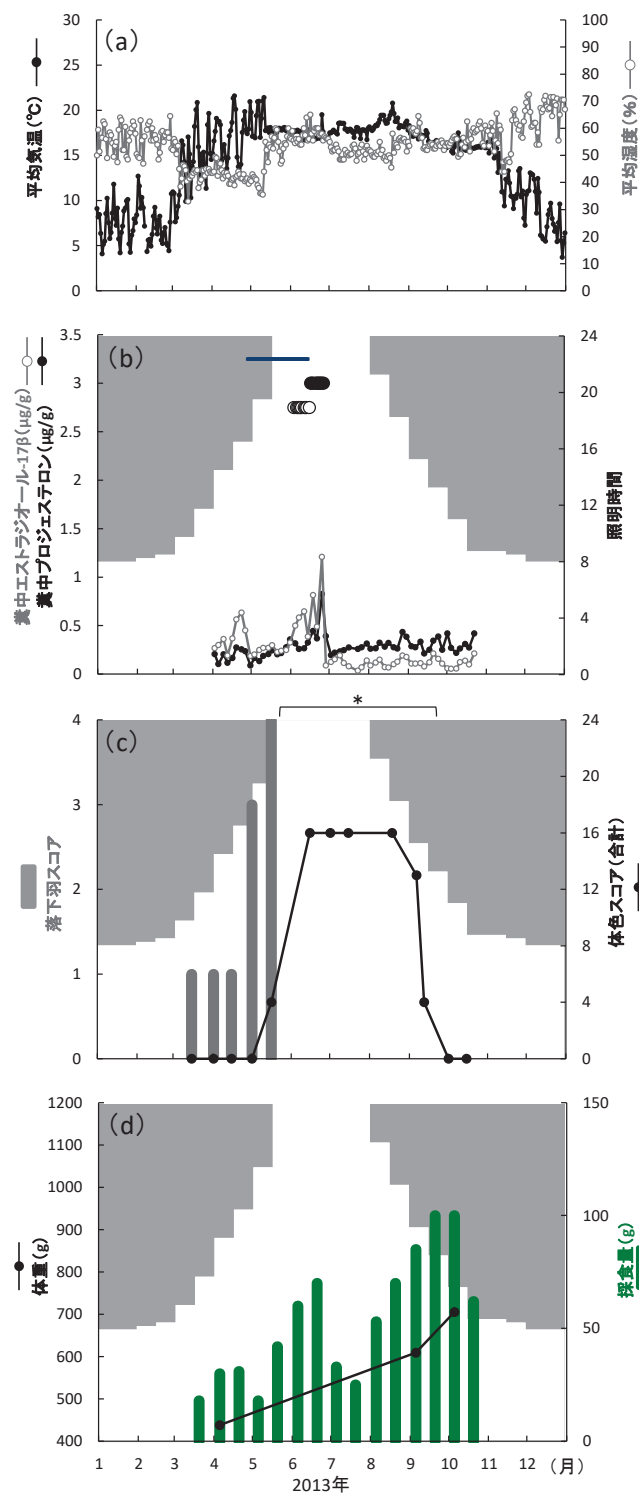


図 2-16 雌スバルバルライチョウ S152 における飼育環境温度および湿度、糞中エストラジオール-17 β およびプロジェステロン含量の動態、落下羽および体色スコアの変化、採食量と体重の変化（富山市ファミリーパーク）
 図（b）内の—は雄との同居，○は有精卵の産卵，●は無精卵の産卵を示す。図（c）内の*は落下羽スコアの測定頻度が月 2 回未満の期間を示す。落下羽の測定期間は 2013 年 3 月 15 日～2013 年 10 月 15 日，採食量の測定期間は 2013 年 1 月中旬～2013 年 10 月中旬であった。

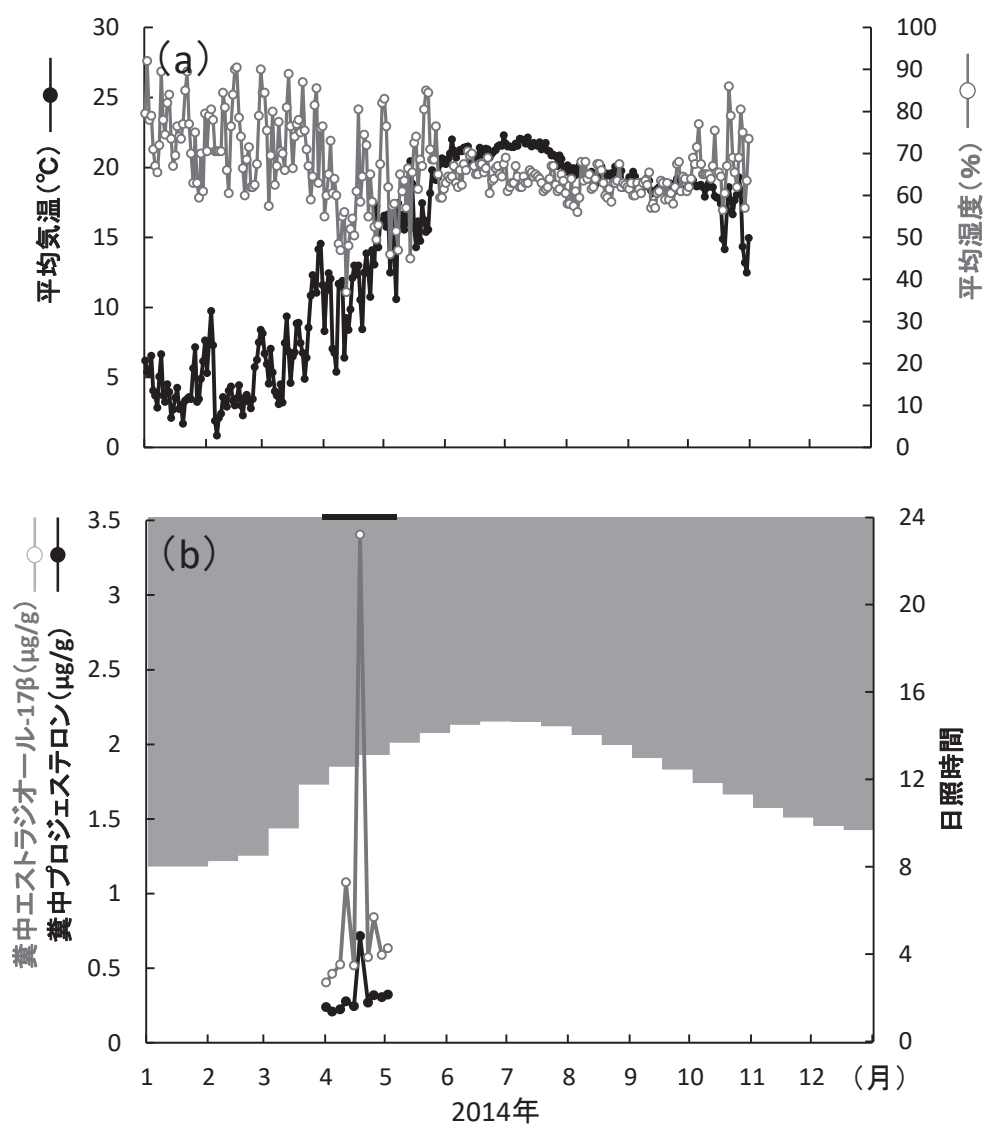


図 2-17 雌スバルバルライチョウ S225 における飼育環境温度および湿度，糞中エストラジオール-17β およびプロジェステロン含量の動態，落下羽および体色スコアの変化，採食量と体重の変化（富山市ファミリーパーク）
 — は自然光 C 区での飼育期間を示す。

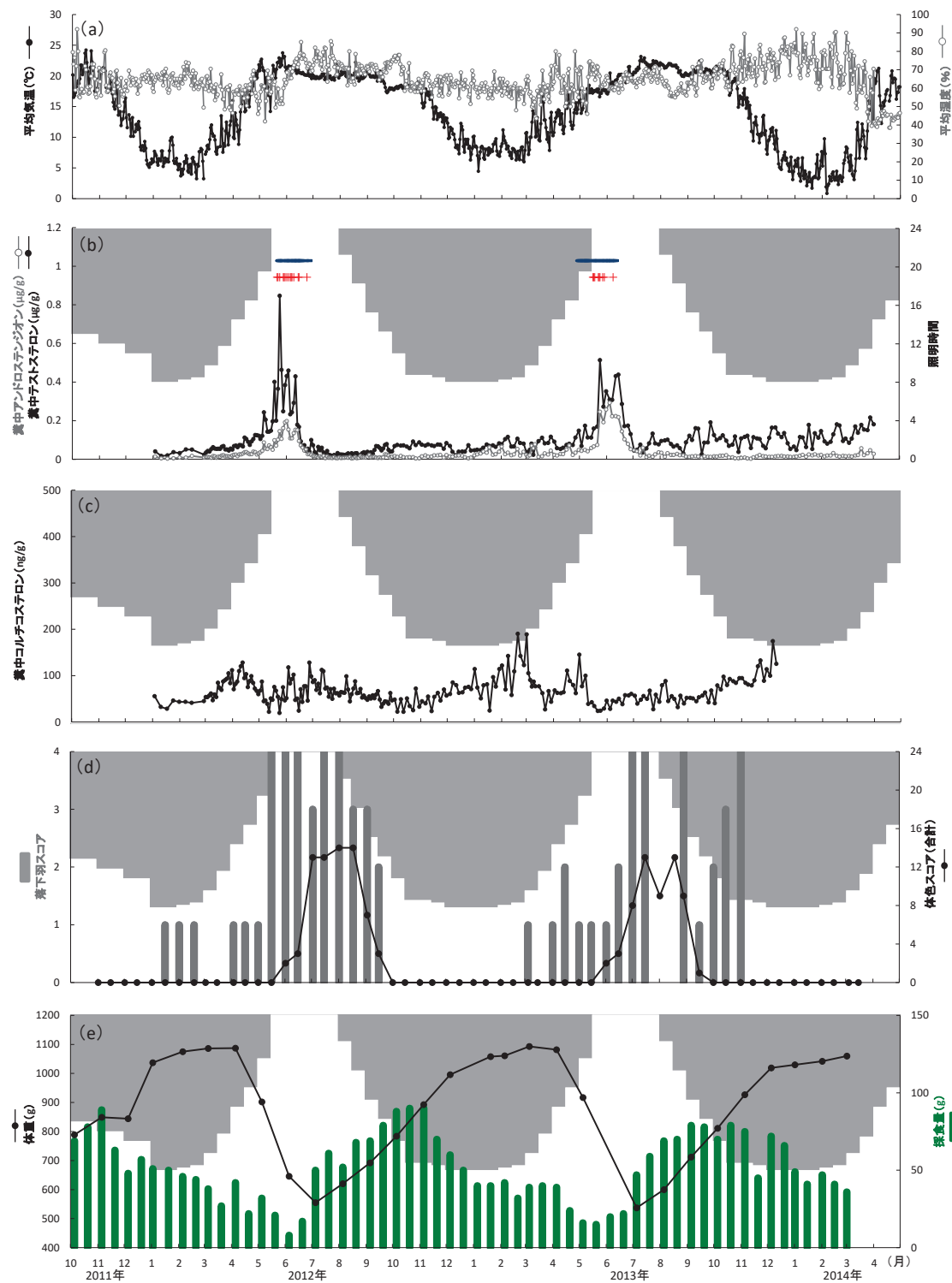


図 2-18 雄スパーバルライチョウ S53 における飼育環境温度および湿度，糞中テストステロンの動態，糞中アンドロステンジオン含量の動態，糞中コルチコステロン含量の動態，落下羽および体色スコアの変化，採食量と体重の変化（富山市ファミリーパーク）
 図（b）内の一は雌との同居，+は交尾を示す。落下羽の測定期間は 2011 年 11 月 1 日～2014 年 3 月 15 日，採食量の測定期間は 2011 年 10 月上旬～2014 年 3 月上旬であった。

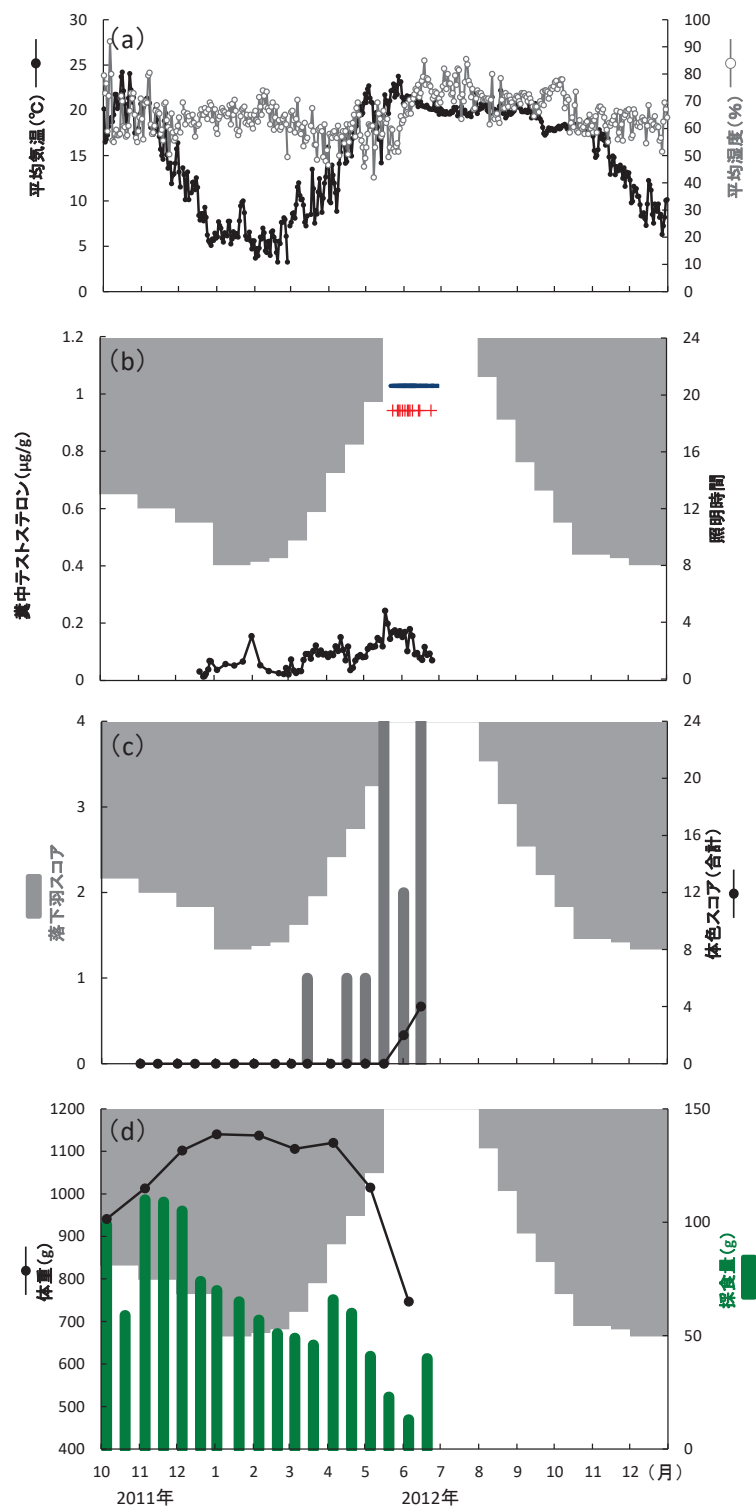


図 2-19 雄スバルバラライチョウ S65 における飼育環境温度および湿度，糞中テストステロンの動態，落下羽および体色スコアの変化，採食量と体重の変化（富山市ファミリーパーク）

図 (b) 内の一は雌との同居，+は交尾を示す。落下羽の測定期間は 2011 年 11 月 1 日～2012 年 6 月 15 日，採食量の測定期間は 2011 年 10 月上旬～2012 年 6 月中旬であった。

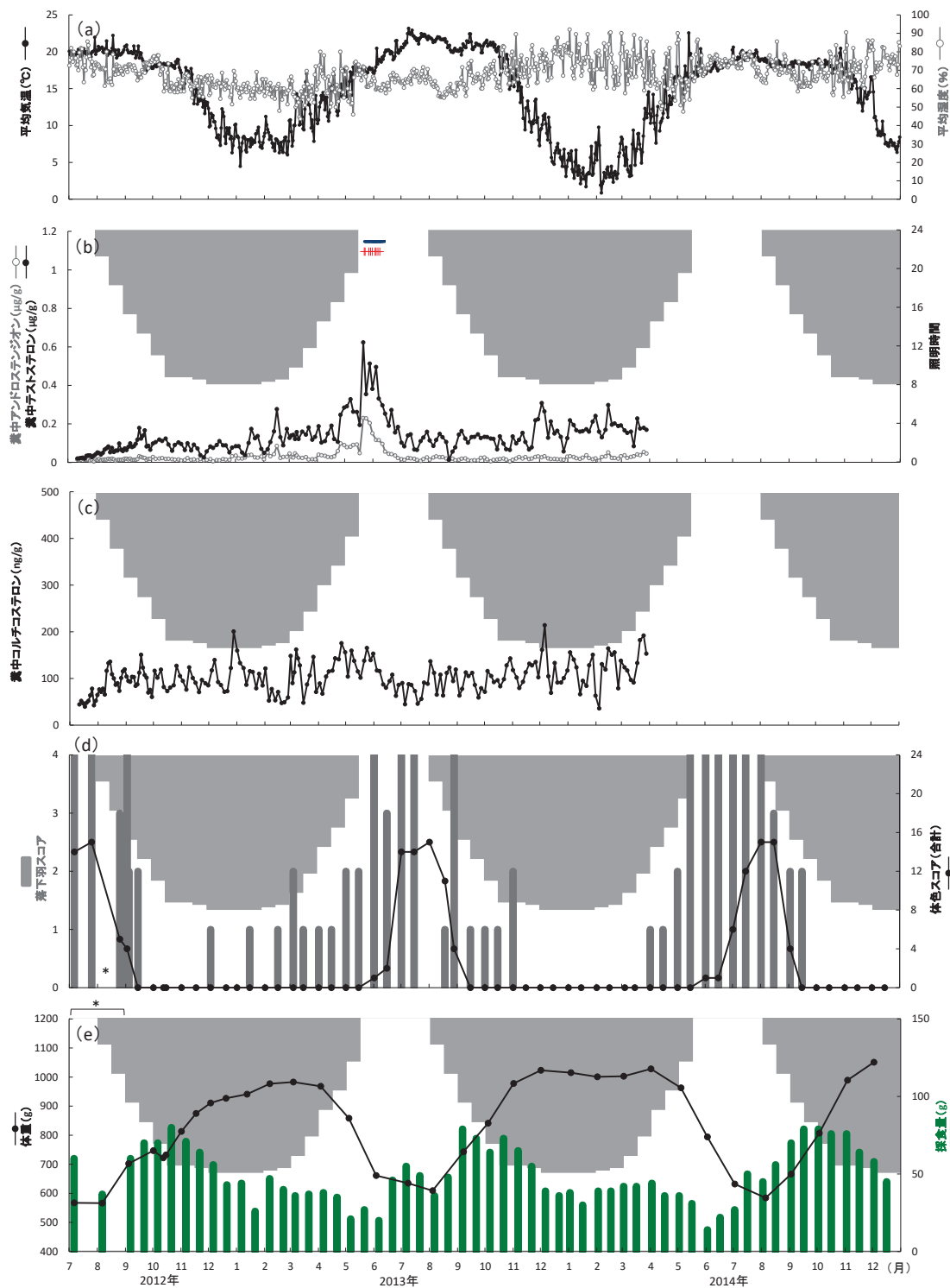


図 2-20 雄スパーバルライチョウ S130 における飼育環境温度および湿度，糞中テストステロンの動態，糞中アンドロステンジオン含量の動態，糞中コルチコステロン含量の動態，落下羽および体色スコアの変化，採食量と体重の変化（富山市ファミリーパーク）
 図 (b) 内の一は雌との同居，+は交尾を示す。落下羽の測定期間は 2012 年 7 月 6 日～2014 年 12 月 15 日，採食量の測定期間は 2012 年 7 月上旬～2014 年 12 月中旬であった。*の期間は落下羽スコアおよび採食量の測定頻度が月 2 回未満の期間を含む。

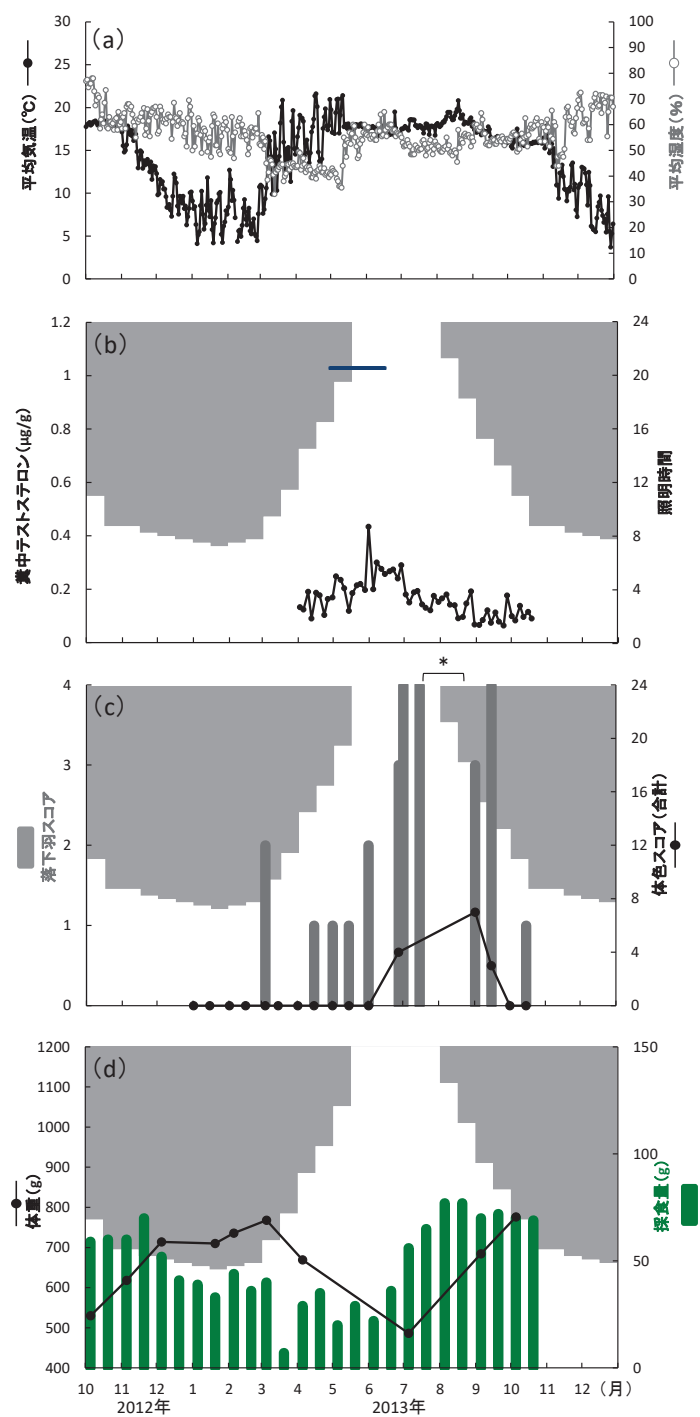


図 2-21 雄スバルバルライチョウ S136 における飼育環境温度および湿度，糞中テストステロンの動態，落下羽および体色スコアの変化，採食量と体重の変化（富山市ファミリーパーク）

図（b）内の一は雌との同居を示す。落下羽の測定期間は 2013 年 1 月 1 日～2013 年 10 月 15 日，採食量の測定期間は 2012 年 10 月上旬～2013 年 10 月中旬であった。＊は落下羽スコアの測定頻度が月 2 回未満の期間を含む。

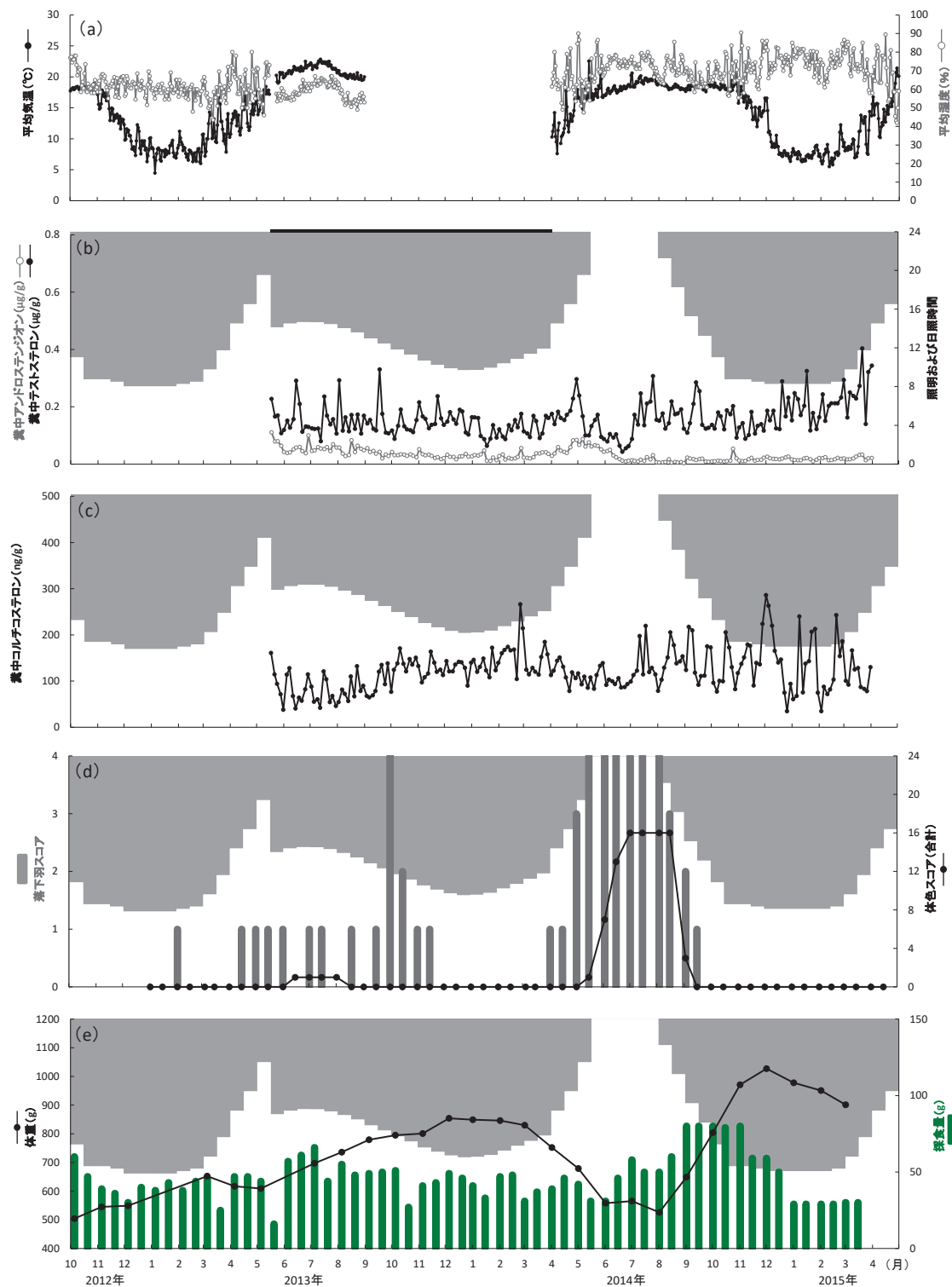


図 2-22 雄スバルバルライチョウ S148 における飼育環境温度および湿度，糞中テストステロンの動態，糞中アンドロステンジオン含量の動態，糞中コルチコステロン含量の動態，落下羽および体色スコアの変化，採食量と体重の変化（富山市ファミリーパーク）
 — は自然光 D 区での飼育期間を示す。落下羽の測定期間は 2013 年 1 月 1 日～2015 年 4 月 15 日，採食量の測定期間は 2012 年 10 月上旬～2015 年 3 月中旬であった。

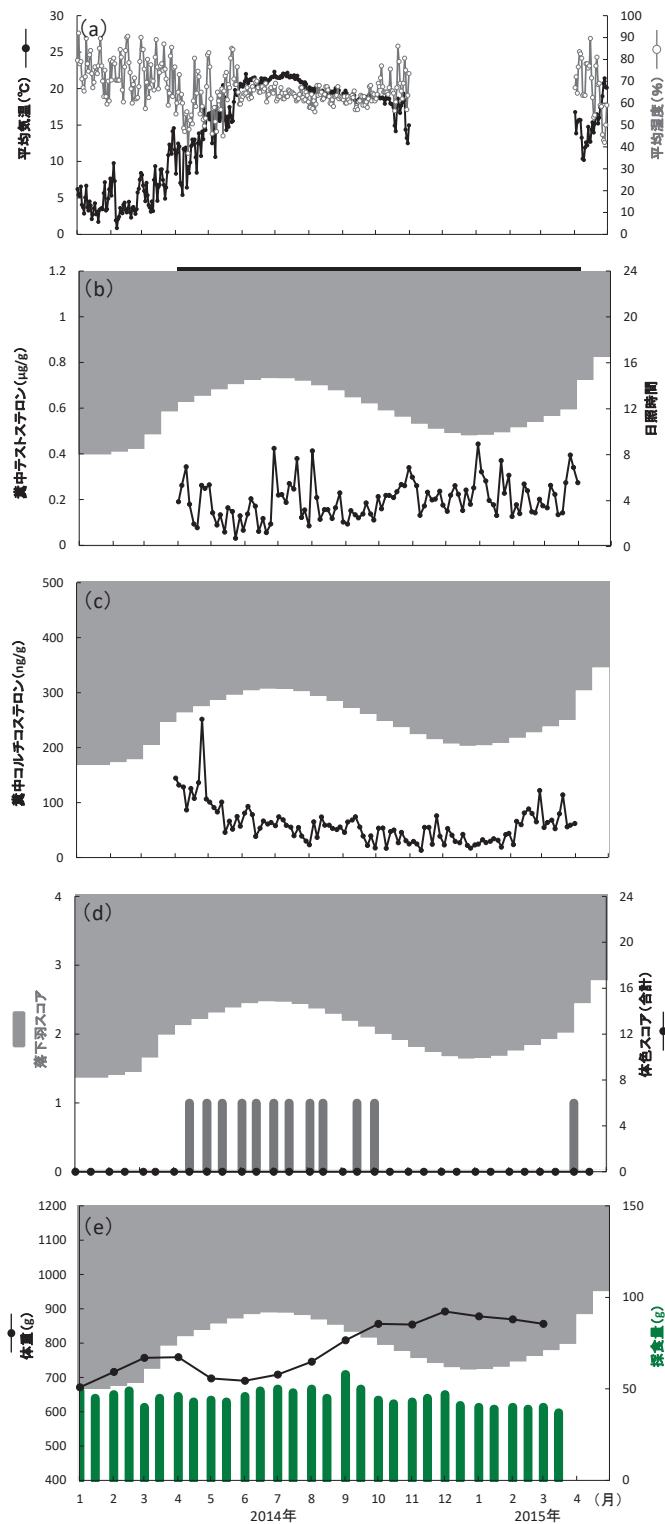


図 2-23 雄スバルバルライチョウ S198 における飼育環境温度および湿度，糞中テストステロンの動態，糞中コルチコステロン含量の動態，落下羽および体色スコアの変化，採食量と体重の変化（富山市ファミリーパーク）
 —— は自然光 D 区での飼育期間を示す。落下羽の測定期間は 2014 年 1 月 1 日～2015 年 4 月 15 日，採食量の測定期間は 2014 年 1 月上旬～2015 年 3 月中旬であった。

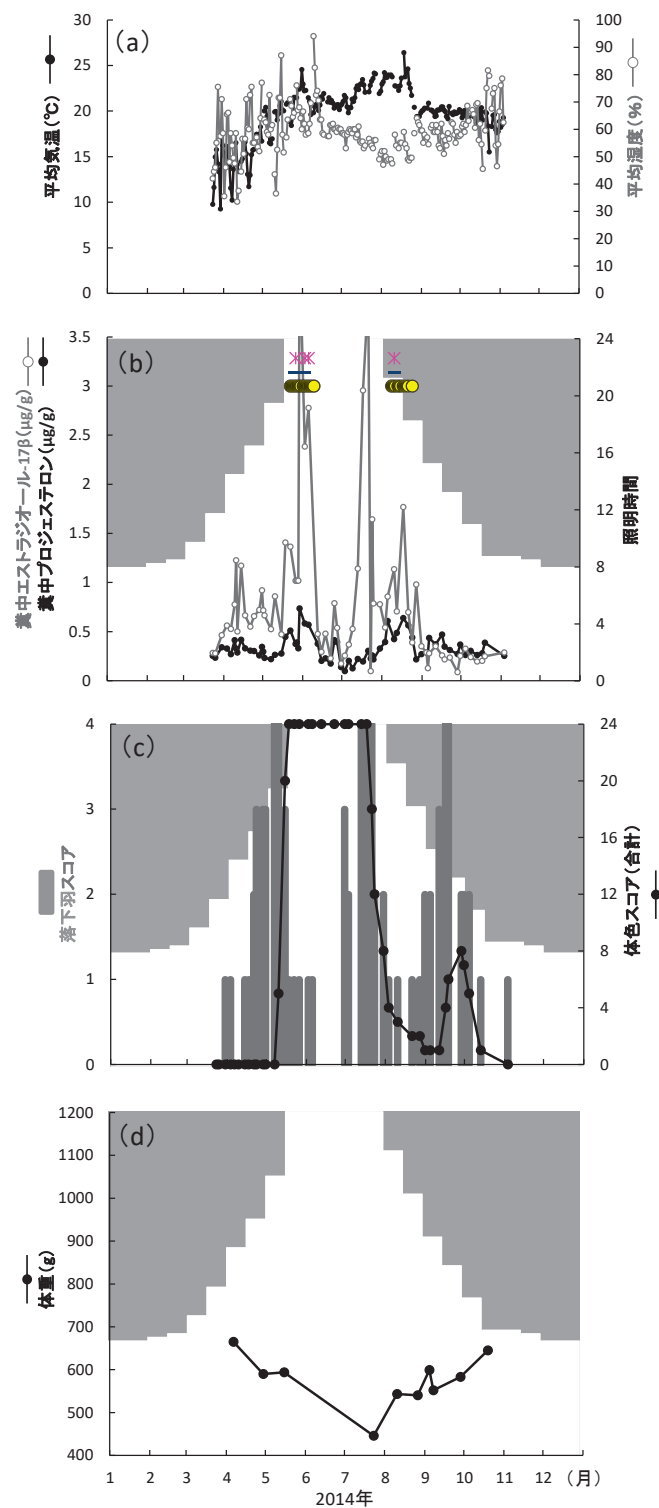


図 2-24 雌スパールバルライチョウ S208 における糞中エストラジオール-17 β およびプロジェステロン含量の動態, 糞中コルチコステロン含量の動態, 落下羽および体色スコアの変化, 採食量と体重の変化 (横生市繁殖センター)
 図 (b) 内の * は発情, - は雌との同居, ● は破卵や軟卵を含む有精・無精の不明卵の産卵を示す。落下羽の測定期間は 2014 年 3 月 23 日～2014 年 11 月 3 日であった。

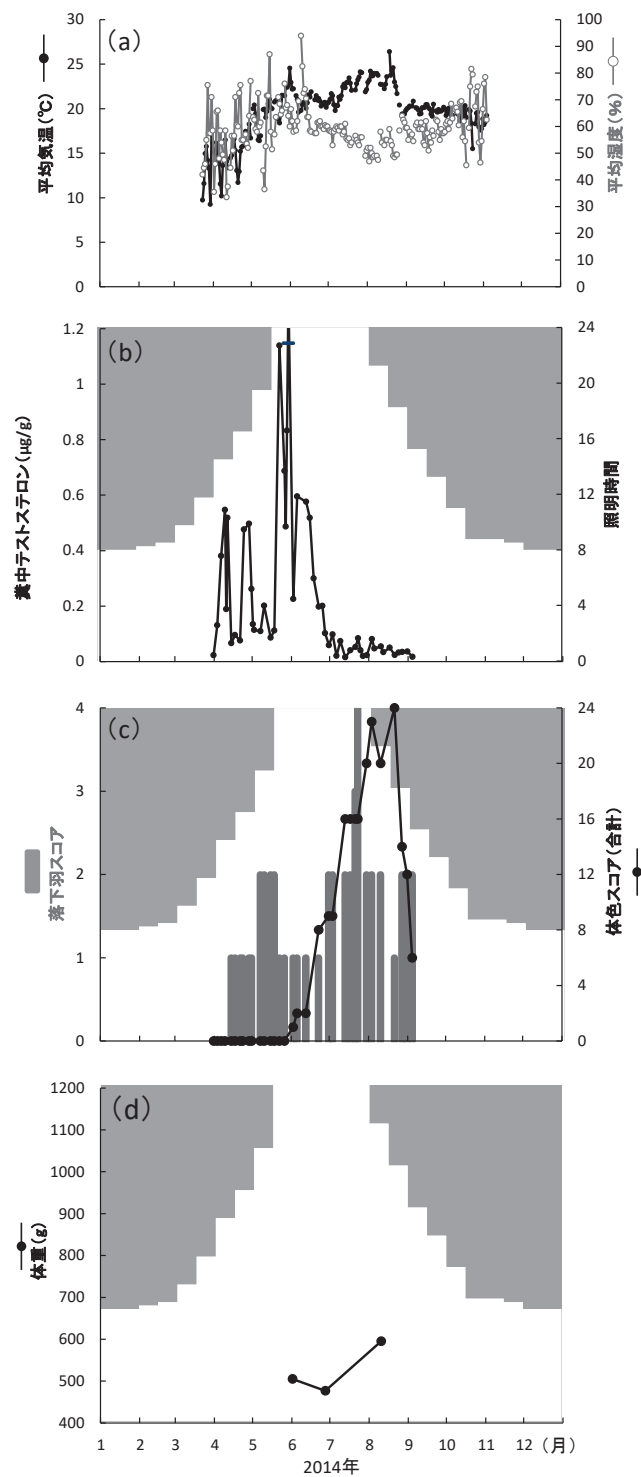


図 2-25 雄スバルバルライチョウ S239 における糞中テストステロンの動態, 糞中コルチコステロン含量の動態, 落下羽および体色スコアの変化, 採食量と体重の変化 (横生市繁殖センター)

図 (b) 内の一は雌との同居を示す。落下羽の測定期間は 2014 年 3 月 31 日～2014 年 9 月 4 日であった。

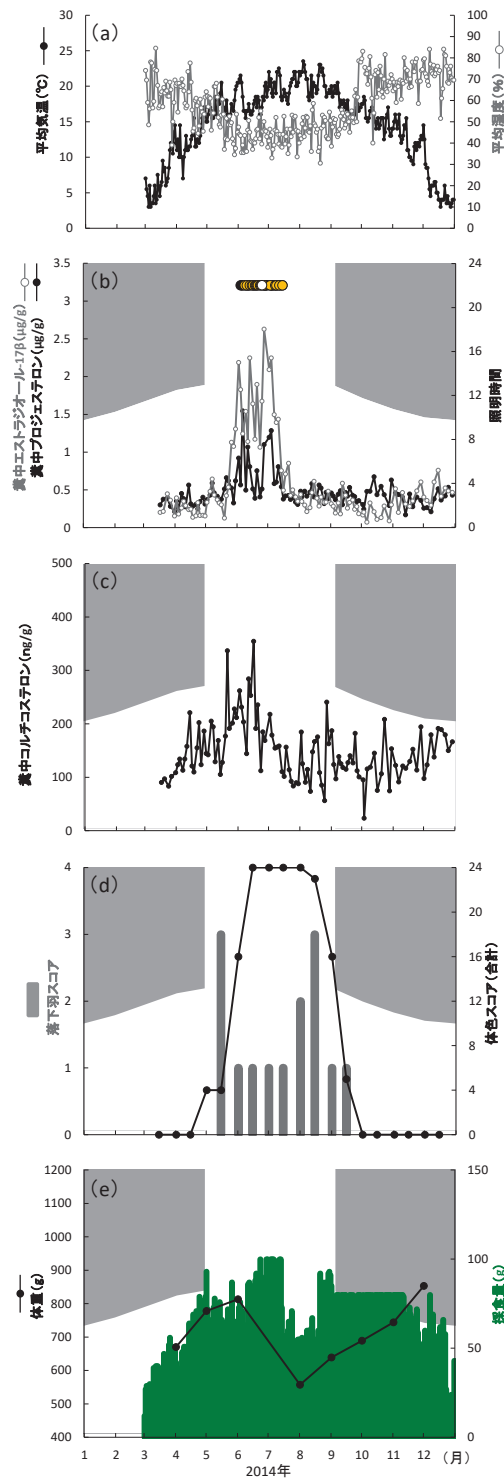


図 2-26 雌スバルバルライチョウ S150 における糞中エストラジオール-17 β およびプロジェステロン含量の動態, 糞中コルチコステロン含量の動態, 落下羽および体色スコアの変化, 採食量と体重の変化 (長野市茶臼山動物園)
 図 (b) 内の○は有精卵の産卵, ●は無精卵の産卵, ●は破卵や軟卵を含む有精・無精の不明卵の産卵を示す。落下羽の測定期間は 2014 年 3 月 15 日～2014 年 12 月 15 日, 採食量の測定期間は 2014 年 3 月 1 日～2014 年 12 月 31 日であった。

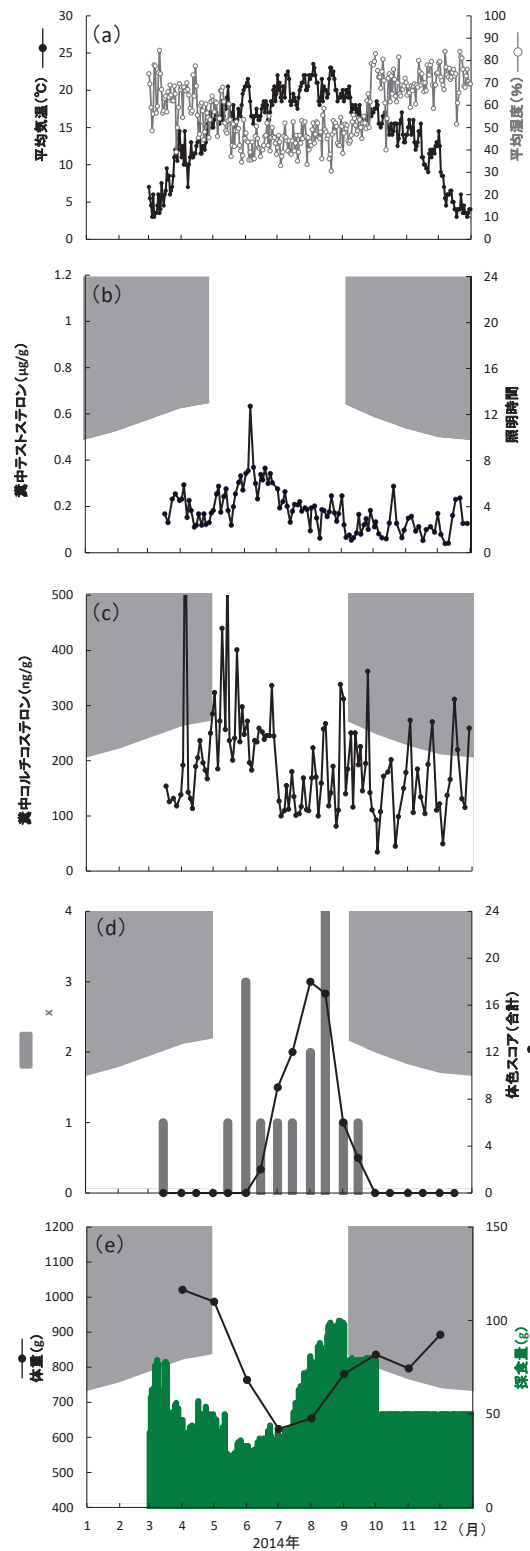


図 2-27 雄スパールバルライチョウ S60 における糞中テストステロンの動態，糞中コルチコステロン含量の動態，落下羽および体色スコアの変化，採食量と体重の変化（長野市茶臼山動物園）

落下羽の測定期間は 2014 年 3 月 15 日～2014 年 12 月 15 日，採食量の測定期間は 2014 年 3 月 1 日～2014 年 12 月 31 日であった。

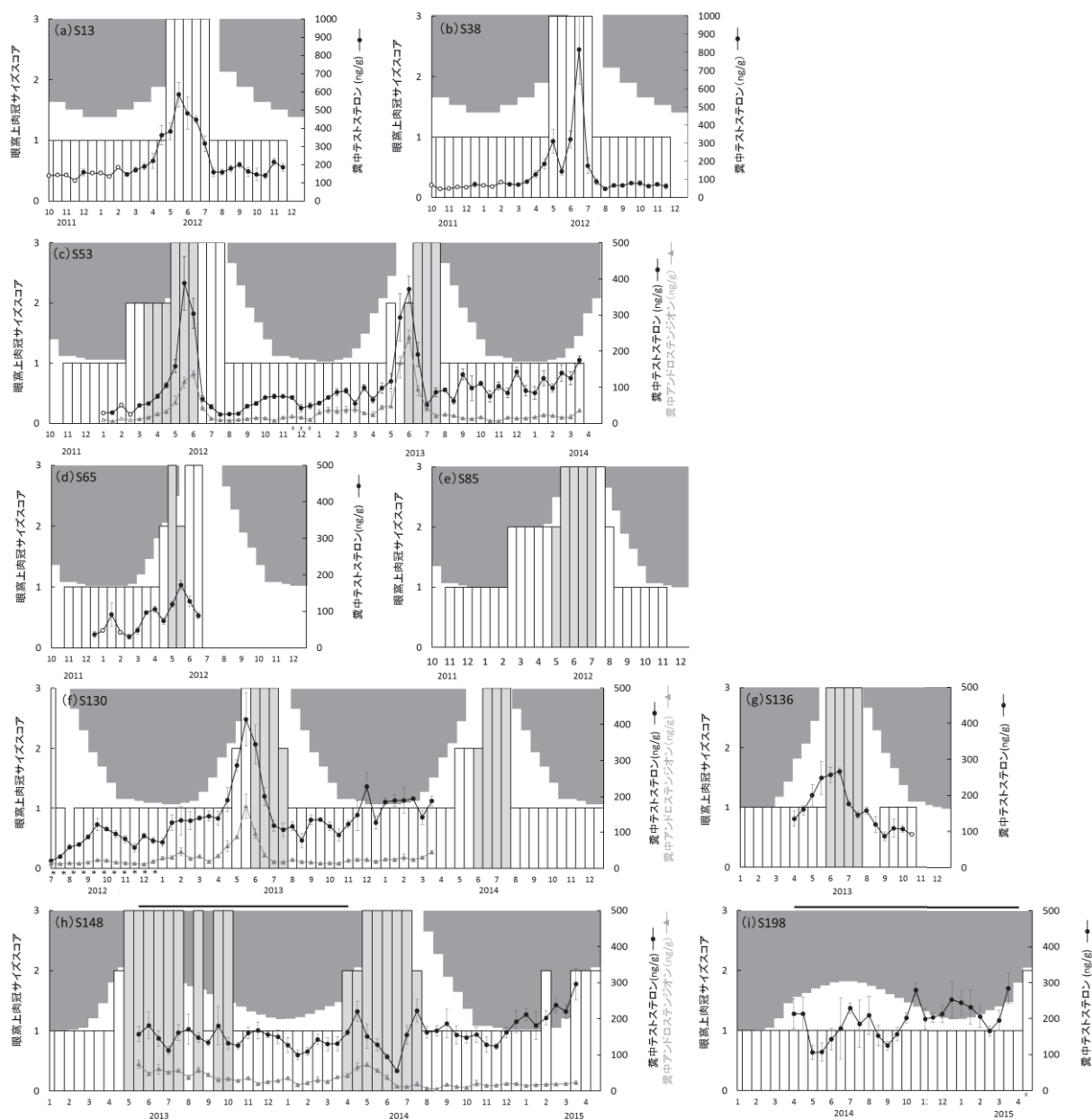


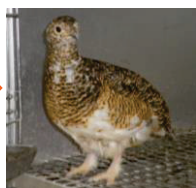
図 2-28 雄スパールバルライチョウにおける眼窩上肉冠と糞中テストステロン含量および糞中アンドロステンジオン含量の季節変化

棒グラフは眼窩上肉冠のサイズをスコアで示し、棒グラフの色は肉冠の色を示す（□は薄い赤色，■は濃い赤色）。糞中の性ステロイドホルモン含量は各月の 1～15 日または 16 日～月末までの平均値±SE を示す。○または△は試料数が 2 個以下ものを示す。＊は色の情報が無い箇所を示す。(h) および (i) における——は自然光 D 区での飼育期間を示す。

照明コントロール B区



2014年4月16日



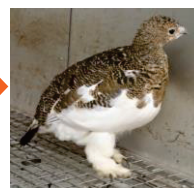
2014年5月24日



2014年6月18日



2012年7月15日



2014年8月17日

自然光 D区



2014年4月2日



2014年5月28日



2014年6月15日

図 2-29 照明コントロール B 区および自然光 D 区における雌スパーバルライチョウの体色変化
日付は撮影日を示す。

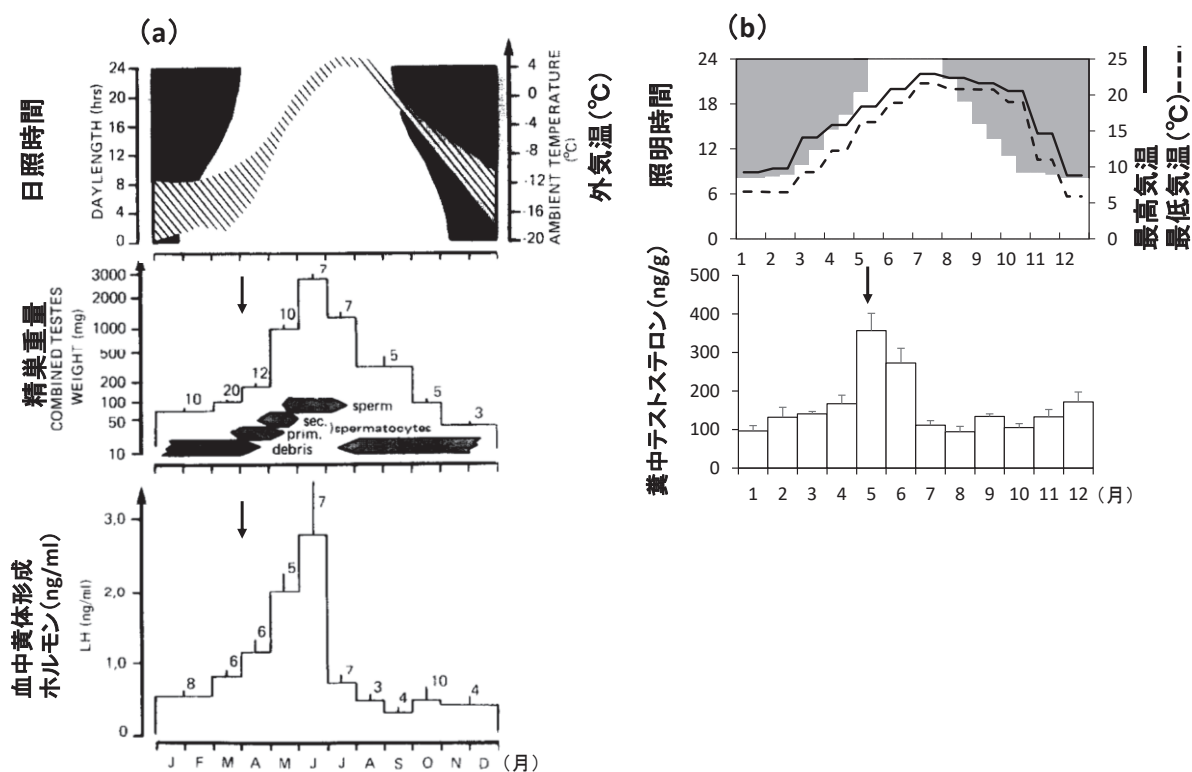


図 2-30 先行研究と本研究における生息条件と内分泌動態の比較

(a) は Stokkan ら (1986b) の図を一部改変したものである。生息地 (79°N) における日照時間、外気温、精巣重量および血中黄体形成ホルモン濃度の動態を示す。(b) は本研究の雄個体 S130 (照明コントロール B1 区) における、照明時間、飼育施設内の最高気温および最低気温、月別の糞中テストステロン含量の動態を示す。図中の↓は白夜または 24 時間照明への移行時期を示す。

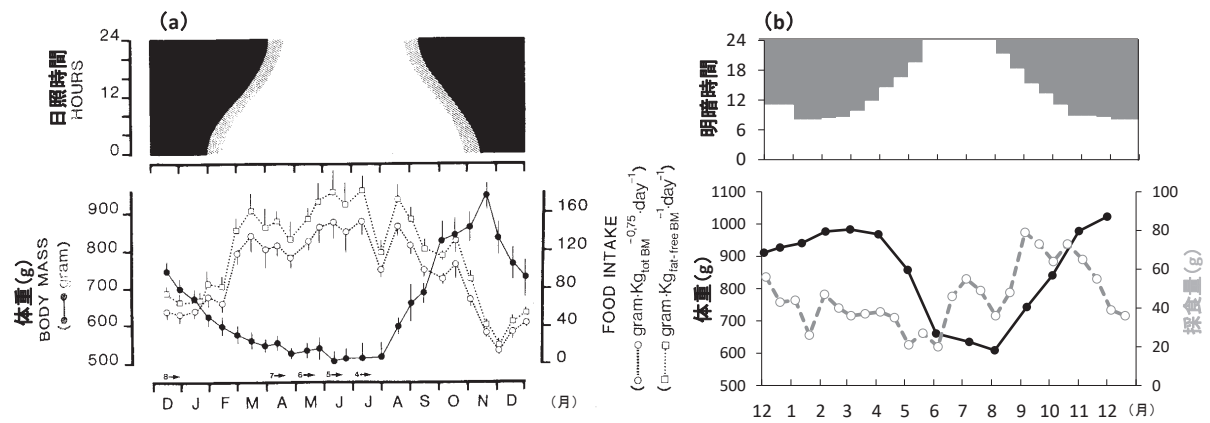


図 2-31 先行研究と本研究における体重と採食変動の比較

(a) は Stokkan ら (1986a) の図を一部改変したものである。生息地 (79°N) において自然光および屋外気温で飼育がなされた。(b) は本研究の雄個体 S130 (照明コントロール B1 区) における照明時間, 体重および採食量の変動を示す。

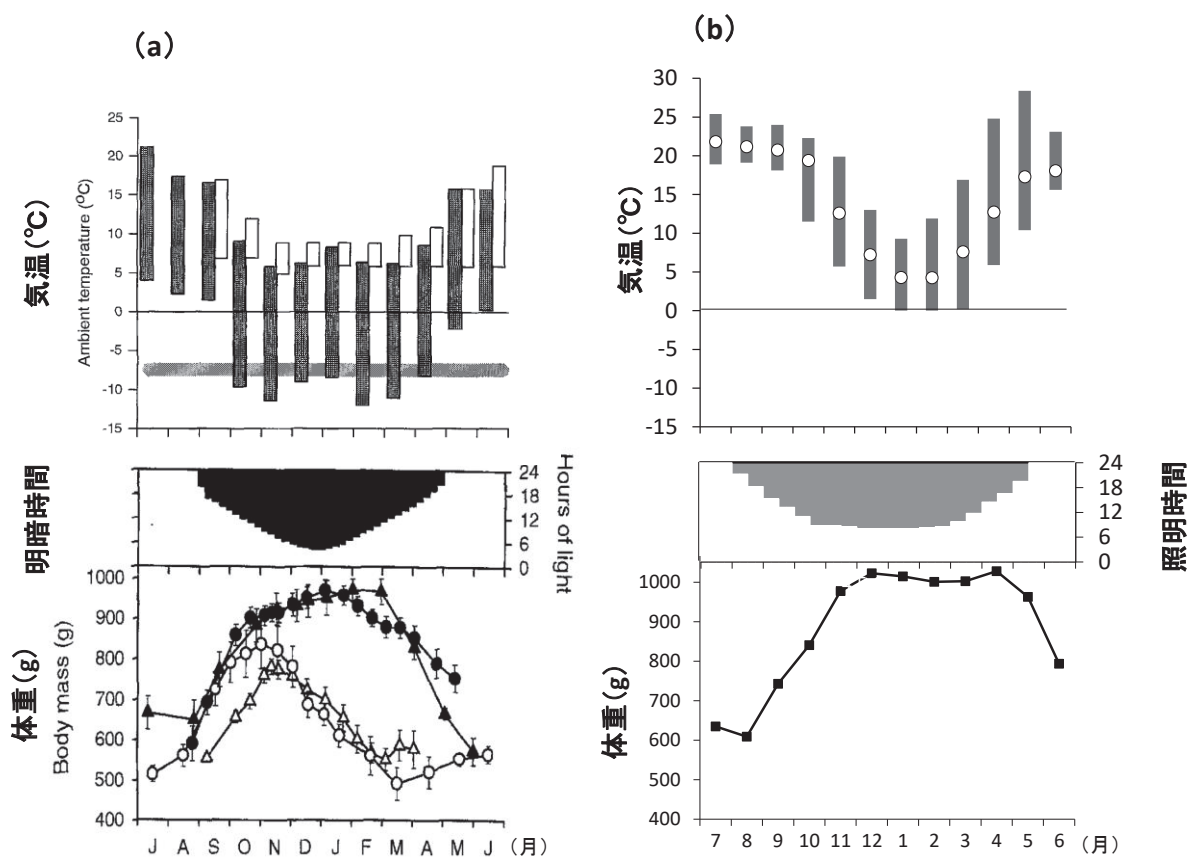


図 2-2-32 先行研究と本研究における飼育条件と体重変動の比較

(a) は Stokkan ら (1995) の図を一部改変したものである。飼育試験地 (69° 46'N) の屋内外で、自然光または人工照明で飼育がなされた。気温のグラフの■は屋外気温, □は屋内気温を示す。体重のグラフの●は屋内気温および自然光, ▲屋内気温および人工照明, ○は屋外気温および自然光, △屋外気温および人工照明で飼育した場合の変動を示す。(b) は本研究の雄個体 S130 (照明コントロール B1 区) における飼育施設内気温, 照明時間および体重の変動を示す。気温のグラフにおける■は気温の変動範囲を示し, ○は平均気温を示す。

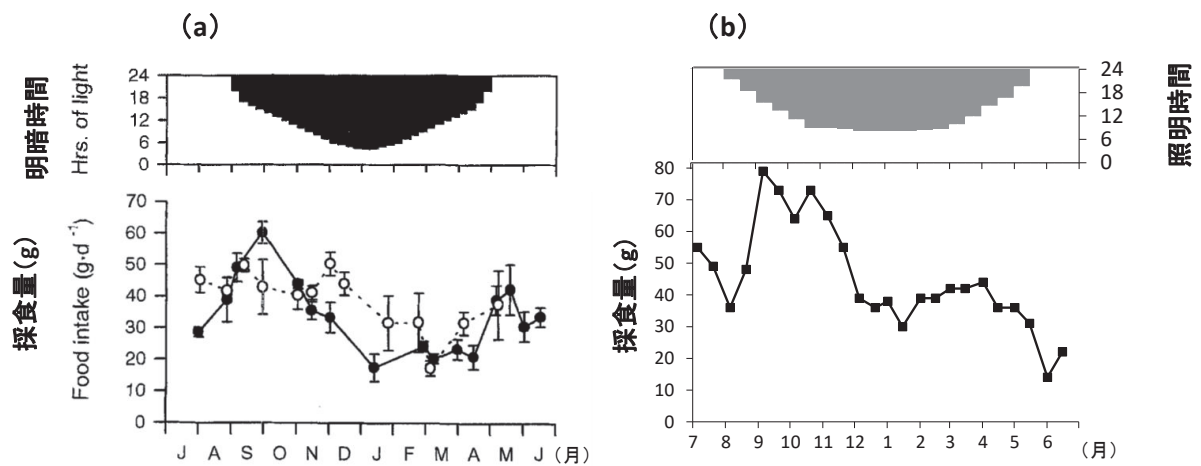


図 2-33 先行研究と本研究における採食量変動の比較

(a) は Lindgard ら (1995) の図を一部改変したものである。飼育試験地 ($69^{\circ}46'N$) の屋内で、自然光または 24 時間照明で飼育がなされた。採食量のグラフの●は自然光 ($69^{\circ}46'N$) で○は 24 時間照明で飼育した場合の変動を示す。飼育施設内気温は $10.9 \pm 4.1 \sim 14.4 \pm 2.6^{\circ}C$ であった。(b) は本研究の雄個体 S130 (照明コントロール B1 区) における照明時間およびの変動を示す。

第3章 ライチョウにおける非侵襲的な DNA 性判別法の確立

3-1 緒 言

3-1-1 野生生物の生態調査のための DNA 性判別

雌雄間においてライフイベントや繁殖における役割などの違いが存在するため、野生生物の生態情報を扱う際に性別を把握することは、ホルモン値を適切に評価する上で重要である。鳥類においては、Ninnes ら (2010) が、野生のアデリーペンギン (*Pygoscelis adeliae*) の血漿および糞中のホルモン測定を行うにあたり、交尾行動等の観察とともに血液由来の DNA を用いた性判別を行うことで雌雄を分類し、ホルモン値の比較を行っている。また、野外で採取した糞を材料とし、DNA 性判別とホルモン含量の測定を組み合わせた研究例には、カワウソ (*Lutra lutra*) (Kalz et al., 2006) やタテガミオオカミ (*Chrysocyon brachyurus*) (Vynne et al., 2011)、アカシカ (*Cervus elaphus*) (Huber et al., 2003) が挙げられる。DNA 性判別を行い、糞試料の雌雄の由来を明らかにすることは、野生生物のホルモン値の適切な解釈を助ける。

3-1-2 鳥類における PCR 法を用いた DNA 性判別

外部形態からの性判別が難しい種については、現在は DNA を用いた Polymerase Chain Reaction (PCR) による性判別法が主流になっている。PCR 法は、少量の鋳型となる DNA を大量に複製することができる方法であるため、少量の材料や微量の DNA から判別を行うことができる。性判別に用いるための DNA 資源の一つに、血液が挙げられる。特に鳥類の赤血球は核を有するため、微量血液から十分な鋳型 DNA を得ることができるが、本研究のように野外の動物の生体情報の材料としては、捕獲や採血による個体へのストレスや、ライフイベントへの侵襲性が懸念される。近年では、鳥類において、非侵襲的な DNA 資源として、抜け落ちた羽や孵化後の卵殻膜が用いられており、排泄糞の有用性も検討されている (Bush et al., 2005; Mukesh et al., 2011)。これらの材料は血液に比べると得られる鋳型 DNA 量が少なく、さらに保存状態の問題や微生物分解による鋳型 DNA の減少があるも

の、個体に接することなく採材が可能であり、保定や採血といった専門的な採取技術も必要ない。

鳥類の性染色体型は、雄が ZZ 型、雌が ZW 型である。性染色体上には chromo-herlicase-DNA-binding protein (CHD) 遺伝子という高度に保存された配列が存在する。Z 染色体と W 染色体の両方に CHD 遺伝子は存在するが、異なる長さのイントロンを持つ。このイントロン長の違いを利用し、それぞれの配列を PCR 法により増幅して性判別が行われている。これまでに、CHD 遺伝子のイントロン領域をターゲットとしたプライマーとして、1237L/1272H (Kahn et al., 1998), P2/P8 (Griffiths et al., 1998), 2550F/2718R (Fridolfsson and Ellegren, 1999) が設計されており、走鳥類以外の様々な鳥種で性判別が可能であり、有用性が高いことが報告されている。それぞれの増幅断片長は、鳥種により異なるが、プライマー1237L/1272HにおいてZ染色体由来バンド250~290 bp, W染色体由来バンド210~320 bpの増幅が見られ、バンドサイズの差は10~70 bpである (Jensen et al., 2003)。プライマーP2/P8においてZ染色体由来バンド320~400 bp, W染色体由来バンド240~410 bpの増幅が見られ、バンドサイズの差は10~80 bpであり、これらの差の多くは30~50 bpであることが報告されている (Jensen et al., 2003)。一方、プライマー2550F/2718RにおいてはZ染色体由来バンド600~1030 bp, W染色体由来バンド450~680 bpの増幅が見られ、バンドサイズの差は80~540 bpであることが報告されている (Ong and Vellayan, 2008)。

CHD 遺伝子は少なくとも2つのイントロンを持つとされており、P2/P8 と 1237L/1272H は同じ標的イントロンの近くに設計されているが、結合する部位が異なるため、得られるバンドサイズが異なっている (Jensen et al., 2003, Dubie and Zagalska-Neubauer, 2006)。1237L/1272H は P2/P8 に比べ、バンドが不明瞭になることや、非特異断片が多く見られる傾向が見られる (Jensen et al., 2003)。一方、P2/P8 はその増幅断片の差は10~80 bp と小さく、アガロースゲルでのバンドの分離が困難な場合もある。また、P2/P8 によるシラヒゲウミスズメ (*Aethia pygmaea*), コウミスズメ (*A. pusilla*), エトロフウミスズメ (*A. cristatella*) およびウミオウム (*Cyclorhynchus psittacula*) の性判別では、雄において2種類のZ (Z')

染色体が検出されることがあり、Z および Z'染色体の差は 12 bp である一方で、Z 染色体と W 染色体の差が 14 bp であったことから、雌雄の誤判定を起こす可能性もある (Dawson et al., 2001)。さらに、P2/P8 で増幅を行った場合、多くの種で Z 染色体は W 染色体より短いバンドを示す。そのため、雌の DNA 試料において、短い断片である Z 染色体が優先的に増幅されることがあり、これによるバンドの検出は 1 本となるため、雌を雄と誤判定する可能性も懸念されている (Dawson et al., 2001)。一方で、2550F/2718R で増幅を行った場合に得られるバンドは、W 染色体で Z 染色体より短くなるため、この問題を回避することができる (Dawson et al., 2001)。また、2550F/2718R による増幅で得られる増幅断片は大きいものの、Z 染色体と W 染色体で 150~250 bp の差が見られるため、アガロースゲル電気泳動法での分離が可能である (Dubie and Zagalska-Neubauer, 2006; Ong and Vellayan, 2008)。

これまでにライチョウ科の種においても PCR 法による性判別が報告されている。キジオリチョウではプライマー2550F/2718R (Baumgardt et al., 2013) および 1273L/1272H (Bush et al., 2005; Baumgardt et al., 2013)、クロライチョウでは 2550F/2718R (Fridolfsson and Ellegren, 1999)、ヨーロッパオオライチョウではプライマーP2/P8 (Segelbacher and Steinbrück, 2001)、2550F および TuWR/TuZR (Regnaut et al., 2006) で性判別が行われている。

3-1-3 本研究の目的

本研究では、野生ニホンライチョウの糞中のホルモン含量測定を行うにあたり、糞の排泄者の性別を明らかにするために、ニホンライチョウの糞由来 DNA を用いた性判別法を確立することを目的とした。まず、先行研究において幅広い鳥種で性判別ができることが報告されている DNA プライマーP2/P8 および 2550F/2718R を選択し、性判別を試みた。次にスバルバルライチョウの血液由来 DNA を元にしたライチョウ用性判別プライマーの設計を行った。このプライマーを用いて、野外で採取したニホンライチョウの糞の排泄個体の性を判断した。

3-2 材料および方法

3-2-1 ニホンライチョウの糞の採取

ニホンライチョウの糞の採取は、2013 年、2014 年および 2016 年の積雪で入山や糞の採取が困難な 10~4 月上旬を除く各月に行った。2013 年および 2014 年は主に乗鞍岳を中心にその他、火打山、陰火打、焼山、仙丈岳、白根三山、荒川岳および聖岳において、2016 年 6 月に御嶽山で行った（表 3-1）。生活痕として発見された糞、または個体による排泄を目視確認した糞を採取し、チャック付きポリ袋に入れ、下山後、冷凍庫に保存した。なお、2013 年および 2014 年の糞の採取と記録は中村浩志氏、小林篤氏によるフィールド調査時に、2016 年は野鳥の会会員らを中心とした御嶽ライチョウ生息状況調査時に行われた。

また、コントロール試料として、飼育下スバルバルライチョウの血液由来 DNA を用いた（表 3-2）。なお、スバルバルライチョウの血液由来 DNA は、その抽出液を横浜市繁殖センターより提供を受けた。

3-2-2 糞由来 DNA の抽出

3-2-2-1 試料の調製

糞検体からの DNA の抽出には、QIAamp DNA Stool Mini Kit (QIAGEN) 内の以下の試薬を使用し、キット内のプロトコール「ヒト DNA 解析のための糞便からの DNA 精製」をもとに抽出を行った。

1) Buffer ASL

Buffer ASL (Stool lysis buffer) は、QIAamp DNA Stool Mini Kit (QIAGEN) 内のものを使用し、使用時まで常温下で保存した。

2) InhibitEX

InhibitEX (タブレット状 PCR 阻害物質の吸着樹脂) は QIAamp DNA Stool Mini Kit (QIAGEN) 内のものを使用し、使用時まで常温下で保存した。

3) Proteinase K

Proteinase K の組成は、20mM トリス-塩酸 (Tris-HCl ; pH7.4), 1mM 塩化カルシウム,

50%グリセロールであった。実験には QIAamp DNA Stool Mini Kit (QIAGEN) 内のものを使用し、使用時まで常温下で保存した。

4) Buffer AL

Buffer AL (DNA 精製 Lysis Buffer) は QIAamp DNA Stool Mini Kit (QIAGEN) 内のものを使用し、使用時まで常温下で保存した。

5) エタノール

99.5%エタノール (和光純薬工業) を使用した。使用時まで常温下で保存した。

6) Buffer AW1

Buffer AW1 は QIAamp DNA Stool Mini Kit (QIAGEN) 内のものを使用し、これに 99.5%のエタノール (和光純薬工業) を 25 ml 添加した。使用時まで常温で保存した。

7) Buffer AW2

Buffer AW2 は QIAamp DNA Stool Mini Kit (QIAGEN) 内のものを使用し、これに 99.5%エタノール (和光純薬工業) を 30 ml 添加した。使用時まで常温下で保存した。

8) Buffer AE

Buffer AE の組成は、10mM トリス緩衝液 (Tris-Cl) と 0.5 mM エチレンジアミン四酢酸 (EDTA, pH 9.0) であった。実験には QIAamp DNA Stool Mini Kit (QIAGEN) 内のものを使用し、使用時まで常温下で保存した。

3-2-2-2 糞検体からの DNA 抽出

DNA 抽出には、15 ml 容コニカルチューブに 0.200 g の糞を極力尿酸の混入がないようにして入れ、Buffer ASL1.6 ml を各試料に加えた。糞試料は、ボルテックスミキサーにより完全にホモジナイズされるまで攪拌した。その後、2500 rpm で 5 分間遠心分離を行った。その上清 1.4 ml を新しい 2 ml 容マイクロチューブに移し、各試料に InhibitEX 錠剤を 1 錠添加し、錠剤が完全に懸濁するまでボルテックスミキサーですぐに攪拌した。その後、室温で 1 分間静置し、阻害物質を InhibitEX マトリックスに吸着させた。各試料を 15000 rpm で 3 分間遠心分離させ、InhibitEX マトリックスに阻害物質と糞便粒子をペレット化して分離

した。遠心後すぐに、上清を新しい 1.5 ml 容マイクロチューブに移し、15000 rpm で 3 分間遠心分離を行った。遠心分離を行っている間に、新しい 2 ml 容マイクロチューブに Proteinase K 25 μ l を分注した。Proteinase K が入った 2 ml 容マイクロチューブに遠心後の上清 600 μ l と、Buffer AL 600 μ l を添加し、15 秒間攪拌した。その後、アルミブロック恒温槽 (EYELA MG-2200) 内で 70°C 下、60 分間インキュベートした。インキュベートの間、15 分毎にボルテックスミキサーを用いてよく混和した。インキュベート後、99.5%エタノールを 600 μ l 加え、ボルテックスミキサーでよく混和した。QIAamp Spin Column (QIAamp DNA Stool Mini Kit 内) を 2 ml 容コレクションチューブ (QIAamp DNA Stool Mini Kit 内) にセットし、そこに抽出溶液 600 μ l を分注し、15000 rpm で 1 分間遠心分離した。QIAamp Spin Column を新しい 2 ml 容コレクションチューブに移し、ろ液を捨て、この DNA ろ過作業を 3 回繰り返した。ろ過終了後、QIAamp Spin Column に新しい 2 ml 容マイクロチューブをセットし、Buffer AW1 を 500 μ l 添加し、15000 rpm で 1 分間遠心分離した。さらに QIAamp Spin Column を新しい 2 ml 容マイクロチューブに移し、Buffer AW2 を 500 μ l 添加し、15000 rpm で 3 分間遠心分離した。さらに QIAamp Spin Column を新しい 2 ml 容マイクロチューブに移し、15000 rpm で 1 分間遠心分離した。QIAamp Spin Column を新しい 1.5 ml 容マイクロチューブに移し、Buffer AE 100 μ l を QIAamp Spin Column のメンブレン上に直接添加した。室温で 10~30 分間静置した後、15000 rpm で 1 分間遠心分離し、Buffer AE により QIAamp Spin Column に吸着した DNA を溶出させた。

3-2-3 ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 法

3-2-3-1 試薬および試薬の調製

抽出した DNA は以下の試薬を使用して PCR 法を行った。

1) オリゴヌクレオチドプライマー

SIGMA Genosys (<https://shop.genosys.jp/imarket/servlet/FrameServlet?firmNo=SGJUSER&userName=Genosys>) に委託し、プライマー P2/P8, 2550F/2718R および Lm-F/Lm-R を作製した (表 3-3)。使用時には、オートクレーブ滅菌超純水で 10 pmol/ μ l に調製したものを、

使用時まで -20°C 下で冷凍保存した。

2) PCR 反応用 buffer

PCR 反応には, Quick Taq® TM HS DyeMix (DTM-101, 東洋紡) を反応用 buffer として用いた。主な組成は, 酵素, グリセロール, 酢酸カリウム, デオキシアデノシン三リン酸 (dATP), デオキシチジン三リン酸 (dCTP), デオキシグアノシン三リン酸 (dGTP), デオキシチミジン三リン酸 (dTTP) で, 使用時まで -20°C 下で凍結保存した。

3) DNA サイズマーカー

100 bp DNALadder (DNA-035, 東洋紡) と付属の 6×Loading Dye buffer を混合し, 使用時まで -20°C 下で凍結保存した。

4) 0.5×TBE buffer

5×TBE (318-90041, 和光純薬工業) の組成は, 0.445 M トリス-ホウ酸 (Tris-borate), 0.01 M エチレンジアミン四酢酸 (EDTA) であった。超純水で 10 倍希釈し, 使用時まで常温下で保存した。

5) アガロースゲル溶液

300 ml 容三角フラスコに 0.5×TBE Buffer 30 ml を入れ, そこに 2%になるように, NuSieve® GTG® Agarose (50080, Lonza) 0.6 g を混合して加えた (ゲル作成用トレイ大 1 枚分量)。電子レンジ (500 W) を用いて約 40 秒間, アガロースを完全に溶解させ, 溶解後エチジウムブロマイド溶液 (EtBr Solution, 和光純薬工業) を 0.15 μl 添加した。

3-2-3-2 性染色体上の特異配列の増幅

分光光度計 (NanoVue, GE Healthcare) で DNA 濃度を測定し, 反応液中の DNA 濃度が 5~40 ng になるように鋳型 DNA 量を決定した。それぞれの PCR 反応液の組成については, 2×Quick Taq™ HS DyeMix (東洋紡) を 5 μl , 10 pmol/ μl の forward/reverse プライマーを各 0.2 μl , DNA 濃度の測定結果を基に鋳型 DNA 量を決定し, 滅菌水で全量 10 μl となるように調製した。サーマルサイクラー (MyCycler, バイオ・ラッド) を用いて反応させ, 電気泳動用試料とした。プライマーは P2/ P8, 2550F/2718R または Lm-F/Lm-R (表 3-3) を用

いた。PCR 条件は 95°C 3～5 分間のプレ熱変性の後、95°C 45 秒間、47°C 45 秒間、72°C 1 分間を 40 サイクル行い、72°C 5 分間でポスト伸長反応とした。PCR 反応には、サーマルサイクラー (MyCycler, バイオ・ラッド) を用いた。

3-2-3-3 アガロースゲル電気泳動法

PCR による増幅の確認は、2%アガロースゲル電気泳動法によりバンドの有無から行った。電子レンジを用いて溶解したアガロース溶液は、少し冷ました後、ゲル作成用のトレイに流し込み、サンプルコームを差し込んで、室温でゲルを固めた。サンプルコームをゆっくりと外した後、0.5×TBE buffer で満たした泳動槽 (Mupid-2plus, タカラバイオ) に移し、1 ウェルあたり 8 μ l の DNA 試料または DNA サイズマーカーを注入し、100 V で 25～40 分間電気泳動を行った。電気泳動終了後、UV トランスイルミネーター (Benchtop 20 V トランスイルミネーター, フナコシ) を用いて波長 302 nm 上で UV 遮蔽フードの上からバンドを確認し、デジタルカメラを用いて写真撮影を行った。

3-2-4 ライチョウ CHD 領域のシーケンスとライチョウ用プライマーの設計

3-2-4-1 プライマー2550F/2718R を用いた標的配列の増幅

飼育下の雌雄スバルバルライチョウの血液由来 DNA のシーケンスおよびライチョウ用プライマーの設計を行った。プライマー2550F/2718R を用いて 3-2-3 の条件で PCR を行い、1.5%アガロースゲルを用いた電気泳動により、増幅の確認を行った。

3-2-4-2 雌特異バンドの精製

雌特異バンドの精製には Wizard® SV Gel and PCR Clean-UP System (A9281, Promega) を用いた。電気泳動により分離した雌特異バンドをゲルから切り出し、1.5 ml チューブに入れた。0.1 g のゲルスライスに対し Membrane Binding Solution (Wizard® SV Gel and PCR Clean-UP System 内) を 100 μ l 添加した。65°Cでゲルが溶けるまでインキュベートし、その後、ボルテックスおよびフラッシュをした。SV Minicolumn (Wizard® SV Gel and PCR

Clean-UP System 内) に溶液を移し、1 分間室温で静置した。その後、13000 rpm で3 分間遠心分離を行った。ろ液を捨て、再度 SV Minicolumn をコレクションチューブにセットした。Membrane Washing Solution を 700 μ l 添加し、13000 rpm で3 分間遠心分離を行った。ろ液を捨て、再度 SV Minicolumn をコレクションチューブにセットし、Membrane Washing Solution を 500 μ l 添加し、13000 rpm で8 分間遠心分離を行った。遠心機 (centrifuge 5415R, eppendorf) の内蓋を開け、13000 rpm で5 分間遠心分離を行い、残っているエタノールを蒸発させた。新しい 1.5 ml チューブに SV Minicolumn を移し、滅菌水を 50 μ l 添加し、1 分間室温で静置した。その後、13000 rpm で3 分間遠心分離し、シーケンス用試料として用いるまで 4°C で保存した。

3-2-4-3 雌雄共通バンドの精製

雌雄共通バンドの精製には illustra ExoStar (US78220, GE Healthcare) を用いた。1.5 ml チューブにアルカリフォスファターゼ 0.5 μ l, エキソヌクレアーゼ 0.5 μ l, 滅菌水 19 μ l を入れて混和した。8 連結チューブに Exostar 2 μ l と雄の PCR 産物を 5 μ l 添加した。サーマルサイクラー (MyCycler, バイオ・ラッド) を用いて 37°C 1 時間, 80°C 15 分間反応させた。

3-2-4-4 プライマー2550F/2718R により増幅された配列のシーケンス

滅菌水 47.5 μ l にプライマー2550F/2718R (100 pm/ μ l) 2.5 μ l を添加し、濃度 5 pm/ μ l となるようにプライマーを希釈した。精製した DNA を 1~2 μ l, 希釈したプライマー1 μ l および滅菌水 7~8 μ l を全量 10 μ l となるように混和した。各試料につき、Forward プライマー用と Reverse プライマー用の 2 つを作成した。これらのシーケンス用試料を用いて岐阜大学生命科学総合研究支援センターにシーケンスを委託した。

3-2-5 ライチョウ用プライマーの設計

シーケンスによる塩基配列データを BioEdit7.2.5 (<http://www.mbio>.)

ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html) で編集した。プライマーとする配列の決定には Primer 3Plus (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>) を使用し、SIGMA Genosys にプライマーの合成を委託した。設計したプライマー名を Lm-F/Lm-R とした。

3-2-6 性別決定の方法と Z 染色体由来バンドの出現率

PCR 法による性別の判定は、各プライマー (2550F/2718R, Lm-F/Lm-R) での PCR を行った電気泳動像からバンドの出現位置と本数で決定した。各検体にそれぞれのプライマーで 2 回の PCR および電気泳動を行った。2 回の結果が、雄 (1 本) と雌 (2 本) になり、相反する性別結果となった場合、雌とすることとした。また、2 回のうち、目的とする増幅断片位置にバンドが一度でも確認されれば、その結果を検体の性とした。

各検体の総供試検体数の電気泳動像のバンドパターンから、雌雄に共通である Z 染色体由来バンドの有無を評価した。Z 染色体由来バンドのみが確認された場合、W 染色体由来バンドと Z 染色体由来バンドが確認された場合およびプライマーによる増幅目的外のサイズにバンドが見られても Z 染色体由来バンドが確認される場合は、Z 染色体由来バンドありとした。

一方で、W 染色体由来バンドまたは増幅目的外のサイズのバンドのみが見られた場合、およびバンドが見られなかった場合には、Z 染色体由来バンドなしとした。

3-3 結 果

3-3-1 スパールバルライチョウ性別既知個体血液由来 DNA を用いたプライマーの選択

性別既知のスパールバルライチョウ血液由来 DNA を用いて、プライマー 2550F/2718R または P2/P8 での性判別を行った (図 3-1)。プライマー P2/P8 を用いた場合、2% アガロースゲル電気泳動法でバンドの増幅が確認できた。雄血液由来 DNA 増幅産物では、Z 染色体由来の約 320 bp のバンドが確認でき、雌血液由来 DNA 増幅産物では、Z 染色体由来の約 320 bp および W 染色体由来の約 380 bp のバンドが確認できた。しかし、約 320 bp のバン

ドの増幅が十分でないために電気泳動像が不明瞭な場合や、電気泳動像でのバンドの確認が困難な場合が多く見られた。プライマー2550F/2718R を用いた場合、2%アガロースゲル電気泳動法でバンドの増幅が確認できた。雄血液由来 DNA 増幅産物では、Z 染色体由来の約 600 bp、雌血液由来 DNA 増幅産物では Z 染色体由来の約 600 bp および W 染色体由来の約 450 bp のバンドが確認できた。アガロースゲル電気泳動法により十分に分離することができたため、ニホンライチョウの性判別にはプライマー2550F/2718R を用いることとした。

3-3-2 ニホンライチョウ糞由来 DNA におけるプライマー2550F/2718R を用いた PCR 性判別

ニホンライチョウの糞試料 189 検体のうち、179 検体で DNA を抽出することができ、10 検体では糞の状態が悪いものや量が少ないものであったため DNA 抽出ができなかった。DNA 抽出を行った検体の内訳は、採取時の目視による個体の外観観察によって性別を判断できた糞が 132 検体（雄 68，雌 64），目視による個体の排泄は確認されず、生活痕として発見された糞が 47 検体であった。

電気泳動法では、Z 染色体由来の約 600 bp および W 染色体由来の約 450 bp のバンドが確認できた。約 600 bp と約 450 bp のバンドパターンから雌雄を判別した。性判別を行った電気泳動の結果の例を図 3-2 に示し、性判別結果を表 3-4 に示した。2 回の PCR および電気泳動像から 179 検体の内、99 検体で性判別ができた。外観情報が雄であった 68 検体では 32 検体が雄、6 検体が雌と判定され、30 検体では性判別ができなかった。これにより、外観情報と PCR 性判別結果の一致率は、47.06%であった（68 検体中 32 検体）。外観情報が雌であった 64 検体では 28 検体が雌、2 検体が雄と判定され、34 検体では性判別ができなかった。これにより、外観情報と PCR 性判別結果の一致率は、43.75%であった（64 検体中 28 検体）。採取時の外観からの性別既知 132 検体におけるプライマー2550F/2718R の性判別による検体情報と性判別結果の一致率は 45.45%であった（132 検体中 60 検体）。また、生活痕として発見された外観情報の不明な 47 検体については、24 検体が雄、7 検体

が雌と判定され、16 検体では性判別ができなかった。

3-3-3 ニホンライチョウ糞由来 DNA における新規作成プライマーLm-F/Lm-R を用いた PCR 性判別

スバルバルライチョウ性別既知個体血液由来 DNA の 2550F/2718R での増幅産物をシーケンスし、性判別プライマーLm-F/Lm-R を設計した (図 3-3)。

プライマーLm-F/Lm-R を用いて、DNA 抽出ができた 179 検体の性判別を行った。その結果、電気泳動像において、Z 染色体由来の約 395 bp および W 染色体由来の約 244 bp のバンドが確認できた。約 395 bp と約 244 bp のバンドパターンから雌雄を判別した。性判別を行った電気泳動の結果の例を図 3-4 に示し、性判別結果を表 3-5 に示した。2 回の PCR および電気泳動像から 179 検体の内、128 検体で性判別ができた。外観情報が雄であった 68 検体では 42 検体が雄、8 検体が雌と判定され、18 検体では性判別ができなかった。これにより、外観情報と PCR 性判別結果の一致率は 61.76%であった (68 検体中 42 検体)。外観情報が雌であった 64 検体では 34 検体が雌、5 検体が雄と判定され、25 検体では性判別ができなかった。これにより、外観情報と PCR 性判別結果の一致率は、53.13%であった (64 検体中 34 検体)。性別既知 132 検体におけるプライマーLm-F/Lm-R での性判別による検体情報と性判別結果の一致率は 57.58%であった (132 検体中 76 検体)。また、生活痕として発見された外観情報の不明な 47 検体については、31 検体が雄、8 検体が雌と判定され、8 検体では性判別ができなかった。

3-3-4 Z 染色体由来増幅産物の出現率とその月別出現割合

179 検体の各検体で 2 回の PCR および電気泳動を行い (総供試検体数 : 358)、電気泳動像から、雌雄に共通である Z 染色体由来バンドの出現率を算出した。

プライマー2550F/2718R を用いた増幅では、Z 染色体由来の約 600 bp のバンドが 174 (48.60%) で確認できた (表 3-6)。また、Z 染色体由来バンドが確認できなかったものの内訳については、本プライマーでの目的外のサイズにバンドが出ていた場合が 11 (3.07%)、

W 染色体由来の約 450 bp にのみバンドが見られた場合が 14 (3.91%), バンドが見られなかった場合が 143 (44.41%) であった。

プライマーLm-F/Lm-R を用いた増幅では, Z 染色体由来の約 395 bp のバンドが 243 (67.88%) で確認できた (表 3-6)。また, Z 染色体由来バンドが確認できなかったものの内訳については, 本プライマーでの目的外のサイズにバンドが出ていた場合が 10 (2.79%), W 染色体由来の約 244 bp にのみバンドが見られた場合が 20 (5.59%), バンドが見られなかった場合が 85 (23.74%) であった。

検体採取月別の Z 染色体由来バンドの出現率を図 3-5 に示した。プライマーLm-F/Lm-R を用いた場合はいずれの月においてもプライマー2550F/2718R よりも高い出現率が見られた。プライマー2550F/2718R では, 6 月, 7 月, 8 月および 10 月に出現率が 40%以下となった。また, いずれのプライマーを用いた場合においても, 夏季に出現率が低くなる傾向が見られた。

3-4 考 察

3-4-1 プライマーの選択

本研究では, まず, スパールバルライチョウ血液および糞由来 DNA をもとに, ライチョウ科の他の種で性判別の報告がなされているプライマーP2/P8 および 2550F/2718R の有用性を調べた。プライマーP2/P8 を用いた場合にはバンドの増幅が確認できたが, 2%アガロースゲル電気泳動法では雌血液由来 DNA においてバンドを十分に確認することができなかった。一方で, プライマー2550F/2718R を用いた場合にはバンドの増幅が確認でき, 2%アガロースゲル電気泳動法で雌血液由来 DNA においてバンドを十分に判別することができた。プライマーP2/P8 での増幅では, Z 染色体および W 染色体での増幅領域長の差が少ないためにアガロースゲル電気泳動法での判別が困難であり, より細かな違いの判別が可能なポリアクリルアミドゲルを利用した方法が必要と考えられた。プライマー2550F/2718R では増幅断片の差からアガロースゲルで十分に雌雄を判別できることからその有用性が他の鳥類における先行研究でも述べられている (Vucicevic et al., 2013)。プライ

マーP2/P8 の雌 DNA 増幅産物のバンド本数の確認が困難であった原因として、プライマー P2/P8 ではプライマーに相補配列が多く、これによりプライマー同士が二本鎖を形成して増幅がなされたことも考えられた。2%アガロースゲル電気泳動法で十分に性判別ができたことから、プライマー2550F/2718R が適していると判断し、ニホンライチョウ糞由来 DNA の性判別を行った。

3-4-2 プライマー2550F/2718R を用いた PCR による性判別

これまでに糞由来 DNA におけるプライマー2550F/2718R を用いた性判別率は、インコ類では 25% (Bosnjak et al., 2013), 野生キジオライチョウでは約 50%であったと報告されている (Baumgardt et al., 2013)。本研究の性別既知 132 検体におけるプライマー2550F/2718R での性判別による検体情報と性判別結果の一致率は 45.45%であり、また、DNA 抽出を行った全 179 検体における Z 染色体由来バンドの出現率は 48.60%であったため、先行研究の判別効率と同程度の結果が得られたものと考えられた。

3-4-3 新たなプライマーの設計による性判別率の改善

本研究では、より短い配列で性判別を行うことを目的に、既存の性判別プライマー 2550F/2718R での増幅産物をシークエンスし、新たなライチョウ用プライマーLm-F/Lm-R を設計した。プライマー2550F/2718R での増幅産物は、約 450 bp および約 600 bp であったのに対し、プライマーLm-F/Lm-R での増幅産物は、約 244 bp および約 395 bp での性判別が可能となった。外観情報のある検体の内、外観情報と性判別結果が一致したのはプライマー2550F/2718R では 45.45%であり、プライマーLm-F/Lm-R では 57.58%であったことから、12.13%の向上が認められた。また、Z 染色体由来バンドの出現率については、プライマー2550F/2718R では 48.60%であり、プライマーLm-F/Lm-R では 67.88%であったことから、19.28%の向上が認められた。

これまでに、オカメインコ (*Nymphicus hollandicus*) の糞 (Ameda, 2012) やペンギン類の血液 (Zhang et al., 2013) の DNA から性判別を行った報告では、プライマーP2/P8 での増

幅産物を基にプライマーの設計がなされ、種特異的なプライマーが性判別に用いられている。設計されたオカメインコのプライマーNhiF1/NhiR1 (CHD1Z : 196 bp, CHD1W : 225 bp) (Ameda, 2012), ペンギン類のプライマーPL/PR (CHD1Z : 276 bp, CHD1W : 294 bp) (Zhang et al., 2013) はプライマーP2/P8 よりも短い増幅配列での性判別が可能となった。本研究においては、スバルバルライチョウ血液由来 DNA のプライマー2550F/2718R での増幅配列をもとにプライマーを設計したことで、性判別率および Z 染色体由来バンドの出現率に向上が認められた。目的とする配列を短縮することで、分解や断片化が進んだ DNA に対しても増幅できる可能性が高まり、これらの改善につながったと考えられた。しかし、さらに分解や断片化が著しい DNA に対しては、プライマーLm-F/Lm-R でも増幅できなかったと考えられた。また、短い配列をターゲットとして性判別を行うことで、性判別効率の改善が見られるが、非特異的なバンドの増幅も増えることが知られている (Bantock et al., 2008)。そのため、本研究のプライマーLm-F/Lm-R においても非特異的なバンドが見られたのはこのことが原因であったと考えられた。

プライマーの設計に際しては、ニホンライチョウではなく、スバルバルライチョウの血液由来 DNA をもとに行った。スバルバルライチョウのプライマー設計に用いた 2550F/2718R による CHD 領域の増幅配列を BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> 2016 年 12 月 1 日現在) に登録されているクロライチョウ (Montell et al., 2001) およびキジオライチョウ (Sundström et al., 2003) の CHD 遺伝子のイントロンの配列と比較すると、Z 染色体由来増幅配列でそれぞれ 97%および 98% (Sequence ID : gb|AF364552.1|AF364552, gb|AF526006.1) (図 3-6), W 染色体由来増幅配列でいずれも 99% (Sequence ID : gb|AF364551.1|AF364551, gb|AF526005.1) (図 3-7) と高い相同性を示しており、この領域はライチョウ類において相同性が非常に高いことが予想された。そのためプライマー設計の際に、ニホンライチョウではなくスバルバルライチョウの血液を用いたことがプライマーの性判別率に影響している可能性は低いと考えられた。

3-4-4 一部の糞検体で性判別ができなかった原因

検体の中には、雌特異バンドのみが確認され、雌雄共通バンドが確認できないものがあった。W 染色体由来バンドのみが見られた原因として、W 染色体由来の短い増幅領域が優先して増幅され、Z 染色体由来のものの増幅がされなかった可能性があると考えられている (Fridolfsson and Ellegren, 1999)。また、Bantock ら (2008) は、博物館の鳥類剥製の羽を材料とした P2/P8 での性判別において、雌雄共通バンドの欠損は雌特異バンドの 2 倍 (CHD1Z : CHD1W = 14% : 7%) になったことを報告している。これらのことから、本研究においても雌特異領域の優先的な増幅がなされたことが考えられた。

また、採取時の外観情報と性判別結果が異なったものがあった。すなわち、外観情報が雌であった検体で、雌雄共通バンドのみが確認されたことから雄と判定したもの (2550F/2718R : 2 検体, Lm-F/Lm-R : 5 検体) や、外観情報が雄であった検体で、バンドが 2 本確認されたことから、雌と判定したもの (2550F/2718R : 6 検体, Lm-F/Lm-R : 8 検体) があった。糞検体の採取時に観察以前に排泄された別個体由来の糞を採取した可能性もあると採取者が述べており (中村浩志, 私信)、このことが外観情報と性判別結果が一致しなかったことに影響している可能性も考えられた。

ニホンライチョウの糞由来 DNA を Lm-F/Lm-R を用いて PCR を行うことで、性判別率や Z 染色体由来バンドの出現率に向上が認められたが、依然として 179 検体中 51 検体では性判別ができなかった。Mukesh ら (2011) は、セキショクヤケイで採取した採材の種類による DNA 量の比較を行っており、DNA 量の多い採材順に、血液 (770 $\mu\text{g/ml}$)、抜いた羽 (67 $\mu\text{g/ml}$)、換羽羽 (34 $\mu\text{g/ml}$)、卵殻 (30 $\mu\text{g/ml}$) および糞 (30 $\mu\text{g/ml}$) であったことを報告している。またライチョウ科の種においては、キジオライチョウで採材の種類による性判別効率の比較が行われ、血液、組織、卵殻膜、口腔内粘液、抜いた羽を用いた場合には十分な性判別が可能であったが、換羽羽ではこれらを用いた場合に比べ判別効率が劣ることが報告されている (Bush et al., 2005)。これらの報告から、非侵襲的な採材は、侵襲性を伴う採材に比べ得られる DNA 量が少ないことや分析材料としての質が低いといった問題があり、それに伴い、性判別効率が低くなる可能性が考えられた。

糞の DNA を扱う際の問題点として、糞が排泄されてから採取されるまでの間に、糞への別の生物や別個体の接触による DNA の混入の可能性や、PCR 阻害物質の存在、微生物による DNA の分解、PCR 時の餌由来の DNA とプライマーとの反応の影響があることが挙げられる (Idaghdour et al., 2003)。本研究に用いた糞検体において増幅がうまくいかなかった原因として、糞由来 DNA の分解が進んでいたことや、糞検体中に含まれる PCR 阻害物質が DNA 抽出時に同時に抽出されたために DNA 抽出阻害が起こったことが考えられた。

DNA 分解酵素による増幅率の低下への影響は、ミトコンドリア DNA に比べ核 DNA で影響が大きく、排泄直後から著しく増幅率が減少する (Murphy et al., 2007; Demay et al., 2013)。DNA 分解酵素の活性量と糞由来 DNA の質の低下は日数の経過に伴い強い相関関係があることが報告されている (Regnaut et al., 2006)。本研究の雌雄に共通して得られた Z 染色体由来バンドの出現率は、採取月別で差が見られた。Z 染色体由来バンドの出現率はプライマー 2550F/2718R を用いた場合には 6, 7, 8 月に、プライマー Lm-F/Lm-R を用いた場合には 7, 8 月に低く、性判別ができなかった検体は夏季に採取された糞検体に多い傾向にあった。すなわち、夏季の気温が DNA 分解酵素の働きに影響していた可能性が考えられた。一方で、雪上や気温が比較的低い時期に発見された糞検体は、排泄日が不明で、排泄から採取までの期間が明らかでない検体であっても、PCR 増幅が十分に行えたものもあった。低温に保つことは、DNA 分解酵素の働きを抑えることが知られている (井上, 2015)。このことから、環境気温が低温であったために、排泄からの時間が経過していても DNA の分解が緩やかであったため、PCR による増幅がなされたと考えられた。

DNA 抽出時の問題として、尿酸 (Segelbacher and Steinbrück, 2001) や餌として食べた物質 (Robertson et al., 1999) による DNA 抽出阻害の影響が考えられており、DNA 抽出時に多くの尿酸が混入することで抽出が阻害されることが示唆されている (Segelbacher and Steinbrück, 2001)。本研究の DNA 抽出においても、大量の尿酸混入により抽出が阻害されていた可能性があった。また、Robertson ら (1999) は、フクロウオウム (*Strigops habroptilus*) の糞から DNA を抽出する際に、糞中に未消化な植物が存在していたことから、植物由来の PCR 阻害物質と一緒に抽出されていた可能性があることを指摘している。特に、糞中の

植物由来の多糖類複合体 (Monteiro et al., 1997) や二次代謝物 (Khanjua et al., 1999) が PCR を阻害すると考えられている。ニホンライチョウは野生下において、季節により異なる植物や果実を採食しているため、フクロウオウムと同様に植物由来の PCR 阻害物質による影響から標的領域の増幅がなされなかった検体があったのではないかと考えられた。

これらのことから、同種内でも増幅産物が得られなかった原因として、DNA の分解が進んでいたため鋳型となる DNA の回収量が少なかったこと、糞試料によっては抽出時に尿酸が混入し、DNA 抽出を阻害していたため十分な増幅産物が得られなかったこと、餌由来の PCR 阻害物質が影響していることなどが予想されたが、実際の原因の特定には至らなかった。

3-5 まとめ

野生生物の生理情報を得るために糞を用いることは、個体の捕獲を必要としないため、非侵襲的であり有益な方法である。野生個体の内分泌状態を知る際に、あらかじめ糞試料が雌雄いずれの由来のものかを把握しておくことは、雌雄それぞれの内分泌動態を正しく解釈する上で重要である。鳥類の性判別には、性染色体上の CHD 遺伝子という高度に保存されている領域をもとに設計されたプライマーが広く用いられている。本研究においては、ライチョウ科で性判別法に関する報告がなされている既存の性判別プライマーの有用性を検討し、スバルバルライチョウ血液由来の DNA を基にライチョウ用性判別プライマーを作製し、PCR 法により野生ニホンライチョウの糞由来 DNA の性判別を行った。

野生ニホンライチョウの糞を DNA 資源とした既存のプライマー 2550F/2718R による性判別の効率 (検体採取個体の外観情報との一致率: 45.45%, Z 染色体由来バンドの出現率: 48.60%) であった。一般的に、短い配列をターゲットとすることで、DNA 分解が進んでいても増幅できる可能性がある。本研究においても、より短い配列をターゲットとするプライマー Lm-F/Lm-R を設計して研究に用いたことで検体採取個体の外観情報との一致率は 57.58%, 雌雄で共通に見られる Z 染色体由来バンドの出現率は 67.88% となり、改善がみられた。Z 染色体由来バンドの出現率を検体採取月で比較したところ、出現率は夏季に

低くなる傾向が見られた。そのため、夏季の外環境の温度が鋳型 DNA の分解に影響していることが考えられた。

表 3-1 野外のニホンライチョウ糞の採取数

	採取地	採取時の外観による性別情報			合計
		雄	雌	不明	
2013 年	乗鞍岳	29	42	19	95
	白根三山		5		
2014 年	乗鞍岳	25	17	18	86
	火打山	3		4	
	陰火打山			1	
	焼山			1	
	仙丈岳	9	2	2	
	白根三山	1	1		
	荒川岳		1		
	聖岳		1		
2016 年	御嶽山	3	1	4	8
合計		67	69	45	189

表 3-2 雌雄スバルバルライチョウの血液由来 DNA の採取個体

国内血統登録番号	個体名	性別
S208	No.4	雌
S210	No.6	雌
S211	No.7	雄
S243	No.12	雄

表 3-3 スバルバルライチョウおよびニホンライチョウの性判別に使用したプライマーの配列および PCR 増幅産物の断片長

プライマー	塩基配列 (5' to 3')	断片長 (bp)
P2	TCTGCATCGCTAAATCCTTT	約 320
P8	CTCCCAAGGATGAGRAAYTG	約 380
2550F	GTTACTGATTCGTCTACGAGA	約 450
2718R	ATTGAAATGATCCAGTGCTTG	約 600
Lm-F	YCGYCAGTTTCCYTTTCA	約 244
Lm-R	ATATTCYMATCASAGYAACCTGA	約 395



図 3-1 スパールバルライチョウ血液由来 DNA を用いたプライマーP2/P8 および 2550F/2718R による PCR 後の電気泳動像

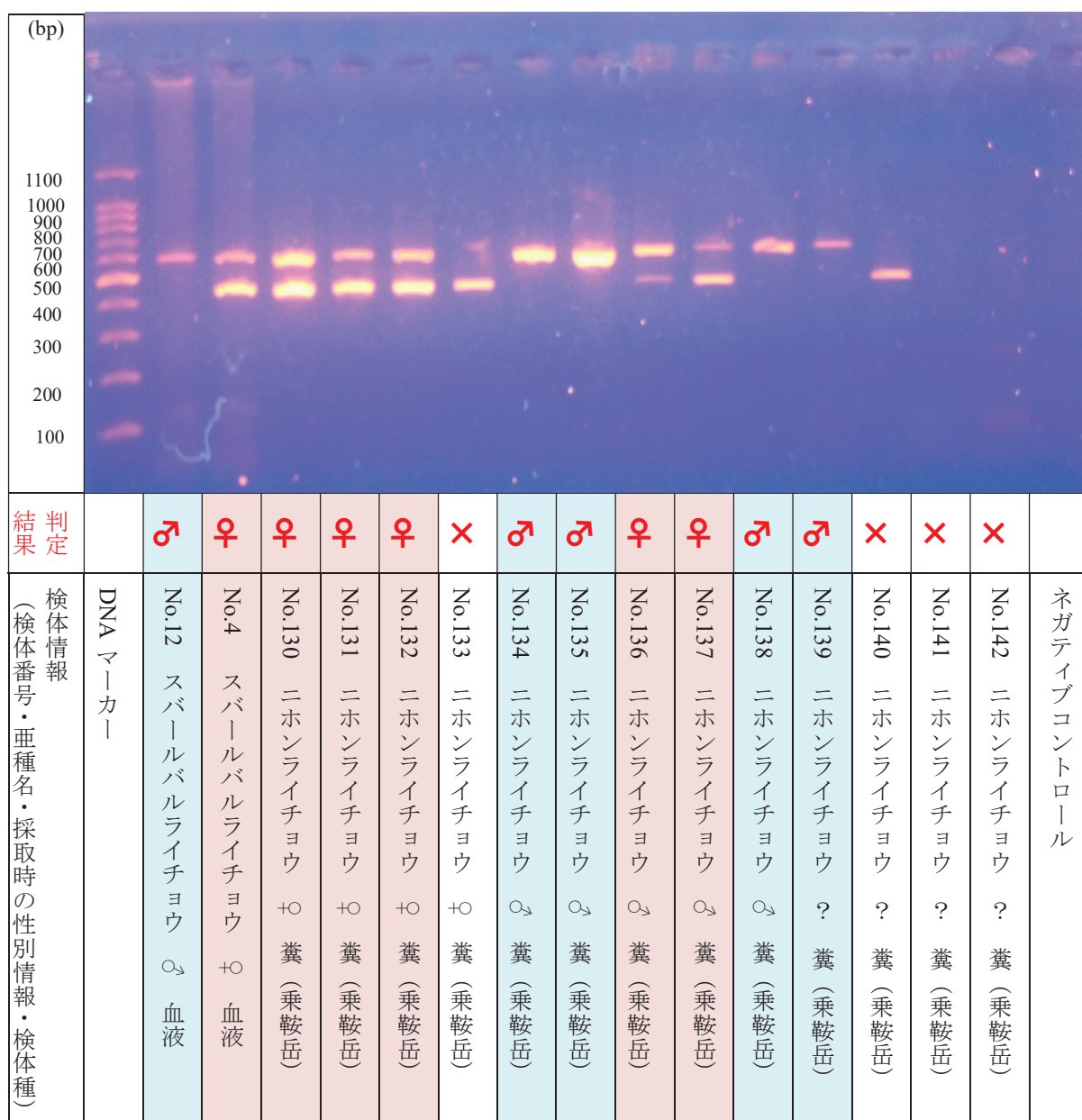


図 3-2 ニホンライチョウ糞由来 DNA を用いたプライマー2550F/2718R による PCR 増幅後の性別判別電気泳動像の例
×は性別を判定できなかったことを示す。

表 3-4 野外ニホンライチョウの糞を用いたプライマー2550F/2718R における性判別結果

外観情報	検体数	性判別結果		
		雄	雌	判別に至らず
雄	68	32 (47.06) *	6 (8.82)	30 (44.12)
雌	64	2 (3.13)	28 (43.75) *	34 (53.13)
不明	47	24 (51.06)	7 (14.89)	16 (34.04)
合計	179	58 (32.40)	41 (22.91)	80 (44.69)

括弧内は外観情報または合計検体数に対する割合（％）を示し，*は外観情報との一致率（％）を示す。

		1		50
CHD-Z	(1)	-----TCAGATGGTGAGGATGCTG	GACATCCTGGCAGAATA	TC
CHD-W	(1)	TTTCTCTC	TCAGATGGTGAGGATGCTA	GACATCCTAGCAGAATACT
		51		100
CHD-Z	(45)	ACCGCCAGTTTCCCTTTTCAGGTAAT	GATCTCAA	-----GTAACCAAGAGG
CHD-W	(51)	ATCGTCAGTTTCCCTTTTCAGGTAAG	GATTITGATGGTA	GTAAGCAAGAAG
		101		150
CHD-Z	(90)	TGTTTATCCTCGAACTTACGAAAA	TCATGTTT	TTTACTCCGAGGGGGGCAG
CHD-W	(101)	CTTTAATCTTTATCTTAATTAAAA	G--TGTCTTTCTGTAAA	-----AG
		151		200
CHD-Z	(140)	AGTAATGGAATACGTAGTT	CAGATGTT--ACGAAATCTC	CATTCTCTGTG
CHD-W	(144)	ACTTATAAAAGTTTAATTTATG	TATAGAAAAAACGGCAAT	TACT---
		201		250
CHD-Z	(188)	ATACTTAAAGCCAAGTGGACAT	GGTCCTGGG	CAGCCTTCGTAGCAGAC
CHD-W	(191)	ATAGTGTGAGGTGTTGCATT-AT	TCCTCCTCCTCCTTCATCCC	CATTTC
		251		300
CHD-Z	(238)	CTTGC-TTGAGCACAGACAAGAT	GACTTCTAAAGGTCTT	GCCAGTGTTT
CHD-W	(240)	CTCCCTTGCCCTCAATTCTTT	TGGCAACTAAGTATGCAT	-----T
		301		350
CHD-Z	(287)	CAGCCGTCTGTGACTATC-TGT	TCTTTACCATTTTGCTTAAG	AAAAGAAA
CHD-W	(281)	CAGGTTGCTCTGATTAGAATAT	AGTATGAGAGTTT-CTTTT	TAACTGTAA
		351		400
CHD-Z	(336)	GCAACTTTGAATTATAAAAGATTT	TGTGAAGGAGTATGTTAACAT	TCCTTC
CHD-W	(330)	TA---TTTGAATCTCTTTAGAGACT	-----	
		401		450
CHD-Z	(386)	TTTTTGTTCTTCGCATTACTGTTT	TATCAGTTGAAAAG	TCAGGTTACTG
CHD-W	(351)	-----		
		451		500
CHD-Z	(436)	TGATGGGAATAT	GGCTAAAGAATTACTTTT	TAGACTGTAGTTTCAATCTC
CHD-W	(351)	-----		
		501	511	
CHD-Z	(486)	CTCAGAGACTT		
CHD-W	(351)	-----		

図 3-3 スパールバルライチョウ CHD 遺伝子の増幅配列の一部とプライマー Lm-F/Lm-R の結合部位

網掛けの箇所は、CHD-Z 遺伝子および CHD-W 遺伝子で塩基配列が同一であることを示す。

□で囲われた箇所は、プライマー Lm-F (5'-YCGYCAGTTTCCYTTTCA-3') /Lm-R (5'-ATATTCYMATCASAGYAACCTGA-3') の結合部位を示す。

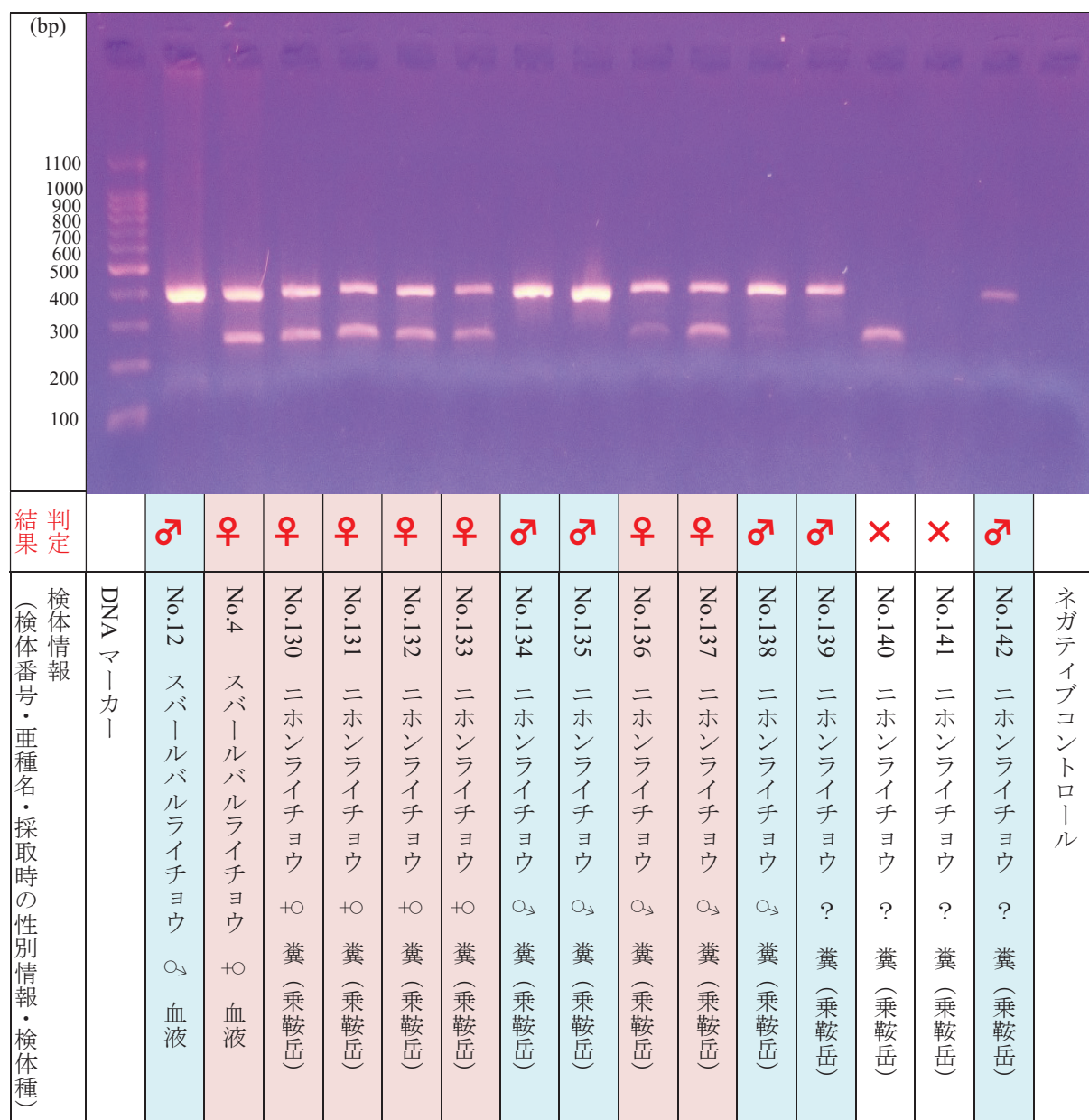


図 3-4 ニホンライチョウ糞由来 DNA を用いたプライマーLm-F/Lm-R による PCR 増幅後の性別電気泳動像の例
×は性別を判定できなかったことを示す。

表 3-5 野外ニホンライチョウの糞を用いたプライマーLm-F/Lm-R における性判別結果

外観情報	検体数	性判別結果		
		雄	雌	判別に至らず
雄	68	42 (61.76) *	8 (11.76)	18 (26.47)
雌	64	5 (7.81)	34 (53.13) *	25 (39.06)
不明	47	31 (65.96)	8 (17.02)	8 (17.02)
合計	179	78 (43.58)	50 (27.93)	51 (28.49)

括弧内は外観情報または合計検体数に対する割合 (%) を示し, *は外観情報との一致率 (%) を示す。

表 3-6 総供試検体数 358 における Z 染色体由来バンドの出現数と出現割合

プライマー	Z 染色体由来 バンドあり	Z 染色体由来 バンドなし	目的外のバンド のみ出現	内訳	
				W 染色体由来 バンドのみ出現	バンド増幅なし
2550F/2718R	174 [12] (48.60)	184 (51.40)	11 (3.07)	14 (3.91)	159 (44.41)
Lm-F/Lm-R	243 [13] (67.88)	115 (32.12)	10 (2.79)	20 (5.59)	85 (23.74)

[] 内は Z 染色体由来バンド以外に目的外のサイズのバンドが見られた場合を示す。() 内は総供試検体数に対する割合 (%) を示す。

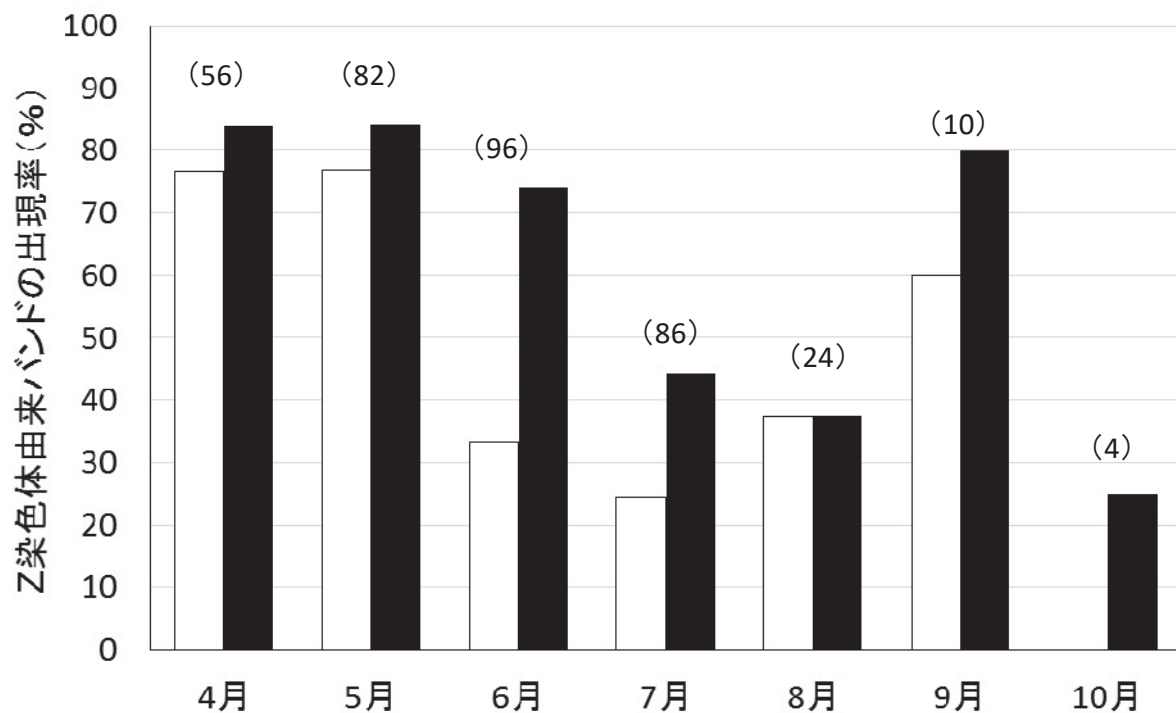


図 3-5 検体採取月別の Z 染色体由来バンドの出現率

□はプライマー2550F/2718R, ■は Lm-F/Lm-R における Z 染色体由来バンドの出現率を示す。
() 内の数値は、総供試検体数を示す。

クロライチョウ	1	GTAATGATCTCAAGTAACCAAGAGGTGTTTCATCCCGAACTTACGAAAAAT
キジオライチョウ	1	GTAATGATCTCAAGTAACCAAGAGGTGTTTCATCC□GAACTTACGAAAAAT
スバルバルライチョウ	1	GTAATGATCTCAAGTAACCAAGAGGTGTTTCATCCCGAACTTACGAAAAAT
	51	□ATGTTTTACTCCGAGGGGGGCAGAGTAATGGAATACGTAGTTCAGATG
	51	CATGTTTTTACTCCGAGGGGGGCAGAGTAATGGAATACGTAG□ATCAG□TG
	51	CATGTTTTTACTCCGAGGGGGGCAGAGTAATGGAATACGTAGTTCAGATG
	101	TTACGAAATCTCC□TTCTCTGTGAT□CTTAAAAGCCAAGTGGACATGGTC
	101	TTACGAAATCTCCA TTCTCTGTGATACTTAAAAG□CAAGTGGACATGGTC
	101	TTACGAAATCTCCA TTCTCTGTGATACTTAAAAGCCAAGTGGACATGGTC
	151	CTGGGCAGCCTTCTGTAGCAGACCTTGCTTGAGCACAGACAAGATGACT□
	151	CTGGGCAGCCTT□GTAGCAGACCTTGCTTGAGCACAGACAAGATGACTT
	151	CTGGGCAGCCTTCTGTAGCAGACCTTGCTTGAGCACAGACAAGATGACTT
	201	CTAAAGGTCCTTGCCAGTGTTTCAGCCGTCTGTGACTATCTGTTCTTTAC
	201	CTAAAGGTCCTTGCCAGTGTTTCAGCCGTCTGTGACTATCTGTTCTTTAC
	201	CTAAAGGTCCTTGCCAGTGTTTCAGCCGTCTGTGACTATCTGTTCTTTAC
	251	CATTTTGCTTAAGAAAAGAAAGCAACTTTGAATT□AAAAGATTTTGTGAA
	251	CATTTTGCTTAAGAAAAGAAAGCAACTTTGAATT□AAAAGATTTTGTGAA
	251	CATTTTGCTTAAGAAAAGAAAGCAACTTTGAATT□AAAAGATTTTGTGAA
	301	GGAGATAT□TTAACATTCCTTCTTTTTGTTCCCTC□CATTACT□TTTTATC
	301	GGAGTATGTAAACATTCCTTCTTTTT□TTCCCTC□CATTACTGTTTTATC
	301	GGAGTATGTAAACATTCCTTCTTTTTGTTCCCTCGCATTACTGTTTTATC
	351	AGTTGAAAAGTCAGGTTACTGTGATGGGAATATGGCTAAAGAATTACTTT
	351	AGTTGAAAAGTCAGGTTACTGTGATGGGAATATGGCTAAAGAATTACTTT
	351	AGTTGAAAAGTCAGGTTACTGTGATGGGAATATGGCTAAAGAATTACTTT
	401	□AGACTGTAGTTTTCAATCTC□TCAG
	401	TAGACTGTAGTTTTCAATCTC□TCA
	401	TAGACTGTAGTTTTCAATCTCCTCAG

図 3-6 クロライチョウ (426 bp; [gb|AF364552.1|AF364552](#)), キジオライチョウ (425 bp; [gb|AF526006.1](#)) およびスバルバルライチョウ (426 bp) の CHD-Z 遺伝子イントロン A の配列比較

スバルバルライチョウの配列との一致率は、クロライチョウで 97%, キジオライチョウで 98% であった。□はスバルバルライチョウと配列が異なる箇所を示す。

クロライチョウ	1	GTAAGGATTTTGATGGTAGTAGCGAAGAAGCTTTAATCTTTATCTTAATT
キジオライチョウ	1	GTAAGGATTTTGATGGTAGTAGCGAAGAAGCTTTAATCTTTATCTTAATT
スバルバルライチョウ	1	GTAAGGATTTTGATGGTAGTAGCGAAGAAGCTTTAATCTTTATCTTAATT
	51	AAAAGTGCCTTTCTGTAAAAAGACTTA□AAAAGTTAATTTTATGTATA
	51	AAAAGTGCCTTTCTGTAAAAAGACTTATA□AAGTTAATTTTATGTATA
	51	AAAAGTGCCTTTCTGTAAAAAGACTTATAAAAAGTTAATTTTATGTATA
	101	GAAAAA□GAC□GGCAATTACTATAGTGTGAGGTGTTGCATTATTCTCCTCC
	101	GAAAAA□GAC□GGCAATTACTATAGTGTGAGGTGTTGCATTATTCTCCTCC
	101	GAAAAAAACCGCAATTACTATAGTGTGAGGTGTTGCATTATTCTCCTCC
	151	TCCTCCTTCATCCCCATTCTCCCCTTGCCCTCAATTCTTTTGGCAACTA
	151	TCCTCCTTCATCCCCATTCTCCCCTTGCCCTCAATTCTTTTGGCAACTA
	151	TCCTCCTTCATCCCCATTCTCCCCTTGCCCTCAATTCTTTTGGCAACTA
	201	AGTATGCATTACAGGTTGCTCTGATTAGAATATAGTATGAGAGTTTCTTTT
	201	AGTATGCATTACAGGTTGCTCTGATTAGAATATAGTATGAGAGTTTCTTTT
	201	AGTATGCATTACAGGTTGCTCTGATTAGAATATAGTATGAGAGTTTCTTTT
	251	TAACTGTAATATTTGATCT□TTTAG
	251	TAACTGTAATATTTGATCTCTTTA
	251	TAACTGTAATATTTGATCTCTTTAG

図 3-7 クロライチョウ (275 bp; [gb|AF364551.1|AF364551](#)), キジオライチョウ (274 bp; [gb|AF526005.1|](#)) およびスバルバルライチョウ (275 bp) の CHD-W 遺伝子イントロン A の配列比較

スバルバルライチョウの配列との一致率は、クロライチョウで 99%, キジオライチョウで 99%であった。□はスバルバルライチョウと配列が異なる箇所を示す。

第4章 野生ニホンライチョウの内分泌動態の調査

4-1 緒言

4-1-1 ニホンライチョウの現状

ニホンライチョウは、キジ目ライチョウ科ライチョウ *Lagopus muta* 31 亜種の中の 1 亜種であり (del Hoyo and Collar, 2014), 世界最南端に生息する亜種であるため, 地球温暖化の影響を最も強く受けることが懸念されている (中村, 2007a)。その個体数は現在 1700 羽以下にまで減少したと予測されており (中村, 2014), 環境省のレッドリストでは, 近い将来における野生での絶滅の危険性が高いとされる絶滅危惧 I B 類に分類されている (環境省, 2012)。この現状を受け, 生息域内外での保全の取り組みが進められている。生息域内では, 長期にわたる個体数のモニタリングや生息環境の調査が行われ, 本亜種の生態特性や環境の変化とそれに伴う本種への影響などが明らかにされている。生息域外では, 動物園において, これまでの飼育下でスバルバルライチョウを用いて蓄積した技術を応用したニホンライチョウの飼育が 2015 年の夏より始められている (渡部・高橋, 2015)。環境省のライチョウ保護増殖事業実施計画においては, 本亜種の飼育技術の確立の後, 遺伝的多様性に考慮した飼育下個体群の維持と野生復帰を目指す段階的な目標が掲げられている (環境省長野自然環境事務所, 2014)。現在では, 飼育下スバルバルライチョウと野生ニホンライチョウの盲腸内常在細菌叢の調査と比較が行われ (Ushida et al., 2016), 将来的な野生復帰に向けた課題の解明の研究も開始されている。

4-1-2 ニホンライチョウの繁殖行動

これまでに生態学的研究によりニホンライチョウの繁殖を始めとする生活史が明らかにされてきた。繁殖地には雪解けが始まる 3 月頃に雄が集まり始め, 雄同士の争いが起こり, 4 月上旬にはなわばりが形成される (中村, 2007a)。5 月には一夫一妻のつがい形成され, 雌は 6 月に産卵および抱卵を行い, 雄は雌の護衛を行う (中村, 2007a)。抱卵約 21 日後に卵が孵化し, 雌のみで行われる育雛は 10 月頃まで続く (中村, 2007a)。10 月頃には, 雌雄混合群が形成され, 11 月下旬に繁殖地から越冬場所へ移動する (中村, 2007a)。

これらの行動の季節変化に伴う、生殖腺の活動様式については不明である。

4-1-3 鳥類の糞中ホルモン測定

ニホンライチョウの生息域外保全において、飼育下でのニホンライチョウの繁殖技術の確立および飼育下個体の群維持が直近の課題である。野生個体の生殖腺活動の様式を把握することは、飼育下繁殖を目指す上での参考情報となり得る。生殖腺活動の状況を間接的に知るために、ホルモン測定による内分泌動態のモニタリングは有効な手段となる。そのモニタリング材料として、血液はデータの信頼性が高いが、血液を得るためには保定などのハンドリングが必要であり、個体にストレスを与えてしまうことになる。また、保定などの外部刺激により血液中の各種ホルモン濃度の上昇あるいは下降をもたらす恐れがある。血液の代替となる材料として排泄糞が挙げられ、これまでに鳥類においては、飼育下のオオサイチョウ (*Buceros bicornis*) (Crofoot et al., 2003)、ブラウンキーウィ (*Apteryx mantelli*) (Jensen and Durrant, 2006) やアフリカオオノガン (*Ardeotis kori*) (Penfold et al., 2013) などで糞中の性ステロイドホルモン含量のモニタリングから個体の生殖能の評価がなされている。また、糞は野生個体の内分泌動態モニタリングにも応用することができる (Lasly and Kirkpatrick, 1991)。フクロウ類においては、糞中のホルモン含量のモニタリング法を飼育下のアメリカフクロウ (*Strix varia*) とアメリカワシミミズク (*Bubo virginianus*) を用いて確立した後、希少種であるニシアメリカフクロウ (*S. occidentalis caurina*) の野外の個体への応用が行われている (Wasser and Hunt, 2005)。このように希少鳥類の野外の個体のホルモンモニタリングを行うにあたり、飼育下の別亜種または近縁種でモニタリング法を確立し、野生個体への応用することは有用な方法であると考ええる。

4-1-4 本研究の目的

本研究では、これまでに飼育下スバルバルライチョウで確立した糞中のステロイドホルモン含量モニタリング法を用い、野外のニホンライチョウにおける生殖情報を把握することを目的とした。ニホンライチョウの繁殖生理を明らかにすることは、その繁殖生態を

理解する上で重要である。また、生息域外保全を実施する上で、野外の生息地における内分泌学的知見は、気温や日照または照明時間などの繁殖に影響する環境要因と生殖腺活動の関係を理解するための一助けとすることができる。

4-2 材料および方法

4-2-1 ニホンライチョウにおける糞の採取と記録

2013 年，2014 年および 2016 年の積雪で入山や糞の採取が困難な 10～4 月上旬を除く各月に糞の採取を行った。2013 年および 2014 年に主に乗鞍岳を中心に，その他，火打山，陰火打，焼山，仙丈岳，白根三山，荒川岳および聖岳，2016 年 6 月に御嶽山において野生ニホンライチョウの糞の採取を行った（第 3 章—表 3-1）。生活痕として発見された糞，または個体による排泄を目視確認した糞を採取し，チャック付きポリ袋に入れ，下山後，冷凍庫に保存した。排泄日または糞の状態から推定排泄日を記録した。個体による排泄を確認した糞については，排泄個体の性別情報と足環の色，つがい形成状況を記録した。なお，2013 年および 2014 年のこれらの糞の採取と記録は中村浩志氏，小林篤氏によるフィールド調査時に，2016 年は野鳥の会会員らを中心とした御嶽ライチョウ生息状況調査時に行われた。

4-2-2 PCR 法による性判別および性別の決定

QIAamp DNA Stool Mini Kit（QIAGEN）を用いて，糞から DNA を抽出し，PCR 法により性判別を行った。性判別には，スバルバルライチョウの血液由来 DNA を基に設計した Lm-F/Lm-R を用いた（第 3 章—表 3-2）。増幅バンドが約 395 bp の 1 本の場合を雄，約 395 bp と約 244 bp の 2 本の場合を雌と判定した。DNA 抽出を行った 179 検体では，検体により 2～9 回の PCR および電気泳動を行った。各試行において，バンドが 1 本の場合と 2 本の場合の結果が得られた場合は，2 本の場合の結果を優先して雌とすることとした。また，目的とする増幅断片位置にバンドが一度でも確認されれば，その結果から性別を決定した。糞量が少なく，DNA 抽出ができなかった検体および PCR 性判別により性判別結果

を決定できなかった検体については、採取時の外観情報がある場合に外観情報により雌雄を分類した。このうち外観情報も無い場合は、ホルモン測定用の検体からは除外した。

4-2-3 糞中の性ステロイドホルモン代謝物の抽出と測定

糞中のステロイドホルモンの抽出はメタノール抽出法により行った(第2章)。P₄、E₂ およびT 含量の測定には、分取したメタノール抽出液を EIA buffer にて 10 倍希釈したものを測定用試料とした。AD および B 含量の測定には、分取したメタノール抽出液を EIA buffer で 5 倍希釈したものを測定試料とした。ホルモン値は、排泄日または予想排泄月を基に月別平均値で示した。

4-2-4 統計分析

糞中のステロイドホルモン含量の測定値は、平均値±標準誤差(SE)で示した。スチューデントの *t* 検定で各月間の有意差の検定を行った。

4-3 結 果

4-3-1 PCR 性判別による糞検体の性別の決定

採取した 189 体のうち、DNA 抽出に用いることができたのは 179 検体であり、10 検体では糞の状態や量のため DNA 抽出ができなかった。179 検体の内訳は、採取時の目視による外観情報のある 132 検体と、生活痕として発見された 47 検体であった。外観情報のある 132 検体の情報は、68 検体が雄、64 検体が雌であった。各検体において 2~9 回の PCR および電気泳動を行い、プライマー Lm-F/Lm-R による野生ニホンライチョウの糞検体の性判別結果を表 4-1 に示した。PCR および電気泳動の結果から、外観情報が雄であった 68 検体では 50 検体を雄、10 検体を雌と判定でき、8 検体では PCR による性判別ができなかった。これにより、雄という外観情報と PCR 性判別結果の一致率は、73.53%であった。外観情報が雌であった 64 検体では 44 検体を雌、8 検体を雄と判定でき、12 検体では PCR 性判別による判別ができなかった。これにより、雌という外観情報と PCR 性判別結果の一致率は、

68.75%であった。また、生活痕として発見された外観情報の不明な 47 検体については、35 検体を雄、9 検体を雌と判定でき、3 検体では PCR による性判別ができなかった。これにより全 179 検体は、93 検体を雄、63 検体を雌と判定することができ、23 検体は性別の決定に至らなかった（図 4-1）。

4-3-2 糞中ステロイドホルモン代謝物含量の雌雄差

雌雄ニホンライチョウの月別の糞中ステロイドホルモン代謝物含量を図 4-2 に示した。糞中 E₂ 含量は、4 月および 5 月に雌で雄より有意に高い値を示した ($p < 0.05$)（図 4-2a）。糞中 P₄ は、8 月に雄で雌より有意に高い値を示した ($p < 0.05$)（図 4-2b）。糞中 T および AD 含量は 7 月および 8 月に雄で雌より有意に高い値を示した ($p < 0.05$)（図 4-2c,d）。糞中 B 含量においては、各月において雌雄で有意な差は見られなかった（図 4-2e）。

4-3-3 雌ニホンライチョウにおける糞中ステロイドホルモン代謝物含量の月間比較

雌において糞中 E₂ 含量は 5 月に他の月よりも有意に高かった ($p < 0.05$)（図 4-3a）。糞中 P₄ 含量は 5 月に高い傾向があり、その後は減少し、8 月に有意に低い値を示した ($p < 0.05$)（図 4-3b）。糞中 T 含量は 6 月に向けて増加が見られ、その後は減少し、8 月には低値となった（図 4-3c）。糞中 AD 含量は 4 月、5 月、6 月に高値を示し、その後は減少し、8 月に有意に低い値 ($p < 0.05$) を示した（図 4-3d）。糞中 B 含量は 4 月、5 月、6 月に高い値を示し、その後は減少し、8 月に低値を示した（図 4-3e）。雌においては、糞中 E₂、P₄ および B 含量は 5 月、糞中 T および AD 含量は 6 月にそれぞれ最大となり、その後に減少する傾向が見られた。9 月には、検体数は 1 つであったが、いずれの糞中ホルモン含量においても高値を示した。

4-3-4 雄ニホンライチョウにおける糞中ステロイドホルモン代謝物含量の月間比較

雄において糞中 E₂ 含量は 4 月より増加傾向が見られ、8 月に高値を示し、その後は減少した（図 4-4a）。糞中 P₄ 含量は 5 月に高値を示し、その後は減少傾向となった（図 4-4b）。

糞中 T 含量は 4 月より増加傾向が見られ、5 月、6 月、7 月および 8 月に高値を示した（図 4-4c）。糞中 AD 含量は 4 月より増加傾向が見られ、6 月に有意に高い値を示した（ $p < 0.05$ ）（図 4-4d）。糞中 B 含量は各月で有意差は見られなかったが、5 月に高い傾向が見られ、6 月以降は一定の値で推移した（図 4-4e）。雄においては、糞中 E_2 含量は 8 月、糞中 P_4 および B 含量は 5 月、糞中 T および AD 含量は 6 月にそれぞれ最大値を示した。

4-3-5 つがい形成の有無による糞中ステロイドホルモン値の比較

採取された一部の糞において、採取時の個体の外観および足環、その個体観察から排泄雄個体のつがい形成状況が明らかなものがあった。つがい雄の検体は、5 月に 5 検体、6 月に 12 検体採取された。独身のあぶれ雄の検体は 5 月に 1 検体、6 月に 3 検体採取された。これらの糞中の T、AD および B 含量を比較した（図 4-5a～c）。6 月の糞中 AD 含量において、つがい雄であぶれ雄より高い値を示した検体が多く見られたが、つがい形成の有無において、各ホルモン含量に有意な差は見られなかった。

4-4 考 察

性判別を行った 179 検体のうち、63 検体を雌、93 検体を雄と判定できた。2006～2012 年の標識調査では、野生下における雌雄の割合は平均すると雌 46%、雄 54%であり、雄が多い傾向にあった（中村，2013f）。本研究で性別を決定した検体数は、雄のものが雌のものより多くなり、野生個体数を反映している可能性が考えられた。

夏季に採取した糞検体において、高い糞中のステロイドホルモン含量が見られた。野生個体の糞を材料とする場合に、排泄からの経過時間は糞中のホルモン含量を変化させる可能性がある。この原因は、微生物活動による代謝が行われるためである。Thiel ら（2005）は、ヨーロッパオオライチョウの糞中 B 含量の継時的な比較を行い、21℃下に糞検体を置いた場合に、7 日目では凍結糞とホルモン含量に差は見られないが、21 日目では有意に高いホルモン含量を示すことを報告している。また、8℃下では凍結した糞検体と同様のホルモン値を示していた（Thiel et al., 2005）。乗鞍岳に位置するコロナ観測所（2,876 m 地点）

における 1971～2000 年の月別平均気温の報告では、最も気温が低くなるのは 1 月下旬～2 月上旬の約 -16°C である一方で、最も気温が高くなるのは 7 月下旬～8 月中旬であるが、その平均最高気温は 15°C に満たない (斉藤・入江, 2000)。本研究における 7 月および 8 月の糞中 B 含量やその他のホルモン含量において、他の月と比べて、また雌雄で比べても必ずしも一定の傾向を示していないことから、気温上昇に伴う微生物活動によるホルモン含量変化への影響は大きくなかったと考えられた。

E_2 は卵黄蓄積に、 P_4 は排卵に働くホルモンであることが家禽でよく知られており、卵胞の急成長に伴い E_2 が増加し、産卵前に P_4 のピークがあったことがブラウンキーウィで報告されている (Jensen and Durrant, 2006)。T は雄において、なわばり維持、ペア形成、雄同士の競争に重要であり、シロトキ (*Eudocimus albus*) での研究では、繁殖前の求愛期において、血中 T 濃度が高くなり、精巣サイズと正の相関があることが報告されている (Heath et al., 2003)。本研究の糞中 E_2 および P_4 含量は雌で 5 月に最大となり、その後減少した。また、いずれのホルモンにおいても、5 月に高くなる傾向が見られた。一方、雄では糞中 T 含量が 6 月を頂値として 5 月～8 月および糞中 AD 含量が 6 月に特に高い傾向が見られた。これらのホルモンの動態は野生のニホンライチョウの生活史の知見と一致していると考えられた。すなわち、雄は 3 月より繁殖地に現れ、なわばりを形成し、雌は 4 月下旬に繁殖地に現われ、つがい形成がなされる (中村, 2013f)。そのため、4 月から 5 月に向けての雄での糞中アンドロジェン含量の増加は、交尾に向けた精子形成に伴う精巣活動の活性化、雌での糞中 E_2 および P_4 含量の増加は産卵に向けた卵巣活動を範囲営していると考えられる。野生下では、ニホンライチョウの産卵は 6 月に見られ、抱卵は雌のみが行い、この間雄は見張り行動を行う (中村, 2007a)。本研究では 6 月に雌の糞中 E_2 および P_4 含量が減少し始めるのに対し、雄の糞中 T および AD 含量は高値で維持されていた。これは、雌では産卵終了および抱卵開始に向けて E_2 および P_4 が減少したが、雄ではこの間になわばりの見張りを行っているため、なわばり防衛に伴い T 濃度が維持されていたものと推察された。野生個体の解剖による生殖器官の測定においても、ニホンライチョウの雄では雌より交尾期終了後の生殖腺退行が遅いことが示唆されている (石沢, 1961)。7 月には孵化が起

こり、雌雄別行動となり、雌のみが育雛を行い、雄は単独行動となる（中村，2007a）。そのため、7月には糞中アンドロジェン含量の減少が見られるものと考えられた。

糞中 B 含量は、雌雄ともに 5 月に高くなる傾向が見られ、特に雄では著しい高値が見られた。これは、5 月のなわばりに他の雄等が侵入した際の防衛行動に伴うストレス状態を反映している可能性があると考えられた。なわばり行動を反映していると考えられる高い血中 B 濃度は、モリツグミ (*Hylocichla mustelina*) (Done et al., 2011) やウミネコ (佐藤ら，2008) において報告されている。さらに、ニホンライチョウの成体における死亡原因は主に捕食であり、捕食による死亡率が最も高くなるのは 5 月である（中村，2013d）。そのため、5 月における高い糞中 B 含量は捕食者に対するストレス状況に関与していることも推察される。ジュズカケバト (*Streptopelia risoria*) では、B 濃度と採食状況との関連が示唆されており、絶食状態が B 濃度の増加を招くことが知られている (Lea et al., 1992)。抱卵期の雌は一日のほとんどを巣内で過ごし、1 日 2~3 回、巣を離れて急いで採食し、30 分後には巣に戻り抱卵を再開する（中村，2007b）。6 月における糞中 B 含量は 5 月の値ほど高値ではないが、抱卵期の雌の採食パターンは、糞中 B 含量へ影響を与えた可能性も考えられた。

繁殖の成功はホルモン濃度が関与していると考えられた。つがい形成雄とつがいを形成できなかった独身のあぶれ雄では、6 月の糞中 AD 含量において、つがい雄であぶれ雄より高値になる傾向が見られたが、有意差は認められなかった。あぶれ雄であることが明らかな糞検体は 4 個のみであったため、つがいの有無とホルモン値との関連を明らかにするためには、検体数を増やした更なるモニタリングが必要である。

雄においては、繁殖期が終了した 8 月末や 9 月の糞で糞中の性ステロイドホルモン含量が高値を示すものがあつた。酒井ら (2005) は、血中の性ホルモン濃度モニタリングにおいて、繁殖期後の秋にニホンキジ (*Phasianus colchicus*) では LH と T 濃度、オシドリ (*Aix galericulata*) の T 濃度の上昇を捉えており、これは次の繁殖期に向けた内分泌現象であると報告している。カラフトライチョウでは 9 月にも繁殖期後のなわばりが見られる (Gruys, 1993)。また、ニホンライチョウの冬羽姿において雌雄の区別が明らかな外観となることに

について、中村（2013e）は、雄同士の強さを示す争いがすでに始まっており、冬の段階で雄であることを明白にしておくことが、次のなわばり形成に有利に働くのではないかと述べている。本研究における雄ニホンライチョウの8月の高い糞中性ステロイドホルモン含量も次の繁殖季節に向けたものであることが予想される。一方で、Hirschenhauser ら（1999）の研究によると、つがいを獲得できなかった雄ハイイログアン（*Anser anser*）は一年を通して、性行動が見られる時期と同様に高い糞中 AD 含量を示すと言われている。本研究の交尾期終了後の糞検体は、つがい雄またはつがい形成の情報が明らかでない雄のものであり、9月および10月の雄の検体が少なかったため、今後さらなる調査が必要である。

本研究の糞検体は主に乗鞍岳で採取されたものであった。乗鞍岳の個体群は安定した個体数を維持しており、他の山岳の同種個体群に比べ、絶滅のリスクが比較的低いと報告されている（Suzuki et al., 2013）。また、ニホンライチョウの繁殖の開始時期は山岳によりずれがあることが示唆されている。今後は、各山岳の個体群においてそれぞれ同様の調査を行い比較することにより、山岳や緯度の違いによる生殖状況を明らかにすることが期待できる。各山岳個体群の内分泌動態を捉え、気温や植生環境との関連を評価することは、野生ニホンライチョウの生殖腺活動の開始をもたらす環境条件を解明することに役立つものとする。一方、飼育下におけるニホンライチョウの内分泌動態のモニタリングを行い、本研究結果の野外のデータと比較することで、現状の飼育環境条件を評価したり、気温や照明時間または日照などの飼育環境の適正条件を明らかにしたりすることにつながり、生息域外保全の推進に寄与できるものと思われる。

4-5 まとめ

ニホンライチョウの保全に向け、生息域内および域外での保全活動がなされている。2015年からは、飼育個体群の確立を目指した飼育下でのニホンライチョウの飼育が開始されている。ニホンライチョウの生息域外保全において繁殖分野では、飼育下での飼育下繁殖技術の確立および飼育下個体群維持が直近の課題である。野生個体における生殖腺活動状況を明らかにすることは、個体の行動内容の解釈や裏付けに必要な情報となる。また、

これらの情報は、今後進められる飼育下個体の飼育環境と生殖腺活動を評価する指標となり、繁殖の促進につながる情報となる。本研究では、第 3 章で設計したプライマー Lm-F/Lm-R を用いた PCR 法による性判別で糞検体を雌雄に分類し、飼育下スパールバルライチョウで確立した糞中ホルモン測定法を適用し、野外のニホンライチョウにおける生殖腺活動を明らかにした。糞中のステロイドホルモン含量は、雌雄共に 4 月より増加が見られ、5 月、6 月に高値となる傾向が見られた。これは、繁殖期が始まり、交尾および産卵が見られる時期と一致していた。また、雄では T 含量が、なわばり行動や雌の護衛行動に伴っている可能性が示唆された。

表 4-1 プライマーLm-F/Lm-R による野生ニホンライチョウの糞検体の PCR 性判別状況

外観情報	検体数	PCR 性判別結果		
		雄	雌	判別に至らず
雄	68	50 (73.53) * ¹	10 (14.71) * ⁴	8 (11.76) * ⁷
雌	64	8 (12.50) * ²	44 (68.75) * ⁵	12 (18.75) * ⁸
不明	47	35 (74.47) * ³	9 (19.15) * ⁶	3 (6.38) * ⁹
合計	179	89 (51.96)	59 (35.20)	23 (12.85)

括弧内は各検体数に対して PCR により結果が得られた検体数の割合 (%) を示す。

*1～9 は図 4-1 内の数字と対応する。

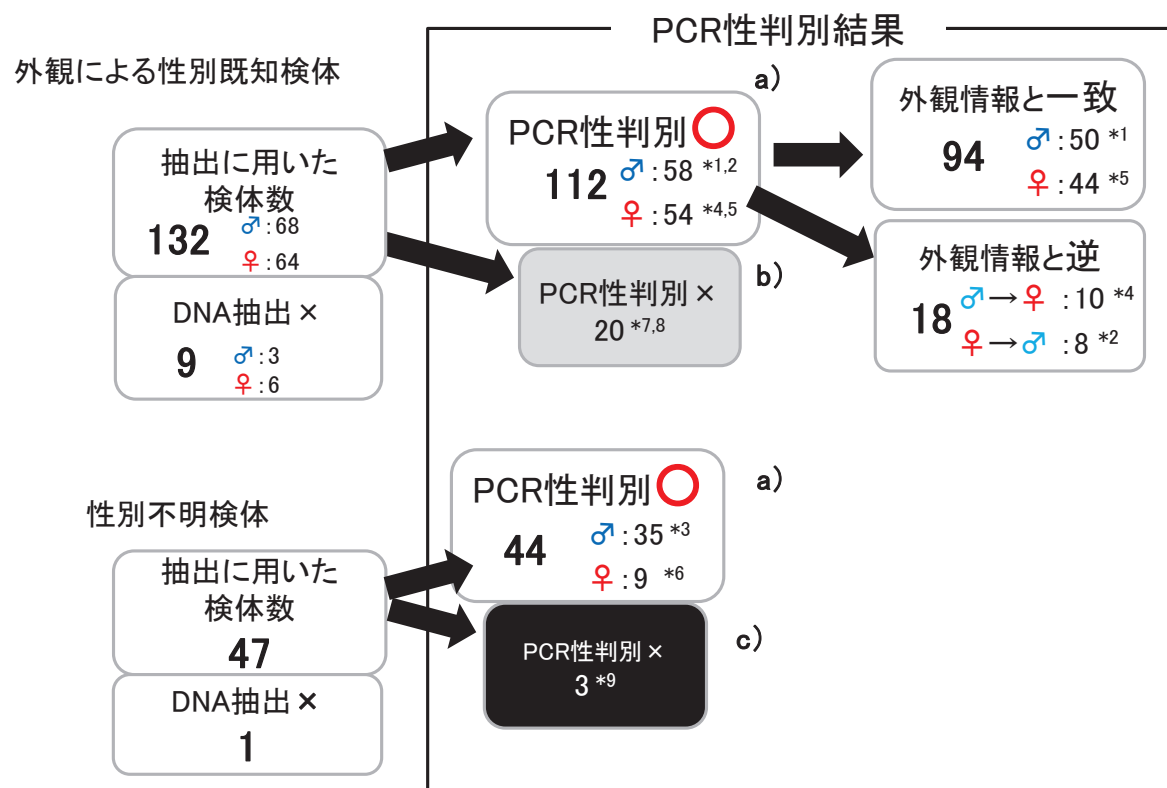


図 4-1 野生ニホンライチョウの糞 189 検体の性判別結果

- 検体により 2～9 回のプライマーLm-F/Lm-R を用いた PCR および電気泳動で性判別を行い、目的とする増幅断片位置にバンドが一度でも確認されれば、その結果を検体の性とした。複数回の試行の中で異なる性別結果が得られた場合には、バンドが 2 本となる雌とすることとした。PCR 性判別の結果を基に雌雄を分け、糞中のステロイドホルモン含量の測定を行った。
- 目的とする増幅断片位置にバンドが確認できなかった場合や、目的外のサイズに増幅断片が見られた場合、さらに DNA 抽出ができなかった検体については、採取時の外観情報の性別とし、糞中のステロイドホルモン含量の測定を行った。
- PCR により性別の決定に至らず、糞採取時の外観情報もない検体については、糞中のステロイドホルモン含量の測定から除外した。

*1～9 は表 1 内の数字と対応する。

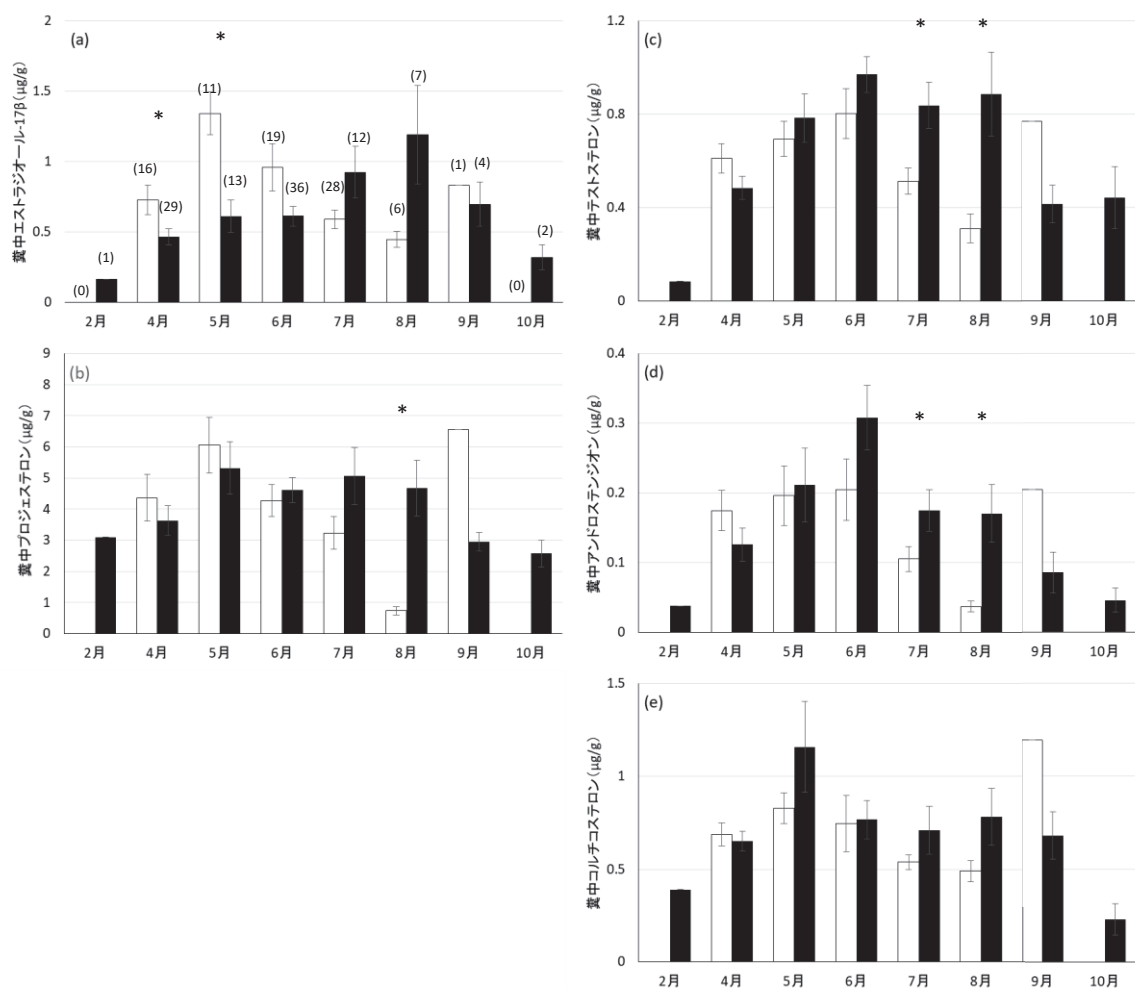


図 4-2 野外の雌雄ニホンライチョウにおける糞中のエストラジオール-17 β (a), プロジェステロン (b), テストステロン (c), アンドロステンジオン (d), コルチコステロン (e) 含量の月別平均値 \pm 標準誤差
□は雌, ■は雄における平均値であり, バーは標準誤差を示す。*は雌雄間のホルモン値に有意差があったことを示す ($p < 0.05$)。 (a) の括弧内の数字は各月の試料数を示す (b ~ e も同数)。

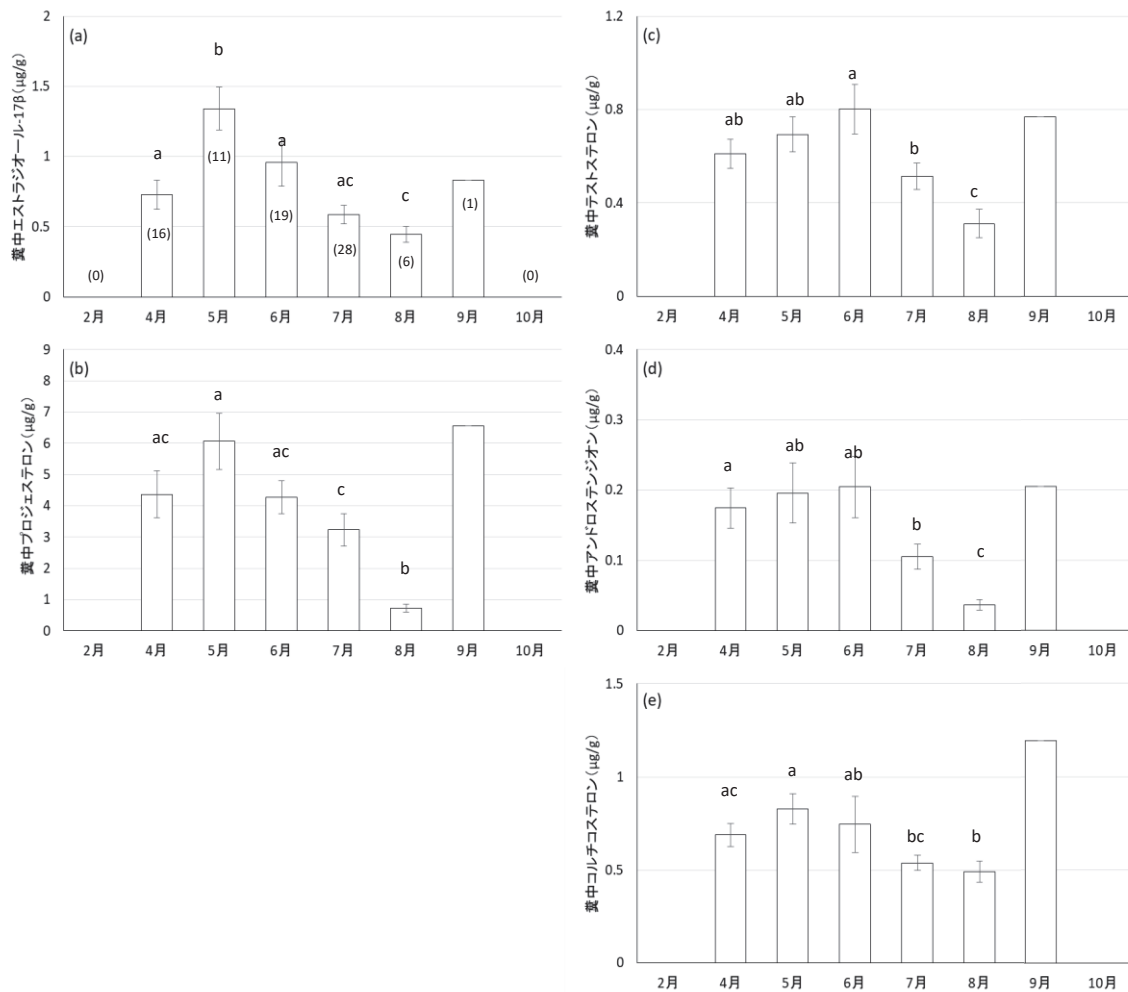


図 4-3 野外の雌ニホンライチョウにおける糞中のエストラジオール-17β (a), プロジェステロン (b), テストステロン (c), アンドロステンジオン (d), コルチコステロン (e) 含量の月別平均値±標準誤差
 (a) の括弧内の数字は各月の試料数を示す (b~e も同数)。アルファベットは有意差関係を示す ($p < 0.05$)。

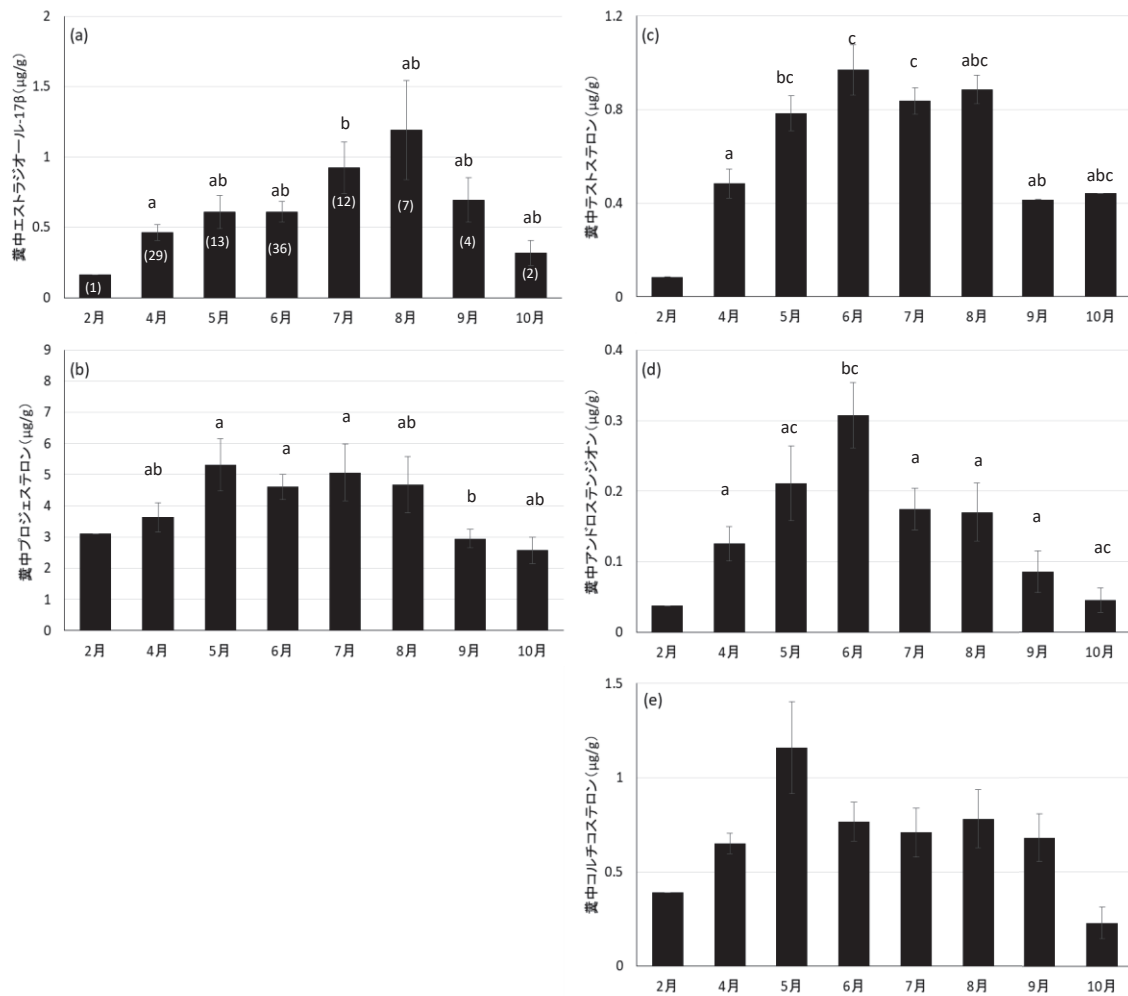


図 4-4 野外の雄ニホンライチョウにおける糞中のエストラジオール-17 β (a), プロジェステロン (b), テストステロン (c), アンドロステンジオン (d), コルチコステロン (e) 含量の月別平均値 \pm 標準誤差
(a) の括弧内の数字は各月の試料数を示す (b~e も同数)。アルファベットは有意差関係を示す ($p < 0.05$)。

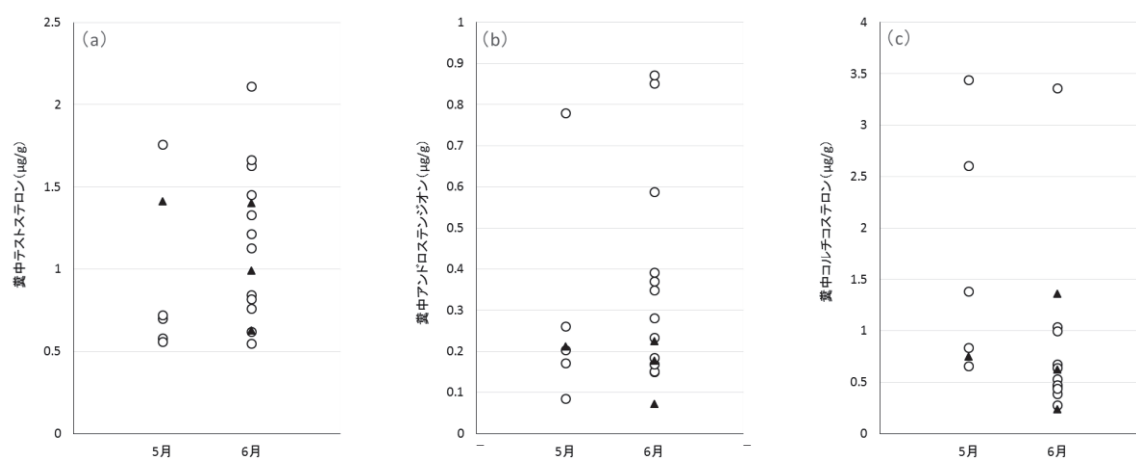


図 4-5 つがい形成雄と独身のあぶれ雄のニホンライチョウにおける糞中のテストステロン (a), アンドロステンジオン (b) およびコルチコステロン (c) 代謝物含量の比較
○はつがい形成雄, ▲はあぶれ雄の検体であることを示す。検体数については, つがい雄が5月に5検体, 6月に12検体であり, あぶれ雄が5月に1検体, 6月に3検体であった。

総 括

ニホンライチョウ (*Lagopus muta japonicas*) は、キジ目ライチョウ科ライチョウ (*Lagopus muta*) の 31 亜種の中の 1 亜種である。ニホンライチョウは、世界最南端に生息する亜種であり、地球温暖化の影響を最も強く受けることが懸念されているため、近年生息域内外での保全の取り組みが進められている。特に生息域内では長期にわたる個体数のモニタリングや生息環境の調査が行われている。一方、生息域外では動物園において、ニホンライチョウの飼育下での繁殖を目指すために、海外での飼育方法が確立されている別亜種のスバルライチョウ (*L. m. hyperboreus*) を飼育して、ライチョウに関する生物学的データの収集がなされている。2015 年からは、一部の飼育施設でニホンライチョウの飼育が開始されている。両種ライチョウは季節繁殖性を示し、厳しい生息環境に対して、ライフサイクルを適応させている。また、一般的に鳥類は光周期に繁殖活動をコントロールされており、生殖腺のサイズや機能がダイナミックに変化する。ホルモン測定による内分泌動態のモニタリングは、それらの生殖腺状況を間接的に把握することを可能にする。さらに排泄糞を材料とすることで個体に対し非侵襲的にモニタリングができる。そこから得られた生理学的な知見により、外的な環境変化に伴う生殖腺活動、換羽の発現並びに体重の変動などへの影響を明らかにすることができる。

本研究では、ライチョウ 2 亜種での内分泌動態の解明を試みた。採取時に個体にストレスを与えない糞を用い、飼育下スバルライチョウでの内分泌動態のモニタリング方法の検討と繁殖特性の解明および性判別方法の確立、希少種であるニホンライチョウの野生個体における内分泌学的変化の調査を試みた。

国内で飼育されている雌雄スバルライチョウおよび野生のニホンライチョウを研究対象とした。スバルライチョウでは血液および糞を用い、ニホンライチョウでは糞を採取した。ステロイドホルモンの抽出は、血液ではジエチルエーテル、糞ではメタノールにより行った。ステロイドホルモン含量の測定は、エストラジオール-17 β (E₂)、プロジェステロン (P₄)、テストステロン (T)、アンドロステンジオン (AD)、コルチコステロンの各抗体を用いた酵素免疫測定法により行った。

第1章では、内分泌動態のモニタリング材料の検討を行った。スバルバルライチョウは腸糞と盲腸糞の2種類の糞を排泄するため、これらの性ステロイドホルモン含量について比較した。両糞中の性ステロイドホルモン含量は同様の変動傾向であったが、盲腸糞では腸糞より有意に高いホルモン含量を示した。さらに、腸糞は血中の性ホルモン濃度を反映しており、内分泌動態のモニタリングに有用であると考えられた。このため、腸糞はモニタリング材料に適していると判断し、以降の実験に用いた。

第2章では、腸糞を用いた非侵襲的な方法で、飼育下スバルバルライチョウの内分泌動態の長期モニタリングを行った。照明条件などの環境からの刺激がスバルバルライチョウの内分泌活動へ与える影響を明らかにした。また、内分泌動態の変化と繁殖行動、眼窩上肉冠、換羽、体重と採食量の変化との関係について調べた。生息地の高緯度の日長に近づけた照明の飼育条件下では、照明時間の延長に伴った雌の糞中 E_2 と P_4 含量および雄の糞中 T と AD 含量の増加が見られた。これらが高値の時に繁殖行動が見られたことから24時間の照明時間となった際には生殖腺活動が活発になっていることが明らかになった。一方で日本の自然光周期下で飼育した場合にはこれらの変動が認められなかった。日本の自然光の最長日照時間（約14時間40分）は本亜種の生殖腺活動の誘起には不十分であることが明らかとなった。糞中の性ステロイドホルモン含量の増加と同時に体重と採食量の減少、雌の夏羽への換羽、雄の眼窩上肉冠の肥大と発色が進んだ。また、これらの濃度が減少を始めると、体重と採食量の回復、雄の夏羽への換羽、眼窩上肉冠の退縮と退色も見られるようになった。これらの変化は生殖腺活動との関連が示唆され、これらの変化が生殖腺活動の外観的指標となることが考えられた。

第3章では、ライチョウの糞由来DNAを用いたPCR法による性判別方法の確立を試みた。初めに、クロライチョウ (*Tetrao tetrix*) およびキジオライチョウ (*Centrocercus urophasianus*) で報告のあったプライマー2550F/2718R、ヨーロッパオオライチョウ (*T. urogallus*) で報告のあったプライマーP2/P8について検討した。スバルバルライチョウの血液由来DNAでのPCR結果から、増幅断片長の差が明白であったプライマー2550F/2718Rが本種の性判別に適していると判断できた。また、2550F/2718Rからの増幅産物のシーク

エンスデータを基にプライマーLm-F/Lm-R を設計した。次に、プライマー2550F/2718R およびプライマーLm-F/Lm-R を用いて野生ニホンライチョウの糞について性判別を行った。Z 染色体およびW 染色体由来バンドはプライマー2550F/2718R を用いた場合は約 450 bp と約 600 bp, プライマーLm-F/Lm-R を用いた場合は約 395 bp と約 244 bp であった。雌雄に共通してみられる Z 染色体由来バンドの出現率は、既存の性判別プライマー2550F/2718R で 48.6%であったのに対し、作製したプライマーLm-F/Lm-R では 67.98%となり、出現率の向上が認められた。これは、増幅の標的領域を短くすることで分解された DNA であっても増幅が可能になったためと考える。しかし、プライマーLm-F/Lm-R を用いた場合でも夏季に採取した糞では、Z 染色体由来バンドの出現率が低くなり、外的因子により鋳型 DNA の分解が著しく進んだものと考えられた。

第4章では、野生ニホンライチョウの内分泌動態の状況を把握するために、雌雄における糞中のステロイドホルモン含量を調査した。雌雄別に評価するために糞検体をプライマーLm-F/Lm-R を用いた PCR 法により雌雄を判定した。DNA 性判別ができなかった場合は、採取時の外観情報を基に雌雄を分類した。雌では5月に糞中の E₂, P₄, T および AD 含量が高値となった。一方で、雄では糞中 T 含量が5~8月に、また糞中 AD 含量が6月に高くなる傾向が見られた。これらのホルモンの動態は野生のニホンライチョウの繁殖行動に関する知見と一致しており、繁殖に伴う生殖腺の活動を反映していると考えられた。

本研究の結果より、ライチョウが排泄した腸糞を用いて、内分泌動態のモニタリングが可能となった。飼育下スバルライチョウでは、同一個体を用いて長期的な糞中のステロイドホルモン含量のモニタリングを行うことで、外的な環境の変化が内分泌動態に与える影響について調べ、スバルライチョウの内分泌と繁殖行動や外観との関連を明らかにすることができた。さらに、野生のニホンライチョウでは、糞中のステロイドホルモン含量の変化の様相から、生息地での生殖腺活動の季節的な変化を捉えることができた。これらの結果は、今後進められるニホンライチョウの飼育下繁殖において有用な内分泌情報となるものと考えられた。

英文要約

The Japanese rock ptarmigan (*Lagopus muta japonicus*) is one of thirty one subspecies of *Lagopus muta*, which is member of the Tetraonidae family in the order Galliformes. Japanese rock ptarmigan is the southern-most living subspecies in the world, so there are concerns about the impact of global warming. In recent years, *in situ* and *ex situ* conservation efforts have been promoted. In particular, *in situ* conservation has involved long-term monitoring of the population and habitat surveys. Elsewhere, *ex situ* conservation of another subspecies of *Lagopus muta*, Svalbard rock ptarmigan (*L. m. hyperboreus*), has established breeding techniques and biological data has been collected in zoos, which may aid with the captive breeding of Japanese rock ptarmigan. The captive breeding of Japanese rock ptarmigan started in some institutions from 2015. Both species are seasonal breeders and their lifecycle is adapted for living in severe habitats. In general, photoperiod coordinates bird activities, including the induction of dynamic change in the size and function of the gonads. Monitoring of endocrinal dynamics allows an understanding of gonadal status indirectly. In particular, using feces makes it possible to perform non-invasive monitoring. Physiological information makes it possible to elucidate the relationship between the environment and breeding in these subspecies and also the effect of breeding on the expression of traits such as molt or body mass change.

In this study, we aimed to elucidate the endocrine dynamics in two subspecies of rock ptarmigan. We attempted to examine monitoring methods of endocrinal dynamics, determine the breeding characteristics in captive Svalbard rock ptarmigan, and investigate the endocrinal profile in wild Japanese rock ptarmigan using feces as a non-invasive sampling approach.

The research objects were male and female captive Svalbard rock ptarmigan and wild Japanese rock ptarmigan. We collected blood from Svalbard rock ptarmigan and feces from both of these species. The steroid hormones in blood were extracted using diethyl ether, and fecal steroid hormones were extracted using methanol. The concentrations of steroid hormones were measured

using enzyme immunoassays with antibodies against estradiol-17 β (E₂), progesterone (P₄), testosterone (T), androstenedione (AD), or corticosterone.

In chapter 1, we examined the monitoring materials for endocrinal dynamics. Because Svalbard rock ptarmigan excrete rectal and cecal feces, we compared sex steroid hormones concentrations in both. The dynamics of sex steroid hormones were similar between in rectal and cecal feces, but cecal feces showed higher hormonal concentrations than rectal feces. The hormonal concentration in rectal feces reflected the hormonal concentration in blood, so these feces seemed to be useful for monitoring. Thus, we concluded that rectal feces were suitable for monitoring and these were used for the subsequent experiments.

In chapter 2, we performed long-term endocrinal monitoring of captive Svalbard rock ptarmigan using this non-invasive approach with rectal feces. We revealed the effect of ambient factors such as light period duration on endocrinal activity. In addition, we also investigated the relationship of endocrinal change with reproductive activity, supraorbital comb, molting, body mass, and feeding. In captive lighting conditions that were close to the day length of a high-latitude environment, the concentration of E₂ and P₄ in female feces or T and AD in male feces increased corresponding to the increase in lighting period. Because these high concentrations were found to be associated with reproductive activities, it was revealed that the gonadal activities were active with 24-hour illumination. On the other hand, with the natural day length in Japan, these hormonal changes were not found. From these results, it was revealed that 24-hour illumination was needed to induce gonadal activation, but the maximum day length in Japan (approximately 14 h 40 min) was not sufficient. The fecal sex steroid hormone concentrations increased with decreasing body mass and feeding, and the progression of female summer molting, male supraorbital comb enlargement, and coloration. When these hormone concentrations started to decline, which was associated with increasing body mass and feeding, and the start of male summer molting, comb regression, and color fading. These appearance or quantitative changes might reflect gonadal activity, so these will be outward indicators of gonadal activity.

In chapter 3, we attempted to establish a method for PCR-based sex identification using DNA extracted from Japanese rock ptarmigan feces. First, we examined the utility of primers 2550F/2718R, which have been used for sex determination in black grouse (*Tetrao tetrix*) and sage grouse (*Centrocercus urophasianus*), and primers P2/P8 for sex determination in capercaillie (*T. urogallus*). From the results of PCR with DNA from Svalbard rock ptarmigan, we concluded that primers 2550F/2718R were suitable for sex determination because two amplified products were clearly distinguished using these primers. In addition, we designed original primers named Lm-F/Lm-R based on sequence data from the amplified products of 2550F/2718R. Next, we carried out sex identification from feces of wild Japanese rock ptarmigan using 2550F/2718R or Lm-F/Lm-R. The amplified products from the Z and W chromosomes were approximately 450 and 600 bps with 2550F/2718R and approximately 395 and 244 bps with Lm-F/Lm-R. The amplification rate of the product from the Z chromosome, which is common to both sexes, was 48.6% with 2550F/2718R and 67.98% with Lm-F/Lm-R, so there was improvement in the rate. Targeting shorter regions might make it possible to amplify products even with degraded DNA. However, in the case of feces collected in summer, the amplification rate of the product from the Z chromosome was low even when using primers Lm-F/Lm-R, and it may be that fecal DNA was significantly degraded by ambient factors.

In chapter 4, to elucidate the endocrinal status of wild Japanese rock ptarmigan, we investigated male and female fecal steroid hormonal concentration profiles. We carried out sex identification using feces with the primers Lm-F/Lm-R. In cases where sex determination was not possible, we categorized males or females based on appearance information from when the feces were collected. In females, fecal E₂, P₄, T, and AD reached high concentrations at May. On the other hand, high concentrations of T were seen during May to August and AD was seen at June in males. These hormonal profiles were consistent with the perception of reproductive activity in wild Japanese rock ptarmigan, so these profiles seemed to reflect the gonadal activity associated with reproduction.

In this study, we were able to monitor endocrinal dynamics using extracted rectal feces. In captive

Svalbard rock ptarmigan, we assessed the ambient environmental effects on endocrinal dynamics and revealed the relationship of endocrine activity to sexual activity or appearance change by monitored long-term changes of fecal steroid hormonal concentrations in the same individuals. In wild Japanese rock ptarmigan, we could elucidate seasonal changes in gonadal activity from fecal steroid hormonal profiles. These results provide important endocrinal information on Japanese rock ptarmigan, and which will develop *ex situ* conservation programs.

謝 辞

本研究の遂行および本論文の作成にあたり，実験計画並びに方法の細部にわたる検討，さらに論文の作成，校閲に至るまで多大なご指導と実験に関する適切なご助言およびご協力を賜りました主指導教員の岐阜大学応用生物科学部 土井 守 教授並びに副指導教員の同学部 楠田哲士 准教授，静岡大学農学部 高坂哲也 教授に甚謝の意を表します。また，本稿のご査読を頂きました岐阜大学応用生物科学部 岩澤 淳 教授に深謝致します。

本研究を行うにあたり，スパーバルライチョウに関する数多くの試料の採取，行動等の記録や，貴重な資料の提供および研究遂行における手続き等で多大なご協力とご支援を頂きました，東京都恩賜上野動物園，富山市ファミリーパーク，長野市茶臼山動物園，横浜市繁殖センター，いしかわ動物園の関係者の皆様に心より厚く御礼申し上げます。ニホンライチョウの野外試料の採取，検体情報の提供等で多大なご協力とご支援を頂きました，信州大学教育学部の中村浩志名誉教授（現 中村浩志国際鳥類研究所 代表理事）並びに東海大学理学部訪問研究員の小林 篤 博士に心より厚く御礼申し上げます。また，御嶽山でのライチョウの野外試料を提供いただきました日本野鳥の会岐阜の大塚之稔様氏に厚謝申し上げます。性判別プライマーの設計に関するご助言をいただきました岐阜大学応用生物科学部 松村秀一 教授，サーモフィッシャーサイエンティフィック ライフサイエンスソリューションズ ライフテクノロジーズジャパン株式会社 中山 収 氏に厚謝申し上げます。

DNA のシーケンス解析には，岐阜大学生命科学総合研究支援センターにご協力いただきました。ここに感謝の意を表します。

さらに本論文に関わる実験の遂行にあたっては，多くの学生に様々な形でご指導とご協力を賜りました。岐阜大学応用生物科学部動物繁殖学研究室を卒業されました先輩方には実験手法を始め，適切な研究のご指導をいただきました。同研究室を卒業された修士課程時の同期生と後輩の皆様，そして現研究室生の諸氏とは，動物への熱い想いを胸に，共に切磋琢磨し，充実した研究室生活を送ることができました。また，動物遺伝学研究室卒業

生の宮野谷 杏 氏には、性判別プライマーの設計の手技のご指導を頂きました。岐阜大学で共に時間を過ごした卒業生と現研究室学生の皆様に心より感謝の意を表します。

そして陰ながら支えてくださいました家族並びに友人諸氏，男女共同参画推進室の先生方と職員の皆様に，深く御礼申し上げます。

本研究は，公益社団法人日本動物園水族館協会ライチョウ域外保全プロジェクトチームおよび各動物園との共同研究として行われ，また一部は，同協会の平成 23 年度および 24 年度野生動物保護募金助成，平成 25 年度公益信託乾太助記念動物科学研究助成基金の研究助成，公益財団法人東京動物園協会の平成 26 年度および 27 年度野生生物保全基金助成，公益信託サントリー世界鳥基金の平成 27 年度年鳥類保護団体への活動助成を受けて行われました。

2016 年 12 月 9 日

山本彩織

引用文献

- Alonso-Alvarez C, Bertrand S, Faivre B, Chastel O, Sorci G. 2007. Testosterone and oxidative stress: the oxidation handicap hypothesis. *Proc R Soc B* 274: 819-825.
- Ameda K. 2012. Sex determination using *chd1* gene in cockatiel *Nymphicus hollandicus* by PCR amplification of fecal DNA. *Ornithol Sci* 11: 65-68.
- Baba Y, Fujimaki Y, Yoshii R, Koike H. 2001. Genetic variability in the mitochondrial control region of the Japanese rock ptarmigan *Lagopus mutus japonicus*. *Jpn J Ornithol* 50: 53-64.
- Bantock TM, Prys-Jones RP, Lee PLM. 2008. New and improved molecular sexing methods for museum bird specimens. *Mol Ecol Resour* 8: 519-528.
- Baumgardt JA, Goldberg CS, Reese KP, Connelly JW, Musil DD, Garton EO, Waits LP. 2013. A method for estimating population sex ratio for sage-grouse using noninvasive genetic samples. *Mol Ecol Resour* 13: 393-402.
- Bercovitz AB, Czekala NM, Lasley BL. 1978. A new method of sex determination in monomorphic birds. *J Zoo Wildl Med* 9: 114-124.
- Björnhag G. 1989. Transport of water and food particles through the avian ceca and colon. *J Exp Zool Suppl* 3: 32-37.
- Blickley JL, Word KR, Krakauer AH, Phillips JL, Sells SN, Taff CC, Wingfield JC, Patricelli GL. 2012. Experimental chronic noise is related to elevated fecal corticosteroid metabolites in lekking male greater sage-grouse (*Centrocercus urophasianus*). *PLoS One* 7(11): e50462. doi:10.1371/journal.pone.0050462
- Bosnjak J, Stevanov-Pavlovic M, Vucicevic M, Stevanovic J, Simeunovic P, Resanovic R, Stanimirovic Z. 2013. Feasibility of non-invasive molecular method for sexing of parrots. *Pak J Zool* 45: 715-720.
- Brown NL, Bayle JD, Scanes CG, Follet BK. 1975. Chicken gonadotropins: their effects on the testes of immature and hypophysectomized Japanese quail. *Cell Tissue Res* 156: 499-520.

- Bush KL, Vinsky MD, Aldridge CL, Paszkowski CA. 2005. A comparison of sample types varying in invasiveness for use in DNA sex determination in an endangered population of greater sage-grouse (*Centrocercus urophasianus*). *Conserv Genet* 6: 867-870.
- Cerit H, Avanus K. 2007. Sex identification in avian species using DNA typing methods. *Worlds Poult Sci J* 63: 91-100.
- 千羽晋示. 1965. ライチョウの食物分析. 山科鳥類研究所研究報告 4 : 184-197.
- Clark LB, Leonard SL, Bump G. 1937. Light and the sexual cycle of game birds. *Science* 85: 339-340.
- Clench MH. 1999. The avian cecum: Update and motility review. *J Exp Zool* 283: 441-447.
- Cornelius JM, Perfito N, Zann R, Breuner CW, Hahn TM. 2011. Physiological trade-offs in self-maintenance: plumage molt and stress physiology in birds. *J Exp Biol* 214: 2768-2777.
- Costantini V, Guaricci AC, Laricchiuta P, Rausa F, Lacalandra GM. 2008. DNA sexing in Humboldt Penguins (*Spheniscus humboldti*) from feather samples. *Anim Reprod Sci* 106: 162-167.
- Cotter RC. 1999. The reproductive biology of rock ptarmigan (*Lagopus mutus*) in the central Canadian arctic. *Arctic* 52: 23-32.
- Czekala NM, Lasley BL. 1997. A technical note on sex determination in monomorphic birds using faecal steroid analysis. *Int Zoo Yearb* 17: 209-211.
- Dawson A. 1994. The effects of daylength and testosterone on the initiation and progress of molt starlings *Sturnus vulgaris*. *Ibis* 136: 335-340.
- Dawson DA, Darby S, Hunter FM, Krupa AP, Jones IL, Burke T. 2001. A critique of avian CHD-based molecular sexing protocols illustrated by a Z-chromosome polymorphism detected in auklets. *Mol Ecol Notes* 1: 201-204.
- Dawson A, King VM, Bentley GE, Ball GF. 2001. Photoperiodic control of seasonality in birds. *J Biol Rhythms* 16: 365-380.
- del Hoyo J, Collar NJ. 2014. Order Galliformes. In: HBW and Bird Life International Illustrated Checklist of the Birds of the World Volume 1 Non-passerines, pp. 66-123. Lynx Edicions,

Barcelona.

- Demay SM, Becker PA, Eidson CA, Rachlow JL, Johnson TR, Waits LP. 2013. Evaluating DNA degradation rates in faecal pellets of the endangered pygmy rabbit. *Mol Ecol Resour* 13: 654-662.
- Dickens MJ, Bournonville C, Balthazart J, Cornil CA. 2014. Relationships between rapid changes in local aromatase activity and estradiol concentrations in male and female quail brain. *Horm Behav* 65: 154-164.
- Dimcheff DE, Drovetski SV, Mindell DP. 2002. Phylogeny of Tetraoninae and other galliform birds using mitochondrial 12S and ND2 genes. *Mol Phylogenet Evol* 24: 203-215.
- Done T, Gow EA, Stutchbury BJM. 2011. Corticosterone stress response and plasma metabolite levels during breeding and molt in a free-living migratory songbird, the wood thrush (*Hylocichla mustelina*). *Gen Comp Endocrinol* 171: 176-182.
- Dubiec A, Zagalska-Neubauer M. 2006. Molecular techniques for sex identification in birds. *Biol Lett* 43: 3-12.
- 海老原史樹文, 安尾しのぶ, 吉村 崇. 2005. 脊椎動物における光周性の制御機構. 生物物理 45 : 185-191.
- 海老原 充, 榊田星史, 泉 徳和. 2008. PCR を用いた走鳥類雌雄鑑別法の確立. 石川県立大学年報 : 生産・環境・食品 : バイオテクノロジーを基礎として 19 : 23-30.
- Ellegren H. 1996. First gene on the avian W chromosome (CHD) provides a tag for universal sexing of non-ratite birds. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 263: 1635-1641.
- Feuerbacher I, Prinzinger R. 1981. The effects of the male sex-hormone testosterone on body temperature and energy metabolism in male Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*). *Comp Biochem Physiol A Physiol* 70: 247-250.
- Follett BK, Mattocks PW, Farner DS. 1974. Circadian function in the photoperiodic induction of gonadotropin secretion in the White-crowned Sparrow, *Zonotrichia leucophrys gambelii*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 71(5): 1666-1669.

- Folstad I, Karter AJ. 1992. Parasites, bright males and the immunocompetence handicap. *Am Nat* 139: 603-622.
- Fridolfsson AK, Ellegren H. 1999. A simple and universal method for molecular sexing on non-ratite birds. *J Avian Biol* 30: 116-121.
- Fridolfsson AK, Ellegren H. 2000. Molecular evolution of the avian CHD1 genes on the Z and W sex chromosomes. *Genetics* 155: 1903-1912.
- García-González R, Aldezabal A, Laskurain NA, Margalida A, Novoa C. 2016. Influence of snowmelt timing on the dietquality of Pyrenean rock ptarmigan (*Lagopus muta pyrenaica*): implications for reproductive success. *PLoS One* 11:e0148632. doi:10.1371/journal.pone.0148632
- Gasaway W. 1976. Seasonal variation in diet, volatile fatty acid production and size of the cecum of rock ptarmigan. *Comp Biochem Physiol A Physiol* 53: 109-114.
- Goymann W. 2005. Noninvasive monitoring of hormones in birds droppings Physiological validation, sampling, extraction, sex differences, and the influence of diet on hormone metabolite levels. *Ann NY Acad Sci* 1046: 35-53.
- Goymann W. 2012. On the use of non-invasive hormone research in uncontrolled, natural environments: the problem with sex, diet, metabolic rate and the individual. *Methods Ecol Evol* 3: 757-765.
- Grammeltvedt R, Steen JB. 1978. Fat deposition in Spitzbergen ptarmigan (*Lagopus mutus hyperboreus*). *Arctic* 31: 496-498.
- Griffiths R, Daan S, Dijkstra C. 1996. Sex identification in birds using two CDH genes. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 263: 1251-1256.
- Griffiths R, Double MC, Orr K, Dawson RJG. 1998. A DNA test to sex most birds. *Mol Ecol* 7: 1071-1075.
- Griffiths R, Krn RM. 1997. A CHD1 gene is Z chromosome linked in the chicken *Gallus domesticus*. *Gene* 197: 225-229.
- Groscolas R, Leloup J. 1986. The endocrine control of reproduction and molt in male and female

- emperor (*Aptenodytes forsteri*) and adeliie (*Pygoscelis adeliae*) penguins II. Annual changes in plasma levels of thyroxine and triiodothyronine. *Gen Comp Endocrinol* 63: 264-274.
- Gruys RC. 1993 Annual and winter movements and sexual segregation of willow ptarmigan. *Arctic* 46: 228-239.
- Gutiérrez RJ, Barrowclough GF, Groth JG. 2000. A classification of the grouse (Aves: Tetraoninae) based on mitochondrial DNA sequences. *Wildlife Biol* 6: 205-211.
- Hagihara M, Yamaguchi T, Kitahara M, Hirai K, Murata K. 2004. Leucocytozoon lovati infections in wild rock ptarmigan (*Lagopus mutus*) in Japan. *J Wildl Dis* 40: 804-807.
- Hahn TP, Swingle J, Wingfield JC, Ramenofsky M. 1992. Adjustments of the prebasic molt schedule in birds. *Ornis Scand* 23: 314-321.
- Hamilton WD, Zuk M. 1982. Heritable true fitness and bright birds: a role for parasites?. *Science* 218: 384-387.
- 羽田健三, 中村浩志, 小岩井 彰, 飯沢 隆, 田嶋一善. 1985. 南アルプス白根三山におけるライチョウ *Lagopus mutus* のなわばり分布と生息個体数. 鳥 34 : 33-48.
- Hannon SJ, Eason P. 1995. Colour bands, combs and coverable badges in willow ptarmigan. *Anim Behav* 49: 53-62.
- Hannon SJ, Wingfield JC. 1990. Endocrine correlates of territoriality, breeding stage, and body molt in free-living willow ptarmigan of both sexes. *Can J Zool* 68: 2130-2134.
- Harvey S, Scanes CG, Howe T. 1977. Growth hormone effects on in vitro metabolism of avian adipose and liver tissue. *Gen Comp Endocrinol* 33: 322-328.
- Harvey S, Davison TF, Klandorf H, Phillips JG. 1980. Diurnal changes in the plasma concentrations of thyroxine and triiodothyronine and their binding to plasma proteins in the domestic duck (*Anas platyrhynchos*). *Gen Comp Endocrinol* 42: 500-504.
- Heath JA, Frederick PC, Edwards TM, Guillette Jr LJ. 2003. Reproductive physiology of free-living white ibises (*Eudocimus albus*) in the Florida Everglades. *Gen Comp Endocrinol* 133: 118-131.
- Hildebrandt T, Pitra C, Sömmer P, Pinkowski M. 1995. Sex identification in birds of prey by

- ultrasonography. *J Zoo Wildl Med* 26: 367-376.
- 平林国男. 1992. 北アルプスのライチョウ. ライチョウ 生活と飼育への挑戦 (大町山岳博物館編), pp.5-56. 信濃毎日新聞社, 長野.
- Hirschenhauser K, Möstl E, Kotrschal K. 1999. Seasonal patterns of sex steroids determined from feces in different social categories of greylag geese (*Anser anser*). *Gen Comp Endocrinol* 114: 67-79.
- Hirschenhauser K, Möstl E, Péczely P, Wallner B, Dittami J, Kotrschal K. 2000. Seasonal relationships between plasma and fecal testosterone in response to GnRH in domestic ganders. *Gen Comp Endocrinol* 118: 262-272.
- Hissa R, Saarela S, Balthazart J, Etches RJ. 1983. Annual variation in the concentrations of circulating hormones in capercaillie (*Tetrao urogallus*). *Gen Comp Endocrinol* 51: 183-190.
- Huber S, Palme R, Arnold W. 2003. Effects of season, sex, and sample collection on concentrations of fecal cortisol metabolites in red deer (*Cervus elaphus*). *Gen Comp Endocrinol* 130: 48-54.
- Huynen L, Millar CD, Lambert DM. 2002. A DNA test to sex ratite birds. *Mol Ecol* 11: 851-856.
- 堀田昌伸, 野宮典夫, 尾関雅章. 2008. 爺ヶ岳から岩小屋沢だけにおけるライチョウ *Lagopus mutus* の生息状況. 長野県環境保全研究所報告 4 : 51-54.
- 堀江明香. 2014. 鳥類における生活史研究の最新動向と課題. 日本鳥学会誌 63 : 197-233.
- Hoshino S, Suzuki M, Kakegawa T, Imai K, Wakita M, Kobayashi Y. Changes in plasma thyroid hormones, luteinizing hormone (LH), estradiol, progesterone and corticosterone of laying hens during a forced molt. *Comp Biochem Physiol A Physiol* 90: 355-359.
- Idaghdour Y, Broderick D, Korrida A. 2003. Faeces as a source of DNA for molecular studies in a threatened population of great bustards. *Conserv Genet* 4: 789-782.
- 今井 清. 2003. ニワトリにおける卵生産過程とそのしくみ. 日本鳥学会 52 : 1-12.
- 井上英治. 非侵襲的試料を用いた DNA 分析—試料の保存, DNA 抽出, PCR 増幅及び血縁解析の方法について—. 霊長類研究 31 : 3-18.
- Ishihara S, Shibashi T, Sato Y, Murata K, Nogami S. 2006. Two *Eimeria* species isolated from wild

- Japanese rock ptarmigans (*Lagopus mutus japonicus*) in Japan. *J Vet Med Sci* 68: 991-993.
- Ishii S, Wada M, Wakabayashi S, Sakai H, Kubodera Y, Yamaguchi N and Kikuchi M. 1994. Endocrinological studies for artificial breeding of the Japanese ibis, *Nipponia nippon*, an endangered avian species in Asia. *J Biosci* 19: 491-502.
- 石澤健夫. 1928. 雷鳥の食餌としてのハヒマツに就いて. 鳥 6 : 47-50.
- 石澤健夫. 1929. 再び雷鳥の食餌としてのハヒマツに就いて. 鳥 6 : 174-178.
- 石沢慈鳥. 1961. 日本北アルプス地方で採取された鳥類の夏季の睪丸と卵巣の大きさについて. 鳥 16 : 355-359.
- Ito H, Sudo-Yamaji A, Abe M, Murase T, Tsubota T. 2003. Sex identification by Alternative polymerase chain reaction methods in Falconiformes. *Zoolog Sci* 20: 339-344.
- Itoh Y, Suzuki M, Ogawa A, Munechika I, Murata K, Mizuno S. 2001. Identification of the sex of a wide range of carinate birds by PCR using primer sets selected from chicken EE0.6 and its related sequences. *J Hered* 92: 315-321.
- Jensen T, Durrant B. 2006. Assessment of reproductive status and ovulation in female brown kiwi (*Apteryx mantelli*) using fecal steroids and ovarian follicle size. *Zoo Biol* 25: 25-34.
- Jensen T, Pernasetti FM, Durrant B. 2003. Conditions for rapid sex determination in 47 avian species by PCR of genomic DNA from blood, shell-membrane blood vessels, and feathers. *Zoo Biol* 22: 561-571.
- Kahn NW, John JST, Quinn TW. 1998. Chromosome-specific intron size differences in the Avian CHD gene provide an effective method for sex identification in birds. *Auk* 115: 1074-1078.
- Kalz B, Jewgenow K, Fickel J. 2006. Structure of an otter (*Lutra lutra*) population in Germany-results of DNA and hormone analyses from faecal samples. *Mamm Biol* 71: 321-335.
- 環境省. 2012. 鳥類 環境省第 4 次レッドリスト (2012) 〈分類群順〉 URL: https://www.env.go.jp/press/files/jp/20551.pdf#search='http%3A%2F%2Fwww.env.go.jp%2Fpress%2Ffile_view.php%3Fserial%3D20551%26hou_id%3D15619' (2015 年 10 月 17 日閲覧).
- 環境省長野自然環境事務所. 2014. 第一期ライチョウ保護増殖事業実施計画. URL:

<http://www.env.go.jp/press/files/jp/24426.pdf> (2015 年 10 月 17 日閲覧).

Khanuja SPS, Shasany AK, Darokar MP, Kumar S. 1999. Rapid isolation of DNA from dry and fresh samples of plants producing large amounts of secondary metabolites and essential oils. *Plant Mol Biol Report* 17: 1-7.

菊山 栄. 2007. 甲状腺ホルモンの合成と分泌のしくみ. 内分泌学 (川島誠一郎編著), pp.54-55. 朝倉書店, 東京.

Klandorf H, Stokkan KA, Sharp PJ. 1982. Plasma thyroxine and triiodothyronine levels during the development of photorefractoriness in willow ptarmigan (*Lagopus lagopus lagopus*) exposed to different photoperiods. *Gen Comp Endocrinol* 47:64-69.

Klasing KC. 2005. Potential impact of nutritional strategy on noninvasive measurements of hormones in birds. *Ann NY Acad Sci* 1046: 5-16.

小林 篤, 中村浩志. 2011. ライチョウ *Lagopus mutus japonicas* の餌内容の季節変化. 日本鳥学会誌 60 : 200-215.

Kobayashi A, Nakamura H. 2013. Chick and juvenile survival of Japanese rock ptarmigan *Lagopus muta japonica*. *Wildlife Biol* 19: 358-367.

小林英司. 1988a. 副腎皮質. 基礎生物学選書 5. 内分泌現象 (訂正版), pp.203-221. 裳華房, 東京.

小林英司. 1988b. 甲状腺. 基礎生物学選書 5. 内分泌現象 (訂正版), pp.105-129. 裳華房, 東京.

小林真知, 中村雅彦 2006. 本州中部の高山帯に生息するカラスの分布と個体数. 山階鳥学会誌 38 : 47-55.

Kouatcho FD, Kenfack A, Ngoula F, Tegui A. 2015. Sexual maturity prediction based on hormonal profiles, testes and semen characteristics in male *Coturnix* quail (Garsault, 1764) in the Western Highlands of Cameroon. *Int J Agron Agric Res* 7: 143-154.

Kuenzel WJ. 2003. Neurobiology of molt in avian species. *Poult Sci* 82: 981-991.

Kurvers RHJM, Roberts ML, McWilliams SR, Peters A. 2008. Experimental manipulation of

- testosterone and condition during molt affects activity and vocalizations of male blue tits. *Horm Behav* 54: 263-269.
- 桑山岳人, 有村君子, 田中克英. 2005. ニワトリの放卵前後の血漿コルチコステロン濃度. 東京農業大学集報 50(2): 49-51.
- Lea RW, Klandorf H, Harvey S, Hall TR. 1992. Thyroid and adrenal function in the ring dove (*Streptopelia risoria*) during food deprivation and breeding cycle. *Gen Comp Endocrinol* 86: 138-146.
- Lèche A, Busso JM, Navarro JL, Hansen C, Marin RH, Martella MB. 2011. Non-invasive monitoring of adrenocortical activity in Greater rhea (*Rhea americana*) by measuring fecal glucocorticoid metabolites. *J Ornithol* 152: 839-847.
- Ligon JD, Thornhill R, Zuk M, Johnson K. 1990. Male-male competition, ornamentation and the role of testosterone in sexual selection in red jungle fowl. *Anim Behav* 40: 367-373.
- Lindgård K, Näslund S, Stokkan KA. 1995. Annual changes in body mass in captive Svalbard ptarmigan: role of changes in locomotor activity and food intake. *J Comp Physiol B* 165: 445-449.
- Lindgård K, Stokkan KA. 1989. Daylength control of food intake and body weight in Svalbard ptarmigan *Lagopus mutus hyperboreus*. *Ornis Scand* 20: 176-180.
- Ligon JD, Thornhill R, Zuk M, Johnson K. 1990. Male-male competition, ornamentation and the role of testosterone in sexual selection in red jungle fowl. *Anim Behav* 40: 367-373.
- Løvenskiold HL. 1954. *Lagopus mufus hyperboreus* Sundevall. In: Norsk Polarinstitutt Skrifter 103: Studies on the Avifauna of Spitsbergen, pp.130-131. Brøgers Boktrykkeris Forlag, Oslo.
- Lucchini V, Höglund J, Klaus S, Swenson J, Randi E. 2001. Historical biogeography and a mitochondrial DNA phylogeny of grouse and ptarmigan. *Mol Phylogenet Evol* 20: 149-162.
- Ludders JW, Langenberg JA, Czekala NM, Erb HN. 2001. Fecal corticosterone reflects serum corticosterone in Florida sandhill cranes. *J Wildl Dis* 37: 343-352.
- Lynn SE, Houtman AM, Weathers WW, Ketterson ED, Nolan V. 2000. Testosterone increases activity but not daily energy expenditure in captive male dark-eyed juncos, *Junco hyemalis*. *Anim*

Behav 60: 581-587.

Martínez-Padilla J, Mougeot F, Pérez-Rodríguez L, Bortolotti GR. 2007. Nematode parasites reduce carotenoid-based signaling in male red grouse. *Biol Lett* 3: 161-164.

丸山直樹, 阿部學, 三浦慎悟, 半田俊孝. 1971. 焼山におけるライチョウ *Lagopus mutus japonicus* 個体群. 鳥 20 : 268-275.

McGraw KJ, Correa SM, Adkins-Regan E. 2006. Testosterone upregulates lipoprotein status to control sexual attractiveness in a colorful songbird. *Behav Ecol Sociobiol* 60: 117-122.

McGraw KJ, Ardia DR. 2007. Do carotenoids buffer testosterone-induced immunosuppression?. An experimental test in a colourful songbird. *Biol Lett* 3: 375-378.

McWhorter TJ, Caviedes-Vidal E, Karasov WH. 2009. The integration of digestion and osmoregulation in the avian gut. *Biol Rev* 84: 533-565.

文部科学省・農林水産省・環境省. 2012. ライチョウ保護増殖事業計画 (案).
URL:http://www.env.go.jp/council/13wild/y130-23/mat01_2.pdf#search=%E3%83%A9%E3%82%A4%E3%83%81%E3%83%A7%E3%82%A6%E4%BF%9D%E8%AD%B7%E5%A2%97%E6%AE%96%E4%BA%8B%E6%A5%AD%E8%A8%88%E7%94%BB (2012 年 12 月 25 日閲覧).

Monteiro L, Bonnemaïson D, Vekris A, Petry KG, Nonnet J, Vidal R, Cabrita J, Négraud F. 1997. Complex polysaccharides as PCR inhibitor in feces: *Helicobacter pylori* model. *J Clin Microbiol* 23: 995-998.

Montell H, Fridolfsson AK, Ellegren H. 2001. Contrasting levels of nucleotide diversity on the avian Z and W sex chromosomes. *Mol Biol Evol* 18: 2010-2016.

Montgomerie R, Lyon B, Holder K. 2001. Dirty ptarmigan: behavioral modification of conspicuous male plumage. *Behav Ecol* 12: 429-438.

Mortensen A, Blix AS. 1986. Seasonal changes in resting metabolic rate and mass-specific conductance in Svalbard ptarmigan, Norwegian rock ptarmigan and Norwegian willow ptarmigan. *Ornis Scand* 17: 8-13.

- Mortensen A, Blix AS. 1989. Seasonal changes in energy intake, energy expenditure, and digestibility in captive Svalbard rock ptarmigan and Norwegian willow ptarmigan. *Ornis Scand* 20: 22-28.
- Mortensen A, Unander S, Kolstad M, Blix AS. 1983. Seasonal changes in body composition and crop content of Spitzbergen ptarmigan *Lagopus mutus hyperboreus*. *Ornis Scand* 14: 144-148.
- Mortensen A, Unander S, Blix AS. 1983. Seasonal changes in body composition and crop content of Spitzbergen ptarmigan *Lagopus mutus hyperboreus*. *Ornis Scand* 14: 144-148.
- Mougeot F, Irvine JR, Seivwright L, Redpath SM, Pieltney S. 2004. Testosterone, immunocompetence, and honest sexual signaling in male red grouse. *Behav Ecol* 15: 930-937
- Mougeot F, Redpath SM, Pieltney SB. 2006. Elevated spring testosterone increases parasite intensity in male red grouse. *Behav Ecol* 17: 117-125.
- Mukesh, Merwyn F, Mandhan RP, Sathyakumar S. 2011. Comparison of different parameters of invasive and non invasive sampling methods for microsatellite genotyping: a case study from red junglefowl and its application. *J Res Biol* 1: 38-43.
- Murata K, Tamada A, Ichikawa Y, Hagihara M, Sato Y, Nakamura H, Nakamura M, Sakanakura T and Asakawa M. 2007. Geographical distribution and seasonality of the prevalence of *Leucocytozoon lovati* in Japanese rock ptarmigans (*Lagopus mutus japonicus*) found in the Alpine regions of Japan. *J Vet Med Sci* 69: 171-176.
- Murphy MA, Kendall KC, Robinson A, Waits LP. 2007. The impact of time and field conditions on brown bear (*Ursus arctos*) faecal DNA amplification. *Conserv Genet* 8: 1219-1224.
- 中村浩志. 2006a. ライチョウの生活. 雷鳥が語りかけるもの, pp.26-36. 山と溪谷社, 東京.
- 中村浩志. 2006b. ライチョウをめぐるさまざまな課題. 雷鳥が語りかけるもの, pp.144-152. 山と溪谷社, 東京.
- 中村浩志. 2007a. ライチョウ *Lagopus mutus japonicus*. 日本鳥学会誌 56 : 93-114.
- 中村浩志. 2007b. ライチョウの現状と保全に関する展望. 鳥類保全学 (山岸 哲) (監修,

- 山科鳥類研究所編), pp.105-126. 京都大学学術出版会, 京都.
- 中村浩志. 2013a. なぜ日本のライチョウは人を恐れないのか?.
二万年の奇跡を生きた鳥ライチョウ, pp.223-237. 農山漁村文化協会, 東京.
- 中村浩志. 2013b. ついに解明された厳冬期の生活. 二万年の奇跡を生きた鳥ライチョウ,
pp.70-84. 農山漁村文化協会, 東京.
- 中村浩志. 2013c. 日本列島での進化と絶滅の歴史. 二万年の奇跡を生きた鳥ライチョウ,
pp.133-145. 農山漁村文化協会, 東京.
- 中村浩志. 2013d. ライチョウの死亡原因と寿命. 二万年の奇跡を生きた鳥ライチョウ,
pp.98-113. 農山漁村文化協会, 東京.
- 中村浩志. 2013e. ライチョウの保護活動. 二万年の奇跡を生きた鳥ライチョウ, pp.198-211.
農山漁村文化協会, 東京.
- 中村浩志. 2013f. 明らかになったライチョウの社会. 二万年の奇跡を生きた鳥ライチョウ,
pp.114-132. 農山漁村文化協会, 東京.
- 中村浩志. 2014. ニホンライチョウの現状と保護. ライチョウパネル展 2014 資料集 (報告書) ニホンライチョウの危機 神の鳥を失わないために, p.55. 岐阜大学 応用生物科学部 動物繁殖学研究室, 岐阜.
- 中村浩志, 小林 篤. 2015. 北アルプス大天井岳で確認されたニホンザルによるライチョウ雛の捕食. 第 16 回ライチョウ会議 静岡大会～市民で守り続ける南アルプスの自然～大会要旨集. p.10.
- Nakane Y, Shimura T, Abe H, Yoshimura T. 2014. Intrinsic photosensitivity of a deep brain photoreceptor. *Curr Biol* 24: 596-597.
- Nakao N, Ono H, Yamamura T, Anraku T, Takagi T, Higashi K, Yasuo S, Katou Y, Kageyama S, Uno Y, Kasukawa T, Iigo M, Sharp PJ, Iwasawa A, Suzuki Y, Sugano S, Niimi T, Mizutani M, Namikawa T, Ebihara S, Ueda HR, Yoshimura T. 2008. Thyrotropin in the pars tuberalis triggers photoperiodic response. *Nature* 452: 317-323.

- 長濱嘉孝. 2007. 副腎－ (2) コルチコイドの分泌と作用. 内分泌学 (川島誠一郎編著), pp.76-77. 朝倉書店, 東京.
- Ninnes CE, Waas JR, Ling N, Nakagawa S, Banks JC, Bell DG, Bright A, Carey PW, Chandler J, Hudson QJ, Ingram JR, Lyall K, Morgan DKJ, Stevens MI, Wallace J, Möstl E. 2010. Comparing plasma and faecal measures of steroid hormones in Adelie penguin *Pygoscelis adeliae*. *J Comp Physiol B* 180: 83-94.
- Nishiumi I, Yomoda N, Kasahara S, Nakamura H. 2012. Microsatellite DNA analysis divided Japanese rock ptarmigan into four genetic clusters. 12th International Grouse Symposium. Matsumoto, Japan. p.16.
- 岡本 新. 2001. 飛翔のあかしと子孫のための戦略—ニワトリの形態と繁殖. ニワトリの動物学, pp.31-74. 東京大学出版会, 東京.
- 尾形光昭, 小泉純一, 森角興起, 松本令以. 2006. 分子生物学的手法を用いたカンムリシギダチョウ (*Eudromia elegans*) の性判別. 野生動物医学会誌 11 : 79-81.
- Ogawa A, Solovei I, Hutchison N, Saitoh Y, Ikeda JE, Macgregor H, Mizuno S. 1997. Molecular characterization and cytological mapping of a non-repetitive DNA sequence region from W chromosome of chicken and its use as a universal probe for sexing Carinatae birds. *Chromosome Res* 5: 93-101.
- 小川 博, 桑山岳人, 一戸健司. 1989. ホロホロ鳥における精子の形成段階および血中テストステロン濃度の成長に伴う変化. 日本家禽学会誌 26 : 326-330.
- Oliver J, Baylé D. 1982. Brain photoreceptors for the photo-induced testicular response in birds. *Experientia* 38: 1021-1029.
- Ong AHK, Vellayan S. 2008. An evaluation of CHD-specific primer sets for sex typing of birds from feathers. *Zoo Biol* 27: 62-69.
- 大町市ライチョウ保護事業策定委員会. 2005. 氷河期から生きるライチョウとともに一大町市ライチョウ保護事業計画策定のための提言—
- Owens IPF, Short RV. 1995. Hormonal basis of sexual dimorphism in birds: implications for new

- theories of sexual selection. *Trends Ecol Evol* 10: 44-47.
- Parker TH, Ligon JD. 2007. Multiple aspects of condition influence a heritable sexual trait: a synthesis of the evidence for capture of genetic variance in red junglefowl. *Biol J Linn Soc* 92: 651-660.
- Pedersen ÅØ, Overrein Ø, Unander S, Fuglei E. 2005. Svalbard rock ptarmigan (*Lagopus mutus hyperboreus*). *Rapportserie Norsk Polarinstitutt* 125: 5-20.
- Péczei P, Astier H, Jallageas M. 1979. Reciprocal interactions between testis and thyroid in male Japanese quail. *Gen Comp Endocrinol* 37: 400-403.
- Persons NW, Hosner PA, Meiklejohn KA, Braun EL, Kimball RT. 2016. Sorting out relationships among the grouse and ptarmigan using intron, mitochondrial, and ultra-conserved element sequences. *Mol Phylogenet Evol* 98: 123-132.
- Peters A. 2007. Testosterone and carotenoids: an integrated view of trade-offs between immunity and sexual signaling. *BioEssays* 29: 427-430.
- ライチョウ域外保全プロジェクトチーム. 2015. スーパーラルライチョウ飼育ハンドブック, p.37 日本動物園水族館協会, 東京.
- Rani S, Kumar V. 2014. Photoperiodic regulation of seasonal reproduction in higher vertebrates. *Indian J Exp Biol* 52: 413-419.
- Reece OW. 2011a. 雄の生殖生理. 明解 哺乳類と鳥類の生理学 (鈴木勝士編), pp.396-419. 学窓社, 東京.
- Reece OW. 2011b. 雌の生殖生理. 明解 哺乳類と鳥類の生理学 (鈴木勝士編), pp.420-458. 学窓社, 東京.
- Redfield JA. 1973. Variations in weight of blue grouse (*Dendragapus obscurus*). *Condor* 75: 312-321.
- Regnaut S, Lucas FS, Fumagalli L. 2006. DNA degradation in avian faecal samples and feasibility of non-invasive genetic studies of threatened capercaillie populations. *Conserv Genet* 7: 449-453.
- Reierth E, Stokkan KA. 1998a. Activity rhythm in high arctic Svalbard ptarmigan (*Lagopus mutus*

- hyperboreus*). *Can J Zool* 76(11):2031-2039.
- Reierth E, Stokkan KA. 1998b. Dual entrainment by light and food in the Svalbard ptarmigan (*Lagopus mutus hyperboreus*). *J Biol Rhythms* 13(5): 393-402.
- Remington TE. 1989. Why do grouse have ceca?. A test of the fiber digestion theory. *J Exp Zool Suppl* 3: 87-94.
- Rintamäki PT, Höglund J, Karvonen E, Alatalo RV, Björklund N, Lundbert A, Rätti O, Vouti J. 2000. Combs and sexual selection in black grouse (*Tetrao tetrix*). *Behav Ecol* 11: 465-471.
- Robertson BC, Minot EO, Lambert DM. 1999. Molecular sexing of individual kakapo, *Strigops habroptilus* aves, from faeces. *Mol Ecol* 8: 1347-1350.
- Romero LM, Cyr NE, Romero RC. 2006. Corticosterone responses change seasonally in free-living house sparrows (*Passer domesticus*). *Gen Comp Endocrinol* 149: 58-65.
- Romero LM, Ramenofsky M, Wingfield JC. 1997. Season and migration alters the corticosterone response to capture and handling in an arctic migrant, the white-crowned sparrow (*Zonotrichia leucophrys gambelii*). *Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol* 116: 171-177.
- Romero LM, Soma KK, Wingfield JC. 1998. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis changes allow seasonal modulation of corticosterone in a bird. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 274: 1338-1344.
- Romero LM, Storchlic D, Wingfield JC 2005. Corticosterone inhibits feather growth: potential mechanism explaining seasonal down regulation of corticosterone during molt. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 142: 65-73.
- Rowan W. 1925. Relation of light to bird migration and developmental changes. *Nature* 115: 494-495.
- 酒井秀嗣, 佐藤 恵, 若林修一. 2005. 鳥類の繁殖期は秋から始まる?. 日本大学歯学部研究紀要 33 : 45-50.
- 斉藤守也, 入江 誠. 2000. 乗鞍コロナ観測所における気象観測. 国立天文台報 6 : 37-47.
- 佐藤 恵, 八嶋桂子, 塩谷正勝, 若林修一, 酒井秀嗣. 2008. 育雛期におけるウミネコ糞中コルチコステロンの変動. 日本大学歯学部紀要 36 : 49-54.

- 佐藤雪太. 2008. ニホンライチョウの原虫感染症. 獣医畜産新報 61 : 373-378.
- 佐久間康夫. 2006. 脳の性分化. 日本生理学雑誌 68 : 355-367.
- Sawa Y, Takeuchi Y, Nakamura H. 2011. Nest site selection and nesting biology of rock ptarmigan *Lagopus mutus japonicus* in Japan. *Bird study* 58: 200-207.
- Schwarzenberger F. 2007. The many uses of non-invasive faecal steroid monitoring in zoo and wildlife species. *Int Zoo Yearb* 41: 52-74.
- Schwarzenberger F, Brown JL. 2013. Hormone monitoring: an important tool for the breeding management of wildlife species. *Wien Tierärztl Monatsschr* 100: 209-225.
- Schwarzenberger F, Möstl E, Palme R, Bamberg E. 1996. Faecal steroid analysis for non-invasive monitoring of reproductive status in farm, wild and zoo animals. *Anim Reprod Sci* 42: 515-526.
- Schillo KK. 2011. 成熟雄における精巣機能の動態. スキッロ 動物生殖生理学 (佐々田比呂志, 高坂哲也, 橋爪一善編), pp.189-209. 講談社, 東京.
- Segelbacher G, Steinbüchel G. 2001. Bird faeces for sex identification and microsatellite analysis. *Vogelwarte* 41: 139-142.
- Sharp PJ, Klandorf H. 1985. Environmental and physiological factors controlling thyroid function in Galliformes. *The Endocrine System and the Environment* (Follett BK, Ishii S, Chandola A eds.), pp.175-188. Japan Scientific Societies Press, Tokyo.
- Sharp PJ, Moss R. 1977. The effects of castration on concentrations of luteinizing hormone in the plasma of photorefractory red grouse (*Lagopus lagopus scoticus*). *Gen Comp Endocrinol* 32: 289-293.
- Sharp PJ, Moss R. 1981. A comparison of the responses of captive willow ptarmigan (*Lagopus lagopus lagopus*), red grouse (*Lagopus lagopus scoticus*), and hybrids to increasing daylengths with observations on the modifying effects of nutrition and crowding in red grouse. *Gen Comp Endocrinol* 45: 181-188.
- Silverin B, Wingfield J, Stokkan KA, Massa R, Jarvinen A, Andersson NA, Lambrechts M, Sorace A, Blomqvist D. 2008. Ambient temperature effects on photo induced gonadal cycles and hormonal

- secretion patterns in great tits from three different breeding latitudes. *Horm Behav* 54: 60-68.
- Stavy M, Gilbert D, Martin RD. 1978. Routine determination of sex in monomorphic bird species using faecal steroid analysis. *Int Zoo Yearb* 19: 209-214.
- Steen JB, Unander S. 1985. Breeding biology of the Svalbard rock ptarmigan *Lagopus mutus hyperboreus*. *Ornis Scand* 16: 191-197.
- Stokkan KA. 1979a. Testosterone and daylength-dependent development of comb size and breeding plumage of male willow ptarmigan (*Lagopus lagopus lagopus*). *Auk* 96: 106-115.
- Stokkan KA. 1979b. The effect of permanent short days and castration on plumage and comb growth in male willow ptarmigan (*Lagopus lagopus lagopus*). *Auk* 96: 682-687.
- Stokkan KA, Harvey S, Klandorf H, Unander S, Bilx AS. 1985. Endocrine changes associated with fat deposition and mobilization in Svalbard ptarmigan (*Lagopus mutus hyperboreus*). *Gen Comp Endocrinol* 58: 76-80.
- Stokkan KA, Lindgård K, Reiherth E. 1995. Photoperiodic and ambient temperature control of the annual body mass cycle in Svalbard ptarmigan. *J Comp Physiol B* 165: 359-365.
- Stokkan KA, Morthensen A, Blix AS. 1986a. Food intake, feeding rhythm, and body mass regulation in Svalbard rock ptarmigan. *Am J Physiol* 251:264-267.
- Stokkan KA, Sharp PJ, Dunn IC, Lea RW. 1988. Endocrine changes in photostimulated willow ptarmigan (*Lagopus lagopus lagopus*) and Svalbard ptarmigan (*Lagopus mutus hyperboreus*). *Gen Comp Endocrinol* 70: 169-177.
- Stokkan KA, Sharp PJ. 1980a. Seasonal changes in the concentrations of plasma luteinizing hormone and testosterone in willow ptarmigan (*Lagopus lagopus lagopus*) with observations on the effects of permanent short days. *Gen Comp Endocrinol* 40: 109-115.
- Stokkan KA, Sharp PJ. 1980b. The roles of day length and the testes in the regulation of plasma LH levels in photosensitive and photorefractory willow ptarmigan (*Lagopus lagopus lagopus*). *Gen Comp Endocrinol* 41: 520-526.
- Stokkan KA, Sharp PJ. 1980c. The development of photorefractoriness in willow ptarmigan

- (*Lagopus lagopus lagopus*) after the suppression of photoinduced LH release with implants of testosterone. *Gen Comp Endocrinol* 41: 527-530.
- Stokkan KA, Sharp PJ. 1984. The development of photorefractoriness in castrated willow ptarmigan (*Lagopus lagopus lagopus*). *Gen Comp Endocrinol* 54: 402-408.
- Stokkan KA, Sharp PJ, Moss R. 1982. Development of photorefractoriness in willow ptarmigan (*Lagopus lagopus lagopus*) and red grouse (*Lagopus lagopus scoticus*) exposed to different photoperiods. *Gen Comp Endocrinol* 46: 281-287.
- Stokkan KA, Sharp PJ, Unander S. 1986b. The annual breeding cycle of high-arctic Svalbard ptarmigan (*Lagopus mutus hyperboreus*). *Gen Comp Endocrinol* 61: 446-451.
- Sundström H, Webster MT, Ellegren H. 2003. Is the rate of insertion and deletion mutation male biased?. molecular evolutionary analysis of avian and primate sex chromosome sequences. *Genetics* 164: 259-268.
- Suzuki A, Kobayashi A, Nakamura H, Takasu F. 2013. Population variability analysis of the Japanese rock ptarmigan *Lagopus muta japonica* in Japan. *Wildlife Biol* 19: 339-346.
- Swengel SR. 1996. Special techniques, C: Sex determination. *Cranes: Their Biology, Husbandry, and Conservations* (Ellis DH, Gee GF, Mirande CM eds), pp.223-231. National Biological Service, Washington DC / International Crane Foundation, Baraboo.
- Taberlet P, Luikart G. 1999. Non-invasive genetic sampling and individual identification. *Biol J Linn Soc Lond* 68: 41-55.
- 高橋幸裕, 石井淳子, 前田美幸. 2012. スーパーバルライチョウの人工孵化と育雛. どうぶつと動物園 64(3) : 10-16.
- 田中克英. 2007. 家禽の繁殖生理. 最新家畜家禽繁殖学 pp.129-142. 養賢堂, 東京.
- Tempel DJ, Gutiérrez RJ. 2004. Factors related to fecal corticosterone levels in California spotted owls: Implications for assessing chronic stress. *Conserv Biol* 18: 538-547.
- Thiel D, Jenni-Eiermann S, Palme R. 2005. Measuring corticosterone metabolites in droppings of capercaillies (*Tetrao urogallus*). *Ann NY Acad Sci* 1046: 96-108.

- Ubuka T, Bentley GE. 2011. Neuroendocrine control of reproduction in birds. *Hormones and Reproduction of Vertebrates, Volume 4: Birds*(Norris DO, Lopez KH eds.), pp.1-26. Academic Press, New York.
- Ubuka T, Haraguchi S, Tobari Y, Narihiro M, Ishikawa K, Hayashi T, Harada N, Tsutsui K. 2014. Hypothalamic inhibition of socio-sexual behavior by increasing neuroestrogen synthesis. *Nat Commun* 5: Article number: 3061 doi:10.1038/ncomms4061.
- 上馬康生, 佐川貴久. 2011. 白山におけるライチョウの生息可能数の推定と絶滅について. 石川県白山自然保護センター研究報告 38 : 47-56.
- 海川庄一, 宮野典夫. 1992. ライチョウの飼育. ライチョウ 生活と飼育への挑戦 (大町山岳博物館編), pp.57-156. 信濃毎日新聞社, 長野.
- Unander S, Mortensen A, Elvebakk A. 1985. Seasonal changes in crop content of the Svalbard ptarmigan *Lagopus mutus hyperboreus*. *Polar Res* 3: 239-245.
- Unander S, Steen JB. 1985. Behavior and social structure in Svalbard rock ptarmigan *Lagopus mutus hyperboreus*. *Ornis Scand* 16: 198-204.
- Ushida K, Segawa T, Tsuchida S, Murata K. 2016. Cecal bacterial communities in wild Japanese rock ptarmigans and captive Svalbard rock ptarmigans. *J Vet Med Sci* 78: 251-257.
- Verhulst S, Dieleman SJ, Parmentier HK. 1999. A tradeoff between immunocompetence and sexual ornamentation in domestic fowl. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 4478-4481.
- Vucicevic M, Stevanov-Pavlovic M, Stevanovic J, Bosnjak J, Gajic B, Aleksic N, Stanimirovic Z. 2013. Sex determination in 58 bird species and evaluation of CHD gene as a universal molecular marker in bird sexing. *Zoo Biol* 32: 269-276.
- Vynne C, Baker MR, Breuer ZK, Wasser SK. 2011. Factors influencing degradation of DNA and hormones in maned wolf scat. *Anim Conserv* 15: 184-194.
- Wada M. 1981. Effects of photostimulation, castration, and testosterone replacement on daily patterns of calling and locomotor activity in Japanese quail. *Horm Behav* 15: 270-281.
- Wada M. 1982. Effects of sex steroids on calling, locomotor activity, and sexual behavior in castrated

- male Japanese quail. *Horm Behav* 16: 147-157.
- 渡部浩文, 高橋幸裕. 2015. 動物園で行うライチョウの域外保全. 第16回ライチョウ会議 静岡大会～市民で守り続ける南アルプスの自然～大会要旨集, p.11.
- Watanabe M, Yasuo S, Watanabe T, Yamamura T, Nakao N, Ebihara S, Yoshimura T. 2004. Photoperiodic regulation of type 2 deiodinase gene in djungarian hamster: possible homologies between avian and mammalian photoperiodic regulation of reproduction. *Endocrinology* 145: 1546-1549.
- Watoson GE. 1963. The mechanism of feather replacement during nature molt. *Auk* 80: 486-495.
- Wiebe KL, Martin K. 1998. Age-specific patterns of reproduction in white-tailed and willow ptarmigan *Lagopus leucurus* and *L. lagopus*. *Ibis* 140: 14-24.
- Wilson S, Martin K. 2010. Variable reproductive effort for two ptarmigan species in response to spring weather in a northern alpine ecosystem. *J Avian Biol* 41: 319-326.
- Wingfield JC, Hahn TP, Maney DL, Schoech SJ, Wada M, Morton ML. 2003. Effects of temperature on photoperiodically induced reproductive development, circulating plasma luteinizing hormone and thyroid hormones, body mass, fat deposition and molt in mountain white-crowned sparrows, *Zonotrichia leucophrys oriantha*. *Gen Comp Endocrinol* 131: 143-158.
- 山口剛士, 福士秀人, 平井克哉. 2000. 忍び寄る山岳地帯の微生物汚染ーライチョウ新鮮糞便からの細菌分離ー. 獣医畜産新報 53 : 923-927.
- Yamamura T, Yasuo S, Hirunagi K, Ebihara S, Yoshimura T. 2006. T₃ implantation mimics photoperiodically reduced encasement of nerve terminals by glial processes in the median eminence of Japanese quail. *Cell Tissue Res* 324: 175-179.
- Yang C, Wang J, Fang Y, Sun YH. 2013. Is sexual ornamentation an honest signal of male quality in the Chinese grouse (*Tetrastes sewerzowi*)?. *PLoS One* 8(12): e82972.
doi:10.1371/journal.pone.0082972
- Yasuo S, Watanabe M, Okabayashi N, Ebihara S, Yoshimura T. 2003. Circadian clock genes and photoperiodism: comprehensive analysis of clock gene expression in the mediobasal

hypothalamus, the suprachiasmatic nucleus, and the pineal gland of Japanese quail under various light schedules. *Endocrinology* 144: 3742-3748.

横山 昭. 2007. 繁殖のホルモン. 最新家畜家禽繁殖学, pp.1-22. 養賢堂, 東京.

Yoshimura T, Yasuo S, Watanabe M, Iigo M, Yamamura T, Hirunagi K, Ebihara S. 2003. Light-induced hormone conversion of T4 to T3 regulates photoperiodic response of gonads in birds. *Nature* 426: 178-181.

Zhang P, Han J, Liu Q, Zhang J, Zhang X. 2013. Sex identification of four penguin species using locus-specific PCR. *Zoo Biol* 32: 257-261.

Zimmerman GS, Millspaugh JJ, Link WA, Woods RJ, Gutiérrez RJ. 2013. A flexible Bayesian hierarchical approach for analyzing spatial and temporal variation in the fecal corticosterone levels in birds when there is imperfect knowledge of individual identity. *Gen Comp Endocrinol* 194: 64-70.

Zuk M, Johnsen TS, Maclarty T. 1995. Endocrine-immune interactions, ornaments and mate choice in red jungle fowl. *Proc R Soc London B* 260: 205-210.