

氏名(本籍)	中村幸子(岐阜県)		
学位の種類	博士(獣医)		
学位記番号	獣医博甲第263号		
学位授与年月日	平成20年9月12日		
学位授与の要件	学位規則第3条第1項該当		
研究科及び専攻	連合獣医学研究科 獣医学専攻		
研究指導を受けた大学	岐阜大学		
学位論文題目	Studies on the Relationship between Reproduction and Maternal Nutritional Condition in the Japanese Black Bear (<i>Ursus thibetanus japonicus</i>) (ニホンツキノワグマにおける繁殖と母体栄養状態の関連性)		
審査委員	主査	岐阜大学	教授 鈴木正嗣
	副査	帯広畜産大学	教授 三宅陽一
	副査	岩手大学	教授 居在家義昭
	副査	東京農工大学	教授 田谷一善
	副査	岐阜大学	教授 北川均
	副査	北海道大学	教授 坪田敏男

論文の内容の要旨

ニホンツキノワグマ (*Ursus thibetanus japonicus*) (以下, クマ) は, 着床遅延や冬眠などに代表される興味深い生態学的, 生理学的特徴を持つ。冬眠期間中, クマは一切の採食, 飲水を行わない。また妊娠雌グマはこの間に産卵し, 授乳を開始する。従って, 約5ヶ月間続く冬眠中の自身の生命および子孫維持のために, 脂肪蓄積はクマにとって重要であると考えられる。事実, 秋の脂肪蓄積量はクマの着床や繁殖率に影響を与えることが報告されている。しかし, クマの栄養状態がどのようなメカニズムや要因, または作用により繁殖に影響を与えるかについては, 未だ十分に解析されていない。そこで本研究は, 脂肪と繁殖の両者に関与するホルモンであるレプチンに着目し, 以下に示す三段階からなる研究を行った。

初めに, クマの脂肪蓄積量, およびその季節変動に関する知見を得た(第二章)。

Bioelectrical impedance analysis (BIA)により, 飼育および野生グマの体脂肪量 (FM) を測定した。5頭の飼育雌グマに対して2005年9月から2006年1月までFMを経時的に測定した結果, FMと体重 (BM) 変動は高い相関 ($r=0.81$, $P<0.01$) を示した。飼育クマにおける体脂肪率 (FR) は季節変動を示し, 9月初旬に最低値 ($29.3 \pm 3.3\%$) を, 12月に最高値 ($41.6 \pm 3.0\%$) を示した。岐阜県および山梨県にて2006年6月から11月に捕獲された13頭の野生グマのFRは, 6.9から31.7%であり, 飼育個体のFRと比較すると低い値であった。以上の結果より, BIAによりクマのFRが示され, その季節変動が明らかとなった。

次に, 血中レプチン分泌組織の特定および血中レプチン濃度変動の観察を行い, 冬眠前に

におけるレプチンの食欲および繁殖に関する作用を検討した（第三章）。白色脂肪組織（WAT）がレプチン産生源であることを確認するため、飼育下妊娠雌クマを用いて real-time RT-PCR による WAT 内レプチン mRNA 発現半定量、WAT 細胞サイズ index、および血中レプチン濃度測定を行った。続いてこれらの結果を基に、クマにおけるレプチンの作用について考察した。WAT におけるレプチン mRNA 発現はサンプリング期間（9月から翌1月まで）を通して確認され、11月下旬と1月にその発現が高い傾向にあった。WAT 細胞サイズ index と血中レプチン濃度変動は高い相関 ($r=0.55$, $P<0.01$) を示し、共に11月に有意に上昇した。これらの結果より、クマにおいてレプチンは WAT より分泌され、血中レプチン濃度は彼らの脂肪量、すなわち栄養状態を表すことが明らかとなった。一方、脂肪蓄積時期である11月中も、血中レプチンは高濃度を示した。血中レプチン濃度は脂肪量と相関することから、クマは秋の脂肪蓄積が冬眠や繁殖に十分な量に達しているかを、レプチンを指標として感知していると考えられた。クマは、自身の秋の脂肪蓄積状態を正確に把握する必要があり、脂肪蓄積量はそれに続く繁殖や冬眠中の生存に大きな影響を与えることが予想された。

最後に、雌生殖器におけるレプチン作用部位を特定した（第四章）。2006年7月から12月に有害捕獲された成熟雌クマより卵巣および子宮を採取し、これらの組織におけるレプチンレセプター（Ob-R）の発現を免疫組織化学染色により確認した。卵巣内に観察された黄体は、組織学的特徴により3タイプに分類された。タイプ1は黄体の最大直径が3から7mmであり、黄体細胞の細胞質に多くの空胞が確認された。これらは機能黄体と考えられた。タイプ2は黄体の最大直径が約7mmであり、黄体細胞質内に空胞がほとんど認められなかった。これらは退行初期の黄体と考えられた。タイプ3は最大直径が約1mmであり、黄体細胞間に多数の膠原繊維が確認された。これらは退行が進行した黄体とされた。これら3タイプの黄体は、Ob-R 染色に対してそれぞれ異なる反応を示した。すなわち、タイプ1は陽性像、タイプ2は非常に弱い陽性像、そしてタイプ3は陰性像を示した。機能的または退行初期の特徴を示す黄体（タイプ1および2）を持つクマでは、発達した子宮腺が観察され、それらは Ob-R 陽性像を呈した。一方、退行が進行した黄体（タイプ3）を持つ、または黄体を持たないクマでは、未発達の子宮腺が観察され、それらは Ob-R 陰性像を呈した。これらの結果より、レプチンは黄体や子宮内膜に直接作用し、それらの発達や機能維持に必要であることを示唆する。クマにおいてレプチンは、栄養状態と繁殖システム間の生理的伝達を担う重要な役割を果たすと考えられた。

本研究により、クマにおいてレプチンは WAT より分泌され、クマの雌生殖器に直接作用することが明らかとなった。冬眠前の脂肪蓄積が十分ではなかった場合、このメカニズムによりクマの繁殖は抑制される可能性が示唆された。これはクマの繁殖メカニズムが、当該年の食物供給量に影響されやすいことを意味する。従って、クマの保全には、秋季の主要な食糧となるブナなどの堅果類に注目しつつ、森林環境のモニタリングや管理を行う必要がある。クマは繁殖と冬眠に備えた体脂肪蓄積を行うため、索餌行動と関連深い行動圏面積もまた、当該年の食物供給量に影響を受けやすい。それ故、クマの行動パターン（人間の生活圏への侵入や農業被害）に関する情報収集が、市街地等における効果的な出没予測や対策立案に重要となる。これらのモニタリングを総合的に行うことにより、クマの個体群の保全や人間との軋轢の軽減に有用な情報が蓄積されるであろう。

審 査 結 果 の 要 旨

本研究は、ニホンツキノワグマ (*Ursus thibetanus japonicus*) (以下、クマ) の脂肪と繁殖に関与するレプチンに着目し、三段階からなる実験を行った。

まず、Bioelectrical impedance analysisにより飼育および野生グマの体脂肪量を測定した。飼育雌グマに対し2005年9月から翌年1月まで体脂肪量を測定した結果、体脂肪量と体重変動に高い相関を認めた。体脂肪率は季節変動を示し、9月初旬に最低値を、12月に最高値を示した。6月から11月に捕獲された野生グマの体脂肪率は、6.9～31.7%と飼育個体に比べ低かった。

次に、妊娠グマを用いreal-time RT-PCRによる白色脂肪組織(WAT)内レプチンmRNA発現半定量、WAT細胞サイズ、血中レプチン濃度測定を行った。WATでのレプチンmRNA発現は2005年9月～翌1月を通じ確認され、11月下旬と1月に高い傾向があった。WAT細胞サイズと血中レプチン濃度は高い相関を示し、共に11月に有意に上昇した。これらの結果より、クマでもレプチンはWATより分泌され、その濃度は脂肪量(栄養状態)を反映することが明らかとなった。レプチン濃度は脂肪量と相関することから、クマは秋の脂肪蓄積が冬眠や繁殖に十分な量に達しているかを、レプチンを指標に感知している可能性が考えられた。

最後に、2006年7～12月に成熟個体から採取した卵巣(黄体)と子宮を用い、レプチンレセプター(Ob-R)の発現を免疫組織化学的に検索した。黄体は組織学的に3タイプに分類された。タイプ1は機能黄体と考えられ、最大直径が3～7mmで黄体細胞の細胞質に多くの空胞が確認された。タイプ2は退行初期の黄体と考えられ、最大直径が約7mmで細胞質の空胞はほとんど認められなかった。タイプ3は退行が進行した黄体と判断され、最大直径が約1mmで黄体細胞間に多数の膠原繊維が確認された。免疫染色において、Ob-Rはタイプ1では陽性、タイプ2では極めて弱い陽性、タイプ3では陰性を示した。タイプ1あるいはタイプ2を持つクマでは発達した子宮腺が観察され、それらはOb-R陽性を呈した。タイプ3の黄体を持つクマが認められなかったクマの子宮腺は未発達でOb-R陰性であった。これらの結果から、レプチンは黄体や子宮内膜に直接作用し、その発達や機能維持に必要なことが示唆された。

以上より、クマのレプチンは、栄養状態と繁殖システム間の生理的伝達を担う物質として、雌生殖器に直接作用することが明らかにされた。そして、冬眠前の脂肪蓄積が不十分な場合、このメカニズムによりクマの繁殖は抑制される可能性が示唆された。

以上について、審査委員全員一致で本論文が岐阜大学大学院連合獣医学研究科の学位論文として十分価値があると認めた。

基礎となる学術論文

- 1) 題 目 : Use of bioelectrical impedance analysis to measure the fat mass of the Japanese black bear (*Ursus thibetanus japonicus*)
著 者 名 : Nakamura, S., Okano, T., Yoshida, Y., Matsumoto, A., Murase, Y., Kato, H., Komatsu, T., Asano, M., Suzuki, M., Sugiyama, M. and Tsubota, T.
学術雑誌 : Japanese Journal of Zoo and Wildlife Medicine
巻・号・頁・発行年 : 13 (1) : 15-20, 2008
- 2) 題 目 : Relationships among changes of serum leptin concentration, leptin mRNA expression in white adipose tissue (WAT), and WAT fat-cell size in female Japanese black bears (*Ursus thibetanus japonicus*)

著者名 : Nakamura, S., Okano, T., Shibata, H., Saito, M., Komatsu, T., Asano, M., Sugiyama, M., Tsubota, T. and Suzuki, M.

学術雑誌 : Canadian Journal of Zoology

卷・号・頁・発行年 : 印刷中

既発表学術論文

- 1) 題 目 : Characteristics of frozen-thawed spermatozoa cryopreserved with different concentrations of glycerol in captive Japanese black bears (*Ursus thibetanus japonicus*)

著者名 : Okano, T., Nakamura, S., Komatsu, T., Murase, T., Miyazawa, K., Asano, M. and Tsubota, T.

学術雑誌 : The Journal of Veterinary Medical Science

卷・号・頁・発行年 : 68 (10) : 1101 - 1104, 2006

- 2) 題 目 : Incidence of ovulation without coital stimuli in captive Japanese black bears (*Ursus thibetanus japonicus*) based on serum progesterone profiles

著者名 : Okano, T., Nakamura, S., Nakashita, R., Komatsu, T., Murase, T., Asano, M. and Tsubota, T.

学術雑誌 : The Journal of Veterinary Medical Science

卷・号・頁・発行年 : 68 (10) : 1133 - 1137, 2006

- 3) 題 目 : Immobilization of Japanese black bears (*Ursus thibetanus japonicus*) with tiletamine hydrochloride and zolazepam hydrochloride

著者名 : Asano, M., Tsubota, T., Komatsu, T., Katayama, A., Okano, T. and Nakamura, S.

学術雑誌 : The Journal of Veterinary Medical Science

卷・号・頁・発行年 : 69 (4) : 433 - 435, 2007

- 4) 題 目 : *Hepatozoon ursi* n. sp. (Apicomplexa: Hepatozoidae) in Japanese black bear (*Ursus thibetanus japonicus*)

著者名 : Kubo, M., Uni, S., Agatsuma, T., Nagataki, M., Panciera, R. J., Tsubota, T., Nakamura, S., Sakai, H., Masegi, T. and Yanai, T.

学術雑誌 : Parasitology International

卷・号・頁・発行年 : 57 (3) : 287 - 294, 2008