



岐阜大学機関リポジトリ

Gifu University Institutional Repository

飼育下キタオットセイの長期モニタリングによる血液性状の周年変動と繁殖生理に関する研究

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2022-06-22 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 香山, 薫 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12099/88154

飼育下キタオットセイの長期モニタリングによる
血液性状の周年変動と繁殖生理に関する研究

2021 年

岐阜大学大学院連合獣医学研究科

香 山 薫

飼育下キタオットセイの長期モニタリングによる
血液性状の周年変動と繁殖生理に関する研究

香 山 薫

目 次

緒 言	1
図 表	5
第 1 章 飼育下キタオットセイ (<i>Callorhinus ursinus</i>) 血液性状と過去 に報告された野生下キタオットセイ血液性状との比較に関する 研究	
序 論	10
材料および方法	12
1) 供試動物	12
2) 試料採取	13
3) 計測および集計	14
結 果	15
考 察	17
図 表	21
第 2 章 キタオットセイ血液性状の季節に伴う変動に関する研究	
序 論	30
材料および方法	33
1) 供試動物	33
2) 試料採 取および計測	33
3) データ解析	34
結 果	36
考 察	38
図 表	42

第3章 キタオットセイ (*Callorhinus ursinus*) の成長と性ステロイドホルモンの消長に関する研究

序 論	54
材料および方法	56
1) 供試動物	56
2) 試料採取	56
3) 性ステロイドホルモンの計測	57
4) 成長と春機発動の関係	58
5) 過去に得られたプロゲステロン計測記録の分析	58
結 果	60
1) 雄獣	60
2) 雌獣	61
3) 春機発動と体重の関係	62
4) プロゲステロン値を用いた妊娠診断	62
考 察	64
図 表	71
総 括	77
謝 辞	81
引用文献	83

略語一覧

- ALP : alkaline phosphatase アルカリ性フォスファターゼ
- BCC : blood cell counts 自動血球分析装置 XN-9100 を使用した多項目
自動血球分析
- BMPB : body mass prior to the breeding season 繁殖期前体重の指標
- BUN : blood urea nitrogen 血中尿素体窒素
- Ca : Calcium カルシウムの元素記号
- Cl : Chlorine 塩素の元素記号
- CI: confidence interval 信頼区間
- COD : cholesterol oxidase コレステロールオキシダーゼ
- COSEWIC : committee on the status of endangered wildlife in Canada
カナダ絶滅危惧野生生物現状調査委員会
- CPK (CK) : creatine (phosphor) kinase クレアチン (ホスフォ)
キナーゼ
- DC : direct current 直流
- EDTA : ethylenediaminetetraacetic acid エチレンジアミン四酢酸
- FC: flow cytometry フローサイトメトリー法を用いた機器 (ADVIA2121i)
を使用した複数種血液分析
- FCM : flow cytometer フローサイトメーター
- GK : glycerol kinas グリセロールキナーゼ
- GLMM : generalized linear mixed model 一般化線形混合モデル
- γ -GT : γ -glutamyltransferase γ -グルタミル基転移酵素
- GPO : Glycerophosphate oxidase グリセロール 3 リン酸オキシダーゼ
- ID : identifier 識別子

IFCC : international federation of clinical chemistry and laboratory
medicine 国際臨床化学連合

JSCC : Japan society of clinical chemistry 日本臨床化学会

LAP : leucine aminopeptidase ロイシンアミノ基加水分解酵素

LED : light emitting diode 発光ダイオード

LOESS : locally weighted scatter-plot smoothing 局所加重回帰

MCV : mean corpuscular volume 平均赤血球容積

MCH : mean corpuscular hemoglobin 平均赤血球血色素量

MCHC : mean corpuscular hemoglobin concentration 平均赤血球血色素濃度

Na : sodium ナトリウムの元素記号

n.d. : no data available データなし

n.l. : not listed in the study 研究内に計測項目なし

NOAA : national oceanic and atmospheric administration アメリカ海洋
大気庁

NPr : non-pregnant 非妊娠個体

P : phosphorus 燐の元素記号

P : p-value P 値

POD : peroxidase ペルオキシダーゼ

Pr : pregnant 妊娠個体

PSAP : N-ethyl-N-sulfopropylaminophenol N プロピル N スルホプロピル
アミノフェノール

RIA : radioimmunoassay 放射免疫測定

SD : standard deviation 標準偏差

SDA : seasonal decomposition analysis 季節分解分析

SE : standard error 標準誤差

SLS : sodium lauryl sulfate ラウリル硫酸ナトリウム

stl : seasonal decomposition of time series by loess 時系列データをトレンド，季節性，残差に分解する R 言語における関数名

TTT : thymol turbidity test チモール混濁試験

u.c. : unable to calculate 計算不能

USDA : United States Department of Agriculture アメリカ農務省

UV : ultraviolet 紫外線

ZTT : zinc sulfate turbidity test 硫酸亜鉛混濁試験

緒 言

キタオットセイ *Callorhinus ursinus* は哺乳綱 Mammalia 食肉目 Carnivora アシカ科 Otariidae オットセイ亜科 Arctocephalinae キタオットセイ属 *Callorhinus* に属し、オホーツク海、ベーリング海を中心とした北部太平洋に局在する 1 属 1 種の海棲哺乳類である (31, 40, 74) (図 I)。主な生息域である水温 12°C 以下の冷たさから身を守る方法として毛皮による断熱に拠るところがカリフォルニアアシカ *Zalophus californianus* やトド *Eumetopias jubatus* など他のアシカ科動物と比較して大きく、毛皮の二重構造 (under fur と over coat) はオットセイ亜科、中でもキタオットセイに顕著な特徴である (31, 40, 74)。

雄は体長 2.1m 程度、体重は季節による変動があるが最大 270kg まで成長する。一方、雌は体長 1.5m 程度、体重は 50kg を超えることは少ない。このようにキタオットセイは明らかな性的二形を示す動物であり、体重比で考えた場合、最も大きな性的二形を示す哺乳類である (31, 74) (図 II)。また、一夫多妻の繁殖形態を持ついわゆるハーレムを作る種であり、繁殖期には米国・アラスカ州に属するプリビロフ諸島やロシアのコマンダー諸島、および千島列島など北部太平洋に 6~7 ヶ所ある繁殖島に集結して大集団を作る (図 III・図 IV)。成熟雄は 5 月下旬からルッカリーと呼ばれる繁殖場で縄張りを確保し、繁殖に適した縄張りを確保できた雄は数頭から多い時は 20 頭以上の成熟雌を囲い込み繁殖を行う。縄張りを確保した成熟雄 (ハーレムブル) は繁殖島に上陸した 5 月下旬から繁殖シーズンが終わって繁殖島を離れるまで絶食し、不眠不休で縄張りを守る。成熟雌は 6 月中旬頃か

ら各個体で毎年ほぼ決まった場所に上陸し、6月下旬から7月上旬にかけて殆どの場合1仔を出産、その後約1週間で発情し交尾する。子育て中は2~3日の哺乳と1週間前後の索餌を繰り返す。新生仔は6~7kgで出生し、生後数日は母獣のそばで過ごす。母獣が索餌に行くようになると新生仔だけで集まるポッドと呼ばれる集団を作る(図V)。索餌から戻った母獣は鳴き声で呼び合いながら自分の子供を探して哺乳する(4, 31, 74)。

最も早く繁殖島に上陸した成熟雄は8月下旬から9月前半には徐々に島を離れて索餌回遊を始める。成熟雌は10月半ば、当歳獣も11月には繁殖島を離れる。繁殖島を離れた成熟個体は翌年の繁殖期まで上陸することなく、広く海上を索餌回遊して過ごす(31, 74, 109)。当歳獣を含む未成熟個体の動向は現在研究が進んでいるが、性成熟するまで上陸することなく北部太平洋上で過ごすものと考えられている(115)。このようにキタオットセイは1年のおよそ1/3を繁殖島で過ごし、残りの2/3は全く上陸することなく広く大洋上を索餌回遊して過ごすという極めて特徴的なライフサイクルを持つことから(31, 74)、索餌回遊期における血液性状や性ホルモンの発現動態などの詳細はいまだ不明な点が多い。

キタオットセイは19世紀から20世紀初頭にかけて、その上質な毛皮を目的とした乱獲が進み絶滅の危機に瀕したが(53, 78, 82)、1911年に日本、米国、ロシアおよびカナダの関係4ヶ国間で締結した「膾炙獣保護条約 North Pacific Fur Seal Convention of 1911」を契機として保護が進み、生息数は徐々に回復した(53, 78, 82)。その後の生息数は比較的安定していたが、1980年代以降原因のはっきりしない生息数の減少、出生数の減少が進みつつある(27, 30, 99,

100) (図VI)。現在の世界の生息数は 100 万～120 万頭と推定されており、また 1985 年以降は毛皮を目的とした商業捕獲は世界的に禁止されていることから直ちに絶滅の危機に瀕しているとも言えないものの、近年の原因不明の生息数減少は憂慮すべき状況であると考えられる (4, 30)。

キタオットセイの近代的研究は Elliot による毛皮の安定的な収量を目的とした保護政策のための生息数推計から始まったものと考えられる (66)。その後、回游期における目視調査や洋上捕獲による研究、繁殖島における生態調査を用いた研究などによりキタオットセイの回游状況や食性、繁殖生態 (4, 11, 31) などが明らかになった。近年ではテレメトリー (5, 22, 55, 83, 115) やデータロガーを用いた行動調査 (55, 115)、安定同位体を利用した詳細な食性研究 (114) なども進んでいる。一方で主にカナダと日本で行われた飼育下研究では、飼育環境による変動の可能性が残るものの摂餌量の記録や行動記録の蓄積だけでなくキタオットセイの網絡まりに関する検証実験 (112, 113)、テレメトリーおよびデータロガーに関する基礎研究 (45)、安定同位体に関する基礎研究 (46, 47)、繁殖生理に関する研究 (50, 51)、人工哺育技術の確立 (52) などが進められた。カナダにおける飼育下研究は次第に下火となり、近年は日本における飼育下研究がほぼ唯一といえる状況である。

野生下におけるキタオットセイの生理学的・血液学的研究は、その特徴的なライフサイクルのため繁殖島に上陸する期間において行われることが多く、広く大洋を回游して過ごす索餌回游期の情報には乏しいことから、年間を通じての血液学的情報は得られていない (図VII)。また、繁殖島に帰島しない春機発動前の個体における繁殖生理に関する

る情報も極めて乏しく、多くの情報が欠落している。現在、飼育下個体を用いた研究により成熟個体の繁殖生理については徐々に明らかになりつつあると言えるが、いまだ詳細は不明な点が残る。

本研究では、野生下個体と飼育下個体の血液性状の差異、血液性状の季節に伴う変動、成長と性ステロイドホルモンおよび春機発動との関係の3点に注目し、これらを明らかにすることを目的として、日本におけるキタオットセイ飼育下研究を継続する形で、同一個体における飼育下キタオットセイ血液性状の長期モニタリングを行なった。



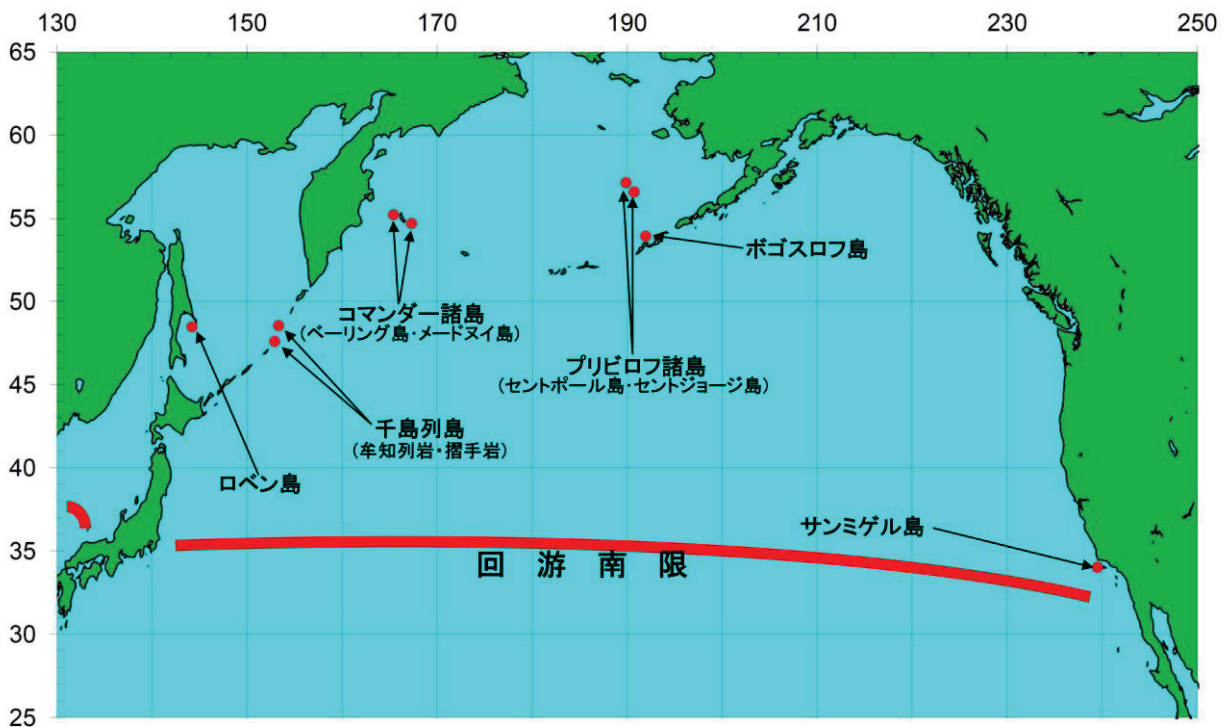
図Ⅰ．伊豆・三津シーパラダイス自然飼育場におけるキタオットセイの母子（2009年6月撮影）。



図Ⅱ．伊豆三津・シーパラダイス自然飼育場におけるキタオットセイ。雄個体と雌個体の体格差を示す（2015年6月撮影）。



図Ⅲ．繁殖島（米国プリビロフ諸島セント・ポール島）におけるいわゆるハーレム。中央の大きい雄個体がハーレムブル（1985年7月米国セント・ポール島にて撮影）。



図Ⅳ．主な繁殖島（●）と回游範囲を示す（馬場 1995, Gentry 1998, 清田 2006 を元に作成）。



図 V. 繁殖島（米国プリビロフ諸島セント・ポール島）におけるポッド（新生仔だけの集団）。黒っぽい小型の個体がこの年に産まれた新生仔たち（1985年7月米国セント・ポール島にて撮影）。

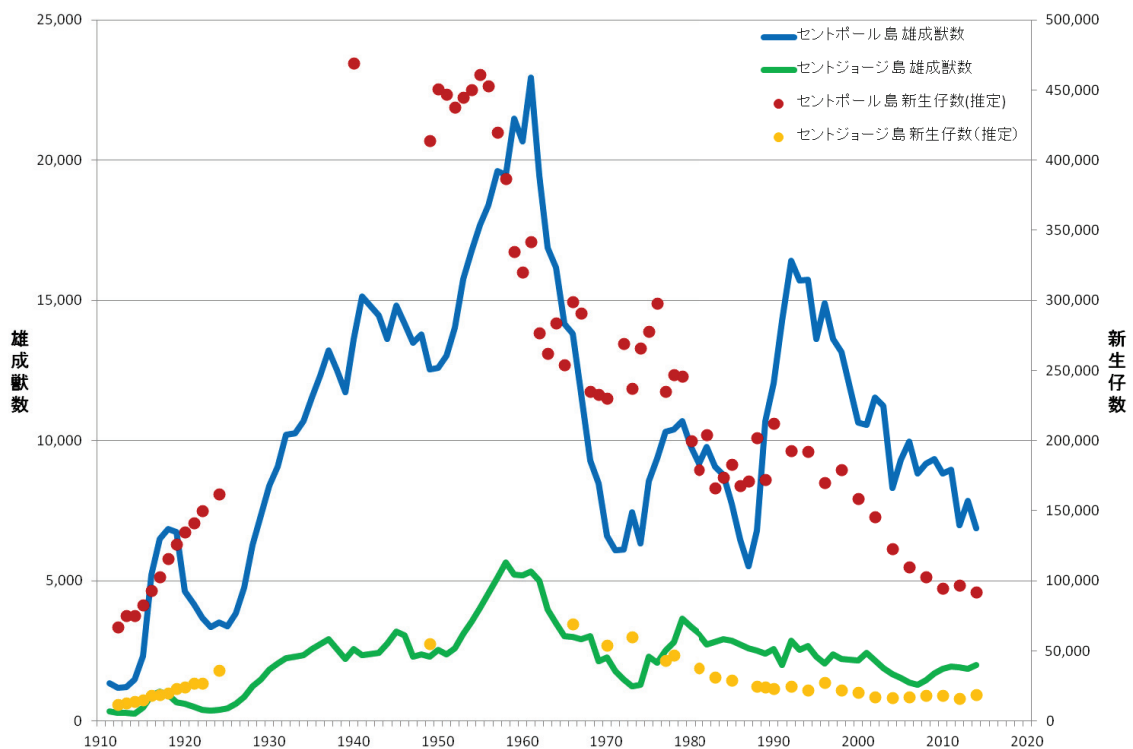
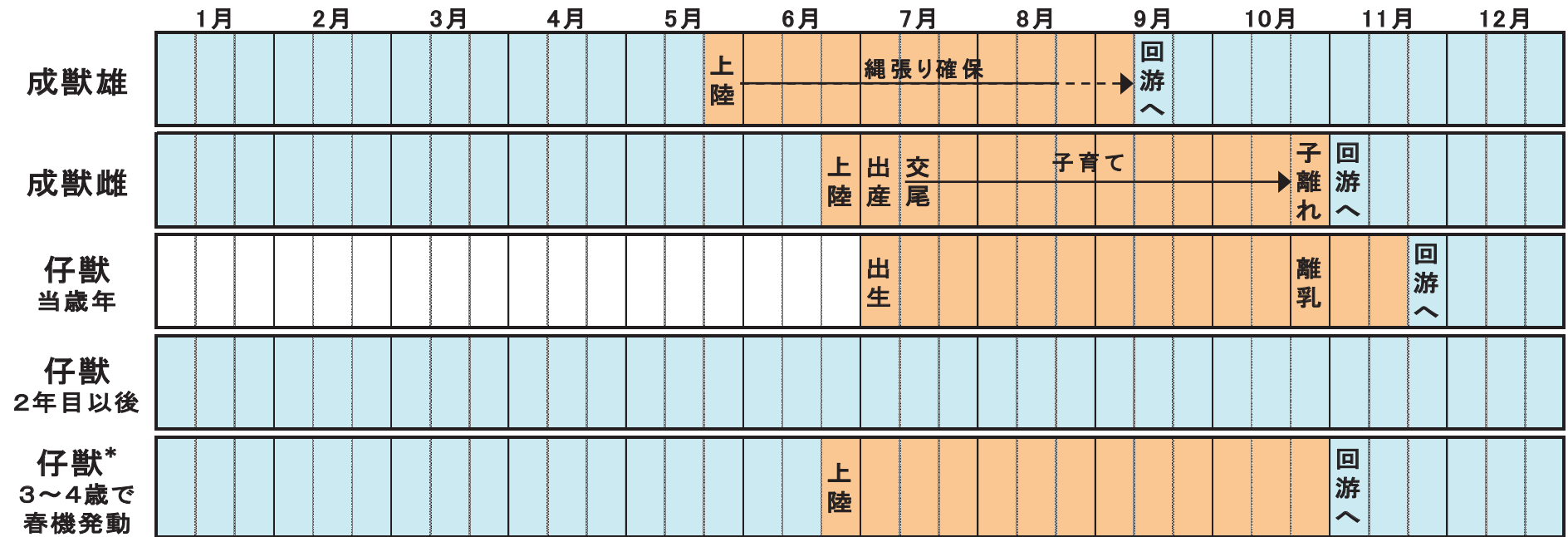


図 VI. 生息数変動の目安として最大の繁殖地である米国プリビロフ諸島の2島における雄成獣数と推定新生仔数の変遷（NOAA Technical Memorandum 2021. Alaska Fur Seal Investigations by Decadeの資料を使用して作図）。



* 仔獣雌は春機発動後繁殖に参加。

仔獣雄は春機発動後、社会的成熟まで繁殖島上で若雄の集団を作る。

■ : 繁殖島上陸 □ : 索餌回游

図VII. キタオットセイ成獣雄，成獣雌および仔獣の年間活動スケジュール模式図

第 1 章

飼育下キタオットセイ (*Callorhinus ursinus*) 血液性状 と過去に報告された野生下キタオットセイ血液性状と の比較に関する研究

本章は Wiley の許可を得て次の論文から一部転載しています。

タイトル: Normal hematology and serum chemistry of northern fur seals (*Callorhinus ursinus*) in captivity.

著者: Kaoru Kohyama, Yasuo Inoshima

雑誌: Zoo Biology

出版年・巻号・頁: 2017 年 36 巻 5 号 345–350 頁

DOI: <https://doi.org/10.1002/zoo.21376>

序 論

キタオットセイは日本近海で最も多く観察される鰭脚類であり(40), 迷入や生存漂着(ライブストランディング)により保護されることもある。日本国内ではキタオットセイの捕獲・所持を国内法で規制しているが, いくつかの水族館では農林水産省の許可を得て, 研究用の個体, 衰弱した個体や治療の必要な個体などそのまま野生に返せない保護個体を飼育している。キタオットセイの野生下個体数が現状のように減少を続ける場合, 将来的に飼育下でキタオットセイを繁殖させる, いわゆる“生息域外保全 *ex situ conservation*”が必要となる可能性も考えられる(95)。動物園や水族館などの飼育下でキタオットセイの健康を維持し, 繁殖を成功させるためには血液検査による健康診断が不可欠であり, またそのための血液計測値の正常値を把握することは極めて重要であると考えられる。

キタオットセイの血液性状および血液生化学性状にはいくつかの報告があるが(12, 43, 44, 68, 69), これらは主に野生下個体から採取された血液のデータに基づいている。一方, ゼニガタアザラシ *Phoca vitulina* (41) およびシロイルカ *Delphinapterus leucas* (96) においては, 野生下個体の血液性状および血液生化学性状が飼育下個体のそれとは一致しないことが報告されている。そこで本研究では, 雌雄各 2 頭, 計 4 頭の飼育下キタオットセイを用いて 1 ヶ月に 1 回の採血を 2 年間継続し, 得られた血液性状と血液生化学性状の計測結果を既報の野生下個体から得られた結果と比較することによりその相違の有無を確認し, また飼育下キタオットセイの血液性状および血

液生化学性状の正常値を明らかにすることを目的とした。本研究で示すことのできた飼育下キタオットセイの血液性状および血液生化学性状の正常範囲は、飼育下キタオットセイの健康状態を把握する上で重要な情報であり、キタオットセイを飼育する際の有力なガイドラインとして役立つと考えられる。

材料および方法

1) 供試動物

本研究では雌雄各 2 頭，計 4 頭のキタオットセイ用いて実験を行なった（表 1-1）。4 頭の内，雄 1 頭と雌 2 頭の計 3 頭は水族館（伊豆・三津シーパラダイス）で出生した個体であり，他の雄 1 頭は岩手県宮古市田老町にライブストランディングし，農林水産省の許可を得て同水族館に保護収容された個体である。この雄個体は保護収容時の体格（体長 73.0cm，体重 7.65kg）から収容時の年齢は 1 歳未満と推定された。

実験期間の 2009 年 3 月から 2015 年 3 月を通して，4 頭のオットセイには体重に応じた 1～2 錠のビタミンミネラルサプリメント（Seavita II，共立製薬，東京，日本）を添加した解凍サバ類（ゴマサバ *Scomber australasicus* およびマサバ *Scomber japonicus* を含む，1 日 2～3kg）を 2 回に分けて給餌した。雄個体の内 1 頭（ID1）は，飼育海水を圧力式砂濾過器（PFV183，荏原製作所，東京）による急速濾過循環（濾過水量 0.5 m³/min）した水量 40 m³のプールを含む飼育場総面積 46.8 m²の屋内施設で，今回の実験には使用していない 2 頭の成熟雌と同居飼育した。残る雄 1 頭と雌 2 頭（ID2-4）は，4.5 m³のプールのある総面積約 16.8m²の屋内施設で同居飼育した。3 頭を飼育した屋内施設のプールの飼育水は外海水を圧力式砂濾過器（S-050-18L10，日本ファイルコン，東京）で急速濾過した海水を 0.1 m³/min でかけ流しとした。この飼育施設では原則として他の個体は飼育しておらず，実験に用いた 3 頭は他の個体との接触はなかった。

二つの室内施設（35° 1′ N, 138° 53′ E）は明かり取り用の窓から自然光が入るが自然光だけでは照度不足となるため、原則として08:30から17:00の間は十分な照度となるよう照明を点灯した。また、これらの施設の気温は外気温によって変動したが、夏期は空調設備を使用して25℃を超えないように調節した。プールの水温は水温調節設備が無い場合制御されておらず、源水の水温等に伴って変動した。実験期間中の供試個体は4頭とも動作食欲の観察、一般的な健康チェック、血液性状の確認等を用いた獣医師の診断では体調の異常を疑わせる結果は得られず、すべて健康であったと考えられる。

2) 試料採取

採血には使い捨ての注射筒（テルモシリンジ 10ml, SS-10SZ, テルモ, 東京）および静脈針（テルモ注射針 22G×1.25, NN-2232S, テルモ）を使用した。採血は後肢指間静脈より行ない、原則として1ヵ月に1回の採血を2年間継続した。採血時キタオットセイには鎮静剤や麻酔薬などの化学的保定は使用せず、物理的保定のみで実施した。具体的には採血するキタオットセイを折りたたみ式のペット用大型ケージに収容し、下部にある間隙から後肢を引き出して行なった（図 1-1）。尚、実験に使用したキタオットセイにはケージ入りトレーニングを行っており、殆どの場合ケージの扉を開くと特に嫌がることなく自らケージに入った。

血液は各回各個体より10～12ml採取した。血液は採血後ただちに血液検査用EDTA加採血管（テルモベノジェクトII VP-DK052K, テルモ）および血清採取用採血管（テルモベノジェクトII VP-AS109K, テルモ）に分注し冷蔵保存した。今回の研究では4頭

のキタオットセイから合計 97 検体を採取し解析を行なった。尚、この研究は、国立研究開発法人 水産研究・教育機構 水産資源研究所(元 遠洋水産研究所) による研究の一環として実施され、岐阜大学動物実験計画書の承認を受けた (承認番号 14094)。

3) 計測および集計

採血後 12 時間以内に冷蔵保存した血液を用いて 15 項目の血液学的計測および 29 項目の血液生化学的計測を行なった (表 1-2, 1-3)。各項目の計測は民間の臨床検査会社 (SRL, 東京) に依頼し、計測には自動血液分析装置 (XN-9100, シスメックス, 神戸) を使用した (表 1-4, 1-5)。得られた各項目の結果について最大値, 最小値, 平均と標準偏差 (SD) および中央値を求め、野生下キタオットセイの繁殖期に収集されたと考えられる計測結果 (12, 68, 69) と比較した。

結 果

今回の研究で得られた各項目の集計値血を血液学的項目および血液生化学的項目に分け、比較のため既報のキタオットセイ血液計測の結果（12, 68, 69）と共にそれぞれ表 1-2 および表 1-3 に示す。

今回の研究で得られた血液学的項目の結果（平均±標準偏差）は、白血球数 86.4 ± 21.6 ($\times 10^2/\mu\text{l}$)、赤血球数 570.2 ± 42.9 ($\times 10^4/\mu\text{l}$)、ヘモグロビン量 119.1 ± 1.5 、ヘマトクリット 56.3 ± 4.1 (%), 平均赤血球容積 98.8 ± 5.6 (fL), 平均血色素量 33.5 ± 1.3 (pg), 平均血色素濃度 33.9 ± 1.1 (%), 血小板数 41.5 ± 10.2 ($\times 10^4/\mu\text{l}$), 網状赤血球比 7.4 ± 2.3 (%), 稗状核好中球比 0.3 ± 0.5 (%), 分葉核好中球比 60.5 ± 9.8 (%), リンパ球比 32.7 ± 11.7 (%), 単球比 2.6 ± 1.6 (%), 好酸球比 3.3 ± 3.9 (%), 好塩基球比 0.2 ± 0.3 (%) であった。

同様に今回の研究で得られた血液生化学的項目の結果は、血清総蛋白 7.1 ± 0.5 (g/dl), チモール混濁試験 (TTT) 0.5 ± 0.2 (U), 硫酸亜鉛混濁試験 (ZTT) 4.2 ± 2.3 (U), クレアチンリン酸化酵素 (CK) 164.3 ± 60.7 (U/L), アスパラギン酸アミノ基転移酵素 (AST) 80.6 ± 22.1 (U/L), アラニンアミノ基転移酵素 (ALT) 63.3 ± 26.6 (U/L), 乳酸脱水素酵素 (LDH) 752.3 ± 158.2 (U/L), アルカリ性脱リン酸化酵素 (ALP) 310.2 ± 96.7 (U/L), γ -グルタミル基転移酵素 (γ -GT) 135.6 ± 75 (U/L), コリンエステラーゼ 261.5 ± 108 (U/L), ロイシンアミノペプチダーゼ (LAP) 118.6 ± 31.2 (U/L), クレアチニン 0.6 ± 0.1 (mg/dl), 尿酸 1.5 ± 0.2 (mg/dl), 血中尿素体窒素 (BUN) 28.6 ± 5 (mg/dl), 中性脂肪 14.8 ± 9.4 (mg/dl), コレステロール 207.1

± 34.1 (mg/dl), Na 151.2 ± 1.8 (mEq/L), P 4.6 ± 0.4 (mEq/L), Cl 109 ± 2.5 (mEq/L), Ca 9.9 ± 0.4 (mg/dl), 血清鉄 88.9 ± 22.8 ($\mu\text{g/dl}$), 総ビリルビン 0 ± 0 (mg/dl), 直接ビリルビン 0 ± 0 (mg/dl), 間接ビリルビン 0 ± 0 (mg/dl), アルブミン 59.5 ± 3.1 (%), $\alpha 1$ -グロブリン 7 ± 2.6 (%), $\alpha 2$ -グロブリン 10.9 ± 2.4 (%), β -グロブリン 10.4 ± 1.8 (%), γ -グロブリン 12.1 ± 3 (%) であった。

考 察

本研究では4頭の飼育下キタオットセイの血液性状および血液生化学性状を2年間継続的に計測し集計した。得られた血液性状15項目(表1-2)の結果の内、12項目は既報の野生キタオットセイ計測値(12)の範囲内であったが、赤血球数、ヘモグロビン値、ヘマトクリット値の3項目は今回の研究で得られた計測値の80%以上が既報の計測結果の範囲よりも高かった(12)。また、血液生化学性状(表1-3)については、今回の研究で計測した29項目の内、野生キタオットセイでも報告のある15項目を今回の結果と比較した。その結果、アルカリホスファターゼ(ALP)、尿酸、およびコレステロールの3項目については今回の研究で得られた計測値の80%以上が既報の計測値(12)の範囲外であった。特にALPは今回得られたすべての計測値が野生キタオットセイから得られた計測値の範囲(12)よりも高かった。

海棲哺乳類の赤血球数は栄養状態によって変動することが報告されている(37, 41, 70, 96, 98)。主に北西太平洋に生息する野生のキタオットセイは、スケトウダラ *Theragra chalcogramma*, マイワシ *Sardinops melanostictus*, カタクチイワシ *Engraulis japonicus*, ハダカイワシ類 Myctophidae, ホタルイカ類 Eupoloteuthidae など、多種多様な種を捕食する opportunistic feeder であり(40, 109)、また今回の研究で比較対象としたベーリング海のキタオットセイ(12, 44)は主としてスケトウダラとテカギイカ類 Gonatidae を捕食していると報告されている(1)。しかし、今回の研究に供試したキ

タオットセイにはビタミンミネラルサプリメントを添加した解凍サバ類のみを給餌した。前述のように野生のキタオットセイにとってサバ類は主要な捕食対象ではない事から、餌料によって野生のキタオットセイと飼育下キタオットセイの間で血液学的な値が異なる可能性が考えられる。また、飼育下の気温や水温、摂餌頻度や運動量などの環境条件の違いに起因する生理的な変動が血液学的計測値に影響を与えた可能性もある。

ALP 値が既報の野生下キタオットセイの計測値と比較して高値を示したのは供試キタオットセイの年齢が若齢に偏ったことによる可能性が高い (26)。尿酸に関しては、血清尿酸値は餌料の影響を受けるとの報告 (18) があることから、野生キタオットセイと飼育下キタオットセイの餌料の違いが血清尿酸値に影響を与えたことが考えられる。同様に血清コレステロールに関しても餌料の違いが野生下と飼育下のキタオットセイの差異を引き起こす可能性は考えられるが、ヒトにおいて食事によって摂取されるコレステロール量と血清コレステロール値の間には明らかな関係はないと報告されている (106)。哺乳動物の基本的な脂質代謝に大きな差はないと考えられ、キタオットセイに関しても餌料の違いが血清コレステロール値に大きな影響を与える可能性は低いと考えられることから、血清コレステロールの野生下個体と飼育下個体の差異の理由は不明である。また肥満が尿酸 (91) あるいはコレステロール (87) の上昇に関連しているとの報告があるが、本研究に供試したキタオットセイでは採血と同時に実施していた体重測定の結果を見る限り肥満は観察されておらず、今回の結果に影響を与えてはいないと考えられる。

本研究で計測した 29 項目の血液生化学的項目の内、チモール混濁

試験 (TTT), 硫酸亜鉛混濁試験 (ZTT), クレアチンフォスフォキナーゼ (CPK), γ -グルタミン酸トランスフェラーゼ (γ -GT), コリンエステラーゼ, ロイシンアミノペプチノーゼ (LAP), 血清鉄, 直接ビリルビン, 間接ビリルビン, アルブミン, α 1-グロブリン, α 2-グロブリン, β -グロブリン, γ -グロブリンの 14 項目は比較対象としたキタオットセイの既報論文 (13) に記載がなかったため今回得られた結果と比較する事が出来なかった。試みに同じアシカ科の近縁種である野生のグアダルーパーオットセイ *Arctocephalus townsendi* で報告された結果 (56) と比較可能であった γ -GT, 直接ビリルビン, 血清鉄の結果を比較したところ, γ -GT および血清鉄の値は得られた結果の範囲内であった。さらなる計測と検討が必要ではあるが, この結果は今後の近縁種間における比較研究に役立つと考えられる。

また, 飼育下キタオットセイでは, 高齢になるとヘモクロマトーシスが発生する恐れがあり, その発生は餌料の選択によって予防できる可能性があることが報告されている (61)。本研究ではヘモクロマトーシスの指標とされるフェリチンではなく血清鉄を計測したが, 得られた値は報告のあるグアダルーパーオットセイ (56) から得られた結果とほぼ同じレベルであり, 本研究の供試個体は現時点でヘモクロマトーシスの恐れがほぼないことを示している。ただし, 飼育下キタオットセイのヘモクロマトーシスは老齢での発生が心配される疾病であり (61), この結果は, 今回の供試個体が年齢を重ねた場合の健康状態を把握する上で重要であると考えられる。

近年, 野生下におけるキタオットセイの個体数と出生率は減少傾向が続いている (99)。この傾向が続くとすれば, 近い将来この種が絶滅の危機に直面する可能性も考えられる。野生下キタオットセイの個

体数が回復できない場合の代替戦略として重要とされるのは“生息域外保全 *ex situ conservation*” (95) である。したがって、飼育下キタオットセイの血液学および血液生化学的正常値を正確に把握することは飼育下キタオットセイの健康を維持し、また継続的な繁殖を確実にするため非常に重要である。本研究における供試飼育下キタオットセイの行動と食欲は正常であり健康であると考えられたにもかかわらず、一部の計測項目は既報の野生キタオットセイから得られた正常範囲に無いという結果であった。今回の研究で飼育下個体の血液性状と比較した野生下個体のデータ (12) は繁殖期のもの (44) であり、特定の生理状態における結果であった可能性も考えられる。また、野生下個体における索餌回遊期のデータ収集が困難であることを踏まえると、項目によっては既報の正常値を飼育下個体にそのまま適用することは慎重であるべきであろう。今後、水族館におけるキタオットセイの飼育や治療、繁殖の機会が増加する可能性があり、課題として計測系の違いによる差異について精査する必要は考えられるものの、本研究で得られた血液学および血液生化学的正常値が飼育下キタオットセイの飼育および繁殖の成績向上に寄与することを期待する。

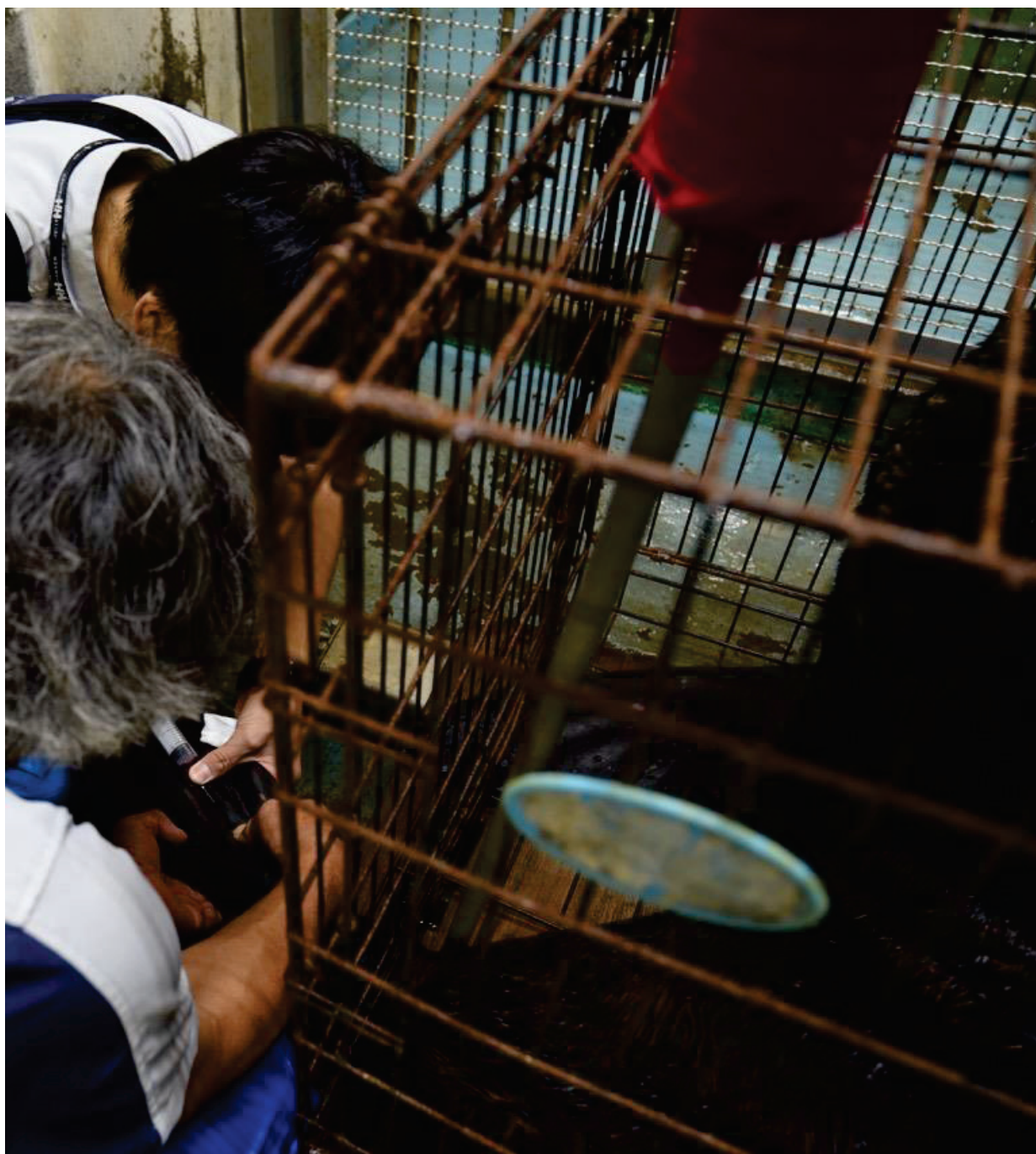


図 1-1 本研究で行なったキタオットセイの採血の様子.

表1-1. 使用したキタオットセイ

ID	性別	出生年月日	試料収集期間		試料数
			年月	年齢	
1	雄	2007年6月25日	2009年3月 - 2011年3月	1歳9ヶ月 - 3歳9ヶ月	25
2	雄	2009年7月 ^a	2013年4月 - 2015年3月	3歳9ヶ月 - 5歳8ヶ月	24
3	雌	2009年6月26日	2013年4月 - 2015年3月	3歳10ヶ月 - 5歳9ヶ月	24
4	雌	2010年6月30日	2013年4月 - 2015年3月	2歳10ヶ月 - 4歳9ヶ月	24

^a 岩手県宮古市田老町にて保護。保護時の体格より当歳個体と判断する。

表1-2. キタオットセイ野生下個体と飼育下個体の血液性状計測値比較

項目	単位	野生下個体			飼育下個体 (n = 97)				
		計測結果の範囲 ^a (n = 8)	授乳中個体の結果 ^b (n = 24)		計測結果の範囲	平均 ± SD	中央値	野生下範囲外計測数 ^c / 全計測数	% ^d
			計測結果の範囲	平均					
白血球数	×10 ² /μl	70 - 138	42 - 148	93	43 - 153	86.4 ± 21.6	83	23 / 97	23.7
赤血球数	×10 ⁴ /μl	384 - 529	350 - 580	460	493 - 739	570.2 ± 42.9	561	84 / 97	86.6
ヘモグロビン量	g/dl	12.7 - 17.8	10 - 17.3	15.1	16.3 - 24.4	19.1 ± 1.5	18.8	79 / 97	81.4
ヘマトクリット	%	34 - 51	35 - 55	46	48 - 69.7	56.3 ± 4.1	55.6	88 / 97	90.7
平均赤血球容積	fL	85 - 105	72 - 139	101	88.4 - 113.4	98.8 ± 5.6	98.1	19 / 97	19.6
平均血色素量	pg	29 - 35	20 - 46	33	30.8 - 36.4	33.5 ± 1.3	33.4	14 / 97	14.4
平均血色素濃度	%	32 - 38	28 - 39	32	30.9 - 36.8	33.9 ± 1.1	34.2	5 / 97	5.2
血小板数	×10 ⁴ /μl	n.l. ^e	n.l.	n.l.	14.2 - 61.7	41.5 ± 10.2	41.9	u.c. ^f / 97	u.c.
網状赤血球比	%	n.l.	n.l.	n.l.	4 - 14	7.4 ± 2.3	7	u.c. / 97	u.c.
桿状核好中球比	%	0 - 2	n.l.	n.l.	0 - 3	0.3 ± 0.5	0	1 / 97	1
分葉核好中球比	%	53 - 83	n.l.	n.l.	29 - 89	60.5 ± 9.8	61	17 / 97	17.5
リンパ球比	%	11 - 38	n.l.	n.l.	0 - 63	32.7 ± 11.7	32	33 / 97	34
単球比	%	0 - 8	n.l.	n.l.	0 - 8	2.6 ± 1.6	2	0 / 97	0
好酸球比	%	0 - 11	n.l.	n.l.	0 - 17	3.3 ± 3.9	1.5	3 / 97	3.1
好塩基球比	%	0 - 0	n.l.	n.l.	0 - 1.5	0.2 ± 0.3	0	37 / 97	38.1

^a Bossart and Dierauf (1990)

^b Norberg et al. (2011)

^c Bossart and Dierauf (1990)で報告された計測結果の範囲を外れた計測値数.

^d 比率が80%を超えたものを太字で示す.

^e n.l.: 計測項目になし

^f u.c.: 計算不能

表1-3. キタオットセイ野生下個体と飼育下個体の血液生化学計測値比較

項目	単位	野生個体			飼育下個体 (n = 97)				
		計測結果の範囲 ^a (n = 4)	授乳中個体の結果 ^b (n = 45)		計測結果の範囲	平均 ± SD	中央値	野生下範囲外計測数 ^c / 全計測数	% ^d
			計測結果の範囲	平均					
血清総蛋白	g/dl	6.3 - 7.8	6.1 - 9.2		5.9 - 8.9	7.1 ± 0.5	7.1	12 / 97	12.4
チモール混濁試験(TTT)	U	n.l. ^e	n.l.		0.2 - 1.3	0.5 ± 0.2	0.5	u.c. ^g / 97	u.c.
硫酸亜鉛混濁試験(ZTT)	U	n.l.	n.l.	n.l.	0.5 - 10.4	4.2 ± 2.3	4.1	u.c. / 97	u.c.
クレアチンリン酸化酵素(CK)	U/L	n.d. ^f	n.l.	n.l.	91 - 466	164.3 ± 60.7	144	u.c. / 97	u.c.
アスパラギン酸アミノ基転移酵素(AST)	U/L	56 - 129	n.l.	n.l.	45 - 136	80.6 ± 22.1	80	17 / 97	17.5
アラニンアミノ基転移酵素(ALT)	U/L	13 - 76	22 - 94	45.1	30 - 206	63.3 ± 26.6	59	19 / 97	19.6
乳酸脱水素酵素(LDH)	U/L	620 - 955	n.l.	n.l.	507 - 1674	752.3 ± 158.2	703	19 / 97	19.6
アルカリ性脱リン酸化酵素(ALP)	U/L	80 - 124	36 - 170	61.3	189 - 599	310.2 ± 96.7	278	97 / 97	100
γ-グルタミル基転移酵素(γ-GT)	U/L	n.d.	n.l.	n.l.	55 - 611	135.6 ± 75	111	u.c. / 97	u.c.
コリンエステラーゼ	U/L	n.l.	n.l.	n.l.	0 - 380	261.5 ± 108	295	u.c. / 97	u.c.

^a アスパラギン酸アミノ基転移酵素, アルカリ性脱リン酸化酵素, 総ビリルビン, 直接ビリルビン, 間接ビリルビンについては n=25 (Bossart and Dierauf 1990)

^b Norberg et al. (2009)

^c Bossart and Dierauf (1990)で報告された計測結果の範囲を外れた計測値数.

^d 比率が80%を超えたものを太字で示す.

^e n.l.: 計測項目になし.

^f n.d.: データなし.

^g u.c.: 計算不能

表1-3. キタオットセイ野生下個体と飼育下個体の血液生化学計測値比較 (続き)

項目	単位	野生個体			飼育下個体 (n = 97)				
		計測結果の範囲 ^a (n = 4)	授乳中個体の結果 ^b (n = 45)		計測結果の範囲	平均 ± SD	中央値	野生下範囲外計測数 ^c / 全計測数	% ^d
			計測結果の範囲	平均					
ロイシンアミノペプチダーゼ(LAP)	U/L	n.l.	n.l.	n.l.	74 - 227	118.6 ± 31.2	112	u.c. / 97	u.c.
クレアチニン	mg/dl	0.2 - 0.8	0.3 - 1.4	0.85	0.37 - 0.86	0.6 ± 0.1	0.59	4 / 97	4.1
尿酸	mg/dl	2.1 - 9.8	n.l.	n.l.	1 - 2.5	1.5 ± 0.2	1.4	95 / 97	97.9
血中尿素体窒素(BUN)	mg/dl	20 - 73	14 - 54	25.7	17 - 39.5	28.6 ± 5	27.7	1 / 97	1
中性脂肪	mg/dl	7 - 249	n.l.	n.l.	4 - 54	14.8 ± 9.4	11	9 / 97	9.3
コレステロール	mg/dl	265 - 317	245 - 309	286	137 - 302	207.1 ± 34.1	200	89 / 97	91.8
Na	mEq/l	147 - 157	139 - 156	149	147 - 156	151.2 ± 1.8	151	0 / 97	0
P	mEq/l	4.4 - 5.1	3.6 - 5.2	4.43	3.8 - 5.5	4.6 ± 0.4	4.6	37 / 97	38.1
Cl	mEq/l	100 - 112	n.l.	n.l.	104 - 117	109 ± 2.5	109	9 / 97	9.3
Ca	mg/dl	9.4 - 9.8	8.3 - 10.7	9.64	8.8 - 10.7	9.9 ± 0.4	9.9	61 / 97	62.9

^a アスパラギン酸アミノ基転移酵素, アルカリ性脱リン酸化酵素, 総ビリルビン, 直接ビリルビン, 間接ビリルビンについては n=25 (Bossart and Dierauf 1990)

^b Norberg et al. (2009)

^c Bossart and Dierauf (1990)で報告された計測結果の範囲を外れた計測値数.

^d 比率が80%を超えたものを太字で示す.

^e n.l.: 計測項目になし.

^f n.d.: データなし.

^g u.c.: 計算不能

表1-3. キタオットセイ野生下個体と飼育下個体の血液生化学計測値比較 (続き)

項目	単位	野生個体			飼育下個体 (n = 97)				
		計測結果の範囲 ^a (n = 4)	授乳中個体の結果 ^b (n = 45)		計測結果の範囲	平均 ± SD	中央値	野生下範囲外計測数 ^c / 全計測数	% ^d
			計測結果の範囲	平均					
血清鉄	µg/dl	n.l.	n.l.	n.l.	37 - 159	88.9 ± 22.8	89	u.c. / 97	u.c.
総ビリルビン	mg/dl	0 - 0.2	0.3 - 0.5	0.36	0 - 0.2	0 ± 0	0	0 / 97	0
直接ビリルビン	mg/dl	n.d.	n.l.	n.l.	0 - 0.1	0 ± 0	0	u.c. / 97	u.c.
間接ビリルビン	mg/dl	n.d.	n.l.	n.l.	0 - 0.1	0 ± 0	0	u.c. / 97	u.c.
アルブミン	%	n.l.	n.l.	n.l.	53.2 - 66.4	59.5 ± 3.1	59.5	u.c. / 97	u.c.
α1-グロブリン	%	n.l.	n.l.	n.l.	1.1 - 17.3	7 ± 2.6	7.2	u.c. / 97	u.c.
α2-グロブリン	%	n.l.	n.l.	n.l.	1.7 - 17.1	10.9 ± 2.4	10.6	u.c. / 97	u.c.
β-グロブリン	%	n.l.	n.l.	n.l.	2.1 - 12.8	10.4 ± 1.8	10.7	u.c. / 97	u.c.
γ-グロブリン	%	n.l.	n.l.	n.l.	5.6 - 21.9	12.1 ± 3	12.2	u.c. / 97	u.c.

^a アスパラギン酸アミノ基転移酵素, アルカリ性脱リン酸化酵素, 総ビリルビン, 直接ビリルビン, 間接ビリルビンについては n=25 (Bossart and Dierauf 1990)

^b Norberg et al. (2009)

^c Bossart and Dierauf (1990)で報告された計測結果の範囲を外れた計測値数.

^d 比率が80%を超えたものを太字で示す.

^e n.l.: 計測項目になし.

^f n.d.: データなし.

^g u.c.: 計算不能

表1-4. 計測を依頼した検査機関における血液性状計測の方法

計測項目	計測方法 ^a
白血球数	半導体レーザーFCM方式
赤血球数	シーフローDC方式
ヘモグロビン量	SLS-Hb方式
ヘマトクリット	シーフローDC方式
MCV	演算法
MCH	演算法
MCHC	演算法
血小板数	シーフローDC方式
網状赤血球比	半導体レーザーFCM方式
分葉核好中球	半導体レーザーFCM方式
リンパ球	半導体レーザーFCM方式
単球	半導体レーザーFCM方式
好酸球	半導体レーザーFCM方式
好塩基球	半導体レーザーFCM方式

^a: シスメックス多項目自動血球分析装置XN-9100を使用して計測

FCM: フロートサイトメトリー, DC: 直流, SLS: ラウリル硫酸ナトリウム,

MCV: 平均赤血球容積, MCH: 平均血色素量, MCHC: 平均血色素濃度

表1-5. 計測を依頼した検査機関における血液生化学性状計測の方法

計測項目	計測方法 ^a
血清総蛋白	Biuret法
チモール混濁試験(TTT)	日本消化器病学会肝機能研究班 標準法変法
硫酸亜鉛混濁試験(ZTT)	日本消化器病学会肝機能研究班 標準法変法
クレアチニン酸化酵素(CK)	JSCC標準化対応法
アスパラギン酸アミノ基転移酵素(AST)	JSCC標準化対応法
アラニンアミノ基転移酵素(ALT)	JSCC標準化対応法
乳酸脱水素酵素(LDH)	IFCC標準化対応法
アルカリ性脱リン酸化酵素(ALP)	IFCC標準化対応法
γ-グルタミル基転移酵素(γ-GT)	JSCC標準化対応法
コリンエステラーゼ	JSCC標準化対応法
ロイシンアミノペプチダーゼ(LAP)	酵素法 (L-ロイシル-p-ニトロアニリド基質)
クレアチニン	酵素法
尿酸	酵素法 (ウリカーゼPOD法)
血中尿素体窒素(BUN)	ウレアーゼ・LED・UV法
中性脂肪	酵素法 (GK-GPO・遊離グリセロール消去)
コレステロール	コレステロール酸化酵素法-COD-POD法
Na	電極法
P	電極法
Cl	電極法
Ca	アルセナゾⅢ法
血清鉄	ニトロソ-PSAP法
総ビリルビン	化学酸化法
直接ビリルビン	化学酸化法
間接ビリルビン	化学酸化法
アルブミン	キャピラリー電気泳動法
α1-グロブリン	キャピラリー電気泳動法
α2-グロブリン	キャピラリー電気泳動法
β-グロブリン	キャピラリー電気泳動法
γ-グロブリン	キャピラリー電気泳動法

^a: シスメックス多項目自動血球分析装置XN-9100を使用して計測

JSCC：日本臨床化学会 IFCC：国際臨床化学連合 POD：ペルオキシダーゼ LED：発光ダイオード

UV：紫外線 GK：グリセロールキナーゼ GPO：グリセロール3リン酸オキシダーゼ

COD：コレステロールオキシダーゼ PSAP：NプロピルNスルホプロピルアミノフェノール

第 2 章

キタオットセイ (*Callorhinus ursinus*) 血液性状の 季節に伴う変動に関する研究

本章は次の論文から一部改変転載しています。

タイトル : Longitudinal study of northern fur seal (*Callorhinus ursinus*) hematology.

著者 : Kaoru Kohyama, Masashi Kiyota, Yasuo Inoshima

雑誌 : The Journal of Veterinary Medical Science

出版年・巻号・頁 : 2021 年 83 巻 7 号 1128–1137 頁

DOI : <https://doi.org/10.1292/jvms.20-0645>

序 論

第1章で示したように、飼育下キタオットセイ4頭から2年間継続して採血を実施し血液性状および血液生化学性状の確認を行なった。その結果を評価・検討する中で、血液性状の項目の中に季節に伴って変動しているのではないかと考えられる項目を認めた。そこで第2章では、実験期間を延長し、血液性状の季節に伴う変化の有無を確認した。

キタオットセイは北太平洋に固有の、主に亜寒帯域に生息するアシカ科の一種(31, 40, 74, 77)で、季節に応じて陸上と外洋の2つの異なる環境に生息することが知られている。キタオットセイは毎年6月から10月までの約5か月間(繁殖期)は北太平洋、ベーリング海およびオホーツク海にある特定のいくつかの島(繁殖島)に上陸して繁殖する。特に雄の成獣は繁殖期初期(6月前半)に繁殖島に上陸し“縄張り”を形成すると、島を離れる9月下旬まで摂餌することなく不眠不休でこの縄張りを守る。一方、繁殖年齢に達した雌成獣は6月後半に繁殖島に上陸し、殆どの場合7月上旬に出産、出産のおよそ1週間後に発情して交尾した後、島を離れる10月後半まで子育てを行なう。当歳の仔獣も11月には島を離れる。繁殖島を離れたキタオットセイは11月から5月までの約7ヶ月間(索餌回遊期)は上陸することなく広く大洋上を索餌回遊して過ごす(21, 29, 31, 48)。キタオットセイはカリフォルニアアシカ *Zalophus californianus* やゴマフアザラシ *Phoca largha* など他の鳍脚類と同様にはっきりとした一年の繁殖周期を持っており(2, 14)、繁殖島に上陸する繁殖期と

全く上陸しないで洋上で過ごす索餌回游期に当たるそれぞれの季節において血液や内分泌などの生理状態が環境に適応するよう変動している可能性が考えられる。しかし、野生下キタオットセイにおいて、1年を通して季節的な生理学的変化を観察することは、彼らの生態的特徴である7~8ヶ月におよぶ全く上陸しない索餌回游期に継続して血液試料を収集しなければならないことからほぼ不可能である。今回の研究では飼育下のキタオットセイ4頭から定期的な採血を3年以上継続して行ない、索餌回游期も含めた周年の計測結果を得ることができた。

第1章でも示したように、近年野生のキタオットセイは、特にアラスカにおいての個体数減少が確認されている(27, 30, 99, 100)。漁業と気候変動に関連する餌生物数の変動と餌種の変化、投棄された漁網など海洋ゴミの影響、環境汚染などいくつかの要因が推測されているが、個体数減少の明らかな原因は不明である(63, 99, 100)。このような状況の中で野生下キタオットセイの個体数減少が続いた場合、将来的な種の保存を考える上で個体群の飼育下管理技術と繁殖技術の確立は検討すべき課題である。キタオットセイの飼育を行なう上で、血液性状を観察することは飼育個体の健康状態を把握するために必要であり、栄養状態や代謝に係る指標の確認、感染症に代表される各種疾病の診断に必要な情報を得るためには重要である(12, 43, 68, 79)。しかし、そのためにはキタオットセイの健康時の正常な血液性状の把握は不可欠であり、その中で血液性状に季節に伴う変動があるのかどうか、また季節に伴う変動があるならそれぞれの変動はどのようなものなのかを理解することはキタオットセイを飼育していく上で必要なことであると考えられる。

そこで今回の研究では第 1 章から実験期間を延長し、雄 2 頭と雌 2 頭の計 4 頭の飼育下キタオットセイから 3 年以上にわたって継続して得られた血液性状の計測値を用いて、キタオットセイの血液性状に季節変動はあるのか、またそれはどのような季節変動なのかを明らかにすることを目的とした。

材料および方法

1) 供試動物

本研究においても第1章で行った研究に供試した雄2頭雌2頭計4頭のキタオットセイから採材した(表2-1)。各個体の摂餌状況、飼育環境等に関する情報は第1章で示したものと同様である。ID1の採血期間は2009年3月から2012年6月までの3年3ヶ月間、ID2、ID3およびID4の採血期間は2013年4月から2016年6月までの3年3ヶ月間とした(表2-1)。

尚、この研究は岐阜大学動物実験計画書の承認を受けた(承認番号341 14094および17186)。

2) 試料採取および計測

試料採取の方法も第1章で示したものと同様である。採取した血液は直ちにEDTA加真空採血管に分注して冷蔵保存し、12時間以内に計測した。3年3ヶ月の研究期間中に、合計157検体を収集した。

血液性状の計測は民間の検査会社(SRL, 東京)に依頼し、14種の血液学的項目(白血球数, 赤血球数, ヘモグロビン量, ヘマトクリット値, 平均赤血球容積(MCV), 平均赤血球ヘモグロビン(MCH), 平均赤血球ヘモグロビン濃度(MCHC), 血小板数, 網状赤血球比, 分葉核好中球比, リンパ球比, 単球比, 好酸球比および好塩基球比)を計測した。計測にはXN-9100自動血液分析装置(シスメックス, 神戸, 日本)を使用した。尚、分葉核好中球, リンパ球, 単球, 好酸球および好塩基球の値は百分比で計測されたが, 比率で表示すること

による他の白血球種に対する過剰な影響を排除するため、本研究ではこれらの値を計測した白血球数を元に血球数に変換して解析に用いた。また、SRLでの自動血液分析装置による計測は、ヒトの血球計測用に最適化された設定を使用しているが、ヒト用の設定で自動分析されたキタオットセイの血液学的計測の妥当性を検証するために、SRLで得られた計測結果を、同じ血液を用いて、血球サイズの影響を受けないフローサイトメトリーシステム（ADVIA2120i 複数種血液分析装置，Siemens Healthineers, Erlangen, ドイツ）を使用した富士フィルム VET システムズ（東京）による計測結果と比較した。

3) データ解析

季節に伴う変動の基準となる季節の分類は気象庁の季節区分に従い、12月から2月を冬期、3月から5月を春期、6月から8月を夏期、9月から11月を秋と定義した。3年3ヶ月間の研究期間で収集した計測記録は計測項目ごと、個体ごとに季節別に分類しそれぞれの平均と標準偏差（SD）を求めた。

また、各項目の月ごとの変動を視覚化するために、季節分解分析（SDA）を実行した。局所加重回帰（LOESS）の手法を用いて、各個体の計測された時系列をトレンド、季節、および残差成分に分離し、R 3.6.3 の stl 分解による季節分解分析を行なった（19, 76）。季節成分の平滑化パラメーターは7に設定したが、結果として生じる季節分解には殆ど影響は無かった。

次に、各計測項目の季節差を調べるために、一般化線形混合モデル（GLMM）を用いて分析を行なった。供試動物の数が限られていた

ため、各個体はランダム切片として扱われ、季節はカテゴリ変数として扱われた。平均と標準誤差(SE)を四季間で比較し、季節差を **Tukey** の多重比較検定を使用して解析し、有意差の有無を確認した。これらの分析はパッケージ **lme4** および **multcomp** による **R 3.6.3** (76) を使用して実行した。

結 果

図 2-1 に 2013 年から 2016 年までの各月の気温・水温の平均と標準偏差および例として 2014 年の飼育場周辺の日長を示す。表 2-3 にヒト用の設定で自動分析されたキタオットセイの血液学的計測の妥当性を検証した結果として本研究に供試した 2 頭を含む 5 頭のキタオットセイの血液計測結果の比較を示す。SRL による計測値の平均は富士フィルム VET システムズによる計測結果の平均と比較して、赤血球で約 5% 高く白血球で約 13% 低いという結果が得られた (表 2-2)。この結果によると、キタオットセイの血液をヒト血球用の設定のまま自動血液分析装置で計測した場合、真の血球数との間にわずかな誤差が生じる可能性がある。しかし、本研究で使用したすべての計測が同じ設定で行われていることから、血球数の増減の傾向に関しては相対的に正しく反映していると考えられる。

供試した各個体の年齢とキタオットセイの性成熟に関する文献の情報 (31) から判断すると彼らは性成熟前から性成熟の過程にあり、また ID3 はこの実験の最終年に ID2 を配偶個体として妊娠が確認され正常に出産したことから、本実験の実験期間はキタオットセイの性成熟前から春機発動期、さらに性成熟後にわたる各段階の時期に対応していると考えられる。

本研究に供試した 4 頭から得られた各項目の季節別平均と標準偏差を表 2-4 に、また SDA によって得られたトレンド、季節成分、および残差成分を図 2-2 に示す。SDA によって抽出された季節成分を見ると供試個体の性別や年齢にかかわらず、以下のように 2 つの異

なる季節サイクルがあることが示された。すなわち、白血球数，網状赤血球，分葉核好中球数および単球数は夏期と秋期に高値を示し，冬期と春期に低下する傾向が認められた。対照的に，赤血球数，ヘモグロビン量およびヘマトクリット値は，秋期と冬期に高値を示し，春期と夏期の値は低下する傾向が見て取れた。MCHCは他の季節より夏期に低値を示した。一方で，MCV，MCH，血小板，リンパ球，好酸球および好塩基球は明確な傾向は認められなかった。

SDAで認められた傾向を確認するためGLMM分析とTukeyの多重比較検定を行なった結果，すべての項目で冬期と春期の間，および夏期と秋期の間に有意差 ($P<0.05$) は認められず，その一方で多くの項目について，冬期-春期と夏期-秋期の間に有意差が認められた

(図 2-3)。SDAで認められた傾向と多重比較検定の結果を総合すると，白血球数，分葉核好中球および単球は夏期-秋期よりも冬期-春期の方が有意に低く，逆に赤血球数，ヘモグロビン量およびヘマトクリット値は，夏期-秋期よりも冬期-春期に有意に高かった。また，網状赤血球は，白血球や分葉核好中球および単球と類似の変動を示したが，春期の平均は夏期の平均と有意差が認められなかった。MCHCは赤血球数，ヘモグロビン量およびヘマトクリット値と同様の変動パターンを示したが，秋期の平均は春期の平均との間に有意な差は認められなかった。MCH，血小板数，リンパ球数，好酸球数および好塩基球数は有意な季節差を示さなかった。

考 察

本研究では、4頭の飼育下キタオットセイの血液性状を3年3ヶ月にわたって継続的に計測した。その結果、多くの血液学的項目が季節に伴った変動が観察された。白血球に関連する項目は冬期-春期よりも夏期-秋期に高値を示した。逆に赤血球に関連した項目は冬期-春期よりも夏期-秋期の方が低値を示した。キタオットセイの血液性状を計測した研究はいくつか報告されているが(9, 58, 69)、本研究で認められたような血液性状の季節に伴う変動はこれまでに報告されていない。また、ヒグマ *Ursus arctos* (36) やアンゴラウサギ *Oryctolagus cuniculus domesticus* (16) などの陸生哺乳類では季節に伴う血液性状の変動が報告されているが、海棲哺乳類の血液性状の季節的変動に関する報告は少なく、文献渉猟の限りではバンドウイルカ *Tursiops truncatus* の血液学的項目の季節変動を示した研究が1つ報告されているのみである(97)。一方で、海棲哺乳類の繁殖期と非繁殖期の血液性状の変化、あるいは年齢による血液性状の変化についてはミナミゾウアザラシ *Mirounga leonina* (59)、ミナミアメリカオットセイ *Arctocephalus australis* (88) カリフォルニアアシカ *Zalophus californianus* (12, 13)、ガラパゴスアシカ *Zalophus wollebaeki* (73) 等で報告されている。これら既報の研究の中から本研究の結果に関係すると思われるトド *Eumetopias jubatus* (32) およびキタゾウアザラシ *Mirounga angustirostris* (108) の年齢や繁殖期における血液性状の変化に関する情報と比較した。

トドでは、赤血球は成長とともに増加する傾向があるのに対し、白

血球は成長とともに減少する傾向があることが報告されており、血球数の変化が動物の生理学的状態に関連していることが示唆されている（32）。本研究では、キタオットセイは供試した個体の性別や年齢にかかわらず、また性的成熟前と成熟後の双方で赤血球と白血球の季節変化を示すという結果が得られた。これは、キタオットセイの場合、成長段階に関係なく赤血球と白血球が季節的に変動するということを示唆している。

白血球の動向に関しては、白血球数の増加が微生物感染に関連している可能性があること（79）、無菌動物と比較すると通常的环境下の動物で白血球数が増加すること（34, 93）などに関連している可能性が考えられる。冬期-春期に外洋で索餌回遊するキタオットセイが曝露する微生物の数は、夏期-秋期に生活する沿岸域や繁殖島よりもはるかに少ない可能性があり（90）、キタオットセイの夏から秋にかけて観察された白血球数の増加について考えられる進化論的な説明として、この種が繁殖期の陸上および沿岸環境で多数の細菌曝露に抵抗するための適応としてこの形質を進化させた可能性も考えられる。

血液性状の季節に伴う変動を説明する一つの可能性として、彼らの繁殖生理、中でも性ステロイドホルモンの影響があげられる。特に殆どの鰭脚類はほぼ正確な一年周期で繁殖する動物であり、関連性も疑われる。キタゾウアザラシ *Mirounga angustirostris* 雄成獣では、白血球数と好中球数が換毛期より繁殖期に有意に増加した（108）との報告がある。白血球数はステロイドの影響を受けることが報告されている（20, 25, 65）ことから、キタゾウアザラシの白血球数の増加は、テストステロンまたはコルチコステロイドの影響である可能性があり、雄のキタオットセイについても同様の可能性は考えられる。し

かし、本研究における白血球数の季節に伴う変動は、年齢的に性成熟に達していない(31)と考えられる採材1年目のID1においても確認された。さらに、本研究では雌のキタオットセイにおいても雄個体と同様の季節的な白血球の変動を示したが、雌キタオットセイのステロイドホルモンは雄個体とは異なる変動を示すことが報告されている(50, 103)。これらの事より、テストステロンまたは他のステロイドホルモンの変動の影響だけでは、キタオットセイの白血球数の季節に伴う変動を説明することはできないため、さらなる解析が必要であると考えられる。

一般的に赤血球に関連する項目(赤血球数、ヘモグロビン濃度、ヘマトクリット値、MCHCなど)は貧血の指標とされている(92)。本研究では、キタオットセイの赤血球数、ヘモグロビン濃度およびヘマトクリット値は冬期-春期よりも夏期-秋期に有意に低いという結果が得られた。しかし、夏期-秋期における彼らの行動や粘膜の色などの観察の上からは貧血の臨床的兆候は認められず、夏期-秋期に低下すると考えるより冬期-春期に上昇すると考える方が適当であると思われる。確証は得られなかったが、冬期から春期にかけての赤血球に関連した項目に高い数値が得られたことは、索餌回遊期間中の遊泳や潜水活動の増加に関連しているのではないかと考えられる。

赤血球に関連した項目の中で、千分率で示された網状赤血球のみは冬期-春期より夏期-秋期の方が有意に高いという結果となった。網状赤血球が増加するとそれに引き続いて赤血球の増加が観察されると報告されている(80)。夏期-秋期に観察された網状赤血球の増加は、冬期-春期に観察された赤血球の増加に引き続いていくものであらうと考えられる。

本研究ではキタオットセイの血液性状の季節に伴う変動を示すことにより、野生下個体を日和見的に採材することから得られた血液学的な理解を多少なりとも改善できたと考える。今後の課題は本研究で観察されたキタオットセイの血液性状の季節に伴う変動の原因を明らかにすることであり、また本研究では明らかに認められなかった性別や成長過程による差、あるいは妊娠、出産などの影響について試料の集積を進め、さらに細かく解析することである。本研究で得られた結果は動物学の知識の蓄積に貢献し、野生下および飼育下キタオットセイの健康状態を診断し維持する際に役立つものと信じる。

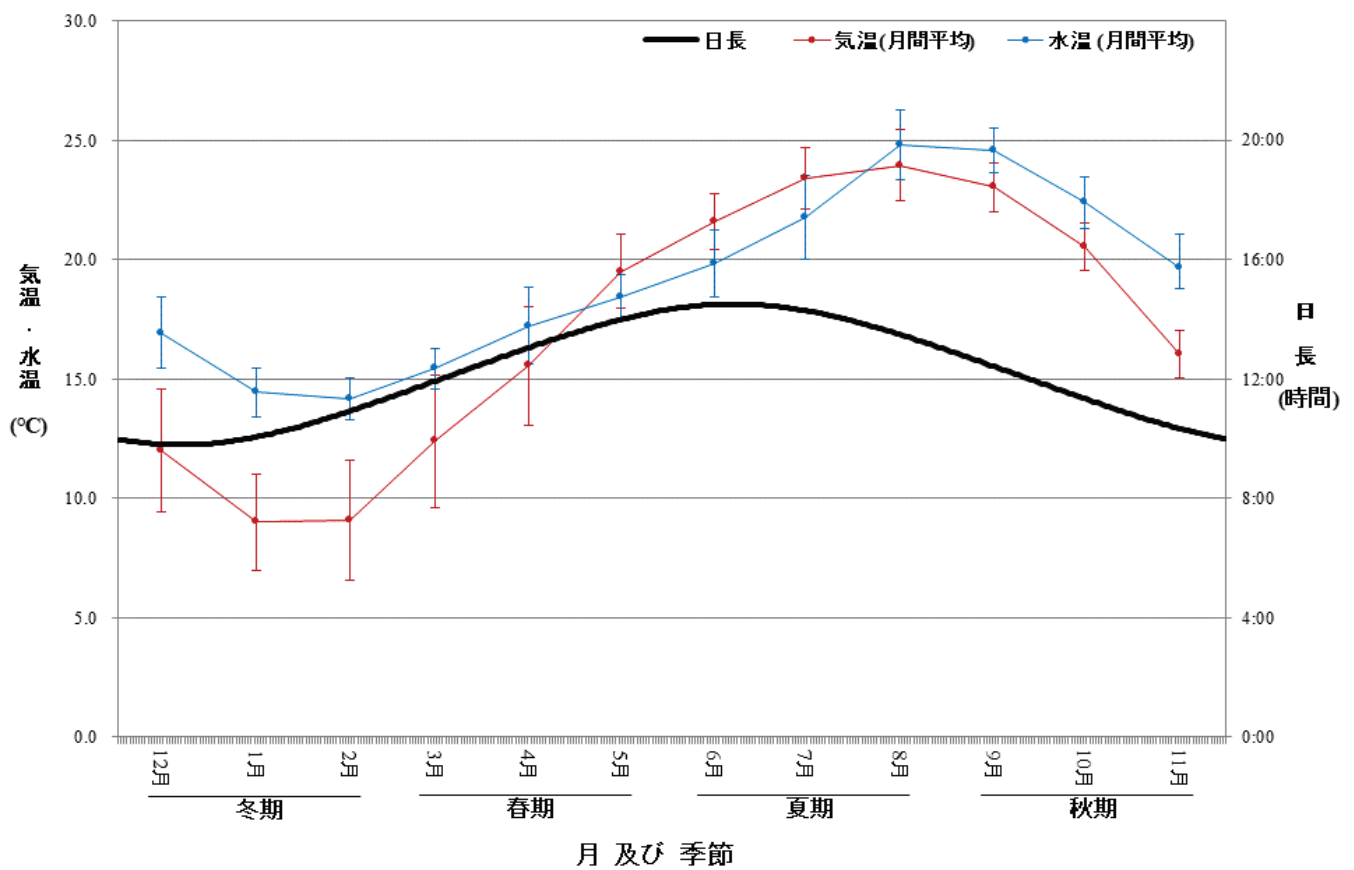
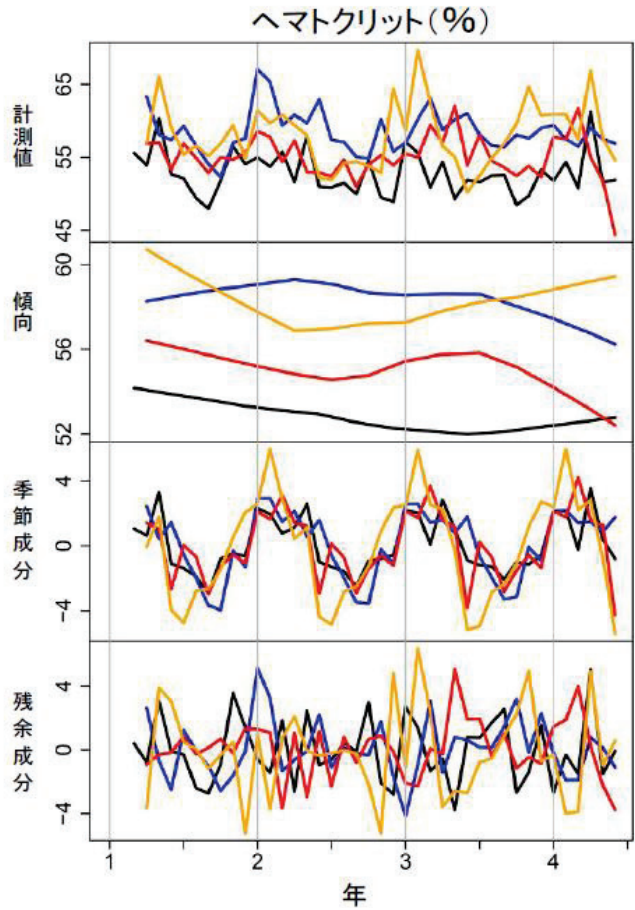
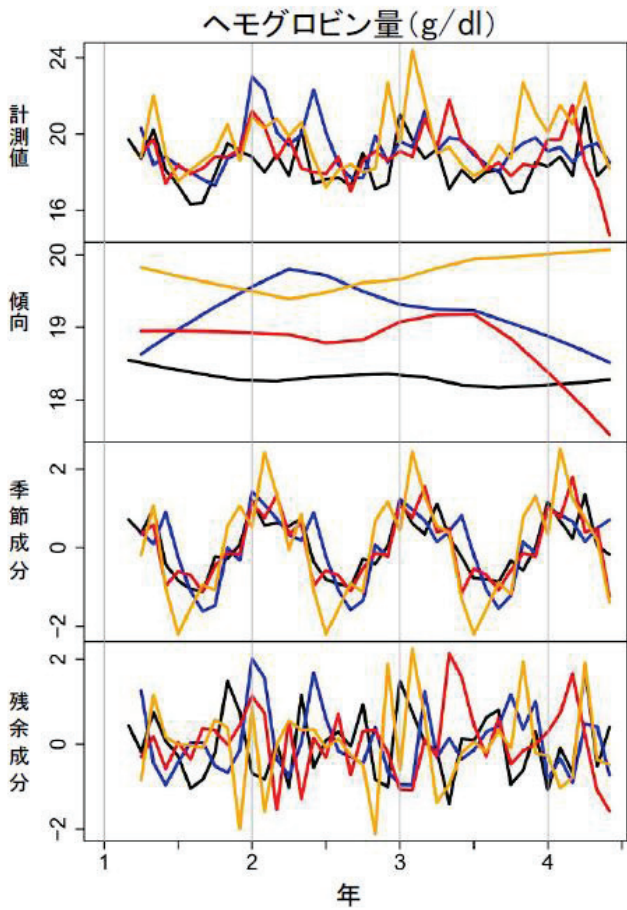
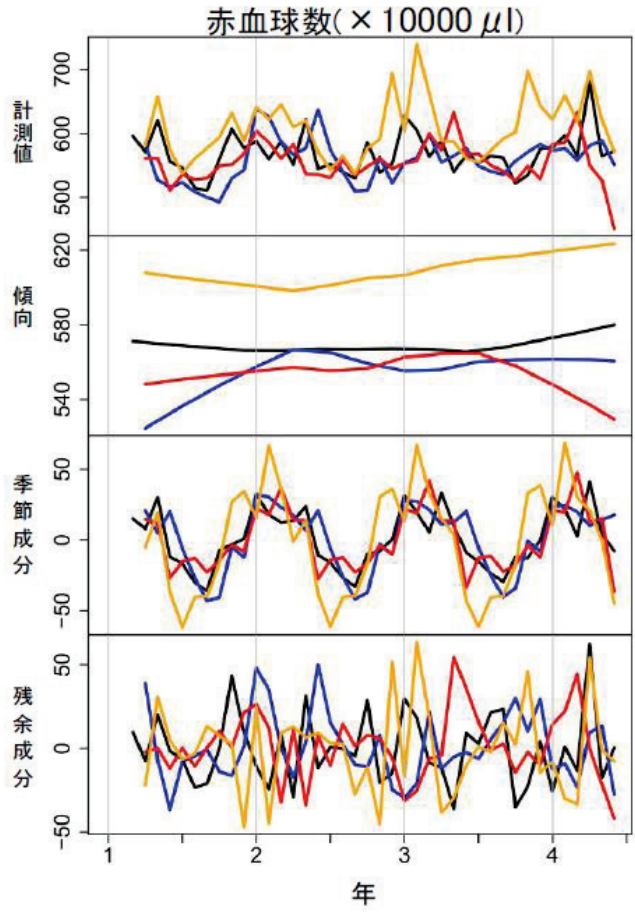
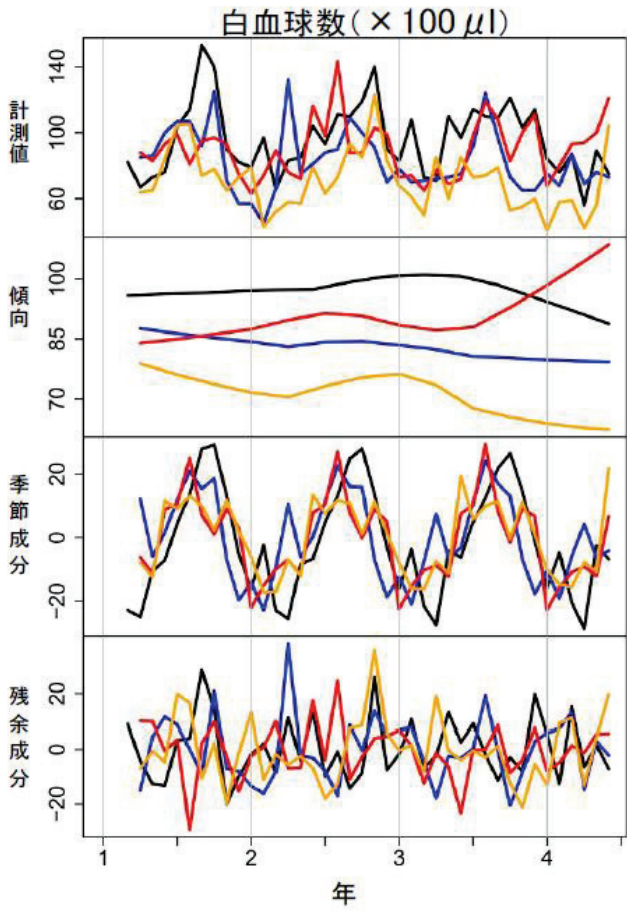


図 2-1. 屋内飼育場の気温・水温および施設周辺の日長.

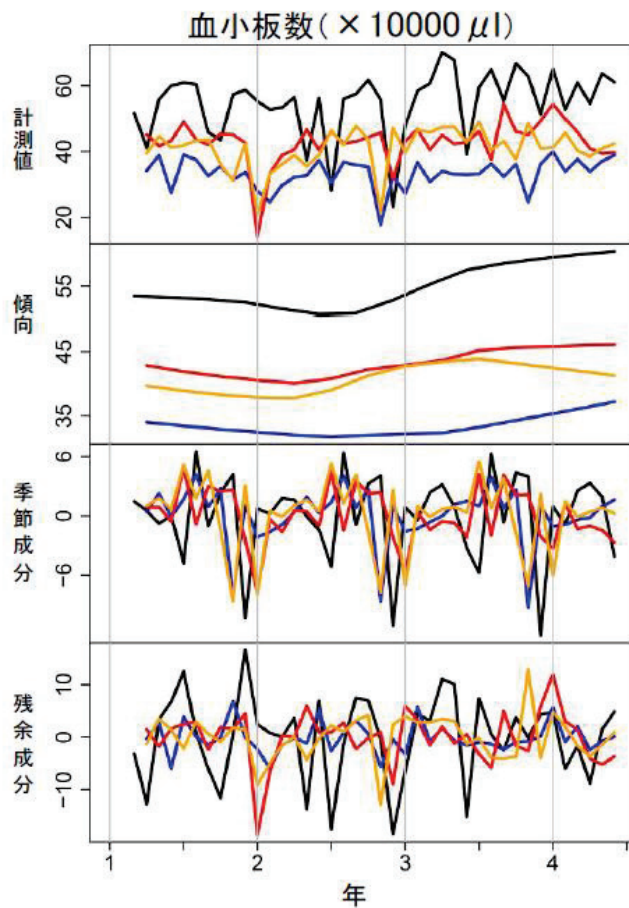
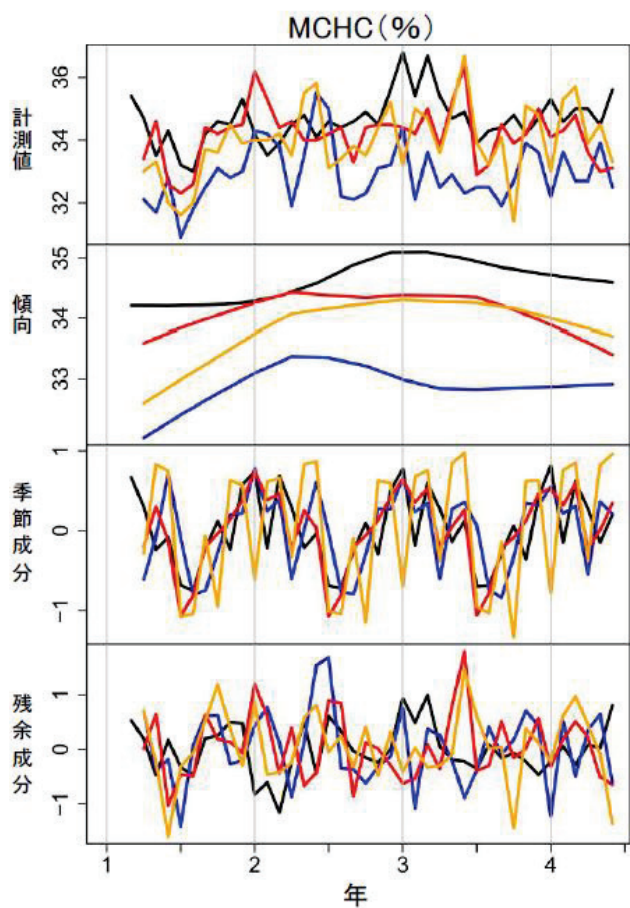
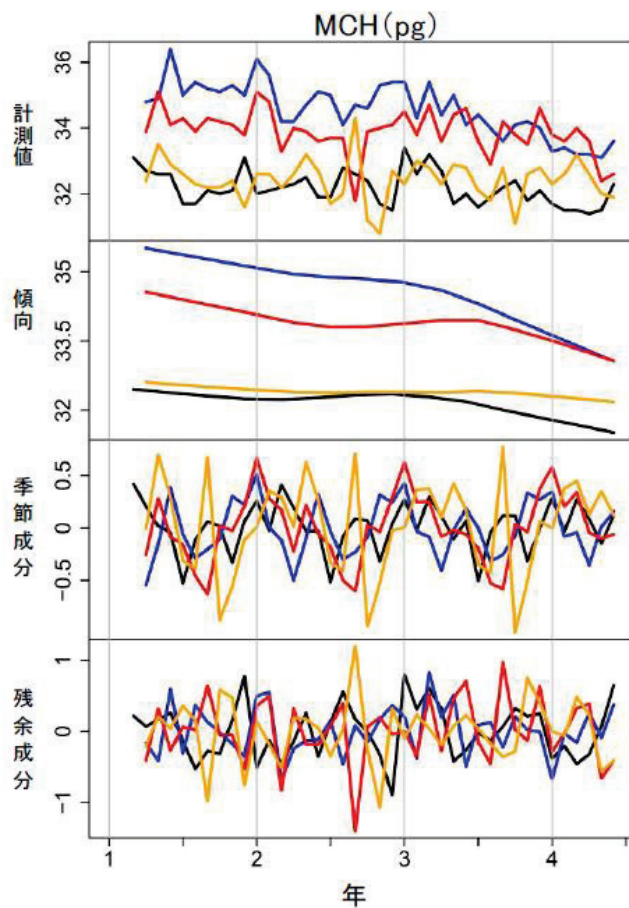
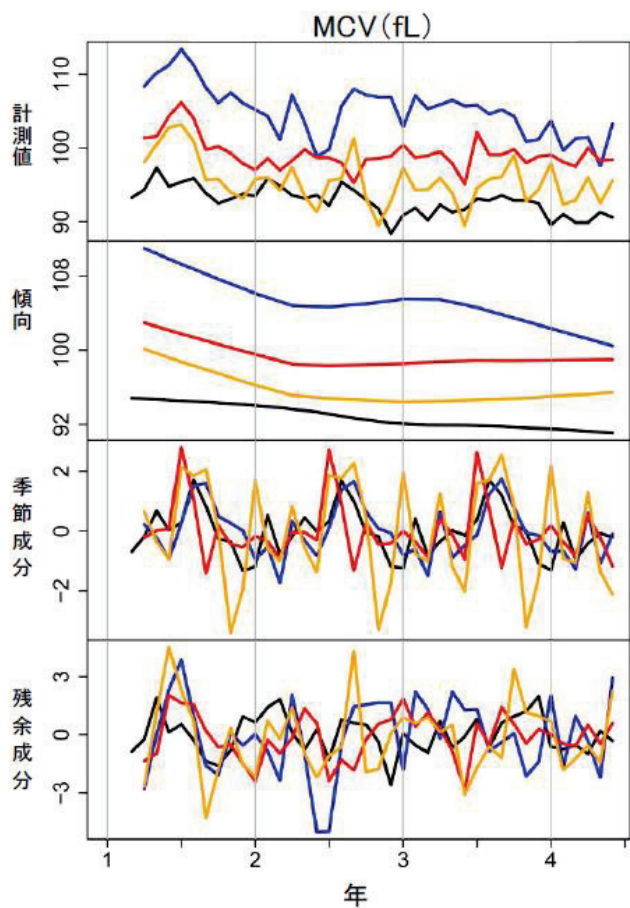
気温と水温は 2013 年から 2016 年までの各月の平均と標準偏差を示す。



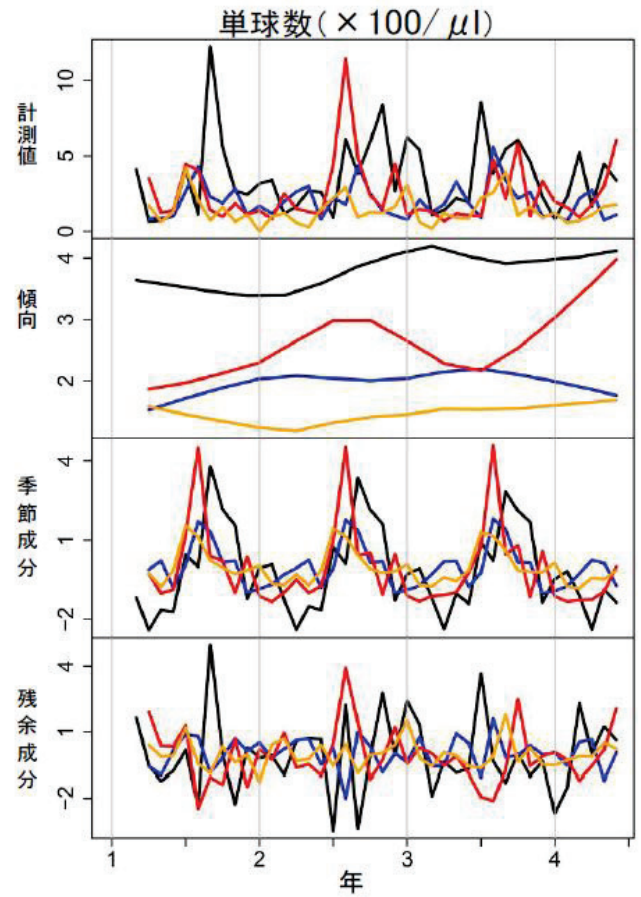
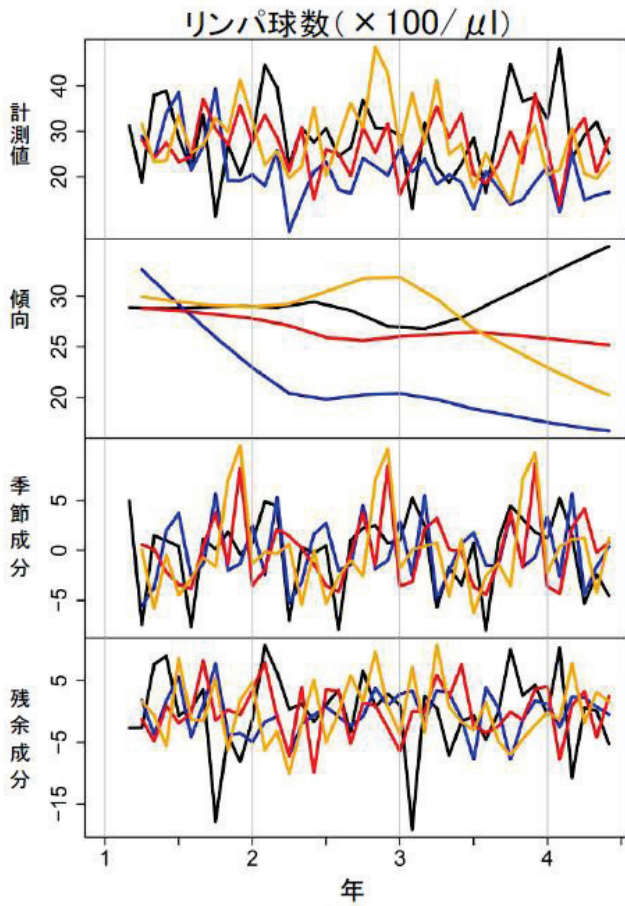
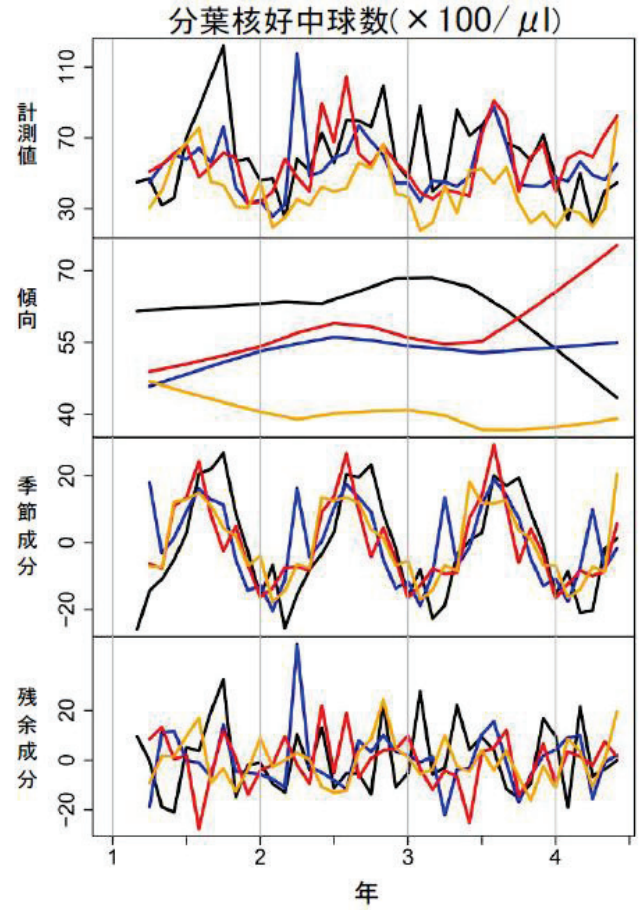
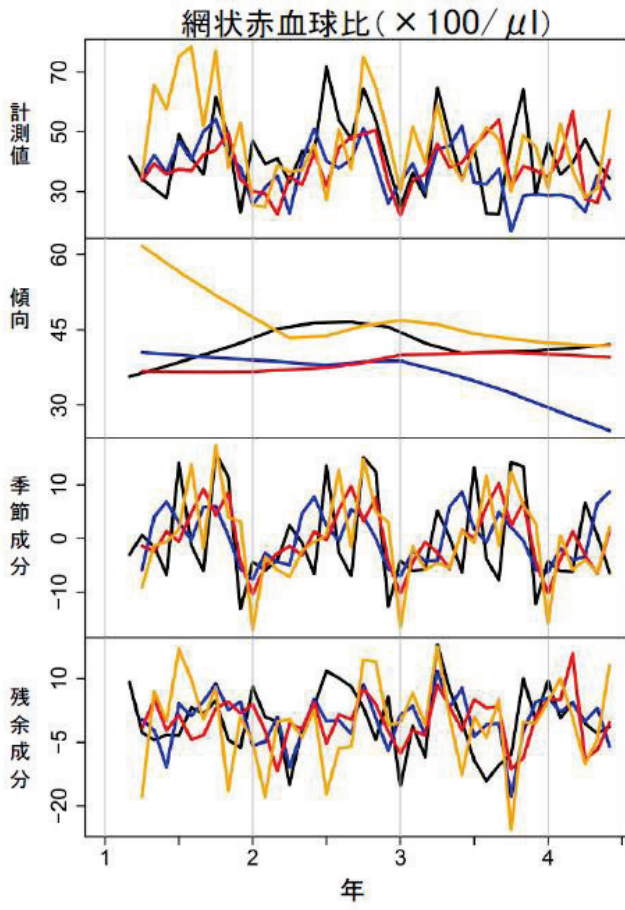
飼育場周辺の日長は例として 2014 年のものを示す。

ID1: — ID2: — ID3: — ID4: —



ID1:  ID2:  ID3:  ID4: 



ID1: ID2: ID3: ID4: 

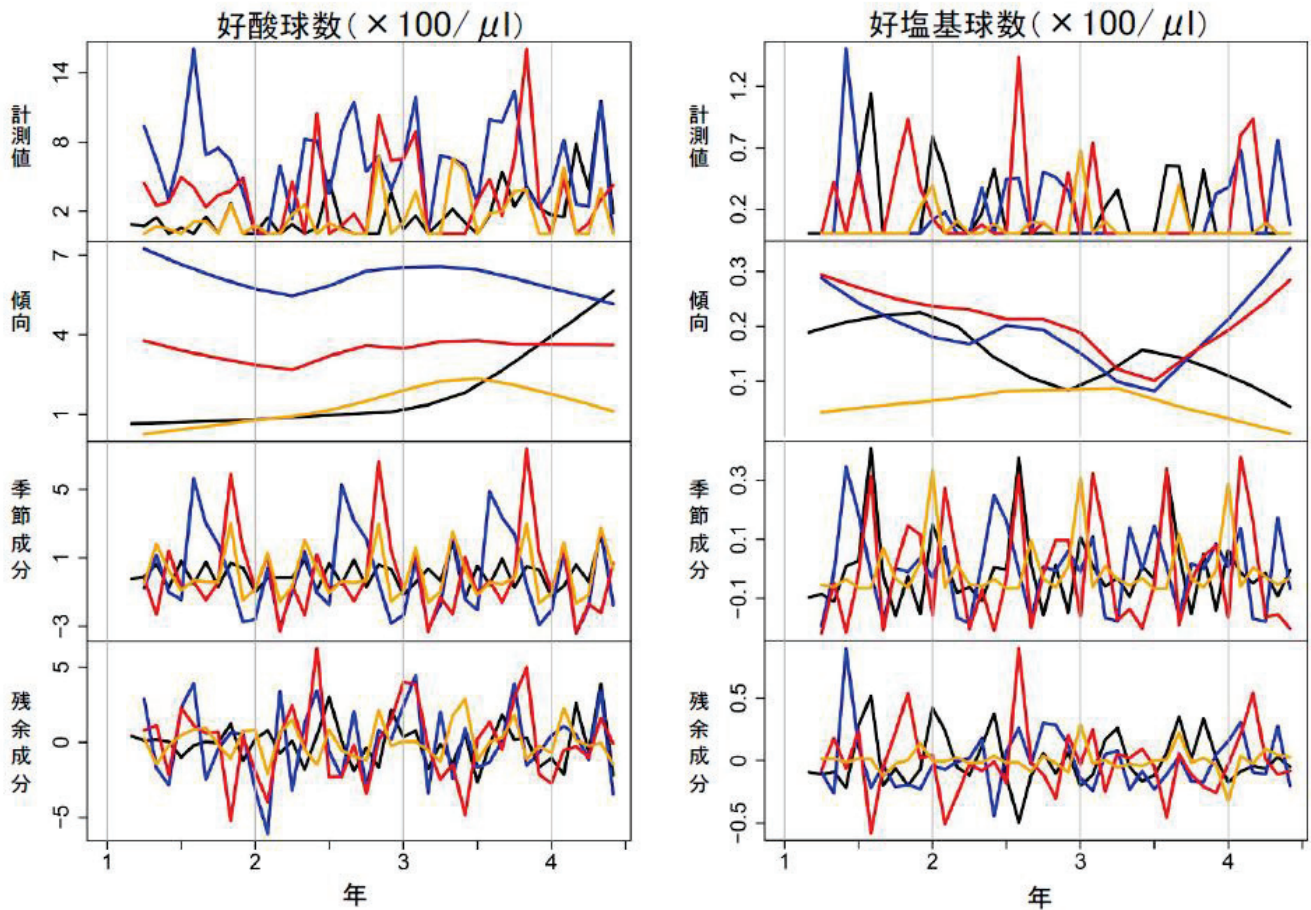
ID1: ID2: ID3: ID4: 

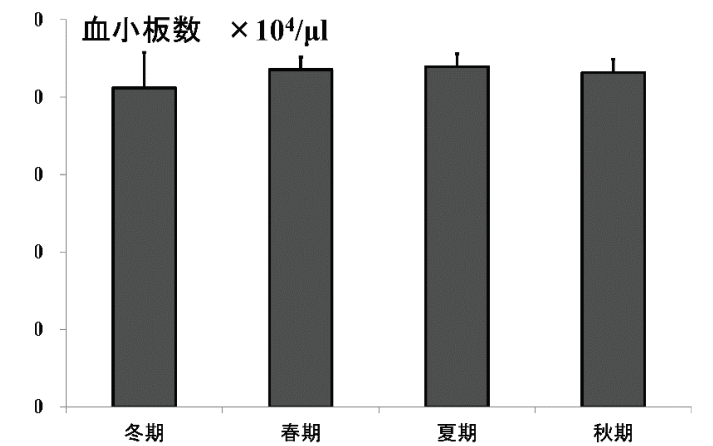
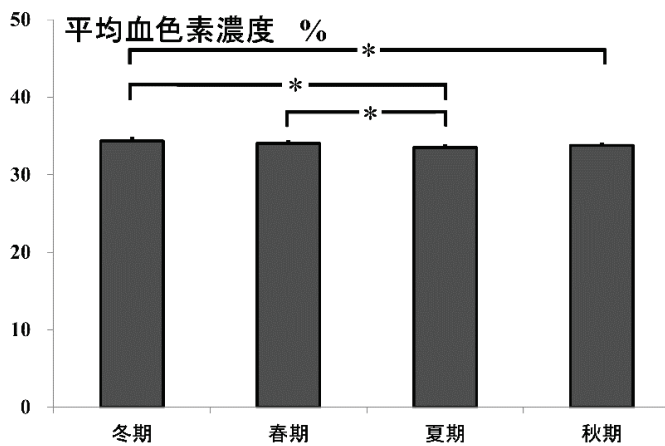
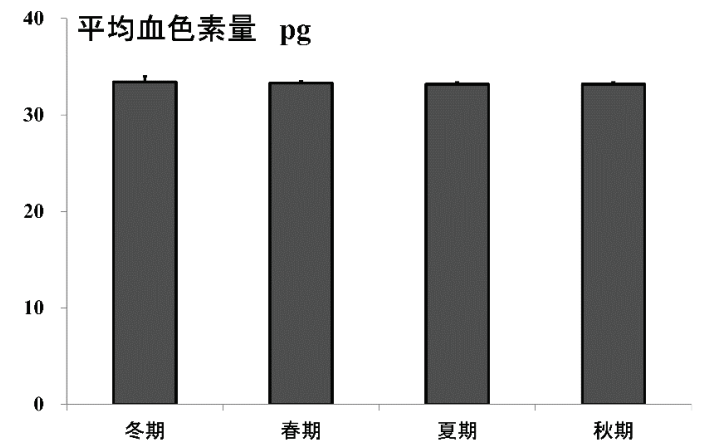
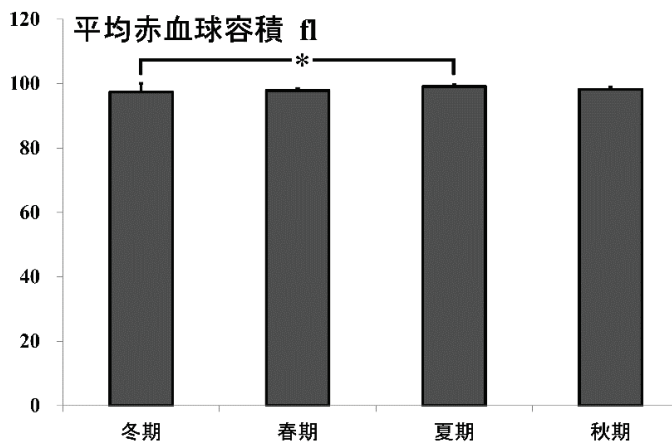
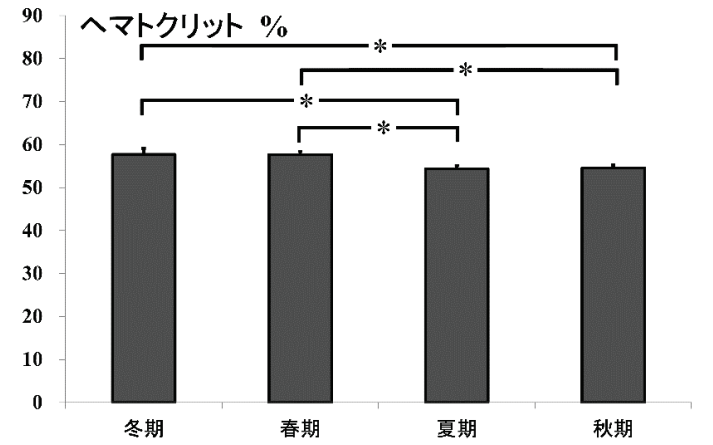
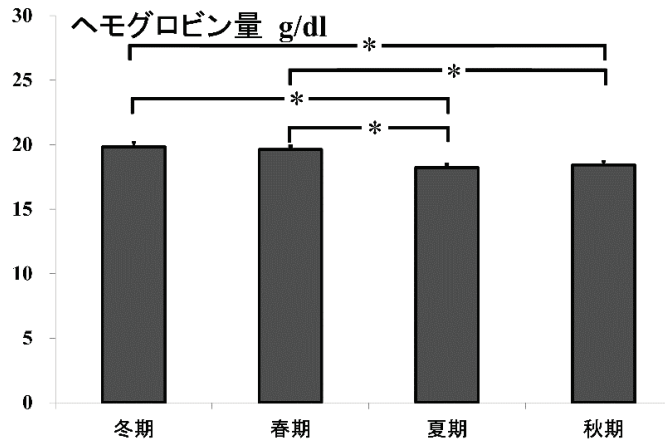
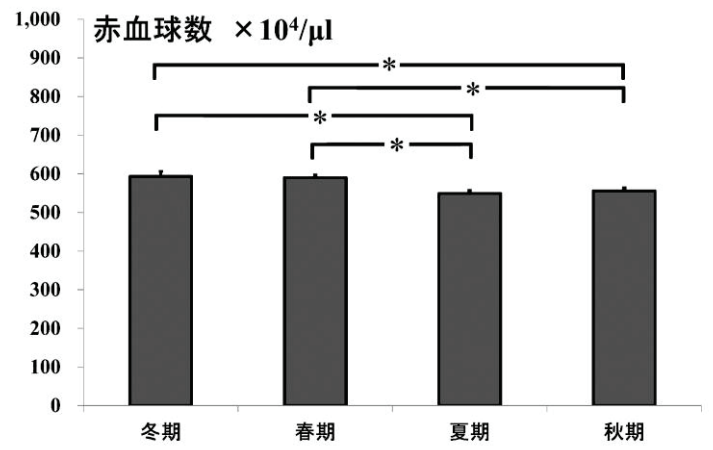
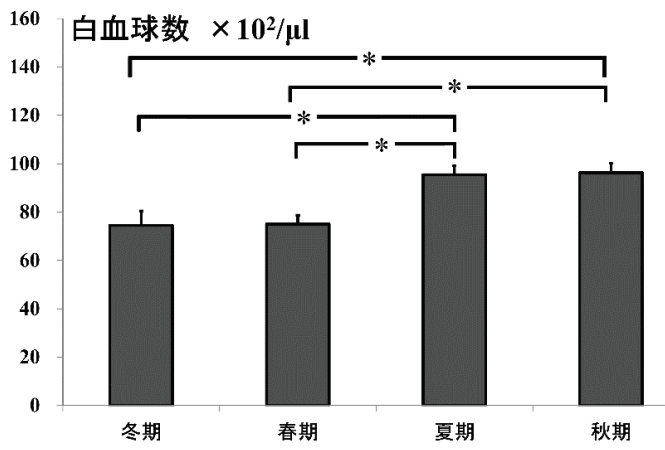
図 2-2-4

図 2-2. キタオットセイ 4 頭から得られた血液計測値との季節分解分析結果

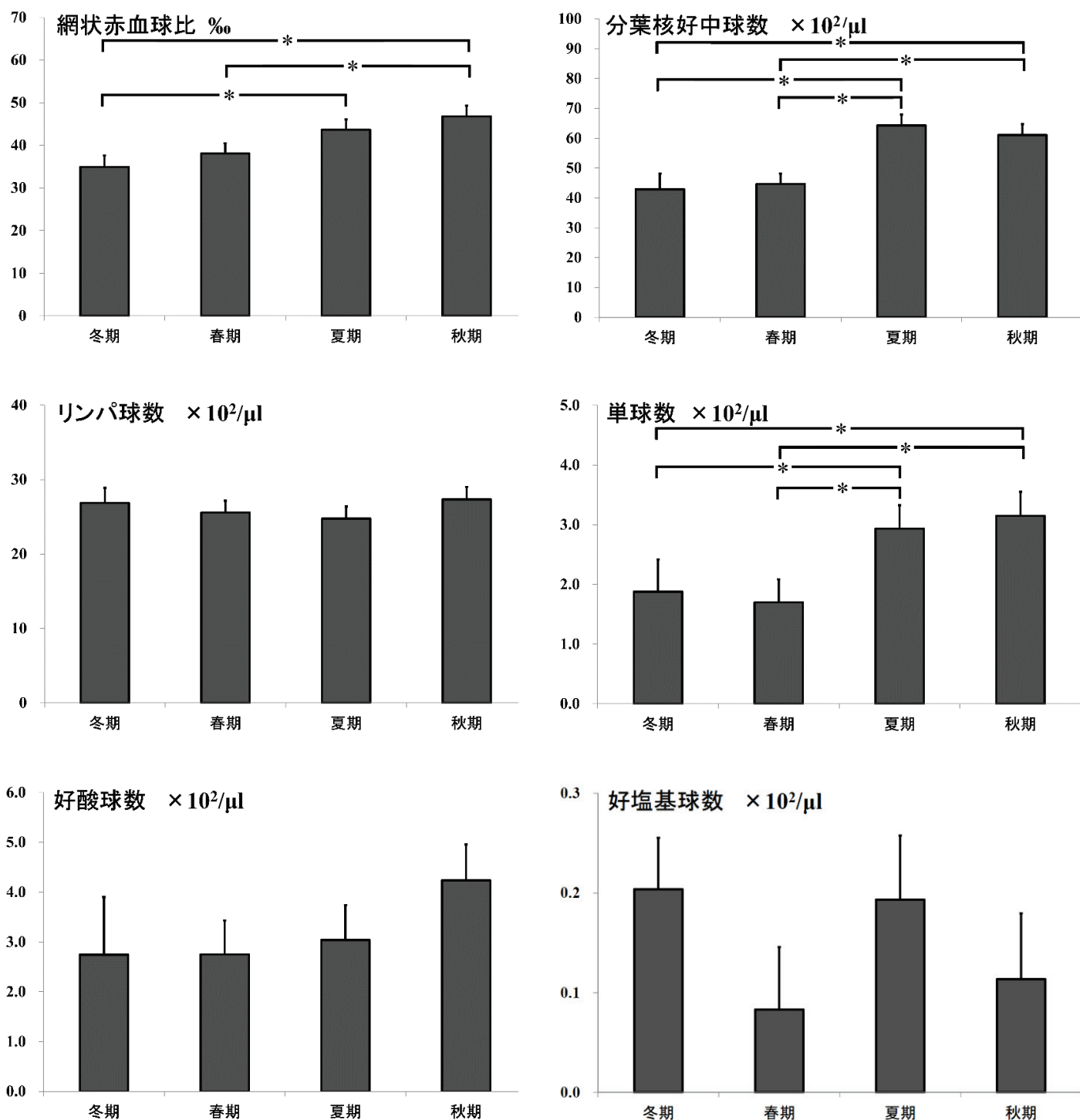
キタオットセイ 4 頭の血液性状の計測値と季節分解分析によって抽出された傾向・季節成分・および残余成分。

横軸の「年」は各供試個体における実験開始年からの経過を示す。

季節成分の確認により白血球数，網状赤血球，分葉核好中球数および単球数は夏期と秋期に高値を示し，冬期と春期に低下した。赤血球数，ヘモグロビン量およびヘマトクリット値は秋期と冬期に高値を示し春期と夏期の値は低下した。MCHC は夏期に低値を示した。MCV, MCH, 血小板，リンパ球，好酸球および好塩基球には明確な傾向は認められなかった。



*: Tukey の多重比較検定により季節間に有意差あり ($P < 0.05$)



*: Tukey の多重比較検定により季節間に有意差あり ($P < 0.05$)

図 2-3-2

図 2-3. キタオットセイ 4 頭から得られた血液学的計測項目の季節別平均
各個体がランダム切片として扱われる一般化線形モデルにより推定。
エラーバーには標準誤差を示す。

*: Tukey の多重比較検定により 2 つの季節間に有意な差を認める ($P < 0.05$)。

表2-1. 使用したキタオットセイ

ID	性別	出生年月日	試料収集期間		試料数
			年月	年齢	
1	雄	2007年6月25日	2009年3月 - 2012年6月	1歳9ヶ月 - 4歳9ヶ月	40
2	雄	2009年7月 ^a	2013年4月 - 2016年6月	3歳9ヶ月 - 6歳11ヶ月	39
3	雌	2009年6月26日	2013年4月 - 2016年6月	3歳10ヶ月 - 7歳0ヶ月	39
4	雌	2010年6月30日	2013年4月 - 2016年6月	2歳10ヶ月 - 6歳0ヶ月	39

^a: 岩手県宮古市田老町にて保護. 保護時の体格より当歳個体と判断する.

表2-2. 5頭のキタオットセイの血液を用いたXN-9100とADVIA2120iによる測定値の比較

ID	性別	赤血球数 ×10,000			白血球数 ×100		
		BCC	FC	BCC/FC	BCC	FC	BCC/FC
3	雌	567	577	98.3%	53	49	108.2%
4	雌	639	671	95.2%	49	44	111.4%
16	雌	519	554	93.7%	83	74	112.2%
18	雄	572	579	98.8%	82	71	115.5%
19	雄	554	571	97.0%	72	60	120.0%
平均	-	570.2	590.4	96.6%	67.8	59.6	113.4%

BCC :多項目自動血球分析装置XN-9100による計測

FC :複数種血液分析装置ADVIA2121iによる計測

表2-4. 飼育下キタオットセイ4頭の血液学的項目の季節別平均と標準偏差

項目	単位	ID1				ID2			
		冬期 ^a n=9	春期 ^b n=12	夏期 ^c n=10	秋期 ^d n=9	冬期 n=9	春期 n=11	夏期 n=10	秋期 n=9
白血球数	×10 ² /ml	90.3 ± 12.5	78.5 ± 13.4	99.8 ± 13.8	120.6 ± 19.1	65.0 ± 9.8	81.1 ± 17.5	93.7 ± 15.2	91.4 ± 18.2
赤血球数	×10 ⁴ /ml	585 ± 21.7	588 ± 37.1	551 ± 15.5	550 ± 29.5	575 ± 35.1	572 ± 19.2	552 ± 35.3	530 ± 27.0
ヘモグロビン量	g/dl	18.8 ± 1.0	19.0 ± 1.2	17.7 ± 0.6	17.7 ± 1.0	20.0 ± 1.5	19.6 ± 0.8	19.1 ± 1.2	18.4 ± 0.9
ヘマトクリット	%	53.8 ± 2.2	54.4 ± 3.7	51.6 ± 0.9	51.2 ± 2.7	59.9 ± 3.6	59.7 ± 2.0	58.3 ± 2.0	56.2 ± 2.2
MCV	fL	91.9 ± 2.2	92.6 ± 2.2	93.6 ± 1.7	93.1 ± 0.7	104.1 ± 2.4	104.4 ± 3.6	106.0 ± 4.6	106.0 ± 2.2
MCH	pg	32.2 ± 0.6	32.3 ± 0.6	32.0 ± 0.4	32.1 ± 0.3	34.7 ± 1.0	34.3 ± 0.8	34.7 ± 0.8	34.7 ± 0.6
MCHC	%	35.0 ± 0.9	34.8 ± 0.8	34.2 ± 0.7	34.5 ± 0.2	33.4 ± 0.8	32.8 ± 0.7	32.8 ± 1.3	32.7 ± 0.6
血小板数	×10 ⁴ /ml	51.8 ± 11.1	56.2 ± 9.3	54.7 ± 11.0	56.3 ± 7.1	32.6 ± 4.7	34.1 ± 2.7	35 ± 3.6	31.3 ± 5.9
網状赤血球比	%	6.1 ± 1.4	7.0 ± 1.6	7.7 ± 2.5	9.0 ± 2.3	5.4 ± 1	6.1 ± 1.4	7.2 ± 1.2	7.7 ± 2.4
分葉核好中球数	×10 ² /ml	54.0 ± 17.0	45.1 ± 16.1	68.2 ± 16.4	80.7 ± 21.6	39.1 ± 7.0	53 ± 21.2	61.9 ± 10.9	59.1 ± 13.1
リンパ球数	×10 ² /ml	31.6 ± 10.4	28.2 ± 6.7	26.5 ± 5.7	30.9 ± 8.8	19.8 ± 3.5	20.0 ± 5.9	22.5 ± 7.5	21.6 ± 7.5
単球数	×10 ² /ml	3.2 ± 1.6	2.3 ± 1.5	3.4 ± 2.3	6.1 ± 2.6	1.2 ± 0.4	1.9 ± 0.9	2.2 ± 1.5	2.6 ± 0.8
好酸球数	×10 ² /ml	1.4 ± 1.1	2.5 ± 3.5	1.1 ± 1.3	1.8 ± 1.9	4.5 ± 3.6	5.6 ± 3.4	6.6 ± 4.4	7.8 ± 2.6
好塩基球数	×10 ² /ml	0.1 ± 0.3	0.1 ± 0.1	0.3 ± 0.4	0.1 ± 0.2	0.2 ± 0.2	0.1 ± 0.2	0.3 ± 0.5	0.1 ± 0.2

^a: 12月 - 2月, ^b: 3月 - 5月, ^c: 6月 - 8月, ^d: 9月 - 11月

MCV: 平均赤血球容積, MCH: 平均血色素量, MCHC: 平均血色素濃度

表2-4. 飼育下キタオットセイ4頭の血液学的項目の季節別平均と標準偏差（続き）

項目	単位	ID3				ID4			
		冬期 n=9	春期 n=11	夏期 n=10	秋期 n=9	冬期 n=9	春期 n=11	夏期 n=10	秋期 n=9
白血球数	×10 ² /ml	79.7 ± 14.5	82.4 ± 10.8	104.0 ± 19.9	95.0 ± 7.5	62.9 ± 13.8	58.9 ± 10.3	84.5 ± 14.5	78.3 ± 20.1
赤血球数	×10 ⁴ /ml	568 ± 22.5	575 ± 33.5	534 ± 32.5	543 ± 10.6	646 ± 44.0	626 ± 34.3	561 ± 12.2	600 ± 41.7
ヘモグロビン量	g/dl	19.4 ± 0.9	19.5 ± 1.4	18.0 ± 1.3	18.4 ± 0.6	21.0 ± 1.6	20.5 ± 1.2	18.1 ± 0.5	19.3 ± 1.4
ヘマトクリット	%	56.0 ± 2.0	56.9 ± 3.1	53.6 ± 3.5	53.6 ± 1.3	61.3 ± 3.8	59.7 ± 3.7	54.2 ± 2.4	57.1 ± 3.5
MCV	fL	98.6 ± 0.9	99.1 ± 1.4	101 ± 3.3	98.7 ± 1.4	94.9 ± 1.9	95.4 ± 2.3	96.5 ± 4.3	95.3 ± 3.3
MCH	pg	34.2 ± 0.5	33.9 ± 0.7	33.7 ± 0.6	33.8 ± 0.7	32.5 ± 0.4	32.7 ± 0.4	32.3 ± 0.4	32.2 ± 1.0
MCHC	%	34.7 ± 0.6	34.2 ± 0.7	33.6 ± 1.2	34.2 ± 0.4	34.3 ± 0.8	34.3 ± 0.9	33.5 ± 1.6	33.8 ± 1.0
血小板数	×10 ⁴ /ml	40.6 ± 11.7	42.5 ± 2.6	43.2 ± 3.3	45.8 ± 3.3	39.8 ± 7.8	41.4 ± 4.1	42.9 ± 2.8	39.3 ± 8.3
網状赤血球比	%	5.8 ± 0.9	6.2 ± 1.3	7.6 ± 0.9	8.3 ± 1.2	6.2 ± 1.7	6.5 ± 1.8	9.3 ± 2.8	8.8 ± 2.8
分葉核好中球数	×10 ² /ml	46.2 ± 11.2	50.9 ± 10.9	71.9 ± 19.5	59.6 ± 10.4	29.4 ± 9.1	30.3 ± 6.7	55.3 ± 13.7	44.9 ± 13.2
リンパ球数	×10 ² /ml	27.3 ± 8.0	28.0 ± 4.2	24.2 ± 5.1	27.4 ± 4.9	30.8 ± 8.1	26.1 ± 6.2	25.9 ± 5.2	29.5 ± 9.2
単球数	×10 ² /ml	1.9 ± 1.1	1.7 ± 0.9	4.0 ± 3.0	2.4 ± 1.6	1.1 ± 0.8	0.9 ± 0.5	2.2 ± 0.9	1.5 ± 0.9
好酸球数	×10 ² /ml	3.8 ± 3.1	1.4 ± 1.8	3.5 ± 2.9	5.1 ± 4.8	1.3 ± 2.0	1.4 ± 2.1	1.0 ± 1.6	2.2 ± 2.2
好塩基球数	×10 ² /ml	0.3 ± 0.3	0.1 ± 0.3	0.2 ± 0.4	0.2 ± 0.3	0.1 ± 0.2	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.1 ± 0.1

^a: 12月 - 2月, ^b: 3月 - 5月, ^c: 6月 - 8月, ^d: 9月 - 11月

MCV: 平均赤血球容積, MCH: 平均血色素量, MCHC: 平均血色素濃度

図表は Kaoru Kohyama, Masashi Kiyota, Yasuo Inoshima. (2021) . Longitudinal study of northern fur seal (*Callorhinus ursinus*) hematology. The Journal of Veterinary Medical Science 83: 1128–1137 から一部改変転載。

第 3 章

キタオットセイ (*Callorhinus ursinus*) の成長と 性ステロイドホルモンの消長に関する研究

本章は次の論文から一部改変転載しています。

タイトル : Fluctuations in serum steroid hormone concentrations and body mass during growth and sexual maturation in captive northern fur seals (*Callorhinus ursinus*).

著者 : Kaoru Kohyama, Yasuo Inoshima, Masashi Kiyota

雑誌 : The Journal of Veterinary Medical Science

出版年・巻号・頁 : 2022 年 84 巻 1 号 171–180 頁

DOI : <https://doi.org/10.1292/jvms.21-0330>.

序 論

第 1 章，第 2 章の実験を開始した時点では供試したキタオットセイ *Callorhinus ursinus* は年齢的にも，また外見上からも性成熟には達していないと考えられたが，実験を進めるうちに春機発動を迎えたと思われる兆候を認めた。そこで研究期間をさらに延長し，性成熟前後の性ステロイドホルモン動態を中心に春機発動と成長の関係および妊娠診断について検討した。

第 2 章でも示したようにキタオットセイは，北部太平洋に生息するアシカ科海棲哺乳類であり，6 月から 10 月にかけてベーリング海やアリューシャン列島，千島列島などにある特定の繁殖島の海岸で密集した集合体（ルッカリー）を形成し，出産・交尾・子育てを行なう（8，31，74）。繁殖期が終わる 11 月までには，当歳の仔獣も含むキタオットセイは繁殖島を離れ，成熟個体は翌年の繁殖期まで大洋上を索餌回游する。キタオットセイの繁殖周期は種として高度に同期しており，殆どの出産と交尾は 7 月前半の 2 週間に集中する（31，48，74）。見かけの妊娠期間は約 360 日で，これには 3～5 ヶ月の着床遅延期間が含まれる（2，23）。雌は通常夏に 1 頭の仔を出産し，11 月初旬までに離乳する。離乳後の仔獣は繁殖島を離れて索餌回游を続け，性成熟後に繁殖島での繁殖活動に参加するまで，数年間上陸することなく索餌回游を続ける（11，29，31，75，115）。キタオットセイは陸上における繁殖と上陸することのない索餌回游という明確な生活様式を持っているため，繁殖周期と成長に関連する性ステロイドホルモンの変化は彼らの環境への適応や生理学的特徴を理解する上で重要であ

り、また大変興味深い。しかし、索餌回游期のキタオットセイの繁殖生理学に関する情報は極めて少ない。

そこで本研究では4頭の飼育下キタオットセイを用いて、春機発動前から性成熟後にわたる3～5年の間、毎月1回の頻度で性ステロイドホルモンを計測し、得られた結果を解析して性ステロイドホルモン濃度の変化を明らかにすると共に、身体の成長と春機発動の関係について明らかにすることを目的とした。加えて、ホルモンプロファイルの変化とホルモンレベルを利用した妊娠診断の可能性についても検討した。

材料および方法

1) 供試動物

本研究ではキタオットセイは第 1 章および第 2 章の研究に供試した個体と同一の雄 2 頭雌 2 頭の計 4 頭から採材した。個体についての詳細は第 1 章および第 2 章と同様であるが，採材時の年齢等は表 3-1 に示す。

採材期間は ID1 が 2009 年 3 月から 2012 年 6 月までの 3 年 3 ヶ月間，残る 3 頭が 2013 年 4 月から 2018 年 3 月までの 5 年間とした。ID1 は同居していた成熟雌 2 頭と共に本研究とは無関係の実験のため 2012 年 6 月下旬に餌料を変更したところ 2012 年 7 月初旬に相次いで死亡した。病理解剖や細菌検査を行なったが 3 頭とも死因の特定はできなかった。本研究で使用した ID1 の全試料は餌料を変更する前に収集が終了しており，また死亡までが急性の経過をとったこと，6 月前半に行なった血液検査に全く異常が認められなかったことから ID1 の死因が血液性状やホルモン値には影響を与えていないと考えられる。図 3-1 にこの調査で使用した屋内施設の 2013 年から 2017 年までの月平均気温と平均水温および 2014 年の日長を示す。その他の飼育環境は第 1 章および第 2 章に述べたものと同様である。

2) 試料採取

第 1 章および第 2 章の試料採取と同様，研究期間中は 1 ヶ月に 1 回それぞれのキタオットセイから採材した。採血の方法も第 1 章および第 2 章と同様である。前述のとおり，ID1 は研究開始から死亡する

までの3年3ヶ月間、残る3頭は5年間継続して1ヶ月に1回の採材を行なった。採取した血液試料は血清採取用の真空採血管に移した後直ちに冷蔵保存し、12時間以内に血清分離して計測した。研究期間中に4頭合計で218の試料を得ることができた。

尚、この研究は、国立研究開発法人 水産研究・教育機構 国際水産資源研究所(横浜)による研究プロジェクトの一環として実施された。また、動物実験手順は、米国立衛生研究所の実験動物の管理と使用に関するガイド(105)に従って、岐阜大学動物実験計画書の承認を受けた(承認番号14094および17186)。

3) 性ステロイドホルモンの計測

性ステロイドホルモンの計測は第1章および第2章と同様に民間の検査機関(SRL)に依頼した。得られた試料から性ステロイドホルモンとして、雄はテストステロン、雌はプロゲステロンとエストラジオールを計測した。3種のホルモンは電気化学発光法により、Cobas8000e801 モジュール(日立ハイテクノロジーズ、東京)を使用して計測した。計測器メーカーの仕様によると、検出限界はテストステロンが0.03ng/ml、プロゲステロンが0.03ng/ml、エストラジオールが5.0pg/ml、また類似のホルモンとの交差反応率は、テストステロンとアンドロステンジオン、コルチゾールおよびコルチゾンが、それぞれ2.66%、0.016%および0.002%、プロゲステロンとアンドロステンジオール、アンドロステンジオン、アロプレグナノロン、コルチコステロンおよび11-デオキシコルチコステロンが、それぞれ0.01%、0.107%、0.347%、0.921%および3.92%、エストラジオールとエストロン、エストリオールおよびアンドロステンジオンが、そ

れぞれ 0.761%, 0.325%, 0.005%であった。

4) 成長と春機発動の関係

成長と春機発動の関係を明らかにするため、各年の繁殖期前の平均体重 (BMPB) を求め、春機発動が認められた年との関係について分析検討した。BMPB はそれぞれの個体で繁殖期前から繁殖期最初期に当たる 4 月から 7 月の体重を平均することにより求めた。

性ステロイドホルモンレベルの上昇が生殖器系の成熟に関連することが報告されていることから (94)、本研究では血清ステロイドホルモン変動の観察を基に春機発動を規定した。具体的には、雄キタオットセイでは繁殖期の成獣雄における精子形成とステロイド産生との関係を示した以前の研究 (103) を基に血清テストステロン濃度の最初の上昇を、また雌キタオットセイでは成獣雌で観察された発情および排卵後の典型的なホルモン変動パターン (50) である血清プロゲステロン濃度の大幅な上昇が初めて観察された時点を春機発動とした。

5) 過去に得られたプロゲステロン計測記録の分析

1990 年代に伊豆・三津シーパラダイスで計測したキタオットセイの血清プロゲステロン値を改めて分析し、妊娠診断に応用できるかどうかについて検討した。1993 年から 1995 年かけて、それぞれの年の 11 月から 5 月に 7 頭の雌成獣のキタオットセイから採材した血清試料を使用し、ラジオイムノアッセイ (RIA) 固相法を用いて血清プロゲステロン値を計測した。計測は民間の臨床検査機関 (SRL) に依頼した供試した雌個体はすべて野生由来であり、水族館に搬入後に繁殖歴のある個体である。また RIA 固相法によるプロゲステロン計測

の検出限界は 0.2ng/ml であった。得られた結果を妊娠個体群と非妊娠個体群に分類し、それぞれ月別の平均値を求めて Welch の t 検定により月毎に妊娠群と非妊娠群の間の有意差の有無を確認した(有意水準 0.05, 両側検定)。実験に用いた雌個体が妊娠個体か非妊娠個体かはその年の繁殖期における出産の有無によって確認した。尚, 統計分析は R4.0.3 を使用して行なった (76)。

結 果

1) 雄獣

図 3-2 および図 3-3 にそれぞれ ID1 および ID2 の血清テストステロン濃度と体重測定値の月ごとの変化を示す。ID1 の採材は、2009 年 4 月に 1 歳 10 ヶ月で開始した。ID1 のテストステロンは、2010 年 7 月に年齢が 3 歳、体重が 27.0kg の時に初めての上昇(0.29ng/ml)が検出された。また、2010 年 12 月と 2011 年 1 月にも血清テストステロン値のわずかな上昇が検出された。2011 年には繁殖期直前に当たる 5 月にテストステロン濃度の急激な上昇 (0.68ng/ml) が検出され、7 月には 0.27ng/ml という値を示した。2012 年には血清テストステロン濃度は 4 月に上昇し始め、その後死亡直前の 6 月まで上昇を続けた。ID1 の体重は急激な上昇を見ることはなかったが、徐々に増加を続けた。実験期間中、ID1 と同居していた雌個体 2 頭に妊娠は確認されず、ID1 は繁殖行動を行っていないと考えられた。

ID2 の採材は、推定年齢 3 歳 9 ヶ月となる 2013 年 4 月に開始した。ID2 が推定年齢 4 歳となった 2013 年 10 月の繁殖期の後、血清テストステロンのわずかな増加 (0.17ng/ml) が検出され、翌年以降毎年、繁殖期に当たる夏期に血清テストステロン濃度の上昇が認められた。ID2 の体重は 2013 年以降、春期から夏期にかけて上昇し秋期から冬期にかけてある程度低下するという周期的な変動を伴いながら徐々に増加し、2015 年の繁殖期には推定年齢 6 歳で 60kg を超えるまでとなった。同居雌個体である ID3 が 2016 年の繁殖期後期に出産したことから、ID2 は 2015 年の繁殖期に ID3 と繁殖活動を行なったと考

えられた。

2) 雌獣

図 3-4 および図 3-5 に ID3 および ID4 の血清プロゲステロン値、血清エストラジオール値、体重および出産日の記録を示す。ID3 の血清プロゲステロン値とエストラジオール値は計測を開始した 3 歳時から 5 歳にいたるまでは大きな変動は認められず、プロゲステロン値は基準値（2013 年 4 月から 2015 年 7 月までの平均値 \pm SD, 2.71ng/ml \pm 1.49）に維持され、エストラジオール値は検出限界を超えることがなかった。ID3 が 6 歳となった 2015 年 8 月に高レベルのプロゲステロン（44ng/ml）が初めて計測された。ID3 はこの繁殖期に妊娠し、翌年 8 月に出産した。ID3 は 2015 年以降、8 月、10 月から 11 月、3 月から 4 月に他の月よりも血清プロゲステロン値が高値を示し、また 2016 年から 2018 年まで毎年の出産が認められた。一方、ID3 の体重は 2013 年から 2015 年にかけて徐々に増加したが、最初の妊娠期間中に当たる 2016 年 1 月から 7 月にかけて著しく増加し出産後に減少した。同様の変動は妊娠が確認された 2016 年から 2018 年にも認められた。

ID3 と同様に、ID4 の血清プロゲステロン値も実験を開始した 3 歳時から 4 歳時までは顕著な変動は認められなかった（2013 年 4 月から 2015 年 6 月までの平均値 \pm SD, 2.34ng/ml \pm 1.47）が、5 歳となる 2015 年 7 月に 34.2ng/ml まで急激に増加した。ID4 はこの急激な上昇が認められた翌年（2016 年）には出産が観察されなかったが、2017 年の繁殖期に出産が観察された。ID4 が妊娠していると考えられる 2016 年～2017 年の血清プロゲステロン値は 8 月、10 月、および 2

月から3月に上昇が観察された。また、ID4の体重は2013年から2015年にかけて徐々に増加したが、妊娠中の2016年11月から2017年6月にかけて大幅な増加が観察された。

雌2頭の血清エストラジオール値は前述のように測定限界以下を示すことが多かった。ID4は2013年6月にエストラジオールの上昇を示したが、プロゲステロンの上昇は認められなかった。2016年6月にもエストラジオールの急激な上昇が計測され、その後鱗脚類においても排卵と黄体形成を表す典型的なホルモン（14）とされるプロゲステロンが徐々に増加した。2015年と2017年には繁殖期初期のエストラジオールの上昇は目立たなかった。ID3は、夏期と冬期にエストラジオールの散発的な上昇が計測された。

3) 春機発動と体重の関係

表3-2に供試キタオットセイの各年齢におけるBMPBを示す。ID1はBMPBが20kgを超えるまで春機発動は認められなかった。ID2は研究を開始した年に春機発動が認められたと考えられるが、この時のBMPBは29.5kgであった。ID3とID4のBMBPは、2015年に春機発動が認められた際、それぞれ21.1kg, 21.6kgであった(表3-2)。供試したキタオットセイは全頭BMPBが20kgを超えた後に春機発動が確認された。

4) プロゲステロン値を用いた妊娠診断

表3-3に前述の1990年代に計測された記録を用いた、妊娠雌と非妊娠雌の月ごとのプロゲステロン濃度の比較を示す。妊娠雌と非妊娠雌のプロゲステロン値をWelchのt検定（両側検定）を用いて各月

で比較したところ，12月，2月，3月の妊娠雌のプロゲステロン値は非妊娠雌よりも有意に高かった ($P < 0.05$)。

考 察

本研究では雌雄各 2 頭の飼育下キタオットセイを使用して、性ステロイドホルモンと体重を長期にわたりモニタリングすることにより、春機発動前後における生理学的変化を明らかにした。野生下キタオットセイの原因不明の減少が続いている現状 (30) において、本研究はキタオットセイの繁殖生理を理解し、また飼育下での繁殖を促進するための基礎となる重要な情報を提供できると考える。

供試した雄 2 頭は血清テストステロン濃度の初めの上昇から、ID1 は 3 歳、ID2 は 4 歳で春機発動を迎えたと判断した。春機発動以降、血清テストステロン濃度は繁殖期に定期的に増加し、キタオットセイにおいてこれまでに報告されたホルモン変動の典型的な季節パターンを示した (51, 72, 103)。鰭脚類のテストステロン濃度は一般的に性成熟に伴って増加することが知られている (81)。雄個体の春機発動は精巣内における最初の精子形成が認められた時と定義されるが、Tsubota et al. 2001 の報告によると、キタオットセイにおいて血清テストステロン濃度と精子形成の間には相関が認められるとのことであり、またキタオットセイの被毛と精子形成およびテストステロン濃度との関係を示した最近の研究 (71) においても類似の結果が得られていることから、本研究では血清テストステロン濃度の初めの上昇を春機発動の指標とした。野生の雄キタオットセイでは精巣重量と陰茎骨長の急激な増加が 3~4 歳で見られることが報告されている (85)。また最近の研究では精巣の大きさと陰茎骨長が性的成熟と精子形成の効果的な指標であることが確認された (42)。今

回の研究における飼育下キタオットセイの縦断的観察は、雄のキタオットセイが3~4歳前後に春機発動を迎え性成熟に向かうという雄の性成熟過程に関する横断的研究結果に基づくこれらの文献情報と一致した。

雄の体重は春機発動に至るまでは細かい変動を伴いながら徐々に増加したが、春機発動後は春から夏にかけて大きく上昇し、秋から冬にかけて下降するという明確な季節に伴う変動を繰り返しながら増加した。成熟した雄キタオットセイに見られるこのような体重変動は **fat male phenomenon** として知られている (24, 86)。野生の雄キタオットセイは繁殖期に長期間絶食するため体重が減少するのであろうと報告されている (31, 102)。しかし今回の研究における雄個体は繁殖期においても要求量を満たすように給餌を行なったにもかかわらず体重の大きな季節変化を示した。この結果はキタオットセイ雄成獣の季節に伴う体重変動は栄養状態だけでなく、毎年の繁殖期において上昇するテストステロンの同化亢進作用に反応した生理状態にも大きく影響されていることを示唆している (24, 54, 64)。

雌キタオットセイの春機発動は、本研究では初めての排卵の結果と考えられる血清プロゲステロン濃度の最初の大きな増加を指標とした。春機発動後の雌キタオットセイからは、血清プロゲステロン濃度の季節に関連した変動と不定期に時折検出されるエストラジオールを計測することができた。今回観察された雌個体の血清プロゲステロン濃度の季節に関連した変動は、過去に報告された飼育下キタオットセイ雌成獣の性ステロイドホルモン変動の概要とほぼ一致していた (50, 57)。また、ID3は2015年の春機発動時に妊娠し、その後毎年正常な出産を繰り返した。ID4は春機発動時の排卵があったと考え

られる 2015 年には妊娠せず、2016 年には出産が認められなかったが、その後 2017 年と 2018 年には出産が認められた。これらの研究期間中の出産は、今回の研究における雌個体 2 頭の春機発動後の生殖周期が正常であることを示している。一方で、血清エストラジオール濃度の計測では、エストラジオールの特徴である排卵時の脈動的な急増（33, 104）のためか、今回の研究で行なった一ヶ月に一回の計測で雌キタオットセイの春機発動を確認することは困難であった。今回の計測ではエストラジオールが測定限界以下となる結果が多かったことから、採血間隔や計測方法の再検討を今後の課題としたい。

今回の研究の結果では血清プロゲステロン濃度の計測がキタオットセイの妊娠診断に利用できる可能性を示す事が出来た。繁殖期初期の血清プロゲステロン濃度の大幅な上昇は排卵後の黄体の成長を反映している。8 月に計測された血清プロゲステロン濃度の上昇から、ID3 では 6 歳、ID4 では 5 歳で春機発動を迎えた事が観察された。8 月に上昇した血清プロゲステロン濃度は翌 9 月に低下し晩秋に再び上昇した。着床遅延のあるキタオットセイにおいて、この晩秋における血清プロゲステロン濃度の増加は、胚の着床に関連した黄体の再活性化を反映していると考えられる（14, 15, 111）。妊娠雌キタオットセイ（ID3 2015–2016, ID3 2016–2017 および ID4 2016–2017）は 2 月、3 月および 4 月にプロゲステロン濃度の上昇を示したが、非妊娠雌（ID4 2015–2016）はこの春期の増加が認められなかった。非妊娠雌では冬期から春期にかけて黄体が退行したと考えられる。

キタオットセイの妊娠雌と非妊娠雌の間に観察された血清プロゲステロン変動の差は妊娠診断に用いることが可能である。伊豆・三津シーパラダイスで 1990 年代に行なったキタオットセイの血清プロゲ

ステロン濃度計測結果の分析により、12月、2月、3月の妊娠個体と非妊娠個体の間にプロゲステロン濃度に有意差があることが明らかになったが、これらの結果は血清プロゲステロン濃度に基づく妊娠診断が冬期から初春にかけて可能であることを示している。キタオットセイの妊娠診断に関しては、血清リラキシン濃度が効果的な指標であると報告されている(10)。しかし、その有効性は妊娠後期に限定されているとされ(89)、またペプチドホルモンであるリラキシンのキタオットセイにおける計測が一般化しているとは言えない。一方で、ステロイドホルモンであるプロゲステロンはヒトの臨床検査機関で比較的手軽に計測できるという実用的な利点がある。また、血清プロゲステロン濃度を指標とした妊娠診断はカリフォルニアアシカ *Zalophus californianus* (38)、トド *Eumetopias jubatus* (84)、オーストラリアアシカ *Neophoca cinerea* (28) およびゼニガタアザラシ *Phoca vitulina* (39) など他の鰭脚類でも報告されている。血清プロゲステロン濃度の計測と血清リラキシン濃度計測あるいは超音波診断のいずれかを組み合わせることで、より正確な妊娠診断が期待できる(81)。

伊豆・三津シーパラダイスの記録によると、屋外自然飼育場で飼育されている雌キタオットセイは大部分が4歳で初めて出産することから3歳で春機発動を迎えていると考えられる。ID3の春機発動は伊豆・三津シーパラダイスにおける飼育下雌キタオットセイの典型的な春機発動よりも3年遅れていたことになる。年齢だけでなく成長の程度や栄養状態などの体の状態は春機発動に影響を与える可能性のあるもう一つの要因である可能性が高い。ID3は出生当初から母乳を飲むことができず、止むを得ず人工哺育を行なった個体であり(52)、

屋外自然飼育場で離乳した個体や離乳がうまくいかず収容して離乳させた個体と比較して初期成長が著しく悪かった。ID3 と ID4 の BMBP は共に春機発動前に 20kg を超えることはなかったが、年齢が違っているにもかかわらず同じ 2015 年に春機発動を迎え、またこの年の BMBP はそれぞれ 21.1kg と 21.6kg で初めて 20kg を超えた(表 3-2)。野生の雌キタオットセイでは年齢が春機発動の重要な要因であると考えられることが多い(29, 31, 110, 115)。しかし今回の研究の結果からは BMBP が 20kg を超えるかどうか飼育下雌キタオットセイの春機発動を迎える目安であることが示唆される。本研究における 2 頭の飼育下雄キタオットセイも 3 歳で春機発動を迎えた際の BMBP は 20kg を超えていた(表 3-2)。野生のキタオットセイでは雄も雌も平均 3~4 歳で体重 20kg に達すると報告されている(7, 102)が、体格的な成長には大きな変動があるとも報告されている(102)。Trites and Bigg (1992) は年間の成長の変動は海の水質条件を反映している可能性があることを示した。性成熟と年齢や体重との関係については、これまでもさまざまな年齢層と体格に関する横断的分析に基づいて考察されている(62, 85, 102)。本研究で得られた結果とこれまでに報告されている研究結果を勘案すると、キタオットセイの体重と栄養状態が彼らの春機発動や性成熟に影響しており、BMBP が 20kg を超えることが春機発動を迎える一つの要件になっている可能性が考えられる。ID3 の性的成熟が遅れた理由の一つとして、ID3 の初期成長が悪く、正常に成長した同年齢のキタオットセイと比較して体重が軽かったことがあげられる。イノシシ (*Sus scrofa*) の精巢の成熟に関して、体重は年齢よりも重要な役割を果たしていると報告されており(60)、また、栄養状態はヒト (*Homo sapiens*) の性成熟

の時期と進行の許容因子として機能することが知られている(3)。これらの報告を勘案すると、キタオットセイにおいても体重が春機発動を迎える時期に影響を与えていることは十分考えられる。

体長と春機発動との関係はトド *Eumetopias jubatus* (107)、ニュージーランドアシカ *Phocarctos hookeri* (17) およびオタリア *Otaria flavescens* (35) など他のアシカ科動物について報告されている。しかし今回の研究では体長でなく体重を指標として春機発動との関係を考察した。体重測定は測定用のケージに入る、あるいは体重計に乗るように動物を訓練することにより、物理的あるいは化学的に保定することなく測定を行なうことが可能である。正確な計測には多くの場合で保定が必要となる体長の計測よりも容易に測定できるという点のほか、個体の栄養状態を反映し易いという点からも今回の研究では体重をキタオットセイの体格および栄養状態の指標として使用した。また、Baker (1985) の報告によると、ヒトにおいて体重と春機発動の関係は体長と春機発動の関係よりも強いとのことであり、これは今回の研究で用いた方法の利点を補強する報告である。これに加えて、体重変動の観察は飼育下キタオットセイの性的成熟や妊娠を推察する方法として有効である。雄キタオットセイにおいて季節変動を伴う体重の急激な増加が春機発動を迎えた可能性を示している。また雌キタオットセイでは、12月と2月の血清プロゲステロン濃度が10ng/mlを超えた後、体重が急激に増加することが妊娠の兆候と考えることができる。

本研究では飼育下キタオットセイにおいて、幼獣期から春機発動を経て性成熟へと進む過程の中で、野生下個体では計測が困難であると思われる長期間継続した血清ステロイドホルモンの変動を明らかに

することができた。今回示すことができた生理学的、繁殖生理学的成熟過程の縦断的観察は、長期にわたる原因の明らかでない個体数の減少に直面している種（21, 27, 30, 99, 101）であるキタオットセイの保護に役立つ情報を提供すると信じる。ただし、第1章で明らかにしたように飼育下のキタオットセイの血液特性は野生下個体とわずかに異なるため、この研究の結果が野生動物にそのまま適用できるかどうかはさらなる検証が必要である。また、この研究は実験条件が制限されていたため、最小限のキタオットセイを供試して実施した。今後の課題として、供試個体数を増やし、より多くの情報を蓄積して結果を検証していかなければならない。

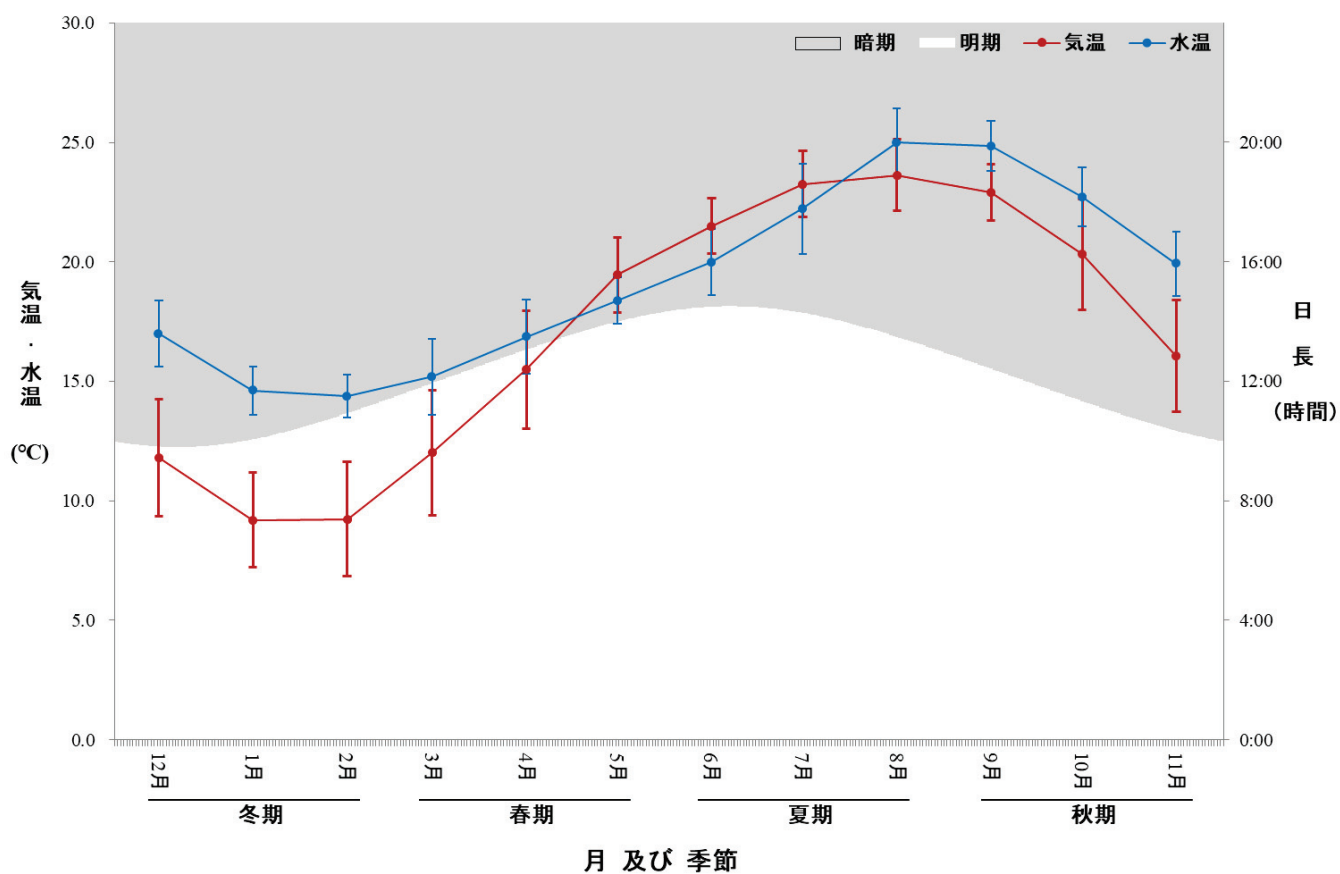


図 3-1. 飼育施設の気温，水温および近隣の日長。

気温と水温は 2013 年から 2017 年までの月平均±標準偏差として，
日長は 2014 年を例として示す。

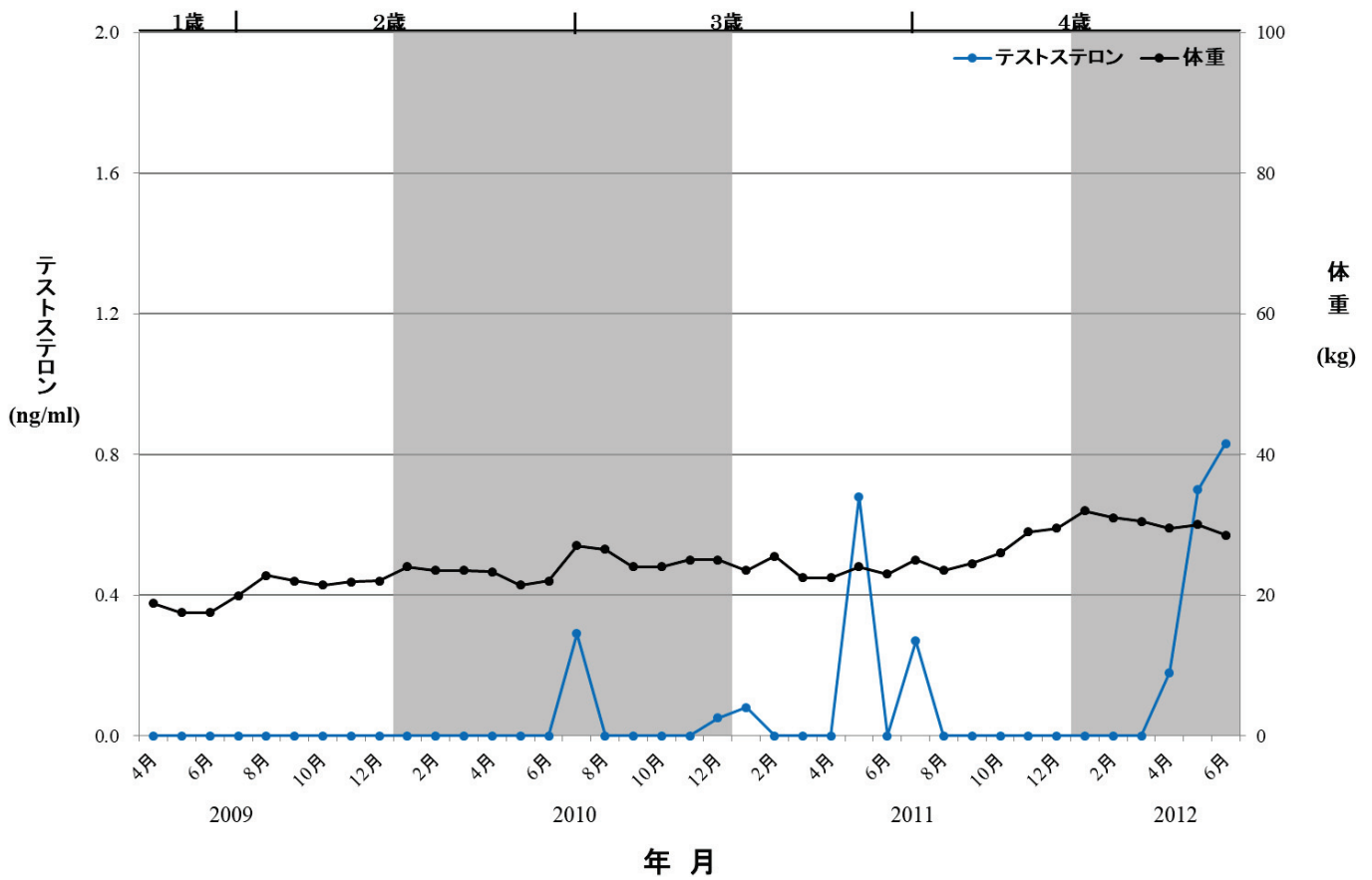


図 3-2. ID1 の血清テストステロン濃度と体重の月ごとの変化(2009 年 4 月-2012 年 6 月)

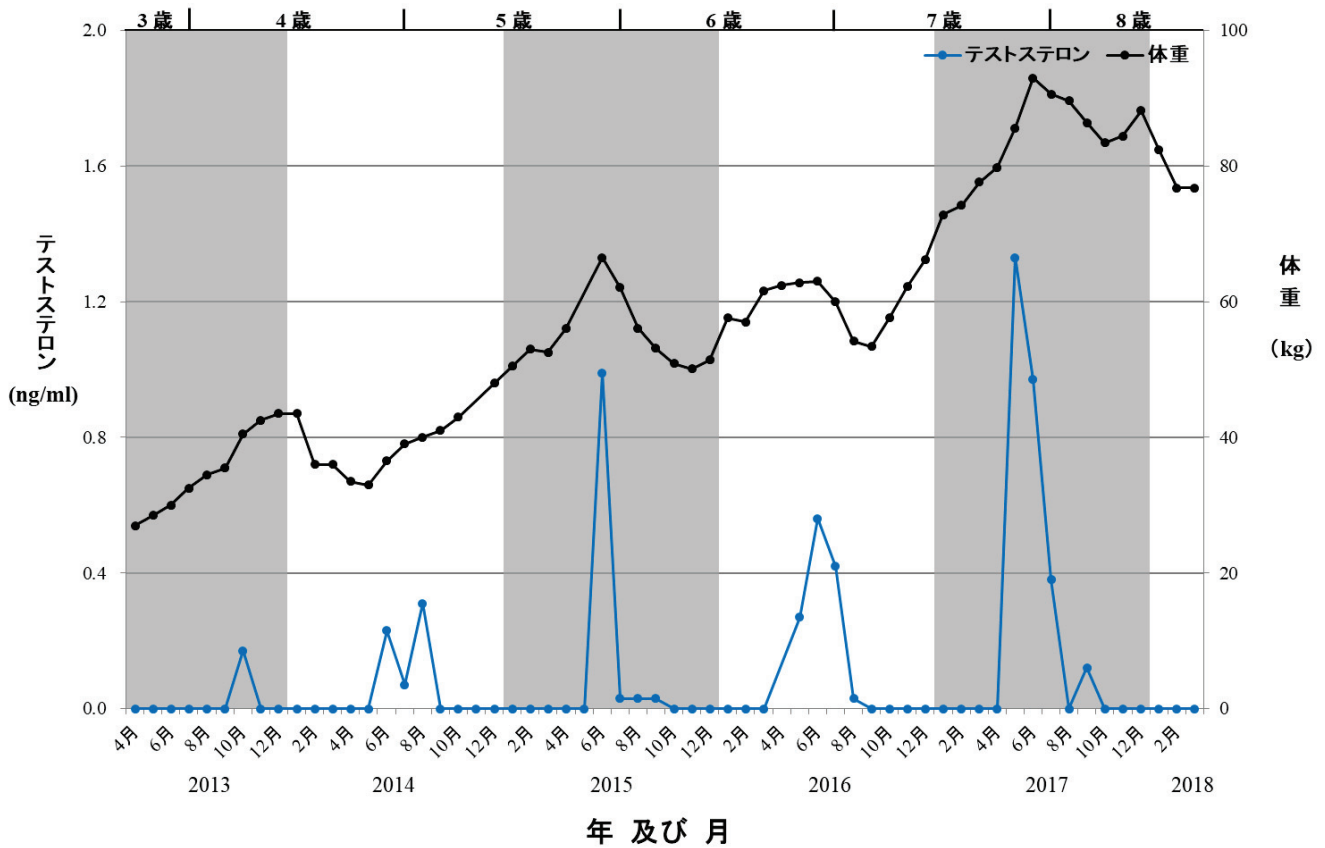


図 3-3. ID2 の血清テストステロン濃度と体重の月ごとの変化(2013 年 4 月-2018 年 3 月)

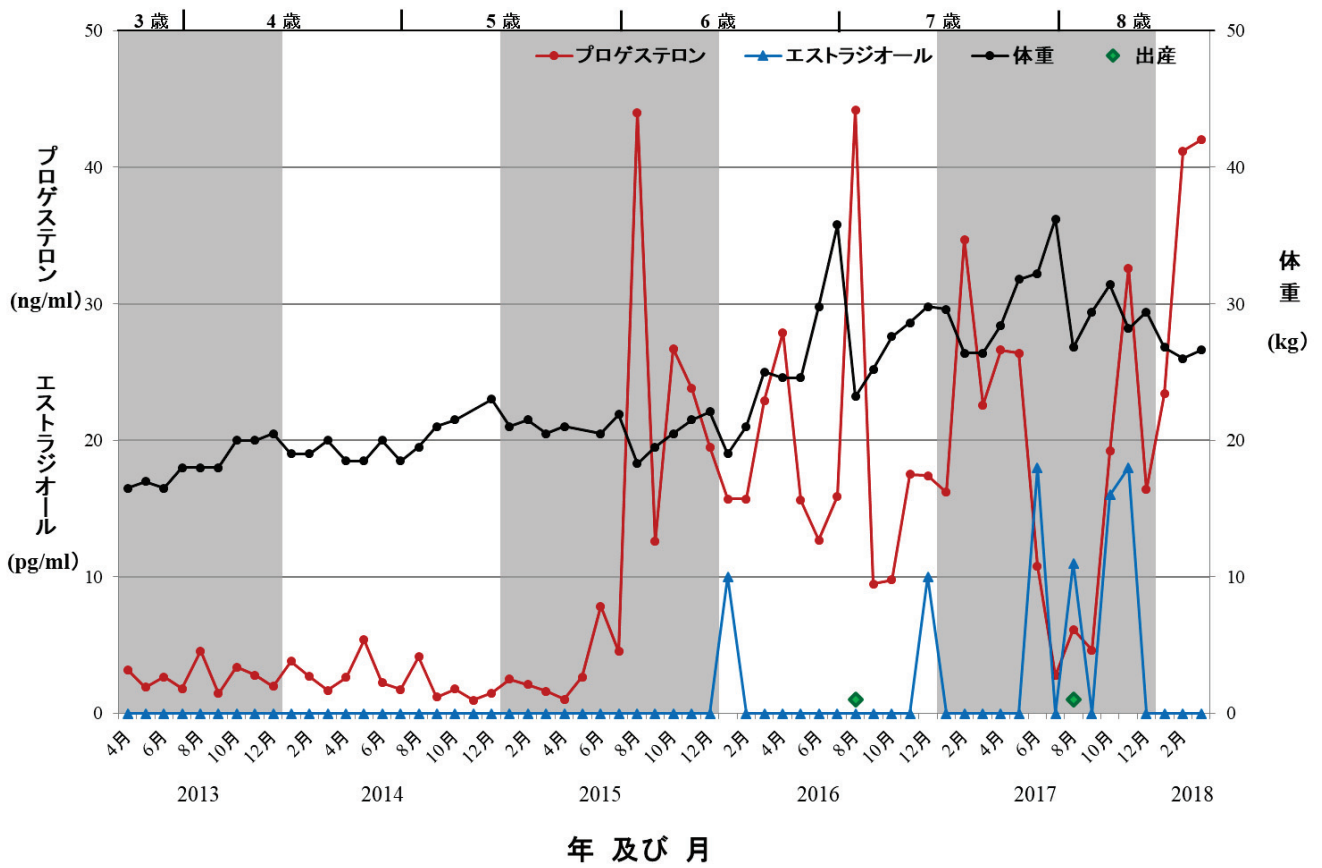


図 3-4 ID3 の血清プロゲステロンおよびエストラジオール濃度，体重の月毎の変化および
 出産記録（2013年4月-2018年3月）

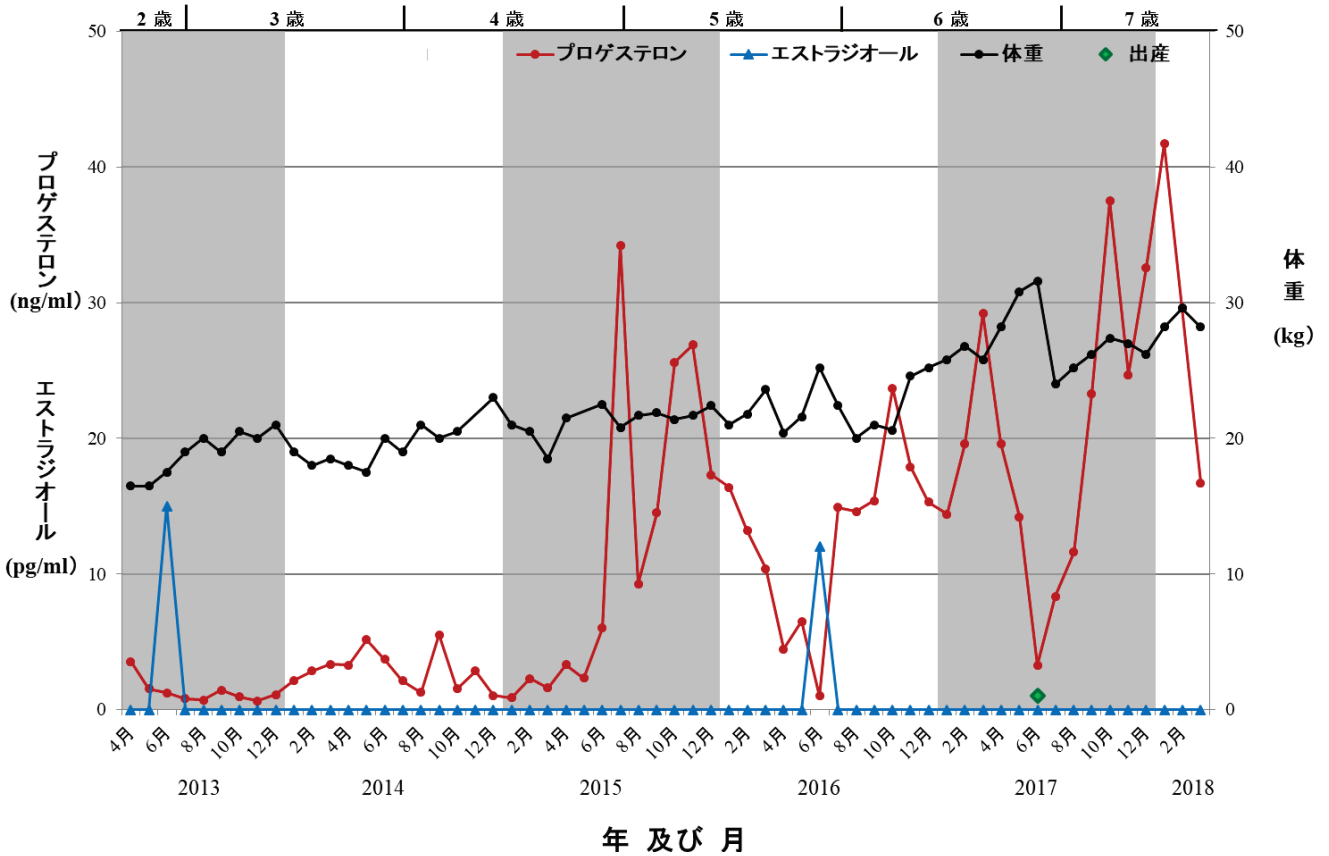


図 3-5 ID4 の血清プロゲステロンおよびエストラジオール濃度，体重の月毎の変化および
 出産記録（2013年4月-2018年3月）

表 3-1. 使用したキタオットセイ

ID	性別	出生年月日	試料収集期間		試料数
			年 月	年 齢	
1	雄	2007年6月25日	2009年3月 - 2012年6月	1歳9ヶ月 - 5歳0ヶ月	39
2	雄	2009年7月 ^a	2013年4月 - 2018年3月	3歳9ヶ月 - 8歳8ヶ月	59
3	雌	2009年6月26日	2013年4月 - 2018年3月	3歳10ヶ月 - 8歳9ヶ月	60
4	雌	2010年6月30日	2013年4月 - 2018年3月	2歳10ヶ月 - 7歳9ヶ月	60

^a : 岩手県宮古市田老町にて保護. 保護時の体格より当歳個体と判断した.

表 3-2. 供試個体の各年齢における繁殖期前4ヶ月^aの平均体重(kg)

ID	性別	年 齢						
		2	3	4	5	6	7	8
1	雄	18.4	23.4 ^b	23.6	29.3	-	-	-
2	雄	-	-	29.5 ^b	35.5	61.5	62.1	87.3
3	雌	-	-	17.0	18.9	21.1 ^b	28.7	32.2
4	雌	-	17.4	18.6	21.6 ^b	22.4	28.7	-

^a: 4月-7月

^b: 繁殖期に春機発動に達した年を示す

-: 今回の研究期間外のため体重計測の記録なし

図 3-3 キタオットセイ (*Callorhinus ursinus*) 雌成獣における妊娠個体と非妊娠個体の月平均血清プロゲステロン濃度 (ng/ml) の比較

	11月		12月		1月		2月		3月		4月		5月	
	NPr	Pr	NPr	Pr	NPr	Pr	NPr	Pr	NPr	Pr	NPr	Pr	NPr	Pr
<i>n</i>	68	12	47	6	42	6	42	6	38	6	15	6	23	6
平均	12.5	16.9	8.5	17.0	6.2	17.0	5.2	12.6	4.4	9.5	4.9	6.8	3.0	4.8
標準偏差	8.3	7.4	8.1	5.5	5.6	11.1	5.4	2.8	5.1	2.4	4.4	2.3	2.2	2.1
95% CI	10.5-14.4	12.7-21.1	6.1-10.8	12.6-21.4	4.5-7.9	8.2-25.9	3.5-6.8	10.4-14.9	2.8-6.1	7.6-11.5	2.7-7.2	4.9-8.6	2.1-3.9	3.1-6.5
<i>P</i> 値	0.0794		0.0128*		0.0618		0.0002*		0.0015*		0.2320		0.1011	

P 値: ウェルチの *t* 検定(両側検定)を用いて計算, *: 有意差あり ($P < 0.05$)

NPr: 非妊娠個体 Pr: 妊娠個体 CI: 信頼区間

図表は Kohyama, K., Inoshima, Y., Kiyota, M. Fluctuations in serum steroid hormone concentrations and body mass during growth and sexual maturation in captive northern fur seals (*Callorhinus ursinus*). The Journal of Veterinary Medical Science 84 (in printing) から一部改変転載。

総 括

キタオットセイは 1800 年代後半から 1900 年代前半にかけて、良質な毛皮を目的とした乱獲により生息数が激減し、絶滅が心配されるようになったが、日本を含む関係各国の保護政策により生息数は回復した。しかし近年、再び生息数が減少しつつあることが確認されている。乱獲が原因であった 1900 年代前半までとは異なり、近年認められる生息数減少は原因がはっきり特定できていない。海洋環境の変化、ヒトとの競合による餌生物の減少、海洋への廃棄物の影響などいくつかの原因が推定されているが、決め手となる原因はまだ示されていない。

この原因不明の生息数減少がこのまま継続した場合、キタオットセイは近い将来において絶滅の危機に瀕する可能性も考えられる。生息数減少の原因を解明してその対策を行ない、野生下における生息数を増加させることは最も重要なことであるが、一方で彼らを絶滅から救う方法の一つとして検討されるべきは飼育下での種の保存である。生息数が減少して手遅れとなる前に野生下と飼育下における違いを理解し、また未知の部分の残る彼らの生理について知見を深めることは飼育下における保全を行なう上で重要であると考えられる。そこで、キタオットセイについて以下の研究を行なった。

第 1 章では水族館出生個体 3 頭と当歳時保護個体 1 頭の計 4 頭（雄 2 頭、雌 2 頭）のキタオットセイから 1 ヶ月に 1 回の採血を 2 年間継続して行ない、そこから得られた血液学的項目 15 項目と血液生化学的項目 29 項目について、既報の野生下個体から得られた血液性状と比較し、飼育下個体と野生下個体の血液性状に差異があるかどうかを検討した。そ

の結果、血液学的項目では赤血球数、ヘモグロビン値およびヘマトクリット値の3項目、血液生化学的項目では比較できた15項目の中でアルカリホスファターゼ(ALP)、尿酸およびコレステロールの3項目において、今回計測した結果の80%以上が既報の野生下個体からの結果の範囲外となった。この差異の原因は確定できないが、**Opportunistic Feeder**である野生下キタオットセイと単一餌料で飼育する飼育下個体との餌料の違いの他、野生下と飼育下の運動量や摂餌頻度の差、水温や気温など生息環境の差などに起因する生理的な変動によって引き起こされた可能性は十分考えられる。この研究では、野生下キタオットセイと飼育下キタオットセイを比較すると、項目によっては健康時の血液性状に差異が見られる可能性を示唆することができ、また飼育下個体の血液性状正常値を示すことができた。この研究で得られた結果は飼育下キタオットセイの健康管理を行なう上で有益な情報になると考えられる。

第2章では血液学的項目の季節に伴う変化について確認した。第1章で実施した研究を続けていく中で、いくつかの血液学的項目の計測値が季節に伴って変動しているように見て取れた。そこで研究期間を延長し、血液学的項目の季節に伴う変動の有無について解析した。季節は気象庁の分類に従って春夏秋冬の4期とし、それぞれの季節内に採材された計測値を集計した。それぞれの項目ごとに集計した計測値を季節分解分析、一般化線形混合モデルを用いて分析し、またTukeyの多重比較検定を使用して季節間の有意差の有無を確認した。その結果、白血球数、網状赤血球、分葉核好中球数および単球数は夏期と秋期に有意に高値を示し、冬期と春期に低下した。対照的に、赤血球数、ヘモグロビン量およびヘマトクリット値は秋期と冬期に有意に高値を示し春期と夏期には低下した。その他の項目については明らかな季節に伴う変動は認められなかつ

た。これらの血液学的項目の季節に伴う変動の原因を確定することはできなかったが、キタオットセイに特徴的な、繁殖期には繁殖島およびその周辺で過ごし、それ以外は上陸することなく広く大洋を索餌回遊するという生活様式に関係していることが考えられる。繁殖期には陸地に接近・上陸するため微生物の暴露が増加することから白血球系の数値が上昇し、それ以外の時期は上陸することがなく遊泳と潜水のみの生活となることから網状赤血球を除く赤血球系が上昇する可能性が考えられる。網状赤血球の変動は冬春期の赤血球数増加のために夏秋期に赤血球の増産が進んだ結果と考えることができる。今回の研究で得られた結果はキタオットセイの飼育を行なう際に血液検査の結果を正しく評価し、適正に健康管理を行なうために有益な情報を得られたと考えている。

第3章ではキタオットセイの成長に伴う性ステロイドホルモン濃度の変化を明らかにし、成長と春機発動の関係について考察することを目的とした。加えて、ホルモンレベルを利用した妊娠診断の可能性についても検討した。第1章、第2章の研究を継続する中で、研究開始時には年齢的にも行動観察から見ても性成熟前であった供試キタオットセイ4頭が春機発動を迎えた兆候を認めたことから研究期間を延長し、繁殖生理に関する研究を行なった。雄はテストステロン、雌はプロゲステロンとエストラジオールの計測を1ヶ月に1回行ない、同時に各個体の体重を記録した。また過去に水族館で行なった飼育下雌キタオットセイの性ステロイドホルモン計測結果を再検討し、プロゲステロン値による妊娠診断の可否についても考察した。その結果、性成熟前から春機発動を経て性成熟が進む過程におけるホルモン変動に加えて雌個体の妊娠年と非妊娠年のプロゲステロン変動の違いを明らかにすることができた。また、春機発動には年齢だけでなく成長、特に体重が大きく関係しており、雌雄

とも春機発動に至るとされる年齢に達しても，繁殖期前 4 ヶ月の平均体重 (BMPB) が 20kg を超えなければ春機発動が起こらないことを示すことができた。一方，過去に得られた記録の分析からは，妊娠個体と非妊娠個体のプロゲステロン値には 12 月，2 月および 3 月に有意な差があることを示すことができた。今回の研究から得られたプロゲステロン変動の観察および妊娠個体と非妊娠個体のプロゲステロン値の有意差により，冬期から早春期，特に 2 月と 3 月に血清プロゲステロン値を用いた妊娠診断が可能であると考えられる。

本研究では，特徴的な生態のため野生下キタオットセイからは得ることが難しい同一個体からの継続した採材を飼育下個体を用いて行ない，連続した試料からしか得ることのできない血液学のおよび繁殖生理学的結果を示すことができた。この研究から得られた結果によりキタオットセイに関する生理学的知見をより深める事が出来たと考える。また，キタオットセイの飼育や飼育下繁殖における重要な情報を提供できたと考えている。

謝 辞

本論文を終えるにあたり，ご指導，ご鞭撻ならびに本論文のご審査を賜りました国立大学法人 東海国立大学機構 岐阜大学 応用生物科学部 共同獣医学科 食品環境衛生学研究室 教授 猪島 康雄 博士に深甚なる感謝の意を表します。先生の的確で厳しく温かいご指導がなければ，本論文を終えることはできませんでした。

本論文のご審査を賜りました国立大学法人 北海道国立大学機構 帯広畜産大学 臨床獣医学研究部門 産業動物獣医療分野 教授 南保 泰雄 博士，国立大学法人 岩手大学 共同獣医学科 獣医生理学研究室 教授 木崎 景一郎 博士，国立大学法人 東京農工大学 農学研究院 動物生命科学部門 教授 渡辺 元 博士，国立大学法人 東海国立大学機構 岐阜大学 応用生物科学部 共同獣医学科 臨床獣医学講座 獣医臨床繁殖学研究室 教授 村瀬 哲磨 博士に深甚なる感謝の意を表します。

キタオットセイの飼育および研究に関し，伊豆・三津シーパラダイス入社時より厳しくまた優しくご指導を賜りました伊豆・三津シーパラダイス 元館長 故中島 将行 博士に深謝いたします。本研究を遂行するにあたり，血液データの解析ならびに論文執筆のご指導を賜りました長崎大学 水産学部 水産・環境科学総合研究科 海洋生産システム学講座 生態系保全管理研究室 教授 清田 雅史 博士に深謝いたします。論文執筆に際し，多大なご指導とご助言を賜りました名古屋港水族館 獣医師 大野 佳 博士に謹んで感謝の意を表します。

キタオットセイ飼育の機会を賜り，また本研究へのご理解を賜りました伊豆箱根鉄道株式会社 代表取締役社長社長執行役員 伍堂 文康 氏，

伊豆箱根鉄道株式会社 執行役員 観光事業部長 齊藤 昌広 氏，並びに歴代伊豆箱根鉄道株式会社役員の皆さまに心から謝意を表します。終始，本研究へのご理解を賜り，また大変多くのご助力をいただきました伊豆・三津シーパラダイス 支配人 植田 行宏 氏，伊豆・三津シーパラダイス 飼育長 土屋 考司 氏，並びに歴代支配人および歴代飼育長に心から謝意を表します。

キタオットセイの飼育および検体採取にご尽力をいただきました伊豆・三津シーパラダイス 前海獣飼育担当マネージャー 吉川 菜穂 氏をはじめ海獣飼育担当の皆さま，並びに獣医師 西木 夏帆 氏，前獣医師 五島 渉 氏に心から謝意を表します。すべての検体を提供していただいた4頭のキタオットセイ達に感謝いたします。皆さまのご協力がなければこの研究を継続することは出来ませんでした。

最後に，水族館で働きたいという我儘を容受し，見守っていただいた亡き父母に深く感謝いたします。

引用文献

- 1) Antonelis, G. A., Sinclair, H., Ream, R. and Robson, B. W. (1997). Inter-island variation in the diet of female northern fur seals (*Callorhinus ursinus*) in the Bering Sea. *J. Zool. London.* 242, 435–451.
- 2) Atkinson, S. (1997). Reproductive biology of seals. *Rev. Reprod.* 2, 175–194.
- 3) Aydin, B.K., Devecioglu, E., Kadioglu, A., Cakmak, A.E., Kisabacak, S., Gokcay, G., Bas, F., Poyrazoglu, S., Bundak, R. and Darendeliler, F. (2017). The relationship between infancy growth rate and the onset of puberty in both genders. *Pediatr. Res.* 82, 940–946.
- 4) 馬場徳寿 (1995). オットセイの生態と歴史. 畜産の研究. 49, 369-376
- 5) Baba, N., Boltnev, A.I. and Stus, A.I. (2000). Winter migration of female northern fur seals from the Commander Islands. *Bull. Nat. Res. Inst. Far Seas Fish.* 37, 39-44.
- 6) Baker, E.R. (1985). Body weight and the initiation of puberty. *Clin. Obstet. Gynecol.* 28, 573–579.
- 7) Baker, J.D., Fowler, C.W. and Antonele, G.A. (1994). Body weight and growth of juvenile male northern fur seals, *Callorhinus ursinus*. *Mar. Mamm. Sci.* 10, 151–162.
- 8) Bartholomew Jr., G.A. and Hoel, P.G. (1953). Reproductive behavior of the Alaska fur seal, *Callorhinus ursinus*. *J. Mammal.* 34, 417–436.
- 9) Beckmen, K. B., Blake, J. E., Ylitalo, G. M., Stott, J. L. and O'Hara, T. M. (2003). Organochlorine contaminant exposure and associations with hematological and humoral immune functional assays with dam age as a factor in free-ranging northern fur seal pups (*Callorhinus ursinus*). *Mar. Pollut. Bull.* 46, 594–606.
- 10) Bergfelt, D.R., Steinetz, B.G., Dunn, J.L., Atkinson, S., Testa, J.W. and Adams, G.P. (2010). Validation of a homologous canine

- relaxin radioimmunoassay and application with pregnant and non-pregnant northern fur seals (*Callorhinus ursinus*). Gen. Comp. Endocr. 165, 19–24.
- 11) Bigg, M.A. (1990). Migration of northern fur seals (*Callorhinus ursinus*) off western North America. Can. Tech. Rep. Fish. Aquat. Sci. No. 1764.
 - 12) Bossart, G. D. and Dierauf, L. A., (1990). Marine mammal clinical laboratory medicine. *In*: Dierauf, L. A. (ed) CRC handbook of marine mammal medicine: Health, diseases, and rehabilitation, pp. 1–52. CRC Press, Boca Raton.
 - 13) Bossart, G. D., Reidarson, T. H., Dierauf, L. A. and Duffield, D. A., (2001). Clinical pathology. *In*: Dierauf L. A. and Gulland, F. M. D. (eds) CRC handbook of marine mammal medicine, 2nd ed., pp. 383–436. CRC Press, Boca Raton.
 - 14) Boyd, I. L. (1991). Environmental and physiological factors controlling the reproductive cycles of pinnipeds. Can. J. Zool. 69, 1135–1148.
 - 15) Browne, P., Conley, A.J., Spraker, T., Ream, R.R. and Lasley, B.L. (2006). Sex steroid concentrations and localization of steroidogenic enzyme expression in free-ranging female northern fur seals (*Callorhinus ursinus*). Gen. Comp. Endocr. 147, 175–183.
 - 16) Çetin, N., Bekyürek, T. and Çetin, E. (2009). Effects of sex, pregnancy and season on some haematological and biochemical blood values in Angora rabbits. Scand. J. Lab. Anim. Sci. 36, 155–162.
 - 17) Childerhouse, S.J., Dawson, S.M., Fletcher, D.J., Slooten, E. and Chilvers, B.L. (2010). Growth and reproduction of female New Zealand sea lions. J. Mammal. 91, 165–176.
 - 18) Choi, H. K., Atkinson, K., Karlson, E. W., Willett, W. and Curhan, G. (2004). Purine-Rich foods, dairy and protein intake, and the risk of gout in men. N. Engl. J. Med. 350, 1093–1103.
 - 19) Cleveland, R. B., Cleveland, W. S., McRae, J. E. and Terpenning, I. (1990). STL: A seasonal-trend decomposition procedure based on loess. J. Off. Stat. 6, 3–73.
 - 20) Cohn, L. A. (1991). The influence of corticosteroids on host

- defense mechanisms. *J. Vet. Intern. Med.* 5, 95–104.
- 21) Committee on the Status of Endangered Wildlife in Canada. (2006). COSEWIC assessment and update status report on the northern fur seal *Callorhinus ursinus* in Canada, Committee on the Status of Endangered Wildlife in Canada. Ottawa, Canada. <http://publications.gc.ca/collections/Collection/CW69-14-74-2006E.pdf>. (accessed on October 30, 2020).
 - 22) CSAS (2012). Recovery potential assessment for the northern fur seal (*Callorhinus ursinus*) in Canadian waters. *Can. Sci. Advis. Sec. Sci. Advis. Rep.* 2012/057 1-13.
 - 23) Daniel, J.C. (1975). Concentrations of circulating progesterone during early pregnancy in the northern fur seal, *Callorhinus ursinus*. *J. Fish. Res. Board Can.* 32, 65–66.
 - 24) Du Mond, F.V. and Hutchinson, T.C. (1967). Squirrel monkey reproduction: the "fatted" male phenomenon and seasonal spermatogenesis. *Sci. New Seri.* 158, 1067–1070.
 - 25) Dunsky, E. H., Zweiman, B., Fischler, E. and Levy, D. A. (1979). Early effects of corticosteroids on basophils, leukocyte histamine, and tissuehistamine. *J. Allergy Clin. Immunol.* 63, 426–432.
 - 26) Eastman, J. R. and Blxler, D. (1977). Serum alkaline phosphatase: Normal values by sex and age. *Clin. Chem.* 23, 1769–1770.
 - 27) Fadely, B., Fritz, L., Ream, R., Towell, R., Sterling, J., Stinchcomb, C., Perryman, W. and Gelatt, T. (2006). Contrasting western steller sea lion and northern fur seal population trends in Alaska. AFSC Quarterly report January-February-March 2006. 1–8. <https://archive.fisheries.noaa.gov/afsc/Quarterly/jfm2006/jfm06feat.pdf>. (accessed on October 30, 2020).
 - 28) Gales, N. J., Williamson, P., Higgins, L.V., Blackberry, M.A. and James, I. (1997). Evidence for a prolonged postimplantation period in the Australian sea lion (*Neophoca cinerea*). *J. Reprod Fertil.* 111, 159–63.
 - 29) Gallet, T. S. and Gentry, R. (2017). Northern fur seal *Callorhinus ursinus*. In: Wursig, B., Thewissen, J. G. M. and Kovacs K. M. (eds) *Encyclopedia of Marine Mammals* 3rd ed., pp. 645–648.

Academic Press, Cambridge.

- 30) Gelatt, T., Ream, R. and Johnson, D. (2015). *Callorhinus ursinus*. The IUCN Red List of Threatened Species 2015: e.T3590A45224953. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2015-4.RLTS.T3590A45224953.en>. (accessed on October 30, 2020).
- 31) Gentry, R. L. (1998). Behavior and Ecology of Northern Fur Seal. Princeton University Press. Princeton.
- 32) Gerlinsky, C. D., Haulena, M., Trites, A. W. and Rosen, D. A. S. (2018). Reference ranges and age-related and diving exercise effects on hematology and serum chemistry of female Steller sea lions (*Eumetopias jubatus*). *J. Zoo Wildl. Med.* 49, 18–29.
- 33) Glover, E.M., Mercer, K.B., Norrholm, S.D., Davis, M., Duncan, E., Bradley, B., Ressler, K.J. and Jovanovic, T. (2013). Inhibition of fear is differentially associated with cycling estrogen levels in women. *J. Psychiatry Neurosci.* 38, 341–348.
- 34) Gordon, H. A. (1959). Morphological and physiological characterization of germfree life. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 78, 208–220.
- 35) Grandi, M.F., Dans, S.L., García, N.A. and Crespo E.A. (2010). Growth and age at sexual maturity of South American sea lions. *Mamm. Biol.* 75, 427–436.
- 36) Græsli, A. R., Evans, A. L., Fahlman, Å., Bertelsen, M. F., Blanc, S. and Arnemo, J. M. (2015). Seasonal variation in haematological and biochemical variables in free-ranging subadult brown bears (*Ursus arctos*) in Sweden. *BMC Vet. Res.* 11, 301.
- 37) Greig, D. J., Gulland, F. M. D., Rios, C. A. and Hall, A. J. (2010). Hematology and serum chemistry in stranded and wildcaught harbor seals in central California: Reference intervals, predictors of survival, and parameters affecting blood variables. *J. Wildl. Dis.* 46, 1172–1184.
- 38) Greig, D.J., Mashburn, K.L., Rutishauser, M., Frances M.D. Gulland, F.M.D., Williams, T.M. and Atkinson, S. (2007). Seasonal changes in circulating progesterone and estrogen concentrations in the California sea lion (*Zalophus*

- californianus*). J. Mammal. 88, 67–72.
- 39) Hall, A., Hewitt, R. and Civil, M.A. (2020). Determining pregnancy status in harbour seals using progesterone concentrations in blood and blubber. Gen. Comp. Endocrinol. 295, 113529.
- 40) Hattori, K. (2015). *Callorhinus ursinus* (Linnaeus, 1758). In: Ohdachi, S. D., Ishibashi, Y., Iwasa, M. A., Fukui, D. and Saitoh, T. (eds) The wild mammals of Japan, 2nd ed., pp. 295–296. Shoukadoh Book Sellers, Kyoto
- 41) Hasselmeier, I., Fonfara, S., Driver, J. and Siebert, U. (2008). Differential hematology profiles of free-ranging, rehabilitated, and captive harbor seals (*Phoca vitulina*) of the German North Sea. Aquat. Mamm. 34, 149–156.
- 42) Hirakawa, Y., Horimoto, T., Suzuki, I. and Mitani, Y. (2020). Estimation of sexual maturity based on morphometrics of genital organs in male northern fur seals, *Callorhinus ursinus*. Mammal Study 46, 41–51.
- 43) Hunter, L. and Madin, S. H. (1976). Clinical blood values of the northern fur seal, *Callorhinus ursinus*. J. Wildl. Dis. 12, 526–530.
- 44) Hunter, L. and Madin, S. H. (1978). Clinical blood values of the northern fur seal, *Callorhinus ursinus*. II. Comparison of fresh versus stored frozen serum. J. Wildl. Dis. 14, 116–119.
- 45) 岩田高志, 三谷曜子, 米崎史郎, 香山 薫, 高橋晃周(2009). 加速度データロガーによる飼育下キタオットセイの遊泳・捕食行動記録の検証. 日本水産学会誌 75, 989–994.
- 46) 伊豆・三津シーパラダイス(2000). 安定同位体比基礎調査. 平成 12 年度水産庁委託事業・複数種一括管理方式検討基礎調査事業報告書.
- 47) 伊豆・三津シーパラダイス(2001). 安定同位体比基礎調査. 平成 13 年度水産庁委託事業・複数種一括管理方式検討基礎調査事業報告書.
- 48) Kiyota, M. (2005). Site fidelity, territory acquisition and mating success in male northern fur seals (*Callorhinus ursinus*). Mammal Study 30, 19–27.
- 49) 清田雅史(2006). キタオットセイの一夫多妻制繁殖システムに関する生理・生態学的研究. 東京大学大学院農学生命科学研究科博士論文

- 50) Kiyota, M., Yamaguchi, Y., Nishikawa, F. and Kohyama, K. (1999). Cytological change in vaginal smear and epithelium associated with the reproductive cycle in northern fur seal, *Callorhinus ursinus*. Bull. Natl. Res. Inst. Far Seas Fish. 36, 17–25.
- 51) 香山 薫, 古田 彰, 中島将行, 馬場徳寿, 清田雅史(1999). 飼育下キタオットセイ成獣雄1頭の生殖周期に関わる血中テストステロン値と体重の変動. 日本動物園水族館雑誌 40, 73–78.
- 52) 香山 薫, 宮沢千鶴, 高橋綾子, 吉川尚基(2012). キタオットセイ新生子の人工哺乳例. 日本動物園水族館雑誌 53, 63–69.
- 53) Kovacs, K. M., Aguilar, A., Auriolles, D., Burkanov, V., Campagna, C., Gales, N., Gelatt, T., Goldsworthy, S. D., Simon, J., Goodman, S. J., Hofmeyr, G. J. G., Härkönen, T., Lowry, L., Lydersen, C., Schipper, J., Sipilä, T., Stuart, S., Thompson, D. and Trillmich, F. (2012). Global threats to pinnipeds. Mar. Mamm. Sci. 28, 414–436.
- 54) Kuhn, C. M. 2002. Anabolic steroids. Recent Prog. Horm. Res. 57, 411–434.
- 55) Kuhn, C.E., Jeremy, T., Sterling, J. T. and Tonya K Zeppelin, T. K. (2015). Linking northern fur seal behavior with prey distributions: the impact of temporal mismatch between predator studies and prey surveys. Anim. Biotelemetry 3, 26.
- 56) Lander, M. E., Gulland, F. M. D. and DeLong, R. L. (2000). Satellite tracking a rehabilitated Guadalupe fur seal (*Arctocephalus townsendi*). Aquat. Mamm. 26, 137–142.
- 57) Larson, S. and Casson, C.J. (2007). Reproductive hormone levels within captive female northern fur seals (*Callorhinus ursinus*) with and without chemical contraceptives. Aquat. Mamm. 33, 195–201.
- 58) Laurie, J. G., Gerber, J. A., Smith, D. M. and Morgan, L. E. (1993). Rehabilitation and treatment success rate of California sea lions (*Zalophus californianus*) and northern fur seals (*Callorhinus ursinus*) stranded along the central and northern California coast, 1984–1990. J. Zoo Wildl. Med. 24, 41–47.
- 59) Lewis, M., Campagna, C., Uhart, M. and Ortiz, C. L. (2001). Ontogenetic and seasonal variation in blood parameters in

- southern elephant seals. *Mar. Mamm. Sci.* 17, 862–872.
- 60) Maistrelli, C., Hüneke, H., Langeheine, M., Keuling, O., Siebert, U. and Brehm, R. (2021). Precocious puberty in male wild boars: a possible explanation for the dramatic population increase in Germany and Europe. *PeerJ* 9: e11798.
- 61) Mazzaro, L. M., Dunn, J. L., St. Aubin, D. J., Andrews, G. A. and Chavey, P. S. (2004). Serum indices of body stores of iron in northern fur seals (*Callorhinus ursinus*) and their relationship to hemochromatosis. *Zoo Biol.* 23, 205–218.
- 62) McKenzie, J., Page, B., Shaughnessy, P.D. and Hindell, M.A. (2007). Age and reproductive maturity of New Zealand fur seals (*Arctocephalus forsteri*) in Southern Australia. *J. Mammal.* 88, 639–648.
- 63) Muto, M. M., Helker, V. T., Angliss, R. P., Boveng, P. L., Breiwick, J. M., Cameron, M. F., Clapham, P. J., Dahle, S. P., Dahlheim, M. E., Fadely, B. S., Ferguson, M. C., Fritz, L. W., Hobbs, R. C., Ivashchenko, Y. V., Kennedy, A. S., London, J. M., Mizroch, S. A., Ream, R. R., Richmond, E. L., Shelden, K. E. W., Sweeney, K. L., Towell, R. G., Wade, P. R., Waite, J. M. and Zerbini, A. N. (2019). Alaska Marine Mammal Stock Assessments, 2018. NOAA Technical Memorandum NMFS-AFSC-393. 29–39. <https://repository.library.noaa.gov/view/noaa/20606>. (accessed on October 30, 2020).
- 64) Nadler R. and Rosenblum, LA. 1972. Hormonal regulation of the “fatted” phenomenon in squirrel monkeys. *Anat. Rec.* 173, 181–188.
- 65) Nakagawa, M., Terashima, T., D’yachkova, Y., Bondy, G. P., Hogg, J. C. and van Eeden, S. F. (1998). Glucocorticoid-induced granulocytosis: contribution of marrow release and demargination of intravascular granulocytes. *Circulation* 98, 2307–2313.
- 66) NOAA Fisheries Marine Mammal Laboratory (2021). Northern fur seal. NOAA fisheries 150th anniversary 1871–2021. <https://www.fisheries.noaa.gov/species/northern-fur-seal>. (accessed on March 5, 2021)
- 67) NOAA Technical Memorandum(2021). Alaska Fur Seal

Investigations by Decade.

<https://www.fisheries.noaa.gov/alaska/marine-mammal-protection/alaska-fur-seal-investigations-decade>. (accessed on October 14, 2021)

- 68) Norberg, S. E., Burkanov, V. N. and Andrews, R. D. (2009). Serum chemistry values of free-ranging, lactating northern fur seals (*Callorhinus ursinus*). *J. Wildl. Dis.* 45, 843–848.
- 69) Norberg, S. E., Burkanov, V. N., Tuomi, P. and Andrews, R. D. (2011). Hematology of free-ranging, lactating northern fur seals, *Callorhinus ursinus*. *J. Wildl. Dis.* 47, 217–221.
- 70) Norman, S. A., Beckett, L. A., Miller, W. A., St. Leger, J. and Hobbs, R. C. (2013). Variation in hematologic and serum biochemical values of berugas (*Delphinapterus leucas*) under managed care. *J. Zoo Wildl. Med.* 44, 376–388.
- 71) Otsuki, M., Horimoto, T., Kobayashi, M., Morita, Y., Ijiri, S. and Mitani, Y. (2021). Testosterone levels in hair of free-ranging male northern fur seals (*Callorhinus ursinus*) in relation to sampling month, age class and spermatogenesis. *Conserv. Physiol.* 9, 1–11.
- 72) Otsuki, M., Kohyama, K., Goshima, W., Kobayashi, M., Hasegawa, Y., Morita, Y., Ijiri, S. and Mitani, Y. (2020). Non-invasive monitoring of faecal testosterone metabolite concentrations in a northern fur seal (*Callorhinus ursinus*). *Jpn. J. Zoo Wildl. Med.* 25, 29–34.
- 73) Páez-Rosas, D., Hirschfeld, M., Deresienski, D. and Lewbart, G. A. (2016). Health status of Galápagos sea lions (*Zalophus wollebaeki*) on San Cristóbal Island Rookeries determined by hematology, biochemistry, blood gases, and physical examination. *J. Wildl. Dis.* 52, 100–105.
- 74) Peterson, R.S. (1968). Social behavior in pinnipeds with particular reference to northern fur seal. *In*: Harrison, R.J., Hubbard, R.C., Peterson, R.S., Rice C.E., Schusterman, R.J. (eds), *The Behavior and Physiology of Pinnipeds*, pp. 3–53. Appleton-Century-Crofts, New York.
- 75) Ragen, T.J., Antonelis, G.A. and Kiyota, M. (1995). Early migration of northern fur seal pups from ST. Paul island, Alaska.

- J. Mammal. 76: 1137–1148.
- 76) R Core Team (2020). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <https://www.R-project.org/>. (accessed on October 30, 2020).
 - 77) Rice, D. W. (1998). *Callorhinus ursinus* (Linnaeus, 1758) (northern fur-seal). *In*: Rice, D. W. (ed) Marine mammals of the world: Systematics and distribution (No. 4), Society for marine mammalogy, pp. 27–28. Allen Press Inc., Lawrence.
 - 78) Riley, F. (1967). Fur seal industry of the Pribilof Islands, 1786–1965. United States department of the interior, Fish and wildlife service, Bureau of commercial fisheries. Circular 275.
 - 79) Riley, L. K. and Rupert, J. (2015). Evaluation of patients with leukocytosis. *Am. Fam. Physician* 92, 1004–1011.
 - 80) Riley, R. S., Ben-Ezra, J. M. and Tidwell, A. (2001). Reticulocyte enumeration: past & present. *Lab. Med.* 10, 599–608.
 - 81) Robeck, T.D., O’Brien, J.K. and Atkinson, S. (2018). Reproduction. *In*: Gulland, F.M.D., Dierauf, L.A. and Whitman, K.L. (eds) CRC Handbook of Marine Mammal Medicine, 3rd ed., pp. 169–178. CRC Press, Boca Raton.
 - 82) Roppel, A. Y. (1984). Management of Northern Fur Seals on the Pribilof Islands, Alaska, 1786-1981. NOAA Technical Report NMFS 4, 1–26.
 - 83) Rosen, D. A. S., Gerlinsky, C. D. and Trites, A. W. (2018). Telemetry tags increase the costs of swimming in northern fur seals, *Callorhinus ursinus*. *Mar. Mamm. Sci.* 34, 385–402.
 - 84) Sattler, R. and Polasek, L. (2017). Serum estradiol and progesterone profiles during estrus, pseudopregnancy, and active gestation in Steller sea lions. *Zoo Biol.* 36, 323–331.
 - 85) Scheffer, V.B. (1950). Growth of the testes and baculum in the fur seal, *Callorhinus ursinus*. *J. Mammal.* 31, 384–394.
 - 86) Schusterman, R.J. and Gentry, R.L. (1971). Development of a fattened male phenomenon in California sea lions. *Deve. Psychobiol.* 4, 333–338.
 - 87) Scott, M., Grundy, B. S. and Griffin, A. C. (1959). Effects of periodic mental stress on serum cholesterol levels. *Circulation.*

- 19, 496–498.
- 88) Seguel, M., Muñoz, F., Keenan, A., Perez-Venegas, D. J., DeRango, E., Paves, H., Gottdenker, N. and Müller, A. (2016). Hematology, serum chemistry, and early hematologic changes in free-ranging South American fur seals (*Arctocephalus australis*) at Guafo Island, Chilean Patagonia. *J. Wildl. Dis.* 52, 663–668.
- 89) Shero, M.R., Bergfelt, D.R., Testa, J.W. and Adams, G.P. (2018). Pairing ultrasonography with endocrinology to elucidate underlying mechanisms of successful pregnancy in the northern fur seal (*Callorhinus ursinus*). *Gen. Comp. Endocr.* 225, 78–89.
- 90) 清水 潮(1992). 海の微生物. 線維学会誌 48, 578–583.
- 91) Shinosaki, T., Inagaki, H., Nakai, T., Yamashita, T. and Yonetani, Y. (1992). Circadian rhythm of plasma uric acid and handling stress-induced hyperuricemia in conscious cebus monkeys. *Jpn. J. Pharmacol.* 58, 443–450.
- 92) Shoho, A. R., Go, R. S. and Tefferi, A. (2000). 22-year-old woman with severe microcytic anemia. *Mayo Clin. Proc.* 75, 861–864.
- 93) 篠田元扶, 前島一淑(1978). 無菌動物の生理学的特性. 日本実験動物学会機関誌 27, 315–327.
- 94) Sisk, C.L. and Zehr, J.L. (2005). Pubertal hormones organize the adolescent brain and behavior. *Front. Neuroendocrin.* 26, 163–174.
- 95) Skråppa, T. (2005). Ex situ conservation methods. *In*: Geburek, T. and Turok, J. (eds) Conservation and management of forest genetic resources in Europe, pp. 567–583. Arbora Publishers, Zvolen.
- 96) St. Aubin, D. J., Dguise, S., Richard, P. R., Smith, T. G. and Geraci, J. R. (2001). Hematology and plasma chemistry as indicators of health and ecological status in beluga whales, *Delphinapterus leucas*. *Arctic.* 54, 317–331.
- 97) Terasawa, F., Kitamura, M., Fujimoto, A. and Hayama, S. (2002). Seasonal changes of blood composition in captive bottlenose dolphins. *J. Vet. Med. Sci.* 64, 1075–1078.
- 98) Thompson, P. M., Tollit, D. J., Corpe, H. M., Reid, R. J. and Ross, H. M. (1997). Changes in haematological parameters in relation to prey switching in a wild population of harbour seals. *Funct.*

- Ecol. 11, 743–750.
- 99) Towell, R. G., Ream, R. R. and York, A. E. (2006). Decline in northern fur seal (*Callorhinus ursinus*) pup production on the Pribilof Islands. *Mar. Mamm. Sci.* 22, 486–491.
 - 100) Trites, A. W. (1992). Northern fur seal: why they declined? *Aquat. Mamm.* 18, 3–18.
 - 101) Trites, A.W. and Bigg, M.A. (1992). Changes in body growth of northern fur seals from 1958 to 1974: density effects of changes in the ecosystem? *Fish. Oceanogr.* 1, 127–136.
 - 102) Trites, A.W. and Bigg, M.A. (1996). Physical growth of northern fur seals (*Callorhinus ursinus*): seasonal fluctuations and migratory influences. *J. Zool, London.* 238, 459–482.
 - 103) Tsubota, T., Nagashima, T., Kohyama, K., Maejima, K., Murase, T. and Kita, I. (2001). Seasonal changes in testicular steroidogenesis and spermatogenesis in a northern fur seal, *Callorhinus ursinus*. *J. Reprod. Dev.* 47, 415–420.
 - 104) 植村次雄, 高口二郎, 塩島令儀(1978). 排卵期における血中 LH と estradiol の変動について. *日本内分泌学会雑誌* 54, 855–865.
 - 105) US National Research Council (2011). Guide for the care and use of laboratory animals, 8th edition. National Academies Press, Washington, D.C.
 - 106) United States department of agriculture (USDA) (2015). Nutrient Intake and Nutrients of Concern. Scientific report of the 2015 dietary guidelines advisory committee. 51-63.
 - 107) Winship, A.J., Trites, A.W. and Calkins, D.G. (2001). Growth in body size of the Steller sea lion (*Eumetopias jubatus*). *J. Mammal.* 82, 500–519.
 - 108) Yochem, P. K., Stewart, B. S., Mazet, J. A. K. and Boyce, W. M. (2008). Hematologic and serum biochemical profile of the northern elephant seal (*Mirounga angustirostris*): variation with age, sex, and season. *J. Wildl. Dis.* 44, 911–921.
 - 109) Yonezaki, S., Kiyota M. and Baba N. (2008). Decadal changes in the diet of northern fur seal (*Callorhinus ursinus*) migrating off the Pacific coast of northeastern Japan. *Fish. Oceanogr.* 17, 231–238.
 - 110) York, A.E. 1983. Average age at first reproduction of the

- northern fur seal (*Callorhinus ursinus*). Can. J. Fish. Aquat. Sci. 40, 121–127.
- 111) York, A.E. and Scheffer, V.B. (1997). Timing of implantation in the northern fur seal, *Callorhinus ursinus*. J. Mammal. 78, 675–683.
- 112) Yoshida, K., Baba, N., Kiyota, M., Nakajima, M., Fujimaki, Y. and Furuta, A. (1990a). Studies of the effects of net fragment entanglement on northern fur seals. Part 1: Daily activity patterns of entangled and non-entangled fur seals. Proceedings of the 2nd International Conference on Marine Debris. NOAA Technical Memorandum NMFS-SWFSC-154: 494-502.
- 113) Yoshida, K., Baba, N., Kiyota, M., Nakajima, M., Fujimaki, Y. and Furuta, A. (1990b). Studies of the effects of net fragment entanglement on northern fur seals. Part 2: Swimming behavior of entangled and non-entangled fur seals. Proceedings of the 2nd International Conference on Marine Debris. NOAA Technical Memorandum NMFS-SWFSC-154: 503-512.
- 114) Zeppelin, T. K., Johnson, D. S., Kuhn, C. E., Iverson, S. J. and Ream R. R. (2015). Stable isotope models predict foraging habitat of northern fur seals (*Callorhinus ursinus*) in Alaska. PLoS ONE 10, e0127615.
- 115) Zeppelin, T., Pelland, N., Sterling, J., Brost, B., Melin, S., Johnson, D., Lea, M.A. and Ream, R. (2019). Migratory strategies of juvenile northern fur seals (*Callorhinus ursinus*): bridging the gap between pups and adults. Sci. Rep. 9, 13921.