

	シマト タツキ
氏 名	 本 樹
本籍（国籍）	東京都
学位の種類	博士（農学）
学位記番号	連研第 668 号
学位授与年月日	平成 28 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 1 項該当課程博士
研究科及び専攻	連合農学研究科 生物環境科学
学位論文題目	Animal biology from feces: ecological and endocrinological research in Siberian flying squirrels <i>Pteromys volans</i> (タイリクモモンガにおける糞を用いた生態学的・内分泌学的研究)
学位審査委員	主査 帯広畜産大学 教授 柳川 久 副査 手塚 雅文(帯広 教授)、青井 俊樹(岩手 教授)、江成 広斗 (山形 准教授)、押田 龍夫(帯広 教授)

論文の内容の要旨

The animal's sign is often focused on when difficult-to-observe animals are researched. Feces are among the most common for animal research, and are used to reveal the basic ecology in various studies. Furthermore, recently fecal steroid hormone analysis that is non-invasive has been developed over the past two decades. Feces can therefore be used as a tool for studying difficult-to-observe animals, and the results obtained can help to elucidate various aspects of animal biology, such as life history, genetic structure, and endocrine patterns.

The Siberian flying squirrel, *Pteromys volans*, a member of the Family Sciuridae, is difficult to observe. However, its feces are distinctive and can be easily identified. Despite the diversity of information offered by fecal analysis, there has been little research on feces in Siberian flying squirrels. Research focusing on fecal characteristics could help to elucidate the ecology and endocrinology of this species.

Here, with a focus on the benefits of using feces, author studied the ecology and endocrinology of Siberian flying squirrels. First, author established the confirmation method for presence of Siberian flying squirrels by using feces (Section 1). Then, author validated the use of fecal progesterone analysis for predicting pregnancy (Section 2). Finally, author investigated progesterone

concentrations during lactation and the progesterone dynamics of lactating females to estimate the presence of postpartum estrus in Siberian flying squirrels (Section 3).

1) A confirmation method for the presence of the Siberian flying squirrel via feces

There is concern about population decline and local population extinction of the Siberian flying squirrel *Pteromys volans* because of forest fragmentation. The goal of this study was to confirm a simple and efficient method of determining the presence of the squirrels to monitor the effects of forest fragmentation. Author searched for their feces in 11 fragmented forests. Author set 12 transects, each 10 m long and 4 m wide, randomly in each forest and searched for feces within each transects. First, to characterize the places where feces were found, author measured the distance between the feces and the closest tree, along with the diameter at breast height (DBH) of that tree. The feces that author found were close to large trees; author therefore found that it was efficient to mainly search for feces within 20 cm of such trees. Second, to reveal the efforts to search feces in each forest, author evaluated the relationship between the number of transects on which author found feces and forest size. The number was unrelated to forest size. Therefore, author did not need to change the research effort according to forest size. Furthermore, author found that five transects per forest gave valid results for squirrel presence.

2) Validation of fecal progesterone analysis for predicting pregnancy in Siberian flying squirrels *Pteromys volans*

Recently steroid hormone analysis using feces have been developed during past twenty years. Development of fecal steroid hormone analysis has facilitated to elucidate a variety of wild and zoo animals. However, there is a paucity of information on the Siberian flying squirrel's basic reproductive physiology, and there is no established method for studying it. The purpose of this study was to validate fecal progesterone analysis in this animal using a commercial enzyme immunoassay (EIA) kit for endocrine profiles in Siberian flying squirrels. First, author tested parallelism between serially diluted fecal progesterone and a standard curve to validate the EIA. Comparison of the slopes of the two regression lines to test for parallelism revealed no significant difference. Therefore,

progesterone concentrations in the fecal samples of the Siberian flying squirrels were exactly measured. Second, author compared progesterone concentrations among four groups—pregnant females, adult females in the non-breeding season, juvenile females, and adult males—to determine whether fecal progesterone analysis was useful for evaluating reproductive status using GLMM. Fecal progesterone concentrations were significantly higher in pregnant females than in other groups. These results indicated that fecal progesterone analysis in Siberian flying squirrels was valid for predicting pregnancy.

3) Fecal progesterone concentrations and dynamics during lactation in Siberian flying squirrels *Pteromys volans*

The reproductive strategy is a key concept of species survival. *Pteromys volans*, which is a seasonal breeder, produces up to two litters per year. But, *P. volans* is imposed to reproduce in a breeding season because of severe winter. To circumvent time constraints, *P. volans* may have a postpartum estrus similarly to a variety of small mammals. Progesterone would be secreted from formed corpus luteum (CL) after postpartum ovulation, if *P. volans* have a postpartum estrus. Therefore, we investigated progesterone concentrations and dynamics during lactation in this species by using an enzyme immunoassay to test this hypothesis. To compare fecal progesterone in lactating females with pregnant females and non-reproductive females, fecal samples were collected from each individuals with different reproductive status. As a result, the 95% confidence interval of fecal progesterone concentrations in lactating females overlapped with that in pregnant and non-reproductive females. This result indicated that a part of used fecal samples included luteal phase. Furthermore, author captured six pregnant females in spring and kept them temporarily to monitor progesterone dynamics during lactation. The durations with high progesterone concentration were detected in 4 of 6 lactating females, which indicated that follicular development was reinitiated after parturition, ovulation occurred, and the formed CLs began secreting progesterone. Thus, author showed that *P. volans* has the physiological potential to mate during lactation.

These studies showed fecal analysis can help to mainly elucidate the basic biology of Siberian flying squirrels. However, the research using feces could also help to conserve this squirrels of which the population have decreased due to forest fragmentation in the worldwide. For instance, the research in section 1

showed that feces can be used as the indicator of presence, and might be useful to monitor the lag time effect of forest fragmentation on the population of the squirrel. Furthermore, forest fragmentation has deleterious effect on the reproductive physiology of living animals in fragmented forests. Therefore, reproductive status needs to be assessed if we are to evaluate the effects of forest fragmentation on Siberian flying squirrels. Fecal progesterone analysis is used to assess reproductive status and detect pregnancy in wild populations of other animals. Also, in Siberian flying squirrels, fecal progesterone analysis could be used to predict pregnancy rates in populations in fragmented forests, and this could help to assess population dynamics in these fragmented areas.

In addition to in situ conservation, ex situ conservation is often applied to animals subjected to population decreases, i.e. endangered species. Ex situ conservation focuses mainly on captive breeding in zoological parks and aquariums to increase populations. Application of endocrine techniques can suggest problems in captive-breeding programs and can guide hormone therapy in endangered species. In section 2, author validated the use of fecal progesterone analysis for predicting pregnancy; not only pregnancy but also other reproductive status could be predicted. Furthermore, in section 3 author showed that high progesterone concentrations were detected despite lactation, and this seems to be the characteristic endocrine pattern of Siberian flying squirrels. If Siberian flying squirrels express postpartum estrus, facilitation of breeding during lactation may permit efficient captive breeding. Nevertheless, for efficient captive breeding author needs to establish a more precise diagnosis of pregnancy and will need to reveal in more detail the dynamics of progesterone during pregnancy.

[和訳]

動物の痕跡である糞は動物を研究する際に様々な目的のためによく用いられている。さらに、近年では内分泌パターンを調査するためのサンプルとしても用いられている。そのため、糞は動物が持つ多大な情報を有している。

タイリクモモンガはリス科に属する小型で夜行性の哺乳類である。本種は直接観察が困難であるが、糞は特徴的で簡単に同定することができる。そのため、糞を用いた研究がしやすいと考えられるが、実際にはほとんどされていない。そこで本研究では、1章で糞を用いたタイリクモモンガの生息確認方法、2章でタイリクモモンガの妊娠状態の推定における糞中プロゲステロン測定の有効性、3章でタイリクモモンガの泌乳期におけるプロゲステロン濃度と動態を明らかにした。

1) 糞を用いたタイリクモモンガ *Pteromys volans* の生息確認方法

タイリクモモンガは、森林分断化の影響によって個体数の減少や地域個体群の絶滅が危惧されている。本種に対する森林分断化の影響を評価するには、生息確認方法を確立し、生息状況をモニタリングする必要がある。本研究では、糞による簡便かつ効率的な生息確認方法を確立するために、糞が頻繁に発見される場所の特徴や樹林面積の違いによる調査努力量の違いを検討した。11ヶ所の樹林地（面積 0.42-13.69ha）において、10m の調査ラインをランダムに 12 本引き、両側 2m の範囲で糞の有無を確認した。全ての樹林地で本種の糞が発見され、発見ライン数は平均 6.2 本であった。糞は胸高直径が太い樹木の近くでよく発見され、胸高直径 25cm 以上の樹木から 20cm 以内の範囲で糞を探ることが効率的であることがわかった。一方で、樹林面積は糞の発見ライン数に影響しなかった。そのため、樹林面積の大きさによって、調査努力量を変える必要はないだろう。本調査の結果から、面積に関わらず 1ヶ所の樹林地につき 5 本程度のラインを引いて糞を探することで、簡便かつ効率的に本種の生息を確認できることがわかった。

2) タイリクモモンガの妊娠状態の推定における糞中プロゲステロン測定の有効性

近年、ステロイドホルモン測定が発展してきており、様々な野生動物や動物園動物の繁殖生理パターンが明らかにされている。しかし、タイリクモモンガにおける繁殖生理パターンは知られておらず、それを明らかにする手法も確立されていない。そこで、本研究では市販の酵素免疫測定法（EIA）キットを用いて、タイリクモモンガにおいて糞中プロゲステロン（ P_4 ）測定が妊娠状態の評価に有効かを検証した。まず、EIA の実験が正常に反応しているのかを評価するために、糞中 P_4 を 2 倍段階希釈したものと標準曲線の平行性を検定した。その結果、段階希釈した糞中 P_4 と標準曲線の 2 つの回帰直線の傾きに有意な差はなかったため、平行性が示された。つまり、本種の糞中 P_4 測定は正確に行われたことがわかった。また、繁殖状態の推定が可能かを明らかにするために、 P_4 濃度が高いであろう妊娠期のメスと P_4 濃度が低いであろう非繁殖期のメス、幼獣および成獣オスの間で P_4 濃度を一般化線形混合モデルにより比較した。測定結果では、妊娠期のメスの P_4 濃度は非繁殖期のメスや幼獣メス、成獣オスよりも有意に高かった。したがって、微量な糞からでも繁殖状態の変化に伴う P_4 の変動を検出でき、市販の EIA キットを用いた糞中 P_4 測定によりタイリクモモンガの妊娠を推定し、生理学的な研究に応用することができるだろう。

3)タイリクモモンガにおける泌乳期中のプロゲステロン濃度と動態

繁殖戦略は種の存続に重要な概念である。タイリクモモンガは季節繁殖動物で、1年に2回繁殖する。しかし、本種は厳冬期が存在する地域に分布しているため、限られた繁殖期中で2回繁殖をしなければならない。この時間的制約に対処するために、本種は他の小型哺乳類と同様に分娩後発情をするかもしれない。もしも、本種が分娩後発情を有するのであれば、泌乳期中に排卵が生じ、プロゲステロン（以下 P_4 ）濃度が上昇するだろう。そこで、本研究ではタイリクモモンガが分娩後発情をする生理学的な状態になっているのかを明らかにするために、泌乳期中のメスの P_4 濃度とその動態を明らかにした。まず、泌乳期中の P_4 濃度を妊娠メスと非繁殖メスと比較した。GLMMを用いて、95%信頼区間を比較した結果、泌乳メスの P_4 濃度は黄体が存在する妊娠メスと非黄体期の非繁殖メスのものと重なっていた。つまり、泌乳期中には黄体期と非黄体期の両方が混在している可能性がある。次いで、6頭のメスを用いて、泌乳期中の P_4 動態を明らかにした。6頭のうち4頭は、高濃度の P_4 が検出された。このことから、泌乳期中に排卵が生じ、黄体が形成され、 P_4 が分泌された可能性がある。つまり、泌乳期のメスは授乳をしているにも関わらず、交尾可能な生理状態であったことがわかった。

本種は森林分断化によりフィンランドや韓国などでは個体数の減少が報告されている。1章から3章では糞が持つ利点を活かし、タイリクモモンガの基礎的な研究を中心に進めてきたが、保全研究にも貢献できるだろう。例えば、森林分断化が持つ長期的な影響を評価するモニタリング手法として、1章で確立した手法を用いることが可能だろう。また、2章で確立した手法を用いて、分断化景観における繁殖状態を評価することができるだろう。さらに、絶滅危惧種などでは域内保全だけではなく域外保全での飼育下繁殖も行われている。内分泌の評価は飼育下繁殖の手助けとなり、効率のいい繁殖が可能となる。本研究により糞中プロゲステロン測定系を確立し、実際に本種の内分泌パターンを明らかにできた。もしも、本種の飼育下繁殖が必要となった場合にも、これらの結果を役立てることが可能だろう。これらのことから、タイリクモモンガの研究を進める上で糞サンプルを用いることが非常に有効であることがわかった。

論文審査の結果の要旨

動物の痕跡である糞は動物が持つ多大な情報を有しており、動物を研究する際に様々な目的のためによく用いられている。近年では内分泌パターンを調査するためのサンプルとしても用いられている。本研究対象動物であるタイリクモモンガはリス科に属する小型で夜行性の哺乳類であるため直接観察が困難である。しかし、糞は特徴的で簡単に同定することができる。そのため、糞を用いた研究がしやすいと考えられるが、実際にはそのような研究はほとんど行なわれていない。そこで、糞を用いることの利点に注目し、タイリクモモンガの研究を進めてきた。

本研究の1章では、糞がよく発見される場所の特徴と生息確認に必要な調査努力量を明らかにし、糞を用いたタイリクモモンガの生息確認方法を確立した。2章では、タイリクモモンガの内分泌パターンを解明する手法を確立するために、糞中プロゲステロン測定が可能であるかを検証し、妊娠状態の推定における糞中プロゲステロン測定の有効性を明らかにした。3章では、タイリクモモンガが泌乳期中に交尾をする能力を有しているのかを明らかにするために、泌乳期におけるプロゲステロン動態を解析し、本種がこの能力を有していることを明らかにした。また、本種は森林分断化によりフィンランドや韓国などでは個体数の減少が報告されている。1章から3章では糞が持つ利点を活かし、タイリクモモンガの基礎的な研究を中心に進めてきたが、保全研究にも貢献できるだろう。

例えば、森林分断化が持つ長期的な影響を評価するモニタリング手法として、1章で確立した手法を用いることが可能だろう。また、2章で確立した手法を用いて、分断化景観における繁殖状態を評価することができるだろう。さらに、絶滅危惧種などでは域内保全だけではなく域外保全での飼育下繁殖も行われている。内分泌の評価は飼育下繁殖の手助けとなり、効率の良い繁殖が可能となる。本研究により糞中プロゲステロン測定系を確立し、実際に本種の内分泌パターンを明らかにできた。本種の飼育下繁殖が必要となった場合にも、これらの結果を役立てることが可能だろう。これらのことから、本研究はタイリクモモンガの研究を進める上で糞サンプルを用いることが非常に有効であることを明らかにした。

よって、本審査委員会は、「岩手大学大学院連合農学研究科博士学位論文審査基準」に則り審査した結果、本論文を博士（農学）の学位論文として十分価値のあるものと認めた。

学位論文の基礎となる学術論文

寫本 樹・古川竜司・鈴木 圭・柳川 久 (2014). 糞を用いたタイリクモモンガ *Pteromys volans* の生息確認方法. 哺乳類科学 54 : 201-206.

Shimamoto, T., Suzuki, K., Furukawa, R., Hamada, M., Tetsuka, M., Yanagawa, H. (2015).

Validation of fecal progesterone analysis for predicting pregnancy in Siberian flying squirrels (*Pteromys volans*). Japanese Journal of Zoo and Wildlife Medicine 20 : 63-70.