

育雛期におけるウミネコ糞中コルチコステロンの変動

佐藤 恵^{1,2} 八嶋 桂子³ 塩谷 正勝³ 若林 修一^{1,2} 酒井 秀嗣^{1,2}

Changes in fecal corticosterone concentrations in brooding period of the Black-tailed Gulls (*Larus crassirostris*)

Megumi Sato^{1,2}, Keiko Yashima³, Masakatsu Shioya³, Shuichi Wakabayashi^{1,2} and Hidetsugu Sakai^{1,2}

Abstract

The present research focused in the assumption that, for general avian species, departure from the breeding ground after breeding may inflict stresses. The amount of fecal corticosterone of the Black-tailed Gulls was measured starting from nesting to fledging, to obtain an index to the magnitude of stresses. The result revealed statistically significant peaks of corticosterone at egg laying and fledging periods. The correlative analysis of the above data and the testosterone data collected as another index suggested the corticosterone regulation shifted during the period between egg-laying and incubation, and also between brooding and fledging. This phenomenon can be interpreted as reflecting strong stresses manifesting themselves in males by territorial defense and mate guarding during the first half of the breeding period, and in the latter half both males and females appeared to be under strong stresses caused by brooding. No apparent hormonal changes at the time of fledging were detected in the present experiment, but the possibilities for the birds' stressful experience were expected.

Key words : Black-tailed Gull, breeding ground, corticosterone, fledging, stress

緒 言

中・高緯度地方に生息する鳥類は、繁殖地への渡り、繁殖、換羽、越冬地への渡り、越冬などをライフイベントとして1年のサイクルを繰り返す。この生活史は季節に従って進行するが、実際には環境の変化に伴って内的な調節機構が働いている¹⁾。我々は、ヒメアマツバメ (*Apus affinis*) において、繁殖終了時にコルチコステロンの分泌が一時的に高まることを捉えてい

る²⁾。また、鳥類の周年活動に視床下部一下垂体一副腎系の内分泌調節が重要な役割を担っていることを示唆する研究が、近年になって多く報告されている^{3,4)}。

一般に、鳥類の繁殖では産卵以降、抱卵から育雛へと進行するのに従って、下垂体一性腺系のホルモン分泌が次第に低下する。繁殖期が終了して性腺系のホルモン分泌が最も低下した後に、換羽が始まる。換羽の進み方は種によって様々で、換羽は全身でほぼ同時期に起こる種も

¹ 日本大学歯学部生物学教室

² 日本大学歯学部総合歯学研究所機能形態部門
〒101-8310 東京都千代田区神田駿河台1-8-13

³ 日本大学生物資源科学部動物資源科学教室
〒252-8510 神奈川県藤沢市亀井野1866
(受理: 2008年9月30日)

¹ Department of Biology, Nihon University School of Dentistry

² Division of Functional Morphology, Dental research center, Nihon University School of Dentistry
1-8-13 Kanda-surugadai, Chiyoda-ku, Tokyo 101-8310, Japan

³ Department of Animal Resource Science, College of Bioresource Science, Nihon University
1866 Kameino, Fujisawa City, Kanagawa 252-8510, Japan

あれば、長い期間にわたって徐々に進行する種もある⁵⁾。しかし、後者であっても、繁殖期後の換羽は最も規模が大きい。我々はこれらのライフイベントの変わり目に、個体は大きなストレスを受けているのではないかと考えた。そこで、繁殖期の終わり、あるいは換羽の始まりに時期にストレスを反映して糖質コルチコイドの分泌が一時的に高まることを予想し、コルチコステロンを指標にその現象を捉えようと試みた。

材料と方法

1. 試料採取

蕪島（北緯 40 度東経 141 度）は青森県八戸市の太平洋側に位置し、毎年約 3 万羽のウミネコが飛来して営巣する日本有数の繁殖地として 1922 年に国の天然記念物に指定された。蕪島は面積が約 1.8 hr の独立した島であったが、1942 年に埋め立てが行われて、現在では陸続きになっている。島の最も高い位置に蕪島神社があり、この境内には自由に立ち入ることができるが、それ以外の地域は保護区域としてフェンスが巡らされていて許可が無いと立ち入ることができない。また、神社の境内には蕪島ウミネコ保護監視所が置かれ、繁殖期には監視員が 24 時間駐在している。

蕪島を管轄する八戸市教育委員会および文化庁の許可を得て、保護区域の中で島の北西側の一角を採取地域とし、詳細な地図を作成して巣の位置を記録した。2006 年 4 月 11 日から 8 月 5 日の間に、19 回に渡って 313 試料の成鳥の糞を採取した。糞は個体が限定できるように巣の周囲にある新しいものを採取し、個々に 85×60 mm のビニール袋に入れて保護監視所の冷凍庫で輸送まで冷凍保存した。

2. ホルモン分画の抽出

試料の糞は解凍後、60°C のオーブンで 48 時間以上乾燥した⁶⁾。状態の目視および秤量により重量の変化がなくなって完全に乾燥したこと

を確認し、最終的に秤量を行った後にホルモン分画の抽出を行った。

まず、15×150 mm のガラス試験管に乾燥した糞を入れ、2 ml の蒸留水を加えてホモゲナイズした。その後 20 分放置した懸濁液を 4°C、3,000 rpm で 20 分間遠心し、上清を同サイズの新しい試験管に移した。沈殿には再度蒸留水 2 ml を加えて同様にホモゲナイズと遠心分離を行い、上清を合一した。この上清に 2 ml のジエチルエーテルを加えてよく攪拌した後、4°C、3,000 rpm で 20 分間遠心してエーテル層を 10×70 mm のガラス試験管に移し、60°C のブロックヒーターで窒素ガスを併用してエーテルを一部蒸発させた。一方、残った水層には再びジエチルエーテルを 1 ml 加えて攪拌後に遠心分離を行い、エーテル層を前述のガラス試験管に加えた。エーテルを完全に蒸発完固させた後、150 mM NaCl を含む 10 mM リン酸緩衝液、pH 7.5 を 0.5 ml 加えて凝固物を再溶解させ、測定を試料とした。ホルモン量は糞の単位乾燥重量当りの含有量に換算して表わした。

3. ホルモンの測定

コルチコステロンは Amersham BioScience (NJ, USA) の Rat corticosterone assay system, RPA548 を使い、佐藤らのステロイドホルモン測定の変法⁷⁾に準じて測定した。これは¹²⁵I で標識したコルチコステロンをトレーサーとする 2 抗体法の放射免疫検定法で、取扱説明書による交叉率は、11-デオキシコルチコステロンが 2.4%、それ以外の調べられたステロイドではいずれも 1%未満である。放射能の測定にはオートウェルガンマシステム ARC-1000 M (アロカ、東京) を用いた。

テストステロンの測定には Cayman Chemical (MI, USA) の Testosterone EIA Kit を用いた。取扱説明書による交叉率は、5 α -ジヒドロテストステロン (5 α -DHT) が 27.4%、5 β -ジヒドロテストステロンが 18.9%、メチルテ

ストステロンが4.7%，アンドロステジオンが3.7%，11-ケトテストステロンが2.2%で，それら以外の調べられたステロイドは1%未満である。反応液の吸光度はBIO-RADモデル680マイクロプレートリーダー（東京）で，405 nmのフィルターを用いて測定した。

測定値からのホルモン量の算出には，若林によるN 88-BASIC用の計算プログラム⁸⁾を角川博哉がMS-DOS用に書き換えて日本繁殖生物学会のホームページから供給しているNewcra for Windows⁹⁾を用いた。

4. 統計

実験データは一元配置分散分析，Kruskal-Wallisの検定法，2試料の分散比較のためのF-検定法，Pearsonの相関分析，KendallおよびSpearmanの各順位相関分析によって検定を行った。これらの検定には統計パッケージSPSS ver. 8.0J（エス・ピー・エス・エス，東京）およびエクセル統計2004（社会情報サービス，東京）を用いた。また，Smirnov-Grubbsの検定は石村¹⁰⁾に従って行った。

結 果

1. 試 料

約4カ月の採取期間に，19回にわたって313個の成鳥の糞を試料として採取した。これらのうち比較的継続して採取されている巣の試料を優先し，同一採取日では特定の巣での採取試料に偏らないように配慮して，26箇所の巣から得られた211試料を選択した。これらのコルチコステロンおよびテストステロン量を測定し，測定値が得られたそれぞれ208および209試料について解析を行った。

2. ホルモンの変動

Kruskal-Wallisの検定の結果，コルチコステロンの変動は強度に有意 ($p=0.010$) で，測定を開始した4月11日から4月26日の間および6月30日以降，特に7月下旬に比較的高い値が

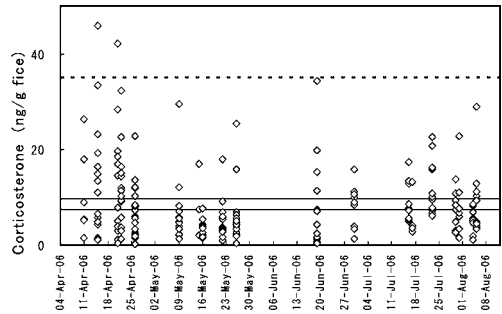


図1 糞中コルチコステロン量の測定結果，乾燥糞重量当たりのホルモン量で表した。図中の実線は測定値全体の平均値の95%信頼区間を破線はSmirnov-Grubbsの検定による外れ値の除却限界 ($p=0.05$) をそれぞれ表す。

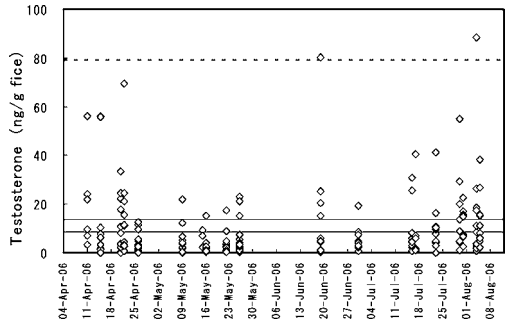


図2 糞中テストステロン量の測定結果，乾燥糞重量当たりのホルモン量で表した。図中の実線は測定値全体の平均値の95%信頼区間を破線はSmirnov-Grubbsの検定による外れ値の除却限界 ($p=0.05$) をそれぞれ表す。

観察された（図1）。また，テストステロンもKruskal-Wallisの検定によって非常に強度な変動が認められ ($p=0.001$)，4月下旬までと7月上旬以降に比較的高い値が観察された（図2）。

両者の変動の中で，極端に高い値が出現していないかどうかをSmirnov-Grubbsの検定によって調べてみた。有意水準5%で検定を行った結果，コルチコステロンは4月に2試料，テストステロンは6月と8月に各1試料がこれに該当した（図1，2）。

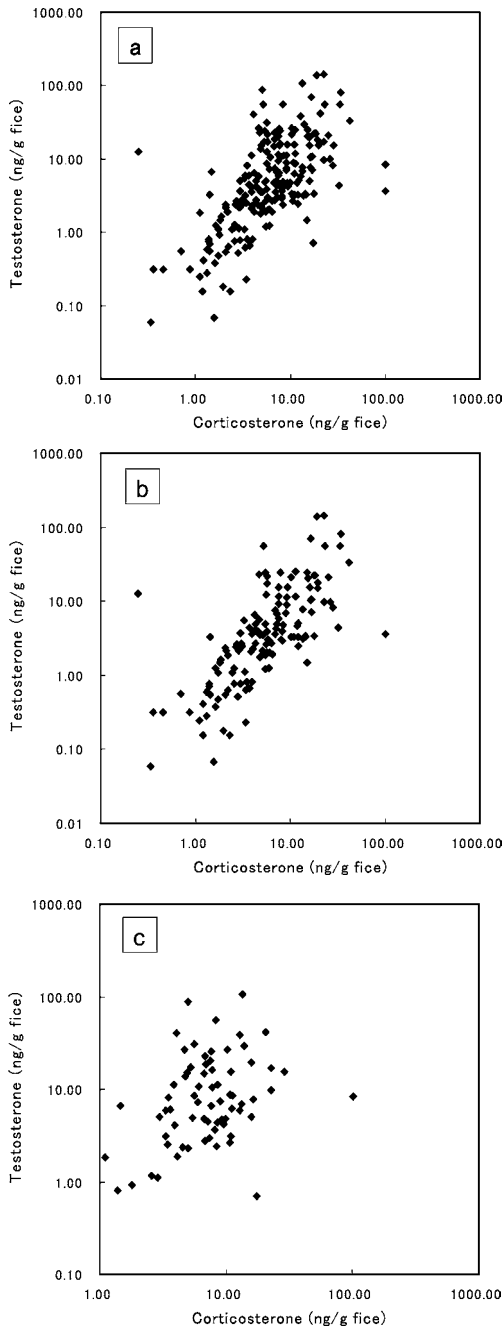


図3 コルチコステロンとテストステロンの測定値の散布図 測定値を対数軸で表した。
 a : 全試料の散布図, b : 4月11日から6月19日までの試料の散布図, c : 6月30日から8月5日までの試料の散布図

また、コルチコステロンとテストステロンの変動が似ていたため、両者の相関を検定した。全測定値での Pearson の相関分析の結果は相関係数 $r=0.215$, $p<0.01$ で強度な相関が認められた。これは Kendall の順位相関分析 ($\tau=0.415$, $p<0.001$) および Spearman の順位相関分析 ($\rho=0.587$, $p<0.001$) においても同様の結果になった(図3 a)。しかし、4月に高かった両者のホルモンレベルが減少して6月末から再び上昇に転じるため、6月19日以前と6月30日以降とに分けて測定値の分散を比較した。この結果、2つの期間の間でテストステロンの分散には有意な違いは認められなかったが、コルチコステロンの分散には非常に強度に差があることが判明した($p<0.001$)。このため、6月19日以前と6月30日以降とで、それぞれ両ホルモンの相関分析をやり直してみた。Pearson の相関分析の結果、6月19日以前の試料では相関係数 $r=0.447$ ($p<0.001$) と更に高度な相関が認められた(図3 b)。一方、6月30日以降の試料では $r=0.166$ で相関は認められなかった(図3 c)。

考 察

ウミネコは2月になると蕪島に到着し始め、徐々に数が増していく。その後、3月中旬頃から縄張り争いが始まり、営巣場所を確保して4月中旬頃からの巣作りやつがい形成を経て、4月下旬から5月上旬にかけて産卵を行う。本研究で試料採取を始めた4月中旬は縄張り争いなどの闘争行動の最中にあたり、この闘争行動のストレスが活発なコルチコステロン分泌に反映していると考えられる。特にウミネコは密集して巣を作るため、互いの縄張りへの侵害が頻繁に発生している。一方で、一般に鳥類ではオスの雄性ホルモンの分泌はメスの発情ホルモンよりも早期に最高値に達する¹¹⁾。これは、メスの産卵前に精子形成を終えていることと、一連の闘

争行動の誘起に関係していると考えられる¹²⁾。

本研究に用いた試料は、地上の糞を採取したためにつがいは特定できるが個体を識別できていない。性ホルモンの分泌が活発な時には雄性ホルモンと雌性ホルモンの比率によって、ある程度は雌雄の判別をすることは可能であるが¹³⁾、テストステロンのみの情報しか得ていないために測定した結果を雌雄に分けて解析することはできなかった。実際、同じ日に同じ巣で採取した試料でもテストステロンの含有量に大きな違いが見られ、各日の測定値のばらつきにも雌雄の試料が混在していることが反映している(図2)。明確な区分は難しいが、テストステロンの値が高い試料は主にオス、低い試料は主にメスのものが多いと推測される。一方で、同じ時期に縄張り争いをするのはオスに限られるため、繁殖期の前半にはコルチコステロンとテストステロンとの間に非常に強い相関が認められたと説明できる。

抱卵中にも産卵を行う種を除いて、産卵が行われる頃にはオスのテストステロンの分泌は低下しており、メスの発情ホルモンも抱卵に入ると低下してくる¹⁴⁾。ウミネコでも抱卵期のオスの血中テストステロン濃度が低いレベルであることが報告されている¹⁴⁾。しかし、その後6月下旬頃から再びコルチコステロンとテストステロンの値が上昇した。この前後でテストステロンの測定値の分散が変わらなかったのに対してコルチコステロンの測定値の分散は有意 ($p < 0.001$) に小さくなった。さらに、この期間には両者の相関も認められなかった。この結果は、両者の値がともに高くなったにもかかわらず、産卵前の4月とは分泌調節に違いがあることを示唆している。テストステロンとの相関が認められなかったことは、コルチコステロンの高い糞には雌雄両者の糞が含まれていることが示唆され、縄張り争いによるストレスの発生とは状況が異なる。抱卵期までは密集する営巣地での

縄張り維持や隣接する巣のオスによる婚外交尾の防止などでオスの負担が大きいが、育雛期になると雛の防御や他の巣の雛や親に給餌を妨害されないための雌雄共通のストレスが生じてくる。今後の課題として同一試料に含まれる発情ホルモンの情報を加味することができれば、繁殖期の前後におけるコルチコステロンの上昇の違いをより明確にできるものと期待される。

7月に入ると生育の早い雛は巣立ちをはじめ、島の中の岩場などに行き交うようになる。さらに8月上旬になるとすべての雛が巣立ち、親鳥ともども島を離れて周辺で採餌をする。本研究にあたって、このライフイベントの変わり目に大きなストレスが生じ、コルチコステロンの分泌に反映するであろうと予想した。実際、巣立ち前の時期にコルチコステロンの分泌が上昇したが、Smirnov-Grubbsの検定で除外されるような極端に高い値は2例に留まった。脳下垂体から分泌される副腎皮質刺激ホルモンに対するコルチコステロン分泌の反応は非常に速く、さらに糞への反映も5分程度であると報告されている¹⁵⁾。このことから、本研究の結果に現れたコルチコステロンの分泌を促す刺激は、非常に強く一過性のものでなく、かなり持続的なものではないかと判断される。この時期のコルチコステロンの分泌が育雛によるストレスだけの反映なのか、巣立ちから離島までのライフイベントの切り替わりにも起因しているのか、もう少し細かい試料採取による見極めが必要であると考えられる。

また、育雛期にテストステロンが再び高くなる現象は、鳥類の繁殖期の一般的な理解とは異なる。性腺からではなく副腎由来のホルモンの可能性も推察されるが、この生理的な意義については更に検討が必要である。

謝 辞

本研究の遂行にあたって、大阪市立大学大学

院理学研究科の富田直樹博士には詳細な助言と試料採取にご協力いただくとともに、蕪島におけるウミネコ研究者の成田章氏から有益な助言をいただいた。また、試料採取にあたって蕪島ウミネコ保護監視所の岡元正光氏にご協力いただいた。本研究の主要部分は、平成 19 年度日本大学歯学部佐藤奨学金の援助による。

文 献

- 1) Gwinner, E (2003) Circannual rhythms in birds. *Curr Opin Neurobiol* 13, 770-778
- 2) 酒井秀嗣, 佐藤恵 (1995) ヒメアマツバメの糞中ステロイドホルモン測定に関する研究. *日大歯紀* 23, 57-62
- 3) Landys, MM, Ramenofsky, M, Wingfeld, JC (2006) Actions of glucocorticoids at a seasonal baseline as compared to stress-related levels in the regulation of periodic life processes. *Gen Comp Endocrinol* 148, 132-149
- 4) McEwen, BS, Wingfeld, JC, (2003) The concept of allostasis in biology and biomedicine. *Horm Behav* 43, 2-15.
- 5) Dawson, A (2006) Control of molt in birds: Association with prolactin and gonadal regression in starlings. *Gen Comp Endocrinol* 147, 314-322
- 6) 佐藤恵, 柳沼千春, 塩谷正勝, 若林修一, 酒井秀嗣 (2007) 糞中ステロイドホルモン抽出方法の比較. *日大歯紀* 35, 49-56
- 7) 佐藤恵, 酒井秀嗣 (1996) 市販の性ステロイドホルモン放射免疫検定キットの応用. *日大歯紀* 24, 49-55
- 8) 若林克己 (1984) ライフサウエンス・パソコン・シリーズ 5 実験データの整理, 培風館, 東京
- 9) コンペティティブアッセイ用プログラム「Newcra for Windows」配布ページ (1999) 日本繁殖生物学会 <http://reproduction.jp/member/newcra.html>
- 10) 石村貞夫 (1996) 測定ミス?—異常値・外れ値の棄却検定, すぐわかる統計解析, 石村貞夫, 東京図書, 東京, 76-79
- 11) Sakai, H, Ishii, S (1986) Annual cycles of plasma gonadotropins and sex steroids in Japanese common pheasants, *Phasianus colchicus versicolor*. *Gen Comp Endocrinol* 63, 275-283
- 12) Wingfield JC, Whaling CS, Marler P (1994) Communication in vertebrate aggression and reproduction: the role of hormone. In *The Physiology of Reproduction*, 2nd ed, Konbil E, Neill JD eds, Raven Press, New York, 303-342
- 13) 酒井秀嗣, 佐藤恵, 塩谷正勝 (1997) 糞中の性ホルモン比による鳥類の性別の推定. *日大歯紀* 25, 57-85
- 14) 風間健太郎, 坂本健太郎, 綿貫豊 (2008) 抱卵期におけるウミネコの血漿テストステロン濃度. *山階鳥学誌* 39, 112-116
- 15) Dehnhard M, Schreer A, Krone O, Jewgenow K, Krause M, Grossmann R. (2003) Measurement of plasma corticosterone and fecal glucocorticoid metabolites in the chicken (*Gallus domesticus*), the great cormorant (*Phalacrocorax carbo*), and the goshawk (*Accipiter gentilis*). *Gen Comp Endocrinol* 131, 345-352