

鯨類の副腎皮質ホルモンに関する生理学的研究

Physiological Studies on Adrenocorticosteroids in Cetaceans

東京大学大学院農学生命科学研究科
水圏生物科学専攻博士課程

鈴木美和
Miwa Suzuki
2001

目次

序	1
第1章 副腎皮質ホルモン代謝	9
第1節 ^{14}C -Pregnenoloneの代謝	11
第2節 ^{14}C -Progesteroneの代謝	17
第3節 ^{14}C -Hydroxyprogesteroneの代謝	19
第2章 血清中cortisol濃度	22
第1節 平均血清中cortisol濃度	24
第2節 体サイズと血清中cortisol濃度	30
第3節 日周変動	33
第4節 年周変動	36
第5節 水族館搬入後の時間経過に伴うcortisol濃度の変化	40
第3章 21-deoxycortisol	44
第1節 血清中21-deoxycortisol濃度	45
第2節 水族館搬入後の時間経過に伴う21-deoxycortisol濃度の変化	49
総合考察	51
要旨	61
謝辞	67
引用文献	70
図表	

序

副腎は、円口類から哺乳類まで幅広く脊椎動物の腎臓上部の腹腔内背側に位置する内分泌器官である (Kawamura and Kikuyama, 1987)。副腎組織はステロイド産生組織である皮質とカテコールアミン産生組織である髄質とからなり、哺乳類においては各々が明確に分かれている。皮質からはコルチコイド (副腎皮質ホルモン) と呼ばれるステロイドホルモンが分泌される。コルチコイドは視床下部 Hypothalamus (副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン) - 下垂体 Pituitary (副腎皮質刺激ホルモン) - 副腎皮質 Adrenal cortex の経路 (HPA 系) を介して分泌され、タンパク質、脂質の分解促進、糖新生、免疫抑制などの作用を有する cortisol (F) や corticosterone (B), cortisone などの糖質コルチコイドと、腎臓での Na⁺吸収、K⁺排出、水の再吸収などを促す aldosterone (Aldo) などの鉱質コルチコイドに分けられる。また、HPA 系はネガティブフィードバックにより調節されている。陸上動物において、ストレスによる生体の生理状態の変化を把握する有効な指標として様々な物質が挙げられるが、これまで主に糖質コルチコイドの分泌および交感神経の緊張による副腎髄質からのカテコールアミン放出の 2 つがストレスの主な指標とされてきた (Stephens, 1980; Dantzer and Mormede, 1983; Becker, *et al.*, 1985; Bennett and Henswerth, 1990)。これらの反応は、基本的にはストレス対応として糖新生により血糖値を上昇させ、生体が戦うための準備をする反応と言われている (前田, 1997)。

鯨類の副腎については 18 世紀後半から報告があるが、飼育の機会や技術の不足

から、近年に至るまでその大部分が座礁個体および捕獲個体を用いた肉眼解剖学的研究であった。Hunter (1787) は、鯨類の副腎について、形は平坦で円形であり、その内部は2層に分かれ、右副腎は横隔膜の下後方、腎臓の上方に位置し、左副腎は右よりも下方、大動脈と左腎臓の間に位置していること、およびヒトや哺乳類に比べてその体重比が小さいことを報告した。Quiring (1943) は、ザトウクジラ *Megaptera nodosa*, マッコウクジラ *Physeter catadon* およびナガスクジラ *Balaenoptera physalus* の3鯨種の副腎について報告しており、大型鯨類の副腎を見つけることは困難であるが、腎臓の上部に横たわり、通常腔腸の静脈から3~4フィートの位置に存在し、外見は卵型で、幅は3.5~5.5インチ、長さは6~9インチ、厚さは1/4~1インチ、神経や血管が通る丈夫な皮膜で覆われ、髄質が中央に位置し、神経分布域はそれほど広くはなく、副腎表面にグングリオン細胞は認められず、いくつかの血管が副腎中に一定の間隔で貫通していると報告した。また Burn *et al.* (1951) は、シロナガスクジラ *Balaenoptera musculus* およびナガスクジラの副腎が腎臓と大腸、場合によっては肝臓に結合組織により接合していると述べ、また、両種ともにノルアドレナリンが主要な神経伝達物質であることを明らかにした。Arvy (1971) は、イワシクジラ *Balaenoptera borealis* について、副腎は横隔膜の背側、腎臓よりもやや前方にあると述べ、右副腎は左副腎に比べやや腹側に位置し、さらに左副腎は大動脈のわずか後方側面、大動脈と左腎臓に挟まれ、右副腎は肝臓後方の表面に隣接していると述べた。また、成獣になるにつれ、副腎は腎臓から遠くに位置するようになると述べている。さらに副腎の外見上の特徴としては、三日月型もしくは錐体をしており、灰色であるが種によっては茶色がかっており、その表面は滑らかで、弾力がある柔らかさを持つと報告した。Shimpton and Gardner(1972) は、Atlantic bottlenosed porpoise の副腎組織像を示し、

陸上動物の副腎に比べて、結合組織の量が多く、また表面の小片化の程度が大きいという相違点を見出した。また、Kirby (1990) は、海生哺乳類の内分泌器官についての総説の中で副腎を取り上げ、副腎と他臓器との位置関係を図示している。

肉眼解剖学的な研究の次に、動物の各器官の相対重量を測定すれば、各器官の生物学的な重要性が示されるという計測学的生物学の視点に基づき、副腎をエネルギー放出に深く関連した器官ととらえ、副腎重量がその動物のエネルギー消費の指標となるという仮説のもとにいくつかの研究がなされた。まず、Crile and Quiring (1940) は、ほぼ同体重量のシロイルカ *Delphinapterus leucas* とウマ (サラブレッド) について、副腎、甲状腺、脳の各々の重量測定およびその体重比を算出し比較している。その結果、副腎重量については、シロイルカで 34.76g (体重比 1 : 15,328=0.0065%)、サラブレッドで 46.62g (体重比 1 : 11,180=0.0089%) であり、瞬発的にエネルギーを必要とするサラブレッドと異なり、恒常的にエネルギーを放出しているシロイルカでは、エネルギー産出を副腎よりも甲状腺に頼っているのではないかと推測した。また、Quiring (1943) は、ザトウクジラ、マッコウクジラおよびナガスクジラの副腎重量 (カッコ内は体重に対する割合を筆者が算出) を測定し、ザトウクジラでは 1.210kg (体重の 0.003%)、マッコウクジラでは 0.350kg (体重の 0.0009%)、ナガスクジラでは 0.732kg (体重の 0.0012%) であったと述べている。次に Slijper (1958) は、ネズミイルカ *Phocoena phocoena* およびゼニガタアザラシ *Phoca vitulina* について副腎重量の体重比を算出し、それを過去の知見と併せて、海生哺乳類の副腎の体重比は体サイズがと反比例するという結果を導き出した。例えば、ネズミイルカの副腎の体重比は 0.05% (同体重の陸上動物の場合は 0.01~0.02%)、バンドウイルカ *Tursiops truncatus* では 0.01~0.04%、シロイルカでは 0.009~0.02%、ナガスクジラ類では 0.001~0.003%で

ある。さらに彼は、鯨類における副腎の体重比は陸上動物よりも大きいと報告しているが、その現象は小型鯨類にのみ当てはまり、大型鯨類には当てはまらないとしている。小型鯨類において副腎の体重比が陸上動物よりも大きいことについて、彼は Crile and Quiring (1940) と同様に、“sprinters” (短距離走者) というよりも “stayers” (長距離走者) である鯨類は甲状腺によりエネルギー産生を賄っていると考えた。これを受け、Harrison (1969) はコビトイルカ *Sotalia fluviatilis* (論文では *Sotalia plumbea*)、コビレゴンドウ *Globicephala macrorhynchus* (同 *Globicephala scamni*)、ヒレナガゴンドウ *Globicephala melas* (同 *Globicephala melaena*)、カマイルカ *Lagenorhynchus obliquidens*、バンドウイルカ、マイルカ *Delphinus delphis* (同 *Delphinus delphis bairdi*)、スジイルカ *Stenella coeruleoalba* (同 *Stenella caeruleoalba*)、ハシナガイルカ *Stenella longirostris*、マダライルカ *Stenella attenuata* (同 *Stenella graffmani*) において副腎の体重比および甲状腺比を算出している。それによると、副腎/甲状腺比は 1.0 を超えず、甲状腺の方が大きい器官であり、鯨類のエネルギー消費は甲状腺が賄っている可能性が強く示唆された。しかし、これらの計測学的生物学が主張したような大きさと重要性との間の単純な相関性についてはその後見直されている。

1960 年代に入ると、鯨類の副腎皮質で産生されるホルモンに関する研究が開始された。Race and Wu (1961) は、マッコウクジラについて、副腎皮質の球状層、束状層、網状層に各々含まれるステロイドホルモンを Aldo, 17-hydroxycorticoid, 17-ketocorticoid (アンドロゲン) に大別してそれぞれの濃度を測定し、Aldo は球状層および束状層に多量に含まれ、17-hydroxycorticoid は 3 層全てに含まれるが特に束状層に多く、17-ketocorticoid も 3 層全てに存在するが特に網状層に多く含まれていることを確認した。彼らはまた、電解質調節に関係するホルモンである

Aldo が球状層および束状層に極めて多く含まれているのは、鯨類が海水を飲み込む場合が多いことによると推測した。しかし、この大まかな分類による研究以降、副腎に含まれるステロイドホルモンについてのより厳密な研究はなされていない。しかし唯一、副腎皮質ホルモンの代謝実験が Carballeira *et al.* (1987a, 1987b) により行なわれている。彼らは座礁したコマッコウ *Kogia breviceps* およびジェルヴェオウギハクジラ *Mesoplodon europaeus* の副腎を用いて、その組織を観察し、RIA 法によりホルモン組成を調べ、さらにコルチコイドの代謝実験を行なったが、座礁した鯨類の副腎が通常とは異なるコルチコイド代謝を行なっている可能性がある述べている。また、バンドウイルカの血中の F : B 比についても異なる見解が報告されている (Thomson and Geraci, 1986 ; Ortiz and Worthy, 2000)。このように、どの種類のコルチコイドが鯨類の副腎で生合成され血中に分泌されるのかについての統一した知見がないのが現状である。こうした中、現在に至るまで、習慣的にストレス指標として血中 F 濃度を測定した報告が増え続けている。副腎での F 生合成を確認できない状況下で、血中で F として検出されている物質が本当に F であるか否かという疑問が生じてくる。そこで本研究の第 1 章では、鯨類の副腎皮質で生合成されるコルチコイドおよびその割合を明らかにするため、クロミンククジラの新鮮な副腎を用いてコルチコイドの代謝実験を行ない、その生合成経路を調べることにした。

鯨類の血中 F 濃度に関する研究は 1970 年代以降に報告があり、これらの大半はストレスの指標として F 濃度を調べた研究である。まず Medway *et al.* (1970) は医学的な研究を行ない、バンドウイルカに個体の抗ストレス薬剤として合成副腎皮質ホルモンであるデキサメタゾン投与した結果、F 濃度は有意に減少したと報告した。また、商業捕鯨によって捕鯨された数十頭のナガスクジラの血中 F 濃

度を始めとして (Kjeld and Ólafsson, 1987; Kjeld and Theodorsdottir, 1991), 飼育下の黒海産バンドウイルカ *Tursiops truncatus ponticus baracasch* における保定に対する血中 F 濃度の変化 (Orlov *et al.*, 1988), バンドウイルカの輸送に対する F 濃度の変化 (Colgrove, 1978), シロイルカにおける捕獲後の時間経過に対する血中 F 濃度の変化 (St. Aubin and Geraci, 1992), 野生のネズミイルカにおける保定に対する血中 F 濃度の変化 (Koopman *et al.*, 1995) など, 様々な鯨類のストレス状況下における生理的反応としての F 濃度の変化が調べられており, これらの研究ではいずれもストレスに対して F 濃度が上昇したと報告されている。ただし, Ortiz and Worthy (2000) は, 野生のバンドウイルカにおいて短期間の捕獲・保定ストレスに対する血中 F 濃度の変化を調べたところ, F 濃度の変化は引き起こされなかったと報告している。上記の通り, 鯨類の F 濃度に関する研究は数々あるが, これらの報告では各鯨種の平均血中 F 濃度についての知見が不足しており, 得られた値の意味について十分な考察が行なわれているとは言い難い (Dierauf, 1990)。そこで本論文の第 2 章第 1, 2 節において, 15 鯨種の平均血清中 cortisol 濃度を調べることにした。

測定された血中 F 濃度を正確に評価するためには, F 濃度の日周変動の有無について知り, 日周変動が認められるならば採血の時刻について留意する必要がある。血中 cortisol 濃度の日周変動については様々な哺乳類で研究されており, 昼行性の動物の血中 F 濃度は早朝に高く夕刻低くなるという日周リズムを刻むことが知られている (Weitzmon *et al.*, 1971; Knutsson *et al.*, 1997; Czeisler and Klerman, 1999; Garrick, *et al.*, 1987; Carnes, *et al.*, 1988; Samya *et al.*, 1995; Hudson *et al.*, 1975; Fulkerson *et al.*, 1980; Thun *et al.*, 1981; Lefcourt *et al.*, 1993; Hoffsis *et al.*, 1970; Irvine and Alexander, 1994; Edqvist *et al.*, 1980; Klemcke *et al.*, 1989; Toutain,

et al., 1988). 鯨類においては, Judd and Ridgway (1977) がバンドウイルカにおける血中 F 濃度およびアンドロゲン濃度の日周および超日リズムを測定しているが, 彼らはイルカを 24 時間担架により保定した状態で採血を行っており, 個体にストレスがかかることは否めず, F 濃度の変動が普遍的な日周変動を示しているとは言い難い. そこで, 本論文第 2 章第 3 節において, 長期飼育されているミナミバンドウイルカ *Tursiops aduncus* およびシャチ *Orcinus orca* を対象として尾びれ持ち採血により 3 時間ごと 24 時間繰り返し採血を行ない, 血清中 F 濃度の日周変動を調べた.

血中 F 濃度の年周変動についても様々な哺乳類で報告がある (Agrimonti *et al.*, 1982; Maes *et al.*, 1997; Gustafson and Belt, 1981; Wilson *et al.*, 1978; Shiml *et al.*, 1999). 鯨類においては, 飼育下の黒海産のバンドウイルカおよびシロイルカ (Orlov *et al.*, 1988) の血中 F 濃度において, 春と秋の比較が行なわれ, 春の方が高いという結果が報告された. また, 野生および半飼育下各々 36 頭のバンドウイルカにおいて, 季節ごとの F 濃度は野生個体の方が飼育個体より高いのみで, 年齢や季節による差はないと報告されている (St. Aubin *et al.*, 1996). しかし, これらは季節ごとの変化を追ったのみであり, 同一個体より年間を通じて定期的に採血を行なった研究はない. そこで本論文第 2 章第 4 節において, シャチを対象に 2 週間ごとに 1 年間, 朝夕に尾びれ持ち採血を行ない, 血清中 F 濃度の年周変動を調べた. これらの基礎知見をもとに, 本論文第 2 章第 5 節においては, シワイルカ *Steno bredanensis*, シャチ, シロイルカおよびバンドウイルカを対象として水族館への搬入後の時間経過に伴う F 濃度の変動を追跡し, 野生個体の水族館への馴化の様子を追跡した.

副腎皮質で産生される中間代謝物質の一種であり, F の前駆体である

21-deoxycortisol (21-DOF) は、陸上哺乳類の血中にはほとんど存在しないことが知られている (MacArthur and O'Donnell, 1967, Horn and Maschler, 1976). 本研究において、RIA 法による鯨類の血清中 F 濃度測定法を確立する際に、21-DOF と 100%交差反応性を示す F 抗体を使用したところ、鯨類の血清中には 21-DOF が F と匹敵する濃度で含まれている可能性が示された。そこで、第 3 章では 21-DOF について、数鯨種の血清中濃度を調べ、さらに野生と飼育個体との間で血清中濃度を比較し、さらに搬入後からの時間経過に伴う濃度変化について調べた。

第1章

副腎皮質ホルモン代謝

陸上哺乳類の副腎皮質においては複数の副腎皮質ホルモン（コルチコイド）が生合成されることが知られている。コルチコイドはステロイド骨格をもち、cortisol (F) や corticosterone (B) などの糖質コルチコイド、aldosterone (Aldo) などの鉱質コルチコイド、および dehydroepiandrosterone (DHA) や androstenedione (A) などの副腎アンドロゲンの3つに大別される (Brooks, 1979)。また、コルチコイド代謝には多くの酵素が関与しており (Miller, 1988)、各ホルモンの合成量は生合成経路における各酵素の活性に影響を受ける。

鯨類の副腎皮質中のホルモンに関しては、マッコウクジラで球状層、索状層、および網状層の各々における大まかなホルモン含有量が示されたのみである (Race and Wu, 1961)。鯨類のコルチコイド代謝に関しては、座礁した鯨類の副腎皮質で B が最終産物として多く産生され、F は産生されなかったという報告があるが (Carballeira *et al.*, 1987a)、座礁個体での実験結果が普遍的であるとは言い難い。血中のコルチコイドに関しては、バンドウイルカの血中 F と B 濃度比について報告があるが、どちらが多いかについての一致した見解はない (Thomson and Geraci, 1986 ; Ortiz and Worthy, 2000)。上記のように、鯨類においては、生合成され分泌されるコルチコイドの種類について一致した見解がない。そこで本章では、鯨類の副腎皮質で生合成されるコルチコイドについて調べるため、クロミンククジラの副腎皮質を用いて ^{14}C -pregnenolone (^{14}C -Preg), ^{14}C -progesterone

(¹⁴C-P) および ¹⁴C-17-hydroxyprogesterone (¹⁴C-17-OHP) を基質とした代謝実験を行なった。

第 1 節

¹⁴C-Pregnenolone の代謝

Preg は cholesterol の側鎖が切断されて生じる物質であり, 陸上哺乳類の副腎皮質では必ず合成され, また, 全てのコルチコイドは Preg を経て生合成されることが知られている. したがって, ¹⁴C-Preg から生じるコルチコイドを調べることで, その個体の副腎皮質で生合成されるコルチコイドが明らかにすることができる. そこで, クロミンクジラの副腎皮質 cell free homogenate (CFH) に ¹⁴C-Preg を加えて培養を行ない, ¹⁴C-Preg が代謝されて生じるコルチコイドの種類を調べた.

材料と方法

試料

財団法人日本鯨類研究所が実施した「1999/2000 年南半球産ミンククジラ調査及び南極海生態系に関する予備調査」において, 2000 年 3 月に捕獲されたクロミンククジラ 11 頭より (オス 5 頭, メス 6 頭, 体長 583~916cm, 体重 2.25~9.95t) 捕獲調査母船上で採取された副腎を用いた. 個体が死亡してから副腎を採取するまでに要した時間は 54~231 分である. 採取した副腎は, 結合組織を除去して重量を測定後, 5mm 程度の厚さに輪切りにし, ビニール袋に個々の試料を入れ空気に触れぬように密封して, -80°C 冷凍庫で凍結保存した. 下船後, -85°C 冷凍庫に移し, 実験まで保存した. 得られた全ての副腎は, 新鮮な肉色をしていた.

試料調製

副腎試料を随時必要量だけ急速に解凍し, 氷冷下で結合組織を完全に除去後,

肉眼で皮質と髄質とに分離した。次に、皮質のみを解剖バサミで細断し、計量後、テフロンガラスホモジナイザーに移した。これに 100mg tissue/mL medium になるように培養液 (Leibovitz's L-15 Medium, Powder with L-glutamine, Life Technologies を蒸留水で溶解) を加え、氷冷下でホモジナイズした。得られた液体を 10mL ポリエチレンチューブに移し、冷却遠心分離器で 20 分間、4°C, 800g の条件で遠心分離した。上清を回収して CFH とし、液体窒素中もしくは -85°C 冷凍庫で代謝実験まで凍結保存した。

代謝実験

準備した CFH を必要量解凍し、等量の培養液を加えて 5mg protein/mL medium に調製し、これをホルモン代謝実験に使用した。まず、蓋付きガラスバイアル (50mL) にプロピレングリコールを 1, 2 滴垂らし、ここに前駆体として約 10 万 dpm 相当量の ^{14}C -pregnenolone を入れ、よく馴染ませた。これに、培養液 3mL, 1mg/mL medium に調製した必要な補酵素 (β -Nicotinamide-Adenine-Dinucleotide-Phosphate, reduced form : NADPH^+ , β -Nicotinamide-Adenine-Dinucleotide : NAD , 共に Sigma) を共に 1mL および 5mg protein/mL medium に調製した CFH を 1mL 各々加え、軽く蓋をして 60 分間振蕩した。振蕩後、15mL のジクロロメタンを加え、1 分間激しく振蕩してステロイドを抽出した。小型の漏斗にガラスウールで軽く栓をし、その上に少量の無水硫酸ナトリウムをのせてナスフラスコ上に置き、これにジクロロメタン層を漏斗に滴下した。この抽出作業を 2 回行ない、回収されたジクロロメタン層をロータリーエバポレーターにより蒸発させた。これに 5mL のジクロロメタンを加えて化合物残渣を溶解させ、その 100 μL を測定用バイアルに移し、ドラフト内で乾燥後、シンチレーターを加えて液体シンチレーション

ンカウンターにより放射活性量 (dpm) を測定し、これを 50 倍したものを総放射活性量とした。

薄層クロマトグラフィー

ナスフラスコに残ったジクロロメタンを再度ロータリーエバポレーターで蒸発させた後、数種のステロイド、すなわち、Preg, P, 17-OHP, S, 21-DOC, F, B, 11-deoxycortisol (S), A, testosterone (T) の 1mg/mL 溶液混合液を 20 μ L 滴下し、これに少量のジクロロメタンを加えて溶解させ、これを 5cm \times 20cm の薄層 (silica gel 60F254, Merck) 上にスポットした。代謝物を薄層上にのせた後のフラスコを少量のジクロロメタンで洗浄し、洗液をバイアルに取る操作を 3 度繰り返し、フラスコ内に残っている放射活性量を測定した。総放射活性量からこの残り分を引いた値を薄層上に滴下された物質の放射活性量とした。薄層を完全に乾燥させた後、クロロホルム：アセトン=9：1 の溶媒系で 60 分間展開した。

展開後、薄層に UV を照射し、吸収の見られた位置に鉛筆で印をつけ、これを X 線フィルムと共にカセットに入れ、 -20°C 冷凍庫にて 1 週間静置した。1 週間後暗室にてフィルムの現像を行ない、UV 吸収の見られた位置と合成されたステロイドの位置とを照合した。

再結晶法によるステロイド同定

薄層クロマトグラフィーで分離した各ステロイドの標準物質と同じ位置に見られた放射性化合物が、その標準物質と同一物質であるか否かを確認するため、再結晶法を行なった。再結晶法とは、既知の標準物質と放射性化合物とを混ぜて溶解・析出を繰り返した時に、両者が同一物質であれば放射性化合物も結晶構造に

組み込まれ、放射性物質が標準物質と同じ動向を示すため両者が同一であると判断できる方法である。まず、目的の放射性化合物を薄層より掻き取り、薬包紙上で微細に砕き、ガラスウールを先に詰めたパスツールピペットに移した。次に、パスツールピペットにクロロホルム：メタノール=1：1 を 1mL 滴下し、流出液をナス型フラスコに回収した。この操作を 5 回繰り返して、放射性化合物を抽出した。抽出液をロータリーエバポレーターで蒸発させ、残渣にジエチルエーテルを 5mL 加えて溶解させたものを 100 μ L 取り、その放射活性量を測定し、これを 50 倍して化合物全体の総放射活性量とした。

次に、10mg の標準物質を入れたスピッツ管と、乾燥させ微量天秤で精秤した No.1~11 までの 11 個の小型アルミ容器を用意し、再結晶法を行なった。まず、標準物質の入ったスピッツ管に、放射性化合物のジエチルエーテル溶液を任意量加えた。ジエチルエーテルを窒素ガス吹き付けにより蒸発させた後、1mL のジエチルエーテルを加え、このうち 100 μ L を No.11 の小型アルミ容器に移し、この放射活性量を全体の 1/10 の放射活性量とした。残ったジエチルエーテルを蒸発させ、残渣が溶けやすい溶媒（クロロホルム、アセトン、ベンゼンを適宜使用）を数滴加えた後、溶けにくい溶媒（ヘキサン、ヘプタンを適宜使用）を適量加え、結晶を析出させた。これを 4 $^{\circ}$ C、3000rpm の条件で 5 分間遠心分離し、上清を No.1 へ移した。残った結晶に 0.9mL のジエチルエーテルを加えて溶解し、この溶液を 100 μ L 取り No.2 へ移した。再度残りのジエチルエーテルを蒸発させ、残渣を溶かしやすい溶媒を数滴加えて溶解させた後、溶けにくい溶媒を適量加えて結晶を析出させ、これを遠心分離して上清を No.3 へ移した。残った結晶に 0.7mL のジエチルエーテルを加えて溶解させ、これを 100 μ L 取り No.4 へ移した。以下同様の操作を順次繰り返したが、No.5 の結晶には 0.5mL、No.7 の結晶には 0.3mL のジエ

チルエーテルを各々加え、100 μ L を No.6, No.8 へ移した。No.9 の結晶には任意量のジエチルエーテルを加えて、よく洗浄しながら No.10 へ全て移した。小型アルミ容器中の溶媒をドラフト内で完全に蒸発させ、乾燥させて精秤した後、各々の小型容器中残渣をメタノールで洗浄しながらバイアルに移し、これを乾燥させ、標準物質の放射活性を測定した。各放射活性量を再結晶後の小型アルミ容器重量から本体の重量を引いた値で割り、重量あたりの放射活性量を求め、その値が変動するか否かを確認し、変動しない場合を標準物質と同一物質であると同定した。

結果と考察

NAD⁺および NADPH⁺の存在下で、クロミンククジラの副腎皮質の CFH に ¹⁴C-Preg を加えて培養し、生じた代謝産物の再結晶法による同定された物質を Table1-1 に、また、各代謝合成産物の割合を Table 1-2 に示した。

この結果、P (合成割合 10.7%, Rf=0.76) の合成が最も多く、したがって、Preg \rightarrow P の変換を触媒する 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase Δ^5 - Δ^4 isomerase (3 β HSD Isom) の作用が強く P 合成が進んだものと推察された。

P に続き、S (10.2%, Rf=0.22) の合成が多く見られた。一方、17-OHP (1.1%, Rf=0.47) や F (3.2%, Rf=0.07) の合成量は少なく、P が steroid 17 α -hydroxylase (P450c17)の作用を受けて 17-OHP へと変換された後、17-OHP は直ちに steroid 21-hydroxylase (P450c21) の作用を受けて S に変換されたが、S \rightarrow F の変換を触媒する steroid 11-hydroxylase (P450c11) の一定時間内での作用は P450c21 に比べて弱く、その結果 S 量が増加したものと推測された。さらに少量ではあるが 21-DOF も確認され (0.2%, Rf=0.17), 17-OHP のごく一部が P450c11 の作用を受けて

21-DOFに変換されたものと考えられた。

Hydroxycorticosterone (DOC ; Rf=0.50) および B (2.8%, Rf=0.12) の合成量より, 17-OHP→S→F の代謝経路と同じく, P→DOC の変換を触媒する P450c21 の作用が DOC→B の変換を触媒する P450c11 の作用と比べて強いものと推測された。

さらに, A (4.0%, Rf=0.67) の合成が確認されたことから, 合成された 17-OHP の一部が P450c17 の作用を受けて A 合成経路へと進んだことが判明した。また, この他に少なくとも 10 種以上の少量のステロイド合成が認められたが, 再結晶法により同定するには量が不足しており, 同定には至らなかった。

上記結果をもとに Preg の代謝経路を Fig.1-1 に図示した。哺乳類における研究より, Preg から P への変換が進み, P から 17-OHP→S→F の経路および P から DOC→B の経路, さらに P から 17-OHP→A の経路の各々に分岐し合成が進んだものと考えられた。

Carballeira *et al.* (1987a, 1987b) は, 座礁したコマッコウおよびジェルヴェオウギハクジラの副腎を用いてコルチコイドの代謝実験を行ない, 基質としたステロイドの種類に関らず B が多く合成され, F は合成されないと述べている。しかし, 本実験により, クロミンククジラにおいては Preg を基質とした場合, B と F はほぼ同量合成されることが確認された。また, F の前駆体である S が全個体において極めて多く合成されているため, 培養時間をさらに延長すれば, 多くの F が合成されてくるものと考えられた。

第2節

¹⁴C-Progesterone 代謝

Pは Preg を前駆体とするステロイドであり、妊娠維持ホルモンとして知られている。また P は、陸上哺乳類の副腎皮質では Preg と同じく必ず生合成され、全てのコルチコイドは P を経て合成される。前節において Preg から代謝される数種のコルチコイドを確認したが、P など Preg から生じる代謝産物を基質とした場合に、代謝されるコルチコイドの合成量を比較することで各酵素の活性の強さについて調べることができる。そこで本節では、クロミンククジラの副腎皮質を用いて ¹⁴C-P の代謝実験を行なった。

材料と方法

副腎試料、試料調製、代謝実験および再結晶は本章第1節で記した方法と同様に行なった。但し、代謝実験では、基質として約 10 万 dpm の ¹⁴C-P を用い、また、NADPH⁺ 要求性の酵素が P からのコルチコイド生合成に関与しないため、培養を NAD⁺ のみの存在下で行なった。

結果と考察

NAD⁺ 存在下で、クロミンククジラの副腎皮質の CFH に ¹⁴C-P を加えて培養し、生じた代謝産物およびその割合を Table 1-3 に示し、さらに P の代謝経路を Fig.1-2 に示した。

これによれば、¹⁴C-P の代謝産物として DOC (合成割合 33.7%) が最も多く合

成され、B (11.7%) も多く合成された (Table 1-3)。この結果は、基質である P の大部分が P450c21 の強い作用を受けて DOC へ変換され、DOC が P450c11 の作用を受けてさらに B に変換されたことを示している。S (15.8%) の合成も多く認められたが、その合成量は DOC の半分であり、また、17-OHP (2.2%) や F (1.6%) の量はわずかであった。これらの結果は、P から 17-OHP への変換を触媒する P450c17 の作用が P450c21 よりも弱く、P は最初に 17-OHP よりも DOC へと多く流れた結果、17-OHP→S→F の経路を進む量が相対的に少なくなったことを示している。また、P から変換された 17-OHP は、P450c21 の作用を受けて速やかに S に移行したが、P450c11 の作用が P450c21 に比べて弱かったために F への変換が迅速には進まず、S に比べて 17-OHP および F の合成が少なくなったものと推測された。さらに、その他多くの代謝産物が認められたが、量が少なく同定には至らなかった。

第3節

¹⁴C-17-Hydroxyprogesterone 代謝

17-OHP は P のステロイド骨格の C17 部位が OH 化されて生じる代謝産物である。17-OHP は S の前駆体であるため、これを基質とした場合、S、F および副腎アンドロゲンが代謝合成されるが、DOC や B は合成されない。したがって、17-OHP から代謝されるコルチコイドの量を比較することで、17-OHP から F 合成までに関与する P450c21 や P450c11 などの酵素活性の強さについて調べることができる。そこで本節では、クロミンククジラの副腎皮質を用いて ¹⁴C-17-OHP の代謝実験を行なった。

材料と方法

副腎試料、試料調製、代謝実験および再結晶は本章第 1 節で記した方法と同様に行なった。但し、代謝実験では、基質として約 10 万 dpm の ¹⁴C-17-OHP を用い、また培養は、NADPH⁺ 要求性の酵素が P からのコルチコイドに関与しないため、NAD⁺ のみの存在下で行なった。

結果と考察

NAD⁺ の存在下で ¹⁴C-17-OHP の副腎皮質における代謝実験を行なった結果を Table 1-4 および Fig. 1-3 に示した。今回の実験では、¹⁴C-17-OHP 基質のほぼ半分がそのすぐ下位の代謝産物である S (55.5%, Table 1-4) に変換されたことになる。さらに代謝経路上で S の次の代謝物である F (8.3%) の合成も認められたが、そ

の合成量は S と比べて少なかった。この結果は、17-OHP→S への転換を触媒する P450c21 の作用が S→F の変換を触媒する P450c11 の作用よりも強く、P450c11 の作用が F 合成の律速段階となっていることを示している (Fig.1-3)。本章第 1, 2 節の各々においても、P450c21 の作用が P450c11 よりも大きいことが示されており、本実験で得られた結果はこれらの結果を支持するものとなった。また、17-OHP の次の代謝物である 21-DOF の合成も認められたがその量はわずか (0.8%) であった。

さらに、副腎アンドロゲンである A (2.8%) の合成も認められた (Table 1-4)。これは、17-OHP が P450c17 の作用を受けて A に変換されたことを示している。これらの結果は、本章第 1 節において ^{14}C -Preg より S, F, A が代謝合成された事実を支持するものとなった。合成された A 量は S や F と比較して少なく、また、他の副腎アンドロゲンがほとんど確認されなかったことから、P450c17 よりも P450c21 や P450c11 の活性が強く、17-OHP は S→F の経路へとより多く代謝されることが判明した。

Carballeira *et al.* (1987a) は、座礁したコマッコウおよびジェルヴェオウギハクジラ副腎におけるコルチコイドの *in vitro* での代謝実験において様々な基質を代謝させているが、その種類に関らず、B が最終産物として合成され、F は産生されなかったと述べている。しかし、本章で得られた結果は彼らの結果とは異なり、 ^{14}C -Preg の代謝では F と B がほぼ同量合成されることが判明した。この結果が座礁した個体と捕獲直後の新鮮個体という動物の置かれていた環境の違いによるものか、鯨種の違いによるものなのかは不明であるが、本実験により、鯨類の副腎で始めて F の合成が直接的に証明された。また、バンドウイルカ血中のコルチコイドについて、Thomson and Geraci (1986) は F : B 比が 5 : 1 であったと述べ、

反対に Oritz and Worthy (2000) は、B : F の比が 4.7 : 1 であるという逆の報告をしており、どのような種類のコルチコイドが生合成され分泌されるのかについての一致した見解はない。今回得られた結果より、生理的条件によってその比が変化する可能性があるが、少なくともクロミンククジラの副腎では F と B の合成量はほぼ等しく、血中にほぼ同量分泌されるのではないかと推測された。

第2章

血清中 cortisol 濃度

Cortisol (F) は分子量 362.47 のステロイド骨格をもつ物質であり、代表的な糖質コルチコイドである。ヒトにおいては、血中に分泌された F の 92% はステロイド結合タンパク質と結合し、残りの 8% が遊離の状態が存在していること、および血中 F 濃度は朝高く (50~150ng/mL) 夕方低い (0~100ng/mL) という日周変動を示すことが知られている。また、F はストレスに応じて分泌されるため「ストレスホルモン」とも呼ばれ、その変動を知ることは飼育環境下などで動物の状態を把握するための有効な手段となると考えられている。

鯨類の F 濃度に関しては、個体にストレスがかかると考えられる状況で採取された血液中の F 濃度に関する報告はいくつかあるが、それらの多くは平常時の F 濃度に留意していない。まず、座礁したナガスクジラについて、血中 F 濃度が 13~40nmol/L (4.7~14.5ng/mL) であり、ヒトに比べて 1/15、家畜動物と比べても 1/2 と低いためにストレス反応を示していないとの報告がある (Kjeld and Ólafsson, 1987; Kjeld and Theodorsdottir, 1991)。しかし、これらの報告は、平常時のナガスクジラの F 濃度について全く考慮していない。また、数種の鯨類について、捕獲や保定のストレスが血中 F 濃度に及ぼす影響を調べた報告はいくつかあるが (Orlov *et al.*, 1988; St. Aubin and Geraci, 1992; Koopman *et al.*, 1995; Ortiz and Worthy, 2000)、これらの報告においても各鯨種の平均血中 F 濃度や平常時の濃度については考慮されておらず、かつ報告間で測定値にばらつきが見られることか

ら、F 濃度の高低や変動について議論できない状態にある。そこで、本章第 1 節において、まず 15 鯨種の平均血清中 F 濃度を調べた。また、第 1 節の結果より個体の体サイズと F 濃度との間に負の相関が認められたため、第 2 節ではこれについてさらに詳しく調べることにした。

鯨類における血中 F 濃度の日周変動については、唯一 Judd and Ridgway (1977) がバンドウイルカを保定したまま日周変動を測定し、成熟個体と若齢個体とで異なる変動を示すことを報告しているが、保定した状態での採血が個体にストレスをかける可能性は高く、普遍的な結果とは言い難い。そこで本章第 3 節では、ミナミバンドウイルカおよびシャチを対象として尾びれ持ち採血による 3 時間おき 24 時間繰り返し採血を行ない、血清中 F 濃度の日周変動を調べた。なお、ストレスのより少ない状態で採血できる点を考慮し、尾びれ持ち採血方法を採用した。

陸上哺乳類において、血中 F 濃度が気温などの環境要因や内因的な生理状態(妊娠や冬眠など)の変化に伴い年周変動を示すという報告がある。鯨類においては、バンドウイルカおよびシロイルカについて、季節ごとに平均 F 濃度を比較した報告があるが (Orlov *et al.*, 1988 ; St. Aubin *et al.*, 1996)、統一した見解は得られていない。また、年間を通じて定期的に採血を行なった研究はない。そこで本章第 4 節では、シャチを対象に 2 週間ごとに 1 年間、朝夕に尾びれ持ち採血を行ない、血清中 F 濃度の年周変動を調べた。

また、本章第 5 節において、シワハイルカを対象に水族館への搬入後の時間経過に伴う血清中 F 濃度の変動を日周変動に留意しながら追跡した。さらに、水族館への搬入後、数年間にわたり採血を行なったシャチ、シロイルカ、バンドウイルカについて、その血清中 F 濃度を測定した。

第1節

平均血清中 cortisol 濃度

血中のステロイドホルモン濃度の測定法としては、High Performance Liquid Chromatography (HPLC), Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS), Radioimmunoassay (RIA) 法などいくつか挙げられるが、微量なステロイドを測定する際には、精度が高く一度に多数の試料を測定できる RIA 法がよく用いられている。本節では、各鯨種の平均 F 濃度を求めることを目的として、RIA 法を用いて鯨類の血清中 F 濃度を測定した。

材料と方法

試料

15 鯨種 (計 1,351 検体), すなわち千葉県鴨川シーワールドの飼育鯨種であるアマゾンカワイルカ *Inia geoffrensis*, イロワケイルカ *Cephalorhynchus commersonii*, バンドウイルカ *Tursiops truncatus*, カマイルカ *Lagenorhynchus obliquidens*, シャチ *Orcinus orca*, オキゴンドウ *Pseudorca crassidens*, ハナゴンドウ *Grampus griseus*, コビレゴンドウ *Globicephala macrorhynchus*, ネズミイルカ *Phocoena phocoena*, シロイルカ *Delphinapterus leucas*, コマッコウ *Kogia breviceps*, オガワコマッコウ *Kogia sima* および 1986/87 年に水産庁北洋イルカ資源調査においてイシイルカ専門調査船により突きん棒漁法で捕獲されたイシイルカ *Phocoenoides dalli*, 和歌山県太地町におけるイルカ追込漁業により 1984 年に捕獲されたコビレゴンドウおよびスジイルカ *Stenella coeruleoalba*, (財)日本鯨類研究所が実施した「1989/1990

期南氷洋産ミンククジラ捕獲調査」により捕獲されたクロミンククジラ *Balaenoptera bonaerensis* を対象として、各々の血清 F 濃度を RIA 法により測定した。採取した血液は、室温で遠心分離もしくは数時間静置して上清を回収し、この血清を冷凍庫で実験まで保存した。なお、上記試料の測定数を Table 2-1 に示した。

RIA 法による血清中 F 濃度測定

RIA 法による血清中の cortisol 濃度測定は、Aida *et al.* (1984) の方法を改変して行なった。氷冷した 180 μ L の 0.1% gel-PBS (0.2mM phosphate buffered saline, pH7.5, containing 0.1% gelatin, 0.14M NaCl, 0.1% NaN₃) を入れた試験管に各鯨類の血清 20 μ L を加え、全体で 200 μ L とした。これに 2mL のジエチルエーテルを加え、室温でダイレクトミキサーにより 5 分間振蕩した後、-80°C の冷凍庫に 15 分間静置して水層を凍結させ、エーテル層のみをデカンテーションにより試験管に移した。再度 2mL のジエチルエーテルを加え、同様の操作を行なった。回収したエーテル層を遠心エバポレーターで乾固させた後、200 μ L の 0.1% gel-PBS を加えて溶解した。これに 100 μ L の ³H-labeled cortisol ([1,2,6,7³H (N)]-hydrocortisone, Du Pont/NEN Research Products) と 200 μ L の F 抗体を加え、4°C 冷蔵庫中で 1 晩培養した。抗体は、Cosmo-Bio 社の FKA404 (cortisol-3-O-carboxymethyl-oxime-BSA をウサギに投与し作製した抗体) の粉末を 4mL の蒸留水に溶解し、この 1mL に EDTA-PBS (0.01M phosphate buffered saline, pH7.5, 0.14M NaCl, 0.05M EDTA and 0.1%NaN₃) を 124mL 加えたものを使用した。培養後、250 μ L の dextran-charcoal mixture (5g of Norit-A and 0.5g of Dextran T-70 in 1000mL of PBS) を加え、ダイレクトミキサーで軽く振蕩し、20 分間氷冷しながら静置した。静置後、3,000rpm,

4°Cで15分間遠心分離し、上清をバイアルに移し、これに3mLのシンチレーター（8g Omnifour, Packard を4L トルエンに溶解）を加え、³Hの放射活性を液体シンチレーションカウンターで測定した。

Fig. 2-1 にオガワコマッコウを除く14鯨種の血清希釈曲線を示した。標準曲線と各鯨類の血清希釈液による競合曲線との平行性の検定は、2×2点法により行なった。標準曲線は0.078~10ng/mLの8点で作成し、全ての鯨種の血清希釈曲線と標準曲線との間には平行性が認められた。また、「B0の放射活性量」に対する「B0の放射活性量の標準偏差の2倍」の割合をS(%)として、標準曲線におけるB/B0(³H-FとF抗体とのBinding/非標識抗体が含まれていない時の³H-Fと抗体のBinding, %)の100%からSを引いた点を示す濃度をアッセイの最小検出限界として求めた結果、0.039ng/mLであった。アッセイ内変動およびアッセイ間変動を、代表としてシャチの血清を用いて測定した結果、各々1.9%および3.2%(共にn=5×3組間での変動)、回収率は90%であった。

抗体の反応特異性についての確認

各鯨種の200μLの血清に200μLの0.1% gel-PBSを加え、これに2mLのジエチルエーテルを入れダイレクトミキサーで5分間攪拌した。攪拌後、-80°C冷凍庫に10~15分間入れて水層を凍結させ、凍結しない上層のエーテル層のみをデカンテーションにより試験管に移した。この抽出操作を2度繰り返し、回収したエーテル層を遠心エバポレーターで乾固させた後、200μLの0.1% gel-PBSで溶解した。

次に、5mLの100%メタノールでconditioningし、さらに5mLの0.1% gel-PBSで洗浄したSep-Pak C18カートリッジ(Waters)を用意し、これに先ほど溶解した

200 μ L の抽出液を滴下した。まず、5mL の 0.1% gel-PBS で水溶性物質を洗い流し、カートリッジに残存しているステロイドを 5mL の 100% メタノールで回収した。³H-cortisol を用いて測定した Sep-Pak C18 における回収率は 85.9%であった。回収した液体を凍結乾燥器により乾固させ、200 μ L の 50% メタノールで溶解し、これを液体クロマトグラフィー用フィルター (Ekicrodisc Acro LC, Gelman Science) でろ過し、HPLC 用溶液とした。

次に、HPLC による分離精製を行なった。逆層カラム (Wakosil-II 5C18-HG, 4.6mm \times 250mm, Wako) を用い、9 種類の副腎皮質ホルモン (全て Sigma), すなわち Aldo, cortisone, 18-hydroxycorticosterone, F, 18-hydroxydeoxy-corticosterone, 21-DOF, S, B および DOC を分離可能な条件 (50%メタノール, flow rate:1.0mL/min) に設定した HPLC (Hitachi, L6200 intelligent pump, L5020 oven, L4000 UV detector, D2500 chromato-integrator) に付し、1 分ごとに 40 画分に分離し回収した。標準物質のピークは UV240nm で検出した。各副腎皮質ホルモン標準物質の保持時間は、aldosterone の 7.69 ± 0.27 分から DOC の 35.16 ± 2.24 分におよび、代表的なものとしては F が 11.19 ± 0.47 分、21-DOF は 15.83 ± 0.78 分、S は 18.39 ± 0.93 分、B は 20.09 ± 1.09 分であった。FKA404 抗体を用いて、各鯨種の血清を上記の通り HPLC で分離した全画分で F として測定された濃度の総和に対する、F 画分 (11.19 ± 0.47 分) 中の F 濃度の割合を測定した結果を Table 2-2 に示す。また、一例として、ネズミイルカについて、HPLC の保持時間を横軸に、全 F 濃度に対する各画分の F 濃度の割合を縦軸にとったものを Fig. 2-2 に示した。この結果、全画分で F として測定された濃度に対して F 画分の占める割合が 70.5~100%と高い割合を示しており (平均 93.1%), FKA404 抗体は、F に対する反応特異性が高く、F 濃度の RIA 法による測定に適していることが証明された。したがって、本研究では、

FKA404 抗体を用いて F 濃度を測定することとした。

結果と考察

各鯨種の平均 F 濃度 (平均±標準偏差), 中央値および範囲を Table 2-1 に示す。これによれば, 15 鯨種の平均 F 濃度はシャチの $2.9 \pm 2.9 \text{ng/mL}$ (中央値 2.0ng/mL) からスジイルカの $39.9 \pm 14.3 \text{ng/mL}$ (中央値 25.2ng/mL) まで広範囲にわたることが判明した。また, どの鯨種においても, 平均値と中央値とはよく一致していた。

平均 F 濃度の低い鯨種としてはシャチやクロミンククジラ ($3.5 \pm 3.2 \text{ng/mL}$), シロイルカ ($6.8 \pm 5.4 \text{ng/mL}$) など, 今回測定した中では比較的大型な鯨類が多く, また濃度の高いものとしてはスジイルカを始めとしてイロワケイルカ ($34.7 \pm 17.1 \text{ng/mL}$), カマイルカ ($28.9 \pm 20.7 \text{ng/mL}$) など比較的小さな鯨類が多く認められた。

そこで, 測定された 15 鯨種の血清 F 濃度と体サイズとの相関関係を調べるため, 縦軸に F 濃度を, 横軸に体サイズとして各鯨種の平均体長の 3 乗の対数 (log) を取り, 各々の鯨種について平均値をプロットした (Fig. 2-3)。その結果, F 濃度を y , 体長の 3 乗を x として $y = -10.664x + 95.339$ ($r^2 = 0.31$) の回帰直線が得られ, 両者の間に有意な負の相関関係が認められた ($p < 0.05$)。次に, 15 鯨種の中から野生個体であるクロミンククジラ, イシイルカ, コビレゴンドウ (野生) を除いた飼育個体のみ 13 鯨種において, 同様に F 濃度と体サイズ (飼育個体は体重の対数を使用) との相関関係を調べたところ (Fig. 2-4), 両者の間には $y = -17.958x + 61.738$ ($r^2 = 0.68$) の回帰直線が得られ, より強い負の相関関係が認められた ($p < 0.01$)。

過去に報告された鯨類の F 濃度と今回測定した濃度を比較すると, まずバンド

ウイルカについては、本研究で得た平均値は $11.0 \pm 9.2 \text{ ng/mL}$ ($n=230$) であり、Medway *et al.* (1970) の報告したバンドウイルカの血中 F 濃度 ($17 \sim 30 \text{ ng/mL}$) や、Orlov *et al.* (1988) が報告した黒海産バンドウイルカの血中 F 濃度 (春 $-32.7 \pm 2.5 \text{ mg/mL}$, 秋 $-23.5 \pm 3.9 \text{ ng/mL}$)、Ortiz and Worthy (2000) の報告したバンドウイルカの F 濃度 ($28 \pm 10 \text{ ng/mL}$) などに比べて半分以下の低い値となった。但し、Thomson and Geraci (1986) により報告されたバンドウイルカの安静時血中 F 濃度 (10.9 ng/mL) と同様の値であった。シロイルカにおいても同様に、本研究で得られた平均濃度 ($n=82$) は $6.8 \pm 5.4 \text{ ng/mL}$ であり、Orlov *et al.* (1988) が報告したシロイルカの F 濃度 (春 $-29.9 \pm 6.5 \text{ ng/mL}$, 秋 $-21.5 \pm 4.2 \text{ ng/mL}$) に比べて極めて低い値となった。また、クロミンククジラの平均 F 濃度は $3.5 \pm 3.2 \text{ ng/mL}$ であり、同じヒゲクジラ類のナガスクジラにおいて報告された $4.7 \sim 14.5 \text{ ng/mL}$ という血中 F 濃度 (Kjeld and Ólafsson, 1987 ; Kjeld and Theodorsdottir, 1991) に比べてやや低い値が得られた。今回得られた F 濃度のうち、既存の報告と比べて低い値を示した飼育個体については、搬入直後の個体の血液も混在しているものの、長期飼育されている健康な個体や尾びれ持ち採血をされた個体の血液が多く混ざっていることを反映した結果であると考えられる。すなわち、本実験で得られた F 濃度はこれらの鯨種における安静時の F 濃度に近い値であると考えられる。野生個体については捕獲方法や追尾時間などが F 濃度に影響していると考えられるが、今回の実験ではそれらの情報が十分には得られなかった。今後、捕獲に関するそれらの情報を把握した試料を増やし、野生個体の F 濃度について検討していく必要がある。

第2節

体サイズと血清中 cortisol 濃度

第1節において、入手可能な15種鯨の血清を用いて血清F濃度を測定したところ、各鯨種の平均F濃度はシャチの2.9 ng/mLからスジイルカの39.9 ng/mLまでの広範囲にわたり、また、種間で濃度と体サイズとの間に負の相関関係が認められた。しかし、この実験に使用した試料は採血時刻や個体の成熟段階、飼育状態などに配慮しておらず、体サイズとF濃度との相関についての正確な情報を得るためには厳密な実験を行なう必要がある。そこで、長期飼育されている健康な個体において、採血時刻や成熟段階、採血方法などに留意した上で実験を行ない、F濃度と体サイズとの負の相関関係を確認した。

材料と方法

1997および1998年に、鴨川シーワールドで長期飼育中の健康で成熟している5種鯨、すなわちシャチ（メス、オス各1頭）、シロイルカ（メス、オス各1頭）、バンドウイルカ（メスオス各1頭）、カマイルカ（オス1頭）、イロワケイルカ（オス1頭）より、09～10時の間に尾びれ持ち採血を行ない、その後適当な間隔をあけて1ヶ月間に採血を5回行なった。また、1998年7月に国営沖縄記念公園水族館で飼育されているミナミバンドウイルカ *Tursiops aduncus*（オス4頭、メス1頭）、オキゴンドウ（メス、オス各1頭）も同じく09～10時の間に尾びれ持ち採血を行ない、これを適当な間隔を開けて5回行なった。

得られた血清中のF濃度をRIA法により測定し（本章第1節参照）、また、採

血日前後に測定された体重の値をもとに、個体間の F 濃度と体重（体サイズ）との相関関係の有無を各園館ごとに調べた。

結果と考察

Fig. 2-5 に鴨川シーワールドの飼育個体における血清 F 濃度と体重の対数との相関を示す。全個体の結果としては、体サイズが大きくなるにつれて F 濃度が低くなる傾向は見られたものの ($y = -2.606x + 11.688$, $r^2 = 0.28$)、有意な相関は認められなかった。Fig. 2-5 を見ると、オスのシロイルカの値が濃度の高い方向へ大きく外れており、この値が全体の相関を弱めているものと考えられた。さらに、他のどの個体にも見られなかったが、このオスのシロイルカのみにおいて、本実験の 5 試料の平均濃度 ($10.1 \pm 3.6 \text{ ng/mL}$) が本実験以外で過去に採取した同じ個体の 12 試料の血清平均 F 濃度 ($4.1 \pm 4.2 \text{ ng/mL}$) よりも極めて高い値を示していたため、これらを *t* 検定により比較したところ、本実験の濃度が有意に高いことが判明した ($p = 0.014$)。そこで、このオスの値を除き体サイズと F 濃度との相関関係を求めたところ、 $y = -2.916x + 11.695$ ($r^2 = 0.62$) で有意な逆相関が認められた ($p < 0.05$, Fig. 2-6)。また、国営沖縄記念公園水族館で飼育されているミナミバンドウイルカおよびオキゴンドウの平均血清 F 濃度を求めた結果、やはり体重の小さいミナミバンドウイルカ ($2.6 \pm 1.0 \text{ ng/mL}$) の方がオキゴンドウ ($1.8 \pm 0.5 \text{ ng/mL}$) に比べて高い平均値を示すことが判明した (Table 2-3)。

前節および本節の実験で得られた体サイズと血清 F 濃度の負の相関については、F が糖新生など個体のエネルギー産生に深く関わるホルモンであることに関係しているためであると推察される。すなわち、体サイズが大きくなるほど体表面積

に対する体積の割合が小さくなり、熱効率が良くなるため、大型になるほどエネルギー産生に関わるホルモン濃度が低濃度になるという推察が成り立つ。さらに、計測学的生物学の視点に基づいた研究で大型鯨類になるほど副腎の体重比が小さくなるという報告があるが (Slijper, 1958), これらの報告は今回得られた結果と符合するものと思われる。しかし、体サイズと F 濃度が負の相関を表す意味や、副腎の大きさと血清 F 濃度の関係、および各々の鯨類における F 要求性器官での有効 F 濃度などについてのさらなる詳しい研究なくしては、今回得られた結果の意味を十分理解することは難しく、今後更なる研究が必要である。

第3節

日周変動

陸上哺乳類の血中 F 濃度に関して、昼行性動物においては早朝に高く夕刻に低く、夜行性動物においては早朝に低く夕刻に高いという日周変動を示すことが知られているが、鯨類の日周変動については保定したまま採血されたバンドウイルカについての報告があるのみである (Judd and Ridgway, 1977)。そこで、本節では、長期間飼育され、尾びれ持ち採血に十分慣れているシャチおよびミナミバンドウイルカを用いて 3 時間おき 24 時間繰り返し採血を行ない、血清 F 濃度の日周変動の有無を確認した。

材料と方法

1997 年 1 月、千葉県鴨川シーワールドで飼育されている 2 頭のシャチ、オス (体長 493cm, 体重 1920kg) およびメス (体長 493cm, 体重 1820kg) を対象として、尾びれ持ち採血により 09, 12, 15, 18, 21, 24, 翌 03, 06 時の計 8 回の繰り返し採血を 1 度行なった。さらに 2000 年 6 月、沖縄県国営沖縄記念公園水族館で飼育されている 2 頭のミナミバンドウイルカ、オス 1 (体長 258cm, 195kg) およびオス 2 (体長 257cm, 体重 195kg) を対象として、尾びれ持ち採血により、09, 12, 15, 18, 21, 24, 翌 03, 06, 09 時の計 9 回の繰り返し採血を 2 度行なった。得られた血清中の F 濃度を RIA 法により測定した (本章第 1 節参照)。

結果と考察

シャチにおける血清 F 濃度の日周変動を Fig. 2-7 に示す。オスについては、採血開始時の 9 時 (2.8ng/ml) から 24 時 (0.8ng/ml) まで徐々に下がり続け、翌 6 時 (2.0ng/ml) に再度高くなった。メスにおいては、採血開始時の 9 時 (3.8ng/ml) から 18 時 (0.8ng/ml) に向かって徐々に低くなり、21 時に一旦高濃度 (3.0ng/ml) を示した後 24 時に再度低濃度 (1.3ng/ml) を示し、翌 3 時 (4.0ng/ml) および 6 時 (3.5ng/ml) に高くなった。これら 2 頭の F 濃度平均の変動については、1 日の全 F 濃度の平均は $2.2 \pm 0.8 \text{ ng/mL}$ であり、平均濃度に比して、採血開始時の 9 時 (3.3ng/mL) および翌 6 時 (2.8ng/mL) の F 濃度が顕著に高くなり、一方、18 時 (1.3ng/mL) および 24 時 (1.1ng/mL) の F 濃度が顕著に低くなった。この結果、9 時から 18 時 (1.8ng/mL) にかけて経時的に低くなり、メスの F 濃度上昇に伴い 21 時に一旦高くなった後 (2.5ng/mL)、24 時に再度低くなり、翌 3 時から翌 6 時にかけて高くなる変動パターンが認められた。しかし、2 個体から 1 回ずつ行なったのみであり、統計的処理は不可能であった。

次に、ミナミバンドウイルカにおける血清 F 濃度の日周変動を Fig. 2-8 に示す。2 頭 2 回計 4 回の平均値について見ると、1 日の全 F 濃度の平均は $5.0 \pm 2.6 \text{ ng/mL}$ であったが、18 時には平均 $2.7 \pm 0.7 \text{ ng/mL}$ と 1 日の平均と比べて有意に低くなり、朝 03 時には平均 $7.8 \pm 3.0 \text{ ng/mL}$ と有意に高くなることが明らかになった (共に t -test, $p < 0.05$)。

Fig. 2-7 および Fig. 2-8 に示したように、両種において、採血開始時の 09 時より 18 時に向かって徐々に F 濃度が低下し、18 時に最低となった。その後、ばらつきは大きいものの、いずれも翌朝 3 時~9 時に向かって上昇した。これらの結果は、長期飼育されている個体から尾びれ持ち採血により得られたものであり、採血時に個体にかかるストレスがより少ないものと考えられ、血清 F 濃度の基本

的な日周変動を示したものであると考えられる。

血中 F 濃度の日周変動をもたらす要因としては、明暗リズムやそれに伴う睡眠リズム (Orth *et al.*, 1967; Luboshitzky, 2000)、活動パターンの変化など、内因的な生理状態の変化が挙げられる。シャチおよびミナミバンドウイルカにおける血清 F 濃度の日周変動 (Fig. 2-7, Fig. 2-8) は陸上の昼行性動物に類似した変動を示しており、両種の活動リズムが昼行性動物と同じであることを示唆している。しかし、水族館の営業時間の都合上、実験対象個体の運動や摂餌の時間帯が飼育員の日常業務時間帯と一致するため、飼育下の鯨類は昼行性にならざるを得ず、F 濃度の日周変動が昼行性動物と似たパターンを示したものとも考えられる。今回得られた F 濃度の日周変動が野生個体においても同様に認められるか否かは不明であるが、本研究結果は、今後、飼育個体の血中 F 濃度を評価する際に、採血時刻に留意し、可能な限り採血時刻を一定にして比較する必要があることを提示するものとなった。鯨類においては、Judd and Ridgway (1977) がバンドウイルカにおける血中 F 濃度の日周変動を測定し、成熟個体においては 18 時までは F 濃度が低く (<50ng/mL)、加えて夜間に 160ng/mL に達するピークが数回起こったと報告している。本実験において両鯨種で得られた夕刻に低くなるという結果は彼らの結果と一致するものであり、また、シャチのメスにおいてみられた 21 時のピークは Judd and Ridgway (1977) の報告で見られた夜間に数回ピークが起こる現象に関係がある可能性も否定できない。しかし、シャチのオスおよびミナミバンドウイルカにおいては夜間の F 濃度上昇は認められなかった。したがって、シャチのメスにおける 21 時の F 濃度上昇は普遍的なものではなく、採血時に何らかの事態が生じた可能性が考えられるが、採血前のこの個体の行動観察においては目立った変化が認められず、その原因については不明である。

第4節

年周変動

陸上哺乳類の血中 F 濃度の年周変動については、ヒト (Agrimonti *et al.*, 1982 ; Maes *et al.*, 1997 ; Walker *et al.*, 1997) を始めとして、トナカイ *Rangifer tarandus* (Bubenik *et al.*, 1998), コウモリ *Myotis lucifugus lucifugus* (Gustafson and Belt, 1981), サル *Saimiri sciureus* (Wilson *et al.*, 1978 ; Schiml *et al.*, 1999) など様々な種において研究されている。一般的に、F は生体内のエネルギー要求に応じて血中に分泌されるという性質を持つことから、冬や冬眠期に血中 F 濃度が高くなる傾向が認められるが、種間、報告間で時期や変動パターンに相違がある。また、気温などの環境要因の他、動物の生理状態、すなわち妊娠や冬眠などにおいて F の年周変動が生じると考えられている。

鯨類においては季節ごとの F 値に関する報告が2つあるが (Orlov *et al.*, 1988 ; St. Aubin *et al.*, 1996), 両研究共に試料数が少なく、季節という括りでのみの議論に留まり、かつ、一致した見解は得られていない。そこで本節では、血清 F 濃度の詳しい年周変動を追跡するため、3 個体のシャチを対象として 1 年間を通じて 2 週間間隔で、かつ採血時刻をそろえて採血を行ない、血清 F 濃度の年周変動を調べた。

材料と方法

1996 年 10 月～1997 年 9 月末までの 1 年間、約 2 週間間隔で、鴨川シーワールドで飼育されている 3 頭のシャチ、オス 1 (体長 618cm, 体重 3050kg), オス 2 (体

長 493cm, 体重 1920kg) およびメス (体長 530cm, 体重 2460kg) より, 9~10 時 および 16~17 時の間の 1 日 2 回, 尾びれ持ちにより採血を行なった. オス 1 およびメスのシャチは採血開始時点ですでに性成熟に達しており, また, メスにおいては全ての採血期間中にわたって妊娠していた. オス 2 は採血期間中に T 濃度が 0ng/mL 前後だったものが数 ng/mL に上昇し始めたため, 性成熟に達したものと判断した. 採取した血液中の F 濃度は RIA 法により測定した (本章第 1 節参照).

結果と考察

シャチにおける F 濃度の年周変動を個体ごとに Fig. 2-9 に示した. F 値は各々 09~10 時と 16~17 時に分けて示し, 上段にはオス 1 の, 中段にはオス 2 の, 下段にはメスの年周変動を示した. 前節の日周変動の結果より, 夕刻には F 濃度が最低に達すると考えられるため, 各個体における 09~10 時の F 濃度のみを用いて, Microsoft 社製「Statistica」を用いた自己相関解析により年周リズムの有無を求めた. その結果, 血清 F 濃度の変動には, オスにおいては夏に濃度が低い傾向が認められ, また, メスにおいては約 4.7 ヶ月の周期性をもつ濃度の低下が認められた ($p < 0.05$).

オス 1 の F 濃度は 12~2 月に高い一方 4~9 月に低くなり, またオス 2 においてはばらつきがあるが 6~9 月に F 濃度が低くなり, これら 2 頭においては夏に低濃度となるという共通の傾向が認められた. Orlov *et al.* (1988) は, 黒海産のバンドウイルカおよびシロイルカの血中 F 濃度において, 秋より春のほうが高い季節間変動が見られたと述べているが, 秋や春が何月であることを明記していないため, 今回得られた結果を彼らの報告と比較することはできない. しかし, ヒトにおい

て、春から夏にかけて低く、秋から冬にかけて高くなるという報告があり (Agrimonti *et al.*, 1982), 今回得られたオスの結果と一致する。

メスの血清 F 濃度においては、約 4.7 ヶ月の周期性が認められ、オスの F 濃度の変動とは異なる周期性を持つ可能性が示された。妊娠していないヒト女性において、血中 F 濃度が 4 ヶ月および 7 ヶ月の周期で高くなるという報告があり (Maes *et al.*, 1997), また、ウマでは、妊娠していない時の血中 F 濃度は約 3 ヶ月ごとの周期性を示すのに対して、妊娠個体では 1 年周期の年周変動を示すことから、妊娠が F 濃度の年周変動を変化させたという報告もある (Flisinska-Bojanowska *et al.*, 1991)。今回実験対象としたシャチのメスは採血期間を通じて妊娠していたが、その血清 F 濃度の年周変動はこれらの妊娠していないメスの哺乳類に類似した変動を示すという結果となった。4.7 ヶ月という周期の意味について調べるため、同試料中の妊娠中に高くなる性ステロイドの progesterone (P) 濃度を RIA 法 (Aida *et al.*, 1984) により測定した (Fig. 2-10)。その結果、F 濃度が減少している時に P 濃度が上昇している傾向が認められたため、F 濃度と P 濃度との相関を調べたところ、負の相関が認められた ($p < 0.001$, Fig. 2-11)。この相関関係の表す意味については不明であるが、生殖活動が糖質コルチコイドの濃度に影響を与えるという報告は多くの動物で見られ (Place and Kenagy, 2000), また、妊娠したアフリカゾウ *Loxodonta africana* において、F 濃度と P 濃度の間にも負の相関が見られたとの報告がある (Bechert *et al.*, 1999)。これらの知見と今回の結果が一致することから、妊娠中の F 濃度が P 濃度によって何らかの影響を受けているものと考えられる。

上記の通り、今回の研究において、シャチのオスとメスとで異なる F 濃度の年周変動をしている可能性が示された。したがって、年周変動については、オスと

メスを一括りにして議論をすると実際の変動が見過ごされる恐れがあり、注意が必要である。

Fig. 2-12 に個体ごとの朝と夕刻各々の平均 F 濃度を示した。t-test の結果、オス 1 (Fig. 2-12-a) においては朝の濃度 ($2.5 \pm 2.2 \text{ ng/mL}$) は夕刻の濃度 ($1.3 \pm 1.3 \text{ ng/mL}$) と比べて有意に高く ($p < 0.05$)、またメス (Fig. 2-12-c) においても朝の値 ($3.2 \pm 0.8 \text{ ng/mL}$) は夕刻の値 ($1.6 \pm 0.6 \text{ ng/mL}$) と比べて極めて有意に高かった ($p < 0.01$)。また、オス 2 (Fig. 2-12-b) においては、有意差こそなかったものの、やはり朝の値 ($1.6 \pm 0.9 \text{ ng/mL}$) は夕刻 ($0.9 \pm 1.1 \text{ ng/mL}$) に比べて高い値を示し、これらの結果は、前章の日周変動の結果を支持するものとなった。ブタにおいて慢性的なストレスが血中 F 濃度に与える影響は時刻によって異なり、日周変動で F 濃度が高い朝はストレスに対して有意には反応せず、夕刻ではストレス反応として F 濃度の増加が大きく起こるという報告がある (Janssens *et al.*, 1995)。今回対象としたシャチのオス 2 においては、オス 1 やメスよりも体が小さいこともあり、日常的に他個体から追尾や噛みつきなどの攻撃行動を受ける回数が圧倒的に多かった。このことから、オス 2 は飼育プール内でのパワーバランスによる慢性的なストレス状態におかれていたとも推測でき、朝と夕刻の F 濃度の差が有意でないことはこれらのことが要因の一つである可能性もある。

第5節

水族館搬入後の時間経過に伴う cortisol 濃度の変化

野生動物が捕獲され動物園や水族館へと搬入・飼育されるという事例は、あえて列挙するまでもなく、またその賛否に関らず、日常的に起こっている。近年、捕獲や移動などに関して、動物にとってより良い方法を探る試みが多くなされており、その際、動物の生理状態を評価する指標の1つとして、主要な副腎皮質ホルモン、特にF濃度が使用されてきた (Morton *et al.*, 1995)。

鯨類において、捕獲や飼育環境への搬入による生理状態の変化を調べるための指標としてF濃度を使用した例としては、捕獲した黒海のパンドウイルカにおいて拘束した時間の長さによりF濃度の変化に違いがあるという報告 (Orlov *et al.*, 1988) や、追跡捕獲直後のシロイルカは5~10週間飼育した後に比べ、副腎皮質刺激ホルモン様物質投与に対する副腎からのF分泌反応が大きいという報告 (St. Aubin and Geraci, 1990)、さらに野生のパンドウイルカは半飼育個体よりもF濃度が高いという報告 (St. Aubin *et al.*, 1996)、および野生のパンドウイルカを短時間捕獲・拘束してもF濃度は変化しないという報告 (Ortiz and Worthy, 2000) が挙げられる。さらに、飼育下への搬入後の比較的長期にわたるF濃度研究としては St. Aubin and Geraci (1989) の報告があり、彼らはシロイルカにおいてプールへの搬入後の数日間は血中F濃度が上昇したが10週間後には減少しており、このF濃度の変動が馴化の過程を表すと推察した。しかし、彼らは採血時刻や10週目以降にF濃度がさらに減少する可能性について留意しておらず、F濃度の低下が馴化を表しているとは一概に言えない。そこで本節では、F濃度の変化を追跡することにより、水族館搬入後の個体の生理的変化を推察することを目的とし

て、シワイルカを対象として、採血時刻に留意しつつ、水族館への搬入後の時間経過に伴う血清 F 濃度の変動を調べた。また、不定期ではあるが、水族館搬入後、数年間にわたり継続して採血を行なっているシャチ、シロイルカおよびバンドウイルカを対象として血清中 F 濃度を測定した。

材料と方法

1998年9月5日、沖縄県宜野座村の港内に迷入し、沖縄県国営沖縄記念公園水族館に収容されたシワイルカ *Steno bredanensis* (オス, BL 243cm, BW 130kg) より、継続して18ヶ月間(2000年3月まで)の採血を行なった。採血は、朝09~10時の間に収容プールを落水し、担架を使用せず飼育員数名でイルカを保定し、尾びれ静脈より行なった(但し、搬入直後は担架上で15時に採血した)。また、シャチ(オス;1988年搬入,メス;1998年搬入)、シロイルカ(オス;1990年搬入,メス;1990年搬入)およびバンドウイルカ(オス;1985年搬入,メス;1988年搬入)において、搬入後から採血時刻は一定ではないが、継続して採取された試料についてコルチゾル濃度を測定した。但し、採血方法については、保定したものや陸揚げして行ったものなど様々なものが含まれている。採取した血液中の F 濃度は RIA 法により測定した(本章第1節参照)。

結果と考察

シワイルカの水族館への搬入後の時間経過に伴う血清 F 濃度の変化を Fig. 2-13 に示す。1998年9月の搬入直後、シワイルカの F 濃度は 35.4ng/mL と高く、

測定 2 回目に該当する 4 日後には 16.2 ng/mL に半減したが、搬入 2 ヶ月後の 11 月まで 20ng/mL 前後の変動を示した。搬入 3 ヶ月後に相当する 1998 年 12 月以降はさらに値が減少し、10ng/mL 前後での変動を繰り返した。このような減少パターンは鯨類においてはこれまでに報告されておらず、また採血時刻を一定にした上での評価は本実験により初めて可能となった。実験個体は搬入直後から飼育員の与えた餌を積極的に摂取している。水族館に搬入された後、餌を摂取し始めるまでの期間は個体によって様々であるが、飼育現場では経験的に、搬入した個体の餌の摂取開始を飼育環境への馴化の第一段階として捉えている。したがって、搬入 4 日後の F 濃度の急激な減少および極めて早い段階での摂餌の 2 点を考慮すると、実験個体は飼育環境に早期に馴化したものと推察できるが、F 濃度が安定するまでには 3~4 ヶ月を要している。

また、シャチ、シロイルカおよびバンドウイルカの水族館搬入後の時間経過に伴う血清 F 濃度の変化を Fig. 2-14 に示す。測定結果から、搬入直後はどの個体も F 濃度が非常に高く、日が経つにつれ徐々に濃度が低下して行く傾向が認められた。各個体の血清 F 濃度が安定したと考えられるまでに要した日数およびその F 濃度は、シャチについてはオスでは約 2 ヶ月間、3ng/ml 前後であり、メスでは約 4 ヶ月間、3ng/ml 前後であった。シロイルカについてはオスでは約 1 ヶ月間、8ng/ml 前後であり、メスでは約 3 年間、6ng/ml 前後であった。バンドウイルカのメスについては約 3 年間、10ng/ml 前後であったが、オスのバンドウイルカについては、安定した日が特定できなかった (Fig. 2-14)。これらの個体については、採血間隔にバラツキがあり、また採血時刻も一定ではないが、オスのバンドウイルカを除き一様に搬入後徐々に血清 F 濃度が減少する傾向が認められ、シワイルカで得られた結果を支持している。しかし、個体により F 濃度が安定するまで要する時

間は異なっていた。

St. Aubin and Geraci (1989) はシロイルカにおいて、飼育プール搬入後の数日間は血清 F 濃度が上昇し、10 週間後には減少したと述べているが、本実験で得られた結果を考慮すると、個体の飼育環境への馴化に要する期間には個体差があり、その様子を F 濃度から推察するには、ある程度長期にわたり追跡する必要があると結論することができる。

Morton *et al.* (1995) は野生動物 18 種 712 個体を対象に、捕獲した際の血中 F 濃度の上昇を調べ、1 種を除く全ての種において捕獲は F 濃度を上昇させること、麻酔した方が麻酔せず捕獲するよりも F 濃度が低くなること、および F 濃度が高かった個体は捕獲後間もなく死亡するケースが多いことの 3 点より、F 濃度がストレスの良い指標として使用できると主張している。また、様々な動物において、人による野生動物の捕獲や輸送、ハンドリング、様々な環境の変化（隔離、見知らぬ個体との同居）などが血中 F 濃度を上昇させるという報告がある（Stephans, 1980 ; White *et al.*, 1991 ; Parrott *et al.*, 1994 ; Shaw *et al.*, 1995）。鯨類においても、本実験で得られた結果と捕鯨（Kjeld and Ólafsson, 1987 ; Kjeld and Theodorsdottir 1991）、保定（Orlov *et al.*, 1988）、ハンドリング（Koopman *et al.*, 1995）などが血中 F 濃度に影響を及ぼすという報告とを考え合わせ、鯨類において血清 F 濃度は個体のストレス状態を表す一つの指標として有効であると言える。

第3章

21-deoxycortisol

ヒトにおいて、21-deoxycortisol (21-DOF) は副腎皮質で 17-hydroxy- progesterone (17-OHP) から合成される cortisol (F) の前駆体であり、コルチコイドの中間代謝産物として知られている。本研究の第1章において、クロミンククジラの副腎皮質でも 21-DOF が少量ながら合成されることが判明した。しかし、陸上哺乳類において、通常 21-DOF はほとんど血中に認められず、その機能についての研究は少ない。

本研究において、F 濃度を測定するための Radioimmunoassay (RIA) 法確立の過程で、鯨類の血中には 21-DOF が F と匹敵する濃度で含まれている可能性が強く示唆されたため、本章第1節では、11 鯨種の血液を用いてそれらの 21-DOF の含有量について調べた。さらに、第2節では、生理的な変化に伴う 21-DOF 濃度の変動の可能性について調べるため、シワハイルカにおいて水族館への搬入後、時間経過（馴化）に伴う血清 21-DOF 濃度の変動を追跡し、さらに F 濃度との関連について調べた。

第1節

血清中 21-deoxycortisol 濃度

21-DOF は副腎で産生される中間代謝物質であり、F の前駆体であるが (MacArthur and O'Donnell, 1967; Horn and Maschler, 1976), 陸上哺乳類においてはほとんど血中に存在せず, steroid 21-hydroxylase (P450c21) 欠損を伴う先天性副腎過形成患者 (Franks, 1974; 斉藤ら, 1977; Fiet *et al.*, 2000) や多嚢性卵巣患者 (Travaflini and Faglia, 1971; Maschler *et al.*, 1976) などの血中に高濃度で検出されることが知られている。最近 21-DOF を特異的に測定する方法が開発されてきてはいるものの (Hill *et al.*, 1995; Fiet *et al.*, 2000), 21-DOF は F と非常に良く似た性質をもつ物質であり、F の測定系内での反応を妨害するという報告がある (Cook *et al.*, 1973)。RIA 法による鯨類の血清 F 濃度測定法を確立する際の子備実験の段階において、21-DOF と 100% 交差反応性を示す F 抗体を使用したところ、鯨類の血清中には 21-DOF が F と匹敵する濃度で含まれている可能性が示された。そこで、本節では、11 鯨種の血液を用いてそれらの 21-DOF の含有量について調べた。

材料と方法

試料

鴨川シーワールドで飼育しているシロイルカ *Delphinapterus leucas* (メス, オス各 1 頭), バンドウイルカ *Tursiops truncatus* (メス, オス各 1 頭), シャチ *Orcinus orca* (メス, オス各 1 頭), コビレゴンドウ *Globicephala macrorhynchus* (メス, オ

ス各 1 頭), ネズミイルカ *Phocoena phocoena* (メス, オス各 1 頭), カマイルカ *Lagenorhynchus obliquidens* (メス, オス各 1 頭), アマゾンカワイルカ *Inia geoffrensis* (オス 1 頭), ハナゴンドウ *Grampus griseus* (メス 1 頭), イロワケイルカ *Cephalorhynchus commersonii* (オス 1 頭), 和歌山県太地町において追い込み漁で捕獲されたコビレゴンドウ(メス 1 頭), 水産庁北洋イルカ資源調査においてイシイルカ専門調査船により突きん棒漁法により捕獲されたイシイルカ *Phocoenoides dalli* (オスメス各 1 頭) の血清を用いた。

ステロイド抽出および HPLC による分離精製

各鯨種の血清からのステロイドの抽出および HPLC による分離精製については, 第 2 章第 1 節, 材料と方法の「抗体の反応特異性についての確認」と同様の方法で行なった。すなわち, 各鯨種の血清よりジエチルエーテルでステロイド抽出を行ない, これを SepPak C18 カラムを用いて精製した後, 9 種各々の副腎皮質ホルモン, すなわち aldosterone, cortisol, 11-deoxycortisol, 21-deoxycortisol, corticosterone, 11-deoxycorticosterone, 18-hydroxycorticosterone, 18-hydroxydeoxycorticosterone, cortisone を分離する条件に設定した HPLC に付して 1 分ごと 40 画分に分離した。

RIA 法による測定

2 種類の F 抗体 (CosmoBio カタログ#: FKA402 : cortisol-21-succinil-BSA に対する抗体および FKA404 : cortisol-3-O-carboxymethyl-oxime-BSA に対する抗体, 共に CosmoBio) に対する 9 種の副腎皮質ホルモン標準物質の交差反応性を Table 3-1 に示した。その結果, F との交差率を 100%とした場合, FKA402 では, 21-DOF が 100%, S が 62.6%, cortisone が 34.5%, それ以外は 5%以下の交差反応性を示

し、一方 FKA404 では S が 48.8%，21-DOF が 11.6%，それ以外は 3%以下の交差反応性を示した。

これら 2 種類の F 抗体を用い、HPLC で分離した各画分中に含まれる F 濃度を RIA 法により測定した（第 2 章第 1 節参照）。

結果と考察

Fig. 3-1 にシロイルカの、Fig. 3-2 にクロミンククジラの、各々HPLCで分離した各画分における F（として測定された）濃度の、全画分の総 F（として測定された）濃度に対する割合を示した。これらの結果によると、FKA402 抗体を用いた場合、シロイルカ（Fig. 3-1）においてもクロミンククジラ（Fig. 3-2）においても、メス、オスともに F の溶出する 11 分付近に F が検出されたが、さらに、15 分付近の 21-DOF の溶出する画分が F として顕著に抗体に反応した。F として測定された濃度の全体に対する F 溶出画分および 21-DOF 溶出画分の割合は、シロイルカのオスにおいては F-11.1%および 21-DOF-88.9%，メスにおいては F-18.4%および 21-DOF-70.4%，またクロミンククジラのオスにおいては F-19.1%および 21-DOF-64.0%，メスにおいては F-19.2%および 21-DOF-64.1%であった。一方、FKA404 抗体を用いた場合には、シロイルカのオスにおいては F-79.9%および 21-DOF-17.2%，メスにおいては F-94.0%および 21-DOF-1.0%であり、クロミンククジラのオスにおいては F-78.7%および 21-DOF-4.9%，メスにおいては F-70.6%および 21-DOF-13.9%であった。FKA402 抗体は 21-DOF に 100%交差反応性を示すことから、21-DOF 画分で F として測定された濃度はすなわち 21-DOF 濃度であると見なすことができる。したがって、FKA402 抗体での

実験結果により、シロイルカおよびクロミンククジラにおいては、21-DOF は F よりも多く血清中に存在している可能性が示された。

Table 3-2 に 11 鯨種の FKA402 を使用した RIA 法による、F および 21-DOF 溶出画分各々の F として測定された濃度の割合を示す。これらの結果、上記で述べた通り、シロイルカとクロミンククジラにおいては血清中の 21-DOF 濃度が F に比べて高く、またシャチやバンドウイルカ、イシイルカのオスなどにおいても 21-DOF 濃度が F と同量もしくはその数分の 1 程度は存在することが判明した。しかし、その他の鯨種では 21-DOF が血清中に少ない、もしくは存在しないことが示された。

21-DOF 濃度差が、種差によるものなのか、個体の生理状態の違いで生じるものなのかは、この実験からは判断できない。また、血中 21-DOF 濃度は、先天性副腎過形成患者や多嚢性卵巣患者などの血中に高濃度で検出され (Franks, 1974 ; 齊藤ら, 1977 ; Fiet *et al.*, 2000, Travaflini and Faglia, 1971 ; Maschler *et al.*, 1976), それらの疾患の診断をする上で重要であるが、上記疾患を伴わないヒトやその他陸上哺乳類の血中にはほとんど検出されず、その生理学的な意味については研究がなされていない。したがって、本実験により判明した、数鯨種の血清中において 21-DOF が F に匹敵する濃度で含まれるという現象の意味を理解するためにはさらなる研究が必要である。

第2節

水族館搬入後の時間経過に伴う 21-deoxycortisol 濃度の変化

前節では、数鯨種の血清中に F 濃度に匹敵するほどの 21-DOF 濃度が含まれることが判明したが、その意味は不明である。そこで本節では、21-DOF 濃度の意義を理解するための一助として、生理状態の変化による 21-DOF 濃度の変化を調べるため、シワハイルカにおいて水族館への搬入後、時間経過（馴化）に伴う血清 21-DOF 濃度の変動を追跡し、さらに F 濃度との関連性について調べた。

材料と方法

本実験には第2章第5節（水族館への搬入後の時間経過に伴う F 濃度の変動実験）で対象とした国営沖縄記念公園水族館で飼育されているシワハイルカ *Stenobredanensis* の血清を再度使用した。これらの血清のうち、搬入後1ヶ月間とその約4ヶ月後（1999年1月）、6ヶ月後（1999年4月）および14ヶ月後（1999年11月）の計8試料からステロイドを抽出した。これらを前節で述べた HPLC 分離法により血清を分離し、21-DOF 画分に溶出する“F”（=21-DOF）濃度を抗体 FKA402（21-DOF と 100%の交差反応性を示す F 抗体）を用いて測定し、搬入後の時間経過に伴う 21-DOF 濃度の変動を調べた。また、得られた 21-DOF 濃度と第2章第5節で得られた F 濃度との相関関係を求めた。

結果と考察

Fig.3-3 にシワハイルカにおける水族館への搬入後の時間経過に伴う 21-DOF 濃

度の変化を示す。これによると、搬入直後 (0.1ng/mL) およびその 4 日後 (検出限界以下) は非常に低い値を示したが、搬入から 12 日後および 25 日後には各々 1.7ng/mL および 1.3ng/mL と少し高くなった。約 4 ヶ月後には 2.3ng/mL, 約 6 ヶ月後には 3.1 ng/mL とさらに高濃度となり, 14 ヶ月後もこれらの値と変わらず高い値であった (3.2 および 2.7ng/mL)。また, 得られた 21-DOF 濃度を横軸に F 濃度を縦軸に取り, その相関を調べたところ, $y = -5.934x + 26.68$ ($r^2 = 0.61$) で有意な負の相関関係があることが判明した ($p < 0.05$)。

これらの結果より, 個体にストレスがかかって F が多く血清中に分泌されている時には 21-DOF が分泌されないものと考えられた。すなわち, ストレス状況下の個体の副腎皮質では, 21-DOF を介する経路ではなく 11-deoxycortisol を経て F 合成が行なわれる経路が極めて活性化した結果, 21-DOF 合成がほとんど起こらず, 一方, 個体にストレスがかかっていない時には 17-OHP→S→F の経路での代謝合成がストレス時に比べて緩やかになり, 17-OHP→21-DOF→F の経路を通っても F が合成され, そのため 21-DOF も多少は血中に分泌されるという仮説が立てられた (Fig. 1-4 参照)。本章第 1 節において, 飼育されているバンドウイルカの血液中には 21-DOF が認められたが, 静岡県伊豆半島富戸で 1999 年 10 月に追い込み漁によって捕殺された 2 頭のバンドウイルカの血清 21-DOF 濃度を測定したところ, 血液中の 21-DOF は検出限界以下であった。また, 捕殺されたこのバンドウイルカの副腎皮質を用いた ^{14}C -17-hydroxyprogesterone を基質としたコルチコイド代謝実験でも 21-DOF の産生は認められなかった。捕殺されたバンドウイルカは, 追い込み後一晩の湾内への抑留および十数人での捕獲, 水揚げなどを経て解体されており, ストレスがかかっていたと考えられ, これらの結果も上記の仮説を支持するものと言える。

総合考察

本研究により、鯨類の副腎皮質ホルモンに関する様々な生理学的知見が得られた。まず第1章では、クロミンククジラ *Balaenoptera bonaerensis* の副腎皮質で代謝合成されるステロイドについて調べた。第1節では ^{14}C -pregnenolone (^{14}C -Preg) を基質として代謝実験を行なったところ、様々なステロイドの合成が認められた。すなわち、progesterone (P) を始めとして、11-deoxycortisol (S), cortisol (F), 11-deoxycorticosterone(DOC), corticosterone(B), 17-hydroxyprogesterone(17-OHP), androstenedione(A) などの他、多数の中間代謝物質の合成が認められ (Table 1-2), pregnenolone(Preg) から P への変換後、 $\text{P} \rightarrow 17\text{-OHP} \rightarrow 11\text{-DOC} \rightarrow \text{F}$ の経路、 $\text{P} \rightarrow \text{DOC} \rightarrow \text{B}$ の経路、さらに $\text{P} \rightarrow 17\text{-OHP} \rightarrow \text{A}$ の経路の各々へと合成が進んだ結果と考えられた (Fig. 1-1)。これらの代謝合成物質の割合から、 $\text{Preg} \rightarrow \text{P}$ を触媒する 3β -hydroxysteroid dehydrogenase Δ^5 - Δ^4 isomerase ($3\beta\text{HSD Isom}$) の作用が最も強く、次に $17\text{-OHP} \rightarrow \text{S}$ や $\text{P} \rightarrow \text{DOC}$ を触媒する steroid 21-hydroxylase (P450c21) の活性の方が $\text{P} \rightarrow 17\text{-OHP}$ を触媒する steroid 17-hydroxylase (P450c17) の活性や $\text{S} \rightarrow \text{F}$ を触媒する steroid 11-hydroxylase (P450c11) よりも強いと推察された (Fig. 1-1)。また、DOC は B よりも合成量が多く、 $\text{P} \rightarrow \text{DOC}$ を触媒する P450c21 の活性が $\text{DOC} \rightarrow \text{B}$ を触媒する P450c11 と比べて強いと推察された (Fig. 1-1)。また、この他に少なくとも 10 種以上のステロイド合成が認められたが、合成量がわずかであり同定には至らなかった。

次に、第2節において ^{14}C -P を基質として代謝実験を行なったところ、DOC お

よびBが多く合成され、次にSが多く、17-OHPやFの合成は少なかった(Table 1-3)。また、これらの合成量から、P→DOCを触媒するP450c21の活性がP→17-OHPを触媒するP450c17よりも非常に強いと推察され(Fig. 1-2)、これは¹⁴C-Pregにおける結果を支持するものとなった。

さらに、第3節では、¹⁴C-17-OHPを基質として代謝実験を行なった。その結果、基質のほぼ半分がそのすぐ下位の代謝産物であるSに変換され、Fや21-DOF、Aの合成もSに比べて少量認められたことから(Table 1-4)、P450c21の活性がP450c11やP450c17よりも強いことが改めて証明された(Fig. 1-3)。

以上、第1章の結果より、クロミンククジラの副腎皮質においては、相対的に3βHSD Isom および P450c21 の活性が極めて強く、次に P450c11 活性が強く、P450c17の活性は弱いことが判明した。Carballeira *et al.* (1987a) は、座礁したコマッコウ *Kogia breviceps* およびジェルヴェオウギハクジラ *Mesoplodon europaeus* の副腎を用いて *in vitro* でのコルチコイド代謝実験を行ない、基質としたステロイドの種類に関らず B が多く合成され、F は合成されないと述べている。しかし、クロミンククジラでは Preg, P, 17-OHP のいずれを基質とした場合においても F は合成された。この結果が個体の生理状態の違いによるものか、鯨種の違いによるものなのかは不明であるが、本実験により、鯨類の副腎で始めて F の合成が証明され、また、クロミンククジラの副腎では F と B の合成量はほぼ等しく、血中にほぼ同量分泌されるものと推察された。また、実験に用いたクロミンククジラの副腎皮質では陸上哺乳類とほぼ同じコルチコイドの代謝経路のパターンが認められたため、このクロミンククジラ個体は捕殺された時点でストレスがかかっていなかったものと推測できる。今後はハクジラ亜目の副腎皮質を用いて同様の実験を行ない、鯨類全般に共通のコルチコイド代謝経路を確定する必要がある。そし

て、ストレスの有無により、副腎皮質で最終産物として合成されるコルチコイドの量や種類が変化するか否かを確かめた上で、ストレス状況下で多く合成されるコルチコイドを鯨類のストレス指標として測定することができるようになれば、鯨類のストレス研究にとって大きな貢献となるものと考えられる。本研究はその基礎となる知見を提示しており、今後の研究を展開していく上で重要な意義を持っている。

第2章では血清中のF濃度についての知見を得た。まず第1節では、15鯨種の平均血清F濃度およびその中央値、変動範囲をRIA法により測定した。15鯨種の平均F濃度はシャチ *Orcinus orca* の $2.9 \pm 2.9 \text{ ng/mL}$ からスジイルカ *Stenella coeruleolca* の $39.9 \pm 14.3 \text{ ng/mL}$ まで広範囲にわたることが判明した (Table 2-1)。得られた値を過去の報告と比較すると、バンドウイルカ *Tursiops truncatus* の平均値は $11.0 \pm 9.2 \text{ ng/mL}$ であり、従来の報告に比べて半分程度の低値となったが (Medway *et al.*, 1970 ; Orlov *et al.*, 1988 ; Oritz and Worthy, 2000), Thomson and Geraci (1986) の報告とはほぼ同じ値であった。シロイルカ *Delphinapterus leucas* の平均F濃度は $6.8 \pm 5.4 \text{ ng/mL}$ であり、従来の報告に対して3分の1~4分の1の低値となった (Orlov *et al.*, 1988)。また、ネズミイルカ *Phocoena phocoena* の平均F濃度は $30.6 \pm 21.5 \text{ ng/ml}$ であり、従来の報告に比べてやはり2分の1~3分の1程度の低値となった (Koopman *et al.*, 1995)。これらの鯨類において、今回得られた平均F濃度が従来の報告よりも低い理由については、試料数が多く、かつ長期飼育個体や尾びれ持ち採血ができる個体の血液が多く混在していることを反映しているためと考えられる。また、シャチについても試料数は十分であり、本実験で示したこれらの鯨種における平均F濃度は安静時の濃度により近い値であると考えられる。しかし、イロワケイルカ *Cephalorhynchus commersonii*, コマッコ

ウ *Kogia breviceps*, オガワコマッコウ *Kogia sima*, アマゾンカワイルカ *Inia geoffernsis* については試料数が少なく、一般的な結果であるとは言い難い。また、コビレゴンドウ *Globicephala macrorhynchus* やスジイルカなどの野生個体については捕獲方法や追尾時間などの情報が十分には得られず、捕獲に関するそれらの情報を把握した試料を増やし、野生個体の F 濃度について検討していく必要がある。しかし、飼育技術の発達に伴い、水族館に様々な種の鯨類が飼育されてきており、また、情報網が発達し、座礁した鯨類に対する救急処置が必要となる場面が多くなってきている現在、今回得られた平均 F 濃度は個体のストレス状態を把握するための一つの基礎データとして役立つものになると考えられる。

第 2 章第 1 節で得られた平均 F 濃度のうち、低い値を示した鯨種にはシャチやクロミンククジラなど大型な鯨種が多く、また高い値を示した鯨種にはスジイルカやイロワケイルカなど小型鯨類が多く認められた。そこで、F 濃度と体サイズとしての体長の 3 乗との相関を調べたところ、両者の間に負の相関が認められた ($p < 0.05$, Fig. 2-3)。このうち、飼育個体のみに関り同様に F 濃度と体サイズとの相関を調べたところ、より強い負の相関関係が認められた ($p < 0.01$, Fig. 2-4)。そこで、第 2 節では、この F 濃度と体サイズとの負の相関について、長期飼育している健康な鯨種を対象として、採血時刻を 9~10 時と一定にして尾びれ持ち採血を行ない、詳しく調べた。その結果、オスのシロイルカのみにおいて、本実験で得られた F 値が過去に得られた同個体の F 濃度より有意に高かったため、値を除いて体サイズと F 濃度との相関関係を求めたところ、有意な逆相関が認められた ($p < 0.05$, Fig. 2-6)。また、別の水族館で長期飼育されているミナミバンドウイルカ *Tursiops aduncus* およびオキゴンドウ *Psuedorca crassidens* の平均血清 F 濃度を測定したところ、体の小さいミナミバンドウイルカの方がオキゴンドウに比べて

高い F 値を示した (Table 2-2)。これらの実験で見られた体サイズと血清 F 濃度の負の相関については、F が糖新生など個体のエネルギー産生に深く関わるホルモンであることが関係していると推測される。すなわち、体サイズが大きい個体ほど、体表面積に対する体積の割合が小さく、熱効率が良くなるため、大型動物ほどエネルギー産生に関連する F が低濃度でもよいという仮説が考えられる。しかし、F 濃度と体サイズとの負の相関が表す意味については、さらに詳しい研究が必要である。しかし、この負の相関は、2~30m まで体サイズが小型から大型まで多岐にわたる鯨類でこそ得られた結果であり、F の根本的な役割がエネルギー産生であることを示唆するデータとなった。

第3節では、シャチおよびミナミバンドウイルカについて、3時間おき24時間繰り返し採血を行ない、血清 F 濃度の日周変動を調べた。その結果、ミナミバンドウイルカでは、18時に有意に低く、朝03時に有意に高くなる日周変動が認められた(共に $p < 0.05$, Fig. 2-8)。シャチにおいても、18時と24時の F 濃度が低く、09時や翌06時の F 濃度が高い傾向が認められた (Fig. 2-7)。両種において認められた夕刻から夜にかけて低いという F 濃度の日周変動パターンは、Judd and Ridgway (1977) のバンドウイルカについての報告と一致する。彼らは動物を保定してコンテナに入れた状態で24時間採血を行なっているのに対して、今回の実験結果は長期間飼育されている個体から尾びれ持ち採血により得られたものであり、採血時に個体にかかるストレスが少ないものと考えられ、血中 F 濃度の基本的な日周変動をより正確に反映したものであると思われる。また、本実験で得られた日周変動は陸上の昼行性動物と同様の変動を示しており、両種が昼行性動物であることを示唆している。また、鯨類の F 濃度も日周変動を示すという事実は、鯨類の血中 F 濃度を評価する際には、採血時刻に留意し、可能な限り採血時刻を

一定にして比較する必要性を提示するものとなった。今後は、3 時間という採血間隔を短縮してさらに詳細な日周変動を調べるのが課題として挙げられるが、頻繁な採血は注射痕からの感染症など動物の健康管理の面で困難が多く、現時点では3 時間間隔での採血が個体にできるだけストレスを与えずに F 濃度の日周変動を追跡する最善の方法であったと考えている。

第4 節では、さらにシャチにおける F 濃度の年周変動を2 週間おきに1 年間採血を行ない調べた。その結果、オスにおいては夏に濃度が低い傾向が認められ、また、メスにおいては約 4.7 ヶ月の周期性をもつ濃度の有意な低下が認められた ($p < 0.05$, Fig. 2-9)。このメスは採血期間を通じて妊娠していたにもかかわらず、妊娠していないメスの哺乳類に類似した変動となった (Maes *et al.*, 1997 ; Flisinska-Bojanowska *et al.*, 1991)。さらにこのメスのシャチにおいて、妊娠維持ホルモンである P 濃度と F 濃度との間に負の相関が認められ ($p < 0.001$, Fig. 2-11)、妊娠していたシャチの F 濃度の周期的な低下は P 濃度によって何らかの影響を受けた結果であるとも考えられた。これらの研究により、シャチの F 濃度の年周変動は、オスとメスとで異なる可能性が示された。また、F 濃度をストレス指標として評価する場合には日周変動と同様、年周変動にも配慮した上で採血する必要性が示されたが、年周変動の意味についてはさらなる研究を要する。さらに、オスにおいて示された夏期に低く、冬期に高いという F 濃度の変動は、気温および水温が低い時期に F 濃度が上昇するということであり、F が基本的にエネルギー産生に関与するホルモンであることを改めて示唆するものとなった。

第5 節では、シワハイルカ *Stenobredanensis* の水族館への搬入後の時間経過に伴う血清 F 濃度の変化を、採血時刻を一定にして調べた。搬入直後、この個体の F 濃度は極めて高かったが、その4 日後には半減したことから、実験個体は飼育環

境に早期に馴化し始めたと推察された(Fig. 2-13)。また、シャチ、シロイルカおよびバンドウイルカの水族館搬入後の F 濃度変動もこの結果を支持するものとなった (Fig. 2-14)。しかし、一方、F 濃度の減少が見られなくなるまでに、数ヶ月～数年を要しており、水族館への動物の完全な馴化の様子を把握するには、ある程度長期にわたって F 濃度を追跡し、該当する種の安静時の F 濃度を知る必要がある。様々な動物と同様、鯨類においても捕獲や輸送、ハンドリングおよび様々な環境の変化などが血中 F 濃度を上昇させるという報告があり (Kjeld and Ólafsson, 1987; Kjeld and Theodorsdottir 1991; Orlov *et al.*, 1988; Koopman *et al.*, 1995), これらの報告と本実験の結果から、鯨類においても血清 F 濃度は個体のストレス状態を表す一つの指標として有効であることが示された。近年、動物の権利などが主張されるようになり、動物園や水族館で野生動物を飼育することに対して世論が批判的になりつつある。これについての論争も頻繁に行なわれているが、これらが科学的な根拠に基づいて行なわれているとは言い難い。本節では、飼育期間が長期になるにつれて血清 F 濃度が低下し、やがて安定するという結果が得られたが、この結果からは、水族館での飼育が鯨類にとってストレスを与える環境ではないという可能性が示されたものとも言える。今後も動物園や水族館で動物を飼育する是非についての議論は続くであろうが、本実験のような F 濃度の測定も含め、より科学的な評価方法による検討を行なった上で飼育の是非は議論されるべきであろう。

以上、第 2 章においては様々な鯨類の血清 F 濃度について調べた。平均 F 濃度や日周変動、年周変動で得られた結果は、鯨類の血中 F 濃度をストレス指標として評価する際に大いに役立つと考えられる。今後は、得られた知見に基づき、飼育環境の変化や個体間の関係など様々な負荷による F 濃度の変化を追跡し、他の

血液性状値や行動などと併せて負荷の種類によるストレス状態の変化を調べ、飼育環境の改善に役立つ研究が必要となるであろう。

第3章では、鯨類の血清 21-DOF 濃度に関する知見を得た。鯨類の血清を HPLC に付した各々の画分について、2種類の F 抗体を用いた RIA 法により F 濃度を測定した。その結果、FKA402 抗体は 21-DOF に 100%交差反応性を示す抗体であったことから、数鯨種の血中に 21-DOF が多く存在することが判明した。特に、シロイルカ (Fig. 3-1) やクロミンククジラ (Fig. 3-2) では 21-DOF が F よりも多く血清中に存在していた。また、他の数鯨種についても 21-DOF 濃度が F と同量もしくはその数分の 1 程度存在することが判明したが、21-DOF が血清中に少ない、あるいは存在しない鯨種もみられた。本実験は、非常に時間と手間のかかる実験のため、1種につき数個体程度のみを行なうのが限界であったが、今後は検体数を増やし、21-DOF が鯨類の血中で多く検出されるという現象が普遍的なものであるのか否かを確かめる必要がある。また、陸上哺乳類の血中ではほとんど認められない 21-DOF が鯨類の血清中で認められたことは興味深い現象であるが、21-DOF 濃度の生理学的な意味についてはこれまでに研究がない。したがって、数鯨種の血清中において 21-DOF が F に匹敵する濃度で含まれる意味について把握するためにはさらなる研究が必要である。

第2節においては、シロイルカにおける水族館への搬入後の時間経過に伴う 21-DOF 濃度の変化を追跡した (Fig.3-3)。これによると、21-DOF 濃度は搬入直後とその4日後は非常に低い値を示したが、時間経過に伴って徐々に増加する変動を示し、F 濃度とは逆の変動を示した。また、21-DOF 濃度と F 濃度との間には、有意な負の相関が認められた ($p < 0.05$)。これらの結果より、21-DOF は F の前駆体であるが (Fig. 1-1 参照)、個体にストレスがかかり F が多く血清中に分泌され

ている時には、17-OHP から 21-DOF を介する経路ではなく、11-deoxycortisol (S) を介する F 合成経路が非常に活性化し、一方、個体にストレスがかかっていない場合には、17-OHP→21-DOF→F の経路を介した F 合成も行なわれ、21-DOF が血中に分泌されるようになるという仮説が立てられた。もしこの仮説が正しいとするならば、21-DOF の濃度が高い個体ほどストレスがかかっていないという指標になり、そのこともまた非常に興味深い。しかし、これについては、21-DOF は全ての鯨種の血清中に存在するわけではないこと、また、水族館への搬入後の時間経過に伴う 21-DOF 濃度の変化を追跡した対象個体も 1 頭であったことから、さらなる研究が必要である。

本研究では鯨類のコルチコイドについて生理学的知見を収集し、個体の F 濃度をストレス指標として評価する際に基礎となる結果を示すとともに、一方、鯨類において、F 濃度がストレス指標に適しているか否かの検証も行なった。Thomson and Geraci (1986) は、F 濃度よりも好中球数が、また、Hyne, et al. (1982) も好中球が、St. Aubin and Geraci (1990) は F 濃度よりも aldosterone 濃度の方が、さらに、Orlov *et al.* (1991) は F 濃度よりも電解質の変動の方が、各々ストレスの指標に適していると述べている。また、St. Aubin and Geraci (1988) は、血中甲状腺ホルモンもストレスの指標として適していると述べている。無論、これらの報告においても F 濃度はストレス時に上昇しており、鯨類において他にもストレス状況下の F 濃度が有意に上昇したという報告はいくつかある (Orlov *et al.*, 1988 ; St. Aubin and Geraci, 1992)。しかし、F 濃度が変化しないという報告もあもある (Kjeld and Ólafsson, 1987; Kjeld and Theodorsdottir, 1991; Oritz and Worthy, 2000)。これらの報告は、実験方法や評価方法など信頼し難い箇所も多く含まれるが、正確に個体のストレス状態を把握するには、F 濃度のみをストレスの指標として扱

うことは避け、複数の指標と同時に評価する方法を確立することが必要であろう。

現在、水族館で鯨類を飼育することの是非や飼育環境の改善、また、捕鯨をする際に問題になる人道的捕殺方法の改善など、鯨類のストレス生理学が取り組むべき課題は多い。今後は、鯨類について、F 濃度を含めたストレス指標についてさらなる研究を続け、人類と鯨類のより良い共存の道を探るための科学的情報を提供していきたいと考えている。

要旨

副腎は円口類から哺乳類まで幅広い脊椎動物が持つ内分泌器官であり、ステロイド産生組織である皮質とカテコールアミン産生組織である髄質とからなる。視床下部（副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン分泌）－下垂体（副腎皮質刺激ホルモン分泌）－副腎皮質系をたどり分泌されるホルモンはコルチコイドと呼ばれている。コルチコイドは、タンパク質と脂質の分解促進、糖新生、免疫抑制などの作用を有する cortisol (F), corticosterone (B), cortisone などの糖質コルチコイドと、腎臓での Na^+ 吸収, K^+ 排出, 水の再吸収などを促す aldosterone などの鉱質コルチコイドとに分けられる。様々な陸上動物において、糖質コルチコイドはストレス環境下で分泌されることが知られており、個体のストレス状態を把握する有効な指標として使用されてきた。

鯨類の副腎に関しては 18 世紀から報告があるが、初期の研究の大部分が肉眼解剖学的研究であった。1940 年以降、動物の各器官の相対的な重量がその器官の生物学的な重要性を示すという視点に基づき、副腎重量が測定され、体の大きい鯨類ほど副腎の体重比が小さいなどの報告がなされた。1960 年代以降に副腎のホルモンに関する研究が行なわれ、副腎中のホルモンの大まかな構成は陸上哺乳類と同じであり、また鯨類の血中コルチコイド濃度は陸上哺乳類と比べて数分の 1 であることが判明した。さらに 1980 年代後半以降、鯨類においてもストレスの指標としてコルチコイドを測定する研究が開始された。しかし、鯨類という大型海生哺乳類を実験動物とすることの困難さから基本的な知見が不足しており、各研究

で得られた値を客観的に評価する基準がない状況が続いてきた。そこで本研究では、鯨類において cortisol 濃度をストレス指標として使用可能な状態とするため、副腎皮質ホルモンに関する基礎的知見を集積した。まず、代謝実験を行い副腎皮質で合成されるコルチコイドの種類を特定し、次にコルチコイドの代表として F に着目し、その平均濃度、日周・年周変動、搬入後からの時間経過に伴う動態などを調べた。さらに、21deoxycortisol (21-DOF) という F の前駆体について、そのストレス指標としての可能性に着目し、研究を行った。

1. 副腎皮質ホルモンの代謝経路

初めに、鯨類における副腎皮質ホルモンの代謝経路を調べるため、(財)日本鯨類研究所の「1999/2000 年南半球産ミンククジラ調査及び南極海生態系に関する予備調査」において捕獲したクロミンククジラ 11 頭の新鮮な副腎を用いて代謝実験を行なった。¹⁴C-pregnenolone を基質とした場合、NAD⁺および NADPH⁺の存在下で progesterone (P) が迅速に合成され、17-hydroxyprogesterone (17-OHP) → 11-deoxycortisol (S) → F の合成と deoxycorticosterone (DOC) → B の合成も確認した。同時に、副腎アンドロゲンである androstenedione (A) および 21-DOF の合成も確認した。¹⁴C-P および ¹⁴C-17-OHP を基質とした場合も上記の結果を支持するものとなった。また、これらの実験から、クロミンククジラの副腎皮質では 3β-hydroxysteroid dehydrogenase/isomerase, P450_{17α,17ase}, P450_{c21}, P450_{11β}などの酵素活性が強く、様々な副腎皮質ホルモンの合成を確認し、また本実験において初めて鯨類における *in vitro* での F 合成を証明した。

2. 血清中 F 濃度およびその変動

次に、15 鯨種（1351 検体）の平均血中 F 濃度を RIA 法により調べた。その結果、15 鯨種の平均濃度はシャチの $2.9 \pm 2.9 \text{ ng/ml}$ （平均 \pm 標準偏差）からスジイルカの $39.9 \pm 14.3 \text{ ng/ml}$ まで広範囲にわたり、かつ各鯨種の平均濃度は従来の報告に比べて数倍低いことが判明した。F 濃度の低い鯨種としてはシャチ、クロミンククジラ ($3.5 \pm 3.2 \text{ ng/ml}$)、シロイルカ ($6.8 \pm 5.4 \text{ ng/ml}$) など大型鯨種が多く、また濃度の高い鯨種としてはスジイルカ、イロワケイルカ ($34.7 \pm 17.1 \text{ ng/ml}$)、カマイルカ ($28.9 \pm 20.7 \text{ ng/ml}$) など小型鯨類が多く認められた。そこで、これらの鯨類の F 濃度と体サイズとの相関を調べたところ、両者の間に有意な逆相関が認められた ($p < 0.05$)。このうち、飼育個体である 13 鯨種において同様に F 濃度と体サイズとの相関関係を調べたところ、より強い逆相関が認められた ($p < 0.01$)。しかし、上記実験に使用した試料は採血時刻、個体の成熟段階および飼育状態などに全く配慮しておらず、その結果が普遍的であるとは言い難い。そこで 1997~1998 年に千葉県鴨川シーワールドで長期飼育している健康で成熟した 6 鯨種、即ちシャチ（オスメス各 1 頭）、シロイルカ（オスメス各 1 頭）、オキゴンドウ（メス 1 頭）、バンドウイルカ（オスメス各 1 頭）、カマイルカ（オス 1 頭）、イロワケイルカ（オス 1 頭）を対象として、9~10 時の尾びれ持ち採血を適当な間隔を開け 5 日間実施し、F 濃度と体サイズとの相関を調べた結果、弱い逆相関が認められた ($p < 0.05$)。本実験により、各鯨種の F 濃度の平均値およびその変動範囲が示され、これらの値は F 濃度を測定した際の基準となるものと期待される。

次に、血中 F 濃度の日周変動を調べるため、1997 年 1 月に鴨川シーワールドの 2 頭のシャチ（オスメス 1 頭ずつ）および尾びれ持ち採血により 9, 12, 15, 18, 21, 24, 翌 3, 6 時の計 8 回の連続採血を 1 度行なった。さらに 2000 年 6 月、沖縄県国営沖縄記念公園水族館の 2 頭（共にオス）のミナミバンドウイルカを対象とし

て、尾びれ持ち採血により 9, 12, 15, 18, 21, 24, 翌 3, 6, 9 時の計 9 回の連続採血を 2 度行なった。その結果、シャチにおいては平均 F 濃度が採血開始時の 9 時 (3.3ng/ml) から 18 時 (1.8ng/ml) にかけて経時的に低くなり、21 時に一旦高くなった後、再度 24 時に低くなり、翌 3 時から 6 時にかけて高くなる変動を示した。ミナミバンドウイルカにおいては、開始時の 9 時 (6.1ng/ml) から 18 時に向かつて徐々に F 濃度が低下し、18 時に最低 (2.7ng/ml) となり、翌 3 時～9 時に上昇する変動を示した。本実験により、鯨類の血中 F 濃度の日周変動は昼行性の陸上哺乳類と同様の傾向を示すことが確認された。

続いて、血中 F 濃度の年周変動を調べるため、鴨川シーワールドの 3 頭のシャチ (オス 2 頭, メス 1 頭) より 1996 年 10 月～翌年 9 月の間、2 週間おきに 9～10 時に尾びれ持ち採血を行ない、F 濃度を測定した。その結果、オスでは夏期に低く冬期に高い変動を示し、メスでは 4.7 ヶ月周期での変動を示した。これまで鯨類の F 濃度の年周変動に関する報告は少なく、統一の見解もなかったが、本実験により雌雄で異なる年周変動を示す可能性が示された。

さらに、水族館へ搬入した個体の生理状態の変化を把握するため、1998 年 9 月に沖縄記念公園水族館に搬入されたオスのシワハイルカについて、搬入後の時間経過に伴う血中 F 濃度の変動を 18 ヶ月間追跡した。採血は 9～10 時の間に落水して行った。その結果、F 濃度は搬入時に 35.4ng/ml と最も高く、4 日目以後 2 ヶ月間は 20ng/ml 前後で変動し、3 ヶ月目以降は 10ng/ml 前後に下がり安定した。この結果から、このシワハイルカは飼育環境に早期に馴化したことが判明した。さらに、千葉県鴨川シーワールドに搬入されたシャチ、シロイルカおよびバンドウイルカより長期にわたり採取された血液中の F 濃度を測定した結果、採血時刻や採血方法が一定ではないものの、どの個体においても搬入後時間経過に伴い徐々

に F 濃度が減少した。但し、F 濃度が安定するまでに要する期間は個体ごとに異なっており、これは飼育環境への馴化の様子を反映したものと考えられた。これらの結果により、鯨類においても血中 F 濃度が動物の生理状態を評価する一つの指標として有効であることが示された。

3. 血清中 21-deoxycortisol 濃度およびその変動

次に、数鯨種の血中 21-DOF 濃度について調べた。21-DOF は F の前駆体であるが、陸上哺乳類ではほとんど血中に存在せず、ヒトでは P450_{c21} 欠損を伴う先天性副腎過形成患者や多嚢性卵巣患者などの血中に高濃度で検出されるのみである。本研究において、RIA による鯨類の血中 F 濃度測定法を確立する際、21-DOF と 100%交差反応性を示す F 抗体を使用したところ、鯨類の血中には 21-DOF が F と匹敵する濃度で含まれている可能性が示された。そこで、数鯨種の血清を高速液体クロマトグラフィーにより分離し、標準物質の 21-DOF 溶出画分と同じ画分の 21-DOF 濃度を測定した。その結果、シロイルカ、クロミンククジラ、バンドウイルカ、シャチにおいて F に匹敵する濃度で 21-DOF が血中に含まれることが判明した。また、野生（1999 年 10 月静岡県富戸の小型鯨類沿岸捕鯨漁にて捕殺）および飼育のバンドウイルカにおける 21-DOF を調べたところ、飼育下の個体の血中には 21-DOF が認められたが野生個体の血中には認められず、また野生個体の副腎を用いて ¹⁴C-17OHP を基質とした副腎皮質ホルモン代謝実験を行っても 21-DOF の産生が認められなかった。追い込み漁で捕殺され、生理状態が正常であったとは言い難い野生個体において 21-DOF が認められず飼育個体では認められるということは、個体がストレスを受けて生理状態が変化した時は、21-DOF を介する経路ではなく S を介する経路で F が産生される可能性があるかと推測され

る。そこで、1998年9月に沖縄記念公園水族館に搬入された雄のシワハイルカを用いて、搬入後の時間経過に伴う21-DOF濃度の変化を調べたところ、時間経過に伴う21-DOF濃度の上昇が認められた。本実験により数種の鯨類における21-DOFの存在と、その動態が動物の生理状態に変化することが初めて示唆されたが、これらについては更に詳細な研究を要する。

以上、本研究により、鯨類コルチコイド生合成経路が明らかとなり、Fを含む様々なホルモン合成が初めて証明された。また、15鯨種の平均血中F濃度が測定され、さらにこの値からF濃度と体サイズとの逆相関が判明した。その他日周、年周変動など生理的変動についても調べられ、鯨類のF濃度に関する基礎知見の集積が行われた。さらに鯨類において21-DOFに着目し、その動態を調べた最初の研究となった。これらの鯨類の副腎皮質ホルモンに関する詳細かつ貴重な情報により、血清中F濃度が鯨類においてもストレス指標として使用可能な状態となった。今後は本研究で得られた結果をもとに、飼育下の鯨類のストレス状態を評価し、飼育環境の改善に役立てたいと考えている。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、大変多くの方々にお世話になった。

東京大学大学院農学生命科学研究科の会田勝美教授には、鯨類研究の場を与えて頂いたことを何よりも感謝申し上げますと共に、研究の遂行において多くのご指導とご厚意を賜ったことに対し、心よりお礼申し上げます。同じく東京大学大学院農学生命科学研究科の小林牧人助教授並びに古川清助手にも研究に対するご助言、ご協力を頂くとともに、研究の遂行において多くのお世話を頂いた。ここに感謝の意を表したい。また、東京大学大学院農学生命科学研究科附属水産実験所の鈴木譲教授にも、多くのご指導を頂いた。ここに感謝申し上げます。

三重大学生物資源学部の吉岡基助教授には、学部4年時より長らく研究指導を頂き、水族館や研究所と共同研究をする際には多大なご協力とご尽力を頂いた。また、「鯨類学をやくざな学問ではなくしたい」という氏の言葉は今でも頭の片隅に残っている。不出来な学生であり、甚大なご迷惑をおかけしたことを詫びながら、厚く感謝の意を表したい。

鴨川シーワールドの鳥羽山照夫常勤名誉顧問には、まだ学部生だった私の拙い研究に対し、その意図をご理解頂くとともに貴重なご助言および最大限の協力を賜り、多くの貴重な血液試料の提供を頂いた。感謝の念を言い表す言葉も見つからない。同水族館の勝俣悦子獣医には、動物の採血実験では大変なお世話になり、また、実習中の生活、研究姿勢など様々な場面において多くの協力や助言を頂いた。ここに、心からお礼を申し上げたい。また、同水族館海獣展示課の平塚賢司

課長をはじめとして、勝俣浩氏、井上聡氏、岡村均氏、石川美和氏、その他全てのスタッフの皆様には、大変な実験にも惜しみないご協力を頂いた。若いスタッフの方々には、日課作業の合間にも色々と気を遣って頂き、楽しく実験させて頂いた。ここに感謝の意を表したい。

国営沖縄記念公園水族館の内田詮三館長には、突然の実験依頼にも関らず快く承諾とご協力を賜り、数々の難しい実験にも、確実かつ最高のデータが取れるようにとのご配慮とご尽力を頂いたことに対してお礼申し上げます。また、同水族館の長崎佑次長および宮原弘和係長には、実験の遂行にあたり、飼育現場の状況と研究の意図の両方から、作業の可否について正確な判断を下して頂くと共に、惜しみないご協力を賜った。ここに感謝の意を表したい。同水族館の植田啓一獣医には、研究の全過程において大変多くのお世話とご助力を頂いた。同水族館での全ての採血は植田獣医の手によるものであり、氏なしには同水族館における実験は遂行できなかった。ここに最大限の謝意を表したい。また、同水族館海獣係の外間克也氏、東直人氏、中里美幸氏、平子健氏、真壁正江氏、小野英彦氏には、忙しい日課作業の合間での実験にも関らず、快いご協力を賜った。ここにお礼申し上げます。真壁氏には滞在中の身の世話など公私共に多くのご厚意を頂き、また同様に同水族館魚類係の横山喜代子氏にも滞在中に多くのご厚意を頂いた。ここに謝意を表したい。

日本鯨類研究所大隅清治理事長および山村和夫理事には貴重な資料であるクロミンククジラ副腎の使用を快諾して頂いたことに対し、厚く感謝申し上げます。また、同研究所藤瀬良弘部長および同研究所調査部採集調査室石川創室長には、私の度重なる要求に対するご理解を賜ると同時に最大の配慮をもって対応して頂いた。ここにお礼を申し上げます。大谷誠司研究員を始めとする同研究所調査部採集

調査室研究員の方々には試料採取を最高の形で行なって頂いた。研究員の方々の努力をなくしてはクロミンククジラの新鮮な副腎を用いた実験の成功はなかった。心より感謝申し上げます。

日本大学生物資源科科学部の朝比奈潔教授には副腎皮質ホルモン代謝実験を丁寧にご教示頂いた。同じく日本大学生物資源科科学部の片瀬隆夫教授および大学院修士課程の金氏には、多忙な中 GC-MS 実験においてご指導並びにご協力を頂いた。心より感謝の意を表す。

南知多ビーチランドの長谷川修平所長並びに大池辰也獣医、下田海中水族館の萩原宗一課長には、研究に対するご助言を頂くと共に、飼育下の鯨類および座礁した鯨類の大変貴重なデータの収集に多大なるご協力とご尽力を頂いた。ここにお礼を申し上げます。また、大洗水族館の酒井孝飼育員、常磐大学の中原史生講師、茨城県立博物館の国府田良樹氏には、茨城県近辺に座礁した鯨類の様々な試料やデータの収集に協力頂いたご厚意に対し、心より感謝申し上げます。

東京大学大学院農学生命科学研究科の川添一郎研究員には HPLC 等々のクロマトグラフィー技術をご教示頂いた。心よりお礼申し上げます。また、神戸川研究所の神戸川明先生にはステロイドの精製や抗体についての適切なご助言並びにご指導を賜った。ここに厚くお礼申し上げます。

東京大学大学院農学生命科学研究科水族生理学研究室の先輩および同輩や鯨仲間には多くの励ましを頂いた。ここに感謝の意を表す。最後に、両親、倉橋孝子さん、そして旧友たちに、研究生活の全期間にわたるご理解と励ましを頂いたことを感謝申し上げます。

引用文献

- Agrimonti, F, Angeli, A, Frairia, R, Fazzari, A, Tamagnone, C, Fornaro, D, and Ceresa, F. 1982. Circannual rhythmicities of cortisol levels in the peripheral plasma of healthy subjects. *Chronobiologia* 9: 107-114.
- Aida, K., Kato, T., and Awaji, M. 1984. Effect of castration on the smoltification of precocious male masu salmon *Oncorhynchus masou*. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.* 50: 565–571.
- Arvy, L. 1971. Endocrine glands and hormonal secretion in cetaceans. In: *Investigation on Cetacea*, ed. by G. Pilleri, vol.III (2) : 229-300pp.
- Bechert, US, Swanson, L., Wasser, SK, Hess, DL, and Stormshak, F. 1999. Serum prolactin concentrations in the captive female African elephant (*Loxodonta africana*): potential effects of season and steroid hormone interactions. *Gen. Comp. Endocrinol.* 114: 269-278.
- Becker, BA, Nienaber, JA, Christenson, RK, Manak, RC, DeShazer, JA, and Hahn, GL. 1985. Peripheral concentrations of cortisol as an indicator of stress in the pig. *Am. J. Vet. Res.* 46: 1034-1038.
- Bernett, JL. and Hemsworth, PH. 1990. The validity of physiological and behavioural measures of animal welfare. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 25: 177-187.
- Bottoms, GD, Roesel, OF, Rausch, FD, and Akins, EL. 1972. Circadian variation in plasma cortisol and corticosterone in pig and mare. *Am. J. Vet. Res.* 33:785-790.
- Brooks, RV. 1979. Biosynthesis and metabolism of adrenocortical steroids. In: *The*

adrenal gland, ed. by VHT. James: 67-92pp, Raven Press, New York.

Bubenik, GA, Schams, D, White, RG, Rowell, J, Blake, J, and Bartos, L. 1998. Seasonal levels of metabolic hormones and substrates in male and female reindeer (*Rangifer tarandus*). *Comp. Biochem. Physiol. C* 120: 307-315.

Burn, JH, Langemann, H, and Parker, RHO. 1951. Noradrenaline in whale suprarenal medulla. *J. Physiol.* 113: 123-128.

Carballeira, A, Brown, JW, Fishman, LM, Trujillo, D, and Odell, DK. 1987a. The adrenal gland of stranded whale (*Kogia breviceps* and *Mesoplodon europaeus*): morphology, hormonal contents, and biosynthesis of corticoid. *Gen. Comp. Endocrinol.* 68:293-303.

Carvilleira, A, Brown, JW, Fishman, LM, Bertetta, C, and Bossart, GD. 1987b. The adrenal gland of stranded whales (*Kogia breviceps* and *Mesoplodon europaeus*): *in vitro* modulation of mitochondrial steroid enzyme activities. *Gen. Comp. Endocrinol.* 68: 304-312.

Carnes, M, Kalin, NH, Lent, SJ, Barksdale, CM, and Brownfield, MS. 1988. Pulsate ACTH secretion: variation with time of day and relationship to cortisol. *Peptides* 9:325-331.

Colgrove, GS. 1978. Suspected transportation-associated myopathy in a dolphin. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 173: 1121-1123.

Cook, DM, Allen, JP, Kendall, JW, and Swanson, R. 1973. Interference of 21-deoxycortisol with cortisol assay methods. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 36: 608-610.

Crile, G and Quiring, DP. 1940. A comparison of the energy-releasing organ of the white whale (*Delphinapterus leucas*) and the thoroughbred horse "Equipoise". *Growth* 4:

291-298.

- Czeisler, CA and Klerman, EB. 1999. Circadian and sleep-dependent regulation of hormone release in humans. *Rec. Prog. Horm. Res.* 54: 97-132.
- Dantzer, R and Mormede, P. 1983 . Stress in farm animals: a need for reevaluation. *J. Anim. Sci.* 57: 6-18.
- Dierauf, LA. 1990. Stress in marine mammals. In: *Handbook of marine mammal medicine: Health, disease, and rehabilitation.* ed. by Dierauf, LA. CRC Press: 295-301pp.
- Edqvist, LE, Einarsson, S, Larsson, K, and Lundstrom, K. 1980. Diurnal variations in peripheral plasma levels of testosterone, androsterone, and cortisol in boars. 1980. *Acta Vet. Scand.* 21: 451-453.
- Fiet, J, Boudi, A, Giton, F, Villette, JM, Boudou, Ph, Soliman, H, Morineau, G, and Galons, H. 2000. Plasma 21-deoxycortisol: comparison of a time-resolved fluoroimmunoassay using a biotinylated tracer with a radioimmunoassay using ¹²⁵iodine. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* 72: 55-60 .
- Flisinska-Bojanowska, A, Komosa, M, and Gill, J. 1991. Influence of pregnancy on diurnal and seasonal changes in cortisol, T, and T₄ levels in the mare blood serum. *Comp. Biochem. Physiol.* 98A:23-30.
- Franks, RC. 1974. Plasma 17-hydroxyprogesterone, 21-deoxycortisol and cortisol in congenital adrenal hyperplasia. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 39: 1099-1102.
- Fulkerson, WJ, Sawyer, GJ, and Gow, CB. 1980. Investigations of ultradian and circadian rhythms in the concentration of cortisol and prolactin in the plasma of dairy cattle. *Aust. J. Biol. Sci.* 33: 557-561.

- Garrick, NA, Hill, JL, Szele, FG, Tomai, TP, Gold, PW and Murphy, DL. 1987. Corticotropin-releasing factor: A marked circadian rhythm in primate cerebrospinal fluid peaks in the evening and is inversely related to the cortisol circadian rhythm. *Endocrinology* 121:1329-1334.
- Geraci, JR and Medway, W. 1973. Simulated field blood studies in the bottlenosed dolphin *Tursiops truncatus*. *J. Wild Dis.* 9: 29-33.
- Gustafson, AW and Belt, WD. 1981. The adrenal cortex during activity and hibernation in the male little brown bat, *Myotis lucifugus lucifugus*: annual rhythm of plasma cortisol levels. *Gen. Comp. Endocrinol.* 44: 269-278.
- Harrison, RJ. 1959 Endocrine organs: hypophysis, thyroid, and adrenal. In: *The biology of marine mammals*. ed. by Andersen, HT. : 349-390pp. Academic Press. New York.
- Hill, M, Lapcik, O, Hampl, R, Starka, L, and Putz, Z. 1995. Radioimmunoassay of three deoxycorticoids in human plasma following HPLC separation. *Steroids* 60: 615-620.
- Hoffsis, GF, Philip, MS, Murdick, W, Tharp, VL, and Adult, K. 1970. Plasma concentrations of cortisol and corticosterone in the normal horse. *Am. J. Vet. Res.* 31: 1379-1387.
- Horn, H and Maschler, I. 1976. Steroid C-21-hydroxylation by dog adrenal microsomes. *Steroids* 28: 405-409.
- Hudson, S, Mullord, M, Whittlestone, WG, and Payne, E. 1975. Diurnal variations in blood cortisol in the dairy cow. *J. Dairy Sci.* 58: 30-33.
- Hunter, J. 1787. Observations on the structure and oeconomy of whales. *Phil. Trans. Roy. Soc. London* 77: 371 – 450.

- Hyne, RH, Lepherd, EE, and Van Everbrock, JL. 1982. Clinical significance of hematologic examinations of the dolphin (*Tursiops* sp.) in captivity. *J. Zoo. Anim. Med.* 13: 95-100.
- Ingram, JR, Crockford, JN, and Matthews, LR. 1999. Ultradian, circadian and seasonal rhythms in cortisol secretion and adrenal responsiveness to ACTH and yarding in unrestrained red deer (*Cervus elaphus*) stags. *J. Endocrinol.* 163: 289-300.
- Irvine, CHG and Alexander, SL. 1994. Factors affecting the circadian rhythm in plasma cortisol concentrations in the horse. *Domest. Anim. Endocrinol.* 11: 227-238.
- Janssens, CJG, Helmond, FA, and Weigant, VM. 1995. The effect of chronic stress on plasma concentrations in cyclic female pigs depends on the time of day. *Domest. Anim. Endocrinol.* 12: 167-177.
- Judd, HL and Ridgway, SH. 1977. Twenty-four hour patterns of circulating androgens and cortisol in male dolphins. In: *Breeding dolphin: Present status, suggestion for the future.* eds. by Ridgway, SH. and Benirscheke, K., Natl. Tech. Info. Serv.: 269-277pp.
- Kawamura, K and Kikuyama, S. 1987. Adrenal gland. In: *Atlas of endocrine organs.* eds. by Matsumoto, A. and Ishii, S., Springer-Verlag: 109-122pp.
- Kerrigan, JK, Veldhuis, JV, Leyo, SA, Iranmanesh, A, and Rogol, AD. 1993. Estimation of daily cortisol production and clearance rate in normal pubertal males by deconvolution analysis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 76:1505-1510.
- Kirby, VL. 1990. Endocrinology of marine mammals. In: *Handbook of marine mammal medicine: Health, disease, and rehabilitation.* ed. by Dierauf, LA: 303-351pp.
- Kjeld, M and Ólafsson, I. 1987. Some biochemical parameters in blood and urine of fin whale (*Balaenoptera physalus*). *Isr. J. Vet. Med.* 43: 117-121.

- Kjeld, M and Theodorsdottir, A. 1991. Some electrolytes, hormones, and other substances in the blood of fin whales of the coast of Iceland. *Naturufraedingurinn* 60: 147-154.
- Klemcke, HG, Nienaber, JA, and Hahn, GL. 1989. Plasma adrenocorticotrophic hormone and cortisol in pigs: effects of time of day on basal and stressor-altered concentrations. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 190: 42-53.
- Knutsson, U, Dahlgren, J, Macus, C, Rosberg, S, Bronnegard, M, Stierna, P, and Albertsson-Wikland, K. 1997. Circadian cortisol rhythms in healthy boys and girls: Relationship with age, growth, body composition, and pubertal development. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 82: 536-540.
- Koopman, HN, Westgate, AJ, Read, AJ, and Gaskin, DE. 1995. Blood chemistry of wild harbor porpoises *Phocoena phocoena* (L.). *Mar. Mam. Sci.* 11: 123-135.
- Lefcourt, AM, Bitman, J, Kahl, S, and Wood, DL. 1993. Circadian and ultradian rhythms of peripheral cortisol concentrations in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 76: 2607-2612.
- Luboshitzky, R. 2000. Endocrine activity during sleep. *J. Pediatr. Endocrinol. Metab.* 13:13-20.
- MacArthur, E and O'Donnell, VJ. 1967. The formation of 21-deoxycortisol by human adrenal tissue. *J. Endocrinol.* 37: 235-236.
- 前田敬一郎. 1997. 「ストレスという概念とその広がり」, 『ストレスとホルモン』: pp. 1-10, 日本比較内分泌学会編, 学会出版センター, 東京.
- Maes, M, Mommen, K, Peeters, D, D'Hondt, P, Ranjant, R, De Meyer, F, and Scharpe, S. 1997. Components of biological variation, including seasonality in blood

concentrations of TSH, TT₃, FT₄, PRL, cortisol and testosterone in healthy volunteers. *Clin Endocrinol (Oxf)* 46: 587-598.

Maschler, I, Salzberger, M, and Finkelstein, M. 1976. Ovarian enzymatic divergence in patients with ovary syndrome excreting urinary pregnanetriolone. *Acta Endocrinol.* 82: 366–379.

Medway, W, Geraci, JR, and Klein, LV. 1970. Hematologic response to administration of corticosteroid in the bottle-nosed dolphin (*Tursiops truncatus*) . *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 157: 563-565.

Miller, WL. 1988. Molecular biology of steroid hormone synthesis. *Endocr. Rev.* 9: 295-318.

Morton, DJ, Anderson, E, Foggin, CM, Kock, MD, and Tiran, EP. 1995. Plasma cortisol as an indicator of stress due to capture and translocation in wildlife species. *Vet. Rec.* 136: 60-63.

Orlov, MM, Mukhlya, AM, and Kulikov, NA. 1988. Hormonal indices in the bottlenosed dolphin *Tursiops truncatus* in the normal conditions and during experimental stress. *Zh. Evol. Biokhim. Fiziol.* 24: 557-563.

Orlov, MM, Mukhlya, AM, and Kuz'min, AA. 1991. Characterization of hormonal and electrolyte changes in the blood of cetaceans after trapping and during experimental stress. *Zh. Evol. Biokhim. Fiziol.* 27: 197-205.

Orth, DN, Island, DP, and Liddle, GT. 1967. Experimental alteration the circadian rhythm in plasma cortisol (17-OHCS) concentration in man. *J. Endocrinol. Metab.* 27:545-555.

Ortiz, RM and Worthy, GAJ. 2000. Effects of capture on adrenal steroid and vasopressin concentrations in free-ranging bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*). *Comp.*

- Biochem. Physiol. A 125: 317-324.
- Parrott, RF, Misson, BH, and De La Riva, CF. 1994. Differential stressor effects on the concentrations of cortisol, prolactin and catecholamines in the blood of sheep. Res. Vet. Sci. 56: 234-239.
- Place, NJ and Kenagy, GJ. 2000. Seasonal changes in plasma testosterone and glucocorticoids in free-living male yellow-pine chipmunks and the response to capture and handling. J. Comp. Physiol. B 170: 245-251.
- Quiring, DP. 1943. Weight data on five whales. J. Mam. 24: 39-45.
- Race, GJ and Wu, HM. 1961. Adrenal cortex functional zonation in the whale (*Physeter catadon*). Endocrinology 68: 156-158.
- 齊藤善親, 丹羽利広, 中内真佐子, 野々田昶, 吉田久, 泉信夫, 市村登寿, 大石多津雄, 国分知子, 神戸川明. 1977. 先天性副腎過形成における血中 17 α -hydroxyprogesterone, 21-deoxycortisol, cortisol 値について. ホルモンと臨床 25: 53-60.
- Sarnya, Z, Veldhuis, JD, Mello, NK, Mendelson, JH, Eros-Sarnyai, M, Mercer, G, Gelles, H, and Kelly M. 1995. The concordance of pulsatile ultradian release of adrenocorticotropin and cortisol in male rhesus monkeys. J. Clin. Endocrinol. Metab. 80:54-59.
- Schimpl, PA, Mendoza, SP, Saltzman, W, Lyons, DM, and Mason, WA. 1999. Annual physiological changes in individually housed squirrel monkeys (*Saimiri sciureus*). Am. J. Primatol. 47: 93-103.
- Shaw, FD, Trout, GR, and McPhee, CP. 1995. Plasma and muscle cortisol measurement as indicators of meat quality and stress in pigs. Meat Sci. 39: 237-246.

- Shimpton, JG and Gardner, MB. 1972. Comparative microscopic anatomy of selected marine mammals. In: Mammals of the sea. ed. by Ridgway, SH, Springfield, IL : 386-392pp.
- Slijper, EJ. 1958. Organ weights and symmetry problems in porpoises and seals. Arch. Neerl. Zool. 13: 97-113.
- St. Aubin, DJ and Geraci, JR. 1988. Capture and handling stress suppresses circulating levels of thyroxine (T₄) and triiodothyronine (T₃) in beluga whales *Delphinapterus leucas*. Physiol. Zool. 6: 170-175.
- St. Aubin, DJ and Geraci, JR. 1989. Adaptive changes in hematologic and plasma chemical constituents in captive beluga whales, *Delphinapterus leucas*. Can. J. Fish. Aqua. Sci. 46: 796-803.
- St. Aubin, DJ and Geraci, JR. 1990. Adrenal responsiveness to stimulation by adrenocorticotrophic hormone (ACTH) in captive beluga whales, *Delphinapterus leucas*. Can. Bull. Fish. Aquat. Sci. 224: 149-157.
- St. Aubin, DJ and Geraci, JR. 1992. Thyroid hormone balance in beluga whales, *Delphinapterus leucas*: Dynamics after capture and influence of thyrotropin. Can. J. Vet. Res. 56: 1-5.
- St. Aubin, DJ, Ridgway, SH, and Wells, RS. 1996. Dolphin thyroid and adrenal hormones: Circulating levels in wild and semidomesticated *Tursiops truncatus*, and influence of sex, age, and season. Mar. Mam. Sci. 12: 1-13.
- Stephens, DB. 1980. Stress and its measurement in domestic animals: A review of behavioral and physiological studies under field and laboratory situations. Adv. Vet. Sci. Comp. Med. 24: 179-210.
- Thomson, CA and Geraci, JR. 1986. Cortisol, aldosterone, and leucocytes in the stress

- response of bottlenose dolphins, *Tursiops truncatus*. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 43: 1010-1016.
- Toutain, PL, Oukessou, M, Autefage, A, and Alcinerie, M. 1988. Diurnal and episodic variations of plasma hydrocortisone concentrations in horses. Domest. Anim. Endocrinol. 5: 55-59.
- Travaglini, P and Faglia, G. 1971. Pregnanetriolone excretion in Stein-Levethal syndrome. Acta Endocrinol. 68: 826-832.
- Thun, R, Eggenberger, E, Zerobin, K, and Luscher, T. 1981. Twenty-four-hour secretory pattern of cortisol in the bull: Evidence of episodic secretion and circadian rhythm. Endocrinology 109: 2208-2212.
- Walker, BR, Best, R, Noon, NP, Watt, GCM, and Webb, DJ. 1997. Seasonal variation in glucocorticoid activity in healthy men. J. Clin. Endocrinol. Metab. 82: 4015-4019.
- Weitzmon, ED, Fukushima, D, Nogeire, C, Roffwarg, H, Gallagher, TF, and Hellman, L. 1971. Twenty-four hour pattern of the episodic secretion of cortisol in normal subject. J. Endocrinol. 33: 14-22.
- White, A, Reyes, A, Godoy, A and Martinez, R. 1991. Effect of transport and racing in ionic changes in thoroughbred race horses. Comp. Biochem. Physiol. 99A: 343-346.
- Wilson, MI, Brown, GM, and Wilson, D. 1978. Annual and diurnal changes in plasma androgen and cortisol in adult male squirrel monkeys (*Saimiri sciureus*) studied longitudinally. Acta Endocrinol. 87: 424-433.

图表

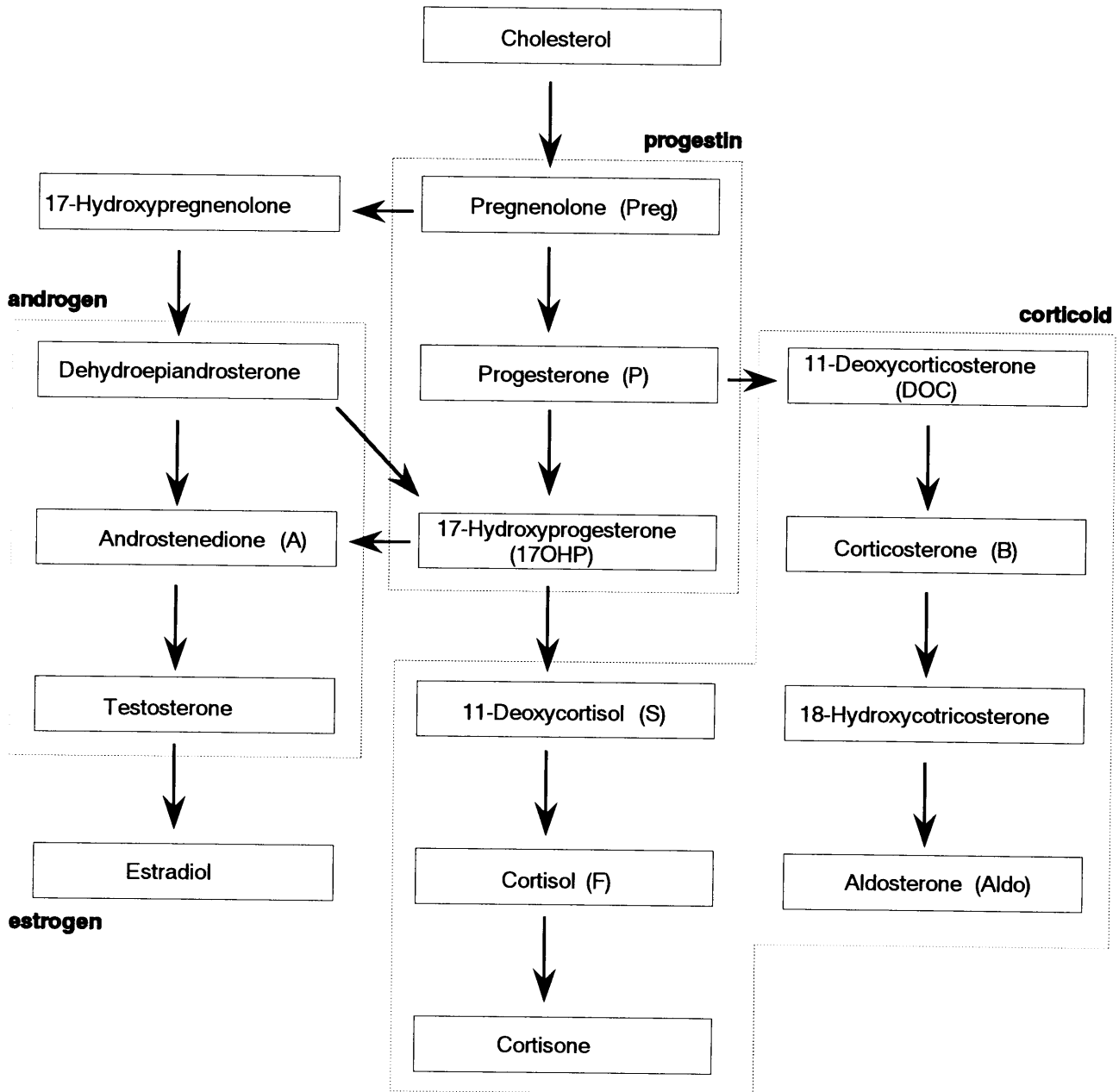


Fig. i. Metabolism of steroid hormones.

substrate

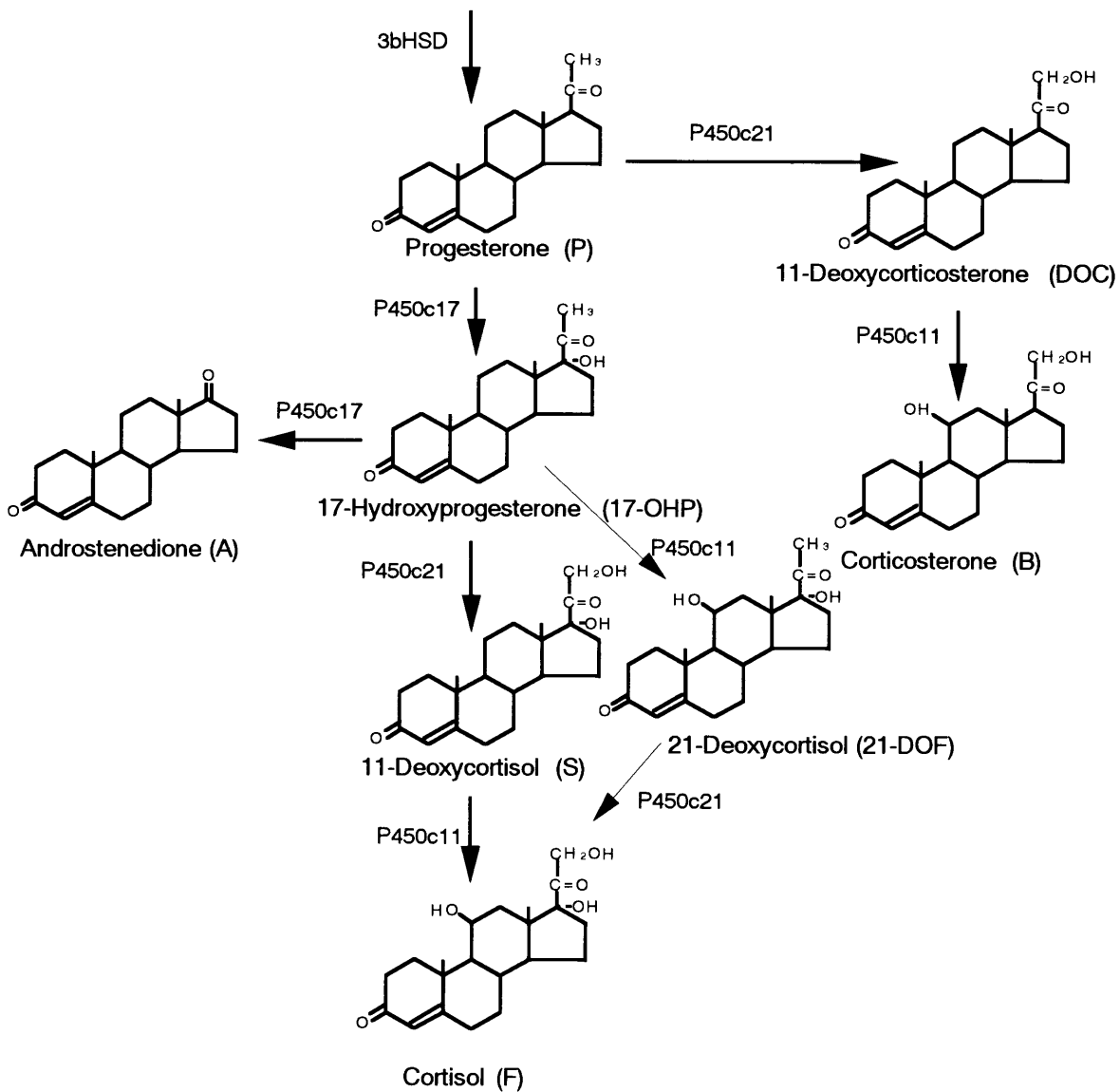
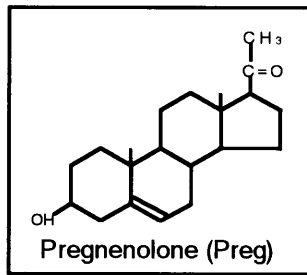


Fig. 1-1 Metabolism of pregnenolone in the adrenal cortex in *Balaenoptera bonaerensis*.

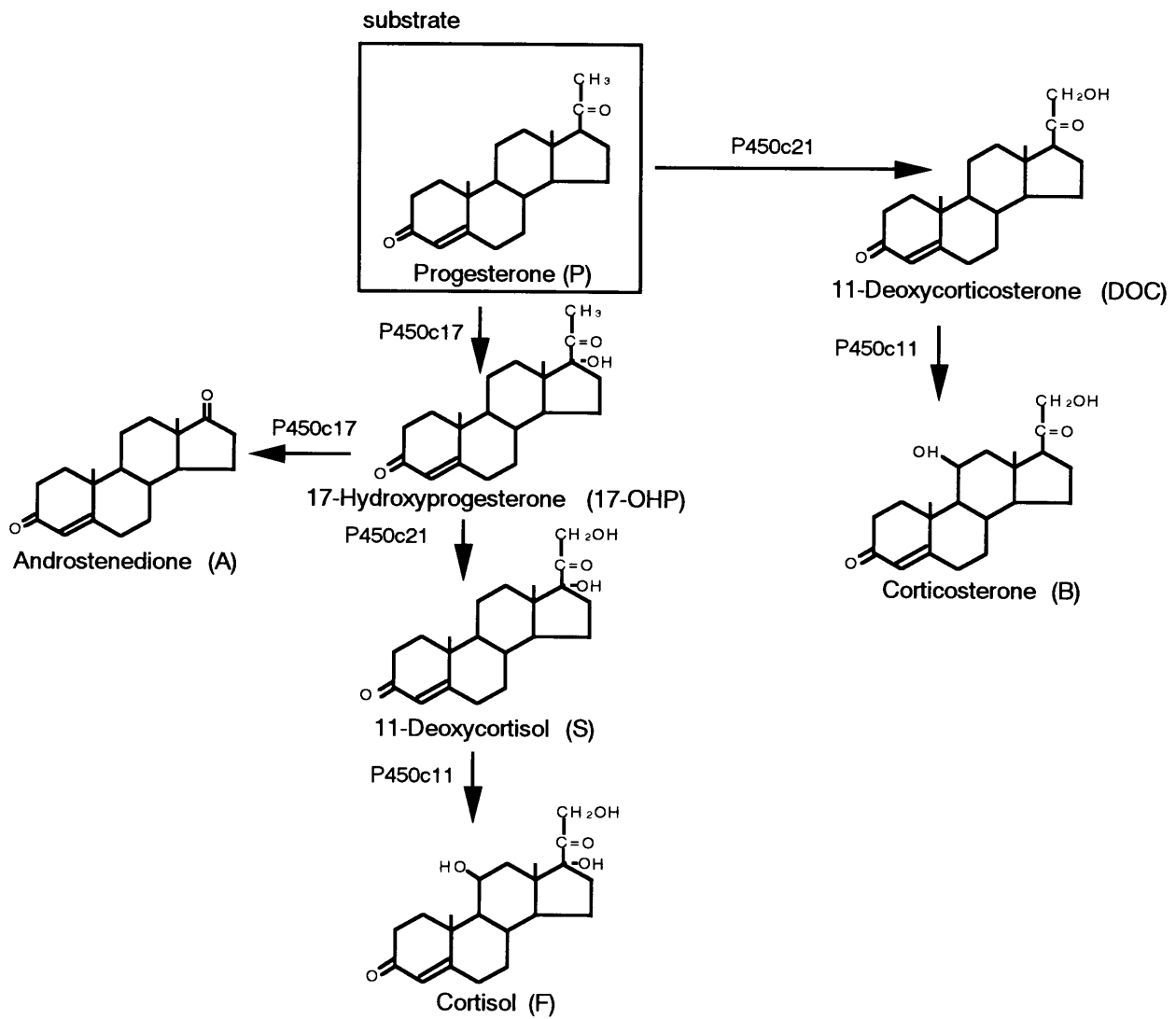


Fig. 1-2 Metabolism of progesterone in the adrenal cortex in *Balaenoptera bonaerensis*.

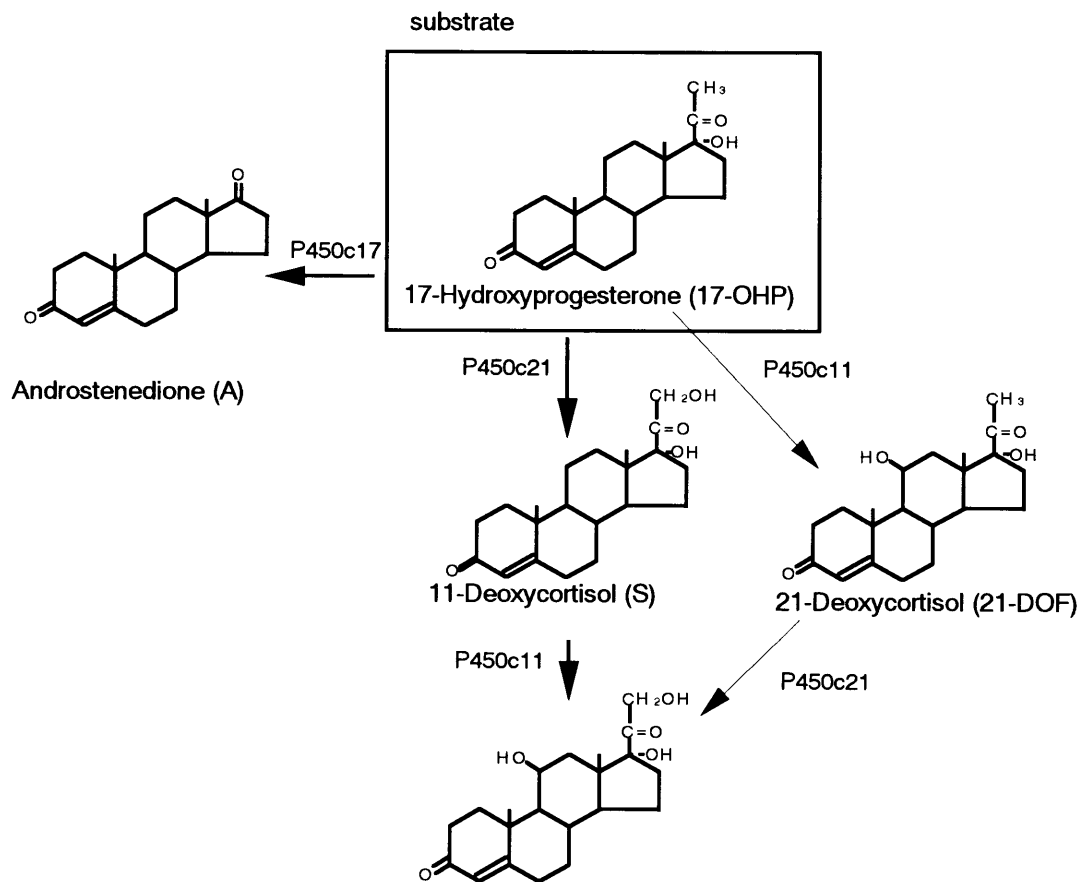


Fig. 1-3 Metabolism of 17-hydroxyprogesterone in the adrenal cortex in *Balaenoptera bonaerensis*.

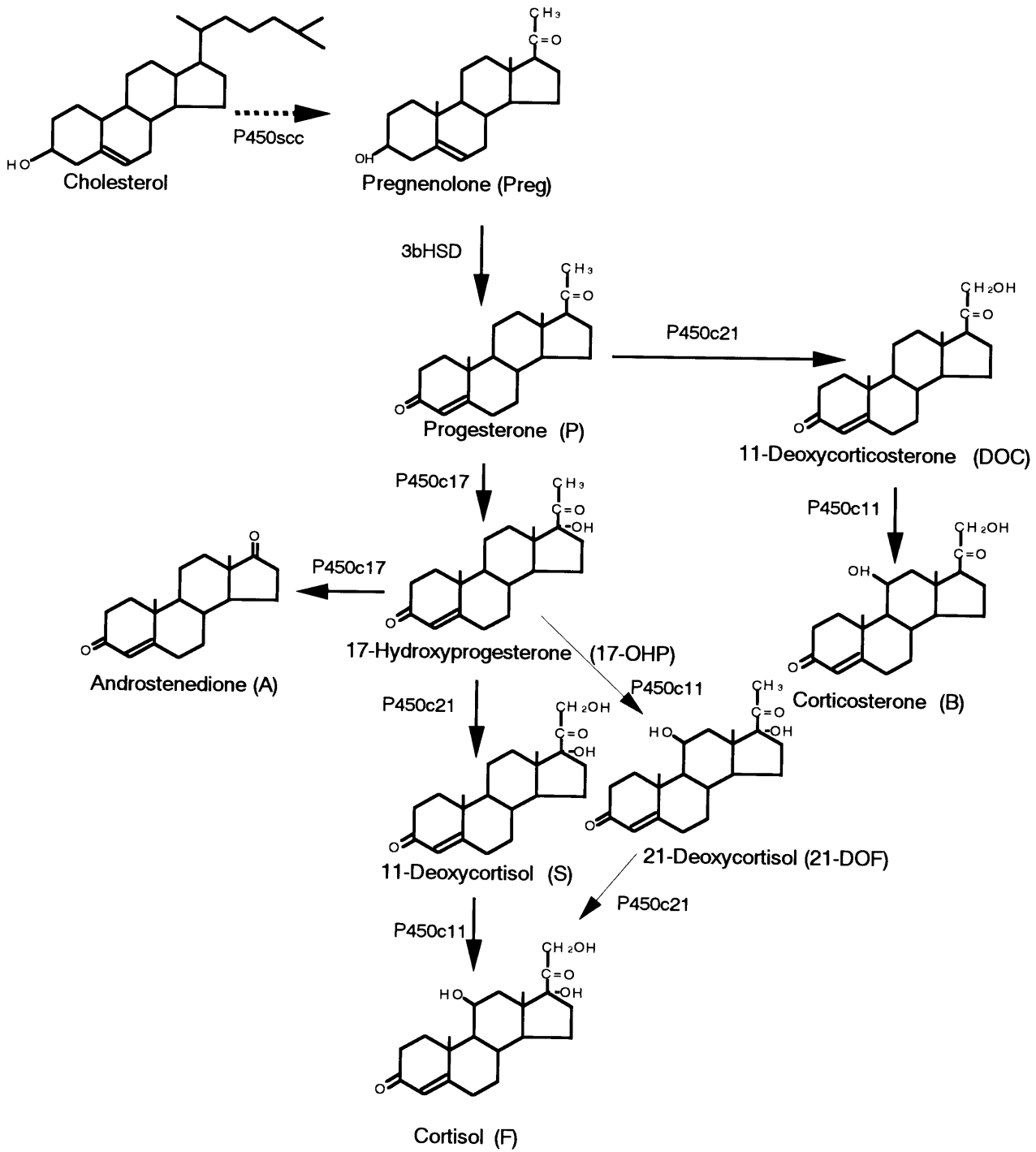


Fig.1-4 Metabolism of corticoids in the adrenal cortex in *Balaenoptera bonaerensis*.

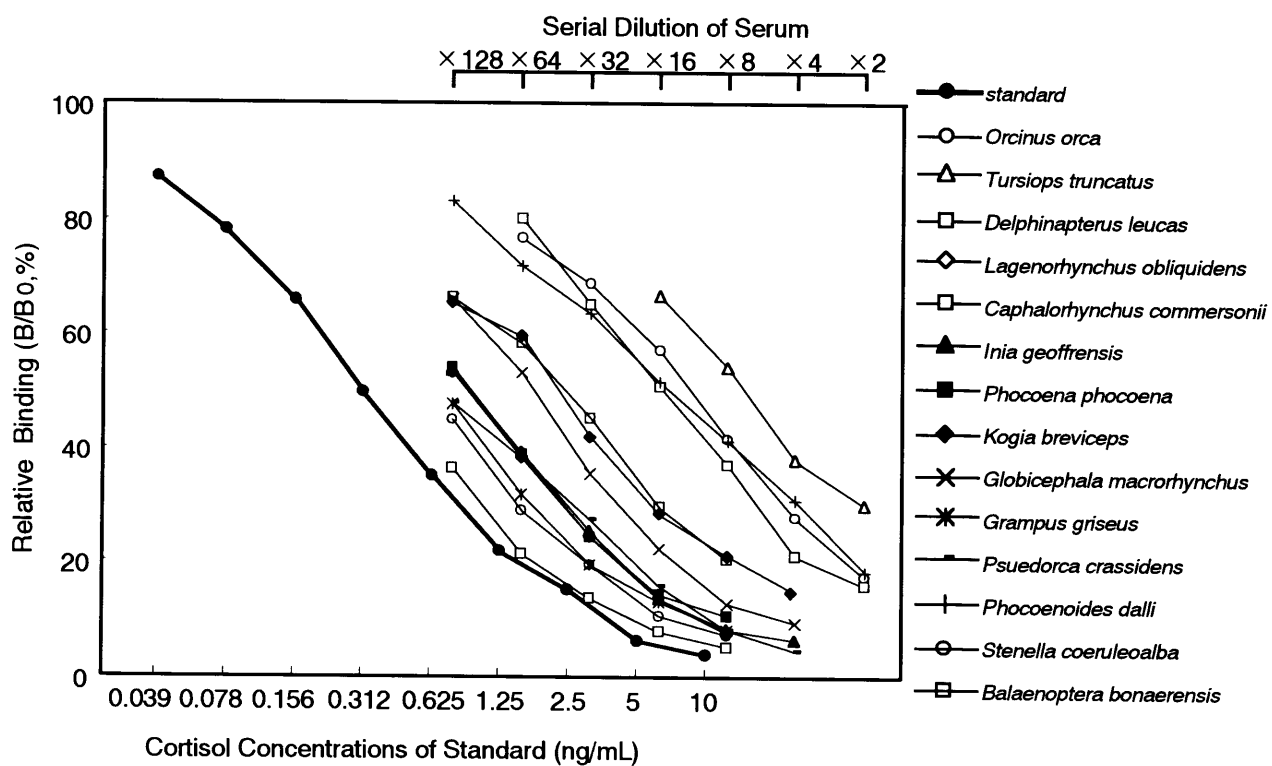


Fig. 2-1 Competition curves for cortisol standard and serum extracts of the 14 cetacean species in the RIA system. The scale for dilution of sera indicates a two-fold serial dilution. Each point represents the average of duplicate determinations. Competition curves for extract and cortisol standard were parallel. The data of *Kogia sima* is not included because of a lack of blood volume.

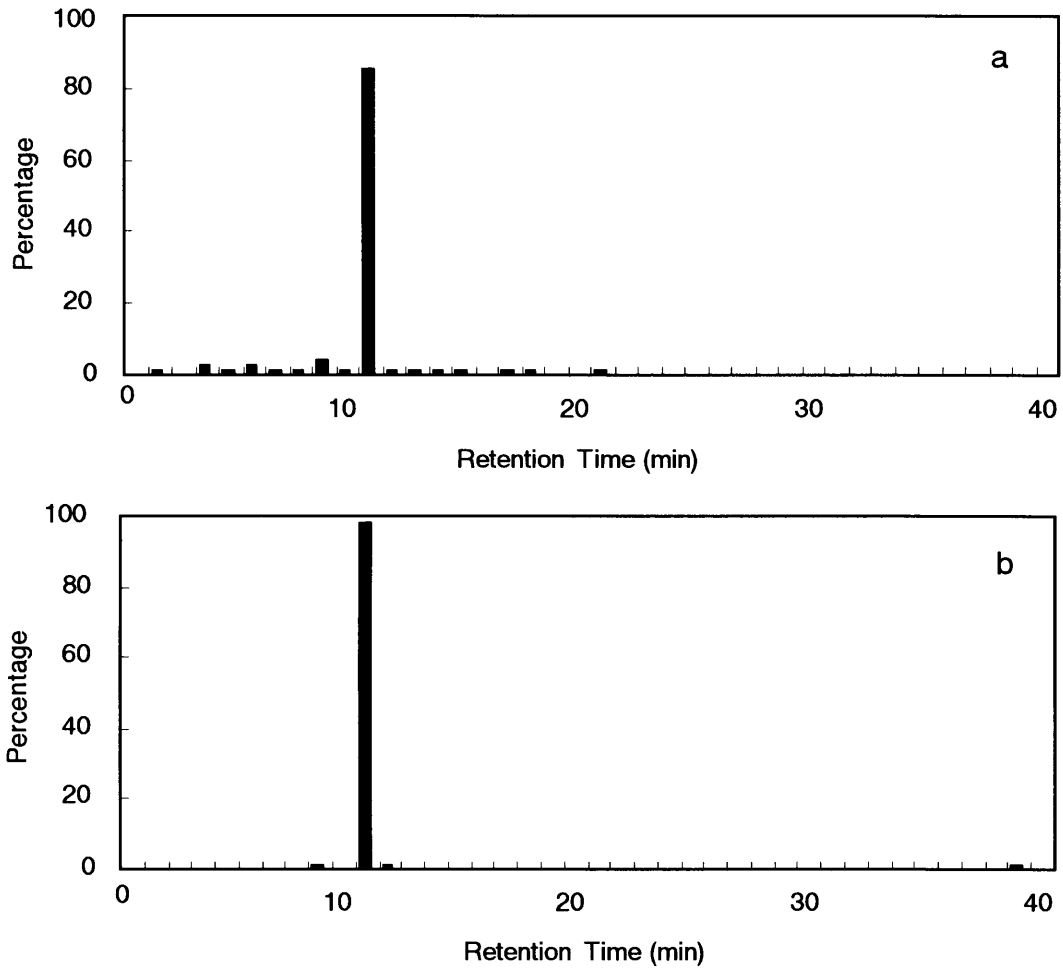


Fig. 2-2 Percentages of cortisol in the HPLC fraction of cortisol for the total concentration in *Phocoena phocoena*. The results using FKA 404 antibody in a male (a) and a female (b).

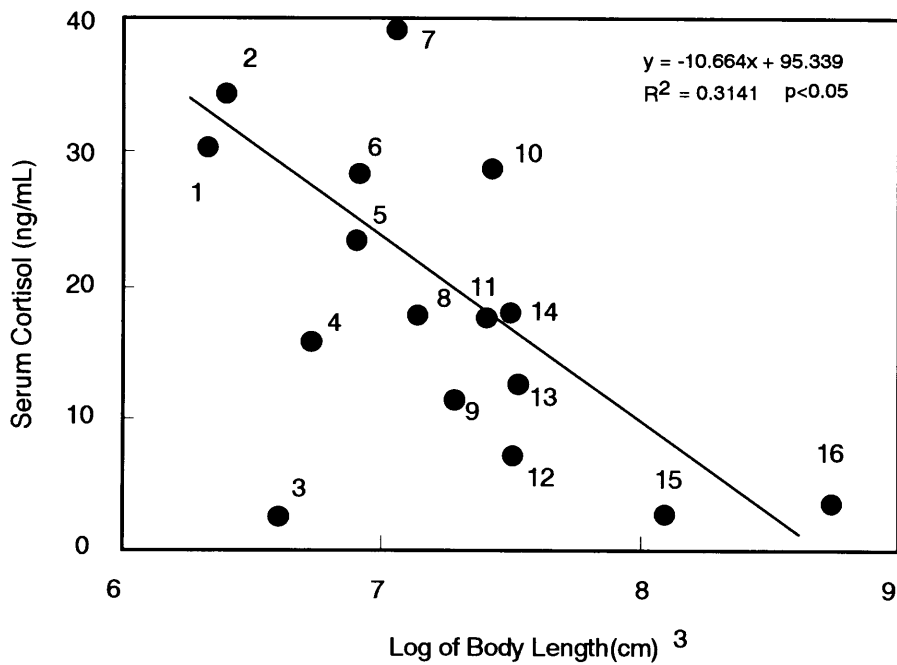


Fig. 2-3 Correlation between average serum cortisol levels and body sizes in 15 cetacean species. 1, *Phocoena phocoena* ; 2, *Cephalorhynchus commersonii* ; 3, *Kogia sima* ; 4, *Phocoenoides dalli* (wild); 5, *Kogia breviceps* ; 6, *Lagenorhynchus obliquidens* ; 7, *Stenella coeruleoalba* (wild); 8, *Inia geoffrensis* ; 9, *Trusiops truncatus* ; 10, *Grampus griseus* ; 11, *Globicephala macrorhynchus* ; 12, *Delphinapterus leucas* ; 13, *Pseudorca crassidens* ; 14, *Globicephala macrorhynchus* (wild); 15, *Orcinus orca* ; and 16, *Balaenoptera bonaerensis* (wild).

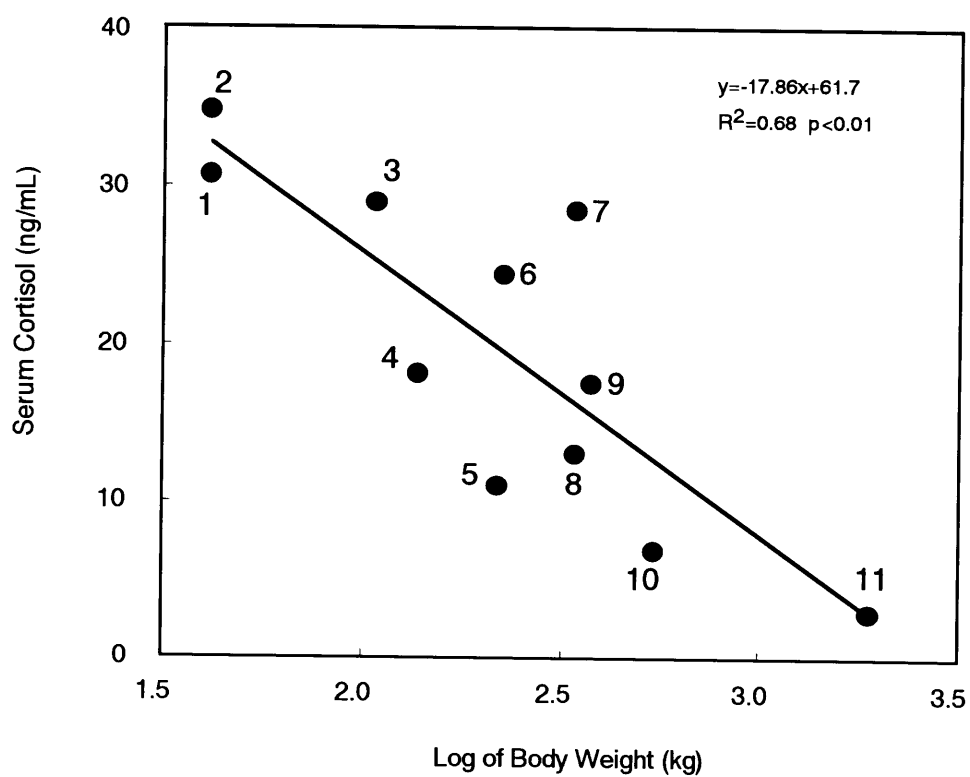


Fig. 2-4 Correlation between average serum cortisol levels and body sizes in captive cetacean species. 1, *Phocoena phocoena* ; 2, *Cephalorhynchus commersonii* ; 3, *Lagenorhynchus obliquidens* ; 4, *Inia geoffrensis* ; 5, *Tursiops truncatus* ; 6, *Kogia breviceps* ; 7, *Grampus griseus* ; 8, *Pseudorca crassidens* ; 9, *Glocephala macrorhynchus* ; 10, *Delphinapterus leucas* ; and 11, *Orcinus orca* .

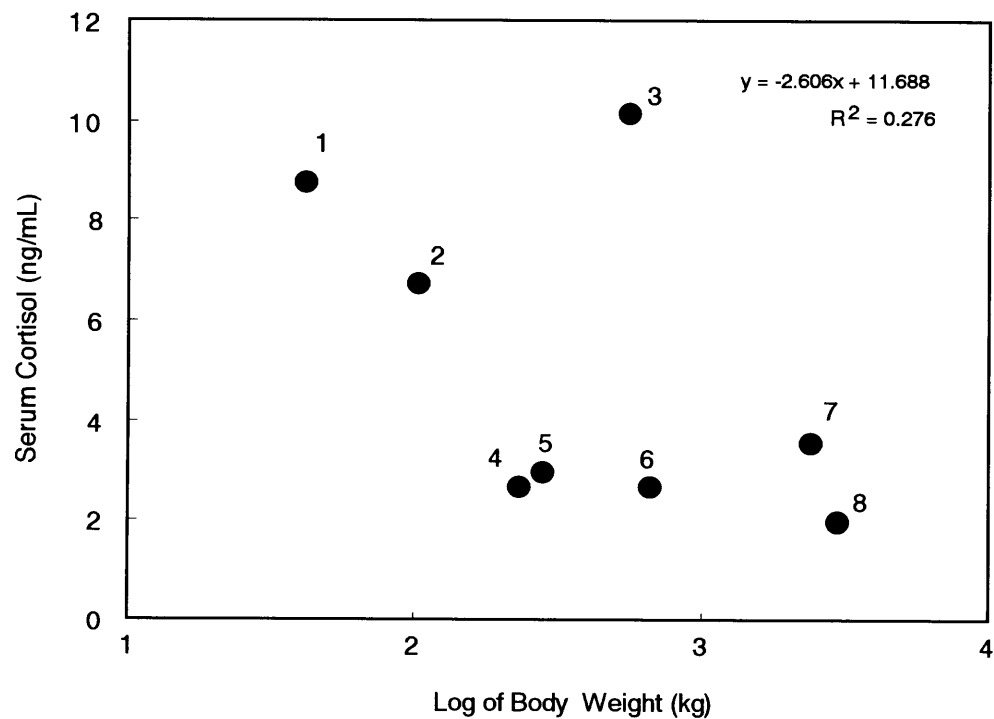


Fig. 2-5 Correlation between average serum cortisol concentrations and body sizes in adult captive cetaceans species in KSW. 1, *Cephalorhynchus commersonii* ; 2, *Lagenorhynchus obliquidens* ; 3, *Delphinapterus leucas* (male); 4, *Tursiops truncatus* (male); 5, *Tursiops truncatus* (female); 6, *Delphinapterus leucas* (female); 7, *Orcinus orca* (female); and 8, *Orcinus orca* (male).

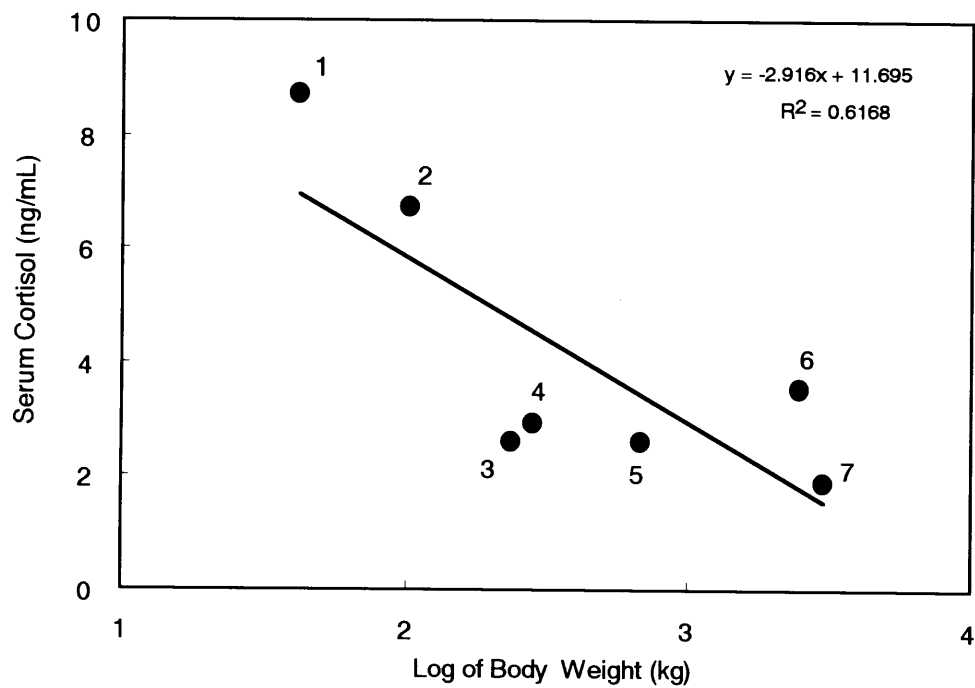


Fig. 2-6 Correlation between average serum cortisol concentrations and body sizes in captive cetaceans in KSW. Data from a male white whale was excluded. 1, *Cephalorhynchus commersonii*; 2, *Lagenorhynchus obliquidens*; 3, *Tursiops truncatus* (male); 4, *Tursiops truncatus* (female); 5, *Delphinapterus leucas* (female); 6, *Orcinus orca* (female); and 7, *Orcinus orca* (male).

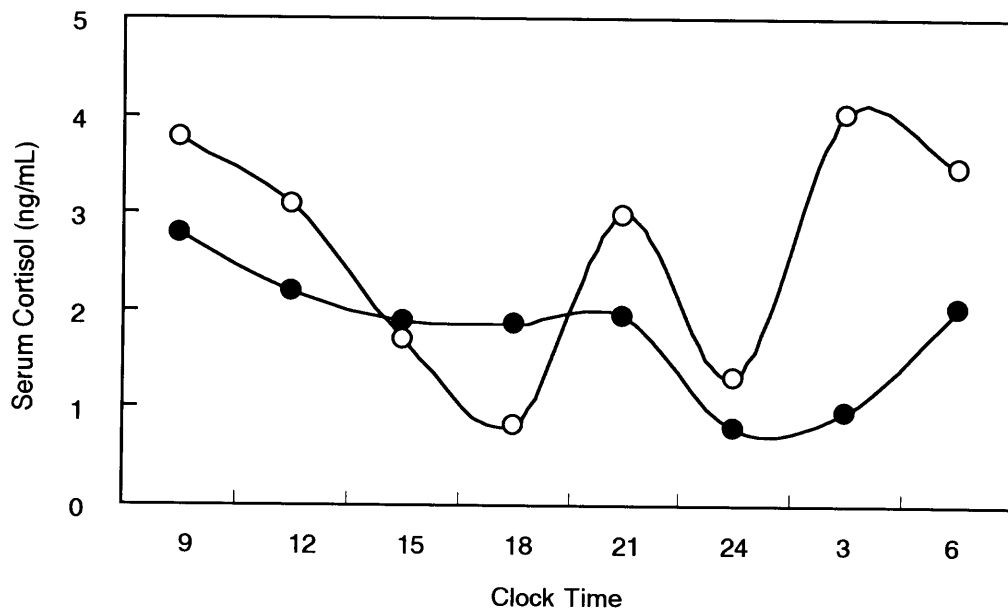


Fig. 2-7 Diurnal changes in serum cortisol concentrations in *Orcinus orca*. Filled circles indicate values in a male and open circles indicate values in a female. The curve line shows a rhythm based on the average concentrations.

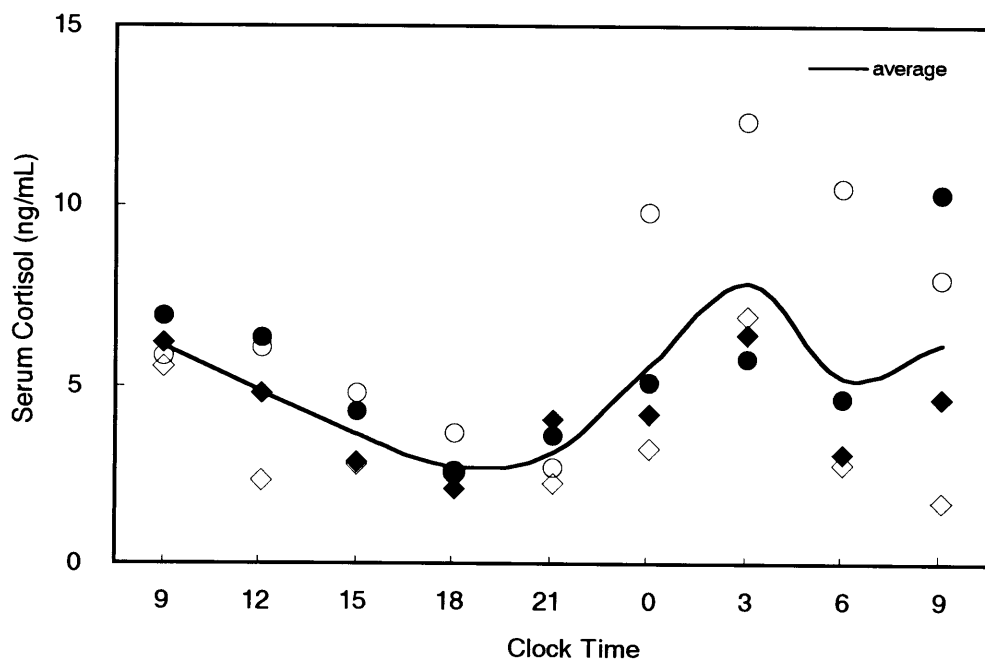


Fig. 2-8 Diurnal changes in cortisol concentrations in *Tursiops aduncus*. Circles show cortisol concentrations for male 1 and diamond shapes show those for male 2. The curve shows a change of average concentrations. Open symbols of both individuals show concentrations in 8th June and filled symbols show it in 15th June.

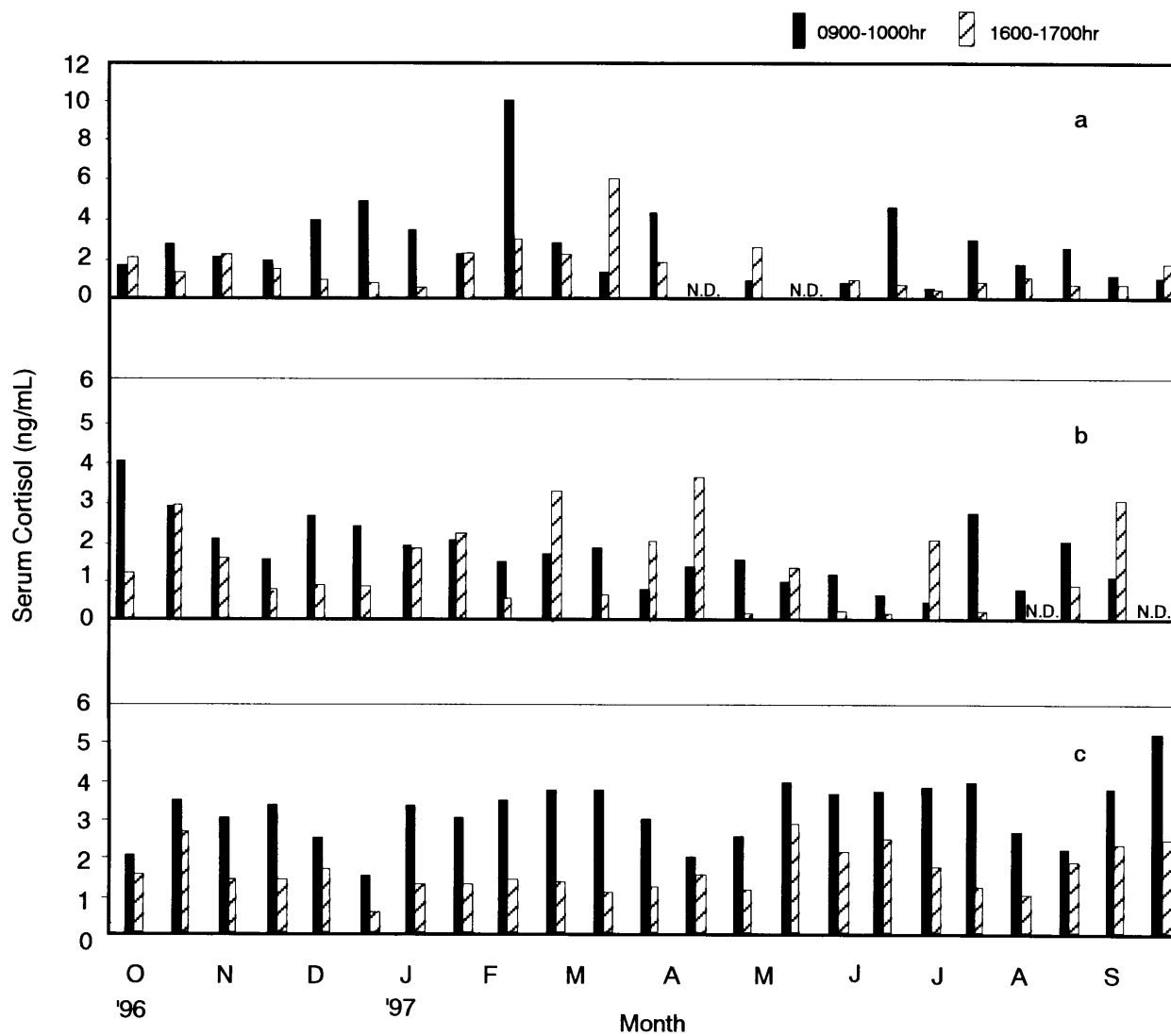


Fig. 2-9 Annual changes in the serum cortisol concentrations in three *Orcinus orca* (a, male1; b, male 2; and c, female). Filled columns indicate values in the morning (9:00-10:00) and striped columns indicate values in the evening. N.D. means not detected.

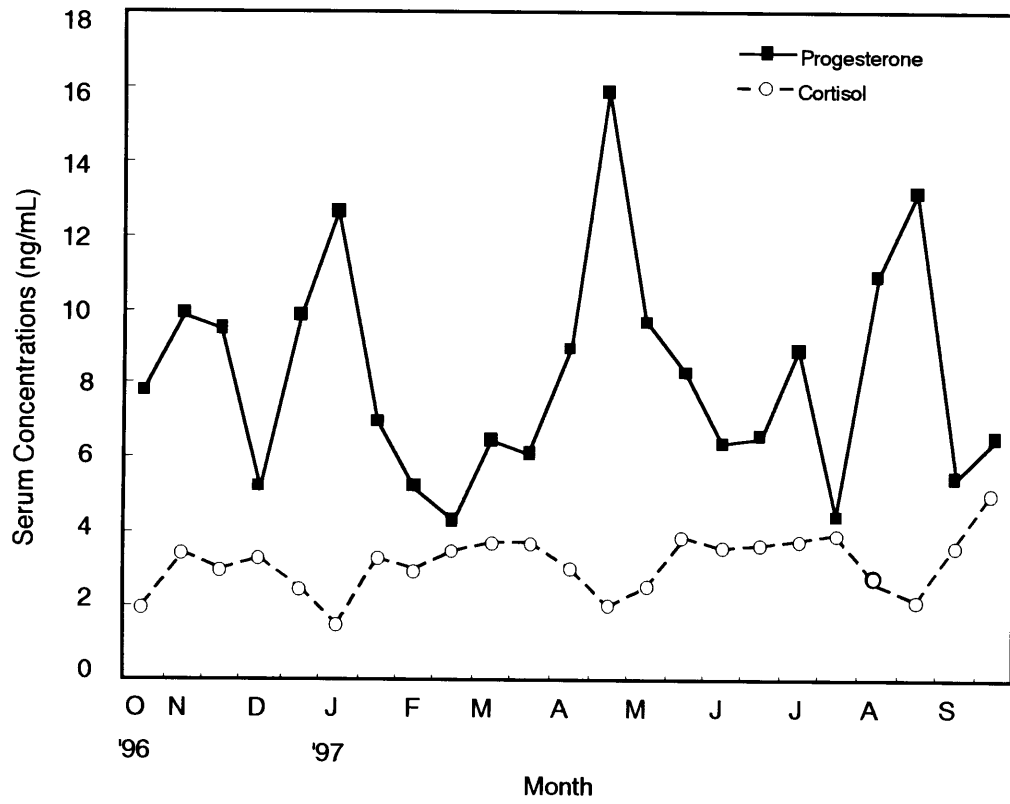


Fig. 2-10 Annual changes in serum cortisol and progesterone concentrations in a female *Orcinus orca*.

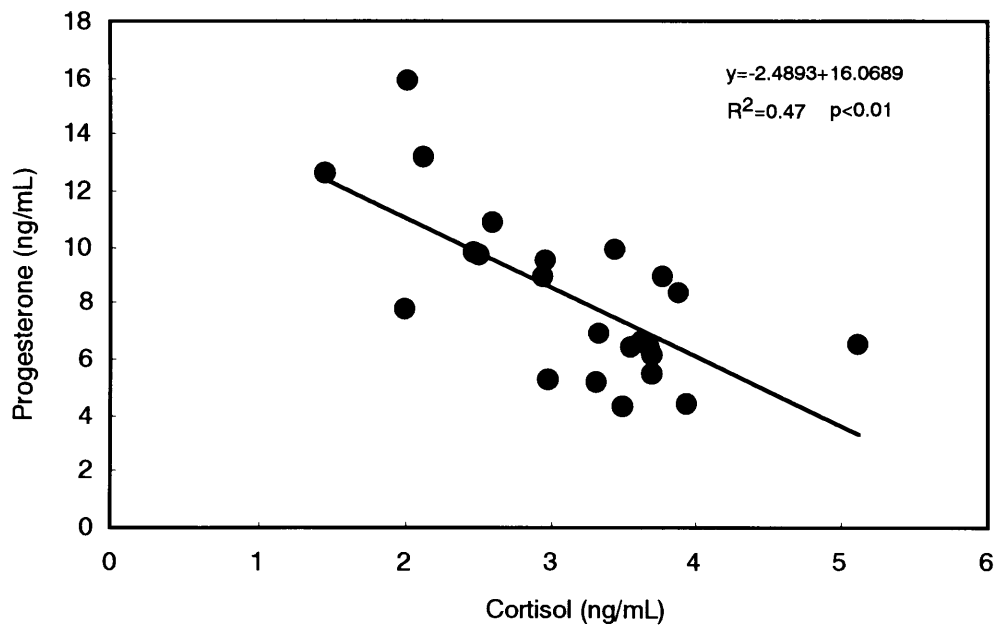


Fig. 2-11 Correlation between serum cortisol and progesterone in a female *Orcinus orca*.

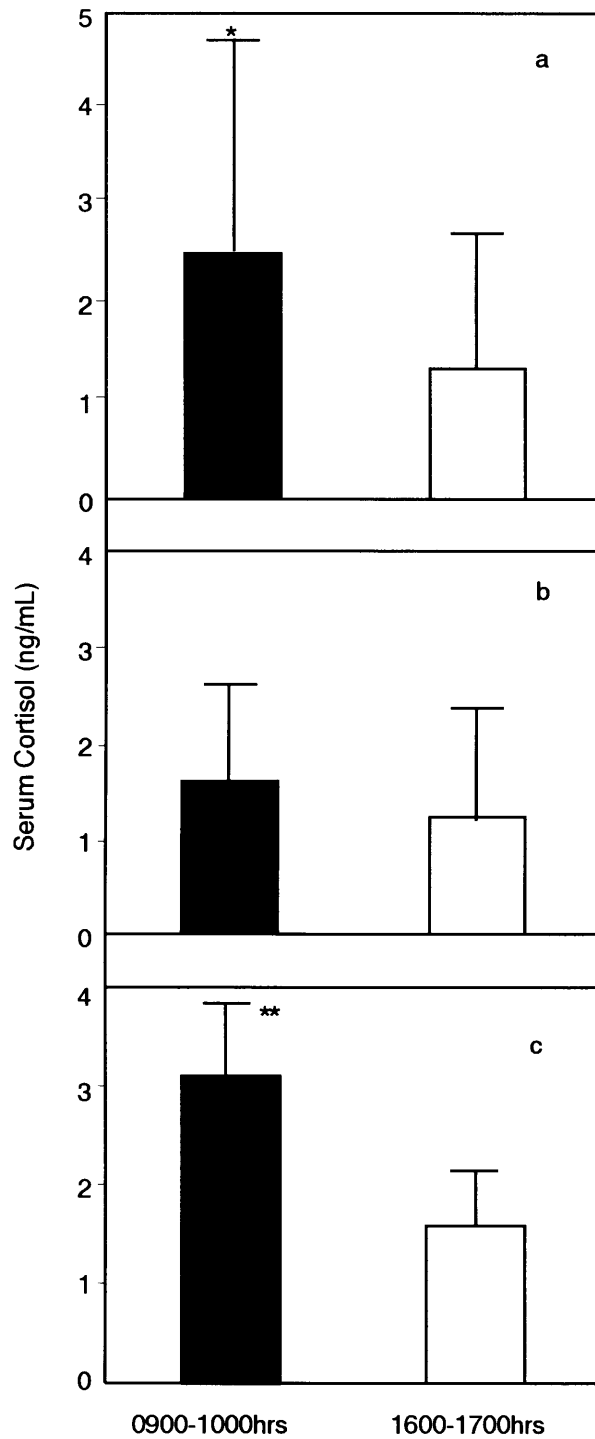


Fig. 2-12 Average serum cortisol concentrations for a year in three *Orcinus orca* (a, male1; b, male 2; and c, female). Filled columns indicate the average values in the morning and open columns indicate those in the evening. Astarisks above columns indicate significant difference between values in the morning and in the evening (*p<0.05, **p<0.01).

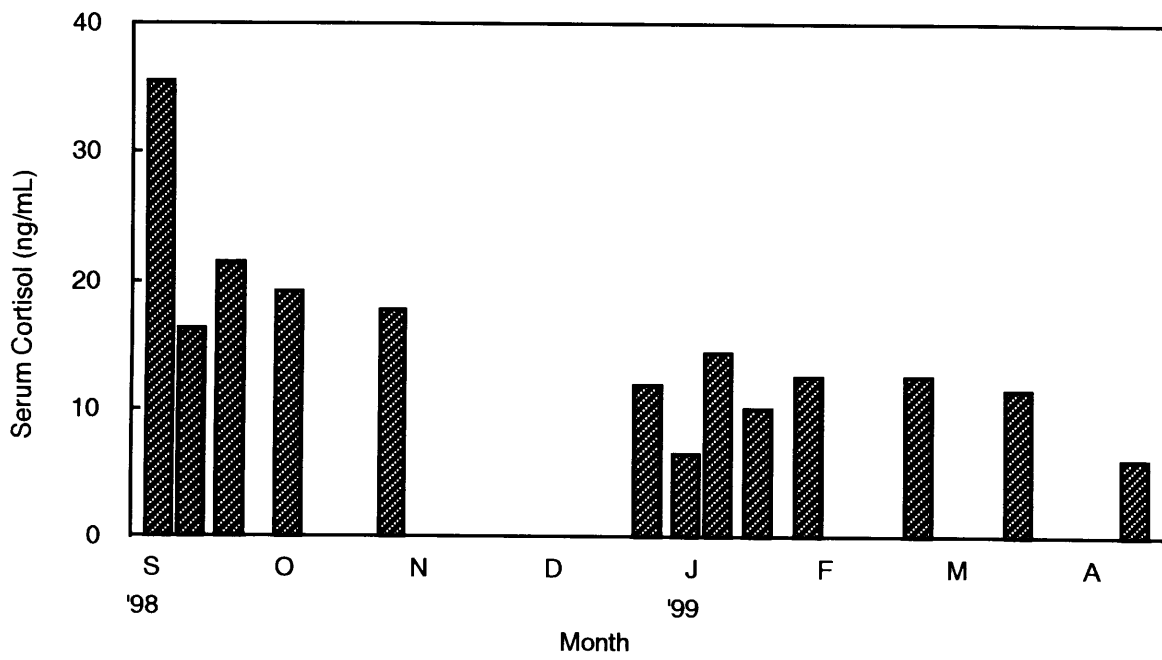


Fig. 2-13 Changes in serum cortisol concentrations after transport into an aquarium in *Steno bredanensis*.

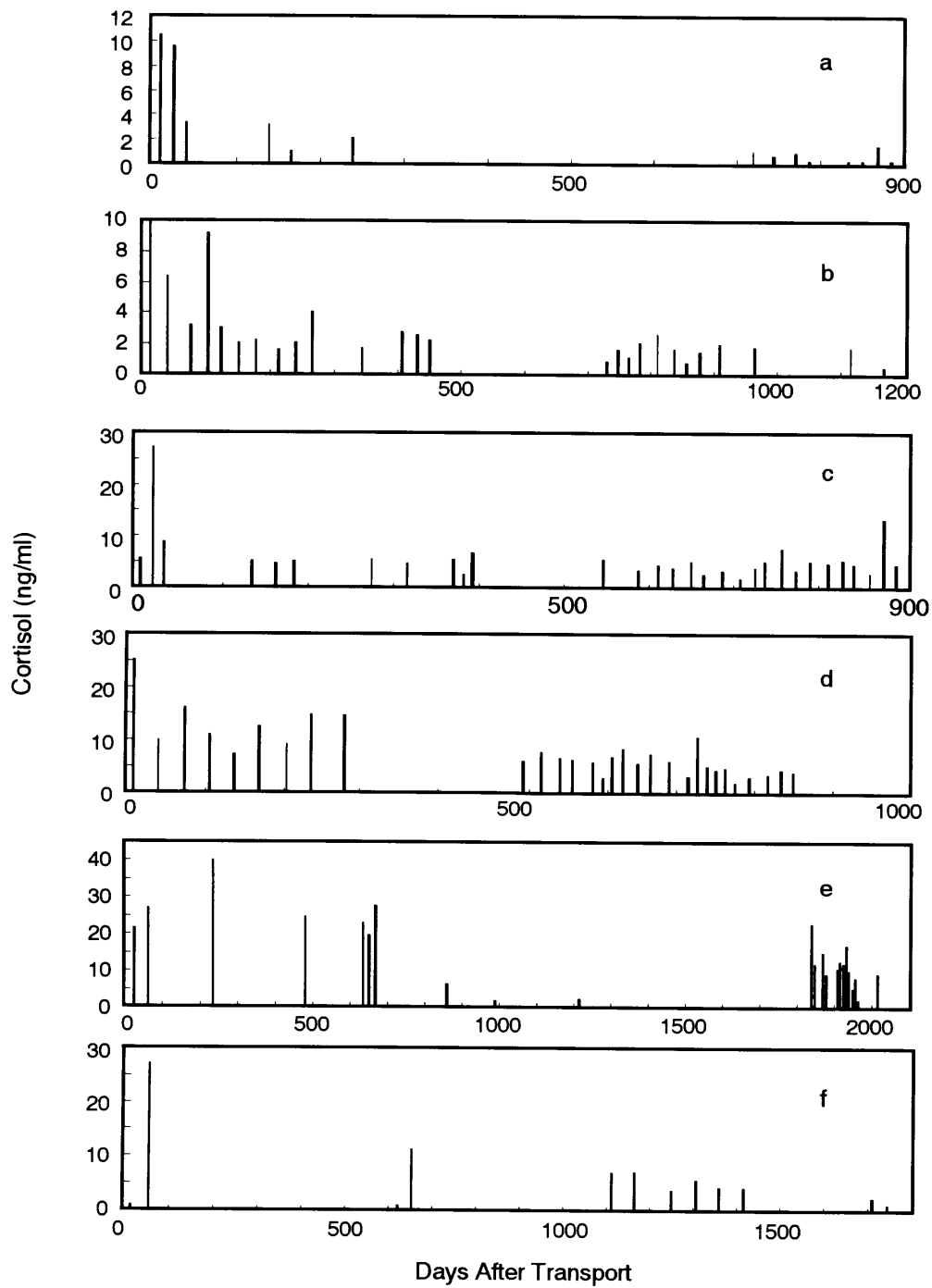


Fig. 2-14 Changes in serum cortisol levels after transport into captivity in *Orcinus orca* (a: male, b: female), *Delphinapterus leucas* (c: male, d: female), and *Tursiops truncatus* (e: male, f: female).

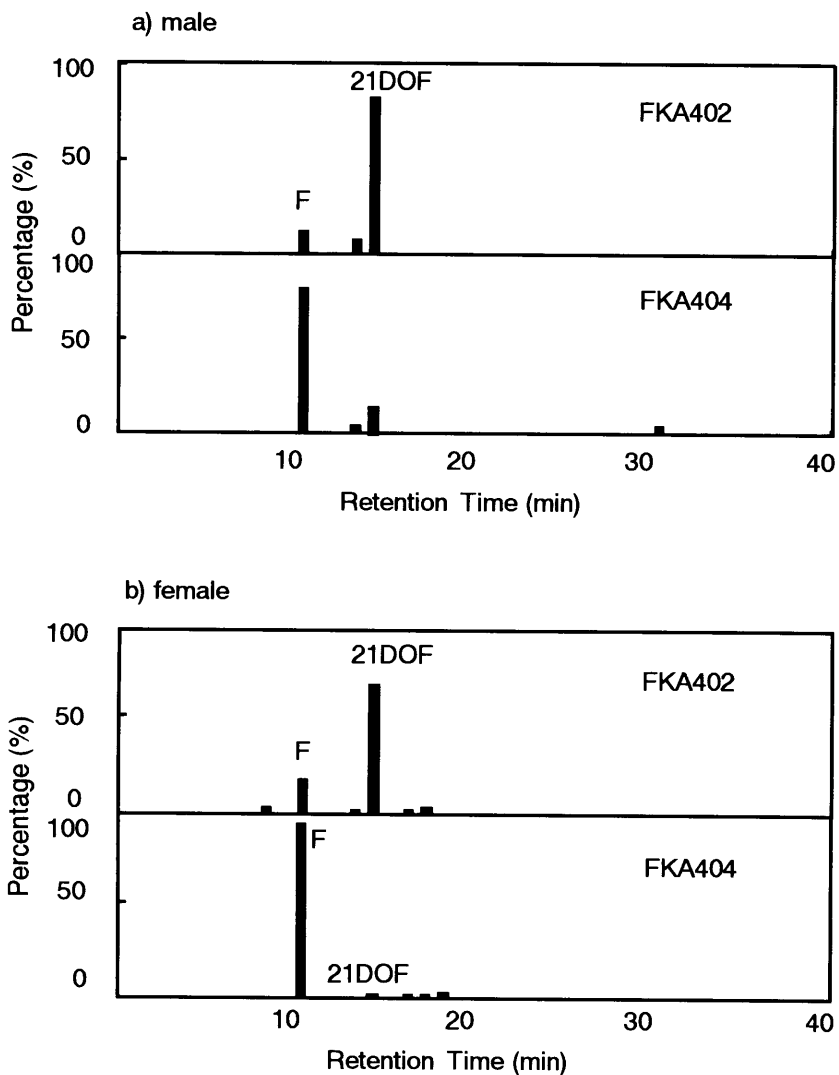


Fig. 3-1 Percentages of cortisol in each HPLC fractions to the total concentration in *Delphinapterus leucas*. The upper rows show the results using FKA 402 and the lower rows show the results using FKA 404 in a male (a) and female (b). These results demonstrate that FKA 402 crossreacts to 21-deoxycortisol.

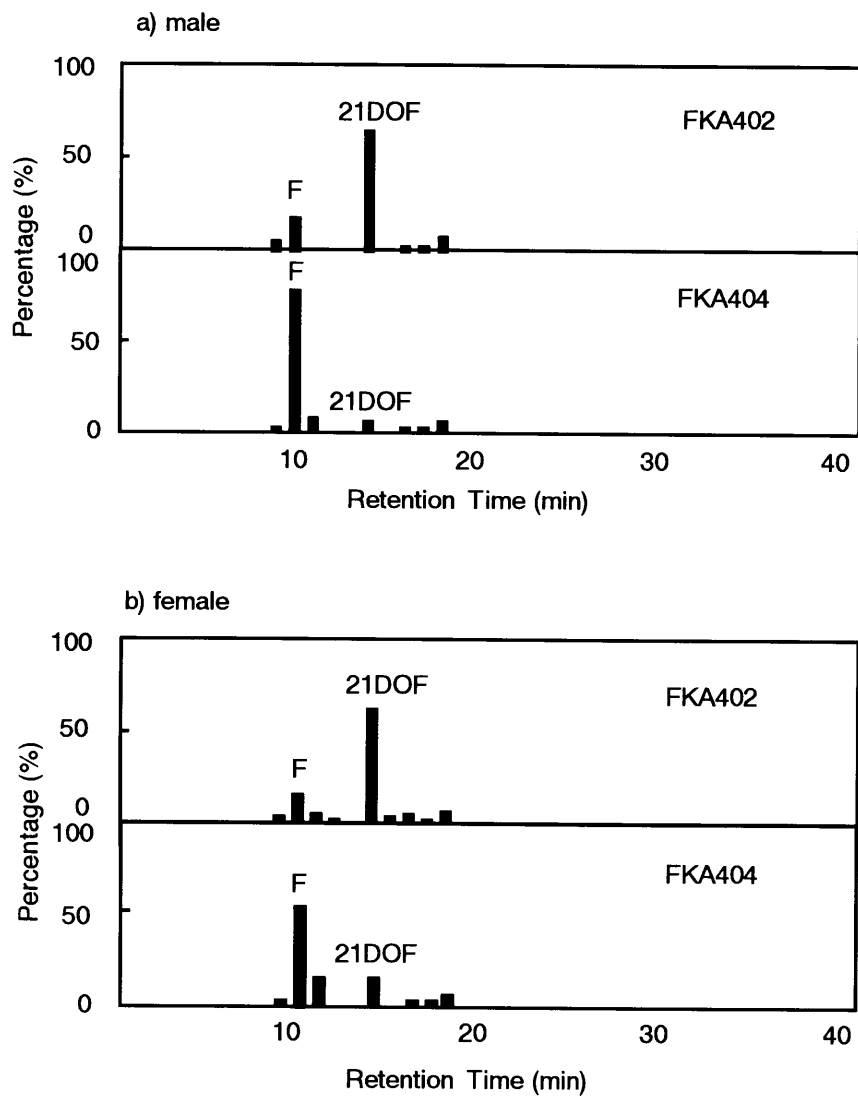


Fig. 3-2 Percentages of cortisol in each HPLC fraction to the total concentration in *Balaenoptera bonaerensis*. The upper rows show the results using FKA 402 and the lower rows show the results using FKA 404 in a male (a) and female (b). These results demonstrate that FKA 402 crossreacts to 21-deoxycortisol.

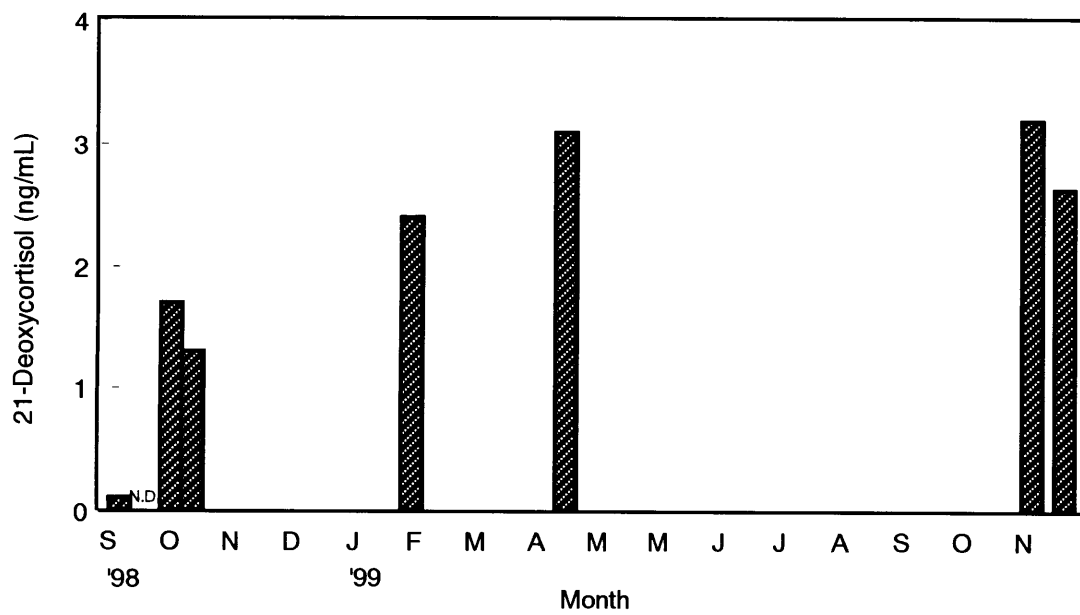


Fig. 3-3 Change in serum 21-deoxycortisol concentrations after transport with time in *Steno bredanensis*. N.D. means not detected.

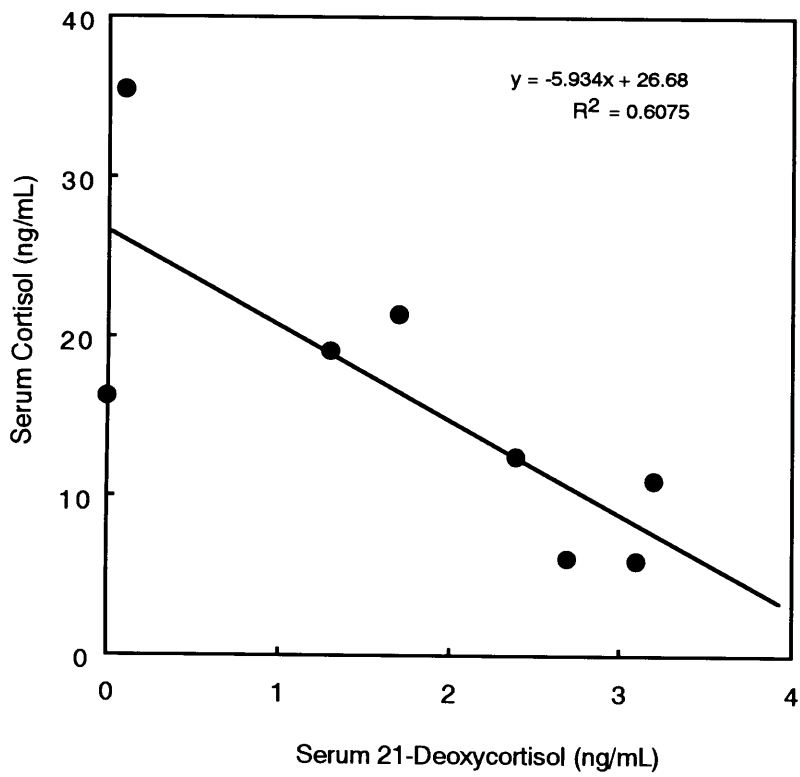


Fig. 3-4 Correlation between serum cortisol and 21-deoxycortisol in *Steno bredanensis*.

Table 1-1 Recrystallization of the radioactive metabolites with the respective authentic steroid for identification.

Metabolite crystallization with	Specific activities of crystal			Sp act before crystallization (No.11)
	1	2	3	
Androstenedione	542	485	474	439
17-Hydroxyprogesterone	1694	1484	1407	1222
Cortisol	636	611	538	531
11-Deoxycortisol	2018	2010	2045	2099
Corticosterone	3574	3626	2108	3111
Deoxycorticosterone	2713	2146	3387	2046
21-Deoxycortisol	211	228	316	274

Table 1-2 Metabolism of pregnenolone in the adrenal cortex of *Balaenoptera bonaerensis*.

Metabolite	Percentage *
Unchanged	
Pregnenolone	4.1
Progesterone	10.7
17-Hydroxyprogesterone	1.1
11-Deoxycortisol	10.2
Cortisol	3.2
11-Deoxycorticosterone	7.6
Corticosterone	2.8
Androstenedione	4.0
21-Deoxycortisol	0.2

* % for total count of substrate.

Table 1-3 Metabolism of progesterone in the adrenal cortex of *Balaenoptera bonaerensis*.

Metabolite	Percentage *
Unchanged	
Progesterone	20.3
17-Hydroxyprogesterone	2.2
11-Deoxycortisol	15.8
Cortisol	1.6
11-Deoxycorticosterone	33.7
Corticosterone	11.7
Androstenedione	1.0

* % for total count of substrate.

Table 1-4 Metabolism of 17-hydroxyprogesterone in the adrenal cortex of *Balaenoptera bonaerensis*.

Metabolite	Percentage *
Unchanged	
17-Hydroxyprogesterone	4.8
11-Deoxycortisol	55.5
Cortisol	8.3
Androstenedione	2.8

* % for total count of substrate.

Table 2-1 Serum cortisol concentration, body length (BL), and number of samples in 15 cetacean species examined.

Species	Cortisol (ng/ml)*	Median of cortisol (Range:Min-Max, ng/ml)	Body Length (cm)*	Wild/Captive	n**
<i>Balaenoptera bonaerensis</i>	3.5±3.2	2.5 (N.D.-18.2)	811.70±105.98	Wild	213 (213)
<i>Cephalorhynchus commersonii</i>	34.7±17.1	32.3 (16.1-69.5)	137.83± 1.46	Captive	8 (2)
<i>Delphinapterus leucas</i>	6.8± 5.4	5.2 (0.1-27.7)	324.63± 26.15	Captive	82 (4)
<i>Globicephala macrorhynchus</i>	17.4±13.9	13.9 (1.0-66.1)	310.29± 36.34	Captive	24 (3)
<i>Grampus griseus</i>	28.5±21.4	23.5 (1.8-67.5)	292	Captive	13 (1)
<i>Globicephala macrorhynchus</i>	16.5±12.2	13.1 (4.1-43.8)	328.27± 31.51	Wild	11 (11)
<i>Inia geoffrensis</i>	18.0± 5.9	15.1 (12.7-26.3)	224.00± 2.94	Captive	3 (1)
<i>Kogia breviceps</i>	24.4± 8.5	28.5 (12.5-32.1)	158	Captive	3 (1)
<i>Kogia sima</i>	3.6± 2.6	3.7 (0.1-7.0)	202	Captive	8 (1)
<i>Lagenorhynchus obliquidens</i>	28.9±20.7	25.2 (1.2-139.0)	204.87± 16.40	Captive	171 (15)
<i>Orcinus orca</i>	2.9± 2.9	2.0 (N.D.-18.8)	502.06± 79.48	Captive	317 (7)
<i>Phocoena phocoena</i>	30.6±21.5	24.8 (1.5-109.2)	129.53± 43.51	Captive	21 (4)
<i>Phocoenoides dalli</i>	16.2± 9.9	13.6 (3.1-52.3)	179.51± 12.23	Wild	88 (88)
<i>Psuedorca crassidens</i>	13.0±10.0	11.1 (N.D.-48.4)	325.76± 27.60	Captive	100 (14)
<i>Stenella coeruleoalba</i>	39.9±14.3	37.1 (11.7-83.9)	229.71± 11.10	Wild	63 (63)
<i>Tursiops truncatus</i>	11.0± 9.2	8.7 (N.D.-67.8)	269.70± 21.17	Captive	230 (18)

*mean ±SD.

** Number of samples (number of individuals)

Table 2-2 Percentages of immunoreactivity as cortisol in the HPLC fractions of cortisol to the total concentration in 11 cetacean species using FKA 404 antiserum.

Species	Sex	Wild/Captive	Cortisol (%)
<i>Balaenoptera bonaerensis</i>	M	wild	84.1
	F	wild	70.5
<i>Cephalorhynchus commersonii</i>	M	captive	95.1
<i>Delphinapterus leucas</i>	M	captive	79.9
	F	captive	94.4
<i>Globicephala macrorhynchus</i>	F	wild	100
	F	captive	100
<i>Grampus griseus</i>	F	captive	94.7
<i>Inia geoffrensis</i>	M	captive	92.4
<i>Lagenorhynchus obliquidens</i>	M	captive	98.4
	F	captive	100
<i>Orcinus orca</i>	M	captive	95.1
	F	captive	100
<i>Phocoena phocoena</i>	M	captive	85.7
	F	captive	97.7
<i>Phocoenoides dalli</i>	M	wild	95.7
	F	wild	100
<i>Tursiops truncatus</i>	M	captive	85.8
	F	captive	100

Table 2-3 Serum cortisol concentrations in
Pseudorca crassidens and *Tursiops aduncus*.

Species	Cortisol (ng/mL)*	n**
<i>Pseudorca crassidens</i>		
Total	1.8 ± 0.5	10 (2)
Male	2.2 ± 0.2	5 (1)
Female	1.4 ± 0.5	5 (1)
<i>Tursiops aduncus</i>		
Total	2.6 ± 1.0	25 (5)
Male	2.8 ± 0.9	20 (4)
Female	1.5 ± 0.9	5 (1)

* Mean ± SD

** Number of samples (number of individuals).

Table 3-1 Steroid crossreactivities for FKA402 and FKA404*.

Steroids	FKA402 (%)	FKA404 (%)
cortisol	100	100
21-deoxycortisol	100	11.6
11-deoxycortisol	62.6	48.8
aldosterone	<0.01	<0.01
cortisone	34.5	2.4
corticosterone	3.8	2.9
11-deoxycorticosterone	3.1	0.7
18-hydroxycorticosterone	1	0.07
18-hydroxydeoxycorticosterone	0.4	<0.01

*FKA402: antiserum against cortisol-21-succinil-BSA,
FKA404: antiserum against cortisol-3-(O-carboxymethyl)-oxime-BSA

Table 3-2 Percentages of immunoreactivity as cortisol in the HPLC fractions of cortisol and 21-deoxycortisol (21-DOF) to the total concentration in 11 cetacean species using FKA 402 antiserum.

Species	Sex	Wild/Captive	Cortisol (%)	21-DOF (%)
<i>Balaenoptera bonaerensis</i>	M	wild	19.1	64.0
	F	wild	19.2	64.1
<i>Cephalorhynchus commersonii</i>	M	captive	91.9	0
<i>Delphinapterus leucas</i>	M	captive	11.1	88.9
	F	captive	18.4	70.4
<i>Globicephala macrorhynchus</i>	F	wild	83.5	0
	F	captive	89.5	0
<i>Grampus griseus</i>	F	captive	81.1	0
<i>Inia geoffrensis</i>	M	captive	89.9	4.0
<i>Lagenorhynchus obliquidens</i>	M	captive	81.7	2.2
	F	captive	93.9	0
<i>Orcinus orca</i>	M	captive	68.9	8.1
	F	captive	27.9	72.1
<i>Phocoena phocoena</i>	M	captive	81.4	2.5
	F	captive	76.9	0.8
<i>Phocoenoides dalli</i>	M	wild	45.2	16.9
	F	wild	94.1	0
<i>Tursiops truncatus</i>	M	captive	36.5	37.8
	F	captive	93.3	6.7

付記

慣用名	構造名	略記
Aldosterone	18,11-Hemiacetalof 11 β ,21-dihydroxy-3,20-dioxo-4-pregnen-18-al	Aldo
Corticosterone	11 β ,21-Dihydroxy-4-pregnen-3,20-dione	B
11-Deoxycorticosterone	21-Hydroxy-4-pregnen--3,20-dione	DOC
18-Hydroxycorticosterone	11 β ,18,21-Trihydroxy-4-pregnen-3,20-dione	
18-Hydroxydeoxycorticosterone	18,21-Dihydroxy-4-pregnen-3,20-dione	
Cortisone	17,21-Dihydroxy-4-pregnen-3,20-dione	
Cortisol	11 β ,17,21-Trihydroxy-4-pregnen-3,20-dione	F
11-Deoxycortisol	17,21-Dihydroxy-4-pregnen-3,20-dione	S
21-Deoxycortisol	11 β ,17-Dihydroxy-4-pregnen-3,20-dione	21-DOF
Pregnenolone	3 β -Hydroxy-5-pregnen-20-one	Preg
Progesterone	4-Pregnene-3,20-dione	P
17-hydroxyprogesterone	17 α -Hydroxy-4-pregnene-3,20-dione	17-OHP
Androstenedione	Androst-4-ene-3,17-dione	A