

( 続紙 1 )

京都大学	博士 ( 理学 )	氏名	毛利 恵子
論文題目	Innovation of Non-Invasive Endocrine Assays for Primates in the Wild (野生霊長類の非侵襲的内分泌測定法の開発)		
(論文内容の要旨)			
<p>In this thesis, the applicant, Keiko Mouri, presents her non-invasive methods developed to monitor the reproductive status and endocrine changes of female primates in the wild. Since steroid hormones are excreted in both urine and feces, measuring these in excreta is an effective way to monitor endocrine status. However, the metabolic mechanisms can vary among primate species, steroid hormones, and excreta types. Hence, it is necessary to validate whether the profiles measured in feces and urine accurately reflect the reproductive status and endocrine changes in each species. Moreover, the challenge of stably storing samples arises in remote sites where the utilization of electrical equipment for sample storage can be impractical. Thus, the applicant investigated practical methods for monitoring the reproductive status of wild female primates using samples from captive Japanese macaques and chimpanzees, to validate protocols.</p> <p>First, enzyme immunoassays (EIAs) for estrogen and progesterone metabolites (<math>E_1C</math>, <math>E_3G</math>, and PdG), and adrenal androgen (DHEAS) in Japanese macaques were developed. For fecal sample extraction, aqueous reagents that reduce complex extraction steps were used as extraction reagents instead of volatile organic solvents. The results revealed that fluctuations in <math>E_1C</math> and PdG in extracts using aqueous reagents were consistent with those using volatile organic solvents, indicating that the profiles showed typical ovulatory cycles and pregnancies. Moreover, it was found that <math>E_3G</math> levels in excreta just before parturition increased significantly, suggesting that the increase of <math>E_3G</math> serves as an indicator of parturition in Japanese macaques. The changes in DHEAS were measured in blood, urine, and feces after administering DHEAS to examine the relationship between blood and excreted DHEAS. The results demonstrated a significant correlation between DHEAS levels in blood and excreta, affirming that measuring DHEAS in excreta is a valid alternative for blood samples. In addition, the method for the long-term storage of chimpanzee urine samples was developed by drying them on filter papers without freezing. The comparison of <math>E_1C</math>, PdG, and <math>E_3G</math> concentrations in frozen urine and dried urine on filter paper showed a significant correlation between both storage methods, resulting in accurate estimation of the day of ovulation and detection of pregnancy. Chorionic gonadotropin was detected in dried urine, indicating protein hormones can also be preserved on filter papers over extended periods of time.</p> <p>Finally, these methods were used to examine reproductive status such as puberty, pregnancy, and resumption of the ovulatory cycle post-parturition in long-term study sites of wild primates. The applicant revealed the relationship between facial redness and reproductive status in wild Japanese macaques, and long-term fluctuations in <math>E_1C</math> levels before and after the timing of female dispersal and during maximal sexual skin swelling towards the next pregnancy from parturition in wild bonobos. The applicant's research has been key to revealing the relationship between hormones and behavior in wild primates. The developed DHEAS EIA and filter paper preservation methods contribute to the elucidation of the endocrine status of wild primates during adolescence and post-menopause in the future.</p>			

(続紙 2 )

(論文審査の結果の要旨)

野生の霊長類の生態を理解するためには、その生理状態を知ることが重要である。しかし、野生動物から血液サンプルを採取することはほとんど不可能であり、侵襲性が高い。そのため、排泄物サンプル中のホルモン測定など、非侵襲的な方法が必要である。ところが、血液中のステロイドホルモンのほとんどは、糞便や尿中に排泄される際に代謝され、分子構造が変化しており、その代謝機構は、動物種、ホルモン種、排泄物によって異なる可能性がある。そのため、それぞれの種における生殖状態や内分泌の状態を反映した最適な糞便・尿中の代謝型を見つける必要がある。さらに、電気機器の使用が困難な調査地において、試料をいかに安定的に保存するかも課題である。研究1では、酵素免疫測定法 (EIA) を用いて排泄物中のエストロゲンとプロゲステロンの代謝物を測定するための簡便な非アルコール抽出法をニホンザルを用いて開発した。糞便抽出試薬は有機溶媒ではなく水性試薬を使用し、有機溶媒を用いた抽出方法との比較を行った。その結果、本研究の開発した簡便な方法が生殖状態の正確なモニターに有効であることが示された。さらに、ヒトで妊娠時に大量に分泌されるエストリオールの測定系を開発し、ニホンザルの糞尿からの測定が初めて可能となった。研究2では、主に副腎から分泌されるデヒドロエピアンドロステロンおよびその硫酸塩 (DHEA、DHEAS) を測定する酵素免疫測定法を開発し、ニホンザルの血中と糞尿中DHEAS の関係を調べた。その結果、血中と糞尿中の動態には有意な差がなく、排泄物中のDHEAS の測定は血中の有効な指標となることがわかった。さらに、エストロゲンとプロゲステロンの代謝物を測定した結果、投与されたDHEAS がエストロゲンとプロゲステロンのレベルに影響を与えることが示された。研究3では、チンパンジーの尿を凍結せずに濾紙上で乾燥させることにより、長期保存する方法を開発し、有効性を検証した。凍結保存した尿試料と、ろ紙上で1年間乾燥した尿試料のエストロゲンとプロゲステロン代謝物、クレアチニン測定値を比較したところ両保存方法に正の有意な相関があり、本研究が開発した方法の有効性が示された。絨毛性性腺刺激ホルモン (CG) も検出され、チンパンジーの妊娠の判断基準となりえることが示された。本研究が開発した方法を用いて、幸島の野生のニホンザルやコンゴ民主共和国ワンバのボノボを対象に、妊娠や、排卵サイクル、発達に伴うエストロゲンの長期変動をモニターし、生殖生理状態と行動との関係を明らかにすることができた。本研究成果は、野生の霊長類を対象とした「field endocrinology」という新しい分野による生殖生理と行動を結びつける新しい研究を可能にするものである。

よって、本論文は博士 (理学) の学位論文として価値あるものと認める。また、令和6年1月22日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行い、その結果をもって令和6年1月24日に霊長類学・野生動物系教員会議で合格と認めた。

要旨公表可能日：                    年                    月                    日以降