

# 血液を用いてヒグマの年齢が推定可能に！

～クマ類の生態学的研究や保護管理への貢献に期待～

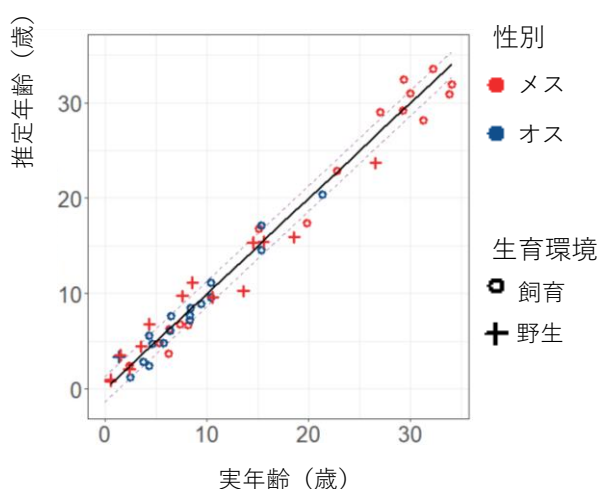
## ポイント

- ・ 飼育、野生ヒグマの血液を用いて DNA メチル化レベルに基づく新規年齢推定法を確立。
- ・ 少量の血液があれば高い精度で年齢推定が可能。
- ・ クマ類の生態学的研究や保護管理への貢献に期待。

## 概要

北海道大学獣医学部（当時）の中村汐里氏、同大学大学院獣医学研究院の下鶴倫人准教授、京都市動物園・京都大学野生動物研究センターの伊藤英之特任研究者らの研究グループは、ヒグマにおける血液 DNA のメチル化レベルに基づく新規年齢推定法を確立しました。

DNA メチル化とは遺伝情報を持つ DNA への修飾機構の一つであり、DNA 塩基配列の変化を伴わずに遺伝子発現などに影響を及ぼします。近年、ヒトを始めとした様々な動物種において、DNA メチル化レベルが年齢とともに変化する DNA 領域があることが明らかになっています。本研究では、年齢が不明な飼育ヒグマ 34 個体、野生ヒグマ 15 個体から血液を採取し、12 領域の DNA メチル化レベルを解析しました。その結果、4 領域において年齢とメチル化レベルの間に強い相関が認められ、それらを利用して年齢推定モデルを作成しました。最も精度が高いモデルは、1 領域（4 ヶ所のメチル化部位を含む）のみを利用したモデルで、推定誤差は約 1 年でした。本研究成果により、血液からヒグマの年齢を高精度で推定可能になりました。従来クマ類では抜歯した歯を用いた年齢推定法が広く用いられてきましたが、本手法はより簡便かつ高精度で、動物への侵襲性が低いという利点があります。本研究成果は、クマ類の生態学的研究や保護管理の一助となるほか、毛や糞を対象とした類似手法の開発、ヒグマ以外のクマ類への応用など、様々な発展が期待されます。なお、本研究成果は、2023 年 3 月 23 日（木）公開の Molecular Ecology Resources 誌に掲載されました。



ヒグマにおける血液 DNA メチル化に基づく年齢推定モデル

(実線は推定年齢=実年齢を、実線と点線の距離は推定年齢と実年齢の差の絶対値の平均を示す)

写真は 10 歳のメスヒグマ (右) と 0 歳の子供 (左)

## 【背景】

野生動物の研究において、個体の年齢情報は生態の解明や保護管理を行う上で非常に重要です。ヒグマは 30 年近く生きる比較的長寿の大型哺乳類ですが、外見から年齢を推定することは困難です。従来、ヒグマの年齢推定には歯根部のセメント質に形成される層を数える方法が用いられてきました。ただし、対象が高齢になるほど推定が困難になることや、歯を抜く必要があるため動物への侵襲性が高いことなどの問題があります。

近年、人をはじめとした様々な動物において、年齢と共に DNA メチル化レベルが変化する DNA 領域があることが報告されています。DNA メチル化とは DNA への修飾機構の一つであり、DNA 塩基配列の変化を伴わずに遺伝子発現などに影響を及ぼすものです。しかしクマ類で同様の研究は行われたことがありませんでした。そこで本研究では、飼育ヒグマと野生ヒグマを対象とし、血液 DNA のメチル化レベルを指標とした新規年齢推定法を確立することを目的としました。

## 【研究手法】

年齢が明らかな 2~34 歳の飼育ヒグマ 34 個体（のぼりべつクマ牧場で飼育）と、知床半島に生息する 0~26 歳の野生ヒグマ 15 個体から、麻酔下で血液を採取しました。血液から DNA 抽出を行い、解析対象である 12 の DNA 領域を PCR で増幅し、パイロシークエンス法でメチル化解析を行いました。得られたデータを基に、統計分析ソフト R を用いて年齢推定モデルを確立しました。さらに、年齢、性別、生育環境の違いが年齢推定モデルの精度に影響を及ぼしているかどうか検証しました。

## 【研究成果】

解析対象とした 12 領域中、4 領域・13 ヶ所のメチル化部位において、年齢とメチル化レベルとの間に強い相関が認められました（図 1）。それらを様々に組み合わせて年齢推定モデルを作成したところ、最も精度が高いモデルは 1 領域・4 ヶ所のメチル化部位を利用したモデルであり、誤差は低値（約 1 年）となりました（概要図参照）。

確立した年齢推定モデルは、性別によらず適用可能であることが分かりました。モデルの精度に影響を与える要因について解析を行ったところ、野生個体の方が飼育個体よりも推定時の誤差が大きい傾向がありました。飼育個体は安定した環境で生活しているのに対し、野生個体は個体により異なる生活を営んでおり、加齢によるメチル化の変化の個体差が大きいと考えられます。また、野生個体では年をとるほどメチル化の変化のスピードが遅くなる傾向がありました。飼育個体は冬も食事を与えられ冬眠をしません、野生個体は冬に約 4 ヶ月冬眠を行います。このため、冬眠が老化を遅らせている可能性が考えられます。

## 【今後への期待】

本研究の成果により、血液を用いて高精度にヒグマの年齢を推定することが可能になりました。この手法は性別にかかわらず、飼育・野生ヒグマどちらにも適用できます。さらに、本手法は従来の歯を用いた年齢推定法と比較して簡便かつ高精度で、動物への侵襲性が低いという利点があります。今後は、死後に採取された血液、他の生息域のヒグマ、ヒグマ以外のクマ類において、本手法が適用可能か検討するとともに、より侵襲性が低く入手可能な毛や糞などの DNA 試料を用いて同様の年齢推定モデルを確立することで、クマ類の生態学的研究や保護管理に大きく貢献できると期待されます。

また、冬眠が老化（=加齢に伴うメチル化の変化）を遅らせている可能性については、いくつかの小型哺乳類において報告があります。クマの冬眠は、体温が数度しか降下しないことや、冬眠中に一

切の摂食・摂水、排糞・排尿を行わないなど、他動物とは全く異なる特徴を有しています。クマにおけるメチル化研究を発展させることにより、冬眠の生物学的意義の一端を明らかにすることができると期待されます。

### 【謝辞】

本研究は、住友財団 基礎科学研究助成 (200561)、京都大学 野生動物研究センター 共同研究助成 (2021-A-16)、科学研究費補助金 課題番号 19K06833 (研究代表者：下鶴)、科学研究費補助金 課題番号 21H02350 (研究代表者：坪田)、科学研究費補助金 課題番号 21H02351 (研究代表者：山崎)、科学研究費補助金 課題番号 22K14910 (研究代表者：伊藤)、科学研究費補助金 課題番号 20H00420 (研究代表者：井上-村山) の支援を受けて実施されました。

### 論文情報

論文名 Age estimation based on blood DNA methylation levels in brown bears (ヒグマにおける血液 DNA メチル化レベルに基づく年齢推定)

著者名 中村汐里<sup>1</sup>、山崎淳平<sup>2,3</sup>、松本直也<sup>4</sup>、井上-村山美穂<sup>5</sup>、斉 惠元<sup>5</sup>、山中正実<sup>6</sup>、中西将尚<sup>6</sup>、柳川洋二郎<sup>7</sup>、佐鹿万里子<sup>1</sup>、坪田敏男<sup>1</sup>、伊藤英之<sup>5,8</sup>、下鶴倫人<sup>1</sup> ( <sup>1</sup>北海道大学大学院獣医学研究院野生動物学教室、<sup>2</sup>北海道大学大学院獣医学研究院トランスレーショナルリサーチ推進室、<sup>3</sup>北海道大学 One Health リサーチセンター、<sup>4</sup>のぼりべつクマ牧場、<sup>5</sup>京都大学野生動物研究センター、<sup>6</sup>公益財団法人知床財団、<sup>7</sup>北海道大学大学院獣医学研究院繁殖学教室、<sup>8</sup>京都市動物園)

雑誌名 Molecular Ecology Resources (分子生態学の専門誌)

DOI 10.1111/1755-0998.13788

公表日 2023年3月23日(木) (オンライン公開)

### 【参考図】

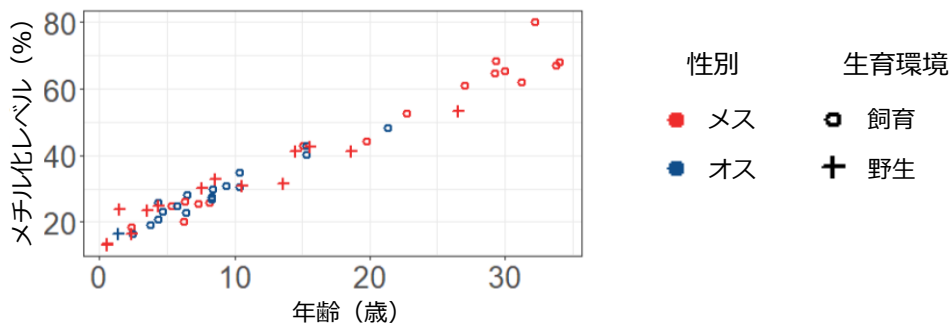


図 1. 年齢とメチル化レベルの間に強い相関が認められたメチル化部位の一例