

平成 29 年 4 月 21 日

横浜市繁殖センター

平成 28 年度 横浜市繁殖センター研究事業報告書

横浜市繁殖センターは、希少動物の繁殖や研究を行う非公開施設として、カンムリシロムク、カグー等の希少動物を飼育し、その繁殖と飼育下で累代的に維持していくことに努めている。また、国内の動物園としては初めての研究を目的とした実験施設を備え、希少野生動物の亜種判定や個体間あるいは種間の近縁関係、雌雄判別などに関する遺伝子解析や繁殖のための性ホルモンの定量など、様々な分野での「種の保存」に係わる研究を行うほか、横浜市立動物園の動物からの精子や卵子の収集・凍結保存等を行っている。

本報告書では、平成 28 年度に繁殖センターが実施した研究事業について報告する。なお、希少動物「種の保存」共同研究事業推進委員会運営要領（平成 22 年 4 月 28 日制定）に基づく横浜市立動物園 3 園（野毛山動物園、金沢動物園、よこはま動物園）との共同研究については、「3 園共同研究」として本文中に明示する。

<要約>

平成 28 年度は、希少野生動物の精子 2 種、体組織 36 種 62 点の凍結保存を行なった。また、よこはま動物園、野毛山動物園および繁殖センターで飼育されている 10 種について糞中ステロイドホルモン濃度を測定した。

一方、DNA 関連研究として、横浜市立動物園の飼育鳥類 12 種 95 羽について DNA による雌雄判別を行った。さらに、横浜市内産のカエル類について遺伝的調査を行った。

<目次>

- (1) 糞中ステロイドホルモン測定による妊娠診断、発情周期の解明
- (2) 配偶子および体組織の凍結保存
- (3) 動物の各種 DNA 解析
- (4) 大学等との共同研究
- (5) 学会等発表資料

(1) 糞中ステロイドホルモン測定による妊娠診断、発情周期の

解明

(3 園共同研究)

平成 28 年度は、よこはま動物園、野毛山動物園および繁殖センターで飼育されている 10 種について測定を行なった。(表 1)。

また、横浜市環境創造局と岐阜大学農学部(現 応用生物科学部)間の共同研究協定書に基づき、ゴールデントーキン、インドゾウ(よこはま動物園、金沢動物園)、インドサイ、アミメキリン、ホッキョクグマ、リカオン、チーター、ユーラシアカワウソ、シロテテナガザル、アカアシドゥクラングールの糞中ステロイドホルモン(もしくは血中、尿中ステロイドホルモン)動態について、岐阜大学応用生物科学部動物繁殖学研究室と共同研究している。

平成 28 年度性ホルモンの測定結果

繁殖センター

石井裕之 大沼友有子

研究補助 須藤杏桂 矢治信之介 田坂翔平 村上芙裕佳

繁殖センターでは酵素免疫測定法にて、横浜市内 3 動物園で採取した排泄物や血液から性ホルモンやその代謝物を抽出し、測定を行っている。性ホルモンを測定する目的は、妊娠の早期発見や繁殖適期の特定など飼育下野生動物の繁殖生理を会飯し、その飼育管理を改善することにある。

平成 29 年 3 月 31 日現在、繁殖センターで性ホルモンを測定した動物は表 1 のとおりである。性ホルモンは自家製キットを使用して、プロジェステロン (P4)、プレグナンジオール (PdG)、エストラジオール-17 β (E2)、テストステロン (T) を測定した。

測定値をグラフ化したものを図 1 から図 30 に示した。

表 1 H28 年度 繁殖センターで性ホルモンを測定した動物種

動物種	個体番号・愛称	性別	所属園	検体	測定ホルモン
スマトラトラ	デル	♀	よこはま動物園	糞	P4 E2
	カリ	♀	よこはま動物園	糞	E2
	ミンピ	♀	よこはま動物園	糞	E2
テングザル	No.1 キナンテイ	♀	よこはま動物園	糞	P4 PdG
	No.2 アプル	♀	よこはま動物園	糞	E2
フランソワルトン	No.9 ミカン	♀	よこはま動物園	糞	PdG
	No.11 チョコ	♀	よこはま動物園	糞	
	No.13 アンズ	♀	よこはま動物園	糞	
	No.17 ショコラ	♀	よこはま動物園	糞	PdG E2
クロサイ	No.2 アキリ	♀	よこはま動物園	糞	P4 E2

ヒトコブラクダ	No.1 ピノ	♀	よこはま動物園	糞	P4
	No.2 ソフィ	♀	よこはま動物園	糞	PdG E2
セスジキノボリカンガルー	No.10 タニ	♀	よこはま動物園	糞	P4 PdG E2
ツキノワグマ	No.26 サンペイ	♂	野毛山動物園	糞 血液	T
	No.27 コマチ	♀	野毛山動物園	糞 血液	P4 PdG E2
オオツノヒツジ	No.37 エコ	♀	金沢動物園	糞	PdG E2
	No.53 チャグ	♀	金沢動物園	糞	
	No.57 ザビコ	♀	金沢動物園	糞	
	No.67 ハナコ	♀	金沢動物園	糞	
アラビアオリックス	No.16 カナ	♀	金沢動物園	糞	P4
	No.19 リズ	♀	金沢動物園	糞	
クロサイ	No.1 ローラ	♀	金沢動物園	糞	P4 E2

図 1-1

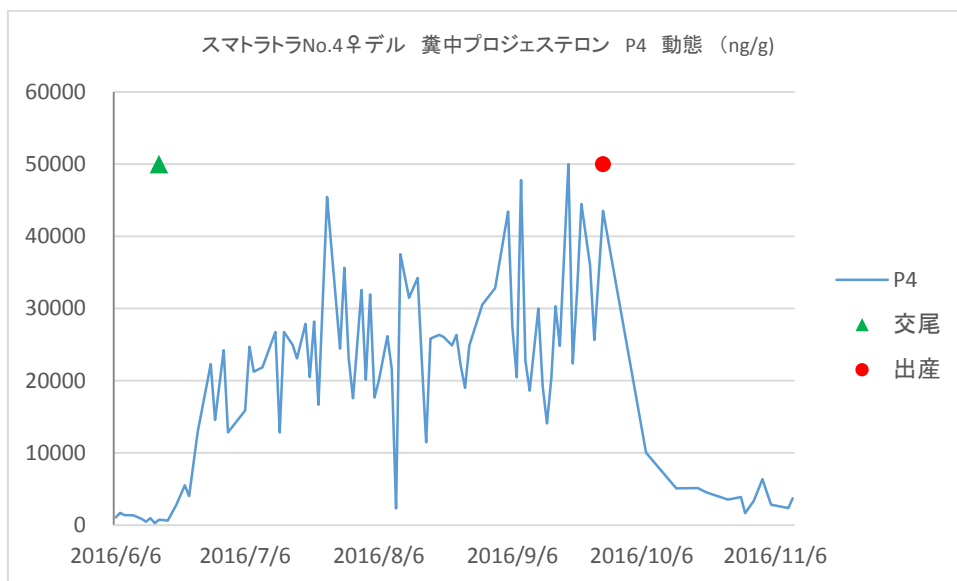


図 1-2

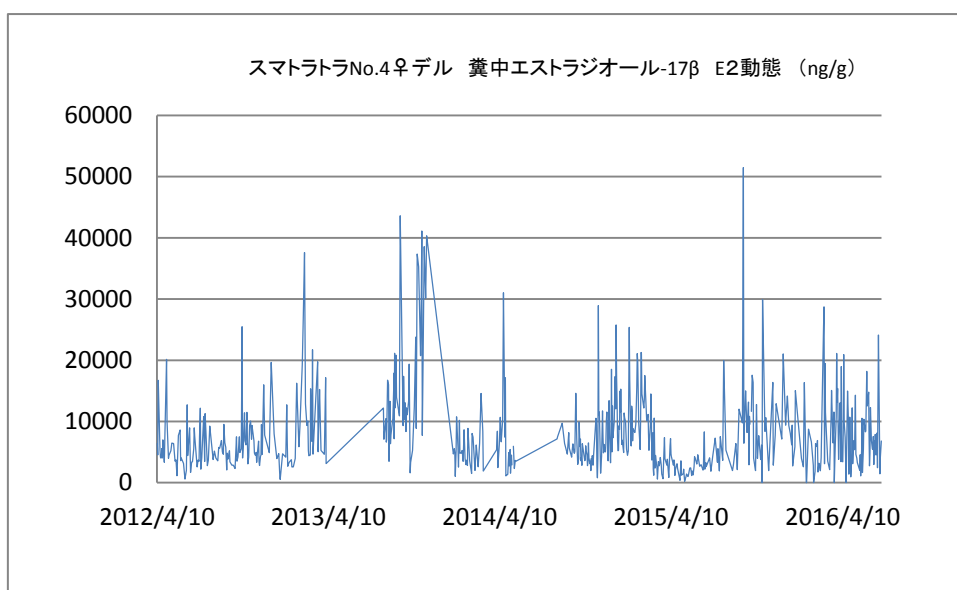


図 2

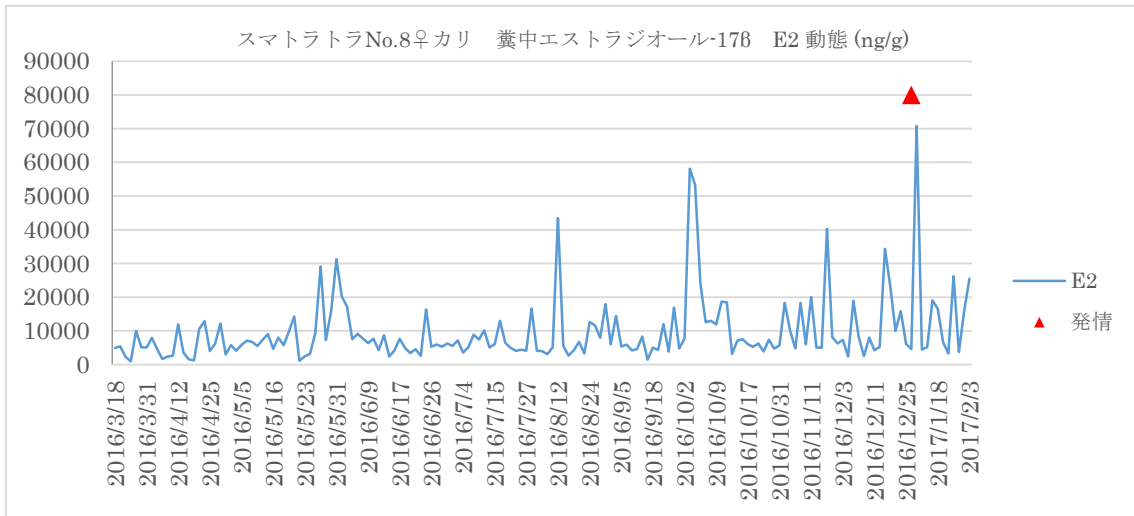


図 3

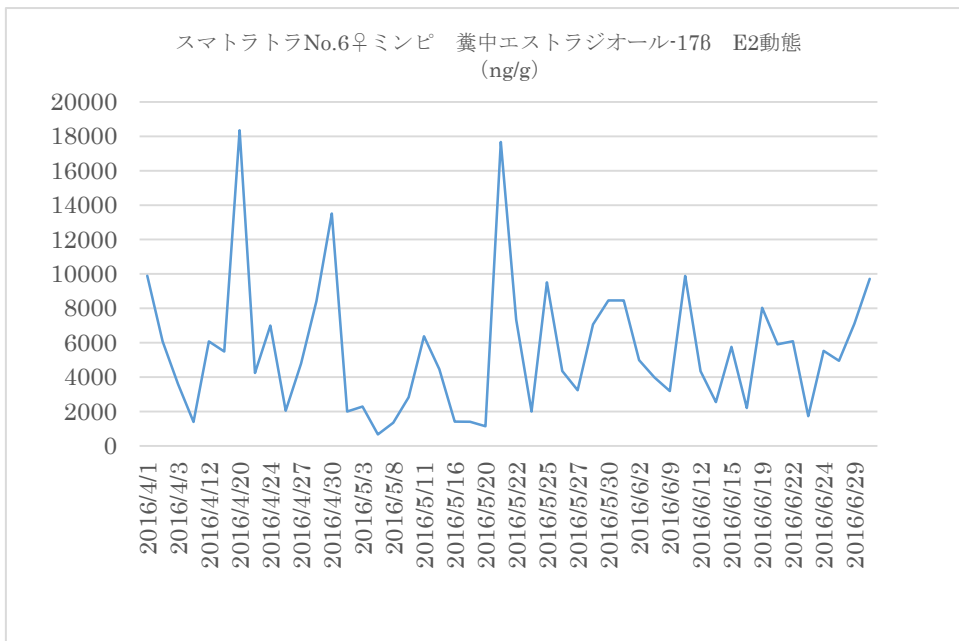


図 4

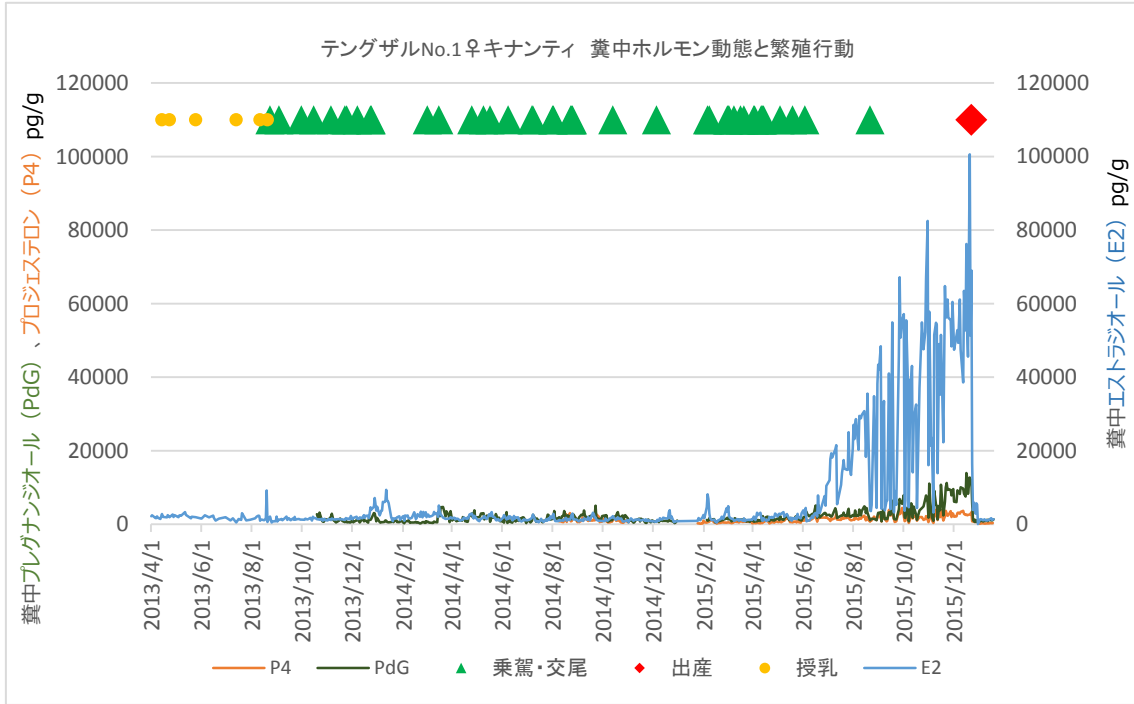


図 5

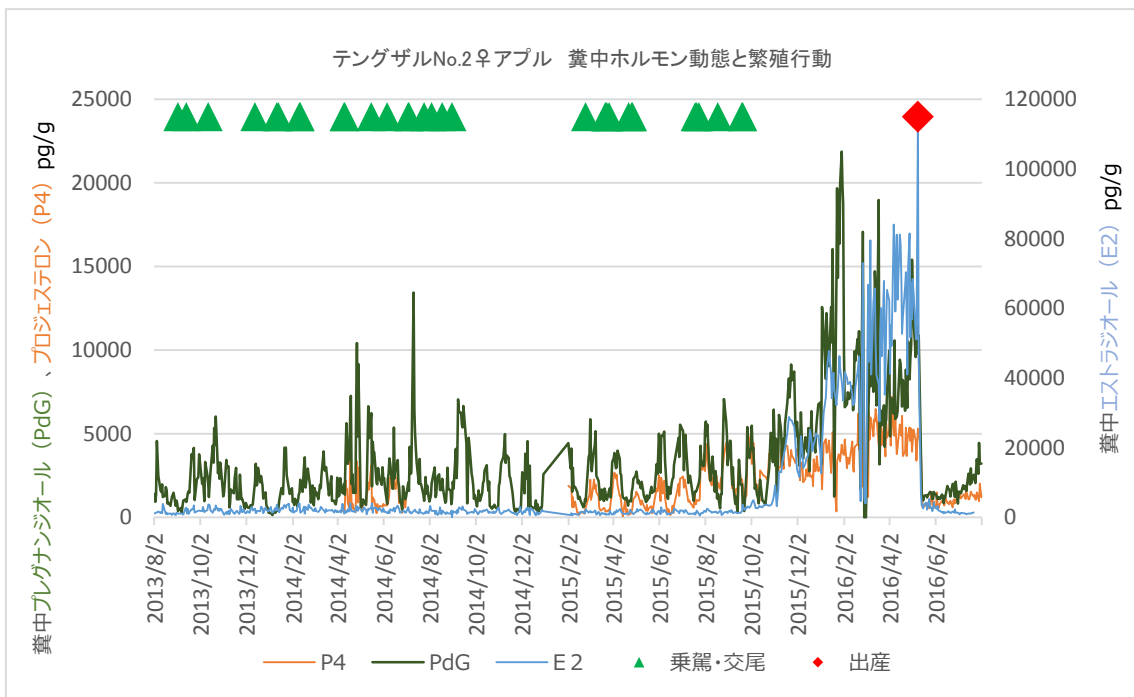


図 6

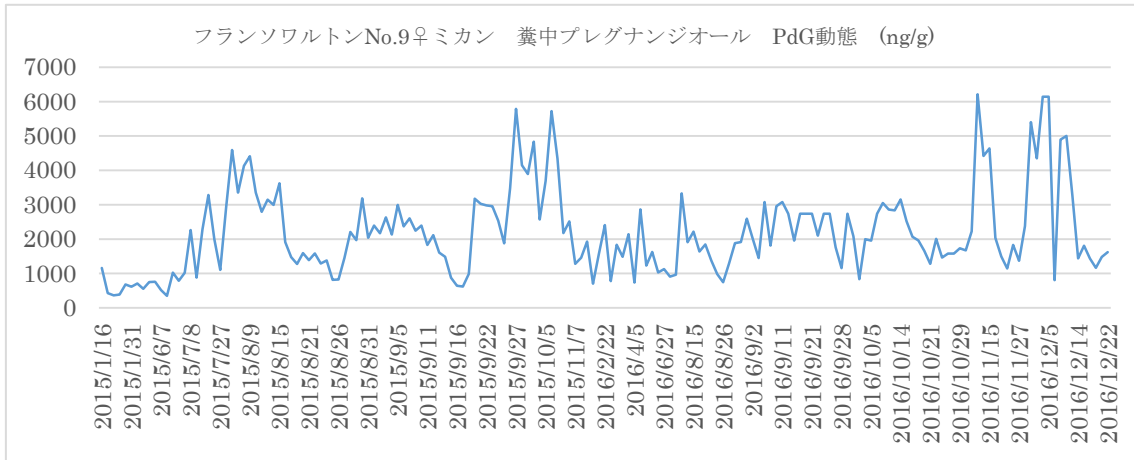


図 7

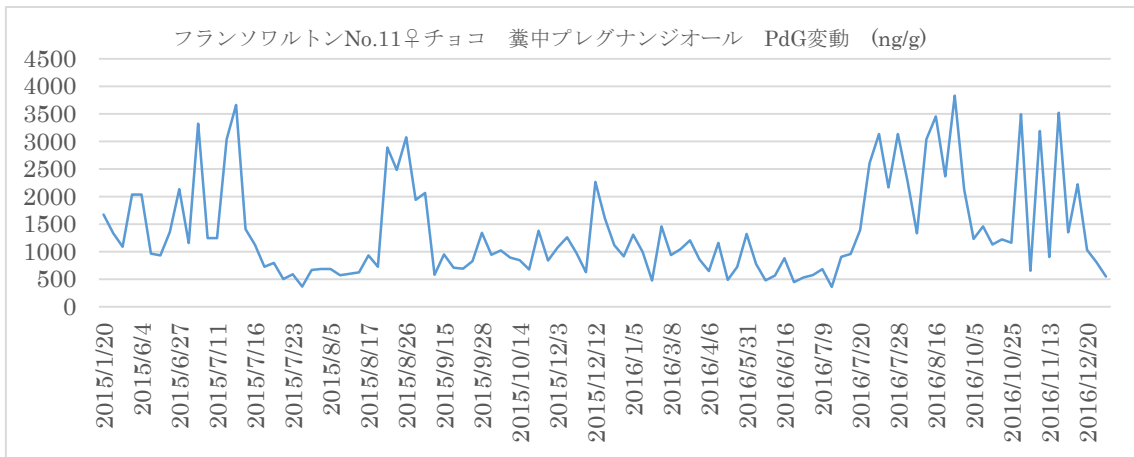


図 8

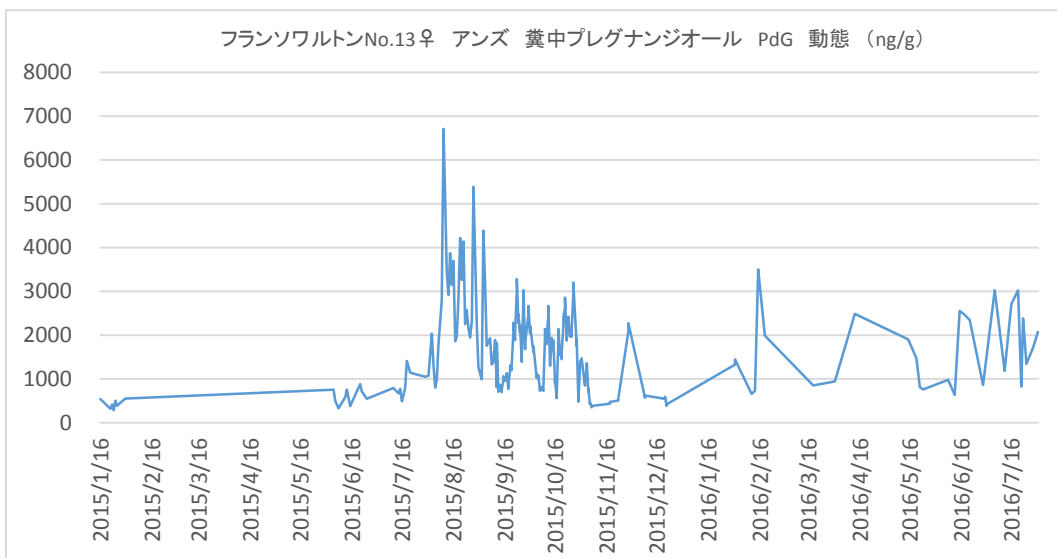


図 9

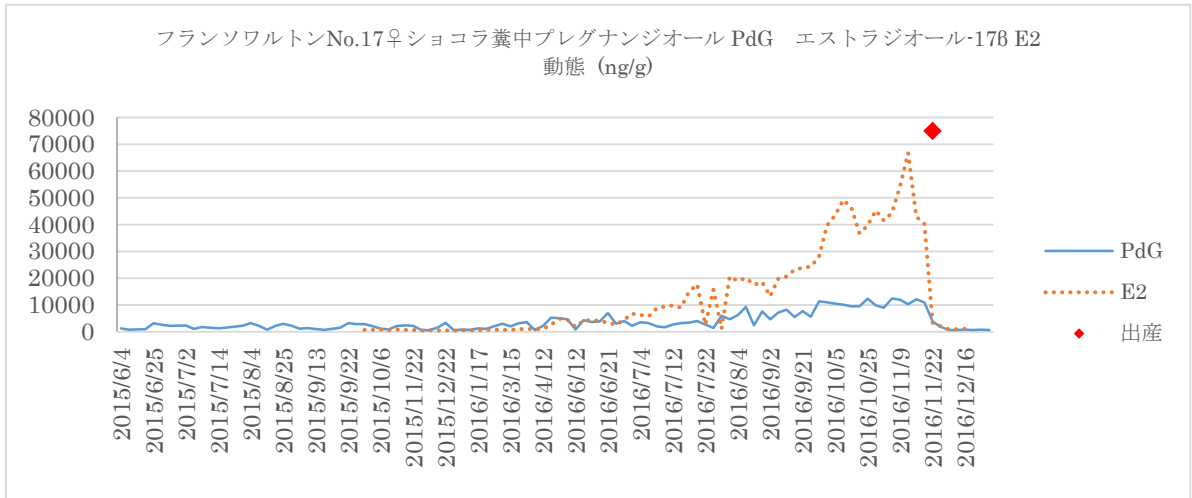


図 10

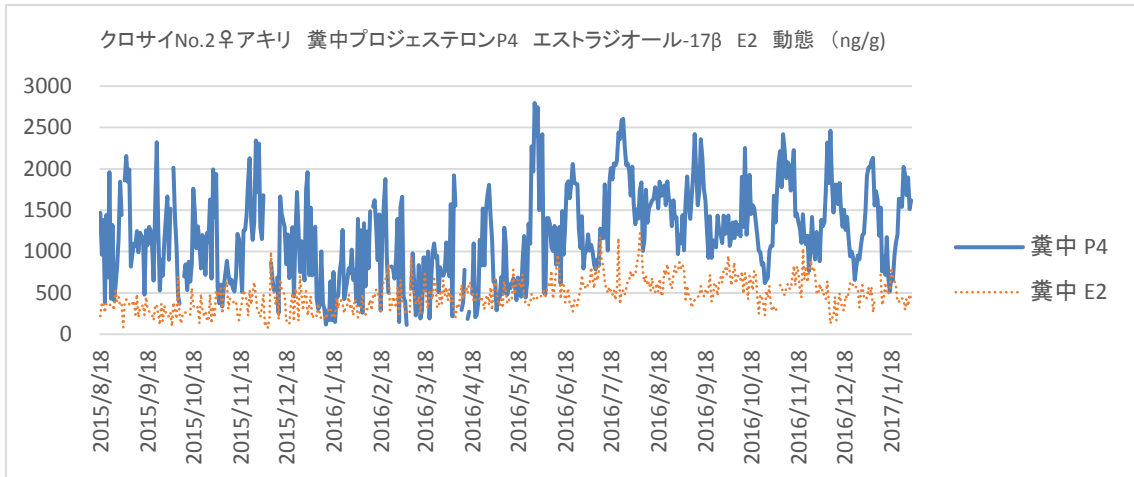


図 11

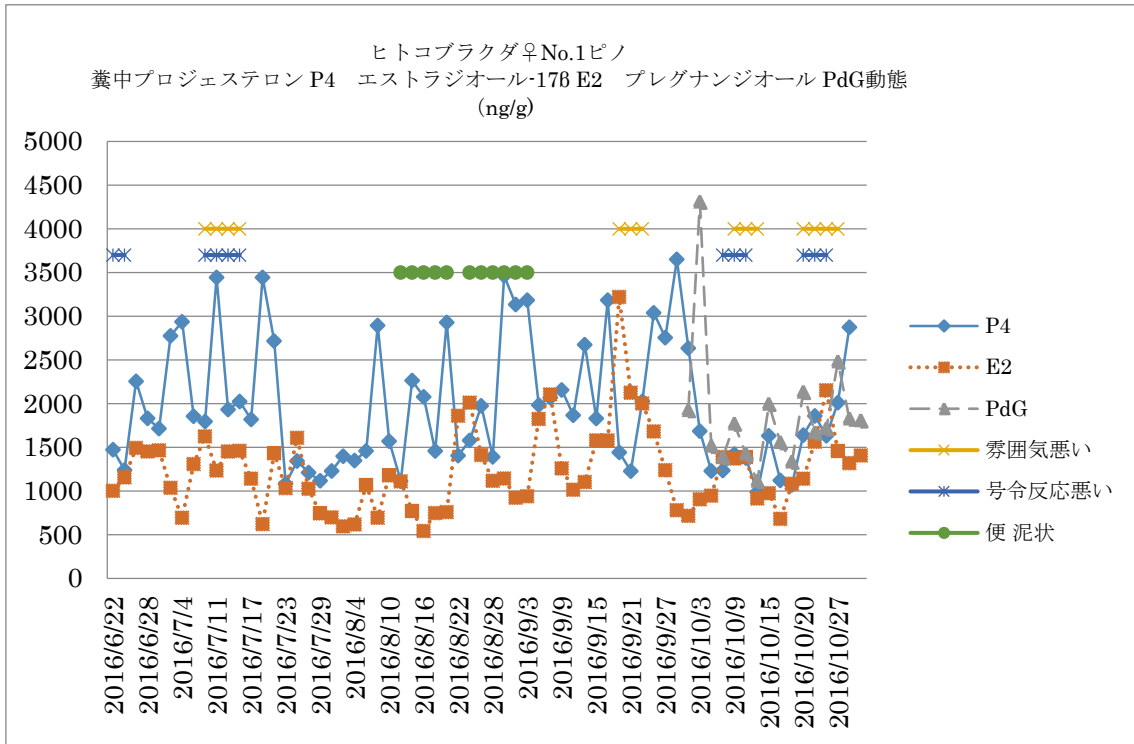


図 12

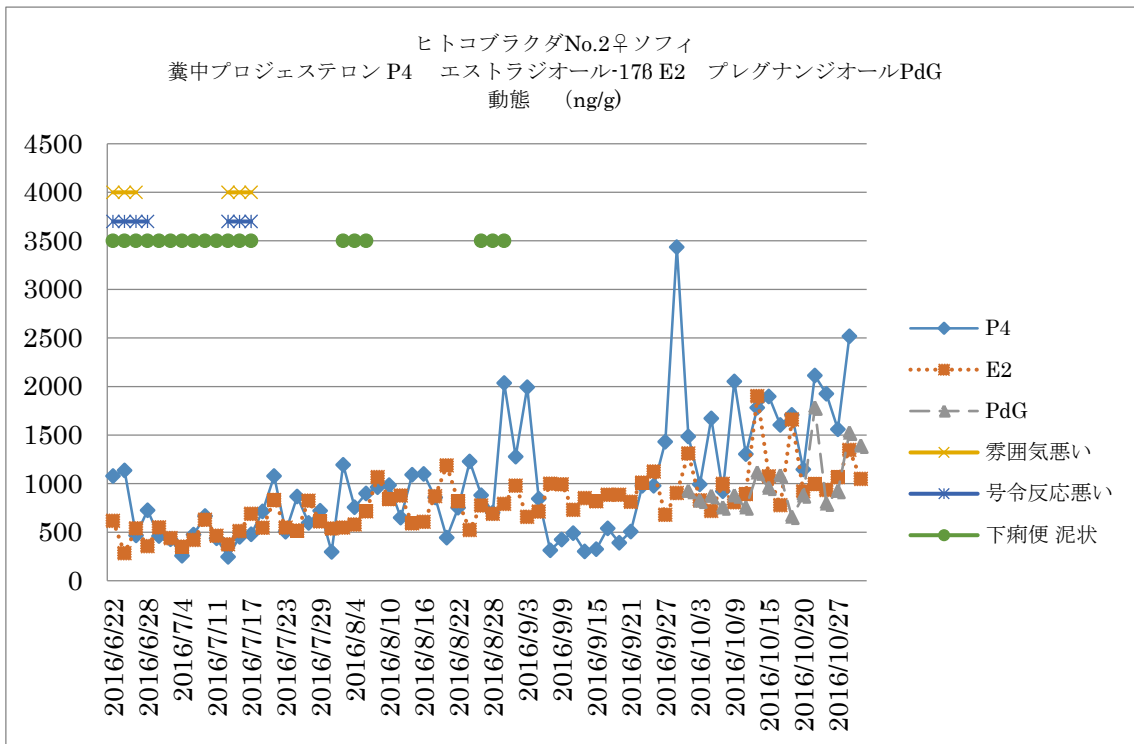


図 13-1

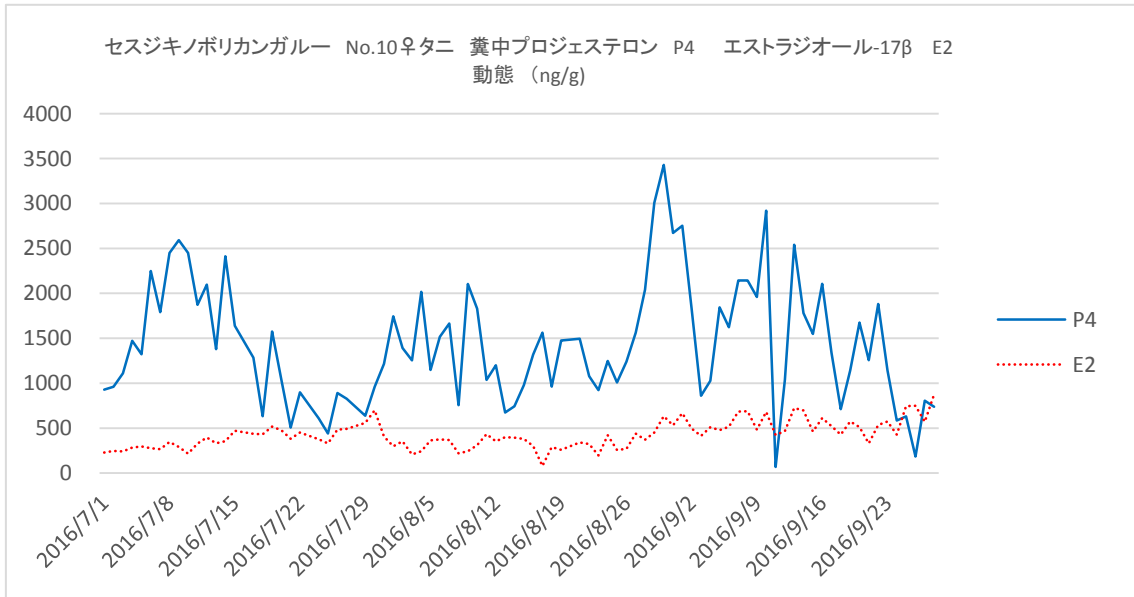


図 13-2

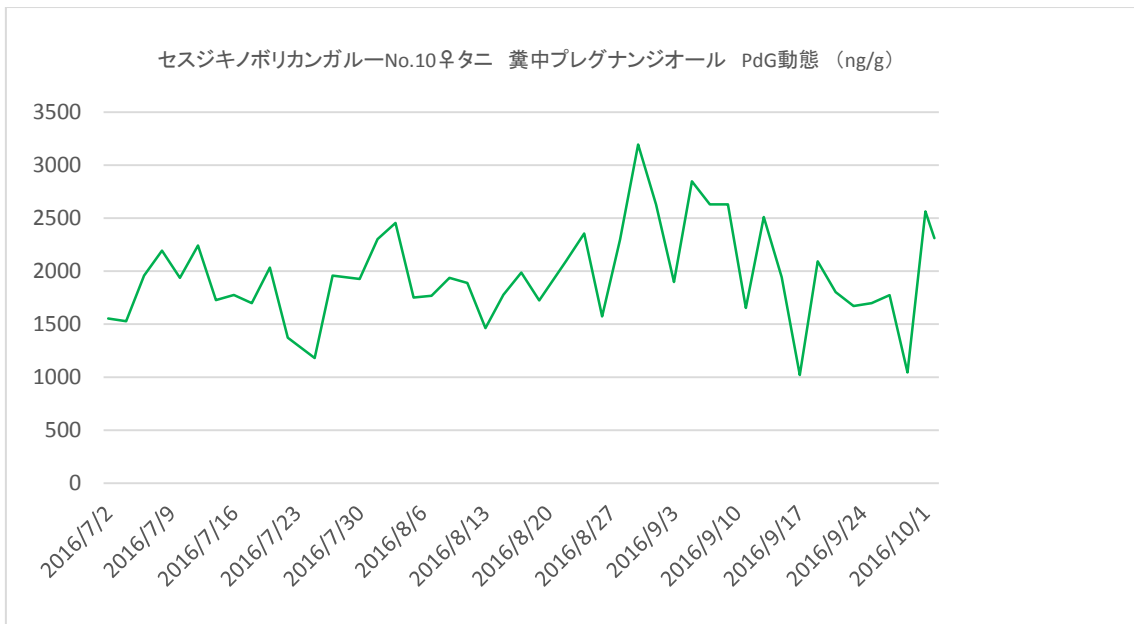


図 14-1

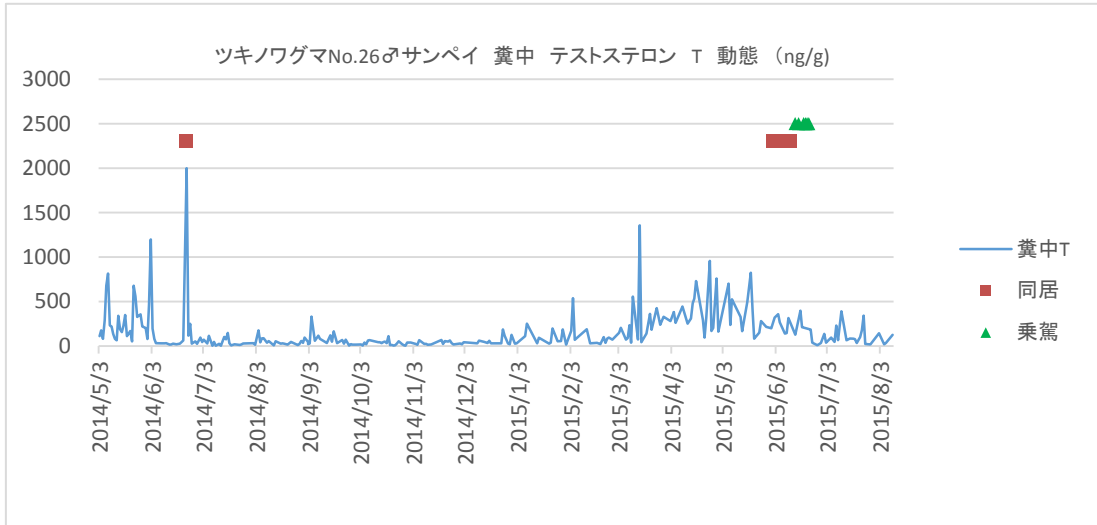


図 14-2

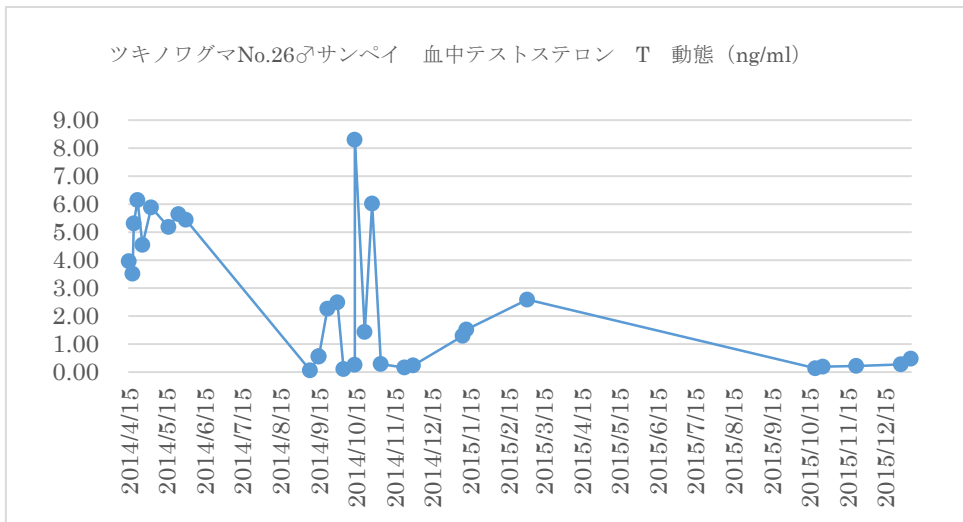


図 15-1

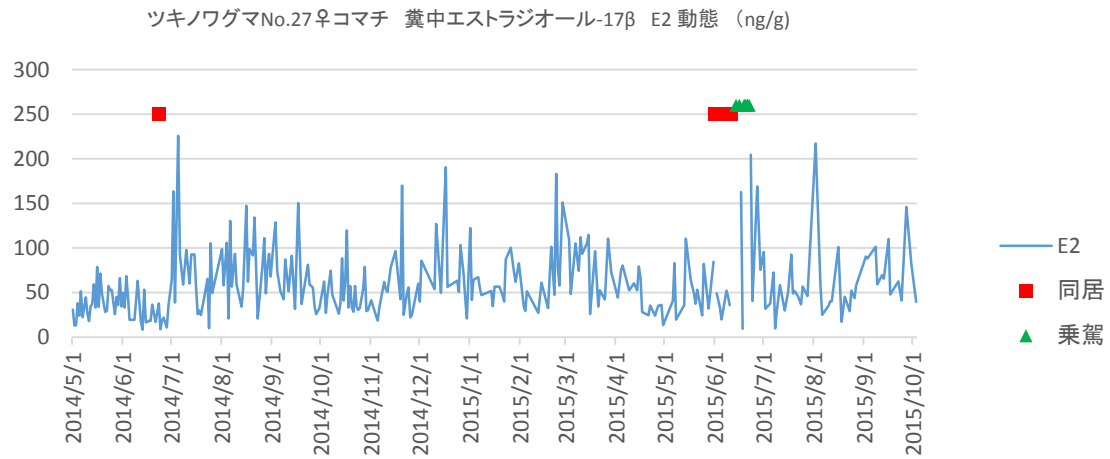


図 15-2

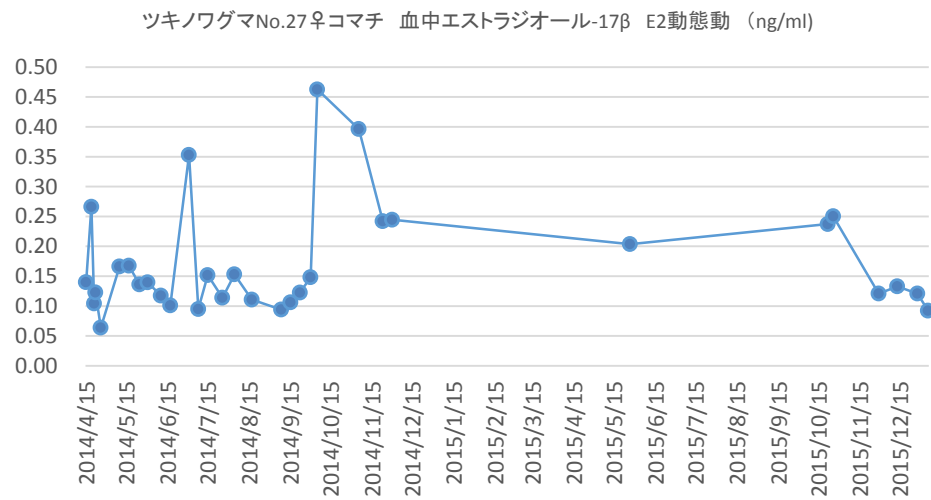


図 15-3

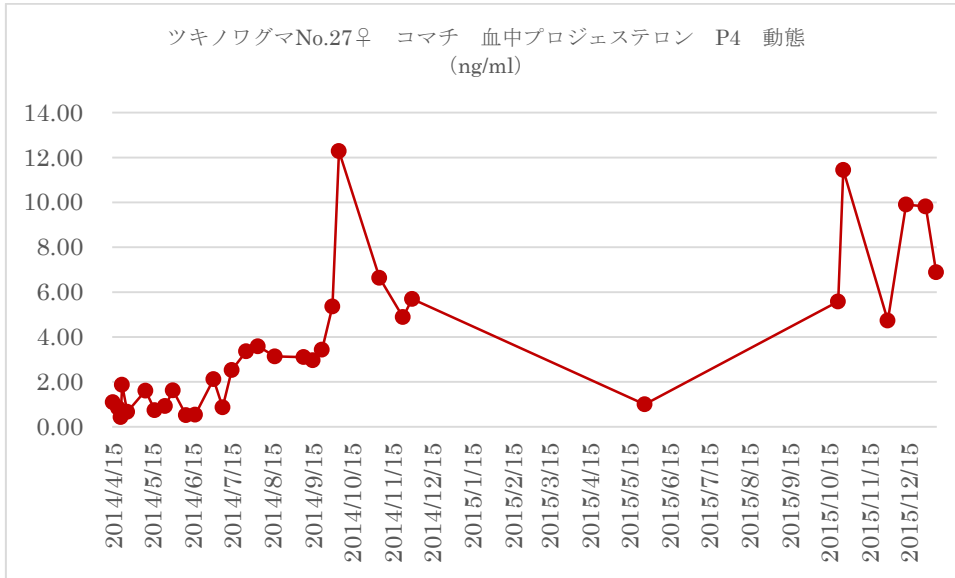


図 15-4

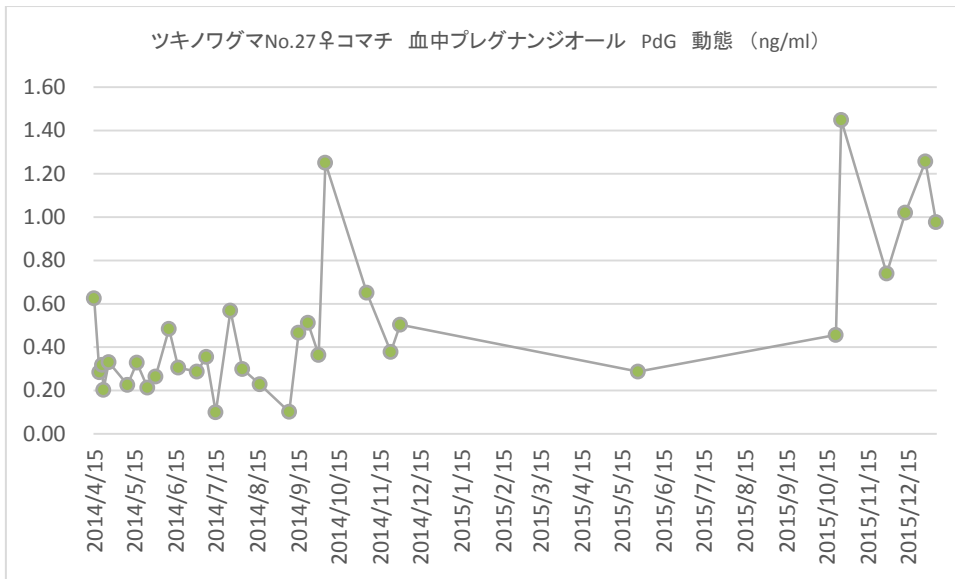


図 16-1

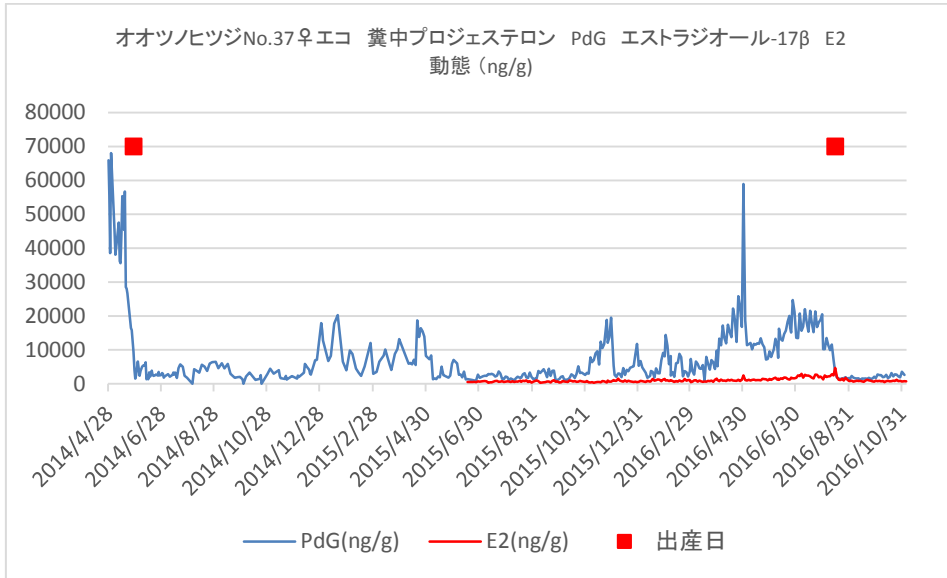


図 16-2

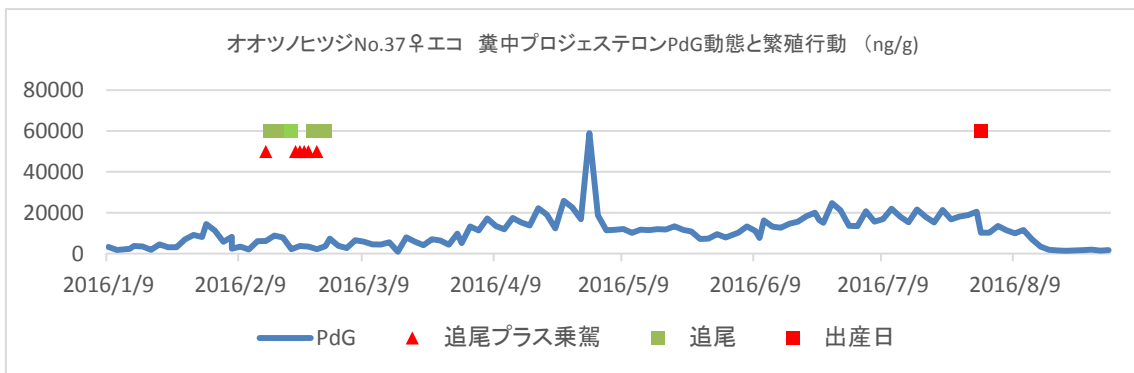


図 17-1

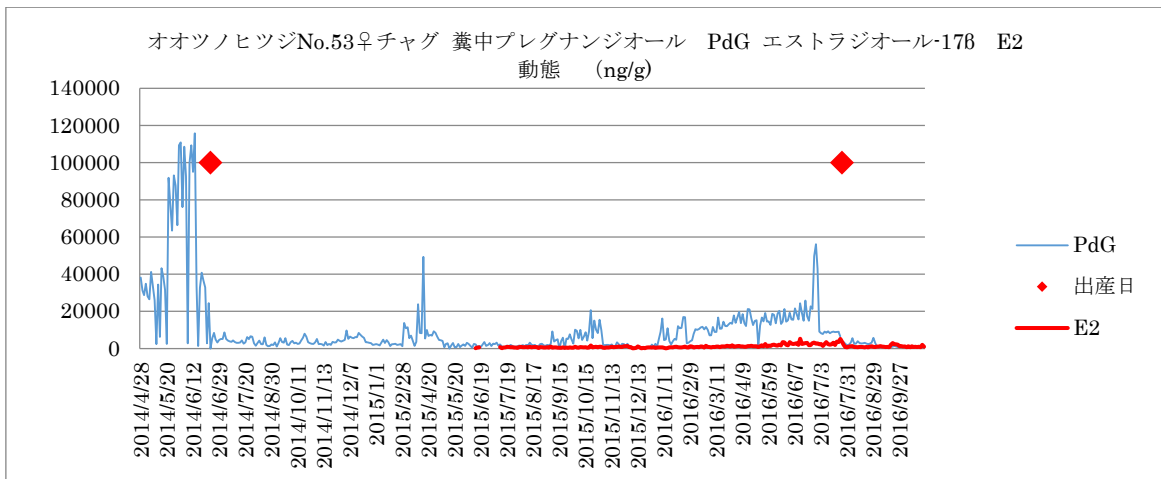


図 17-2

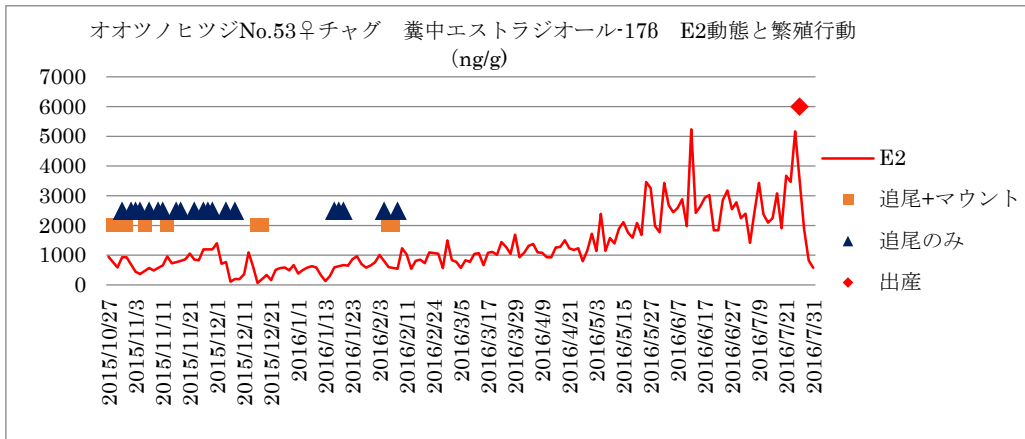


図 18

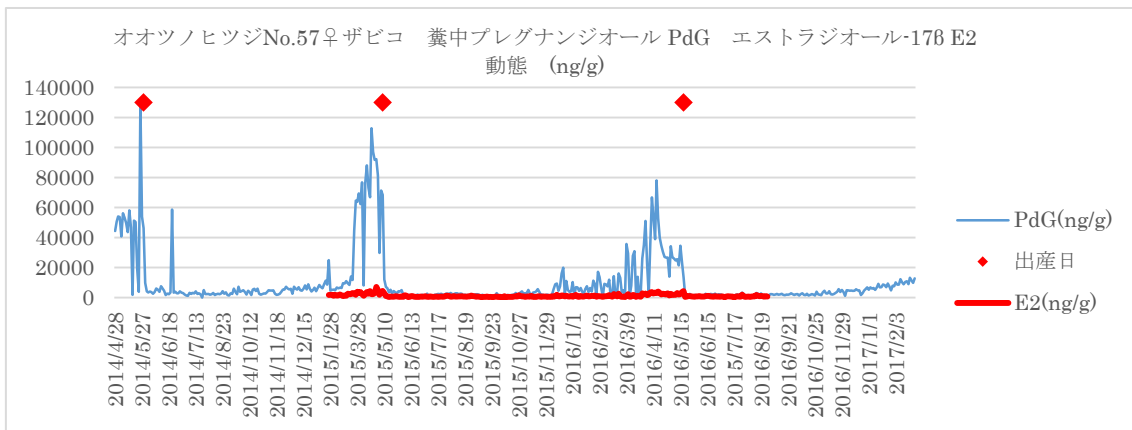


図 19

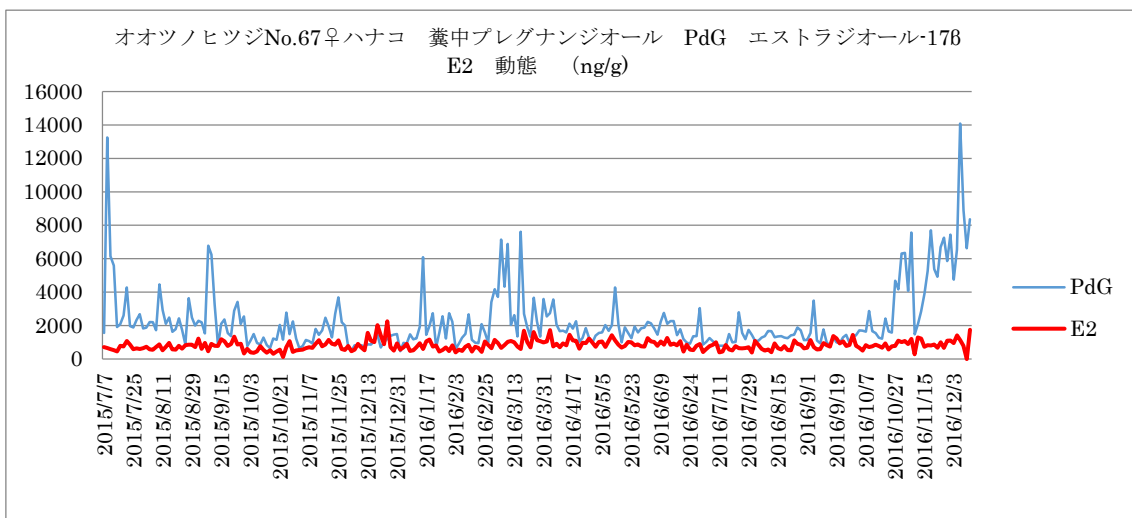


図 20

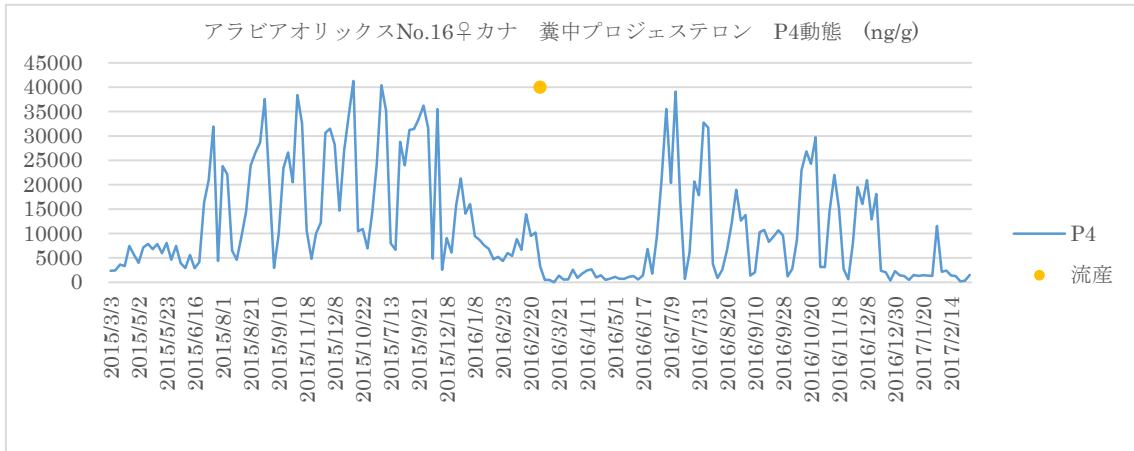


図 21

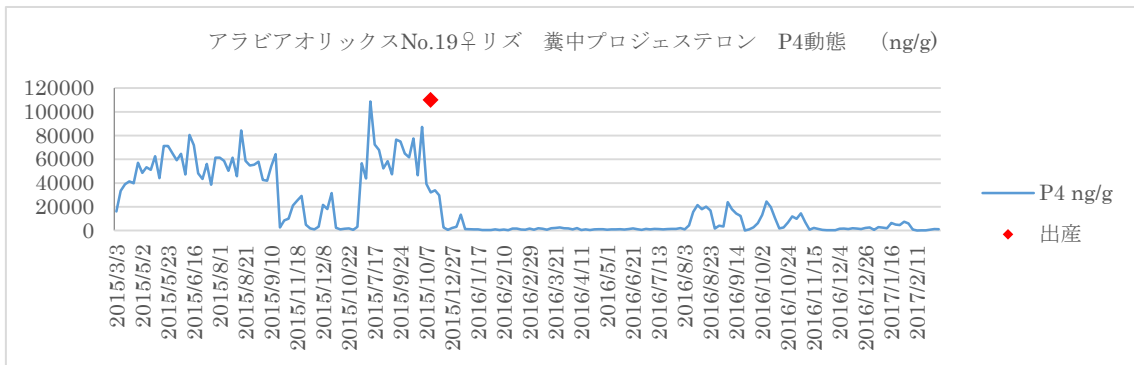
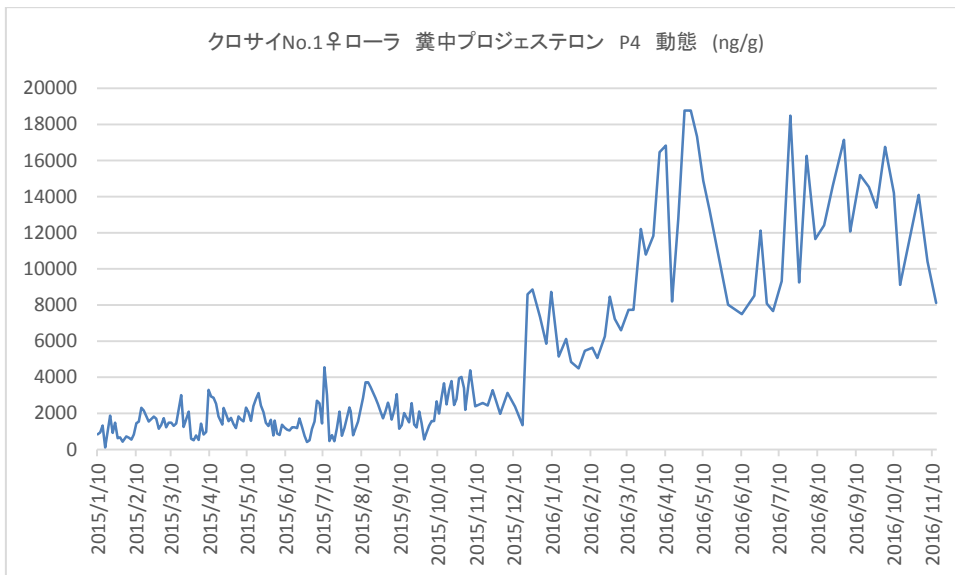


図 22



2 配偶子および体組織の凍結保存

平成 28 年度は、哺乳類 10 種の精液の凍結保存を試み、そのうち 2 種の精液を凍結保存した。精液は死亡個体の精巣上体より灌流法もしくは細切法により回収しストローに注入後、液体窒素下 (-196℃) に保存した。加えて、ツシマヤマネコは電気刺激装置による人工採精において、精液を採取および保存を行った。

また、哺乳類 6 種について卵子回収を行なった。しかしすべての検体において良好な卵子を回収することはできなかった。

また、遺伝子保存の一環として、死亡動物の 36 種 62 点（鳥類 14 種 21 点、哺乳類 22 種 41 点）の体組織（筋肉、肝臓、脾臓）を -80℃ 下で凍結保存した。更に 10 種については細胞培養の上、培養細胞を凍結保存した。

なお、繁殖センターには平成 11 年以降精子 54 種（ストロー数 1,251 本）、卵子 3 種（ウンピョウ、アリクイ、インドガウル）、体組織 161 種が凍結保存されている。（29 年 3 月末）

表1 平成 28 年度精子回収状況

種名	処理日	回収状況	保存状況
オオツノヒツジ	160530	灌流	無
オオカンガルー	160611	細切	無
オオツノヒツジ	160611	灌流	無
ヤブイヌ	160621	灌流	無
ニホンザル	160702	灌流・細切	無
ツシマヤマネコ	160818	細切	無
クイーンズランドコアラ	160909	灌流	無
マレーバク	160919	灌流	無
マレーバク	160919	灌流	無
レッサーパンダ	161027	灌流・細切	無
ツシマヤマネコ	161114	細切	無
アカカンガルー	161127	灌流	有袋類（グリセリン 5%）
スーチョワンバーラル	170111	灌流・細切	無
ツシマヤマネコ	170207	電気刺激	EYT(グリセリン 7%)
アカカンガルー	170214	灌流	無
ツシマヤマネコ	170222	細切	TTE（グリセリン 5%）
ツシマヤマネコ	170301	細切	EYT(グリセリン 7%)
ヤブイヌ	170310	灌流	無

表2 平成 28 年度卵子回収状況

種名	処理日	回収状況	保存状況
カピバラ	160525	細切	無
マレーバク	160902	細切	無
ヤブイヌ	161117	細切	無
ツシマヤマネコ	170110	細切	無
ツシマヤマネコ	170113	細切	無
アカカンガルー	170131	細切	無
テングザル	170303	細切	無
ツシマヤマネコ	170313	細切	無
ツシマヤマネコ	170324	細切	無

表3 平成 28 年度培養細胞凍結状況

種名	培養開始日	保存日	保存液
ユーラシアカワウソ	160414	160427	10%DMSO FBS
オジロウチワキジ	160427	160518	10%DMSO FBS
カピバラ	160526	160608	10%DMSO FBS
イワシャコ	160715	160730	10%DMSO FBS
インドライオン	180826	160905	10%DMSO FBS
マレーバク	160920	161005	10%DMSO FBS
レッサーパンダ	161028	161108	10%DMSO FBS
インドライオン	161107	161123	セルバンカー1
オセロット	161129	161227	10%DMSO FBS
チベットモンキー	170126	170330	セルバンカー1
テングザル	170303	170330	セルバンカー1

3 DNA解析

(1) 鳥類の雌雄判別

横浜市立動物園の飼育展示・保護個体については、10種90個体で雌雄判別を実施した。
また、国内他施設への協力事業として2種5個体の性別判定を実施した。

横浜市立動物園鳥類雌雄判別件数内訳

動物園名	種名	羽数	備考
繁殖センター	スバールバルライチョウ	9	
	カグー	4	
	ミゾゴイ	4	
	カンムリシロムク	14	
野毛山動物園	ルリゴシボタンインコ	31	
	ブロンズトキ	2	
よこはま動物園	フンボルトペンギン	3	
	ウミネコ	3	
	ライラックニシブッポウソウ	4	
	ベニハチクイ	16	

国内他施設への協力件数

施設名	種名	羽数	備考
神奈川県立博物館	カナダガン	2	特定外来種防除への協力
油壺マリンパーク	イワトビペンギン	3	DNA性別判定研修

(2) コロブス類のマイクロサテライトマーカー探索

テングザルの個体識別用に開発されたマイクロサテライトマーカーによるコロブス類の個体識別を目的に、テングザル用のプライマーによるコロブス類の DNA 増幅を試みた。材料は①キンシコウ②アビシニアコロブス③ダスキールトン④ドゥ克蘭グール⑤フランソワルトンの 5 種類を用い、DNA は繁殖センターに凍結保存されていた各動物の組織より抽出した。各種とも 2 個体ずつを解析した。

PCR プライマーは Salgado et al (2012)により報告されている 8 種のマーカーを用い、フォワードプライマーの 5'末端を 6 FAM もしくは 5HEX により蛍光標識した。

PCR は QIAGEN Multiplex PCR Plus Kit を用い、アニーリング温度を 57°C に設定し、PCR サイクルは PCR kit に添付の説明書に従った。PCR 産物のサイズは ABI 310 Genetic Analyzer により行った。マーカーは Gene Scan 500 Rox を用いた。

加えて、糞便による個体識別についても試みた。糞便からの DNA 抽出は QIA Stool Mini Kit を用い、採取後半日以内の糞便の表面を滅菌済みの綿棒を用いて拭き、綿棒を抽出液内にて撹拌したものを DNA 抽出に用いた。糞便からの DNA 抽出は現在飼育されているドゥ克蘭グール、アビシニアコロブス、フランソワルトンを対象とした。

解析の結果、キンシコウを除く 4 種で概ね DNA 増幅が見られた。ダスキールトン、フランソワルトン、ドゥ克蘭グールでは半分以上のマーカーで個体差を確認できた。8 つのマーカーの内 N1P2F3, N1E10, N1P3B2 についてはキンシコウを除くすべての種で増幅可能である一方で、個体差も確認できる優良なマーカーであることが明らかとなった。

更に糞便 DNA においても 8 種のマーカーのうち 6 種は DNA 増幅が可能であった。

Primer 種名	N1P1C5	N1P1A6	N1P2F3	N1E10	N1P2D6	N1P4C11	N1D10	N1P3B2	
キンシコウ	×	×	△	×	×	×	×	×	○(多型あり) ●(増幅あるも多型なし) △(一部個体は増幅できず) ×(増幅無)
アビシニアコロブス	△	●	○	○	○	△	△	●	
ダスキールトン	●	●	○	○	○	△	●	○	
ドゥ克蘭グール	○	○	○	○	△	○	△	●	
フランソワルトン	△	△	○	●	○	○	●	○	

(3) マイクロサテライト DNA 多型に基づく飼育下カンムリシロムクの遺伝的多様性解析

カンムリシロムクの飼育下個体群の遺伝的多様性解析に向け、カンムリシロムクのマイクロサテライトマーカー探索を行った。国立環境研究所との共同研究により、カンムリシロムク 1羽の全 DNA を次世代シーケンサーにより解析し、2～3塩基の繰り返し配列を含むマイクロサテライト DNA を選択したうえで、それらの領域に対するプライマー配列を決定した。それらの中から、繰り返し配列を多く含む 54 個のプライマーセットを選択し、増幅される DNA 断片長の多型の有無を確認した。その結果、8 個のプライマーセットで断片長の多型が確認された。更に繁殖センターの飼育下個体由来の 11 羽の DNA を用い、8 つのプライマーセットにより増幅されるマイクロサテライト DNA の多型解析を試みた。その結果、いずれのプライマーセットもアレル数は 2～3 個であった。

一方でこれまでに繁殖センターに導入されたカンムリシロムクに存在する 6 つの独立した母系統のミトコンドリア DNA について CO2 配列 675bp を解析した結果 3 つのハプロタイプが確認されたものの、ハプロタイプ間の塩基差は非常に小さい (0.1～0.3%) ことが既に明らかとなっている。これらの結果から、繁殖センターの飼育下個体群の遺伝的多様性は低いことが示唆される。今後は本種の本産国であるインドネシアの飼育個体群について同様の解析をすることにより、本種の遺伝的多様性を評価していく必要がある。

Primer set	LR072172	LR031337	LR130581	LR101101	LR104861	LR123908	LR115591	LR038882
No. of Allele	3	3	2	3	3	3	2	2

(4) 市内産カエルの DNA 解析結果報告

横浜市内産カエル類の保全に向け、保全計画立案の基礎データを得ることを目的に、市内の個体群間の遺伝的関係を予備的に調査した。なお、試料収集は主に横浜市環境科学研究所が担当し、試料分析は繁殖センターが担当した。

調査内容

① 市内丘陵地域間の遺伝的関係の解析

☆目的

市内北部緑地が属する多摩丘陵と南部緑地が属する三浦丘陵に分布する有尾両生類では、両丘陵間の個体群間で生物地理学的に有意な遺伝的分化が報告されている

(Matsui et al 2007)。このことは、過去に両丘陵間の生物がある一定期間にわたって、遺伝的交流が絶たれた結果、両地域間で独自に遺伝的分化を遂げたことを意味している。このようなケースでは、両地域間の生物個体群を同一集団として取り扱うことは、保全生物学上、問題となる。

そこで、市内産のカエルについても同様の遺伝的分化が見られるかどうかについて解析し、三浦丘陵と多摩丘陵の個体群の取り扱いを検討する。

☆方法

★対象種：ヤマアカガエル (*Rana ornativentris*)

★選定理由：谷戸に生息し、なおかつ横浜市内の三浦丘陵および多摩丘陵に分布するため。

★調査地[サンプル数]：10 地点（新治市民の森[1]、県立四季の森公園[4]、森の台雨水調整池[1]、横浜市立川井小[3]、旭区こども自然公園[1]、よこはま動物園[2]、氷取沢市民の森[1]、舞岡公園[1]。金沢動物園[7]、横浜自然観察の森[1]）

★調査期間：平成 27 年 1 月～平成 28 年 5 月

★解析方法：調査地点よりヤマアカガエルの幼生もしくは卵を採集し、そこから組織片を採取した後、DNA 抽出キットにより DNA を回収した（QIA Blood and Tissue Kit）。

抽出した DNA からアカガエル類で比較的早い遺伝子進化速度を示すミトコンドリア DNA の ND1 遺伝子（Eto et al., 2012）を PCR 法により増幅し ABI310 Genetic Analyzer により塩基配列を解析した。なお PCR には TaKaRa Ex Taq を用い PCR サイクルは表 1 に記載した。また塩基配列の解析には PCR プライマーを使用した。塩基配列は 1 方向のみ解析した。PCR プライマーについては表 1 に記載した。

☆結果

10 個体群 22 匹について解析を行った。その結果、5 つのハプロタイプが確認された。しかしハプロタイプ間の遺伝的差異は小さく (0.1~0.5%)、南部地域と北部地域で共通のハプロタイプが確認されたケースがあるなど、多摩丘陵、三浦丘陵間で明確な遺伝的分化は確認できなかった。

②市内個体群間の遺伝的関係の解析

☆目的

ヤマアカガエルの調査結果を踏まえ、繁殖センターにおける保全対象種であり神奈川県絶滅危惧種でもあるニホンアカガエルについて個体群間の遺伝的関係を明らかにする。

☆方法

- ★対象種：ニホンアカガエル(*Rana japonica*) 神奈川県絶滅危惧種
- ★選定理由：県下絶滅危惧種で市内新治地区でも減少傾向が著しいため。
- ★調査地[サンプル数]：5 地点 (新治市民の森[19]、県立四季の森公園[3]、小菅ヶ谷北公園[1]、徳生公園[2]、茅ヶ崎公園[3])
- ★調査期間：平成 27 年 1 月～平成 28 年 5 月
- ★解析方法：調査地点よりニホンアカガエルの幼生もしくは卵塊を採集し、ヤマアカガエルと同じ方法により DNA を抽出した。

抽出した DNA から個体群間の関係を解析する際に広く用いられるミトコンドリア DNA の D-loop 領域を PCR により増幅した (小林他 2012)。なお PCR には TaKaRa Ex Taq を用い PCR サイクルは表 1 に示したように設定した。また塩基配列の解析には PCR プライマーをそのまま使用した。塩基配列は 1 方向のみ解析した。PCR プライマーについては表 1 に記載した。

更に保全対象としている新治市民の森個体群の遺伝的多様性を調査するために、ニホンアカガエルのマイクロサテライト DNA (Koizumi et al., 2009) 4 領域について多型解析を行った。フォワードプライマーを 6-FAM もしくは 5-HEX で蛍光標識し、ABI310Genetic analyzer により電気泳動した。サイズマーカーには Genescan-500 (Rox 標識) を用いた。PCR 産物の断片長決定には GeneScan software ver.2 を用いた。なお PCR は QIAGEN Multiplex PCR Plus Kit を使用した。

☆結果

5 個体群 28 個体について D-loop 領域 576bp を解析した。その結果、5 か所 12bp の挿入塩基を除いた 564bp から 5 つのハプロタイプが確認された。ハプロタイプ間の塩基配列の違いは 0.2%~1.2%であった。ヤマアカガエルの場合とは異なり、近隣個体群同士 (茅ヶ崎—徳生) でハプロタイプを共有する一方で、地理的に連結していない谷戸間 ([茅ヶ崎

-徳生]-[新治-四季の森]では明瞭な違いが見られた(図3)。このことから、ニホンアカガエルでは地理的に点在する谷戸間では遺伝的交流が絶たれていることが示唆された。また、近隣個体群間(新治-四季の森)であっても、繰り返し配列数に違いが見られた(表2)これらのことから、現時点では近隣個体群間であっても遺伝的交流が絶たれている可能性が示唆された。その一方で、地理的に離れた個体群間でハプロタイプを共有するなど、上記に一致しないデータも観察された(小菅ヶ谷北-新治)。

一方で、新治市民の森の19匹についてマイクロサテライトDNA多型解析を行った結果、新治市民の森内の個体群で観察された遺伝子座数が、既報の個体群(栃木県)より少なく、更にヘテロ接合体率も0.5以下と低い値だった(表3)。同様にD-loop領域のハプロタイプ数(3個)も既報の個体群(千葉県)より少なかった(平均6.7個)。このことから、新治市民の森では、近隣集団との遺伝的交流が絶たれた結果、遺伝的多様性が減少していることが示唆された。

③ 人為的移入が疑われる個体群

こども自然公園(旭区)で採集されたニホンアカガエル4個体について、他個体同様にD-loop領域の増幅を試みたが、増幅できなかった。ニホンアカガエルとヤマアカガエルは外部形態が類似しているため、こども自然公園の個体がヤマアカガエルの誤認の可能性も考えられた。そこで、ND1遺伝子の塩基配列を解析した結果、こども自然公園の個体はヤマアカガエルではなかったものの、ニホンアカガエルの市内他個体群と異なる塩基配列を示し、むしろ広島市の個体群と近縁であった(図4)。ニホンアカガエルは、箱根山地から新潟県上越市へ縦断する地域(フォッサマグナ)を境に、東西集団で部分的な生殖隔離が起きるほど、遺伝的に分化していることが知られている(Sumida 1981, Sumida and Ogata 1998)。そのため、こども自然公園の個体群は、フォッサマグナ以西の地域から、何らかの原因で人為的に移入された個体であることが示唆された。また、先述の小菅ヶ谷北公園も市内地域間の人為移入に由来する可能性も考えられる。ただしこのハプロタイプの一一致は、ヤマアカガエルで見られたような、種内多型の独立した固定に基づく可能性もあるため、この点は、小菅ヶ谷北公園のサンプル数等を増やすことで検証していく必要がある。

要約

横浜市内に生息するカエル類の保全を検討するため、市内に生息するアカガエル2種を対象に、①市の南北地域における地理的分化、②市内個体群間の遺伝的關係、について予備的に解析した。その結果、①市南部の三浦丘陵と市北部の多摩丘陵間で遺伝的に大きな違いは見いだせないこと②市内の個体群間では近隣個体群であっても、遺伝的に分断され、個体群内の遺伝的多様性が減少している可能性があることが示唆された。

謝辞

本調査における試料収集に当たり、以下の機関にご協力いただきました。横浜市環境創造局みどりアップ推進課、同北部公園緑地事務所、同南部公園緑地事務所、横浜市立金沢動物園、緑区緑土木事務所、都筑区都筑土木事務所、横浜市立川井小学校、横浜自然観察の森、小菅ヶ谷北公園、舞岡公園、県立四季の森公園、新治市民の森、氷取沢市民の森、こども自然公園、徳生公園、茅ヶ崎公園、広島大学両生類研究センター。

参考文献

- Eto K, Matsui M, Sugahara T, Tanaka-Ueno T. (2012) Highly complex mitochondrial DNA genealogy in an endemic Japanese subterranean breeding brown frog *Rana tagoi* (Amphibia, Anura, Ranidae). *Zool. Sci.* 29(10): 662-671
- Koizumi N, Watanabe K, Mori A, Takemura T (2009) Isolation and characterization of 19 polymorphic microsatellite DNA markers in the Japanese brown frog (*Rana japonica*). *Mol. Ecol. Res.* 9, 248–250
- 小林 聡、阿部 聖哉、松本 吏弓 (2012) 環境アセスメントにおける生物多様性保全のための調査手法の開発 電力中央研究所 研究報告 V11014
- Matsui M, Tominaga A, Hayashi T, Misawa Y, and Tanabe S. (2007) Phylogenetic relationships and phylogeography of *Hynobius tokyoensis* (Amphibia: Caudata) using complete sequences of cytochrome b and control region genes of mitochondrial DNA. *Mol. Phylogenet. Evol.* 44(1) 204-217
- Sumida M (1981) Studies on the Ichinoseki population of *Rana japonica*. Scientific report of the Laboratory for Amphibian Biology 5: 1-46
- Sumida M and Ogata M (1998) Intraspecific differentiation in the Japanese brown frog *Rana japonica* inferred from mitochondrial DNA sequences of the cytochrome *b* gene. *Zool. Sci.* 15 989-1000

表 1 PCR プライマーおよび PCR サイクル

遺伝子	Primer(forward) 5'-3'	Primer (reverse) 5'-3'	PCR cycle
ND1	CGACCTCGATGTTGG ATCAGG	AGGAAGTACAAAGGG TTTTGATC	94°C5分⇒33 サイクル (94°C 30 秒⇒ 50°C30 秒⇒72°C 90 秒) ⇒72°C5 分
D-loop	TAGCCTAGAACACCC AGCTTAC	AAGCTTTCACTTGGA CTTGC	98°C1分⇒35 サイクル (98°C10 秒⇒ 60°C1分⇒72°C30 秒) ⇒60°C30 分
Raja3	TTCAACACCCCACAC AGC	GGTGAACCTTGGCAGG CTAC	95°C5分⇒38 サイクル (95°C30 秒⇒ 57°C90 秒⇒72°C30 秒) ⇒68°C30 秒
Raja4	GTGTTTTCGCTGGTGG ATG	ACCAACCCCTCTCTT CTCCT	
Raja10	ATGTTATGGCAGGAA GTGGTTG	GTATTGTTAGAGTTG TCCGTGC	
Raja18	CGATGAAAACGGTCC ATCAGAC	GGGAATACAGAGAAG AAGGAGG	

表 2 ニホンアカガエルの D-loop 領域における 2 塩基(TA)繰り返し数

調査地点	新治	四季の森	茅ヶ崎	徳生	小菅ヶ谷北
繰り返し数	4	5	3	3	4

表 3 新治市民の森におけるニホンアカガエルのマイクロサテライト DNA の遺伝子座数とヘテロ接合体率 () 内は栃木県内個体群 24 匹のデータ (Koizumi et al. 2009)

遺伝子座名	Raja3	Raja4	Raja10	Raja18	平均
遺伝子座数	5 (11)	5 (11)	4(8)	4(11)	4.5(10.25)
ヘテロ接合体率	0.471	0.353	0.647	0.176	0.412

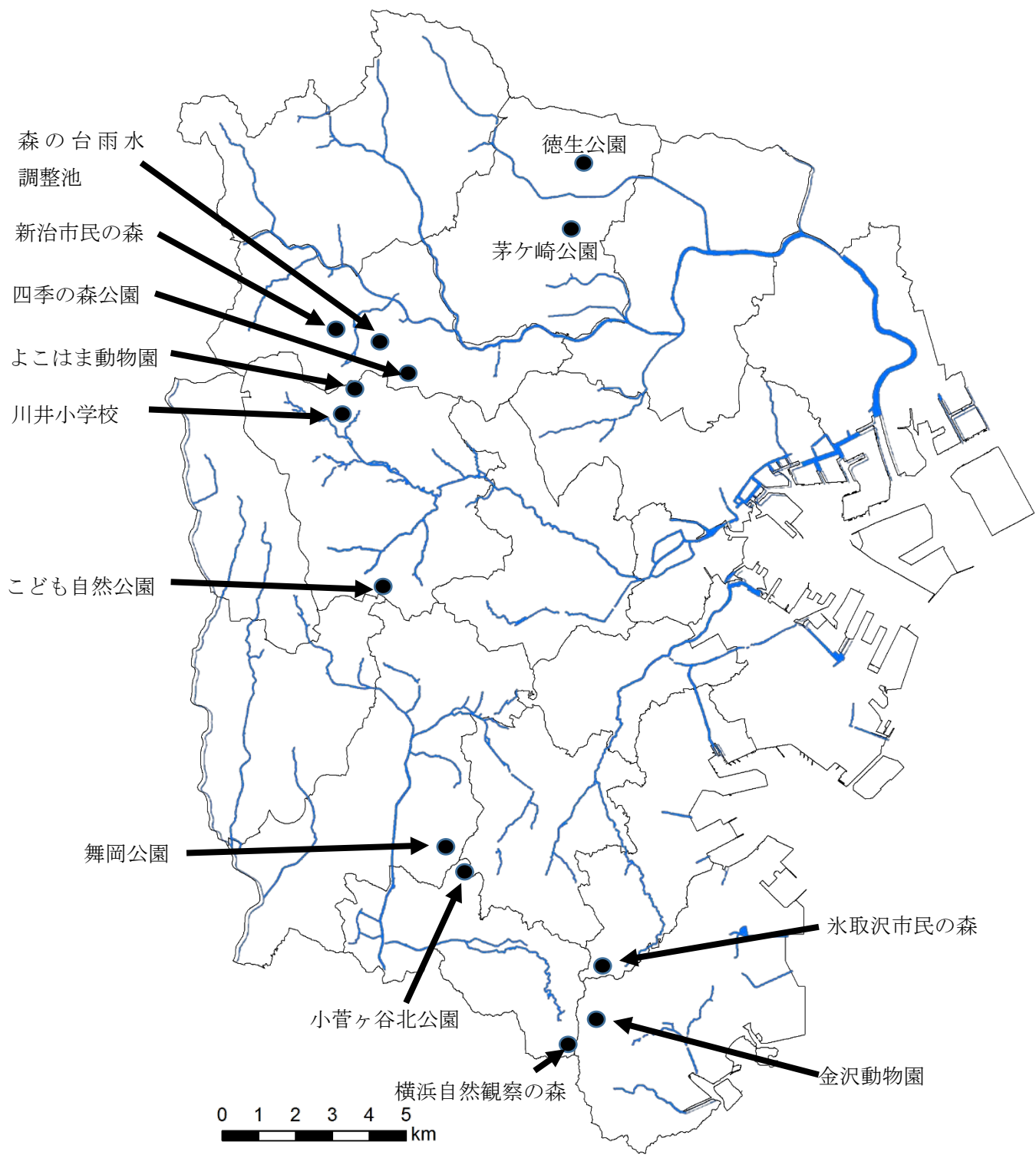


図1 調査地点

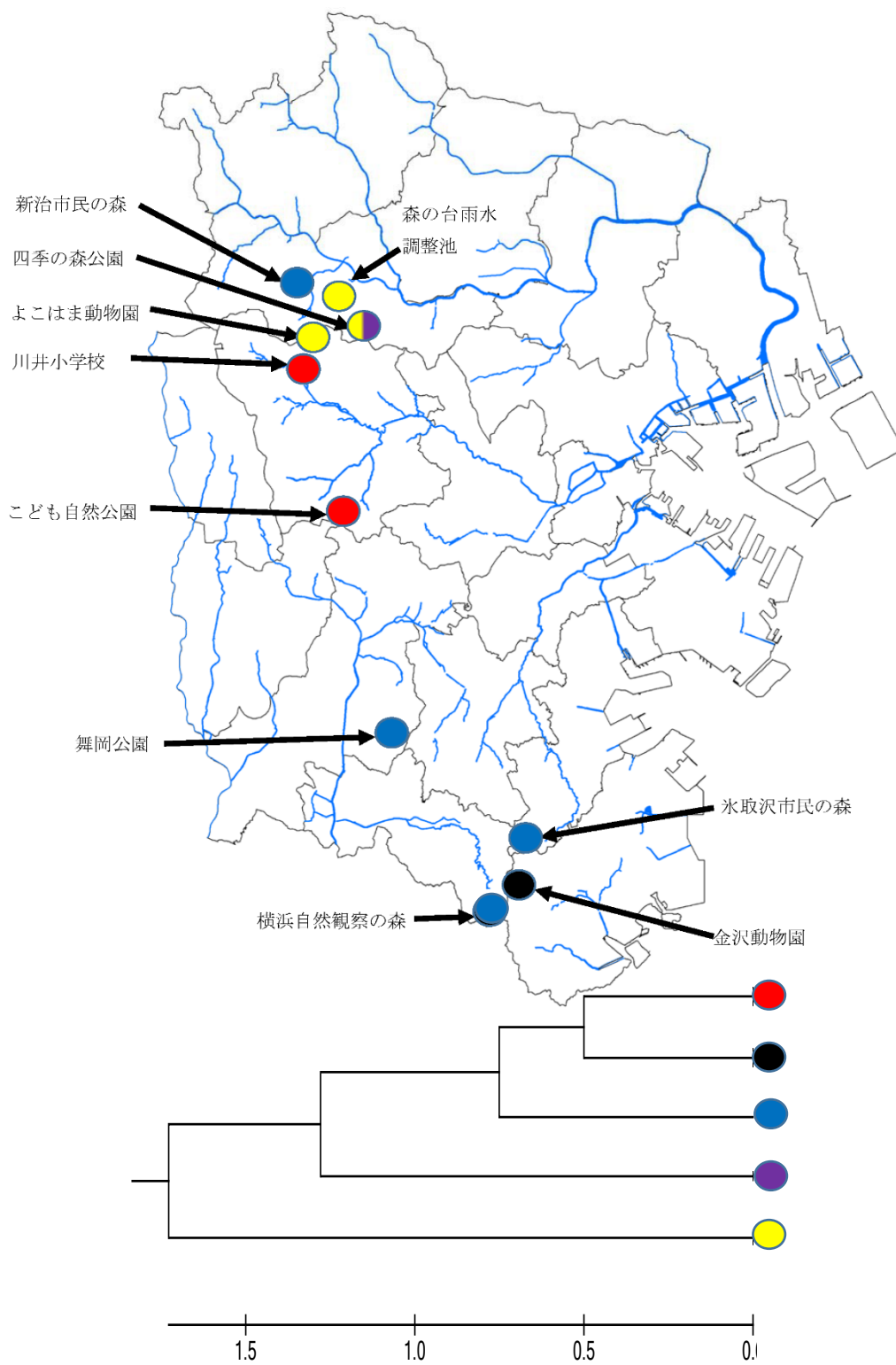


図2 ヤマアカガエルのハプロタイプ間の遺伝的關係と分布状況 (ND1 遺伝子) ハプロタイプを色別で示した。下の値は塩基置換数

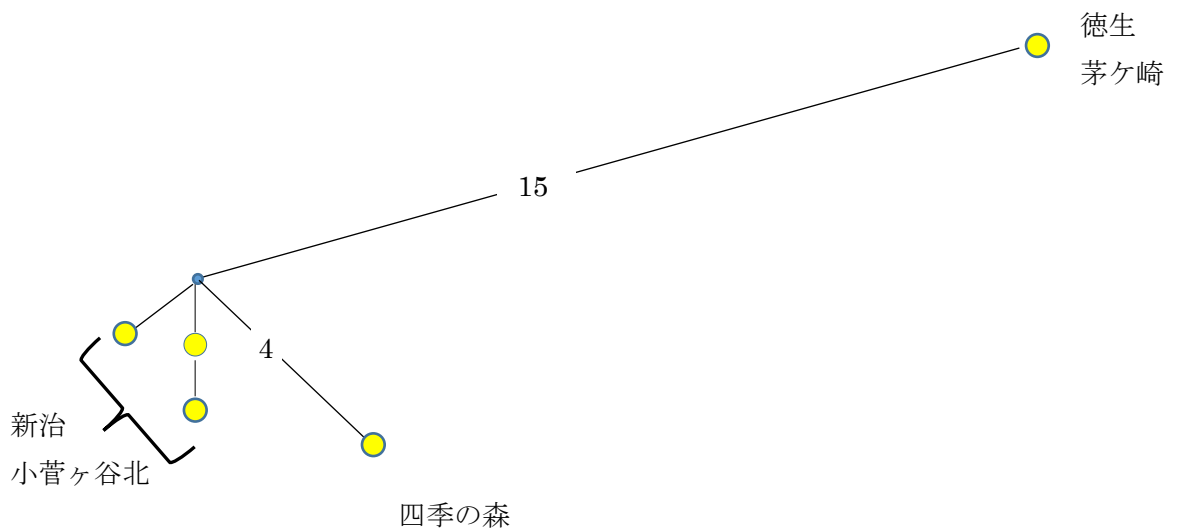


図3 ニホンアカガエルにおける生息地間の遺伝的関係 (D-loop 領域) 線上の数値は異なる塩基数を表している。数値の無い場合は1塩基

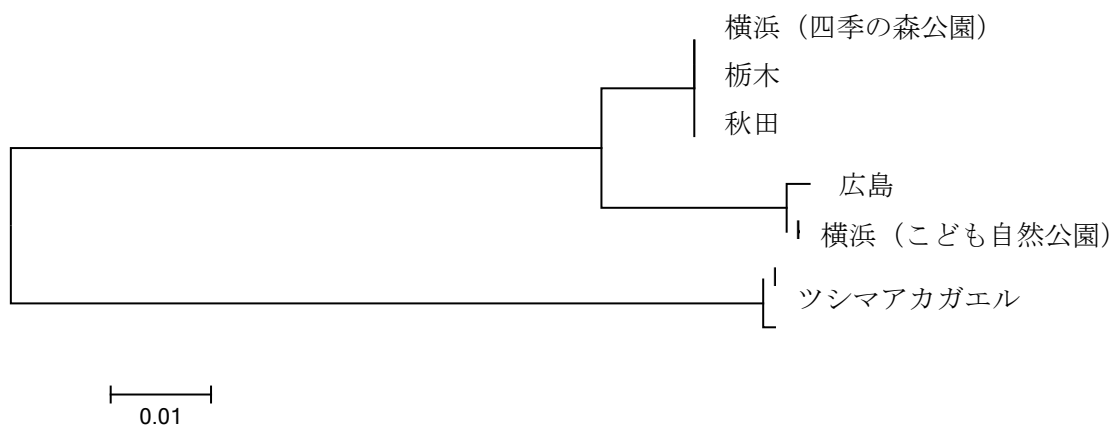


図4 ニホンアカガエルの地域間の遺伝的関係 (ND1 遺伝子)
ツシマアカガエルは比較に用いた別種。数値は異なる塩基の割合を示す

4 大学との共同研究

平成 28 年度、繁殖センターでは以下の大学等研究機関と共同研究を行った。

平成 28 年度共同研究

- (1) 岐阜大学応用生物科学部動物繁殖学研究室
P2 に記載済
- (2) 独立行政法人 国立環境研究所生物生態系環境研究センター
ホオアカトキの生物資源凍結保存および希少動物の体細胞培養に関する研究
- (3) 名古屋市立大学医学研究科
霊長類配偶子の凍結保存に関する研究
- (4) 広島大学理学研究科附属両生類研究施設分化制御機構研究部門
サドガエル等の配偶子保存等に関する研究
- (5) 公益社団法人日本動物園水族館協会
配偶子バンク等事業
- (6) 京都府立大学生命環境科学研究科
ライチョウ腸内細菌叢の検索に係る共同学術研究
- (7) 東京都市大学環境情報学研究科保全生態学研究室
カグーの保全に向けた行動生態学的研究
- (8) 中部大学創発学術院中部高等学術研究
霊長類の種の保存に係る共同学術研究について

5 研究発表

平成 28 年度は 7 件の研究発表（口頭発表 6 件、ポスター発表 1 件）を行った。

- 1 第 6 回関東東北・北海道合同ブロック動物園技術者研究会（口頭）
- 2 第 17 回ライチョウ会議長野大会（口頭）
- 3 環境創造局業務研究・改善事例報告会（口頭）
- 4 第 12 回カゲー円卓会議（口頭）
- 5 日本爬虫両生類学会第 46 回大会（口頭）
- 6 第 64 回動物園技術者研究会（ポスター）
- 7 合同飼育研究会（口頭）

ベニジュケイの親子判定の試み

○尾形光昭¹⁾，坂田直樹²⁾，伊藤咲良²⁾

(¹⁾ よこはま動物園・繁殖センター，²⁾ よこはま動物園)

ベニジュケイ (*Tragopan temminckii*) はキジ目の鳥類で、オスの求愛行動が特徴的であることが知られている。よこはま動物園では現在7羽飼育されており、毎年繁殖に成功している。一方で当園の飼育個体群には複数の成熟雌雄が同居展示されているため、産卵された有精卵の雄親を特定することが困難であった。さらに抱卵雌が途中で交代する場合もあるため、母親の特定も困難であった。そこで本研究では、よこはま動物園の飼育個体群内で確認された有精卵の父母を特定するために、DNAによる親子判定を試みた。

本調査では、よこはま動物園で2014年および2015年に産卵された有精卵12個を対象とした。調査卵の卵殻膜よりDNAを抽出し、6種類のマイクロサテライトDNA多型解析およびミトコンドリアDNAのD-loop領域の塩基配列解析により親子判定を行った。その結果、12卵中10卵の母親を特定できた。さらに、この内の1卵は同雌由来の4卵と父親が異なっていたことから、調査個体群内で番外交尾が起きていたことが示唆された。これらの結果から、DNAによる親子判定は本種飼育個体群の親子判定法として有効であると考えられた。一方で、ミトコンドリアDNAの塩基配列解析から、塩基配列が明瞭に異なる2つのハプロタイプが確認された。本種はジュケイ属の中でも最も広域に分布する種で、その分布域は中国南部からベトナム北部と広いことから、生息地域間で遺伝的に分化していることが予想される。そのため、今回確認された2つのハプロタイプは、それぞれ異なる地域集団に由来することが示唆された。

第 17 回ライチョウ会議長野大会

スバルライチョウを用いた飼育方法の検討及び個体群管理
白石利郎（横浜市繁殖センター）

二ホンライチョウ(*Lagopus muta japonica*)の長期飼育に日本で初めて成功したのは市立大町山岳博物館で、1963 年からおよそ 40 年間にわたって、生息域外保全を目指した飼育技術の確立に取り組んできた。この間、生息域内から 14 回にわたって 77 個の卵と 10 羽の雛及び親鳥を捕獲して飼育し、213 羽の飼育下繁殖(孵化)に成功しているが、残念ながら 2004 年 2 月に最後の 1 羽が死亡してからは、飼育の中断を余儀なくされた。このため大町市では 2004 年 9 月に「山岳博物館ライチョウ保護検討委員会」を設置し、今後のライチョウ飼育について協議を行った。委員会の報告書の中では、「未だにライチョウの十分な飼育技術確立はなされていない」とした上で、「まず外国産亜種を用いた飼育下繁殖(パイロットプラン)を成功させた後に、再び日本産亜種の飼育下繁殖へ移行させる段階的な計画策定」を提案している。これを受けて東京都恩賜上野動物園では、2008 年と 2009 年にノルウェー・トロムソ大学極地生物学研究所よりスバルライチョウ(*L. m. hyperboreus*)の卵計 109 個を導入し、2010 年には富山市ファミリーパークでも 105 個の卵を導入して、計 82 羽を孵化させ、パイロットプランが開始された。その後これらの個体およびその子孫を国内の動物園で分散させて飼育し、ライチョウの飼育技術の基礎データの蓄積、調査研究などを共同で実施することになった。

スバルライチョウ導入にあたっては、トロムソ大学の「ライチョウ飼育ハンドブック」に準拠して飼育することとしたが、当初は個別ケージでの飼育を基本として衛生管理に努め、飼料についてはペレットを主体とした内容としている。この結果、飼育下繁殖に一定の成果が得られ、2016 年 3 月現在で 8 園館 89 羽が飼育されるまでになった。かつての二ホンライチョウに比べると育成率や生存率は向上しており、死亡原因の過半数を占めていた感染症や、給与飼料に起因するとみられる盲腸機能障害などは減少している。しかしながら、スバルライチョウも同様に比較的死亡率が高い傾向にあり、脂肪肝や腸炎、ショック死など、ケージ飼育による運動不足、飼料の栄養価、ストレスなどが原因と思われる死亡例が目立つようになった。

スバルライチョウに関しては血統登録に基づく個体群管理を行っているが、ブリーディングローン等により血縁係数の低い個体同士でのペアリングを実施したり、寄与率の高い個体の繁殖制限を進めるなど、飼育下個体群の遺伝的多様性維持に努めている。現在の遺伝的多様性は 90%を超えるが、これを今後も維持していくためには、新たなファウンダーの導入が不可欠となる。スバルライチョウを今後どの程度の期間維持していくのかは決まっていないが、これらの人工統計学的・遺伝学的数値を二ホンライチョウの生息域外で維持していくための分析用パラメータとして活用出来ればと考えている。

第 12 回カグー円卓会議（口頭発表）

日本における飼育下カグーの人口統計学および遺伝学的分析
Demographic and Genetic Analysis of Captive Kagu in Japan
白石利郎（横浜市繁殖センター）

横浜市では、1989 年よりカグーの飼育を行っているが、飼育してきたカグーとその親世代のデータを用いて、カグーの飼育下における人工統計学および遺伝学的分析を行った。

横浜市の動物園では 1989 年以降これまでに、ニューカレドニアから 1992 年に雌 1 羽、1999 年に雄 1 羽、2010 年に雄 1 羽雌 1 羽、2011 年に雌 2 羽の合計 6 羽の寄贈を受けている。また、1999 年 7 月にドイツのフォーゲルパーク鳥類園へ雌 1 羽、2003 年 3 月にアメリカのサンディエゴ動物園へ 1 ペアを輸出しており、2007 年 6 月にはドイツのフォーゲルパーク鳥類園と雌雄 1 羽ずつの交換を行っている。横浜市ではこれまでに 85 羽のカグーが孵化して 21 羽が成育していて、現在 1 歳から 32 歳までの 18 羽が飼育されている。

日本におけるカグーの繁殖は、ほぼ一年中みられるが、9 月にはあまり繁殖が見られなくなる。これはカグーの換羽の時期と関係しているものと思われる。初産の年齢は 3 歳で、28 歳になっても繁殖が見られ、比較的長い間、繁殖が可能だが、雄では 25 歳を過ぎても繁殖率はあまり変わらないが、雌では 18 歳くらいをピークにその後減少する傾向にあった。

現在の個体群の遺伝的多様性は 89.7%を維持しており、近交係数の平均値は 0.0174、平均血縁度は 0.028 から 0.143 で、遺伝的に健全な群れであると言える。ただし、このまま個体群サイズ等の条件を現在で飼育し続けた場合、100 年後には遺伝的多様性は 60%以下、200 年後には 40%以下に減少してしまう。個体数を無制限に増やした場合でも、100 年後の遺伝的多様性は 75%以下に減少してしまい、また個体数も 170 羽に増加してしまうので、飼育スペースのことを考慮すると現実的な数値ではない。飼育個体数の上限を 50 羽として、10 年ごとに 2 羽ずつファウンダーを導入するとした場合では、遺伝的多様性は 100 年後でもおよそ 90%保持することが出来、現実的なプランであると言える。しかしこれらを実現するためには、国際的な血統管理と保全計画の立案を実施すると共に、ニューカレドニアとの連携が益々重要となってくる。

日本爬虫両生類学会第 55 回大会

長野県内におけるツチガエル地域集団の分布

尾形光昭（横浜市繁殖センター）・丸野内淳介（神奈川県立生命の星・地球博物館）・田上正隆（世界淡水魚園水族館 アクア・ととぎふ）・伊藤道彦（北里大・理）・三浦郁夫（広島大・両生類研究センター）

Distribution of three different geographic populations of *Glandirana rugosa* in Nagano prefecture

Mitsuaki Ogata, Junsuke Marunouchi, Masataka Tagami, Michihiko Ito and, Ikuo Miura

日本産ツチガエルは性決定機構の違いに基づいて、5つの遺伝的地域集団（東日本、西日本、ZW, Neo-ZW, XY）に分かれる。近畿地方では性決定機構の異なる地域集団間の境界域において、性決定機構の異なる個体が同一個体群内に混在するなど複雑な様相を呈することが知られている。一方で、長野県はツチガエルの3つの地域集団（東日本, XY, ZW）が分布を接するとされていたが、詳細な分布調査は行われてこなかった。そこで長野県内におけるツチガエルの地域集団の境界域を特定するために、その分布状況を調査した。その結果、関東山地沿いには東日本集団が分布し、天竜川沿いには東海地方に広く分布するXY集団が生息することが明らかとなった。一方で、大町市ではZW集団が確認された。これらの結果から、関東山地がツチガエル東日本集団の分布域の西縁であることが示唆された。さらに、東日本集団とXY集団は塩尻 - 伊那付近で近接しているが、両者が混在した個体群は確認されなかった。チトクローム b 伝子の部分塩基配列に基づく系統解析の結果、長野県内のXY集団は、他地域のXY集団から早期に分化していることが明らかとなった。このことから、長野県内においてXY集団と東日本集団の混在域が確認されないのは、両者の近接した分布が最近になって形成されたことによるものではなく、両者の分布域間に存在する木曾 - 赤石山脈等の山地群によりXY集団の伊那市以北への侵入が阻まれているためであることが示唆された。

糞中性ステロイドホルモン代謝物を指標としたテングザルの排卵周期の確認と妊娠判定の試み

○大沼友有子¹⁾、石井裕之¹⁾、清野悟²⁾、矢治信之介¹⁾、堀田裕子¹⁾、中野佑香¹⁾、楠田哲士³⁾

(¹⁾ 横浜市繁殖センター、²⁾ よこはま動物園、³⁾ 岐阜大学応用生物科学部)

テングザル *Nasalis larvatus* はボルネオ島の固有種で、生息環境の変化等から個体数が減少し、絶滅危惧 IB 種 (EN) に位置付けられている。よこはま動物園では 2009 年にインドネシアからテングザルを導入し、横浜市繁殖センターと協同して飼育下繁殖を推進している。本研究では、糞中性ステロイドホルモン代謝物の動態を指標として排卵周期の確認と妊娠判定を試みたので報告する。対象はよこはま動物園で飼育中のテングザルの成獣雌 2 頭で、それぞれ別の成獣雄とペアリングしていた。それらの糞中性ステロイドホルモン代謝物としてプロジェステロン (P4)、プレグナンジオール (PdG)、エストラジオール-17 β (E2) を酵素免疫法によって測定した。また、測定結果とテングザルの行動との関連を調べた。糞サンプルは 2013 年 8 月から 2016 年 8 月まで、可能な限り毎日採取した。その結果、雌一頭では、糞中 P4、および PdG 値の上昇開始付近の時期に乗駕と交尾行動が観察されていたことから、これらのホルモン動態の周期性は排卵周期を示すものと考えられた。各ホルモン動態から算出した平均周期日数はそれぞれ 29.6 日と 28.8 日であった。もう一頭の雌では明確な周期性は認められなかった。本研究期間中に 2 頭はそれぞれ 2015 年 12 月と 2016 年 5 月に出産した。交尾日およびホルモン動態から判断した妊娠期間は 2 頭とも約 200 日と推察された。いずれも妊娠中は E2 が急激に上昇し、出産まで高い値を維持し、出産時に減少した。また、P4、PdG も非妊娠期に比べて高い値を示していた。以上の結果から、これらのホルモン動態を把握することで、排卵周期の確認と妊娠判断が可能と思われた。

テングザルの繁殖と糞中性ステロイドホルモン測定結果について

大沼 友有子¹⁾，矢治 信之介¹⁾，堀田 裕子¹⁾，中野 佑香¹⁾ 清野 悟²⁾ 楠田 哲士³⁾

(¹⁾ 横浜市繁殖センター，²⁾ よこはま動物園，³⁾ 岐阜大学応用生物科学部)

よこはま動物園では2009年からテングザル *Nasalis larvatus* を飼育展示しています。テングザルはボルネオ島だけにすみ、木の葉を主食にしています。生息地の環境破壊により、現在の野生個体数は1万頭前後に減少しています。

テングザルの繁殖を進めるために、よこはま動物園と横浜市繁殖センターは2013年から糞に含まれる性ステロイドホルモン代謝物の変動を調べる研究を行ってきました。そして2015年12月22日にキナンティが出産、引き続き2016年5月11日にアプルが出産し、2頭の妊娠前、妊娠中の糞中性ステロイドホルモン代謝物（エストラジオール-17β、プロジェステロン、プレグナンジオール）の変化を把握することができました。

その結果、これら3種の糞中性ステロイドホルモン代謝物の量が、妊娠後著しく増えることが確認され、出産時に急激に減少しました。そこで、これらを測ることで、テングザルの妊娠判断ができるのではないかと考えられました。

また、行動観察結果とホルモン変化の結果を照らし合わせてみると、キナンティでは乗駕や交尾という発情行動周期を示すと思われるエストラジオール-17βの周期変化が見られました。一方アプルでは排卵周期を示すと思われるプロジェステロンとプレグナンジオールの周期的変化が認められました。このことから今回のキナンティの妊娠期間は203日、アプルの妊娠期間は204日と推察されました。

今回は1頭1回ずつの出産についての測定結果なので、今後はデータを蓄積していくことで出産時期の推定も可能になるのではないかと思います。