

平成 25 年 4 月 17 日

横浜市繁殖センター

## 平成 24 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、カゲ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 24 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。

### <内容要約>

平成 24 年度は、希少野生動物の精子 2 種、卵子 2 種、体組織 21 種 29 点の凍結保存を行った。また、よこはま動物園および野毛山動物園で飼育されている 5 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 関連研究として飼育鳥類 19 種 84 個体について DNA による雌雄判別を行った。さらに、動物園動物 3 種について mtDNA やマイクロサテライト DNA による遺伝的多様性解析を行った。

### <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 | ・・・P1  |
| (2) 配偶子および体組織の凍結保存               | ・・・P7  |
| (3) 動物の各種 DNA 解析                 | ・・・P8  |
| (4) 大学等との共同研究                    | ・・・P18 |
| (5) 学会等発表資料                      | ・・・P19 |

## (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24年度は、よこはま動物園および野毛山動物園で飼育されている5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、ゴールデンターキン、ニホンカモシカ、インドゾウ、インドサイ、ホッキョクグマ、メガネグマ、ヤブイヌ、ツシマヤマネコ、レッサーパンダ、シロテテナガザル、オランウータン、チンパンジー、アカアシドゥクラングール、フランソワルトン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24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 瀬尾亮太 木下美歩 三田さくら 高橋めい

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清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解明し、その飼育管理を改善することにある。

平成 24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 の通りである。この他に採材している動物の性ホルモンの測定は、岐阜大学にお願いしている。また、よこはま動物園のウンピョウ アニル♀（2012年5月～2012年8月分）については人工授精を行った際、繁殖センターと神戸大学と協力して測定を行った。

性ホルモンは自家製キットを使用して、♀はプロジェステロン（P4）とエストラジオール17β（E2）を、♂はテストステロンを測定した。

測定値をグラフ化したものを図 1 から図 6 に示した。

表 1 H24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	No. 4 デル	♀	よこはま動物園	糞	プロジェステロン（未） エストラジオール17β
ウンピョウ	No. 19 アニル	♀	よこはま動物園	糞	プロジェステロン エストラジオール17β
シシオザル	No. 8 エブリ No. 2 ノランダ No. 5 ボナー	♀ ♀ ♀	よこはま動物園	糞	プロジェステロン エストラジオール17β（未）
レッサーパンダ	キンタ	♀	野毛山動物園	糞	プロジェステロン エストラジオール17β
レッサーパンダ	ウミ	♂	野毛山動物園	糞	テストステロン
レッサーパンダ	ケンケン	♂	野毛山動物園	糞	テストステロン（未）
アンデスコンドル	ジュン	♂	野毛山動物園	糞	テストステロン

セスジキノボリカンガルー（No. 3♀、No. 5♀）についてはペアリング相手の♂個体が死亡したため、測定を終了した。シシオザルについては、3 個体中 1 個体（No. 8 エブリ）についてのみ予備的に測定した。

表1 スマトラトラ ♀No.4 デル

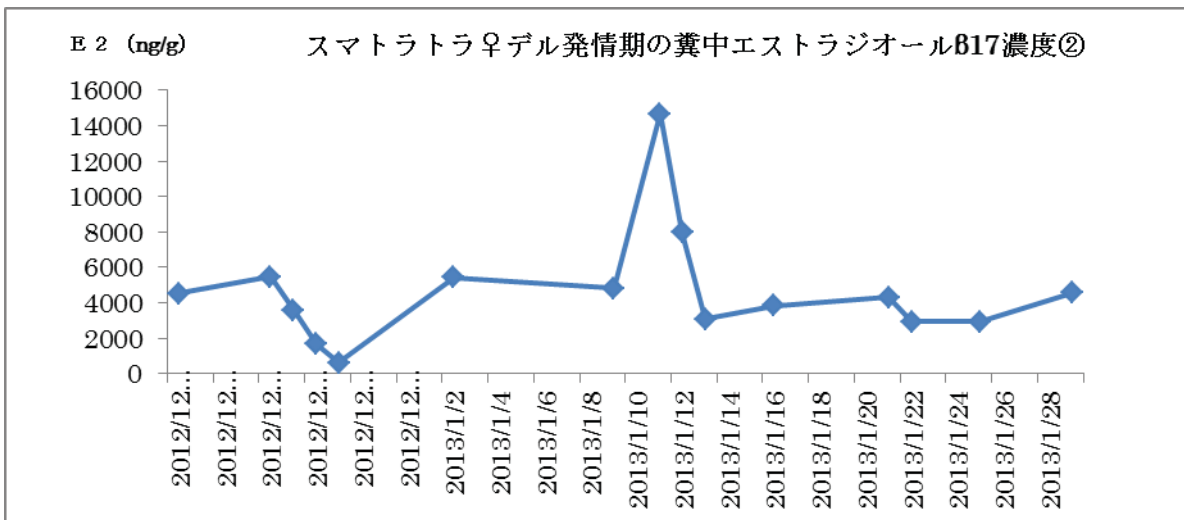
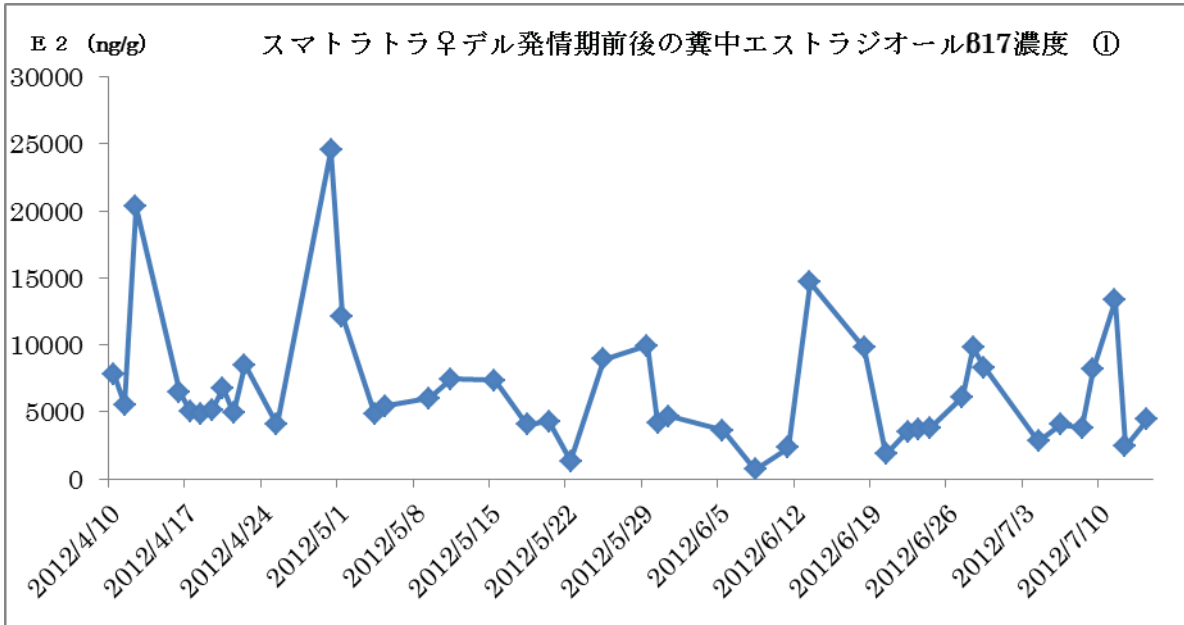


表2 ウンピョウ ♀ No.17 アニル

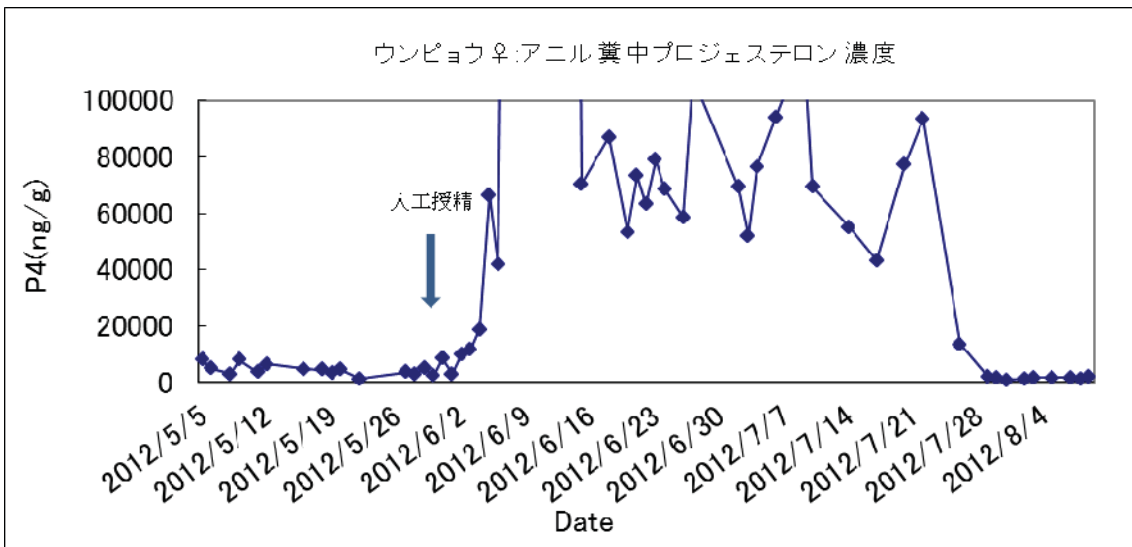
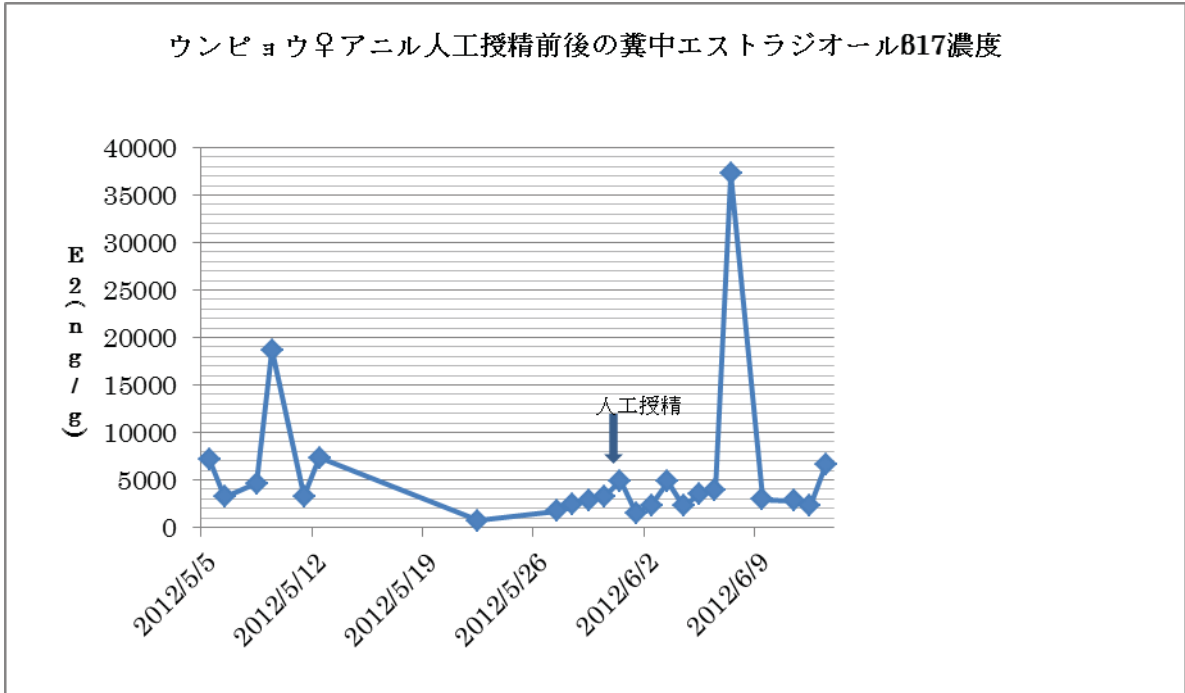


表3 シシオザル ♀ No.8 エブリ

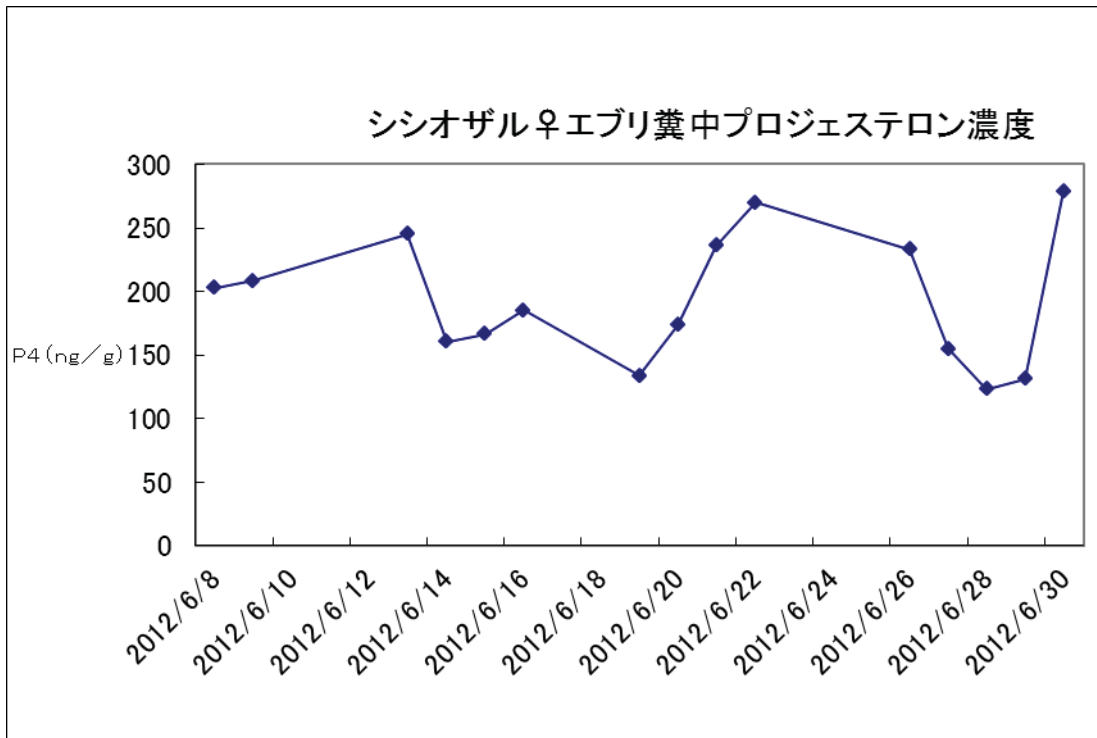


表4 レッサーパンダ ♀ キンタ

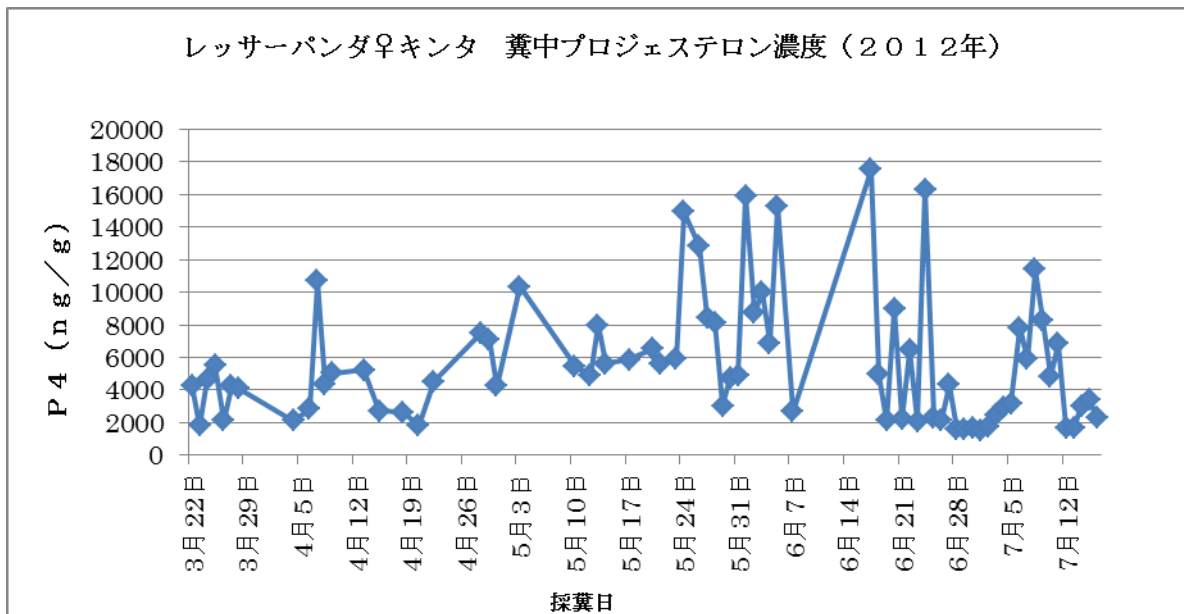


表5 レッサーパンダ ♂ ウミ

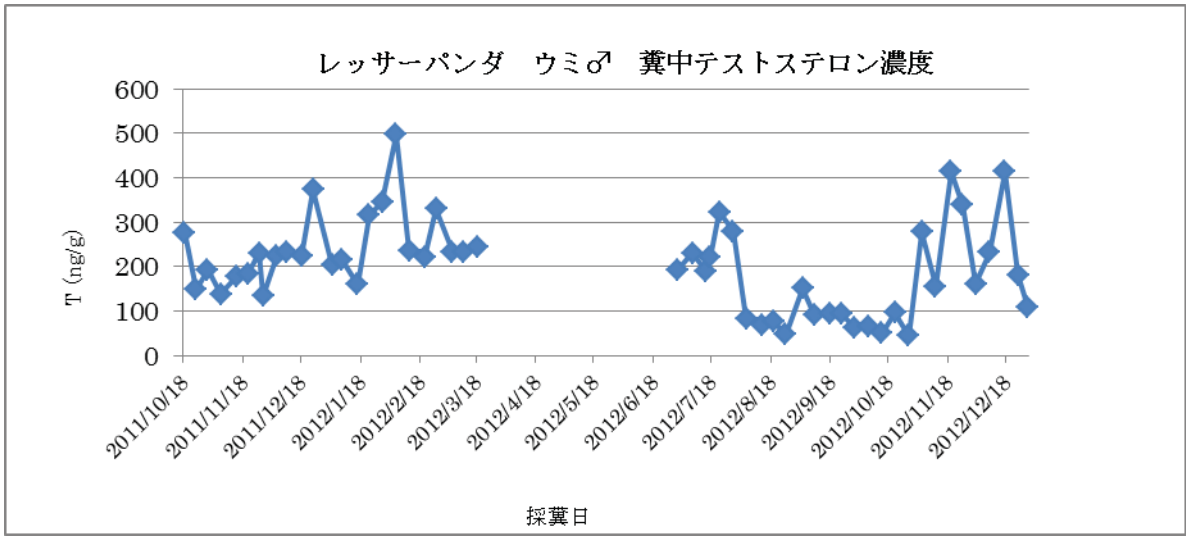
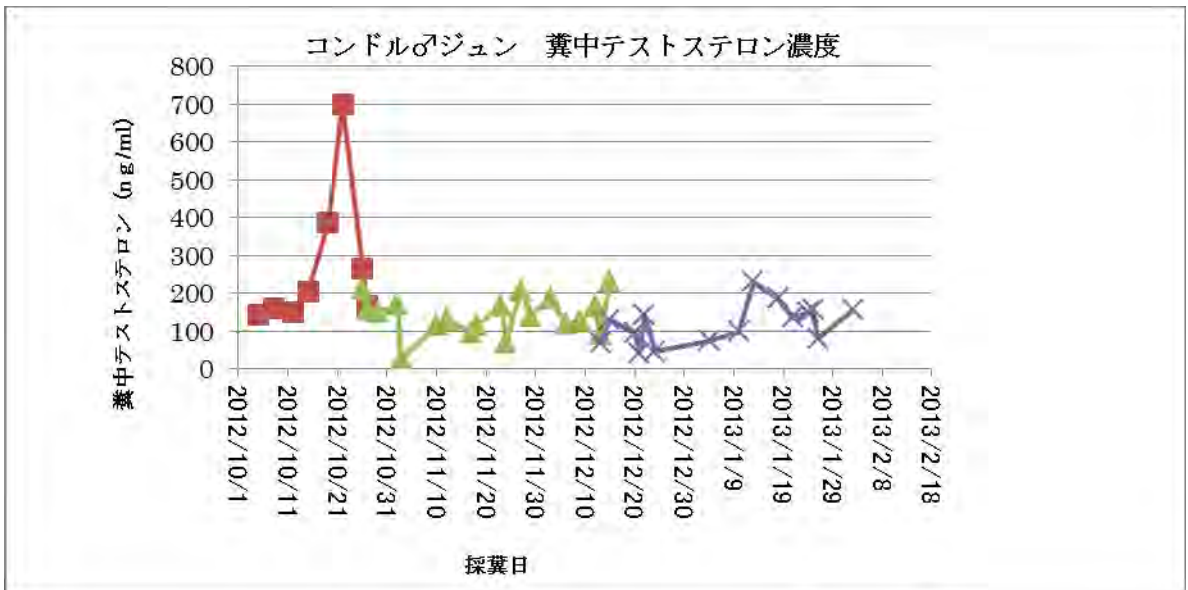


表6 アンデスコンドル ♂ ジュン



## 2 配偶子および体組織の凍結保存

平成 24 年度は、哺乳類 14 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。(表 2)

また、哺乳類 9 種について卵子回収を行なった。その結果、2 種で卵子を回収し、凍結保存を実施した。(表 3) なお、これらの結果は希少動物人工繁殖研究会第 21 回会議で報告する予定となっている。

また、遺伝子保存の一環として、死亡動物の 21 種 29 点(鳥類 10 種 13 点、哺乳類 11 種 16 点)の体組織(筋肉、肝臓、脾臓)を-80℃下で凍結保存した。

なお、繁殖センターには平成 11 年以降これまでに精子 57 種(哺乳類 45 種、鳥類 10 種、爬虫類 2 種、ストロー本数 1,250 本)、卵子 4 種、体組織 157 種 708 点が凍結保存されている。(平成 25 年 3 月末現在)

横浜市繁殖センター・精子回収状況(2012. 4~2013. 3)

綱	目	種	性	由来	採材時 年齢 (歳)	死因	経過 時間 (h)	配偶子回収			配偶子 回収総数		生存 精子率 (%)	形態正常 精子率 (%)	
								左右	部位	方法	精子×百万	精子活性			
哺乳	食肉	ドール	雄	飼育	13	衰弱	24	右	精巣上体尾部	灌流	—	—	—	—	
			雄	飼育	15	胃捻転	—	左	精巣上体尾部	灌流	—	—	—	—	
		ヤブイヌ	雄	飼育	不明	衰弱	9	右	精巣上体尾部	灌流	—	—	—	—	
			雄	飼育	—	—	—	左	精巣上体尾部	灌流	—	—	—	—	
		有袋	セスジキノポリカンガルー	雄	飼育	12	肺炎	30	右	精巣上体尾部	灌流	—	—	—	—
				雄	飼育	—	—	—	左	精巣上体尾部	灌流	1.5	5±	84	—
			アカカンガルー	雄	飼育	10	消化器疾患	2	右	精巣上体尾部	灌流	18	5±	55	—
				雄	飼育	11	消化器疾患	5	右	精巣上体尾部	灌流	74	20+15±	55	—
		奇蹄	ベアードバク	雄	飼育	30	老衰	5	右	精巣上体尾部	灌流	—	—	—	—
				雄	飼育	—	—	—	左	精巣上体尾部	灌流	—	—	—	—
霊長	ニホンザル	雄	飼育	21	胃破裂	24	右	精巣上体尾部	灌流	—	—	—	—		
		雄	飼育	—	—	—	左	精巣上体尾部	灌流	—	—	—	—		

\*8 個体より精子の回収を試み、2 個体より採取できた。そのうちセスジキノポリカンガルー、アカカンガルーについて保存に供した。

横浜市繁殖センター・卵子回収状況(2012. 4~2013. 3)

綱	目	種	性	由来	採材時 年齢 (歳)	死因	経過 時間 (h)	配偶子回収			配偶子 回収総数	良好 卵子	
								左右	部位	方法			
哺乳	食肉	ドール	雌	飼育	9	子宮蓄膿症 *子宮摘出	4	右	卵巣	切開	—	—	
			雌	飼育	10	子宮蓄膿症 *子宮摘出	24	右	卵巣	切開	—	—	
		ウンピョウ	雌	飼育	12	子宮内膿症 *子宮摘出	7	右	卵巣	切開	1	1	
			雌	飼育	—	—	—	左	卵巣	切開	—	—	
		レッサーパンダ	雌	飼育	12	心不全	24	右	卵巣	切開	2	—	
			雌	飼育	—	—	—	左	卵巣	切開	1	—	
		ニホンアナグマ	雌	飼育	12	肺炎	24	右	卵巣	切開	—	—	
			雌	飼育	—	—	—	左	卵巣	切開	—	—	
		有毛	オオアライクイ	雌	飼育	12	衰弱	24	右	卵巣	切開	3	—
		奇蹄	ヒガシクロサイ	雌	飼育	1	衰弱	48	右	卵巣	切開	—	—
雌	飼育			—	—	—	左	卵巣	切開	—	—		
鯨偶蹄	アミメキリン	雌	飼育	15	不明	24	右	卵巣	切開	—	—		
		雌	飼育	—	—	—	左	卵巣	切開	—	—		
霊長	フランソワルトン	雌	飼育	22	不明	4	右	卵巣	切開	—	—		
		雌	飼育	—	—	—	左	卵巣	切開	—	—		
ウサギ	トウホクノウサギ	雌	飼育	0.5	不明	24	右	卵巣	切開	—	—		
		雌	飼育	—	—	—	左	卵巣	切開	—	—		

\*10 個体より卵子の回収を試み、2 個体より採取できた。そのうちウンピョウ、オオアライクイについて保存に供した。



### 3 DNA 解析

#### (1) 鳥類の雌雄判別

横浜市立動物園の飼育展示個体と傷病鳥獣保護個体については、19 種 84 個体で雌雄判別を実施した。また、ポジティブコントロール(PC)サンプル採取のため、凍結保存サンプル 6 種 11 個体からの DNA 抽出を行った。また、国内飼育ペンギン類の雌雄判別については、15 施設 7 種 117 個体について実施した。

#### 横浜市立動物園鳥類雌雄判別および DNA 抽出件数内訳

動物園名	種名	羽数	備考
繁殖センター	ホオアカトキ	4	
	コンゴクジャク	1	
	カグー	2	
	カンムリシロムク	30	
野毛山動物園 6	フンボルトペンギン	2	
	クロツラヘラサギ	3	
	ミゾゴイ	1	
	サカツラガン	3	
	カルガモ	5	
	ノスリ	1	
金沢動物園 1 1	ダーウィンレア	1	PC サンプル
	ハシボソミズナギドリ	1	
	ハイイロウミツバメ	1	PC サンプル
	カルガモ	4	
	トビ	2	PC サンプル(1 羽)
	タンチョウ	2	PC サンプル
	ウミスズメ	2	PC サンプル(1 羽)
	フクロウ	2	
	アオバネワライカワセミ	5	PC サンプル
	カワセミ	1	
	アオゲラ	1	
よこはま動物園 6	フンボルトペンギン	2	
	カルガモ	11	
	シロカケイ	2	
	ウミネコ	2	

	カラスバト	2	
	アオゲラ	3	

国内飼育ペンギン類雌雄判別実施件数内訳(横浜市立動物園を除く)

種名	施設名	羽数	備考
オウサマペンギン	大阪海遊館	2	
ジェンツーペンギン	南知多ビーチランド	1	
	島根県立しまね海洋館	1	
	マリンピア松島水族館	11	
	豊橋総合動植物公園	5	
	名古屋港水族館	5	
アデリーペンギン	名古屋港水族館	1	
イワトビペンギン	豊橋総合動植物公園	1	
ケープペンギン	東北サファリパーク	5	
	淡島マリnpark	3	
	千葉市動物公園	8	
	掛川花鳥園	1	
	久留米市鳥類センター	1	
フンボルトペンギン	虹の公園おさかな館	2	
	愛媛県立とべ動物園	2	
	南知多ビーチランド	4	
	島根県立しまね海洋館	3	
	飯田市立動物園	3	
マゼランペンギン	淡島マリnpark	47	
	神戸市立須磨海浜水族園	11	

## テングザルの遺伝的多様性解析

[目的] よこはま動物園で飼育されている、絶滅危惧種テングザル(*Nasalis larvatus*)の遺伝的な血統管理を目的に、同動物園の創始個体の遺伝的多様性を解析した。

[方法] インドネシア共和国スラバヤ動物園より入園した創始個体 5 頭の血液から DNA を抽出し、ミトコンドリア DNA の D-loop 領域の塩基配列を解析した。また、木村の 2 変数法により配列間の DNA 距離を算出し、その値に基づき近隣結合法により配列間の系統関係を解析した。さらに NCBI データベース上に登録されているボルネオ島北部マレーシア領内の個体群由来の DNA 配列も系統解析に用いた。更にマイクロサテライト DNA の 4 遺伝子座の多型解析も行った。

[結果] 塩基配列解析の結果、よこはま動物園の飼育下テングザル 5 頭の D-loop 領域 450bp から 4 つのハプロタイプが確認され、それらは大きく 3 グループに分けることが可能であった。(Fig.1) しかしマイクロサテライト DNA の 4 遺伝子座による多型解析では、mtDNA で観察されたグループを確認できなかった。(Fig.2) 一方、今回確認されたハプロタイプと既知のハプロタイプ間で共通する 257bp について系統解析を行った結果、よこはま動物園の飼育個体で確認された 3 ハプロタイプは、マレーシア領由来のハプロタイプと大きく分化していることが分かった。(Fig.3)

[考察] ミトコンドリア DNA は母系遺伝であるため、よこはま動物園の創始個体 5 頭は 3 頭の異なる母親由来であることが示唆された。また mtDNA と両親遺伝のマイクロサテライト DNA から得られた個体間の遺伝的關係が一致しないことから、5 頭は極端な近親交配により得られた個体ではないことが示唆された。一方で、よこはま動物園の創始個体は原産地が不明であるものの、同動物園から確認されたハプロタイプの一部はボルネオ島北部個体群由来のハプロタイプとは分化していることから、テングザルの遺伝的多様性は低いことが示唆された。

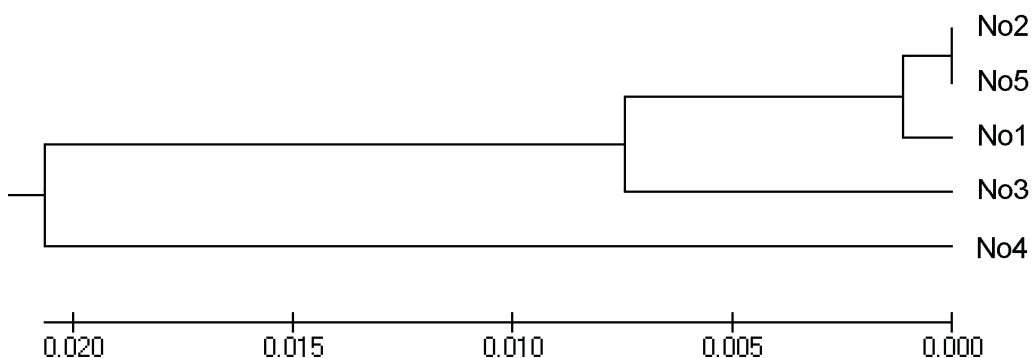


Fig.1 飼育下テングザル 5 頭の遺伝的關係 (D-loop sequences,450bp).

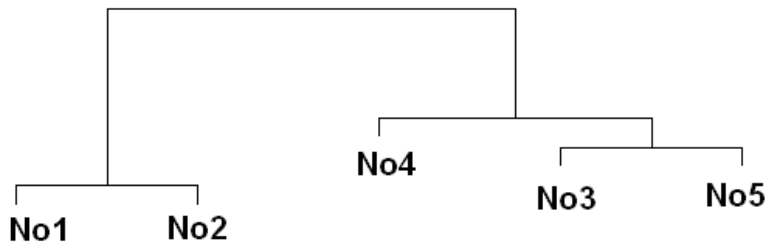


Fig.2 マイクロサテライト DNA 4 領域の多型解析に基づく飼育下テングザル 5 頭の遺伝的関係

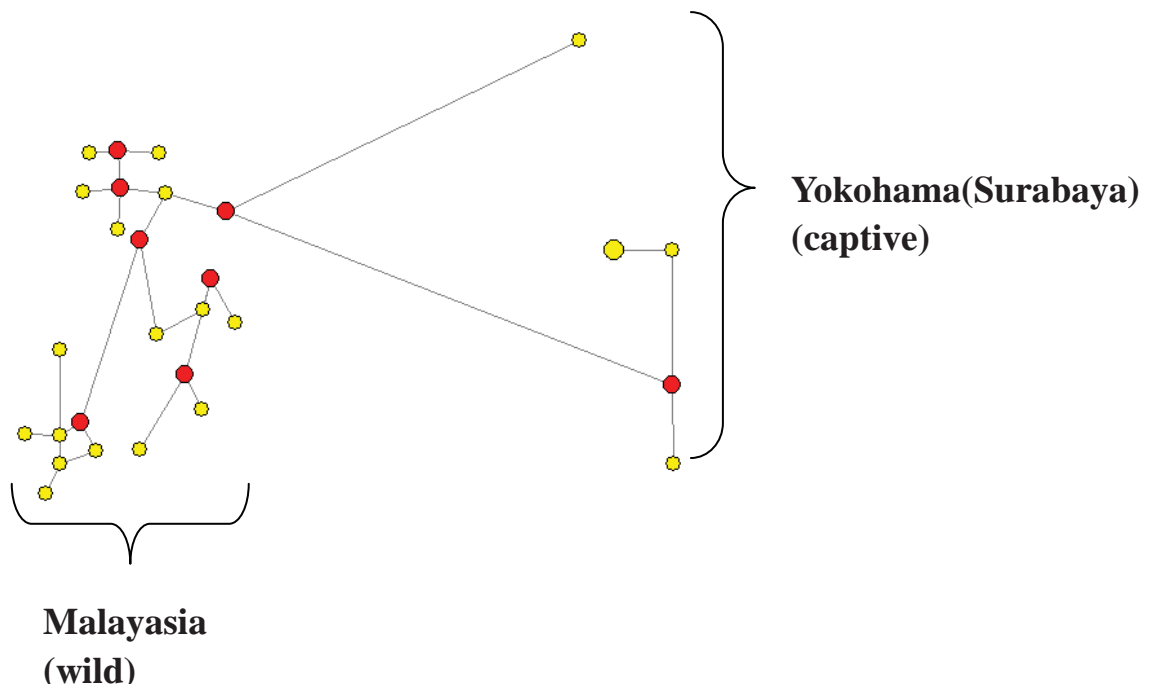


Fig.3 テングザル (野生個体を含む) の D-loop 領域(257bp)のハプロタイプネットワーク

## カンムリシロムクの遺伝的多様性解析

[目的]絶滅危惧種カンムリシロムクの野生個体群回復に向け、インドネシア飼育下個体群の安定的な維持管理を目的に、インドネシア国内飼育下個体群の遺伝的多様性を解析する。

[方法] インドネシア共和国生物多様性センターおよびカンムリシロムク保護協会（APCB）と共同でインドネシア国内の飼育下カンムリシロムク 196 羽から DNA 抽出を行い、mtDNA の COII 遺伝子領域の塩基配列解析とマイクロサテライト DNA について多型解析を行った。

[結果]COII 遺伝子解析では 129 個体について塩基配列 434bp を解析した。変異サイトは 2 か所、3 ハプロタイプが確認された。(Fig. 1)

一方で、マイクロサテライト DNA 解析では、近縁種で得られているマイクロサテライト DNA プライマー 25 種およびカンムリシロムク DNA 中から見出されたマイクロサテライト DNA、20 領域について多型解析を行った結果、2 領域のみ多型を示した。インドネシア国内飼育個体 136 個体について、2 領域のマイクロサテライト DNA の多型解析を行った。その結果、各マイクロサテライト DNA 領域について、2 および 3 アリルが確認された。これらの多型を基に、インドネシア国内の飼育施設の遺伝的分化の有無を推定した結果、特定施設の飼育集団が多少の遺伝的分化を示した。(Table1, 2)

[考察]mtDNA の遺伝子解析およびマイクロサテライト DNA 多型解析から、インドネシア飼育下個体群の遺伝的多様性が高いことは示されなかった。これは、カンムリシロムクの記載当初から野生個体群の分布域が限られていることから示唆される。一方で、特定飼育施設が多少なりとも遺伝的分化を示したことから、インドネシア飼育施設間で個体交流が十分でない可能性があることが示唆された。

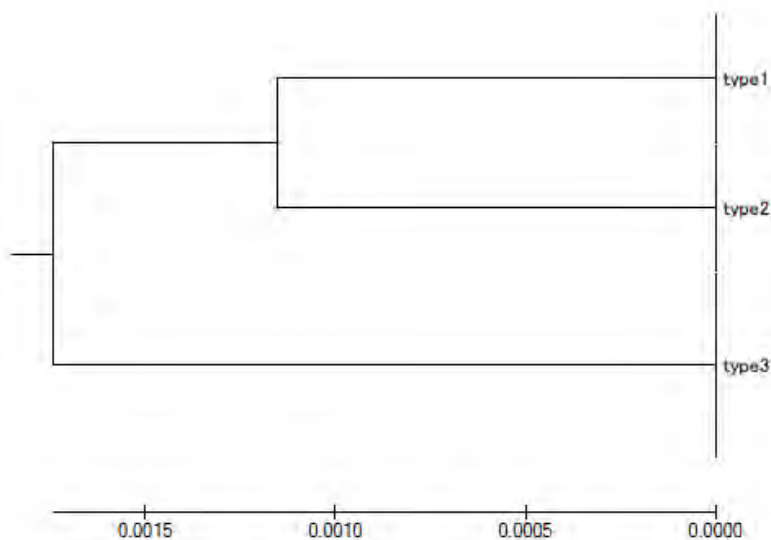


Fig. 1 mtDNA-COII 遺伝子 434bp 配列に基づく 129 羽の遺伝的關係 (UPGMA 法)

Table 1. 解析に用いたインドネシア国内飼育施設

Population	Abbreviation	No. of DNA samples using microsatellite DNA analysis	Group
Taman safari Indoensia	TSI	12	TSI
Kere Ayam BF	Kereayam	20	Other
Bosetia	Bosetia	7	Other
Sejaherera Jaya	Sejaherera	3	Other
Sahabat	Sahabat	4	Other
Gatot	Gatot	2	Other
Yanto	Yanto	1	Other
Unknown	Unknown	2	Other
Taman safari & Marine Park, Gianyar-Bali	TSM	15	TSI
Museum Renaissance Antonio Blanco Campuhar	MRABC	4	Other
Taman National Bali Barat Tegal Bunder	TNBBTB	19	TNBB
Taman National Bali Barat Tanjung Gelap	TNBBTG	3	TNBB
Kebun Binatang Surabaya	Surabaya	14	Other
Penangkaran Burung Kertosono	Penangkaran	3	Other
Taman national Bali Barat	TNBB	28	TNBB

Table 2. インドネシア国内 15 施設間の遺伝的分化 (施設名称は Table.1)

	TSI	Kere ayam	Bosetia	Sejaherera	Sahabat	Gatot	Yanto	unknown	TSM	MRABC	TNBB- TB	TNBB- TG	Surabaya	Penang karan	TNBB
TSI		NS	NS	NS	NS	NS	NA	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Kereayam			NS	NS	NS	NS	NA	NS	*	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Bosetia				NS	NS	NS	NA	NS	*	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Sejaherera					NS	NS	NA	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Sahabat						NS	NA	NS	*	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Gatot							NA	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Yanto								NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
unknown									NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
TSM										*	*	NS	NS	NS	NS
MRABC											NS	NS	NS	NS	NS
TNBB-TB												NS	NS	NS	NS
TNBB-TG													NS	NS	NS
Surabaya														*	NS
Penangkaran															NS
TNBB															NS

NS; Not significant, NA; No analysis, \*; Significant

## ミゾゴイの遺伝的多様性解析

[目的]絶滅危惧種であるミゾゴイの飼育下保全活動に当たり、遺伝学的な基礎データ収集し、今後の飼育下繁殖計画策定に寄与する

[方法]日本国内で保護されたミゾゴイ 5 羽の DNA を抽出し、mtDNA の cytb 遺伝子、12SrRNA 遺伝子、ND2 遺伝子の塩基配列の解析、およびゴイサギ用に開発されたマイクロサテライト DNA プライマーを用い多型解析を試みた

[結果]横浜（よこはま、野毛）、名古屋（東山）、宮崎（フェニックス）の計 5 羽について、mtDNA の 3 遺伝子について合計、1100bp 程度の塩基配列を解析したが、5 羽間で遺伝的多様性はほぼ皆無であった（1 羽で 1 塩基のみ置換）。一方で、ゴイサギのマイクロサテライト DNA プライマー 11 種について、ミゾゴイでの PCR 増幅を試みた結果、4 種について多型が疑われるプライマーが確認された。この 4 種について、蛍光標識により多型解析を行ったが、1 種類のみ多型が確認され、他の 3 種については良好な PCR 増幅が行えなかった。

[考察]mtDNA 解析の結果から、繁殖地間で大きな遺伝的分化を示さないことが示唆された。今後はより多くの遺伝マーカーおよびより多くの個体数を用いて、種内の詳細な遺伝構造を調査し、繁殖計画策定に寄与する必要がある。



## 4 大学との共同研究

平成 24 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 24 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  
P1 に記載済
- (2) 神戸大学農学研究科生物多様性利用科学講座  
希少動物の配偶子保存に関する研究（ウンピョウ他）
- (3) 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それを活用した共同研究
- (4) 広島大学理学研究科付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 発表資料

- 1 第 18 回日本野生動物医学会大会（口頭発表）  
（平成 24 年 8 月 25,26 日）
- 2 第 60 回動物園技術者研究会発表資料（ポスター発表）  
（平成 24 年 10 月 17,18 日）
- 3 平成 24 年度環境創造局職員業務研究改善事例発表会（口頭発表）  
（平成 24 年 10 月 30 日）
- 4 シンポジウム「島に生きる希少鳥類」  
（平成 25 年 3 月 2 日）
- 5 投稿論文  
（平成 24 年 12 月 Zootaxa 3575: 49-62）

第 18 回日本野生動物医学会大会（口頭発表）

（平成 24 年 8 月 25,26 日）

## 飼育下テングザルの遺伝的多様性について

○尾形光昭<sup>1</sup> 清野悟<sup>2</sup> (1横浜市繁殖センター, <sup>2</sup>よこはま動物園)

### Genetic variation of captive proboscis monkey

○Mitsuaki Ogata<sup>1</sup>, Satoru Seino<sup>2</sup> (<sup>1</sup> Preservation and research center, city of Yokohama, <sup>2</sup>Yokohama zoological gardens)

[目的] よこはま動物園で飼育されている, 絶滅危惧種テングザル(*Nasalis larvatus*)の遺伝的な血統管理を目的に, 同動物園の創始個体の遺伝的多様性を解析した.

[方法] インドネシア共和国スラバヤ動物園より入園した創始個体 5 頭の血液から DNA を抽出し, ミトコンドリア DNA の D-loop 領域の塩基配列を解析した. また, 木村の 2 変数法により配列間の DNA 距離を算出し, その値に基づき近隣結合法により配列間の系統関係を解析した. さらに NCBI データベース上に登録されているボルネオ島北部マレーシア領内の個体群由来の DNA 配列も系統解析に用いた.

[結果]塩基配列解析の結果, よこはま動物園の飼育下テングザル 5 頭の D-loop 領域 485bp から 4 つのハプロタイプが確認され, それらは大きく 3 グループに分けることが可能であった. 一方, 今回確認されたハプロタイプと既知のハプロタイプ間で共通する 257bp について系統解析を行った結果, よこはま動物園の飼育個体で確認された 3 ハプロタイプは, マレーシア領由来のハプロタイプと大きく分化していることが分かった.

[考察] ミトコンドリア DNA は母系遺伝であるため, よこはま動物園の創始個体 5 頭は 3 頭の異なる母親由来であることが示唆された. 一方で, よこはま動物園の創始個体は原産地が不明であるものの, 同動物園から確認されたハプロタイプの一部はボルネオ島北部個体群由来のハプロタイプとは分化していることから, テングザルの遺伝的多様性は低いことが示唆された.

## テングザル (*Nasalis larvatus*)

- 1属1種、オナガザル科、IUCNレッドリスト(EN)
- ボルネオ島の固有種。主な生息地は海沿いのマングローブ林や川沿いの湿地林
- 成熟♂1頭と♀複数頭でハーレムを形成。ハーレム間で雌の移動もある
- 日本国内ではよこはま動物園のみで飼育

	性別	生年月日
No.1(キナンティ)	♀	04/2/17
No.2(アブル)	♀	03/8/21
No.3(ゲンキ)	♂	03/4/11
No.4(クルボン)	♀	04/1/8
No.5(ジャカ)	♂	02/5/18



## 生息域



## テングザル (*Nasalis larvatus*)

- 1属1種、オナガザル科、IUCNレッドリスト(EN)
- ボルネオ島の固有種。主な生息地は海沿いのマングローブ林や川沿いの湿地林
- 成熟♂1頭と♀複数頭でハーレムを形成。ハーレム間で雌の移動もある
- 日本国内ではよこはま動物園のみで飼育

	性別	生年月日
No.1(キナンティ)	♀	04/2/17
No.2(アブル)	♀	03/8/21
No.3(ゲンキ)	♂	03/4/11
No.4(クルボン)	♀	04/1/8
No.5(ジャカ)	♂	02/5/18



## 目的

- よこはま動物園で飼育されている、テングザル5頭間の遺伝的関係を推定する。

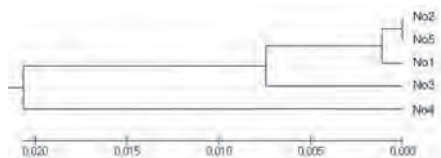
## 方法

- DNA: 血中より抽出
- mtDNA: D-loop領域(450bp)
- マイクロサテライトDNA: 4遺伝子座



## • MtDNA

- 5頭のテングザルにおいてD-loop領域450bpを比較した結果、22箇所の変異サイト、挿入欠失2箇所が確認
- 変異サイトに基づき、4つのハプロタイプが確認 (p-distance = 0.002-0.042)

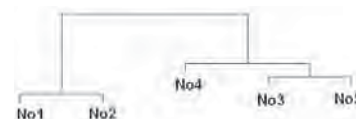


## マイクロサテライトDNA解析

( )内はSalgado *et al.*, 2010、野生個体(n=20)

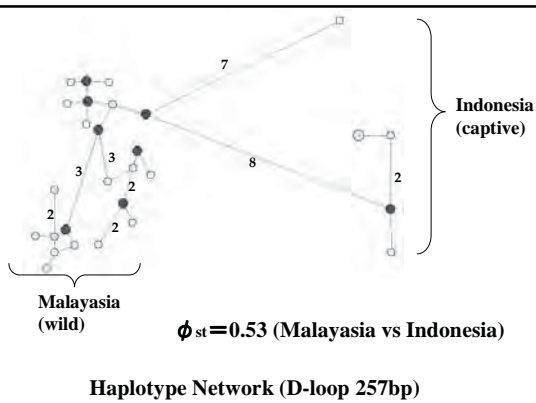
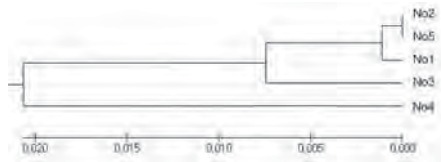
Locus	No. of alleles	He	Ho
Locus 1	3 (4)	0.62 (0.58)	0.6 (0.58)
Locus 2	6 (6)	0.84 (0.79)	0.8 (0.76)
Locus 3	4 (5)	0.8 (0.66)	1.0 (0.64)
Locus 4	3 (7)	0.62 (0.69)	0.6 (0.7)
Mean. ± s.d.	4 ± 1.4	0.75 ± 0.12	0.72 ± 0.19

He ↔ Ho: 有意差なし



• MtDNA

- D-loop領域450bp。22箇所の変異サイト、挿入欠失2箇所



- よこはま動物園で飼育されているテングザルからは、極端な近親交配を示すデータは得られなかった。
- ボルネオ島内の各地域集団間で、遺伝的に分化している可能性が示唆された。

第 60 回動物園技術者研究会発表資料（ポスター発表）

（平成 24 年 10 月 17,18 日）

# PCR 法による鳥類の雌雄判別における各種 PCR プライマーセットの有効性

○白石利郎<sup>1)</sup>, 尾形光昭<sup>1)</sup>, 小泉純一<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup> 横浜市立よこはま動物園・繁殖センター、<sup>2)</sup> 横浜市動物愛護センター

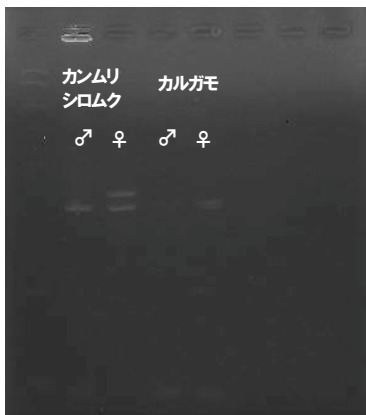


外見的特徴から性別判別が難しい鳥類について、近年、DNA による PCR 法を用いた雌雄判別の方法が広く用いられるようになってきた。しかし、これまでに複数の雌雄判別用 PCR プライマーセットが報告されているものの、総ての鳥類に適用できるユニバーサルプライマーと呼べるようなものは未だ開発されていない。そこで、既に報告されている 17 種類のプライマーセットを用い、各プライマーセットの汎用性について調べた。

解析には 21 目 55 科 156 種の鳥類の血液または組織から抽出した DNA を用い、各種ごとに複数のプライマーセットで PCR を行い、電気泳動により増幅した DNA の雌雄差を確認した。この結果、雌雄の検体がそろった 21 目 45 科 112 種のうち、ほぼ総ての種で、いずれかのプライマーを用いて性別判定が可能であることが確認された。最も汎用性があったのは 2550F/2718R のプライマーセットで、このプライマーを用いて調べた 44 科 86 種のうち 87% で雌雄判別が可能であった。P2/P8 のプライマーセットも多くの種で用いることが出来たが、サギ類やカモ類、エボシドリ類、ハチドリ類、キツツキ類などには不適合であった。また、USP1/USP3/INTR/INTF のプライマーセットはハト類やインコ類、エボシドリ類に、USP1/USP3/CPE15R/CPE15F はキジ類やハト類、オウム類に、AWS3/USP3/

INTR/INTF はトキ類やフラミンゴ類、カモ類に、AWS3/USP3/CPE15R/CPE15F はペンギン類やタカ類、ツル類に、NRD4/USP1/CPE15R/CPE15F はフクロウ類に、それぞれ有効であることが確認された。

現れるバンドパターンは、用いるプライマーセットによって異なるが、同じプライマーセットを用いても鳥類種によって異なる場合がある。また、中には様々なバンドが現れるなどして、判別が難しい場合もあった。確実性を高めるために、今後も機会があるごとに各種鳥類から DNA のサンプリングを行い、雌雄判別法の検証を行っていきたい。



プライマーP2/P8を用いた場合  
カルガモには不適合



プライマー2550F/2718Rを用いた場合  
カモとペンギンではパターンが異なる

プライマーセット1	P2 P8	2550F 2718R	1237L 1272H	USP1 USP3	USP1 USP3	AWS3 USP3	AWS3 USP3	NRD4 USP1	AWS5 NRD4	SS1 SS2	SS1 SS2	P2 P8	P2 P8	EF9 ER10	SPIN12 SPIN13	K7 WI	K2 YS2
プライマーセット2				INTR INTF	CPE15R CPE15F	INTR INTF	CPE15R CPE15F	CPE15R CPE15F	SINTR SINTF	INTR INTF	L014a L014b						
制限酵素												Mbo II	Mbo I	Bgl II			
タビョウ科		×								○							
レア科										×						○	×
エミュー科																	
シギタビョウ科	×	○		×	×	×	×		×		×				○	×	
ミスチキドリ科		○			○		○										
ウミツバメ科		△	×		△												
ペンギン科	○	○	○		○		○										
ウ科		○			○		○										
ペリカン科		○	×		○	×	○										
サギ科	×	○	△		×	△	○	△	△								
コウブリ科		○	×						○								
ハンビロコウ科		○															
トキ科		○	×			○						○			×		
フラミンゴ科		○				○											
コンドル科	○	△					×	×	×								
タカ科		○					○										
ハヤブサ科		○					△										
カモ科	×	○	○			○											
キジ科	○	○	○		○		×										
ツル科		○					○										
クイナ科		○															
カゲ科	○	○															
チドリ科	×	○	×					×									
シギ科	○	○	○		×			×	×								
カモメ科	○	○	○	×			×	△	×								
ハト科		○	○	○	○												
オウム科	○	○	×		○		×	×	×								
インコ科	○	○	○	○	○												
エボシドリ科	×	○	○	○	○												
カッコウ科	○	×		×			×										
メンフクロウ科	○	○	×					×	○								
フクロウ科	×	○						○									
ガマガチヨタカ科	×	○	○		×		○	×	×						○		
アマツバメ科		×															
ハチドリ科	×	△	×		×		×	×	×						○		
カワセミ科	○	○															
キツツキ科	×	○			×		×	×	×								
ツバメ科	○	△															
セキレイ科	○						×										
ヒヨドリ科	○																
モズ科	○																
ツグミ科	○																
チメドリ科	○																
ヒタキ科	○																
シジュウカラ科	○	△															
メジロ科	△	△	△	×													
ホオジロ科	○																
アトリ科	○	○	○														
ハタオリドリ科	○	○															
ムクドリ科	○	○															
カラス科	○	○	△														

○: 雌雄判定可能 △: 不確実 ×: 判別不可



平成 24 年度環境創造局職員業務研究改善事例発表会（口頭発表）

（平成 24 年 10 月 30 日）

# カンムリシロムクの繁殖の成否に関わる要因について

動物園課繁殖センター ○石井 裕之  
白石 利郎

カンムリシロムクはインドネシア・バリ島固有の希少種で近年の野生生息数は十数羽とされており、IUCNのレッドリストでは近絶滅種に指定されている。絶滅の危機に瀕した動物の個体数を回復させるには、生息地での植樹や捕獲の禁止など生息地の環境改善を図ると同時に、繁殖センターのような生息域外の保護施設において増やして種を存続させ、その繁殖した個体を野生復帰させるといった総合的な取り組みが不可欠である。繁殖センターでは、このカンムリシロムクの域外保全に取り組むとともに現地関係施設に対する技術支援・繁殖個体の現地送致等を行ってきたが、今回は域外保全の取り組みから得られた繁殖効率に関する知見を報告する。

カンムリシロムクの生息域外保全においては、その寿命が最大でも 20 年程度であるため、効率的に繁殖させていくことが飼育下で種を存続させていくために重要である。そこで、1999 年から 2010 年までの 12 年間に飼育してきた 66 ペアの繁殖に関して、雌雄の年齢やペアの形成法、ペアの継続年数などの要因が繁殖結果にどのように影響しているかについて調査した。

雌雄それぞれの年齢と繁殖結果の関係では、雄では 15 歳を超えてもペアにした個体の約半数が繁殖しているのに対して、雌では 12 歳以上になるとペアにした個体の約 2 割しか繁殖しなくなることがわかった。次にペアの形成法を、人為的に組み合わせたものと、複数の雌雄を集団で飼育して自然に出来たものの二つに分けて、形成した年の繁殖結果と比較したところ自然に出来たペアのほうがよく繁殖していることがわかった( $p < 0.05$ ,  $\chi^2$ 検定)。さらに同じペアを継続して飼育すると次第に繁殖しなくなり、4 年目では約半数のペアが繁殖しなくなるともわかった。そして一度繁殖しない年があった後、次の繁殖期に再び繁殖するかどうかを調べたところ、そのような例は 66 ペアのうち 3 ペアで各 1 回見られたのみで、繁殖の中断が 2 年以上になるとその後再開した例はなかった。またこのような繁殖が中断したペアを組みかえると、雄では 18 例中 12 例で、雌では 10 例中 6 例で繁殖が再開した。

以上のことから、雌の年齢とペアの継続年数によるペアの組みかえ時期及びペアリングの方法を確立し、カンムリシロムクの繁殖をより効率的に進めることが可能となった。

## カンムリシロムクの繁殖の成否に関わる要因について



動物園課繁殖センター  
石井裕之 白石利郎

## カンムリシロムク

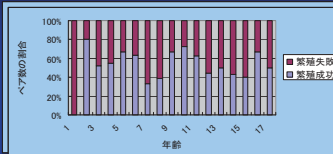


- インドネシアのバリ島にのみ生息
- 野生生息数は十数羽
- よこはま動物園内にある繁殖センターでは、この種の域外保全に取り組むとともに、現地関係施設に対する技術支援や繁殖個体の現地送致も行っている

## 調査の目的と方法

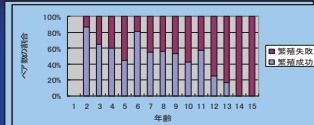
- 寿命が最大でも20年程度であるため、効率的に繁殖させられるよう、繁殖の成否に関わる可能性のある要因について調査  
雌雄の年齢、ペアの形成方法、ペアの継続年数など
- 1999年から2010年までの12年間で66ペアを飼育
- 繁殖期は4月から9月の年1回であるため、この66ペアから延べ193繁殖期の結果を得て、分析

## オスの年齢と繁殖結果の関係



- 年齢に関わらずペアにした個体の約半数が繁殖に成功している

## メスの年齢と繁殖結果の関係



- 11歳までは年齢に関わらずペアにした個体の約半数が繁殖に成功している
- 12、13歳ではペアにした個体の約2割、14歳以上では繁殖が見られなかった

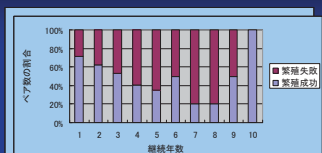
## ペアの形成方法と繁殖結果の関係

	ペアを形成した年の繁殖結果	
	繁殖成功	繁殖失敗
人為的に組合せたペア	22	14
集団で飼育して自然に出来たペア	23	4

(ペアで導入した3ペアを除く33ペアの結果)

- 血統を考慮しつつ複数の雌雄を集団で飼育して、自然に出来たペアの方が有意に繁殖に成功している  
( $p < 0.05$ ,  $\chi^2 = 4.38$ )

## ペアの継続年数と繁殖結果の関係



- ペアを継続して飼育すると、次第に繁殖しなくなる
- 4年目では約半数のペアが繁殖に成功しなくなる

## 繁殖しない年があった後、再び繁殖するかどうか？

ペアの繁殖結果の例

例1		例2		例3	
継続年数	繁殖結果	継続年数	繁殖結果	継続年数	繁殖結果
1年目	○	1年目	○	1年目	○
2年目	○	2年目	×	2年目	○
3年目	○	3年目	○	3年目	×
4年目	×	4年目	×	4年目	×
5年目	○	5年目	○	5年目	○

↓

66ペア中3ペアで見られた	1例もなし	1例もなし
---------------	-------	-------

## 繁殖が中断したペアを組みかえると

オス  
18例中12例で繁殖が再開  
この12例のうちで年齢が最高のものは15歳

メス  
10例中6例で繁殖が再開  
この6例のうちで年齢が最高のものは12歳

繁殖の成否に関わる要因

- ペアの形成方法、メスの年齢  
ペアの継続年数



繁殖センターにおける飼育下繁殖方法を確立

- 雌雄を集団で飼育し、鳥同士で自然にペアを作らせる
- 12歳以上のメスは、なるべくペアにしない
- 2年以上繁殖していないペアは原則組み替える

シンポジウム「島に生きる希少鳥類」

(平成 25 年 3 月 2 日)

## インドネシアにおけるカンムリシロムク *Leucopsar rothschildi* の野生復帰事業

石井裕之（横浜市繁殖センター）

カンムリシロムクはインドネシアのバリ島にのみ生息するムクドリ仲間です。生息地の開発や乱獲によって近年生息数が減少し、国際自然保護連合(IUCN)のレッドリストでは近絶滅種(CR)に指定されています。特に1980年代後半からは、生息数が100羽を下回って減少傾向が続いています。そのため、カンムリシロムクの唯一の野生生息地である西部バリ国立公園で、1988年から国立公園による放鳥事業が始められましたが、散発的であったためか効果が見られず、2006年には一時期、野生の個体が確認できない状態になってしまいました。

一方、横浜市では1976年から野毛山動物園でのカンムリシロムクの飼育を始め、1999年に横浜市繁殖センターが出来てからはそちらに拠点を移して、飼育下での保護繁殖に取り組んで来ました。繁殖センターで順調に個体数が増えてきたことから、2003年に横浜市とインドネシア共和国林業省との間で合意文書を取り交わし、繁殖センターなどで繁殖したカンムリシロムク100羽をインドネシア側に提供し、同時に現地での保護活動にも協力していくことになりました。この取り決めに基づいて、今までに4回に分けて日本生まれのカンムリシロムクをインドネシア側へ送り、2010年には100羽の提供を完了しています。

また、2004年には国際協力機構(JICA)の草の根技術協力事業の採択を受け、現地で実際に保護に携わっている関係者への技術的な支援も始めました。その主な内容は横浜市繁殖センターへの研修員の受入れと、技術指導のためのインドネシアへの専門家派遣で、この事業は現在まで続けられています。研修員の受入れでは、毎年インドネシアから関係者を迎え、カンムリシロムクの飼育管理、健康管理、近親交配を避けるための血統管理などの研修を行っています。加えて放鳥後の管理技術向上のため、ニホンコウノトリの放鳥事業を視察したり、生息地の回復保全法を学ぶため横浜市内の樹林地を視察し、その手法について学んでもらったりしています。日本からの専門家派遣では、実際に現地を訪れ、飼育管理や健康管理、血統管理の技術指導などを行ってきました。また、放鳥後のモニタリング技術向上のため小型発信器を装着しての追跡技術の指導をしたり、地元住民と協働してカンムリシロムクを保護する体制を作るため、小学校などを訪れて環境教育活動なども行って来ました。さらに血統管理を詳細に行うことができるよう、DNAによる遺伝的多様性の解析もインドネシアの研究者と協働して行っています。


このような活動を続ける中で、インドネシア国内でもカンムリシロムク保護の機運が高まり、インドネシア国内の飼育施設や研究機関、保護団体などが中心となったカンムリシロムク保護協会が設立されました。また同協会とインドネシア共和国林業省、西部バリ国立公園の三者による放鳥事業が2007年から活発化し、放鳥した個体による繁殖も観察されるようになってきました。しかし一方で、天敵による捕食も頻繁に起きており、野生下の個体数は伸び悩んでいるのが現状です。そのため、今後は放鳥後の管理に重点を置き、引き続き現地での協力を続けていく必要性を感じています。



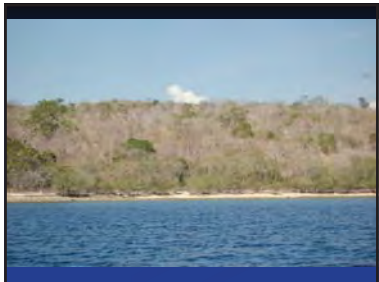
インドネシアにおける  
**カンムリシロムク**の野生復帰事業  
 ~横浜市立繁殖センターの協力~

横浜市立繁殖センター  
 石井 裕之

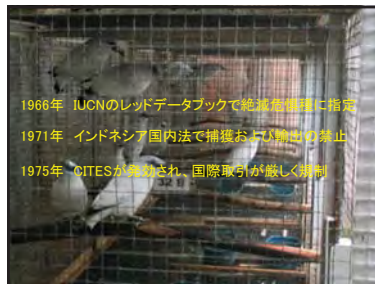
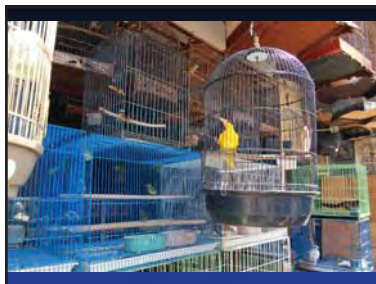
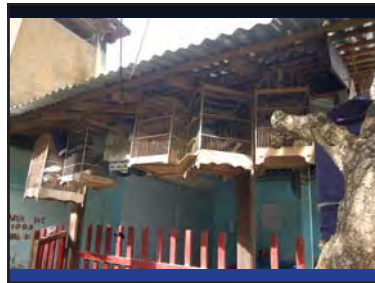
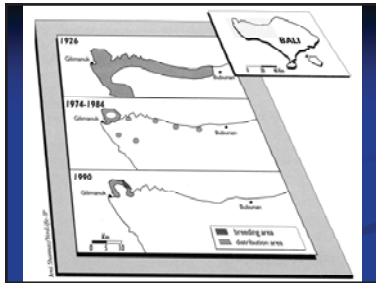
**カンムリシロムク**



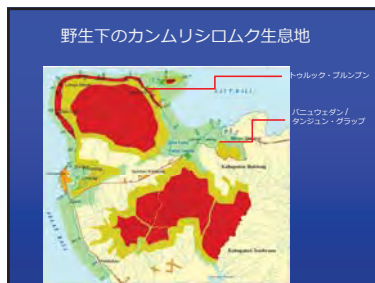
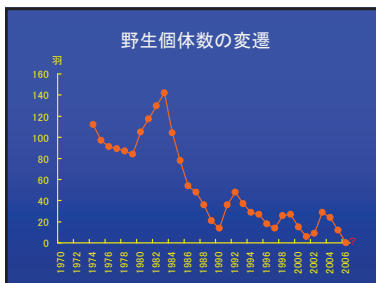
- インドネシアのバリ島にのみ生息
- 生息地の開発や乱獲により個体数が減少
- IUCNのレッドリストでは近絶滅種(CR)







1966年 IUCNのレッドデータブックで絶滅危惧種に指定  
 1971年 インドネシア国内法で捕獲および輸出が禁止  
 1975年 CITESが締結され 国際取引が厳しく規制



### 横浜市繁殖センター

- よこはま動物園ズーラシア内の非公開施設
- 希少種の種の保存と研究に従事
- カンムリシロムクの飼育を野毛山動物園から1999年に引き継ぐ





### カムリシロムク野生復帰事業 (1)100羽のカムリシロムクの送致

- 2003年インドネシア共和国林業省と100羽のカムリシロムク送致と技術協力について合意文書を結ぶ

### 送致の実績

送致年	送致羽数	送致先
2004年6月	20羽	西部バリ国立公園
2006年1月	30羽	カムリシロムク保護協会
2008年3月	20羽	カムリシロムク保護協会
2010年3月	30羽	カムリシロムク保護協会

### カムリシロムク野生復帰事業 (2)JICA草の根技術協力事業

- 2004年、国際協力機構(JICA)の草の根技術協力事業の採択を受ける
- 現地の保護関係者への技術支援
- 内容と実績
  - ①研修員受入れ(9回)
  - ②技術指導のための専門家派遣(11回)

### 研修員の受入(1)

- 飼育管理・診療
- DNAによる雌雄判別

### 研修員の受入(2)

- 鳥類の野外調査法
- 日本国内の希少鳥類保護施設視察

### 研修員の受入(3)

- 生息地の回復保全のための樹林地管理

### 研修員の受入(4)

- 日本の方へのカムリシロムク野生復帰事業の紹介

### 専門家の派遣(1)

- 飼育管理・診療

### 専門家の派遣(2)



- 野外でのモニタリング法
- 地元住民と協働した環境教育活動


### 専門家の派遣(3)



- 現地研究機関との遺伝的多様性の共同解析



### 野生下カンムリシロムクの状態



Year	放鳥数 (Released Birds)	野生個体数 (Wild Individuals)
1998	0	50
1999	0	40
2000	0	45
2001	0	40
2002	0	35
2003	0	30
2004	0	35
2005	0	30
2006	0	35
2007	10	45
2008	20	55
2009	15	45
2010	10	40
2011	10	40
2012	10	40

- 1998年から野生復帰事業を再開
- 2006年に野外で観察されなくなる
- 2007年からはカンムリシロムク保護協会の協力をえる
- 2008年、放鳥個体が野外で繁殖しているのを確認



Save The Bali Mynah

Bali Mynah Conservation Project  
Yokohama・Indonesia・JICA

投稿論文

(平成 24 年 12 月 Zootaxa 3575: 49-62)

[www.mapress.com/zootaxa/2012/f/zt03575p062.pdf](http://www.mapress.com/zootaxa/2012/f/zt03575p062.pdf)

上記 URL で公開