

令和 5 年 5 月 5 日

横浜市繁殖センター

令和 4 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、令和 4 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 28 年 6 月 15 日改正）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>

令和 4 年度は、希少野生動物の精子 9 種、卵子 1 種、体組織 11 種 14 点の凍結保存を行った。また、横浜市立動物園で飼育されている 6 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 11 種 34 個体について DNA による雌雄判別を行った。また、国内他施設との協力事業として 1 種 1 個体の性別判定を実施した。

<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) 研究発表

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)

令和4年度は、よこはま動物園で飼育されている4種と金沢動物園で飼育されている2種について測定を行った(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、ゴールドエンターキン、ユーラシアカワウソ、グレビーシマウマの糞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。

(1) 繁殖センターにおける測定

繁殖センターでは酵素免疫測定法にて、横浜市立動物園で採取した排泄物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。

令和5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。性ホルモン測定用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-17β(E2)、アンドロステンジオン(AD)を測定した。

測定値をグラフ化したものを図1から図9に示した。

表1 令和4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
テングザル	No.7 エミ	♀	よこはま動物園	糞	E2 PdG
スマトラトラ	No.4 デル	♀	よこはま動物園	糞	E2 P4
スマトラトラ	No.13 ラウト	♀	よこはま動物園	糞	E2 AD
スマトラトラ	No.12 ムジュ	♀	よこはま動物園	糞	P4 AD
オカピ	No.10 ララ	♀	よこはま動物園	糞	E2 PdG P4
ウーリーモンキー	No.14 アールグレイ	♀	よこはま動物園	糞	E2 P4 AD
ウーリーモンキー	No.15 ハーブ	♀	よこはま動物園	糞	E2 P4 AD
アラビアオリックス	No.19 リズ	♀	金沢動物園	糞	P4
ニホンカモシカ	No.36 ツバキ	♀	金沢動物園	糞	E2 P4 AD

図1 テングザル No.7エミ
糞中エストラジオール17β (E2) プレグナジオール(PdG)動態

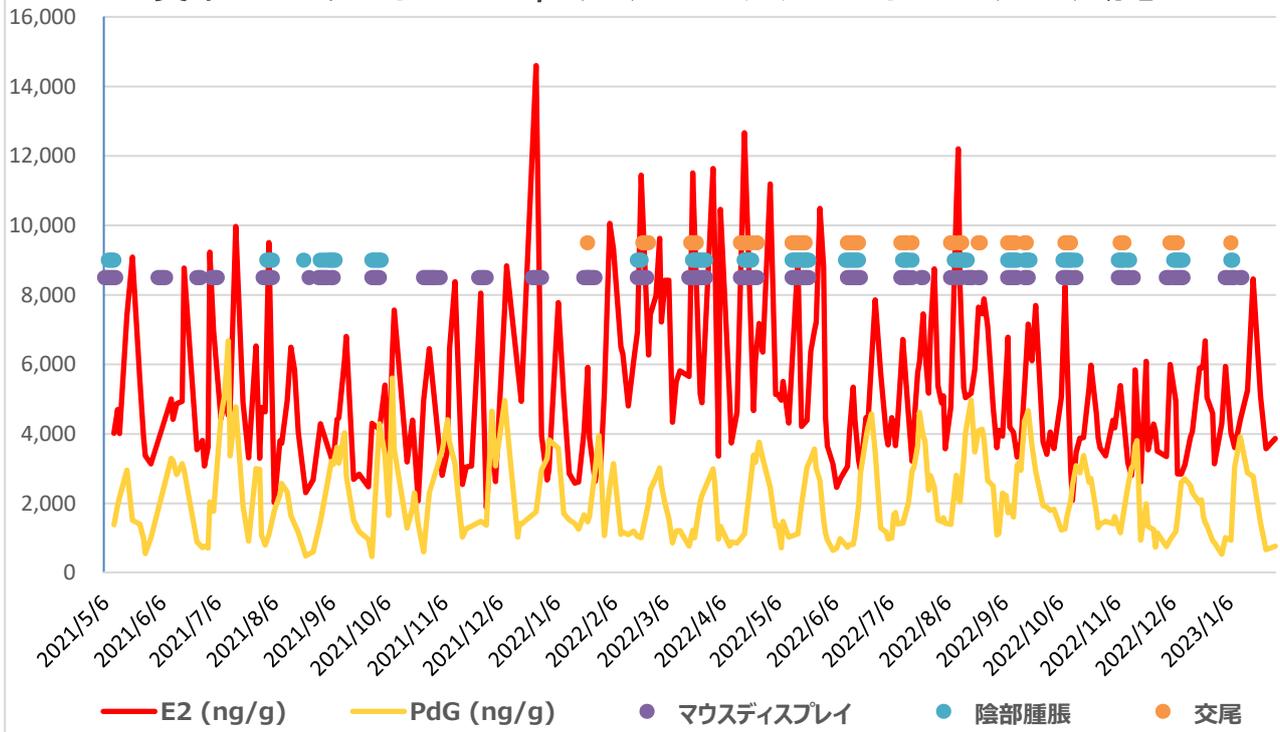


図2 スマトラトラNo.4デル
糞中エストラジオール17β (E2) プロジェステロン(P4)動態

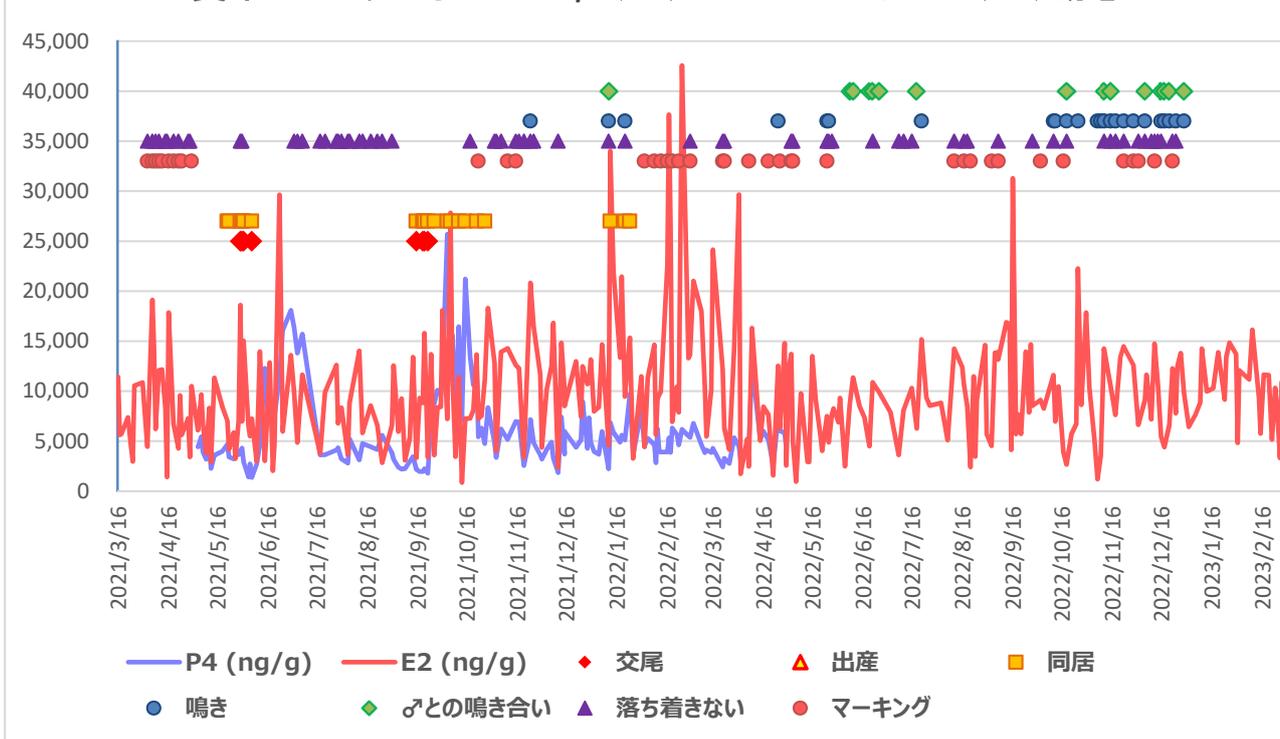


図3 スマトラトラNo.13ラウト 糞中エストラジオール17β (E2)
 プロジェステロン(P4) アンドロステンジオン(AD) 動態

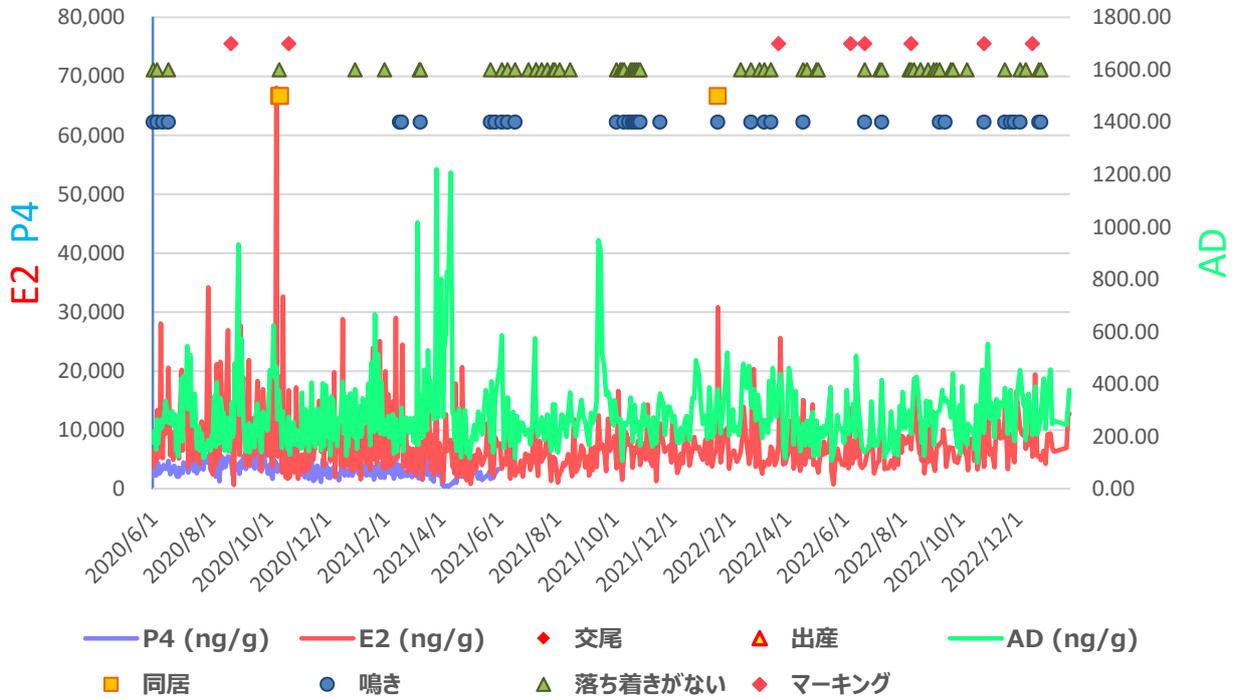


図4 スマトラトラNo.12ムジュ
 糞中プロジェステロン(P4) アンドロステンジオン(AD) 動態

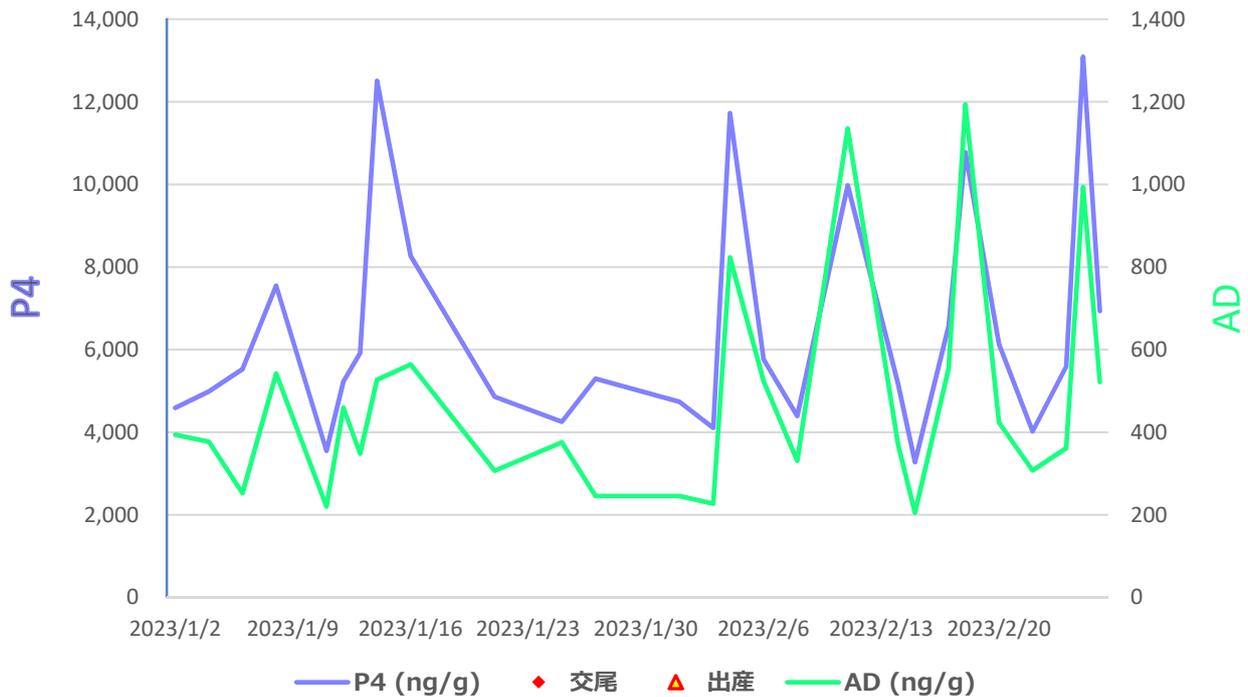


図 5 オカピNo.10ララ 糞中エストラジオール17β (E2)
 プレグナジオール(PdG) プロジェステロン(P4)動態

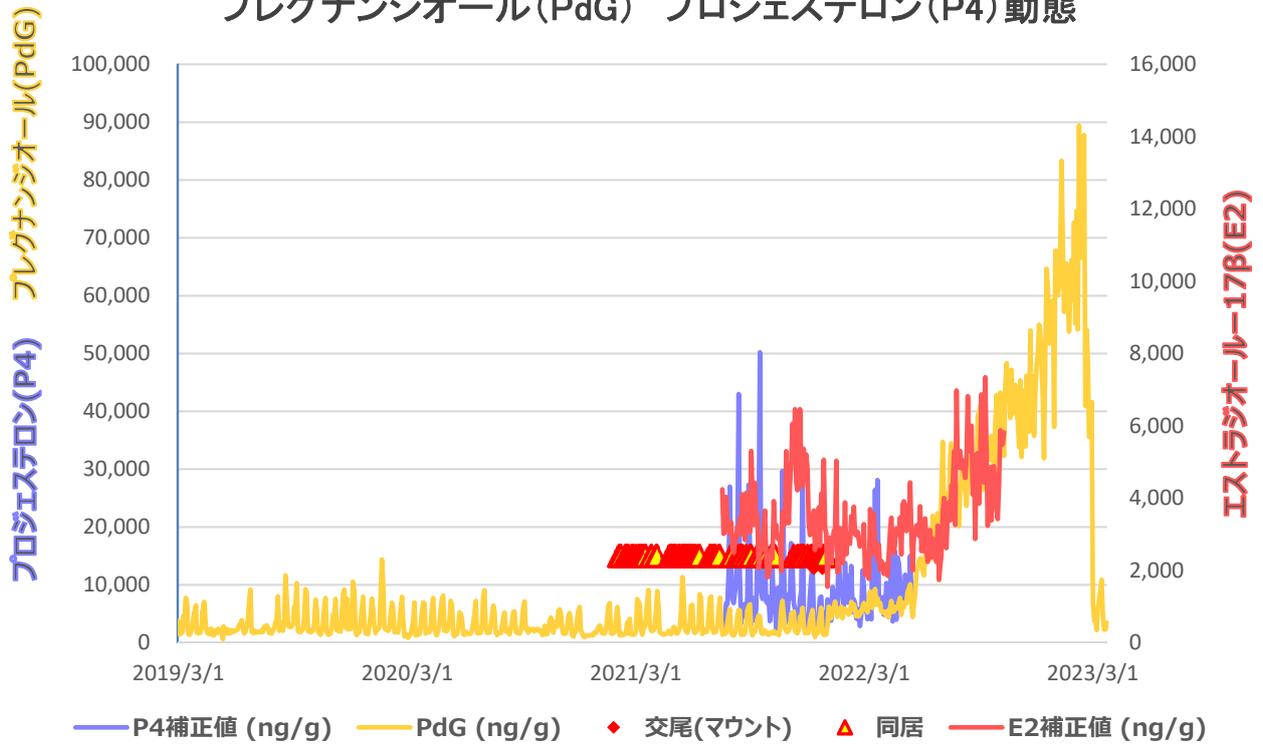


図 6-1 ウーリーモンキーNo.14アールグレイ
 糞中プロジェステロン(P4) アンドロステンジオン(AD) 動態

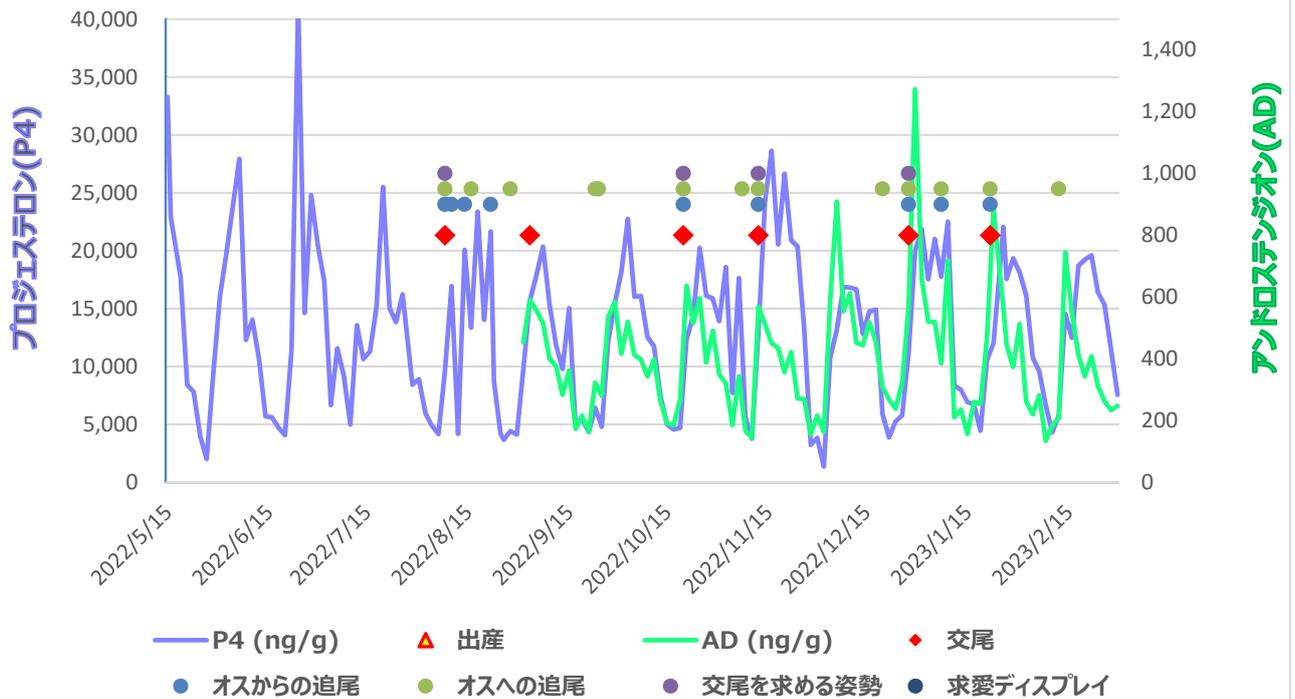


図 6-2 ウーリーモンキーNo.14アールグレイ
糞中エストラジオール17β (E2) 動態

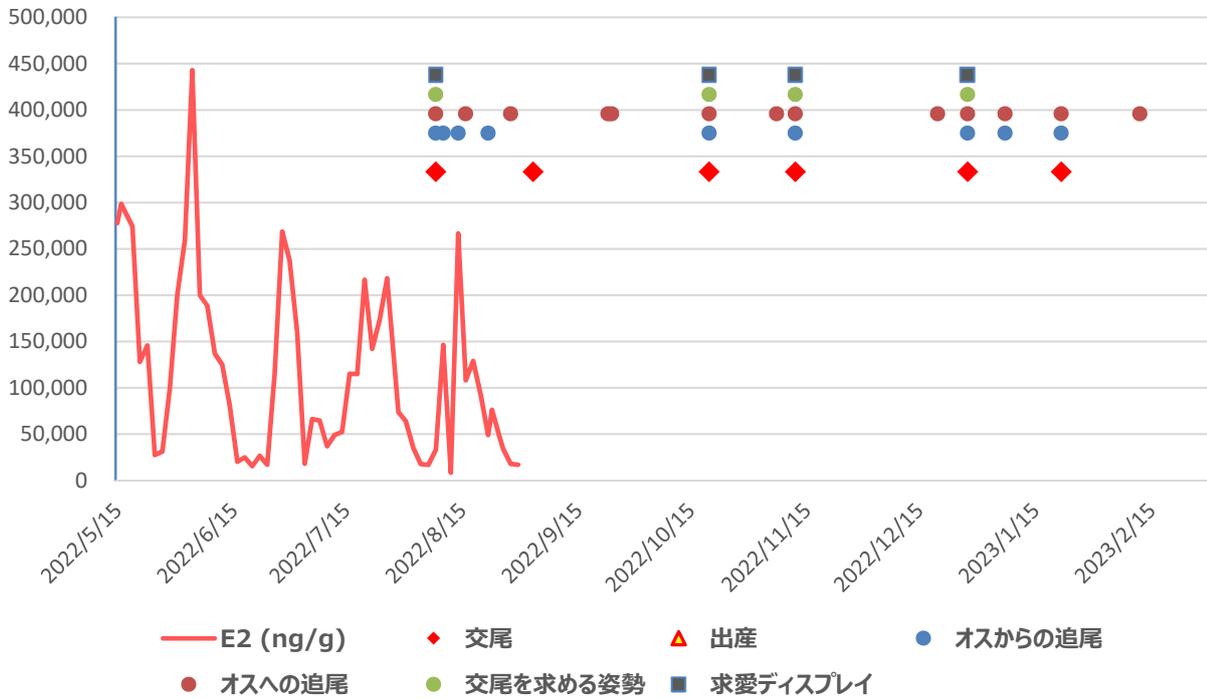


図 7-1 ウーリーモンキーNo.15ハーブ
糞中プロジェステロン(P4) アンドロステンジオン(AD) 動態

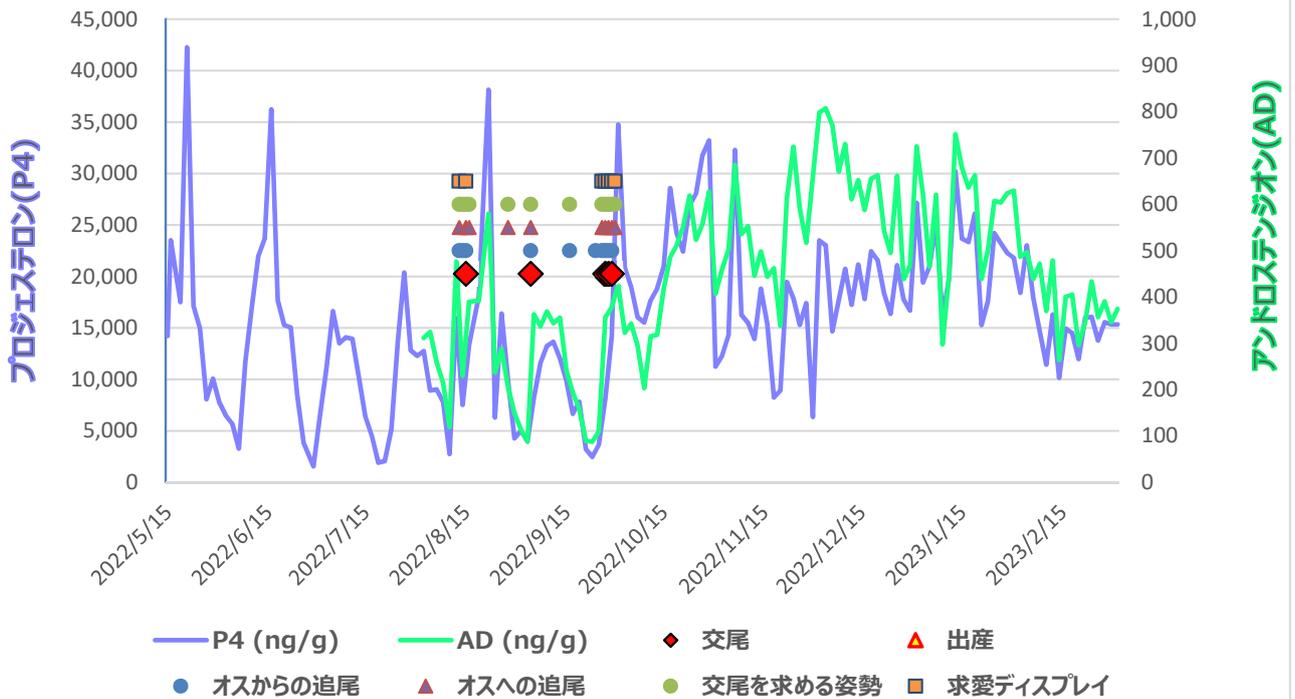


図 7-2 ウーリーモンキーNo.15ハーブ
糞中エストラジオール17β (E2) 動態

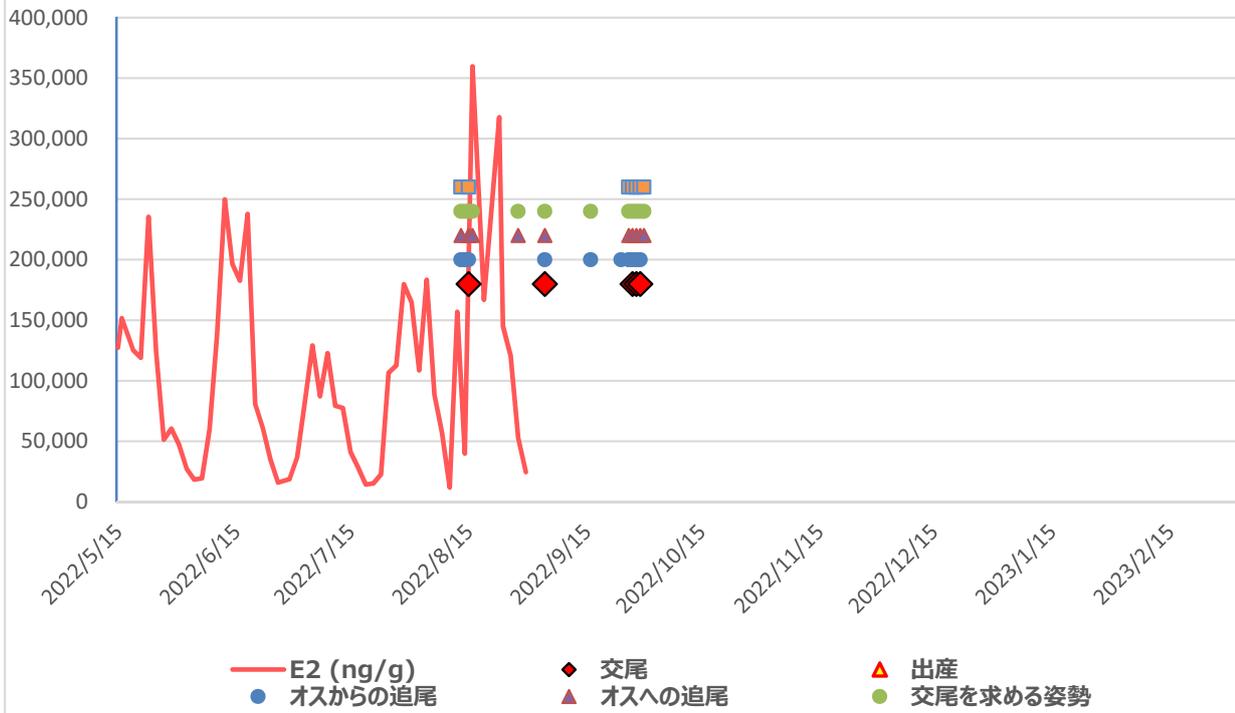


図 8 アラビアオリックスNo.19リズ
糞中プロジェステロン(P4)動態

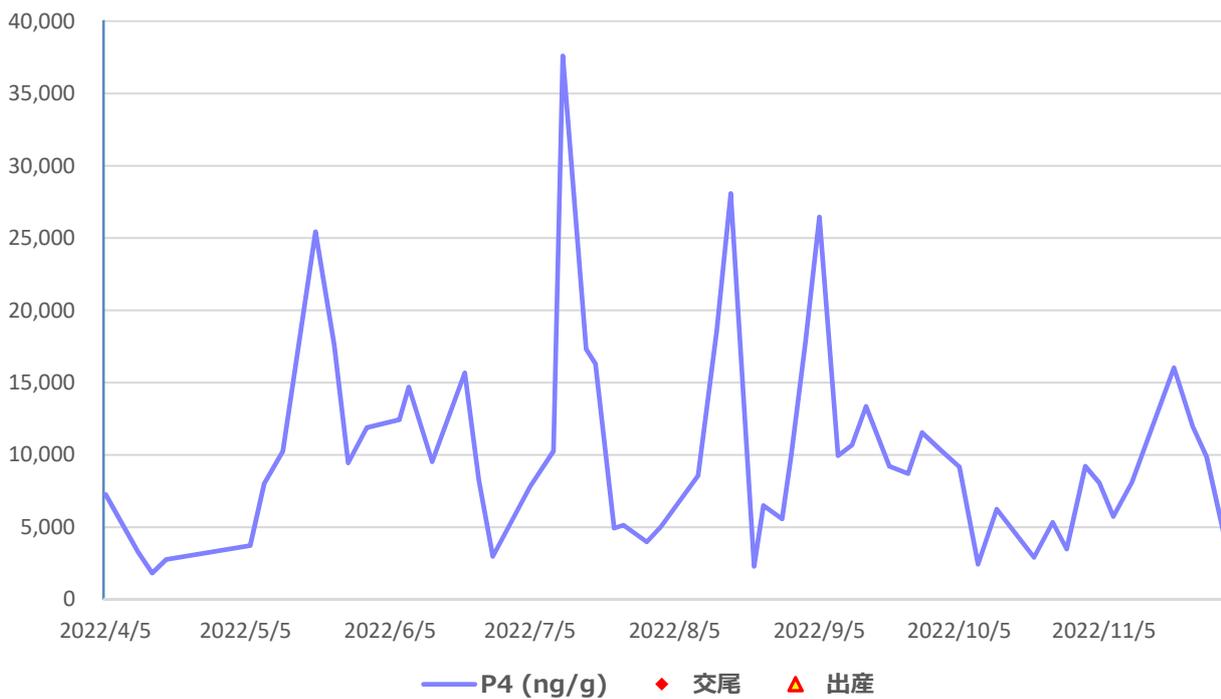
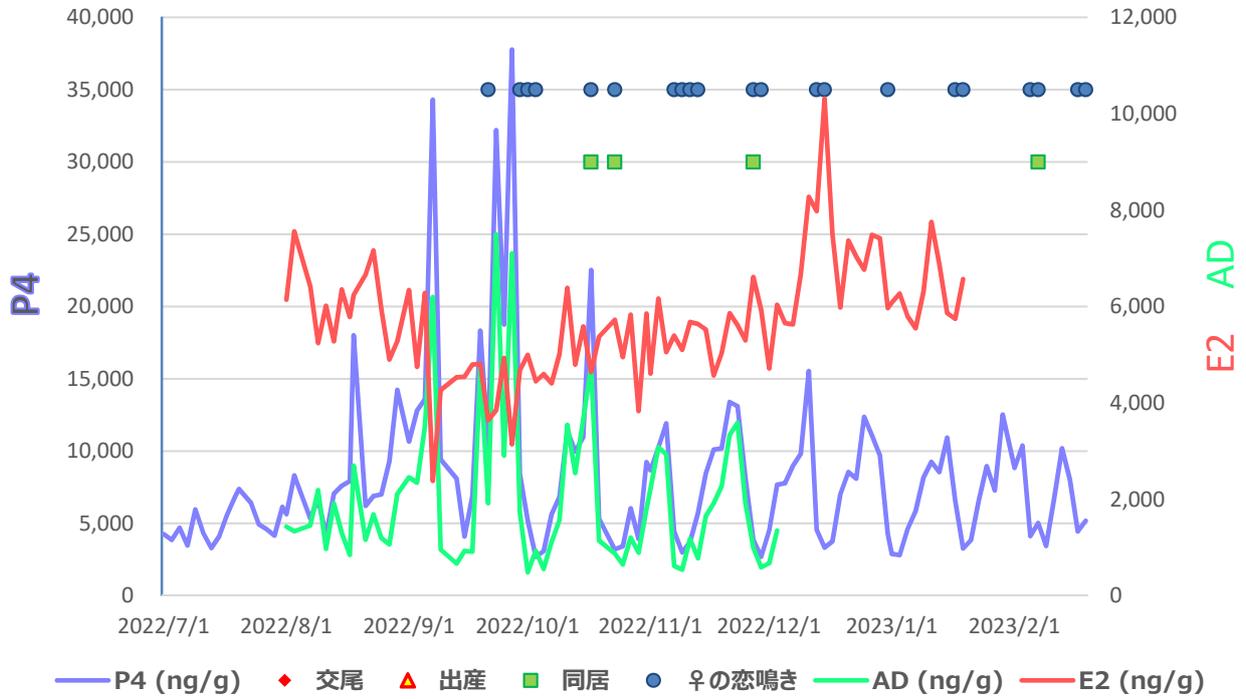


図 9 ニホンカモシカNo.36ツバキ 糞中エストラジオール17β (E2)
 プロジェステロン(P4) アンドロステンジオン(AD) 動態



2 配偶子および体組織の凍結保存

令和元年度より、保存対象を IUCN レッドリスト掲載の絶滅危惧種から横浜市立動物園の重点保全種へと変更した。

令和4年度は、哺乳類 11 種 15 点の死亡個体の精巣上体中の精液より回収した精液の凍結保存を試み、そのうち 9 種の精液を凍結保存した（表1）。精液は灌流法もしくは細切法により回収し、ストローに注入後、-196℃で保存した。

一方、卵巣に関しては、哺乳類 1 種について、原始卵胞を含む卵巣表層の凍結保存に取り組んだ（表2）。

なお、繁殖センターでは平成 28 年度から、日動水との研究協定に基づき、日本動物園水族館協会加盟園館の希少動物についても配偶子回収を試みている（表中※印）。

また、遺伝子保存の一環として、死亡動物の 10 種 12 点（鳥類 2 種 2 点、爬虫類 1 種 1 点、哺乳類 8 種 11 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 年以降精子 54 種、卵子 3 種（ウンピョウ、アリクイ、インドガウル）、体組織 168 種が凍結保存されている。（4 年 3 月末）

表1 令和4年度精子回収状況

種名	回収状況	保存状況
マレーバク	還流	無
インドサイ	還流	無
チーター	還流および細切	EYT-FC
ホッキョクグマ	還流	無
ヤブイヌ	還流	EYT-FC
ユーラシアカワウソ※	細切	無
コアラ※	細切	有袋類用
グレビーシマウマ※	還流	HF20
アミメキリン※	灌流	HYG
アミメキリン※	灌流	HYG
アミメキリン※	灌流	HYG
マレーバク※	還流	HF20、TTE、HYG
マレーバク※	還流	HF20
マンドリル※	還流および細切	無
ニシチンパンジー※	還流および細切	無

表2 令和4年度卵巣処理

種名	保存部位	保存状況
ホッキョクグマ	卵巣表層	-196℃

3 動物の各種 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、11 種 34 個体(受精卵を含む)で雌雄判別を実施した。また、国内他施設との協力事業として 1 種 1 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	検体数	備考
繁殖センター	ニホンライチョウ	1	
	ミゾゴイ	1	
	カグー	1	
	カンムリシロムク	2	
	カワラヒワ	7	
よこはま動物園	ベトナムキジ	12	受精卵性別判定
	ギンケイ	4	受精卵性別判定
	オウギバト	2	
野毛山動物園	クロツラヘラサギ	1	
	ルリゴシボタンインコ	1	
金沢動物園	ウミネコ	2	

国内他施設との協力事業件数

施設名	種名	検体数	備考
いしかわ動物園	ニホンライチョウ	1	域外保全事業の一環

(2) ライチョウの父子判定

◆目的

複数雄の精子を用いた人工授精により誕生したニホンライチョウ雛の父親を明らかにし、血統管理に反映させることを目的とした。

◆方法

ライチョウの父子判定に必要となる DNA マーカー (マイクロサテライトマーカー) は既に研究報告が行われている (Costanzi et al. 2018 BMC Res Notes 11:147)。今回は、既報の手法に従い、ライチョウの 14 種類のマイクロサテライトマーカーを解析に用いた。対象個体は人工授精により誕生した雛とその雌親および人工授精に供した雄 3 羽(個体 ID : N9,N10,N60)とした。成体については、各個体の羽軸から体組織を採取した。雛については卵殻膜に付着した血管を採材した。採材したサンプルから DNA を抽出した後、PCR により目的 DNA を増幅し、ABI310Genetic analyser により電気泳動を行った。目的 DNA のサイズは GeneScan2.0 により行った。PCR 産物の蛍光標識は 6-FAM もしくは 5-Hex 蛍光色素を付加した M-13 primer により行った。

◆結果 (下表)

14 種類のマイクロサテライトマーカーのうち、雄親候補 3 羽が異なるアリルを有していたのは 1 マーカーのみであった(Mut8)。調査対象 5 羽の同マーカーのアリルを比較した結果、雛と共通するアリルを有する雄は N9 のみであった (赤字)。このことから、人工授精により得られた雛の父親は N9 であると推察された。

個体 DNA	雛	雌親	N60	N9	N10
Mut1	108	108	112	108	108
	108	112	112	108	108
Mut2	114	114	114	114	114
	114	114	120	114	120
Mut3	149	149	120	149	120
	149	149	149	149	149
Mut4	109	109	103	103	109
	109	109	109	109	109
Mut6	134	134	134	134	134
	134	134	134	134	134
Mut8	141	141	149	144	153
	144	141	153	149	166

Mut9	158	158	158	158	158
	158	158	158	158	158
Mut12	149	149	149	149	149
	149	149	149	149	149
Mut14	180	180	180	180	180
	180	180	180	180	180
Mut16	183	183	183	183	183
	183	183	191	191	183
Mut17	210	210	213	213	207
	229	210	213	229	213
Mut18	196	196	196	196	196
	196	196	196	196	196
Mut22	208	208	208	208	208
	208	208	208	208	208
Mut23	208	208	208	208	208
	212	212	208	212	208

(3) 県内産カエルの DNA 解析

◆目的

相模原市で捕獲された種不明のカエルについて、種を特定し、県内のカエル類の多様性解明に貢献することを目的とした。(相模川ふれあい科学館との共同研究)

◆方法

(1) 解析サンプル

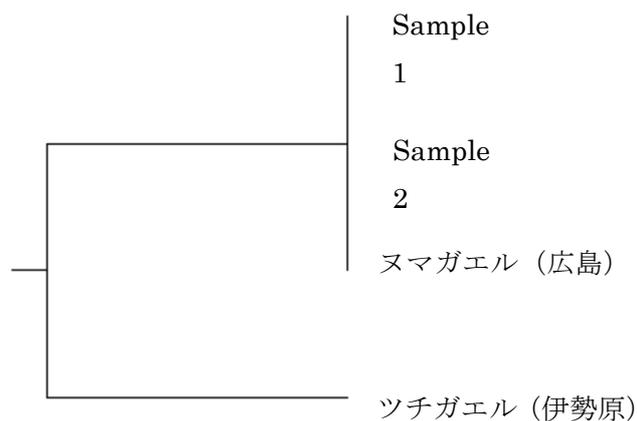
2 検体 (相模原市中央区田名水田。外見よりヌマガエルと推定)

(2) 解析方法

エタノール保存されたサンプルの一部を切り出し、エタノールを 37℃で蒸発させたのち、QIADNeasy Blood and Tissue Kit を使用して、サンプルから DNA を回収した。回収した DNA から、参考文献に従い、ミトコンドリア DNA 12SrRNA 遺伝子の部分配列を PCR 法により増幅し、ABI310 Genetic Analyzer により増幅産物の塩基配列を解析した。得られた塩基配列を DNA データバンク上に登録されたヌマガエルおよびツチガエル (伊勢原市産) と比較した。

◆結果

解析対象サンプルから DNA を回収し、12SrRNA 遺伝子を増幅することができた。増幅された DNA から、明瞭に塩基配列が解読できた領域 (322bp) について、DNA データバンク上に登録された配列と比較した結果、解析対象サンプルはヌマガエルの DNA と完全に一致した (下図)。そのため、解析サンプルは外見からの推定同様、国内外来種であるヌマガエルと推定された。



ミトコンドリア DNA 12SrRNA 遺伝子 (322bp) の遺伝子系統樹 (UPGMA 法)

*参考文献

Zoological Science (2007), 24(6): 547-562

4 大学との共同研究

令和4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。

令和4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
別途記載（糞中ステロイドホルモン測定）
- (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
希少動物のDNAに関する研究
- (3) 広島大学両生類研究センター
両生類の保全等に関する研究
- (4) 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
- (5) 北海道大学獣医学研究科繁殖学研究室
希少動物の人工繁殖等に係る研究
- (6) 日本大学生物資源科学部くらしの生物学科動物のいるくらし研究室
ミゾゴイの繁殖期を対象とした行動学的研究
- (7) 相模原市立相模川ふれあい科学館
神奈川県内の両生類保全に関わる共同研究

5 研究発表

令和4年度は6件の研究発表（口頭発表5件、ポスター発表1件）を行い、更に論文3件が出版された。

- 1 第5回野生動物保全繁殖研究会大会（口頭）
「オカピにおける糞中の性ステロイドホルモン動態を指標とした長期モニタリングによる繁殖生理の解明」
- 2 令和4年度環境創造局業務研究・改善事例発表会（口頭）
「ニホンライチョウにおける繁殖補助的技術開発の取り組みについて」
- 3 第70回動物園技術者研究会（口頭）
「横浜市内におけるムカシツチガエルの再導入について」
- 4 富山市ファミリーパーク希少動物保全基金講演会（口頭）
「動物園の取り組む外国産希少鳥類の保全 インドネシアにおけるカンムリシロムクの保全事業」
- 5 3園合同公開飼育研究会（口頭）
「ニホンライチョウの人工授精の取り組み」
- 6 第5回野生動物保全繁殖研究会大会（ポスター）
「日本動物園水族館協会の配偶子バンク等事業における横浜市繁殖センターの配偶子回収実績（2019～2021年度）」
- 7 論文
ランドスケープ研究 2022 Vol.86 No.3 248
多様なステークホルダーと連携したツチガエルの野生復帰について
- 8 共著論文
Zootaxa 5174 (1): 25–45
Genetic and morphological variation analyses of *Glandirana rugosa* with description of a new species (Anura, Ranidae)
要旨
日本国内 161 地点および朝鮮半島と佐渡島に生息するツチガエル属 (*Glandirana*) の

カエルについて、外部形態やミトコンドリアと核 DNA を解析し、系統進化および分類学的検討を行った。その結果、関東から東北太平洋側に生息するツチガエルは、外部形態に大きな違いは見られないものの、ゲノム配列は従来のツチガエルとは著しく異なることが判明した。一方、他地域のツチガエルはミトコンドリア DNA や性決定様式に地域変異が見られるが、核ゲノムは単一のグループを形成すること、さらに現在、朝鮮半島に生息するチョウセンツチガエルに近縁な比較的若い系統であることが判明した。以上の結果に加え、幼生の形態(標本で観察できる腹面腺の分布)に独自の特徴が確認されたことから、関東および東北太平洋側に生息するツチガエルは新種に相当すると判断されたため、新規に「ムカシツチガエル(*Glandirana reliquia*)」と命名された。

9 共著論文

Primates volume 64, issue 1, pages123–141 (2023)

Modifying the diets of captive proboscis monkeys in a temperate zoo to reduce weight loss and renal disease

要旨

動物飼育において、食事は健康な体型の維持、繁殖のサポート、種固有の寿命の促進に役立つものである。動物園で飼育されている葉食性霊長類には、繊維質の多い葉を与えることが推奨されているが、温帯地域では、特に秋から冬にかけて新鮮な葉を入手することが難しいため、その必要性を満たすことは難しい。また、適切な治療を行うためには、病的な問題や病理学的な所見を詳細に報告することが重要であるが、そのような臨床報告は限られている。そこで、前腸菌を持つテングザル (*Nasalis larvatus*) を対象に、(1) よこはま動物園における腎疾患および体重減少の個々の臨床報告を記載し、(2) 腎疾患および体重減少の他の誘因を排除するために、これらの動物に供給される飼料の栄養プロファイルを決定した、(3) 体重減少や高カルシウム血症・低リン酸血症の発症を最小限に抑えるように食餌療法を変更し、(4) 食餌療法前後の体重、Ca・P 濃度、血中 Ca/P 比を飼育個体と野生個体間で比較し、その効果を検討した。食餌の栄養プロファイルから、報告された腎不全の症例は、秋から冬にかけて適正値をはるかに超える Ca/P 比の葉を摂取したことが原因である可能性があると結論付けた。また、動物園で飼育されているテングザルに対して、ミネラルと代謝エネルギーを調整した食事は、一定の有益な効果をもたらすことがわかった。