

令和6年4月25日

横浜市繁殖センター

令和5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、令和5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5年度は、横浜市立動物園で飼育されている10種について糞中ステロイドホルモン濃度を測定した。

希少野生動物の精子1種、卵子0種、体組織10種12点の凍結保存を行なった。

DNA関連研究として、横浜市立動物園の飼育鳥10種30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3種8個体の性別判定を実施した。

飼育鳥を対象に人工採精や精液の保存、人工授精等の繁殖補助技術の開発に取り組んだ。

<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) 繁殖補助技術開発
- (5) 大学等との共同研究
- (6) 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 およびストレスの評価

(3 園共同研究)

令和5年度は、よこはま動物園で飼育されている7種と金沢動物園で飼育されている2種、野毛山動物園で飼育されている1種について測定を行った(表1)。

また、横浜市環境創造局(現 みどり環境局)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、ユーラシアカワウソ、ウンピョウ、ホッキョクグ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、横浜市立の3動物園で採取した対象種の排泄物からステロイドホルモン(性ホルモンや副腎皮質ホルモン及びその代謝物)を抽出し、酵素免疫測定法にて糞中ステロイドホルモン含量の測定を行っている。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。同様に副腎皮質ホルモンを測定する目的は、対象個体の受けているストレスを評価し、その飼育管理を改善することにある。

令和5年度に、繁殖センターで糞中ステロイドホルモンを測定した動物は表1の通りである。ステロイド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)、コルチゾール(COR)を測定した。

測定値をグラフ化したものを図1から図13に示した。

表1 令和5年度 繁殖センターでステロイド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	PdG
スマトラトラ	No.4 デル	♀	よこはま動物園	糞	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	PdG
ウーリーモンキー	No.11 ウリ	♀	よこはま動物園	糞	P4 AD
ウーリーモンキー	No.14 アールグレイ	♀	よこはま動物園	糞	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
ミナミアフリカオットセイ	No.10 ワン	♀	よこはま動物園	糞	E2 P4
クロサイ	No.2 アキリ	♀	よこはま動物園	糞	P4
ヤブイヌ	No.62 カノン	♀	よこはま動物園	糞	P4
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	P4
モルモット			野毛山動物園	糞	COR

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

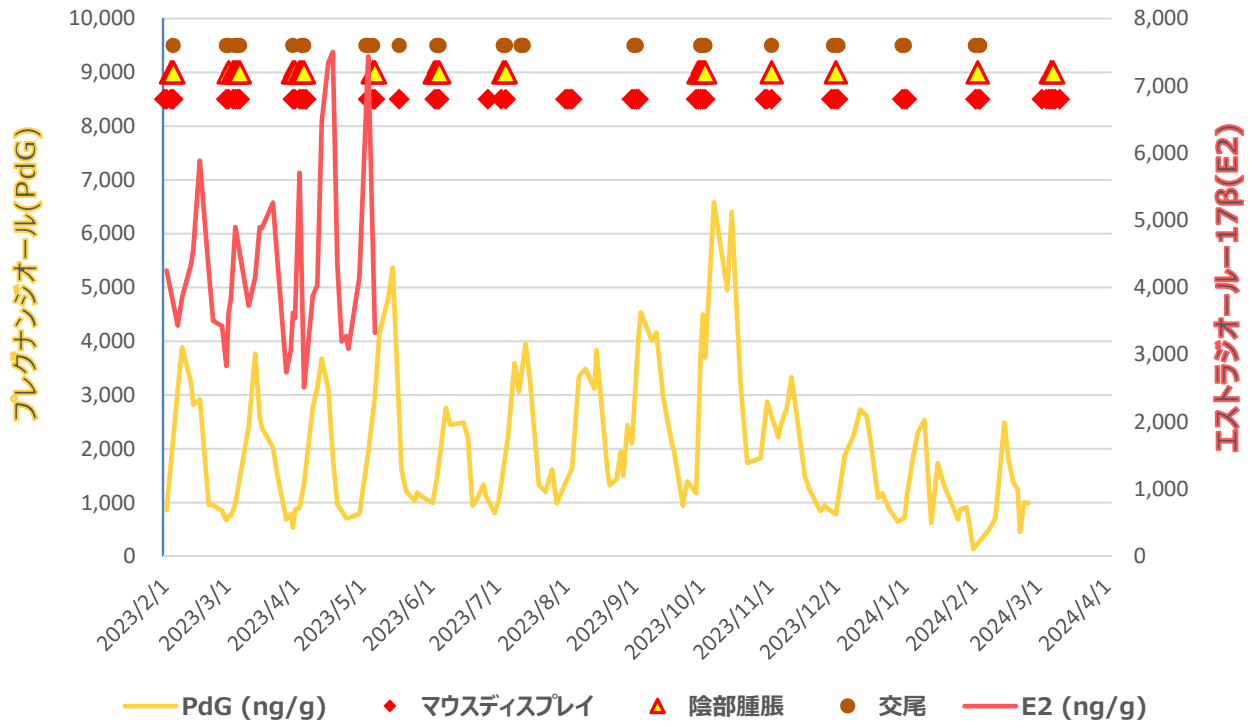


図2 スマトラトラNo.4デル 糞中エストラジオール17β (E2) プロゲステロン (P4) アンドロステンジオン (AD) 動態

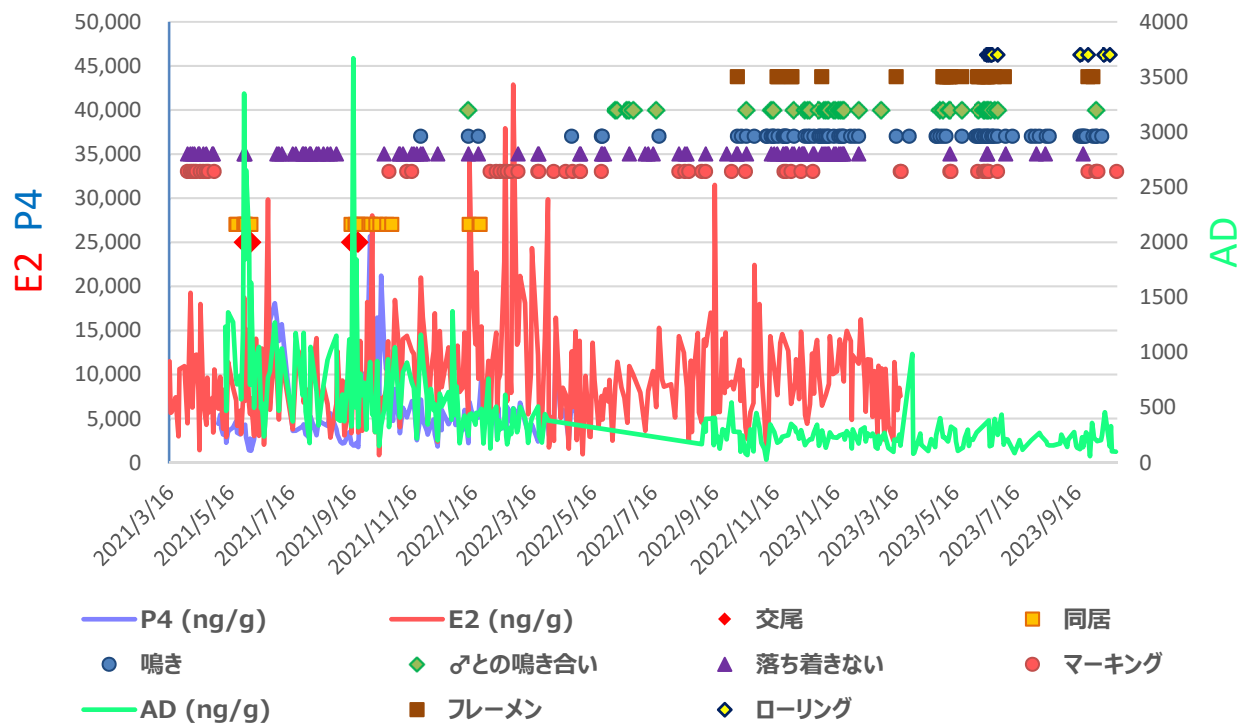


図3 スマトラトラNo.12ムジュ
糞中プロジェステロン(P4) アンドロステンジオン(AD) 動態

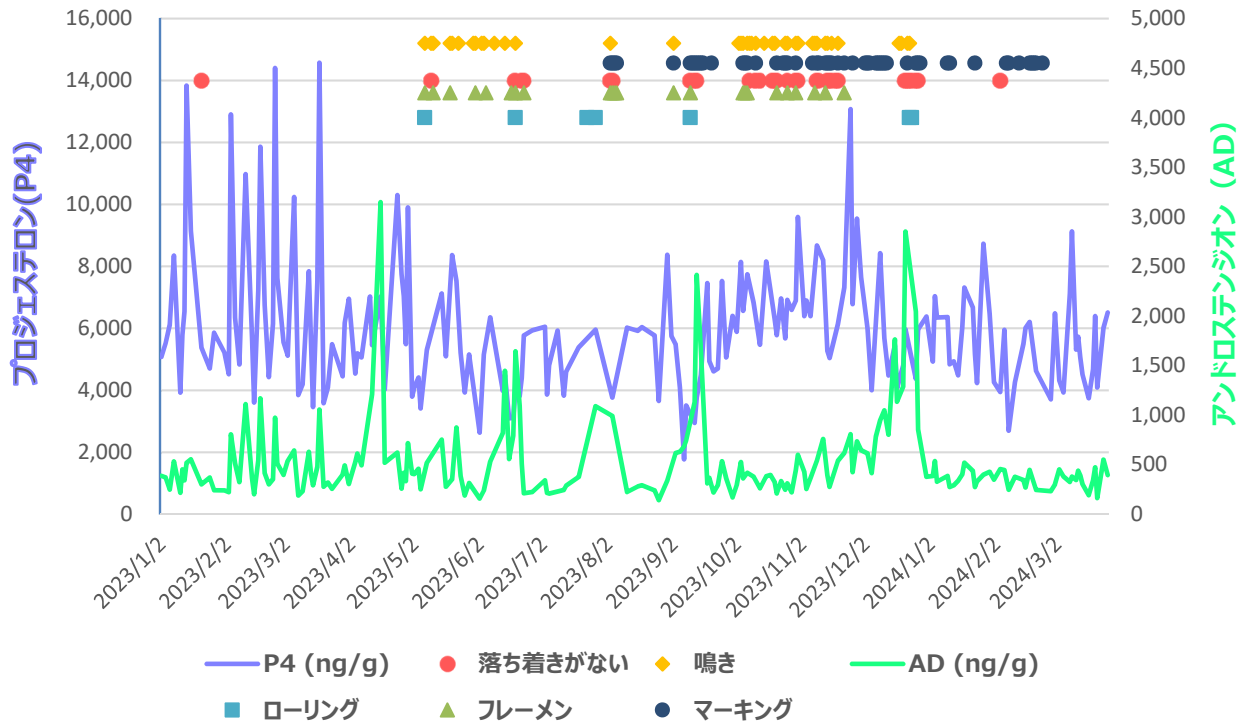


図4 オカピNo.10ララ
糞中プレグナンジオール(PdG)動態



図5 ウーリーモンキーNo.11ウリ
糞中プロジェステロン(P4) 動態

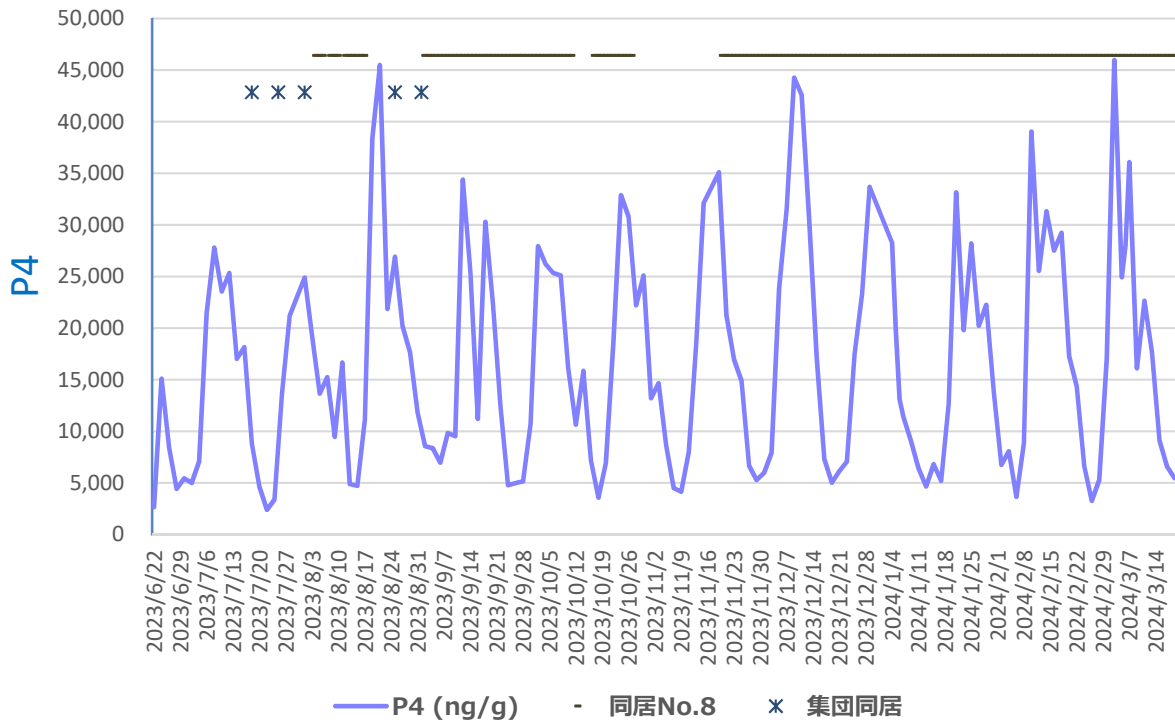


図6 ウーリーモンキーNo.14アールグレイ
糞中プロジェステロン(P4) アンドロステンジオン(AD) 動態

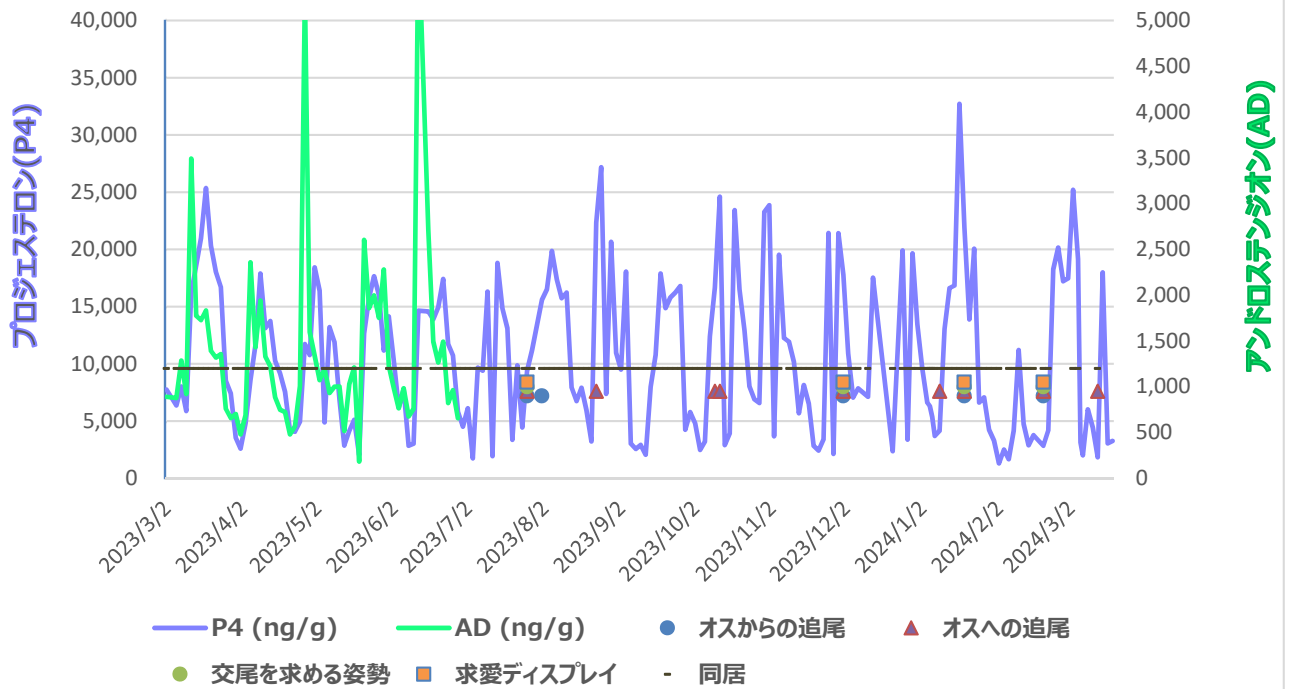


図7 ウーリーモンキーNo.15ハーブ 糞中エストラジオール17β (E2) プロジェステロン(P4) アンドロステンジオン(AD) 動態

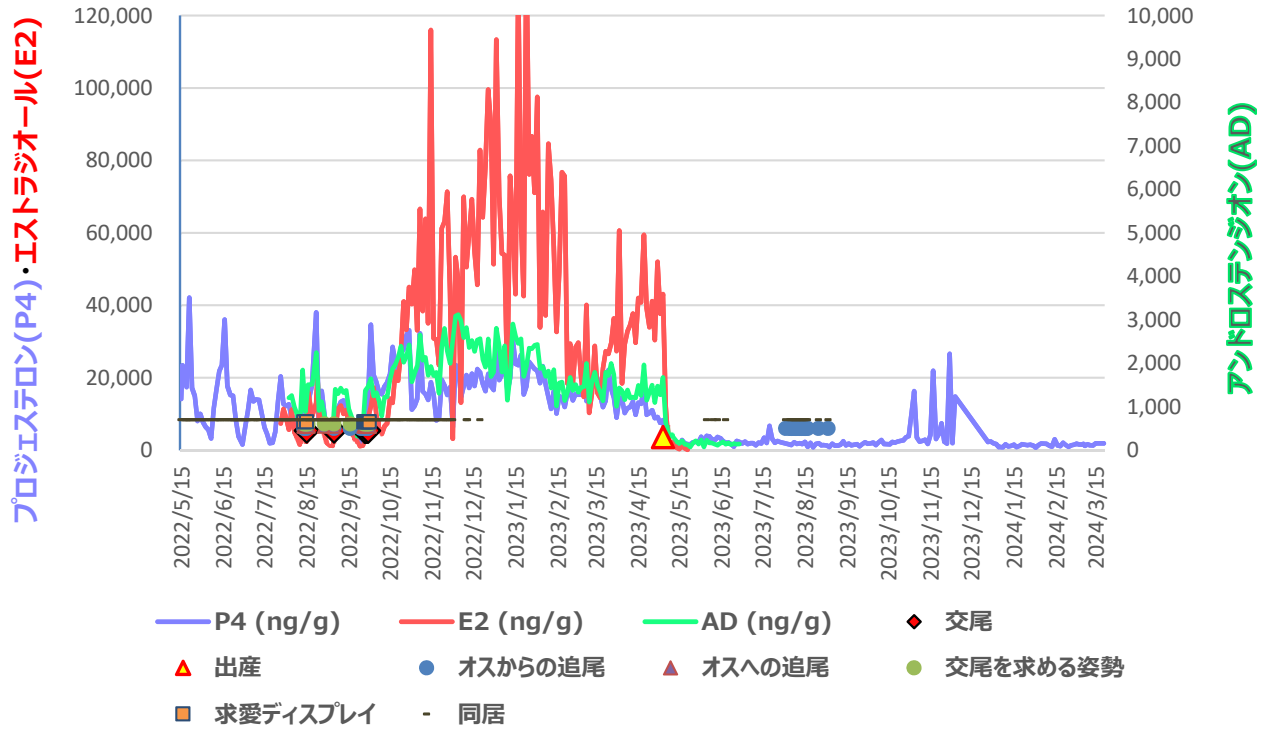


図8 ミナミアフリカオットセイNo.10ワン 糞中エストラジオール17β (E2) プロジェステロン(P4) 動態

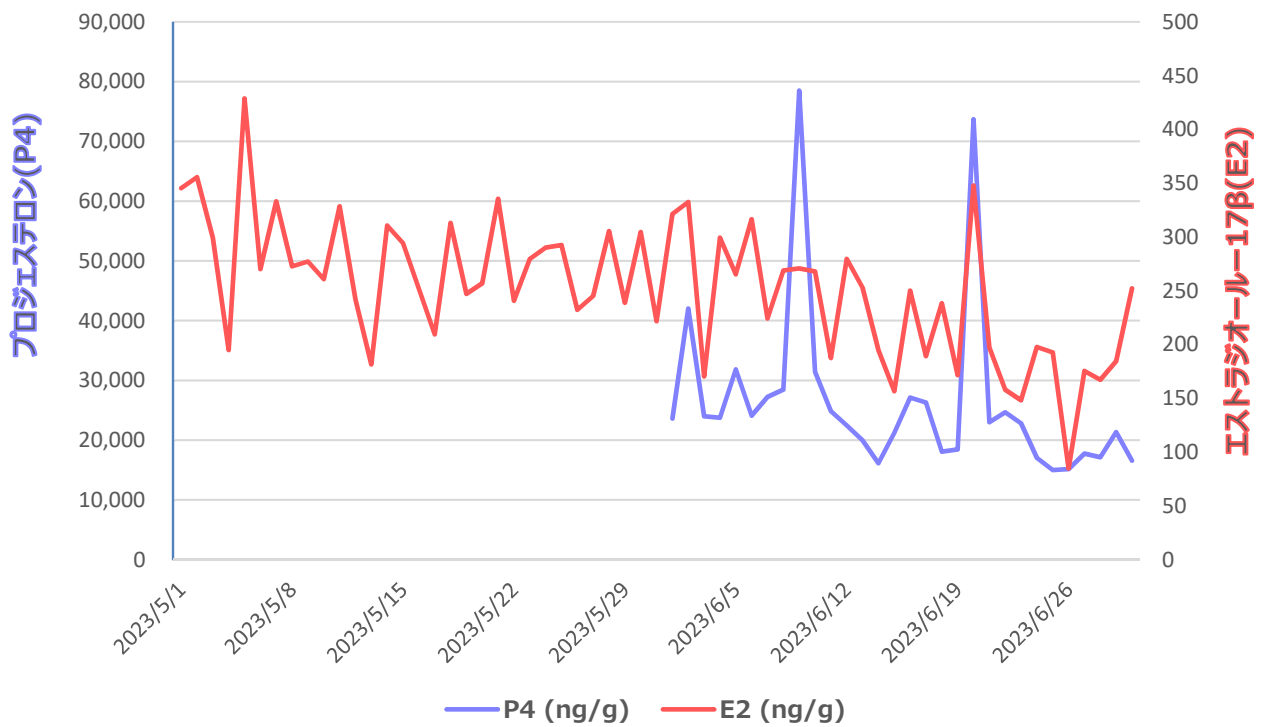


図9 クロサイNo.2アキリ
糞中プロジェステロン(P4)動態

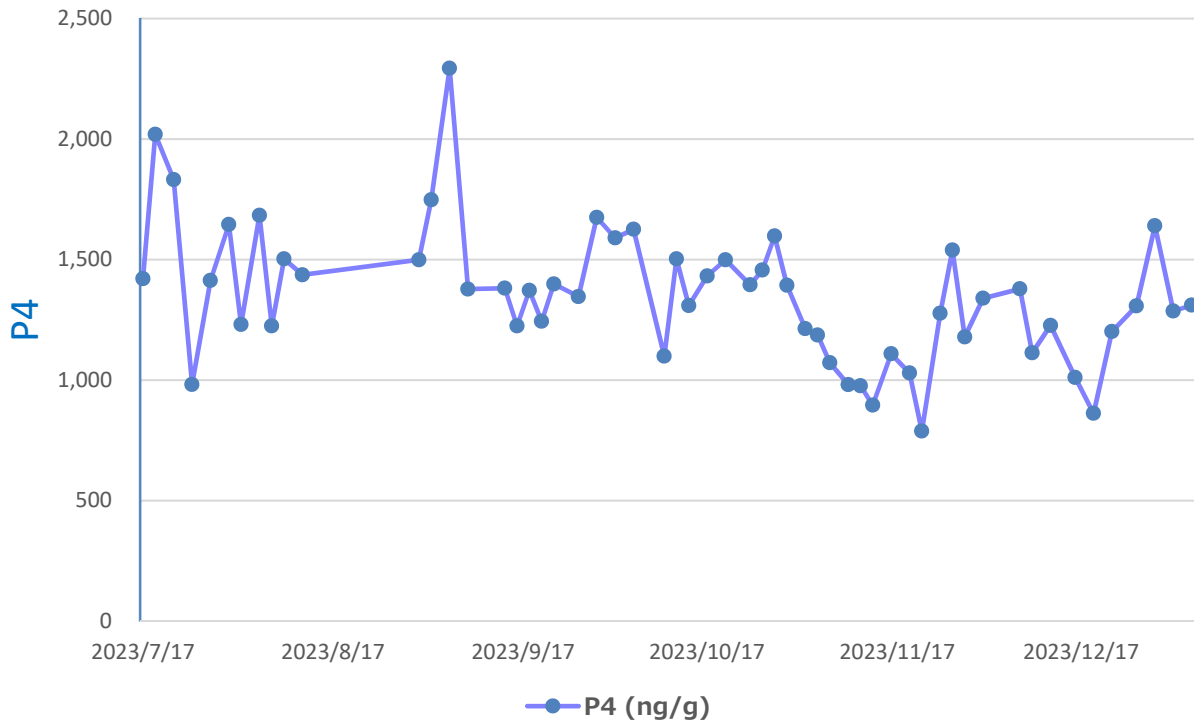


図10 ヤブイヌNo.62カノン
糞中プロジェステロン(P4)動態

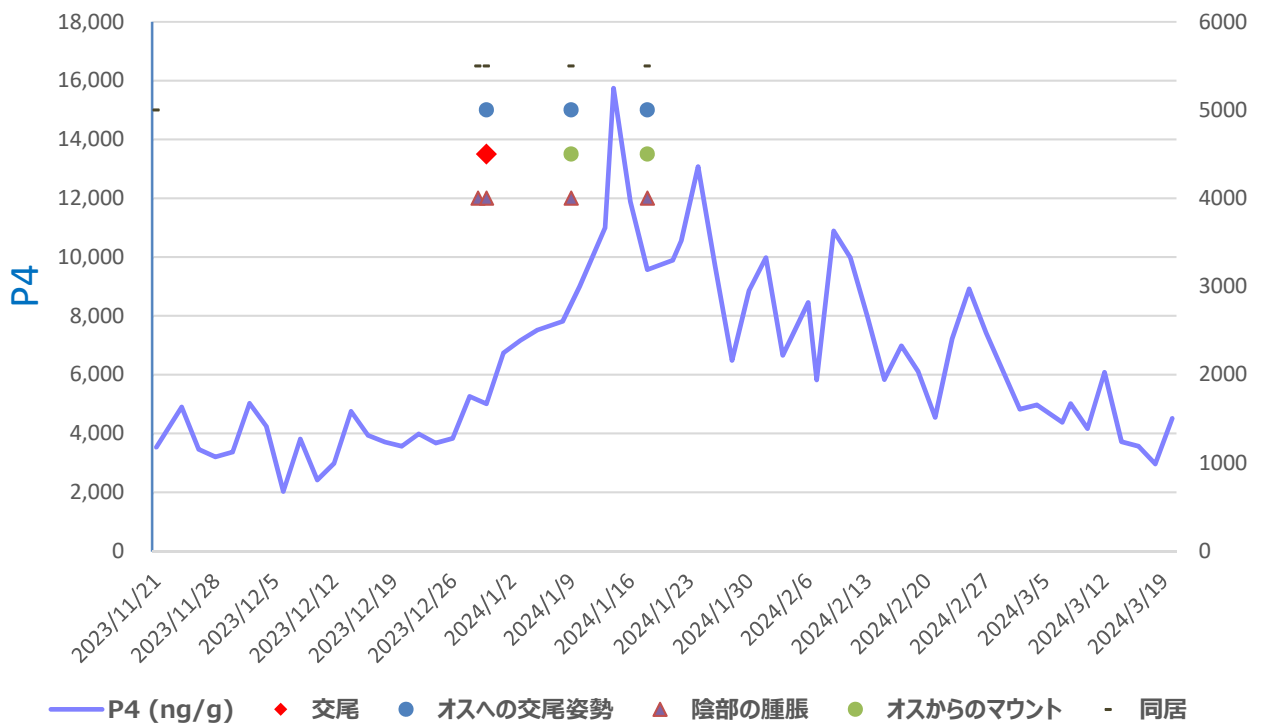


図11 アラビアオリックスNo.19リズ
糞中プロジェステロン(P4)動態

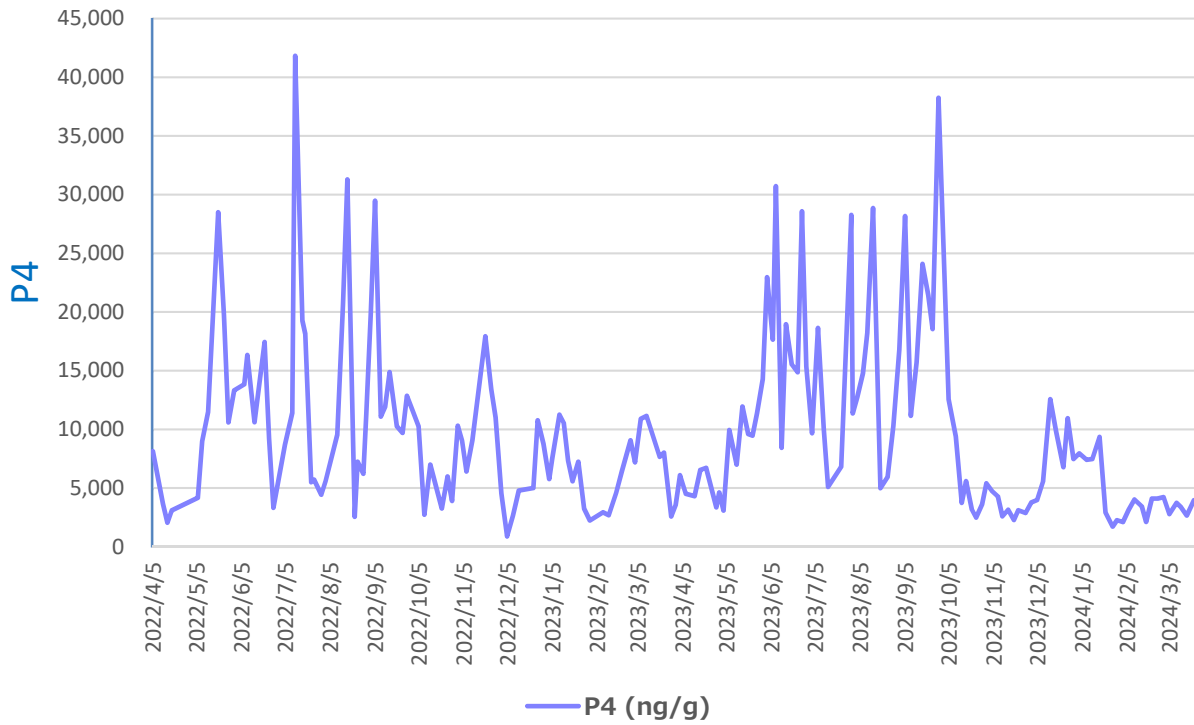


図12 ニホンカモシカNo.36ツバキ
糞中プロジェステロン(P4)動態

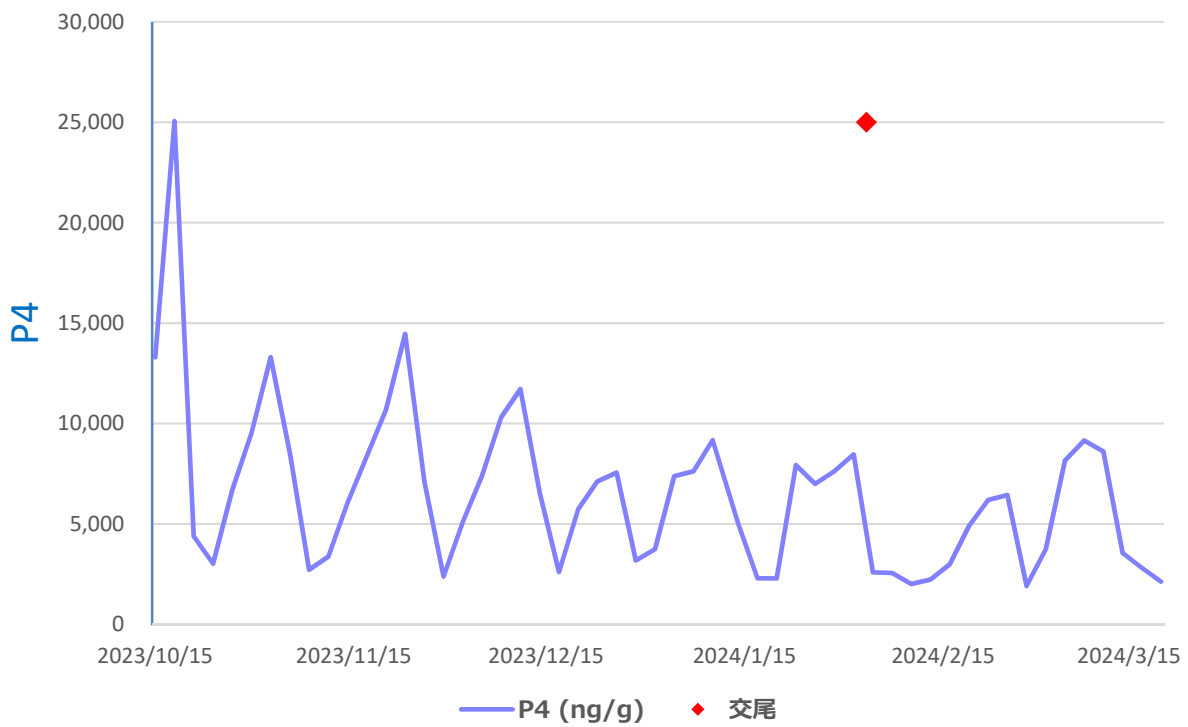
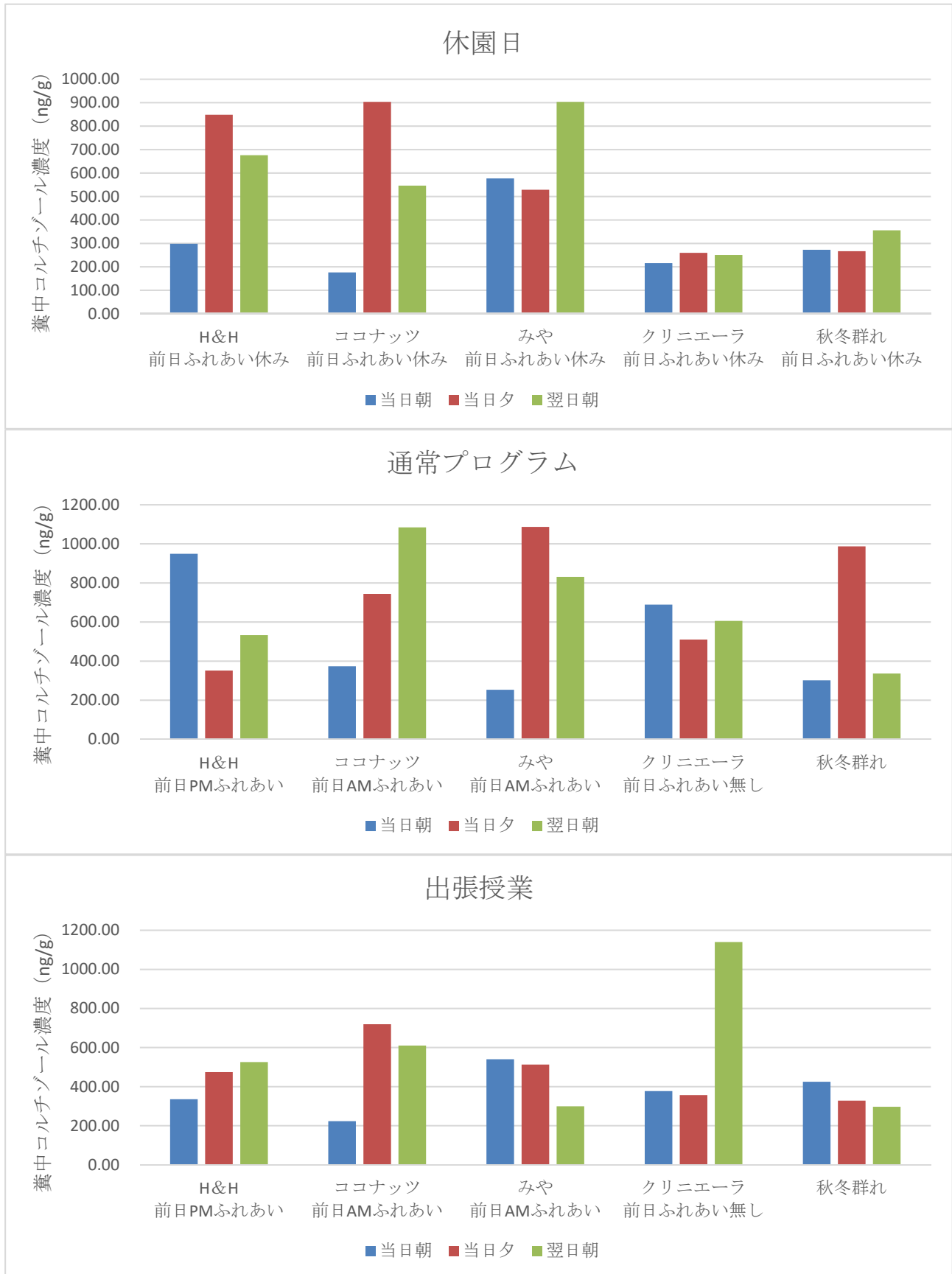


図 13 野毛山動物園モルモットのストレス評価
 (休園日、通常プログラム、出張授業時の糞中コルチゾール濃度の比較)



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5年度は、哺乳類8種10点の死亡個体の精巣上体の精液を灌流法もしくは細切法により回収したが、無精子や活性がないなど良好な精子が得られなかったため、保存に至らなかった(表1)。

一方、卵巣に関しては、哺乳類3種について卵胞の回収を試みたが、良好な卵子を得られず、1種については、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)。

生体からの配偶子の回収では鳥類1種(2亜種)について、保定下で人工採精を実施し得られた精液について低温保存試験、また一部については凍結保存を行った。

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、アクリイ、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5年度精子回収状況

種名	回収状況	保存状況
アカアシドゥクラングル	還流および細切	無
アムールヒョウ※	還流	無
スマトラトラ	細切	無
ヤブイヌ	細切	無
ヤブイヌ	細切	無
シセンレッサーパンダ※	細切	無
オカピ※	還流	無
コツメカワウソ※	還流および細切	無
シロオリックス※	灌流	無
コツメカワウソ※	灌流および細切	無
ニホンライチョウ	用手採精	HS-2、BPSE (0.5~96時間低温保存後) -196℃
スバルバルライチョウ	用手採精	BPSE (28時間低温保存後) -196℃

表2 令和5年度卵巣処理

種名	保存部位	保存状況
マレーバク	卵胞	無
ユーラシアカワウソ	卵巣表層	-196℃
ボウシテナガザル	卵胞	無

3 DNA解析

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30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3種8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	ミゾゴイ	1	
	カンムリシロムク	1	
	カワラヒワ	6	
よこはま動物園	フンボルトペンギン	4	
	ベトナムキジ	4	受精卵性別判定
	ベトナムキジ	3	
	カンムリセイラン	1	受精卵性別判定
	オウギバト	3	
野毛山動物園	シロトキ	2	
	ルリゴシボタンインコ	4	
金沢動物園	コブハクチョウ	1	

国内他施設との協力事業件数

施設名	種名	検体数	備考
富山市ファミリーパーク	ニホンライチョウ	4	域外保全事業の一環
	カンムリシロムク	1	域外保全事業の一環
周南市徳山動物園	キュウカンチョウ	3	共同研究の一環

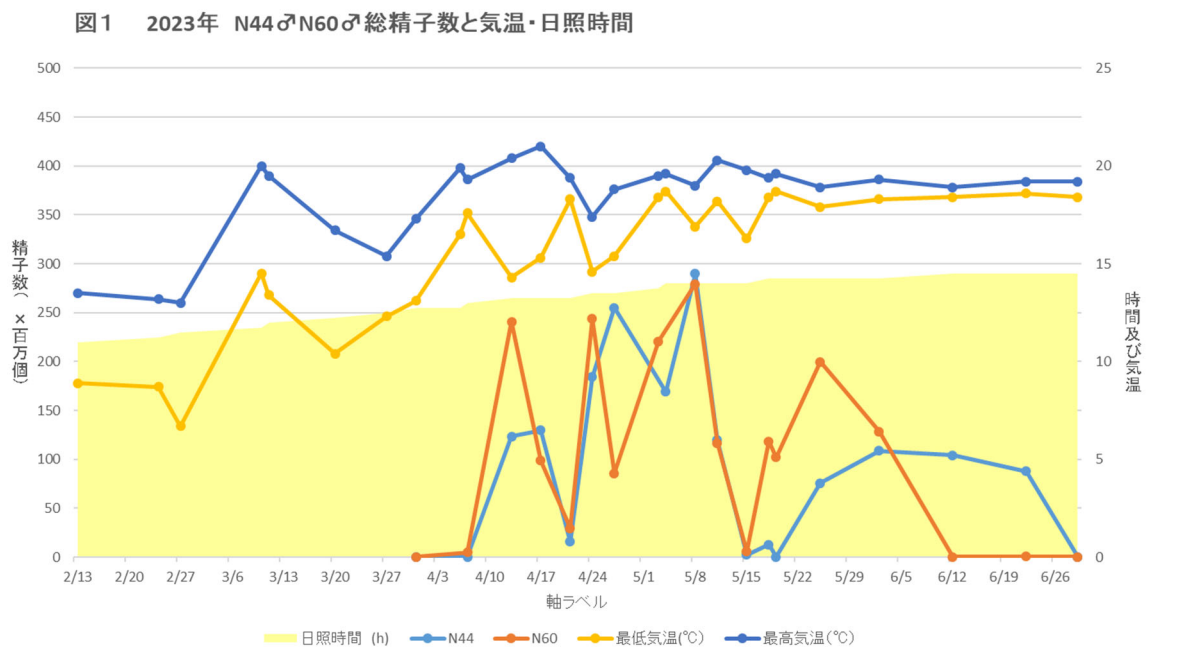
4 令和5年度 繁殖補助技術の開発の取り組みについて

日本産希少動物保全事業として、環境省のライチョウ保護増殖事業に参画し、令和3年度から、生息域内の雄個体から採精し、生息域外雌個体への人工授精を実施し、生息域外個体群の遺伝的多様性の確保を目的として繁殖補助技術開発事業に取り組んでおり、令和5年度は次の4つの取り組みを実施した。

- (1) 採精可能時期の把握のため、飼育雄2羽から経時的に用手マッサージによる採精を実施し、精液の検査を実施した。また精液を低温保存用液で希釈し低温保存性試験を実施した（表1、図1）。

表1 令和5年度 ニホンライチョウ採精及び精液検査実績

実施期間	3月30日から6月29日
各雄の採精延べ日数	各15日
精液検査	58検体
低温保存性検査	47検体



- (2) 24 時間以上低温保存後の精液希釈液にて、飼育している雌2羽に週2回人工受精試験を行い、受精率の確認を実施した。

(表 2) 24 時間以上低温保存精液による人工授精結果

総産卵数	20 卵
受精卵	4 卵
受精率	20%

(3) 採精技術の確認のため、他施設で飼育されている採精されたことのない雄 13 羽から採精を実施した。

(表 3) 他施設の未採精雄からの採精結果

未採精雄数	採精成功数
施設 A 6 羽	4 羽
施設 B 7 羽	6 羽

(4) 他施設での採精技術確立試験で採れた精液について、他施設から、当センターまで、魔法瓶（水筒）による低温輸送を行い、24 時間後に活性の変化を確認した（表 4）。

(表 4) 輸送前後の精液活性結果

	輸送前の精液活性 (+、±、-)	輸送後の精液活性 (+、±、-)
検体 1	(30、30、40) 採精 24 時間後	(15、15、70) 採精 48 時間後
検体 2	(40、40、20) 採精 24 時間後	(40、40、20) 採精 48 時間後
検体 3	(75、15、10) 採精直後	(60、20、20) 採精 24 時間後
検体 4	(50、20、30) 採精直後	(60、30、10) 採精 24 時間後

(+ 前進運動精子、 ±前進運動以外の運動精子、 -不動精子)

5 大学との共同研究

令和5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5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) 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
- (3) 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
飼育下ミゾゴイの音声コミュニケーションに関する研究
- (4) 麻布大学獣医学部 病理学研究室
希少鳥類におけるトリ白血病ウイルス（ALV）病変に係る共同学術研究

6 研究発表

令和5年度は6件の研究発表（口頭発表4件、ポスター発表2件）を行った。
共著論文1件、投稿記事1件が出版された。

- 1 第6回野生動物保全繁殖研究会大会（口頭）
「飼育下ハイロモウーリーモンキーの雄個体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繁殖生理の解明」
- 2 令和5年度環境創造局業務研究・改善事例発表会（口頭）
「横浜市内におけるムカシツチガエルの試験放野について」
- 3 第33回日本動物園水族館両生類爬虫類会議（口頭）
「横浜市内におけるムカシツチガエルの試験放野について」
- 4 3園合同公開飼育研究会（口頭）
「カワラヒワの繁殖技術確立のための取り組み オガサワラカワラヒワの現状と生息域外保全事業」
- 5 第6回野生動物保全繁殖研究会大会（ポスター）
「動物園水族館繁殖研究アライアンスの活動報告（2022年度）」
- 6 日本爬虫両生類学会 第62回大会（ポスター）
「横浜市および三浦半島のアカハライモリのミトコンドリアDNA解析」
- 7 共著論文
日本鳥学会誌 72(1), 85-93 (2023)
日本のライチョウ *Lagopus muta japonica* における排泄糞 DNA を用いた非侵襲的な PCR 性判別法の確立
- 8 投稿記事
BIRDER Vol.38 No.03 (2024)
方舟の鳥たち ～希少な鳥を動物園で守る 3.カグー