

令和 2 年 4 月 1 日

横浜市繁殖センター

## 令和元年度 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、令和元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>

令和元年度は、希少野生動物の精子 1 種、体組織 13 種 14 点の凍結保存を行なった。また、横浜市立動物園で飼育されている 4 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 11 種 48 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) 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)

令和元年度は、よこはま動物園で飼育されている4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、ゴールデンターキン、キリン(野毛山動物園、よこはま動物園)、インドサイ、インドゾウ(よこはま動物園)、ホッキョクグマ、チーター、ウンピョウ、ユーラシアカワウソ、オランウータン、ボウシテナガザ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。

## (1) 繁殖センターにおける測定

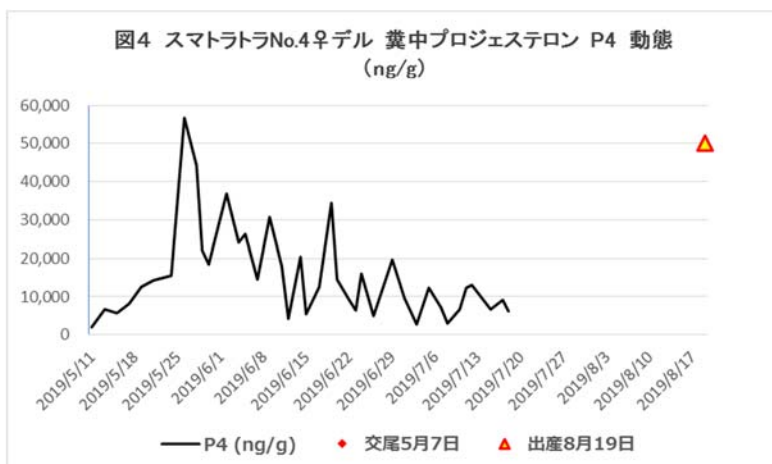
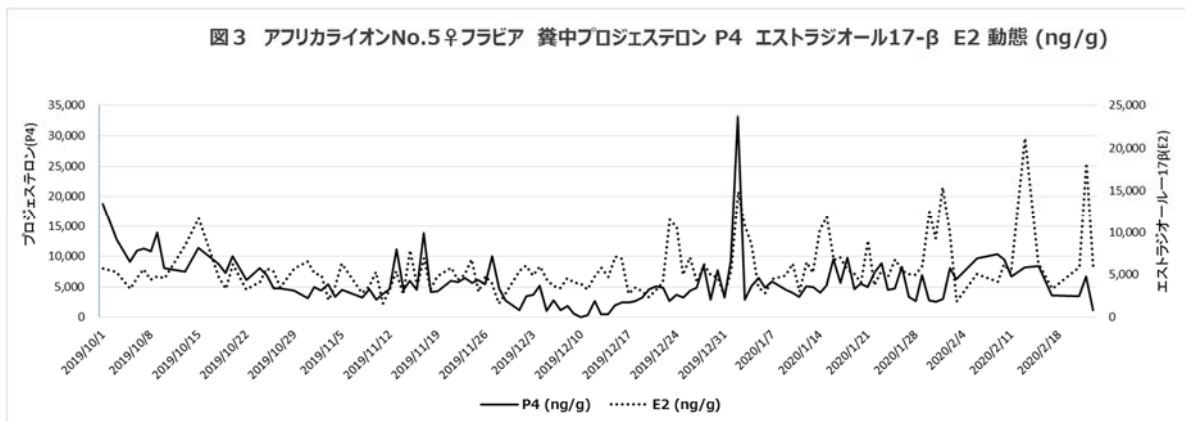
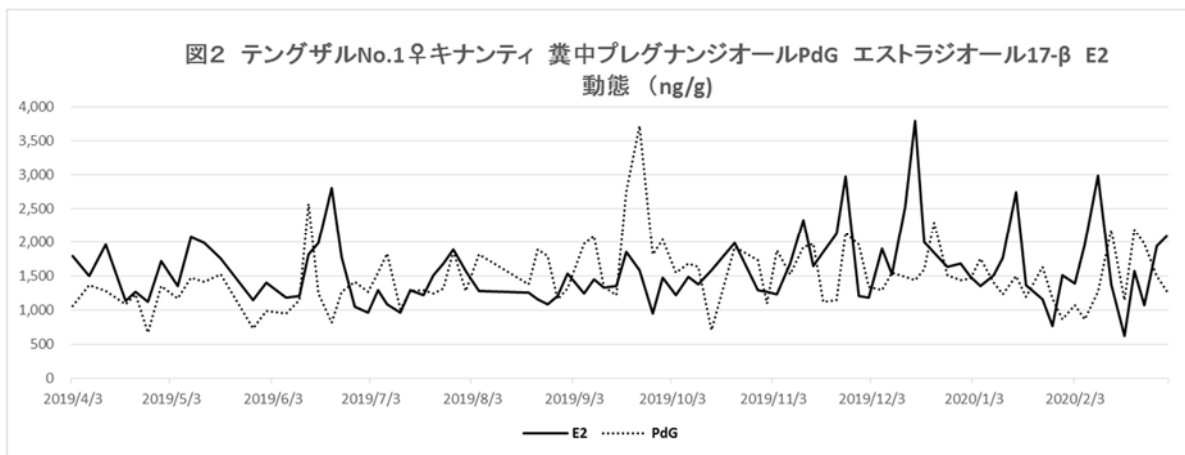
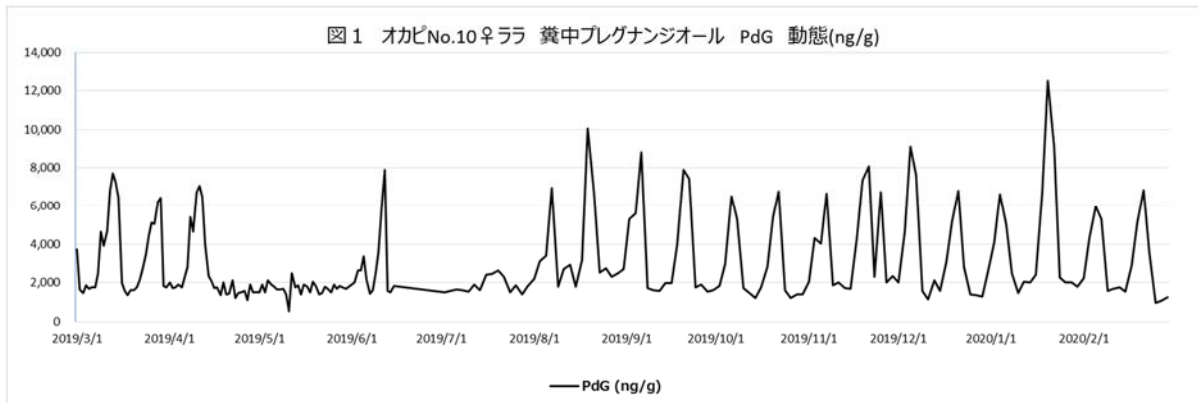
繁殖センターでは酵素免疫測定法にて、横浜市内 3 動物園で採取した排泄物から性ホルモンやその代謝物を抽出し、測定を行っている。性ホルモンを測定する目的は、妊娠の早期発見や繁殖適期の特定など飼育下野生動物の繁殖生理を解明し、その飼育管理を改善することにある。

令和2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)を測定した。

測定値をグラフ化したものを図1から図4に示した。スマトラトラNo.4♀デルについて糞中プロジェステロン濃度を測定し非妊娠と判断したが、その後出産にいたった。測定期間が短かったための誤判定と思われた。

表1 R1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
オカピ	No.10 ララ	♀	よこはま動物園	糞	PdG
テングザル	No.1 キナンティ	♀	よこはま動物園	糞	PdG E2
アフリカライオン	No.5 フラビア	♀	よこはま動物園	糞	P4 E2
スマトラトラ	No.4 デル	♀	よこはま動物園	糞	P4



## 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。

令和元年度は、哺乳類 9 種および鳥類 1 種の死亡個体の精巣上体中の精液（鳥類は精巢内）より回収した精液の凍結保存を試み、そのうち 1 種の精液を凍結保存した（表 1）。精液は細切法により回収し、ストローに注入後、 $-196^{\circ}\text{C}$ で保存した。

一方、卵巣に関しては、哺乳類 2 種について卵子の回収を試みたが、高齢個体由来の卵巣のため、卵子は回収できなかった（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 13 種 14 点（鳥類 3 種 3 点、哺乳類 10 種 11 点）の体組織（筋肉、肝臓、脾臓）を $-80^{\circ}\text{C}$ 下で凍結保存した。更に哺乳類 2 種について、細胞培養の上、培養細胞を $-80^{\circ}\text{C}$ で凍結保存した（表 3）。

なお、繁殖センターには平成 11 年以降精子 53 種（ストロー数 1,276 本）、卵子 3 種（ウンピョウ、アライグマ、インドガウル）、体組織 164 種が凍結保存されている。（2 年 3 月末）

表1 令和元年度精子回収状況

種名	処理日	回収状況	保存状況
ウンピョウ	190603	細切	無
ヤブイヌ	190627	細切	無
アラビアオリックス	191022	細切	無
アビシニアコロブス	200125	細切	無
ツシマヤマネコ*	190502	細切	無
ニホンライチョウ*	190527	細切	無
ワタボウシタマリン*	190527	細切	無
ツシマヤマネコ*	190621	細切	無
コツメカワウソ*	190924	細切	無
マンドリル*	191205	細切	無
アラスカラッコ*	200325	細切	EYT (グリセリン)

表2 令和元年度卵巣処理

種名	処理日	保存部位	保存状況
オカピ	200313	卵胞	無
ツシマヤマネコ*	190809	卵胞	無

表3 令和元年度培養細胞凍結状況

種名	培養開始日	保存日	保存液
ボウシテナガザル	191120	191223	セルバンカー
ミナミアフリカオットセイ	200313	200331	セルバンカー

### 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、11種48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3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	ミゾゴイ	3	
	カンムリシロムク	25	
よこはま動物園	エミュー	1	
	フンボルトペンギン	3	
	コウノトリ	4	受精卵性別判定
	オウギバト	8	
	セイキムクドリ	2	
	コセイキムクドリ	2	
野毛山動物園	クロツラヘラサギ	1	
金沢動物園	ミゾゴイ	1	
	カルガモ	2	
	オオコノハズク	1	

#### 国内他施設との協力事業件数

施設名	種名	羽数	備考
宮崎フェニックス自然動物園	ミゾゴイ	2	域外保全事業の一環
奄美いんまや動物病院	ミゾゴイ	1	域外保全事業の一環

## (2) 市内産カエルの遺伝的な解析について

環境創造局動物園課繁殖センター・環境科学研究所

市内産カエルの保全に向け、保全計画立案の際の基礎データとす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環境科学研究所が担当し、試料分析は動物園課繁殖センターが担当した。

### 調査項目

#### 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昆虫類や有尾両生類では、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 (Tominaga et al 2006)。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。更に、樹上生活を行わないことからニホンアマガエルなどと異なり農作物の運搬に伴う人為的な移動の可能性が低いため。

★調査地：14 地点（新治市民の森、県立四季の森公園、森の台雨水調整池、横浜市立川井小、旭区こども自然公園、よこはま動物園、氷取沢市民の森、舞岡公園。金沢動物園、横浜自然観察の森、荒井沢市民の森、瀬上市民の森、新井町公園、希望ヶ丘水の森公園）

★採材期間：平成 27 年～平成 30 年

★解析方法：

\*材料：調査地点よりヤマアカガエルの幼生を数匹採集し、尾部の一部を EtOH 下で保存し、保存組織から DNA 抽出キットにより DNA を回収した (QIA Blood and Tissue Kit)。

\*mtDNA 解析：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。

\*マイクロサテライト DNA 解析：Okamiya et al (2017) に従い、ヤマアカガエルのマイクロサテライト DNA を増幅し、ABI310 Genetic Analyzer により各マイクロサテライト DNA のアレルを解析した。解析に用いた集団は、非血縁と思われる個体が比較的多く得られた 4 地点（新治市民の森、四季の森公園、横浜自然観察の森、舞岡市民の森）24 個体を用いた。各個体間の遺伝子構成は Structure software を用いて解析した。更に、市南部（自然観察の森、舞岡）と市北部（新治市民の森、四季の森公園）の遺伝的関係の解析には Genepop software を用いた。PCR プライマーおよび PCR 条件は表 1 に示した。

#### ☆結果

\*mtDNA：14 個体群 27 匹について解析した。その結果、7 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 (図 1)。

\*マイクロサテライト DNA：各個体群の 7 つのマイクロサテライト DNA 遺伝子座のアレル数及びヘテロ接合体率は表 2 に示した。また、市南北の集団間の遺伝子型頻度に基づく統計解析の結果、市南北の集団は遺伝的に有意に分化しており ( $\chi^2$  検定  $df=14, p<0.001$ )、更に世代あたりの集団間の移住個体数 ( $N_m$ ) も 1 個体以下 (0.9) と推定された。(一般的に  $N_m \geq 1$  の場合、集団間の遺伝的分化は起きないとされる)。一方、各個体間の遺伝解析の結果、新治市民の森の個体群は、近傍の四季の森公園の個体群と遺伝子構成が分化していることが示された (図 2)。

#### ☆考察

今回、横浜市内の南北間における両生類の遺伝的分化の有無を mtDNA およびマイクロサテライト DNA を指標に解析した。解析には市内に広く生息し、荷物運搬などに付随する人為的な分布拡大の可能性が低いヤマアカガエルを用いた。その結果、mtDNA では市南北で有意な分化は見られなかった一方、マイクロサテライト DNA の遺伝子型頻度は市南北で有意に異なっていた。更に集団間の遺伝的な交流も低いものと推定された。一般的に、マイクロサテライト DNA は現在の遺伝的な関係の解析に適する一方で、mtDNA は過去の遺伝的な関係の解析に適すると考えられている。そのため、今回の解析結果は、市内のヤマアカガエルは、かつては市南北である程度の遺伝的な交流があったため、mtDNA では有意な分化が示されなかった一方、現在は市南北で遺伝的な交流が妨げられているため、マイクロサテライト DNA の遺伝子型頻度などに有意な違いが見られたものと考えられる。市南北の遺伝的交流を妨げている要因としては、市内の宅地化の進行に伴い生息地間の個体移動が妨げられたことが想定される。このことは、近傍の 2 個体群



間で、マイクロサテライト DNA の遺伝子構成に明瞭な分化が見られることから示唆される (図 2)。この 2 個体群も、それぞれ近隣の宅地化が進んでいるため、2 個体群は住宅地により分断されている。このような生息地の分断は、個体群サイズの減少を引き起こすため、各地域個体群の存続が危うくなる場合もある。そのため、今後、市内に生息するヤマアカガエルの生息数の動向に注意する必要がある。

#### ☆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、市内に生息するヤマアカガエルを対象に、市の南北地域における遺伝的分化について解析した。その結果、①市南部の三浦丘陵と市北部の多摩丘陵間では過去には遺伝的交流があったと思われるが、現在では交流が絶えていること②近隣個体群であっても、宅地化等に伴う生息地間の分断により、遺伝的な交流が断たれていることが示唆された。

#### ☆協力機関

本調査における試料収集に当たり、以下の方々にご協力いただきました。横浜市環境創造局南部公園緑地事務所、同北部公園緑地事務所、同みどりアップ推進課、緑土木事務所、旭土木事務所、保土ヶ谷土木事務所、横浜市立金沢動物園、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、こども自然公園、希望ヶ丘水の森公園、荒井沢市民の森、瀬上市民の森。横浜市立川井小学校

#### ☆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). Zoological science 29(10): 662-671

Okamiya H, Igawa T, Nozawa M, Sumida M, Kusano T. (2017) Development and characterization of 23 microsatellite markers for the montane brown frog (*Rana ornativentris*). Current herpetology 36(1) 63-68

表 1 PCR プライマーおよび PCR サイクル

遺伝子	Primer(forward)	Primer (reverse)	PCR cycle
-----	-----------------	------------------	-----------

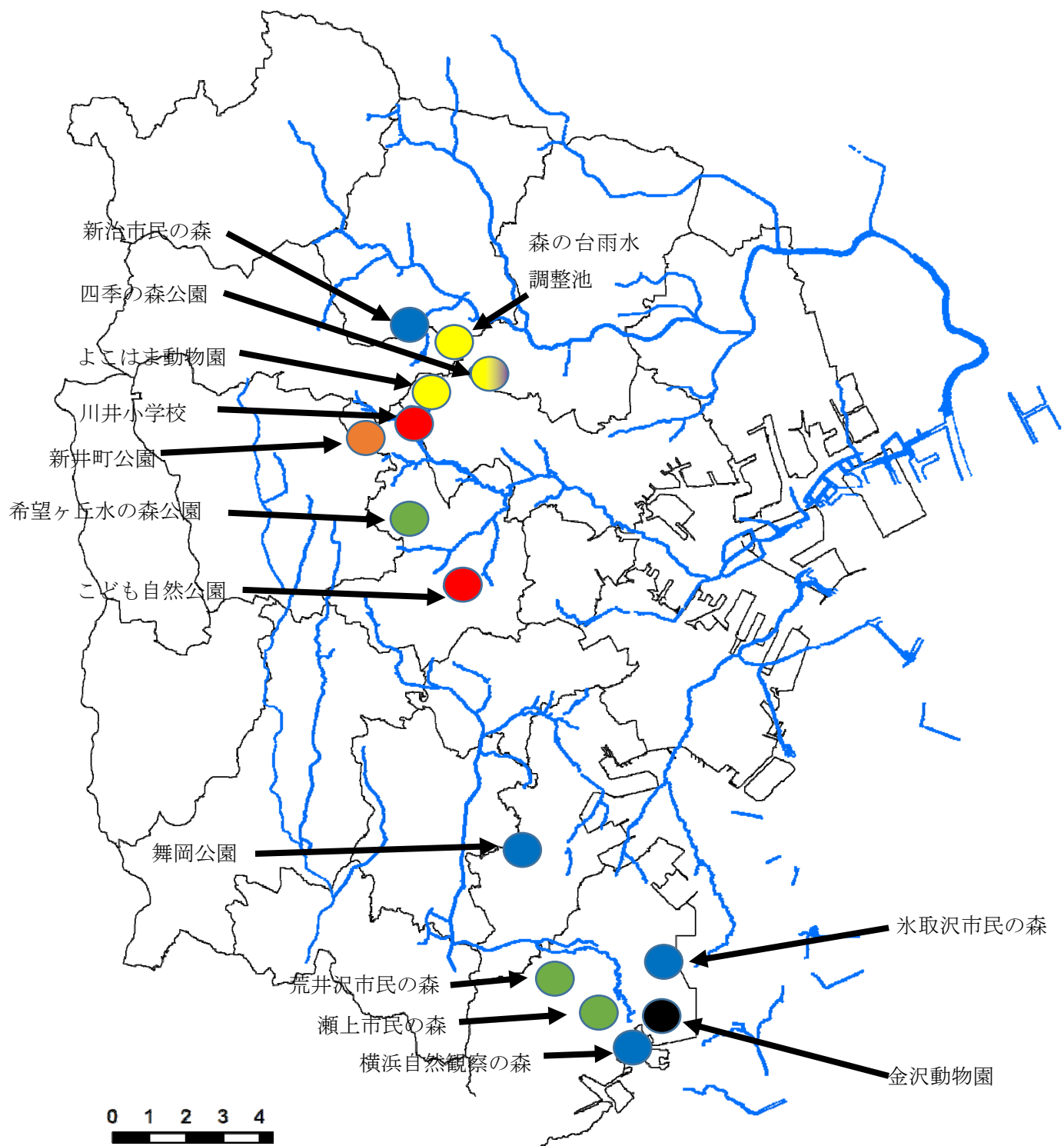
	5'-3'	5'-3'	
ND1	CGACCTCGATGTT GGATCAGG	AGGAAGTACAAAGGG TTTTGATC	94°C5分⇒33 サイクル (94°C 30 秒⇒50°C30 秒⇒72°C 90 秒) ⇒ 72°C5 分
Rorna5	TGTA AACGACGG CCAGTGTGTCAAG ATCCTACGGG	AGGAACAAGAGCACC CAGAG	95°C5分⇒30 サイクル (95°C15 秒⇒58°C30 秒⇒72°C30 秒) ⇒8 サイクル (95°C15 秒⇒53°C30 秒 ⇒72°C30 秒) ⇒72°C10 分
Rorna6	TGTA AACGACGG CCAGTTTCCAAGG TCAGGGCAG	TGCTTGTCATTGCT TGTCG	
Rorna9	TGTA AACGACGG CCAGTGAGCTATG GATGAG	ATTGTGGTGCCCTCA TGTTG	
Rorna17	TGTA AACGACGG CCAGTACATGTCC ACCACTCTGC	AAACAGCCCATAAAC TCGCC	
Rorna18	TGTA AACGACGG CCAGTTTGAGCAG GGTGTGTGTATAC	GTGGAGGAAGCTGCA TCTTG	
Rorna21	TGTA AACGACGG CCAGTACACCAGG GTATGCATTATGTG	ACACTTCTGATGGGT CCACTC	
Rorna23	TGTA AACGACGG CCAGTACACCTCC CTCCACCAATG	GGGATTCCTTTGCCA TCACC	

表2 マイクロサテライト7遺伝子座におけるアリル数及びヘテロ接合体率

	Rorna5	Rorna6	Rorna9	Rorna17	Rorna18	Rorna21	Rorna23
自然観察 の森	No. of allele=2	No. of allele=2	No. of allele=7	No. of allele=6	No. of allele=5	No. of allele=3	No. of allele=5
	He: 0.545	He: 0.409	He: 0.909	He: 0.848	He: 0.833	He: 0.439	He: 0.787
	Ho: 0	Ho: 0.5	Ho: 1	Ho: 0.667	Ho: 0.333	Ho: 0.167	Ho: 0.333
舞岡公園	No. of allele=3	No. of allele=2	No. of allele=5	No. of allele=3	No. of allele=5	No. of allele=2	No. of allele=4
	He: 0.318	He: 0.5303	He: 0.833	He: 0.53	He: 0.848	He: 0.53	He: 0.652
	Ho: 0.333	Ho: 0.5	Ho: 1	Ho: 0.333	Ho: 0.667	Ho: 0.5	Ho: 0.167
新治市民 の森	No. of allele=3	No. of allele=2	No. of allele=1	No. of allele=4	No. of allele=3	No. of allele=2	No. of allele=5
	He: 0.714	He: 0.429	He: 0	He: 0.821	He: 0.75	He: 0.429	He: 0.856
	Ho: 0.5	Ho: 0	Ho: 0	Ho: 0.25	Ho: 0.5	Ho: 0	Ho: 0.5
四季の森 公園	No. of allele=5	No. of allele=3	No. of allele=8	No. of allele=7	No. of allele=8	No. of allele=2	No. of allele=4
	He: 0.775	He: 0.433	He: 0.917	He: 0.875	He: 0.9	He: 0.4	He: 0.517
	Ho: 0.5	Ho: 0.25	Ho: 0.5	Ho: 0.875	Ho: 0.25	Ho: 0.5	Ho: 0.375
Total	No. of allele=6	No. of allele=5	No. of allele=11	No. of allele=10	No. of allele=11	No. of allele=4	No. of allele=7

He:ヘテロ接合体率の期待値

Ho:ヘテロ接合体率の観察値



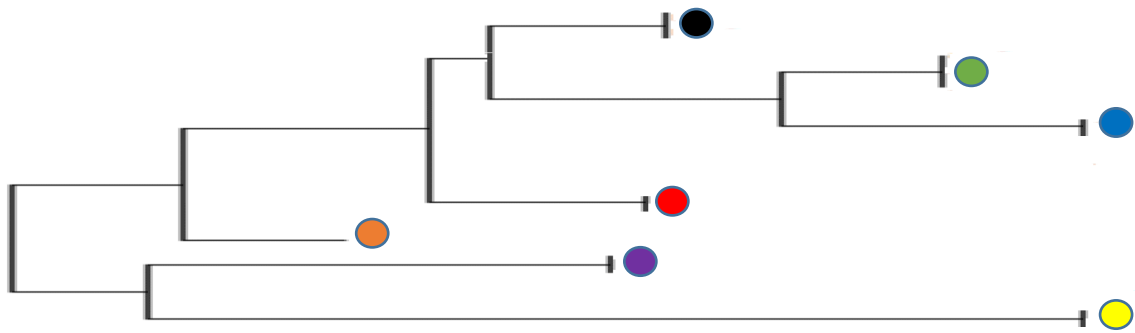


図1 ヤマアカガエルのハプロタイプ間の遺伝的関係と分布状況 (ND1 遺伝子) ハプロタイプを色別で示した。

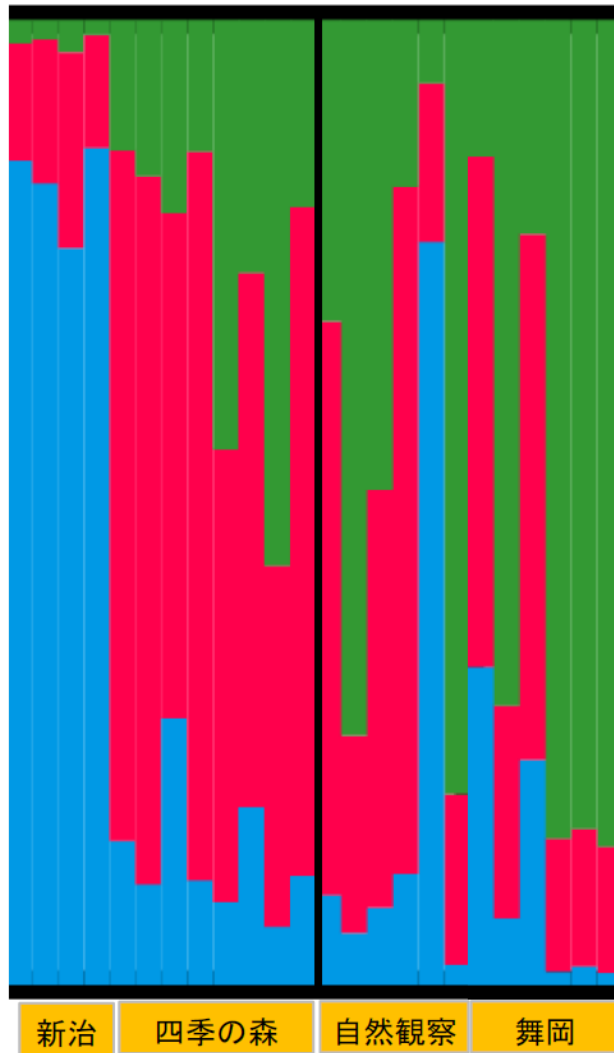


図2 マイクロサテライト 7 遺伝子座のアリル頻度に基づく Structure 解析。K=3

## 4 大学との共同研究

令和元年度、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。

### 令和元年度共同研究

- (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  
キメラ動物を活用した新たな鳥類増殖方法開発および希少動物の体細胞培養に関する研究
- (3) 広島大学両生類研究センター  
サドガエル等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) 北里大学獣医学部獣医解剖学研究室  
鳥類の疾病原因究明に関する共同研究
- (7) 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

## 5 研究発表

令和元年度は4件の研究発表（口頭発表1件、ポスター発表3件）を行い、更に共著論文1件、報文1件が出版された。

- 1 第3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事業における横浜市繁殖センターの配偶子回収実績」
- 2 第21回種保存会議（ポスター）  
「インドネシアにおけるカンムリシロムクの保護活動とその成果」
- 3 環境創造局業務研究・改善事例報告会（口頭1件、ポスター1件）  
「生息域外保全を目的としたニホンライチョウの導入と飼育経過について」（口頭）  
「横浜市繁殖センターにおけるニホンアカガエルの保全活動について」（ポスター）
- 4 共著論文：野生動物医学会誌 24(1):1-7 (2019)  
「Genetic assessment of reinforcement of Japanese brown frog」
- 5 報文：爬虫両生類学会報 2019(2) 152-155  
「横浜市の水田域におけるカエルの分布状況」