

令和3年4月1日

横浜市繁殖センター

令和2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2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2年度は、希少野生動物の精子3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、横浜市立動物園の飼育鳥類9種83羽についてDNAによる雌雄判別を行った。さらに、横浜市内産のアカハライモリ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2年度は、金沢動物園で飼育されている1種とよこはま動物園で飼育されている5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、ホッキョクグマ、チーター、ウンピョウ、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2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3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8に示した。アフリカライオンNo.5については12月に死亡するまでの測定となった。

表1 令和2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
ヒガシクロサイ	No.1 ローラ	♀	金沢動物園	糞	P4
テングザル	No.1 キナンティ	♀	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	P4
スマトラトラ	No.13 ラウト	♀	よこはま動物園	糞	E2 P4
アフリカライオン	No.5 フラビア	♀	よこはま動物園	糞	E2
オカピ	No.5 ルル	♀	よこはま動物園	糞	PdG
オカピ	No.10 ララ	♀	よこはま動物園	糞	PdG

図1 ヒガシクロサイNo.1♀ローラ 糞中プロジェステロン P4 動態
2019年9月4日交尾(非妊娠)

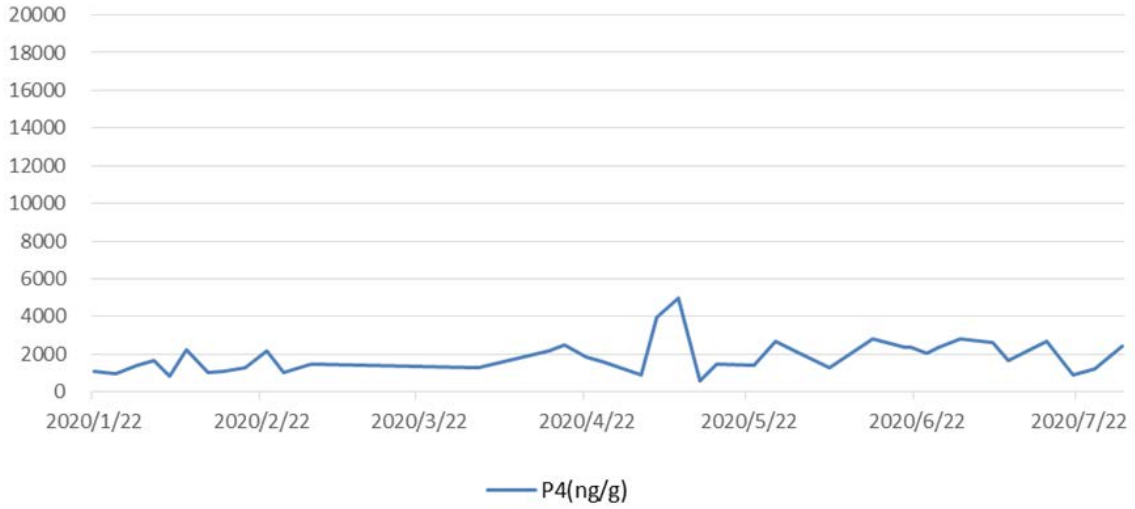


図2 テングザル No.1♀キナンティ 糞中Pプレグナンジオール PdG, エストラジオール17-β E2 動態
2019年1月15日出産 発情復帰

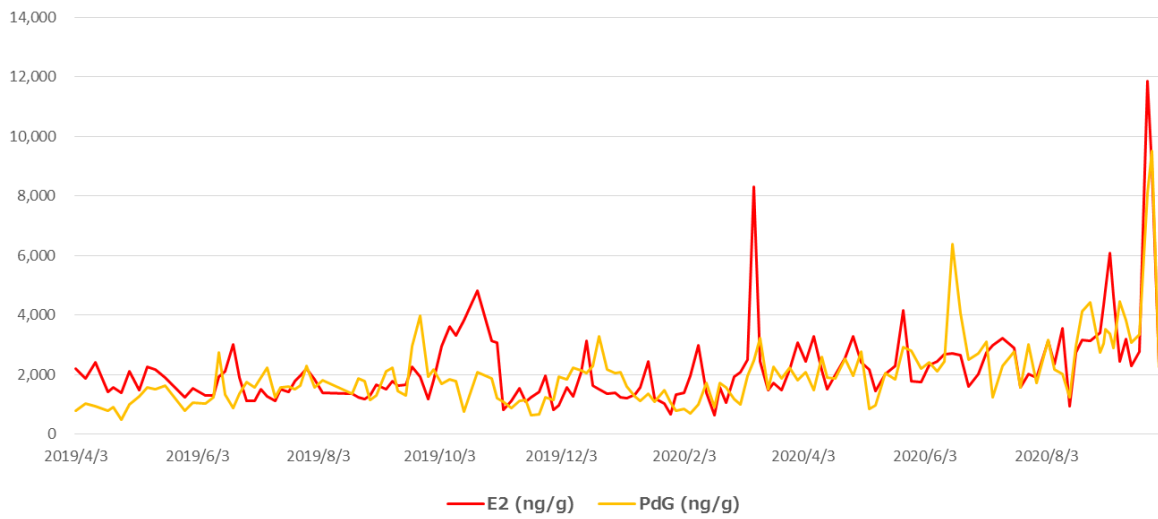


図3 テングサル No.1 キナンティ 糞中プレグナンジオール PdG エストラジオール17β E2 動態
2020年9月13日交尾(妊娠)

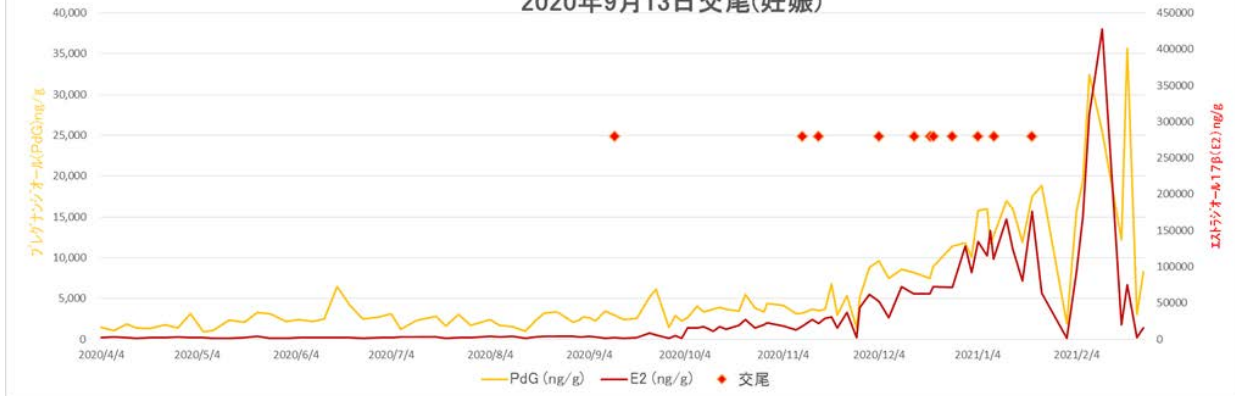


図4 スマトラトラ No.4 ♀デル 糞中プロジェステロン P4 動態
2020年3月末交尾 (非妊娠)

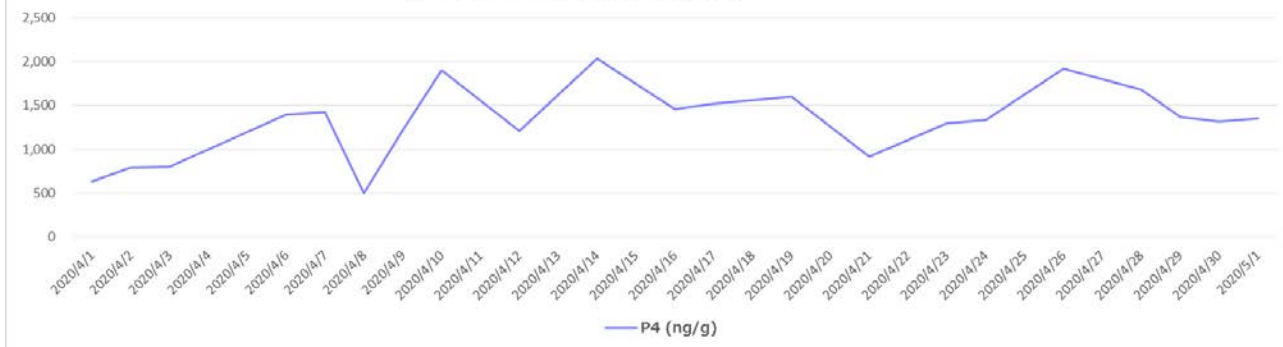


図5 スマトラトラ ♀ No.12 ラウト 糞中プロジェステロン P4 エストラジオール17β E2 動態

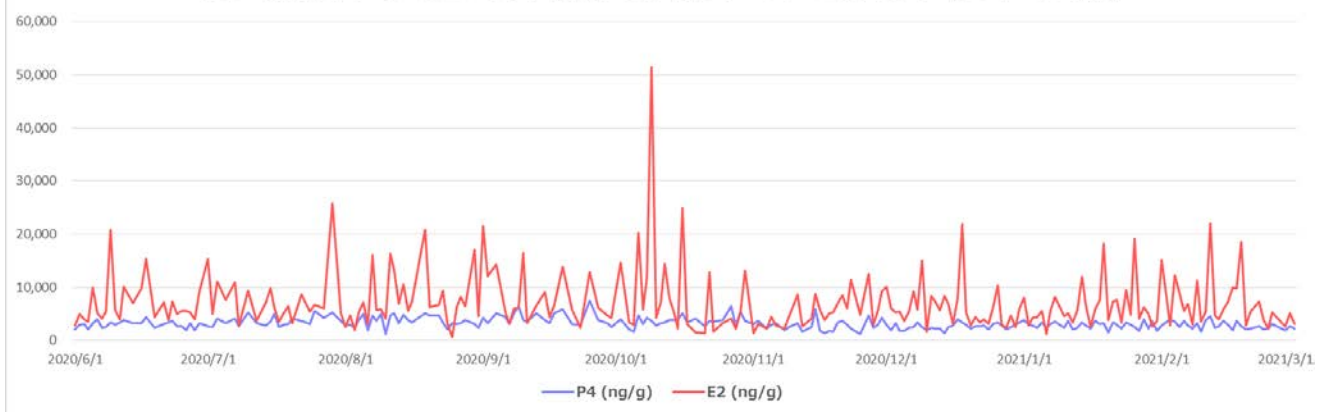


図6 アプリカライオン No.5 ♀ フラビア エストラジオール17β E2 動態

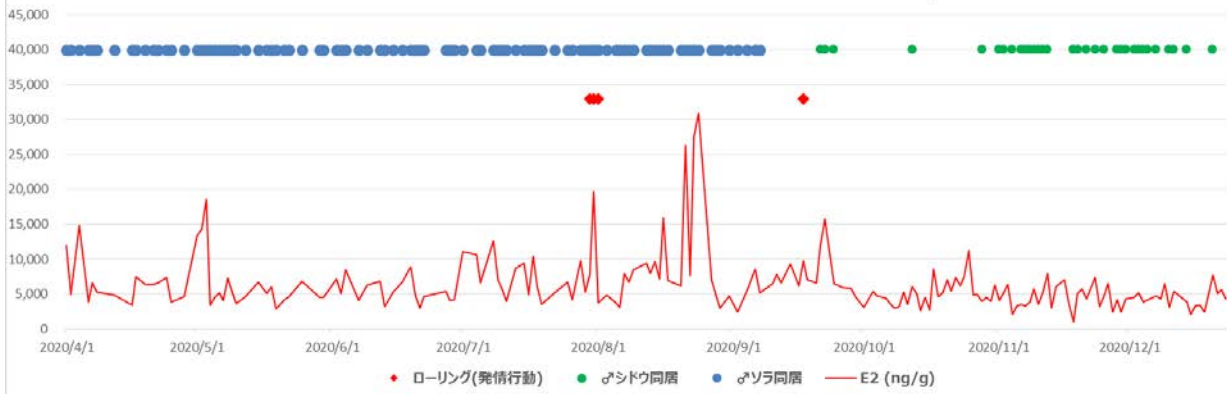


図7 オカビNo.10♀ララ 糞中プロゲステロン PdG 動態

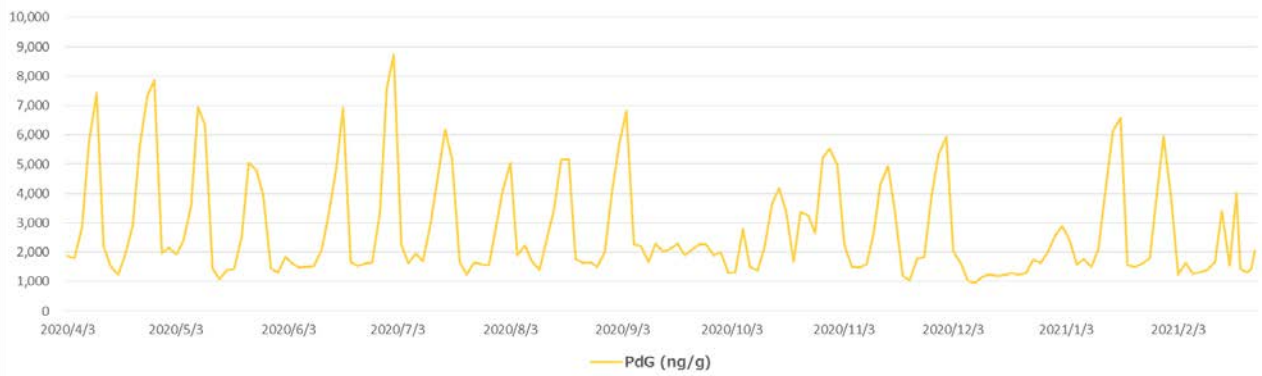
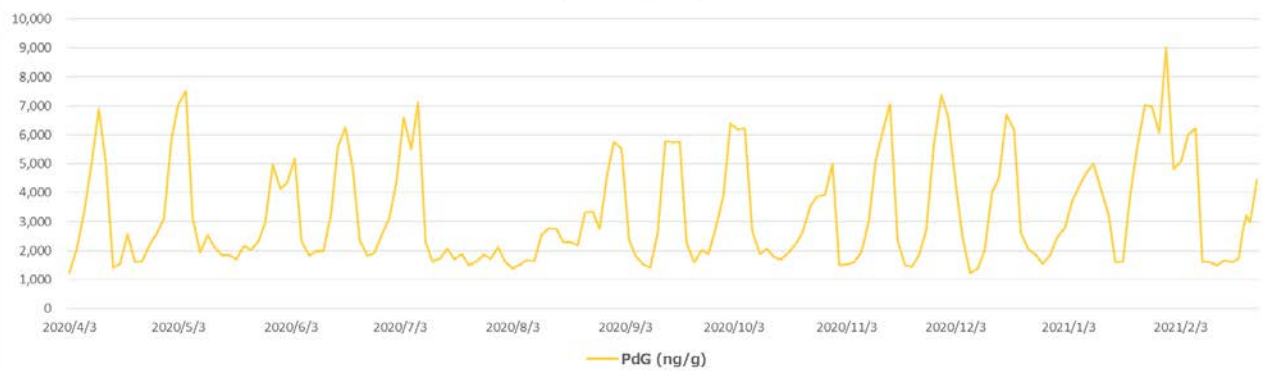


図8 オカビ No.5 ♀ルル 糞中プロゲステロン PdG 動態



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 2 年度は、哺乳類 6 種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 1 種の精液を凍結保存した（表 1）。精液は灌流法により回収し、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 10 種 11 点（鳥類 3 種 3 点、哺乳類 7 種 8 点）の体組織（筋肉、肝臓、脾臓）を-80℃下で凍結保存した。更に哺乳類 1 種について、細胞培養の上、培養細胞を-80℃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、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。（3 年 3 月末）

表1 令和2年度精子回収状況

種名	処理日	回収状況	保存状況
オグロワラビー	200708	細切	無
マレーバク	201120	細切	無
ボウシテナガザル	201222	細切	無
ゴールドセンターキン	210203	灌流	TTE
コツメカワウソ*	200510	細切	無
マサイキリン*	200903	細切	無

表2 令和2年度卵巣処理

種名	処理日	保存部位	保存状況
ウンピョウ	210208	卵胞	無

表3 令和2年度培養細胞凍結状況

種名	培養開始日	保存日	保存液
シロイワヤギ	200811	200830	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、9種83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6種12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	カグー	1	
	ホオアカトキ	1	
	ミゾゴイ	3	
	カンムリシロムク	23	
よこはま動物園	エミュー	2	受精卵性別判定
	ウミネコ	1	
	オウギバト	4	
	ベニハチクイ	42	全飼育個体再度検査
野毛山動物園	ルリゴシボタンインコ	6	

国内他施設との協力事業件数

施設名	種名	羽数	備考
富山市ファミリーパーク	カンムリシロムク	4	繁殖契約対象個体
大阪市天王寺動植物園	ミゾゴイ	1	域外保全事業の一環
沖縄こどもの国	ミゾゴイ	1	共同研究事業の一環
	シロハラクイナ	1	
	リュウキュウオオコノハズク	2	
	コミミズク	1	
	アオバズク	2	

(2) 横浜市内産アカハライモリの DNA 解析

◆目的

横浜市金沢動物園で飼育されている横浜市金沢区産のアカハライモリの出自を明らかにし、今後の飼育方針に反映させることを目的とした。

◆方法

アカハライモリの日本列島における地域分化については、詳細な研究報告が行われている(例:Tominaga et al., 2013)。今回は、これら既報の手法に従い、ミトコンドリア DNA の NADH6-tRNAGlu-cytb 遺伝子の部分塩基配列(407bp)を解析した。解析には神奈川県内2地点(横浜市金沢区、葉山町)と栃木県1地点(那須)9匹を用いた。エタノール保存された組織(尾部先端等)から DNA を抽出した後、PCR により目的 DNA を増幅し、ABI310Genetic analyser により目的 DNA の塩基配列を解析した。PCR 条件は Tominaga et al., (2013)に従った。得られた塩基配列を ClustalW により整列したうえで、MEGA7 を用いて DNA データバンクに登録されているアカハライモリの塩基配列と比較した。配列間の近縁関係は木村の 2 変数により遺伝距離を算出後、近隣結合法で行った。なお組織サンプルの収集は、金沢動物園を通じて行った。

◆結果および考察

金沢動物園で飼育されている金沢区産のアカハライモリは、近傍の葉山町や横須賀市とは遺伝的に大きく異なっていた。このことから、現存の横浜市金沢区産アカハライモリは自然分布ではない可能性が示唆された。

一方で、現在、横浜市ではアカハライモリの生息情報が殆どなく、絶滅が危惧される状況である。更に同種は神奈川県内でも絶滅危惧種となっている。今後は、神奈川県内のアカハライモリの保全を視野に、県内の個体群についても遺伝的な解析を行う必要がある。

◆参考文献

Tominaga et al., (2012). Phylogeny and historical demography of *Cynops pyrrhogaster* (Amphibia: Urodela): Taxonomic relationships and distributional changes associated with climatic oscillations. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 66 (3) p 654-667

4 大学との共同研究

令和2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2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

5 研究発表

令和2年度は3件の研究発表（口頭発表2件、ポスター発表1件）を行い、更に論文2件（共著1件）が出版された。

- 1 環境創造局業務研究・改善事例報告会（ポスター）
「ツチガエルの野生復帰（再導入）に向けて」
- 2 3園合同飼育研究会（口頭 オンライン）
「ツチガエルの野生復帰（再導入）に向けて」
- 3 高碓賞受賞講演（口頭 オンライン）
「ミゾゴイの飼育と繁殖——横浜市立動物園での15年間の取り組み」
- 4 論文：International Zoo yearbook 54(1) 165-173
Characterization of eight polymorphic microsatellite DNA markers and mitochondrial cytochrome c oxidase subunit II gene in Bali myna *Leucopsar rothschildi*.
- 5 共著論文：Life Science Alliance：4 (5)
Comparative genomics of *Glandirana rugosa* using unsupervised AI reveals a high CG frequency.