

令和 4 年 4 月 9 日

横浜市繁殖センター

令和 3 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 3 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 3 年度は、希少野生動物の精子 1 種、体組織 10 種 12 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 11 種 29 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3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、ホッキョクグマ、チーター、ボウシテナガザル、マレーバク、グレビーシマウマ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4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8に示した。

表1 令和3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.1 キナンティ	♀	よこはま動物園	糞	E2 PdG
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 P4 AD
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
セスジキノボリカンガルー	No.10 タニ	♀	よこはま動物園	糞	PdG P4
セスジキノボリカンガルー	No.12 ジャヤメイ	♀	よこはま動物園	糞	E2 PdG P4

図1 テングザル No.1 キナンティ
糞中プレグナジオール(PdG) エストラジオール17β(E2) 動態

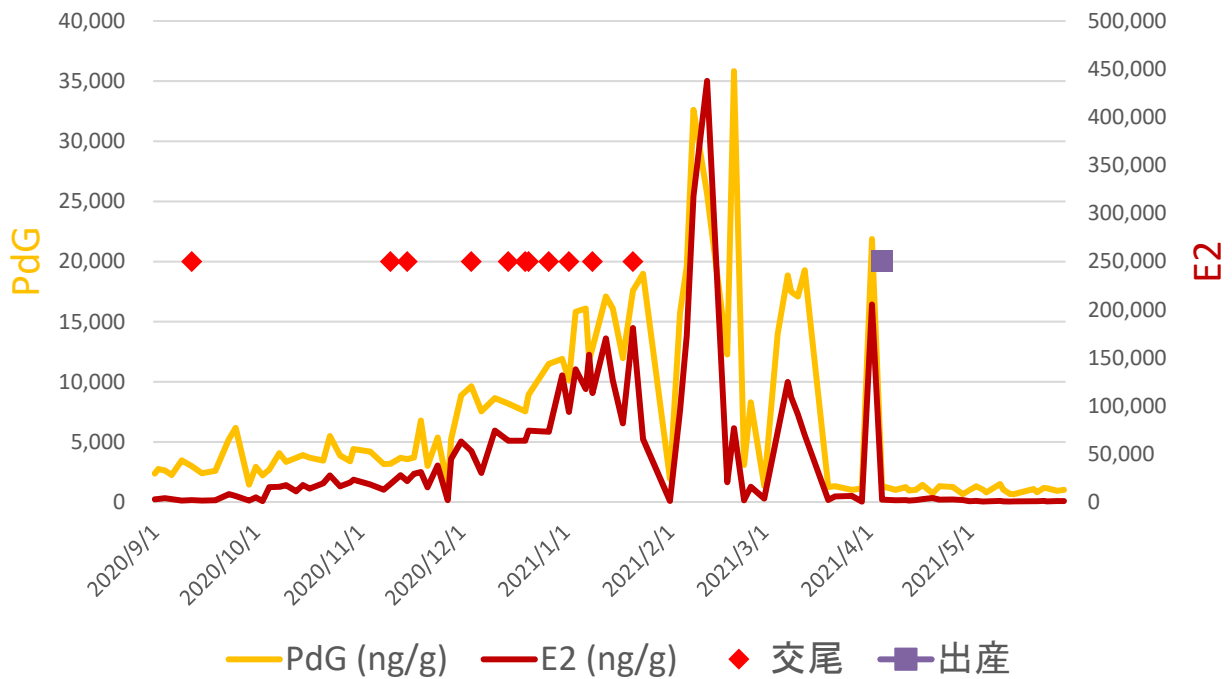


図2 テングザル No.7エミ
糞中エストラジオール17β (E2) プレグナジオール(PdG)動態

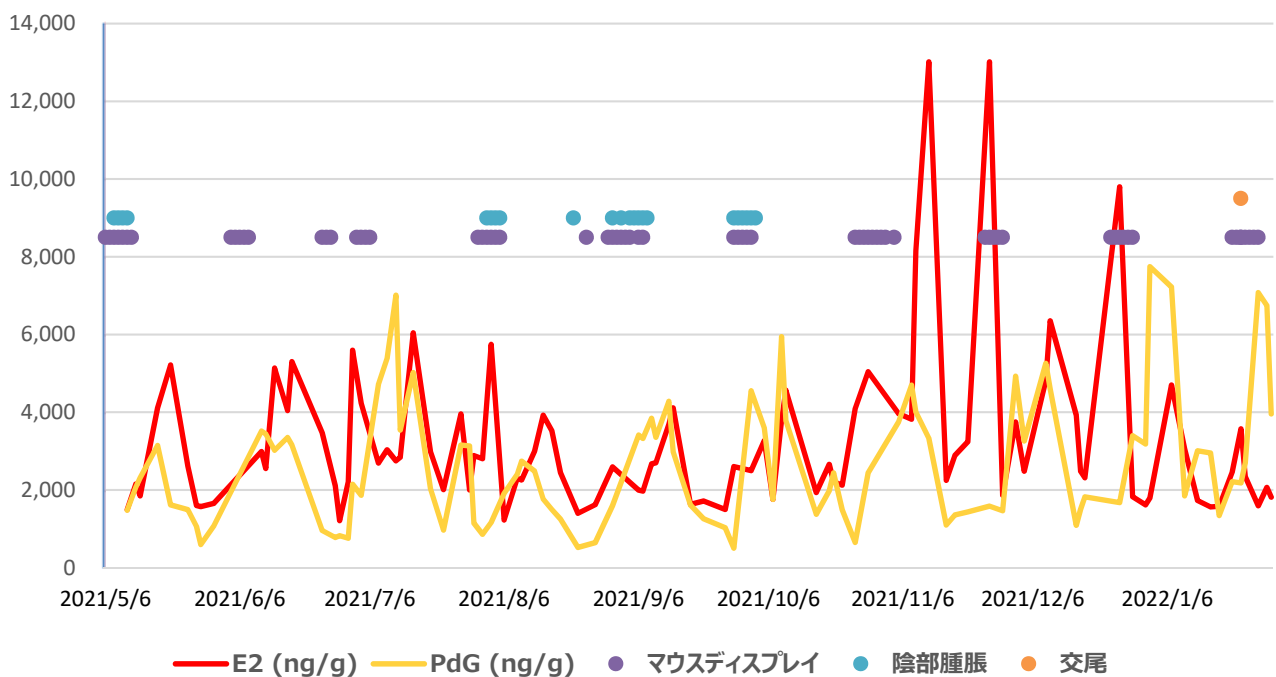


図3 スマトラトラNo.4デル
糞中エストラジロール17β (E2) プロジェステロン (P4) 動態

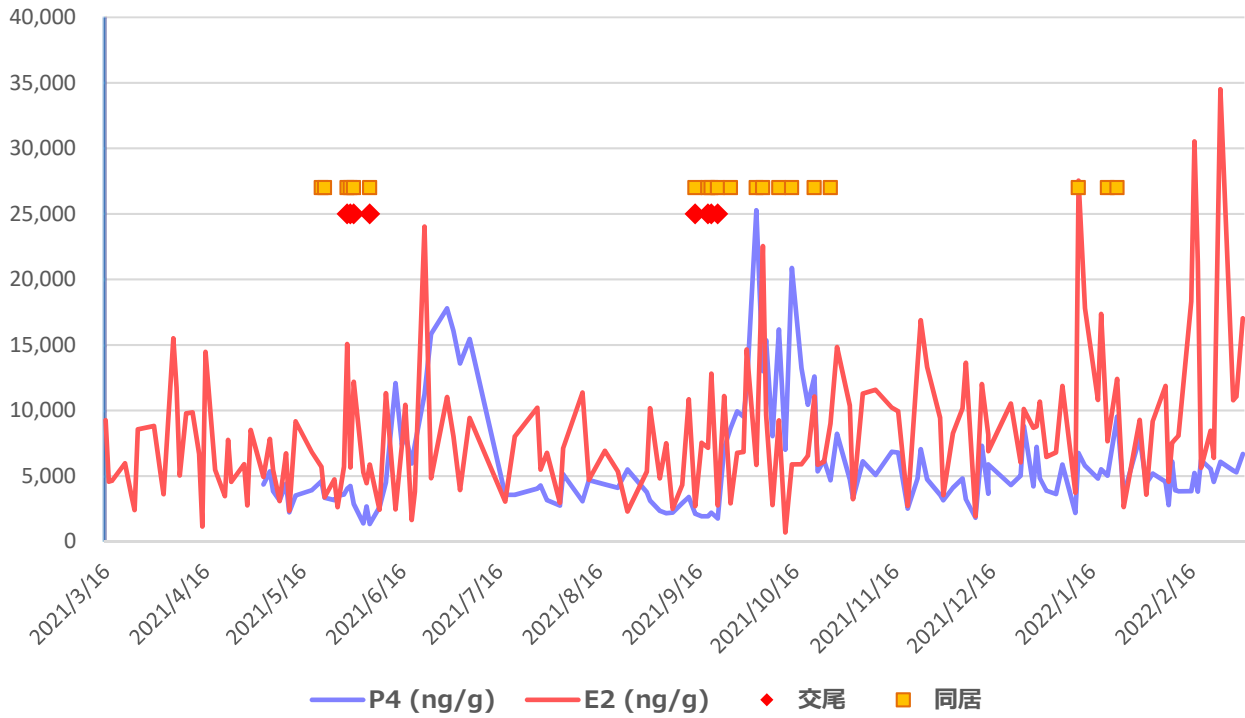


図4 スマトラトラNo.13ラウト 糞中エストラジロール17β (E2) プロジェステロン (P4) アンドロステンジオン (AD) 動態

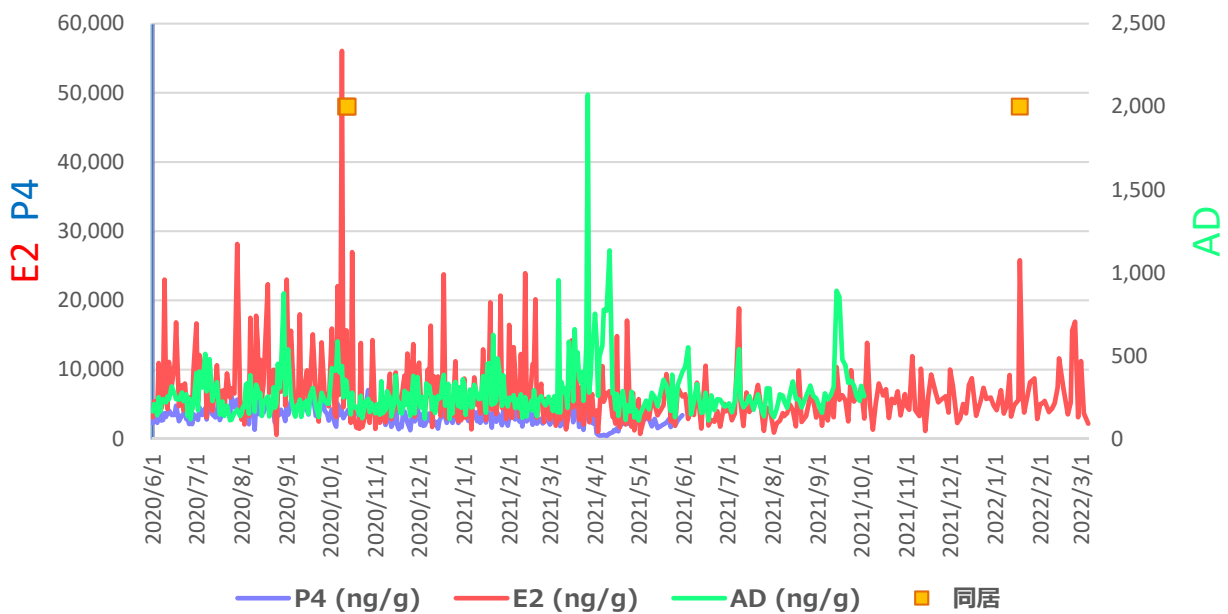


図5 オカピNo.5 ルル
糞中プレグナンジオール (PdG) 動態

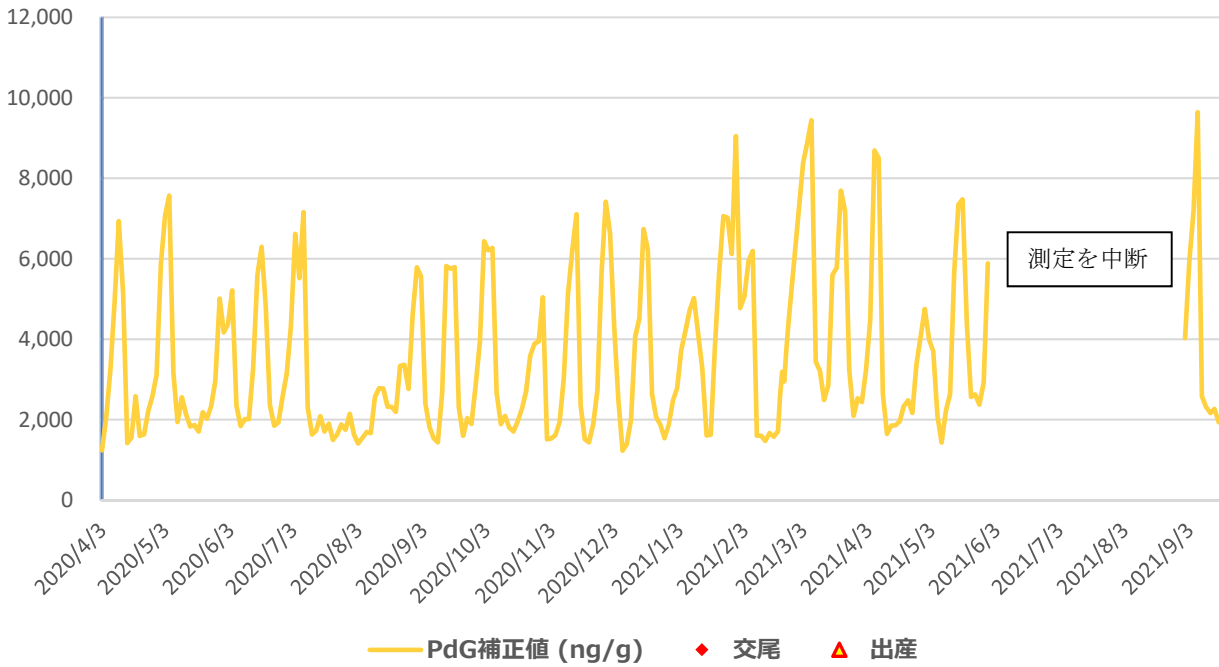


図6 オカピNo.10 ララ
糞中プレグナンジオール (PdG) 動態

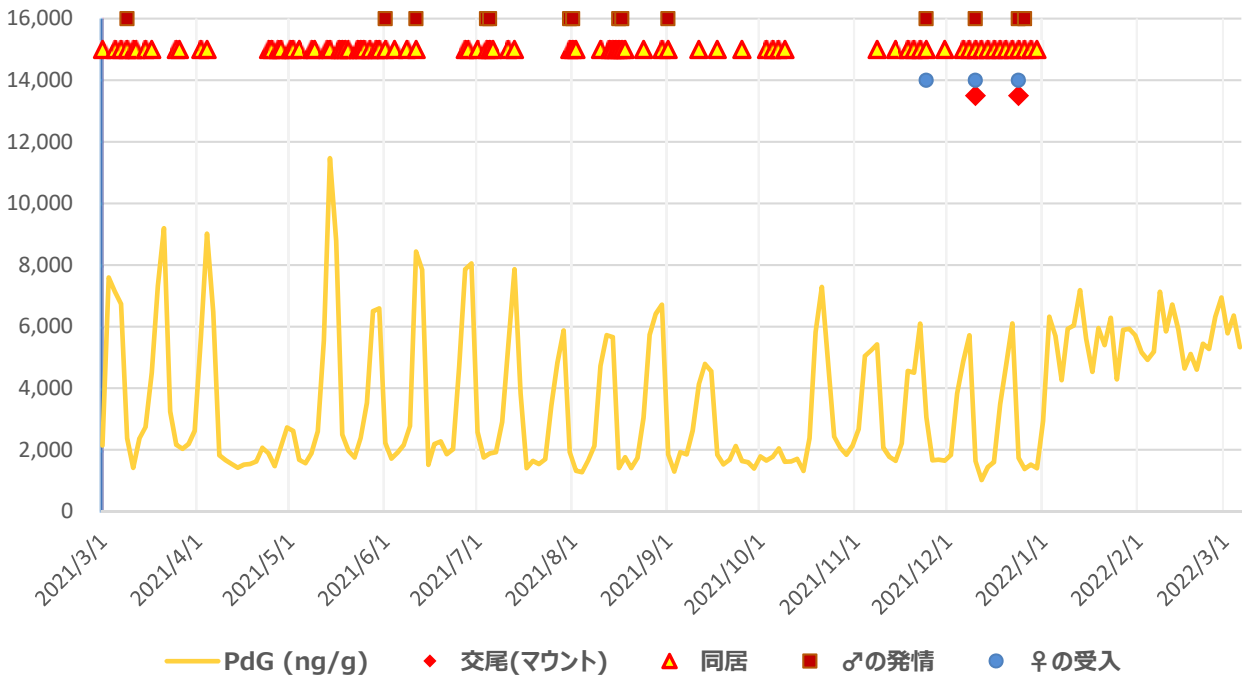


図7 キノポリカンガルーNo.10タニ
糞中プロジェステロン (P4) プレグナンジオール(PdG)動態

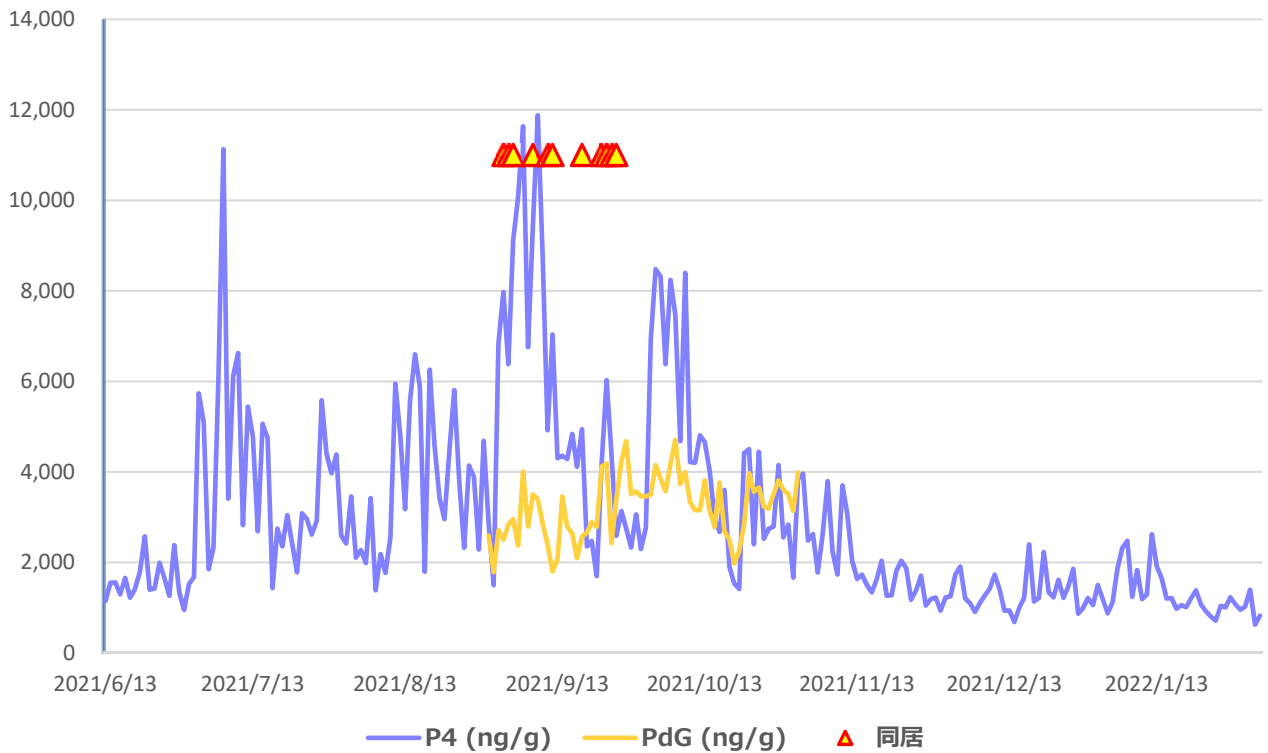
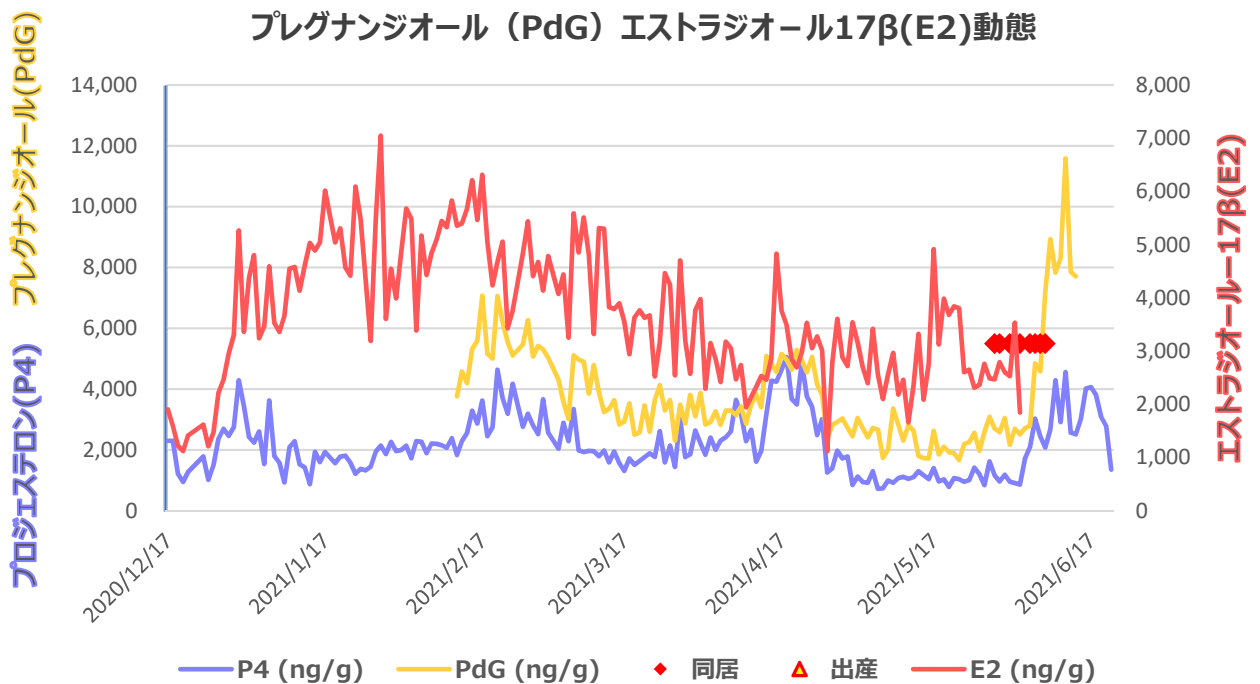


図8 キノポリカンガルーNo.12ジャヤメイ 糞中プロジェステロン (P4)
プレグナンジオール (PdG) エストラジオール17β(E2)動態



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3年度は、哺乳類 10 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 3 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 12 点(鳥類 1 種 1 点、爬虫類 1 種 1 点、哺乳類 8 種 10 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 54 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3年度精子回収状況

種名	回収状況	保存状況
アカアシドクラングール	細切	無
アカアシドクラングール	細切	無
チーター	灌流	無
ヤブイヌ	灌流	EYT-FC
ユーラシアカワウソ	灌流	無
アラビアオリックス	細切	無
スンダスローロリス※	細切	無
グレビーシマウマ※	細切	無
オランウータン※	細切	無
ピグミーマーモセット※	細切	無
レッサーパンダ※	細切	無
レッサーパンダ※	細切	無

表2 令和3年度卵巣処理

種名	保存部位	保存状況
オカピ	卵胞	無
アカアシドゥ克蘭ゲール	卵胞	無
セスジキノポリカンガルー	卵胞	無
セスジキノポリカンガルー	卵胞	無

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 29 個体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 2 種 5 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	ホオアカトキ	2	
	ミゾゴイ	2	
	ミゾゴイ	2	
	カンムリシロムク	1	
よこはま動物園	エミュー	7	
	フンボルトペンギン	1	
	カンムリセイラン	2	
	セグロカモメ	2	
	オウギバト	4	
	フクロウ	1	
野毛山動物園	ルリゴシボタンインコ	3	
金沢動物園	オオタカ	2	

国内他施設との協力事業件数

施設名	種名	検体数	備考
宮崎市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
沖縄こどもの国	ミゾゴイ	1	共同研究事業の一環
	コクチョウ	2	

(2) 親子判定

ホウシャガメ 1 匹およびツシマヤマネコ 1 頭の親子判定に取り組んだ。いずれも既報の方法に従い実施した。ホウシャガメについては、対象個体の両親の推定に至ったものの、ツシマヤマネコについては雄親の特定に至らなかった。

(3) 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., 2012)。今回は、これら既報の手法に従い、ミトコンドリア DNA の NADH6-tRNA^{Glu}-cytb 遺伝子の部分塩基配列(408bp)を解析した。解析には神奈川県内 13 地点(横浜市金沢区、葉山町)と千葉県および栃木県から各 1 地点より合計 40 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., (2012)に従った。得られた塩基配列を ClustalW により整理したうえで、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。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のイモリ(北日本系統)とは遺伝的に大きく異なり、西日本系統と近縁であった。このことから、現存する横浜市金沢区産のアカハライモリは西日本地域からの持ち込み個体由来であると推定される。

一方で、丹沢周辺に生息するアカハライモリは伊豆半島以西から近畿地方に生息する中央日本系統が大部分を占めていたが、一部地域については、三浦半島の葉山や横須賀と同じく北日本系統であることが明らかとなった。このことから神奈川県内には遺伝的に異なる 2 系統のイモリが自然分布することが明らかとなった。今後神奈川県内のイモリの保全活動に取り組む際は、この点を踏まえ、産地別の保全を心掛ける必要があることが示唆された。なお本結果は *Current herpetology*41(1)132-137 に掲載されている。

◆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3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3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
研究発表
日本鳥学会 2021 年度大会
飼育下ミゾゴイの繁殖スケジュールおよび繁殖期における雌雄の役割分担

5 研究発表

令和3年度は3件の研究発表（口頭発表1件、ポスター発表2件）を行い、更に論文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）
「ツチガエルの試験放野について」
- 2 環境創造局業務研究・改善事例報告会（ポスター）
「横浜市繁殖センターにおける性ステロイドホルモンの測定について 近年の実施状況と成果の報告」
- 3 3園合同飼育研究会（口頭 オンライン）
「横浜市繁殖センターにおける性ステロイドホルモンの測定について 近年の実施状況と成果の報告」

4 論文

Current herpetology41(1):132-137

Phylogenetic origins of a newly found Japanese red-bellied newt population in Yokohama city and other populations in Kanagawa prefecture.

要旨

近年、横浜市内で発見されたアカハライモリの由来を明らかにするために、横浜市内1地点と神奈川県内11地点のアカハライモリのミトコンドリアDNA上の遺伝子配列(408塩基)を解析し、既報のデータと比較した。その結果、横浜市内のアカハライモリは西日本地域からの移入個体に由来することが分かった。更に神奈川県内の丹沢周辺において、遺伝的に異なる2つの系統が隣接して分布していることが明らかとなった。