

令和 7 年 4 月 25 日

横浜市繁殖センター

令和 6 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 6 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 6 年度は、横浜市立動物園で飼育されている 12 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 3 種、体組織 2 種 2 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 9 種 54 個体および哺乳類 1 種 1 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 12 個体の性別判定を実施した。金沢動物園内に 5 か所に自生するクマガイソウの遺伝的多様性を考慮した人工授粉の実施に向け、自生地内のクマガイソウ株のクローン判別を実施した。

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6年度は、よこはま動物園で飼育されている9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6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-17 β (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15に示した。

表1 令和6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	P4
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
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
ウーリーモンキー	No.15 ハーブ	♀	よこはま動物園	糞	P4
ミナミアフリカオットセイ	No.8 ハッピー	♀	よこはま動物園	糞	E2 P4
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	E2 P4
ボルネオオランウータン	No.7 バレンタイン	♀	よこはま動物園	糞	PdG P4
オオアリクイ	No.11 アモ	♀	よこはま動物園	糞	E2 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
糞中プロジェステロン(P4) プレグナンジオール(PdG)動態

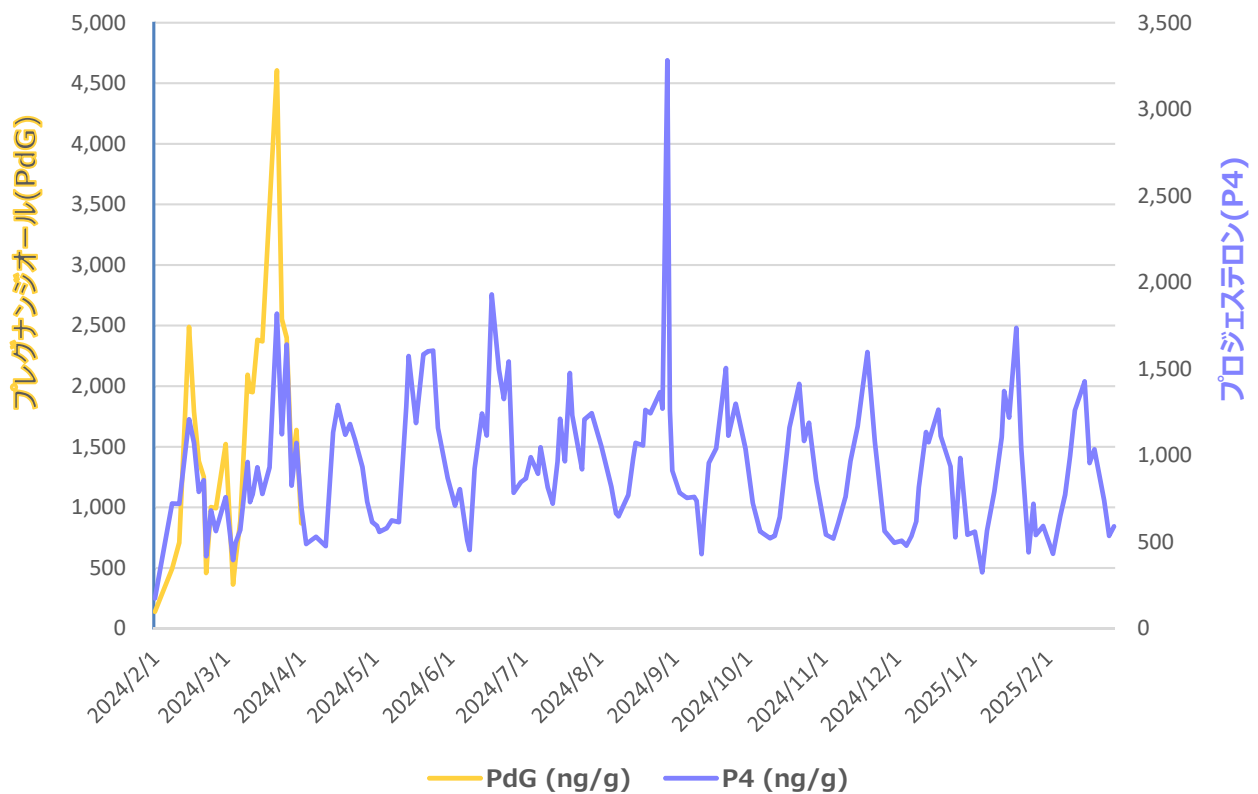


図 2 スマトラトラNo.12ムジュ
糞中プロジェステロン(P4) アンドロステンジオン(AD) 動態

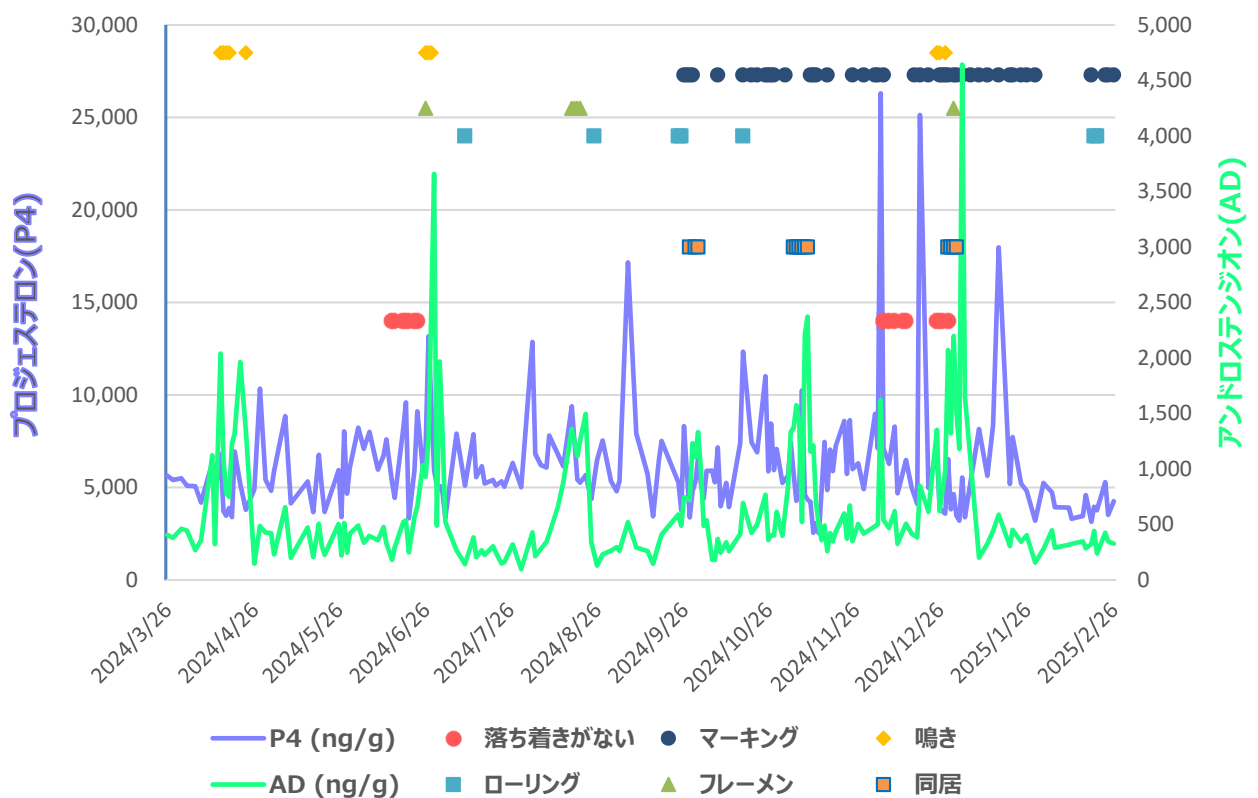


図 3 オカピNo.10ララ
糞中プレグナンジオール(PdG)動態

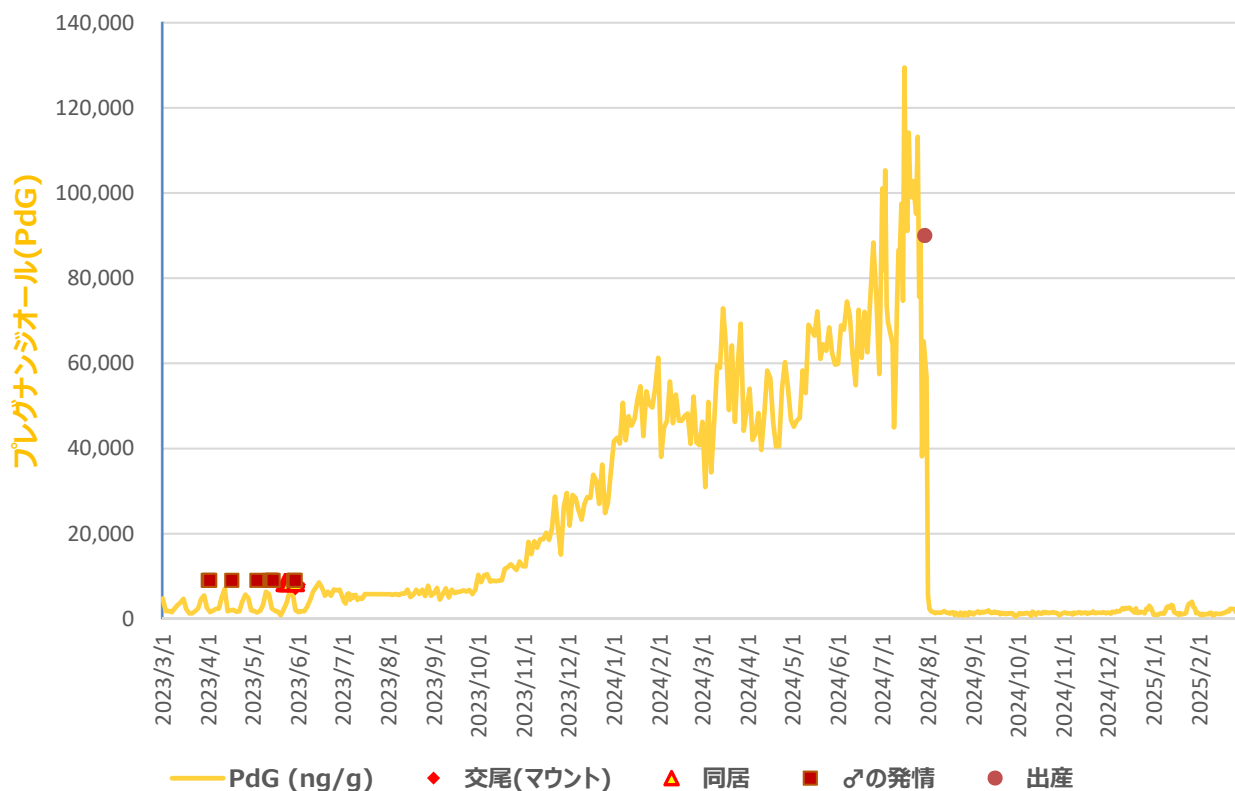


図 4 ウーリーモンキーNo.11ウリ
糞中プロジェステロン(P4) アンドロステンジオン(AD) 動態

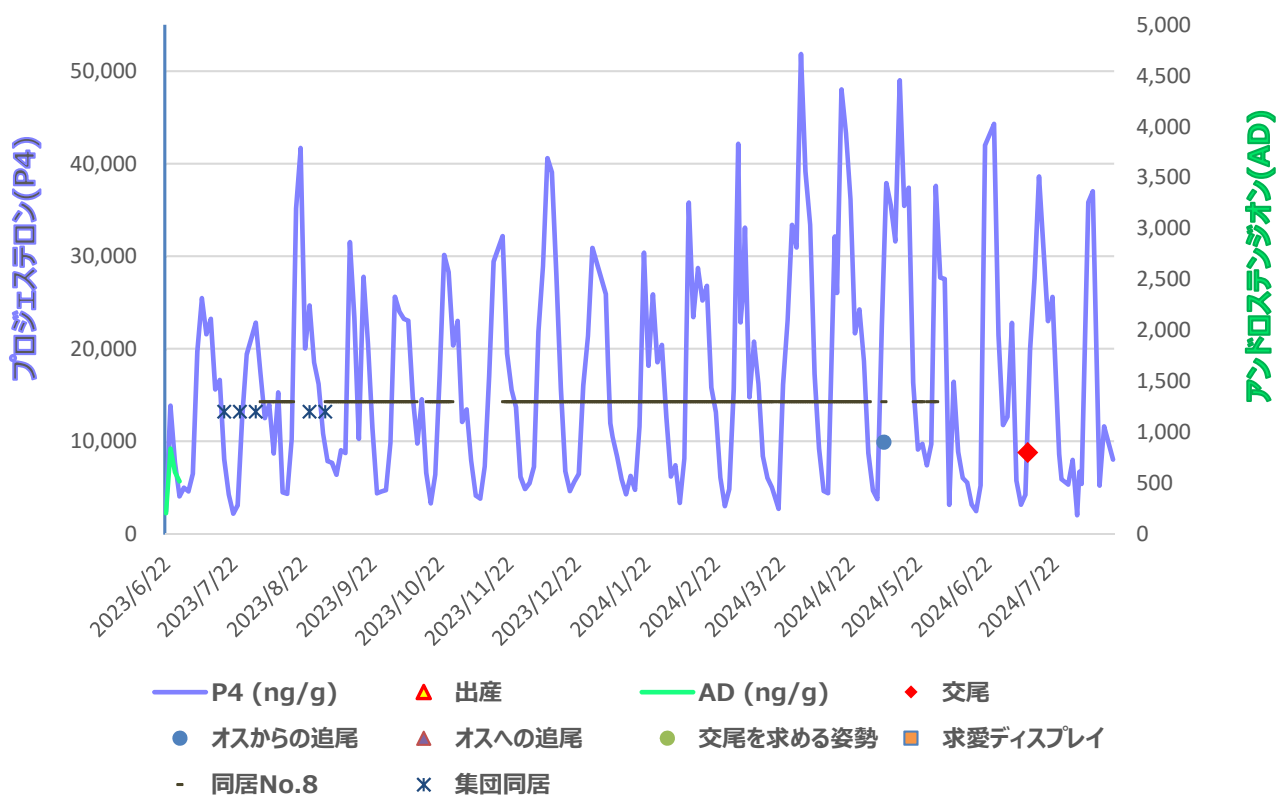


図 5 ウーリーモンキーNo.14アールグレイ
糞中プロジェステロン(P4) アンドロステンジオン(AD) 動態

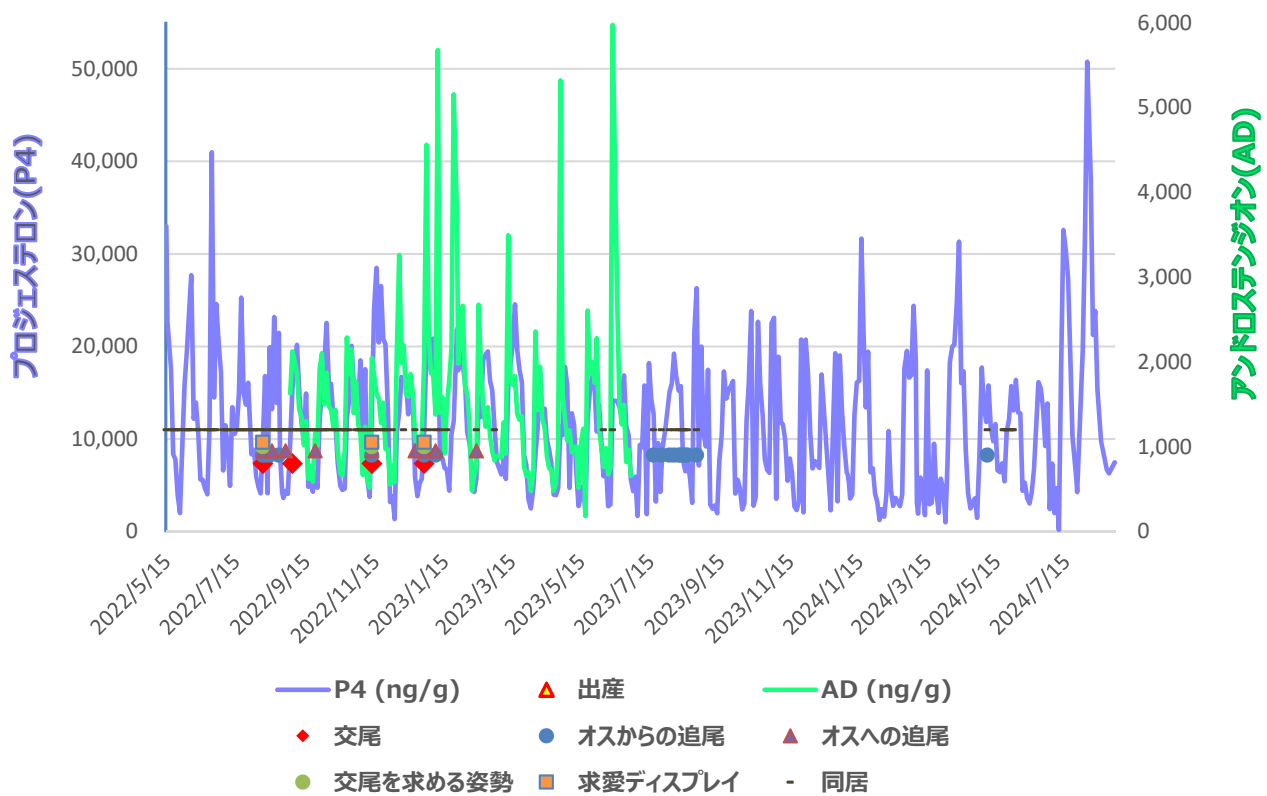


図 6 ウーリーモンキーNo.15ハーブ 糞中エストラジオール 17β (E2)
プロジェステロン(P4) アンドロステンジオン(AD) 動態

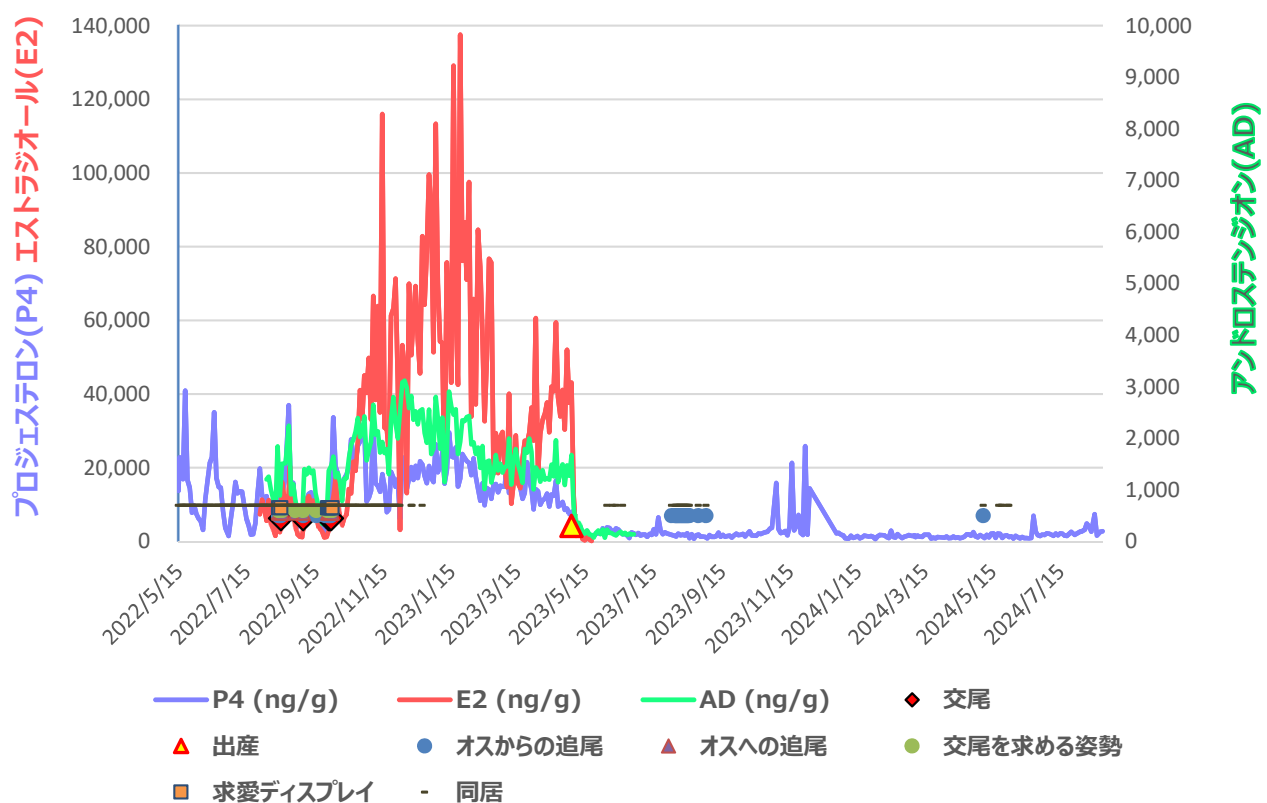


図 7 ミナミアフリカオットセイNo.8ハッピー
糞中エストラジオール17β (E2) プロジェステロン(P4)動態

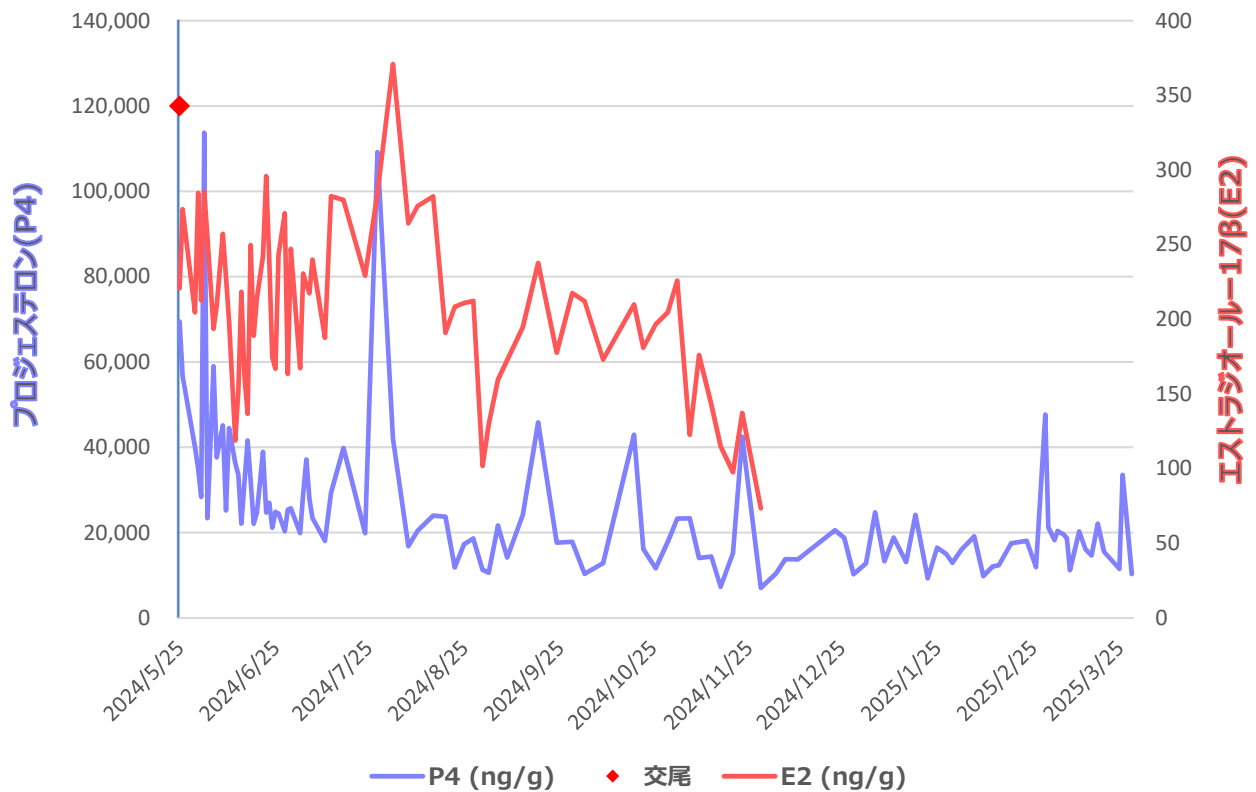


図 8 ミナミアフリカオットセイNo.10ワン
糞中エストラジオール17β (E2) プロジェステロン(P4)動態

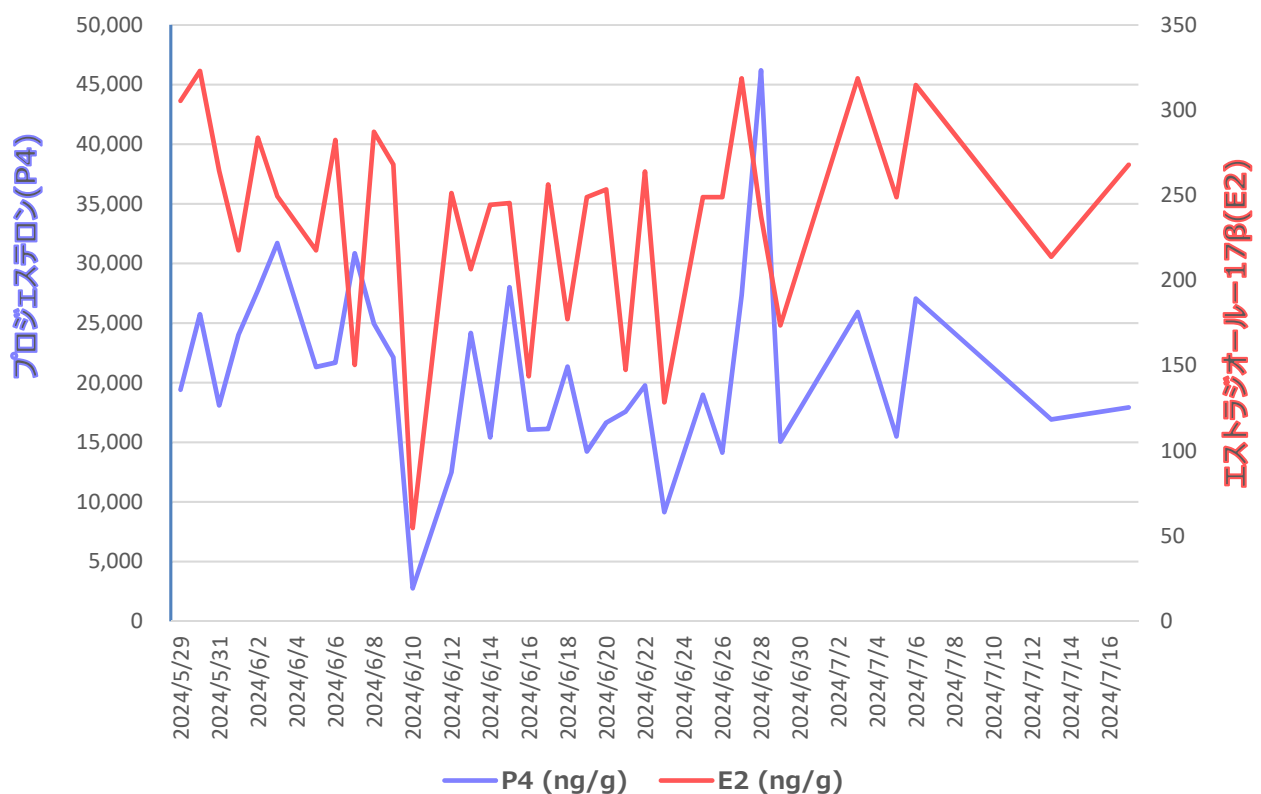


図 9 クロサイNo.2アキリ
糞中プロジェステロン(P4)動態

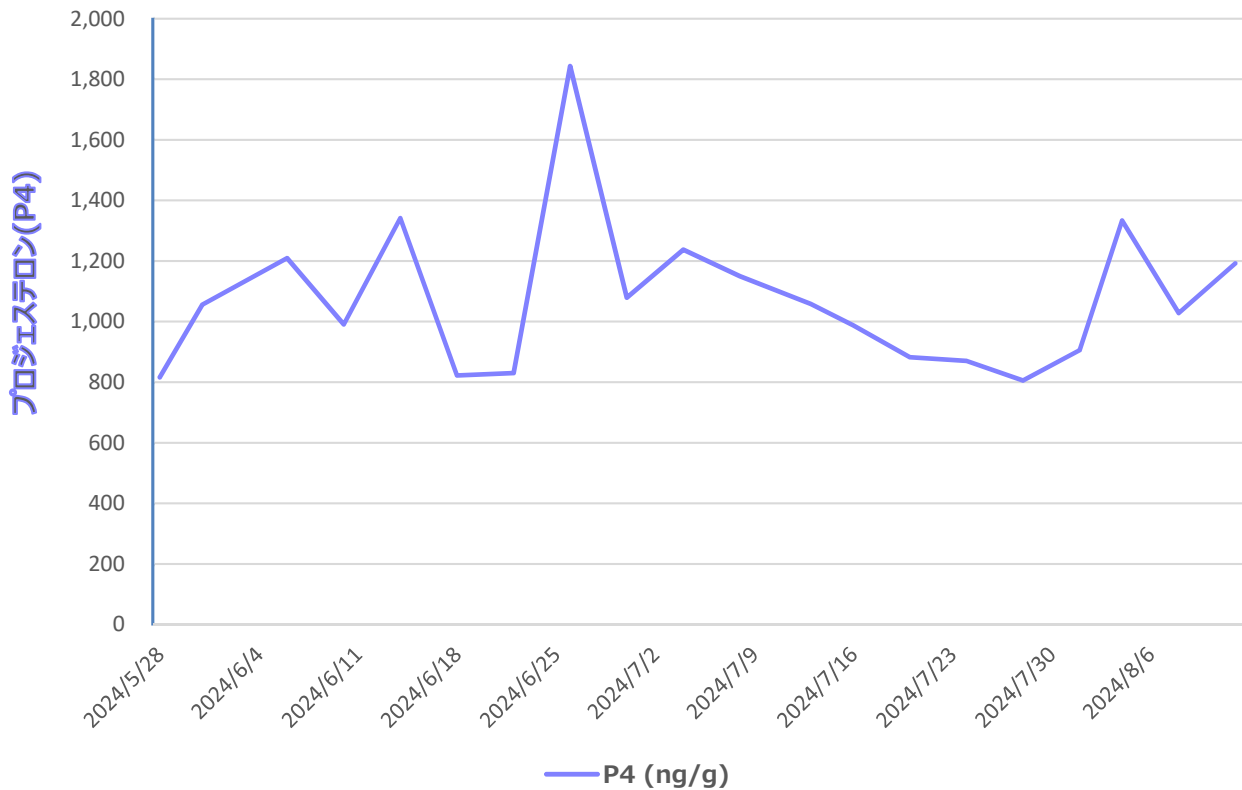


図 10 ヤブイヌNo.62カノン
糞中エストラジオール17 β (E2) プロジェステロン(P4)動態

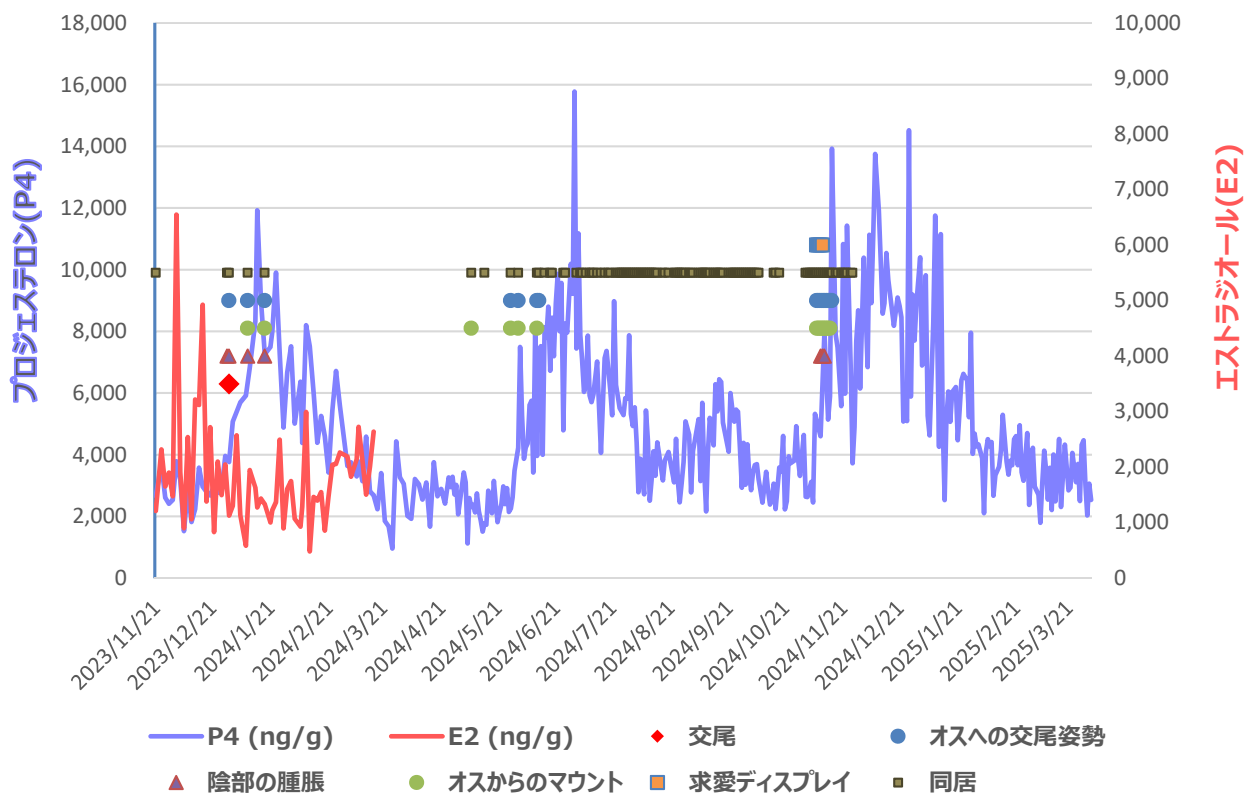


図 11 ボルネオオランウータンNo.7バレンタイン
糞中プロジェステロン(P4) プレグナジオール(PgG)動態

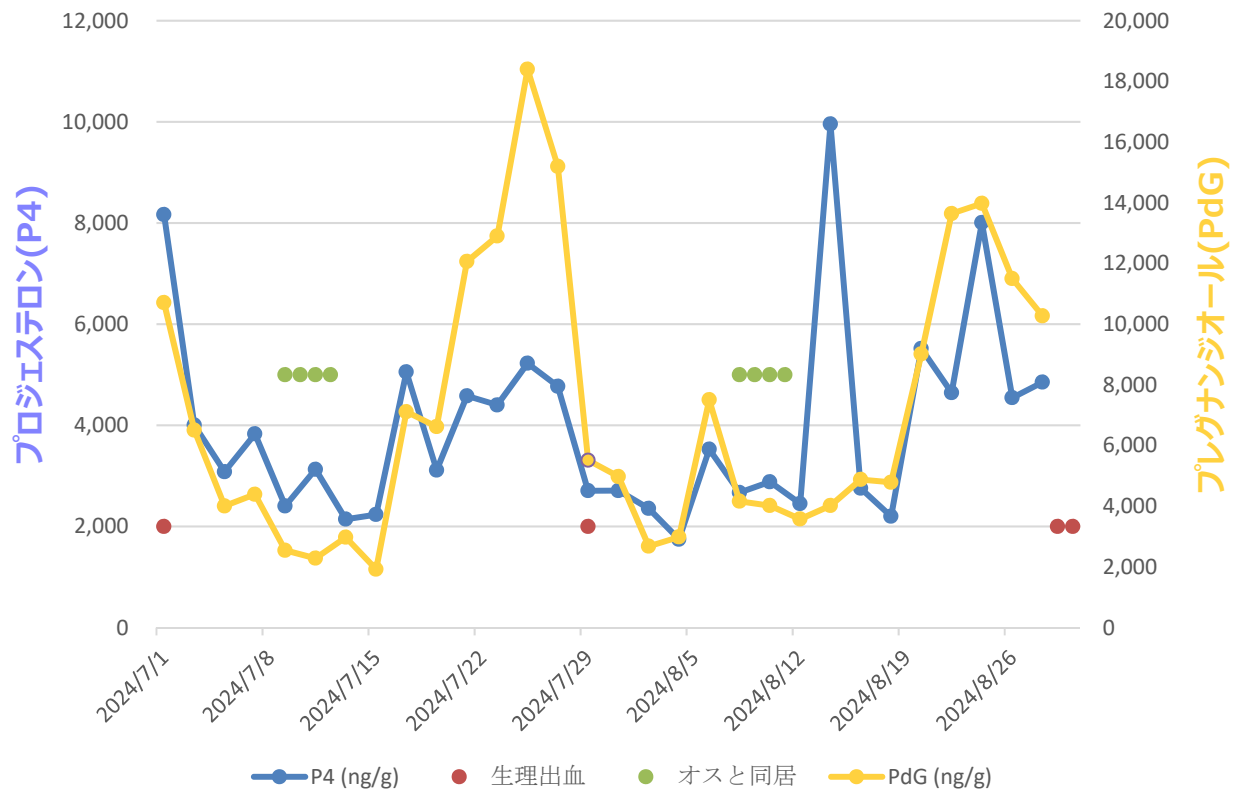


図 12 オオアリクイNo.11アモ
糞中エストラジオール17β (E2) プロジェステロン(P4)動態

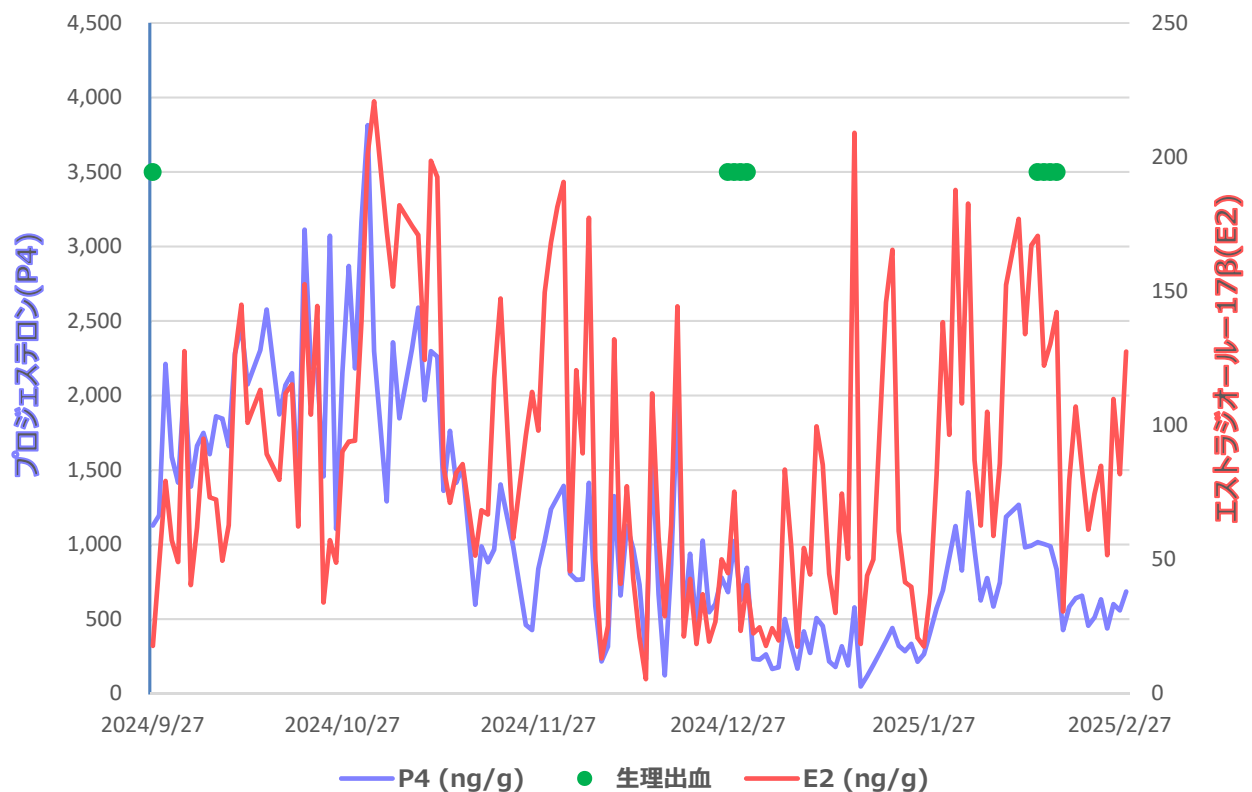


図 13 アラビアオリックスNo.19リズ
糞中プロジェステロン(P4)動態

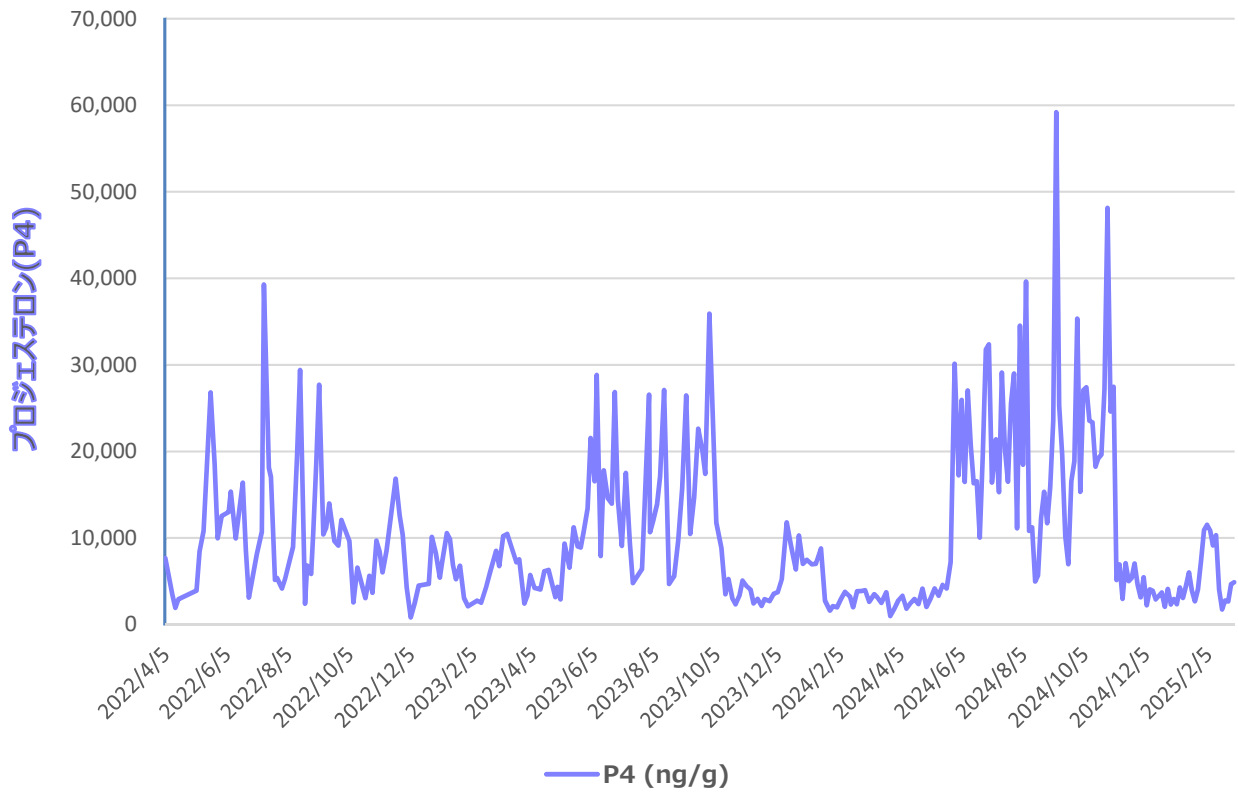


図 14 ニホンカモシカNo.36ツバキ
糞中プロジェステロン(P4)動態

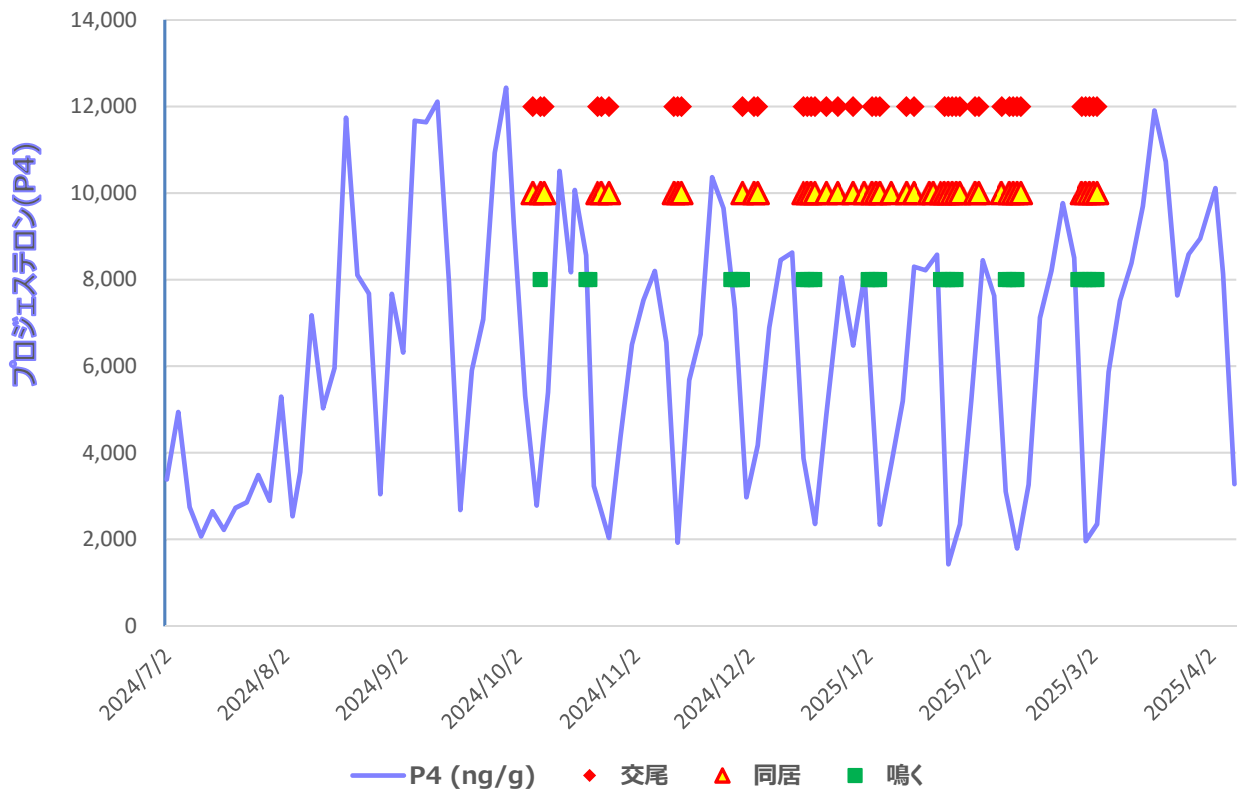
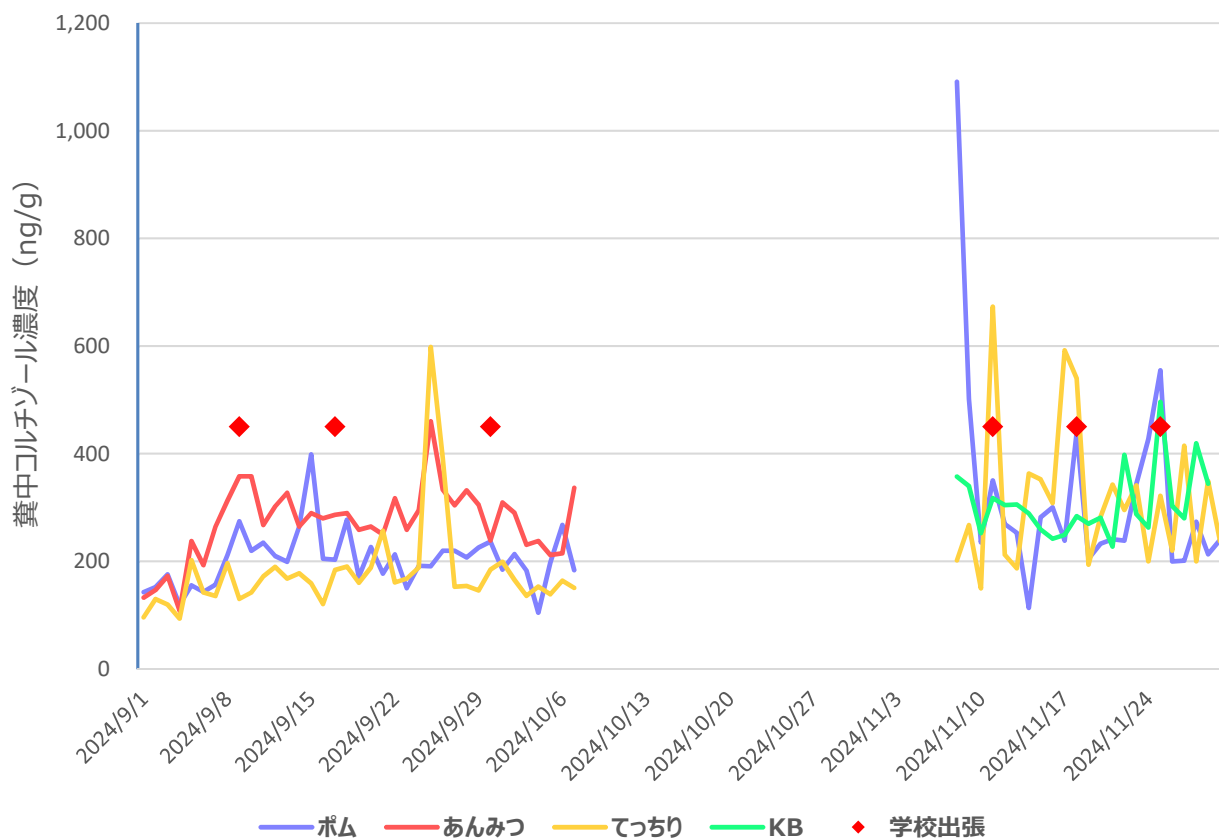


図 15 モルモット4頭の糞中コルチゾール動態



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6年度は、哺乳類5種5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、そのうち3種について精液を凍結保存した（表1）。

一方、卵巣に関しては、哺乳類1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、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（1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4時間経過後に凍結保存を行った。

また、遺伝子保存の一環として、死亡動物の2種2点（哺乳類2種2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55種、卵子3種（ウンピョウ、アrikui、インドガウル）、体組織170種が凍結保存されている。（7年3月末）

表1 令和6年度精子回収状況

種名	回収状況	保存状況
アカアシドックラングール	還流法	無
インドライオン	還流法	無
ミナミコアrikui	還流法	TESTYORK、EYTFC -196℃
フサオネズミカンガルー※	細切法	EYTFC、有袋類用 -196℃
ユーラシアカワウソ※	細切法	TESTYORK -196℃
ニホンライチョウ	用手採精	HS-2 4時間低温保存後凍結保存 -196℃

表2 令和6年度卵巣処理

種名	保存部位	保存状況
フランソワルトン	卵胞表層	有

3 DNA 解析

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、鳥類 9 種 54 個体(受精卵を含む)および哺乳類 1 種 1 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 1 種 12 個体の性別判定を実施した。

横浜市立動物園雌雄判別件数内訳

動物園名	種名	検体数	備考
繁殖センター	ミゾゴイ	6	
	ホオアカトキ	1	
	カンムリシロムク	6	
	カワラヒワ	7	
よこはま動物園	ベトナムキジ	16	受精卵性別判定
	カンムリセイラン	3	受精卵性別判定
	オウギバト	3	
	ベンガルワシミミズク	1	
	カワラヒワ	2	保護動物
	ホッキョクグマ	1	
野毛山動物園	ミゾゴイ	1	保護動物
	ルリゴシボタンインコ	8	

国内他施設との協力事業件数

施設名	種名	検体数	備考
大町山岳博物館	ニホンライチョウ	12	協力事業の一環

(2) クマガイソウのクローン判定

◆目的

希少動物種の保存研究事業として、金沢動物園より提案された研究案件で、金沢動物園内に 5 か所に自生するクマガイソウの遺伝的多様性を考慮した人工授粉の実施に向け、自生地内のクマガイソウ株のクローン判別を実施した。

◆方法

令和 6 年 7 月に 5 つの自生地 (A-1,A-2,A-3,E-1,E-2) から採取されたクマガイソウの葉を -80℃で保管し、DNeasy Plant Mini Kit(QIAGEN)を用いて DNA を抽出した。抽出に当たり、液体窒素下で使い捨てホモジナイザーにより手動でサンプルを粉碎した。サンプリングは各株から葉 1 枚とした。

PCR プライマーは Yamashita et al 2016 に記載されたプライマーの中で検出アレル数の多い 4 種 (Cypj047、Cypj091、Cypj094、Cypj100) を用いた。

PCR 条件は Yamashita et al に従い、蛍光テイルドプライマーにより PCR 産物を蛍光標識した。PCR 産物を ABI310Genetic analyzer により電気泳動し、各株の遺伝子型を解析した。

◆結果

保全優先度の高い自生地 (A-1) については、プライマー 4 種の遺伝子型を判定した。その結果、Cypj091 のみ株間で多型を確認できた。そのため、以降の解析は Cypj091 のみ遺伝子型を判別した。その結果、各自生地内で、複数のクローンが確認された (下表)

表：各株の遺伝子型

自生地内でクローン別に色分け。数字は PCR 産物のサイズ。

サンプル	cypj91	サンプル	cypj91	サンプル	cypj91	サンプル	cypj91	サンプル	cypj91
A-1-1	124 130	A-2-1	124 126	A-3-1	126 130	E-1-1	122 128	E-2-1	126 128
A-1-2	124 130	A-2-2	124 130	A-3-2	122 128	E-1-2	122 128	E-2-2	124 130
A-1-3	124 130	A-2-3	124 124	A-3-3	128 128	E-1-3	126 128	E-2-3	126 128
A-1-4	124 124	A-2-4	124 130	A-3-4	128 128	E-1-4	124 130	E-2-4	122 126
A-1-5	124 124	A-2-5	124 124	A-3-5	128 130	E-1-5	124 130		
A-1-6	124 130	A-2-6	124 130			E-1-6	122 128		
A-1-7	124 130					E-1-7	124 124		
A-1-8	124 130					E-1-8	124 124		
A-1-9	124 130								
A-1-10	124 124								

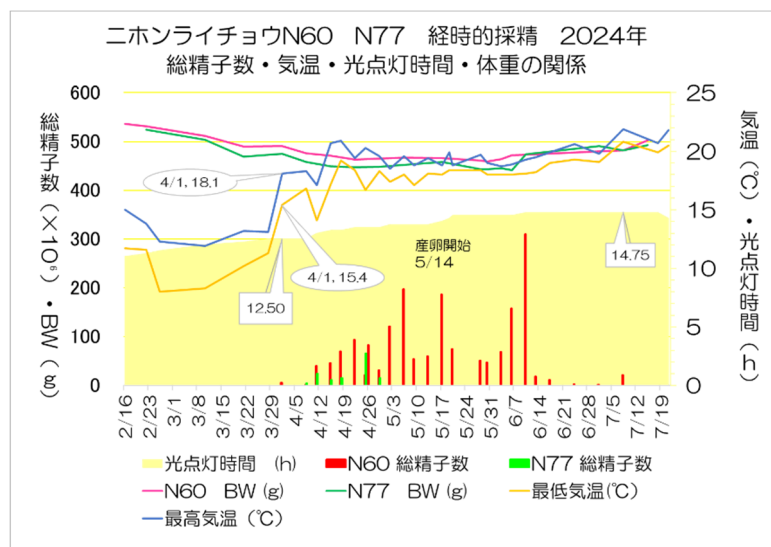
4 令和6年度 繁殖補助技術の開発の取り組みについて

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いる。

I.当センターでは乗鞍岳の野生ライチョウから採精を行うことを想定し、昨年に引き続き、野生個体の採精可能適期（期間）を予測するための飼育個体による経時的採精試験、採精した精液を低温輸送で下山し、凍結保存することをイメージし、精液希釈液の4時間低温保存後の凍結融解試験、さらに融解液による人工授精試験を実施した。

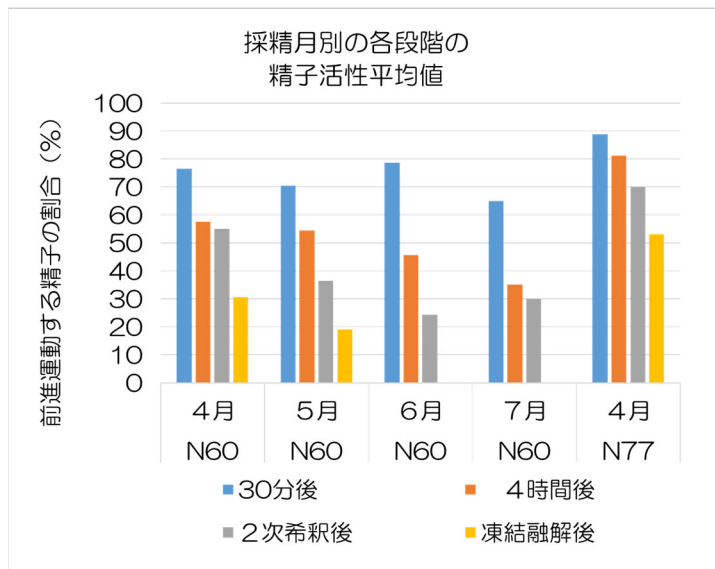
（1）経時的採精試験

飼育下雄2羽からの経時的採精試験を週2回のペースで実施した。採精は、用手マッサージ法にて1回2搾取で採精した精液量を1日量とした。また換羽状況について、写真撮影による記録を2週間に1回程度行った。



（2）精液希釈液の4時間低温保存後の凍結融解試験

経時的採精した精液はHS-2液にて2～3倍希釈し、4時間の低温保存後に耐凍剤としてメチルアセトアミドを最終濃度6または7.5%となるように2次希釈し、すぐにストローに充填後、液体窒素上空4～4.5 cmで30分静置し液体窒素に投下、液体窒素タンクに保存した。人工授精にも用いたため雌の産卵に合わせて、氷水2～4℃中で2～5分間で凍結精液を融解した。なお、N60の5月後半、6月、7月に採精して凍結した分は未融解であり、今回の融解後の精子活性検査結果には含まれていない。



(3) 人工授精

上記試験の融解後精液を用いて、融解後 30 分以内に、平均注入精子数 105×10^6 で N122 に週 2 回、人工授精を深部注入で実施した（5 月 6 日から 5 月 23 日までの合計 7 回）。産卵した 10 卵は雌に抱卵させたが孵化しなかった。抱卵後の卵の割卵検査により初期発生中止卵がいくつか確認できた。初期発生中止の原因ははっきりしないが、原因の一つとして抱卵する卵が多く均等に温められなかった可能性がある。

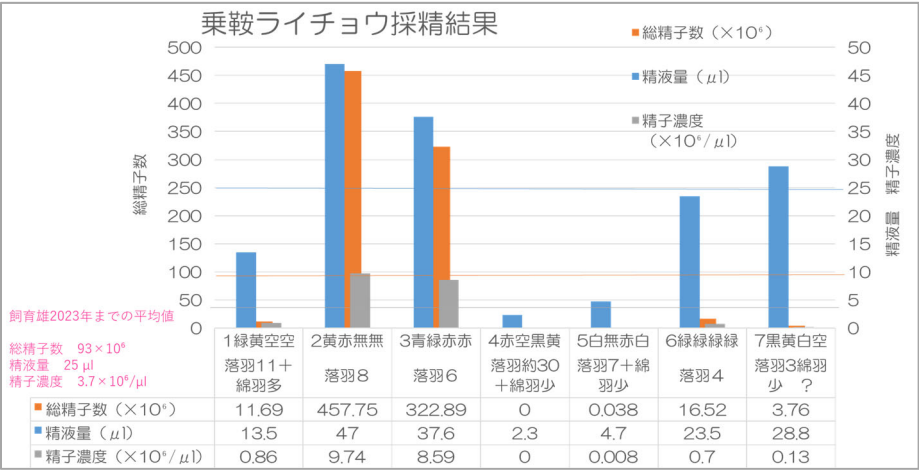
II. 乗鞍岳における野生オスからの採精と人工授精の取り組み

ライチョウの採精は飼育下個体であれば未馴致であっても可能であることが分かっている（昨年度の調査結果）。一方で捕獲や保定されたことのない野生個体からも採精出来るかは未知であり、それを確かめるために今回の野生ライチョウからの人工採精の試みを環境省、恩賜上野動物園、富山市ファミリーパークと共同で 5 月 24 日～26 日に、乗鞍岳の肩の小屋周辺個体からの採精の試みを行った。

捕獲された 7 羽について採精を行ったところ、6 羽から精液は採取できたが精液性状に個体差があった。2 羽目と 3 羽目からはそれぞれ総精子数が 457 百万、322 百万の精液が得られた。一方、腰背部マッサージで多くの羽毛が抜けた 4 羽目からは精子が採れなかった。落羽については、採精者によってもマッサージの圧で落羽の量が変わるため、採精による落羽なのか、換羽による落羽なのか今回の採精結果だけでは判断できない。また、5 羽目以外は縄張り雄であった。

また採れた精液を BPSE 液にて希釈し富山市ファミリーパークに低温輸送し、飼育下雌ライチョウに人工授精したところ、2 羽のヒナが誕生し、繁殖補助技術の開発目的であった飼育下個体群の遺伝的多様性の確保の 1 例目となった。

<採精精液の性状検査結果>



※個体情報は 採精No.・左脚カラーリング・右脚カラーリング
採精マッサージによる落羽の状況、撮影ビデオからの観察記録
脇腹・下尾筒あたりの落羽枚数と綿羽の飛散について。
7羽目はビデオ撮影画像が一部しかないため参考値。

<人工授精した精液の精子数と採精からの経過時間>

雌No.	注入精子検 体 No.	注入精子数 (×10 ⁶)	注入精子中 活性+ (前進運動精子) 精子数 (×10 ⁶)	採精からの経過 時間 時間：分	
T-1801 N45	2-1-2	406.6	121.8	5:49	2 卵初期発 生停止
T-1908 N70	3-1	168.3	0.49	5:40	
T-2011 N105	2-1-1	24.8	2.48	30:04	雑誕生
	3-2	67	23	29:44	雑誕生
	6-2	7.2	0.7	5:07	
T-2005 N99	2-1-1	24.8	2.48	30:14	
	3-2	67	23	29:54	
	6-2	7.2	0.7	5:17	
T-2009 N103	3-2	19.2	3.84	52:22	
	6-2	2	0.2	27:45	

5 大学との共同研究

令和6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6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) 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
マレーバクの身体的成長と体表模様変化の関連に関する研究
- (5) 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6年度は4件の研究発表（口頭発表2件、ポスター発表2件）を行った。
投稿記事1件が出版された。

- 1 令和6年度みどり環境局業務研究・改善事例発表会（口頭）
「乗鞍岳に生息するニホンライチョウからの採精の取り組みについて」
- 2 3園合同公開飼育研究会（口頭）
「乗鞍岳に生息するニホンライチョウからの採精の取り組みについて」
- 3 第7回野生動物保全繁殖研究会大会（ポスター）
「乗鞍岳に生息するニホンライチョウの精液利用を目的とした人工授精技術開発の取り組みについて」
- 4 第72回動物園技術者研究会（ポスター）
「カワラヒワの繁殖技術確立に向けた試験飼育の実績と観察された繁殖行動」
- 5 投稿記事
遺伝 25（1）68-72
横浜市におけるムカシツチガエル保全の取り組み