

平成20～23年度
ニホンザル保護（交雑モニタリング）事業報告書（案）

平成24年12月

千葉県環境生活部自然保護課

はじめに

千葉県環境生活部自然保護課長

目 次

1 調査方法	1
2 結 果	5
3 資 料	1 3

1 調査方法

(1) 検体

使用した検体（1個体1検体）は次のとおり。

- ① サルの捕獲を実施している市町から提供を受けた尾、耳。
- ② 市町が捕獲し、県が採血した血液。
- ③ 県が捕獲・採血した血液。
- ④ 京都大学霊長類研究所が保管していた血液。
- ⑤ NPO法人房総自然博物館から提供を受けた血液。

なお、ほかに由来を特定できなかった2検体がある。

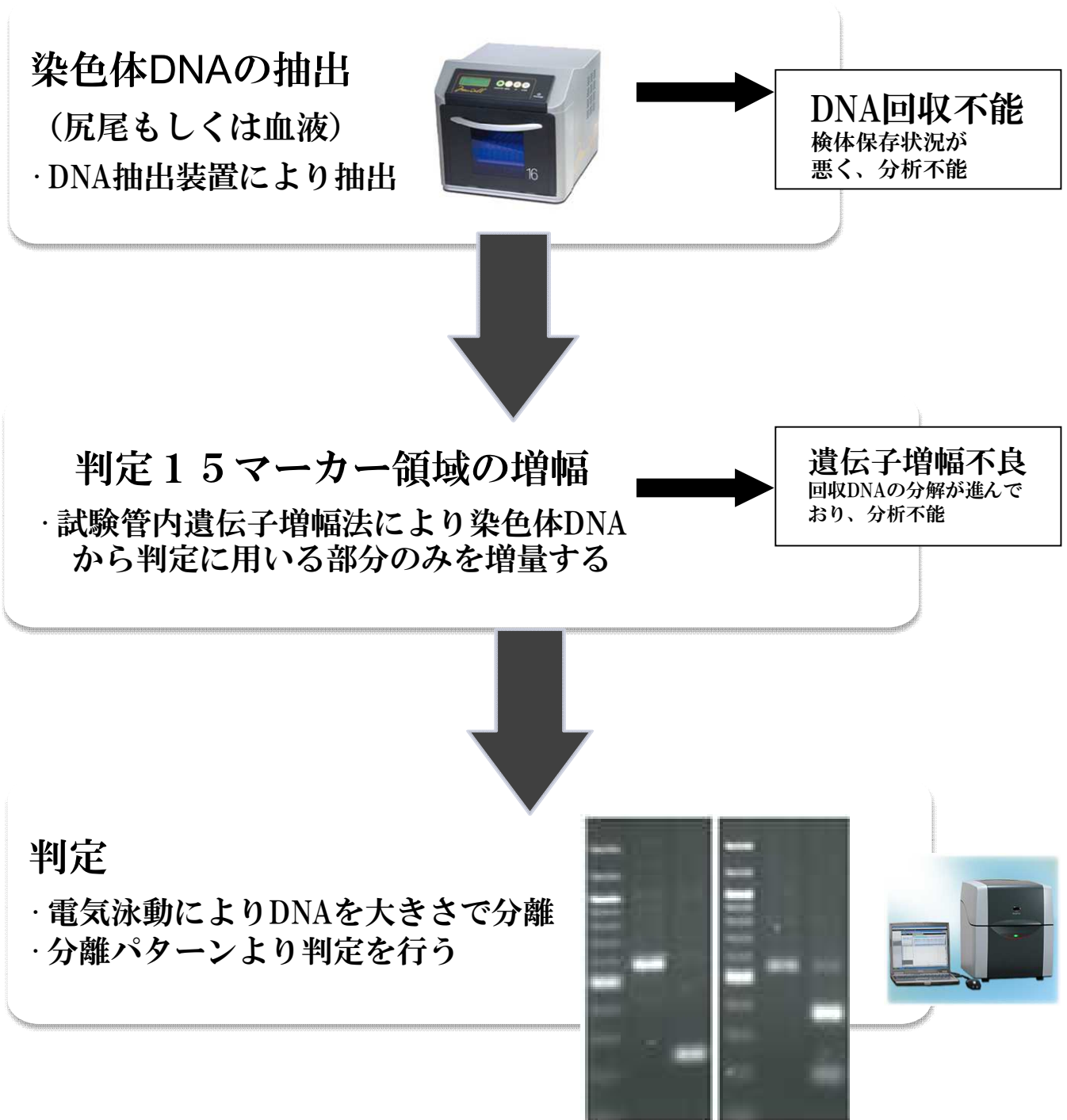
(2) 事業期間

平成20年度から平成23年度までの間、実施した。

なお、検体は平成19年度以前の採取分を含む。

(3) 検査

① 検査の流れ



② 判定マーカー

(公益財団法人) かずさDNA研究所および京都大学霊長類研究所からの提案により、当初のモニタリングでは29マーカーを利用した。

その後、データを蓄積し、千葉県特定鳥獣保護管理計画（ニホンザル）検討会での検討を経て、15のマーカーを選び判定に利用している。

選定した15マーカーは次のとおり。

mul_D03、mul_F20、mul_G01、mul_N15、mul_A12、mul_F01、mul_H04、mul_B01、
mul_B13、mul_A18、mul_F03、mul_L08、mul_J20、mul_H06、fus_A01

なお、29マーカーは房総半島丘陵地域のニホンザル21個体と、他の遺伝分析から純粋なアカゲザルと推定されていた房総半島先端地域に定着した外来種6個体の遺伝子を比較し選び出したものである。

アカゲザルはニホンザルに近縁で、種内の遺伝子多様性が高いため、種を判定する際に悉無律（全か無か）的に利用できるマーカーが少ないという難点があることがわかっている。

③ 判定基準

陰性と陽性の判別には2種類のサルの種内個体差の影響や実験誤差の影響を加味する必要があると判断し、千葉県特定鳥獣保護管理計画（ニホンザル）検討会での検討を経て、15マーカーの内、3マーカー以上で陽性反応を示した個体をニホンザルとアカゲザルの交雑個体（アカゲザルを含む）とした。

④ 分析方法の名称及び特徴

本事業により採用したニホンザルと交雑個体（アカゲザルを含む）の判定方法を「千葉 H20-M15DNA 分析法」と名付ける。

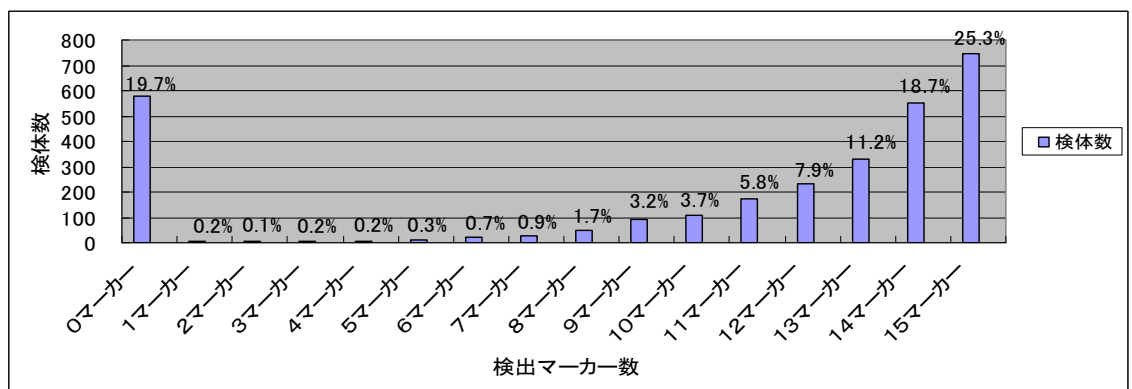
特徴

- ・外見で判断が困難な個体の交雑判定に役立つ。
- ・交雑度の定量が可能で、交雑の拡大範囲だけでなく程度が評価できる。

- ・検査に時間を要する。
- ・検査に費用がかかるため、モニタリングに予算確保が必要になる。
- ・検体の保存状態に起因するDNAの劣化により、すべてのマーカーを検査できないことがある。

このことは、陽性マーカー数及び未抽出マーカー数により、交雑と判定されなかった検体の中に、交雑個体が含まれている可能性が否定できないことを意味する。

(参考) 本事業の場合、マーカーの抽出数の割合は次のとおり。



また、交雑と判定されなかった2, 3 2 5 検体の内、1 3 9 検体は交雑個体である可能性を否定できない。

内訳)

陽性マーカー数2かつ未抽出マーカー数1以上：5 検体(♂4、♀1)

陽性マーカー数1かつ未抽出マーカー数2以上：1 2 検体(♂3、♀9)

陽性マーカー数0かつ未抽出マーカー数3以上：1 2 2 検体(♂78、♀44)

- ・交雑が何世代にも及ぶと、アカゲザル由来のマーカーの割合が低い交雑個体が生じるため、判定基準の有効性が低下する。

1 5 マーカーの内、3 マーカー以上を交雑個体とする基準は、陽性率 2 0 % 以上に相当する。理論的には、交雑 1 代目が一方の種と戻し交雑を 2 代繰り返すと (陽性率 1 2 . 5 % に相当) 交雑が判定できなくなる。

(4) 委託先

公益財団法人 かずさDNA研究所に委託した。

2 結果

(1) 交雑結果

千葉H20-M15DNA分析法による判定結果を表1に示す。

なお、同一検体で複数回検査結果提出がある場合、直近の検査結果を採用した。

分析可能検体（抽出マーカー1以上）2,363検体（頭）の内、1.6%の38検体（頭）の交雑個体が見つかった。

全分析可能検体数（抽出マーカー1以上）に占める交雑個体数の割合はオス1.7%、メス1.5%であった。

ニホンザル生息域の9市町の内、勝浦市、大多喜町、鴨川市、鋸南町、木更津市、君津市の6市町で交雑オス及び交雑メスが確認され、メスザルは生まれた群れを出ないことから、これらの交雑メスは捕獲場所を行動域とする群れで生まれたものと考えられる。

なお、交雑率は各市町間でばらつきがあるが、市町別で検体数に差があることや、被害地での集中捕獲など選択的な捕獲がなされているなどから、必ずしも本県ニホンザル個体群全体の交雑率を反映しているとは言えない可能性がある。

表1 千葉H20-M15判定法による市町村別交雑結果累計（ニホンザル生息域内）

捕獲場所	総検体数	分析不能検体	分析可能検体				内、交雑個体						
			検体数	♂	♀	性別不明	♂	♀	計	交雑率(♂)	交雑率(♀)	交雑率(全体)	
市原市	30	2	28	11	17	0	0	0	0	0	0	0	0
勝浦市	240	39	201	101	85	15	3	4	7	3.0%	4.6%	3.5%	
大多喜町	152	21	131	65	66	0	3	1	4	4.6%	1.5%	3.1%	
鴨川市	1,425	287	1,138	677	461	0	8	5	13	1.2%	1.1%	1.1%	
南房総市 (旧富山町)	17	0	17	13	4	0	0	0	0	0	0	0	
鋸南町	322	42	280	152	128	0	7	1	8	4.6%	0.8%	2.9%	
木更津市	14	4	10	4	6	0	1	1	2	25.0%	16.7%	20.0%	
君津市	597	112	485	269	199	17	1	2	3	0.4%	1.0%	0.6%	
富津市	143	72	71	47	22	2	0	0	0	0	0	0	
不明	1	0	1	0	1	0	0	1	1	0	100.0%	33.3%	
計	2,941	579	2,362	1,339	989	34	23	15	38	1.7%	1.5%	1.6%	

注) 市町別で検体数にばらつきがあることや、被害地での集中捕獲など選択的な捕獲がなされているなど、本県ニホンザル個体群全体の交雑率を反映していない可能性がある。

また、千葉H20-M15DNA分析法による年度別交雑個体一覧を表2に、交雑オスの捕獲位置を図1に、交雑メスの捕獲位置を図2に示す。

交雑メスが見つかったことから、アカゲザル生息域からアカゲザルオス及び交雑オスが流入しなくとも、ニホンザル生息域内で交雑が再生産される段階に達している可能性が高い。

なお、表2のmtDNAは検査個体の母系がニホンザル由来（ニホンザル生息域生まれ）かアカゲザル由来（アカゲザル生息域生まれ）かを、検査結果の分母は抽出できたマーカー数、分子はアカゲザルと識別されたマーカー数を示す。

表2-1 H20-M15判定法による年度別交雑個体一覧表（ニホンザル生息域内）

No	捕獲年度	捕獲市町	捕獲場所	捕獲日	性別	尾長(cm)	体重(kg)	mtDNA	検査結果
1	H19	鋸南町	大六	H19.12.20	♂		1	ニホンザル	3/15
2	H19	鋸南町	大六	H20.1.25	♂		6	アカゲザル	13/15
3	H19	鋸南町	大六	H20.2.1	♂		6	アカゲザル	12/15
4	H19	鋸南町	竜島	H20.2.20	♂		5	アカゲザル	7/12
5	H20	勝浦市	上植野	H20.7.17	♀	4.8	7.5	未調査	7/15
6	H20	勝浦市	向小羽戸	H20.12.20	♀		8	未調査	3/13
7	H20	鴨川市	G2	2008/6/14	♂		3.5	未調査	3/13
8	H20	鴨川市	A2	H20.12.24	♀		3	未調査	3/15
9	H20	鋸南町	横根	H20.8.5	♂		23	ニホンザル	4/14
10	H20	鋸南町	大六	H20.12.2	♂		2	未調査	3/14
11	H20	君津市	糸川	H20.9.6	♀		4	ニホンザル	6/14
12	H21	勝浦市	新官	H21.7.24	♀	9	5.5	ニホンザル	3/14
13	H21	鴨川市	G7	H22.1.17	♂		6	アカゲザル	9/15
14	H21	鴨川市	G7	H22.1.17	♂		5.5	ニホンザル	3/14
15	H21	鴨川市	G7	H22.1.18	♂		4	ニホンザル	3/12
16	H21	鋸南町	大六	H21.11.2	♂		5	ニホンザル	8/15
17	H22	勝浦市	浜行川 U1	H22.6.6	♀		5.0	ニホンザル	3/14
18	H22	勝浦市	沢倉 U5	H22.7.24	♂		7.0	ニホンザル	3/14
19	H22	勝浦市	沢倉 U5	H22.7.24	♂		6.0	ニホンザル	5/14
20	H22	勝浦市	上野 U2	H22.11.24	♂		8.0	ニホンザル	3/13
21	H22	大多喜町	小田代	H22.7.20	♀		5	ニホンザル	3/14
22	H22	鴨川市	G1	H22.6.22	♀		3	ニホンザル	3/11
23	H22	鴨川市	G9	H23.1.4	♀		5	ニホンザル	5/13
24	H22	鋸南町	大帷子	22.08.04	♀		8	ニホンザル	8/14

表 2 - 2 H20-M15 判定法による交雑個体一覧表 (ニホンザル生息域内)

No	捕獲年度	捕獲市町	捕獲場所 (注 2)	捕獲日	性別	尾長 (cm)	体重 (kg)	mtDNA	検査結果
25	H22	木更津市	茅野七曲	H22. 5. 10	♂		4. 9	ニホンザル	7/15
26	H22	君津市	小糸大谷(西谷)	H22. 8. 4	♀		4. 5	ニホンザル	4/14
27	H22	君津市	東猪原	H22. 10. 23	♂		2. 0	ニホンザル	3/11
28	H23	大多喜町	平沢	H23. 11. 3	♂		10	ニホンザル	4/14
29	H23	大多喜町	田代	H23. 11. 14	♂		10	ニホンザル	3/15
30	H23	大多喜町	平沢	H23. 11. 16	♂		15	アカゲザル	8/18
31	H23	鴨川市	A 1	H23. 5. 23	♂		7	ニホンザル	3/15
32	H23	鴨川市	A 2	H23. 6. 27	♂		9	ニホンザル	3/15
33	H23	鴨川市	A 1	H23. 7. 3	♀		0. 2	ニホンザル	3/15
34	H23	鴨川市	G 9	H23. 8. 19	♀		3	ニホンザル	4/14
35	H23	鴨川市	A 5	H23. 10. 15	♂		3. 5	ニホンザル	3/9
36	H23	鴨川市	G 3	H24. 1. 27	♂		10	ニホンザル	3/14
37	H23	木更津市	七曲	H23. 12. 13	♀		4	ニホンザル	4/14
38	H23	不明 (注 1)	七曲	H24. 1. 28	♀		4	ニホンザル	5/14

注 1 No 28 の捕獲市町は勝浦市と記載されていたが、勝浦市の野生猿鹿保護管理事業実績報告書に該当個体がなく、捕獲場所から木更津市で捕獲された個体の可能性があるが確証がないため捕獲市町不明とした。

注 2 「アルファベット+数字」は、シカ保護管理ユニット。

※ 体重は計測機により計測しているか否かは不明。

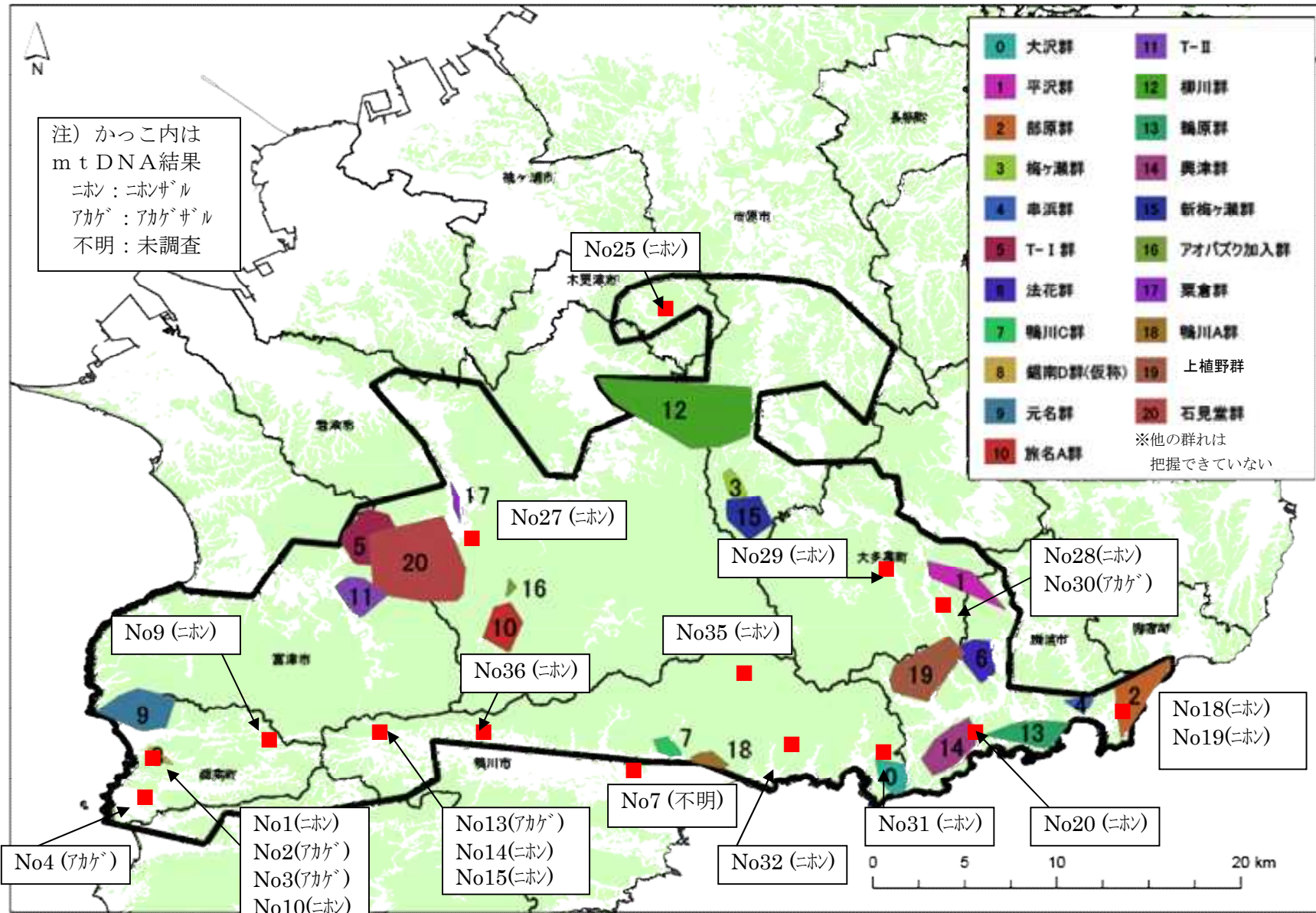


図1 交雑オスの捕獲位置

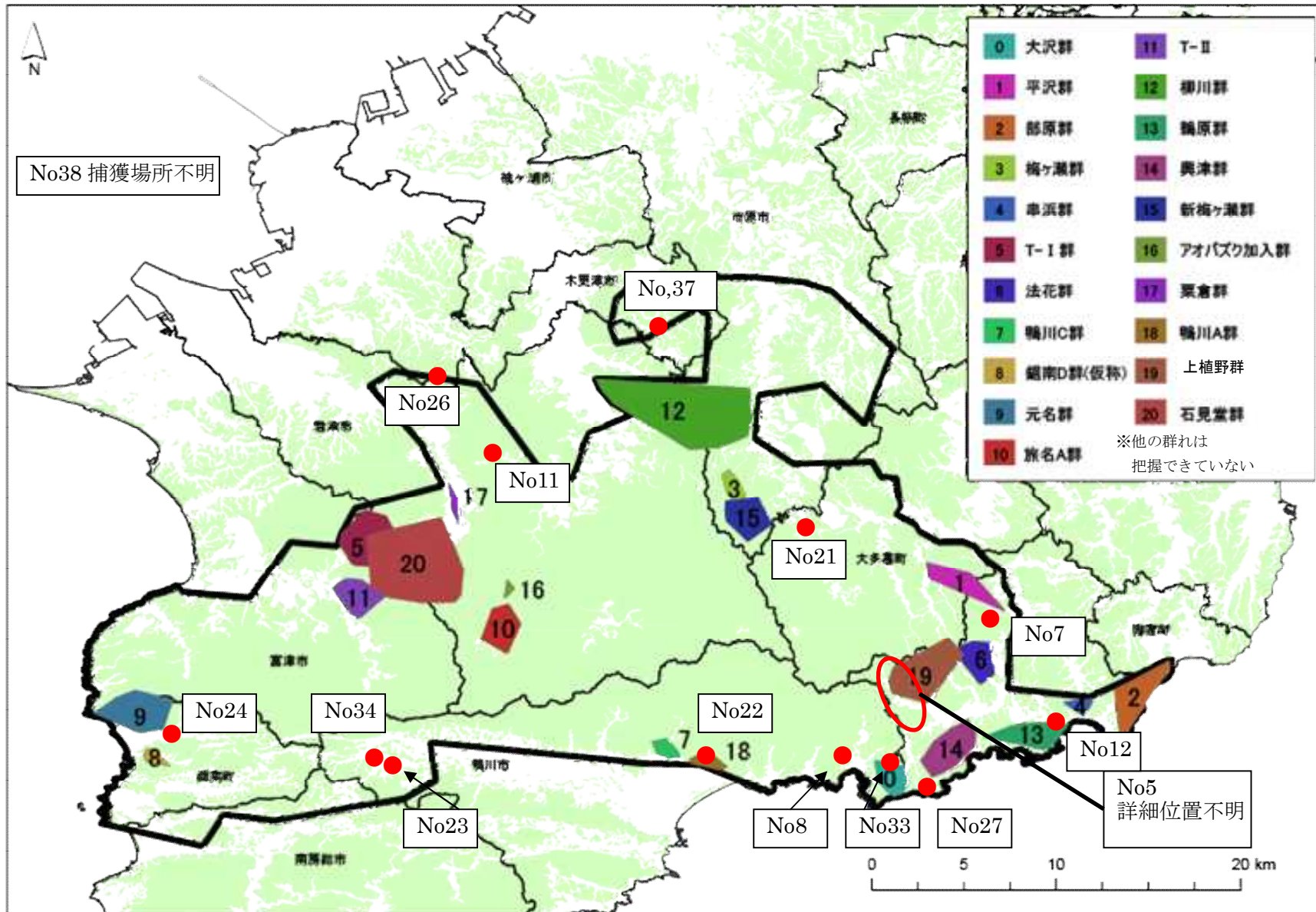


図2 交雑メスの捕獲位置

(2) 交雑率の時間変化

捕獲年度別交雑率を表3に、捕獲年度、市町別分析可能検体数を表4に示す。
参考に、表2を市町別に組み替えた表5を付す。

交雑オスは平成19年度以降、交雑メスは平成20年度以降に確認された。

また、交雑メスの交雑率の変化は、平成20年度2.5%、平成21年度0.5%、平成22年度2.0%、平成23年度2.1%であり、年々交雑率が高くなっている状況ではなかった(表3)。

ただし、同一市町でも年度ごとに分析可能検体数にばらつきがあることから(表4)、必ずしも年度別の交雑率の実態を表していない可能性がある。

表3 捕獲年度別交雑率

捕獲年度	分析可能検体				内、交雑個体					
	検体数	♂	♀	性別不明	♂	♀	計	交雑率(♂)	交雑率(♀)	交雑率(全体)
H8～H18年度	106	61	45	0	0	0	0	0.0%	0.0%	0.0%
H19年度	179	96	83	0	4	0	4	4.1%	0.0%	2.2%
H20年度	390	225	161	4	3	4	7	1.3%	2.5%	1.8%
H21年度	479	262	213	4	4	1	5	1.5%	0.5%	1.0%
H22年度	750	434	295	21	5	6	11	1.2%	2.0%	1.5%
H23年度	458	260	191	7	7	4	11	2.7%	2.1%	2.4%
不明	1	0	1	0	0	0	0	0.0%	0.0%	0.0%
計	2,363	1,338	989	36	23	15	38	1.7%	1.5%	1.6%

表4 捕獲年度、市町別分析可能検体数

	市原市	勝浦市	大多喜町	鴨川市	南房総市	鋸南町	木更津市	君津市	富津市	不明	合計
H8～H18年度	4	0	0	0	15	26	3	26	32	0	106
H19年度	2	0	0	31	0	18	0	128	0	0	179
H20年度	0	24	0	206	0	47	1	107	5	0	390
H21年度	18	10	27	263	2	63	0	71	25	0	479
H22年度	1	128	95	334	0	74	4	106	6	2	750
H23年度	3	38	9	304	0	52	2	47	2	1	458
不明	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
計	28	201	131	1,138	17	280	10	485	70	3	2,363

表5-1 千葉H20-M15判定法による市町別、年度別交雑個体一覧表
(ニホンザル生息域内)

No	捕獲市町	捕獲年度	捕獲場所	捕獲日	性別	尾長(cm)	体重(kg)	mtDNA	検査結果
5	勝浦市	H20	上植野	H20. 7. 17	♀	4. 8	7. 5	未調査	7/15
6		H20	向小羽戸	H20. 12. 20	♀		8	未調査	3/13
12		H21	新官	H21. 7. 24	♀	9	5. 5	ニホンザル	3/14
17		H22	浜行川 U1	H22. 6. 6	♀		5. 0	ニホンザル	3/14
18		H22	沢倉 U5	H22. 7. 24	♂		7. 0	ニホンザル	3/14
19		H22	沢倉 U5	H22. 7. 24	♂		6. 0	ニホンザル	5/14
20		H22	上野 U2	H22. 11. 24	♂		8. 0	ニホンザル	3/13
21	大多喜町	H22	小田代	H22. 7. 20	♀		5	ニホンザル	3/14
28		H23	平沢	H23. 11. 3	♂		10	ニホンザル	4/14
29		H23	田代	H23. 11. 14	♂		10	ニホンザル	3/15
30		H23	平沢	H23. 11. 16	♂		15	アカゲザル	8/18
7	鴨川市	H20	G 2	2008/6/14	♂		3. 5	未調査	3/13
8		H20	A 2	H20. 12. 24	♀		3	未調査	3/15
13		H21	G 7	H22. 1. 17	♂		6	アカゲザル	9/15
14		H21	G 7	H22. 1. 17	♂		5. 5	ニホンザル	3/14
15		H21	G 7	H22. 1. 18	♂		4	ニホンザル	3/12
22		H22	G 1	H22. 6. 22	♀		3	ニホンザル	3/11
23		H22	G 9	H23. 1. 4	♀		5	ニホンザル	5/13
31		H23	A 1	H23. 5. 23	♂		7	ニホンザル	3/15
32		H23	A 2	H23. 6. 27	♂		9	ニホンザル	3/15
33		H23	A 1	H23. 7. 3	♀		0. 2	ニホンザル	3/15
34		H23	G 9	H23. 8. 19	♀		3	ニホンザル	4/14
35		H23	A 5	H23. 10. 15	♂		3. 5	ニホンザル	3/9
36		H23	G 3	H24. 1. 27	♂		10	ニホンザル	3/14
1	鋸南町	H19	大六	H19. 12. 20	♂		1	ニホンザル	3/15
2		H19	大六	H20. 1. 25	♂		6	アカゲザル	13/15
3		H19	大六	H20. 2. 1	♂		6	アカゲザル	12/15
4		H19	竜島	H20. 2. 20	♂		5	アカゲザル	7/12
9		H20	横根	H20. 8. 5	♂		23	ニホンザル	4/14
10		H20	大六	H20. 12. 2	♂		2	未調査	3/14
16		H21	大六	H21. 11. 2	♂		5	ニホンザル	8/15
24		H22	大帷子	22. 08. 04	♀		8	ニホンザル	8/14

表5-2 千葉 H20-M15 判定法による市町別、年度別交雑個体一覧表
(ニホンザル生息域内)

No	捕獲市町	捕獲年度	捕獲場所	捕獲日	性別	尾長(cm)	体重(kg)	mtDNA	検査結果
25	木更津市	H22	茅野七曲	H22. 5. 10	♂		4.9	ニホンザル	7/15
37		H23	七曲	H23. 12. 13	♀		4	ニホンザル	4/14
11	君津市	H20	糸川	H20. 9. 6	♀		4	ニホンザル	6/14
26		H22	小糸大谷(西谷)	H22. 8. 4	♀		4.5	ニホンザル	4/14
27		H22	東猪原	H22. 10. 23	♂		2.0	ニホンザル	3/11
38	不明 (注1)	H23	七曲	H24. 1. 28	♀		4	ニホンザル	5/14

検査方法

かずさ DNA 研究所により僅かな構造変化をもつ未知 DNA を選択的にクローニングできる方法 (IGCR 法: ゲル内 DNA 競合 再結合法) を利用し、アカゲザルとニホンザルを判別する検査法が確立できた。

具体的な検査方法は次のとおり。

1. ゲノム DNA の抽出

自動核酸抽出装置 Maxwell16(プロメガ)を使用して検体からのゲノム DNA 抽出を行う。

2. 判定マーカーの増幅準備

Quant-it dsDNA HS Assay Kit(ライフテクノロジーズ)にて検査に必要なゲノム DNA が得られたかを確認する。必要に応じてゲノム DNA 増幅試薬 Genomiphi(GE ヘルスケア)を用いてゲノム DNA の増幅を行う。

3. 判定マーカーの増幅

15 マーカーに対応する各 primer 対を用いて PCR 反応を行う。PCR 反応には Multiplex PCR Assay Kit(タカラバイオ)もしくはそれに相当する反応系を用いる。15 マーカーのうち 12 マーカーについては、PCR 産物を制限酵素 BfuCI(ニュー・イングランド・バイオラボ)を用いて切断処理を行う。

4. 判定マーカーの判定

DNA/RNA 分析用マイクロチップ電気泳動装置 MultiNA(島津製作所)を使用して、判定マーカーの電気泳動を行う。ニホンザルとアカゲザルでは判定マーカーの電気泳動像が異なる事を利用し、いずれの電気泳動像が得られたかを識別する。