

環境研究総合推進費 終了研究成果報告書

公募区分： 環境問題対応型研究（一般課題）

研究予定期間： 令和3（2021）年度 ～ 令和5（2023）年度

課題番号： 【4-2101】

体系的番号： （J P M E E R F 2 0 2 1 4 0 0 1）

研究課題： 「生殖細胞を活用した絶滅危惧野生動物の生息域外保全」

Research Title： Ex situ conservation of endangered wildlife using germ cells

研究代表者： 村山 美穂

研究代表機関： 国立大学法人京都大学

研究分担機関： 京都市動物園、国立大学法人東海国立大学機構岐阜大学、国立研究開発法人国立環境研究所、国立大学法人岩手大学、NPO法人どうぶつたちの病院沖縄

研究領域： 自然共生領域

キーワード： ツシマヤマネコ、ヤンバルクイナ、遺伝的多様性、ホルモン、生殖細胞保存

令和6（2024）年5月

目次

環境研究総合推進費 終了研究成果報告書	1
I. 成果の概要	3
1. はじめに（研究背景等）	5
2. 研究開発目的	5
3. 研究目標	5
4. 研究開発内容	6
5. 研究成果	8
5-1. 成果の概要	8
5-2. 研究目標の達成状況	9
5-3. 研究成果の学術的意義と環境政策等への貢献	12
6. 研究成果の発表状況の概要	15
6-1. 成果の件数	15
6-2. 主な査読付き論文等の主要な成果	15
7. 国際共同研究等の状況	16
8. 研究者略歴	17
II. 成果の詳細	18
II-1 サブテーマ1「絶滅危惧野生動物の繁殖に関わる基盤情報の整備」	18
[サブテーマ1要旨]	18
1. サブテーマ1研究開発目的	18
2. サブテーマ1研究目標	18
3. サブテーマ1研究開発内容	19
4. サブテーマ1結果及び考察	19
5. サブテーマ1研究目標の達成状況	27
II-2 サブテーマ2「絶滅危惧野生動物の生殖細胞の活用と人工繁殖」	27
[サブテーマ2要旨]	33
1. サブテーマ2研究開発目的	27
2. サブテーマ2研究目標	27
3. サブテーマ2研究開発内容	28
4. サブテーマ2結果及び考察	28
5. サブテーマ2研究目標の達成状況	32
III. 研究成果の発表状況の詳細	40
(1) 成果の件数	40
(2) 誌上発表	40
(3) 口頭発表	35
(4) 知的財産権	39
(5) 「国民との科学・技術対話」の実施	39
(6) マスメディア等への公表・報道等	40
(7) 研究成果による受賞	42
(8) その他の成果発表	42

I. 成果の概要

<課題情報>

公募区分：	環境問題対応型研究（一般課題）
研究実施期間：	令和3（2021）年度～令和5（2023）年度
課題番号：	【4-2101】
研究課題：	「生殖細胞を活用した絶滅危惧野生動物の生息域外保全」
研究代表者：	村山美穂（京都大学、教授）
重点課題（主）：	【重点課題⑬】生物多様性の保全に資する科学的知見の充実や対策手法の技術開発に向けた研究
重点課題（副）：	【重点課題⑭】生態系サービスの持続的な利用やシステム解明に関する研究・技術開発
行政要請研究テーマ（行政ニーズ）：	（4－2）絶滅危惧野生動物の生息域外保全における飼育下保護増殖戦略策定のための分野横断的研究
研究領域：	自然共生領域

<キーワード>

ツシマヤマネコ
ヤンバルクイナ
遺伝的多様性
ホルモン
生殖細胞保存

<研究体制>

サブテーマ1「絶滅危惧野生動物の繁殖に関わる基盤情報の整備」

<サブテーマ1リーダー及び研究分担者>

機関名	部署名	役職名	氏名	参画期間
京都大学	野生動物研究センター	教授	村山美穂	
京都大学	アジア・アフリカ地域研究研究科	准教授	木下こづえ	
京都市動物園	生き物・学び・研究センター	研究教育係長	伊藤英之	
岐阜大学	応用生物科学部	教授	楠田哲士	
国立環境研究所	生物多様性領域	主幹研究員	大沼学	2021年度～研究協力者 2023年度～研究

				分担者
--	--	--	--	-----

サブテーマ2「絶滅危惧野生動物の生殖細胞の活用と人工繁殖」

＜サブテーマ2リーダー及び研究分担者＞

機関名	部署名	役職名	氏名	参画期間
岩手大学	理工学部	准教授	金子武人	
京都大学	野生動物研究センター	特定准教授	藤原摩耶子	
NPO法人どうぶつたちの病院沖縄		理事長	長嶺 隆	

＜サブテーマ2研究協力者＞

機関名	部署名	役職名	氏名
NPO法人どうぶつたちの病院沖縄		獣医師	中谷裕美子

＜研究経費（間接経費を含む）＞

年度	直接経費	間接経費	経費合計
2021	27,630千円	8,289千円	35,919千円
2022	27,630千円	8,289千円	35,919千円
2023	27,630千円	8,289千円	35,919千円
合計	82,890千円	24,867千円	107,757千円

1. はじめに（研究背景等）

日本は先進国の中でも生物多様性に恵まれ、特に固有種が多い。その中で絶滅の危惧される種は国内希少野生動植物種に指定され、さらに特段の対策が必要な種では保護増殖事業計画が策定されている。その計画の一環で野生復帰を目指した飼育下繁殖が行われているが、自然繁殖が順調でない種や、飼育集団の遺伝的多様性の維持が課題となっている種がある。繁殖に関連する機能遺伝子の個体差や多様性も種の存続に大きく影響するが、その実態は不明である。また個体ごとのストレスや繁殖周期の指標となるホルモン動態は、繁殖の成否を左右するため正確に把握する必要がある。さらに将来の安定した遺伝資源確保のためにも、生殖細胞や受精卵の保存技術も検討する必要がある。私たちはこれまでに「保全生物学コンソーシアム」を形成して共同で研究を行ってきた。また科学研究費補助金基盤A「ゲノム・細胞情報に基づく国内希少動物の繁殖促進戦略」（令和2-4年度）でもニホンイヌワシなどを対象に、ラボワークによる保全研究を進めてきた。京都大学野生動物研究センターや国立環境研究所で築いた「野生動物遺伝資源データベース」の試料と情報を本研究にも活用する。

2. 研究開発目的

本研究では、上記の問題解決のため生殖細胞の活用範囲を広げる。繁殖に関わるゲノムや内分泌情報を基盤として、保存生殖細胞を用いた人工授精や受精卵作製といった繁殖補助技術を開発する。哺乳類はツシマヤマネコ、鳥類はヤンバルクイナを主な対象とする。ツシマヤマネコ（絶滅危惧IA類、環境省第4次レッドリスト）の飼育下繁殖は研究開始前3年間で6頭出生4頭生育と少なかった。野生個体数の減少が懸念される中、野生個体を飼育下に移動させて繁殖を促すことの判断も難しい場合がある。そのため将来的には、個体を移動させることなく生殖細胞の移動のみで飼育下繁殖を成功に導く技術の確立が求められる。ヤンバルクイナ（絶滅危惧IA類、環境省第4次レッドリスト）では、飼育下繁殖技術や個体群の管理体制が整備されつつある。しかし飼育個体群を緊急時の「保険個体群」として機能させるために、野生個体群と同様な遺伝的多様性を飼育下で維持することが課題になっている。そこで両種の飼育下繁殖の効率化を図り、保護増殖事業に貢献する目的で、ゲノムや内分泌の情報など絶滅危惧種の繁殖の成否に関わる年齢、行動、性格などの個体差の分子基盤を解析する。さらに飼育施設と協力して、生殖細胞の保存条件を検討し、受精卵の作製や産子の作出を目指す。本研究はSDGs15-5の、陸の生物多様性損失の阻止を図り、絶滅危惧種の保護対策を講じることに貢献する。

3. 研究目標

全体目標	絶滅危惧野生動物種（ツシマヤマネコとヤンバルクイナ）についてのゲノム情報（性格や繁殖に関連する遺伝子の多型等）と内分泌学的情報（繁殖周期、ストレス）を統合した繁殖基盤情報を整備する。この情報に基づいて繁殖個体を評価し、保存した生殖細胞を用いて、ツシマヤマネコでは受精卵作製、ヤンバルクイナでは人工授精による産子の作出といった繁殖補助技術を開発する。また、それらの成果を、他の絶滅危惧野生動物種の保護増殖事業計画策定時の参考情報として関係機関に提供することにより、生息域外保全の実現に貢献する。
サブテーマ 1	「絶滅危惧野生動物の繁殖に関わる基盤情報の整備」
サブテーマ 1 実施機関	京都大学、岐阜大学、京都市動物園、国立環境研究所

サブテーマ 1 目標	非侵襲的に得られる糞や羽毛を用いたDNA解析によって個体群の遺伝的多様性や近交度を明らかにする。年齢、性格や内分泌機能などの繁殖に影響する関連遺伝子を探索し、飼育下繁殖の成否に関わる遺伝学的な要因を推定する。さらに、繁殖機能に関わる性ホルモンやストレスのバイオマーカーである副腎皮質ホルモンの動態といった内分泌学的要因との関連性も非侵襲試料を用いて明らかにする。加えて、個体間の行動の違いも分析することで、遺伝的多様性や近交度、年齢、行動や性格、ストレスが繁殖機能低下に与える影響を評価し、最終的には、飼育下繁殖の成否に関わる複合要因を明らかにする。サブテーマ2と協力して試料、飼育記録、繁殖成績等の情報を取得し、得られた遺伝および内分泌の情報をサブテーマ2の繁殖ペア形成に活用する。ツシマヤマネコやヤンバルクイナに加え、モデル動物としてイエネコやニワトリの情報収集も同時に行い、情報の深化を図る。 ツシマヤマネコのDNAおよびホルモンの試料は、すでに保存済みのものに加え、共同研究協定を締結している複数の飼育施設とのネットワークによって新たに入手する。DNA試料は飼育下の全成体の約25個体、ホルモン試料は年あたり成体雌約5個体から、動物や飼育施設の状況から許される範囲で採取する。また交通事故等で死亡した野生個体が得られる機会があれば採取する。行動観察は、ツシマヤマネコ野生順化ステーションで撮影した2個体以上のビデオを用いて活動変化を評価する。
------------	---

サブテーマ 2	「絶滅危惧野生動物の生殖細胞の活用と人工繁殖」
サブテーマ 2 実施機関	岩手大学、京都大学、どうぶつたちの病院沖縄
サブテーマ 2 目標	ツシマヤマネコとヤンバルクイナの生殖細胞保存法を開発する。サブテーマ1で収集し整備する遺伝的多様性や繁殖周期の情報に基づき、適切な繁殖個体を選別しペアを形成する。保存した生殖細胞を活用して体外授精による受精卵作製（ツシマヤマネコ）および人工授精による産子作出（ヤンバルクイナ）の事例を示す。これにより、次世代が作出可能な生殖細胞保存法であることを証明するとともに、生息域外保全を加速させる人工繁殖技術を開発する。 サブテーマ1で得られた繁殖の基盤情報をもとに保存すべき生殖細胞や個体を選定し、継続的な生息域外保全を可能とする野生個体由来遺伝子の導入のための人工繁殖技術を提案する。継続的な試料採取が可能なモデル動物のイエネコ、ニワトリも用いて、同様の方法で基礎データを収集する。 ツシマヤマネコ（およびイエネコ）では、生殖細胞保存法を開発し、ツシマヤマネコの死亡個体由来の生殖細胞を保存する（2020年度は5個体を保存済）。保存生殖細胞の受精能力評価および産子作出に利用できる受精卵を作製する。 ヤンバルクイナ（およびニワトリ）では、精子保存法を開発し、飼育下のヤンバルクイナ3個体分以上の精子を保存する。また、保存精子からの人工授精による産子作出する。卵巣保存法の開発については、最初にニワトリをモデル動物として条件検討を行う。次にヤンバルクイナの死亡野生個体や国立環境研究所に保存中の卵巣を活用して適用性を評価する。 両種について、サブテーマ1の基盤情報とサブテーマ2の生殖細胞保存や繁殖成功に関して得られた情報を記録した個体別データベースを作製し、保護増殖事業に活用する。

4. 研究開発内容

本研究では、絶滅危惧野生動物種（ツシマヤマネコとヤンバルクイナ）についてのゲノム情報（性

格や繁殖に関連する遺伝子の多型等）と内分泌学的情報（繁殖周期、ストレス）を統合した繁殖基盤情報を整備した。この情報に基づいて繁殖個体を評価し、保存した生殖細胞を用いて、ツシマヤマネコでは受精卵作製、ヤンバルクイナでは人工授精による繁殖補助技術を開発した。また、それらの成果を、他の絶滅危惧野生動物種の保護増殖事業計画策定時の参考情報として関係機関に提供することにより、生息域外保全の実現に貢献した。

【サブテーマ1】絶滅危惧野生動物の繁殖に関わる基盤情報の整備

遺伝、ホルモン、行動から得られる情報の蓄積と解析を行った。

ツシマヤマネコの多様性を解析するための遺伝マーカーを整備し、新規導入個体の有用性や既存ファウンダー（創始個体）の繁殖優先度を明らかにするため、個体間の遺伝的關係を解明した。ネコ科動物で広く利用されるマイクロサテライト12マーカー、およびゲノムワイド解析の1つであるGRAS-Di解析によって検出した139カ所の一塩基置換（SNP）を指標として遺伝的多様性を解析した。

飼育下および野生個体群の遺伝的多様性にもとづき、個体群存続可能性分析（Population viability analysis：PVA）を行って個体群サイズの変化を推定し、存続に影響する指標を検討した。

ゲノム配列情報から繁殖の成功、特に受精に関連する遺伝子領域を特定するため、ツシマヤマネコについては、詳細なリファレンスゲノムを作成し、ヤンバルクイナについては、登録済みゲノム情報を用いて、遺伝子機能を予測して、繁殖機能や行動特性に関与する遺伝子の多型を探索し、繁殖成績との関連を解析した。

DNAメチル化率を指標とした年齢推定について、飼育下の年齢既知個体の血液DNAを用いて、メチル化率と年齢の関連を解析し、年齢相関領域を選出して推定モデルを作成した。さらに野生個体への応用のためフンでの解析も実施した。

ホルモン測定用に、糞や羽毛など個体に対して非侵襲的に採取できる試料を定期的に採取して個体の健康状態の情報とともに蓄積した。また、ビデオを設置し、飼育担当者に共通記録シートを配布して、行動データを取得した。さらに、野生下と飼育下でのホルモン濃度の差異について比較検討するために、事故等で死亡した野生個体の試料を入手した。行動と性ホルモンやストレスホルモンとの関連性を解析した。

【サブテーマ2】絶滅危惧野生動物の生殖細胞の活用と人工繁殖

生殖組織採取法と生殖細胞保存法を開発した。

保存する生殖細胞の繁殖能力には、採取時の組織の状態が大きく影響するため、ツシマヤマネコについては、野生死亡個体からの組織採取法を確立するための条件検討を行った。雄については、摘出した精巣から精子を採取して、機能解析を行い、安定的な保存のために従来の凍結保存法に加え金子らが開発しているフリーズドライ保存法を用いた。雌については、藤原らが開発している凍結保存法を用いて、卵巣内に無数に存在する卵母細胞を保存した。また、受精可能な成熟卵子が回収された際にはガラス化法を用いて急速凍結保存することで、性成熟段階及び繁殖期に関わらない新しい生殖細胞保存技術を確立するための条件検討を行った。

ヤンバルクイナについては、飼育個体からの精子採取法を確立し、凍結およびフリーズドライ保存を行った。卵巣については、野生死亡個体からの卵巣採取法および実験室までの輸送法を確立し、凍結保存を行うとともに、凍結前の卵子の生存性を評価した。

また主要な対象種は両種とも継続的な試料採取が困難なため、モデル動物としてイエネコ、ニワトリも用いて、同様の方法で基礎データを収集した。

5. 研究成果

5-1. 成果の概要

全体として、ゲノム情報やホルモンレベルと繁殖機能の解析情報の整備と生殖細胞の保存体制を進めることができた。ツシマヤマネコおよびヤンバルクイナにおいて目標の成果が得られたのに加え、ネコ科や猛禽類の他の絶滅危惧種にも応用できる成果を得て、活用範囲を広げることに成功した。ツシマヤマネコおよびヤンバルクイナでは、飼育ほぼ全個体について、繁殖成績とゲノム、ホルモン、行動の関連を解析し、繁殖の基盤情報のデータベースを整備し、生殖細胞保存との連携の例を示した。飼育施設とのネットワーク強化により飼育及び野生の死亡個体から速やかに保存できる体制を整備して多数の生殖細胞を保存し、ネコやニワトリをモデルとした保存および培養技術を開発した（図0-1）。

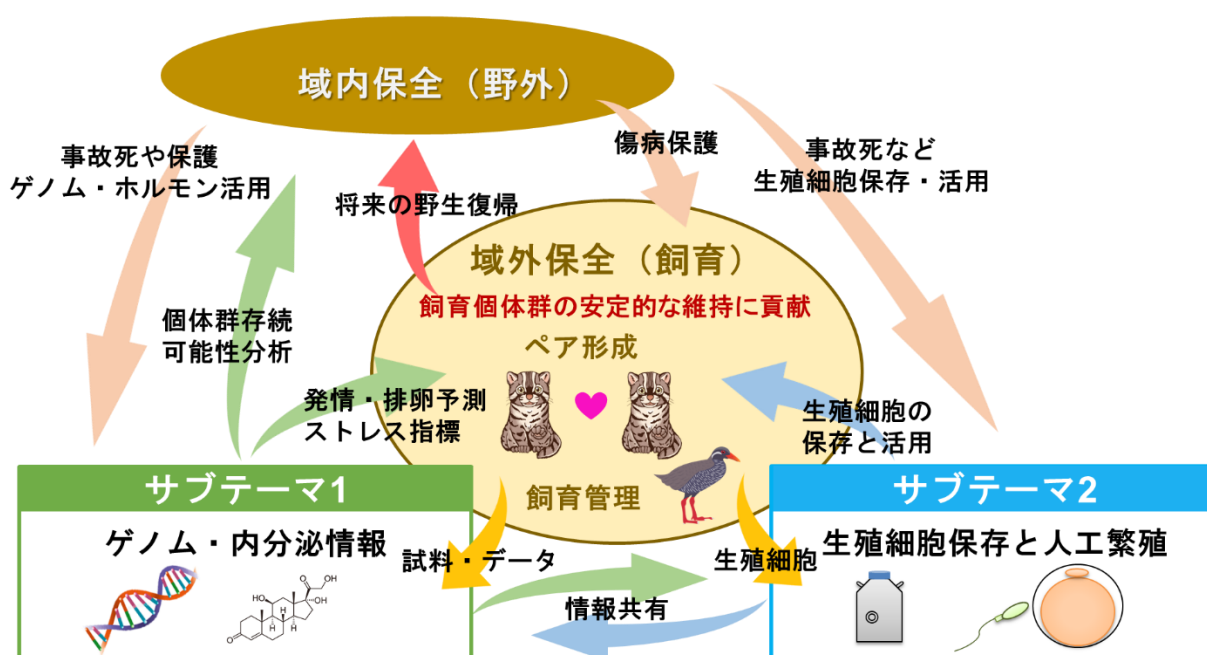


図0-1 研究体制および成果の保全現場へのフィードバック

サブテーマ1では、ツシマヤマネコおよびヤンバルクイナの多様性を解析するための遺伝マーカーを整備し、飼育下および野生個体群の遺伝的多様性に大きな差異が無いことを示した（成果番号3, 4）。さらに遺伝的多様性にもとづき、個体群サイズの推定や個体群存続可能性分析（Population viability analysis : PVA）を行った。主なパラメーターとして、環境収容力を上げ、1歳までの死亡率を下げ、飼育個体群を安定維持することが重要であることを示した。両種のゲノム配列情報について、ヒトやモデル動物のゲノム配列情報を参照して繁殖に関連する遺伝子を特定し、多型を解析した。個体の遺伝子型と繁殖成績を比較したところ、関連を見いだした。年齢推定について、飼育下個体のゲノム中の特定領域のDNAメチル化の割合を検出し、高精度の年齢推定指標を作成した（成果番号1, 6-8, 23）。ホルモン測定用に、糞や羽毛など個体に対して非侵襲的に採取できる試料を定期的に採取して個体の健康状態の情報とともに蓄積し、性ホルモンおよびストレスホルモンの分析に供した。また、ビデオを設置し、飼育担当者に共通記録シートを配布して、行動データを取得した。ホルモンや行動データに基づいて排卵や妊娠を正確に予測できるようになった（図1-6）。飼育施設とのネットワークの強化により、野生下と飼育下でのホルモン濃度の差異について比較検討するために、事故等で死亡した野生個体の試料を入手した。ツシマヤマネコでは、同一個体の遺伝子型、ホルモン、生殖細胞保存状況のデータベースを作成し、繁殖に最適の個体を選定するための情報を整備した。野生順化ステーションにて異なる飼育環境下における活動変化およびホルモン濃度変化を調べた。ヤンバルクイナでは、雌雄と

もに糞中の性ステロイドホルモンが産卵に伴って変化することや個体差が大きいことを確認した。さらにビデオ観察によって、繁殖行動と性ホルモン値の関連を見いだした。これらの取り組みの成果を一般向けの総説として報告した（成果番号15-22）。

サブテーマ2では、サブテーマ1と連携して生殖細胞保存のシステム構築と条件検討を行った。ツシマヤマネコにおいては、死亡個体から採取した精巣および卵巣を48時間以内の、ヤンバルクイナでは24時間以内の短時間で輸送する体制を構築した。またサブテーマ1と連携し、生殖細胞保存を実施した個体とサブテーマ1で基盤情報を調べた個体について、共通する個体で結果を比較した。モデル動物としてマウス、ラット、ニワトリを用いて保存や受精の条件を検討した（成果番号9-13）。ツシマヤマネコでは、雄は精巣を摘出し、精子を採取した。凍結保存、フリーズドライ保存した。卵巣については、摘出した卵巣を凍結保存した（図2-6）。保存した精子および卵巣は、国立環境研究所に輸送し保管した。ヤンバルクイナについては、飼育個体から精子を採取した。そのうち、精子は凍結保存、フリーズドライ保存を行った。卵巣については、野生死亡個体から摘出後24時間で輸送した。輸送後の卵巣内の卵子の生存が確認され、凍結保存を行った（図2-13）。凍結精子及び卵巣は、国立環境研究所に輸送し保管した。生殖細胞を活用した域外保全の取り組みを国際学術誌で紹介した（成果番号14）。

これらの取り組みの成果を一般向け雑誌の特集で報告した（成果番号24-29）。

5-2. 研究目標の達成状況

<全体の達成状況>・・・・・・・・・・・・・・ 1. 目標を大きく上回る成果をあげた

「生殖細胞を活用した絶滅危惧野生動物の生息域外保全」

全体目標	全体の達成状況
絶滅危惧野生動物種（ツシマヤマネコとヤンバルクイナ）についてのゲノム情報（性格や繁殖に関連する遺伝子の多型等）と内分泌学的情報（繁殖周期、ストレス）を統合した繁殖基盤情報を整備する。この情報に基づいて繁殖個体を評価し、保存した生殖細胞を用いて、ツシマヤマネコでは受精卵作製、ヤンバルクイナでは人工授精による産子の作出といった繁殖補助技術を開発する。また、それらの成果を、他の絶滅危惧野生動物種の保護増殖事業計画策定時の参考情報として関係機関に提供することにより、生息域外保全の実現に貢献する。	全体として、ツシマヤマネコおよびヤンバルクイナにおいて目標の成果が得られたのに加え、ネコ科や猛禽類の他の絶滅危惧種にも応用できる成果を得て、活用範囲が広がる研究に発展することができた。ツシマヤマネコおよびヤンバルクイナでは、飼育ほぼ全個体について、繁殖成績とゲノム、ホルモン、行動の関連を解析し、繁殖の基盤情報のデータベースを整備した。生殖細胞保存では、飼育施設とのネットワーク強化により飼育及び野生の死亡個体から速やかに保存できる体制を整備し、保存および培養技術を開発した。 以上より、目標とした解析をすべて実行できた上に、目標数を大きく上回る個体数の基礎情報を解析し、生殖細胞を保存し、基礎情報を生かした保存体制が整備できたこと、他種にも応用可能な技術を開発できたことから、目標を大きく上回る成果をあげたと評価できる。

<【サブテーマ1】達成状況>・・・・・・・・・・・・・・ 1. 目標を大きく上回る成果をあげた

「絶滅危惧野生動物の繁殖に関わる基盤情報の整備」

サブテーマ1目標	サブテーマ1の達成状況
1. 非侵襲的に得られる糞や羽根を用いたDNA解析によって個体群の遺伝的多様性や近交度を明らかにする。年齢、性格や内分泌機能などの繁殖に影響する関連遺伝子を探索し、飼育下繁殖の成否に関わる遺伝学的な要因を推定する。	1. ツシマヤマネコおよびヤンバルクイナの多様性を解析するための遺伝マーカーを整備して、野生と飼育で遺伝的多様性を比較した結果、大きな差は無く、飼育個体群が野生個体群の補完として有用なことを示した（P. 20, 28）。両種の飼育下

2. さらに、繁殖機能に関わる性ホルモンやストレスのバイオマーカーである副腎皮質ホルモンの動態といった内分泌学的要因との関連性も非侵襲試料を用いて明らかにする。加えて、個体間の行動の違いも分析することで、遺伝的多様性や近交度、年齢、行動や性格、ストレスが繁殖機能低下に与える影響を評価し、最終的には、飼育下繁殖の成否に関わる複合要因を明らかにする。サブテーマ2と協力して試料、飼育記録、繁殖成績等の情報を取得し、得られた遺伝および内分泌の情報をサブテーマ2の繁殖ペア形成に活用する。ツシマヤマネコやヤンバルクイナに加え、モデル動物としてイエネコやニワトリの情報収集も同時に行い、情報の深化を図る。 3. ツシマヤマネコのDNAおよびホルモンの試料は、すでに保存済みのものに加え、共同研究協定を締結している複数の飼育施設とのネットワークによって新たに入手する。DNA試料は飼育下の全成体の約25個体、ホルモン試料は年あたり成体雌約5個体から、動物や飼育施設の状況から許される範囲で採取する。また交通事故等で死亡した野生個体が得られる機会があれば採取する。 4. 行動観察は、ツシマヤマネコ野生順化ステーションで撮影した2個体以上のビデオを用いて活動変化を評価する。	および野生個体群の遺伝的多様性にもとづき、個体群サイズの推定や個体群存続可能性分析（PVA）を行った。中間評価のご指摘に対応して令和5年度に研究体制を変更し、経験豊富な研究分担者を追加して野生個体群の維持に必要な条件を詳細に検討することができた。環境収容力上昇、一歳未満死亡率低下、飼育個体群の遺伝的多様性維持が有効なことを示した（P. 20-22, 28-29）。 両種のゲノム配列情報について、ヒトやモデル動物のゲノム配列情報を参照して特定した繁殖に関連する遺伝子のうち、ツシマヤマネコ19遺伝子、ヤンバルクイナ44遺伝子で多型を見いだした。飼育下繁殖の成否との比較から関連を認めた。この遺伝子は飼育集団の安定維持に大きく貢献することが期待できる。さらにツシマヤマネコの飼育ほぼ全個体に野生由来個体も加えた66個体の詳細なリシーケンス情報が得られたことは予定以上の成果で、本研究で解析した繁殖関連遺伝子以外にも、本種のゲノムに関する貴重な基礎情報が期待される（P. 22, 30）。 年齢推定について、従来の方法に加え、年齢既知の飼育下個体の84試料のゲノム中の特定領域のDNAメチル化の割合を検出し、高精度の指標の作成に成功した。野生由来個体の管理や繁殖、野生集団の年齢構成の推定への貢献が期待できる（P. 22, 30）。 2. ホルモン測定用に、糞や羽毛など個体に対して非侵襲的に採取できる試料を定期的に採取して個体の繁殖情報と健康状態の情報とともに蓄積した。また、ビデオを設置し、飼育担当者に共通記録シートを配布して、行動データを取得した。ツシマヤマネコでは、予定よりも多い延べ32個体のホルモンを解析した。繁殖成績とゲノム、ホルモン、行動の関連を解析し、データの比較によって排卵や妊娠を正確に予測できる指標を見いだした（P. 22-25, 30-32）。繁殖成績とゲノム、ホルモン、行動の関連を解析し、繁殖の基盤情報のデータベースを整備した。（P. 26）。 3. 飼育施設とのネットワークの強化により、野生下と飼育下でのホルモン濃度の差異について比較検討するために、野生死亡個体および野生個体保護時の試料を入手した。（P. 25-26） ツシマヤマネコでは、死亡個体も含め飼育下に存在した100個体のリストを作成し、同一個体の遺伝子型、ホルモン、生殖細胞保存状況の一覧表を作成し、繁殖に最適の個体を選定するための情報を整備した（P. 27）。 4. ツシマヤマネコでは、野生順化ステーションにて異なる飼育環境下における活動変化およびホルモン濃度変化を調べた（P. 27）。
--	---

	ヤンバルクイナの糞を用いた解析により、雌雄ともに糞中の性ステロイドホルモンが産卵に伴って変化することや個体差が大きいことを確認した。さらにビデオ観察との比較によって、繁殖行動と性ホルモン値の関連を見いだした。精子数や精子活性との顕著な関連はみられなかった（P. 32）。 以上より、計画を大きく上回る個体数のゲノム、ホルモン、行動のデータを得て、相互の関連を解析し、対象種に関する詳細な情報に加え、他種にも応用可能な成果が得られたことから、目標を大きく上回る成果を上げたといえる。

＜【サブテーマ2】達成状況＞・・・・・・・・・・

1. 目標を大きく上回る成果をあげた

「絶滅危惧野生動物の生殖細胞の活用と人工繁殖」

サブテーマ2 目標	サブテーマ2 の達成状況
1. ツシマヤマネコとヤンバルクイナの生殖細胞保存法を開発する。サブテーマ1で収集し整備する遺伝的多様性や繁殖周期の情報に基づき、適切な繁殖個体を選別しペアを形成する。保存した生殖細胞を活用して体外授精による受精卵作製（ツシマヤマネコ）および人工授精による産子作出（ヤンバルクイナ）の事例を示す。これにより、次世代が作出可能な生殖細胞保存法であることを証明するとともに、生息域外保全を加速させる人工繁殖技術を開発する。 2. サブテーマ1で得られた繁殖の基盤情報をもとに保存すべき生殖細胞や個体を選定し、継続的な生息域外保全を可能とする野生個体由来遺伝子の導入のための人工繁殖技術を提案する。継続的な試料採取が可能なモデル動物のイエネコ、ニワトリも用いて、同様の方法で基礎データを収集する。	1. ツシマヤマネコとヤンバルクイナの生殖細胞保存法を開発した。ツシマヤマネコにおいては、死亡個体から採取した精巣および卵巣を48時間以内の短時間で輸送する体制を構築したことにより、鮮度の高い組織から配偶子の採取、保存を可能にした（P. 34）。ヤンバルクイナについては、飼育個体から精子を採取、保存した（P. 37）。本研究で開発した技術は、次世代が作出可能な生殖細胞保存法であり、生息域外保全を加速させる人工繁殖技術として確立した。 2. サブテーマ1と連携し、生殖細胞保存を実施した個体とサブテーマ1で基盤情報を調べた個体について、共通する個体で結果を比較した結果、ツシマヤマネコの飼育個体のうち、雌1個体で死亡直前の繁殖期まで性ホルモン濃度動態をモニタリングしており、死後の卵子回収・保存を実施し、同一個体で繁殖期でのエストロジェンの上昇と卵子の回収成功を確認できた。ホルモン測定によって繁殖能力（卵胞発育）を示した個体から生殖細胞を回収できたことから、本連携により、繁殖基盤情報を元に生殖細胞保存に供する個体の選定が可能であることを示せた（P. 39）。 また、イエネコとニワトリを用いて卵巣組織の凍結保存と卵子の体外成熟について、卵子の生存性、体外成熟率を上昇させる条件を検討した。特に、ニワトリで見出した卵子の凍結技術について、ヤンバルクイナだけではなく他の希少鳥類へも応用可能であることを確認した（P. 38）。 3. ツシマヤマネコでは、死亡個体から精巣、卵巣を摘出し、48時間以内に輸送した組織を用いて精子、卵巣保存法を開発した。 4. ヤンバルクイナについては、精子採取法およ

3. ツシマヤマネコ（およびイエネコ）では、生殖細胞保存法を開発し、ツシマヤマネコの死亡個体由来の生殖細胞を保存する（2020年度は5個体を保存済）。保存生殖細胞の受精能力評価および産子作出に利用できる受精卵を作製する。 4. ヤンバルクイナ（およびニワトリ）では、精子保存法を開発し、飼育下のヤンバルクイナ3個体分以上の精子を保存する。また、保存精子からの人工授精による産子を作出する。卵巣保存法の開発については、最初にニワトリをモデル動物として条件検討を行う。次にヤンバルクイナの死亡野生個体や国立環境研究所に保存中の卵巣を活用して適用性を評価する。 両種について、サブテーマ1の基盤情報とサブテーマ2の生殖細胞保存や繁殖成功に関して得られた情報を記録した個体別データベースを作製し、保護増殖事業に活用する。	び保存法を確立し、飼育個体から精子を採取した。精子は凍結保存、フリーズドライ保存を行った。令和4年度に研究資金の物品費を計画から変更して全自動セルアナライザーを購入し、保存した凍結精子の凍結保護剤の適性および人工授精への適用の可能性についての評価の精度を上げることができた。卵巣については、野生死亡個体から摘出後24時間で輸送した。輸送後の卵巣内の卵子は生存が確認され、凍結保存を行った。凍結後の卵巣組織中の卵子も一部は生存性が維持されていることを確認した（P. 38）。凍結精子及び卵巣は、国立環境研究所に輸送し保管した（P. 39）。 ツシマヤマネコの飼育個体の生殖細胞保存や精子性状の情報を一括記録するデータベースを構築し、サブテーマ1のホルモン測定によって繁殖能力（卵胞発育）を示した個体から生殖細胞を回収できたことから、本連携により、繁殖基盤情報を元に生殖細胞保存に供する個体の選定が可能であることを示せた。（P. 39） 以上より、計画を大きく上回る数の生殖細胞の保存が達成できたことから、目標を大きく上回る成果を上げたといえる。
---	--

5－3． 研究成果の学術的意義と環境政策等への貢献

<得られた研究成果の学術的意義>

サブテーマ1では、ゲノム解析から遺伝的分断は飼育と野生に差が無いことを確認し、飼育集団が野生の補完として機能できることを示した。また遺伝的多様性にもとづいて100年後までの個体数を予測し、個体数減少を防ぐための指標を明確に示した。また繁殖に影響する機能遺伝子の多型を見いだした。さらにDNAメチル化率を指標として動物の生前に適用可能な精密な年齢推定法を開発した。ホルモンと行動の解析から、ストレスや繁殖ステージの指標を開発した。さらにこれらの情報をデータベースとして整備し、サブテーマ2の結果と連携させた。これらはいずれも対象種では初めての知見であり、野生動物での例も少ないことから、学術的意義は極めて大きく、今後、多様な種への応用が期待されるという点から先導性がある。

サブテーマ2では、飼育個体や死亡個体から効率的に良好な生殖組織を採取する技術を確立し、短時間輸送の実現により受精能力を保持した生殖細胞保存法の開発に成功した。これまで個体による繁殖を行ってきた動物種において、保存した生殖細胞を活用することは動物を移動させることなく繁殖を行うことができるため学術的意義は大きい。また、サブテーマ1の繁殖に関する基盤情報を連携させることで、より繁殖に適した個体の選定が可能な新しい生殖細胞を活用した繁殖体制の構築を提案できた。さらに保存した生殖細胞は国立環境研究所で安全に保管されており、今後のプロジェクトへの活用も可能である。本計画は、絶滅危惧種の繁殖において、これまでにないシステムを先駆的に構築することができた。さらに本計画で開発した方法は、他の絶滅危惧種の保全に応用できるものであり、学術的意義

は極めて大きい。

<行政等に既に貢献した成果>

公益社団法人日本動物園水族館協会と環境省合同の以下の会議において、動物園や環境省ツシマヤマネコ野生順化ステーションの飼育個体の性ホルモン動態からみた繁殖生理状態（主に交尾後の排卵状況等）に関する分析結果を提示した。

令和3年度第1回ツシマヤマネコ飼育管理検討会議（令和3年7月13-15日）

令和3年度ツシマヤマネコ計画推進会議（令和3年7月13-15日）

令和3年度第2回ツシマヤマネコ飼育管理検討会議（令和3年9月14-15日）

令和4年度第1回ツシマヤマネコ飼育管理検討会議（令和4年7月14-16日）

令和4年度ツシマヤマネコ計画推進会議（令和4年7月14-16日）

令和5年度第1回ツシマヤマネコ飼育管理検討会議（令和5年7月12-13日）

令和5年度ツシマヤマネコ計画推進会議（令和5年7月12-13日）

令和5年度第2回ツシマヤマネコ飼育管理検討会議（令和5年9月27日）

また、生殖細胞保存に向けた死亡個体からの組織採取・輸送の条件についても、環境省を通じて情報提供を行った。

ツシマヤマネコ野生復帰ワーキンググループ（令和3年9月28日、11月26日、令和4年8月19日、11月8日、12月20日）に出席し、環境省ツシマヤマネコ野生順化ステーション飼育個体の野生順化過程におけるストレスホルモン動態や行動変化に関する分析結果を提示した。また令和5年度ツシマヤマネコ研究報告会（令和6年3月12日）に参加し、年齢推定、ホルモン解析、野生個体のフンからの食物解析について報告した。その他、「ステーションにおける繁殖に係る合同ヒアリング（請負業者：自然環境研究センター）」（令和6年2月27日）および「今後のツシマヤマネコ域外保全のあり方に関する合同ヒアリング（請負業者：日本動物園水族館協会）」（令和6年2月14日）に有識者として参加し、ツシマヤマネコの野生順化ステーションと動物園での繁殖計画について議論を交わした。

2024年2月22日に行われた令和5年度第2回ヤンバルクイナ保護増殖事業WG会合でPVAの結果について説明を行った。

<行政等に貢献することが見込まれる成果>

遺伝的多様性にもとづく個体群存続可能性予測により、ツシマヤマネコ、ヤンバルクイナともに個体数の漸減が示唆された。個体数減少を防止するため、生息域外で補強を前提とする飼育個体群の維持を今後も継続する必要がある。

DNAのメチル化率を指標として、高精度の年齢推定モデルを作成した。この方法による年齢推定は、野生から保護された個体の適切な飼育や繁殖への活用、さらに野生集団の年齢構成の推定にも役立つことが期待できる。

動物に対して非侵襲的に採取可能な糞を用いて、糞中の性ホルモン動態から排卵の状況を把握でき、併せて行動変化により排卵と発情回帰時期を推定できた。排卵が起こった場合で不妊の場合は、約2ヵ月後以降に発情回帰する可能性があり、繁殖期内に再度の交配時期を推定できる。

発情指標について、ツシマヤマネコの雌の行動記録と糞中エストロジェン濃度動態の調査を行った

ところ、「体の擦り付け」、「尿スプレー」、「陰部舐め」、「ローリング」の増加が特に発情の行動的指標になると考えられた。その他の行動を観察した施設では「コーリング」や「残餌量」の増加、「巣箱利用時間」の減少も発情指標になると考えられた。個体差もあることが明らかになったため、これら複数の行動を注視し、総合的に判断することで発情を外見的に推定できる可能性がある。これらの行動を指標とした同居タイミングの見極めにより、闘争行動を軽減できることにつながる。

個体のストレス状態についても糞から把握できる。飼育現場で役立てるためには、飼育情報等と照らし合わせてより詳細に分析する必要がある、連携施設との情報共有体制の一層の強化が重要である。

ツシマヤマネコの効果的な生殖細胞保存に向けて、死亡個体の生殖細胞をより良い状態で保存し将来的な活用を目指す必要がある。そのためには迅速な生殖器の輸送が重要で、飼育する複数の動物園との連携強化が必須である。

ヤンバルクイナの効果的な生殖細胞保存に向けて、生体からの精液採取、死亡個体からの卵巣回収によって、生殖細胞が保存できることを示した。種の遺伝的多様性の維持と域外保全への活用が見込まれるため、できるだけ多くのヤンバルクイナの配偶子を継続して保存・管理する体制が必要である。

6. 研究成果の発表状況の概要

6-1. 成果の件数

成果の種別	件数
査読付き論文：	14
査読付き論文に準ずる成果発表（人文・社会科学分野）：	0
その他誌上発表（査読なし）：	15
口頭発表（国際学会等・査読付き）：	49
口頭発表（学会等・査読なし）：	27
知的財産権：	0
「国民との科学・技術対話」の実施：	22
マスコミ等への公表・報道等：	33
研究成果による受賞：	3
その他の成果発表：	0

6-2. 主な査読付き論文等の主要な成果

成果番号	主要な成果（10件まで）
1	Qi H, Kinoshita K, Mori T, Matsumoto K, Matsui Y, Inoue-Murayama M (2021) Age estimation using methylation-sensitive high-resolution melting (MS-HRM) in both healthy felines and those with chronic kidney disease. Scientific Reports, 1(1):19963. doi: 10.1038/s41598-021-99424-4
2	Kusuda S, Funahashi T, Adachi I, Yamamoto H, Nagao E, Matsui K, Akiba Y (2022) Fecal Glucocorticoid Metabolites as a Noninvasive Indicator of Stress in the Tsushima Leopard Cats (<i>Prionailurus bengalensis euptilurus</i>): Application to Health Care. Animals, 12(9):1072. doi: 10.3390/ani12091072
3	Ito H, Nakajima N, Onuma M, Inoue-Murayama M (2022) Comparison of the Genetic Diversity of the Captive and Wild Populations of the Tsushima Leopard Cat Using a GRAS-Di Analysis. Animals12(11):1464. doi: 10.3390/ani12111464
4	Katayama M, Fukuda T, Kaneko T, Nakagawa Y, Tajima A, Naito M, Ohmaki H, Endo D, Asano M, Nagamine T, Nakaya Y, Saito K, Watanabe Y, Tani T, Inoue-Murayama M, Nakajima N, Onuma M (2022) Induced pluripotent stem cells of endangered avian species. Communications BIOLOGY, 5:1049. doi.org/10.1038/s42003-022-03964-y www.nature.com/commsbio
8	Qi H, Lim QL, Kinoshita K, Nakajima N, Inoue-Murayama M (2024) A cost-effective blood DNA methylation-based age estimation method in domestic cats, Tsushima leopard cats

	(<i>Prionailurus bengalensis euptilurus</i>), and <i>Panthera</i> species, using targeted bisulfite sequencing and machine learning models. <i>Molecular Ecology Resources</i> , 24(3):e13928. doi.org/10.1111/1755-0998.13928
9	Taketsuru H, Tsukada Y, Kaneko T(2021) Survivability and subsequent development of vitrified early-stage mouse embryos after warming at different temperatures. <i>Biochemical and Biophysical Research Communications</i> , 591:50-53. doi: 10.1016/j.bbrc.2021.12.092
10	Nakagawa Y, Kaneko T (2022) Treatment with MG132 prevents spontaneous activation of rat oocyte in culture and promotes embryonic development after intracytoplasmic sperm injection. <i>Scientific Reports</i> , 12(1):2706. Doi: 10.1038/s41598-022-06714-6
11	Endo M, Tsunoda S, Tawara H, Abe H, Kaneko T (2022) Successful pseudopregnancy of rats by short period artificial stimulation using sonic vibration. <i>Scientific Reports</i> , 12(1):1187. Doi: 10.1038/s41598-022-05293-w
12	Fujihara M, Shiraishi J, Onuma M, Ohta Y, Inoue-Murayama M (2022) Cryopreservation competence of chicken oocytes as a model of endangered wild birds: Effects of storage time and temperature on the ovarian follicle survival. <i>Animals</i> , 12(11):1434. doi.org/10.3390/ani12111434
13	Wake Y, Endo M, Tsunoda S, Tawara H, Abe H, Nakagawa Y, Kaneko T. (2023) Successful induction of pseudopregnancy using sonic vibration in mice. <i>Scientific Reports</i> , 13(1):3604. doi: 10.1038/s41598-023-30774-x

※この欄の成果番号は「III. 研究成果の発表状況の詳細」と共通です。

7. 国際共同研究等の状況

<国際共同研究等の概要>

インドのCentral University of South Biharとの日本学術振興会二国間交流事業 共同研究プログラム「希少鳥類保全のための配偶子保存技術の開発」において、相手国の研究者を招へいし、希少鳥類の生殖細胞保存に関する共同研究・セミナーを開催した。これにより、ヤンバルクイナ等にも応用できる情報共有ができた。

英国のUniversity of EdinburghおよびNature Scotとの日本学術振興会二国間交流事業「比較ゲノム解析情報にもとづく高次捕食動物の保全を目指した国際共同研究」において、イヌワシの野生復帰、飼育下繁殖、ゲノム解析等に関するオンラインセミナーを4回開催して情報交換した。また英国の研究者や国内の保全関係者を招へいして、鳥海南麓自然保護官事務所のご協力によるフィールド見学とハイブリッドセミナー「イヌワシ保全に関する関係者意見交換会」を開催し、日本自然保護協会、京都大学野生動物研究センターによる一般向け講演会「ニホンイヌワシの未来」を開催した。これにより、国内外の保全関係者が一堂に会して情報共有をし、今後の保全策を話し合うとともに、一般の関心を高める効果があった。

キルギス共和国のSnow Leopard Foundation in Kyrgyzstanと共同研究に関する覚書を締結し、2つの自然保護区にて希少ネコ科動物の生態および生理学的調査を実施し、国際共著論文を発表した。同様に、ネパールのCentre for Ecological Studiesとも共同研究に関する覚書を締結し、希少ネコ科動物の個体数密度および生理学的調査を国立公園にて実施した。この成果や手法はツシマヤマネコ等の国内希少種にも応用できる。

<相手機関・国・地域名>

機関名	国・地域名（本部所在地等）
Central University of South Bihar	インド・ガヤ

University of Edinburgh	英国・エディンバラ
Snow Leopard Foundation in Kyrgyzstan	キルギス共和国・ビシュケク
Centre for Ecological Studies	ネパール・カトマンズ

8. 研究者略歴

<研究代表者略歴>

代表者氏名	略歴（学歴、学位、経歴、現職、研究テーマ等）
村山 美穂	京都大学理学研究科博士課程修了、博士（理学）、社団法人畜産技術協会附属動物遺伝研究所、岐阜大学応用生物科学部を経て、京都大学野生動物研究センター・教授、京都府環境審議会委員、日本学術会議第二部会員 研究テーマは遺伝情報にもとづく野生動物保全

<研究分担者（サブテーマリーダー）略歴>

分担者氏名	略歴（学歴、学位、現職、研究テーマ等）	参画期間
1) 金子 武人	近畿大学大学院生物理工学研究科修了、博士（医学）、熊本大学生命資源研究・支援センター助教、米国ハワイ大学訪問研究員、京都大学大学院医学研究科講師を経て、岩手大学理工学部准教授（令和6年4月より大阪公立大学教授） 研究テーマは繁殖学	全期間

II. 成果の詳細

II-1 サブテーマ1「絶滅危惧野生動物の繁殖に関わる基盤情報の整備」

[サブテーマ1 要旨]

サブテーマ1では遺伝、ホルモン、行動から得られる情報の蓄積と解析を行った。

ツシマヤマネコの多様性を解析するための遺伝マーカーを整備し、新規導入個体の有用性や既存ファウンダー（創始個体）の繁殖優先度を明らかにするため、個体間の遺伝的関係を解明した。ネコ科動物で広く利用されるマイクロサテライト12マーカー、およびゲノムワイド解析の1つであるGRAS-Di解析によって検出した139カ所の一塩基置換（SNP）を指標として遺伝的多様性を解析した結果、野生と飼育の個体群の間に大きな差は無く、**飼育個体群が野生の補完として重要**なことを示した。

飼育下および野生個体群の遺伝的多様性にもとづき、個体群サイズの推定や個体群存続可能性分析（Population viability analysis：PVA）を行った。主なパラメーターとして、**環境収容力を上げ、1歳までの死亡率を下げ、飼育個体群を安定維持することが重要**であることを示した。

ゲノム配列情報から繁殖の成功、特に受精に関連する遺伝子領域を特定するため、ツシマヤマネコについては、本研究で詳細なリファレンスゲノムを作成し、イエネコとの比較からアノテーション（遺伝子配列の注釈、または注釈付けのことをいう。生物学情報データベースや様々な機能予測プログラム、過去の文献情報などを用いて、遺伝子の機能を予測すること）を実施した。ヤンバルクイナについては、ニワトリの情報を参考にした。特定された繁殖関連遺伝子の個体差と繁殖成績を比較したところ、関連がみられた。

DNAメチル化率を指標とした年齢推定について、イエネコとツシマヤマネコの血液DNAを用いて、メチル化率と年齢の関連を解析し、年齢相関領域を選出した。イエネコでは、RT-PCR的手法であるメチル化感受性高分解能融解分析（MS-HRM）を用いて各検体の対象遺伝領域のメチル化率を出して、年齢推定モデルを作成した。ツシマヤマネコでは、年齢推定精度を向上させるために対象遺伝領域を増やし、次世代シーケンシングを実施した。鳥類で先例の少ないヤンバルクイナでは、RRBS法

（Reduced representation bisulfite sequencing）を用いてゲノム全体を探索した。その結果、**両種で高精度の年齢推定に成功**した。

ホルモン測定用に、糞や羽毛など個体に対して非侵襲的に採取できる試料を定期的に採取して個体の繁殖情報と健康状態の情報とともに蓄積し、性ホルモンおよびストレスホルモンの分析に供した。

ツシマヤマネコでは、飼育担当者に共通記録シートを配布して、行動データを取得した。その結果を、糞中の性ステロイドホルモン濃度動態と比較することで、発情状態を把握しながら発情の指標となる行動を明らかにした。雌の糞中の性ステロイドホルモン濃度動態から、交尾後の排卵の有無の調査と妊娠判定等を実践し、繁殖計画にあった毎年のすべての雌個体について、繁殖生理状態を評価した。得られた**繁殖生理状態の推定情報を、各飼育個体の動物園へ逐次報告**し、毎年の繁殖季節内の雌雄同居時期の推定や妊娠個体の出産準備等の管理に反映させた。

野生下と飼育下でのホルモン濃度動態からみた繁殖生理状態の差異について比較検討するため、事故等で死亡した野生個体や救護収容された個体の保護時の試料を入手し、野生での年間の繁殖生理状態の季節性について解析した。また、**サブテーマ2と連携し、死後の卵巢状態と生前の糞中の性ステロイドホルモン動態から推定した卵巢状態の推定結果とを初めて比較**することができた。

また野生順化ステーションにて異なる飼育環境下における活動変化およびホルモン濃度変化を調べた。

これらゲノム、ホルモンの情報を個体ごとにデータベースとして整備し、サブテーマ2の生殖細胞の情報と比較できるようにした。

1. サブテーマ1 研究開発目的

サブテーマ1では、哺乳類はツシマヤマネコ、鳥類はヤンバルクイナを主な対象に、ゲノムや内分泌の情報など、絶滅危惧種の繁殖の成否に関わる年齢、行動などの個体差の分子基盤を解析する。

2. サブテーマ1 研究目標

サブテーマ1	「絶滅危惧野生動物の繁殖に関わる基盤情報の整備」
--------	--------------------------

サブテーマ1 実施機関	京都大学、岐阜大学、京都市動物園、国立環境研究所
サブテーマ1 目標	非侵襲的に得られる糞や羽毛を用いたDNA解析によって個体群の遺伝的多様性や近交度を明らかにする。年齢、性格や内分泌機能などの繁殖に影響する関連遺伝子を探索し、飼育下繁殖の成否に関わる遺伝学的な要因を推定する。さらに、繁殖機能に関わる性ホルモンやストレスのバイオマーカーである副腎皮質ホルモンの動態といった内分泌学的要因との関連性も非侵襲試料を用いて明らかにする。加えて、個体間の行動の違いも分析することで、遺伝的多様性や近交度、年齢、行動や性格、ストレスが繁殖機能低下に与える影響を評価し、最終的には、飼育下繁殖の成否に関わる複合要因を明らかにする。サブテーマ2と協力して試料、飼育記録、繁殖成績等の情報を取得し、得られた遺伝および内分泌の情報をサブテーマ2の繁殖ペア形成に活用する。ツシマヤマネコやヤンバルクイナに加え、モデル動物としてイエネコやニワトリの情報収集も同時に行い、情報の深化を図る。 ツシマヤマネコのDNAおよびホルモンの試料は、すでに保存済みのものに加え、共同研究協定を締結している複数の飼育施設とのネットワークによって新たに入手する。DNA試料は飼育下の全成体の約25個体、ホルモン試料は年あたり成体雌約5個体から、動物や飼育施設の状況から許される範囲で採取する。また交通事故等で死亡した野生個体が得られる機会があれば採取する。行動観察は、ツシマヤマネコ野生順化ステーションで撮影した2個体以上のビデオを用いて活動変化を評価する。

3. サブテーマ1 研究開発内容

サブテーマ1では、遺伝、ホルモン、行動から得られる情報の蓄積と解析を行った。ツシマヤマネコの多様性を解析するための遺伝マーカーを整備し、新規導入個体の有用性や既存ファウンダー（創始個体）の繁殖優先度を明らかにするため、個体間の遺伝的関係を解明した。ネコ科動物で広く利用されるマイクロサテライト12マーカー、およびゲノムワイド解析の1つであるGRAS-Di解析によって検出した139カ所の一塩基置換（SNP）を指標として遺伝的多様性の解析を行い、野生個体群と飼育個体群で比較した。

飼育下および野生個体群の遺伝的多様性にもとづき、個体群存続可能性分析（Population viability analysis：PVA）を行って個体群サイズの変化を推定し、存続に影響する指標を検討した。

ゲノム配列情報から繁殖の成功、特に受精に関連する遺伝子領域を特定するため、ツシマヤマネコについては、詳細なリファレンスゲノムを作成し、ヤンバルクイナについては、登録済みゲノム情報を用いて、遺伝子機能を予測して、繁殖機能や行動特性に関与する遺伝子の多型を探索し、繁殖成績との関連を解析した。

DNAメチル化率を指標とした年齢推定について、飼育下で年齢既知個体の血液DNAを用いて、メチル化率と年齢の関連を解析し、年齢相関領域を選出して推定モデルを作成した。さらに野生個体への応用のためフンでの解析も実施した。

ホルモン測定用に、糞や羽毛など個体に対して非侵襲的に採取できる試料を定期的に採取して個体の健康状態の情報とともに蓄積した。また、ビデオを設置し、飼育担当者に共通記録シートを配布して、行動データを取得した。さらに、野生下と飼育下でのホルモン濃度の差異について比較検討するために、事故等で死亡した野生個体の試料を入手した。行動と性ホルモンやストレスホルモンとの関連性を解析した。

4. サブテーマ1 結果及び考察

ツシマヤマネコ

飼育下および野生個体群の遺伝的多様性にもとづき、個体群サイズの推定や個体群存続可能性分析を行った。

マイクロサテライトを用いた調査では、飼育34個体、野生救護または死亡64個体の解析の結果、野生集団・飼育集団は遺伝的多様性に大きな差はなく、両集団で遺伝的分断も見られないことがわかった。GRAS-Di解析においても、飼育集団は野生集団とほぼ同等の遺伝的多様性を有していることが示され、飼育集団の遺伝的管理は良好であると考えられた（図1-1、表1-1）。新規導入個体の有用性や既存ファウンダーの繁殖優先度決定の指標として、飼育個体の全34個体のマイクロサテライト型を判定した。

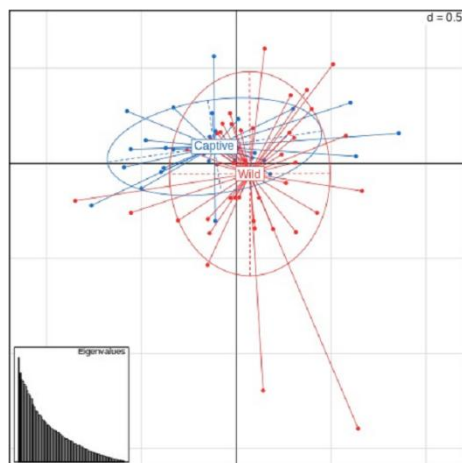


図1-1 GRAS-Di解析によるツシマヤマネコの野生および飼育集団の主成分分析

赤は野生個体、青は飼育個体

表1-1 ツシマヤマネコの飼育および野生集団の遺伝的多様性指標

	<i>N</i>	<i>Na</i>	<i>Ho</i>	<i>He</i>	<i>Ar</i>	<i>PE</i>	<i>PID</i>	<i>PID-sib</i>
Captive	26.360	1.705	0.069	0.065	1.67	0.987	9.8E-09	1.1E-04
Wild	44.424	1.971	0.076	0.074	1.82	0.993	7.2E-10	3.0E-05

N: mean number of individuals genotyped, *Na*: the number of effective alleles, *Ho*: observed heterozygosity, *He*: expected heterozygosity, *Ar*: allelic richness, *PE*: Cumulative probability of exclusion, *PID*: Cumulative probability of identity, *PID-sib*: Cumulative *PID* among siblings

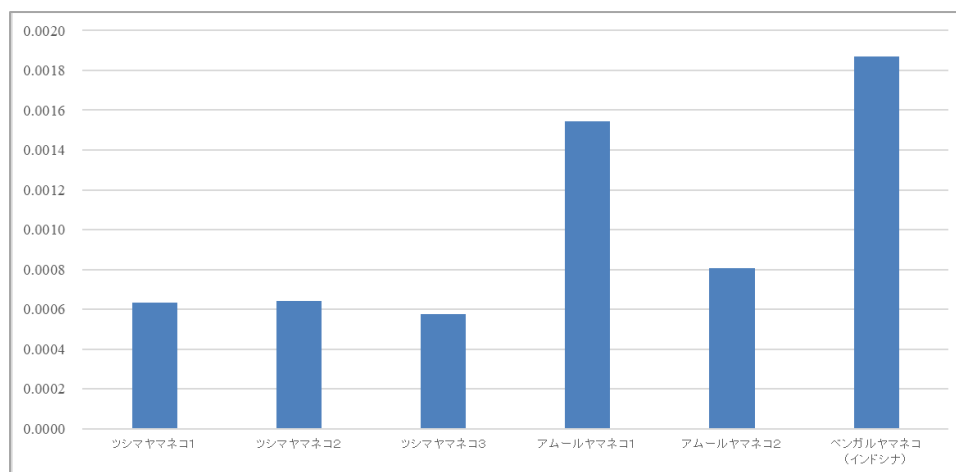


図1-2 ベンガルヤマネコ地域集団のヘテロ接合率

また全ゲノム配列を取得したツシマヤマネコのヘテロ接合率は0.0006前後で、ベンガルヤマネコの大陸の亜種（集団）よりも低く、ツシマヤマネコの遺伝的多様性がベンガルヤマネコの他の集団よりも低いことが示唆された（図1-2）。

ツシマヤマネコの野生個体群を単一の個体群として、存続可能性分析（Population Viability Analysis、以下PVA）を実施した。

繁殖関連遺伝子の解析では、過去10年間の飼育個体群の繁殖記録を精査し、飼育下で繁殖が成功した個体と成功しなかった個体を抽出した。当初の計画では近縁種であるイエネコあるいはツシマヤマネコで作成したドラフトゲノムをリファレンスとして、繁殖成功個体・非繁殖個体のゲノム比較を実施す

る予定であったが、ロングリード解析を追加し、より精度の高いリファレンスゲノムを作製した。イエネコのリファレンスゲノムを参照し、アノテーションを行った。次にツシマヤマネコ66個体のショートリードの全ゲノム情報を取得し、ツシマヤマネコのリファレンスゲノムにマッピングを実施した。マッピングの結果、100万以上の遺伝子多型情報を取得した。マウスやヒトにおいて受精に関連している69個の遺伝子のうち、ツシマヤマネコのゲノム配列の中で、同一の遺伝子名でアノテーションされ、多型が検出された遺伝子は19個であった。

次にSnEffを用い、多型が検出された19遺伝子内の変異の機能的効果の影響を予測したところ、HIGH（影響が大きい変異）と判定されたものが3カ所、MODERATE（中程度の影響）と判定されたものが30カ所であった。これらの変異は繁殖成績（妊孕性）との関連は認められなかった。

ヒトやネコで親和行動や攻撃性などの性格に影響するとの報告があるオキシトシン受容体、バソプレシン受容体、ドーパミン受容体の多型領域をツシマヤマネコで解析したところ、オキシトシン受容体で2カ所、バソプレシン受容体で1カ所、ドーパミン受容体で1カ所の一塩基置換多型が認められたものの、30項目の質問紙による性格評定との関連は見られなかった。

年齢推定について、イエネコ79個体をモデルとして、*ELOVL2*と*RARYL*の2遺伝領域のメチル化率にもとづき誤差3.88年で推定できる方法を確認し、論文を発表した。その後、ツシマヤマネコについて飼育下の年齢既知の19個体の血液DNA 84試料を用いて、ターゲットバイサルファイトシーケンシングにより、上記2つを含め4領域を選出した（近隣遺伝子：*ELOVL2*、*RARYL*、*DLX5*、*TCF21*）。Elastic net-svm回帰による年齢予測モデルから1.35歳の推定誤差で年齢を予測できた。またツシマヤマネコと同じ領域をネコ科の他の希少種の年齢推定にも応用可能なことがわかった。さらにハンドウイルカやアジアゾウでも、ゲノム領域は異なるが同様の手法で推定可能なことがわかった。

ホルモン測定用に、個体に対して非侵襲的に採取できる試料として糞を定期的に採取し個体の繁殖情報と健康状態の情報とともに蓄積した。糞中の性ホルモン濃度解析用に、当初毎年雌5頭からの採材を計画していたが、想定以上に動物園での交尾ペアが増え、また野生順化ステーションの飼育個体でも測定の必要性が求められたことから、これら飼育施設の協力により多数の個体で採材を実施できた。

飼育下ツシマヤマネコの雌において、3年間で計13頭、延べ32頭（令和3年：9頭、令和4年：11頭、令和5年：12頭。ツシマヤマネコ野生順化ステーションでの飼育期間の2頭含む）、ツシマヤマネコの補完として、同亜種のアムールヤマネコ（大陸側の個体群）の飼育下の雌雄各1頭と同属のスナドリネコの飼育下の雌1頭で、継続的に糞の採取を行った。これらのヤマネコにおいて、継続的な糞中の性ステロイドホルモン濃度動態から卵胞発育（発情）、排卵および妊娠の有無を推定することができた。まず、ツシマヤマネコの発情行動指標を明らかにする一環として、神戸どうぶつ王国の協力を得て、同属のスナドリネコの雌に対して、ホルモン剤であるウマ絨毛性性腺刺激ホルモン（eCG）による発情誘起試験を実施した。誘起試験前後の詳細な行動観察を、赤外線カメラで連続撮影した映像を用いて行い、糞中の性ホルモン濃度の動態と比較した。eCG投与の効果に関しては明確ではなかったが、その後、糞中プロゲステロン濃度が上昇したため排卵が起こっていることが強く示唆された。したがってその直前時期にあたる時期は発情期（卵胞期）であると考えられ、この時期に雌の「発声」、「尿スプレー」、「自身の陰部舐め」が順に高頻度で確認された。すなわち、発情指標になると思われる行動の種類とその変化のパターンを把握できた（図1-4）。

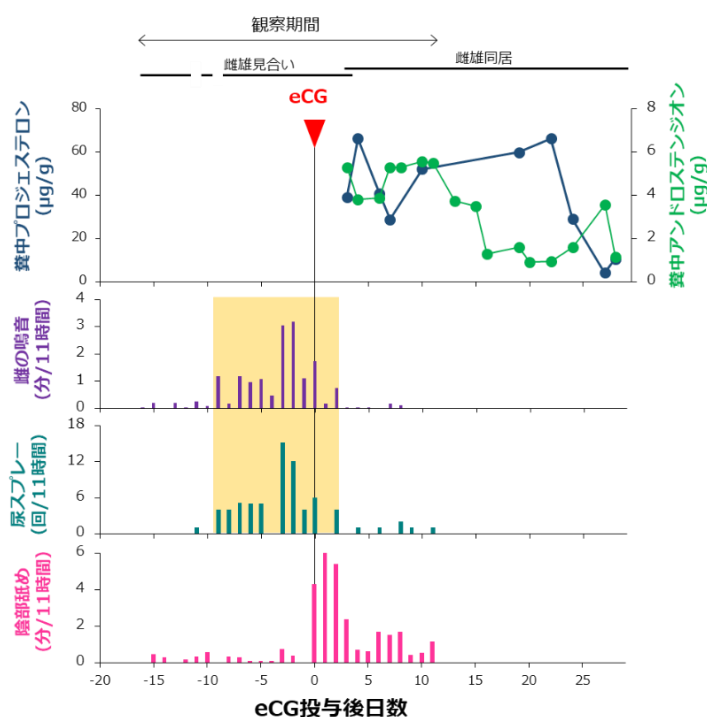


図1-4 排卵直前時期である発情期の雌スナドリネコ（ツシマヤマネコと同属）の行動変化

日本動物園水族館協会のツシマヤマネコ自然繁殖担当者と連携して、飼育動物園との検討会議（令和3年12月1日）において、行動記録シートの様式説明や統一化の議論を行った。各動物園の飼育担当者に共通記録シートを配布し、原則すべての繁殖予定個体に対して、統一フォーマットで行動データを記録することとした（図1-5）。

ツシマヤマネコ行動記録シート（ヘアリング・交尾記録）											※ヘアごとにシート作成								
対象ペア		♀：No.1		♂：No.2		観察方法		行動の強度		※は回数カウント		観察方法							
ヘアリング											交尾記録								
実施日	体の 磨り付 け	ロー リング	自 分の 陰部 舐め	♀の尿ス プレー	♀を追尾 無○ 有○	闘 争 無○ 有○	マ ウ ン ト 回 数 ※	マ ウ ン ト 回 数 ※	実施時間	備考（雌雄の様子など）	マ ウ ン ト 回 数	日 付	継続 時間 （秒）	マ ウ ン ト 姿 勢	マ ウ ン ト 時 雌 雄 に メ ス が 呼 ぶ	体 の 磨 り 付 け	ロー リン グ	自 分 の 陰 部 舐 め	
2022/1/20	0	0	1	2	0	0	1	0	0	10：00～11：00	軽い競争あり。	1	2/23	40	○	○	○	○	○
2022/1/26	0	0	0	0	0	0	0	0	0	12：00～12：30	互いに関心が低い。	2	2/23	50	○	○	○	×	○
2022/1/31	0	1	0	0	0	0	0	0	0	13：00～13：40		3	2/23	30	×	×	○	○	マ
2022/2/5	0	1	0	0	0	0	0	0	0	10：00～10：20		4	2/23	45	○	○	○	○	○
2022/2/6	0	1	0	2	1	1	0	1	0	14：00～15：00	メスのオスへの関心高い。	5	2/24	60	○	○	○	○	○
2022/2/7	0	1	0	0	1	1	0	2	0	15：00～15：40	メスのオスへの関心高い。	6	2/24	80	○	○	○	×	○
2022/2/13	1	0	2	0	0	0	0	0	0	10：00～11：00		7	2/24	20	×	×	○	○	腰
2022/2/14	0	0	0	0	0	0	1	0	0	13：00～13：30	軽い競争あり。	8	2/25	40	○	○	○	○	○
2022/2/23	0	2	0	0	2	2	0	2	4	13：00～20：00	交尾4回	9							
2022/2/24	0	0	0	0	0	2	0	1	3	6：30～19：00	交尾3回	10							
2022/2/25	0	0	0	0	0	2	0	1	1	6：30～17：00	交尾1回	11							
												12							
												13							

図1-5 ツシマヤマネコ飼育動物園間統一の行動記録シート

この行動記録と糞中エストロジェン（エストラジオール-17βまたはエストロン）濃度動態を比較した結果、「体の擦り付け」、「尿スプレー」、「陰部舐め」、「ローリング」の増加が特に発情の行動的指標になると考えられた（図1-6）。その他の行動を観察した施設では「ローリング（発声）」や「残餌量」の増加、「巣箱利用時間」の減少も発情指標になると考えられた。個体差もあることが明らかになったため、これら複数の行動を注視し、総合的に判断することで発情を外見的に推定できる可能性が考えられた。

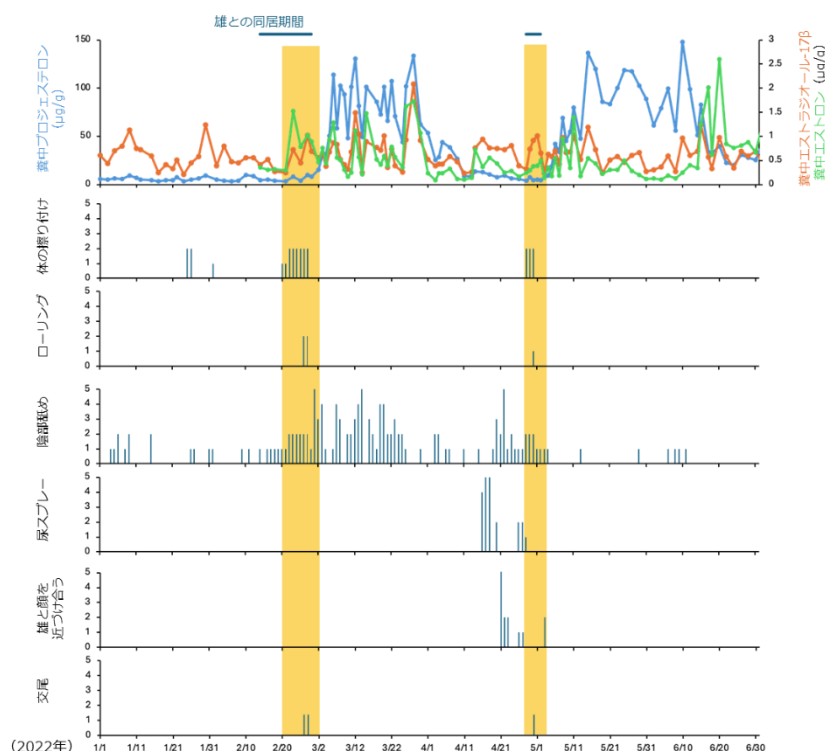


図1-6 ツシマヤマネコにおける糞中の性ステロイドホルモン濃度動態と行動変化の関係
(No.74の令和4年のデータを例示)

ツシマヤマネコおよび同亜種アムールヤマネコ（大陸側の亜種）において、交尾後の糞中プロゲステロン濃度の上昇動態から排卵を推定できた。ツシマヤマネコの令和3～5年の繁殖期において、延べ25ペアの自然交配があり、これらすべての事例で排卵が起こったと推定された。この3年間で延べ計7頭の雌で出産を認めた（うち1頭は2年

連続で出産）。

令和3年1月頃からの繁殖期開始当初は本研究期間の直前であったが、すでに採材を実施していたため、それらの分析に基づく結果についてもあわせて報告する。令和3年は、ツシマヤマネコにおいて、すべての交尾事例で、糞中プロゲステロン濃度動態から排卵を推定できた。その後の糞中プロスタグランジン $F_{2\alpha}$ 代謝物である13,14-dihydro-15-keto-PGF $_{2\alpha}$ （PGFM）濃度測定による妊娠判定で、2頭の妊娠を確認し、出産を認めた。令和3年に分析対象であった個体のうち1頭は、研究期間前の令和2年5月末から糞の採取が行われており、令和2年6～9月および令和3年1月から測定終了の4月まで糞中エストラジオール-17 β に増減変化が認められた。前述のDNAメチル化を指標とした年齢推定において、性ホルモン測定期間内の複数の血液検体の分析から9.1～10.1歳と判定されている。少なくともこの年齢において、卵胞発育があったものと推察された。さらに、当該個体は令和3年11月に死亡したため、サブテーマ2と連携し、死後に卵子が回収された。同年の繁殖期（前シーズン）に糞中エストラジオール-17 β 動態から卵胞発育していたと考えられたため、サブテーマ間の連携により、糞中の性ホルモン動態からの卵巢活動の推定と、実際の卵巢内の状態を初めて関連付けることができた。

令和4年1月頃からの繁殖期では、ツシマヤマネコにおいて、すべての交尾事例で、糞中プロゲステロン濃度動態から排卵を推定できた。その後の糞中PGFM濃度測定による妊娠判定で、3頭の妊娠を確認し、出産を認めた。アムールヤマネコ1頭においても同様の方法で、排卵と妊娠を確認でき、出産に至った。

令和5年1月頃からの繁殖期では、ツシマヤマネコにおいて、すべての交尾事例で、糞中プロゲステロン濃度動態から排卵を推定できた。その後の糞中PGFM濃度の測定による妊娠判定では、1頭の妊娠を確認し、出産を認めた。アムールヤマネコ1頭においても同様の方法で、排卵と妊娠を確認でき、出産に至った。糞中プロゲステロン濃度測定を、現場での繁殖管理に活用する方法として、排卵有無を確認するだけでなく、交尾後不妊の場合の次の発情回帰（交配計画）のタイミングを計ることができる。すなわち、繁殖期内の1度目の交尾期に排卵したが不妊であった雌については、交尾から約2ヵ月後またはそれ以降に発情が回帰する可能性がある。したがって、この時期に雌が再度交尾を許容する可能性が高いことから、繁殖期内の再度の繁殖（雄との同居、交配）を試みる事が可能である。

この3年間で繁殖期最初の交尾期に排卵が起こったにも関わらず妊娠出産に至らず、その年の繁殖期内に発情回帰があり2度目の排卵に至った雌は3頭（令和4年：2頭、令和5年：1頭）であった。さらに、このうちの雌1頭ではこの2度目の排卵で妊娠出産に至っている。

以上3年間のそれぞれの自然交配において、最終交尾日からの糞中プロゲステロンおよびPGFM濃度の平均動態から、最終交尾後の糞中プロゲステロン濃度の上昇により排卵を判断し、最終交尾後約40日頃以降のPGFM濃度の上昇により妊娠を判断できることになる。すなわち、1) 最終交尾後に糞中プロゲステロン濃度の上昇がなければ排卵に至っておらず、数週間程度で発情が回帰する可能性があること（次の雌雄ペアリングの実施を計画）、2) プロゲステロン濃度の上昇があった場合で、その後のPGFM濃度の上昇がなければ妊娠可能性は低く、プロゲステロン濃度が基底値に戻る2ヵ月後付近またはそれ以降に発情回帰する可能性があること（次の雌雄ペアリングの実施を計画。前項1より発情回帰に時間がかかる）、3) プロゲステロン濃度の上昇があり、その後のPGFM濃度の上昇もあれば妊娠可能性が高いことになる（出産準備や観察に注力する）。

飼育下の繁殖生理状態（特に季節性）と比較するために、野生死亡個体および野生個体保護時の平成12～令和4（2000～2022）年の蓄積保管試料（雌：血清または血漿58、眼房水24、膀胱尿31、腸管内糞29、雄：同じ順に90、20、67、24）について、環境省対馬野生生物保護センターから提供を受けた。これらの試料を活用し、性ホルモン濃度を測定して月ごとに集計した。雌個体では、血中・眼房水中・膀胱尿中・腸管内糞中のエストロゲンおよびプロゲステロン、雄個体では、血中・眼房水中のテストステロンと膀胱尿中・腸管内糞中のテストステロンおよびアンドロステンジオン濃度を測定した。各検体は、成獣・亜成獣・幼獣・記録上不明の個体のものであり、同じ個体からすべての検体を採取できているわけではないこと、各月に均一な検体数ではないことなど、結果の評価が難しい場合が多かった。中でも比較的妥当な判断が可能であったのは、雌では糞中プロゲステロン、雄では尿中テストステロンおよびアンドロステンジオンであった。

雌の糞中プロゲステロンは、12月、3月、4月、6月、8月に比較的高い数値の成獣の検体が含まれていた。飼育下での取得データとも考え合わせると、これらの検体の採取日の数日前から2ヵ月程度前までの範囲内で排卵に至っている可能性があり、交尾排卵動物であることから、この期間内に雄との交尾に至っている可能性がある（飼育下では稀に自然排卵が起こるが、野生下で自然排卵がどの程度起こるかは不明）。また、雄の尿中テストステロンおよびアンドロステンジオンは同様のパターンであり、10月から5月に比較的高い数値を含む山なりの年間動態が成獣および亜成獣の検体から認められた。この結果は、過去に飼育下個体で調査した際に得られた結果（未発表）と同様であり、野外での繁殖生理状態の季節性の一端を推定できた。

サブテーマ1と連携し、生殖細胞保存を実施した個体とサブテーマ1で基盤情報を調べた個体について、共通する個体で結果を比較した結果、ツシマヤマネコ飼育個体のうち、雌1個体で死亡直前の繁殖期まで性ホルモン濃度動態をモニタリングしており、死後の卵子回収・保存を実施し、同一個体で繁殖期でのエストロゲンの上昇と卵子の回収成功を確認できた。ホルモン測定によって繁殖能力（卵胞発育）を示した個体から生殖細胞を回収できたことから、本連携により、繁殖基盤情報にもとづき生殖細胞保存に供する個体の選定が可能であることを示せた。

ストレスモニタリングのため、ツシマヤマネコ野生順化ステーションの飼育個体と動物園間を移動した個体の糞サンプルを収集した。想定以上に多くの個体から採取することができた。糞サンプルのストレスホルモン（コルチゾール）濃度を測定し、移動等のストレス事象時のホルモン動態を捉えることができた。なお、ストレスホルモン変化には個体差があり、この現象は、前述のDNAメチル化を指標とした年齢推定において9.1～10.1歳と判定された野生由来の雌にも同様に見受けられた。野生および飼育下生まれの出自や幼齢または成獣などの年齢に関係なく施設内の移動等のストレス事象を繰り返すことでストレス応答が緩慢になった可能性が考えられるが、さらなる原因の解明が必要である。また、行動観察については、当初予定していた野生順化ステーションに設置済みのビデオデータを用いた観察に加え、京都市動物園での直接観察も実施した。野生順化ステーションに関しては、管理区域については全区画を観察できたが、順化ケージに関しては、多くの死角があり、観察方法の検討が必要となった。さらに新たな指標として個体に装着済みの加速度データロガーから活動量の変化を分析した。活

動量変化が糞中コルチゾール濃度変化に有意な影響を与えた例は見られず、活動パターンと生理的ストレスとの明確な関連性はえられなかった。また、京都市動物園で直接観察を行った個体についても糞中コルチゾール濃度と関連のある特定の行動は確認されなかった。なお、野生順化ステーションの個体とは異なり、糞中コルチゾール濃度に季節性がみられた（図1-11）。複数種のヤマネコを対象にした研究においても糞中コルチゾールの平均濃度は夏季が最も低く、春季と秋季に高い傾向にあり、本研究と類似した結果が得られていた。よって個体差があるものの、ツシマヤマネコにおいても糞中コルチゾール濃度に季節性がある可能性が示唆された。行動変化とコルチゾール濃度変化に関しては、多くの動物種ではストレス状態では「歩行・探索」や「常同行動」を示すことが知られているが、観察対象個体においては、これら行動と糞中コルチゾール濃度との間に有意な相関は見られなかった。一方で、寝室などの視界外で動かない様子が観察された。これは、ベンガルヤマネコやマーゲイなどの小型ネコ科動物における報告と類似した結果となった。小型ネコ科動物という捕食者であると同時に被食者でもある種の性質が関連していると考えられた。

さらに行動に関連する遺伝子の候補として、オキシトシン受容体遺伝子、およびバソプレシン受容体遺伝子について、ツシマヤマネコの多型を解析した。これらの遺伝子はヒトやマウスで社会性に関連しており、ネコではオキシトシン遺伝子型が「荒っぽさ」に影響することが報告されている。また攻撃性に関わるアンドロゲン受容体遺伝子やドーパミン受容体遺伝子についても、モデル動物としてネコでの解析を進めた。

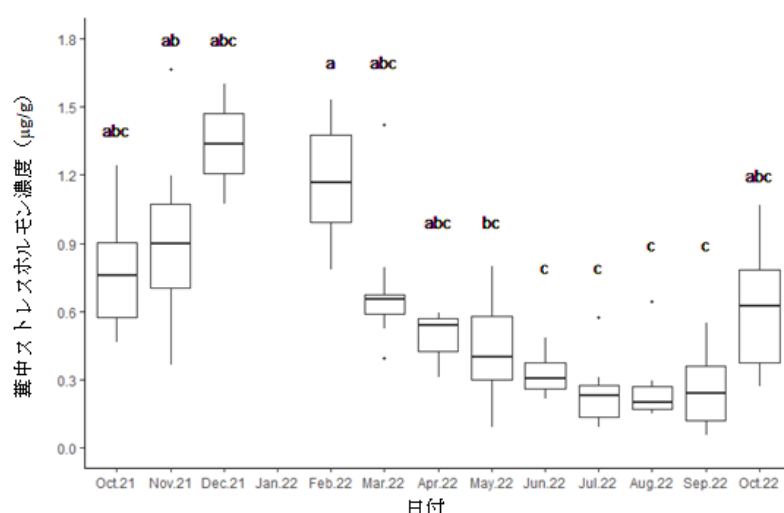


図1-11 京都市動物園で飼育管理されていた雄個体の糞中コルチゾール濃度の月変化

ツシマヤマネコの飼育全個体の遺伝子型、性格評定、ゲノム解析、ホルモン解析の情報を一括記録するデータベースを構築し、サブテーマ2の生殖細胞保存と連携できるようにした。飼育下の31個体の30項目の性格評定の結果、攻撃性、好奇心、社交性、神経質の4因子が抽出さ

れた。オキシトシン受容体遺伝子のTをホモで持つと神経質という傾向がみられたが、有意ではなかった ($P = 0.15$)。繁殖歴を比較したところ、Tをホモで持つ個体の妊娠成立や交尾成立の割合 (0.43, 0.38) が、それ以外の遺伝子型を持つ個体 (0.50, 0.57) よりも低い傾向が見られた。さらに例数を増やして検討する必要がある。

ヤンバルクイナ

国立環境研究所で保存済みの野生個体のDNA約100個体を対象にマイクロサテライト型を解析した結果、ヤンバルクイナの野生個体群には明瞭な遺伝学的構造が無いことがすでに報告されている。この結果から、現状のヤンバルクイナの野生個体群を単一の個体群として、存続可能性分析 (Population Viability Analysis、以下PVA) を実施した。

繁殖関連遺伝子の解析では、ヤンバルクイナの登録済みゲノム情報 (GCA_002003005) をNCBIデータベースよりダウンロードし、Augustusを用いて遺伝子領域を推定したgffファイルを作成した。基準とした受精に関連する47個のニワトリ遺伝子のうち、ヤンバルクイナのゲノム配列の中で確認できた遺伝子は44個であった。

次に、20 個体でこれら確認された 44 遺伝子について多型の有無を確認するため、各個体の組織を用いて DNA 抽出後、全ゲノムシーケンシング (WGS) を行った。WGS データを Reference 配列に張り付けることで (Mapping)、Reference 配列との違い・遺伝子多型を見ることができる。得られた生データに fastp ver. 0.20.0 (Chen, 2023) を用いて、データのクオリティの低い部分等の除去を行った。

Reference 配列は Mapping 効率、精度向上のため RepeatMasker

(<https://github.com/rmhubble/RepeatMasker>) にて処理しリピート配列領域 (トランスポゾン領域など) をマスクした。その後 bwa-mem2 (Md et al., 2019) を用いて Mapping を行った。Mapping 後に gatk (McKenna et al., 2010) を用いて variant を網羅的に示すファイルである vcf ファイルを出力した。その後 vcftools と Base Quality Score Recalibration による処理・フィルタリングを行い、より精度の高い vcf ファイルを出力した。出力された高精度 vcf ファイルをもとに当該遺伝子における変異・多型の特定を行った。同時に Mapping 結果より出力される bam ファイル (Mapping されたデータがコードされているファイル) も参照し多型特定を行った。

その結果、17 遺伝子に多型が確認された。さらに、これらの 17 遺伝子の多型と繁殖成績に関連があるのか確認するため、繁殖が成功したグループ (ヒナが産まれたことのあるペア: 雌 3 個体、雄 3 個体) と繁殖が失敗したグループ (ペアリングが成功したがヒナが産まれたことのないペア: 雌 3 個体、雄 1 個体) を対象に、上記の 17 遺伝子の多型の中にそれぞれのグループを特徴づけるものがあるのか確認した。解析は各個体より全ゲノムデータを取得し、上記と同様の方法で行った。

その結果、繁殖が失敗したグループに属する雌に特徴的な多型が認められた。今後は、繁殖成績に関するデータがある個体をさらに追加で解析し、多型と繁殖の成功について関連を評価する必要がある。

年齢推定については、ヤンバルクイナのゲノム配列をもとに、年齢既知の 47 個体を用いて RRBS 法 (Reduced representation bisulfite sequencing) を用いてゲノム全体にわたるメチル化を調べ、そのうち年齢と特に強い相関がある ($|r| > 0.7$) 箇所を用いて推定できた。

ヤンバルクイナのホルモン解析に関しては、捕獲時の糞を採取し、ストレスに関与していると考えられるステロイドホルモンを選択し、ストレスモニタリングに適したホルモンの同定を試みた。その結果、いずれのステロイドホルモンに関しても捕獲時のストレスを反映したホルモン濃度変化が得られなかった。一般的に鳥類ではコルチコステロン濃度測定によるストレス評価が可能とされているが、ヤンバルクイナの糞試料においてはストレス評価に適していないことが示唆された。次に、糞を採取し、性ステロイドホルモン濃度を測定した。繁殖に供さない (近接したケージに雄なし) 雌と人工繁殖に供した雌 (近接したケージに雄あり) の糞中性ステロイドホルモンのエストラジオール— 17β (E_2) およびプロジェステロン (P_4) 濃度動態を比較した結果、人工繁殖雌は産卵が観察され、産卵に伴った性ステロイドホルモン濃度変化が得られた。

一方で、繁殖に供さなかった雌に関しては、性ステロイドホルモン濃度の変化が全く見られなかった個体もいれば、変化がみられた個体もいた。しかし、その上昇値は産卵個体よりは低値であった。雄に関しては、糞中テストステロン濃度を測定した。その結果、雌の産卵日または産卵より前に高濃度を示していた。雌の産卵に同期してテストステロン濃度が変化している可能性が示唆された。一方で、サブテーマ2と連携して、精子活性および精子数とテストステロン濃度を比較した結果、顕著な関係性は見られなかった。

ヤンバルクイナの行動変化については、繊細で環境の変化に影響されやすい本種のために、個体に負担をかけない行動観察方法を模索し、ビデオカメラによる行動観察を実施した。対象個体は、自然繁殖ペア、人工繁殖ペア、繁殖に供さない個体を対象とした。毎日の膨大な録画データを取得したため、本研究期間中にすべてのデータを観察するに至らなかった。そのため、令和4年度に繁殖に供さない雌 (近接したケージに雄なし) と人工繁殖に供した雌 (近接したケージに雄あり) に焦点を当てて行動を観察した。その結果、繁殖に供した個体は産卵がみられ、産卵期は巣材の運搬や巣に座る時間等繁殖に

関係する行動が増加した。また、この時期は樹上での休息がほぼ見られず、産卵期が終了（7月）すると樹上での休息もしくは地上での採餌・移動のみを行うようになった。この他に、フェンス越しに飼育されていた雄個体に対する羽づくろい行動や交尾姿勢を取るような行動が見られた。一方で、繁殖に供さなかった雌は、いずれの期間も樹上での休息もしくは地上での採餌・移動等を主に行っていた。

5. サブテーマ1 研究目標の達成状況

サブテーマ1では、ツシマヤマネコとヤンバルクイナのゲノムや内分泌の情報など繁殖の成否に関わる分子基盤の整備を目的とした。飼育のほぼ全個体及び野生個体を目標数より多く解析し、ゲノムや内分泌に関する繁殖情報の高精度な指標が得られたことから、目標を大きく上回る成果を達成したと評価する。

II-2 サブテーマ2 「絶滅危惧野生動物の生殖細胞の活用と人工繁殖」

〔サブテーマ2 要旨〕

サブテーマ2では、ツシマヤマネコおよびヤンバルクイナの生殖細胞保存法の開発を目的に行った。ツシマヤマネコについては、野生死亡個体からの組織摘出、梱包、輸送までを48時間以内に行う短時間輸送を確立した。これにより、雄については生殖細胞を輸送し、精子の採取に成功した。凍結保存またはフリーズドライ保存し、計画していた個体数を大きく上回る個体の精子保存に成功した。運動精子を確認できた個体の新鮮精子を解析した。雌については卵巣を摘出し、卵子を回収して凍結保存を行った。以上のことから、ツシマヤマネコにおいての計画は十分達成できた。

ヤンバルクイナについては、精子採取は飼育個体を使用した。採精については、糞便の混入による品質低下を防止するため、糞便の混入しない精液採取法を樹立した。計画数を大きく上回る個体から精子を採取し、そのうち精子は凍結保存、フリーズドライ保存を行った。凍結精子の一部を融解し、詳細な解析を行った。卵巣については、成鳥死亡個体から摘出し、2日間での短時間輸送に成功した。輸送後の卵巣は卵胞発育を確認し、生存卵子が多数含まれていることを確認した。卵巣組織はニワトリで有効だったニードルを用いたガラス化法で凍結保存し、凍結後の卵巣については組織解析により本保存法の適用性を評価することで、ヤンバルクイナ組織の輸送方法、卵巣組織および卵子の凍結保存法の確立に成功した。以上のことから、ヤンバルクイナにおいての計画は十分達成できた。

1. サブテーマ2 研究開発目的

サブテーマ2では、ツシマヤマネコおよびヤンバルクイナの生殖細胞保存法を開発し、保存した精子および卵子の受精能力を評価する。また、保存した生殖細胞を活用して種ごとに最適化し、将来的により多くの個体で繁殖を可能とする繁殖補助技術確立する。

2. サブテーマ2 研究目標

サブテーマ2	「絶滅危惧野生動物の生殖細胞の活用と人工繁殖」
サブテーマ2 実施機関	岩手大学、京都大学、どうぶつたちの病院沖縄
サブテーマ2 目標	ツシマヤマネコとヤンバルクイナの生殖細胞保存法を開発する。サブテーマ1で収集し整備する遺伝的多様性や繁殖周期の情報に基づき、適切な繁殖個体を選別しペアを形成する。保存した生殖細胞を活用して体外授精による受精卵作製（ツシマヤマネコ）および人工授精による産子作出（ヤンバルクイナ）の事例を示す。これにより、次世代が作出可能な生殖細胞保存法であることを証明するとともに、生息域外保全を加速さ

	せる人工繁殖技術を開発する。 サブテーマ1で得られた繁殖の基盤情報をもとに保存すべき生殖細胞や個体を選定し、継続的な生息域外保全を可能とする野生個体由来遺伝子の導入のための人工繁殖技術を提案する。継続的な試料採取が可能なモデル動物のイエネコ、ニワトリも用いて、同様の方法で基礎データを収集する。 ツシマヤマネコ（およびイエネコ）では、生殖細胞保存法を開発し、ツシマヤマネコの死亡個体由来の生殖細胞を保存する（2020年度は5個体を保存済）。保存生殖細胞の受精能力評価および産子作出に利用できる受精卵を作製する。 ヤンバルクイナ（およびニワトリ）では、精子保存法を開発し、飼育下のヤンバルクイナ3個体分以上の精子を保存する。また、保存精子からの人工授精による産子を作出する。卵巣保存法の開発については、最初にニワトリをモデル動物として条件検討を行う。次にヤンバルクイナの死亡野生個体や国立環境研究所に保存中の卵巣を活用して適用性を評価する。 両種について、サブテーマ1の基盤情報とサブテーマ2の生殖細胞保存や繁殖成功に関して得られた情報を記録した個体別データベースを作製し、保護増殖事業に活用する。
--	---

3. サブテーマ2 研究開発内容

サブテーマ2では生殖組織採取法と生殖細胞保存法を開発した。

保存する生殖細胞の繁殖能力には、採取時の組織の状態が大きく影響するため、ツシマヤマネコについては、野生死亡個体からの組織採取法を確立するための条件検討を行った。雄については、摘出した精巣から精子を採取して、機能解析を行い、安定的な保存のために従来の凍結保存法に加え金子らが開発しているフリーズドライ保存法を用いた。雌については、藤原らが開発している凍結保存法を用いて、卵巣内に無数に存在する卵母細胞を保存した。また、受精可能な成熟卵子が回収された際にはガラス化法を用いて急速凍結保存することで、性成熟段階及び繁殖期に関わらない新しい生殖細胞保存技術を確立するための条件検討を行った。

ヤンバルクイナについては、飼育個体からの精子採取法を確立し、凍結およびフリーズドライ保存を行った。卵巣については、野生死亡個体からの卵巣採取法および実験室までの輸送法を確立し、凍結保存を行うとともに、凍結前の卵子の生存性を評価した。

また主要な対象種は両種とも継続的な試料採取が困難なため、モデル動物としてイエネコ、ニワトリも用いて、同様の方法で基礎データを収集した。

4. サブテーマ2 結果及び考察

ツシマヤマネコ

野生死亡雄個体からの組織採取法の条件を検討した。保存する精子は、高い運動性および受精能力を保持していなければならない。そこで、良好な精子を採取することを目的に野生死亡個体からの組織採取法の検討を行った。まず、イエネコを用いて組織摘出、梱包、輸送手順の検討について試験的に行った。対馬野生生物保護センターにおいて、去勢を目的としたイエネコの手術を実施した。摘出された精巣周辺組織を発泡スチロール製の箱に梱包した（図2-1）。民間の宅配業者に輸送を委託し冷蔵で岩手大学まで輸送した。48時間以内に岩手大に到着した精巣周辺組織から精巣上体を切り出し、精子を回収した。回収した精子は細胞培養液に懸濁し顕微鏡下で濃度および運動精子の有無を確認した。



図 2-1 輸送用梱包資材

上記の手順で、良好な精子の回収が確認できたことから、この方法をツシマヤマネコに応用することとした。交通事故等により発見された死亡個体から精巣周辺組織を摘出（図2-2）し、同様の方法で岩手大学に冷蔵輸送した。翌々日に岩手大に到着した精巣周辺組織から精巣上体を切り出し、精子を回収した。回収した精子は細胞培養液に懸濁し顕微鏡下で濃度および運動精子の有無を確認した（図2-3）。さらに精子運動解析装置（図2-4）を用いてさらに詳細な解析を行った。令和3年4月から令和6年3月まで輸送を実施した。精子の採取に成功し、凍結保存、フリーズドライ保存した。運動精子を確認できた個体の新鮮精子を解析した結果、**死亡個体から精巣を摘出し48時間以内で輸送した組織から運動精子を回収できた**ことは大きな成果であり、体外受精に利用できる精子を確保することができた。今回、**死体発見から組織摘出および岩手大までの短時間輸送を確立できた**ことが良好な精子を回収できた要因の一つと考えられる。



図 2-2 ツシマヤマネコの精巣

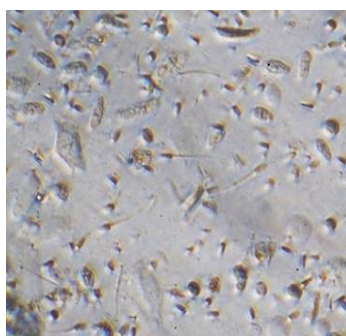


図2-3 精子の顕微鏡解析

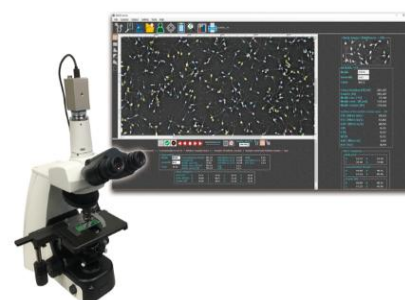


図 2-4 精子運動解析装置

また、全ての精子に運動性は確認できなかったが、運動性のない精子はフリーズドライ保存することで顕微授精に十分利用できる。我々は、フリーズドライ精子の受精能力をマウスやラットの卵子を用いて評価する方法を開発している。（Kaneko et al., Plos One 9, e113381, 2014）。この方法を用いて、保存したツシマヤマネコのフリーズドライ精子の受精能力を評価した。計画では3個体以上の精子の保存を予定していたが、その数を大きく上回る個体の精子の保存に成功した。

雌については、藤原らが開発している凍結保存法を用いて、卵巣内に多数存在する卵母細胞を卵巣組織ごと保存した。また、受精可能な成熟卵子が回収された際にはガラス化法を用いて急速凍結保存することで、**性成熟段階及び繁殖期に関わらない新しい生殖細胞保存技術を確立**した。令和3年度以降、今までに死亡個体からの卵巣提供があり、卵子を回収でき、凍結保存を行った（図2-6）。また、全ての個体で未成熟卵子を対象にした卵巣組織保存を実施した。

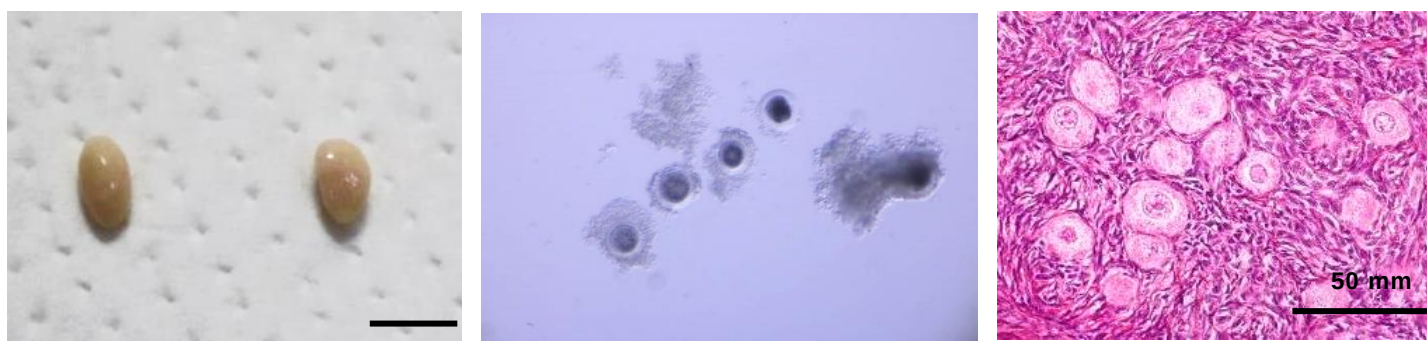


図2-6 ツシマヤマネコの卵巣（左）と、回収された卵子（中央）、および未成熟卵子を多数含んだ卵巣組織の組織像（ヘマトキシリン・エオシン染色、右）

さらに、多数の卵巣組織片を凍結保存したツシマヤマネコについて、凍結組織の一部を融解し、組織観察によって凍結保存の未成熟卵子への影響を解析した。

回収した卵子を体外受精させるためには、受精能を持つ第2減数分裂中期まで体外で成熟させる必要がある。一般的な卵子の体外成熟研究は、実験動物などで卵巣回収後、速やかに卵子の成熟を開始して行われる。一方、ツシマヤマネコの死亡個体から回収した卵巣は、摘出後速やかに輸送するものの、死後最低1日はかかるため、成熟率が低いと考えられる。そこで、成熟率を向上させるため、ツシマヤマネコから回収・輸送した卵巣を想定し、回収後1日経過したイエネコの卵巣を用いて、異なる培養条件で卵子の体外成熟を実施した。培養28時間後の卵子を染色体と微小管の蛍光染色によって詳しく成熟段階を調べた結果、一部の卵子で第2減数分裂中期まで成熟できていることが確認できた（図2-8）。現在、さらに成熟率を向上させ、ツシマヤマネコに応用するため、卵子の体外成熟法により詳細な検討を行っている。

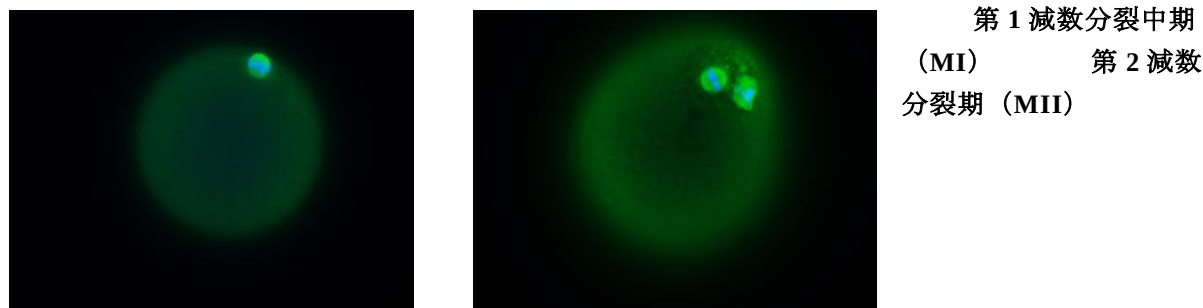


図 2-8 28 時間体外成熟した、ネコの卵子の蛍光染色写真。左が第 1 減数分裂中期（MI）の未成熟卵、右が第 2 減数分裂期（MII）の成熟卵（青：染色体、緑：微小管。右は紡錘体が二つ観察され、第 2 減数分裂中期に達していることがわかる。）

ヤンバルクイナ

ヤンバルクイナの精子採取は、飼育個体を使用するため計画的な採取が可能である。そのため、本計画では飼育施設において採精から保存までの作業を実施した。鳥類は組織の構造上、採精時に糞便が混入することがあり精子の運動性に影響を及ぼす。また、保定によるストレスが採精量に影響を与えると考えられた。このことから、保定の繰り返しによるストレスを緩和するために綿密な採精スケジュールを立てて、保定方法や刺激方法を改善することで糞便の混入しない精液採取法を樹立した。令和3年から5年度において、計画数を大きく上回る個体から精子を採取した。そのうち、精子は凍結保存、フ

リーズドライ保存を行った。凍結精子の一部を融解し、顕微鏡下で濃度および運動精子の有無を確認した。さらに精子運動解析装置を用いてさらに詳細な解析を行った。

ヤンバルクイナの雌の配偶子保存については、まずはモデル動物としてニワトリを用い、鳥類の卵子保存に適した卵巣の輸送条件を検討した。L15液を基礎培地とした保存液で卵巣を室温下と冷蔵下それぞれで保存し、輸送時の保存温度条件および保存日数の卵子の生存性へ与える影響を検討した。その結果、室温下では死後1日まで卵子の生存性が維持されたのに対し、冷蔵下では死亡後3日目まで卵子の生存性の維持が確認できた。さらに、この条件下で保存・輸送した卵巣を、ニードルを用いたガラス化凍結法によって凍結保存したところ、卵巣組織ごと凍結保存した後も一部の卵子は生存性を維持していることを確認できた。このことから、死後3日目までに冷蔵条件下で実験室へ輸送し、ガラス化凍結を行うことで、卵子を凍結保存できることを示した（図2-10）。この成果は国際学術誌で発表した。

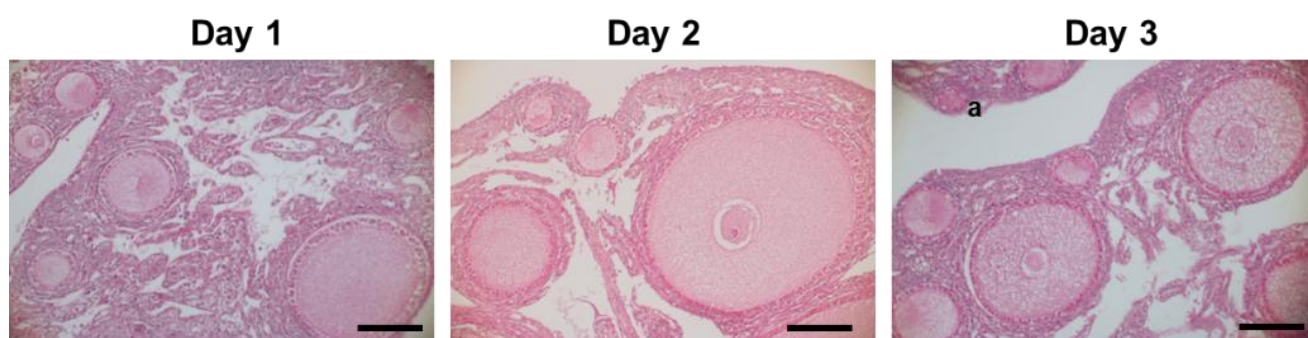


図2-10 冷蔵下で1～3日間保存後、凍結保存したニワトリ卵巣組織の組織像（ヘマトキシリン・エオシン染色）。保存3日目の卵巣でも、凍結後に正常な形態の卵子が観察された。

さらに、野生ヤンバルクイナの成鳥死亡個体が収容された際、ニワトリで見出した条件を応用し、卵巣を採取し、京都まで卵子の凍結保存のために輸送した。一般的に、沖縄からの荷物は空輸する関係で冷蔵輸送できないが、事前に長時間保冷できる定温輸送容器や特殊な保冷剤を準備し、民間の運送会社と契約を結ぶとともに、卵巣用の保存液を準備・保管しておくことで、ヤンバルクイナの卵巣を保存液中で冷蔵状態のまま、最短日数（採材・発送の翌日、死後2日目）で輸送することができた（図2-11）。ヤンバルクイナの卵巣を受け取り、凍結保存を実施した。受け取った卵巣は形態観察を行い、卵胞発育を確認するとともに、ニワトリで用いた生存性解析の手法を用いて、全てで生存卵子が多数含まれていることを確認した（図2-12）。卵巣組織はニワトリで有効だったニードルを用いたガラス化法で凍結保存し（図2-13）、凍結後の卵巣の一部は融解して、生存性解析、および組織解析により本保存法の適用性を評価した。その結果、全ての個体で凍結後の卵巣でも卵子の生存性を確認し、一部の卵子は凍結前と同様の状態で形態の正常性が維持されていることを確認できた。

これらのことから、ヤンバルクイナ組織の輸送方法、卵巣組織および卵子の凍結保存法の確立に成功した。



図 2-11 ヤンバルクイナ卵巣の入る定温輸送容器（沖縄より到着時）

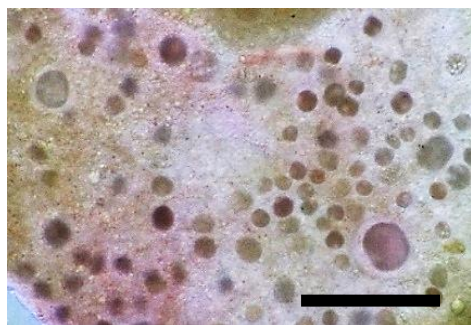


図2-12 ニュートラルレッド染色による生存性評価
赤く染色＝生存卵子。Bar = 0.5 mm



図2-13 ヤンバルクイナの卵巢（左）と、ニードルを用いた卵巢組織のガラス化凍結保存（右）

死亡個体には年齢既知の追跡個体も含まれることから、ヤンバルクイナの年齢と卵巢内動態との関連を知る上でも有用な情報となる。

ツシマヤマネコの飼育個体の生殖細胞保存や精子性状の情報を一括記録するデータベースを構築し、サブテーマ1のゲノムやホルモン情報と連携できるようにした。データベースをもとに生殖細胞保存を実施した個体とサブテーマ1で基盤情報を調べた個体について、共通する個体で結果を比較した結果、ツシマヤマネコの飼育個体のうち、雌1個体で死亡直前の繁殖期まで性ホルモン濃度動態をモニタリングしており、ホルモン測定によって繁殖能力（卵胞発育）を示した個体から生殖細胞を回収できたことから、本連携により、繁殖基盤情報を元に生殖細胞保存に供する個体の選定が可能であることを示せた。

凍結精子及び卵巢は、長期保存のために国立環境研究所に輸送し保管した。

5. サブテーマ2 研究目標の達成状況

サブテーマ2では、ツシマヤマネコとヤンバルクイナの生殖細胞保存法の開発を目的とした。死亡個体や飼育個体から良質な生殖細胞の採取に成功し、48時間以内の短期間の輸送体制の構築により受精能力を保持した生殖細胞を保存した。数値目標以上の個体からの採取、保存ができたことから、目標を大きく上回る成果を達成したと評価する。

III. 研究成果の発表状況の詳細

※この項目の成果番号は通し番号です。

(1) 成果の件数

成果の種別	件数
査読付き論文：	14
査読付き論文に準ずる成果発表（人文・社会科学分野）：	0
その他誌上発表（査読なし）：	15
口頭発表（国際学会等・査読付き）：	49
口頭発表（学会等・査読なし）：	27
知的財産権：	0
「国民との科学・技術対話」の実施：	22
マスコミ等への公表・報道等：	33
研究成果による受賞：	3
その他の成果発表：	0

(2) 誌上発表

<査読付き論文>

成果 番号	【サブテーマ1】の査読付き論文
1	Qi H, Kinoshita K, Mori T, Matsumoto K, Matsui Y, Inoue-Murayama M (2021) Age estimation using methylation-sensitive high-resolution melting (MS-HRM) in both healthy felines and those with chronic kidney disease. Scientific Reports, 1(1):19963. Doi: 10.1038/s41598-021-99424-4
2	Kusuda S, Funahashi T, Adachi I, Yamamoto H, Nagao E, Matsui K, Akiba Y (2022) Fecal Glucocorticoid Metabolites as a Noninvasive Indicator of Stress in the Tsushima Leopard Cats (<i>Prionailurus bengalensis euptilurus</i>): Application to Health Care. Animals, 12(9):1072. Doi: 10.3390/ani12091072
3	Ito H, Nakajima N, Onuma M, Inoue-Murayama M (2022) Comparison of the Genetic Diversity of the Captive and Wild Populations of the Tsushima Leopard Cat Using a GRAS-Di Analysis. Animals12(11):1464. Doi: 10.3390/ani12111464
4	Katayama M, Fukuda T, Kaneko T, Nakagawa Y, Tajima A, Naito M, Ohmaki H, Endo D, Asano M, Nagamine T, Nakaya Y, Saito K, Watanabe Y, Tani T, Inoue-Murayama M, Nakajima N, Onuma M (2022) Induced pluripotent stem cells of endangered avian species. Communications

	BIOLOGY, 5:1049. Doi.org/10.1038/s42003-022-03964-y www.nature.com/commsbio
5	Matsumoto Y, Konno A, Ishihara G, Inoue-Murayama M (2023) Genetic dissection of behavioral traits related to successful training of drug detection dogs. Scientific Reports, 13:7326. Doi.10.1038/s41598-023-33638-6
6	Yagi G, Qi H, Arai K, Kita YF, Kogi K, Morisaka T, Yoshioka M, Inoue-Murayama (2023) Non-invasive age estimation based on fecal DNA using methylation-sensitive high-resolution melting for Indo-Pacific bottlenose dolphins. Molecular Ecology Resources. Doi: 10.1111/1755-0998.13906
7	Arai K, Qi H, Inoue-Murayama M (2023) Age estimation of captive Asian elephants (<i>Elephas maximus</i>) based on DNA methylation: An exploratory analysis using methylation-sensitive high-resolution melting (MS-HRM). PLOS ONE, 18(12): e0294994. Doi: 10.1371/journal.pone.0294994
8	Qi H, Lim QL, Kinoshita K, Nakajima N, Inoue-Murayama M (2024) A cost-effective blood DNA methylation-based age estimation method in domestic cats, Tsushima leopard cats (<i>Prionailurus bengalensis euptilurus</i>), and <i>Panthera</i> species, using targeted bisulfite sequencing and machine learning models. Molecular Ecology Resources, 24(3): e13928. Doi.org/10.1111/1755-0998.13928

成果 番号	【サブテーマ2】の査読付き論文
9	Taketsuru H, Tsukada Y, Kaneko T(2021) Survivability and subsequent development of vitrified early-stage mouse embryos after warming at different temperatures. Biochemical and Biophysical Research Communications, 591:50-53. Doi: 10.1016/j.bbrc.2021.12.092
10	Nakagawa Y, Kaneko T (2022) Treatment with MG132 prevents spontaneous activation of rat oocyte in culture and promotes embryonic development after intracytoplasmic sperm injection. Scientific Reports, 12(1):2706. Doi: 10.1038/s41598-022-06714-6
11	Endo M, Tsunoda S, Tawara H, Abe H, Kaneko T (2022) Successful pseudopregnancy of rats by short period artificial stimulation using sonic vibration. Scientific Reports, 12(1):1187. Doi: 10.1038/s41598-022-05293-w
12	Fujihara M, Shiraishi J, Onuma M, Ohta Y, Inoue-Murayama M (2022) Cryopreservation competence of chicken oocytes as a model of endangered wild birds: Effects of storage time and temperature on the ovarian follicle survival. Animals, 12(11):1434. Doi.org/10.3390/ani12111434
13	Wake Y, Endo M, Tsunoda S, Tawara H, Abe H, Nakagawa Y, Kaneko T. (2023) Successful induction of pseudopregnancy using sonic vibration in mice. Scientific Reports, 13(1):3604. Doi: 10.1038/s41598-023-30774-x
14	Fujihara M, Inoue-Murayama M (2024) The wildlife biobanking of germ cells for in situ and ex situ conservation in Japan. Theriogenology Wild,4:100086. Doi:/10.1016/j.therwi.2024.100086

<査読付き論文に準ずる成果発表（人文・社会科学分野）>
特に記載すべき事項はない

<その他誌上発表（査読なし）>

成果 番号	【サブテーマ1】のその他誌上発表（査読なし）
15	村山美穂 (2023) ゲノム、ホルモン、細胞から生息域外保全を促進する. 生物の科学 遺伝 77(5): 336-340.
16	伊藤英之 (2023) ツシマヤマネコの遺伝解析. 生物の科学 遺伝, 77(5): 341-345
17	大沼 学 (2023) ヤンバルクイナにおける遺伝資源保存の現状. 生物の科学 遺伝, 77(5): 346-351
18	楠田哲士、足立 樹 (2023) 動物園と進めるツシマヤマネコの繁殖生理研究. 生物の科学 遺伝, 77(5): 352-357
19	斉恵元 (2023) DNA メチル化から動物の年齢を知る. 生物の科学 遺伝, 77(5): 374-375

20	田中千聖、伊藤英之、伊谷原一、木下こづえ (2023) 「ストレス」を行動とホルモンから推測する. 生物の科学 遺伝, 77(5): 358-364
21	楠田哲士 (2023) 動物園と進めるネコ科動物の繁殖研究—飼育下繁殖から生息域外保全へ. TOBA SUPER AQUARIUM 84: 14-15
22	村山美穂 (2024) 動物からみた“個性” 特集 脳と個性 生体の科学 75(1): 45-50.
23	斉恵元 (2024) DNA ネコ科の多様な種におけるエピジェネティックロックの開発—小型種から大型種、飼育から野生まで. 生物の科学 遺伝, 78(3): 196-201

成果 番号	【サブテーマ2】のその他誌上発表（査読なし）
24	藤原摩耶子、村山美穂 (2021) 「野生動物の保全を目的にしたメス遺伝資源バンクの整備」. アグリバイオ、5巻、39-42
25	藤原摩耶子 (2022) 「生息域外保全における種の保全～配偶子から個体まで～」. 「野生生物と社会」学会ワイルドライフフォーラム、27巻（1）、6-8
26	金子武人 (2022) 私の研究「フリーズドライ精子保存法」. LABIO21, 85:21-24
27	長嶺 隆、中谷裕美子 (2023) ヤンバルクイナの棲む森と生息域外保全. 生物の科学 遺伝, 77(5): 332-334
28	金子武人 (2023) 希少野生動物の人工繁殖を目的とした精子保存と受精技術. 生物の科学 遺伝, 77(5): 364-368
29	藤原摩耶子 (2023) 希少野生動物の人工繁殖を目的とした精子保存と受精技術. 生物の科学 遺伝, 77(5): 369-373

(3) 口頭発表

<口頭発表（国際学会等・査読付き）>

成果 番号	【サブテーマ1】の口頭発表（国際学会等・査読付き）
30	Yoshimura H, Hayakawa T, Qi H, Kikuchi DM, Jumabay-Uulu K, Sharma K, Hirata Satoshi, Kinoshita K (2021) Plants for carnivores: Metabarcoding analysis of wild snow leopards (<i>Panthera uncia</i>) focusing on dietary plant species. The 16th International Symposium on Primatology and Wildlife Science
31	Kuriyama Y, Kinoshita K, Izawa M, Idani G (2021) Reproductive physiology of Iriomote cat (<i>Prionailurus bengalensis iriomotensis</i>). The 16th International Symposium on Primatology and Wildlife Science
32	Tanaka C, Kinoshita K, Iwashita A, Idani G (2021) Relationship between stress hormone concentration and behavioral changes in captive Tsushima leopard cats (<i>Prionailurus bengalensis euptilurus</i>). The 16th International Symposium on Primatology and Wildlife Science（ポスター発表）
33	Ito H, Nakajima N, Onuma M, Murayama M. (2021) The genetic diversity, structure and demographic history in Tsushima leopard cat (<i>Prionailurus bengalensis euptilurus</i>). 第14回アジア保全医学会・第27回日本野生動物医学会 2021年合同大会（ハイブリッド：オンラインとオンライン同時開催）（ポスター発表）
34	斉 恵元、木下こづえ、森 尚志、松本佳織、松井由希子、村山美穂 (2021) DNA メチル化を指標としたネコ科動物の年齢推定. DNA 多型学会第30回学術集会
35	木下こづえ (2021) 野生動物と動物園動物をつなぐ研究、と保全活動～ユキヒョウを例に～. 日本哺乳類学会2021年度大会
36	Tanaka C, Kinoshita K, Iwashita A, Idani G (2022) Evaluating stressors in captive Tsushima leopard cats (<i>Prionailurus bengalensis euptilurus</i>) based on stress hormone concentration and behavioral changes. The 17th International Symposium on Primatology and Wildlife Science (Online),（ポスター発表）

37	Arai K, Qi H, Inoue-Murayama M (2022) Age Prediction for Captive Asian Elephants Using Methylation-Sensitive High-Resolution Melting (MS-HRM). The 15th International Conference of Asian Society of Conservation Medicine.
38	Kuriyama Y, Kinoshita K, Izawa M, Murayama M, Idani G (2022) How can we get information from old fecal samples of Iriomote cats?: Methods for species identification, sex determination, and hormone measurements. The 17th International Symposium on Primatology and Wildlife Science.
39	Suzuki S, Qi H, Naito-Liederbach AM, Nakaya Y, Nagamine T, Onuma M, Inoue-Murayama M (2022) Estimating Epigenetic Age in Okinawa rail (<i>Hypotaenidia okinawae</i>) using Methylation-Sensitive High-Resolution Melting (MS-HRM) The 17th International Symposium on Primatology and Wildlife Science (Online) (ポスター発表)
40	Qi H, Nakajima N, Iwashita A, Hata D, Kinoshita K, Inoue-Murayama M (2022) Age estimation of Tsushima leopard cats based on DNA methylation. The 15th International Conference of Asian Society of Conservation Medicine (ポスター発表)
41	鈴木菜緒, 足立 樹, 加藤俊紀, 佐藤康弘, 斎藤裕樹, 井之上尚文, 瀬尾亮太, 土佐祐輔, 楠田哲士 (2022) ツシマヤマネコにおける糞中の性ステロイドホルモン代謝物の動態と行動の関係からみた行動的発情指標の検討. 第5回野生動物保全繁殖研究会大会 (ポスター発表)
42	鈴木菜緒, 足立 樹, 斎藤裕樹, 井之上尚文, 楠田哲士 (2022) 飼育下ツシマヤマネコにおける糞中プロジェステロンおよび 13,14-dihydro-15-keto-PGF $_{2\alpha}$ 濃度測定による排卵確認・妊娠判定と動物園での排卵・妊娠率. 第5回野生動物保全繁殖研究会大会
43	楠田哲士, 佐藤哲也, 堀 秀正, 栗田正徳, 中川大輔, 尾形光昭, 堀 達也, 柳川洋二郎, 藤原摩耶子, 金子武人, 大沼 学, 下川優紀, 高柳真世 (2022) 動物園水族館繁殖研究アライアンスの紹介と活動報告 (2021 年度). 第5回野生動物保全繁殖研究会大会
44	木下こづえ (2022) 希少ネコ科動物たちの生理状態を知る. 日本動物心理学会第 82 回大会
45	田中千聖, 木下こづえ, 岩下明生, 木滑黄平, 伊谷原一 (2022) 糞中ストレスホルモン分析と行動解析によるツシマヤマネコのストレス評価, 第 28 回日本野生動物医学会大会. (ポスター発表)
46	小澤賢一, 東美緒, 北濱健太, 大塚亮真, 金子武人, 木下こづえ (2022) アムールヒョウの行動学的保定下用手採精による精液性状の基礎研究. 第5回野生動物保全繁殖研究会大会
47	村山美穂, 佐藤悠, 伊藤英之 (2023) 絶滅危惧動物種の保全への遺伝的多様性データの活用. 第 70 回日本生態学会大会.
48	Kinoshita K, Yoshimura H, Qi H, Shimada J, Hayakawa T, Kusuda S, Khanal G (2023) An attempt to evaluate the physiology of wild snow leopards using fecal steroid hormone analysis. 8th Conference of the International Society of Wildlife Endocrinology.
49	Hattori M, Kinoshita K, Saito A, Yamamoto S (2023) Effects of oxytocin administration on cat-human interaction. The Animal Behavior Society.
50	村山美穂, 藤原摩耶子 (2023) ゲノム情報と卵子バンクを活用した野生動物の生息域外保全 第 46 回日本分子生物学会年会シンポジウム「絶滅生物と新世代技術」
51	高橋明帆, 井戸優海, 小村 潤, 浦川 翔, 西中高志, 田邊哲哉, 木下佳奈, 大峽 芽, 長嶋敏博, 中川大輔, 佐藤哲也, 楠田哲士 (2023) 飼育下スナドリネコにおける糞中エストロゲン濃度動態と発情行動パターン. 第 6 回野生動物保全繁殖研究会大会 (ポスター発表)
52	尾形光昭, 楠田哲士, 中川大輔 (2023) 動物園水族館繁殖研究アライアンスの活動報告 (2022 年度). 第 6 回野生動物保全繁殖研究会大会 (ポスター発表)
53	井戸優海, 唐沢瑞樹, 田島日出男, 吉澤 円, 地挽良典, 楠田哲士 (2023) 飼育下の雌雄アムールヤマネコにおける糞中の性ステロイドホルモン代謝物濃度動態と行動を指標とした発情期および妊娠期の非侵襲的モニタリング. 第 6 回野生動物保全繁殖研究会大会 (ポスター発表)
54	加藤 輝, 楠田哲士 (2023) ネコ科動物における糞中の性ステロイドホルモン代謝物の簡易抽出および簡易測定 of 検討. 第 6 回野生動物保全繁殖研究会大会 (ポスター発表)
55	岡本優芽, 服部円, 村山美穂 (2023) ネコ (<i>Felis catus</i>) の行動特性とアンドロゲン受容体遺伝子型の関連. 第 42 回日本動物行動学会大会.
56	山根美子, 大塚亮真, 玉那覇彰子, 向 真一郎, 中谷裕美子, 長嶺隆, 村山美穂, 木下こづえ (2023) 性ステロイドホルモン濃度と行動変化からヤンバルクイナの繁殖特性を探る. 第 42 回日本動物行動学会大会

57	Okamoto Y, Hattori M, Arahori M, Inoue-Murayama M (2023) Factors that relate to cats' behavior: assessing the relationship between polymorphism in the oxytocin receptor gene and behavior questionnaire results. 日本動物心理学会第 83 回大会
58	佐藤 悠、村山美穂、大沼学 (2023) 島国の鳥類ゲノム：イヌワシとヤンバルクイナの多様性. 第70回日本生態学会大会.
59	唐沢瑞樹、田島日出男、楠田哲士 (2023) 【話題提供】井の頭自然文化園におけるアムールヤマネコの繁殖～日常の飼育管理の中で繁殖のためにできる小さな取り組み～. 第6回野生動物保全繁殖研究会大会
60	足立 樹、川上那於、井之上尚文、斎藤祐樹、白木康雄、加藤俊紀、瀬尾亮太、井上 啓、鈴木菜緒、井戸優海、楠田哲士 (2023) 飼育下ツシマヤマネコにおける自然繁殖の現状について. 第6回野生動物保全繁殖研究会大会
61	鈴木彩月、内藤アンネグレート素、大沼学、長嶺隆、中谷裕美子、村山美穂 (2024) DNAメチル化を指標としたヤンバルクイナの年齢推定. 第71回日本生態学会大会 (ハイブリッド：オンサイトとオンライン同時開催) (ポスター発表)
62	内藤アンネグレート素、佐藤 悠、三浦匡哉、村山美穂 (2024) ニホンイヌワシにおける主要組織適合性複合体 (MHC) 遺伝子の多様性と繁殖への影響. シンポジウム「種の保存法に基づく保護増殖事業対象種の保全ゲノミクス」第71回日本生態学会大会 (ハイブリッド：オンサイトとオンライン同時開催)
63	佐藤 悠、村山美穂、大沼学 (2024) 島国の鳥類ゲノム：イヌワシとヤンバルクイナの多様性. 日第71回日本生態学会大会 (ハイブリッド：オンサイトとオンライン同時開催)
64	村山美穂、藤原摩耶子、佐藤悠 (2024) ゲノムと生殖細胞による野生動物保全の取り組み. 動物園水族館大学. (ポスター発表)
65	關 真理江、尾川楽人 (2024) ツシマヤマネコ野生順化ステーション内外における野生および飼育個体の行動および生理的变化の関係. 対馬学フォーラム (ポスター発表)
66	斎藤裕樹、山崎理恵子、楠田哲士 (2024) ツシマヤマネコ繁殖の取り組みと3個体の特筆すべき繁殖事例報告. 日本動物園水族館協会第71回動物園技術者研究会
67	井戸優海、唐沢瑞樹、田島日出男、吉澤 円、地挽良典、楠田哲士 (2024) アムールヤマネコの発情期と妊娠期における糞中ホルモンと行動のモニタリング. 第5回動物園水族館大学シンポジウム.

成果 番号	【サブテーマ2】の口頭発表 (国際学会等・査読付き)
68	Fujihara M, Inoue-Murayama M (2021) "Vitrification of ovarian tissues and development of primordial follicles by in vitro culture/ xenotransplantation in model animals". European Society of Medicine (ESMED) congress 2022, Vienna, Austria (ハイブリッド：オンライン参加)
69	Fujihara M, Kinoshita K, Ito H, Kusuda S, Otsuka R, Kaneko T, Nagamine T, Onuma M, Nakaya Y, Kawashima T, Inoue-Murayama M (2021) Ex situ conservation of endangered wildlife, Tsushima leopard cats and Okinawa rails, using germ cells. 第 14 回アジア保全医学会・第 27 回日本野生動物医学会 2021 年合同大会 (ハイブリッド：オンサイトとオンライン同時開催) (ポスター発表)
70	金子武人、遠藤茉里奈、角田繁巳、俵博祐、中川優貴、安部寿幸、外尾亮治 (2022) ラットにおける人工偽妊娠誘起法の開発. 第 69 回日本実験動物学会総会 (ポスター発表)
71	竹鶴裕亮、平山瑠那、夏目里恵、阿部学、崎村建司、笹岡俊邦、金子武人 (2022) ラット GV 期卵の体外成熟に及ぼす顆粒膜細胞の影響. 第 69 回日本実験動物学会総会 (ポスター発表)
72	中谷裕美子 (2022) ヤンバルクイナの域外保全～野生復帰を目指して～. 日本飼育技術学会 (オンライン)
73	金子武人 (2023) 希少野生動物配偶子バンクの構築と保存配偶子を用いた生殖技術の開発. 第 6 回野生動物保全繁殖研究会大会
74	中川優貴、金子武人 (2023) MG132 を用いたラット卵子の自発的活性化抑制が顕微授精後の胚発生に及ぼす影響. 第 70 回日本実験動物学会総会 (ポスター発表)
75	竹鶴裕亮、平山瑠那、夏目里恵、阿部学、崎村建司、笹岡俊邦、金子武人 (2023) ラット卵巣内 GV 期卵の体外成熟および受精後の発生について. 第 70 回日本実験動物学会総会 (ポスター発表)

76	藤原摩耶子、西本千夏、村山美穂 (2023) ツシマヤマネコをはじめとする野生ネコ科動物の卵子保存. 第 6 回野生動物保全繁殖研究会大会
77	片山雅史、福田智一、金子武人、中川優貴、田島淳史、内藤充、大槇仁美、遠藤大二、浅野玄、長嶺隆、中谷裕美子、齊藤慶輔、渡邊有希子、谷哲弥、村山美穂、中嶋信美、大沼学 (2023) 絶滅危惧鳥類 4 種からの iPS 細胞の樹立. 第 29 回日本野生動物医学会大会
78	Fujihara M (2024) Wildlife biobanking for in-situ and ex-situ conservation in Japan. The 50th Annual Conference of International Embryo Technology Society (IETS), CANDES Preconference Symposium

<口頭発表（学会等・査読なし）>

成果 番号	【サブテーマ 1】の口頭発表（学会等・査読なし）
79	村山美穂 (2022) 「プロジェクト紹介」. 公開シンポジウム「知りたい！ツシマヤマネコ保全の最前線」(オンライン)
80	楠田哲士、木下こづえ (2022) 「ツシマヤマネコの繁殖をフンから調べる～飼育下繁殖の推進にむけて」. 公開シンポジウム「知りたい！ツシマヤマネコ保全の最前線」(オンライン)
81	伊藤英之 (2022) 「ツシマヤマネコの遺伝子解析」. 公開シンポジウム「知りたい！ツシマヤマネコ保全の最前線」(オンライン)
82	村山美穂 (2022) 鳥類、哺乳類の生息域外保全. 日本学術会議公開シンポジウム「生物多様性からみたワイルドサイエンス」(オンライン)
83	鈴木 彩月 (2022) 経過報告：「DNA からヤンバルクイナの年齢を知る」. 公開シンポジウム「知りたい！ヤンバルクイナ保全の最前線」(オンライン)
84	大沼 学 (2022) 「交通事故にあったヤンバルクイナから分かることー国立環境研究所におけるヤンバルクイナの保全活動ー」. 公開シンポジウム「知りたい！ヤンバルクイナ保全の最前線」(オンライン)
85	山根 美子・大塚 亮真・木下 こづえ (2022) 経過報告：「行動とホルモンからヤンバルクイナの繁殖特性を知る」. 公開シンポジウム「知りたい！ヤンバルクイナ保全の最前線」(オンライン)
86	楠田哲士 (2023) ネコ科動物の繁殖推進にむけた非侵襲的な排卵確認と妊娠判定. 第 6 回野生動物保全繁殖研究会大会開催記念：東京動物園協会 保全繁殖研究シンポジウム「ネコ科絶滅危惧種をまもる動物園での繁殖の取組」
87	小澤賢一、池田美緒、北濱健太、金子武人、木下こづえ (2023) アムールヒョウにおける行動的保定下用手採精による精液性状の基礎研究. 京都大学野生動物研究センター共同利用研究会 2022
88	楠田哲士 (2023) 動物園学入門：絶滅の危機にある野生動物をまもる. 群馬県立勢多農林高等学校 講演会
89	楠田哲士 (2023) 動物園学入門：絶滅の危機にある野生動物をまもる. 岐阜大学応用生物科学部 オープンキャンパス 2023 模擬講義
90	楠田哲士 (2023) 動物園学入門：絶滅の危機にある野生動物をまもる. 岐阜県立大垣北高等学校
91	楠田哲士 (2023) 動物園学入門：絶滅の危機にある野生動物をまもる. 三重県立神戸高等学校
92	楠田哲士 (2023) かわいいツシマヤマネコの危機と保全. NHK 文化センター講座
93	村山美穂 (2023) 「ゲノム、ホルモン、細胞から生息域外保全を促進する」公開シンポジウム「野生動物ラボの挑戦-ヤンバルクイナとツシマヤマネコ保全の最前線-」(ハイブリッド)
94	楠田哲士、木下こづえ (2023) 「ツシマヤマネコの繁殖生理研究とストレスの評価ー飼育下繁殖の推進にむけて」公開シンポジウム「野生動物ラボの挑戦-ヤンバルクイナとツシマヤマネコ保全の最前線-」(ハイブリッド)
95	佐藤 悠、大沼学、伊藤英之 (2023) 「多様性喪失？ヤンバルクイナとツシマヤマネコのゲノム解析」公開シンポジウム「野生動物ラボの挑戦-ヤンバルクイナとツシマヤマネコ保全の最前線-」(ハイブリッド)

96	村山美穂 (2024)「動物の社会性の遺伝的背景を探る」ヒトの発達と社会性に関するヒューマンサイエンス研究領域連携拠点 企画シンポジウム (招待講演)
97	尾川楽人 (2024) ツシマヤマネコにおけるストレスホルモン変化と行動変化の関係とその展望. 令和5年度ツシマヤマネコ研究報告会
98	關真理江 (2024) 野生ツシマヤマネコの食性解析の試みと飼育個体に接近する野生個体について. 令和5年度ツシマヤマネコ研究報告会
99	斉恵元 (2024) ツシマヤマネコの血液および糞からの年齢推定. 令和5年度ツシマヤマネコ研究報告会

成果番号	【サブテーマ2】の口頭発表 (学会等・査読なし)
100	藤原摩耶子 (2022) 「生殖細胞保存によるツシマヤマネコ保全の可能性」. 公開シンポジウム「知りたい！ツシマヤマネコ保全の最前線」(オンライン)
101	金子武人 (2022) 「ヤンバルクイナの精子保存と人工授精への挑戦」. 公開シンポジウム「知りたい！ヤンバルクイナ保全の最前線」(オンライン)
102	中谷裕美子 (2022) 「ヤンバルクイナの飼育下繁殖ー野生復帰をめざしてー」. 公開シンポジウム「知りたい！ヤンバルクイナ保全の最前線」(オンライン)
103	金子武人 (2023) 人工偽妊娠誘起法を用いた胚移植について. 第57回日本実験動物技術者協会総会
104	金子武人、藤原摩耶子 (2023) 「希少野生動物の人工繁殖に活用する生殖細胞保存技術の開発」公開シンポジウム「野生動物ラボの挑戦-ヤンバルクイナとツシマヤマネコ保全の最前線-」(ハイブリッド)
105	長嶺 隆 (2023) ヤンバルクイナの絶滅の危機の立ち向かう科学者たち」公開シンポジウム「野生動物ラボの挑戦-ヤンバルクイナとツシマヤマネコ保全の最前線-」(ハイブリッド)

(4) 知的財産権

特に記載すべき事項はない。

(5) 「国民との科学・技術対話」の実施

成果番号	実施年度	【サブテーマ1】の実施状況
106	2021	木下こづえ「動物たちの落とし物“糞”から彼らの内面を読み解く」第10回ふれデミックカフェ@KRPwith 京大オリジナル (主催：京大オリジナル、オンライン、2021年6月18日、参加者約80名) にて推進費プロジェクトの紹介
107	2021	木下こづえ、野生動物と動物園動物をつなぐ研究、と保全活動～ユキヒョウを例に～、日本哺乳類学会2021年度大会公開シンポジウム「学生の皆さん、コロナが収束したら海外フィールドワークに飛び出そう！」(主催：日本哺乳類学会、オンライン、2021年8月28日、参加者約400名) にて推進費プロジェクトの紹介
108	2021	伊藤英之、京都市立錦林小学校授業「絶滅危惧種とは？」(2021年9月9日、参加者100名) にて推進費プロジェクトの紹介
109	2021	楠田哲士、第10回やまねこ博覧会「ツシマヤマネコにおける生殖細胞を活用した生息域外保全」「絶滅危惧種ツシマヤマネコの繁殖ー動物園との生息域外保全研究」(主催：京都市動物園、京都市動物園、2021年10月17日、参加者6,019名) にてパネル展示と解説
110	2021	斉 恵元、木下こづえ、大牟田市動物園オンラインイベント (2022年1月23日、参加者約80名) にて推進費プロジェクトの紹介
111	2022	村山美穂、兵庫県阪神シニアカレッジにおける授業「イヌはなぜヒトの友達になった？遺伝子から見る動物のこころ」(2022年2月2日、聴講者約200名) にて推進費プロジェクトの紹介

112	2022	公開シンポジウム「知りたい！ツシマヤマネコ保全の最前線」（主催：公開シンポジウム「知りたい！ツシマヤマネコ保全の最前線」実行委員会、オンライン、2022年2月5日、参加者160名）にて研究成果紹介
113	2022	村山美穂「鳥類・哺乳類の生息域外保全」日本学術会議シンポジウム 生物多様性とワイルドサイエンス（主催：日本学術会議ワイルドライフサイエンス分科会、オンライン、2022年2月26日、参加者119名）にて推進費プロジェクトの紹介
114	2022	村山美穂、兵庫県阪神シニアカレッジにおける授業「イヌはなぜヒトの友達になった？遺伝子から見る動物のこころ」（2022年6月24日、聴講者約200名）にて推進費プロジェクトの紹介
115	2022	楠田哲士、聖マリア女学院高等学校出前講義「動物園学入門：絶滅の危機にある野生動物をまもる」（2022年7月5日、聴講者26名）にてツシマヤマネコの域外保全と繁殖研究の紹介
116	2022	村山美穂、福岡県立筑紫丘高等学校学外授業「野生動物保全ラボの挑戦」（2022年7月27日、聴講者13名）にて推進費プロジェクトの紹介
117	2022	伊藤英之、楠田哲士 第11回やまねこ博覧会「ツシマヤマネコの保全に向けた研究」（主催：京都市動物園、京都市動物園、2022年10月16日、参加者60名）にてパネル展示と講演会
118	2022	楠田哲士ヤマネコ祭2022「ツシマヤマネコにおける生殖細胞を活用した生息域外保全」「絶滅危惧種ツシマヤマネコの繁殖—動物園との生息域外保全研究」（主催：井の頭自然文化園、2022年10月29日）にてパネル展示と解説
119	2022	公開シンポジウム「知りたい！ヤンバルクイナ保全の最前線」（主催：公開シンポジウム「知りたい！ヤンバルクイナ保全の最前線」実行委員会、オンラインとオンサイト、2022年12月3日、参加者155名）にて研究成果紹介
120	2023	楠田哲士、第12回やまねこ博覧会「動物園と進めるツシマヤマネコの繁殖生理研究—飼育下繁殖の推進のために」（主催：京都市動物園、2023年10月15日）にて講演
121	2023	楠田哲士、ヤマネコ祭2023「動物園と進めるツシマヤマネコの繁殖生理研究—飼育下繁殖の推進のために」（主催：井の頭自然文化園、2023年10月28-29日）にてパネル展示と解説
122	2023	公開シンポジウム「野生動物ラボの挑戦 -ヤンバルクイナとツシマヤマネコ保全の最前線-」（主催：「生殖細胞を活用した絶滅危惧野生動物の生息域外保全」公開シンポジウム実行委員会、オンラインとオンサイト、2023年12月9日、参加者112名）にて研究成果紹介
123	2024	木下こづえ（2024年3月3日）動物園から世界につながる—ユキヒョウを例に—, Human Feedback プロジェクト2024「動物とヒトとの共存—そのために私たちに何ができるか？—」, 名古屋市東山動植物園, （聴講者約80名）
124	2021	ホームページによる研究内容・研究成果の紹介 http://web.cc.iwate-u.ac.jp/~takehito/erca_4-2101/index.html

成果 番号	実施 年度	【サブテーマ2】の実施状況
125	2021	藤原摩耶子、マナティ研究所 オンラインサイエンスカフェ「絶滅危惧種ツシマヤマネコから考える生物多様性保全」（2021年7月3日、参加者訳30名）にて推進費プロジェクトの紹介
126	2022	藤原摩耶子、京都市動物園 動物園 DE サイエンストーク「卵子を保存して野生動物を守る」（2022年3月27日、参加者約30名）にて推進費プロジェクトの紹介
127	2022	金子武人、岩手大学オープンキャンパス、（2022年8月8日）にて推進費プロジェクトの紹介

(6) マスメディア等への公表・報道等

成果 番号	【サブテーマ1】のメディア報道等
----------	------------------

128	BBC Earth（2021年4月1日、映像提供「Snow Leopards: Ghosts in the Snow（Full Episode）」）
129	読売新聞［サイエンス Human］（2021年5月、「自然繁殖できる飼育環境へ」）
130	読売新聞（2021年5月16日、自然繁殖できる飼育環境へ）
131	高校生スキップル（2021年6月、13巻、26頁、「野生動物を絶滅から守るために」）
132	読売中高生新聞（2021年10月22日、「絶滅から守れ ツシマヤマネコ精子、卵子保存プロジェクト」）
133	潮出版社（2021年11月1日、幻のユキヒョウを絶滅から守りたい！ 双子姉妹の挑戦）
134	読売新聞（2022年2月2日、「シンポジウムの広報」）
135	京都大学新聞（2022年2月16日、「遺伝子から動物を知る」）
136	朝日新聞デジタル（2022年2月22日、「このネコ何歳？ 遺伝子の状態から測定、負担少なく正確に」）
137	読売中高生新聞（2022年2月25日、「DNAで年齢もわかる？」）
138	ArtSnow（2022年8月1日、動物監修映画「ベルベット・クイーンーユキヒョウを探してー」監修）
139	日本テレビ（2022年11月19日、京都大学野生動物研究センターの動物スペシャリスト集団に学ぶ！『どうぶつのわかっていること わかっていること』）
140	J-WAVE 81.3 FM（2023年2月17日、JK RADIO TOKYO UNITED）
141	Fm yokohama 84.7（2023年6月19日、Keep Green & Blue）
142	日本経済新聞（2023年7月15日、「希少種助けたい」姉妹の冒険記）
143	電通報（2022年8月26日、「野生動物研究者に学ぶ！『探求力』の可能性）
144	NHK Eテレ「ウチのどうぶつえん」（2023年3月31日、「ナカノヒト×ソトノヒト」（ツシマヤマネコ））
145	NHK Eテレ「ウチのどうぶつえん」（2023年5月19日、「集まれ！ころころりん」（ツシマヤマネコ））
146	NHK（2023年12月9日、動物監修「グレートヒマラヤトレイル」）

成果 番号	【サブテーマ2】のメディア報道等
147	日経産業新聞（2021年8月27日、「精子を凍結乾燥、常温で保存」）
148	LABIO21（2022年1月1日、「私の研究「フリーズドライ精子保存法」」）
149	岩手大学HP（2022年1月24日、「動物の妊娠環境を音波振動で短時間に作り出す技術を開発」）
150	岩手大学HP（2022年2月18日、「卵子の活性化を抑える手法を開発ー受精後の成長を妨げる受精前の活性化を抑制することにより、新たな体外受精技術等の開発につながる可能ー」）

151	マイナビニュース（2022年2月21日、「受精卵の正常な成長を妨げる卵子の受精前の活性化を抑制する手法、岩手大が開発」）
152	岩手日報（2022年3月26日、「不妊症要因の「卵子活性化」抑制の物質 手法解明」）
153	岩手大学 HP（2023年3月6日、「音波振動で動物の妊娠環境を瞬時に作り出す技術の開発に成功」）
154	日経バイオテク（2023年3月6日、「岩手大、音波振動で動物の妊娠環境を瞬時に作り出す技術の開発に成功」）
155	マイナビニュース（2023年3月7日、「岩手大、音波でマウスの妊娠環境を瞬時に構築」）
156	Science Japan（2023年3月24日、「音波振動で妊娠環境を瞬時に構築」）
157	科学新聞（2023年5月26日、「Successful induction of mouse pseudopregnancy」）
158	Hi こちら岩手大学（2023年8月4日、「命をつなぎ時空を超える生殖技術の開発」）
159	岩手大学 HP（2023年10月30日、「動物の妊娠環境を人工的に作り出す音波振動装置を開発・製品化」）
160	科学新聞（2023年11月10日、「ラットの妊娠環境 人工的に誘起」）

(7) 研究成果による受賞

成果 番号	【サブテーマ1】の研究成果による受賞
161	田中千聖，木下こづえ，岩下明生，木滑黄平，伊谷原一，糞中ストレスホルモン分析と行動解析によるツシマヤマネコのストレス評価，第28回日本野生動物医学会大会．優秀発表賞
162	Arai K, Qi H, Inoue-Murayama M (2022) Age Prediction for Captive Asian Elephants Using Methylation-Sensitive High-Resolution Melting (MS-HRM). The 15 th International Conference of Asian Society of Conservation Medicine.
163	關 真理江，尾川楽人，木下こづえ（2024）ツシマヤマネコ野生順化ステーション内外における野生および飼育個体の行動および生理的変化の関係，対馬学フォーラム．企画賞

成果 番号	【サブテーマ2】の研究成果による受賞
	特に記載すべき事項はない

(8) その他の成果発表

特に記載すべき事項はない

Abstract

[Research Title]

Ex situ conservation of endangered wildlife using germ cells

Project Period (FY):	2021-2023
Principal Investigator:	Murayama Miho
(PI ORCID):	ORCID0000-0003-4249-876X
Principal Institution:	Kyoto University Sakyo, Kyoto City, JAPAN Tel: +81-75-771-4375 Fax: +81-75-771-4394 E-mail: miho.murayama.5n@kyoto-u.ac.jp
Cooperated by:	Iwate University, Gifu University, Kyoto City Zoo, National Institute of Environmental Studies, NPO Corporation Animal Hospital Okinawa
Keywords:	Tsushima leopard cat, Okinawa rail, Genetic diversity, Hormone, Gamete preservation

[Abstract]

In this study, we developed basic breeding information for endangered wildlife species by integrating genomic and endocrinological information. Based on this information, breeding individuals were evaluated, and using the stored germ cells, assisted reproductive technologies were developed for the Tsushima leopard cat (*Prionailurus bengalensis euptilurus*) and the Okinawa rail (*Gallirallus okinawae*). We also contributed to the ex-situ conservation by providing these results to relevant organizations as reference information for other endangered wildlife species.

In sub-theme 1, we accumulated and analyzed information obtained from genetics, hormones, and behavior in order to develop basic information on breeding. The genetic diversity of captive and wild populations was compared, and a population viability analysis (PVA) in the wild was conducted to determine conditions for survival after 100 years. Genome sequence information was used to identify genes related to reproduction and found to be associated with reproductive performance. We detected the percentage of DNA methylation in the genome of captive individuals with known ages and created a highly accurate age estimation model. Based on fecal sex steroid hormone levels and behavioral observations, we evaluated the reproductive physiological status of all captive females in the breeding program. Activity changes and stress hormone concentrations were shown to be useful for predicting reproductive status and stress. This genomic and hormonal information was recorded in a database for each individual, which can be compared with the germplasm information in sub-theme 2.

In sub-theme 2, bio-banking of germ cells with information from sub-theme 1 was developed. A transportation system was established to ensure that testes and ovaries collected from dead individuals arrive at the laboratory within 48 hours for the Tsushima leopard cat and within 24 hours for the Okinawa rail. In the Tsushima leopard cat, testes were removed from 17 male animals, and sperm were collected from 5 adult animals and frozen or freeze-dried for preservation. The preserved sperm were shown to have sufficient fertilization ability. Some of the sperm were fertilized with in-vitro matured oocytes to produce fertilized eggs. Ovaries were cryopreserved for 10 individuals. In the Okinawa rail, sperm from

113 individuals were frozen and 7 individuals were freeze-dried. Some of the frozen sperm were used for artificial insemination, and it was confirmed that the eggs were fertilized. Ovaries from three wild-dead females were also removed and cryopreserved. The frozen sperm and ovaries were stably stored in the National Institute for Environmental Studies.

[References]

- Kusuda S, Funahashi T, Adachi I, Yamamoto H, Nagao E, Matsui K, Akiba Y (2022) Fecal Glucocorticoid Metabolites as a Noninvasive Indicator of Stress in the Tsushima Leopard Cats (*Prionailurus bengalensis euptilurus*): Application to Health Care. *Animals*, 12(9):1072. doi: 10.3390/ani12091072
- Ito H, Nakajima N, Onuma M, Inoue-Murayama M (2022) Comparison of the genetic diversity of the captive and wild populations of the Tsushima leopard cat using a GRAS-Di analysis. *Animals*, 12(11):1464. doi: 10.3390/ani12111464
- Qi H, Lim QL, Kinoshita K, Nakajima N, Inoue-Murayama M (2024) A cost-effective blood DNA methylation-based age estimation method in domestic cats, Tsushima leopard cats (*Prionailurus bengalensis euptilurus*), and *Panthera* species, using targeted bisulfite sequencing and machine learning models. *Molecular Ecology Resources*, 24(3):e13928. doi.org/10.1111/1755-0998.13928
- Nakagawa Y, Kaneko T (2022) Treatment with MG132 prevents spontaneous activation of rat oocyte in culture and promotes embryonic development after intracytoplasmic sperm injection. *Scientific Reports*, 12(1):2706. Doi: 10.1038/s41598-022-06714-6
- Wake Y, Endo M, Tsunoda S, Tawara H, Abe H, Nakagawa Y, Kaneko T. (2023) Successful induction of pseudopregnancy using sonic vibration in mice. *Scientific Reports*, 13(1):3604. doi: 10.1038/s41598-023-30774-x
- Fujihara M, Shiraishi J, Onuma M, Ohta Y, Inoue-Murayama M (2022) Cryopreservation competence of chicken oocytes as a model of endangered wild birds: Effects of storage time and temperature on the ovarian follicle survival. *Animals*, 12(11):1434. doi.org/10.3390/ani12111434
- Fujihara M, Inoue-Murayama M (2024) The wildlife biobanking of germ cells for in situ and ex situ conservation in Japan. *Theriogenology wild*. In press doi:/10.1016/j.therwi.2024.100086

This research was funded by the Environment Research and Technology Development Fund (ERTDF).

指摘等	対応状況・非対応理由等
採択時コメント「成果が期待できる。実際の繁殖への道筋も示して欲しい。保護増殖事業の現場の課題に対応。」	生殖細胞保存の成功例を示し、基礎情報にもとづく繁殖の事例を示した。保護増殖事業の会議等で、現場の課題にもとづく情報の提供につとめた。
採択時コメント「本研究課題の実施を通じて、若い学生・研究者が関心を持ち、将来を支える人材として育っていくことを期待したい。」	本研究には、大学院生やポスドクが多数参加し、修士号や博士号の取得や学会発表での受賞につながった。さらに、プロジェクト開始以降に、多くの研究分担者（楠田、木下、金子、藤原）が准教授や教授へ昇進したことからも、将来を支える若手人材の育成に貢献できたと考えられる。
採択時コメント「対象 としている２種は、主な死亡要因が交通事故なので、事故個体からどのように生殖細胞を採取するのかの技術確立が重要だと考えられる。時間経過、容器、温度といったことが把握される必要がある。年齢推定は、どの程度の年齢クラスに分けられるのか、絶対年齢が可能なのか、セメント質年輪法などと対照されたい。野外の個体群構造の分析にも期待したい。」	事故個体からは、できるだけ早く採取し、輸送・保存できる体制を整備した。また現地での保存体制も確立した。 メチル化率を指標とした年齢推定は、死後ではなく生存中の年齢が推定できて、飼育下繁殖に参加できることの意義が大きい。
採択時コメント「糞情報から、繁殖時期に好んで食べている植物などが解ると、人工的に育成した個体 を野外へ戻すときの重要な資源情報だと思われる。繁殖成功の可否を遺伝子から検討するのには挑戦的であるが、サンプル数の確保ができるのかどうか、疑問点である。また、寄生虫などは、可能なかぎり情報収集を期待する。」	本研究では計画の遂行に集中し、食べ物や寄生虫の解析はしなかった。しかし、フンからの食べ物の解析法はユキヒョウで確立し、ツシマヤマネコにも適用できる体制を整え、現在シカの採食の有無を検証する研究を進めている。
採択時コメント「受精卵移植の技術開発や供試個体の確保（もしくは異種間移植）についても検討を加えておくべき。」	受精卵移植の技術開発や供試個体の確保については、本研究の期間中には目標としていない。しかしながら本研究を通して形成したネットワークにより、最適な方法について議論を進めることができた。
採択時コメント「年齢既知の飼育猫のDNAメチル化のデータはツシマヤマネコにも適用可能か。」	イエネコの情報をツシマヤマネコに応用し、さらにネコ科各種での比較も行った。信頼度はネコ科共通の指標でもそれなりに高いが、種ごとに指標を設定するほうが、精度が高いことがわかった。
採択時コメント「多様な家畜でこれまで行われてきた技術や知見を活用するためには、その専門家がアドバイザーとして関わったほうがいいのではないか。」	家畜の経験豊富な坪田教授にアドバイザーをお願いし、アドバイスをいただいた。

採択時コメント「域外保全を経た個体の野外放逐集団は存続可能性モデルに導入できるのだろうか。モデルの改良も期待したい。」	飼育から個体を追加した場合の野生個体群の存続可能性シミュレーションを実施した。
採択時コメント「既存の生殖研究の成果を活かすが種特異性があるので、対象種の研究が必要である、という主張と本研究の成果は 他の希少種の域外保全にも利活用できる、という主張は、自己矛盾ではないか。基本的に前者で評価したい。作成された受精卵が本当に出産までつながるのか。また、受精卵の保存体制がやや脆弱な印象。」	受精卵の保存体制については、担当者のポスト確保や昇進によって、研究の継続ができるようになった。保存した生殖細胞は国立環境研究所に送り、安定保存できている。
採択時コメント「地元コミュニティの巻き込みも重要なので、地元の人が調査活動に関与できるよう更に工夫することが望ましい。」	毎年の公開シンポジウム開催に加え、ラジオ、新聞、テレビ、飼育園のイベント、学校の授業等でプロジェクトの広報を行い、死体や救護の情報協力等において効果が得られた。
採択時コメント「繁殖の成否は様々な要因に左右されるとすれば、機能遺伝子の解析から繁殖成功要因がどこまでわかるか。このため”個性に合わせた飼育管理や最適な繁殖ペア”がどこまで具体的に提案できるのかやや疑問。年齢査定についても同様である。」	個体ごとのゲノム、ホルモン、行動のデータを得て、相互の関連を解析し、生殖細胞保存に有用な情報を得た。ツシマヤマネコでは飼育個体について共有情報をデータベースとして整備した。
中間評価コメント「PVA は結論ありきになっていないか。実際の生態学的調査によってPVA は作成されるべきだと思われ、交通事故やワナによる混獲を評価に入れるべきである。 PVA は、モデルの構造やパラメータの数値、野外との対応（たとえば環境収容力は長期的に変動している可能性がある）などについて検討が必要であり、様々な要因の重要度を評価するための参考情報という位置づけになると思われるが、確実性の高い将来予測と受け止められるおそれがあるため、前提に関する説明を加えるなど、結果の示し方を工夫してほしい」	PVAは、生態情報と合致しているともいえる。個体数の増加は発見された時代に復帰しただけなので、今後環境収容力が適切に管理できなければまた減少すると考えている。2023年度から分担者を新規追加（国立環境研究所 大沼学）して解析を強化し、最終報告書では、多様なパラメーターでのシミュレーションを実施した。
中間評価コメント「サブテーマ1 がサブテーマ2 の生殖細胞の活用と人工繁殖にどう利用されていくのか。生殖細胞レベルで人が予想した相性の良さを検証するための基準（たとえば、胚の生存率）などが示されることを期待。」	共有情報のデータベースを作成し、基盤情報と生殖情報の関連を追跡できるようにした。ホルモンの情報を生殖細胞保存に生かすことができた。性格関連遺伝子等についても関連を解析した。
中間評価コメント「中間評価コメント「行動とホルモンとの関連などを一般化するために、必要な個体数。集団（家族含む）に暮らす個体と隔離されている個体では、どの程度、行動に影響が出るのか。相性を司る遺伝子。」	共有情報のデータベースを作成し、基盤情報と生殖情報の関連を追跡できる体制を整備した。遺伝子との確たる関連は見いだせなかったが、傾向が見られたため、今後も個体数を増やして情報を蓄積する。
中間評価コメント「DNAメチル化からの年齢推定に領域数を増やすと精度が上がるのか。」	ツシマヤマネコでは解析領域を1領域から4領域に増やすことで精度を上げ、誤差1.35歳に改善した。ヤンバルクイナではゲノム全体を対象に領域を

	探索した結果、47領域を用いて誤差1.21歳で推定できた。
中間評価コメント「科学的新規性の要はどの部分か。」	繁殖関連遺伝子、メチル化率を指標とする年齢推定、ホルモンや行動を指標とする妊娠推定やストレス評価、精子および卵子の保存方法等はいずれも革新的で、科学的新規性がきわめて高い。
中間評価コメント「プロジェクト終了後の資料保存体制、環境政策の進展、環境省でのシステム構築の準備、行政、国立環境研究所、大学等の研究機関の間の連携構築、実現可能な仕組みの提案、域外保全手法の確立、様々な種への適用」	本研究で構築した飼育機関とのネットワークを生かして、試料と情報保存し、保全対策へ活用する仕組みをつくる。令和6年度から開始した推進費「生殖細胞保存による猛禽類の域外保全の推進」で他の種への応用をはかる。たとえば3度にわたる公開シンポジウムにおける行政、飼育、研究などの関係者の発表や、2023年9月にはイヌワシの域内・域外保全に関する関係者の集まるセミナーを企画して、情報共有につとめた。