

課題名	D-1007 高人口密度地域における孤立した霊長類個体群の持続的保護管理
課題代表者名	古市 剛史（京都大学霊長類研究所 社会進化分野）
研究実施期間	平成22～24年度
累計予算額	173,263千円（うち24年度52,813千円） 予算額は、間接経費を含む。
本研究のキーワード	霊長類、孤立個体群、生息地評価、遺伝的多様性、遺伝子交流、人獣共通感染症、存続可能性分析

研究体制

- (1) 最小存続可能集団の定義にむけた孤立個体群の生物学的・集団遺伝学的研究
(京都大学霊長類研究所)
- (2) 孤立個体群における人獣共通感染症のリスクアセスメントとサーベイランス
(京都大学霊長類研究所)
- (3) 孤立個体群の現状分析と生息地の維持・回復のための生態学的・社会学的研究
(京都大学野生動物研究センター)

研究概要

1. はじめに(研究背景等)

ヒト以外の霊長類はすべて赤道から中緯度の地域、すなわち人口密度の高いところにいる。そのため、人間とそれ以外の霊長類は共存することを余儀なくされ、農地の拡大や森林伐採等によって生息地が「分断化」され、「孤立化」している。将来にわたって霊長類個体群の存続を保証しようと考えた場合、大面積の自然林とそこに住む霊長類を保護するというだけでは、もはや対応できない。このような分断された個体群をいかに守り、いかに次世代に伝えるかが、霊長類を次世代にまで残そうとする場合の最重要課題となっている。

人間の居住する地域に孤立して生息する霊長類は、さまざまな点で人間およびその活動との接点も多く、持続的な生存にはさまざまな難題がある。まず農地や市街地によって分断された地域個体群では、個体群間の個体の移動が難しく、遺伝的孤立とそれによる遺伝的多様性の低下が起こり、近親交配係数の上昇によって個体群の存続がむずかしくなる可能性がある。また、とりわけ人間に似た遺伝子構成をもつ類人猿では、他の動物群と違って「人獣共通感染症」のアウトブレイクが大きな脅威となる。これまでも、人からの感染が疑われるポリオ、エボラ出血熱、インフルエンザ様の呼吸器疾患の流行によって多くの類人猿個体群が壊滅的な打撃を受けている。さらに、害獣としての駆除、食用、薬用などのための狩猟など、人間活動に起因するさまざまな脅威にもさらされている。以上のような霊長類孤立個体群特有の存続リスクに焦点をあてた現状把握のための研究手法の開発、それを用いた実態調査、その結果にもとづく保護政策の立案が、霊長類の保護のための急務となっている。

日本は、アフリカだけでも10年～50年間も続く類人猿の長期調査地を6カ所も有し、類人猿の研究においては世界でも並外れた存在感を示している。また、野生霊長類が生息する唯一の先進国として、ニホンザルをどのように保護・管理して共存を維持していくのかという点が、常に世界の注目を集めている。本研究プロジェクトで、類人猿とニホンザルを中心として保護管理上の重要問題に先頭に立って取り組むことは、生物多様性の保全にむけた世界の動きの中で、日本の取り組みのプレゼンスを大いに高めることになる。

2. 研究開発目的

上記のような霊長類孤立個体群の存続上のリスクの実態を調べ、適切な保護計画を立案するために、主として以下のような目的で研究を行った。

- 1) 各種霊長類の生息域全体を対象とする広域レベルで、衛星画像、地理情報システム(GIS)などにもとづいて各種霊長類の生息適地を割り出し、生息状況の現状把握と将来の保護区の設定等の保護政策立案に役立てる。
- 2) 野生個体から非侵襲的方法で集める糞試料から、効率的にDNAを抽出する手法を開発する。また、それらのサンプルを用いて各孤立個体群に存在する遺伝子型とその頻度を調べ、地域個体群のサイズ、分断化からの経過年数、地域個体群の遺伝的多様性の相互関係を明らかにする。また、これらの研究成果にもとづいて、存続可能となる最小の個体数や遺伝的多様性の基準を定める。

- 3) 個体のMHC型に関連する遺伝子領域など、個体の生存価に直結する遺伝子領域の多様性を調べる手法を開発する。
- 4) 野生個体の糞試料から、ヒト感染症の病原体特異抗体を検出する方法を開発する。またその手法を用いて、各野生個体群がどういった種類のヒト由来感染症にどの程度の割合で罹患しているのかを調べる。その結果に基づいて、個体群ごとのヒト由来感染症のアウトブレイクのリスク評価を行い、感染防止のためのガイドラインを作る。
- 5) アジア、アフリカの主な絶滅危惧霊長類を対象に、生息地面積、植生、個体数、人口動態等の情報をまとめ、データベース化して公開する。これらの情報と、本研究で得られる遺伝的多様性とヒト由来ウイルスの感染リスクに関する情報をあわせて、各地域個体群の存続可能性分析を行う。
- 6) 霊長類研究所で発生したニホンザルの原因不明の血小板減少症について、人獣共通感染症である可能性も含めて原因を特定する。
- 7) 以上の結果にもとづいて、地域レベルで有効な霊長類保護計画をたて、それを実行に移しつつ効果を検証する。また、本研究の成果をもとに、国際自然保護連合等の国際機関に協力して各種を対象とした保護のマスタープランを作り、行政による保護政策の立案に寄与する。

3. 研究開発の方法

(1) 最小存続可能集団の定義にむけた孤立個体群の生物学的・集団遺伝学的研究

- 1) 広域レベルの生息地評価では、絶滅危惧種であり、生息地全域からの情報と試料の入手ができるボノボを対象に、過去の観察情報をもとにボノボの現在の生息地を割り出した。また、GIS(地理情報システム)を用いて、ボノボの生息に影響を与えると考えられる生息域内各地の伐採地の密度、川からの距離、農地からの距離、人口密度を調べた。これらの情報を総合して、ボノボの生息好適地を割り出し、現在国立公園、学術保護区、コミュニティリザーブ等として保護されている地域と比較した(GAP分析)。
- 2) 詳細レベルの生息地評価では、長期にわたる現地調査が行われてきたルオー学術保護区において、衛星画像(Landsat TM)から分析した植生タイプと、2008年1年間にボノボを追跡しながら1分おきに記録したGPSの位置情報と、採食、休息等の行動データをあわせて分析し、季節ごとにボノボが採食や泊まり場としてそれぞれの植生を利用する頻度を割り出した。これによって、どのような植生がボノボにとって利用価値が高いのか、年間を通じて食物を得るためには、どのような植生が遊動域内になくてはならないのかといった生息地評価を行った。
- 3) 野生個体から採取する糞サンプルは、鮮度が低かったり各種阻害物質の影響を受けたりするため、DNAの抽出が難しい。本研究では、細胞膜を破碎する界面活性剤としてドデシル硫酸ナトリウム、DNA分解酵素の阻害剤としてエチレンジアミン四酢酸およびTris-HCl緩衝液を主成分とする溶解液を用いた独自の手法を開発し、効率的にDNAを抽出できるようにした。
- 4) 従来の遺伝的多様性の研究では、生存価に直結しない中立領域の塩基配列を調べることが多かった。本研究ではそれに加えて、免疫系を決めるMHC領域等、個体の生存価に直結する領域の遺伝的多様性を調べる手法を開発した。
- 5) 以上の方法により、地域個体群内の遺伝的多様性、個体群間の遺伝子交流の程度などを解析し、各地域個体群の存続可能性の評価を行った。

(2) 孤立個体群における人獣共通感染症のリスクアセスメントとサーベイランス

- 1) 野生個体のヒト由来病原体の感染状況を調べるため、糞試料から病原体特異的IgA抗体を検出する方法を開発した。このため、霊長類研究所の飼育チンパンジーの血液で、一般に使われるIgG抗体とIgA抗体がともに検出された個体について、糞中からIgA抗体を検出するプロトコル(ELISA法)を作成し、糞中のIgA抗体の検出で感染状況が調べられることを示した。さらに、野生チンパンジーでアウトブレイクが観察されている呼吸器感染症の原因ウイルスについて、それぞれの特異抗体を検出するELISA系を独自に構築した。
- 2) この方法を用いて、野生ボノボの4つの地域集団から得られた糞試料を分析し、ヒト由来の各ウイルスに対する感染実態を調べた。
- 3) ニホンザルの血小板減少症については、社団法人予防衛生協会、国立感染症研究所、大阪大学微生物病研究所、京都大学ウイルス研究所等の研究機関との共同研究により、RDV法(Rapid Determination system of Viral RNA sequence method)や次世代シーケンサーによるメタゲノム解析といった網羅的解析法、および病原体特異的なPCRあるいはRT-PCR法を用いて原因病原体の解明を試みた。

(3) 孤立個体群の現状分析と生息地の維持・回復のための生態学的・社会学的研究

- 1) 生息地に関する基礎的な情報(気候、地形、植生)、個体群の存続に影響を及ぼす人間活動を含めた個体群動態に関連する情報を、既存の文献から該当する記述を抽出、整理しデータベース化した。

- 2) 金華山島および宮城県本土側の個体群から得られたマイクロサテライト8領域の情報をを用い、個体群間の遺伝的構造を分析した。これにより、両孤立個体群におけるボトルネック効果の有無や遺伝的な有効集団サイズを推定した。また、下北半島のニホンザル群を例に個体数変動のシミュレーションを行い、過去の個体数データとの比較でモデルの正確性を検証した。
- 3) ポノボの個体群データを例に、VOLTEXプログラムを用いて存続可能性分析を行った。

4. 結果及び考察

(1) 最小存続可能集団の定義にむけた孤立個体群の生物学的・集団遺伝学的研究

- 1) ポノボを対象とした広域レベルの生息地分析では、重要な生息好適地の半分程度が国立公園等の保護区として守られていることがわかった。しかし一方、生息好適地とはいいがたくポノボもほとんど生息していない地域が保護区となっている例や、大面積のポノボの生息好適地に保護の網がかけられていない例があることが明らかになった。
- 2) この分析の結果を用いて保護政策立案に向けた活動を行った結果、2012年4月にイオンジ・コミュニティ・ポノボ保護区の設立がコンゴ民主共和国環境省に認可された。
- 3) ポノボの生息域全域をカバーする7つの地域個体群から糞資料を収集して分析し、ミトコンドリアDNAの遺伝子型の分布を明らかにした。この分析で6つのハプログループが分類されたが、このうちの1つは、従来から存在は知られていたがその分布地がわからなかったもの、もう1つは今回新たにその存在が明らかになったもので、この研究によってポノボの遺伝子型の分布様式の理解に大きく寄与した。
- 4) ポノボの7個体群は西部、中央部、東部の3つのコホートに分けられ、中央部のコホートはもっとも多様な遺伝子型を保持している点で、東部のコホートは独自のユニークな遺伝子型を保有している点で保護計画上とくに重要であることを示した。また、他の個体群から隔離されている西部、中央部、および東部コホートに属する各1個体群では、個体群内の遺伝的多様性が他の個体群に比べて低く、孤立が遺伝的多様性の低下に結びついていることが示された。
- 5) 東北地方のニホンザルの遺伝子型の分布に関する分析では、下北半島と津軽半島の個体群が他の個体群から遺伝的に孤立していること、地理的隔離からの年数や現存個体数から考えられる以上に遺伝的劣化が進んでいることが確認された。このことは、目標頭数のみに頼る現在の保護管理政策のあり方の再考を促すものとなった。
- 6) バングラデシュ都市部に生息するアカゲザル、スリランカに生息するトクモンキーについても遺伝子型の分布と個体群内の遺伝的多様性に関する分析を行い、保護計画の立案に資する基礎情報を得ることができた。

(2) 孤立個体群における人獣共通感染症のリスクアセスメントとサーベイランス

- 1) 霊長類研究所で飼育されている14頭のチンパンジーから得た血清由来試料を用いて、各種病原体に対する特異的IgG抗体の有無を検討した。その結果15種のヒト由来感染症の病原体特異抗体がきわめて高率で確認され、予想以上にヒトからの感染が起こっていることが確認された。
- 2) 野生ポノボの4地域個体群から採取された糞試料を調べたところ、インフルエンザウイルスにおいては21-28%、パラインフルエンザウイルス、ムンプスウイルス、RSウイルスについては22-27%の抗体陽性率が認められた。また、各ウイルスに対する抗体陽性率は、個体群ごとに大きく異なった。陽性率が高いところについては、過去に頻繁にヒトからのウイルス感染が起こっていることが考えられ、これをもとに感染防止のガイドラインを作成して試験的に実行に移した。一方、陽性率が低いところについては、免疫力のないところに新たにヒト由来感染症のウイルスが入ることで爆発的なアウトブレイクが起こる可能性が考えられ、とくに厳しいガイドラインを作成する必要があることがわかった。
- 3) ニホンザルの血小板減少症については、カニクイザルを自然宿主とするサルレトロウイルス4型がニホンザルに感染することによって致死的な感染症を引き起こされることがわかった。このことは、本研究のテーマのひとつである種の壁を越えた感染の危険性を、改めて認識させることになった。

(3) 孤立個体群の現状分析と生息地の維持・回復のための生態学的・社会学的研究

- 1) アジア・アフリカに生息する類人猿とニホンザルについて、各孤立個体群の現状についての情報を集めてデータベース化し、世界に公開した。大型類人猿については、ボツソウ・ニンバ生態圏保護区(ギニア共和国)、カリンズ森林保護区(ウガンダ共和国)、マハレ山塊国立公園・ウガラ森林保護区(タンザニア連合共和国)、カフジ・ビエガ国立公園(コンゴ民主共和国)、ムカラバ・ドウドウ国立公園(ガボン共和国)のチンパンジー、ルオー学術保護区(コンゴ民主共和国)のポノボ、カフジ・ビエガ国立公園のヒガシローランドゴリラ、ムカラバ・ドウドウ国立公園のニシローランドゴリラ、ダナムパレー保護区(マレーシア)のオランウータンを情報収集の対象とした。またニホンザルについては、下北半島・津軽半島、金華山島、淡路島、小豆島、幸島、および屋久島の孤立個体群を対象

とした。これらのデータは各地の保護計画の立案に大いに活用されるものと期待される。

2) ニホンザルについては、環境収容力の小さな島嶼個体群と本土の個体群における、個体群の縮小と回復の過程でおこる遺伝的影響を検討した。また、個体群動態パラメータの推定に使用したデータの年数や精度によって、存続可能性の評価(個体数変動の予測)の正確性がどのように異なるか検討した。これらの成果は、存続可能性を考慮したニホンザルの保全管理対策を考える際に、有用な参考情報として利用できる。

3) ボノボについては、上記のデータベースのデータを用いて、存続可能性分析を行った。また、その成果とサブテーマ1、2の成果をもとに、国際自然保護連合のワーキンググループの一委員としてボノボの保護のためのマスタープラン“bonobo (*Pan paniscus*) conservation strategy 2012-2022”を編纂し、出版した。このマスタープランは、コンゴ民主共和国政府によるボノボの保護政策の立案や世界の様々なNGOによる保護活動に大いに活用されるものと期待できる。

5. 本研究により得られた主な成果

(1) 科学的意義

科学的意義としてはまず、野生個体から非侵襲的手法で入手できる糞資料から効率的にDNAと病原体特異的IgA抗体を抽出する方法を開発したことがあげられる。糞資料からDNAを抽出する方法はこれまでも利用されてきたが、主として利用されている方法が民間企業であるQiagen社が販売するキットを使うもので、単価が高価なことや、仕様が公開されていないために抽出効率の改善ができないことなどの問題があった。本研究で開発した試薬はきわめて安価につくることができ、また仕様を公開することで各研究者が自由に改良に取り組むことができる。抽出効率も Qiagen社のキットと同等以上になっている。すでにいくつかの研究グループから問い合わせがあり、今後多くの野外研究で利用されることが期待される。一方糞から病原体特異抗体を抽出して野生個体の感染症罹患歴をさぐるというのは、全く新しい方法である。これまでのような血液試料を用いる方法とはことなり、広域に分布する多くの個体の罹患状況を調べることができ、人獣共通感染症のリスクの研究や罹患状況のモニタリングに、画期的な展開をもたらすことができる。

本研究の主要な対象のひとつである類人猿のボノボについて、世界各国の研究チームとの協力のもとに、ボノボの生息域全体をカバーする7カ所の地域個体群からの糞試料が日本に集まってくるシステムを築き上げたことも、きわめて高い学術的価値をもつ。人にもっとも近く、かつ絶滅危惧種に指定されているボノボについて、これほど広域からの試料を扱える研究チームはほかになく、大きな学術的価値をもつ研究を生み出すことができる。

実際ボノボの遺伝子型の研究では、ボノボの生息域全域にわたるミトコンドリアDNAのハプロタイプの分布と各地域個体群の遺伝的多様性を明らかにする世界ではじめてとなる研究成果をあげた。Y染色体の遺伝子の多様性や常染色体のマイクロサテライトの遺伝子の多様性に関する分析も進めており、近い将来さらに多くの研究成果をあげることができると期待される。また、野生ボノボの病原体特異抗体の研究では、野生ボノボが20～30パーセントというきわめて高い率で各種病原ウイルスに対する特異抗体を持っていることを、はじめて明らかにした。また、病原抗体の保有率は地域個体群によって大きく異なることも明らかにし、それぞれの地域の実情に即した感染防止のガイドラインの作成に寄与することができた。

ニホンザルを対象として行った、生存や繁殖に関係が深い遺伝子群をもつMHC領域の多様性についての研究も、保全生物学上きわめて大きな価値をもつ。これまでの遺伝的多様性に関する研究は、個体の生存価に直接関係のない中立的な染色体部位を用いて行われてきたが、それでは検出された遺伝的多様性が地域個体群の存続可能性とどのような関係を持つかがわからない。この研究の成果は、霊長類のみならず多くの動物種について、孤立個体群の適応度や存続可能性に関する研究に活用されるものと期待される。

霊長類研究所で発生したニホンザルの致死性の血小板減少症の原因を究明したことも、高い学術的価値をもつ。カニクイザルを宿主とするほぼ無害なSRV4型ウイルスが、ニホンザルに感染するときわめて重篤な感染症を引き起こすことは、鳥インフルエンザやSARSなど、種の壁を越えた病原体感染の危険性を改めて認識させることになった。また、複数の研究機関が密接に協力して異例ともいえる速さで原因ウイルスを特定したことは、将来の未知のウイルスの発生に対応する体制を作り上げたという点で大きな意義がある。

(2) 環境政策への貢献

<行政が既に活用した成果>

本研究のサブテーマ1では、コンゴ民主共和国にのみ生息するボノボについて、過去の観察例のデータベース、衛星画像、地理情報システムを活用して生息適地を割り出し、国立公園等の既存の保護区とのずれを検討するGAP分析を行った。その結果、ボノボの生息域内に保護の網のかかっていない広大な生息適地が2カ所あることがわかった。このうちのひとつであるイヨンジ村南部地域では、かねてから本研究チームが、同地区の住人がつくるNGO、コンゴ民主共和国生態森林研究所、国際的NGOであるAfrican Wildlife Foundation等と協力して保護区化への取り組みを進めていたが、本研究の成果も大きな力の一つとなって、2012年4月に同国環境省によ

ってイヨンジ・コミュニティ・ボノボ保護区の設立が正式に認められた。

日本人研究者がイニシアティブをとる形でボノボの保護区が設立されたのは、1989年に設立されたルオー学術保護区に次いで2つ目になる。人にもっとも近い絶滅危惧種であるボノボの保護に貢献することで、日本の環境行政の世界におけるプレゼンスを大いに高めることができた。

<行政が活用することが見込まれる成果>

ボノボについては、研究代表者の古市が委員として参加する国際自然保護連合のワーキンググループで向こう10年間の保護に関するアクションプランを作成し、“Bonobo Conservation Strategy 2012-2022”として2013年1月に出版した。このアクションプランでは、本推進費プロジェクトが遺伝的多様性と人獣共通感染症の調査、分析を担当した。このワークグループにはコンゴ民主共和国環境省および科学研究省のメンバーも参加しており、同国政府によるボノボの保護政策の立案に際しては、保護すべきプライオリティ・ポピュレーションの選定や実際の保護計画の策定という点で、この提案書の内容が活用されると期待できる。また、類人猿各種の長期調査で圧倒的なプレゼンスをもつ日本が遺伝的多様性の劣化と人獣共通感染症という今日の問題の研究に先頭に立って取り組むことで、生物多様性の保全にむけた国際的な取り組みにおける日本の環境行政のプレゼンスを大いに高めることができる。

ニホンザルについては、個体群の大幅な縮小を経験した島嶼および本土の個体群について、遺伝的特性を明らかにすることができた。とくに、下北半島と津軽半島の個体群では、現存頭数から推定される以上に遺伝的多様性の低下が進んでいることが確認できた。分析できたのは一部の個体群に過ぎないが、同様の歴史を持つ各地の個体群について、遺伝的特性を考慮した保全管理対策を行う際に参考となる情報を提供できた。さらに、下北のニホンザル個体群の長期データを用いることで、調査の年数や精度と個体数シミュレーションの正確性について一応の基準を示すことができた。現在各地のニホンザル個体群の保護管理は、個体数管理の権限を地方自治体にゆだねて駆除等を行う形で進められている。本研究の結果は、こういった現場レベルの頭数のみによる保護管理では重要な地域個体群の将来にむけた存続が保証できない可能性があることを示しており、学術的エビデンスに基づいた環境省等による国レベルの管理が強く求められる。

野生動物の糞資料を用いた病原体特異抗体の検出技術の開発は、人獣共通感染症のサーベイランスや感染症発生のモニタリング、感染防止のガイドラインの作成に大いに活用されるものと期待できる。また、本研究では社団法人予防衛生協会、国立感染症研究所、大阪大学微生物病研究所、京都大学ウイルス研究所、長崎大学熱帯医学研究所が協力してニホンザルのウイルス感染症の解明にあたったが、ここで築きあげた協力体制は、今後起こりうる新興感染症のリスク評価、原因解明、対策立案といった点で、日本の環境・厚生行政に寄与するものと考えている。

6. 研究成果の主な発表状況

(1) 主な誌上発表

<査読付論文>

- 1) Furuichi T (2011) Female contributions to the peaceful nature of bonobo society. *Evolutionary Anthropology* 20: 131-142
- 2) Furuichi T, Idani G, Ihobe H, Hashimoto C, Tashiro Y, Sakamaki T, Mulavwa BN, Yangozene K, Kuroda S (2011) Long-term studies on wild bonobos at Wamba, Luo Scientific Reserve, D.R. Congo: towards the understanding of female life history in a male-philopatric species. In: Kappeler P, Watts D (eds) *Long-term field studies of primates*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 413-433.
- 3) Tsuji Y (2011) Seed dispersal by Japanese macaques (*Macaca fuscata*) in western Tokyo, Japan: a preliminary report. *Mammal Study* 36: 165-168.
- 4) Tsuji Y (2011) Sleeping site preferences of wild Japanese macaques (*Macaca fuscata*): the importance of nonpredatory factors. *Journal of Mammalogy* 92: 1261-1269.
- 5) 辻大和, 和田一雄, 渡邊邦夫 (2011) 野生ニホンザルの採食する木本植物 付記: ニホンザルの食性研究の今後の課題. *霊長類研究* 27: 27-49.
- 6) Adenyo C, Hayano A, Inoue E, Kayang BB, Inoue-Murayama M (2012) Development of microsatellite markers for grasscutter (*Thryonomys swinderianus*, RODENTIA) using next-generation sequencing technology. *Conservation Genetics Resources*, 4(4): 1011-1014.
- 7) Imai H, Suzuki N, Ishimaru Y, Sakurai T, Yin L, Pan W, Abe K, Misaka T, Hirai H (2012) Functional diversity of bitter taste receptor TAS2R16 in primates. *Biology Letters* 8: 652-656.
- 8) Hayakawa T, Sugawara T, Go Y, Udono T, Hirai H, Imai H (2012) Eco-Geographical Diversification of Bitter Taste Receptor Genes (TAS2Rs) among Subspecies of Chimpanzees (*Pan troglodytes*). *PLOS*

ONE 7, e43277.

- 9) Hayashi M, Ohashi G, HeungJin R (2012) Responses toward a trapped animal by wild bonobos at Wamba. *Animal Cognition* 15: 731–735.
- 10) Kanamori T, Kuze N, Malim TP, Bernard H, Kohshima S (2012) Fatality of a wild Bornean orangutan (*Pongo pygmaeus morio*): behavior and death of a wounded juvenile in Danum Valley, North Borneo, *Primates* 53(3): 221–226.
- 11) Saito A, Kawamoto Y, Higashino A, Yoshida T, Ikoma T, Suzaki Y, Ami Y, Shioda T, Nakayama EE, Akari H (2012) Allele Frequency of Antiretroviral Host Factor TRIMCyp in Wild-caught Cynomolgus Macaques (*Macaca fascicularis*). *Frontiers in Microbiology* 3: 314.
- 12) Saito A, Kono K, Nomaguchi M, Yasutomi Y, Adachi A, Shioda T, Akari H, Nakayama EE (2012) Geographic, genetic and functional diversity of antiretroviral host factor TRIMCyp in Cynomolgus macaque (*Macaca fascicularis*). *Journal of General Virology* 93, 594–602.
- 13) Sugawara T, Imai H (2012) Post-Genome Biology of Primates Focusing on Taste Perception. In: Hirai H, Imai H, Go Y (eds), *Post-Genome Biology of Primates*, Springer, 79–92.
- 14) Tokuyama N, Emikey B, Bafike B, Isolumbo B, Iyokango B, Mulavwa MN, Furuichi T (2012) Bonobos apparently search for a lost member injured by a snare. *Primates* 53: 215–219.
- 15) Tranquilli S, Abedi-Lartey M, Amsini F, Arranz L, Asamoah A, Babafemi O, Barakabuye N, Campbell G, Chancellor R, Davenport TRB, Dunn A, Dupain J, Ellis C, Etoga G, Furuichi T, Gatti S, Ghiurghi A, Greengrass E, Hashimoto C, Hart J, Herbinger I, Hicks TC, Holbech LH, Huijbregts B, Imong I, Kumpel N, Maisels F, Marshall P, Nixon S, Normand E, Nziguyimpa L, Nzooch-Dogmo Z, Okon DT, Plumptre A, Rundus A, Sunderland-Groves J, Todd A, Warren Y, Mundry R, Boesch C, Kuehl H (2012) Lack of conservation effort rapidly increases African great ape extinction risk. *Conservation Letters* 5: 48–55.
- 16) Vallo P, Petrzelkova KJ, Profousova I, Petrasova J, Pomajbikova K, Leendertz F, Hashimoto C, Simmons N, Babweteera F, Machanda Z, Piel A, Robbins MM, Boesch C, Sanz C, Morgan D, Sommer V, Furuichi T, Fujita S, Matsuzawa T, Kaur T, Huffman MA, Modry D (2012) Molecular diversity of entodiniomorphid ciliate *Troglodytella abrossarti* and its coevolution with chimpanzees. *Amer J Phys Anthropol* 148: 525–533.
- 17) Yoshida T, Omatsu T, Saito A, Katakai Y, Iwasaki Y, Iijima S, Kurosawa T, Hamano M, Nakamura S, Takasaki T, Yasutomi Y, Kurane I, Akari H (2012) CD16 positive natural killer cells play a limited role against primary dengue virus infection in tamarins. *Archives of Virology*. 157: 363–368.
- 18) 吉川翠、小川秀司、小金澤正昭、伊谷原一(2012)タンザニアの乾燥疎開林地帯に生息するチンパンジー (*Pan troglodytes*)の泊まり場選択. *霊長類研究* 28: 3–12.
- 19) Iida GE, Ogawa H, Idani G (2013) Mammalian fauna of the miombo forest in the Ugalla area, Western Tanzania. *African Study Monographs*, 33(4): 253–270.
- 20) Hasan MK, Aziz MA, Alam SMR, Kawamoto Y, Jones-Engel L, Kyes RC, Akhtar S, Begum S, Feeroz MM (2013) Distribution of rhesus macaques (*Macaca mulatta*) in Bangladesh: Inter-population variation in group size and composition. *Primate Conservation* 26: 125–132.
- 21) Kawamoto Y, Takemoto H, Higuchi S, Sakamaki T, Hart JA, Hart TB, Tokuyama N, Reinartz GE, Guislain P, Dupain J, Cobden AK, Mulavwa MN, Yangozene K, Darroze S, Devos C, Furuichi T (2013) Genetic structure of wild bonobo populations: Diversity of mitochondrial DNA and geographical distribution. *PLoS ONE* 8(3): e59660.
- 22) Kazahari N, Tsuji Y, Agetsuma N (2013) The relationships between feeding-group size and feeding rate vary from positive to negative with characteristics of food items in wild Japanese macaques (*Macaca fuscata*). *Behaviour* 150: 175–197.
- 23) Kooriyama T, Okamoto M, Yoshida T, Nishida T, Tsubota T, Saito A, Tomonaga M, Matsuzawa T, Akari H, Nishimura H, Miyabe-Nishiwaki T (2013) Epidemiological study of zoonoses derived from humans in captive chimpanzees. *Primates* 54: 89–98. (Epub Aug 14, 2012)
- 24) Ramadan S, Miyake T, Yamaura J, Inoue-Murayama M (in press) DNA polymorphism within LDH-A gene in pigeon (*Columba livia*). *The Journal of Poultry Science*.
- 25) Yoshida T, Omatsu T, Saito A, Katakai Y, Iwasaki Y, Kurosawa T, Hamano M, Higashino A, Nakamura S, Takasaki T, Yasutomi Y, Kurane I, Akari H (in press) Dynamics of cellular immune responses in the acute phase of dengue virus infection. *Archives of Virology*. DOI: 10.1007/s00705-013-1618-6.

(2) 主な口頭発表(学会等)

- 1) Akari H (2010.8) Novel non-human primate models for hepatitis C and AIDS, 2010 KALAS international symposium, Korea.
- 2) Hasan MK, Feeroz MM, Kawamoto Y (2010.9) Distribution of rhesus macaque (*Macaca mulatta*) in Bangladesh: Inter-population variation in group size and composition. ASIAN-HOPE 2010/IPS Pre-congress Symposium and Workshop, Inuyama.
- 3) Huffman MA (2010.9) Field Techniques for health monitoring and the study of disease transmission in primates: some recent examples of their use in the wild. ASIAN-HOPE 2010/IPS Pre-congress Symposium and Workshop, Inuyama.
- 4) Kawamoto Y, Oi T, Seino H, Kawamoto S, Higuchi S (2010.9) Genetic architecture of social group of Japanese macaques (*Macaca fuscata*): Inference from analysis on all members of single group with microsatellite markers. ASIAN-HOPE 2010/IPS Pre-congress Symposium and Workshop, Inuyama.
- 5) Furuichi T (2010.9) Life history of female bonobos and their contribution to peaceful nature of the society. The 23rd Congress of International Primatological Society, Kyoto.
- 6) Furuichi T, Mulavwa MN, Hashimoto C (2010.9) Comparison of food patch use and ranging pattern between bonobos at Wamba and chimpanzees in the Kalinzu Forest. The 23rd Congress of International Primatological Society, Kyoto
- 7) Hamada Y, Malaivijitnond S, Pathomthong S, Kingsada P, Son VD, Van NH, Minh NV, San AM, Thu A, Oi T, Kawamoto Y (2010.9) Distribution, phylogeography and present status of macaques distributed in Indochina. The 23rd Congress of International Primatological Society, Kyoto.
- 8) Hasan MK, Feeroz MM, Kawamoto Y (2010.9) Diversity and molecular phylogeny of mitochondrial DNAs of rhesus macaques in Bangladesh. The 23rd Congress of International Primatological Society, Kyoto.
- 9) Hashimoto C, Furuichi T, Sakamaki T, Mulavua MN, Yangozene K (2010.9) Comparison of ranging behavior between wild bonobos and chimpanzees. The 23rd Congress of International Primatological Society, Kyoto.
- 10) Huffman MA, Nahallage CAD (2010.9) Macaque-Human interactions in Sri Lanka. [Abstract, Primate Research 26: 203.] The 23rd Congress of International Primatological Society, Kyoto.
- 11) Idani G (2010.9) From the bonobos'forest to the chimpanzees'woodland. The 23rd Congress of International Primatological Society, Kyoto.
- 12) Kooriyama T, Okamoto M, Nishida T, Nishimura H, Miyabe T (2010.9) Serological survey of human pathogens in captive chimpanzees at the Japanese Primate Reserch Center. The 23rd Congress of International Primatological Society, Kyoto.
- 13) Mulavwa MN, Yangozene K, Yamba-Yamba M, Motema-Salo B, Mwanza NN, Furuichi T (2010.9) What we know from nest groups of bonobos at Wamba: habitat use, socio-ecological features, and comparisons with chimpanzees. The 23rd Congress of International Primatological Society, Kyoto.
- 14) Petrzalkova KJ, Petrasova J, Uzlikova M, Kostka M, Huffman MA, Mapua MI, Bobakova L, Mazoch V, Singh J, Kaur T, Modry D (2010.9) Gastrointestinal parasites of indigenous and introduced primate species of Rubondo Island National Park, Tanzania with emphasis on Blastocytis infections. [Abstract, Primate Research 26: 181.] The 23rd Congress of International Primatological Society, Kyoto.
- 15) Suzumura T, Kanchi F, Sugiura H, Matsuzawa T, Idani G (2010.9) Demographic data of wild Japanese monkeys on Koshima Island: preliminary analysis of the period 1952 – 2009. The 23rd Congress of International Primatological Society, Kyoto.
- 16) Tashiro Y, Furuichi T, Hashimoto C (2010.9) Biomass of mammals and ecology of sympatric cercopithecines in chimpanzee habitat of the Kalinzu Forest, Uganda. The 23rd Congress of International Primatological Society, Kyoto.
- 17) Tsuji Y (2010.9) Temporal and spatial variation in feeding ecology of Japanese macaques. The 23rd Congress of International Primatological Society, Kyoto.
- 18) Yoshikawa M, Ogawa H, Koganezawa M, Idani G (2010.9) Habitat selection by chimpanzees (*Pan troglodytes*) in savanna woodland, western Tanzania. The 23rd Congress of International Primatological Society, Kyoto.
- 19) Idani G (2010.9) Studies and conservation activities of wild bonobos at Wamba in the Luo Scientific Reserve, Democratic Republic of the Congo. Biodiversity, Zoos and Aquariums: The message from

- animals. The 15th Kyoto University International Symposium, Nagoya.
- 20) Kanamori T, Kuze N, Bernard H, Malim TP, Kohshima S (2010.9) Feeding ecology of Bornean orangutans (*Pongo pygmaeus morio*) in Danum Valley, Sabah, Malaysia: A 3-year record including two mast fruitings. The 15th Kyoto University International Symposium, Nagoya.
 - 21) 鈴木崇文、冠地富士男、杉浦秀樹、松沢哲郎、伊谷原一 (2010.11) 幸島野生ニホンザルにおける58年間の人口統計学的解析、第13回SAGAシンポジウム、横浜
 - 22) 鶴殿俊史、谷川和也、鈴木幸一、石井則久、藤澤道子、伊谷原一 (2010.11) チンパンジーに見られたハンセン病の1例、第13回SAGAシンポジウム、横浜
 - 23) 吉田友教、岡本宗裕、明里宏文、今井啓雄、松井淳、早川敏之、生駒智子、伯川美穂、齊藤波子、渡邊朗野、兼子明久、宮部貴子、鈴木樹理、平井啓久 (2011.5) 京大霊長研に見られたニホンザル血小板減少症(4):疫学調査. 第58回日本実験動物学会総会、東京
 - 24) 明里宏文、鈴木樹理、岡本宗裕、宮部貴子、渡邊朗野、兼子明久、熊崎清則、阿部政光、鎌中慶朗、前田典彦、森本真弓、渡邊祥平、須田直子、平井啓久、松沢哲郎 (2011.5) 京大霊長研に見られたニホンザル血小板減少症(1):概要報告. 第58回日本実験動物学会総会、東京
 - 25) Kawamoto Y (2011.6) Genetic diversity of macaques in Sri Lanka. "International Symposium Integrative Research on Monkeys, Man and Malaria in Asia", University of Sri Jayewardenepura, Sri Lanka.
 - 26) 橋本千絵、安岡宏和、手塚賢至、古市剛史 (2011.7) ウガンダ共和国における森林保護区周辺の地域住民による森林資源の利用の実態. 第27回日本霊長類学会大会、犬山
 - 27) 金森朝子、久世濃子、山崎彩夏、Bernard H, Malim PH, 幸島司郎 (2011.7) ボルネオ島ダナムバレー森林保護地域における野生オランウータンの個体群密度と果実生産量 -3回の一斉結実を含む5年間の季節変化- ポスター発表. 第27回日本霊長類学会大会、犬山
 - 28) 川本芳、三戸幸久、樋口翔子、川本咲江 (2011.7) 津軽半島個体群の遺伝的特徴からみた北限のニホンザルの成立. 第27回日本霊長類学会大会、犬山
 - 29) 風張喜子、井上英治、川本芳、中川尚史、井上-村山美穂 (2011.7) 金華山のニホンザルの遺伝的多様性. 第27回日本霊長類学会大会、犬山
 - 30) 久世濃子、金森朝子、山崎彩夏、Henry Bernard, Titol Peter Malim, 幸島司郎 (2011.7) ボルネオ島ダナムバレー森林保護区において5年間に観察されたオトナ雄の移出入. 第27回日本霊長類学会大会、犬山
 - 31) 中村美知夫、ナディア・コープ、藤本麻里子、藤田志歩、花村俊吉、早木仁成、保坂和彦、マイケル・A・ハフマン、稲葉あぐみ、井上英治、伊藤詞子、川中健二、沓掛展之、清野(布施)未恵子、郡山尚紀、リンダ・F・マーシャント、松本晶子、松阪崇久、ウィリアム・C・マックグルー、ジョン・C・ミタニ、西江仁徳、乗越皓司、坂巻哲也、島田将喜、リンダ・A・ターナー、上原重男、ジェームズ・V・ワキバラ、座馬耕一郎、西田利貞 (2011.7) マハレのチンパンジーの遊動域—16年間のデータから. 第27回日本霊長類学会大会、犬山
 - 32) 吉川翠、小川秀司、小金澤正昭、伊谷原一 (2011.7) 疎開林に棲息するチンパンジーの泊まり場の植生と地形. 第27回日本霊長類学会大会、犬山
 - 33) 今井啓雄、郷康広、平井啓久 (2011.9) 霊長類ゲノムスクリーニングによる自然発生的遺伝子変異モデルの探索. 第34回日本神経科学学会大会、横浜
 - 34) 辻大和 (2011.9) 金華山島におけるニホンザルの生態研究—長期調査からみえてきたこと—. 日本哺乳類学会奨励賞記念講演. 日本哺乳類学会、宮崎
 - 35) Yoshida T, Okamoto M, Akari H, Suzuki J, Miyabe-Nishiwaki T, Hayakawa T, Imai H, Matsui A, Watanebe A, Kaneko A, Hirai H (2011.9) Simian retrovirus-4-associated infectious thrombocytopenia in Japanese macaques. The Unlimited World Microbes International Union of Microbiological Societies 2011 Congress XV International Congress of Virology. Sapporo.
 - 36) 明里宏文、鈴木樹理、岡本宗裕、宮部貴子、渡邊朗野、兼子明久、阿部政光、釜中慶朗、前田典彦、森本真弓、渡邊祥平、須田直子、平井啓久、松沢哲郎 (2011.9) ニホンザル血小板減少症の発生に関する経過概要. 第152回日本獣医学会学術集会、大阪
 - 37) 明里宏文 (2011.10) 霊長類モデル動物を用いたウイルス感染症研究. 東京医科歯科大学・難治疾患共同研究拠点研究集会、東京
 - 38) 古市剛史 (2011.11) ボノボ:水がボノボを生んだ~コンゴ盆地のボノボの進化と生活. 第14回SAGAシンポジウム、熊本市動物園、熊本
 - 39) 古市剛史 (2011.11) ボノボの住むコンゴ盆地の大熱帯雨林:その現状と将来. 第56回プリマーテス研究会日本モンキーセンター、犬山

- 40) Nackoney J, 古市剛史, Baraldi A, Nolinari G (2011.11) コンゴ民主共和国の戦時下のルオー保護区周辺の森林の破壊とボノボ個体群におよぼす影響のモニタリング. 第65回日本人類学会退会, 沖縄県立博物館・美術館・那覇
- 41) 吉田友教 (2012.2) ニホンザル血小板減少症における病理組織解析. 第1回 ニホンザル血小板減少症シンポジウム, 京都
- 42) 古市剛史, Nackoney J (2012.5) コンゴ民主共和国戦時中の森林の空洞化: ランドサットイメージによる分析. 日本アフリカ学会第49回学術大会, 吹田
- 43) 岡本宗裕(2012.5) 実験動物感染症の現状:ニホンザル血小板減少症. 第59回日本実験動物学会・第46回日本実験動物技術者協会総会, 別府
- 44) 吉田友教, 宮部貴子, 郡山尚紀, 竹元博幸, 生駒智子, 渡邊朗野, 兼子明久, 渡邊祥平, 齊藤暁, 早川敏之, 鈴木樹理, 岡本宗裕, 松沢哲郎, 古市剛史, 明里宏文(2012.5) 大型類人猿における人獣共通感染症の抗体スクリーニング方法の開発. 第59回日本実験動物学会, 別府
- 45) 吉田友教, 竹元博幸, 佐藤英次, 坂巻哲也, 宮部貴子, 生駒智子, 渡邊朗野, 兼子明久, 渡邊祥平, 早川敏之, 鈴木樹理, 岡本宗裕, 松沢哲郎, 明里宏文, 古市剛史(2012.5) アフリカ野生大型類人猿におけるIgA抗体スクリーニングによる人獣共通感染症の実態調査. 第59回日本実験動物学会, 別府
- 46) 古市剛史, 坂巻哲也, Mulavwa MN (2012.7) ルオー学術保護区のボノボによる湿地林の利用. 第28回日本霊長類学会大会, 名古屋
- 47) 橋本千絵, 古市剛史(2012.7) ウガンダ共和国カリンズ森林の野生チンパンジーにおける, 遊動パターンとパーティ構成の雌雄差について. 第28回日本霊長類学会大会, 名古屋
- 48) Huffman MA, Nahallage CAD, Kawamoto Y, Kawamoto S, Shotake T (2012.7) Two is company, three is a crowd: スリランカのトクモンキー (*Macaca sinica*) の系統地理. 第28回日本霊長類学会大会, 名古屋
- 49) 川本芳, 樋口翔子, 田中洋之, 川本咲江 (2012.7) ニホンザル野生個体群における主要組織適合遺伝子複合体 (MHC) 領域のマイクロサテライト座位の多様性. 第28回日本霊長類学会大会, 名古屋
- 50) 風張喜子, 井上英治, 川本芳, 中川尚史, 宇野壮春, 井上-村山美穂 (2012.7) 島嶼のニホンザル個体群における個体群縮小の遺伝的影響. 第28回日本霊長類学会大会, 名古屋
- 51) 竹元博幸, 樋口翔子, 川本芳, 坂巻哲也, 古市剛史 (2012.7) ボノボ野生個体群の広域的な遺伝子構造:ミトコンドリアDNAタイプの多様性と分布(予報). 第28回日本霊長類学会大会, 名古屋
- 52) 吉川翠, 小川秀司, 小金澤正昭, 伊谷原一(2012.7) タンザニア乾燥疎開林地帯のチンパンジーの採食品目とその季節変化. 第28回日本霊長類学会大会, 名古屋
- 53) 吉田友教, 宮部貴子, 郡山尚紀, 竹元博幸, 生駒智子, 渡邊朗野, 兼子明久, 渡邊祥平, 齊藤暁, 早川敏之, 鈴木樹理, 岡本宗裕, 松沢哲郎, 古市剛史, 明里宏文(2012.7) 大型類人猿における糞便サンプルを用いた人獣共通感染症の抗体スクリーニング方法の開発. 第28回日本霊長類学会, 名古屋
- 54) Barnett A, Alho C, Chism J, Covert N, Feanside P, Fragaszy D, Ferreira GR, Furuichi T, Hanya G, Hashimoto C (2012.8) Primates of flooded habitats: threats, perspectives and future research. The 24th Congress of International Primatological Society, Cancun, Mexico.
- 55) Hashimoto C, Furuichi T (2012.8) Female association and ranging in chimpanzees of the Kalinzu Forest, Uganda. The 24th Congress of International Primatological Society, Cancun, Mexico.
- 56) Hashimoto C, Sakamaki T, Mulavwa MN, Furuichi T (2012.8) Hourly, daily, and monthly changes in the size and composition of parties of chimpanzees at Kalinzu and bonobos at Wamba. The 24th Congress of International Primatological Society, Cancun, Mexico.
- 57) Yoshida T, Takemoto H, Sato E, Sakamaki T, Miyabe-Nishiwaki T, Ikoma T, Watanabe A, Kaneko A, Watanabe S, Hayakawa T, Suzuki J, Okamoto M, Matsuzawa T, Akari H, Furuichi T (2012.8) Epidemiological study of zoonotic pathogens by screening of IgA antibodies in wild great apes in Africa. The 24th Congress of International Primatological Society, Cancun, Mexico.
- 58) Nahallage CAD, Huffman MA, Kawamoto Y, Kawamoto S, Shotake T (2012.8) Phylogeography of toque monkeys in Sri Lanka. The 3rd International Symposium on Southeast Asian Primate Research, Bangkok.
- 59) Norbu T, Rabgay K, Wangda P, Dorji R, Sherabla, Kawamoto Y, Hamada Y, Oi T, Chijiwa A (2012.8) Ecological assessment of Assamese macaques for the control of agricultural damage in the western Bhutan Himalayas. The 3rd International Symposium on Southeast Asian Primate Research, Bangkok.
- 60) Idani G (2012.10) The study of the bonobo in tropical rain forest and the chimpanzee in the savanna woodland. CCTBio 1st International Workshop, INPA, Manaus, Brazil.
- 61) Yoshida T (2012. 12) Risk assessment and Surveillance of Zoonoses in wild bonobos. Symposium

7. 研究者略歴

課題代表者:古市 剛史

京都大学理学部卒業、理学博士、現在、京都大学霊長類研究所 社会進化分野教授

研究参画者

(1):川本 芳

東北大学理学部卒業、理学博士、現在、京都大学霊長類研究所 ゲノム多様性分野准教授

(2):明里 宏文

鹿児島大学農学部卒業、獣医学博士、現在、京都大学霊長類研究所 人類進化モデル研究センター教授

(3):伊谷 原一

酪農学園大学酪農学部卒業、理学博士、現在、京都大学野生動物研究センター教授

D-1007 高人口密度地域における孤立した霊長類個体群の持続的保護管理
 (1) 最小存続可能集団の定義にむけた孤立個体群の生態学的・集団遺伝学的研究

京都大学 霊長類研究所

社会進化分野	古市剛史
ゲノム多様性分野	川本芳
社会進化分野	ハフマン・マイケル
遺伝子情報分野	今井啓雄
生態保全分野	半谷吾郎
生態保全分野	橋本千絵
思考言語分野	林美里
社会進化分野	辻大和
社会進化分野	竹元博幸

平成22～24年度累計予算額：89,103千円

(うち、平成24年度予算額：28,634千円)

予算額は、間接経費を含む。

[要旨]

絶滅が危惧される野生霊長類の地域個体群を対象に、類人猿による利用実態にもとづいた生息地評価と、各個体群の遺伝的多様性および遺伝的多型の分布様式に関する研究を行った。

広域レベルの生息地評価では、ボノボの生息確認地の GPS (汎地球測位システム) 情報と、農地からの距離等の GIS (地理情報システム) 情報をあわせて分析してボノボの生息好適地を割り出し、国立公園や保護区として守られていない地域については保護の網をかぶせるようつとめた。一方詳細レベルでは、1年間にわたって蓄積されたボノボの遊動の毎分の GPS 情報と、ランドサット衛星画像から割り出した植生タイプを比較して植生タイプごとの利用度を割り出し、ボノボの生息地の環境許容度に関する分析を進めた。

遺伝子に関する研究では、ニホンザル、アカゲザル、トクモンキー、ボノボの野生個体群を対象に、糞資料を用いた非侵襲的方法で地域個体群内の遺伝的多様性や個体群間の交流について調べた。まず糞 DNA による調査法の検討を行い、溶解液によるサンプリング法を考案し、簡便な DNA 調製法を確立した。また、調製 DNA の質と量を判定する独自の検査系も考案し、実用化した。つぎに、糞で得た少量の DNA で多種の遺伝標識を反復試験する方法として、2段階マルチプレックス PCR を改良し実用化した。さらに、繁殖や生存に関係する MHC 領域の遺伝的多様性を検査するため、MHC-STR 検査法を導入し、研究に応用した。

これらの方法を用いて、東北地方に孤立するニホンザル個体群の遺伝的多様性とその原因、長期観察から繁殖や生存の記録が豊富なニホンザル幸島個体群の MHC 多型の特徴、バングラデシュの都市に孤立するアカゲザル個体群の遺伝的特徴と成立過程、スリランカの固有種トクモンキーの亜種分化と遺伝分化の関係および系統地理、コンゴ民主共和国のボノボ個体群の mtDNA 変異からみた遺伝的多様性と地域分化等、保全計画の立案に資する基礎情報を把握できた。

[キーワード]

孤立個体群、生息地評価、植生利用、非侵襲的遺伝子分析、遺伝的多様性

1 はじめに

(1) 背景について

ヒト以外の霊長類はすべて赤道から中緯度の地域、すなわち人口密度の高いところにいる。そのため、人間とそれ以外の霊長類は共存することを余儀なくされ、農地の拡大や森林伐採等によって生息地が「分断化」され、「孤立化」している。将来にわたって霊長類個体群の存続を保証しようと考えた場合、大面積の自然林とそこに住む霊長類を保護するというだけでは、もはや対応できない。このような分断された個体群をいかに守り、いかに次世代に伝えるかが、霊長類を次世代にまで残そうとする場合の最重要課題となっている。日本は、アフリカだけでも10年～50年間も続く類人猿の長期調査地を6カ所も有し、類人猿の研究においては世界でも並外れた存在感を示している。また、野生霊長類が生息する唯一の先進国として、ニホンザルをどのように保護・管理して共存を維持していくのかという点が、常に世界の注目を集めている。本研究プロジェクトで、類人猿とニホンザルを中心として保護管理上の重要問題に先頭に立って取り組むことは、生物多様性の保全にむけた世界の動きの中で、日本の取り組みのプレゼンスを大いに高めることになる。

この目的のためには、まずそれぞれの霊長類種について、現在どこに生息しているか、どこが生息に適した地域か、その地域は保護政策によって守られているかどうかといった、広域レベルでの分析を行う必要がある。GAP分析ともよばれるこの分析は、生息現況の把握とともに、今後保護活動を展開すべき地域の選定にも役立つ。さらに、それぞれの生息地について、その霊長類種が採食、休息等にどのような植生をどの程度利用しているのか、年間を通じて生息を保証するにはどういった植生の組み合わせが必要かなどといった詳細レベルの分析を行い、各地域の生息可能頭数を評価する必要がある。これらの情報にもとづいて、地域レベルでの有効な保護計画を立案することができる。

一方、孤立個体群の保護には、遺伝的多様性の評価も欠かせない。個体群の孤立を理解するには、まず問題となる個体群の構成個体について遺伝子情報を集め、質的および量的な評価をすることが先決となる。また、生存や絶滅に関する研究は遺伝学的な情報だけでは成り立たず、遺伝子構成や遺伝子多様性と個体群パラメータの照合が必要になる。

孤立個体群や絶滅に瀕する個体群から遺伝子情報を得るとき、捕獲に頼る試料採取は現実的でない。このため、本サブテーマにおける集団遺伝学的研究では、捕獲によらない、非侵襲的試料採取法(non-invasive sampling method)を採用する必要がある。実際には、個体の遺伝子を調査するため、糞に含まれる腸管由来の細胞をDNA分析の試料とすることになった。

多様な社会構造をもつ霊長類の野生個体群を対象にこのような集団遺伝学的調査を実施するとき、利用する遺伝子ツールの選択に配慮すべき問題として、標識遺伝子の遺伝様式がある。表1には調査に利用可能な遺伝子ツールとその遺伝様式の違いをまとめた。

表 1 霊長類の野生個体群を対象にした集団遺伝学研究で利用可能な遺伝子ツール

標識となる遺伝子ツール	遺伝様式
ミトコンドリア DNA (mitochondrial DNA, mtDNA)	母性遺伝
常染色体 DNA (autosomal DNA)	両性遺伝
X 染色体 DNA (X chromosomal DNA)	両性遺伝
Y 染色体 DNA (Y chromosomal DNA)	限性遺伝

遺伝子ツールの遺伝様式の違いと同様に、霊長類では種に特有な雌雄の生活史に注意することも本サブテーマの集団遺伝学的研究では重要である。ニホンザルや多くの旧世界ザルで顕著な母系社会をもつ種では、メスが出生群に残るのに対してオスは移住し、個体群間の遺伝子交流の担い手となる。一方、チンパンジーやボノボでは、メスが移住しオスが出生グループに残る逆の生活史をもつ。従って、遺伝様式の違いと生活史の違いによる性差を組み合わせることにより、対象種の個体群に関する遺伝的特徴の調査方法の設計が変わってくる。実際、本プロジェクトではマカク（ニホンザル *Macaca fuscata*、アカゲザル *M. mulatta*、トクモンキー *M. sinica* を含む分類単位）とボノボ *Pan paniscus* という異なる生活史をもつ対象につき、同じ遺伝子を別の意味をもつツールとして利用することになった。

(2) ツール開発の経緯

本サブテーマの集団遺伝学的研究では2つの重要な技術を考案し、応用できた。第一は糞試料による多様性研究手法の確立、第二は個体群の適応性評価との関連付けが期待できる主要組織適合遺伝子複合体 (MHC = major histocompatibility complex) にある DNA の反復配列多型の分析方法の確立である。

前者は1年目の研究で糞から独自の DNA 抽出と分析法を開発し、2年目の研究で更にその方法を改良した2段階マルチプレックス PCR 法を考案、利用することで達成できた。この開発により、本サブテーマで目標に掲げた種や個体群を対象にした遺伝学的調査は順調に進み、ほぼ当初の目的を満たす結果を得ることに成功した。それらの内容については、以下の節で詳しく説明する。

後者は2年目の研究で基本的なデザインを考案し、ニホンザル下北個体群で試験研究を行った。そのあと3年目の研究でニホンザル幸島個体群を対象に応用研究を行うとともに、ボノボの研究にも試験的に応用することで達成できた。このツール開発は、1年目の1月に行われたアドバイザーボード会議で、アドバイザーから受けたアドバイスが発端となっている。糞 DNA 分析の目処がたったことを報告した際に、いわゆる自然選択に対して中立と考えられる遺伝子標識以外に、孤立する個体群の生存や繁殖に関係深い適応関連遺伝子を加えることを求められたのが契機である。結果的には当時進めていた反復配列 (STR = short tandem repeat) 多型の検索を MHC 領域へ拡張する形となったが、こうした発想と技術的な開発は本研究プロジェクトの成果の中でも当初計画を超える内容を生み出した。

以上の新しいツール開発とともに、川本らにより検査法が確立できていた mtDNA および Y 染色体 DNA も個体群調査の標識として利用した¹⁾。

2 研究開発目的

(1) 広域レベル、詳細レベルの生息地評価

本研究では、1) 絶滅危惧種に指定されており、2) 種の生息域全域にわたって情報や試料の収集が可能で、3) 各地域での詳細な研究が行われている種として、ボノボ (*Pan paniscus*) を取り上げて生息地評価を行った。この分析ではまず、衛星画像と GIS (地理情報システム) による情報を活用して、ボノボの生息地、生息好適地、保護政策によって守られている地域を割り出して比較した。また、同じく衛星画像を用いた植生タイプの分類と、長年観察対象としてきたボノボの追跡データを組み合わせて、ボノボによる植生利用のパターンを割り出し、生息地の環境許容力を評価した。これらの研究は、ボノボの保護計画の立案に寄与するだけでなく、他の霊長類種の生息地評価にも応用できる手法の開発につながる。

(2) 個体群の遺伝学的調査のツール開発 — 糞 DNA による野外調査法の確立

遺伝子分析法を考案し、実用化の目処をつけることを目的とした。糞に含まれる細胞から調査個体の遺伝子情報を調査する際、妨げになる要因が主に3つある。第1は糞に含まれる細菌等からの DNA 混入、第2は低い DNA 収量、第3は胆汁酸塩やビリルビン (胆汁色素) などの PCR 阻害物質の影響、である。これらに関する対策なしには、安定で信頼性のある遺伝子情報を得ることは不可能である。従来は、市販の高価なキットを利用する研究が多かった。絶滅が危惧される霊長類は熱帯を中心に生息しており、野外での試料採取の方法や、採取した試料の保存に関しても、キットが求める条件を満たせないという問題も生じやすい。こうした問題の解決も含めて、広汎な野外調査に利用できる研究手法を開発することが、本サブテーマの第一の課題となった。

(3) 個体群の遺伝学的調査のツール開発 — 多標識検索方法の確立

糞試料から得られる DNA 量は少ない。少量の DNA から効率的に多様な遺伝標識に関する個体情報を得るための技術開発を目標にした。細胞当たりの DNA コピー数が多い mtDNA はタイピングが容易であるが、シングルコピーの DNA 標識である多くの STR 標識や性染色体性の DNA 標識のタイピングは難しい。DNA を多量に回収することには限界があることから、ここでは分析の可否を判断する基準を設けることを目的とした。先行研究では、癌原遺伝子の一種 *c-myc* を利用したリアルタイム PCR により、調査個体由来の DNA を定量するアイデアが報告されていた²⁾。このアイデアを参考に、安価で簡便に試料の利用価値を選別する検査系を設計した。次に、選別した試料につき、シングルコピーの標識遺伝子を多数調べる方法を検討した。こうした検討は、糞試料に含まれる遺伝情報を効率的に利用するフィールド研究の基礎技術になるもので、第二の課題として重要な開発目標になった。

(4) 個体群の遺伝学的調査のツール開発 — MHC-STR 検査法の確立

ヒト、チンパンジー、ボノボでは第6染色体、マカクでは第4染色体にある MHC 領域には罹患性、抗病性、免疫など、生存や繁殖を司る機能的に重要な多数の遺伝子が配位することが知られている。近年のゲノム研究の発展により、この領域にある機能遺伝子群やその関連部位では、遺伝子重複、組み換え、逆位改変など複雑な DNA の構造変化があることがわかっている。また、顕著に認められる遺伝的多型の維持には自然選択が強く関与する場合があることも知られている。

他方、生物がもつ MHC 領域の遺伝的多型は、DNA 構造変化が著しいために、時として相同領域の判定が難しく、個体変異を集団レベルで比べる際に問題がつかまとう。多くの先行研究は MHC 領域の多型を検出しながら、相同性比較の難しさから個体群、特にここで問題にする野生動物の個体群の遺伝的特性を確たる基準で定量し議論することができていない。塩基配列解読や免疫学的手法による個体比較は行われてきたが、類人猿やマカクの野生個体群を体系的に調査するには至っていない。しかし、MHC 領域の遺伝的多型を比較することは、個体群レベルで生存維持を研究するのに重要な情報であることは明らかで、この検査法を確立することは今後の保全遺伝学に重要な意味をもつと考えた。そこで、本研究では MHC 領域にあって機能的には重要性が低いと予想される STR に検出できる多型を遺伝標識に利用することを検討した。言うまでもなく、この標識自体には適応的意義を付与できるわけでないが、近傍にある機能的に重要な遺伝子群と連鎖し、ハプロタイプとして連動する性格（ヒッチハイク効果）を念頭に標識開発を計画した。アドバイザリーボード委員のアドバイスが引き金となり、この課題に注目し、目標に加えることになった。

（５） 遺伝標識を利用した地域個体群の遺伝的多様性、地域分化の分析

ニホンザルでは各地の個体群を対象にした mtDNA の比較³⁾や、東北地方の個体群（津軽半島個体群を除く）を対象にした常染色体と Y 染色体の STR 多型の比較¹⁾が報告されている。これらは血液や皮膚組織から得た DNA 試料を利用して行われている。本サブプログラムでは糞由来の DNA 試料を研究利用することが目標になったことから、ニホンザルでは新たに津軽半島に孤立するニホンザル個体群を対象に糞試料を採取し、遺伝学調査が可能かを試験した。また、スリランカのトクモンキー、バングラデシュのアカゲザル都市個体群、およびボノボでは糞由来の DNA 試料を中心に調査を試み、開発した非侵襲的調査法の実用性を検証することを目標にした。

3 研究開発方法

（１） 広域レベル、詳細レベルのボノボの生息地評価

広域レベルでは、コンゴ民主共和国コンゴ川左岸のボノボ生息地全域を対象に、過去の観察情報をもとにボノボの現在の生息地を割り出した（図 1）。また、GIS（地理情報システム）を用いて、ボノボの生息に影響を与えると考えられる生息域内各地の伐採地の密度、川からの距離、農地からの距離、人口密度を調べた。これらの情報を総合して、ボノボの生息好適地を割り出し、現在国立公園、学術保護区、コミュニティリザーブ等として保護されている地域と比較した（GAP 分析）。

詳細レベルでは 1973 年以来ボノボの生態学的研究が行われてきたルオー学術保護区（図 1、2）⁴⁾において、衛星画像（Landsat TM）から分析した植生タイプと、2008 年 1 年間にボノボを追跡しながら 1 分おきに記録した GPS の位置情報と、採食、休息等の行動データをあわせて分析し、季節ごとにボノボが採食や泊まり場としてそれぞれの植生を利用する頻度を割り出し、どのような植生がボノボにとって利用価値が高いのか、年間を通じて食物を得るためには、どのような植生が遊動域内になくはないのかといった生息地評価を行った。

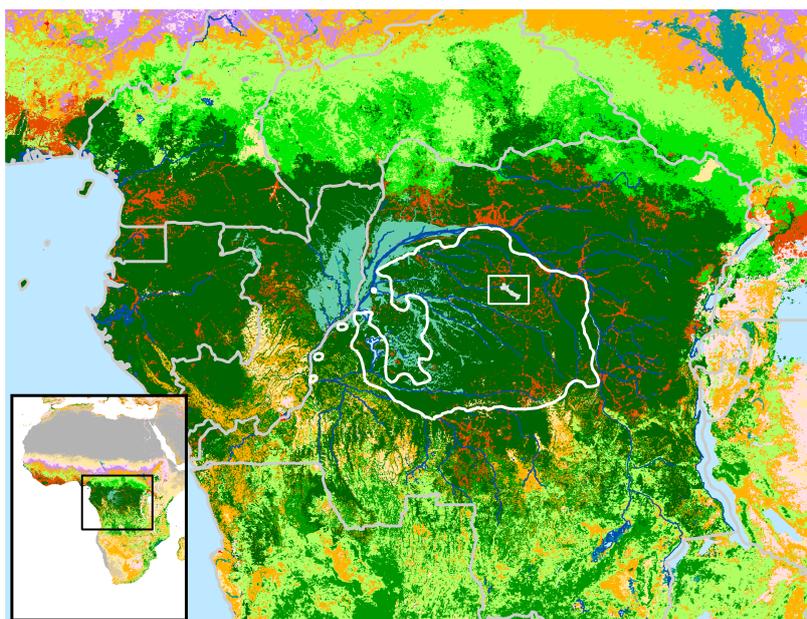


図1 コンゴ盆地中央部のボノボの生息域（白線で囲まれた地域）。生息域内の右上に位置する白く塗られた地域は、ルオー学術保護区とイオンジ・コミュニティ保護区。



図2 ルオー学術保護区と本研究期間に新たに設立されたイオンジ・コミュニティ・ボノボ保護区。

(2) 個体群の遺伝学的調査のツール開発 — 糞DNAによる野外調査法の確立

糞を材料に遺伝子分析用の試料を調製する方法として、野外での採取・保存には二つの異なるアプローチが考えられる。実際、既存の方法はこれらのいずれかを採用して行われてきた。第一は、細胞を破壊せずに固定させる方法で、乾燥保存法である。この方法ではシリカゲルが利用され、採取した糞を無処理で直接乾燥させる直接シリカゲル乾燥法と、いったんアルコールで固定

させてから乾燥させる間接シリカゲル乾燥法がある。第二は、糞採取の直後に細胞膜を破壊させ細胞内容物を溶液に保存する液浸保存法である。市販の製品を利用するこの方法には、RNAlater 法 (Applied Biosystems 社製など) や ASL 法 (Qiagen 社の stool kit に添付されている組成不明の溶解液) がある。本研究では、乾燥保存法より液浸保存法が優れていると判断し、既存の製品に頼らずに採集地で溶解液により細胞を破壊し保存する液浸保存法を独自に考案した。この判断理由は、1) 乾燥法では乾燥状態でも微生物の増殖による DNA 試料の劣化の怖れがある、2) 液浸法では採取直後に細胞内容物を浮遊させ、DNA の分解阻害薬を加えておくことにより、長期にしかも常温保存できる、3) 高温多湿の調査地でシリカゲルの劣化を心配しながら頻繁に交換する必要がない、からである。

自家製の保存液は、細胞膜を破砕する界面活性剤として SDS (ドデシル硫酸ナトリウム、sodium dodecyl sulfate)、DNA 分解酵素の阻害剤として EDTA (エチレンジアミン四酢酸、ethylenediaminetetraacetic acid) および Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0) を主成分とする溶解液とした。この溶液は White らが他の目的で有核赤血球をもつ爬虫類に利用したもの⁵⁾を参考に考案したもので、表 2 にその内容を示した。

表 2 糞採取に利用した溶解保存液の内容

成分	容量
1M Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0)	50 ml
0.5M EDTA 溶液 (pH 8.0)	100 ml
5M NaCl 溶液	1 ml
SDS	2.5 g
蒸留水	全量が 500 ml になるように添加

野外調査のサンプリングでは、上記の溶解液をオートクレーブ後に 2 ミリリッターの滅菌セラムチューブに (容量 2 ミリリッター) に分注して携行した。滅菌綿棒を使い、糞表面を擦って付着する腸管細胞を採り、溶解液に棒端を浸けて付着物を溶かし込んだ。この擦り取り作業は綿棒当たり 4 回、2 本使って計 8 回採取した。採取後はチューブキャップを閉めて、常温で実験室まで保存した。この方法で、少なくとも試料は 2 年間保存できることを確認している。

溶解液に保存し実験室に搬入した試料は、遠心処理、阻害物質除去処理、DNA 精製処理の 3 段階を経て調製した。はじめに、溶液に残る糞内容物やその他の大きな混入物を除去するため、1,5000 回転/分で 15 分間の遠心を行い、粗分画を分別した。2 ミリリッターのチューブを用意し、上清を 1.5 ミリリッター移し替えた。この中に、加水分解したジャガイモデンプン 600 マイクログラムを加え、ボルテックスミキサーで約 1 分混合し、試料中の PCR 阻害物質と考えられるビリルビンや胆汁酸塩の除去を図った。遠心後、36 度の恒温機に 10 分静置し、ふたたびボルテックスミキサーで攪拌したのち、15,000 回転/分で 10 分間遠心した。上清 700 マイクロリッターを別のチューブ (容量 1.5 ミリリッター) に移した。続いて、Promega 社製の Wizard SV Gel and PCR Clean-up System を利用し、シリカ膜による DNA 精製処理を行った。等量の Membrane Binding 溶液を試料液に加え攪拌してカラムに充填し、10,000 回転/分で 1 分の遠心処理により

カラムに DNA を吸着させた。そのあと 700 マイクロリッターの Washing 液で 10,000 回転/分で 1 分の遠心による洗浄を 2 回行い、最後に 500 マイクロリッターの Washing 溶液で 10,000 回転/分で 10 分の遠心処理を行い、水分をカラムから除去した。カラムを滅菌済みの 1.5 ミリリッターのチューブに装填し、50 マイクロリッターの純水をシリカ膜へ滴下したのち、10,000 回転/分で 1 分の遠心処理により DNA を膜から溶出させた。得られた DNA 調製試料はマイナス 30 度で凍結保存し、分析に利用した。

本研究では、糞 DNA の STR 分析への利用につき、考案した方法と既存の方法を比較するため、ASL 法と間接シリカゲル法（いったんエタノール固定してから乾燥保存）との成績の違いを検討した。

調製 DNA が遺伝子分析に利用できるかの判断については、Morin らが詳細な検討を行っている²⁾。この中では、糞に混入する微生物由来の DNA と被検体となる宿主霊長類の DNA を区別するため、霊長類特異的なゲノム因子を利用した定量 PCR を行っている。ここで使われた標識因子は霊長類に特異的な癌原遺伝子（oncogene）の *c-myc* である。彼らはリアルタイム PCR 機による定量から、安定した結果が得られる STR 分析には一反応あたり 200 ピコグラム以上の宿主 DNA が必要と結論している。そこで、この検査系を参考に、調製 DNA に含まれる宿主 DNA 量の測定を試みた。この検査では検量線を描くため、ヒト胎盤由来の精製 DNA で濃度既知のコントロール試料を調製して利用する。さらに本研究では、この検査系を改良して、簡便かつ安価に宿主 DNA を定量するため、電気泳動後の PCR 産物の染色強度を利用した方法を考案した。

この簡便定量法では、定量 PCR 法と同様に濃度既知のコントロール試料ともども、*c-myc* プライマーを利用して検体から調製した DNA の PCR を行う。得られた PCR 産物を適量用いて（通常は 3～5 マイクロリッター）、2 パーセントのアガロースゲルにより 100 ボルト定圧の条件で 30～40 分の電気泳動を行う。この際には TAE 緩衝液系を利用した。泳動後、臭化エチジウムで染色し、トランスイルミネーターで紫外線照射したときに観察できる蛍光発色を直接観察あるいは写真撮影した。コントロールにした既知濃度の DNA 試料の発色強度と比較して、200 ピコグラムのコントロールより弱い発色しかないものは、遺伝子分析（特に STR 多型検索）には不適と判断した。また、考案した簡便定量法が定量 PCR 法による判定結果と相関するかを、ニホンザルの糞から調製した DNA 検体により確認した。

（3） 個体群の遺伝学的調査のツール開発 — 多標識検索方法の確立

試料に含まれる DNA 量が少ないことから、糞由来の DNA 試料の再現性試験回数を飛躍的に増加させる方法の開発は本サブテーマの中で、重要な課題となった。ここで考えた方法は、2 段階マルチプレックス PCR 法である。この方法の特徴は 1 段階目の PCR で蛍光標識をつけないマルチプレックス PCR を多数座位で行い、予め標的座位を選択的に DNA 増幅したあと、2 段階目の PCR で蛍光標識をつけたプライマーで再度増幅し多型を検索することである。2 段階目の PCR を座位ごと行う既報⁶⁾とは違う 2 重マルチプレックス PCR を試みた。この実験の意図するところは、少ない収量の糞 DNA 試料を部分増幅し、分析可能な原試料を増やした上で、再現性試験を繰り返し、信頼性の高い結果を多くの DNA 標識で得るところにある。

1 段階目の PCR では、検索対象に複数の標識に対応した蛍光ラベルしないプライマー対を 20 ピコモルに調製し、反応液を調製した。通常の実験では、初回に増幅対象とする標識数を最大 10

までとし、検索対象をこれ以上にする場合には、10 以内になるように分割してプライマーの混合を調整した。表 3 に 2 段階マルチプレックス増幅に利用する反応液の組成と PCR 条件をまとめた。

表 3 改良した 2 段階マルチプレックス PCR の反応液組成と反応条件

第 1 PCR 反応（10 標識の場合）

成分	1 検体当たりの容量（総量 20 μ l）
調製した DNA 試料	1.0 μ l
緩衝液（2 倍濃縮液）	10.0 μ l
dNTP 液	4.0 μ l
20pM プライマー（非標識フォワード）	0.15 μ l \times 10 種類 = 1.5 μ l
20pM プライマー（非標識リバース）	0.15 μ l \times 10 種類 = 1.5 μ l
DNA ポリメラーゼ（KOD FX）	0.4 μ l
純水	1.6 μ l

反応	条件
初期熱変成	94 度 2 分間
サイクル増幅	35 サイクル
サイクル変成反応	98 度 10 秒間
サイクルアニーリング反応	58 度 30 秒間
サイクル伸長反応	58 度 30 秒間

第 2 PCR 反応（3 標識の場合）

成分	1 検体当たりの容量（総量 12.5 μ l）
第 1 PCR 反応産物	0.5 μ l
緩衝液（2 倍濃縮液）	6.25 μ l
dNTP 液	2.5 μ l
5 pM プライマー（標識フォワード）	0.375 μ l \times 3 種類 = 1.125 μ l
5 pM プライマー（非標識リバース）	0.375 μ l \times 3 種類 = 1.125 μ l
DNA ポリメラーゼ（KOD FX）	0.25 μ l
純水	0.75 μ l

反応	条件
初期熱変成	94 度 2 分間
サイクル増幅	45 サイクル
サイクル変成反応	98 度 10 秒間
サイクルアニーリング反応	58 度 30 秒間
サイクル伸長反応	58 度 30 秒間

STR の遺伝子型タイピングでは、3100 Genetic Analyzer ないしは 3130xl Genetic analyzer (Applied Biosystems 社) によるフラグメント分析を行った。実験では、サイズマーカーに GeneScan 400HD ROX Size Standard を利用し、解析にはソフトウェア Genotyper ないしは Gene Mapper (Applied Biosystems 社) を用いた。

(4) 個体群の遺伝学的調査のツール開発 — MHC-STR 検査法の確立

・幸島ニホンザルの MHC-STR 研究

2011 度から適応関連遺伝子群が密集する主要組織適合遺伝子複合体の開発を始めた。STR 多型解析の手法を改良し、2ステップマルチプレックス PCR を用いた分析を計画した。川本らの研究室が 1970 年代から収集してきた同個体群の血液試料と人口学的記録を利用することにより、4 期 (1972 年、1978 年、1986 年、1996 年) に生存したメンバーが保有していた MHC-STR のプロフィールを評価した (試料数は 1972 年 32、1978 年 50、1986 年 73、1996 年 56 で延べ検体数 211)。遺伝子構成の比較を行うために、MHC 領域の STR 6 座位と MHC 領域以外の領域 (non-MHC 領域) の STR 20 座位の多型を比較し、生息環境や発育・出産の変化と遺伝子構成の変化の関係につき分析した (図 3)。

上記の常染色体 STR 標識はいずれも MHC 領域とは別のゲノムサイトに配位する。MHC に関するニホンザルの STR 多型の検討では、アカゲザルゲノムプロジェクトの成果を参考に、主要組織適合性複合体ゲノム領域に配位することがわかっているマイクロサテライト DNA 標識 (MHC-STR) でニホンザルに適用できるものを検索した。この結果、6 座位 (染色体上の配置順に、D6S2972, D6S2970, D6S2704, D6S2691, MICA, D6S2793) を選び、野生個体群を調査した。個体群の履歴情報が蓄積されている幸島個体群を中心に、幸島 48 検体、宮崎県 220 検体、滋賀県で全頭調査ができた大津 E 群 39 検体、の合計 307 検体を分析した。この実験では、MHC 領域以外 (non-MHC) の STR 標識は 20 座位を利用し、多様性の比較を試みた。これらの non-MHC 座位は、D1S533、D1S548、D3S1766、D3S1768、D4S2365、D5S1470、D5S1457、D6S493、D6S501、D7S821、D7S794、D8S1106、D9S921、D10S61、D11S2002、D13S765、D14S306、D17S1290、D19S582、D20S484 である。

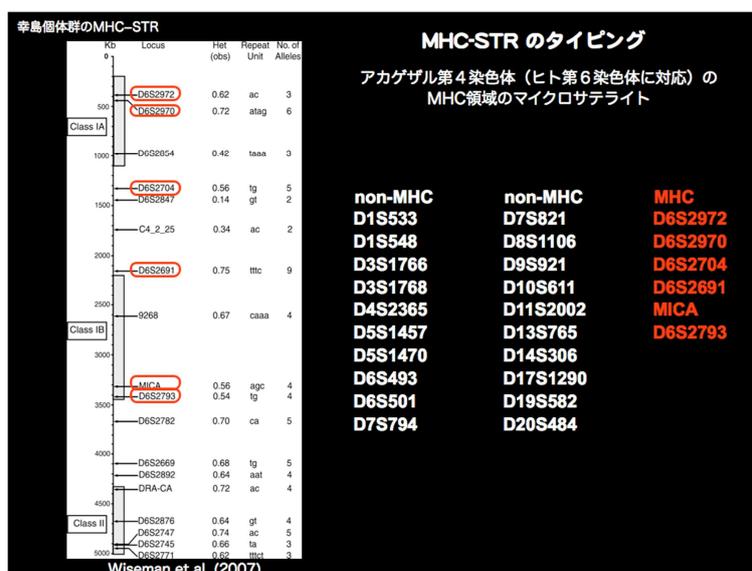


図 3 MHC-STR 分析の対象にしたマーカー群。赤丸と赤字で示したものが MHC 関連マーカー

さらに、MHCに関するニホンザルの研究では、個体群が保有する多様性を調べるため、個体群の人口動態とMHC領域の遺伝的変異性の関係に関する検討を進めた。このため、MHC-STRの6座位（染色体上の配置順に、D6S2972, D6S2970, D6S2704, D6S2691, MICA, D6S2793）とnon MHC-STRの20座位をニホンザルの幸島48検体、宮崎県220検体、滋賀県で全頭調査ができた大津E群39検体、の合計26座位307検体につき、遺伝子型判定を行った。なお、これらの分析に利用したDNA試料は血液から調製したものである。個体ごと、座位ごとに遺伝子型を判定し、対立遺伝子の頻度が有意な経時変化を示すかを幸島個体群で調べた。また、遺伝子多様性の指標として、座位当たりの対立遺伝子数とヘテロ接合率を算定し、幸島と他地域で比較した。

・ ボノボのMHC-STR研究

過去2年間に確立できた糞からのDNA抽出法により、非侵襲的に適応度関連遺伝子群の多様性をボノボでも分析できるかを検討した。さらに、ゲノムのより広い領域をカバーするマーカーが比較できるよう、ゲノム情報を活用する実験計画を立案し、2段階マルチプレックスPCR法の1次増幅で対象とするMHCマーカーを12種類（D6S2691, D6S2669, D6S2745, D6S2747, D6S2782, D6S2847, D6S2854, D6S2876, D6S2892, D6S2970, C4-2-25, DRA-CA）として、各個体群の反応性を試験した。利用可能なDNA試料が少なかったSalonga個体群以外の6個体群で、対立遺伝子の構成を比較した。

（5） 遺伝標識を利用した地域個体群の遺伝的多様性、地域分化の分析

・ ニホンザルの集団遺伝学的研究

東北地方で地理的に孤立する4つの地域個体群（下北、津軽、白神、五葉山）を中心に研究を進めた（図4）。この研究において、津軽個体群は未調査だったため、試料を新しく集める必要があり、2010年6月と10月に現地で糞試料を採取した。実際に供試できた試料総数は42検体であった。

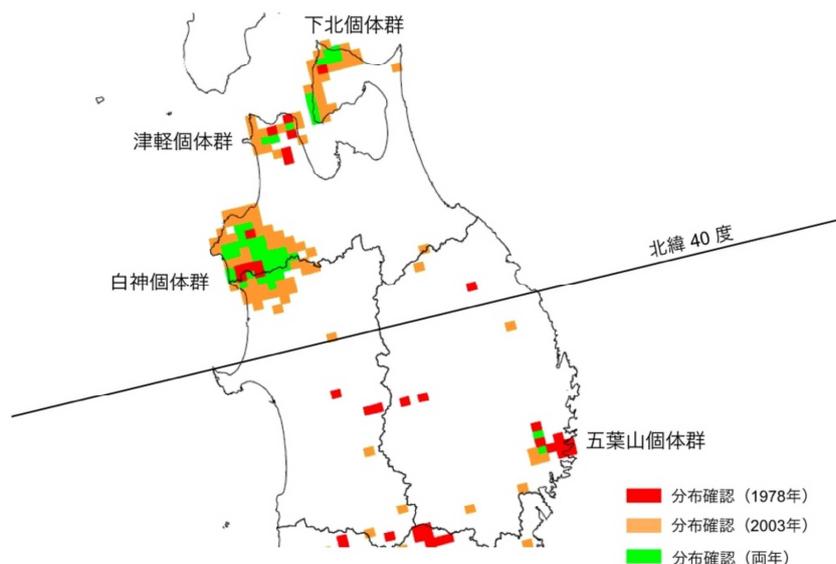


図4 孤立する地域個体群の調査で分析した東北北部のニホンザル個体群の分布

津軽半島の検体以外には、以前に入手できていた血液試料、皮膚組織資料、糞試料から抽出した DNA が利用でき、下北 41、白神 13、五葉山 7、宮城県 44、山形県 23、福島県 8 の検体をそれぞれ分析した。東北南部の 3 県のサル生息地は連続していることから、これらは一括して東北南部個体群（検体合計は 75）として扱った。

この研究で検索した STR 遺伝子座は、常染色体 11 種類（D1S533、D1S548、D3S1768、D5S1470、D6S493、D7S821、D10S611、D14S306、D17S1290、D19S582、D20S484）および Y 染色体 3 種類（DYS472、DYS569、DYS645）であった。また、Y 染色体標識については、糞試料の性判別を行い、オスのタイピングを行う必要があった。このため、橋本らの方法 7) を参考に、Amelogenin を標識とする PCR 法を採用し、検体中のオスを特定し、STR 分析に供した。

- ・ バングラデシュの都市に孤立するアカゲザルの集団遺伝学的研究

バングラデシュのアカゲザル都市個体群については、これまでに存在を確認した群れから、糞 DNA 分析に必要な試料を得るため、溶解液に綿棒で回収した腸管由来細胞を溶かし、試料収集を行った。アカゲザルが生息する都市や集落の 14 地点（Kolargaon、Chandpur、Satchari、Madhupur、Fenchuganj、Karamjal、Charmuguria、Kalenga、Jaintapur、Wajirpur、Chashnipeer、Jahan、Bormi、Chunati）から糞試料を採集し、mtDNA の第 1 可変域の塩基配列を解読して、地域間の遺伝的分化と地域内の遺伝的多様性を調査した。

- ・ スリランカのトクモンキーの集団遺伝学的研究

スリランカのトクモンキーでは、調査地に生息する個体群の系統地理的な関係の評価するために、mtDNA の非コード領域（339 塩基）と 16S rRNA（393 塩基）の配列を解読し比較した。前者では全島を網羅する 19 地点、後者では 24 地点を比較した。これらの試料は、現地の観察調査により、亜種の区別、標高や植生などの生息地の情報がわかっており、孤立や遺伝子以外の地域分化と遺伝分化の関係を解析するのに有効なものである。常法に従って遺伝子の系統解析を行い、クラスター分析などからトクモンキーの地域分化の性質を調査した。また、生態や形態から区別されている 3 亜種と mtDNA 地域遺伝分化の関係につき検討し、特に高所に孤立する亜種の *opistomelas* の遺伝的性格に注目した。

アカゲザルとトクモンキーを対象にした研究では、mtDNA の非コード領域の塩基配列を解読する際に、以下のプライマーを利用して PCR を行った。

LqqF（フォワードプライマー） 5' - TCCTAGGGCAATCAGAAAGAAAG -3'
 saru5（リバースプライマー） 5' - GGCCAGGACCAAGCCTATTTG-3'

PCR で得られた産物は、Promega 社製の Wizard SV Gel and PCR Clean-up System によるカラム処理でプライマー除去と洗浄ののち、ダイレクトシーケンシング法で塩基配列を解読した。

- ・ コンゴ民主共和国のボノボの集団遺伝学的研究

確立した糞 DNA 分析法の実用化を目指し、海外研究者の協力も得て、長期観察が行われているボノボ個体群の主要調査地 7 カ所（Malebo、Lac Tumba、Salonga、Lomako、Wamba、Iyondji、T12）で糞試料を収集した。採取した試料を用い、改良した STR 分析法（2 段階マルチプレックス PCR による STR 分析法）の実用性を検証した。少量試料を効率的に分析できるかを検討した。さらに、オス特異的な Y 染色体 DNA の分析でも同様の検索を進めて、ハプロタイプ分類を行った。ミトコ

ンドリア DNA 分析では、非コード領域の全塩基配列を解読する方法を確立し、調査へ応用した。

分析に供した検体総数は 376 で、個体の重複や検査に不適なため除外した残り検体数は 136 であった。調製した DNA 試料から、最初に非コード領域の全体を増幅するために、以下のプライマーを用いた。

outF (フォワードプライマー) 5' -ACCATCAGCACCCAAAGCTA-3'
outR (リバープライマー) 5' -GTGTGGCTAGGCTAAGCGTC-3'

PCR で得られた産物は、Promega 社製の Wizard SV Gel and PCR Clean-up System によるカラム処理でプライマー除去と、回収 DNA 産物の洗浄ののち、ダイレクトシーケンシング法で塩基配列を解読した。全長が 1 キロ塩基対を超えるシーケンシングのため、ラベリングでは以下のインターナショナルプライマーを利用して、解読した配列に誤りがないことを確認した。

53F (フォワードプライマー) 5' -GCCACCATCCTCCGTGAAAT-3'
inF1 (フォワードプライマー) 5' -CGACATCTGGTTCCTACCTC-3'
inF2 (フォワードプライマー) 5' -CCTATGTCGCAGTATCTGTC-3'
inR2 (リバープライマー) 5' -AGGAACCAGATGTCGGATAC-3'

4. 結果及び考察

(1) 広域レベル、詳細レベルのボノボの生息地評価

広域レベルの分析では、重要な生息好適地の半分程度が国立公園等の保護区として守られていることがわかった (図 5)。一方、かねてからその存在意義が疑われていたサンクル保護区は生息好適地とは言いがたくボノボもほとんど生息していないこと、ルオー保護区の南東、およびサンクル保護区の北の地域は大面積のボノボの生息好適地となっているにもかかわらず保護の網がかけられていないことがあきらかになった。この結果をもとにして、かねてから進めていたイヨンジ・コミュニティ・ボノボ保護区の設立にむけた働きかけを強めた結果、2012 年の 4 月にこの保護区の設立が正式に認可された (図 2)。

詳細レベルの分析では、衛星画像を元にして作成した植生図と、ルオー保護区に生息するボノボの E1 集団の 2008 年の遊動記録を用いて分析を行った (図 6)⁸⁾。その結果、この集団が、乾燥一次林だけでなく南を流れるルオー川の両側に広がるスワンプ林 (雨期には水で満たされる湿地林。ルオー川は図の下方 (南) のスワンプ林の中を蛇行して東から西に流れる) を頻繁に利用していること、スワンプ林では、乾燥一次林とほぼ同頻度で採食地や泊まり場として利用していること、この年の 6 月に見られるようにスワンプ林がきわめて重要な採食場所になっている時期があることなどがわかった (図 7)。このことは、ボノボの遊動域が一次林とスワンプ林の両方を含むような遊動域をもって生活しているという従来の指摘⁸⁾を具体的に裏付けるものとなった。また、採食にはスワンプを用いるものの夕方には一次林にもどって泊まるという従来の考えとは異なって、スワンプ林に多くの食物がある時期には、スワンプ林も泊まり場として利用していることがわかった。これらの分析結果から、一次林から遠く離れたスワンプ林にもボノボが生息している可能性があることがわかり、観察の行えないスワンプ林の奥地にはボノボはいないという前提で考えられていたボノボの分布や推定生息数を見直す必要があることを示唆するものとなった。

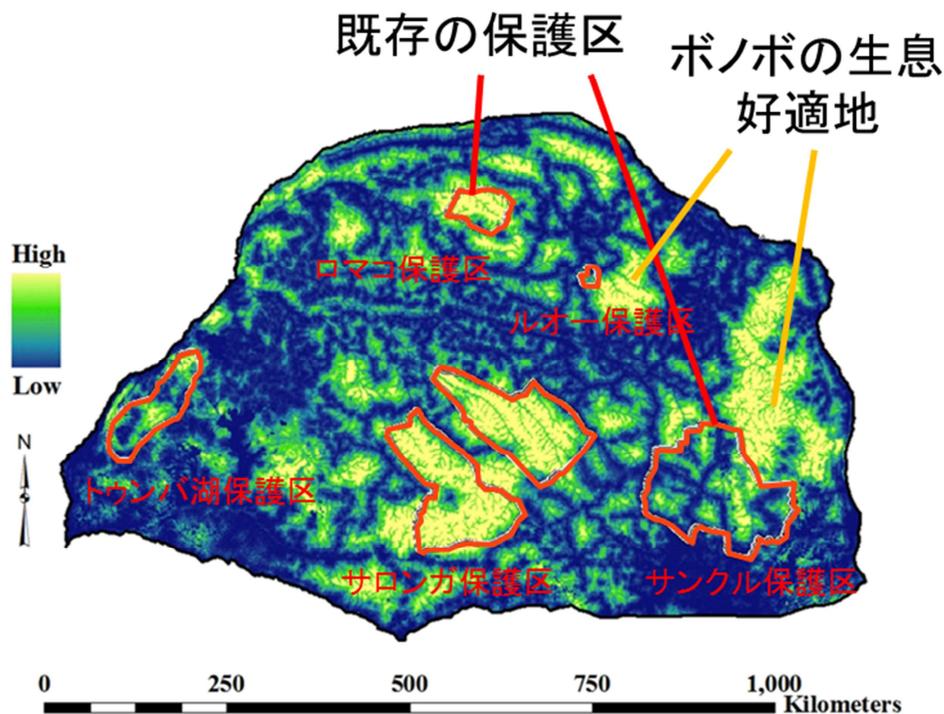


図5 ボノボの生息好適地と既存の保護区（Jena Hickey 他投稿中の論文の図を改変）。

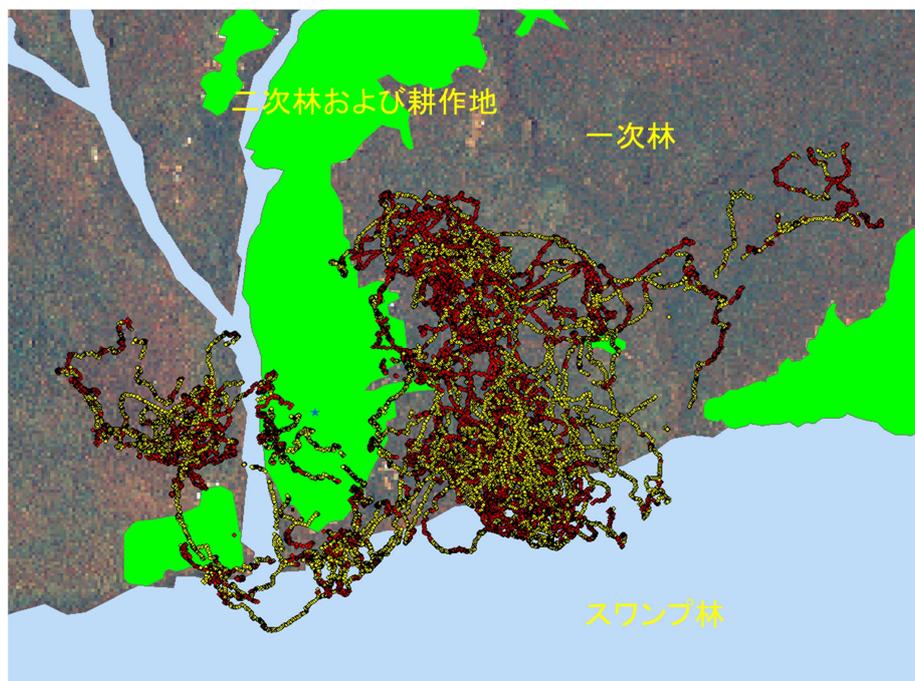


図6 植生タイプとE1集団の遊動ルート。毎分の1が1ドットで示されている。赤は直接観察、黄色は足跡を追跡しているときの位置情報。

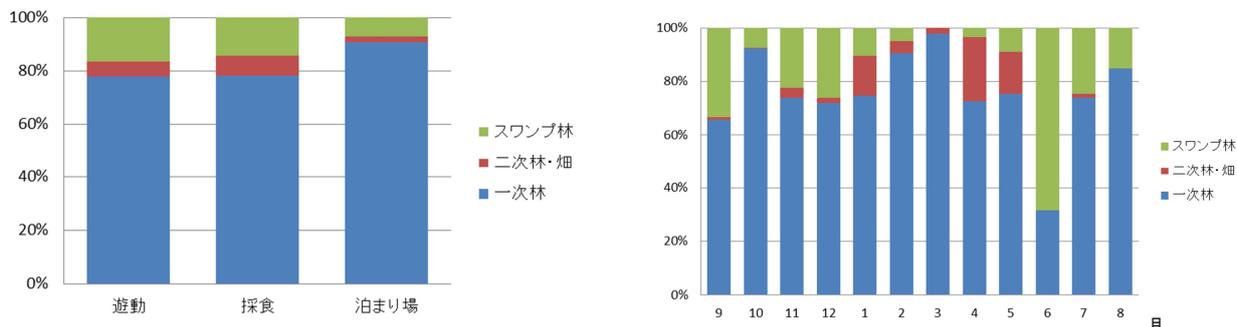


図7 目的ごと（左）、月ごと（右）の各植生タイプの利用

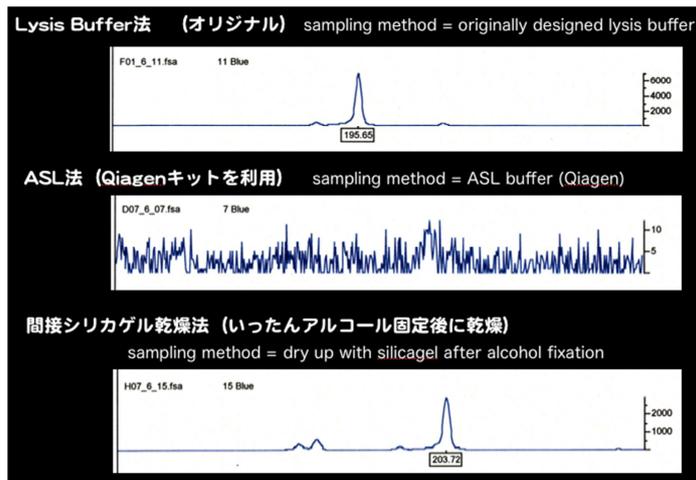
(2) 個体群の遺伝学的調査のツール開発 — 糞DNAによる野外調査法の確立

独自に開発した溶解液を利用した試料採取と保存法は、特に熱帯地域の気温や湿度が高い調査地でも操作性に優れ、常温保存がきく点で従来の方法より優れていた。分析への利用に問題がないかをSTR標識のタイピング結果で既存の方法とくらべた例を図8に示した。これは、同一の糞試料を3つの方法で採取・保存してDNA抽出し、特異的プライマーでPCRを行い、蛍光ラベルできた反応産物をフラグメント解析して得たパターンをくらべた結果である。

まずAの比較では、反応強度に方法による違いが認められる。ASL法ではシグナルが弱く、ノイズレベルにあるため、タイピングができなかった。一方、間接シリカゲル乾燥法と独自開発した方法では、強度は得られたが、異なるタイピング結果となった。前者では弱いシグナルを示す別の低分子ピークが認められ、判定に影響を与えたが、後者では明瞭な単峰性のピークが検出され、ホモ接合体の可能性を強く示唆した。つぎにBの比較では、ASL法と間接シリカゲル乾燥法で4検体と同じ3つのピークを示し、タイピングができなかった。しかし、独自に開発した方法では、2種類のヘテロ接合体に4検体が区別でき、判定に問題がなかった。以上の結果から、本研究で考案した溶解液を利用した糞試料の採取法は、野外調査に有効な方法と考えられた。

しかし、実際に野外調査に利用する際に注意が必要なものも明らになってきた。それは綿棒を利用した糞からの試料採取に関する問題である。本研究ではマカクとボノボを対象とした。このうちマカクでは初夏の水分含量の高い草本を主食とする時期に、またボノボでは果実を主食とする採食生態によりほぼ周年にわたり、軟便を排泄する。こうした軟便では、乾燥した綿棒を初回に糞表面に当てることで、大量に異物を含む試料が採取されてしまう。硬い糞であれば、新鮮な糞表面を擦ればあまり着色しない状態で溶液に細胞が回収できる。着色原因のひとつは胆汁色素（ビリルビン）と考えられ、これはPCRを阻害することが知られている。従って、糞採取では着色を抑えて、細胞を多く採ることが肝要といえる。こうした経験から、軟便を材料にする場合は、乾燥した綿棒を直接糞に当てることは避け、はじめに綿棒を溶解液に浸してから擦る方がよいと判断し、採取するようになった。

A 反応強度と反応パターンの比較



B 複数反応ピークの出現の比較

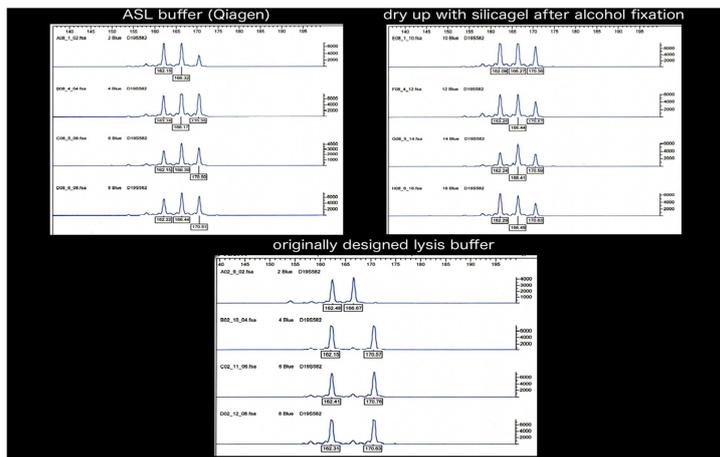


図8 異なるDNA採取・保存・調製法で得た糞DNAのSTR分析結果の比較

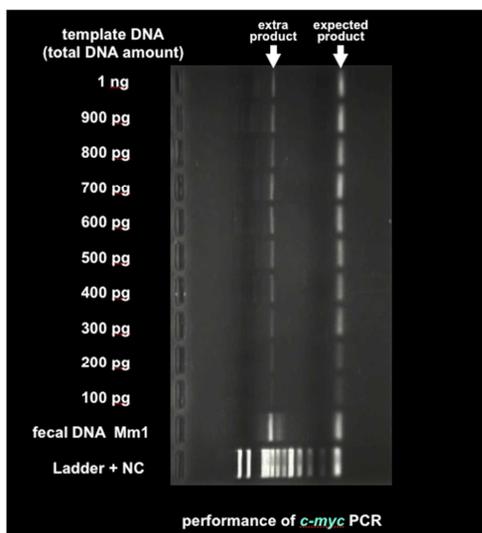


図9 *c-myc* の増幅産物の染色強度判定による調製DNA試料の判定例。

図9は定量PCRに代わる調製DNA試料の収率判定を電気泳動で行った例を示す。ここでは、市販の精製したヒト胎盤由来のDNAから希釈系列を作り、Morinらが報告した*c-myc*を増幅するプライマーでPCRを行った²⁾。下から2番目のレーンは京都大学霊長類研究所に飼育されているアカゲザル個体から採取した糞を材料に、開発したDNA調製法で得た試料のPCR産物である。比較したのは、濃度が100から1000ピコグラムのDNA試料で、濃度が高くなるほど*c-myc*に特異的なバンドの染色強度が高くなっている。この希釈系列のバンドの色とくらべることにより、調製した試料は300ピコグラム以上の収率をもつと判断できる。比色による定性的な定量法だが、十分に利用でき、コストは大幅に軽減できた。また、電気泳動装置とPCR機（現在では小型で海外でも利用可能な機種が販売されている）が用意できれば、原産国でも判定できるという利点がある。

図9の実験結果では、本来期待される約90塩基対のバンド以外に高分子領域にも別のPCR産物が認められた。この余剰産物はPCR反応条件や試料混入物に由来する可能性があり、定量PCRにも影響する場合が予想された。泳動パターンとしてバンドが区別できる利点から、万一こういう余剰産物が強く影響するような場合には、今回考案した定性的な簡便定量法の方が原法より正しい判断を下すことになるとも考えられる。なお、最終的に実用段階では、既知濃度のコントロールとして100、300、500ピコグラムのDNA溶液を利用し、300ピコグラム試料の産物を染色したときの蛍光強度より高いDNA試料なら、検体に利用できると判断することにした。

(3) 個体群の遺伝学的調査のツール開発 — 多標識検索方法の確立

マルチプレックスPCR法は、法医学、獣医学、生物学の分野で集団遺伝学研究に汎用される技術のひとつである。プライマーの親和性があるため、通常マルチプレックスPCRでは、予めプライマーの相性を試験し、互いの増幅を妨害しない組み合わせを決める必要がある。今回の分析では、第1段階のPCRにおいて異なるプライマー間でダイマー形成などによるPCR阻害効果を心配した。しかし、得られた結果では親和性の影響は第2段階でのみ考えられ、第1段階のPCRでは深刻ではなかった（データの詳細は省略）。

Arandjelovicらの提案した方法では、第2段階のPCRを個々の標識座位ごとに行っている⁶⁾。しかし、今回の研究により、第1段階だけでなく、プライマーの親和性を考慮すれば、第2段階でもマルチプレックスPCRを適用できた。第1段階のPCRでは、調製DNA試料を消耗するものの、第2段階では原試料を使わないため、大幅に試料の消耗が節約でき、さらに第2段階でもマルチプレックスPCRを利用すれば、コストや手間が節約できる。一方、当然ながら再現性試験の効率は原試料の質や量に影響される。本研究では、最終的に3回の反復試験を行う系を標準として、第1段階のPCRは最大10標識のプライマーセットを混合した20マイクロリッターの反応液の形で設計した。KOD FXを増幅酵素に利用して、35サイクルの反応でDNA増幅を行えば良好と判断した。第2段階のPCRは最大4標識のプライマーセットを混合する12.5マイクロリッターの反応に設計した。同じくKOD FXにより、45サイクルの反応でDNAをラベリングし、標識により1~30倍に水で希釈した反応産物をフラグメント解析に供した。多くの反応では、3回の反復試験を行えば、遺伝子型の判定が可能であった。

(4) 個体群の遺伝学的調査のツール開発 — MHC-STR 検査法の確立

・ニホンザルの MHC-STR 研究

2ステップマルチプレックス法は MHC 領域の STR 多型の検査でも有効であった。各 STR 座位の遺伝子につき、調査年の頻度推定値と誤差を計算し、座位ごと対立遺伝子ごとに頻度が調査期間で有意に変化したかを検定した結果を図 10 にまとめた。non-MHC の 20 座位では時間の経過とともにしだいに有意な頻度変化が増える傾向が認められた。一方、MHC の 6 座位では異なる傾向が認められ、1996 年と他の 3 期の間で有意な変化が認められたのに対して、他の期間の間では認められなかった。これが発育・出産の遅延の発生以降に現れていることに注目が必要である。しかし、分析結果から MHC 関連領域の遺伝子構成変化を適応と関わる変化だと断定することには問題が残った。サンプリングした座位の母数が異なる点、急激な個体数の変化による突然変異消失の影響、などについて今後さらに検討する必要がある。前者については、MHC-STR マーカーを増やし non-MHC に匹敵するサンプル座位を確保して比較すること、後者についてはボトルネックや集団拡大に関係した遺伝子数とヘテロ接合率の関係変化を解析して判断する必要があると考えている。なお、遺伝子多様性を他の個体群と比較した結果では、幸島個体群がやや低い傾向を示した（結果の詳細は省略）。

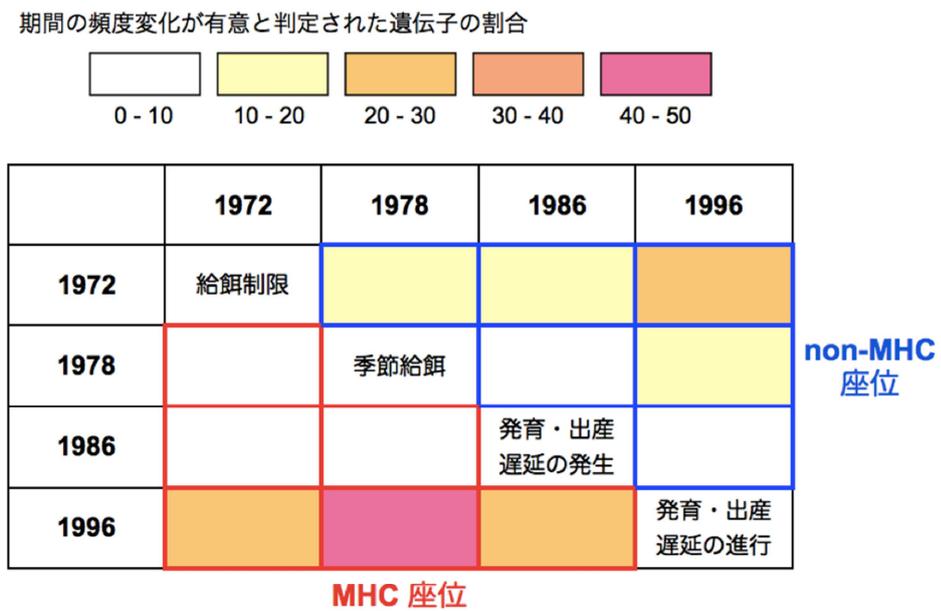


図 10 幸島個体群に認められた MHC 座位と non-MHC 座位の遺伝子構成変化の比較。

・ボノボの MHC-STR 研究

6つの調査個体群全体で検出した対立遺伝子の総数を MHC 領域の STR 座位ごとに集計した（図 11）。座位ごとに多様性は異なり、座位により対立遺伝子数は 2 個から 22 個まで変化した（図 11 の右図）。また、MHC 領域中の位置と多様性の程度を見ると、多様性が大きい座位は、クラス IA やクラス III の領域内の方が領域間より多い傾向が認められた（図 11 の左図）。さらに、個体群別に STR 座位の多様性を比較すると、座位により多様性の程度に違いが認められ、特定の

個体群が常にどの座位でも大きな多様性を示す傾向は認められなかった（データは表示せず）。以上の結果から、開発した手法を利用すれば、ボノボでも野生個体群を対象に MHC 領域の遺伝的多様性調査が可能と判断した。今回の予備調査で、個体群やマーカー座位により、多様性の分布が異なるという知見を得た。今後さらに試料数を増やし、non-MHC の STR マーカーの多様性や、サブテーマ 2 が問題にする個体群の感染履歴等の結果を参考にすると、適応に関係した自然選択を考える情報になる可能性がある。

(5) 遺伝標識を利用した地域個体群の遺伝的多様性、地域分化の分析

- ・ ニホンザルの集団遺伝学的研究

津軽半島での 2 回の糞試料採取により、2010 年度に考案した糞 DNA を利用する遺伝学調査の方法を検証することができた。考案した溶解液から抽出法で得た DNA 試料を使い、常染色体と Y 染色体のそれぞれ 11 座位、3 座位の STR 標識につき遺伝子型タイピングを実施した。表 4 はその試験結果を要約したものである。

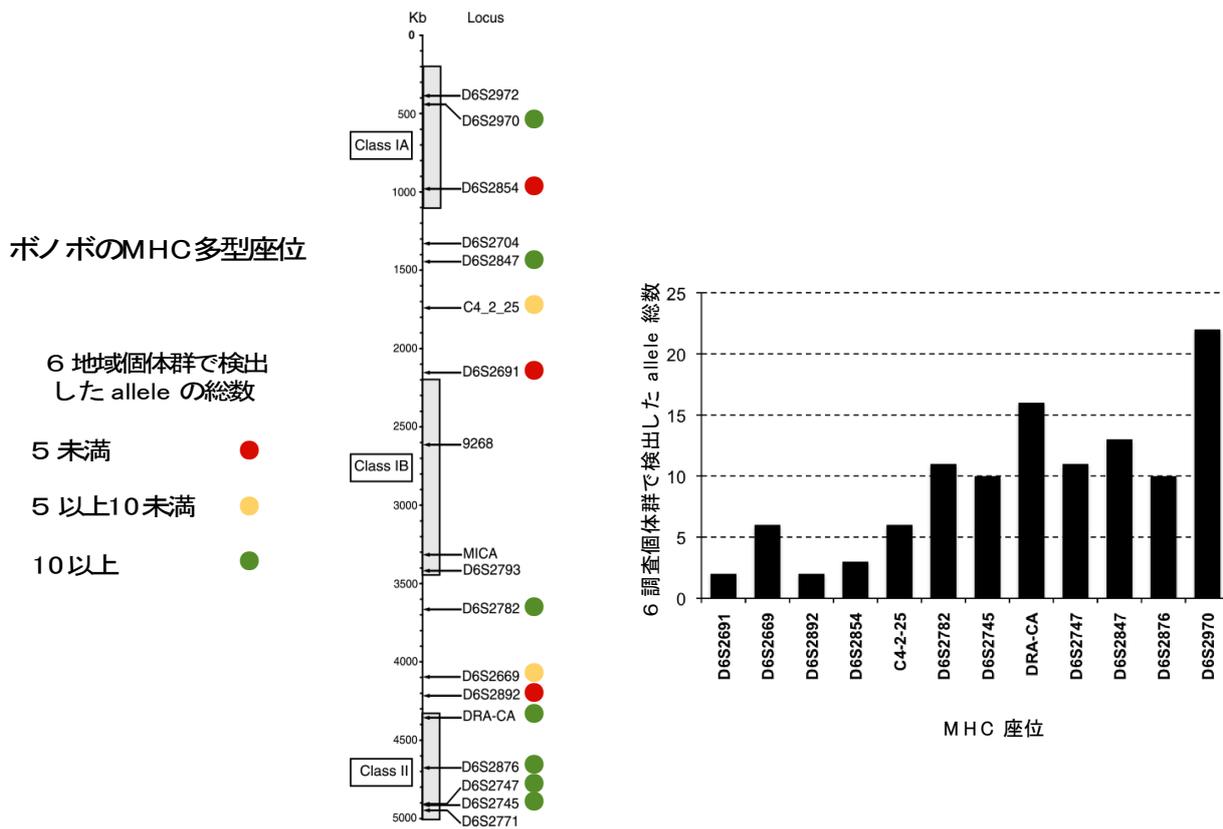


図 11 ボノボの調査個体群全体で MHC 座位に検出できた対立遺伝子 (allele) の総数。右図は座位間の allele 数の比較結果。左図は MHC 領域の各座位の位置を示す。allele 数を 3 つに区分し、MHC 領域の場所による多様性の違いを別色で示した。

表 4 津軽半島個体群の糞試料による STR 試験の結果要約

試料総数	42
重複試料（同一個体試料）	5
判定不能試料	4
糞以外の試料	1（皮膚試料）
分析成功率（全体）	90.2% (=37/41)
試料重複率	12.2% (= 5/41)
分析実質成功率	78.0% (=32/41)

糞以外に入手した皮膚試料の結果を除外して、糞分析の効率を判断してみると、同一個体からの重複サンプリングと試験に失敗した試料による情報の欠損が、全体の 22 パーセントと見積もられた。つまり、開発したシステムを利用すると、5 つ糞試料のうち約 4 つで STR 分析が可能となった。無論、こうした成功率は個体群サイズ、採集時の糞性状、サンプリングにかかるその他のバイアスの影響により、容易に変化することが予想できる。しかし、本研究が目的とする非侵襲的手法で野生霊長類の個体群に関する遺伝情報を得る方法としては、従来の同様の試みに匹敵あるいはそれを超えた実効性のある研究手法が提供できる判断した。実際、研究対象に選んだ津軽半島に孤立するニホンザル個体群については、断片的な生息地の情報があるくらいで、遺伝学的情報については mtDNA の少数例について塩基配列情報が報告されているだけだった³⁾。今回の調査により、常染色体や Y 染色体の遺伝子に関する情報が初めて得られたことは、貴重な成果となった。

津軽を加えて下北、白神、五葉山、東北南部の 5 つの地域個体群につき、遺伝子多様性と個体群間分化を検討した。まず STR 座位に認めた対立遺伝子の構成と分布の特徴では、座位による性格に違いもあるが、概ね北限に位置する下北と津軽の半島部で孤立する個体群で、対立遺伝子数の減少や他地域と異なる対立遺伝子構成が認められた。図 12 には常染色体 STR 遺伝子座の D20S484 と Y 染色体ハプロタイプの例を示した。Y 染色体標識では 3 つの STR 座位を別々にタイピングしたが、これらは完全に連鎖し相同染色体がないために組み換えが起こらず、常にセットの形でオスの世代間で伝達される。

図 12 の B に示した Y 染色体ハプロタイプにみられる変異の分布は、現在の個体群間にオスを介した遺伝子流動がどの程度あるかを判断するのに、直接的な証拠を与えるデータである。例外的に黄緑色で示したハプロタイプは調査したすべての個体群に検出された。この結果を地域間の遺伝的交流と見なすことも可能だが、別の可能性として共通祖先に由来するタイプが残存し現在は交流がないと解釈することもできる。このタイプ以外では、津軽と下北は他の個体群とかけ離れた構成を示し、オスを介した外部との交流が乏しいことを示した。

常染色体については 11 種類の STR 座位を標識とした。この結果をもとに、座位当たりの対立遺伝子数の平均値、および平均ヘテロ接合率（任意交配を仮定した場合の期待値）で各個体群の遺伝的多様性を比較した結果を図 13 に示した。いずれの場合も、遺伝子多様性は下北と津軽で他地域の個体群より低い傾向が認められた。また、下北では対立遺伝子数の平均値に比して平均ヘテロ接合率が低いのに対して、津軽では逆の関係が認められた。北限に孤立するこれら地域個体群

とは対比的に、分布が連続し生息個体数が多い東北南部個体群では、いずれの指標でも高い値となり、多様な遺伝子が保有されていた。

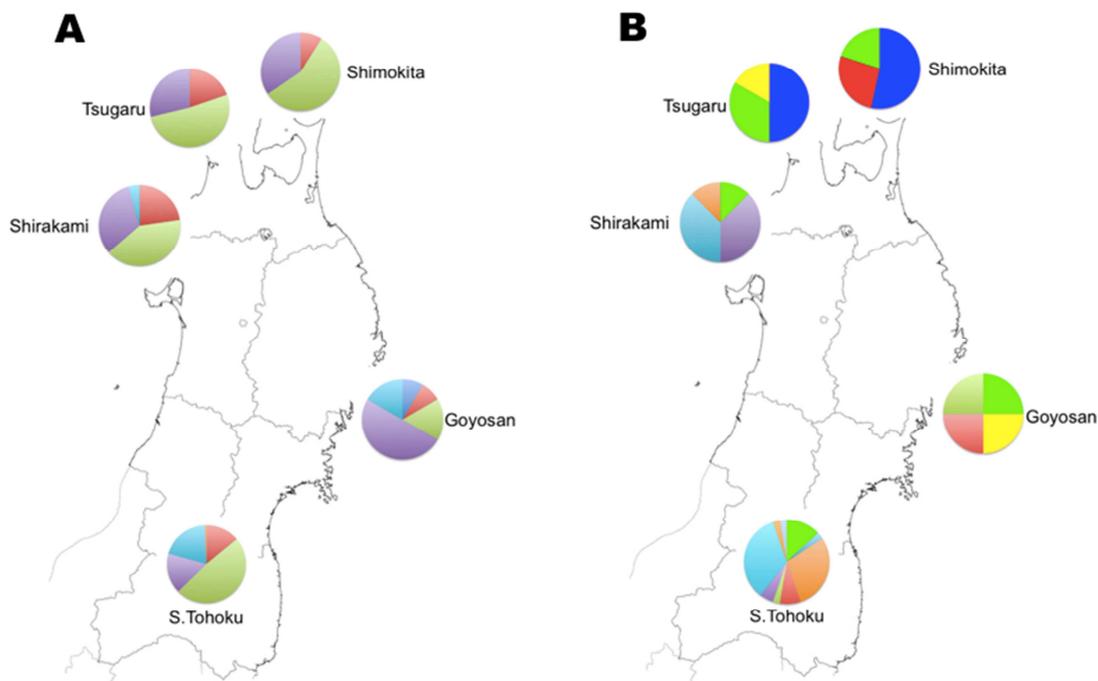


図 12 東北地方のニホンザル個体群に検出された遺伝子タイプの分布例。Aは常染色体の STR 座位 D20S484 の対立遺伝子を、Bは Y 染色体上に連鎖している 3 つの STR 座位 DYS472-DYS569-DYS645 に検出された対立遺伝子の組み合わせで定義できたハプロタイプを色分けして示した。

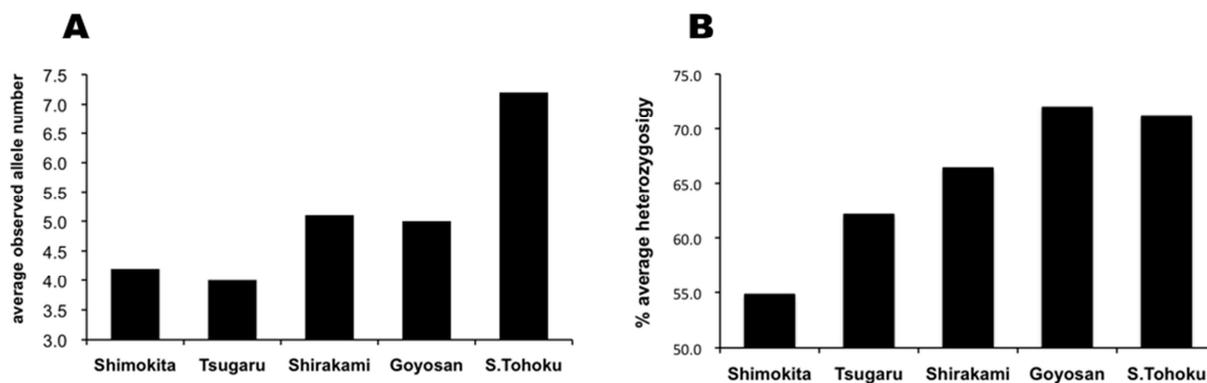


図 13 東北地方のニホンザル個体群の遺伝的多様性の比較。Aは調査した 11 種類の常染色体 STR 座位あたりにみられた対立遺伝子数の平均値を、Bは平均ヘテロ接合率（任意交配を仮定したときの期待値）を表す

検体から得た遺伝子型セット情報をもとに、ソフトウェア STRUCTURE⁹⁾を使い任意交配と連鎖平衡を前提に仮想した分集団に個体を割り当てるアサインメント解析を行った結果を図 14 に示した。統計的に最も強く支持された分集団数 K は 2 となり、この場合には図 14 で上のプロットが示すように下北が他所から区別された。次に支持された K 値は 3 で、この場合には図 14 で下のプロットが示すように下北と津軽が他所から区別された。以上の結果から、調査した 5 つの地理的に孤立した東北地方の個体群の遺伝的構造が解明でき、下北が最も他から分化し、次いで津軽も分化していると判断できた。

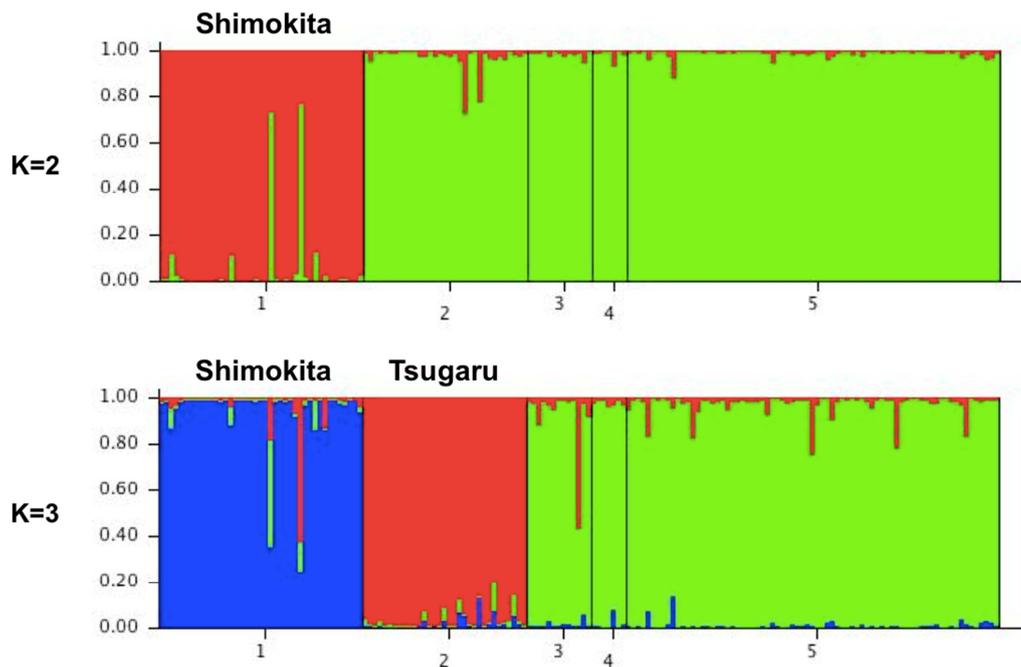


図 14 11 種類の STR 座位で得た遺伝子型データからの東北地方 5 地域個体群の比較。

この分化の原因には、少なくとも 1) オスを介した現在の交流が制限されている影響、2) 歴史的な孤立の影響、のふたつが考えられる。1) の可能性は、図 12 に示したオスの Y 染色体ハプロタイプの変異分布からも示唆される。一方、2) については、下北も津軽も半島部に生息する個体群であることから、孤立の歴史を地理的な要因と重ねて考えることも必要である。時間的に古くから他から切り離されたと考え、個体群のサイズ減少の影響、つまりボトルネック効果の兆候を検証することは、意味があると考えられる。

ボトルネック効果はその初期とそれに続く時期で対立遺伝子数とヘテロ接合率の関係に特徴的な変化を導くと考えられている^{10), 11)}。この変化は、効果の及ぶ初期には遺伝的浮動に伴いマイナーな（頻度の低い）対立遺伝子を個体群から急速に消去するのに対し、ヘテロ接合率はそれに準じた低下が遅れるため、過渡的に対立遺伝子数に比べてヘテロ接合率が高く見える状態を生み出す。ソフトウェア Bottleneck¹²⁾ を利用し、中立突然変異と遺伝的浮動の平衡を仮定してこの検定を行った結果を図 15 に示した。この検定では、5 個体群ごとに、ヘテロ接合体の過剰の有無を検定する目的で、突然変異モデルに TP (two-phase model) を仮定した。このモデルは無限対立遺伝子モデル (infinite allele model) と段階突然変異モデル (step-wise mutation model) の混合モデルを想定しており、両者の割合により結果が変動する。図中の横軸ではこのうち段階突

突然変異モデルで説明する割合をSM比率としてゼロパーセント（無限対立遺伝子モデルに従う突然変異のみ）から100パーセント（段階突然変異モデルに従う突然変異のみ）まで変動させたときの、検定結果をまとめている。縦軸は過剰を判定する確率を表し、5パーセント以下なら、有意に過剰と判定する。この検定では、遺伝子多様性がともに低いと判定された下北と津軽の個体群に違いが認められた。つまり、下北の場合には条件を変えてみると他の3個体群と同様の変動傾向を示し、SM比率が高いと有意ではない。しかし津軽の場合には、条件を変えても常に有意にヘテロ接合体が過剰と判定され、ボトルネック効果の兆候を強く示唆した。

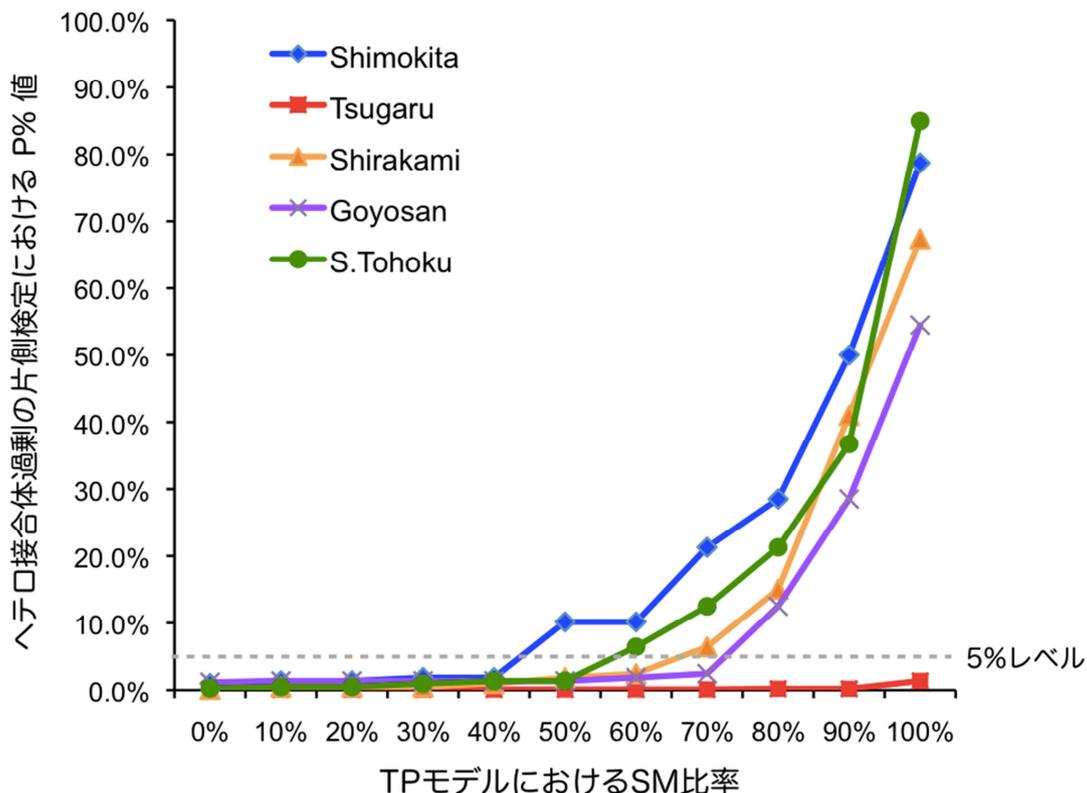


図 15 ソフトウェア Bottleneck によるヘテロ接合体過剰で測ったボトルネック効果。

以上の結果は、北限の半島個体群に作用している孤立の影響が遺伝的に異なることを意味する。いずれの個体群でも遺伝的多様性が低下しているが、下北ではボトルネックの初期相を超えてヘテロ接合体が見かけ上過剰になる状態を経過していると解釈できる。一方、津軽ではまだ初期相にあり、ヘテロ接合体の過剰が認められる。従って、ボトルネックが関与した歴史的な時間に翻訳すると、下北の方が古くから孤立していて、津軽はそれよりあとに孤立した、と考えることが可能である。三戸は明治以降の狩猟圧が東北地方のニホンザル生息地を急激に縮小させたと指摘している¹³⁾。この予想は、長谷部のニホンザル分布調査¹⁴⁾からも支持できる。しかし、今回の遺伝学調査により、これ以前から北限のサルたちは地理的に孤立していたことが理解でき、現在の交流を阻害する生態的あるいは地理的な隔離以外に、古環境変遷の影響で歴史的にも隔離されてきたことが確認できた¹⁾。

・ バングラデシュの都市に孤立するアカゲザルの集団遺伝学的研究

バングラデシュの各地から収集したアカゲザルの糞試料42検体につきmtDNAの第1可変域の塩基配列を比較した結果、15種類のハプロタイプが区別できた(図16)。人口が密集する都市や集落に孤立するアカゲザル個体群には、それぞれに特徴的なハプロタイプが区別でき、母系の分断隔離を反映した地理的な構造が予想された。

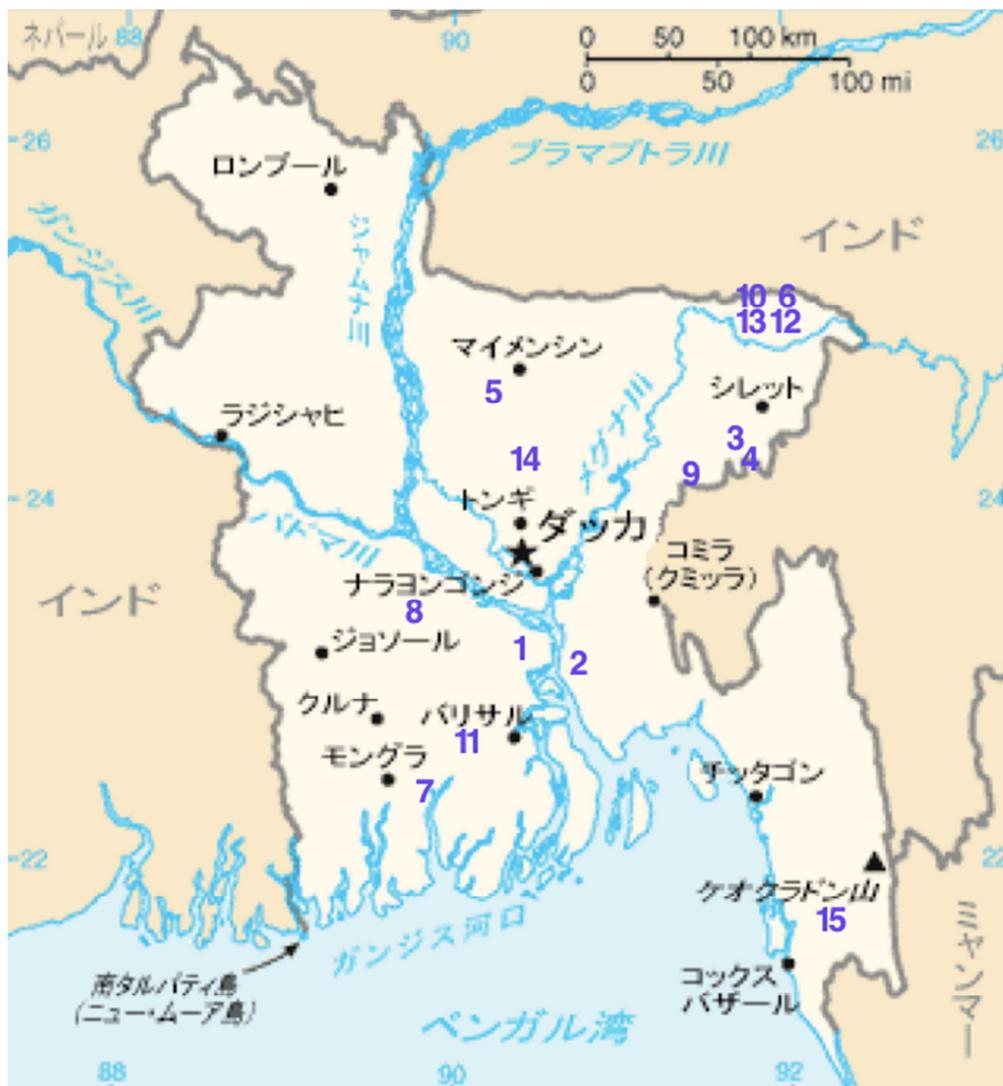


図16 バングラデシュのアカゲザル孤立個体群に検出したmtDNAハプロタイプの分布。紫色の数字は各地点のハプロタイプに対応する番号を示す。

アカゲザルはアジア大陸の広域に分布し、実験動物として利用されているため、周辺地域から輸出された個体のmtDNA分析結果をデータベースから利用できる。相同配列から分子系統樹を構築した結果を図17に示した。この結果から、バングラデシュのアカゲザルはミャンマーのタイプと同じクラスターを形成すること、ミャンマー国境に近い東部の個体群に認められたハプロタイプ15以外は単系的な独立クラスターからなること、が明らかになった。従来の研究から、アカゲザルでは系統的に中国に代表されるアジア東部個体群とインドに代表されるアジア西部個体群の存在が議論されてきた¹⁵⁾。しかし、今回の研究により、バングラデシュのアカゲザルはこれらと

は明らかに異なる系統として成立しており、ベンガル湾岸地域の広大な氾濫原に生存する遺伝的に特徴的なアカゲザルの個体群と評価できた。さらに、ミャンマー隣接地域の東部山岳地帯の個体群を除く平野部の孤立個体群は、系統樹に現れたクラスターの凝集性から判断して、共通祖先から短期間に拡大したのちに人口増加や狩猟圧等の人為的要因で現在の生息地へ分断隔離された成立の歴史をもつことが予想できた。

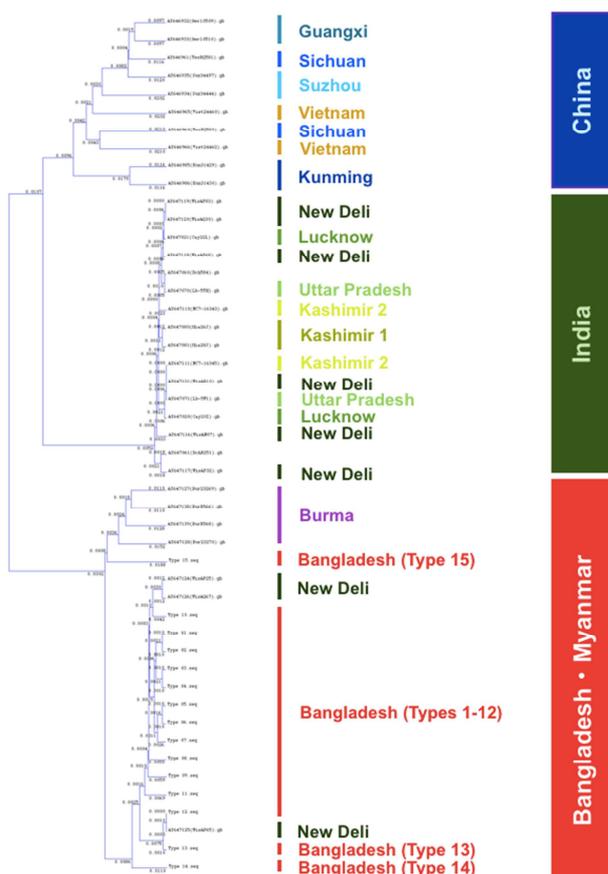


図 17 バングラデシュのアカゲザル個体群に検出した mtDNA ハプロタイプの分子系統関係を示す枝分かれ図。バングラデシュタイプは赤字で示した。比較に利用した他地域のタイプは Smith らの研究¹⁵⁾を参照した。

・ スリランカのトクモンキーの集団遺伝学的研究

スリランカ全域に分布するトクモンキーの代表的生息地 24 地点から採集した試料につき、遺伝子分析を行った。これらの調査地は 3 種類の亜種 (*sinica*, *aurifrons*, *opisthomelas*) の生息地を含んでいる。13 地点は血液試料¹⁶⁾から、11 地点は糞試料から、試料を調製して mtDNA の非コード領域第 1 可変域 339 塩基と 16S rRNA 領域 393 塩基を比較した。島嶼内の系統地理的な構造の解析結果は両領域で基本的に同様と判断できたので、ここでは非コード領域第 1 可変域の結果を説明する。

mtDNA ハプロタイプのクラスター分析結果を図 18 に示した。島内には明瞭に区別できる二つのクラスター (A と B) が検出できた。野外観察ないしは生息分布から判定した亜種タイプとくら

べると、mtDNA のクラスターは亜種分類に一致せず、複数の亜種を同じクラスターに包含する結果となった。つまり、個体群の成立過程を反映する母性遺伝標識から考えると、形態や生態で区別される亜種の違いは、群分裂を介したこの種の分布変遷の歴史に対応していないと解釈できる。この形質の不一致の原因としては、亜種の間で異なる形態や生態の形質には、進化過程の適応が強く反映され、この変化が進化時間に同調していない可能性が考えられる。

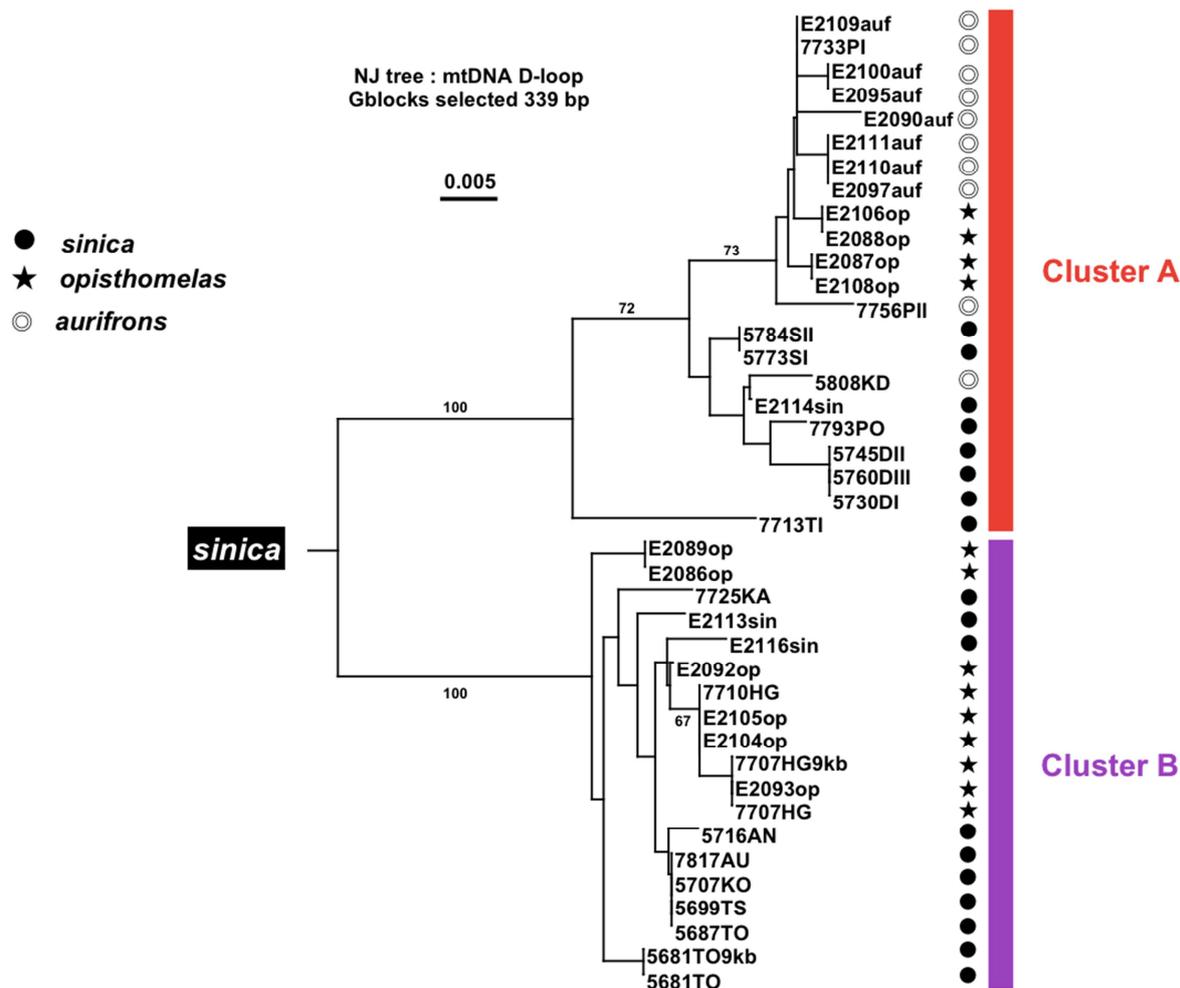


図 18 mtDNA ハプロタイプのクラスター分析により描いた枝分かれ図。図中には試料個体の亜種の違いを示した。

二つの mtDNA クラスターのタイプの島内分布を図 19 に示した。ハプロタイプのグループの分布には明瞭な地理的構造が認められ、A クラスタータイプの個体群は地史的にみて島内の浸食面台地 (penepene) の高層に生息するのに対して、B クラスタータイプの個体群は低層に生息していた。この結果は、トクモンキーの成立過程が地理的構造変化と相関する環境変動に影響されてきた歴史をもつことを示唆する。近縁種との分子系統解析から、トクモンキーの成立は単系的と判断できた (データの詳細は省略)。さらに詳細に検討すると、mtDNA の塩基多様度から、B クラスター内では島嶼の南部地域が北部地域より古くに成立した兆候が認められた。このことから、南部の比較的湿潤な生息環境から北部の乾燥化した生息地への拡大が起きたことが考えられる。この結果は、更新世に繰り返されたスリランカ島嶼とインド亜大陸間の陸橋形成が祖先の成立に

影響せず、現存個体群はそれ以前に種分化し、種全体が島嶼に孤立した形を維持しながら、環境変動とともに地理的には標高帯と相関する進化を遂げていることを示唆する。今後の研究では、高所に孤立するとみなされてきた亜種 *opisthomelas* をはじめとして、現存個体群の地域間交流を調査し、個体群の繁殖構造や保全を考える必要がある。

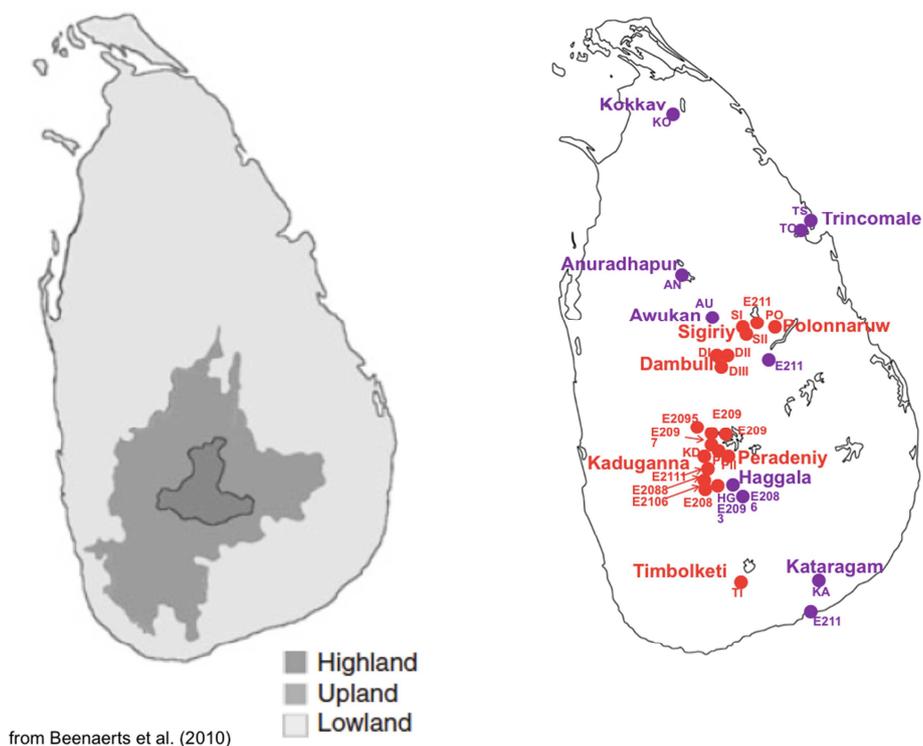


図 19 左図は島内に区別できる標高帯の違いを示す。右図は mtDNA 分析で区別できた 2 系統のサル生息地を示す。赤と紫はそれぞれ A と B クラスターに対応する。

・ コンゴ民主共和国のボノボの集団遺伝学的研究

7 地域個体群由来の 136 試料は、54 ハプロタイプに区別できた。分子系統樹を構築し、クラスター解析を行ったところ、6 つのハプログループが分類できた (図 20)。これらのうち、A1 と A2 は従来の研究で A クレード、B1 と B2 は B クレードと認められていたものである。また、C クレードのタイプは 3 年前に海外に輸出されたボノボで発見された出自不明のハプロタイプに一致あるいは類似するものであった¹⁷⁾。今回の調査では、Wamba と Iyondji の個体群だけに C クレードのハプロタイプが確認できた。さらに、これら以外のタイプで構成される新しいハプログループが検出でき、これを D クレードと命名した。このクレードを構成するハプロタイプはすべて分布東端の TL2 由来の個体で検出された。ボノボ生息域の mtDNA ハプロタイプ分布は、メスによる拡散が予想されたにも関わらず、局在傾向が著しかった。個体群ごとに他個体群とのハプロタイプ共有率を測ると、最大が Wamba の 67% で、TL2 では 0% を記録した。この結果は、現在地域間ではメスによる遺伝的交流が乏しく、個体群の孤立が強いことを意味する。実際、図 20 の右にまとめた分布では、特定地域個体群ないしは近隣にある複数の個体群に特徴的なハプロタイプが目立ち、この傾向は性差を区別しても同様に認められた。

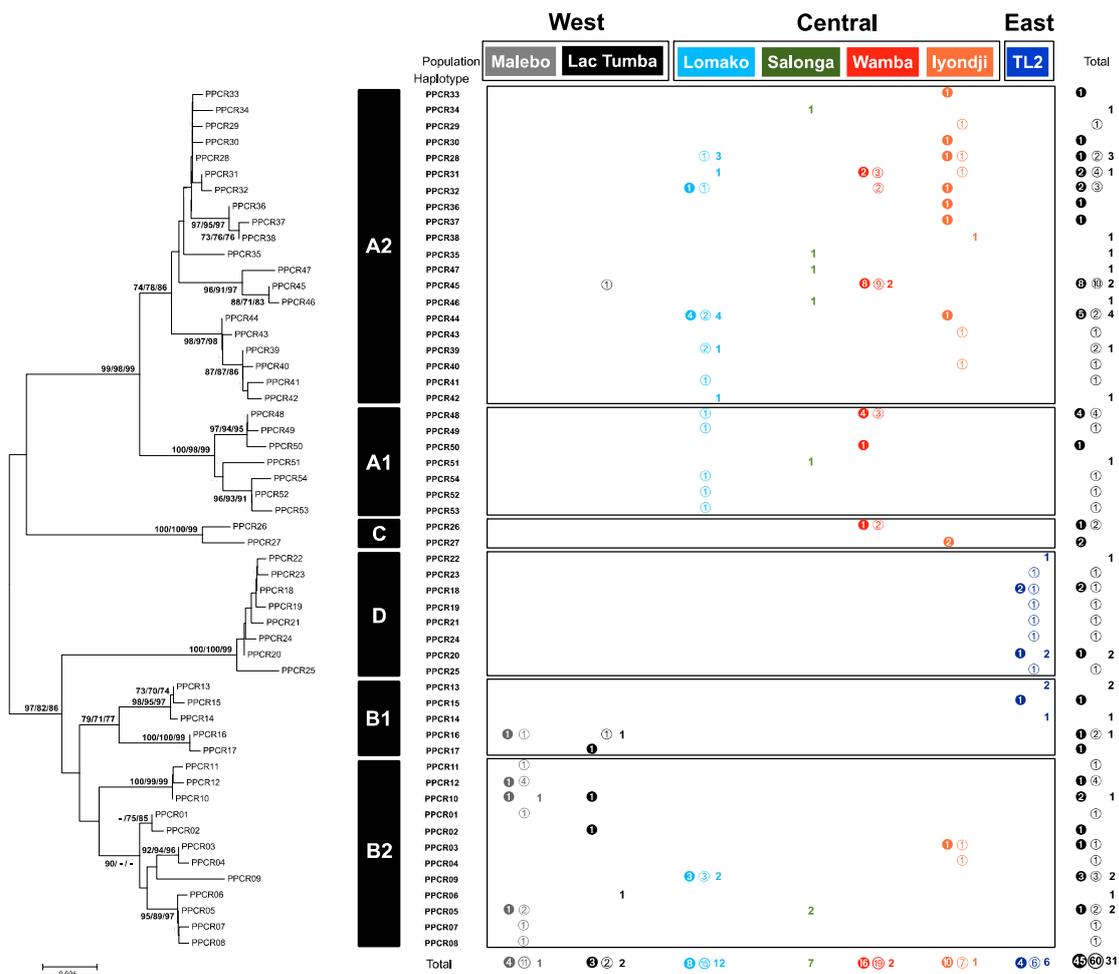


図 20 ボノボに検出した mtDNA の 54 ハプロタイプの分布、ならびにクラスター分析から区別できたハプログループ。表中の数字はカウント数を表し、丸中が白字はオス、白丸中の数字はメス、丸なし数字は性不明を意味する。

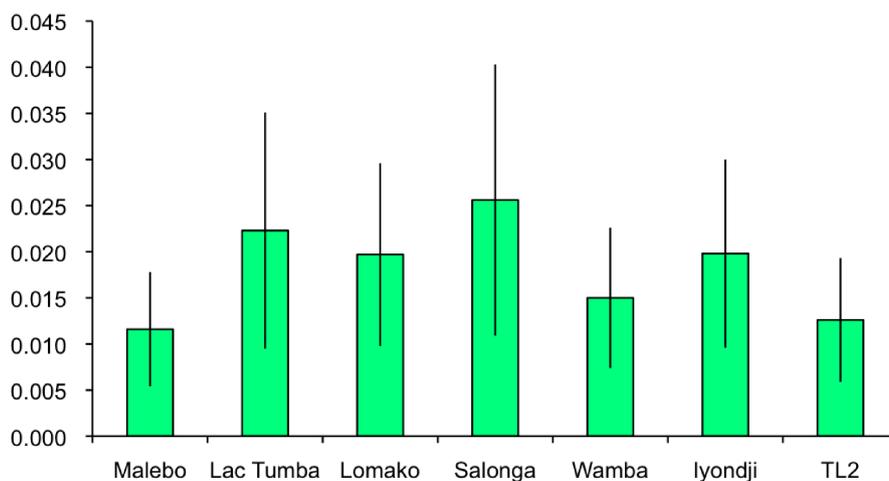


図 21 調査個体群の塩基多様度比較。バーは誤差を表す。

孤立に伴う多様性の低下を考えるために定量した遺伝的多様性では、個体群による違いが明らかになった（図 21）。3種類の多様性指標による定量は概ね一致する結果となったので、図 21には塩基多様度による比較結果を示した。コンゴ盆地中央に生息する個体群にくらべて西端のMaleboと東端のTL2は多様性が低かった。ただし、中央部でも例外的にWambaでは低い多様性が認められた。

F_{ST} 距離を求めクラスター分析により個体群間の遺伝分化を調べた結果、7個体群は西部（Malebo, Lac Tumba）、中央部（Salonga, Lomako, Wamba, Iyondji）、東部（TL2）の3グループに区別できた（図 22）。他個体群への平均遺伝距離ではTL2が最大値を示し、孤立による遺伝的分化が大きいことを示唆した。区別した3グループ間の遺伝距離を比較すると、地理的な位置関係に反して東部と中央部（ F_{ST} 平均距離 0.5334）が東部と西部（ F_{ST} 平均距離 0.4731）や西部と中央部（ F_{ST} 平均距離 0.4281）を上回っていた。

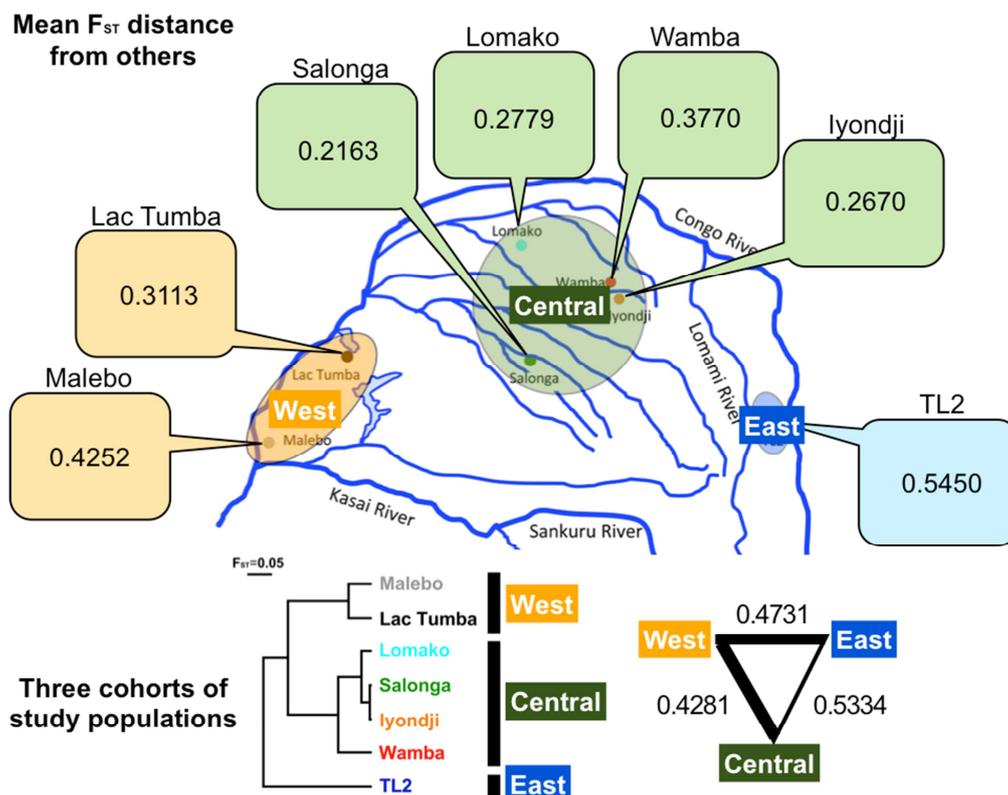


図 22 遺伝距離 F_{ST} を用いて個体群間の遺伝分化を定量した結果。地図中の数値は、各個体群と他の 6 個体群との平均遺伝距離を示す。左下の樹形図はクラスター分析から区別した 3 コホートを示す。右下の図は 3 コホート間の平均遺伝距離を示す。

以上の結果は、個体群間の遺伝分化は河川障壁による隔離を含めた単純な距離による隔離を反映するものでないことを意味する。比較した 7 つの地域個体群では、分布の辺縁に位置するものの多様性が低い。この関係は現在の交流の程度で説明可能だが、個体群の成立や分断の歴史を反映している可能性も考えられる。

AMOVA により、7 個体群とクラスターとして区別できた 3 コホートのそれぞれの場合で、分集団間の分散成分比率を計算すると、前者で 41%、後者で 48%であった。つまり、現存する遺伝的

多様性を分集団として区別するとき、3コホートを仮定した分割で7個体群の保有する遺伝的多様性の分布構造を大きく損ねることはない。今後の保全では、西部、中央部、東部の3区分を意識することが重要であろう。遺伝的多様性を最も保有するものを優先するか、固有遺伝子を最も保有するものを優先するか、判断基準により選択は異なるが、ここで区別した3コホートを管理単位とすることには意義があると考えられる。

個体群間の遺伝分化に及ぶ河川による隔離障壁の影響を検討した結果では、河川を迂回した距離と遺伝距離の相関が最も強く、河川を無視した直線距離と遺伝距離の相関がこれに次ぐ値を示したが、両方の値は近接していた。一方、特定個体群から他の個体群に向けた両距離の相関を求めると、TL2が異なる性質をもち、極端に相関が低かった。そこで、この個体群を除外した6個体群だけで相関を比較しなおしたところ、迂回距離よりも直線距離が強く遺伝距離と相関する結果を得た。従って、TL2に関しては河川による強い隔離の影響が考えられるものの、他のコンゴ盆地の生息地間ではそのような隔離障壁の影響は認めにくいと判断した。地理的距離に比例する遺伝分化の構造を説明する方法にはいくつか考えられる。気候変動など古環境の変動でボノボの生息環境が変化したことも重要な説明要因である。また、Wambaで認めた低いmtDNA多様性は、戦火や開発により比較的短期間に局所隔離が人為的に誘導された可能性を示唆し、攪乱も遺伝分化の原因のひとつと考えられる。今回の研究により、ボノボの保有する多様性や地域分化は単純に河川による隔離だけで説明できるものではなく、それ以外の原因が関与する複合的要因により派生したものと結論する。今後の研究では、過去の環境変動とボノボ生息域変化の関係、人為攪乱による個体群動態とそれに付随する遺伝的特性の変化、を調査する必要がある。

5. 本研究により得られた成果

(1) 科学的意義

非侵襲的手法で野生霊長類の遺伝的多様性や地域分化を定量する方法の開発に成功し、これまで調査が困難だった個体群の基礎研究や保全計画への道を開拓した。

生存や繁殖に関係が深い遺伝子群をもつMHC領域について、ニホンザル地域個体群で遺伝的多様性の経時変化をはじめて分析できた。また、幸島個体群でMHC領域以外と異なる変動を検出し、発育や出産の遅延に付随する変化との示唆を得た。さらに、開発した手法をボノボの野生個体群に応用する展望をつけ、野生個体群の予備調査で座位や個体群により多様性の性格が異なるとの新知見を得た。

コンゴ盆地で絶滅が危惧されるボノボについて、広域をカバーする国際共同研究を実現し、mtDNAからみた地域分化の構造を解明した。さらに、河川障壁だけでなく、個体群の歴史や環境変動が遺伝分化に影響することを初めて明らかにし、保護に向けた個体群単位を提案した。

(2) 環境政策への貢献

<行政が既に活用した成果>

本研究チームが、コンゴ民主共和国のイヨンジ地区住民、コンゴ民主共和国生態森林研究所、African Wildlife Foundation等と協力して進めてきたイヨンジ村南地区の保護区化への努力が実り、2012年4月に同地区が同国環境省によって正式にコミュニティ・リザーブとして認められ

た。この決定には、前述の広域レベルの生息地評価で同地区がきわめて重要なボノボの生息域であることを示したことが、大きく貢献した。

<行政が活用することが見込まれる成果>

絶滅危惧種のリストを作成する国際自然保護連合が策定したボノボの保護のアクションプランで、日本の環境省のプロジェクトが遺伝的多様性と人獣共通感染症の調査、分析を担当した。

国内（千葉県）の外来種交雑問題の影響評価で、本プロジェクトで開発した遺伝子分析技術が応用され、野生ニホンザルの交雑実態を明らかにした。この結果をもとに、平成 25 年度の対策事業が県で検討されている。

6. 国際共同研究等の状況

国際自然保護連合種生存委員会霊長類専門家グループ大型類人猿セクションに代表者の古市が執行委員として参加し、本研究プロジェクトサブテーマ 1～3 の成果を提供して、**Bonobo (*Pan paniscus*) Conservation Strategy 2012-2022** を作成。2013 年 1 月に出版された。

コンゴ民主共和国イヨンジ村のローカル NGO の Forest de bonobos、同国科学研究省生態森林研究所、国際 NGO の African Wildlife Foundation との共同プロジェクトとして、イヨンジ村南部地域をボノボのための保護区とする活動を展開。2012 年 4 月に、イヨンジ・コミュニティ・ボノボ保護区として同国環境省に設立が正式に認可された。

コンゴ民主共和国では、ボノボの生態情報および分析用試料の収集のため、さまざま研究グループと協力して調査をおこなった。以下に調査地域と協力者（所属）を列挙する。

TL2: John A. Hart, Terese B Hart (Lukuru Wildlife Research Foundation, Kinshasa, Democratic Republic of Congo)

Wamba: Monkengo-mo-Mpenge Ikali, Mbangi N. Mulavwa (Research Center for Ecology and Forestry, Ministry of High Education and Scientific Research, Mabali, Democratic Republic of Congo)

Iyobdji: Monkengo-mo-Mpenge Ikali, Mbangi N. Mulavwa (Research Center for Ecology and Forestry, Ministry of High Education and Scientific Research, Mabali, Democratic Republic of Congo); Jef Dupain (African Wildlife Foundation, Kinshasa, Democratic Republic of Congo)

Lomako: Jef Dupain, Amy K. Cobden (African Wildlife Foundation, Kinshasa, Democratic Republic of Congo)

Salonga: Gay E. Reinartz, Patrick Guislain (Bonobo and Congo Biodiversity Initiative, Zoological Society of Milwaukee, Milwaukee, Wisconsin, United States of America)

Lac Tumba: Mbangi N. Mulavwa, Kumugo Yangozene (Research Center for Ecology and Forestry, Ministry of High Education and Scientific Research, Mabali, Democratic Republic of Congo)

Malebo: Serge Darroze, Céline Devos (World Wide Fund for Nature, Kinshasa, Democratic Republic of Congo)

調査出発前に、各調査協力者と連絡を取ってボノボの生息情報を聞き、調査計画を検討した。現地においては調査許可発行省庁との話し合い等事務手続きから実際の野外調査まで助力をいただいた。調査中に現地スタッフに資料のサンプリング方法を詳細に伝え、試料採取に習熟しても

らった。したがって複数のパーティーでボノボの痕跡を探ることができ、試料採取の効率が上がった。我々が現地を離れた後も、DNA試料の拡充、人獣共通感染症感染率の経時的変化を追跡するため、試料採取を継続するよう依頼し、機会がある度に試料とその他ボノボに関する情報をいただいた。なお、上記7地域のうちSalongaについては、キンシャサで試料調査方法を調査協力者に詳細に伝えたのち、現地調査を依頼した。これらの研究グループとは現在も緊密な連携を保っており、今後の研究および保護活動においても協力してあたることができる。この連携は、本研究プロジェクトで得られたきわめて大きな資産だといえる。

7. 研究成果の発表状況

(1) 誌上発表

<論文(査読あり)>

- 1) Hirata S, Yamamoto S, Takemoto H, Matsuzawa T (2010) A Case Report of Meat and Fruit Sharing in a Pair of Wild Bonobos. *Pan Africa News* 17: 21-23.
- 2) Sugawara T, Go Y, Udono T, Morimura N, Tomonaga M, Hirai H, Imai H (2010) Diversification of bitter taste receptor gene family in western chimpanzees. *Mol. Biol. Evol.* 28: 921-931.
- 3) Suzuki N, Sugawara T, Matsui A, Go Y, Hirai H, Imai H (2010) Identification of non-taster Japanese macaques for a specific bitter taste. *Primates* 51: 285-289.
- 4) Furuichi T (2011) Female contributions to the peaceful nature of bonobo society. *Evolutionary Anthropology* 20: 131-142
- 5) Furuichi T, Idani G, Ihobe H, Hashimoto C, Tashiro Y, Sakamaki T, Mulakwa BN, Yangozene K, Kuroda S (2011) Long-term studies on wild bonobos at Wamba, Luo Scientific Reserve, D.R. Congo: towards the understanding of female life history in a male-philopatric species. In: Kappeler P, Watts D (eds) *Long-term field studies of primates*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 413-433.
- 6) Tsuji Y (2011) Seed dispersal by Japanese macaques (*Macaca fuscata*) in western Tokyo, Japan: a preliminary report. *Mammal Study* 36: 165-168.
- 7) Tsuji Y (2011) Sleeping site preferences of wild Japanese macaques (*Macaca fuscata*): the importance of nonpredatory factors. *Journal of Mammalogy* 92: 1261-1269.
- 8) 辻大和、和田一雄、渡邊邦夫 (2011) 野生ニホンザルの採食する木本植物 付記: ニホンザルの食性研究の今後の課題. *霊長類研究* 27: 27-49.
- 9) Imai H, Suzuki N, Ishimaru Y, Sakurai T, Yin L, Pan W, Abe K, Misaka T, Hirai H (2012) Functional diversity of bitter taste receptor TAS2R16 in primates. *Biology Letters* 8: 652-656
- 10) Hayakawa T, Sugawara T, Go Y, Udono T, Hirai H, Imai H (2012) Eco-Geographical Diversification of Bitter Taste Receptor Genes (TAS2Rs) among Subspecies of Chimpanzees (*Pan troglodytes*). *PLOS ONE* 7, e43277.
- 11) Hayashi M, Ohashi G, HeungJin R (2012) Responses toward a trapped animal by wild bonobos at Wamba. *Animal Cognition* 15: 731-735.

- 12) Saito A, Kawamoto Y, Higashino A, Yoshida T, Ikoma T, Suzaki Y, Ami Y, Shioda T, Nakayama EE, Akari H (2012) Allele Frequency of Antiretroviral Host Factor TRIMCyp in Wild-caught Cynomolgus Macaques (*Macaca fascicularis*). *Frontiers in Microbiology* 3: 314.
- 13) Sugawara T, Imai H (2012) Post-Genome Biology of Primates Focusing on Taste Perception. In: Hirai H, Imai H, Go Y (eds), *Post-Genome Biology of Primates*, Springer, 79-92.
- 14) Tokuyama N, Emikey B, Bafike B, Isolumbo B, Iyokango B, Mulavwa MN, Furuichi T (2012) Bonobos apparently search for a lost member injured by a snare. *Primates* 53: 215-219.
- 15) Tranquilli S, Abedi-Lartey M, Amsini F, Arranz L, Asamoah A, Babafemi O, Barakabuye N, Campbell G, Chancellor R, Davenport TRB, Dunn A, Dupain J, Ellis C, Etoga G, Furuichi T, Gatti S, Ghiurghi A, Greengrass E, Hashimoto C, Hart J, Herbinger I, Hicks TC, Holbech LH, Huijbregts B, Imong I, Kumpel N, Maisels F, Marshall P, Nixon S, Normand E, Nziguyimpa L, Nzooch-Dogmo Z, Okon DT, Plumtre A, Rundus A, Sunderland-Groves J, Todd A, Warren Y, Mundry R, Boesch C, Kuehl H (2012) Lack of conservation effort rapidly increases African great ape extinction risk. *Conservation Letters* 5: 48-55.
- 16) Vallo P, Petrzalkova KJ, Profousova I, Petrasova J, Pomajbikova K, Leendertz F, Hashimoto C, Simmons N, Babweteera F, Machanda Z, Piel A, Robbins MM, Boesch C, Sanz C, Morgan D, Sommer V, Furuichi T, Fujita S, Matsuzawa T, Kaur T, Huffman MA, Modry D (2012) Molecular diversity of entodiniomorphid ciliate *Troglodytella abressarti* and its coevolution with chimpanzees. *Amer J Phys Anthropol* 148: 525-533.
- 17) Hasan MK, Aziz MA, Alam SMR, Kawamoto Y, Jones-Engel L, Kyes RC, Akhtar S, Begum S, Feeroz MM (2013) Distribution of rhesus macaques (*Macaca mulatta*) in Bangladesh: Inter-population variation in group size and composition. *Primate Conservation* 26: 125-132.
- 18) Kawamoto Y, Takemoto H, Higuchi S, Sakamaki T, Hart JA, Hart TB, Tokuyama N, Reinartz GE, Guislain P, Dupain J, Cobden AK, Mulavwa MN, Yangozene K, Darroze S, Devos C, Furuichi T (2013) Genetic structure of wild bonobo populations: Diversity of mitochondrial DNA and geographical distribution. *PLoS ONE* 8(3): e59660.
- 19) Kazahari N, Tsuji Y, Agetsuma N (2013) The relationships between feeding-group size and feeding rate vary from positive to negative with characteristics of food items in wild Japanese macaques (*Macaca fuscata*). *Behaviour* 150: 175-197.

<その他誌上発表（査読なし）>

特に記載すべき事項はない。

(2) 口頭発表（学会等）

- 1) Hasan MK, Feeroz MM, Kawamoto Y (2010.9) Distribution of rhesus macaque (*Macaca mulatta*) in Bangladesh: Inter-population variation in group size and composition. ASIAN-HOPE 2010/IPS Pre-congress Symposium and Workshop, Inuyama.

- 2) Huffman MA (2010.9) Field Techniques for health monitoring and the study of disease transmission in primates: some recent examples of their use in the wild. ASIAN-HOPE 2010/IPS Pre-congress Symposium and Workshop, Inuyama.
- 3) Kawamoto Y, Oi T, Seino H, Kawamoto S, Higuchi S (2010.9) Genetic architecture of social group of Japanese macaques (*Macaca fuscata*): Inference from analysis on all members of single group with microsatellite markers. ASIAN-HOPE 2010/IPS Pre-congress Symposium and Workshop, Inuyama.
- 4) Saeki M, Kawamoto Y, Kawamoto S, Norikoshi K, Shirai K, Kawamura A (2010.9) Genetic structure of Taiwanese macaques (*Macaca cyclopis*) in Izu-Oshima Island: An assessment of mitochondrial DNA and nuclear DNA. ASIAN-HOPE 2010/IPS Pre-congress Symposium and Workshop, Inuyama.
- 5) Foitova I, Huffman MA, Dusek L, Jarkovsky J, Klapka R, Osansk M (2010.9) Parasite species diversity and infection intensity of orangutans- ecological factors with an emphasis on food items in their diet. [Abstract, Primate Research 26: 146.] The 23rd Congress of International Primatological Society, Kyoto.
- 6) Furuichi T (2010.9) Life history of female bonobos and their contribution to peaceful nature of the society. The 23rd Congress of International Primatological Society, Kyoto.
- 7) Furuichi T, Mulavwa MN, Hashimoto C (2010.9) Comparison of food patch use and ranging pattern between bonobos at Wamba and chimpanzees in the Kalinzu Forest. The 23rd Congress of International Primatological Society, Kyoto.
- 8) Huffman MA, Nahallage CAD (2010.9) Macaque-Human interactions in Sri Lanka. [Abstract, Primate Research 26: 203.] The 23rd Congress of International Primatological Society, Kyoto.
- 9) Hamada Y, Malaivijitnond S, Pathomthong S, Kingsada P, Son VD, Van NH, Minh NV, San AM, Thu A, Oi T, Kawamoto Y (2010.9) Distribution, phylogeography and present status of macaques distributed in Indochina. The 23rd Congress of International Primatological Society, Kyoto.
- 10) Hasan MK, Feeroz MM, Kawamoto Y (2010.9) Diversity and molecular phylogeny of mitochondrial DNAs of rhesus macaques in Bangladesh. The 23rd Congress of International Primatological Society, Kyoto.
- 11) Hashimoto C, Furuichi T, Sakamaki T, Mulavua MN, Yangozene K (2010.9) Comparison of ranging behavior between wild bonobos and chimpanzees. The 23rd Congress of International Primatological Society, Kyoto.
- 12) Kawamoto Y (2010.9) Case study: Feral non-Japanese monkeys. The 23rd Congress of International Primatological Society, Kyoto.
- 13) Koyabu DB, Endo H, Shimizu D, Hashimoto C, Furuichi T, Tashiro Y, Go M, Ihobe H (2010.9) Food toughness and craniodental morphology in three sympatric guenon species in Kalinzu Forest, Uganda. The 23rd Congress of International Primatological Society,

Kyoto.

- 14) Mulavwa MN, Yangozene K, Yamba-Yamba M, Motema-Salo B, Mwanza NN, Furuichi T (2010.9) What we know from nest groups of bonobos at Wamba: habitat use, socio-ecological features, and comparisons with chimpanzees. The 23rd Congress of International Primatological Society, Kyoto.
- 15) Oi T, Seino H, Hamazaki S, Kawamoto Y (2010.9) Intra group variation in the dietary profile of Japanese macaques as revealed by stable isotope analysis of hair. The 23rd Congress of International Primatological Society, Kyoto.
- 16) Pebsworth PA, Huffman MA (2010.9) Documenting geophagy in wild chacma baboons at Wildcliff, South Africa using trap cameras. [Abstract, Primate Research 26: 145.] The 23rd Congress of International Primatological Society, Kyoto.
- 17) Petrzekova KJ, Petrasova J, Uzlikova M, Kostka M, Huffman MA, Mapua MI, Bobakova L, Mazoch V, Singh J, Kaur T, Modry D (2010.9) Gastrointestinal parasites of indigenous and introduced primate species of Rubondo Island National Park, Tanzania with emphasis on Blastocytis infections. [Abstract, Primate Research 26: 181.] The 23rd Congress of International Primatological Society, Kyoto.
- 18) Sugiura H, Shimooka Y, Tsuji Y (2010.9) Variation in interindividual spacing and behavioral correlates in a group of Japanese macaques. The 23rd Congress of International Primatological Society, Kyoto.
- 19) Takemoto H (2010.9) Difference in terrestriality between chimpanzees and bonobos influenced by air temperature inside forest. The 23rd Congress of International Primatological Society, Kyoto.
- 20) Tanaka H, Morimoto M, Kamanaka Y, Matsubayashi K, Kawamoto S, Kawamoto Y (2010.9) Characterization of genetic diversity and structure of captive colonies of macaques. The 23rd Congress of International Primatological Society, Kyoto.
- 21) Tashiro Y, Furuichi T, Hashimoto C (2010.9) Biomass of mammals and ecology of sympatric cercopithecines in chimpanzee habitat of the Kalinzu Forest, Uganda. The 23rd Congress of International Primatological Society, Kyoto.
- 22) Tsuji Y (2010.9) Temporal and spatial variation in feeding ecology of Japanese macaques. The 23rd Congress of International Primatological Society, Kyoto.
- 23) 清野紘典、川本芳 (2010.9) 遺伝標識を用いたニホンザル群間のオス移住の評価. 日本哺乳類学会2010年度岐阜大会
- 24) 半谷吾郎 (2011.3) 一斉結実に対する動物の反応: ボルネオ島サバ州のレッドリーフモンキーの場合. 第58回日本生態学会、札幌
- 25) 風張喜子、辻大和、揚妻直樹 (2011.3) ニホンザルにおける採食グループサイズと採食成功の関係. 第58回日本生態学会、札幌
- 26) 吉田友教、岡本宗裕、明里宏文、今井啓雄、松井淳、早川敏之、生駒智子、伯川美穂、齊藤波子、渡邊朗野、兼子明久、宮部貴子、鈴木樹理、平井啓久 (2011.5) 京大霊長研に見られたニホンザル血小板減少症 (4) : 疫学調査. 第58回日本実験動物学会総会、東京

- 27) Kawamoto Y (2011.6) Genetic diversity of macaques in Sri Lanka. "International Symposium Integrative Research on Monkeys, Man and Malaria in Asia", University of Sri Jayewardenepura, Sri Lanka.
- 28) 橋本千絵、安岡宏和、手塚賢至、古市剛史 (2011.7) ウガンダ共和国における森林保護区周辺の地域住民による森林資源の利用の実態. 第27回日本霊長類学会大会、犬山
- 29) 早川卓志、菅原亨、郷康広、鶴殿俊史、平井啓久、今井啓雄 (2011.7) チンパンジー3亜種における苦味受容体遺伝子ファミリーの分子進化. 第27回日本霊長類学会大会、犬山
- 30) 川本芳、三戸幸久、樋口翔子、川本咲江 (2011.7) 津軽半島個体群の遺伝的特徴からみた北限のニホンザルの成立. 第27回日本霊長類学会大会、犬山
- 31) 風張喜子、井上英治、川本芳、中川尚史、井上-村山美穂 (2011.7) 金華山のニホンザルの遺伝的多様性. 第27回日本霊長類学会大会、犬山
- 32) 中村美知夫、ナディア・コープ、藤本麻里子、藤田志歩、花村俊吉、早木仁成、保坂和彦、マイケル・A・ハフマン、稲葉あぐみ、井上英治、伊藤詞子、川中健二、沓掛展之、清野(布施)未恵子、郡山尚紀、リンダ・F・マーシャント、松本晶子、松阪崇久、ウィリアム・C・マックグルー、ジョン・C・ミタニ、西江仁徳、乗越皓司、坂巻哲也、島田将喜、リンダ・A・ターナー、上原重男、ジェームズ・V・ワキバラ、座馬耕一郎、西田利貞 (2011.7) マハレのチンパンジーの遊動域—16年間のデータから. 第27回日本霊長類学会大会、犬山
- 33) 鈴木南美、松井淳、郷康広、石丸喜朗、三坂巧、阿部啓子、平井啓久、今井啓雄 (2011.7) ニホンザルにおける地域特異的な苦味感受性変異. 日本進化学会第13回大会、京都
- 34) 今井啓雄、郷康広、平井啓久 (2011.9) 霊長類ゲノムスクリーニングによる自然発生的遺伝子変異モデルの探索. 第34回日本神経科学学会大会、横浜
- 35) 辻大和 (2011.9) 金華山島におけるニホンザルの生態研究—長期調査からみえてきたこと—. 日本哺乳類学会奨励賞記念講演. 日本哺乳類学会、宮崎
- 36) Yoshida T, Okamoto M, Akari H, Suzuki J, Miyabe-Nishiwaki T, Hayakawa T, Imai H, Matsui A, Watanebe A, Kaneko A, Hirai H (2011.9) Simian retrovirus-4-associated infectious thrombocytopenia in Japanese macaques. The Unlimited World Microbes International Union of Microbiological Societies 2011 Congress XV International Congress of Virology. Sapporo.
- 37) 古市剛史 (2011.10) ボノボはヒトの何を語るか. モンキーカレッジ、日本モンキーセンター、犬山
- 38) 古市剛史 (2011.11) ボノボ、最後の類人猿. 第2回値の拠点セミナー、京都大学東京オフィス、東京
- 39) 古市剛史 (2011.11) ボノボ:水がボノボを生んだ〜コンゴ盆地のボノボの進化と生活. 第14回SAGAシンポジウム、熊本市動物園、熊本
- 40) 古市剛史 (2011.11) ボノボの住むコンゴ盆地の大熱帯雨林:その現状と将来. 第56回プリマーテス研究会、日本モンキーセンター、犬山
- 41) 早川卓志、菅原亨、郷康広、鶴殿俊史、平井啓久、今井啓雄 (2011.11) チンパンジーの味覚に地域差はあるか?〜分子遺伝学からの考察〜. SAGA14、熊本
- 42) Nackoney J, 古市剛史, Baraldi A, Nolinari G (2011.11) コンゴ民主共和国の戦時下の

- ルオー保護区周辺の森林の破壊とボノボ個体群におよぼす影響のモニタリング. 第65回日本人類学会大会、沖縄県立博物館・美術館、那覇
- 43) Tsuji Y, Fujita S, Sugiura H, Nakagawa N (2012.3) Rome was not built in a day: time to grasp information on plant feeding of wild Japanese macaques (*Macaca fuscata*). ESJ59/EAFES5、大津
- 44) 古市剛史、Nackoney J (2012.5) コンゴ民主共和国戦時中の森林の空洞化: ランドサットイメージによる分析. 日本アフリカ学会第49回学術大会、吹田
- 45) 吉田友教、宮部貴子、郡山尚紀、竹元博幸、生駒智子、渡邊朗野、兼子明久、渡邊祥平、齊藤暁、早川敏之、鈴木樹理、岡本宗裕、松沢哲郎、古市剛史、明里宏文 (2012.5) 大型類人猿における人獣共通感染症の抗体スクリーニング方法の開発. 第59回日本実験動物学会、別府
- 46) 吉田友教、竹元博幸、佐藤英次、坂巻哲也、宮部貴子、生駒智子、渡邊朗野、兼子明久、渡邊祥平、早川敏之、鈴木樹理、岡本宗裕、松沢哲郎、明里宏文、古市剛史 (2012.5) アフリカ野生大型類人猿におけるIgA抗体スクリーニングによる人獣共通感染症の実態調査. 第59回日本実験動物学会、別府
- 47) Imai H, Suzuki N, Ishimaru Y, Sakurai T, Yin L, Pan W, Abe K, Misaka T, Hirai H (2012.6) Functional diversity of bitter taste receptor TAS2R16 in primates to natural ligands. XVI International Symposium on Olfaction and Taste, Stockholm, Sweden.
- 48) Suzuki N, Matsui A, Go Y, Ishimaru Y, Misaka T, Abe K, Hirai H, Imai H (2012.6) Identification of PTC "non-taster" Japanese macaques caused by TAS2R38 dysfunction. XVI International Symposium on Olfaction and Taste, Stockholm, Sweden.
- 49) 古市剛史、坂巻哲也、Mulavwa MN (2012.7) ルオー学術保護区のボノボによる湿地林の利用. 第28回日本霊長類学会大会、名古屋
- 50) 橋本千絵、古市剛史 (2012.7) ウガンダ共和国カリンズ森林の野生チンパンジーにおける、遊動パターンとパーティ構成の雌雄差について. 第28回日本霊長類学会大会、名古屋
- 51) Huffman MA, Nahallage CAD, Kawamoto Y, Kawamoto S, Shotake T (2012.7) Two is company, three is a crowd: スリランカのトクモンキー (*Macaca sinica*) の系統地理. 第28回日本霊長類学会大会、名古屋
- 52) 川本芳、樋口翔子、田中洋之、川本咲江 (2012.7) ニホンザル野生個体群における主要組織適合遺伝子複合体 (MHC) 領域のマイクロサテライト座位の多様性. 第28回日本霊長類学会大会、名古屋
- 53) 風張喜子、井上英治、川本芳、中川尚史、宇野壮春、井上-村山美穂 (2012.7) 島嶼のニホンザル個体群における個体群縮小の遺伝的影響. 第28回日本霊長類学会大会、名古屋
- 54) 竹元博幸、樋口翔子、川本芳、坂巻哲也、古市剛史 (2012.7) ボノボ野生個体群の広域的な遺伝子構造: ミトコンドリアDNAタイプの多様性と分布 (予報). 第28回日本霊長類学会大会、名古屋
- 55) 吉田友教、宮部貴子、郡山尚紀、竹元博幸、生駒智子、渡邊朗野、兼子明久、渡邊祥平、齊藤暁、早川敏之、鈴木樹理、岡本宗裕、松沢哲郎、古市剛史、明里宏文 (2012.7) 大型類人猿における糞便サンプルを用いた人獣共通感染症の抗体スクリーニング方法の開発. 第

28回日本霊長類学会、名古屋

- 56) Barnett A, Alho C, Chism J, Covert N, Feanside P, Fragaszy D, Ferreira GR, Furuichi T, Hanya G, Hashimoto C (2012. 8) Primates of flooded habitats: threats, perspectives and future research. The 24th Congress of International Primatological Society, Cancun, Mexico.
- 57) Hashimoto C, Furuichi T (2012. 8) Female association and ranging in chimpanzees of the Kalinzu Forest, Uganda. The 24th Congress of International Primatological Society, Cancun, Mexico.
- 58) Hashimoto C, Sakamaki T, Mulavwa MN, Furuichi T (2012. 8) Hourly, daily, and monthly changes in the size and composition of parties of chimpanzees at Kalinzu and bonobos at Wamba. The 24th Congress of International Primatological Society, Cancun, Mexico.
- 59) Yoshida T, Takemoto H, Sato E, Sakamaki T, Miyabe-Nishiwaki T, Ikoma T, Watanabe A, Kaneko A, Watanabe S, Hayakawa T, Suzuki J, Okamoto M, Matsuzawa T, Akari H, Furuichi T (2012. 8) Epidemiological study of zoonotic pathogens by screening of IgA antibodies in wild great apes in Africa. The 24th Congress of International Primatological Society, Cancun, Mexico.
- 60) Kawamoto Y (2012. 8) How did monkeys reach the northern limits of their range? - Lessons from a population genetic study of Japanese macaques. The 3rd International Symposium on Southeast Asian Primate Research, Bangkok.
- 61) Nahallage CAD, Huffman MA, Kawamoto Y, Kawamoto S, Shotake T (2012. 8) Phylogeography of toque monkeys in Sri Lanka. The 3rd International Symposium on Southeast Asian Primate Research, Bangkok.
- 62) Norbu T, Rabgay K, Wangda P, Dorji R, Sherabla, Kawamoto Y, Hamada Y, Oi T, Chijiwa A (2012. 8) Ecological assessment of Assamese macaques for the control of agricultural damage in the western Bhutan Himalayas. The 3rd International Symposium on Southeast Asian Primate Research, Bangkok.
- 63) Kawamoto Y (2012. 10) Application of population genetic study in primatology: studies on Japanese macaques and bonobos. Symposium: "Conservation of isolated primate populations", Inuyama.

(3) 出願特許

特に記載すべき事項はない。

(4) シンポジウム、セミナー等の開催（主催のもの）

- 1) アジアからの若手招待研究者を含む霊長類との共存に関する国際シンポジウムおよびワークショップ (Quest for Coexistence with Non-human Primates) (2010年9月6日-10日、犬山国際センター「フロイデ」、観客70名、国際霊長類学会のプレコングレス集会のひとつとして開催)

- 2) 野生のボノボとチンパンジーの比較研究の進展に関するシンポジウム (Recent advances in behavioral comparisons between wild bonobos and chimpanzees) (2010年9月14日、京都大学、観客50名、国際霊長類学会のシンポジウムのひとつとして開催)
- 3) ニホンザルと日本人:ニホンザルの保全に関する歴史と課題を紹介する国際シンポジウム (Japanese monkeys and the Japanese people: History and issues in Japanese monkey conservation) (2010年9月15日、京都大学、観客40名、国際霊長類学会のシンポジウムのひとつとして開催)
- 4) ホミニゼーション研究会 近親交配再考:人類学から自然保護まで (2011年3月4日-5日、京都大学霊長類研究所、観客50名、霊長類研究所の共同利用研究会として開催)
- 5) International Symposium Integrative Research on Monkeys, Man and Malaria in Asia, June 21- 22, 2011, University of Sri Jaywardenepura, Sri Lanka
- 6) Introduction to DNA analysis in field study - sexing and male typing - AA Workshop, Inuyama, Nov. 2012
- 7) Symposium: Conservation of isolated primate populations "Application of population genetic study in primatology: studies on Japanese macaques and bonobos", Inuyama, Nov. 2012
- 8) 京都大学霊長類研究所共同利用研究会として開催 『生態系における霊長類の役割』 (2013年2月16日-17日 京都大学霊長類研究所、犬山)

(5) マスコミ等への公表・報道等

- 1) 「“文化”を受け継ぐチンパンジー ～ウガンダの森～」 (NHK-BShi、2010年9月27日)
- 2) 「ニホンザル絶滅個体群のDNA研究」 (岩手日報、2010年10月8日)
- 3) 「日本列島奇跡の大自然 第1集 森 大地をつつむ緑の物語」 (NHK総合、2010年10月9日、ニホンザル北限地域個体群の研究成果について73分紹介)
- 4) 「厩の記憶—なぜサルはそこに居たのか」 (牛の博物館ニュースレター、2010年10月、博物館機関誌)
- 5) NHKスペシャル「日本列島～奇跡の大自然」 (NHK総合、2011年3月)
- 6) 「チンパンジーの謎に迫る～アフリカ・ウガンダ～」 (NHK-BShi、2011年3月11日)
- 7) 「かんきつ類で味覚変わる?紀伊のサル、苦味OK」 (読売新聞全国版夕刊、2011年7月27日)
- 8) 「チンパンジー、生息地で味覚異なる」 (読売新聞中部版朝刊、2011年12月28日)
- 9) 「Bonobos are caring because they are led by females」 (New Scientist電子版、2012年3月8日)
- 10) 「類人猿ボノボにも「絆」傷ついた仲間を捜索」 (読売新聞電子版、2012年3月10日)

(6) その他

- 辻大和 日本霊長類学会高島賞 (2012年7月)

8. 引用文献

- 1) Kawamoto Y, Tomari K, Kawai S, Kawamoto S (2008) Genetics of the Shimokita macaque population suggest an ancient bottleneck. *Primates* 49: 32-40.
- 2) Morin PA, Chambers KE, Boesch C, Vigilant L (2001) Quantitative polymerase chain reaction analysis of DNA from noninvasive samples for accurate microsatellite genotyping of wild chimpanzees (*Pan troglodytes*). *Molecular Ecology* 10: 1835-1844.
- 3) Kawamoto Y, Shotake T, Nozawa K, Kawamoto S, Tomari K, Kawai S, Shirai K, Morimitsu Y, Takagi N, Akaza H, Fujii H, Hagihara K, Aizawa K, Akachi S, Oi T, Hayaishi S (2007) Postglacial population expansion of Japanese macaques (*Macaca fuscata*) inferred from mitochondrial DNA phylogeography. *Primates* 48: 27-40.
- 4) Furuichi T, Idani G, Ihobe H, Hashimoto C, Tashiro Y, Sakamaki T, Mulavwa MN, Yangozene K, Kuroda S (2012) Long-term studies on wild bonobos at wamba, luo scientific reserve, d. R. Congo: Towards the understanding of female life history in a male-philopatric species. . In: Kappeler PM, Watts DP (eds) Long-term field studies of primates. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, pp 413-433
- 5) White PS, Densmore III LD (1992) Mitochondrial DNA isolation. In: Hoelzel AR (eds) Molecular genetic analysis of populations: a practical approach. IRL Press/Oxford University Press, Oxford, pp 29-58.
- 6) Arandjelovic M, Guschanski K, Schubert G, Harris TR, Thalmann O, Siedel H, Vigilant L (2009) Two-step multiplex polymerase chain reaction improves the speed and accuracy of genotyping using DNA from noninvasive and museum samples. *Molecular Ecology Resources* 9:28-36.
- 7) 橋本千絵, 早川祥子, Kim H-S, 竹中修 (2000) 非侵襲的試料を用いたPCR法による性判別について: チンパンジー, ボノボ, ニホンザルの分析. *霊長類研究* 16: 133-138.
- 8) Hashimoto C, Tashiro Y, Kimura D, Enomoto T, Ingmanson EJ, Idani G, Furuichi T (1997) Habitat use and ranging of wild bonobos (*pan paniscus*) at wamba. *International Journal of Primatology* 19:1045-1060
- 9) Pritchard J, Stephens M, Donnelly P (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155:945-959.
- 10) Cornuet JM, Luikart G (1996) Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. *Genetics* 144:2001-2014.

- 11) Luikart G, Cornuet JM (1998) Empirical evaluation of a test for identifying recently bottlenecked populations from allele frequency data. *Conservation Biology* 12:228-237.
- 12) Piry S, Luikart G, Cornuet JM (1999) BOTTLENECK: a computer program for detecting recent reductions in the effective population size using allele frequency data. *Journal of Heredity* 90:502-503.
- 13) 三戸幸久 (1992) 東北地方のニホンザルの分布はなぜ少ないか. *生物科学* 44: 141-158.
- 14) 長谷部言人 (1923) 大正十二年東北帝国大学医学部による全国ニホンザル生息状況のアンケート調査に対する各郡、支庁、島の解答資料.
- 15) Smith DG, McDonough J (2005) Mitochondrial DNA variation in Chinese and Indian rhesus macaques (*Macaca mulatta*). *American Journal of Primatology* 65: 1-25.
- 16) Shotake T, Nozawa K, Santiapilai C (1991) Genetic variability within and between the troops of toque macaques, *Macaca sinica*, in Sri Lanka. *Primates* 32: 283-299.
- 17) Zsurka G, Kudina T, Peeva V, Hallmann K, Elger CE, Khrapko K, Kunz WS (2010) Distinct patterns of mitochondrial genome diversity in bonobos (*Pan paniscus*) and humans. *BMC Evolutionary Biology* 10: 270.

(2) 孤立個体群における人獣共通感染症のリスクアセスメントとサーベイランス

京都大学 霊長類研究所

人類進化モデル研究センター 明里宏文
岡本宗裕
鈴木樹理
宮部貴子
早川敏之
吉田友教

平成 22 年～24 年度累計予算額：46,589 千円

(うち、平成 24 年度予算額：12,608 千円)

予算額は、間接経費を含む。

[要旨]

本サブテーマではアフリカ及びアジアの野生霊長類に関して、感染症学的研究から得られるエビデンスに基づく人獣共通感染症のリスクアセスメントを目的として以下の研究を行なった。

1. 絶滅が危惧される類人猿であるボノボについて、人獣共通感染症を引き起こす原因ウイルスに対する特異抗体の測定システムが確立され、これにより様々な呼吸器感染症における疫学調査が可能となった。特にこれまで困難とされた、アフリカで収集した糞便サンプルからの抗ウイルス特異抗体を抽出・検出する方法論を初めて確立した。これにより野生類人猿における病原体感染状況のサーベイランス実施の基盤が整備された点で特筆すべき成果である。さらに本技術による解析の結果、ウイルス特異抗体の保有率が孤立個体群の生息地域により異なることが明らかになった。このことは、孤立個体群におけるウイルス暴露への多様性を示しているとともに、感染疫学から得たエビデンスに基づいたリスク評価を行うことで、可能な限り孤立個体群ごとに感染症対策の最適化が可能であることを表しており特筆すべき成果である。

2. 外来マカクザル由来病原体によるニホンザルの感染症リスク研究：ニホンザルで生じた血小板減少症の原因を究明し、解析過程で得られた知見を基に新規感染症のリスクについて評価した。その結果、通常カニクイザルでは重篤な臨床症状を示さず（不顕性）自然感染しているサルレトロウイルス 4 型が、ニホンザルへの感染伝播により想定外の致死性症状を引き起こすことが初めて明らかとなった。このことは、外来マカクザルに自然感染している病原微生物がニホンザルに「種の壁」を越えて伝播することにより新規感染症を引き起こす可能性を表わしている。マカクザル間の病原体伝播が引き起こしうる重篤な人獣共通感染症の検出体制の充実により実態解明が進んだことで、今後の起こりうる感染症のアウトブレイクに即応できる体制が整ったことは特筆すべき成果である。

[キーワード]

人獣共通感染症、野生霊長類、リスクアセスメント、感染疫学、アウトブレイク

1. はじめに

野生の霊長類集団が生息する森林地域は、伐採や資源開発、戦争など近年の社会・経済的变化などによってヒトが踏み入る機会が格段に増加し、もはや野生霊長類にとっての聖域ではなくなりつつある。未開の森林に存在していた微生物は、その住人である野生動物にとっては何ら害のない「共生する生命」であった。しかし外来生物であるヒトにとっては未知の感染症を引き起こす危険な病原体の宝庫であった。エボラ出血熱やマールブルグ病、エイズなど枚挙にいとまがない。新興感染症とは乱暴な侵入者であったヒトへの、未開の森林からの手痛いしっぺ返しと言えよう。さらにこの不幸な想定外の出来事は、ヒトから森林の住人である野生霊長類への返礼へと繰り返されることになる。すなわち近年に野生霊長類において発生した致死性感染症のアウトブレイクは、ヒトにとっては多くの場合ありふれた風邪ウイルスによって引き起こされたことが明らかにされている¹⁾。その結果、森林開発により生息地が分断化・縮小化された孤立霊長類個体群が、さらにヒト由来病原体による感染症アウトブレイクのため、その存続さえも脅かされている。

2. 研究開発目的

人獣共通感染症、特にヒト由来共通感染症 (Anthropo-zoonosis) による絶滅のリスクから孤立霊長類個体群を保護するためには、もはや自然の復元力に期待するといった消極的施策では手遅れとなりかねない。従って、感染拡大防止や早期封じ込めといった積極的な対策を施すことが急務と考えられる。「種の壁」を越えた病原微生物の野生霊長類への伝搬によるリスク評価やその対策立案のためには、その基礎となる具体的な科学的なエビデンス、すなわち野生霊長類における人獣共通感染症に関する感染疫学情報が不可欠である。しかしこれまで、こうした疫学的・感染症学的情報は非常に限られている。科学的にも医学的にも進歩した現代社会にあって、何故依然としてこのような状況にあるのだろうか？その原因の一つは、野生霊長類を対象とした感染疫学研究の困難さにある。すなわち感染疫学の基本は、病原体に対する血清中特異抗体の検出であるが、野生霊長類から血液採取を行うことは非常に困難を伴う。麻酔を行えば採血そのものは可能であるが、仮にある生息地の個体群 100 頭の捕獲、麻酔を想像して見れば、その手間はかなりのものとなろうことは容易に想像できるだろう。また、その個体群は二度とヒトを自らに近づけることはなくなるだろう。長年の信頼関係を構築することによって初めて可能となる、霊長類生態研究の側からすれば容易に許容しがたい所行であろう。他方、感染疫学に従事する（ヒトを対象とする）医学研究者からすれば、採血そのものが（倫理的側面を除いて）最大のネックとなることは全く想定外、想像外のことであろう。普段研究対象としているヒトであれば、看護師に指示しておけば血液の入ったチューブが実験室に届くのだから。このように、生態学者と医学者は、お互いの不理解やスタンスの違いもあって、野生霊長類を対象とした協調的な感染疫学研究の発展には至らなかった。こうした困難なハードルを乗り越えて、野生霊長類における感染疫学研究は果たして可能なのだろうか？

ところで、本邦固有のサル類であるニホンザルに関して、人獣共通感染症の罹患状況や、リスク評価についてはほとんど情報が得られていない。もちろん、長年人間界に境界を接した、もしくは重複した（アフリカの野生霊長類と比較して）生息地に住むニホンザルが、ヒトにとって大きな感染症リスクがあるとは考えにくいので、積極的な感染疫学調査に至らないのも無理ないこ

とであるが、こうした中で、国内におけるアカゲザルやタイワンザル等外来種マカクザルの野生化によりニホンザルとの遺伝的交雑が危惧されているが、外来マカクザルに自然感染している病原微生物がニホンザルに「種の壁」を越えて伝播した場合の危険性、リスクについてはこれまでに全く検討がなされていない。

上述の二つの課題、一見全く関連性のないテーマに感じられよう。しかし「種の壁」を超えた微生物が新たな宿主にどのようなバイオハザードとなり得るのか、多くの場合その答えを持ち合わせていない。我々は、こうした背景を踏まえ、3年間という短い期間ではあったがこれらのチャレンジな課題に取り組もうと決意した。

3. 研究開発方法

(1) 野生類人猿の人獣共通感染症原因ウイルスに関する感染疫学調査

ヒトおよび類人猿に感染症を起こしうる病原微生物の感染状況を把握することを目的にモニタリングシステム確立を試みた。通常、各種病原体に対する特異的 IgG 抗体を血清由来サンプルから検出することにより病原体への感染状況をサーベイするのが一般的である。しかし野生生息域で血液の採取は上述のように困難であり、事実上採取可能なサンプルは糞便に限られることから、このような一般的方法論は本課題には適応できない。そこで本研究では、糞便中より粘膜型抗体である IgA 抗体が検出するのではないかとという作業仮説に基づき、その実証を試みた。このためには、以下の疑問点、障害を解消する必要があった。すなわち第1に、さまざまな病原体がその感染刺激により宿主免疫応答として IgG 型と IgA 型を同時に誘導しうるのか？という疑問が生じる。第2に、誘導された IgA が糞便サンプルから再現良く検出可能なのか？第3に、これらを明らかにするためには、高い IgG 抗体価を示す病原体およびその類人猿個体の特定、さらにその個体からの糞便と血液のペアサンプル入手が不可欠であった。しかも、検出系確立のための標準サンプルとして用いるためには、抗体価が減弱していない新鮮なペアサンプルが求められる。こうした複雑な条件検討を適切に行なうため、当研究所で飼育されている複数のチンパンジーより血液及び糞便をペアサンプルとして採取し、まず各種病原体に対する特異的 IgG 抗体の有無を血清由来サンプルにて検討することにした。次にこの結果を踏まえ、抗体陽性率が高い病原体を選定し、血清中の特異的 IgA 抗体を測定する。これらの結果、IgG および IgA ともに陽性を示した特定の病原体（今回の場合、Epstein Barr virus (EBV)を選定した)・チンパンジー個体を選定する。そして当該個体の糞便サンプル抽出液における当該病原体に対する IgA 抗体の有無について検討を行なうとともに、同病原体に対する IgG 抗体価との相関性について比較検討を行なった。結果的にはこれらのステップを全てクリア出来たため、これらの結果を基に、野生類人猿由来糞便サンプル（各個体の糞便サンプル収集については、サブテーマ1での報告を参照のこと）について上述のように選定された特定の病原体に対する IgA 抗体の有無について検討を行なった。この時点で、野生類人猿由来糞便サンプルから EBV に対する IgA 抗体が有意な割合で検出されたことは本課題の成否を決定する重要なポイントであった（詳細は結果の稿で詳述）。そこで、インフルエンザウイルスをはじめとする人獣共通感染症病原微生物の感染状況を把握することを目的にモニタリングシステムを確立した。すなわち、小規模霊長類個体群が生息する調査地における各個体の糞便サンプルから IgA 抗体を抽出し、独自に構築した ELISA 法およびウェスタンブロッ

ト法によりヒト由来呼吸器感染症を引き起こす各種ウイルス特異抗体の検出を試みた。

(2) 外来マカクザル由来病原体によるニホンザルの感染症リスク研究

原因不明のニホンザル血小板減少症の解明にあたっては、社団法人予防衛生協会、国立感染症研究所、大阪大学微生物病研究所、京都大学ウイルス研究所等の研究機関との共同研究により様々な解析手法を駆使した。病原体ゲノム同定には RDV 法 (Rapid Determination system of Viral RNA sequence method) や次世代シーケンサーによるメタゲノム解析といった網羅的解析法、および病原体特異的な PCR あるいは RT-PCR 法を用いた。ウイルス検出には、培養試験および電子顕微鏡観察を行なった。さらに抗ウイルス抗体検査を行なった。これらの解析から得られたデータを基に、ニホンザル血小板減少症の原因病原体について総合的な分析を行ない、その同定を進めた。これらの結果、ニホンザル血小板減少症の原因が simian retrovirus typr-4 (SRV-4) 感染によるものであることを突き止めた。次に SRV-4 の感染源の特定を行なうため、SRV-4 特異的 DNA-PCR と SRV 特異的抗体の検出法を確立し、京都大学霊長研に飼育されている全てのサル種における SRV-4 のスクリーニングを行なった。これにより、どのサル種からどのように「種の壁」を越え SRV-4 がニホンザルに伝搬したかを評価した。さらに、SRV-4 による血小板減少を主徴とする病原性の原因究明を念頭に、感染ニホンザルの各種臓器における凍結切片を用いた SRV-4 に対する特異的免疫染色法とヘマトキシリン・エオシン染色法を併用し、SRV-4 の組織分布解析を行った。

4. 結果及び考察

(1) アフリカ類人猿の人獣共通感染症サーベイランス

まず当研究所で飼育されている 14 頭のチンパンジーから得た血清由来サンプルにおいて、各種病原体に対する特異的 IgG 抗体の有無を検討した。その結果を図に示す (図 1)。主に呼吸器感染症では、パラインフルエンザウイルス、メタニューモウイルス、RS ウイルス、アデノウイルス、コクサッキーウイルス、麻疹ウイルス、百日咳菌、肺炎マイコプラズマ、肺炎クラミジアの特異抗体が検出された。ヘルペスウイルス感染症においては、サイトメガロウイルス、水痘・帯状疱疹ウイルス、エプスタインバーウイルス (EBV) の特異抗体が検出された。消化器感染症では、A 型肝炎ウイルス、ロタウイルス、赤痢アメーバの特異抗体が検出された。

次に、国内飼育されているチンパンジーの血清サンプル中、特に IgG 抗体価が高かった EBV について抗 EBV-IgA 抗体を検討したところ、いずれの個体においても高い IgA 抗体価が確認された (図 2)。そこで、同一個体の糞便サンプル抽出液における IgA 抗体の有無について検討を行なった。その結果、血清抗 EBV-IgG/IgA 抗体が陽性であった殆どの個体において、抗 EBV-IgA 抗体が検出された (図 2)。さらにウエスタンブロット法において、血清、糞便サンプルのいずれからでも抗 EBV-IgA 抗体特異バンドが検出された (図 3)。この時点で、野生類人猿由来糞便サンプルから EBV に対する IgA 抗体が有意な割合で検出されたことは本課題の成否を決定する重要なポイントであった。すなわちこの結果より、①ウイルス感染刺激により宿主免疫応答として IgG, IgA 抗体を同時に産生し、この IgA が糞便中にも残存していること、そして②糞便サンプルから IgA 抗体が抽出可能であること、を実証できたのである。この結果によって、類人猿由来糞便サンプルからの IgA 抗体抽出技術そのものは確立できたものと判断されたため、類人猿由来糞便サンプルからの病原体特異抗体の定性、定量解析が可能となったのである。

- ### 呼吸器感染症
- ・ パラインフルエンザウイルス
 - ・ メタニューモウイルス
 - ・ RSウイルス
 - ・ アデノウイルス
 - ・ コクサッキーウイルス
 - ・ 麻疹ウイルス
 - ・ 百日咳菌
 - ・ 肺炎マイコプラズマ
 - ・ 肺炎クラミジア

- ### ヘルペスウイルス感染症
- ・ サイトメガロウイルス
 - ・ 水痘・帯状疱疹ウイルス
 - ・ エプスタインバーウイルス

- ### 消化器感染症
- ・ A型肝炎ウイルス
 - ・ ロタウイルス
 - ・ 赤痢アメーバ

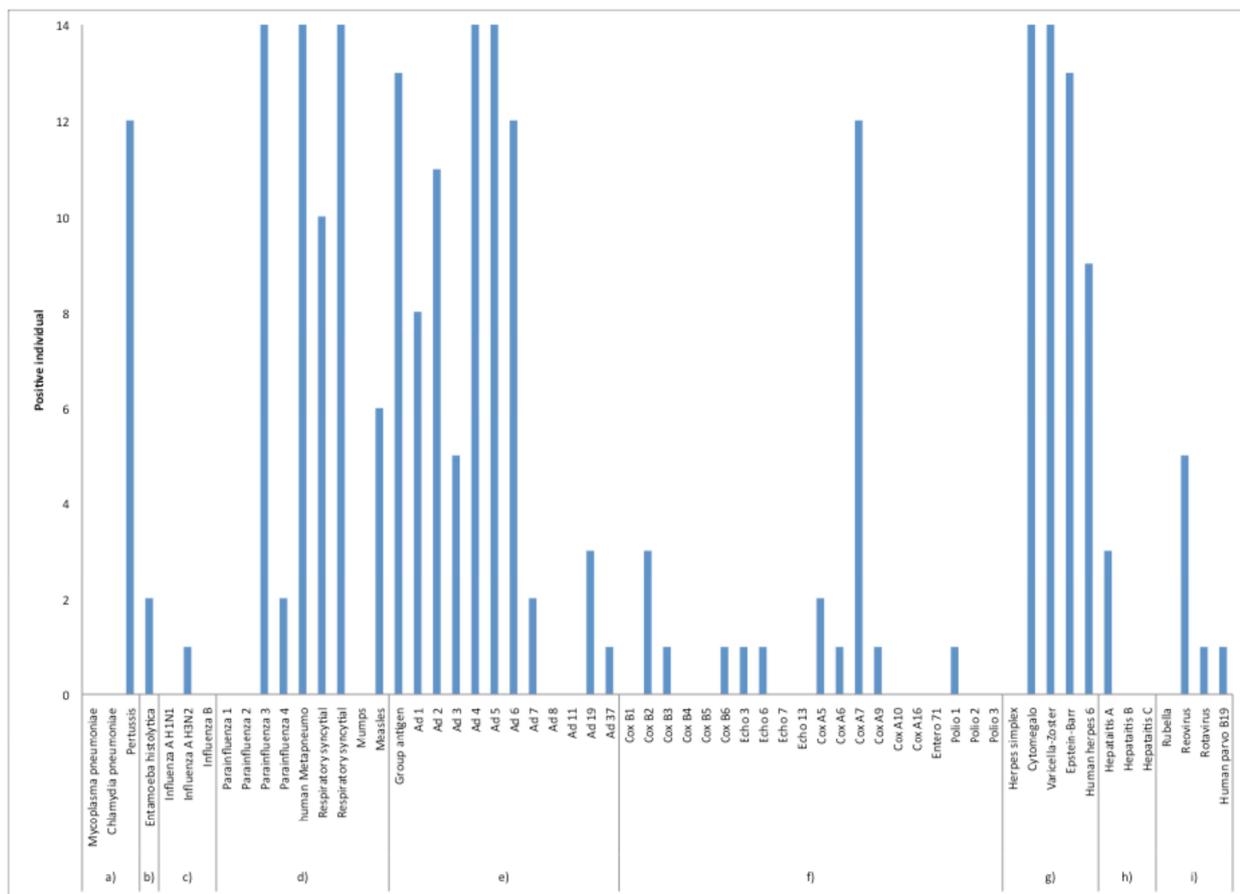


図1 霊長類研究所チンパンジーにおける各種ヒト病原微生物に対する特異抗体の保有状況

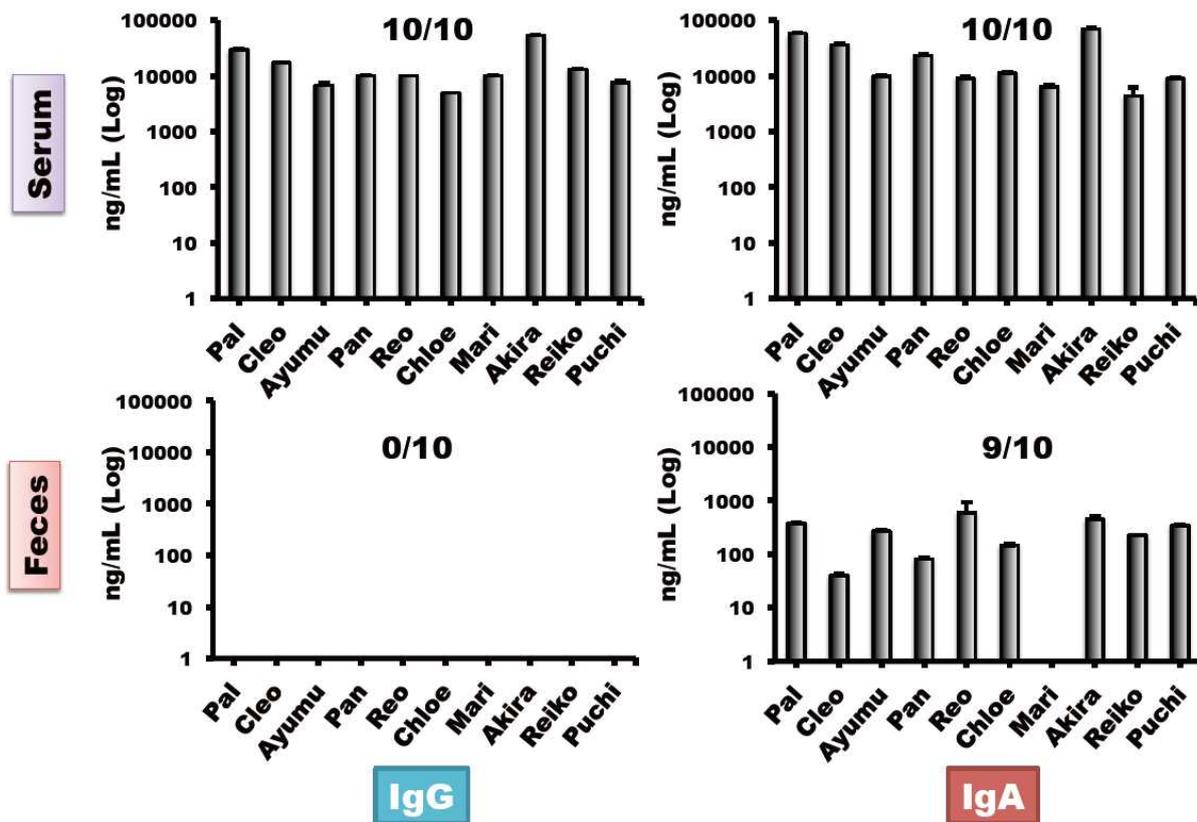


図2 飼育下チンパンジーにおける EBV 特異的 IgG、IgA 特異抗体の検出

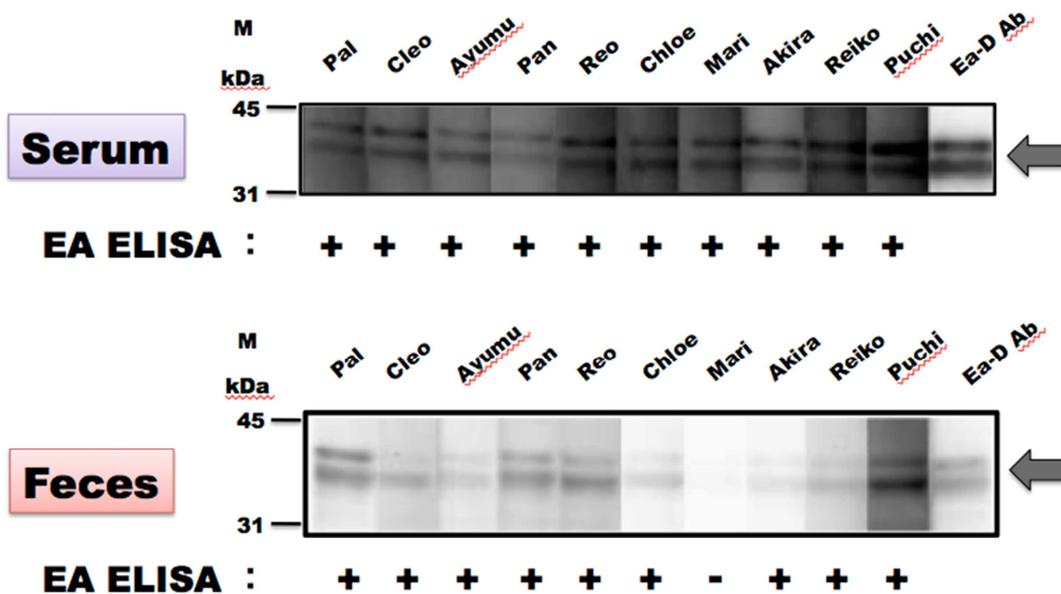


図3 WB 法による飼育下チンパンジーにおける EBV 特異的 IgA 特異抗体の検出

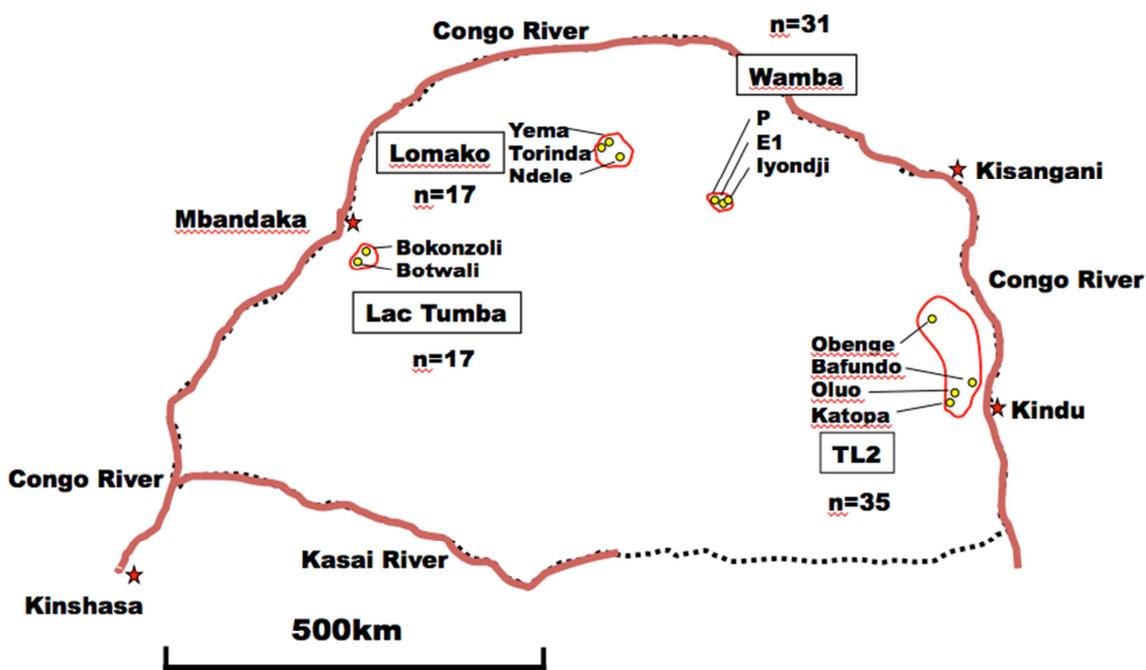


図4 コンゴ民主共和国における野生ボノボ糞試料採集地

そこで、コンゴ共和国の野生ボノボ各生息地（図4）から採取した糞便サンプルから IgA 抗体を抽出し、ELISA 法により抗 EBV 抗体について検討を行った。その結果、100 頭中 25 頭において EBV に対する特異抗体を保有していることが明らかになった（図5）。

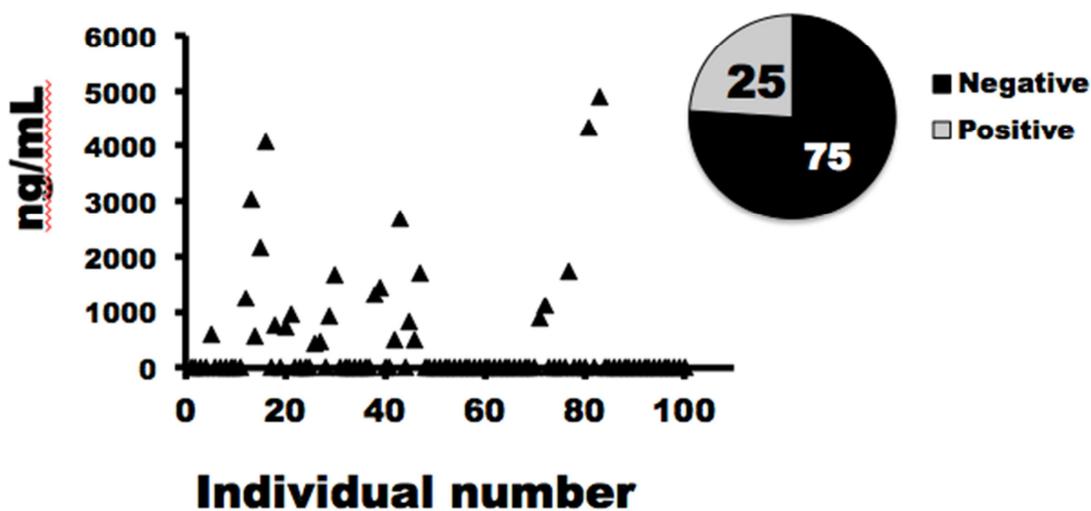


図5 野生ボノボにおける抗 EBV-IgA 抗体価

興味深いことに、ボノボ生息地ごとに抗体陽性率が顕著に異なることを見出した（表 1）。すなわち Wamba, TL2, Lomako では 19-41%という高い抗体陽性率であるのに対し LacTumba では全頭陰性であった。その結果より、ボノボの生息地により EBV 感染分布に大きな偏りがあることが初めて明らかとなった。

表 1 異なる地域の野生ボノボの糞試料における EBV 特異 IgA 抗体の陽性率

Habitat	% positive for EBV-specific IgA
Wamba	6/31 (19.4)
TL2	12/35 (34.3)
Lomako	7/17 (41.2)
Lac Tumba	0/17 (0)

以上の結果より、類人猿由来糞便サンプルからの病原体特異抗体の定性、定量解析系が確立されたと判断し、最後に野生チンパンジーでアウトブレイクが観察されている呼吸器感染症の原因ウイルス（インフルエンザウイルス、パラインフルエンザウイルス、ムンプスウイルス、RS ウイルス）について、それぞれの特異抗体を検出する ELISA 系を独自に構築した。この系を用いて、野生ボノボの糞便における IgA 型特異抗体を調べた（図 6, 7）。その結果、インフルエンザウイルスにおいては、21-28%が陽性であることが示された。またパラインフルエンザウイルス、ムンプスウイルス、RS ウイルスに対する抗体陽性率は、22-27%であった。この時点では、複数の異なるウイルスに対して一見同等な抗体陽性を示していたことから、本法による検査結果が非特異的反応によるものである可能性を否定できなかった。しかし個体ごとの結果を精査すると、ウイルス種ごとに、もしくは同じウイルス種内でも異なるジェノタイプ間では特異抗体の有無やその抗体価が大きく異なっていた。したがって本法により検出される抗体反応は特異的であるものと考えられた。

注目すべきことに、ボノボ生息地によりウイルス抗体陽性率は顕著に異なっていた（図 8, 9）。ウイルス種により多少ばらつきがあるが LacTumba では全般的に陽性率が低く、このことは EBV における結果と同様であった。ただし、インフルエンザ B 型やパラインフルエンザ 2 型、RSV-B では中等度の陽性率であり、病原体によっては一定の感染歴があることが推定された。他方、TL2, Lomako では全般的に陽性率が高かった。以上の結果から、生息域により全般的なウイルス流行傾向に大きな偏りがあること、同じ生息域であってもウイルスの種類やその型別によって流行状況にかなり違いがあることが明らかとなった。

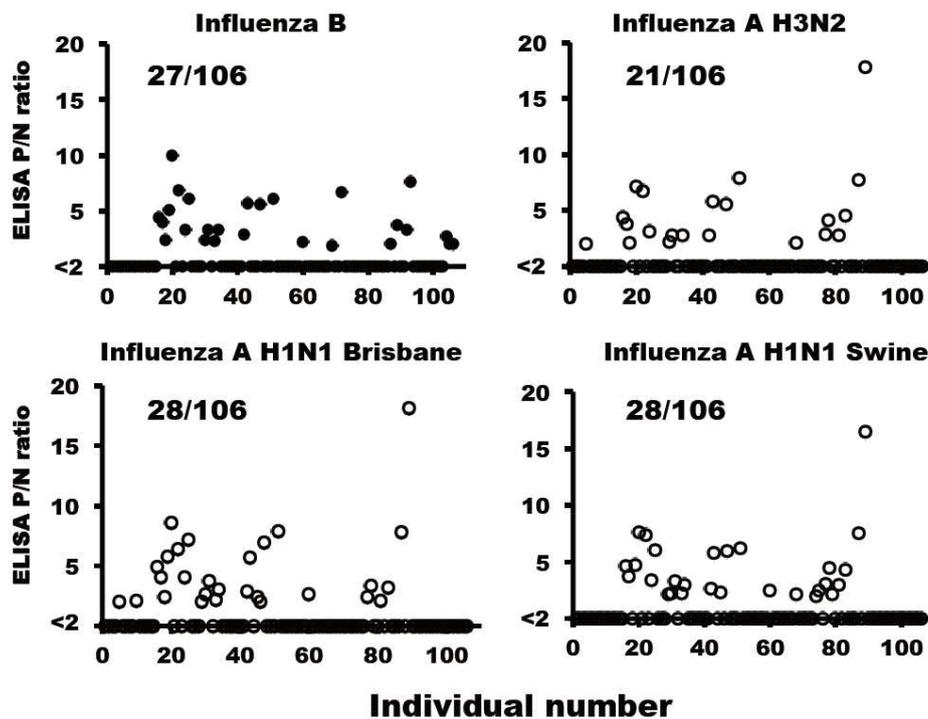


図6 野生ボノボにおけるオルソミクソウイルス科呼吸器感染症ウイルス特異的 IgA 特異抗体の検出。P/N 比が 2 以下は特異抗体陰性。

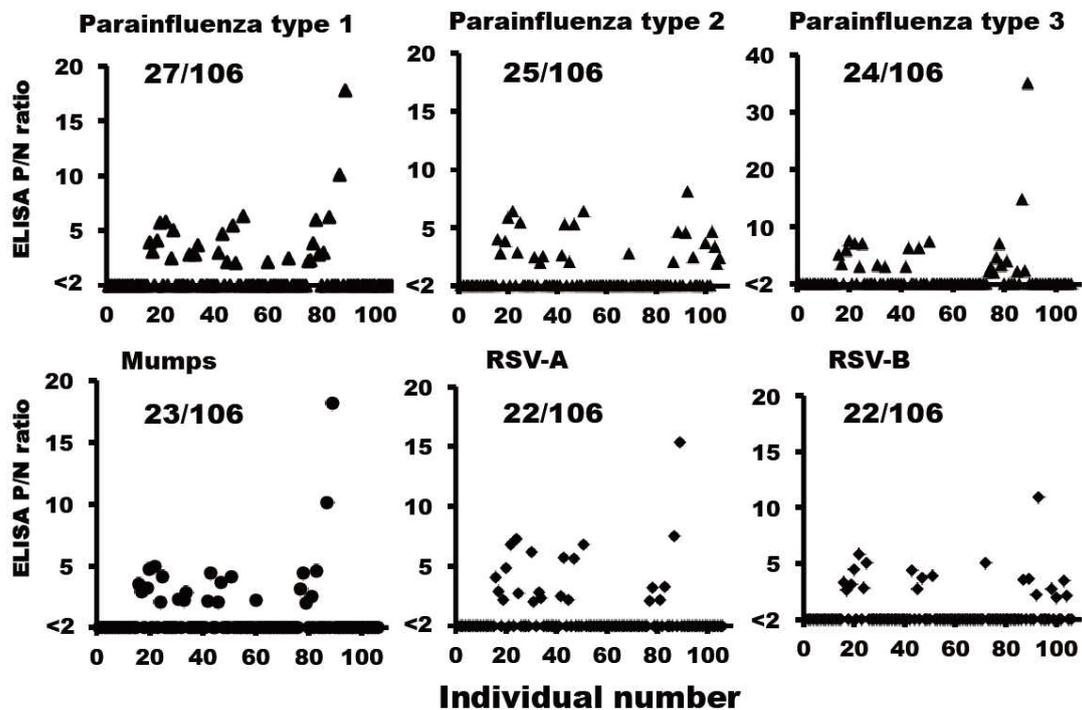


図7 野生ボノボにおけるパラミクソウイルス科呼吸器感染症ウイルス特異的 IgA 特異抗体の検出

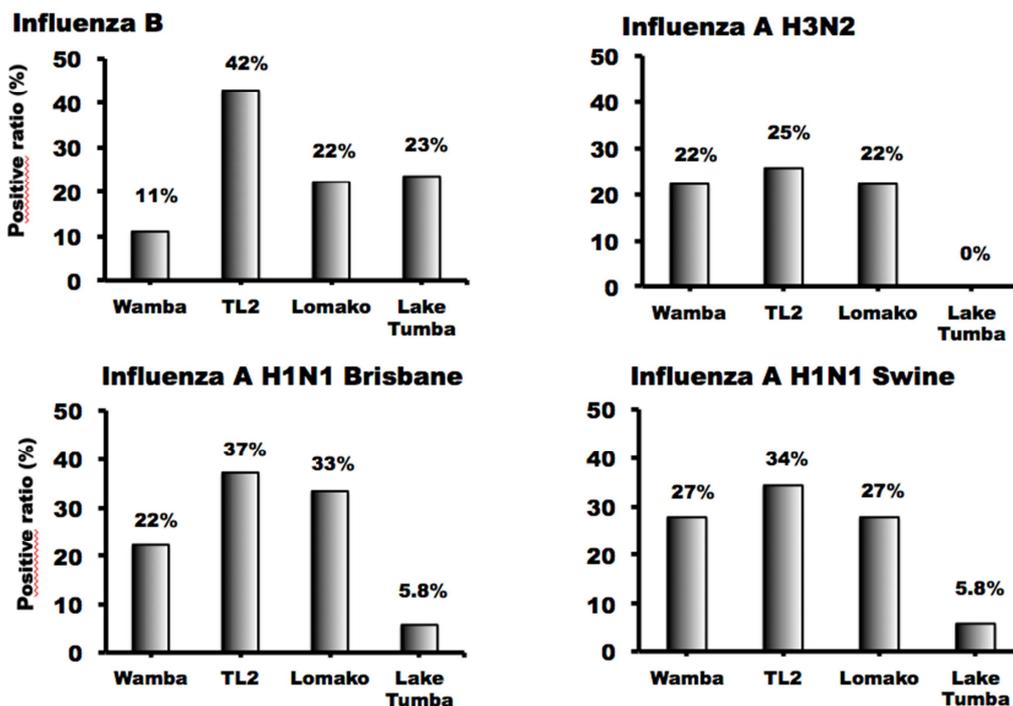


図8 野生ボノボ生息地域別のオルソミクソウイルス科呼吸器感染症ウイルス特異抗体陽性率の比較

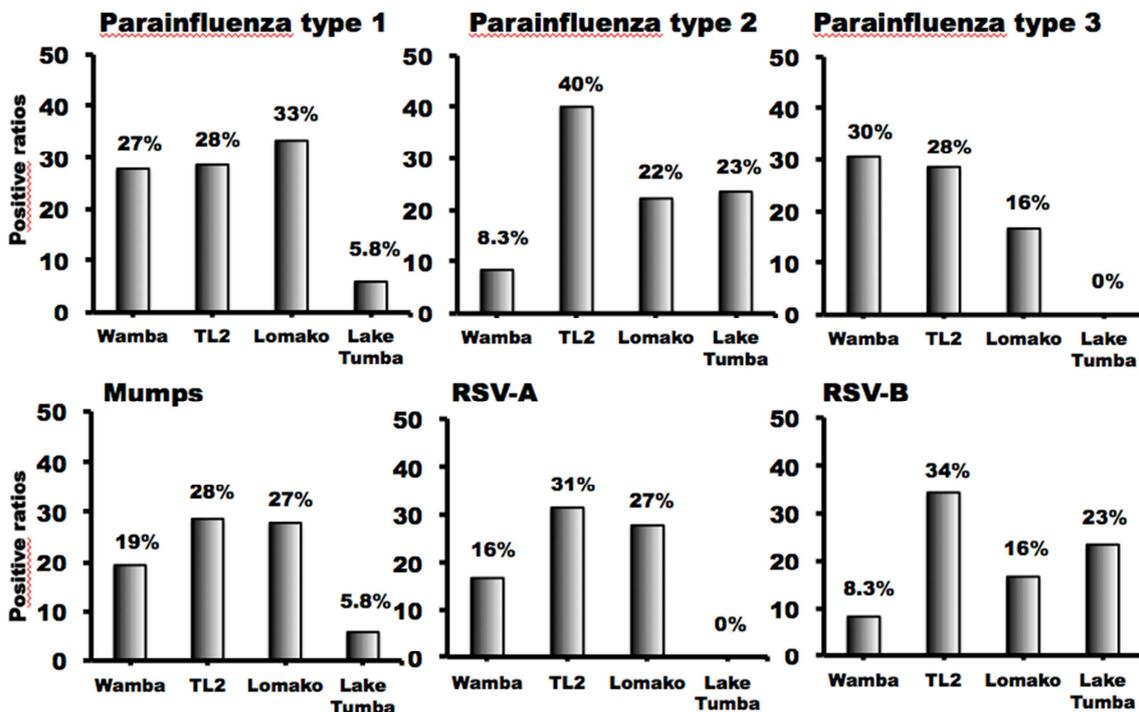


図9 野生ボノボ生息地域別のパラソミクソウイルス科呼吸器感染症ウイルス特異抗体陽性率の比較

ところで、今後の類人猿保護政策を考える際、こうした感染疫学的知見は、どのような意義があるだろうか？ヒト由来ウイルスに暴露する機会が多く、ウイルス特異的な抗体を高頻度で保有するボノボ個体群では、結果論として感染により致死性症状を呈さず治癒したことを表しており、その多くが多様なウイルスに対する防御免疫を獲得している可能性がある。この場合、その地域個体群は当該ウイルスおよび近縁ウイルスによる再感染流行に対し抵抗性を示す（いわゆるワクチン効果）ことが期待される。一方、過去にこうした感染流行のなかった生息域では、ウイルスの新規流行（特に現地住民ではなく海外からの観光客や研究者が持ち込むもの）に対して免疫学的にナイーブであり、ある生息域の個体群が特定のウイルスに対して感受性が高く致死性症状を呈してしまう恐れがある。実際、さまざまな感染症において特定の MHC ハプロタイプが感染への抵抗性/感受性を規定することはよく知られており、他の地域との交流がない孤立個体群では遺伝子型の多様性に乏しいためにある種の病原体侵入に対して適切な防御免疫を誘導できないといった可能性も想定される。こういった可能性を考慮し、例えば LacTumba のような、過去にウイルス感染流行頻度が少なかったと推測される生息域では、特に海外からの観光客や研究者の立ち入りを制限する、もしくはリスク抑制を念頭にした予防策（事前の健康チェックやマスク装着等）をより厳格に実施するなどのオーダーメイド対策を執ることが望ましい。

今回の感染疫学調査で対象とした呼吸器感染症では、原因ウイルス感染から長くとも数週間以内に治癒するのが通常であり、1度の感染であれば特異抗体価は1、2年程度で漸減しやがて検出限界以下となる。現時点で糞便から抗体が検出されるということは、原因ウイルスの野生個体群への感染流行が比較的最近に生じたか、もしくは現在流行している可能性が考えられる。今後、横断的調査に加えて一定地域の個体群における経時的な抗体価動態をフォローアップすることにより、病原体ごとに流行の消長が把握できるものと期待される。

（2）外来マカクザル由来病原体によるニホンザルの感染症リスク研究

京都大学霊長類研究所では、この10年間で2回、血小板の急激な減少という症状でニホンザルが死亡する事例があった。いったん発症すると致死率は極めて高く、第1期の2001-2002年の約1年間に7頭発症して6頭が死亡し、6年間において、第2期の2008年3月から2010年12月までの間に42頭発症して41頭が死亡した（図10）。

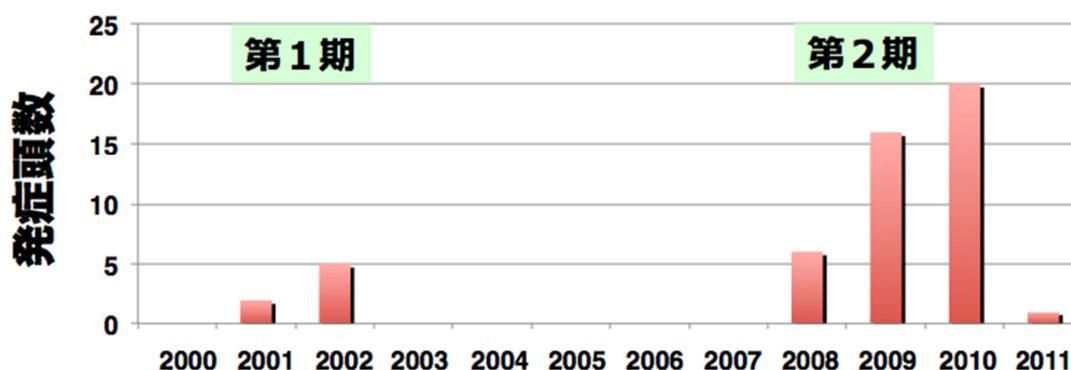


図10 ニホンザル血小板減少症の発症数の推移

臨床症状としては皮下、口腔、消化管や肺などの出血や血便が典型的であり、発症後数日で急性転機を辿り死に至る。性、年齢、捕獲地などに発症の偏りは見られない。血液学的には通常 $30\text{-}40$ 万/ mm^3 ある血小板の激減とそれに続く赤血球ならびに白血球の減少が発症個体全頭に共通して認められる。特に死亡時には血小板数がほぼ0になるケースがほとんどであり、これが本疾病のもっとも特異的な現象となっている。第2期のアウトブレイクにおける発症例の急激な拡大から、何らかの感染症が疑われた。そこでまず、Ebola（エボラ出血熱）、Marburg（マールブルグ病）、Lassa（ラッサ熱）、CCHF（クリミアコンゴ出血熱）等のヒトが感染すると重篤な出血性の症状を呈する病原体に対する抗体およびゲノムの有無を調べたが、いずれも陰性であった。そこで、社団法人予防衛生協会、国立感染症研究所、大阪大学微生物病研究所、京都大学ウイルス研究所等の研究機関の協力により、考えられるあらゆる方策（RDV法、次世代シーケンサーによるメタゲノム解析、電子顕微鏡による観察、培養試験、抗体検査等）を駆使し、複数の発症個体について病原体の同定を試みた。その結果、RDV法およびメタゲノム解析にてSRVに高い相同性を示すウイルスゲノムが検出された。その後、詳細なゲノム解析により、このウイルスがSRV-4であることが突き止められた。また電子顕微鏡解析の結果、発症ニホンザルの血漿中にはサルレトロウイルス4型（SRV-4）と非常に類似した形体のウイルス粒子が観察された（図11）。

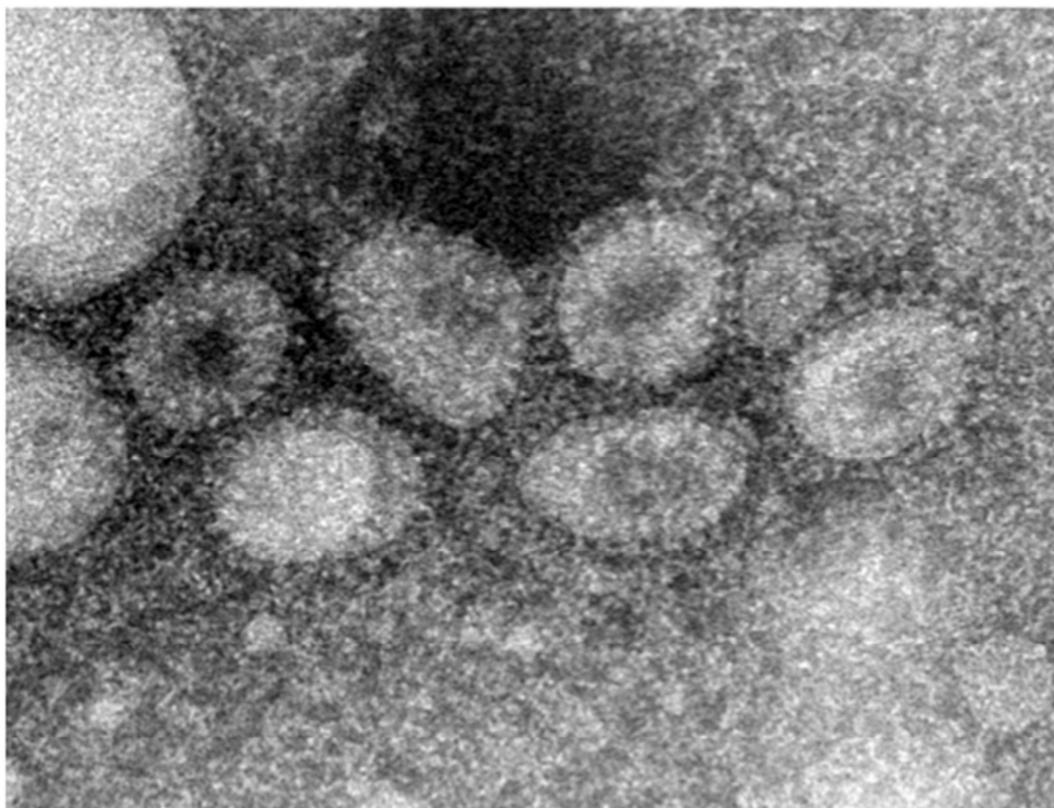


図11 発症個体血漿中のSRV粒子像

以上の結果より、ニホンザルにおける血小板減少症の原因は、SRV-4である可能性が高いと判断された。そこで、研究所内の多様なサル種への感染流行状況の把握および感染ザルの摘発淘汰が急務と考えられたため、上述のウイルスゲノム情報を基に、血漿及び血球からのウイルスRNA検出法を確立した（図12）。

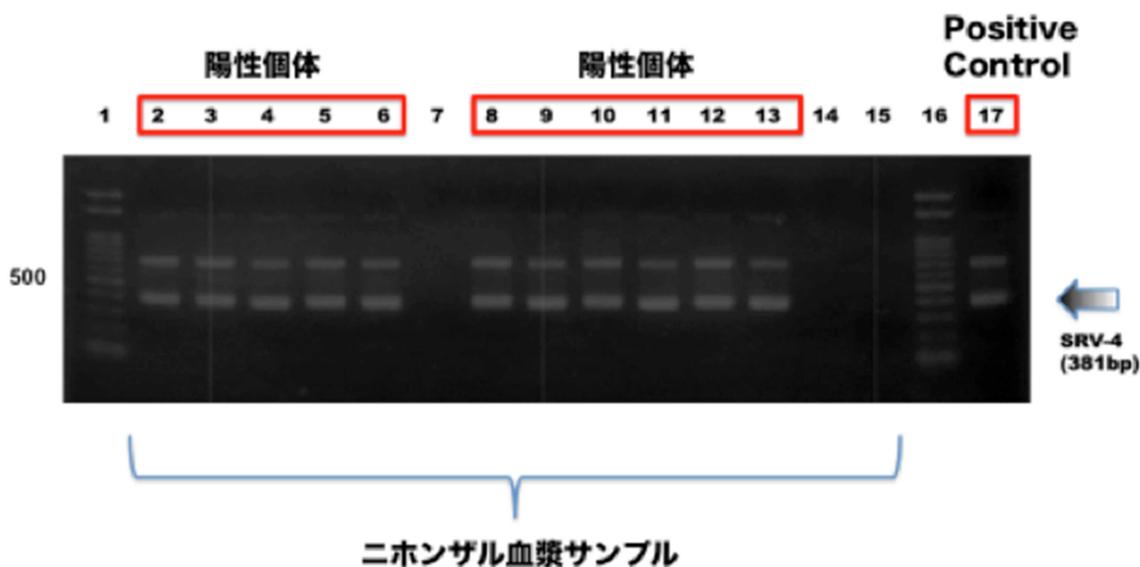


図 12 RT-PCR 法による SRV-4 ゲノムの同定

本法による解析の結果、発症個体の血漿中のみならず糞便や尿、各臓器中において SRV-4 遺伝子が確認された。他方、発症したサルとまったく接点のない正常ザルでは、いずれのサンプルからも SRV-4 遺伝子は検出されなかった。

次に発症個体及びハイリスク群（発症個体と同居飼育）、ローリスク群（同居ザルに発症個体なし）の血漿におけるウイルス遺伝子および抗 SRV 抗体について解析を行った（図 13）。重要なことに、発症個体では全て SRV-4 遺伝子が陽性であるにも関わらず、抗 SRV 抗体は全て陰性であった。一方、ハイリスク群では多くの例で抗体陽性であった。またローリスク群ではいずれも陰性であった。このことから、何らかの要因により SRV に対して適切な抗体応答が誘導されないニホンザル個体群ではウイルス感染制御が破綻し、その結果ウイルスが骨髄細胞を傷害し血小板減少に至るものと考えられた。

興味深いことに、SRV-4 はカニクイザルが自然宿主であることがアメリカの研究グループによって最近報告された²⁾。事実、当研究所で飼育されていたカニクイザルについて調査したところ、複数の個体から抗 SRV 特異抗体が陽性であることが確認され、また一部の個体からは SRV-4 遺伝子が検出された（図 13）。国内カニクイザル繁殖施設において SRV-4 の高頻度な感染が確認されているが、今回ニホンザルで見られるような致死性血小板減少症は見られない。従って、自然宿主であるカニクイザルでは重篤な臨床症状を示さない（不顕性感染）が、ニホンザルへの感染により想定外の致死性疾患を呈するものと考えられた。最後に、感染ニホンザル生体内における SRV-4 の組織分布について検討を行った（図 14-19）。その結果、血小板減少症を発症した個体からサンプリングしたさまざまな組織（小腸、大腸、盲腸、腸間膜リンパ、腎臓）より SRV-4 Env 蛋白特異的シグナルが検出された。それぞれの組織ごとに詳しく調べてみると、小腸、大腸、盲腸の粘膜上皮で SRV-4 特異的反応が強く観察された。また、腎臓においては腎小体内部において、SRV-4 特異反応が観察された。しかし心臓においては、SRV-4 感染は観察されなかった。SRV-4 非感染ザル由来組織ではいずれの部位でも陰性であった。

以上の結果より、SRV-4 はニホンザルにおいてリンパ組織のみならず、消化管や腎臓など多様な組織で感染増殖していることが示された。このことは、糞便や尿中にウイルスが検出されることと一致するとともに、ニホンザル放飼場やグループケージにおける糞便や尿を介した個体間の感染伝播の原因となっているものと考えられた。

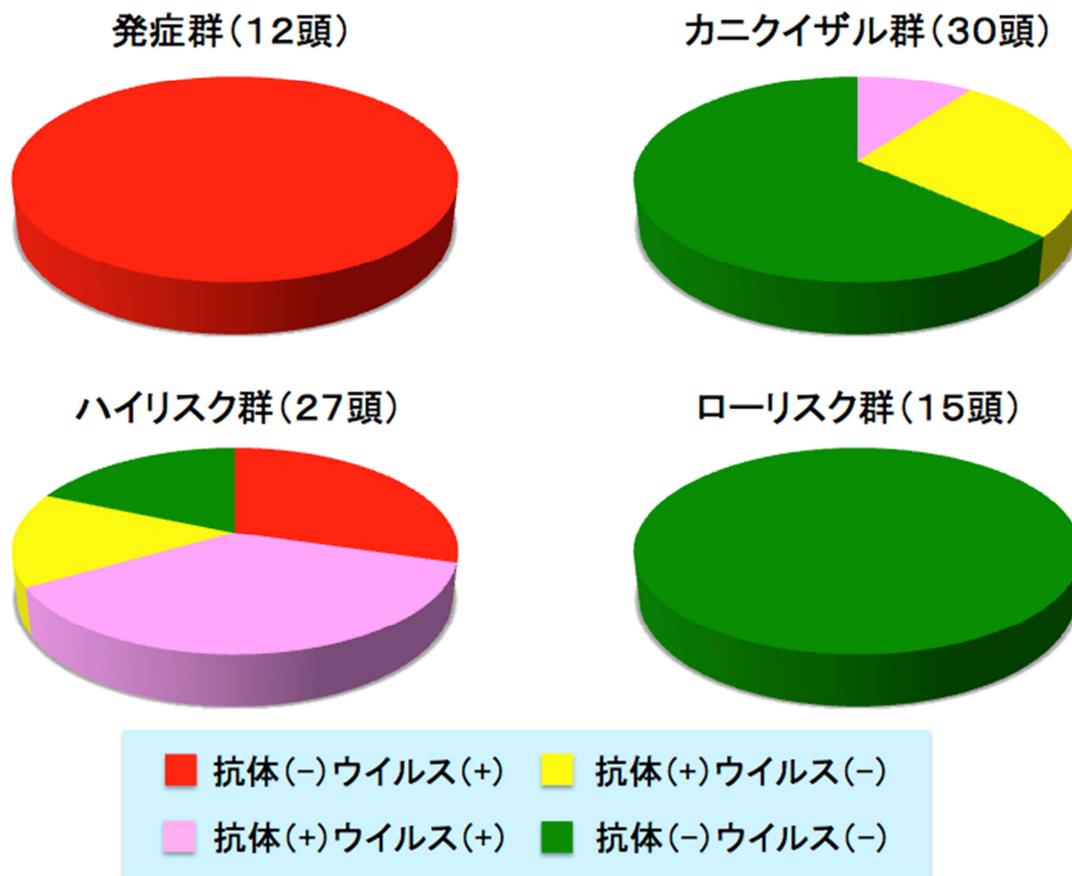


図 13 ニホンザル及びカニクイザルにおける SRV-4 及び抗体の検出

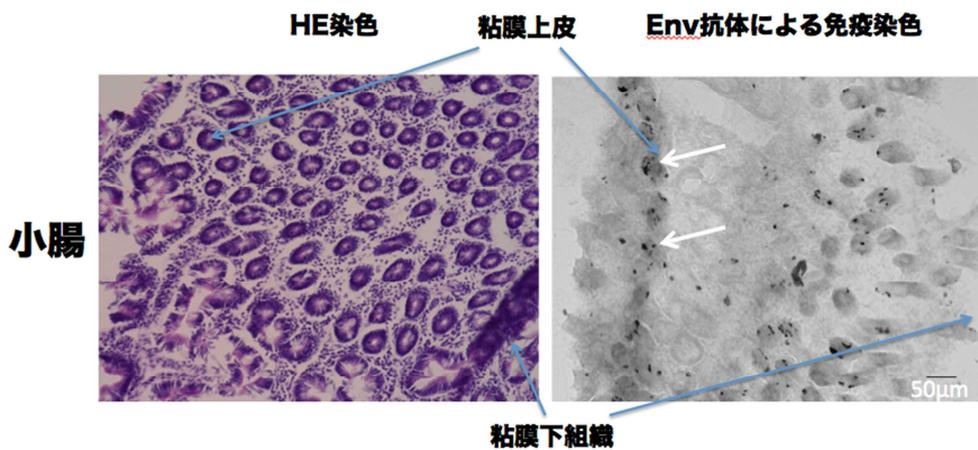


図 14 SRV-4 感染ニホンザル小腸における SRV-4 Env 抗原の検出

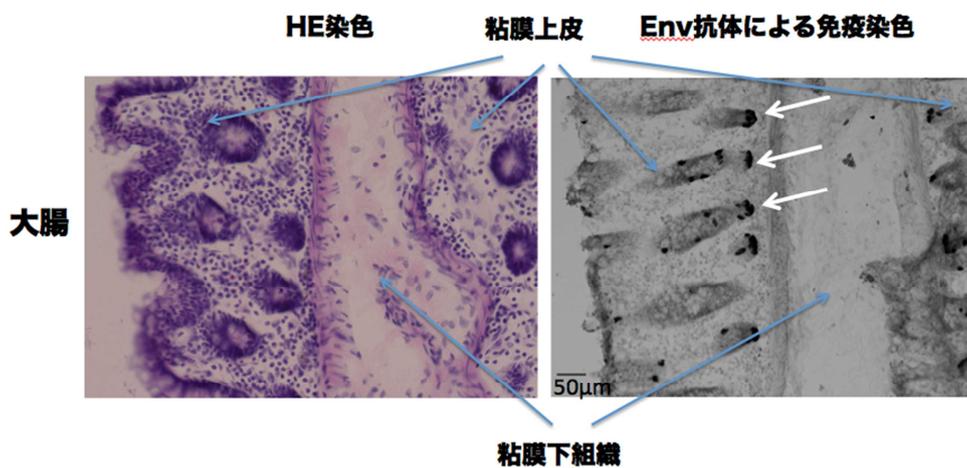


図 15 SRV-4 感染ニホンザル大腸における SRV-4 Env 抗原の検出

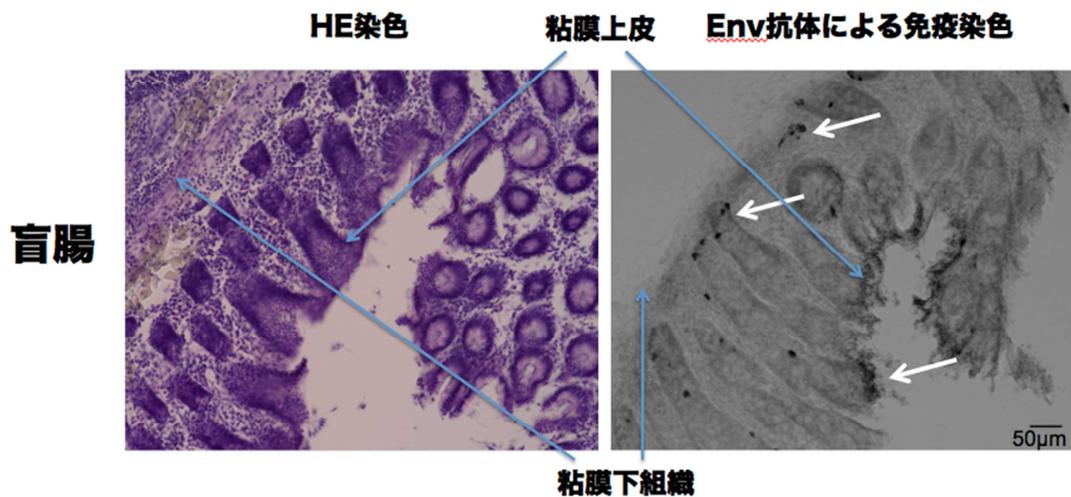


図 16 SRV-4 感染ニホンザル盲腸における SRV-4 Env 抗原の検出

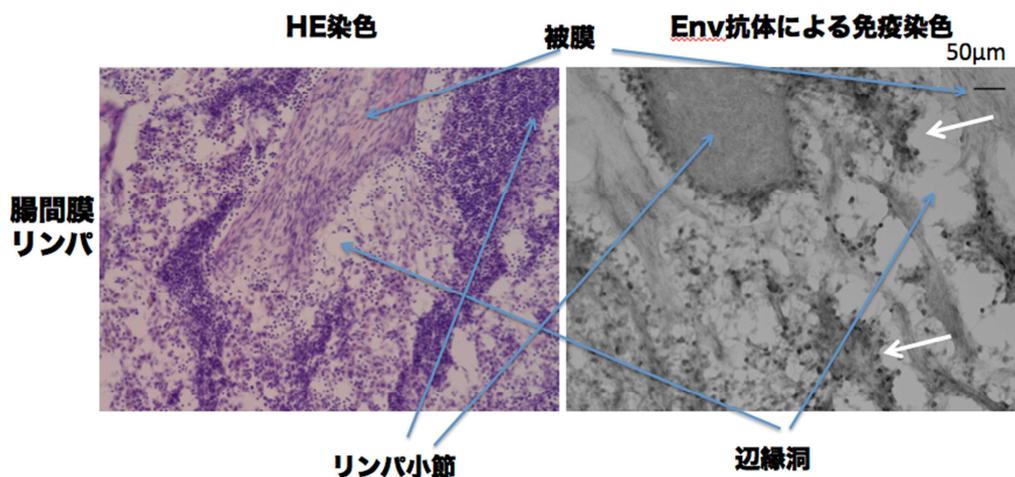


図 17 SRV-4 感染ニホンザル腸間膜リンパ節における SRV-4 Env 抗原の検出

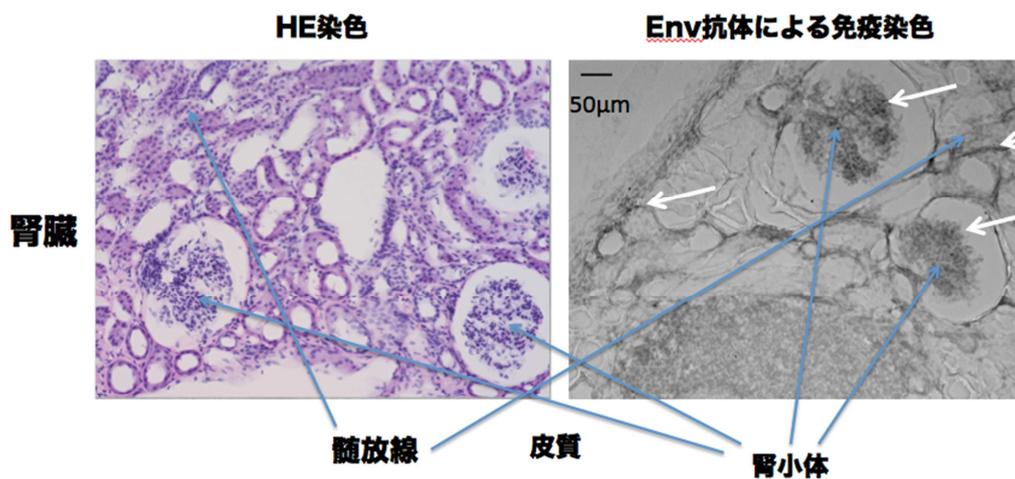


図 18 SRV-4 感染ニホンザル腎臓における SRV-4 Env 抗原の検出

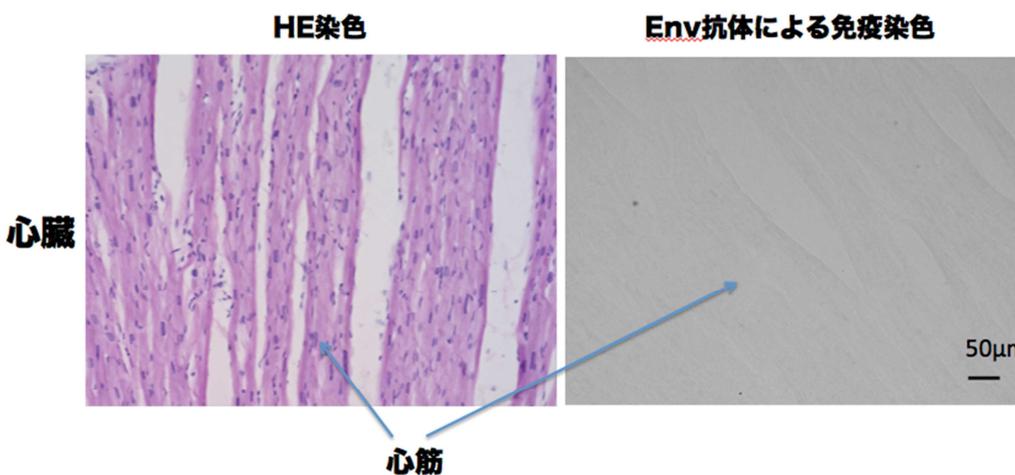


図 19 SRV-4 感染ニホンザル心臓における SRV-4 Env 抗原の検出

5. 本研究により得られた成果

(1) 科学的意義

第1に、野生類人猿であるチンパンジーとボノボにおいてヒト由来人獣共通感染症のリスクが危惧される状況において、その克服に不可欠な科学的なエビデンスとしての野生霊長類における人獣共通感染症に関する感染疫学情報を得るための技術的基盤が初めて確立された。すなわち、類人猿由来糞便サンプルからのIgA抗体抽出技術とそれを応用した病原体特異抗体の定性、定量解析が本研究により可能となったことは画期的な進歩である。本成果は、霊長類生態学とウイルス学の専門家がそれぞれの得意分野を生かしつつ、本プロジェクトによる協調的かつ生産的な共同研究活動があって初めて成し遂げられたものである。また霊長類研究所という飼育下の類人猿のサンプルが比較的容易に入手できる希有な環境に支えられ、本研究実施に当たり最も困難と思われた方法論の確立が短期間に為し得たものであろう。本邦において、このような学術的にも疎遠な異なる他分野間での協力関係に基づくブレークスルーは希であり、まさに霊長類研究所というユニークな環境ならではの優れた成果であると言えよう。

これまでに類人猿の孤立個体群における人獣共通感染症が原因となる大規模な頭数減少が報告されている。こうした危機的状況の回避に向け、専門家会議等ではワクチン投与や治療などの人為的介入が検討されているが、その是非については今も意見が分かるところである。その最大の問題は感染疫学調査に基づく科学的エビデンスの欠如にあり、旧来の経験則に基づく環境保護政策では必ずしも適切な対策を講じられないのが実情である。すなわち生息地域により異なる社会のおよび政治経済的な背景の多様性に起因して、孤立個体群によって感染症罹患状況や罹患歴、各病原体への防御免疫保有率などが異なる可能性が考えられるため、実際問題としてボノボ全体に一律の感染症対策を講じることが適切とは言いがたい。従って、よりピンポイントに適材適所の対策を講じることが望ましい。こうした背景において、本研究成果として様々な呼吸器感染症における疫学調査が可能となったことは意義深い。特に、昨年度の本研究において予備的結果ではあるが孤立個体群の生息地域によりウイルス特異抗体の保有率などに顕著な差が見られたことから、今後リスク要因となる各種病原ウイルスの孤立個体群におけるより精密な感染疫学データを積み重ね、そのエビデンスに基づいたリスク評価を行い、可能な限り孤立個体群ごとに最適化された感染症対策を実施していくことが重要である。

第2に、より私たちの身近に住むマカク類の種の壁を越えた感染症の疫学調査による感染源の特定と感染経路の予測が立てられたことである。霊長類研究所のニホンザルでは、数年前から原因不明の血小板の減少による致死的疾患が発生しており、その原因究明が急がれていた。そこで国内諸研究機関との共同研究により原因ウイルスの特定に尽力し、SRV-4のニホンザル感染こそがその原因であることを突き止めた。すなわちSRV-4特異的ゲノム検出系と抗体検査法を確立し、ニホンザルのみならず多様なサル種におけるSRV-4の疫学調査を行い、感染源の特定と感染経路の予測を行なった。その結果、SRV-4がカニクイザルからニホンザルに伝搬して、その「種の壁」を超えたことが想定外の致死的疾患をニホンザルに引き起こしたことが解明された。このような短期間で原因ウイルスを解明し、その防疫体制を確立できたことは感染症学的観点において特筆に値する。さらに放飼場で自然に近い飼育環境での感染が拡大したことは、万が一SRV-4の自然宿主であるカニクイザルが野生ニホンザルと接触することがあれば同様な悲劇が起こりえることを示唆するものであり、非常に意義深い。鳥インフルエンザなどの例にも見られるように、予想

を超えた劇症化をもたらす種の壁を越えたウイルス感染は、ヒトや野生動物にとって重大な問題であり、今後もその解明や予防策の更なる改善を図り、野生霊長類における感染症のアウトブレイクが起こった場合に、直ちにその原因究明や感染拡大防止等に対応可能な基盤技術、霊長類感染症研究拠点の維持発展、さらにそのための人的育成が不可欠であろう。

(2) 環境政策への貢献

<行政が既に活用した成果>

特に記載すべき事項はない。

<行政が活用することが見込まれる成果>

アジア・アフリカ野生霊長類の人獣共通感染症に関して、その感染流行状況は充分把握されておらず、よって各病原体のリスク評価が行なわれていないのが実情であった。その原因として、野生霊長類の感染症研究を担う研究機関・施設がこれまで国内で欠如しており、そのため基盤的技術開発および人材育成が進められてこなかった事が挙げられる。3年間の本研究事業では、アジア・アフリカ野生霊長類に関する人獣共通感染症モニタリングのための基盤技術開発が大きく進捗した。これは今後の霊長類種や生息域に応じたリスク評価実施およびガイドライン策定に向け、具体性および実現可能性を高めた意義深い成果と言えるであろう。さらに、本研究実施に伴い、本サブテーマメンバーおよび若手スタッフによる感染症研究チームが新たに確立するとともに、社団法人予防衛生協会、国立感染症研究所、大阪大学微生物病研究所、京都大学ウイルス研究所、長崎大学熱帯医学研究所等との共同研究ネットワークが構築され、非常に効率的な研究推進が可能となった。この結果として、マカクザル間の病原体伝播が引き起こしうる重篤な人獣共通感染症の可能性を実証した事は、今後のリスク評価及びその対策立案といった側面も踏まえ、環境行政上非常に意義深い。以上、これらの成果は、霊長類感染症に関する研究拠点形成および若手研究者育成といった長期的ビジョンに立脚した野生霊長類関連環境政策に大きく貢献するものと期待される。

さらに、マカクザル間の病原体伝播が引き起こしうる重篤な人獣共通感染症の検出体制の充実により実態解明が進んだことは、今後の起こりうる感染症のアウトブレイクに即応できる体制が整ったことを意味する。以上、これらの成果は、霊長類感染症に関する研究拠点形成および若手研究者育成といった長期的ビジョンに立脚した野生霊長類関連環境政策に大きく貢献するものと期待される。

6. 国際共同研究等の状況

国際自然保護連合種生存委員会霊長類専門家グループ大型類人猿セクションに代表者の古市が執行委員として参加し、本研究プロジェクトサブテーマ1～3の成果を提供して、**Bonobo (*Pan paniscus*) Conservation Strategy 2012-2022** を作成。2013年1月に出版された。

コンゴ民主共和国では、ボノボの生態情報および分析用試料の収集のため、さまざま研究グループと協力して調査をおこなった。以下に調査地域と協力者(所属)を列挙する。

TL2: John A. Hart, Terese B Hart (Lukuru Wildlife Research Foundation, Kinshasa, Democratic Republic of Congo)

Wamba: Monkengo-mo-Mpenge Ikali, Mbangi N. Mulavwa (Research Center for Ecology and Forestry, Ministry of High Education and Scientific Research, Mabali, Democratic Republic of Congo)

Iyobdji: Monkengo-mo-Mpenge Ikali, Mbangi N. Mulavwa (Research Center for Ecology and Forestry, Ministry of High Education and Scientific Research, Mabali, Democratic Republic of Congo) ; Jef Dupain (African Wildlife Foundation, Kinshasa, Democratic Republic of Congo)

Lomako: Jef Dupain, Amy K. Cobden (African Wildlife Foundation, Kinshasa, Democratic Republic of Congo)

Salonga: Gay E. Reinartz, Patrick Guislain (Bonobo and Congo Biodiversity Initiative, Zoological Society of Milwaukee, Milwaukee, Wisconsin, United States of America)

Lac Tumba: Mbangi N. Mulavwa, Kumugo Yangozene (Research Center for Ecology and Forestry, Ministry of High Education and Scientific Research, Mabali, Democratic Republic of Congo)

Malebo: Serge Darroze, Céline Devos (World Wide Fund for Nature, Kinshasa, Democratic Republic of Congo)

調査出発前に、各調査協力者と連絡を取ってボノボの生息情報を聞き、調査計画を検討した。現地においては調査許可発行省庁との話し合い等事務手続きから実際の野外調査まで助力をいただいた。調査中に現地スタッフに資料のサンプリング方法を詳細に伝え、試料採取に習熟してもらった。したがって複数のパーティーでボノボの痕跡を探ることができ、試料採取の効率が上がった。我々が現地を離れた後も、DNA 試料の拡充、人獣共通感染症感染率の経時的变化を追跡するため、試料採取を継続するよう依頼し、機会がある度に試料とその他ボノボに関する情報をいただいた。なお、上記7地域のうち Salonga については、キンシャサで試料調査方法を調査協力者に詳細に伝えたのち、現地調査を依頼した。これらの研究グループとは現在も緊密な連携を保っており、今後の研究および保護活動においても協力してあたることができる。この連携は、本研究プロジェクトで得られたきわめて大きな資産だといえる。

7. 研究成果の発表状況

(1) 誌上発表

< 論文 (査読あり) >

- 1) Yoshida T, Saito A, Iwasaki Y, Iijima S, Kurosawa T, Katakai Y, Yasutomi Y, Reimann KA, Hayakawa T, Akari H (2010) Characterization of natural killer cells in tamarins: a technical basis for studies of innate immunity. *Frontiers in Microbiology* 1: 128.
- 2) Saito A, Kawamoto Y, Higashino A, Yoshida T, Ikoma T, Suzaki Y, Ami Y, Shioda T, Nakayama EE, Akari H (2012) Allele Frequency of Antiretroviral Host Factor TRIMCyp in Wild-caught Cynomolgus Macaques (*Macaca fascicularis*). *Frontiers in Microbiology* 3: 314.
- 3) Saito A, Kono K, Nomaguchi M, Yasutomi Y, Adachi A, Shioda T, Akari H, Nakayama EE (2012) Geographic, genetic and functional diversity of antiretroviral host factor TRIMCyp in Cynomolgus macaque (*Macaca fascicularis*). *Journal of General Virology*, 93: 594-602.

- 4) Yoshida T, Omatsu T, Saito A, Katakai Y, Iwasaki Y, Iijima S, Kurosawa T, Hamano M, Nakamura S, Takasaki T, Yasutomi Y, Kurane I, Akari H (2012) CD16 positive natural killer cells play a limited role against primary dengue virus infection in tamarins. Archives of Virology, 157: 363-368.
- 5) Kooriyama T, Okamoto M, Yoshida T, Nishida T, Tsubota T, Saito A, Tomonaga M, Matsuzawa T, Akari H, Nishimura H, Miyabe-Nishiwaki T (2013) Epidemiological study of zoonoses derived from humans in captive chimpanzees. Primates 54: 89-98.
- 6) Yoshida T, Omatsu T, Saito A, Katakai Y, Iwasaki Y, Kurosawa T, Hamano M, Higashino A, Nakamura S, Takasaki T, Yasutomi Y, Kurane I, Akari H (in press) Dynamics of cellular immune responses in the acute phase of dengue virus infection. Archives of Virology. DOI: 10.1007/s00705-013-1618-6.

<その他誌上発表（査読なし）>

特に記載すべき事項はない。

(2) 口頭発表（学会等）

- 1) Akari H (2010.8) Novel non-human primate models for hepatitis C and AIDS, 2010 KALAS international symposium, Korea.
- 2) Kooriyama T, Okamoto M, Nishida T, Nishimura H, Miyabe T (2010.9) Serological survey of human pathogens in captive chimpanzees at the Japanese Primate Reserch Center. The 23rd Congress of International Primatological Society, Kyoto.
- 3) Suzuki J, Yamamoto H, Ishida T, Li T-C, Takeda N (2010.9) Health management of macaque outdoor colonies with focus on hepatitis E infection. The 23rd Congress of International Primatological Society, Kyoto.
- 4) Akari H (2010.10) A novel monkey-tropic HIV-1: toward the development of a new non-human primate model, 11th Kumamoto AIDS seminar, Kumamoto.
- 5) 吉田友教、岡本宗裕、明里宏文、今井啓雄、松井淳、早川敏之、生駒智子、伯川美穂、齊藤波子、渡邊朗野、兼子明久、宮部貴子、鈴木樹理、平井啓久 (2011.5) 京大霊長研に見られたニホンザル血小板減少症（4）：疫学調査。第58回日本実験動物学会総会、東京
- 6) 明里宏文、鈴木樹理、岡本宗裕、宮部貴子、渡邊朗野、兼子明久、熊崎清則、阿部政光、鎌中慶朗、前田典彦、森本真弓、渡邊祥平、須田直子、平井啓久、松沢哲郎 (2011.5) 京大霊長研に見られたニホンザル血小板減少症（1）：概要報告。第58回日本実験動物学会総会、東京
- 7) Yoshida T, Okamoto M, Akari H, Suzuki J, Miyabe-Nishiwaki T, Hayakawa T, Imai H, Matsui A, Watanebe A, Kaneko A, Hirai H (2011.9) Simian retrovirus-4-associated infectious thrombocytopenia in Japanese macaques. The Unlimited World Microbes International Union of Microbiological Societies 2011 Congress XV International Congress of Virology. Sapporo.
- 8) 明里宏文、鈴木樹理、岡本宗裕、宮部貴子、渡邊朗野、兼子明久、阿部政光、釜中慶朗、

- 前田典彦、森本真弓、渡邊祥平、須田直子、平井啓久、松沢哲郎 (2011.9) ニホンザル血小板減少症の発生に関する経過概要. 第152回日本獣医学会学術集会、大阪
- 9) 明里宏文 (2011.10) 霊長類モデル動物を用いたウイルス感染症研究. 東京医科歯科大学・難治疾患共同研究拠点研究集会、東京
- 10) 吉田友教 (2012.2) ニホンザル血小板減少症における病理組織解析. 第1回 ニホンザル血小板減少症シンポジウム、京都
- 11) 岡本宗裕 (2012.5) 実験動物感染症の現状:ニホンザル血小板減少症. 第59回日本実験動物学会・第46回日本実験動物技術者協会総会、別府
- 12) 吉田友教、宮部貴子、郡山尚紀、竹元博幸、生駒智子、渡邊朗野、兼子明久、渡邊祥平、齊藤暁、早川敏之、鈴木樹理、岡本宗裕、松沢哲郎、古市剛史、明里宏文 (2012.5) 大型類人猿における人獣共通感染症の抗体スクリーニング方法の開発. 第59回日本実験動物学会、別府
- 13) 吉田友教、竹元博幸、佐藤英次、坂巻哲也、宮部貴子、生駒智子、渡邊朗野、兼子明久、渡邊祥平、早川敏之、鈴木樹理、岡本宗裕、松沢哲郎、明里宏文、古市剛史 (2012.5) アフリカ野生大型類人猿におけるIgA抗体スクリーニングによる人獣共通感染症の実態調査. 第59回日本実験動物学会、別府
- 14) 吉田友教、宮部貴子、郡山尚紀、竹元博幸、生駒智子、渡邊朗野、兼子明久、渡邊祥平、齊藤暁、早川敏之、鈴木樹理、岡本宗裕、松沢哲郎、古市剛史、明里宏文 (2012.7) 大型類人猿における糞便サンプルを用いた人獣共通感染症の抗体スクリーニング方法の開発. 第28回日本霊長類学会、名古屋
- 15) Yoshida T, Takemoto H, Sato E, Sakamaki T, Miyabe-Nishiwaki T, Ikoma T, Watanabe A, Kaneko A, Watanabe S, Hayakawa T, Suzuki J, Okamoto M, Matsuzawa T, Akari H, Furuichi T (2012.8) Epidemiological study of zoonotic pathogens by screening of IgA antibodies in wild great apes in Africa. The 24th Congress of International Primatological Society, Cancun, Mexico.

(3) 出願特許

特に記載すべき事項はない。

(4) シンポジウム、セミナー等の開催（主催のもの）

- 1) シンポジウム：霊長類モデル動物を用いたウイルス感染症研究（主催） 東京医科歯科大学・難治疾患共同研究拠点 研究集会（東京）平成23年10月7日

(5) マスコミ等への公表・報道等

- 1) 「Japanese monkey deaths puzzle」 (Nature 英語版、2010年7月15日 vol 466)
- 2) 「ニホンザルで謎の出血症」 (Nature 日本語版、2010年7月15日 vol 466)
- 3) 「京大霊長類研サル50頭ウイルス死：ヒトに病気起こさず」 (朝日新聞電子版、2010年11月11日)
- 4) 「京大ニホンザル大量死 原因を特定」 (産経新聞電子版、2010年11月11日)

- 5) 「ニホンザル大量死、別種からウイルス感染 京大霊長類研究所」(中日新聞電子版、2010年11月11日)
- 6) 「ニホンザル謎の大量死 ウイルス所内感染か」(京都新聞電子版、2010年11月11日)

(6) その他

明里宏文 Early Investigator Award 受賞 (29th Annual Symposium on Nonhuman Primate Models for AIDS, Seattle, USA, Oct. 2011)

8. 引用文献

- 1) Boesch C (2008) Why do chimpanzees die in the forest? The challenges of understanding and controlling for wild ape health. *American Journal of primatology* 70, 722-726.
- 2) Zao CL, Armstrong K, Tomanek L, Cooke A, Berger R, Estep JS, Marx PA, Trask JS, Smith DG, Yee JL, Lerche NW (2010) The complete genome and genetic characteristics of SRV-4 isolated from cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). *Virology* 405, 390-396.

(3) 孤立個体群の現状分析と生息地の維持・回復のための生態学的・社会学的研究

京都大学 野生動物研究センター

伊谷原一
松沢哲郎
幸島司郎
村山美穂
杉浦秀樹
中村美知夫
風張（長谷川）喜子

平成 22 年～24 年度累計予算額：37,571 千円

（うち、平成 24 年度予算額：11,571 千円）

予算額は、間接経費を含む。

[要旨]

霊長類の多くの種において、活発な人間活動による個体群の孤立が起こっている。孤立した小さな個体群は、さまざまな要因によって個体数が変動しやすく、絶滅のリスクが大きい。したがって、霊長類の保全においては、孤立個体群の保全が重要課題と言える。大型類人猿では、効果的な種の保全のためにプライオリティ・ポピュレーション(保全対策の優先的対象個体群)の選定が喫緊の課題とされているが、地域個体群に関する情報が集約されておらず、学術的根拠に基づいた選定が困難な状況が続いている。一方で、国内では孤立したニホンザル個体群がいくつも存在している。これらの多くは、客観的な存続可能性の検討が行われずに保全上の位置づけがなされ、また、農作物被害を軽減するための捕獲対象にもなっている。そこで、本サブテーマでは、大型類人猿とニホンザルの孤立個体群について、存続可能性の検討に必要な情報を収集し、データベースを構築した。また、大型類人猿のプライオリティ・ポピュレーションの選定・保全政策の立案・実証的研究の開始に向けて、予備的に個体群の存続可能性を分析した。今後、個体群の存続をおびやかす要因を考慮して存続可能性を再評価することで、具体的な保全政策の立案に結び付けることができる。さらに多くの個体群について分析が進めば、客観的な評価に基づいてプライオリティ・ポピュレーションを選定できる。ニホンザルについては、環境収容力の小さな島嶼個体群と本土の個体群における、個体群の縮小と回復の遺伝的影響を検討した。また、個体群動態パラメータの推定に使用したデータの年数や精度によって、存続可能性の評価(個体数変動の予測)の正確性がどのように異なるか検討した。これらの成果は、存続可能性を考慮したニホンザルの保全管理対策を考える際に、有用な参考情報として利用できる。

[キーワード]

大型類人猿、ニホンザル、孤立個体群、データベース、存続可能性分析

1. はじめに

霊長類の多くの種において、活発な人間活動による個体群の孤立が起こっている^{1),2),3)}。孤立し

た小さな個体群は、近交弱勢、遺伝的多様性の消失、人口学的確率性、環境変動、カストロフなどによって個体数が減少しやすく、絶滅のリスクが大きい⁴⁾。したがって、霊長類の保全においては、孤立個体群の保全が重要課題と言える。

全ての種が絶滅危惧種となっている大型類人猿では、ほとんどの個体群が孤立しており、効果的な種の保全のためには優先的に保全対策を実施するプライオリティ・ポピュレーションの選定が急務である²⁾。プライオリティ・ポピュレーションを選定するには、各地域個体群の存続可能性と保全対策を実施した場合に見込まれる効果を検証する必要がある。しかし、地域個体群に関する情報が集約されていないため、学術的根拠に基づいたプライオリティ・ポピュレーションの選定が困難な状況が続いている。一方で、国内に目を向けると、日本の固有種であるニホンザルにおいても孤立した地域個体群がいくつも存在している。現在は分布、個体数ともに拡大中だという理由で、客観的な存続可能性の検討が行われずに保全上の位置づけがなされている（下北半島の個体群など⁵⁾）。また、これらの多くは、農作物被害を軽減するための有害駆除の対象となっており^{6),7),8)}、実際の効果とは無関係に、毎年、多くの個体を取り除かれている地域もみられる⁹⁾。このような行為が個体群の存続に及ぼす影響を危惧する声はあるものの¹⁰⁾、その影響は未だ検証されていない。

2. 研究開発目的

本サブテーマでは、大型類人猿とニホンザルの孤立した地域個体群について、存続可能性の検討に必要な情報を収集し、データベースを構築することを目的とした。また、大型類人猿のプライオリティ・ポピュレーションの選定・保全政策の立案・実証的研究の開始に向けて、各個体群の存続可能性を分析する。ニホンザルについては、有害駆除・個体数調整の影響を含め、個体群の存続可能性を正確に分析した上で保全管理が行われる必要がある。その助けとなるような情報を提供する。以下に、それぞれについての具体的な内容を記す。

(1) データベースの構築

大型類人猿とニホンザルの孤立した地域個体群について、生息地に関する基礎的な事項(地形・気候・植物相など)や個体群動態、個体群存続を脅かす要因などの情報を収集し、データベースを構築する。

(2) 個体群の縮小と回復による遺伝的影響の検討（ニホンザル）

遺伝的多様性は、集団の存続に影響を及ぼす重要な要因の一つだと考えられている¹¹⁾。近年、ニホンザルは人間活動によって多くの個体群が縮小と回復を経験した。島嶼や半島の孤立個体群も例外ではない。急激な有効集団サイズの縮小は、ボトルネック効果と呼ばれる極端な遺伝的浮動によって遺伝的多様性を低下させるが¹¹⁾、個体群が速やかに回復する場合、突然変異によってボトルネック効果が緩和され、遺伝的多様性は比較的回復しやすいと考えられている^{12),13),14),15)}。ただし、島嶼や半島などの環境収容力が小さい孤立個体群では、たとえ有効集団サイズが回復したとしても、突然変異が蓄積するほどの大きさでないために、ボトルネック効果の緩和はほとんど期待できず、遺伝的多様性の回復は著しく抑制されると考えられる。

宮城県石巻市金華山島の個体群は、戦中から戦後にかけて大幅な縮小を経験し、その後回復した¹⁶⁾ (図1)。ただし、環境収容力のために300個体を超えて増加したことはない(図2)。本

土側の個体群も、深刻な個体群の縮小を経験しているが¹⁾(図1、2)、現在は個体群を拡大中である(図2)。同様の経験を持つニホンザル個体群のモデルとしてこれらの個体群に着目し、個体群の縮小と回復による遺伝的影響を検討する。

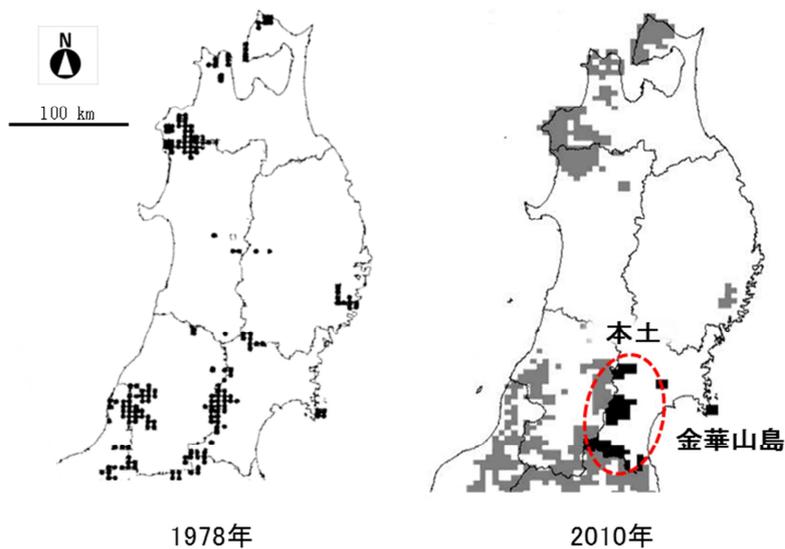


図1 東北地方におけるニホンザルの生息域の変遷と金華山島および本土個体群。
(参考文献 17),18) を改変)

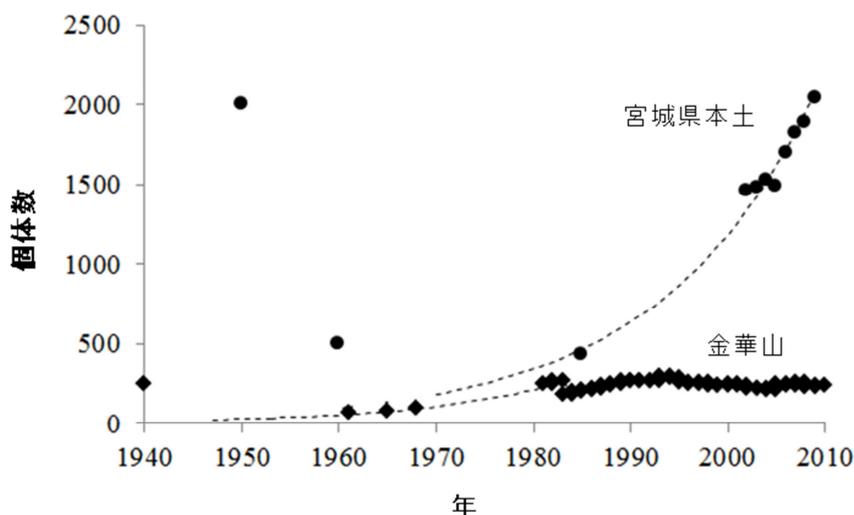


図2 金華山島および宮城県本土個体群における個体数変動

●：実測値（参考文献 19),20),21),22),23)より） ◆：実測値（参考文献 24),25),26)より） ---：推定値

(3) 調査年数と個体数シミュレーションの正確性に関する検討（ニホンザル）

存続可能性分析では、個体群に関する複数の動態パラメータから将来の個体数をシミュレーションする。一般に、妥当な予測を得るには6年以上の調査によって動態パラメータを推定する必要があるとされている²⁷⁾。しかし、ニホンザルにおいて、6年以上個体群動態が調べられている

個体群は多くない。保全管理の現場では、とくに農作物への依存が強い個体群に関しては、2～3年の調査でも十分に妥当な予測が得られるとの意見もあるようだ。そこで、数十年にわたって個体群動態が把握されている青森県下北半島のデータを利用して、調査の年数によってシミュレーションの正確性がどの程度異なるのか検証する。これらの結果から、妥当な予測を得るために必要な調査の年数を検討する。

(4) 個体群の存続可能性分析 (大型類人猿)

データベースに集約した情報から、個体群動態パラメータを推定できた大型類人猿の個体群について、存続可能性を評価する。

3. 研究開発方法

(1) データベースの構築

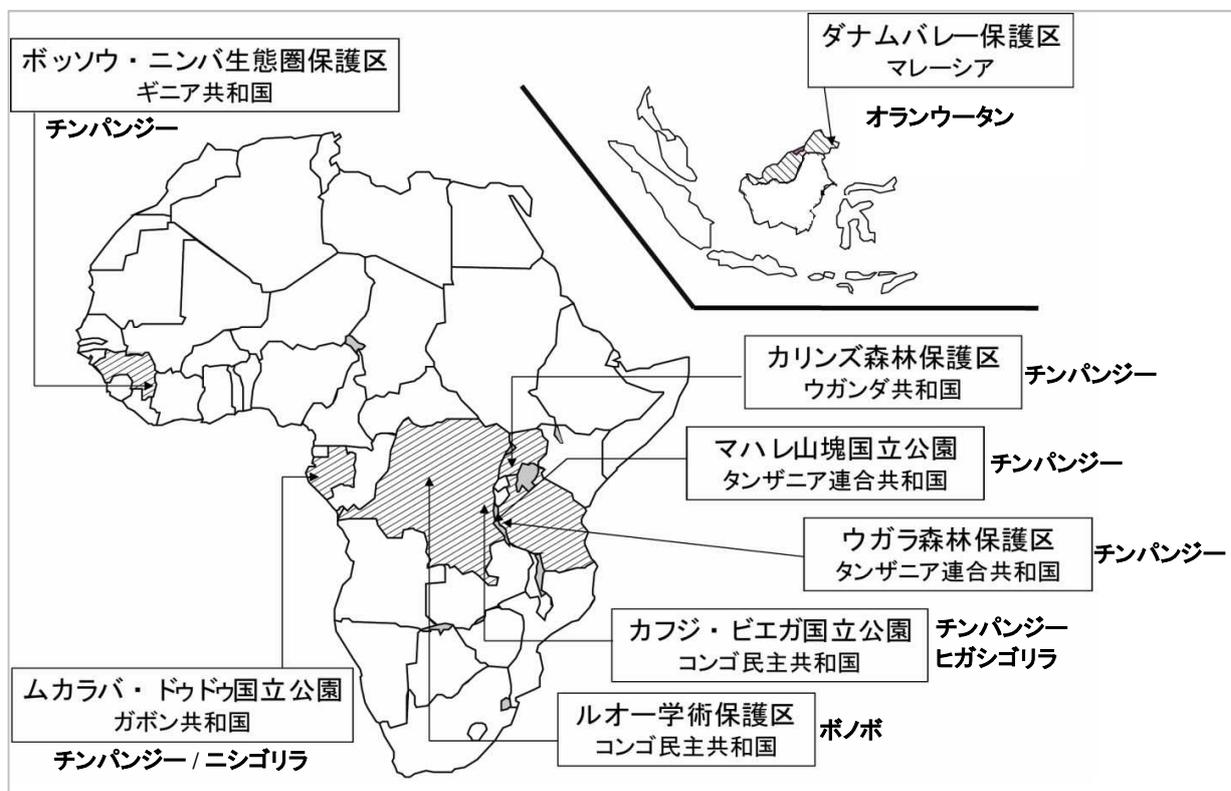


図3 大型類人猿の対象種・地域個体群 (参考文献³⁾を改変)

大型類人猿については、ボソウ・ニンバ生態圏保護区 (ギニア共和国、以下ボソウ)、カリンズ森林保護区 (ウガンダ共和国、以下カリンズ)、マハレ山塊国立公園・ウガラ森林保護区 (タンザニア連合共和国、以下それぞれマハレ、ウガラ)、カフジ・ビエガ国立公園 (コンゴ民主共和国、以下カフジ)、ムカラバ・ドゥドゥ国立公園 (ガボン共和国、以下ムカラバ) のチンパンジー、ルオー学術保護区 (コンゴ民主共和国、以下ルオー) のボノボ、カフジのヒガシゴリラ、ムカラバのニシゴリラ、ダナムバレー保護区 (マレーシア、以下ダナムバレー) のオランウータ

ンを情報収集の対象とした（図3）。また、ガーナ共和国にもチンパンジーが生息している可能性があるため、生息状況の調査対象とした。ニホンザルに関しては、下北半島・津軽半島(青森県)、金華山島(宮城県)、淡路島(兵庫県)、小豆島(香川県)、幸島(宮崎県)、屋久島(鹿児島県)を対象とした（図4）。



図4 ニホンザルの分布と対象地域個体群（参考文献¹⁸⁾に加筆）

収集する情報の種類は、生息地に関する基礎的な情報(気候、地形、植生)、個体群の存続に影響を及ぼす人間活動を含めた個体群動態に関連する情報を、既存の文献から該当する記述を抽出、整理しデータベースに掲載した。ボソウとマハレ、ウガラのチンパンジー、ダナムバレーのオランウータン、金華山島と屋久島のニホンザルについては、現地調査によっても情報収集を行った。

(2) 個体群の縮小と回復による遺伝的影響の検討 (ニホンザル)

金華山島および宮城県本土側の個体群 (それぞれ約 40 個体) から得られたマイクロサテライト 8 領域 (D1s548, D3s1768, D6s493, D7s821, D14s306, D17s1290, D19s582, D20s484) を利用した。まず、ソフトウェア STRUCTURE によるアサインメントテストとソフトウェア GenAlEx による AMOVA によって、個体群間の遺伝的構造を分析した。次に、両個体群の遺伝的多様性 (領域ごとのアリル数・アレリックリッチネス・遺伝子多様度) を定量化した。また、ボトルネック効果の初期段階では、アリル数から予測されるヘテロ接合体よりも遺伝子多様度が高くなる (ヘテロ接合体過剰)^{28),29)}。逆に、急激に拡大中の個体群ではその逆の現象 (ヘテロ接合体過少) が起こることが知られている^{28),29)}。本研究では、2 通りの突然変異の起こり方 (IAM および SMM) を仮定し、ソフトウェア BOTTLENECK を用いて、個体群ごとにヘテロ接合体過剰・過少を検証した。最後に、遺伝的浮動の強さは有効集団サイズに依存するので、個体群がこれまでに受けた遺伝的浮動の強さの指標として、有効集団サイズを推定した。本研究では、実際の個体数から、個体数激減の直前・直後、現在および個体群縮小以降の個体数変動を反映した長期的な有効集団サイズを推定した。また、マイクロサテライトのデータより遺伝的な有効集団サイズ (現在の遺伝的多様性に寄与する個体数) を推定した。各時期の有効集団サイズは個体数の 3 分の一³⁰⁾、長期的な有効集団サイズは各時期の有効集団サイズの調和平均とした³¹⁾。遺伝的な有効集団サイズの推定には、ソフトウェア ONeSAMP を使用した。

(3) 調査年数と個体数シミュレーションの正確性に関する検討 (ニホンザル)

下北の個体群では、現在までの約 30 年間、一部の群れについて個体識別に基づく調査およびセンサス調査が行われている。個体ベースおよび長期センサスのデータ (1986 から個体数調整開始以前の 2003 年) について動態パラメータを推定し、群れのメスの個体数をシミュレーションした。さらに、長期センサスのデータから連続した 2~6 年のデータセットを作り、データセットごとに推定した動態パラメータをもとに、群れのメスの個体数をシミュレーションした。

個体数変動のシミュレーションには段階構造モデルを使用した。生存曲線と調査における年齢査定精度に応じて生活史を数段階に分け (個体ベース: 0 歳・1-4 歳・5-19 歳・20-23 歳・24 歳以上; センサス: 0 歳・1 歳以上)、調査年ごとに各段階に加入・残留する率、各段階でメスの仔を出産する率を求めた。データセットごとに、これらの平均値±SD の範囲で各パラメータをランダムに変動させ、1986 年から 2003 年までの 17 年間の個体数変動を 100 回ずつシミュレーションした。個体数の初期値は 1986 年の実際の個体数とし、環境収容力や密度効果は考慮しなかった。

シミュレーションの正確性は、シミュレーション平均値が実際の個体数から逸脱している割合 (逸脱割合) によって評価した。2~6 年間のデータセットについては、データの年数と逸脱割合との関係を検証した。シミュレーションの正確性は調査精度の影響も受けると考えられるので、正確なカウントが出来なかった調査の数を考慮した。

(4) 個体群の存続可能性分析 (大型類人猿)

ルオーのボノボ個体群について、存続可能性の予備的な分析を行った。ボノボの個体群は、1990~2000 年代の社会混乱期の大規模な密猟や環境破壊によって著しく縮小した^{32),33)}。長期データ

が蓄積されている群れでも、2000年代半ばまでに17個体まで個体数が減少した³⁴⁾。この群れでは、現在は社会混乱以前の個体数レベルにまで回復している³⁴⁾。そこで、本分析では、大規模密猟の影響を除いたボノボの自然な動態パラメータ（年齢別生存率・出生性比・繁殖開始年齢・年間の出産率）を推定した。これをもとに、大規模密猟以前の群れの個体数をシミュレーションし、パラメータの妥当性を確認した。次に、この動態パラメータを個体群全体にも適用できると仮定して、今後50年間の個体群全体の変動をシミュレーションした（繰り返し数=100回）。現在の個体数・環境収容力、生存・繁殖における密度効果については既存文献に基づいて決定した。シミュレーションにはソフトウェア VORTEX を用いた。

4. 結果及び考察

(1) データベースの構築

対象とした個体群のすべてにおいて、データベースを構築し公開できた（<http://www.wrc.kyoto-u.ac.jp/PIP/index.html>：図5、6）。長期研究が行われているチンパンジーの個体群（カリンズ・ボツソウ・マハレ）とボノボの個体群（ルオー）、ニホンザルの個体群（下北半島、金華山島、幸島）については、存続可能性分析に必要な動態パラメータに関する情報（表1、図7）を掲載できた。また、サブテーマ1によって、初めて明らかになった野生のボノボの遺伝的空間構造についてもデータベースに加えることができた。しかし、詳細な情報が欠如している個体群も多かった。効率的な保全管理のためには、現地調査によって存続可能性評価に耐えうるだけの情報の収集、蓄積が緊急の課題と言える。

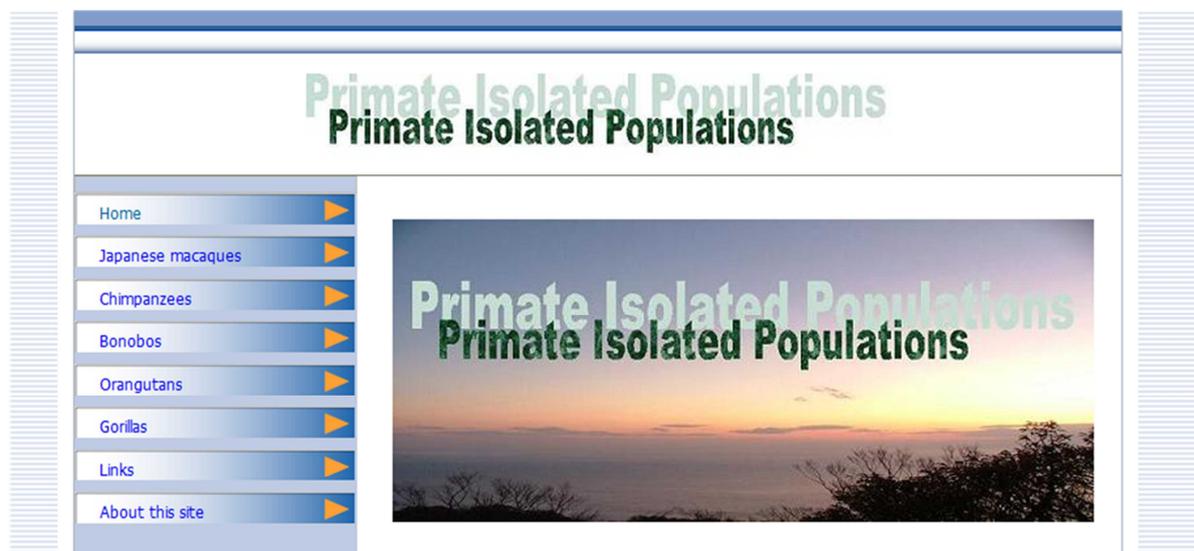


図5 構築したデータベースのウェブサイトのトップページ

Primate Isolated Populations

Primate Isolated Populations

- Home ▶
- Japanese macaques ▶
- Chimpanzees ▶
- Bonobos ▶
- Orangutans ▶
- Gorillas ▶
- Links ▶
- About this site ▶

Mahale Mountain National Park (Summary)

Population Information

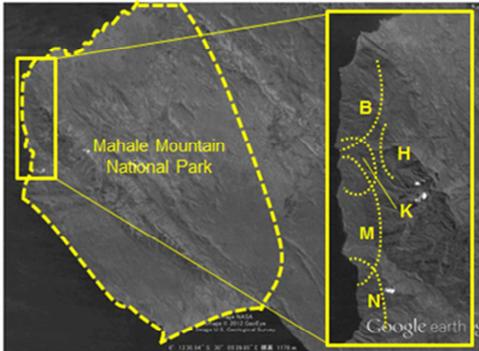
		Source
Long-term study period	1965-present	[62]
The park area (km ²)	1613	[63]
Population density (individuals/Km ²)	0.41-0.44	[63]
Provisioning Period	1965-1986	
	Coordinated or personal	[64]
Part or whole of the population	Coordinated	
	Part	
Conservation	1975 - present	[64]

Source:

[62] Itani J. (2002) Preface. In: Nishida T., Uehara S. & Kawanaka K. (ed.) The Mahale Chimpanzees: Thirty-seven Years of <Pantropology>. Kyoto University Press, Kyoto (in Japanese)

[63] Idani G. (2009) Research on distribution and density of grape apes. In: Final Report: Search for measures to prevent the extinction of the great apes based on natural and social sciences, Global Environment Research Fund 2006-2008, Ministry of Environment, Tokyo. pp. 1-13 (in Japanese)

[64] Nishida T. (2002) The short history of research in Mahale. In: Nishida T., Uehara S. & Kawanaka K. (ed.) The Mahale Chimpanzees: Thirty-seven Years of <Pantropology>. Kyoto University Press, Kyoto (in Japanese)



Distribution of unit groups in 1975, drawn from source [67]

[67] Norikoshi K. (2002) Vegetation and ranging pattern in Kasoge region: changes during twenty years around establishment of national park. In: Nishida T., Uehara S. & Kawanaka K. (ed.) The Mahale Chimpanzees: Thirty-seven Years of <Pantropology>. Kyoto University Press, Kyoto

Distribution of unit groups in Kasoge
Specific Data

[Demographic change \(csv\)](#), [Life Table \(csv\)](#), [Causes of mortality \(csv\)](#), [Female reproductive parameter\(csv\)](#)

[Back to Chimpanzees](#)

図6 収集した情報の公開例
(マハレのチンパンジー個体群についてのページの一部)

表 1 存続可能性分析に向けて情報収集した項目

繁殖パラメータ	<ul style="list-style-type: none"> 繁殖における環境変動 繁殖開始齢 繁殖可能な最高齢 1回の最大産子数 出生個体の性比 密度依存繁殖
繁殖率	<ul style="list-style-type: none"> 繁殖可能なメスの割合 繁殖可能なメスの割合の変動
年齢別死亡率	
捕獲	<ul style="list-style-type: none"> 捕獲個体数 捕獲個体の性・年齢
カタストロフ	<ul style="list-style-type: none"> 生起頻度 繁殖率・生存率の低下
環境収容力	

Cohort life table for M group chimpanzees during 19 years (1980-1999)

x	Nx^{*1}	dx^{*2}	cx^{*3}	qx^{*4}	lx^{*5}
0	152	53	0	0.34868	1.00000
1	99	24	8	0.25263	0.65132
2	67	9	1	0.13534	0.48678
3	57	7	3	0.12613	0.42090
4	47	1	2	0.02174	0.36781
5	44	3	0	0.06818	0.35981
6-10	178	7	11	0.04058	0.34521
11-15	79	3	9	0.04027	0.32940
16-20	38	1	4	0.02941	0.31614
21-25	20	1	1	0.05128	0.30684
26-30	11	0	2	0	0.29111

*1 The total number of individuals included in the specific age interval, from age x to age x+1

*2 The total number of individuals that died between specific age intervals

*3 The total number of individuals that emigrated from the group between specific age intervals

*4 Annual mortality rate between specific age interval, calculated from the equation $dx(Nx-cx/2)$

*5 Survival rate between birth and specific age x

Source:

[67] Nishida T., Corp N., Hamaib M., Hasegawa T., Hiraiwa-Hasegawa M., Hosaka K., Hunt K.D., Itoh N., Kawanaka K., Matsumoto-Oda A., Mitani J.C., Nakamura M., Norikoshi K., Sakamaki T., Turner L., Uehara S., Zamma K. (2003) Demography, female life history, and reproductive profiles among the chimpanzees of Mahale. Am. J. Primatol. 59: 99-121

図 7 収集した情報の公開例

(マハレのチンパンジー個体群の生命表)

(2) 個体群の縮小と回復による遺伝的影響の検討（ニホンザル）

STRUCTURE による分析および AMOVA の結果から、金華山島と宮城県本土の個体群は、遺伝的に異なる集団であり（図 8）、分化の程度が大きいことが明らかになった。遺伝的多様性については、アレル数、アレリックリッチネス、遺伝子多様度の全てで、金華山島個体群は本土個体群よりも有意に小さい値を示した。

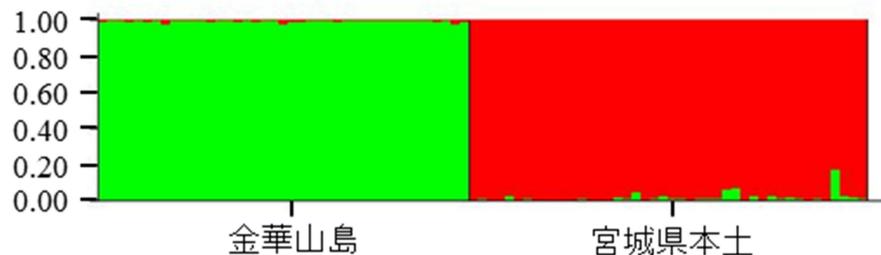


図 8 STRUCTURE による分析結果
（横軸は個体を、縦軸は各個体群に属する確率を示す）

また、金華山島個体群では、仮定した 2 つの突然変異のモデルで、近年の個体群縮小によるヘテロ接合体過剰が見られた。金華山島の個体群ではボトルネック効果の痕跡が強く残っていると見える。宮城県本土の個体群では、一方のモデル（IAM）ではヘテロ接合体過少の傾向が、他方（SMM）ではヘテロ接合体過剰の傾向が見られた。

最後に、両個体群とも、個体群縮小時の有効集団サイズの縮小の程度はかなり大きかったが（約 90%）、現在は縮小前のレベルに回復していた。長期間平均の有効集団サイズと遺伝的な有効集団サイズはほぼ一致していた。したがって、各個体群の現在の遺伝的な有効集団サイズ（遺伝的多様性に寄与する個体数）は、個体群縮小後の個体数変動を反映していると言える。これらの有効集団サイズは、個体群縮小前や現在の有効集団サイズより小さかった。このことは、どちらの個体群にも急激な縮小による強い遺伝的浮動がかかり、現在もその影響から完全には回復していないことを示唆している。また、どの時点においても、金華山島の個体群の有効集団サイズは本土側個体群より非常に小さかった。これは、金華山島個体群は一貫してより強い遺伝的浮動の影響を受けていることを示している。

宮城県本土の個体群は、現在でも高い個体群増加率を示す一方で、金華山島の個体群は、小さな環境収容力のために数十年前から個体群の拡大が見られない（図 2）。今回の分析結果から、宮城県本土の個体群では、個体群の回復による突然変異がボトルネック効果を緩和した可能性がある。それに対して、金華山島の個体群では、有効集団サイズは完全に回復したものの環境収容力のために非常に小さく、突然変異によるボトルネック効果はなかったと考えられる。ヘテロ接合体過剰・過少の検証結果が個体群間で異なっていたのも、このためだと考えられる。先行研究によるミトコンドリア DNA の多型解析³⁶⁾と海峡形成の歴史³⁷⁾から、金華山島の個体群は金華山島ができた約 5,000 年前から孤立している可能性がある。金華山島個体群の遺伝的多様性の低さは、地史的スケールでの孤立の影響が大きいことが十分考えられるが、個体群縮小後の遺伝的多様性の回復が抑制されたことと矛盾しない。

ニホンザルは、人間活動の影響を受けて、多くの地域で個体群の縮小を経験した¹⁾。今回の分析結果から、過去に個体群縮小を経験した個体群は、分布や生息数の拡大に関わらず、縮小による遺伝的影響から完全には回復していない可能性が示唆される。とくに、金華山島の例は、島嶼や半島などの環境収容力の小さい孤立個体群では、縮小による遺伝的影響からほとんど回復していない可能性が高いと言える。遺伝的多様性の消失は、絶滅メカニズムの重要な要因とされている¹⁾。このような個体群の保全管理には、より慎重な姿勢が求められるだろう。

(3) 調査年数と個体数シミュレーションの正確性に関する検討（ニホンザル）

個体ベースデータに基づいたシミュレーションでは、実際の変動からの逸脱割合が非常に小さく（6%）、個体数変動をほぼ正確に予測できた（図9）。長期センサスデータに基づいた場合も、逸脱割合はそれほど大きくないが（18%）、個体ベースデータより正確性は低いと言える。2～6年の短期センサスデータに基づいたシミュレーションでは、すべてのデータセットで個体数が増加傾向にあることは正しく評価できた。しかし、個体数の増加の程度はデータセットによって大きく異なっていた。実際の変動からの逸脱割合（シミュレーションの正確性）は、調査年数・調査精度の影響を受けており（図10）、2～3年の調査では、逸脱割合が特に大きい。実際に、個体数が5割近くも過大・過少に予測されるデータセットも見受けられた。このことから、2～3年の調査では妥当な予測が得られない可能性が非常に高いと言える。

これまで、ニホンザルの個体数予測について調査の年数や精度と予測の正確性に関する情報が乏しかった。さらにいくつかの個体群でも同様の検討を行って一般性を高める必要はあるが、本研究によって、個体数予測の正確性についての一応の基準を示すことができた。本研究の結果は、具体的な数値目標（維持する個体数など）を掲げて管理計画を実施する際の存続可能性分析では、特に有用な情報となることが期待される。本研究では、群れの個体数についてのシミュレーションを行ったが、今後、個体群全体の変動を予測するためのデータについても検討を行う予定である。

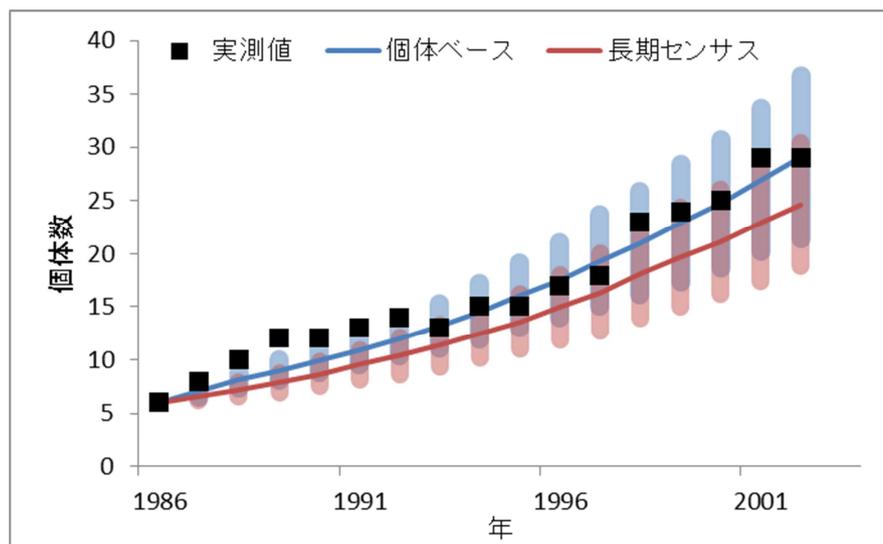


図9 実際の個体数変動と個体ベースおよび長期センサスデータに基づいたシミュレーションの結果。実線：シミュレーション平均値、エラーバー：SD。

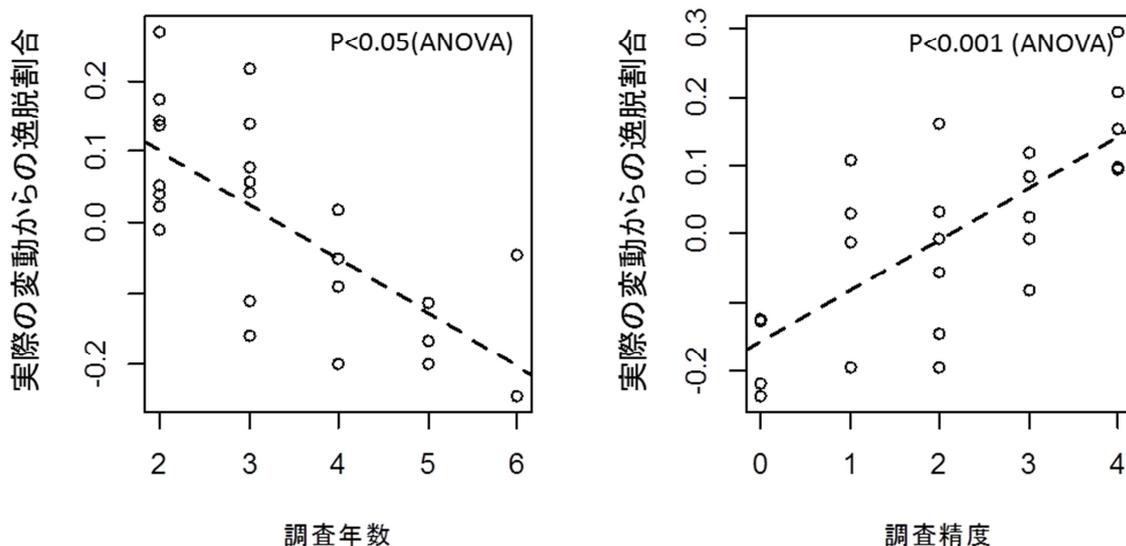


図 10 調査の年数・精度と実際の変動からの逸脱の程度の関係（ pv プロット）。
○：逸脱割合、---：一般化線形モデルによる推定値。

（４）個体群の存続可能性分析（大型類人猿）

予備的ではあるが、ルオーのボノボ個体群について、現状での存続可能性を客観的に評価することができた。大規模密猟の影響を取り除いたボノボの自然な動態パラメータからは、今後 50 年間の絶滅の可能性は著しく低く、個体数の増加も見込めることが示唆された（図 11）。

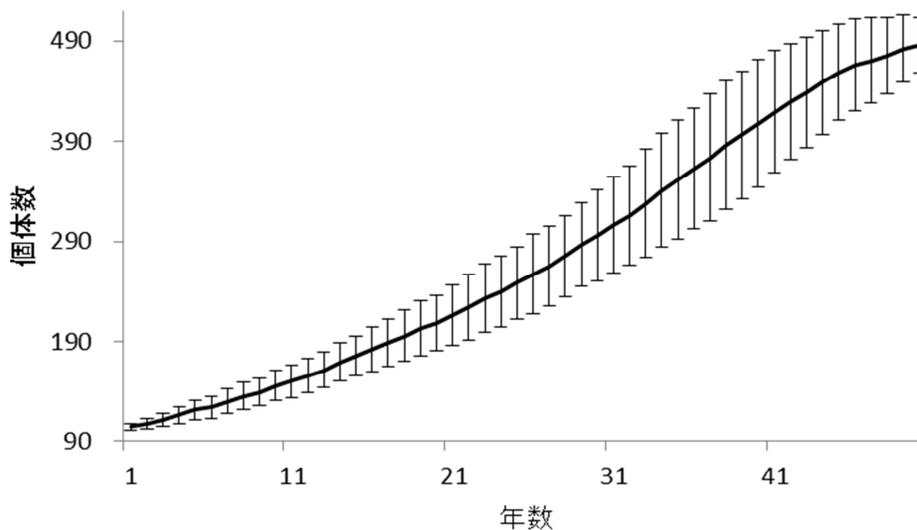


図 11 ルオーのボノボ個体群の今後 50 年間の個体数変動予測。
実線：予測平均値、エラーバー：SD。

ただし、ボノボ個体群の存続を脅かす要因はいくつもある。現在、各地の大型類人猿の個体群において、感染症のアウトブレイクによって多くの個体が死亡している。ルオーの個体群でも、幸いに死亡個体が出なかったもののインフルエンザ様の感染症の流行が記録されている³⁷⁾。人間活動の影響も懸念される。これまでの度重なる戦争の影響で密猟が増加してきた³²⁾。人口増加や農地拡大によって環境収容力が低下する可能性もある。今後は、感染症のアウトブレイクや人間活動の影響を考慮して存続可能性を評価し、具体的な保全政策の立案・実証的研究に結び付けたい。また、長期データの蓄積されているチンパンジーの個体群についても、同様の分析を行う用意が整っている。

5. 本研究により得られた成果

(1) 科学的意義

本サブテーマのひとつめの目的は、類人猿 4 種とニホンザルについて、保護管理政策の立案に必要なさまざまな情報を集約するデータベースを構築し、公開することである。対象としたすべての種に関する情報を整理し、データベース(<http://www.wrc.kyoto-u.ac.jp/PIP/index.html>)を公開することができた。この種のデータ収集には、文献等埋もれたデータの発掘、穴のある部分を埋めるための現地調査等に非常に時間がかかり、まだその入り口に達したに過ぎないが、公開を開始したことで、今後情報集積の速度は大きく上がるものと期待される。とくに、チンパンジーに関しては、ニシ・チュウオウ・ヒガシチンパンジーの 3 亜種、ゴリラに関してはニシ・ヒガシゴリラの 2 亜種のフィールドをカバーしており、個体群動態パラメータやその変動特性に種特異性や亜種間変異が見いだされる可能性もある。

個体群の縮小が、ニホンザル個体群の遺伝的多様性に及ぼす影響についての分析結果については、現在、学術誌への投稿準備を進めている。論文が掲載されれば、ニホンザル個体群の遺伝的多様性、ひいては存続可能性を保証するには、保全管理における慎重な姿勢が求められることを、説得力をもって示すことができる。さらに、この分析結果は、環境収容力の小さな孤立個体群では、ボトルネック効果からの回復が著しく抑制されることを、環境収容力の異なる実際の個体群を用いて実証した数少ない研究例でもある。

また、下北のニホンザル個体群の長期データを用いて、個体数シミュレーションの正確性を調査の年数や精度などの条件ごとに比較・検討した。一般に、個体数シミュレーションの正確性を評価できるほどデータが蓄積されている例はごく少ない。そのため、シミュレーションの正確性を客観的に評価できたことの科学的意義は大きい。

(2) 環境政策への貢献

<行政が既に活用した成果>

特に記載すべき事項はない。

<行政が活用することが見込まれる成果>

大型類人猿のプライオリティ・ポピュレーションの選定・保全政策の立案・実証的研究の開始に向けて、各個体群の存続可能性を分析することは、本サブテーマの大きな目的のひとつであった。カリンズ、ボソウ、マハレのチンパンジー個体群、ルオーのボノボ個体群に関しては、必

要な情報がそろった。ボノボの個体群については、予備的ではあるが存続可能性を分析できた。今後、個体群の存続をおびやかす要因を考慮して存続可能性を再評価することで、具体的な保全政策の立案に結び付けることができる。さらに多くの個体群について分析が進めば、各個体群の存続可能性の客観的な評価に基づいてプライオリティ・ポピュレーションを選定できる。

とくにボノボについては、本プロジェクトの成果を盛り込んだ”Bonobo Conservation Strategy 2012-2013”が 2013 年 1 月に研究代表者の古市が委員として参加する国際自然保護連合から出版され、コンゴ民主共和国の関係各省庁にも配布された。同国環境省および科学研究省は、国際自然保護連合のボノボ保護に関するワークグループにも参加しており、ボノボの保護政策の立案に際しては、この提案書の内容が大いに活用されるものと期待できる。

また、個体群の大幅な縮小を経験したニホンザルの島嶼および本土の個体群について、遺伝的特性を明らかにすることができた。分析できたのは一部の個体群に過ぎないが、同様の歴史を持つ各地の個体群について、遺伝的特性を考慮した保全管理対策を行う際に参考となる情報を提供できた。

さらに、下北のニホンザル個体群の長期データを用いることで、調査の年数や精度と個体数シミュレーションの正確性について一応の基準を示すことができた。分析する個体群を増やし一般性を高める必要はあるが、存続可能性を客観的に評価した上での保全管理を可能にするための、有用な情報となるはずである。



6. 国際共同研究等の状況

国際自然保護連合種生存委員会霊長類専門家グループ大型類人猿セクションに代表者の古市が執行委員として参加し、本研究プロジェクトサブテーマ 1～3 の成果を提供して、Bonobo (*Pan paniscus*) Conservation Strategy 2012-2022 を作成。2013 年 1 月に出版された。

コンゴ民主共和国イオンジ村のローカル NGO の Forest de bonobos、同国科学研究省生態森林研究所、国際 NGO の African Wildlife Foundation との共同プロジェクトとして、イオンジ村南部地域をボノボのための保護区とする活動を展開。2012 年 4 月に、イオンジ・コミュニティ・ボノボ保護区として同国環境省に設立が正式に認可された。

7. 研究成果の発表状況

(1) 誌上発表

<論文(査読あり)>

- 1) Hirata S, Yamamoto S, Takemoto H, Matsuzawa T (2010) A Case Report of Meat and Fruit

- Sharing in a Pair of Wild Bonobos. Pan Africa News, 17: 21-23.
- 2) Adenyo C, Hayano A, Inoue E, Kayang BB, Inoue-Murayama M (2012) Development of microsatellite markers for grasscutter (*Thryonomys swinderianus*, RODENTIA) using next-generation sequencing technology. Conservation Genetics Resources, 4(4): 1011-1014.
 - 3) Kanamori T, Kuze N, Malim TP, Bernard H, Kohshima S (2012) Fatality of a wild Bornean orangutan (*Pongo pygmaeus morio*): behavior and death of a wounded juvenile in Danum Valley, North Borneo, Primates vol 53, Issue 3: 221-226.
 - 4) 吉川翠、小川秀司、小金澤正昭、伊谷原一(2012) タンザニアの乾燥疎開林地帯に生息するチンパンジー(*Pan troglodytes*)の泊まり場選択. 霊長類研究 28: 3-12.
 - 5) Furuichi T, Idani G, Ihobe H, Hashimoto C, Tashiro Y, Sakamaki T, Mulavwa MN, Yangozene K, Kuroda S (2012) Long-term studies on wild bonobos at Wamba, Luo Scirntic Reserve, D. R. Congo: towards the understanding of female life history in a male-philopatric species. In: Kappeler P, Watts D (eds) Long-term field studies of primates. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 413-433.
 - 6) Iida GE, Ogawa H, Idani G (2013) Mammalian fauna of the miombo forest in the Ugalla area, Western Tanzania. African Study Monographs, 33(4): 253-270.
 - 7) Kazahari N, Tsuji Y, Agetsuma N (2013) The relationships between feeding-group size and feeding rate vary from positive to negative with characteristics of food items in wild Japanese macaques (*Macaca fuscata*). Behaviour Vol. 150: 175-197.
 - 8) Kooriyama T, Okamoto M, Yoshida T, Nishida T, Tsubota T, Saito A, Tomonaga M, Matsuzawa T, Akari H, Nishimura H, Miyabe-Nishiwaki T (2013) Epidemiological study of zoonoses derived from humans in captive chimpanzees. Primates 54: 89-98.
 - 9) Ramadan S, Miyake T, Yamaura J, Inoue-Murayama M (in press) DNA polymorphism within LDH-A gene in pigeon (*Columba livia*). The Journal of Poultry Science.

<その他誌上発表(査読なし)>

特に記載すべき事項はない。

(2) 口頭発表(学会等)

- 1) Inoue-Murayama M (2010.6) Plan for the future collaboration between Ghana and Japan. Collaboration for Conservation and Sustainable Utilization of Wildlife Resources, Ghana.
- 2) Adenyo C, Hayano A, Kayang BB, Inoue-Murayama M (2010.9) Genetic analysis of cane rat (*Thryonomys swinderianus*) in Ghana. Special Seminar: Collaboration for Conservation and Sustainable Utilization of Wildlife Resources, Ghana.
- 3) Adenyo C, Hayano A, Kayang BB, Inoue-Murayama M (2010.9) Genetic analysis of cane rat (*Thryonomys swinderianus*) in Ghana. Special Seminar: Conservation and Sustainable Use of Ghanaian Wildlife Resources: Veterinary, Genetic and Ethological

- approach, Ghana.
- 4) Idani G (2010.9) From the bonobos' forest to the chimpanzees' woodland. The 23rd Congress of International Primatological Society, Kyoto.
 - 5) Inoue-Murayama M, Weiss A, Kato K, Morimura N, Tanaka M, Yamagiwa J, Idani G (2010.9) Molecular behavioral research in great apes. The 23rd Congress of International Primatological Society, Kyoto.
 - 6) Kazahari N, Agetsuma N (2010.9) Mechanisms underlying the effect of feeding subgroup size on feeding rate in Japanese macaques (*Macaca fuscata*). The 23rd Congress of International Primatological Society, Kyoto.
 - 7) Sugiura H, Shimooka Y, Tsuji Y (2010.9) Variation in interindividual spacing and behavioral correlates in a group of Japanese macaques. The 23rd Congress of International Primatological Society, Kyoto.
 - 8) Suzumura T, Kanchi F, Sugiura H, Matsuzawa T, Idani G (2010.9) Demographic data of wild Japanese monkeys on Koshima Island: preliminary analysis of the period 1952 - 2009. The 23rd Congress of International Primatological Society, Kyoto.
 - 9) Yoshikawa M, Ogawa H, Koganezawa M, Idani G (2010.9) Habitat selection by chimpanzees (*Pan troglodytes*) in savanna woodland, western Tanzania. The 23rd Congress of International Primatological Society, Kyoto.
 - 10) Idani G (2010.9) Studies and conservation activities of wild bonobos at Wamba in the Luo Scientific Reserve, Democratic Republic of the Congo. Biodiversity, Zoos and Aquariums: The message from animals. The 15th Kyoto University International Symposium, Nagoya.
 - 11) Kanamori T, Kuze N, Bernard H, Malim TP, Kohshima S (2010.9) Feeding ecology of Bornean orangutans (*Pongo pygmaeus morio*) in Danum Valley, Sabah, Malaysia: A 3-year record including two mast fruitings. The 15th Kyoto University International Symposium, Nagoya.
 - 12) Kazahari N, Agetsuma N (2010.9) Mechanisms determining relationship between feeding subgroup size and foraging success in food patch use by Japanese macaques (*Macaca fuscata*). The 15th Kyoto University International Symposium, Nagoya.
 - 13) 鈴木崇文、冠地富士男、杉浦秀樹、松沢哲郎、伊谷原一 (2010.11) 幸島野生ニホンザルにおける58年間の人口統計学的解析、第13回SAGAシンポジウム、横浜
 - 14) 鶴殿俊史、谷川和也、鈴木幸一、石井則久、藤澤道子、伊谷原一 (2010.11) チンパンジーに見られたハンセン病の1例、第13回SAGAシンポジウム、横浜
 - 15) 吉川翠、小川秀司、Mapinduzi Mbalamwezi、小金澤正昭、伊谷原一 (2010.11) リランシンバの北20kmのトゥピラで発見されたチンパンジー (*Pan troglodytes*) のベッド、第13回SAGAシンポジウム、横浜
 - 16) 吉川翠、小川秀司、Mapinduzi Mbalamwezi、小金澤正昭、伊谷原一 (2010.11) 乾燥疎開林におけるチンパンジーのベッドの崩壊速度、日本動物行動学会第29回沖縄大会、那覇
 - 17) 落合 - 大平知美、伊谷原一、佐藤義明、打越万喜子、松沢哲郎 (2010.12) NBRP「GAIN

- (大型類人猿情報ネットワーク)」：チンパンジー・ゴリラ・オランウータンのデータベースの拡充、第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会合同大会、神戸
- 18) 風張喜子、辻大和、揚妻直樹 (2011.3) ニホンザルにおける採食グループサイズと採食成功の関係、第58回日本生態学会、札幌
- 19) 杉浦秀樹 (2011.3) 屋久島におけるニホンザル行動域の長期的な移動、第58回日本生態学会、札幌
- 20) 鈴木真理子、杉浦秀樹 (2011.3) 森林の視界環境がニホンザルの他個体モニタリング行動に与える影響、第58回日本生態学会、札幌
- 21) 明里宏文、鈴木樹理、岡本宗裕、宮部貴子、渡邊朗野、兼子明久、熊崎清則、阿部政光、鎌中慶朗、前田典彦、森本真弓、渡邊祥平、須田直子、平井啓久、松沢哲郎 (2011.5) 京大霊長研に見られたニホンザル血小板減少症 (1) : 概要報告. 第58回日本実験動物学会総会、東京
- 22) 井上英治、中川尚史、風張喜子、井上-村山美穂 (2011.7) メスは遺伝的に異なるオスと繁殖しているか. 第27回日本霊長類学会大会、犬山
- 23) 金森朝子、久世濃子、山崎彩夏、Bernard H, Malim PH, 幸島司郎 (2011.7) ボルネオ島ダナムバレー森林保護地域における野生オランウータンの個体群密度と果実生産量 -3回の一斉結実を含む5年間の季節変化 - ポスター発表. 第27回日本霊長類学会大会、犬山
- 24) 風張喜子、井上英治、川本芳、中川尚史、井上-村山美穂 (2011.7) 金華山のニホンザルの遺伝的多様性. 第27回日本霊長類学会大会、犬山
- 25) 久世濃子、金森朝子、山崎彩夏、Henry Bernard, Titol Peter Malim, 幸島司郎 (2011.7) ボルネオ島ダナムバレー森林保護区において5年間に観察されたオトナ雄の移出入. 第27回日本霊長類学会大会、犬山
- 26) 中川尚史、井上英治、風張喜子、井上-村山美穂 (2011.7) 金華山のニホンザルオスの繁殖成功. 第27回日本霊長類学会大会、犬山
- 27) 中村美知夫、ナディア・コープ、藤本麻里子、藤田志歩、花村俊吉、早木仁成、保坂和彦、マイケル・A・ハフマン、稲葉あぐみ、井上英治、伊藤詞子、川中健二、沓掛展之、清野 (布施) 未恵子、郡山尚紀、リンダ・F・マーシャント、松本晶子、松阪崇久、ウィリアム・C・マックグルー、ジョン・C・ミタニ、西江仁徳、乗越皓司、坂巻哲也、島田将喜、リンダ・A・ターナー、上原重男、ジェームズ・V・ワキバラ、座馬耕一郎、西田利貞 (2011.7) マハレのチンパンジーの遊動域—16年間のデータから. 第27回日本霊長類学会大会、犬山
- 28) 吉川翠、小川秀司、小金澤正昭、伊谷原一 (2011.7) 疎開林に棲息するチンパンジーの泊まり場の植生と地形. 第27回日本霊長類学会大会、犬山
- 29) 明里宏文、鈴木樹理、岡本宗裕、宮部貴子、渡邊朗野、兼子明久、阿部政光、釜中慶朗、前田典彦、森本真弓、渡邊祥平、須田直子、平井啓久、松沢哲郎 (2011.9) ニホンザル血小板減少症の発生に関する経過概要. 第152回日本獣医学会学術集会、大阪
- 30) Amekugbe M, Owusu E, Kayang BB, Adenyo C, Hayano A, Inoue-Murayama M (2011.10) Preliminary Studies on the Genetic Diversity of Two Monkey Species at the Boabeng Fiema and Tafi Atome Monkey Sanctuaries in Ghana, Special Seminar: Conservation and Sustainable Use of Ghanaian Wildlife: Report of Research in Japan and Future Plan,

Ghana.

- 31) Inoue-Murayama M, Adenyo C, Hayano A, Princess K. Botchway, Amekugbe M, Owusu EH, Kayang BB (2011.10) Study of genetic diversity for wildlife conservation, Special Seminar: Conservation and Sustainable Use of Ghanaian Wildlife: Report of Research in Japan and Future Plan, Ghana.
- 32) Tsuji Y, Fujita S, Sugiura H, Nakagawa N (2012.3) Rome was not built in a day: time to grasp information on plant feeding of wild Japanese macaques (*Macaca fuscata*). ESJ59/EAFES5、大津
- 33) 飯田恵理子、伊谷原一 (2012.5) 西部タンザニア、ミオンボ疎開林における哺乳動物相. 日本アフリカ学会第49回学術大会、吹田
- 34) 吉田友教、宮部貴子、郡山尚紀、竹元博幸、生駒智子、渡邊朗野、兼子明久、渡邊祥平、齊藤暁、早川敏之、鈴木樹理、岡本宗裕、松沢哲郎、古市剛史、明里宏文 (2012.5) 大型類人猿における人獣共通感染症の抗体スクリーニング方法の開発. 第59回日本実験動物学会、別府
- 35) 吉田友教、竹元博幸、佐藤英次、坂巻哲也、宮部貴子、生駒智子、渡邊朗野、兼子明久、渡邊祥平、早川敏之、鈴木樹理、岡本宗裕、松沢哲郎、明里宏文、古市剛史 (2012.5) アフリカ野生大型類人猿におけるIgA抗体スクリーニングによる人獣共通感染症の実態調査. 第59回日本実験動物学会、別府
- 36) 風張喜子、井上英治、川本芳、中川尚史、宇野壮春、井上-村山美穂 (2012.7) 島嶼のニホンザル個体群における個体群縮小の遺伝的影響. 第28回日本霊長類学会大会、名古屋
- 37) 吉田友教、宮部貴子、郡山尚紀、竹元博幸、生駒智子、渡邊朗野、兼子明久、渡邊祥平、齊藤暁、早川敏之、鈴木樹理、岡本宗裕、松沢哲郎、古市剛史、明里宏文 (2012.7) 大型類人猿における糞便サンプルを用いた人獣共通感染症の抗体スクリーニング方法の開発. 第28回日本霊長類学会、名古屋
- 38) 吉川翠、小川秀司、小金澤正昭、伊谷原一 (2012.7) タンザニア乾燥疎開林地帯のチンパンジーの採食品目とその季節変化. 第28回日本霊長類学会大会、名古屋
- 39) Yoshida T, Takemoto H, Sato E, Sakamaki T, Miyabe-Nishiwaki T, Ikoma T, Watanabe A, Kaneko A, Watanabe S, Hayakawa T, Suzuki J, Okamoto M, Matsuzawa T, Akari H, Furuichi T (2012.8) Epidemiological study of zoonotic pathogens by screening of IgA antibodies in wild great apes in Africa. The 24th Congress of International Primatological Society, Cancun, Mexico.
- 40) Idani G (2012.10) The study of the bonobo in tropical rain forest and the chimpanzee in the savanna woodland. CCTBio 1st International Workshop, INPA, Manaus, Brazil.
- 41) 吉川翠、小川秀司、小金澤正昭、伊谷原一 (2012.11) 自動撮影カメラを用いたチンパンジーとその採食競合者の調査. 第15回SAGAシンポジウム、札幌
- 42) Idani G (2013.2) Wild bonobo studies in Democratic Republic of Congo. Special lecture in Center of Ecological Sciences, Indian Institute for Science, Bangalore, India.

(3) 出願特許

特に記載すべき事項はない。

(4) シンポジウム、セミナー等の開催（主催のもの）

- 1) 日本学術振興会・平成22年度アジア・アフリカ学術基盤形成事業「動植物資源の保全と持続的活用に関する研究交流セミナー」（2010年6月8日～9日、京都大学理学研究科セミナーハウス、観客100名）
- 2) COP10パートナーシップ事業・第15回京都大学国際シンポジウム「生物多様性と動物園・水族館：大学との連携による保全・研究・教育」（2010年9月19日～20日、名古屋港湾会館、観客400名）
- 3) 京都大学・京都市連携3周年記念事業「野生動物学のすすめ」（2011年3月19日～20日、京都市動物園、観客200名）
- 4) 京都大学野生動物研究センターシンポジウム「ずーどすえ。動物園大学1 in京都」（2011年3月21日、京都会館会議場、観客300名）
- 5) 京都大学野生動物研究センターシンポジウム「ずーだがや。動物園大学2 in名古屋」（2012年3月20日、名古屋市千種区役所講堂、観客300名）
- 6) 京都大学野生動物研究センター国際シンポジウム”Prospect and Cooperation for Wildlife Research in Tanzania”（2012年5月16日、京都大学野生動物研究センター会議室、観客50名）
- 7) 京都大学野生動物研究センターシンポジウム「ずーばってん。動物園大学3 in熊本」（2013年3月24日、熊本市動植物公園、観客300名）

(5) マスコミ等への公表・報道等

- 1) 「京いちにち」特集「ラブ☆ラボ：チンパンジーからヒトへの進化をさぐれ」（NHKニュース610、2010年6月15日）
- 2) 「ダーウィンが来た！」（NHK総合、2010年7月5日）
- 3) 「京いちにち」特集「ラブ☆ラボ総集編」（NHKニュース610、2010年8月17日）
- 4) 「道具文化 もっと古くから？—340万年前の石器使用痕発見」（読売新聞、2010年8月31日）
- 5) 「京に輝く」（京都市広報紙「きょうと市民しんぶん」、2010年12月1日）
- 6) 「遺伝子使って性別判定」（京都新聞、2011年3月20日）
- 7) 「野生動物を遺伝子から見る」（読売新聞全国版、2012年1月23日朝刊）京都大学品川セミナー

(6) その他

特に記載すべき事項はない。

8. 引用文献

- 1) 三戸幸久（1997）東北地方北部のニホンザルの分布変遷について．ワイルドライフ・フォーラム3(1)：23-30.

- 2) Caldecott J, Miles L (eds) (2005) World Atlas of Great Apes and their Conservation. University of California Press, Berkeley.
- 3) 伊谷原一 (2009) 大型類人猿の分布と密度に関する研究. 環境省地球環境研究総合推進費終了研究成果報告書(F-061). 環境省 pp. 11-23.
- 4) 鷺谷いづみ、矢原徹一 編 (1996) 保全生態学入門. 文一総合出版.
- 5) 環境省 (2007) 改訂レッドリスト付属説明書-哺乳類-.
- 6) 小金沢正昭、東英生 (1991) ニホンザルの現況-1991. 第1期・第2期プロ・ナトゥーラ・ファンド助成成果報告書. pp.168-172.
- 7) 揚妻直樹 (1996) 屋久島の自然保護と野生生物. ワイルドライフ・フォーラム 2(2): 23-32.
- 8) 揚妻直樹 (1998) 屋久島の野生ニホンザルによる農作物被害の発生過程とその解決策の検討. 保全生態学研究 3: 43-55.
- 9) Muroyama Y, Yamada A (2010) Conservation: Present status of the Japanese macaque population and its habitat. In: Nakagawa N, Nakamichi M, Sugiura H (Eds.), The Japanese Macaques, Springer, pp. 143-164.
- 10) 小金沢正昭 (1991) ニホンザルの分布と保護の現状およびその問題点. 野生動物保護-21世紀への提言- pp.124-157.
- 11) Frankham R, Ballou JD, Briscoe DA (2002) Introduction to Conservation Genetics. Cambridge University Press, Cambridge.
- 12) Nei M, Maruyama T, Chakraborty R (1975) The bottleneck effect and genetic variability in populations. Evolution 29: 1-10.
- 13) Maruyama T, Fuerst PA (1984) Population bottlenecks and nonequilibrium models in population genetics. I. Allele numbers when populations evolve from zero variability. Genetics 108: 745-763.
- 14) Maruyama T, Fuerst PA (1985) Population bottlenecks and nonequilibrium models in population genetics. II. Number of alleles in a small population that was formed by a recent bottleneck. Genetics 111: 675-689.
- 15) Slatkin M (1994) Linkage disequilibrium in growing and stable populations. Genetics 137: 331-336.
- 16) 伊沢紘生 (1983) 金華山のニホンザルの生態学的研究 -第一報- 宮城教育大学紀要 18: 24-45.
- 17) 環境庁 (1979) 第2回自然環境保全基礎調査. 動物分布調査報告書.
- 18) 環境省自然環境局生物多様性センター (2011) 特定哺乳類生息状況調査報告書.
- 19) 伊沢紘生 (1963) 金華山のニホンザル. 野猿 14: 5-11.
- 20) 伊沢紘生 (2004) SNC構想の担い手・金華山のサルの23年. 宮城教育大学環境教育研究紀要 7: 1-11.
- 21) 東滋、林勝治、河合雅雄 (1967) 1966年宮城県金華山島における大型哺乳動物の調査. Ann. Rep. JIBP-CT(5) pp. 197-203.
- 22) 好広真一 (1980) 金華山のニホンザル. モンキー 24(5): 14-15.
- 23) 宮城のサル調査会 (2010) 平成21年度宮城県ニホンザル保護管理事業委託業務完了報告

書.

- 24) 岸田久吉 (1953) 代表的林棲哺乳動物ニホンザル調査報告. 鳥獣調査報告 14
- 25) 竹下完 (1964) 野生ニホンザルの分布及びポピュレーション(下) -アンケート調査による-. 野猿 20・21: 12-21.
- 26) 伊沢紘生、遠藤純二 (1987) 群れの分布と頭数. 宮城県のニホンザル 2: 1-12.
- 27) Morris WF, Groom M, Doak D, Kareiva P, Fieberg J, Gerber L, Murphy P, Thomson D (1999) A practical handbook for population viability analysis. The Nature Conservancy, Washington.
- 28) Cornuet J-M, Luikart G (1996) Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. Genetics 144: 2001-2014.
- 29) Luikart G, Cornuet J-M (1998) Empirical evaluation of a test for identifying recently bottlenecked populations from allele frequency data. Conserv. Biol. 12: 228-237.
- 30) Nozawa K (1972) Population genetics of Japanese monkeys: I. Estimation of the effective troop size. Primates 13: 381-393.
- 31) Caballero A (1994). Developments in the prediction of effective population size. Heredity 73: 657-679.
- 32) 古市剛史 (2004) 危機に瀕するボノボの現状. 霊長類研究 20: 67-70.
- 33) Tashiro Y, Idani G, Kimura D, Bongoli L (2007) Habitat changes and decreases in the bonobo population in Wamba, Democratic Republic of the Congo. African Study Monographs, 28: 99-106.
- 34) Furuichi T, Idani G, Ihobe H, Hashimoto C, Tashiro Y, Sakamaki T, Mulavwa MN, Yangozene K, Kuroda S (2011) Long-term studies on wild bonobos at Wamba, Luo Scientific Reserve, D. R. Congo: Towards the understanding of female life history in a male-philopatric species. Kappeler PM & Watts DP (eds.), Long-Term Field Studies of Primates, Springer-Verlag Berlin Heidelberg. pp. 413-433.
- 35) 宮城のサル調査会 (2007) 平成18年度特定鳥獣保護管理計画：モニタリング手法. 調査請負業務完了報告書.
- 36) 大嶋和雄 (1977) 海峡形成史 (VI): 海峡形成史からみた日本列島の成立. 地質ニュース 280: 36-44.
- 37) Sakamaki T, Mulavwa M, Furuichi T (2009) Flu-like epidemics in wild bonobos (*Pan paniscus*) at Wamba, the Luo Scientific Reserve, Democratic Republic of Congo. Pan Africa News 16: 1-4.

Sustainable Conservation Management of Isolated Primate Populations in Areas of Human Habitation

Principal Investigator: Takeshi FURUICHI

Institution: Primate Research Institute, Kyoto University

41-2, Kanrin, Inuyama, Aichi, 484-8506 Japan

Tel: +81-568-63-0537, Fax: +81-568-63-0085

E-mail: furuichi@pri.kyoto-u.ac.jp

[Abstract]

Key Words: Primate, Isolated population, Sustainable conservation management, Habitat quality, Genetic diversity, Zoonosis

Many non-human primates exist in isolated populations in areas where humans also live in high densities. These primates are at risk of extinction due to degraded habitat quality, genetic deterioration and human-animal transmission of zoonotic diseases.

In sub-theme 1 of this project, we analyzed habitat quality of wild bonobos at the wide-range and a detailed local levels. We identified some promising areas for conservation of bonobos, which helped in the establishment of a new national reserve. We established methodologies to detect DNA from fecal samples from wild primates. We analyzed fecal samples from various sites of wild bonobos, and documented the distribution of haplotypes of mitochondrial DNA across the entire natural range of the species, and identified areas to be given priority for conservation. We also showed that isolated small populations had less genetic diversity. This information will make substantial contributions to the conservation planning of this endangered species. The analysis of genetic diversity of Japanese macaques that populations in Shimokita and Tsugaru are genetically isolated from other populations, and made us aware of the need to be cautious of the bottleneck effect when considering minimal effective population size.

In sub-theme 2, we established a methodology for detecting the IgA antibody for zoonotic diseases from fecal samples from wild animals. Using this methodology, we examined fecal samples from various study sites of chimpanzees and bonobos. We found that wild bonobos had antibodies for various zoonotic diseases at very high proportions, and that there are considerable variations in the positive ratio among study sites. Using this information, we created guidelines for preventing human-ape disease transmission for each site. We also investigated the cause of the fatal disease that recently occurred among Japanese macaques, and revealed that transmission of SRV-4 from *Macaca fascicularis* was the cause in Japanese macaques, which renewed our awareness of the danger of disease transmission between different primate species.

In sub-theme 3, we collected information on ecological, genetic, environmental, and human factors that are relevant to the conservation of isolated populations. We assembled this information into a database, and released it to the public. Using this information and results from the other sub-themes, we contributed to the publication of a “bonobo (*Pan paniscus*) conservation strategy 2012-2022”, as a member of a working group of the IUCN. We expect that it will provide a great impact for the conservation

planning by the government of DR Congo.

