

森林総合研究所
交付金プロジェクト研究 成果集 48

モンテカルロ法を用いたツキノワグマ 個体数推定方法の開発

独立行政法人 森林総合研究所
2011. 12

「交付金プロジェクト」は、平成13年度に森林総合研究所が独立行政法人となるにあたり、これまで推進してきた農林水産技術会議によるプロジェクト研究（特別研究など）の一部、および森林総合研究所の経費による特別研究調査費（特定研究）を統合し、研究所の運営費交付金により運営する新たな行政ニーズへの対応、中期計画の推進、所の研究基盤高揚のためのプロジェクト研究として設立・運営するものである。

この成果集は、交付金プロジェクト研究の終了課題について、研究の成果を研究開発や、行政等の関係者に総合的且つ体系的に報告することにより、今後の研究と行政の連携協力に基づいた効率的施策推進等に資することを目的に、「森林総合研究所交付金プロジェクト研究成果集」として公表するものである。

ISSN1349-0605

森林総合研究所交付金プロジェクト研究成果集48

「モンテカルロ法を用いた

ツキノワグマ個体数推定方法の開発」

発行日 平成23年12月31日

発行 独立行政法人森林総合研究所

〒305-8687茨城県つくば市松の里1番地

電話 029-873-3211（代表）

目 次

研究の要約	1
第1章 モンテカルロ法を用いたツキノワグマ個体数推定方法の開発	4
1. 青森県における個体識別用プライマーの決定と標識再捕法による 下北・津軽地域の個体数推定	4
2. DNA個体識別法と痕跡調査法を用いた三八上北地域の個体数の推定	7

研 究 の 要 約

I 研究年次及び予算区分

平成 20～22 年（3 か年）

運営交付金（交付金プロジェクト）

II 主任研究者

主査 小泉透（野生動物研究領域長）

副主査 岡輝樹（野生動物研究領域）

取りまとめ責任者 岡輝樹（野生動物研究領域）

III 研究場所

地域特性による違いが十分に考えられることから、可能な限り多くの地域で痕跡調査結果と遺伝学的な個体数調査を実施することが望ましいが、本課題ではまず、個体識別調査が実施中であった青森県の地域個体群を対象とした。

IV 研究目的

ツキノワグマは我が国の森林の豊かさを象徴する動物である。しかし数年に一度、例えば 2006 年のように推定個体数(10,000～15,000 頭)の 1/3～1/2 にあたる個体が捕殺されることがあり、シカやイノシシに比べて繁殖率が著しく低いクマ類の存続可能性を危惧する声も強い。クマ類の地域個体群は県境をまたがって分布するため、大量出没時には県境を越えた広い地域で同様に被害が発生し、各所で有害動物として駆除される。地域個体群を共有する隣接県は共同して一貫的、統一的対策をとり、保護管理を進める必要がある。しかし、そのための根幹となる「推定個体数」が各府県によって独自に、様々な方法で算出された値であるという事実は、生息ユニットを意識した広域的保護管理策を実施するための大きな障害となっており、より信頼度の高い統一された手法で全国の個体数を再推定する必要に迫られている。

そのため、本課題は、広域ユニットでのツキノワグマ保護管理策を円滑に実施することができるよう、科学的に信頼性の高い遺伝学的分析技術を用いた個体数推定方法と、より軽労、安価で広域的に実施できる生息分布・痕跡調査結果を融合させた新手法を開発し、個体数管理技術を確立させることを目的とする。

V 研究方法

青森県に生息するツキノワグマ個体群については遺伝学的個体識別のためのプライマーの種類が確定していないため、まず、これまでに得られた試料（捕獲個体の肉片及びヘアトラップによる体毛サンプル）を用いて遺伝的な多型を解析し、個体識別するために必要なマイクロサテライトプライマーの種類を決定した。

一方で、生息情報に関する聞き取り調査及び捕獲記録をもとに生息域と非生息域に分類し、ツキノワグマ個体群の生息分布を明らかにした。一方、痕跡調査をおこなった調査区からさらに一部を選択して同時にヘアトラップを用いた遺伝学的個体識別調査を実施し、得られた結果から発見痕跡数と識別個体数の関係を探り、その確率分布を用いて個体数を近似的に推定するモンテカルロシミュレーションによって生息地域全域に拡張し、個体数の最尤値を求めた。

VI 研究結果

研究計画表

課題名：モンテカルロ法を用いたツキノワグマ個体数推定方法の開発

担当：森林総研 野生動物研究領域

期間：20～22

2005 年～2007 年にかけておこなわれた青森県による「ツキノワグマ保護管理対策事業」及び「ツキノワグマ被害防止緊急対策事業」によって採集された体毛サンプル（下北半島 53 サンプル、津軽地域 77 サンプル）を対象に、6～9 遺伝子座のマイクロサテライトを用いて DNA 個体識別をおこなった。その結果、9 遺伝子座（G1A、G10L、G10M、Mu23、G10X、UamA107、UamD102、UamD2、Mu64）全てにおいて遺伝子型が決定したサンプルは下北半島 32 サンプル、津軽地域 66 サンプルであり、これらには同一個体からのものと思われるサンプルはなかった。また、下北半島集団は津軽地域の集団に比べてヘテロ接合度、各遺伝子座におけるアレル数が低いことがわかった。

青森県において記録された 2004～2009 年の狩猟、有害捕獲、目撃地点データをもとに生息分布状況を把握、推定し、基準地域メッシュ（約 1×1km）により生息域、非生息域、不明区域を区分したところ、青森県の生息域は 3296 メッシュ（県全体の約 31.7%）、非生息域は 3374 メッシュ（約 32.4%）であった。

青森県下北地域、津軽地域に生息するツキノワグマの個体数を DNA 個体識別による標識再捕法の技術を利用して推定したところ、下北地域個体群は 195 ± 75 個体、津軽地域個体群は 824 ± 343 個体となった。また青森県三八上北地域の個体数を痕跡調査及び DNA 個体識別法により推定したところ、238 個体（信頼度 70%区間：218～257 個体）となった。

本研究により、生息分布・痕跡調査は遺伝学的分析技術を用いた個体数推定方法に比べて精度は劣るが個体数推定に利用可能であることがわかった。さらにこの方法は軽労、安価で広域的に実施できるため、個体数変動を長期的に把握するうえで非常に有用であり、数年に一度遺伝学的手法を用いた個体数推定により補正を加えることでより精度を高めることが可能である。

VII 成果の利活用

青森県は本プロジェクトによる個体数推定結果を踏まえてツキノワグマ保護管理計画を実施する予定である。また、宮城県では同様の手法により、DNA 個体識別及び痕跡調査を 10 区画、痕跡調査のみを 40 区画で実施し、仮定した生息域でシミュレーションを行い、生息数を推定している。この結果は同県のツキノワグマ保護管理計画に採用された。なお、岩手県がツキノワグマ保護管理計画を実施するにあたっては同様の手法を用いている。

このように、本プロジェクトはより簡便、低コストでありながら科学的に精度の高い方法で個体数の変動を把握する手法を、管理を担当する自治体に提供した。各自治体はこれをもとに管理ユニット内の生息個体数に関する情報を共有したうえで、ツキノワグマ保護管理の円滑な遂行のために、広域的管理を実施する体制を確立させることができると考えられる。

VIII 今後の問題

青森県に生息するツキノワグマ個体群の個体識別には 9 遺伝子座を調べる必要があることがわかったが、ヘアトラップで採集できるサンプル数は限られており、これら全ての遺伝子座について遺伝子型を明らかにできない、あるいは識別確率が非常に低いままになってしまう場合も多い。より効率の良いヘアトラップ方法、より多型の見られる遺伝子座の発見が必要である。また、ある地域個体群について、部分的に得られた推定個体数を地域個体群全体に拡張するにあたっては、生息分布域をより正確に把握することが不可欠である。

IX 研究発表

田中裕久・奥村友梨・高津戸望・梶原麻友香・鈴木恵理子・山本俊昭・岡輝樹（2009）下北半島に生息するツキノワグマの遺伝的特性．第 56 回日本生態学会講演要旨集、475．

山本俊昭・奥村友梨・田中裕久・高津戸望・岡輝樹（2009）下北半島に生息するツキノワグマの集団遺伝学的解析．日本哺乳類学会 2009 年度台北大会講演要旨集、98．

Yamamoto, T. ・Oka, T. ・Ohnishi, N. ・Tanaka, H. ・Takatsuto, N. ・Okumura, Y. （2012） Genetic characterization of northernmost isolated population of Asian black bear (*Ursus thibetanus*) in Japan. *Mammal Study*、37(2)、85-91．

X 研究担当者

岡 輝樹

第1章 モンテカルロ法を用いたツキノワグマ個体数推定方法の開発

1. 青森県における個体識別用プライマーの決定と標識再捕法による下北・津軽地域の個体数推定

ア 研究目的

捕獲個体の肉片及びヘアトラップによる体毛サンプルを用いて遺伝的な多型を解析し、個体識別するために必要なマイクロサテライトプライマーの種類を決定する。

イ 研究方法

①DNAの抽出

顕微鏡下において、採取した体毛サンプルに毛根が残っているかどうかを確認した。

毛根部が確認されたものについて、毛根部分のみを選んで切断し、5本を1サンプルとしてまとめた。

サンプルごとに ISO HAIR (NIPPONGENE 社) キットを用いて DNA を抽出した。なお、Extraction buffer、Enzyme solution、Lysis solution による溶解後に、タンパク質などの不純物を減らすためにフェノール処理を追加した。

処理が終わった試料をエタノール沈殿、乾燥させた後、TE (pH8.0) で溶解した。

この DNA 溶液は使用時以外 4℃で保存した。

②PCR

ポリメラーゼ及びバッファーの組み合わせとして、EX Taq (TAKARA) + AmpDirect (Shimazu)、PrimeStar (TAKARA) + PrimeStar Buffer (TAKARA) の 2 通りの方法を用いた。

③シーケンシング

PCR 産物の遺伝子型の決定は、310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) を用いて電気泳動した後、GENEMAPPER (Applied Biosystems) によりおこなった。なお、電気泳動では 2%アガロースゲルを用いた。

④解析

Cervus3.0 の Identity Analysis によって個体識別をおこなったのち、各個体がどの個体群に帰属するのかを推定するために 10,000 回繰り返しによって Gene Class 2.0 による Assignment test をおこなった。地域ごとに遺伝的多様性を把握するため、対立遺伝子頻度を MSA-win4.05 を用いて算出した。

ウ 結果及び考察

下北地域で採集された 85 サンプルのうち 61 サンプル (72%)、津軽地域で採集された 141 サンプルのうち 137 サンプル (97%) から良好な DNA 標本を得ることができた。これらのうち、下北地域の 53 サンプル、津軽地域の 77 サンプルでは 6 遺伝子座以上の遺伝子型を決定でき、さらに 9 遺伝子座で遺伝子型を決定することができたサンプルは、下北地域 32 サンプル、津軽地域 66 サンプルであった。下北地域では平均 6.83 座位、津軽地域では平均 7.87 座位で個体識別がおこなわれた。

①下北、津軽地域の個体を識別するためのプライマー

両個体群において個体識別に使用するプライマーを表 1-1 に示す。下北地域における第 1 回目識別個体数は 26 個体、第 2 回目識別個体数は 28 個体、うち 3 個体が第 1 回目にも識別された

個体であり、最少識別個体数は 51 個体であった。Assignment test の結果、98%が下北地域個体群に帰属した。津軽地域における第 1 回目識別個体数は 54 個体、第 2 回目識別個体数は 59 個体、うち 3 個体が第 1 回目にも識別された個体であり、最少識別個体数は 110 個体であった。Assignment test の結果、97%が津軽地域個体群に帰属した。

表 1－1：下北、津軽地域個体の識別に用いたプライマー

プライマー		塩基配列		長さ	文献	
G1A	F	GACCGTCGACT CTCCTCTGATG	R	GCACTGTCTTGC GTAGAAGTGAC	174-216	Paetkau and Strobeck. 1994
G10L	F	GTAAGTATTTAAT TCACATTTCCC	R	GAAGATACAGAAA CCTACCCATGC	124-140	Paetkau and Strobeck. 1994
G10M	F	TTCCCGTCATCGT AGGTTGTA	R	AATAATTTAAGTG CATCCCAGG	190-206	Paetkau <i>et al.</i> 1995
G10X	F	AGTTTATACCTTT CAACCACC	R	TCAGTTATCTGTG AAATCAAAA	127-151	Paetkau <i>et al.</i> 1995
Mu23	F	GCCTGTGTGCTAT TTTATCC	R	GTTTCTTAATGGG TTTCTGTTTAAT TAC	112-132	Taberlet <i>et al.</i> 1997
UamA107	F	ATTCGCATTGGTG CCTCT	R	CCCCCATCAAAA TCCAT	144-160	Meredish <i>et al.</i> 2008
UamD2	F	ACACCTGTCTTCC CTTCCTAAC	R	TTCCATCTGAGAG GCTGAAC	177-193	Meredish <i>et al.</i> 2008
UamD102	F	AAACTATCAGGCC TGTCTGTC	R	CTGCCCTCATTT TTACTT	199-219	Meredish <i>et al.</i> 2008
Mu64	F	ACTCAACACAACC ATTAATCA	R	AGGACCCAAATGA CACTACA	178-194	Taberlet <i>et al.</i> 1997

②下北、津軽地域個体の各遺伝子座におけるヘテロ接合度の期待値と観察値

下北、津軽地域個体の各遺伝子座におけるヘテロ接合度の期待値と観察値を表 1－2 に示す。青森県内に生息するツキノワグマ個体群の遺伝的多様性は、分断化による孤立化が進んでいると言われている西日本個体群に比べてさらに低く (Ohnishi *et al.* 2007)、とりわけ下北地域個体群のそれは極めて低いことが示唆された。

表 1－2：下北、津軽地域個体の各遺伝子座のヘテロ接合度期待値と観察値

遺伝子座		下北地域	津軽地域	全体
G1A	アリル数	10	15	17
	特異的アリル数	2	7	
	ヘテロ接合度期待値	0.73	0.81	0.77
	ヘテロ接合度観察値	0.38	0.57	0.47
G10L	アリル数	5	5	6
	特異的アリル数	1	1	
	ヘテロ接合度期待値	0.73	0.76	0.74
	ヘテロ接合度観察値	0.44	0.45	0.45
G10M	アリル数	5	9	9
	特異的アリル数	0	4	
	ヘテロ接合度期待値	0.56	0.80	0.68
	ヘテロ接合度観察値	0.24	0.63	0.43
G10X	アリル数	8	8	10
	特異的アリル数	2	2	
	ヘテロ接合度期待値	0.73	0.39	0.56
	ヘテロ接合度観察値	0.40	0.37	0.38
Mu23	アリル数	6	7	7
	特異的アリル数	0	1	
	ヘテロ接合度期待値	0.72	0.73	0.73
	ヘテロ接合度観察値	0.44	0.79	0.61
UamA107	アリル数	3	5	5
	特異的アリル数	0	2	
	ヘテロ接合度期待値	0.29	0.39	0.34
	ヘテロ接合度観察値	0.33	0.30	0.32
UamD102	アリル数	3	5	5
	特異的アリル数	0	2	
	ヘテロ接合度期待値	0.56	0.55	0.56
	ヘテロ接合度観察値	0.84	0.60	0.72
UamD2	アリル数	2	6	6
	特異的アリル数	0	4	
	ヘテロ接合度期待値	0.45	0.64	0.55
	ヘテロ接合度観察値	0.54	0.58	0.56
Mu64	アリル数	5	8	8
	特異的アリル数	0	3	
	ヘテロ接合度期待値	0.60	0.77	0.68
	ヘテロ接合度観察値	0.77	0.83	0.80
平均	ヘテロ接合度期待値	0.60	0.65	0.63
	ヘテロ接合度観察値	0.49	0.57	0.53

識別個体数から生息数を推定するにあたって利用した式はPetersen-Lincolnによる推定式をもとにした Chapman(1951)の式である。ここで、 n_1 は第1回目の採集サンプルから識別された個体数、 n_2 は第2回目の採集サンプルから識別された個体数、 m_2 は第1、2回目ともに確認された個体数、 $\widehat{N}_c$ は推定生息数である。

$$\widehat{N}_c = \frac{(n_1 + 1)(n_2 + 1)}{m_2 + 1}$$

なお、このとき、分散 (Var) 及び標準誤差 (SE) は Seber(1982)により

$$\text{Var}(\widehat{N}_c) = \frac{(n_1 + 1)(n_2 + 1)(n_1 - m_2)(n_2 - m_2)}{(m_2 + 1)^2(m_2 + 2)}$$

$$\text{SE} = \pm \sqrt{\text{Var}(\widehat{N}_c)}$$

Chapman の式に下北地域における観察値 ($n_1=26$ 、 $n_2=28$ 、 $m_2=3$) 及び津軽地域における観察値 ($n_1=54$ 、 $n_2=59$ 、 $m_2=3$) を代入し、次のような推定値を得た。

下北地域個体群： 195±75 個体 (120～270 個体)

津軽地域個体群： 824±343 個体 (481～1167 個体)

エ 今後の問題点

いずれの地域も第 1 回、第 2 回ともに確認された個体数が 3 個体と少なく、十分な精度を持つ推定値ではない。多くの地域で同様の手法による個体数推定が試みられているが、再捕個体数を充分確保する必要がある、問題点として残る。

オ 要約

青森県に生息するツキノワグマを個体識別するために利用するマイクロサテライトプライマーを決定した。

カ 引用文献

Chapman, D. H. (1951) Some properties of the hypergeometric distribution with applications to zoological censuses. University of California Publications in Statistics 1, 131-160.

Ohnishi, N.・Saitoh, T.・Ishibashi, Y.・Oi, T. (2007) Low genetic diversities in isolated populations of the Asian black bear (*Ursus thibetanus*) in Japan, comparison with large stable population. Conservation Genetics, 8, 1331-1337.

Seber, G. A. F. (1982) The estimation of animal abundance and related parameters, 2nd ed. Chapman, London and Macmillan, New York.

2. DNA 個体識別法と痕跡調査法を用いた三八上北地域の個体数の推定

ア 研究目的

ヘアトラップによる DNA 個体識別法と痕跡調査法を併用してより軽労かつ簡便に個体数を推定する。

イ 研究方法

①痕跡調査及びヘアトラップ調査

1) 生息地域の確認

青森県全域について、2004～2009 年の有害駆除、狩猟、目撃情報地点に関する情報を集め、「標準地域メッシュ・システム (昭 48. 7. 12 行政管理庁告示第 143 号「統計に用いる標準地域メッシュ及び標準地域メッシュコード)」に基づく「第 3 次地域区画 (基準地域メッシュ、約 1km 格子)」により生息域、非生息域、不明区域を区分した。

2) 痕跡調査

青森県三八上北地域について、生息が確認された地域のメッシュをもとに、調査区画 (2km×2km、基準地域メッシュ 4 個分) を 35 区画設定した。各調査区画内を 2 人 1 組で 2 時間踏査し、ツキノワグマのフン及び足跡が確認された地点、数を踏査ルートとともに記録した。なお、踏査ルートは当該区画の地形、野生動物の利用が考えられる「けものみち」の状況により任意に設定し、その他の付帯情報も記録した。

3)ヘアトラップ調査

上記 1)で設定した 35 区画のうち 25 区画を選び、ヘアトラップを各区画が 3 ないし 4 基包含するように設置した。ヘアトラップの構造については Miura & Oka (2003)を参考にして、約 3.5m 四方の方形区を設定し、立木、イボ竹等を利用して有刺鉄線を地上高 30cm、及び 60cm の 2 段に張る。誘引餌にはリンゴ、もしくは蜜蝋等を利用した。体毛の回収にあたっては汚染を防ぐためのビニール手袋等を使用して有刺鉄線にかかっている体毛を採取し小袋に集め、速やかに冷凍庫で保管した。

②DNA 分析

ヘアトラップによって採集した体毛サンプルのうち一連の個体識別分析過程に耐えうる量が確保できると考えられたサンプルについて解析を行った。サンプルごとに ISO HAIR (NIPPONGENE 社) キットを用いて DNA を抽出し、Extraction buffer、Enzyme solution、Lysis solution による溶解後に、タンパク質などの不純物を減らすためにフェノールによる処理を追加した。処理後、エタノール沈殿、乾燥させた後、TE (pH8.0) で溶解した。

次に、EX Taq (TAKARA) + AmpDirect (Shimazu) を用いて PCR (DNA 特定部位の増幅) を行った。解析対象部位であるマイクロサテライトの多型性は 1 の結果を参照して、9 種類のプライマー (G1A、G10L、G10M、Mu23、G10X、UamA107、UamD102、UamD2、Mu64) を適用した。PCR 産物の遺伝子型の決定は、310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) を用いて電気泳動した後、GENEMAPPER (Applied Biosystems) によりおこなった。

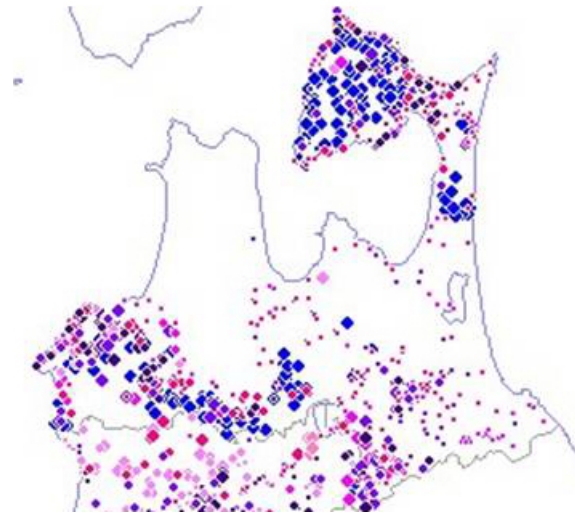
③シミュレーションによる個体数の推定

個体数は、三八上北地域を対象とした生息分布調査、35 区画で行われた痕跡調査、及び 25 区画で行われた DNA 個体識別調査と痕跡調査の結果をもとに推測された。すなわち、痕跡調査のみが行われた区画それぞれの痕跡数は痕跡数あたりの識別個体数のいずれかを同じ頻度で反映していると仮定してシミュレーションをおこない、その結果を生息が確認された区画全てについて拡張するものである。

ウ 結果及び考察

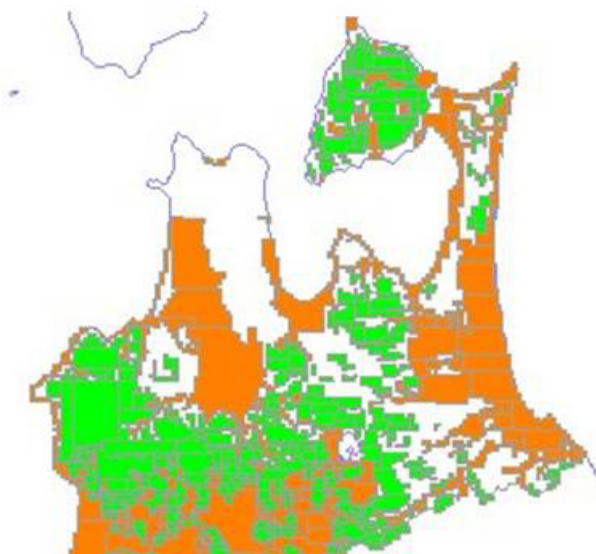
生息分布調査の結果、青森県全体で 2004～2009 年にツキノワグマの生息が確認された地点を図 2－1 に示す。

図 2－1：ツキノワグマ有害捕獲地点、狩猟地点、目撃地点



これを基準地域メッシュに置き換えると、青森県の生息域は 3296 メッシュ（県全体の約 31.7%）、非生息域は 3374 メッシュ（約 32.4%）となった（図 2－2）。

図 2－2：ツキノワグマの推定生息域と非生息域



DNA 個体識別調査実施区画、未実施区画における痕跡調査結果を図 2－3、2－4 に示す。
図 2－3：

DNA 個体識別調査実施区画における痕跡調査結果

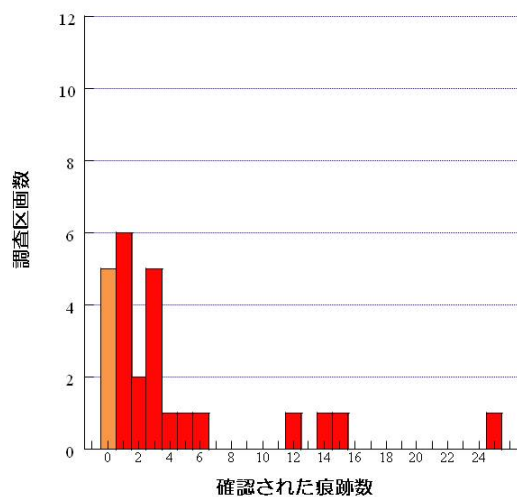
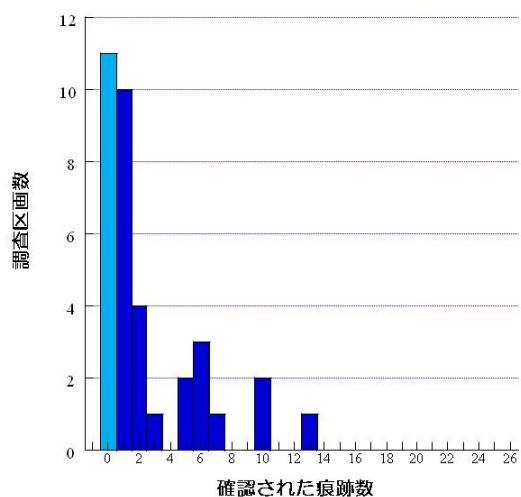


図 2－4

DNA 個体識別調査未実施区画における痕跡調査結果

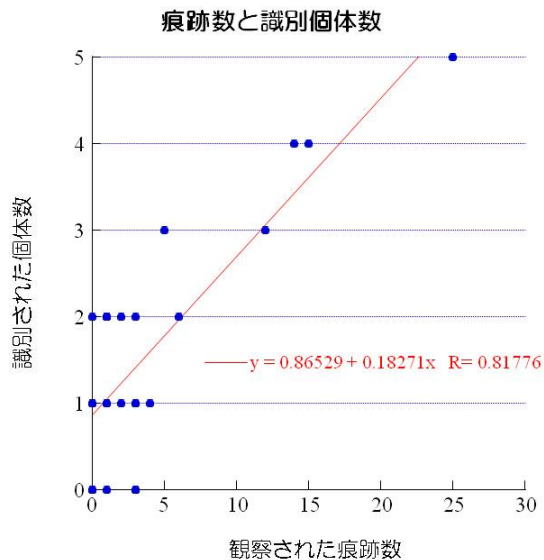


DNA 個体識別調査（ヘアトラップ調査）実施区、未実施区における痕跡数の頻度分布には偏りがなかった。対象地域で採集された 104 サンプルのうち 81 サンプル（78%）から良好な DNA 標本を得ることができた。これらのうち、42 サンプルでは 6 遺伝子座以上の遺伝子型を決定できた。最少識別個体数は 46 個体、体毛採取は 2 回行ったが、第 1 回目と第 2 回目に共通している個体は 5 個体と少なかったため、以降の解析は 2 回の採取による固体識別結果を同時に採取したものと

見なしておこなった。

観察された痕跡数と実際に識別された個体数との関係を図 2－3 に示す。

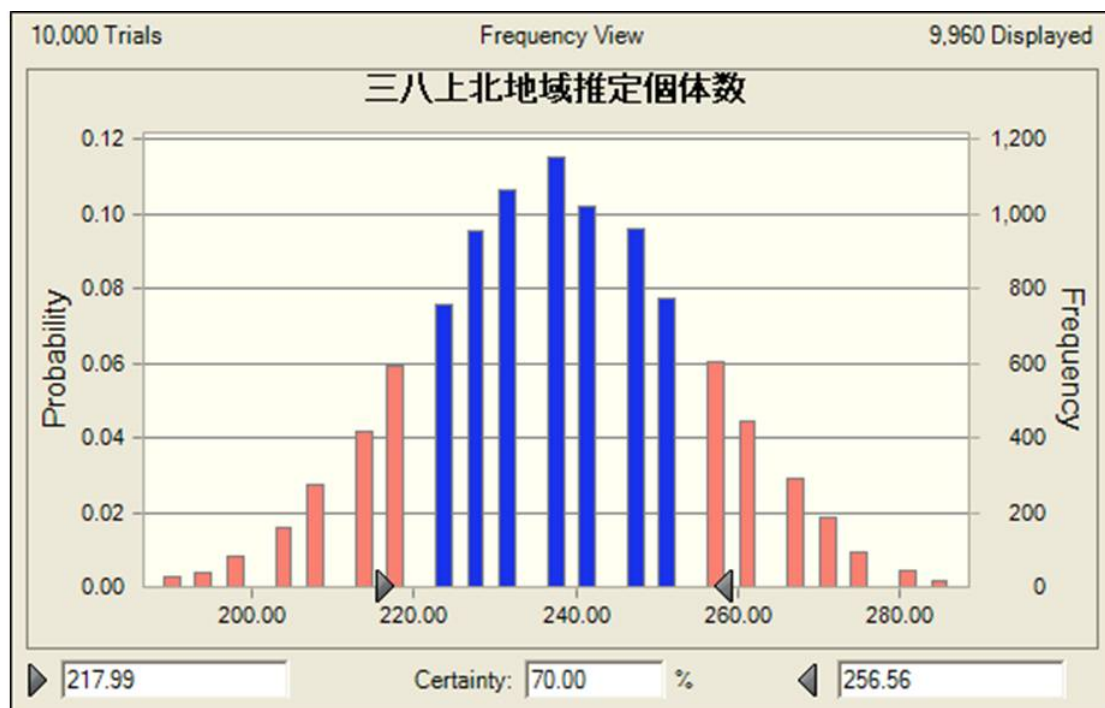
図 2－3：観察された痕跡数と識別された個体数



観察された痕跡数 X と実際に識別された個体数 Y には有意な相関が見られた ($Y=0.183X+0.865$ ($r=0.818$)). この結果を用いて個体数をシミュレーションより推定するにあたり、痕跡数 0～3 の区画については、2) の痕跡調査結果から得られた区画あたりの痕跡数の頻度分布を用い、痕跡数 4 以上については区画あたり痕跡数 X とそれぞれの平均個体数 Y から求めた回帰式より内挿によって求め、これに固定することで対応した。

痕跡調査がおこなわれた 35 区画、それぞれにおいて確認される痕跡数は、上記と同じ頻度で個体数を反映しているであろうということを仮定して、10,000 回のシミュレーションをおこなった。さらに、この値を 1) により推定生息域であるとされた 675 平方キロにも同程度に生息しているであろうと仮定して全てに拡張した。その結果、三八上北地域の個体数は 70% の確からしさをもって 218.0～256.6 個体 (平均 237.5 個体) と算出された (図 2－4)。

図 2-4：モンテカルロシミュレーションによる個体数推定



237.5個体（218.0～256.6；確からしさ70%）

エ 今後の問題点

ある地域個体群について、部分的に得られた推定個体数を地域個体群全体に拡張するにあたっては、生息分布域をより正確に把握することが不可欠である。

オ 要約

ツキノワグマ地域個体群の個体数を求める手法として、ヘアトラップを利用して得た体毛からDNAレベルによる個体識別をおこない、これと同時に実施した痕跡調査結果から、生息地域全体にシミュレーションによって拡張する方法を開発した。

カ 引用文献

Miura, S. Oka, T. (2003) Evaluation of apple bait hair-traps for genetic tagging of Asiatic black bears in the Kitakami Highland, northern Honshu, Japan. Mammal Study, 28(2), 149-152.