

DNA 個体識別技術を利用したヒグマ調査マニュアル
～非侵襲的試料を用いた DNA 解析の成功率向上を目指して～

令和 4 年（2022 年）3 月版

国立大学法人 北海道大学 大学院獣医学研究院

公益財団法人 知床財団

地方独立行政法人 北海道立総合研究機構

国立大学法人 東京農工大学

マニュアルの作成にあたって

本マニュアルは、環境研究総合推進費・令和元年度採択課題「遺産価値向上に向けた知床半島における大型哺乳類の保安全管理手法の開発」（課題番号 4-1905）におけるサブテーマ「ヒグマ個体群の新規個体数推定法の開発」の一つとして、北海道大学大学院獣医学研究院が中心となって作成したものである。

体毛や糞などの非侵襲性(捕殺や捕獲を伴わず生体を傷つけない)の生体試料から得られる DNA 情報を用いて個体識別および個体数を推定する方法は、多くの野生動物において主流となっている。本マニュアルでは、知床半島におけるヒグマ DNA 試料の採取方法および解析方法について、作成者が 10 年以上にわたり試行錯誤を繰り返しながら得た経験・知見をもとに、「効果」「効率」「簡便さ」「コスト」の観点から優れていると考えた点について記載した。

DNA マーカーを活用したクマ類の生息密度推定法については、「クマ類の個体数推定法の開発に関する研究」（平成 21～23 年度、環境省環境研究総合推進費、米田政明代表）により作成された資料（[参考文献①](#)）や、「環境情報を活用した遺伝子マーカーによる個体識別を用いたヒグマ生息密度推定法の開発」（平成 23～25 年度、地方独立行政法人北海道立総合研究機構）により作成された資料（[参考文献②](#)）など、すでにいくつか利用可能な調査マニュアルが存在する。これから調査を計画する際は、これらを見比べた上で、調査目的と調査規模、および調査地域の環境条件にあったやり方を選択されたい。特に、空間明示型標識再捕獲生息密度推定モデルを用いた調査デザインについては、上記資料に掲載されているため、このマニュアルでは割愛する。また、今回我々が開発した「空間明示型標識再捕獲モデルとタグ・リカバリー法を組み合わせた新規個体数推定法」については、学術誌でその科学的妥当性が認められたのちに、改めて共有することを目指す。このマニュアルでは、既存のマニュアルには掲載されていないような手技に関するコツ（解析の確度を下げずに、解析コスト・労力を抑えるやり方など）や、体毛以外の生体試料（糞、唾液など）の採取・解析方法についても記載しているという点が既存のものとは異なる。特に、糞 DNA の解析は、個体数推定だけではなく、農作物や家畜などに被害を及ぼした個体を特定するための手法として管理上有用である。調査員や対策員等が十分な経験を有していなくとも、サンプルの採取や解析が可能となることを願って作成した。

本マニュアルが、日本全国におけるクマ類（ヒグマ・ツキノワグマ）の調査・研究に活用され、人とヒグマが共存のための方策をみつけるための一助となることを期待する。

目次

| | |
|--------------------------------------|----|
| 調査を始める前に | 4 |
| 1. はじめに | 4 |
| 2. 調査時期の決定 | 4 |
| ヘアトラップを用いた体毛の採取と解析 | 6 |
| 1. はじめに | 6 |
| 2. 立木型ヘアトラップの設置方法 | 7 |
| 3. ヘアトラップの見回りおよび体毛試料の採取方法 | 12 |
| 4. 体毛 DNA の解析方法 | 17 |
| 糞 DNA の採取と解析 | 21 |
| 1. はじめに | 21 |
| 2. 糞試料の採取方法 | 21 |
| 3. 糞 DNA の解析方法 | 24 |
| その他の DNA 試料の採取と解析 | 27 |
| マイクロサテライトマーカーによる個体識別 | 29 |
| 1. はじめに | 29 |
| 2. マイクロサテライト多型座位の選別（個体識別用） | 29 |
| 3. その他のマイクロサテライト多型座位および性判別マーカー | 35 |

付録：記録様式集

調査を始める前に

1. はじめに

調査を始める前に、調査の目的や予算規模、作業員の数、対象地域の環境（気温・積雪深・降水量・湿度など）などを十分に検討した上で、その目的と地域にあった調査デザインを決定する必要がある。また、サンプルの採取方法や、ラベリング（サンプルIDの付与）の仕方、保管方法などを作業員の間で事前に検討し統一しておく必要がある。実際に経験を有するものから手ほどきを受けるなど、口頭や紙面だけの説明に留まらないよう心がける。

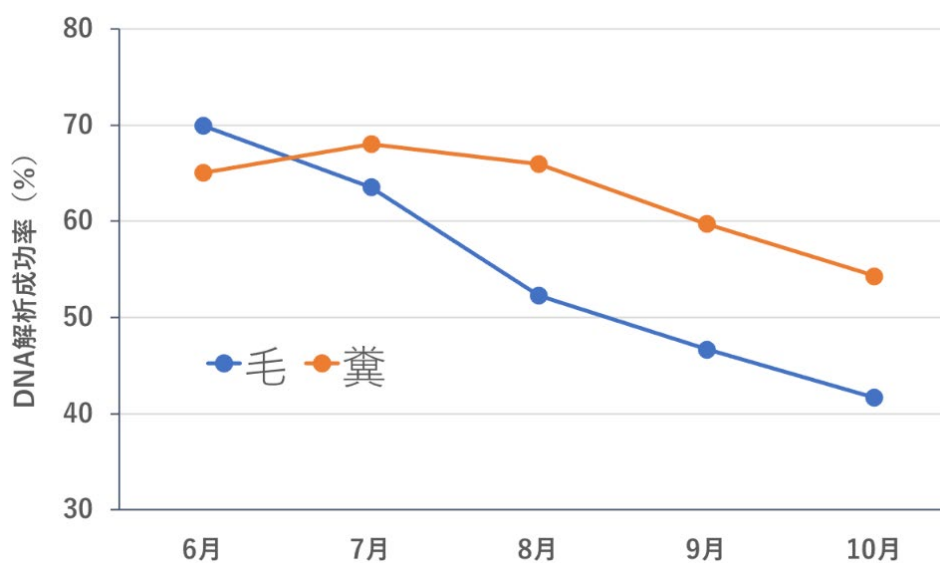
採取したサンプルの属性情報（採取日・場所など）は、作業員全体で共有し確認ができるよう、ウェブ上で管理できる仕組み（スプレッドシートなど）を利用することが望ましい。ただし、複数の人間が編集を行える設定とした場合は、誤ってデータが削除されることもあるため、定期的に自動でバックアップがされるよう、データの管理に努める。

2. 調査時期の決定

DNA解析による個体識別に基づく個体数推定調査を実施する際は、1) 時期による行動圏の変化や、生息密度の偏り、2) 時期による試料のDNA解析成功率（以下、解析成功率）の変化、を考慮に入れ、調査時期を決定する必要がある。一般的に、ヘアトラップ調査をベースとした空間明示型標識再捕獲モデルでは、個体が大きく行動圏を変えるような秋期以降を調査対象から除外することが推奨されている。しかしながら、短い調査期間では動物が動く空間範囲は限定されるため、トラップを密に配置しないと有効サンプリング範囲が縮小して対象地域全体の個体密度分布を正しく推定できない懸念が生じる。したがって、推定対象地域の中でアクセスの問題等で調査できない範囲が広い場合には、従来型の調査デザインよりも長期の調査を検討する余地がある。知床半島など一部地域では8月後半からサケ科魚類を利用し始め、9月からは冬眠前の主要食物である堅果類を利用する。サケ科魚類や堅果類の資源量は年によって大きく変動することが知られており、ヒグマの行動はこのような主要食物資源の豊凶によって大きく変化する可能性がある。このため、我々は初年度の調査（2019年）において6月上旬～10月下旬まで調査期間を長く設定し、その結果をもとに2020年の調査期間を定めることを計画した。結果として、秋期は識別個体数が増加し、調査期間を8月までと限定するよりもむしろ推定精度を高めることができるかと判断されたため、2年間を通して6月上旬～10月下旬まで調査を実施した。

また、8月下旬ごろ以降になると毛や糞の解析成功率が低下することにも注意が必要である。秋に採取される毛は毛根を有さず解析に適さないものの割合が高くなることや、堅果を食した糞に含まれる成分がDNA解析を阻害することなどが知られている。我々の調査では、サンプルの解析成功率は秋に低下傾向にあったものの、糞ではある程度の高い成功率を保つことができ（下図）、毛についても分析に供試するサンプル数を増やした結果、秋における識別数はかえって増加した。後述するように、使用する毛の選定や、DNA阻害物質の除去などに工夫を講じることにより、一年を通じて良好な解析結果を得ることが期待できる。

このように、調査環境は地域により異なるため、大規模なDNA調査を実施する際はなるべく複数年での実施計画とし、初年度は調査期間をできるだけ長く設定し、時期による動物の行動やDNA解析成功率の変化が及ぼす影響について検討した上で、次年度以降の調査時期を決定するのが望ましい。



毛と糞から抽出したDNAを用いた個体識別の解析成功率（月別変化）

2019～2020年に知床半島で採取した試料を対象とし、後述する手法によりDNA解析を実施した際の解析成功率を示した。

ヘアトラップを用いた体毛の採取と解析

1. はじめに

体毛の採取装置としてこれまで使用されてきたヘアトラップの構造には、大きくわけて

- 1) フェンス型：有刺鉄線で囲ったエリア内に食べ物の匂いでヒグマを誘引する方法、
- 2) 立木型：クマの背擦り行動を誘発する方法、の2種類が存在する。フェンス型は1辺3～6mほどの多角形（三角形～六角形、周囲長約20m）のスペースを有刺鉄線で囲うものであり、ヒグマを対象とする場合、有刺鉄線は40cmと85cmなど、2段張りとする構造が基本である。ロープを用いてヘアトラップ中央部3.3～3.5mの高さ（雄ヒグマが立ち上がっても届かない高さ）に誘引餌（シカ肉・シカ内臓、魚など）を設置し、食べ物に誘引されたヒグマがトラップに進入する際に有刺鉄線に体毛が絡まることを期待する。この方法はクマ類における体毛試料の採取法として古くから使用されており、参考文献②③により詳しい記載がある。腐敗臭を発する死肉の誘引効果は高く、嗅覚の優れたクマ類を対象とする手法として確立された方法である。しかしながら、設置にあたっては広い平坦なスペースが必要となること、1基設置するのに時間と労力がかかること、稀にヒグマに有刺鉄線を破壊されたり誘引餌を取られたりすることがあり、定期的なメンテナンスが必要であること、などの欠点がある。さらに近年では、「餌を用いて野生動物を誘引する行為」として、たとえ調査研究目的であったとしても使用が避けられる（あるいは許可されない）傾向にある。そこで、本マニュアルでは立木型の手法について紹介する。

立木型ヘアトラップは、ヒグマが木に背中を擦り付けて行う匂い付け行動（マーキング行動）を利用するものである。有刺鉄線をまきつけた木などに、背擦り行動を誘発する匂い（木材防腐剤）を塗布し、絡まった毛を採取するというものである。本研究では林内の樹木を利用したが、擬木を用いる方法もある（参考文献④）。



フェンス型ヘアトラップ



立木型ヘアトラップ

2. 立木型ヘアトラップの設置方法

1) 必要な資材・機材など

資材

- 有刺鉄線：亜鉛メッキ線
- 木杭またはL字鋼：カメラを設置する適当な樹木がない場合に使用

工具類

- ペンチ、メタルカッター、コンベックス（5m以上）、鎌
- 皮手袋
- ピンクテープ
- ボルト、レンチ（L字鋼を使用する場合）
- ロープ：看板設置用

カメラ関連

- 自動撮影カメラ：マニュアル作成者は HykeCam SPI08-J フルHD（株式会社 Hyke、北海道）を使用
- 周辺機器（オプション）：ハイク セキュリティボックス（HCSB-02）、スイベルブラケット（SWB-01）、ラチェット式ストラップ
- SDカード：8～16GB
- 電池

背擦り行動誘発剤

- 油性強力木材防腐剤 クレオソート R（株式会社吉田製油所、東京都）
- プラスチック手袋、刷毛
- 雨具：塗付作業時に羽織る。色素が付着するため、作業用のものを準備した方がよい。

記録その他

- 記録用紙：付録①を参照
- GPS
- デジタルカメラ
- 注意喚起看板：調査目的であることや、連絡先を記載。ラミネートしておく。

2) ヘアトラップ設置場所および対象木の選定

けもの道が近くにある、餌となる草本などが多い沢が近くにあるなど、ヒグマが頻繁に通るような環境を選定する。付近にすでに背擦り木として使用されている木があるとよい。少なくとも、対象木の周辺は平坦であるほうがよい。トラップに併設する自動撮影カメラが日射や葉のてかりによって誤作動を起こすことを防止するためには、日当たりが良すぎず暗めの林内であること、林床にササや高茎草本が繁茂していないことが望ましい。



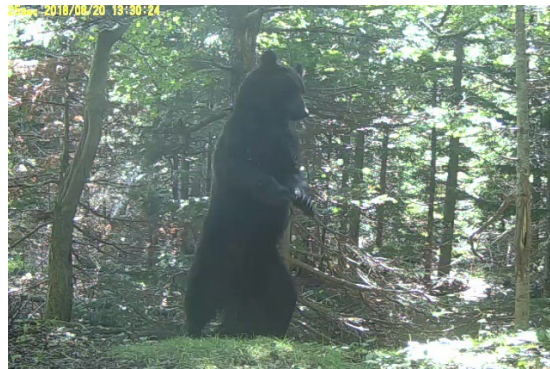
立木型ヘアトラップの設置に適した環境（作業員の横の木が対象木）

有刺鉄線を巻きつける対象木として、けもの道や林道沿いに生えているものを選ぶ。すでに背擦り木として使用された跡がある木は、特に適している。木の根元の地面は、ヒグマが立ち上がる際に支障がないよう平坦で障害物がないことが望ましく、木の全周囲がそのような整った状況であれば、背擦りする幹の面が一つに限定されないためなおよい。さらに、木は垂直で、背を擦る際に障害となる横枝が少ないとよい。但し、地面から180～230cm程度の位置に横枝があると、ヒグマがつかまり立ちしやすいので、むしろよい。木が細すぎると背擦りしづらく、複数個体の体毛が混ざってしまう恐れもあるため、胸高直径は30cm程度の太さが必要である。我々が知床半島で実施した調査では、樹種として主にアカエゾマツまたはトドマツを対象木に選定した。樹液が出ている木にはヒグマが誘引されやすく、すでに背擦り木に使われている場合もある。アカエゾマツであれば、樹皮にも体毛が付着しやすい。

対象木から6～7m（カメラの画角による；立ったヒグマの全身が映るように決める）離れた位置に、自動撮影カメラを設置できるかどうかを確認しておく。適当な樹木があればよいが、なければ杭などを立てて設置してもよい。映像に太陽光が入って不鮮明になることを防ぐため、カメラが南向きになることは避ける。

3) ヘアトラップの設置手順

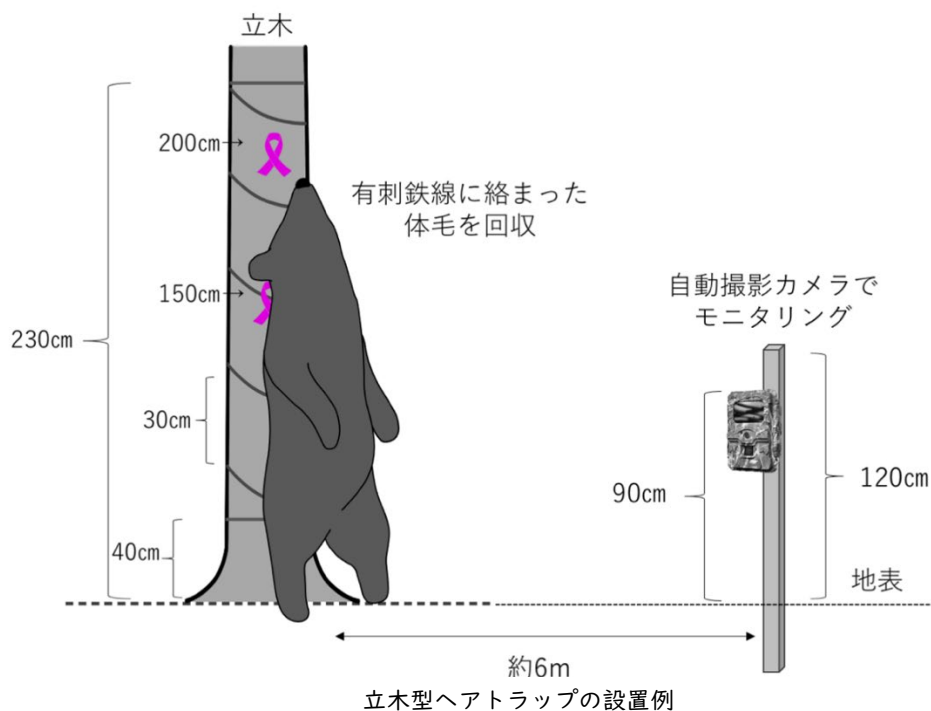
- ① 有刺鉄線の運搬・敷設時には、必ず皮手袋を着用する。また、着衣などに絡まないよう注意する
- ② 上記の条件に基づいて、ヘアトラップの設置地点、対象木および自動撮影カメラの設置場所を決定する。作業を始める前に、設置場所の環境を撮影しておく。
- ③ 下草刈りが必要な場合は、地権者の了解を得たうえで実施する。対象木の横枝も、必要であれば切り落とす。
- ④ メジャーを用いて対象木をカメラ側から計測し、地面から40cm、200cm、230cmの位置に釘などで印をつける。
- ⑤ 地面から230cmの位置に有刺鉄線を強く一周巻きつけて固定し、地面から40cmの位置まで約30cm間隔でらせん状に有刺鉄線を巻き付ける。固定して切断する。
- ⑥ 150cmおよび200cmの高さに、ピンクテープを釘で固定するなどして印を付けておく。自動撮影カメラの映像を用いてヒグマの性別年齢クラスを識別する際に、立ち上がった状態の高さが2m以上の場合は成獣オス、1.5m以下は3歳以下であることが多い、というように判断できる(参考文献⑤)。



2mの高さにピンクテープをつけたヘアトラップ(左)を、成獣オスヒグマが訪れた映像(右)

- ⑦ 背擦り行動を誘発することが知られている木材防腐剤を一部の幹に塗布する。1箇所にのみ塗布すると、そこにクマが集中して背擦りをした結果、複数個体の毛が混ざることがあるため、複数の箇所(たとえば表裏左右の4側面など)に塗布した方がよい。この際は、手袋を2重にしたり、雨具を羽織ったりするなど、防腐剤が皮膚に触れないように注意する。

- ⑧ ヘアトラップから約 6m 離れた位置に、杭や周辺の木を利用して自動撮影カメラを設置する（下図）。この際、木の根元から、230 cmの高さまでを含む領域を映すことができているか、画角を入念に調整する。ラチェット式ストラップとスイベルブラケットを使用すると、微調整が容易である。L字鋼とボルトを使用する場合や、木にベルトのみで取り付ける場合は、カメラの上部または下部に枝を挟むことで画角を調整するとよい。また、一般の人が立ち入る可能性のある地域であれば、セキュリティボックスと鍵を併用することが望ましい。
- ⑨ 周辺にササなどが繁茂していると、カメラが動きに反応して撮影頻度が極端に増加してしまうことがあるため、再度下草刈りを行う。
- ⑩ GPS 機器を用いて設置場所の緯度経度を記録するとともに、使用したカメラおよびケースの識別 ID、カメラの取り付け方法、対象木の樹種および胸高直径、カメラから対象木までの距離、地面からカメラまでの高さなどを記録しておく。設置後の写真も撮影しておく。
- ⑪ トラップの近くに、注意喚起の看板を設置する。また、トラップ地点名（ID）を記載したピンクテープなどを、カメラや付近の木に巻き付けておくとうい。
- ⑫ なお、背擦り行動を誘発する防腐剤がついた手で、カメラやその支柱を触ってはならない。ヒグマが触ったり齧り付いたりしてカメラの画角が動いたり破損したりする恐れがある。



4) 自動撮影カメラの設定

使用する機種 of 機能に合わせて設定を行う必要があるが、ここではマニュアル作成者が調査で使用した機器 (HykeCam SPI08-J) において推奨する設定を記す。

| | |
|---------------|-----------------|
| モード | 動画 |
| 解像度 | 720P (HD) |
| 撮影時間 | 25 秒 |
| センサー感度 | 低 (必要に応じて中に上げる) |
| インターバル (ディレイ) | 5 秒 |
| タイムスタンプ | ON |
| フラッシュ | 高 |
| 音声 | OFF |
| タイムラプス | OFF |
| 上書き設定 | OFF |

*撮影された映像を解析することによって、トラップを訪れたヒグマの個体情報 (体サイズ、性別、胸部斑紋など) や子連れ状況を把握することができ、何個体のヒグマが DNA 解析で検出されるのかを推定することができる。また、各個体がトラップのどの範囲に擦っていたのかを映像から確認することによって、解析に供試するサンプルを選別することができる。これらの作業 (詳細は P.17 を参照) をするための十分な情報を得るためには、静止画ではなく動画モードで撮影することが必要である。データの容量が膨大になるため、SD カード回収後のデータの保存場所 (外付け HDD など) も準備しておきたい。

*SD カードへの書き込みに時間がかかるため、実際には、設定したインターバル時間よりも長く間隔があくことがある。撮影時間を長くすると、書き込みにより長い時間がかかる。そのため、短いインターバルと長い撮影時間の組み合わせは避けたほうがよい。

3. ヘアトラップの見回りおよび体毛試料の採取方法

1) 必要な道具

| 道具 | 備考 | | | | | | | | | | |
|-------------------------|---|----|----------|-----------|--|------------|--|-----|------------------|----|--|
| プラスチック手袋 | サンプル採取用+木材防腐剤塗付用 | | | | | | | | | | |
| ピンセット | サンプル採取用 | | | | | | | | | | |
| ターボライター | ピンセットを焼く際に使用 | | | | | | | | | | |
| 封筒 | <p>1 地点につき、30 袋以上準備</p> <p>調査日、トラップ地点名、試料番号、毛の状態や量などを記載しやすいよう、予め印刷しておく（右図）</p> <table border="1" data-bbox="1054 667 1318 1111"> <tr> <td>日付</td> <td>2020 / /</td> </tr> <tr> <td>トラップサイトID</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Sample No.</td> <td></td> </tr> <tr> <td>毛根量</td> <td>あり・なし・？ 多・並・少</td> </tr> <tr> <td>備考</td> <td></td> </tr> </table> | 日付 | 2020 / / | トラップサイトID | | Sample No. | | 毛根量 | あり・なし・？ 多・並・少 | 備考 | |
| 日付 | 2020 / / | | | | | | | | | | |
| トラップサイトID | | | | | | | | | | | |
| Sample No. | | | | | | | | | | | |
| 毛根量 | あり・なし・？ 多・並・少 | | | | | | | | | | |
| 備考 | | | | | | | | | | | |
| 70%エタノール入り 15mL チューブ | 1 地点につき、10 本以上準備 樹液が付着した体毛の採取に使用 | | | | | | | | | | |
| 鉛筆（シャープペンシル） | エタノール入りチューブに記録する際、油性ペンを使用すると消えるので要注意 | | | | | | | | | | |
| 点検記録用紙 | 付録②を参照 | | | | | | | | | | |
| バーナーヘッド・ガス缶 | ガス缶と適合するか事前に確認する。夏季はガス缶を車内に放置しない | | | | | | | | | | |
| 木材防腐剤・刷毛 | | | | | | | | | | | |
| 雨具・防毒マスク | 木材防腐剤の塗付作業時に使用 | | | | | | | | | | |
| 脚立 | 小型・軽量のものがよい | | | | | | | | | | |
| しの・ペンチ | 有刺鉄線のメンテナンスに使用 | | | | | | | | | | |
| 鎌 | 下草刈りに使用 | | | | | | | | | | |
| SD カード | 見回る地点数+α準備しておく 回収後のカードと新しいカードが混ざらないよう注意 | | | | | | | | | | |
| 電池 | 設置から2~3 か月経過した時期には多めに準備する | | | | | | | | | | |
| 予備の自動撮影カメラ | 不具合があれば交換 | | | | | | | | | | |

2) 点検・試料採取手順

DNA 試料の劣化を防ぐため、また、背擦り行動誘発剤の効果を継続させるために、1～2週間に一度の頻度で見回りを行う。知床半島では、2週間に一度の頻度でも試料の採取効率や分析成功率は十分高いが、湿度や気温が高い地域では1週間以内に試料を採取しなければ劣化して分析成功率が低下する場合もある。調査を実施する地域に合わせて見回り頻度を設定されたい。

① 自動撮影カメラの簡易チェック

- 併設された自動撮影カメラの映像をチェックし、ヒグマが映っているか否か、何頭のヒグマが映っているか、各個体がトラップのどの範囲に体を擦っていたか、という情報を作業員間で共有する。

② 体毛の有無の確認

- 複数の作業員で、体毛の有無をチェックする。この際、成獣オスでは2メートルを超えた高さに体毛が付着していることもあるので、脚立を利用して確かめる。
- 有刺鉄線以外にも、木の幹や根元周辺に体毛が絡まっている場合もあるので入念に探す。また、トラップのとなりの木に背擦りをする個体も稀に存在するため、自動撮影カメラの映像を現場で確認し、どこに体毛が付着している可能性があるか見当をつけることが望ましい。自動撮影カメラにヒグマが映っていないのに体毛が付着している、ということもあるので、先入観を持たずにまんべんなく毛を探すのがコツである。



有刺鉄線に絡まった体毛



樹皮に付着した体毛をピンセットで採取する

③ 体毛の採取

- 可能であれば、試料採取者と記録者で作業を分担するとよい。
- 試料採取者はプラスチック手袋をし、有刺鉄線の棘ごとにピンセットを用いて体毛を採取し、封筒内に保存する。木の樹液が付着してベタベタしている毛は、70%エタノールを入れた15mLチューブ内に浸漬し、保存する。
- 記録者は、採取する封筒に調査日・トラップ名（トラップのID）・試料番号、毛の状態（毛根あり、なし、不明、など）、毛の数（1本、少ない、多い、など）を記録する。また「備考欄」に「シカ毛の可能性がある」「焼き残しのような形状をしている」などの情報も記録しておくことと、DNA抽出に使用する体毛を選別する際に有用である。
- 記録者は、木のどの部分から体毛を採取したのかを点検記録用紙に図示し、記録しておく（下図）。
- 異なる個体の毛の混入をなるべく避けるため、必ず一つの棘ごとに一つの封筒またはチューブに採取する。1本の毛でも解析に成功する場合があるので、毛の多い少ないで取捨選択することなく、丁寧に一つ一つの棘から採取しておくことが、後々のDNA 個体識別の精度を高めるために最も重要なことである。
- 一か所のサンプルを採取する度にピンセットアルコールで拭いたり、火で炙ったりすることを推奨しているマニュアルもある（そうすることが好ましい）が、他の位置で採取した毛が混入しなければ、同じピンセットを繰り返して使用しても特に問題はない。ただし、各トラップでの作業終了時は、使用したピンセットの先をバーナーで軽く炙った上で、次のトラップでの作業に臨むべきである。
- 1箇所での毛の採取が終わったら、すべての封筒に必要事項が記載されているか、すべてのサンプルの採取位置が記録用紙に示されているか、サンプルした総数に間違いがないか、を現場で確認する。

ルンペ調査 標識ID: 172410000 背標り木トラップ 点検記録

| | | | |
|-----|------------|------|-----|
| 期日 | 2018.10.23 | 調査員 | |
| 地点名 | ルンペ | 地点記号 | R1C |
| 天候 | 12本 | | |

見取り図: 毛の採取位置(高さ)やサンプル番号など記載のこと

| | | | | |
|------------|---|--------------------------------------|---------------------------------|-------------|
| 見回り時間 | 10:57 | カメラ種別 | Alfa Bushnell | Bushnell ID |
| カメラNo. | 23 | ケースNo. | 5 | |
| 装置 取り付け | <input checked="" type="checkbox"/> 1字横+ベルト | <input type="checkbox"/> 立木+ツイベル+ベルト | <input type="checkbox"/> 立木+ベルト | |
| SD | in R12 | 出力 | R2F | |
| 電池 | 電圧レベル OK | 交換 | Y (X) | |
| 時計 | 0分 遅れ・進み | 調整 | Y (X) | |
| クレンジグ | (Y) N | 鍵一(5)・Bushnell ID () | ・ナンバー (0) | |
| サンプル数 | 65 | 前回見回り日 | 2018.10.10 | |

| | | |
|-------|-------------|--------|
| 新規設置時 | 樹種: | 樹高直径: |
| | カメラ-背標り木距離: | カメラ高さ: |

点検記録の記入例

④ 自動撮影カメラの点検

- カメラの SD カードを交換し、使用するカードの識別 ID を記録する。
- 電池の残量目盛りを確認し、記録する。電池の残量が減ると、カメラの機種によっては夜間の撮影時間が短くなるなどの不具合が生じることがある。このため、電池の残量目盛りが 1 減った時点ですべての電池を入れ替えることを推奨する。
- 日時設定に誤りがないかを確認する。日時のずれがある場合、ずれの詳細（何分、何日遅れていた・進んでいた）を記録するとともに、修正をしたかどうかも記録する。
- 動物によるカメラへの接触や倒木によってカメラの向きが変わっている場合は、画角を調整する。

⑤ 残存試料の処理および誘発剤の塗付

- 毛が付着している可能性のある場所をガスバーナーで炙り、毛が残っていない状態にする。この行程を疎かにすると、次のセッションで同一の個体が識別された時に、毛の焼き残しによるものであるか否かを判別することが難しくなる。このため、すべての有刺鉄線を満遍なく炙るとともに、木の幹についても残存した毛がないか注意深く観察しながら、作業を行う。万が一の山火事を避けるため、高水圧で噴射できるジェットタイプの強力霧吹きに水を入れて携帯しておくこと。なお、木材防腐剤が付着した有刺鉄線や木の幹を炙った際に発生する有害ガスの吸入を防止するために、調査員は有機溶剤作業用の防毒マスクを着用するのが望ましい。
- 焼却し、毛が残っていない状態にした後、火が消えていることを確認してから木材防腐剤の塗布を行う。前回と同じ領域に、繰り返し塗布するのがよい。この際は、手袋を 2 重にしたり、雨具（色素が付着するため、作業用のものを準備した方がよい）を羽織ったりするなど、防腐剤が皮膚に触れないように注意する。また、木材防腐剤のついた手袋で自動撮影カメラを触ると匂いがうつってしまい、興味を持ったヒグマがカメラに触れ、画角がずれる原因になる。このため、防腐剤を塗る作業員と、カメラの設定をする作業員は別の方が望ましい。
- 自動撮影カメラを再び ON にしたことを、必ず複数の作業員で確認する。


⑥ 体毛の保存（DNA 抽出時まで）

- 持ち帰った試料は、風通しのよい部屋で自然乾燥させるか、乾燥機などを利用して、封筒ごと試料を乾燥させる。試料の乾燥を怠ると、細胞が劣化し、DNA 解析の成功率を著しく低下させる原因となるので、注意が必要である。高温多湿の環境（梅雨時期など）でサンプルの迅速な乾燥が難しい場合は、そのまま冷凍庫で保存する方がよい。
- 乾燥後のサンプルは、同じトラップ地点で採取したサンプルごとに輪ゴムでまとめ、解析まで冷凍庫（ $-20\sim 30^{\circ}\text{C}$ ）で保存する。常温でも保存は可能だが、この場合、シリカゲルと一緒に密封袋に入れるなどして乾燥状態を保つ必要がある。

4. 体毛 DNA の解析方法

1) 体毛試料の選別および個体識別の進め方

1 回の調査セッションにおいてトラップを訪れる個体が 1 頭のみであった場合、たとえ体毛が大量に採取されたとしても、すべてを解析に供試するのは極めて効率が悪い。一方、知床半島のように、ヒグマの生息密度が高い地域は、1 回のセッションの間に複数の個体がトラップを訪れることも多いため、採取したサンプルのうちどれを DNA 解析に使用すべきか、事前に方針を決めておく必要がある。本マニュアル作成者が行った調査では、自動撮影カメラの映像を精査した上で、新たな個体が識別される可能性が残っている限り、解析を繰り返すこととした。

- ① 各トラップに併設された自動撮影カメラの映像を解析し、ヒグマが撮影された日時および観察開始から観察終了までの時間を 1 個体（あるいは 1 組）ごとに記録する。この際、撮影されたヒグマの個体情報（体サイズ、性別など）を記録する。また、胸部斑紋を有している場合、その形状を記録しておく。子をつれている場合は、子の大きさ（ほとんどは 0 歳、1 歳のどちらか）と数を記録する。
- ② 背擦り行動（あるいは体の一部を擦る行動）が認められた場合は「背擦りあり」と記録するとともに、個体がトラップのどの範囲に擦っていたかを記録簿に図示する。背擦りが認められなかった場合は、「背擦りなし」、明瞭でなかった場合は「微妙」などと記録しておく。（次ページの  および付録②③を参照）
- ③ これらの記録をもとに、該当セッションにおいて何個体のヒグマがヘアトラップを訪れていたのか（最小～最大値）を記録する。同様に、背擦りを行った個体（つまり、DNA 解析で検出される可能性がある個体）の最低数と最大数を算出する。複数回撮影されていても、胸部斑紋などの特徴から明らかに同一個体であると判断できる場合は、重複を除く。
- ④ DNA で識別される可能性のある個体それぞれについて、擦った範囲から採取されたサンプルを選択し、DNA の抽出を行う。

2) 必要な道具および試薬

- ピンセット：毛の先をつかむのに適したもの（例：MEISTER ピンセット No.3C (3C-SA))
- DNA 抽出試薬：ISOHAIR EASY（ニッポンジーン, 1,000uL×5 本入り）
- 0.2mL PCR シングルチューブ（メーカー不問）

*毛の毛根部からの DNA 抽出を行うための市販のキットは、ISOHAIR EASY の他にも複数存在する。マニュアル作成者もかつては他の商品を使用していたが、下記の利点からこのキットに切り替えた。

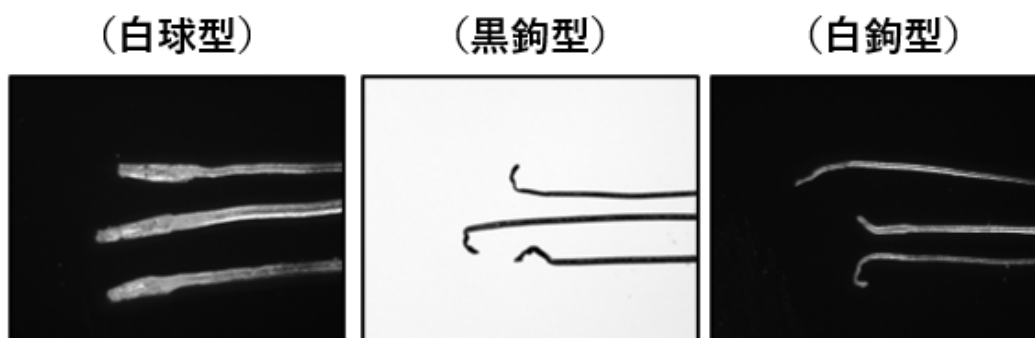
- ・カラム式 DNA 抽出キットなどに比べると、サンプルあたりにかかる費用が安い。他社キットは 1 試料の抽出に 500 円前後の費用がかかる。一方、ISOHAIR EASY は 100 回用で 15,000 円（定価）であり、下記の方法に従うと 1 試料 100 円ほど。
- ・作業行程が簡単で、所要時間が短い。
- ・溶出液をそのまま DNA 試料として PCR に使用できる（精製する必要がない）。
- ・解析成功率が高い。

3) ISOHAIR EASY を用いた DNA 抽出

- ① 0.2mL PCR シングルチューブの蓋または側面にラベリングし、ISOHAIR EASY を 30uL 入れる
※プロトコール上は 50uL だが、30uL まで減らしても問題ない
- ② 封筒に入っている体毛を紙（ソフトハンドタオルなど）の上に出し、毛を選定する。毛根が白くはっきりと見えるガードヘアが望ましい。
- ③ 毛の毛根部を 5mm 程度切り取り、0.2mL チューブ内の溶液に浸漬する。
※この際、毛が溶液内で遊離したことを目視でしっかりと確認する。冬期など乾燥している時は、毛がピンセットについたまま離れない時があるので要注意。
- ④ 最大 5 本まで、同様の作業を続ける。
※複数個体の毛が混ざる（コンタミ）心配がある場合は、数を減らす（1 本でもいい）。コンタミの心配がなく、DNA 濃度を増やしたい場合は 10 本ほど使用してもよい。

- ⑤ PCR 機などを用い、55℃ (20 分) →94℃ (10 分) →4℃ (5 分ほど) でインキュベートする。
- ⑥ チューブを軽くスピンドウンした後、なるべく毛をとらないようにしながら、溶液を保存用の 1.5mL チューブにうつす。(※毛が混入しても特に問題はない)
- ⑦ PCR に使用するまで -20~-30℃ で保存する。
- ⑧ PCR 使用時は、下記のプロトコールに従い、1uL (全量 10uL の PCR の場合) 使用する。

*コツ：毛根が明瞭な毛を選別することが、成功率を左右する一番のポイントである。毛根の形状は、春から秋にかけて白球型→黒鉤型→白鉤型に変化する（下図：参考文献⑥）。白球型の毛根が大きく目立つため使用する毛としては最も適切だが、黒鉤型・白鉤型の毛根も解析に使用できるため、よい毛を探すこと。また、明瞭な毛根が認められない毛でも、根元の部分に皮脂（あるいは汚れ）のような薄いコーティングが見られる場合もあり、このような毛から DNA 抽出が可能であることも多い。複数個体の毛が混ざっていることが想定される場合は、5 本以上使用せずに、1~2 本に留めておくことも有効である。ガードヘアの白球型の毛根であれば、1 本でも良好な結果を得られることが多い。また、細くふわっとしたアンダーファーで毛根が確認できないような毛であっても、毛根を切り取らずに溶液にそのまま浸してしまうことで、解析が成功することもある。



ヒグマの毛根に見られる 3 つのタイプ (引用文献⑥)

糞 DNA の採取と解析

1. はじめに

DNA 試料としての糞は、個体数推定に用いる以外にも、ヒグマ出没現場や農作物・家畜被害現場などにおいて個体を特定する際に極めて有用なツールとなる。しかしながら、糞から個体を特定できるという知識がない、採取道具を持っていない、あるいは採取方法がわからない、などの理由で見逃されてしまうケースも少なくない。このため、できるだけ多くの人に試料の採取方法を周知し、事前に採取道具を配付しておくことが重要である。本マニュアルでは、特殊な技術を必要とせず、道具の持ち運びやサンプル採取後の保管方法が簡単である方法を紹介する。

2. 糞試料の採取方法

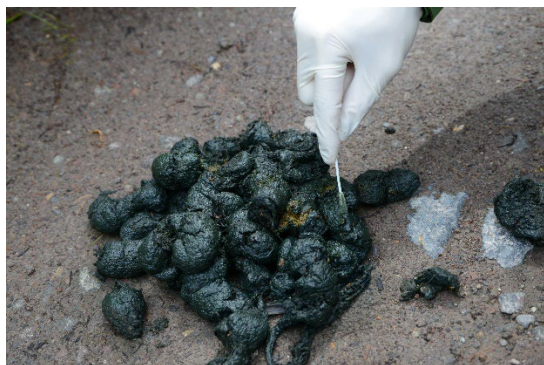
1) 必要な道具および試薬

- 2.0mL プラスチックチューブ（メーカー不問）
- Inhibitex Buffer（QIAGEN, CatNo. 19593 または QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit に含まれる）
- スワブ（下記 2 商品が望ましいが、ない場合は綿棒などでもよい）
 - ☆ フロックスワブ R30（Copan 社、株式会社スギヤマゲン、520CS01）
 - ☆ スギヤマゲン（ピューリタンメディカルプロダクトカンパニー：25-3606-H）（<https://www.sugiyama-gen.co.jp/publics/index/488/>）上記 2 商品は、スワブ先端から 3cm で切れやすくなっているため、採取後スワブの先端をチューブ内に収めることができ衛生的でお勧め。
- ☆ 代替品：スギヤマゲン（ピューリタンメディカルプロダクトカンパニー：25-3706-H, 25-3806-H, 25-3406-H, 25-3306-H）：これらはブレードポイントがないので、使用後は挟みなどで先端を切ってチューブ内に収める必要がある。

2) 試料採取手順

- ① 2.0mL チューブに、Inhibitex Buffer 1.1mL を分注しておく。
- ② 採取対象とする糞は、排泄後 3~4 日程度までのものを対象とすると解析が成功する確率が高い。個体数推定を目的とする場合は、採取する糞の基準（排泄後の経過日数など）を定めておく必要がある。ヒグマ管理上重要な試料（市街地への出没現場で発見された糞など）の場合は、少し古くても採取しておくこと、また、再解析ができるよう 1 個の糞から複数試料を採取しておくことを勧める。
- ③ 採取対象とする糞を発見した際は、日付と糞の番号をチューブの蓋および側面にマジックで記載し、発見場所を野帳などに記録する。この際、GPS 機器（スマートフォンでもよい）を用いて採取した位置の緯度経度を記録することが望ましい。また、わかる場合は糞の状況（排泄からの推定経過日、表面が乾いているか湿っているか、糞に含まれる採食物、ウジの有無、など）を記録しておく（付録④）。
- ④ 糞が新鮮で表面につや（湿り気）がある場合は、スワブの先端で糞の表面を丁寧に擦り、チューブ内の溶液内に入れる。この時、スワブの軸を回転させ、糞を溶液内に落とす。この作業を、同じスワブを使用して糞の異なる数カ所で繰り返す。最終的に、溶液の容量の 3 分の 1 から 4 分の 1 程度の量の糞を入れる。使用したスワブは先端を切り、溶液とともに 2.0mL チューブ内に入れる。

*フロックスワブ R30 およびもう一つのスワブ (25-3606-H) は、先端が折れる仕組みになっているので使い勝手がよく衛生的だが、コロナ禍の始まり以来欠品していることが多い。代替品はハサミで先端部を切る必要がある。



糞の表面をスワブで擦る



溶液内でスワブを回転させる

- ⑤ 糞の表面が乾いている場合は、糞の内側にスワブを挿入して回転させ、同じく溶液の容量の3分の1から4分の1程度の量になるよう、糞を採取する。
- ⑥ 採取した糞は、常温で数日置いても結果に影響しないが、可能であれば-20℃程度で冷凍して保管する。
- ⑦ 実際の採取方法については、下記の動画を参照されたい。

<https://youtu.be/Hr9FCfFHv0U>

<https://youtu.be/-ZhSXIAGwq0>

*コツ：糞の状態は、ヒグマが食べたものや排泄後の経過日数および天候により異なる。排泄後1日以内の新鮮な糞であれば、適当な量が採取できていれば8割以上のケースで分析に成功する。排泄後2日以上が経過し、表面が乾いている場合には、表面を擦ることに重きを置きすぎず、最終的に適当量（溶液の容量の3分の1から4分の1程度）を採取することを心がけるとよい。採取時は手袋を着用するのが望ましいが、素手で行った場合は、手をよく洗うこと。

親子連れのクマが長い時間木陰で眠ったり休んでいることがある。そんな時は、子グマのDNA試料を採取できるチャンスである。ヒグマが立ち去った後、その場に行くと明らかに細く小さい糞や体毛を採取することができる。

3. 糞 DNA の解析方法

本マニュアルの作成者は、QIAGEN 社のキット（QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit）以外を使用したことがないため、他社製品の解析成功効率については不明である。本キットを使用するメリットとしては、糞採取時に使用する Buffer（+糞）をそのまま抽出作業に持ち込める点である。ここではキット付属のプロトコールを少し改訂した方法を紹介する。

1) Fast DNA Stool Mini Kit を用いた DNA 抽出

- ① エキノコックス対策として、糞を採取したチューブを 70~80℃のヒートブロックで 1 時間加熱する。
※今までクマでの感染は報告されていないが、キツネがクマ糞の上に糞をする場合や、誤ってタヌキの糞を採取する可能性があるため。
※この間に、以降に使用するチューブのラベリングなどをしておく。
- ② 加熱後のチューブをよくボルテックスした後、スピンドウンし、ピンセットでチューブ内のスワブを摘み捨てる。この際、スワブをチューブの内壁に押さえつけ、絞り出すようにするとよい。
- ③ 蓋をしめ、最高速度（15000rpm）で 1 分間遠心。
- ④ 新しい 2ml チューブに、20ul の Protease K を入れる。
- ⑤ ③を取り出し、上清 600ul を④のチューブに移す。
- ⑥ 600ul のバッファ-AL を加え、ボルテックス・スピンドウン。その後 70℃で 10 分静置。
- ⑦ 600ul のエタノール（99.5%）を加え、ボルテックス・スピンドウン。
- ⑧ ⑦のうち 600ul をスピンカラムに入れ、最高速度（15000rpm）で 30 秒遠心。

- ⑨ ろ液の入ったコレクションチューブを捨て（ろ液はエタノール廃液として処理する）、カラムを新しいコレクションチューブに移す（または、ろ液のみを捨て、同じコレクションチューブを再利用しても可）。
- ⑩ ⑧～⑨を2回繰り返す。
- ⑪ 500ulのバッファAW1を加える（AW1に予めエタノールが入っていることを確認）。最高速度（15000rpm）で30秒遠心。
- ⑫ ろ液をすて、同じコレクションチューブにカラムをのせる。500ulのバッファAW2を加える（予めエタノールが入っていることを確認）。最高速度（15000rpm）で3分遠心。
- ⑬ カラムを新しいコレクションチューブに移し、そのまま最高速度（15000rpm）で1分遠心。
- ⑭ サンプルIDを記した1.5mlチューブにカラムをのせ、50ulのAE（またはATE）バッファを加え室温で1分以上放置。
- ⑮ 最高速度で1分遠心。1.5mLチューブ内の溶出液（約50ul）をピペットで吸い、再び同じカラムにのせ、1分放置。その後最高速度（15000rpm）で1分遠心。カラムを捨て、1.5mlチューブの蓋をしめて完成。

2) 抽出液に着色が認められる場合の精製方法

糞の内容物によっては、DNA 溶出液に着色が認められる場合がある。特に、糞の量が多すぎた場合や、ミズナラやサケ科魚類を含む糞などで生じ易い。着色が軽度である場合はその後の PCR 反応による増幅に影響を与えないこともあるが、明らかに着色がある場合は、PCR に失敗することがほとんどである。これは、ミズナラに含まれるタンニンなどの PCR 阻害物質が影響していると考えられる。このような場合、DNA 溶液を下記の方法で再精製することで、着色が消え（あるいは薄まり）、解決されることがあるため、その手法を記す。

使用するキット：FastGene Gel/PCR Extraction Kit

(日本ジェネティクス：FG-91292 又は FG-91302)

*一般的に販売されているカラム式の PCR 産物精製キットを使用しても同様の結果が得られると思うが、本キットは比較的安価であるため、例として挙げる。

- ① 溶出液 (50ul) に対して、バッファ-GP1 を 5 倍量 (250ul) 加え、ボルテックスする。
- ② 混合液をキット付属のカラムに分注し、13,000rpm で 30 秒遠心する。廃液は捨て、コレクションチューブは再利用する。
- ③ カラムの上からバッファ-GP2 を 600ul 分注し、13,000rpm で 30 秒遠心する。廃液は捨て、カラムを新しいコレクションチューブ (蓋を切り取った 1.5ml チューブでも可) に移す。
- ④ 何も入っていない状態のカラムを 13,000rpm で 2 分遠心し、メンブレンを乾燥させる。
- ⑤ 蓋にサンプル ID を記載した 1.5ml チューブにカラムを載せ替え、30ul のバッファ-GP3 をカラム内のメンブレンに入れ、室温で 2 分放置したのち、13,000rpm で 2 分遠心する。カラムを捨て、1.5ml チューブの蓋をしめて完成。

*なお、これでも着色が残る場合は、工程 3 の後に、99.5%のエタノール 600ul を加えて遠心、廃液を捨てる作業を 2 回ほど繰り返すことで解決する場合がある。また、着色度合いが特に濃い場合は、1 で加える GP1 の量を増やす (500ul) ことで全体を薄くすることでうまくいく場合もある。

その他の DNA 試料の採取と解析

体毛や糞以外にも野外からヒグマの DNA を採取できる可能性がある生体試料として、唾液、尿、およびダートバイオプシー法を用いた皮膚片が挙げられる。

1) 唾液

ヒグマの食痕に残された唾液をサンプリングする。例として、草本類などの採食跡、サケ科魚類の食べ残し、採食被害にあった農作物の食べ残し、が挙げられる。いずれも糞試料の採取に用いる Inhibitex Buffer 入りの 2mL チューブを使用できる。唾液で湿っている葉そのものを採取しチューブ内に浸漬するか、まだ唾液の湿り気が確認できる場合は糞採取時に使用するスワブで拭い、バッファー内に浸漬する。なるべく多く試料が入った方が成功率が上がるため、他の採食痕について繰り返し行う。カラフトマスなどの魚類を捕食した食べ残しや、トウモロコシの食べ跡などからも、DNA を採取できる可能性がある。糞採取で使用するスワブを用いてヒグマの唾液が付着していると思われる箇所を拭い、バッファー内に浸漬する作業を、入念に繰り返し行う。この際、魚や農作物の一部が入ってしまっても問題はないが、それらの混入はなるべく少ない方がよい。採取したサンプルは糞サンプルと同様に保存し、DNA 抽出を行う。



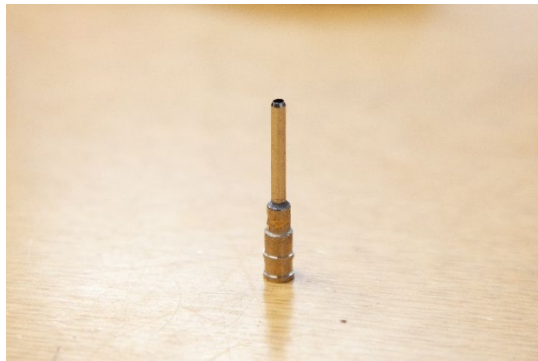
ヒグマが食べ残したサケ

2) 尿

非常に稀なケースではあるが、ヒグマの放尿が確認された際、葉などに残された尿をサンプリングすることで DNA 解析に使用できることもある。唾液と同様に、尿が付着した葉などを直接あるいはスワブを用いて Inhibitex Buffer 入りの 2mL チューブに入れ、保存と DNA 抽出を行う。

3) ダートバイオプシー法

本手法は、麻酔銃を使用して専用の注射筒をヒグマに命中させることにより、少量の皮膚片を採取するものである。使用にあたっては、車内など安全な場所から、標的となる個体の約 30 メートル以内に接近する必要があるが、知床半島など安全にヒグマに接近できる環境でのみ適応可能な手法である。このため本マニュアルでは詳説を控えるが、詳しくは[参考文献③](#)を参照して頂きたい。得られた組織片は、70%エタノールを 1mL 程度入れた 1.5mL チューブ内に浸漬し、DNA 抽出（一般的な DNA 抽出キットを使用：DNeasy Blood and Tissue Kit, キアゲン社など）を行う。場合によっては、皮膚に刺さった針先内に組織片が確認できないこともある。そのような場合は、針から組織片を入念にかき出す（たとえ目視できなくても）か、針そのものをエタノール内に浸漬した状態で持ち帰り、ボルテックスにより針ごと溶液を攪拌するなどした後針を取り出す。その後、1.5mL チューブの遠心を行い（15,000 回転、2~3 分）、慎重に上清のエタノールをデカンテーションで取り除き、沈殿物を乾燥させる。この沈殿物を DNA 抽出に用いる（一般的に用いられる組織用 DNA 抽出キットを使用）ことで、良好な解析結果を得られることがある。



ダートバイオプシーに使用する針



針から組織片を出す

マイクロサテライトマーカーによる個体識別

1. はじめに

DNA上に存在するマイクロサテライト多型領域（数塩基の繰り返し配列を含み、個体により繰り返し回数に差がある領域）を標的とした個体識別は、国内外におけるクマ類の研究において20年以上使用されている手法であり、安定した結果が得られることが確認されている。ただし、調査対象とする個体群によって、同じ多型座位であってもアレル数やアレル出現頻度が異なるなど、各マーカーの個体識別能力に差が生じるため、使用する座位と座位数は事前に検討を行う必要がある。本マニュアルでは、知床半島および周辺地域（斜里町・羅臼町・標津町・中標津町・清里町）で1998～2021年に採取された遺伝子試料に対して使用された、DNA解析プロトコルを紹介する。なお、同地域では24年間で全1288個体（2022年3月現在）が識別されている（Shimozuruら、投稿中）。

2. マイクロサテライト多型座位の選別（個体識別用）

使用する座位の条件として、1) PCRで安定した増幅が確認されること、2) アレル数・ヘテロ接合度が多く、高い個体識別力を有すること、が重要である。1) については、短いフラグメント（100bp前後）領域の方が、長いもの（200bp以上）よりもPCRによる増幅が良好であることが一般的である。ただし、増えやすい＝結果が信用できる、ということでは必ずしもないことに注意して頂きたい。また前述のように、解析に適した多型座位は個体群等により異なる。しかし、今回知床半島周辺のヒグマ個体群を対象として使用した6つのマーカーは、過去において道南地方で使用されていたもの（[参考文献②](#)）と共通しているため、北海道全域において広く適応可能であると考えられる。ここでは、計6座位を対象とし、3座位ずつのマルチプレックスPCRを行う方法を紹介する。

1) 使用する座位

下記の表に記載した6座位を使用した。知床半島およびその周辺地域で遺伝子情報を収集した1288個体を対象に、アリルの種類（フラグメントの長さ）、アリルの数、ヘテロ接合度、個体間の偶然の一致率を示したのが下の表である。アリルの長さは、マニュアル作成者が使用している機械により算出されたフラグメントの長さをもとに記載しているが、使用する機械の種類などその他の条件によって数bp変わることが多々あるので、注意して頂きたい。この6座位を使用した場合、個体間で遺伝子型が偶然一致する確率は100万頭に1頭前後であること、また同腹子で偶然一致する確率は500頭に1頭未満であることが確認された。このことは、この6座位の組み合わせが十分に高い個体識別力を有することを示している。ただし実際には、異なる個体間で同じ遺伝子型となったケースも数例存在するので、距離の離れた場所で同一個体が検出された場合などは、座位を追加して検討した方がよいだろう。

個体識別に使用する 6 座位の塩基配列

| 座位 | Multiplex | 蛍光色素 | 配列 | | 文献 |
|------|-----------|------|-----------------------------|-------------------------------|----|
| G1A | A | NED | GACCCTGCATACTCTCCTCTGATG | tail-GCACTGTCCTTGCGTAGAAGTGAC | a |
| MU05 | A | FAM | tail-GTGATTTTTCTTGTAGCCTAGG | GAACTTGTTATGGGAACCA | b |
| MU51 | A | VIC | GCCAGAATCCTAAGAGACCT | tail-AAGAGAAGGGACAGGAGGTA | b |
| MU50 | B | FAM | TCTCTGTCATTTCCCATC | tail-AAAGGCAATGCAGATATTGT | b |
| G10B | B | VIC | GCCTTTTAATGTTCTGTTGAATTTG | tail-GACAAATCACAGAAACCTCCATCC | a |
| MU23 | B | NED | GCCTGTGTGCTATTTTATCC | tail-AATGGGTTTCTTGTTTAATTAC | b |

tail- : テイルドプライマー配列が付加されていることを示す。

a) Paetkau et al. 1995, b) Taberlet et al. 1997

個体識別に使用する 6 座位のアリルの種類およびヘテロ接合度

| 座位 | アリルの長さ | アリル数 | H ₀ | H _E | P _{ID} | P _{ID-sib} |
|------|---------------------------------|------|----------------|----------------|------------------------|---------------------|
| G1A | 181/183/187/189/191/193/197 | 7 | 0.74 | 0.75 | 0.10 | 0.40 |
| MU05 | 132/134/136/138 | 4 | 0.69 | 0.73 | 0.12 | 0.42 |
| MU51 | 113/115/117/119/121/123 | 6 | 0.67 | 0.68 | 0.15 | 0.45 |
| MU50 | 198/204/208/210/214/216/224 | 7 | 0.75 | 0.73 | 0.12 | 0.42 |
| G10B | 147/156/158/163/165/167/169/173 | 8 | 0.73 | 0.78 | 0.08 | 0.38 |
| MU23 | 119/121/123/125/127/129/131/133 | 8 | 0.80 | 0.81 | 0.06 | 0.36 |
| 計 | | | | | 1.1 × 10 ⁻⁶ | 0.004 |

H₀: 観察されたヘテロ接合度, H_E: 期待されたヘテロ接合度, P_{ID}: 個体間で偶然一致する確率, P_{ID-sib}: 同腹子間で偶然一致する確率

2) Multiplex PCR 条件

① 必要な試薬

- Multiplex PCR Assay Kit Ver. 2 (Takara Bio)
他社のマルチプレックス PCR 用のキットでも使用できると思われるが、本マニュアル作成者は試した経験がないため事前の検討が必要。
- プライマー Mix (蛍光標識プライマー, Thermo Fisher Science) : 2 種類
各 3 座位 6 プライマーをそれぞれ 5 pmol/uL となるよう混合したもの
プライマー Mix A (G1A, MU05, MU51) および Mix B (MU50, G10B, MU23)

② 反応液の調整 (例)

<全量 10 uL>

| | |
|---------------------|---------|
| PCR 用水 | 3.45 uL |
| プライマー Mix (A または B) | 0.5 uL |
| キット付属のバッファー (Mix 2) | 5 uL |
| キット付属の酵素液 (Mix 1) | 0.05 uL |
| DNA サンプル溶液 | 1 uL |

③ PCR 条件

- 94°C 1 分
- 94°C 30 秒 → 55°C 30 秒 → 72°C 30 秒 : ×40 サイクル
- 72°C 5 分

④ フラグメント解析

使用するシーケンサーのマニュアルに従う。この際、プライマー Mix A と B を使用した PCR 精製物を、混合して解析に供することで、1 度に 6 座位すべての結果を得ることができる。上記の蛍光色素の組み合わせを採用すれば、同じ色素を使用した座位同士のデータが重複することなく、アリルの長さを読むことができる。

3) フラグメント解析結果の取り扱い

フラグメント解析結果の分析は、最も慎重を要する工程の一つである。特に、組織サンプルなど質・量ともに十分な DNA を得られるサンプルと異なり、毛や糞由来のサンプルは PCR での十分な増幅が得られないことも多く、不安定な結果が得られることがしばしばある。注意すべき点について以下に記す。

① 人為的なミス

同じ機械を使用していたとしても、当日のコンディション（室温など）によって、アリル長に若干（1bp 前後）のずれが生じることがある。このため、泳動時に得られるアリルの長さの値だけをもって判定すると、間違いが生じることがある。このため、必ず複数の個体のデータを同時に解析し、個体間の波形データを見比べながらアリル長を判断することを強く勧める。また、アリル長を自動で判定してくれるプログラムを使用することもできるが、不安定な解析結果については解析者本人が精査しなければならないため、使用したとしても参考程度に留めるべきである。人為的なミスとして生じうる例を下記に挙げる。

- アリル長やホモ／ヘテロの判定ミス
初心者に起こり易い。十分な経験を有する者の指導が不可欠。
- リストにない新規アリルの存在に気づかない
既出のアリルリストだけを参照すると、新規アリルを見逃すことがある。特に、既出の最も長いアリル長までをフレームに入れて解析していると、枠外にアリルが存在していた場合に気づかないという問題がある
- 結果の転記ミス（手書きで結果を転記している場合は起こることがある）
- サイズスタンダードが正しく機械に認識されていないことによる判別ミス
泳動時間が不足した場合などに生じることがある。

② DNA サンプルの質に起因して生じる問題

毛および糞由来の DNA を解析する際は、フラグメント解析で得られた波形データを注意深く精査し、解析が良好に行われたか否かを判断できる力が必要とされる。解析結果の信ぴょう性が懸念される代表例を下記に挙げる。

- 全体的にシグナル（波）が弱く、多くの座位でホモザイゴートと判定される場合本来存在するはずのアリルが増幅していない可能性が考えられる。
- 解析座位のうち一部の座位で波形シグナル（DNA 増幅）が認められない場合増幅した座位の結果についても注意が必要。
- 2つのアリルのうち、アリル長の短いアリルのシグナルが、長いアリルよりも低い

短いアリルは長いアリルより増幅しやすい。解析が良好であった場合、たとえ数 bp の違いであっても短いアリルのシグナル強度が強くなる。

*上記のように解析に難があると考えられた場合、とりうる方針をまとめ、解析者間で共有しておく必要がある。最も保守的な方法は「解析から外す」ことである。特に6座位中半数以上の座位が増幅しない場合は、再解析しても安定的な結果が得られないことがほとんどであるため、除外することが望ましい。一方、1~2座位のみ増幅が認められない、あるいは波形に難があるなどのケースでは、再解析により遺伝子型を決定できる場合がある。2回目のマルチプレックス PCR (Mix A および Mix B) を実施し、前回得られたデータと比較を行う。この際、初回で得た遺伝子型（増幅が不安定であった座位を除く）と2回目の解析結果が大きく食い違う場合は、遺伝子型を決定することが難しいと判断し解析から外す。特定の座位のみ安定した結果が得られない場合は、その座位のみを標的としたシングル PCR を行うことにより、問題が解決されることもある。

③ 遺伝子型の照合

得られた遺伝子型は、エクセルファイルにとりまとめ管理を行う。すでに識別個体のデータの蓄積がある場合は、解析ソフトウェア（CERVUS: [参考文献⑦](#)，あるいは GENECAP: [参考文献⑧](#)）などを用いて、過去に識別された個体との遺伝子型の類似性を確認する。特に、再解析で遺伝子型を決定したサンプルが新規個体と判定された際は、遺伝子型が類似した個体（1～2 座位のみ解析結果が異なる個体）と比較し、必要に応じて該当座位をシングル PCR により再解析するなど注意を払う必要がある。

④ ミスを防ぐための対策

遺伝子を決定する際に生じるミスを低減するために、下記の対策を講じることを強く勧める。

- 複数人が独立して同じデータを解析する。これが難しい場合は、同一人物が違う日に同じデータを解析しなおす。（ダブルチェック）
- 新規個体については、座位数を追加して解析を行い、既知の個体の中に遺伝子型が近い個体がないかどうか、解析ソフト（CERVUS など）を用いて検証する。例えば 21 座位中 2 座位のみ異なる、という個体があった場合、不一致が見られた座位をシングル PCR で再度解析して精査する。

3. その他のマイクロサテライト多型座位および性判別マーカー

上記に述べた個体識別用の 6 座位の他に使用可能な 15 座位、および性判別マーカー（アメロゲニン遺伝子）についてプライマーリスト等の情報を記載する。なお、マルチプレックス PCR の条件は上記 6 座位と同じである。計 21 座位の遺伝子型データを使用すれば、個体間の血縁関係についても高精度で推定することが可能である。

その他のマイクロサテライト多型マーカーおよび性判別マーカー

| 座位 | Multi-plex PCR | フラグメント解析 | 蛍光色素 | 配列 | 文献 | アリルの長さ | アリル数 | |
|------------|----------------|----------|------|---------------------------|----------------------------------|--------|-------------------------------------|---|
| G10X | C | C & E | FAM | tail-CCACCTTCTTCCAATTCTC | TCAGTTATCTGTGAAATCAAAA | c | 181/187/189/191 | 4 |
| G10P | C | C & E | VIC | AGGAGGAAGAAAGATGGAAAAC | tail-TCATGTGGGGAAATACTCTGAA | a | 141/160/162/164/166/172 | 6 |
| G10C | C | C & E | NED | AAAGCAGAAGGCCTTGATTTCTG | tail-GGGGACATAAACACCGAGACAGC | a | 103/105/109/111/113 | 5 |
| G10M | D | D & F | FAM | TTCCCCTCATCGTAGGTTGTA | tail-TTTCCAATAATTTAAATGCATCC | a | 196/200/206/208/210/214 | 6 |
| MU09 | D | D & F | VIC | tail-TTGAAGTTCAGGGTAAATGC | ATATAGCAGCATATTTTTGGCT | b | 131/139/141/143/147 | 5 |
| MU59 | D | D & F | NED | GCTCCTTTGGGACATTGTAA | tail-GACTGTCACCAGCAGGAG | b | 107/109/121/125/127/129 | 6 |
| MU61 | E | C & E | VIC | ACCCAGAGAAGTCCGATTAC | tail-CTGCTACCTTTCATCAGCAT | b | 206/210/212 | 3 |
| G1D | E | C & E | NED | GATCTGTGGGTTTATAGGTTACA | tail-CTACTCTTCTACTCTTTAAGAG | a | 178/180/184/186 | 4 |
| MU10 | E | C & E | FAM | TTCAGATTTTCATCAGTTTGAC | tail-CAGCATAGTTACACAAATCTCC | b | 124/134/136/138 | 4 |
| UamD2 | F | D & F | VIC | ACACCTGTCTTCCCTTCCTAAC | tail-TTCCATCTGAGAGGCTGAAC | d | 200/204/208/212/216 | 5 |
| UamB5 | F | D & F | NED | CCGGTGGATCTATCTCAGAGT | tail-GGGATCTGTCTATCCTGCTC | d | 148/153/157/161 | 4 |
| MU26 | G | G & H | VIC | GCCTCAAATGACAAGATTTTC | tail-TCAATTAATAAGGAAGCAGC | b | 188/192/194/196 | 4 |
| G10L | G | G & H | NED | GTA CTGATTTAATTCACATTTCCC | tail-GAAGATACAGAAACCTACCCATGC | a | 142/158/162/166/168/170/172/174/176 | 9 |
| G10H | H | G & H | FAM | tail-CAACAAGAAGACCACTGTAA | AGAGACCACCAAGTAGGATA | c | 219/221/227/229/233/237/241/255 | 8 |
| Cxx20 | H | G & H | VIC | AGCAACCCTCCCATTACT | tail-GTTTCTTTTGATCTGAATAGCTCTGCG | e | 135/139/141/143/145/147/149/151/153 | 9 |
| 性判別 | | | | Forward (蛍光プライマー) | Reverse | | | |
| Amelogenin | F | D & F | PET | CAGCCAAACCTCCCTCTGC | CCCGCTTGGTCTTGTCTGTTGC | f | メス (249のみ) オス (196/249) | |

フラグメント解析：PCR産物CとE、DとF、GとHは混合してフラグメント解析に用いることが可能

tail-：テイルドプライマー配列が付加されていることを示す。Amelogeninプライマーには不使用

a) Paetkau et al. 1995, b) Taberlet et al. 1997, c) Paetkau et al. 1998, d) Meredith et al. 2009, e) Ostrander et al. 1993, f) Yamamoto et al. 2002

6. 参考文献

1. 「クマ類の個体数推定法の開発に関する研究」(平成21~23年度、環境省環境研究総合推進費、米田政明代表) (http://www.bear-project.org/pdf/houkoku/H21Suishinhi_BearReportv31_unification_Revised1.pdf)
2. 「環境情報を活用した遺伝子マーカーによる個体識別を用いたヒグマ生息密度推定法の開発」(平成23~25年度、地方独立行政法人北海道立総合研究機構) (http://www.hro.or.jp/list/environmental/research/ies/katsudo/shizen_kankyo/bear_density_estimation/)
3. 「知床半島先端部地区におけるヒグマ個体群の保護管理、および、羅臼町住民生活圏へ与える影響に関する研究」下鶴倫人・山中正実, 知床博物館研究報告特別号 2: 95-120, 2017年
4. “Evaluation of the effectiveness of scented wooden posts for DNA hair snagging of brown bears” Sato Y., Nakamura H., Kobayashi K., Sekiguchi M, Ishibashi Y., and Itoh T. *Mammal Study* 45(3): 1-6, 2020.
5. “Diel and monthly activity pattern of brown bears and sika deer in the Shiretoko Peninsula, Hokkaido, Japan” Kawamura K., Jimbo M., Adachi K., Shirane Y., Nakanishi M., Umemura Y., Ishinazaka T., Uno H., Sashika M., Tsubota T., and Shimozuru, M. *under review*.
6. “Hair growth in brown bears and its application to ecological studies on wild bears” Jimbo M., Matsumoto N., Sakamoto H., Yanagawa Y., Torii Y., Yamanaka M., Ishinazaka T., Shirane Y., Sashika M., Tsubota T. & Shimozuru M. *Mammal Study* 45: 337-345, 2020.
7. “Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment” Kalinowski ST., Taper ML., & Marshall TC. *Molecular Ecology*, 16(5): 1099-1106, 2007.
8. “GENECAP: a program for analysis of multilocus genotype data for non-invasive sampling and capture-recapture population estimation” Wilberg MJ. and Dreher BP. *Molecular Ecology Notes*, 4: 783-785, 2004.

(独) 環境再生保全機構・環境研究総合推進費
遺産価値向上に向けた知床半島における大型哺乳類の保安全管理手法の開発
(課題番号 4-1905)

DNA 個体識別技術を利用したヒグマ調査マニュアル

～非侵襲的試料を用いた DNA 解析の成功率向上を目指して～

2022 年 3 月 31 日 第一版

問い合わせ先：下鶴 倫人（しもづる みちと）
国立大学法人 北海道大学 大学院獣医学研究院
〒060-0818 札幌市北区北 18 条西 9 丁目
電話：011-706-7188
メール：shimozuru@vetmed.hokudai.ac.jp

付録：記録様式集

- ① 背擦り木トラップ 設置時記録用紙
- ② 背擦り木トラップ 点検記録用紙
- ③ 背擦り木トラップ 映像記録用紙
- ④ 糞・毛 採取記録用紙

立木型ヘアトラップ設置時 記録用紙

| | | | | | |
|------|--|-----|--|----|--|
| 設置日 | | 時間 | | 天気 | |
| 調査員 | | | | | |
| 地点ID | | 地点名 | | | |

| | | | |
|---------------------|---|--------|--------|
| GPS位置情報 (WPのみで可) | GPS WP : | | |
| | 緯度 : | 経度 : | |
| カメラNo. | | ケースNo. | |
| カメラ取り付け | <input type="checkbox"/> L字鋼+ボルト <input type="checkbox"/> 立木+スイベル+ベルト <input type="checkbox"/> 立木+ベルト | | |
| SDカードNo. | | ボックス鍵 | なし・あり |
| 樹種 | | 胸高直径 | cm |
| カメラ~背擦木距離 | m | カメラ高さ | m |
| 林道の鍵 | 要 (No.) ・ 不要 | 草刈り | 要 ・ 不要 |
| アクセス留意事項 | | | |
| 備考 | | | |

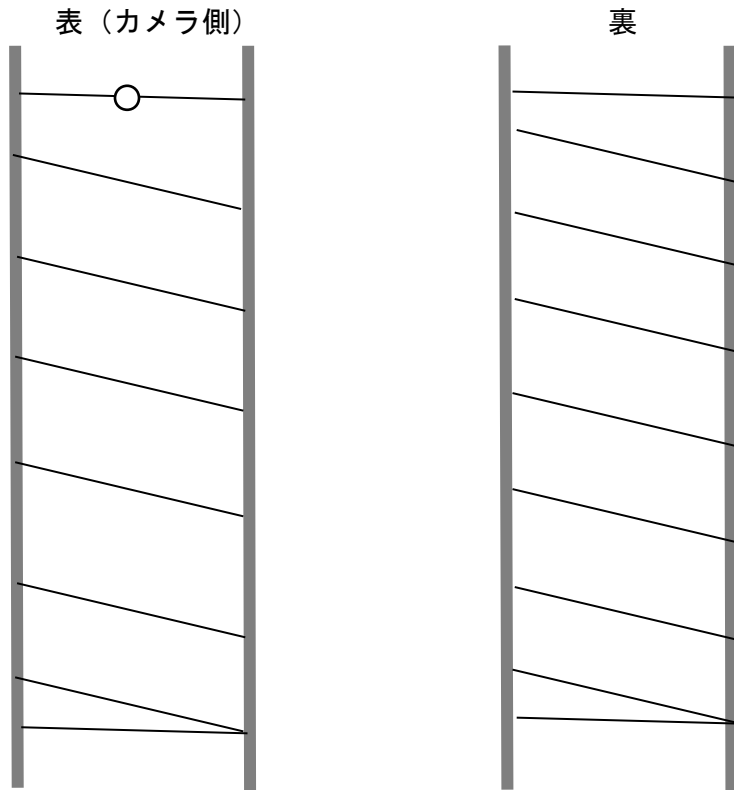
作業確認チェックシート

- カメラは南をむいていませんか？
- カメラの設定を確認しましたか？
- SDカードを入れ、ナンバーを記録しましたか？
- SDカードを入れ、動画の試し撮りをしましたか？
- 画角（根本～230cmまで）を確認しましたか？
- カメラをONにしましたか？
- 周辺の笹や背の高い草を刈りましたか？
- クレオソートをぬりましたか？
- 【調査中】の看板は設置しましたか？
- ピンクテープに地点コードを記入しカメラにつけましたか？

立木型ヘアトラップ 点検記録

| | | | | | |
|------|--|-----|--|----|--|
| 期日 | | 調査員 | | | |
| 地点ID | | 地点名 | | 天候 | |

見取り図： 毛の採取位置(高さ) やサンプル番号など記載のこと



| | | | | | |
|---------|---------|------------------|----------------|---|----------------------------|
| 見回り時間 | : | 【最後に確認！】 | | | チェック欄 |
| カメラ No. | | カメラの電源をONにしましたか？ | | | → <input type="checkbox"/> |
| SD | in | | out | | |
| 電池 | 電圧レベル | | 交換 | Y | N |
| 時計 | 分 遅れ・進み | | 調整 | Y | N |
| クレオ追加 | Y | N | 鍵→ なし・あり(No.) | | |
| サンプル数 | | | 前回見回り日 | | |
| ヒグマ映り込み | Y | N | | | |
| 備考 | | | | | |

立木型ヘアトラップ・映像記録シート（ヒグマ）

解析者

解析日

| | | | |
|------|--|---------|--|
| 地点ID | | サンプル回収日 | |
| 最小頭数 | | 最大頭数 | |
| メモ | | | |

| ヒグマ | 映像番号 | | 時刻 | | 背擦り | 大きさ | 性別 | 子連れ | 同一個体 | 備考 |
|-----|------|----|----|----|--------|--------------|--------|-----|------|----|
| | 開始 | 終了 | 開始 | 終了 | | | | | | |
| ① | | | | | 有・無・微妙 | 成獣・亜成獣・1歳・0歳 | M・F・UK | | | |
| ② | | | | | 有・無・微妙 | 成獣・亜成獣・1歳・0歳 | M・F・UK | | | |
| ③ | | | | | 有・無・微妙 | 成獣・亜成獣・1歳・0歳 | M・F・UK | | | |
| ④ | | | | | 有・無・微妙 | 成獣・亜成獣・1歳・0歳 | M・F・UK | | | |
| ⑤ | | | | | 有・無・微妙 | 成獣・亜成獣・1歳・0歳 | M・F・UK | | | |
| ⑥ | | | | | 有・無・微妙 | 成獣・亜成獣・1歳・0歳 | M・F・UK | | | |
| ⑦ | | | | | 有・無・微妙 | 成獣・亜成獣・1歳・0歳 | M・F・UK | | | |
| ⑧ | | | | | 有・無・微妙 | 成獣・亜成獣・1歳・0歳 | M・F・UK | | | |
| ⑨ | | | | | 有・無・微妙 | 成獣・亜成獣・1歳・0歳 | M・F・UK | | | |
| ⑩ | | | | | 有・無・微妙 | 成獣・亜成獣・1歳・0歳 | M・F・UK | | | |
| ⑪ | | | | | 有・無・微妙 | 成獣・亜成獣・1歳・0歳 | M・F・UK | | | |
| ⑫ | | | | | 有・無・微妙 | 成獣・亜成獣・1歳・0歳 | M・F・UK | | | |
| ⑬ | | | | | 有・無・微妙 | 成獣・亜成獣・1歳・0歳 | M・F・UK | | | |
| ⑭ | | | | | 有・無・微妙 | 成獣・亜成獣・1歳・0歳 | M・F・UK | | | |
| ⑮ | | | | | 有・無・微妙 | 成獣・亜成獣・1歳・0歳 | M・F・UK | | | |
| ⑯ | | | | | 有・無・微妙 | 成獣・亜成獣・1歳・0歳 | M・F・UK | | | |
| ⑰ | | | | | 有・無・微妙 | 成獣・亜成獣・1歳・0歳 | M・F・UK | | | |
| ⑱ | | | | | 有・無・微妙 | 成獣・亜成獣・1歳・0歳 | M・F・UK | | | |
| ⑲ | | | | | 有・無・微妙 | 成獣・亜成獣・1歳・0歳 | M・F・UK | | | |
| ⑳ | | | | | 有・無・微妙 | 成獣・亜成獣・1歳・0歳 | M・F・UK | | | |

※成獣オスと判断した場合は、その根拠を備考欄に記すこと。

例) 立ち上がった際の高さが200cm以上、生殖器がみえた、明らかに体が大きい、等

※子連れ状況：C（当歳）、Y（一歳）を何頭つれているか記入する。子がない場合は「単独」と記入する。

例) 当歳2頭連れ=C2、一歳1頭連れ=Y1、など

| |
|---------------|
| 解析する体毛サンプルNo. |
| |

ヒグマ糞・毛 採取記録

| | | | | | | | | |
|---------|--|----|----|-------------|--|-----|--|--|
| 期日 | | 時刻 | | 天候 | | 調査員 | | |
| GPS機No. | | | 地区 | S・R・SB・M・HU | | | | |

地区(斜里=S、羅臼=R、標津=SB、岬=M、HU=ルシヤ)に加え、地区詳細を記入

| サンプルID | 糞No. | GPS WP | 採取状況、備考 | 魚臭 | DNA サンプル | 糞採集 サンプル | 糞のときのみ記入 | | GPSTラック データの有無 |
|--------|------|--------|---------|-----|-------------|-------------|----------|------------------|-------------------|
| | | | | | | | 新旧 | 内容物(食物種名+推定容量比%) | |
| | | | | Y・N | Y・N | Y・N | | | |
| | | | | Y・N | Y・N | Y・N | | | |
| | | | | Y・N | Y・N | Y・N | | | |
| | | | | Y・N | Y・N | Y・N | | | |
| | | | | Y・N | Y・N | Y・N | | | |
| | | | | Y・N | Y・N | Y・N | | | |

| | |
|----|--|
| 備考 | |
|----|--|

採取状況は、例) 通勤中、休日に〇〇林道で散策中などなにをしていたか分かるように記載してください。
GPS WPがない場合は、地点を落とした地図を添付 または 緯度経度(10進法)を記入すること。