



あたらしい 林業技術

No.602

ニホンジカ雌雄判別キットの開発 —毛根 DNA による判別方法—

平成 26 年度

—静岡県経済産業部—

要 旨

1 技術、情報の内容及び特徴

- (1) 1時間以内に簡易に行える遺伝子診断技術によるニホンジカ雌雄判別方法を開発しました。
- (2) 毛根がついている毛が1本あれば判別可能です。
- (3) 本方法は高価なDNA分析装置が不要です。
- (4) 雌雄の捕獲単価に差額をつけた場合の行政側の雌雄確認方法として効率的です。

2 技術、情報の適用効果

雌雄の捕獲単価に差額をつけた場合、捕獲者が下顎などを一箇所へ郵送すれば、雌雄確認が一度にできます。そのため、捕獲毎に現地で行う雌雄確認作業がなくなり、効率的に雌ジカの捕獲を進めることができます。

3 適用範囲

雌雄の捕獲単価に差額をつけ、雌ジカを効率的に捕獲したい地域

4 普及上の留意点

毛根の腐敗、他個体の血液等が検体に混入した場合、検査が正確にできないことがあります。

目 次

はじめに	1
1 開発の背景	1
2 雌雄判別方法	1
(1) 道具の準備	1
(2) 検体の準備	3
(3) 毛根からの DNA 抽出	3
(4) 雌雄判別	4
おわりに	5

はじめに

増えすぎたニホンジカの個体数を削減するためには、子を産む雌ジカの捕獲を進めることが必要です。その対策の一つとして、雌ジカの捕獲報奨費を雄ジカよりも高く設定することで、雌ジカの捕獲を促進させる方法が考えられます。そのためには捕獲個体の雌雄確認が必要になりますが、捕獲個体の中には雌雄判別が難しい損傷個体の存在や、捕獲個体が多い場合は現地確認が対応できない問題等が発生します。そこで、体毛から簡易に雌雄判別ができる“ニホンジカ雌雄判別キット”を株式会社ニッポンジーンと共同開発しました。

1 開発の背景

静岡県自然保護課が所管する野生鳥獣緊急対策事業において、捕獲報奨費を雄 8,500 円/頭に対し雌 12,500 円/頭とすることで、雌ジカの捕獲促進を図る予定でしたが、報奨費の支払いには、行政として捕獲予定数約 4,200 頭の雌雄確認する方法が課題でした。そこで、現行の捕獲頭数確認で捕獲個体の一部（下顎や耳）が一箇所に集められていることから、畜産分野で実用化されている牛受精卵の性判別キットをニホンジカに転用できないか検討を行いました。この方法は、牛の受精卵細胞から DNA 抽出し、Y 染色体上にある *SRY* 遺伝子と X 染色体上にある *ZFX* 遺伝子の塩基配列を、LAMP 法という一定温度で迅速かつ特異的な DNA の増幅を行う方法です。抽出 DNA に対象の遺伝子配列が存在すれば、試薬が白濁（発色）する仕組みです。雄の場合、X 染色体と Y 染色体を検出する試薬が発色します。雌の場合、X 染色体を検出する試薬のみが発色します。

2 雌雄判別方法

（１） 道具等の準備

ア シカ雌雄判別キット（㈱ニッポンジーン、製品コード：NE0141）

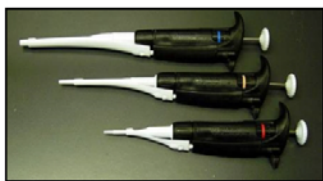


図1 シカ雌雄判別キット

イ マイクロピペット：200～1000 μ l、10～200 μ l、0.5～10 μ l を各1ケ

多検体を検査するときには8連マイクロピペット（0.5～10 μ l）と連続分注機があると便利です。

● マイクロピペット
(0.5-10 μ l、10-100 μ l、200-1,000 μ l)



● 8連ピペット（0.5-10 μ l）



● 連続分注機

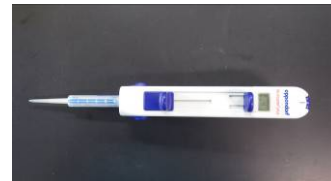


図2 マイクロピペット類

マイクロピペットの取扱い経験が浅い場合、フィルター付マイクロチップを使用することで、汚染を防ぐことができます。

●フィルター無マイクロチップ



●フィルター付マイクロチップ



図3 マイクロチップ

エ マイクロチューブ

多検体を検査するときには8連マイクロチューブが便利です。

●マイクロチューブ
(1.5 ml あるいは 2.0 ml)



●8連マイクロチューブ
(0.5ml)



図4 マイクロチューブ類

オ 使い捨て手袋

カ インキュベータ（恒温器）

ウォーターバス、ヒートブロック、サーマルサイクラー、エアーインキュベーター等、64℃、80℃、94℃それぞれを保持する機器が必要です。機器が無い場合、電気ポット又は2層構造の水筒と温度計で代用できます。多検体を処理する場合は、サーマルサイクラーが便利です。



●ヒートブロック



●機器がない場合は電気ポットと水筒など



●サーマルサイクラー

図5 加温に必要な道具

キ ピンセット

下顎から毛を抜くときに使用します。先が平らなものが便利です。

ク 氷（クラッシュアイス）

試薬を保冷するために使用します。

ケ ポリエチレン袋

ごみ類を捨てるため使用します。

コ エタノール

下顎に泥や血液がついていた場合、70%エタノールで洗浄します。

サ ペーパータオル

洗浄した下顎の水分を拭き取ります。

シ マジック

マイクロチューブのナンバリングに使用します。

(2) 検体の準備

ア 検体の解凍

下顎が凍結している場合、検査に必要な毛根を抜くことができないため、常温に12~24時間放置して解凍します。検査結果と下顎の整合性が取れるように、ナンバーテープなどでサンプル袋へナンバリングします。



図6 ナンバーテープを付けた検査検体

ナンバーテープをサンプル袋にホッチキス等で止めること。マジックは消えてしまう可能性が高いので使用しない。

イ 検体の洗浄

下顎が泥や血液により汚れていると検査できない場合があるので、汚れが目立つ場合は水や70%エタノールで下顎を洗浄し、水分をペーパータオルで拭き取ります。

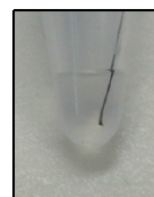
(3) 毛根からのDNA抽出

ア Deer 抽出液の準備

常温に放置し融解させます。1頭あたり50 μ lのDeer抽出液を、検査予定数分を事前に番号を記したマイクロチューブに分注します。

イ 毛根の採取

下顎より黒く長い体毛1本をピンセットで抜き、毛根がマイクロチューブ中のDeer抽出液に完全に浸かるように入れ、蓋をします。蓋からはみ出ている毛は切り落とします。



毛根が確実に抽出液に浸かっていることを確認する。

図7 毛根の採取とDNA抽出

ウ 64℃で5分保温

64℃で保温することでDNAを抽出します。

エ 94℃で5分間保温（シカゲノムDNAとする）

94℃で保温することでDNA抽出するための酵素反応を停止させます。

（4）雌雄判別

ア 検査液の作製

下表に示した検査液をまとめて作製し、1検査あたり16μlを分注します。

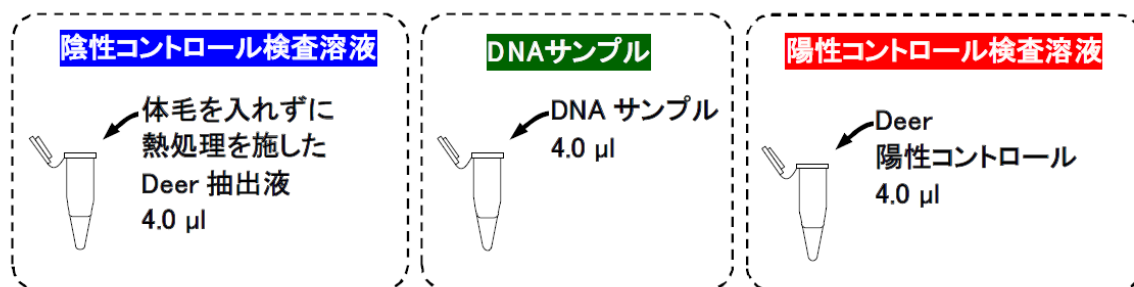
【注意】キット付属の試薬を原液から取り分けるときに、他の原液と混ざらないようにマイクロチップを交換ながら行います。1テストあたりを調整する場合、Deer検査液①から14.4μl、蛍光発色液を0.8μl、Deer酵素液を0.8μl取りますが、それぞれマイクロチップは交換ながら原液を取ります。

試薬	1テストあたり	24+1テスト*	48+2テスト*
Deer検査液① あるいは Deer検査液②	14.4 μl	360.0 μl	720.0 μl
蛍光発色液	0.8 μl	20.0 μl	40.0 μl
Deer酵素液	0.8 μl	20.0 μl	40.0 μl
検査溶液合計	16.0 μl	400.0 μl	800.0 μl

* 分注時の液量の不足を防ぐため、1から2テスト分多めに作製する。

コントロールとDNAサンプルを以下のとおり添加します。

【注意】陰性コントロール、陽性コントロール、DNAサンプルを添加するとき、他の検査液と混ざらないようにマイクロチップを交換しながら行います。マイクロチップを交換しないで作業を行うと、前に作業したDNAサンプルが混入する恐れがあります。



イ 64℃で30分保温

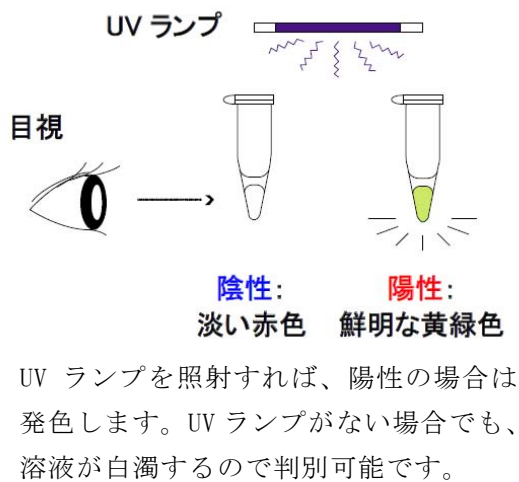
64℃で保温することで検査反応が始まります。

ウ 80℃で5分間保温する

80℃で保温することで検査反応を停止させます。

エ 判定

下図の発色パターンで雌雄判別を行います。Deer 検査液①が発色せず、Deer 検査液②が発色すれば、体毛は雌由来と判定されます。Deer 検査液①及び②が発色した場合、体毛は雄由来と判定されます。どちらも発色しない場合、DNA 抽出ができていないか、シカ以外の体毛である可能性があります。



発色パターン	I	II
Deer 検査液① 検査溶液	陽性 	陰性 
Deer 検査液② 検査溶液	陽性 	陽性 
判定	オスと判定	メスと判定

おわりに

静岡県において、ニホンジカの管理捕獲による捕獲頭数は平成 13 年度より増加傾向にあり、平成 25 年現在 3,400 頭/年となっています。しかし、ニホンジカによる農林産物被害や環境への影響は抑えられていないのが現状です。

平成 22 年度の調査では、シカを目撃頭数は雄 4 割に対し雌 6 割ですが、捕獲頭数は雌雄とも同数となっており、雌ジカ捕獲割合を高めることが行政上の課題でした。平成 26 年度より県自然保護課では、本キットを活用して雌雄の捕獲単価に差額をつけた管理捕獲を実施します。雌ジカの捕獲割合が高まれば、県内市町や他府県でも活用されることが期待できます。

本内容は、新成長戦略研究「イノシシと戦う集落づくりと森林づくりに必要なシカ管理に関する研究（平成 25 度～）」により得られた研究成果です。

農林技術研究所森林・林業研究センター 森林育成科 主任研究員 山田晋也

発行年月：平成２７年３月
編集発行：静岡県経済産業部振興局研究調整課

〒４２０－８６０１
静岡市葵区追手町９番６号
TEL ０５４－２２１－２６７６

この情報は下記のホームページからご覧になれます。
<http://www.pref.shizuoka.jp/sangyou/sa-130a/>

