

フィリピンに生息する絶滅危惧水牛タマラオ  
(*Bubalus mindorensis*) の保全に関する調査研究

筑波大学大学院

生命環境科学研究科

博士（農学）学位論文

石 原 慎 矢

## 目次

第 1 章 緒言 .....	1
第 1 節 タマラオの分布と特性 .....	1
第 2 節 タマラオの保全に関する IUCN およびフィリピン政府の取組み ....	4
第 3 節 本研究の目的と構成 .....	7
第 2 章 イグリット保護区におけるタマラオの生態調査 .....	11
第 1 節 イグリット保護区におけるタマラオの個体数変動 .....	11
2-1-1 目的 .....	11
2-1-2 材料および方法 .....	12
2-1-3 結果 .....	18
2-1-4 考察 .....	19
2-1-5 小括 .....	25
第 2 節 イグリット保護区におけるタマラオの行動習性調査 .....	36
2-2-1 目的 .....	36
2-2-2 材料および方法 .....	37
2-2-3 結果 .....	37
2-2-4 考察 .....	39
2-2-5 小括 .....	42
第 3 章 イグリット保護区以外の地域におけるタマラオの生息状況	50
第 1 節 アルヤン保護区におけるタマラオの生息調査 .....	50
3-1-1 目的 .....	50
3-1-2 材料および方法 .....	51
3-1-3 結果 .....	52

3-1-4	考察.....	53
3-1-5	小括.....	55
<b>第2節</b>	<b>カラビテ保護区におけるタマラオの生息域調査.....</b>	<b>62</b>
3-2-1	目的.....	62
3-2-2	材料および方法.....	62
3-2-3	結果.....	64
3-2-4	考察.....	64
3-2-5	小括.....	66
<b>第4章</b>	<b>糞DNAを用いたタマラオの生態情報調査.....</b>	<b>72</b>
<b>第1節</b>	<b>糞から抽出したDNAを用いたタマラオ同定法の検討.....</b>	<b>72</b>
4-1-1	目的.....	72
4-1-2	材料および方法.....	73
4-1-3	結果.....	77
4-1-4	考察.....	77
4-1-5	小括.....	81
<b>第2節</b>	<b>タマラオ集団のmtDNA上のD-loop配列を用いた集団遺伝学的解析.....</b>	<b>85</b>
4-2-1	目的.....	85
4-2-2	材料および方法.....	85
4-2-3	結果.....	88
4-2-4	考察.....	89
4-2-5	小括.....	92
<b>第5章</b>	<b>総合考察.....</b>	<b>99</b>

摘要.....	111
英文要約.....	114
謝辭.....	118
引用文献.....	120

## 第1章 緒言

### 第1節 タマラオの分布と特性

#### (1) タマラオの生息地と個体数

タマラオ (*Bubalus mindorensis*) は、フィリピン共和国 (以下、フィリピン) のミンドロ島にのみ生息する小型の野生スイギュウである (図 1-1)。国際自然保護連合 (International Union for Conservation of Nature and Natural Resources: IUCN) のレッドリストによれば、タマラオの生息地はミンドロ島中央に位置するイグリット・バコ山国立公園 (Mount Iglit-Baco National Park, 総面積 75,445ha) 内のイグリット地区に設置されたタマラオ保護区 (Tamaraw conservation area, 16,000ha; 以下、イグリット保護区)、イグリット保護区に隣接するアルヤン・マラティ山タマラオ保護区 (Mount Aruyan-Malati Tamaraw Reservation、以下、アルヤン保護区)、ミンドロ島北部に位置するカラビテ山野生動物保護区 (Mount Calavite Wildlife Sanctuary、以下、カラビテ保護区) の3カ所に限定され (図 1-2)、全個体数は約 300 頭でそのほとんどがイグリット保護区に生息し、他の2つの保護区に生息するタマラオはいずれも 20 頭以下と推定されている (Hedges et al., 2013)。さらに同報告では、ミンドロ島全体のタマラオの成熟個体数は 250 頭以下で、全体の 90%以上がイグリット保護区の単一集団に属し、今後 3 世代もしくは 30 年間に 25%の個体数減少が予測されるとし、これらのリスク評価 (C1+2a(ii)に相当) に基づき、タマラオを最も危険度の高い絶滅危惧 IA 類 (Critically endangered: CR) に分類するとともに、適切な生息地の保全対策、タマラオの生活史等に関する学術的な情報収集の必要性を指摘している。

かつてタマラオはミンドロ島の至る所で観察され、焼き畑農業を営むミンドロ島の原住民である Mangyan と共生していたと考えられている (Everett,

1878; Steere, 1888)。しかしながら、ヴィサヤ系住民（ヴィサヤノス）による移住と開発に伴う森林減少、タマラオの乱獲、および牛疫の伝播により急速に個体数が減少し、1949年には1,000頭、1990年代には200~300頭まで減少した（Custodio et al., 1996）。1936年にはフィリピン政府によりタマラオを保護するためタマラオの捕獲や殺傷を禁止する法律が施行されたが、その後もタマラオの密猟が続き、開発による生息地の破壊と相まって個体数の減少は止まることがなかった（Kuehn, 1986; Oliver, 1993）。現在、確実にタマラオの生息が確認できる場所は、イグリット保護区だけである。

## （2）タマラオの動物分類と特徴

タマラオはウシ科（*Bovidae*）に分類される野生スイギュウの1種である。ウシ科にはウシ、スイギュウ、ヒツジ、ヤギ、アンテロープなど140種が含まれる。このうちウシやスイギュウはウシ亜科（*Bovinae*）、ウシ族（*Bovini*）として区分され、さらにウシ近縁種はウシ属（*Bos*）とバイソン属（*Bison*）に、スイギュウ近縁種はアフリカスイギュウ属（*Syncerus*）とアジアスイギュウ属（*Bubalus*）に分類される（野村, 2009）。これまでのところ、スイギュウ属とウシ属との間の異属間雑種およびアジアスイギュウ属間で雑種が誕生したという報告は無い。

アジアスイギュウ属にはアジア地域で肉用、乳用、または役用の家畜として飼養される家畜スイギュウ（*Bubalus bubalis*）と4種の野生スイギュウが含まれる（Tanaka et al., 1996）。すなわち、インド亜大陸に生息し家畜スイギュウの祖先種にあたるアジア野生スイギュウ（*Bubalus arnee*）、インドネシアのスラウェシ島に生息するローランドアノア（*Bubalus depressicornis*）およびマウンテンアノア（*Bubalus quarlesi*）、そして本研究の対象であるタマラオ

(*Bubalus mindorensis*) である。野生スイギュウの 4 種はいずれも IUCN のレッドリストで絶滅危惧種の指定を受けているが、タマラオ以外の 3 種が絶滅危惧 IB 類 (Endangered: EN) に位置づけられているのに対し、タマラオはよりリスクの高い CR に指定され、緊急かつ実効性のある保護対策が求められている。

タマラオはフィリピン在来の家畜スイギュウと比較して小型であり、家畜スイギュウの成獣オスの体重が 600kg に達するのに対し、タマラオは成獣オスでも 300kg 程度である (Namikawa et al., 1995)。また、家畜スイギュウが C 字型の角を持つのに対し、タマラオは V 字型の角を持っている (図 1-1)。タマラオの行動や習性などの生態的特徴については科学的観察に基づく客観的な情報が乏しく、ほとんど何も知られていないといっても過言ではないが、一般には夜行性で気性が荒く用心深い動物として知られている (Custodio et al., 1996)。家畜スイギュウの祖先種であるインド野生スイギュウの体躯や角の形状が家畜スイギュウと類似しているのに対し、アノアとタマラオは小型で角の形状が家畜スイギュウとは異なることから、かつてはアノアとタマラオを別属のアノア属 (*Anoa*) とする説もあったが (Kuehn, 1977)、現在は全体をアジアスイギュウ属 (*Bubalus*) とする前述の分類が一般に使用されている。近縁種間で染色体数を比較すると、家畜スイギュウのうちインド以西に分布する河川スイギュウ (River buffalo) は  $2n=50$ 、インド以東に分布する沼沢スイギュウ (Swamp buffalo)、ローランドアノアおよびマウンテンアノアは  $2n=48$ 、タマラオは  $2n=46$  であり、さらにシトクロム *b* 遺伝子の塩基配列の違いから種の分化の年代を推定した分子系統学的解析によれば、アノア 2 種の分化が 200 万年前、河川スイギュウと沼沢スイギュウの分化が 170 万年前、沼沢スイギュウとタマラオの分化が 150 万年前で、タマラオはアノアよりも沼沢スイギュウに近い動物で

あるとされている。(Tanaka et al., 1996)。これらの遺伝解析の結果は、タマラオとアノアは家畜スイギュウの直接の祖先種ではないが、その成立に深く関わっていることを示しており、現存する野生スイギュウの保全対策は家畜遺伝資源の保全という観点から重要である。

## 第2節 タマラオの保全に関する IUCN およびフィリピン政府の取組み

1965 年の IUCN バンコク会議において、タマラオの推定個体数が 100 頭程度に減少している危機的状況が報告され、IUCN はタマラオについて早急な保護対策の必要性を提言したが、この提言を受けてフィリピンで組織的な保護活動が開始されるまでにはさらに 10 数年もの年月を要した。1979 年になってフィリピン政府は公的な保全への取組みを開始し、マルコス大統領（当時）がタマラオおよびその生息域を保全するための大統領委員会（Presidential Committee for the Conservation of the Tamaraw）を創設した（Lawas & de Leon, 1996）。これが公式のタマラオ保全計画（Tamaraw Conservation Program: TCP）の始まりとされている（Lawas & de Leon, 1996）。その後、1985 年には大統領委員会が改組され、同年に TCP は環境・自然資源省（Department of Environment and Natural Resources: DENR）の管理下に置かれることとなった（Lawas & de Leon, 1996）。この時期の TCP ではタマラオの生息域外保全および人工増殖に重点が置かれ、DENR は政府軍の協力を得てアルヤン保護区で 1982 年から 1993 年にかけて 20 頭のタマラオを捕獲し、低地のマヌート（Manoot）に開設した増殖場（Gene pool）に移送して研究および増殖計画を実行に移した。我が国からも名古屋大学の研究グループが参加し、タマラオについて個体レベルでの繁殖や遺伝に関する貴重なデータが得られたが（Namikawa et al., 1995）、増殖計画そのものは失敗に終わった。現在、マ

ヌートの増殖場にはオス 1 頭（2014 年の段階で 12 歳齢）が生存するのみで、タマラオについての組織的・系統的な研究は行われておらず、増殖場そのものの存続が危ぶまれている。

1995年にIUCNの種保存委員会（Species Survival Commission: SSC）はアジア野生牛専門家グループ（Asia Wild Cattle Specialist Group: AWCSG）を再編成し、同年にアジア野生牛専門家グループは野生生物保全繁殖専門家グループ（Conservation Breeding Specialist Group）とともに、タイ王国のチョンブリ県（Chonburi）のカオキアオ動物園（Khao Kheow Open Zoo）で、アジア野生牛専門家グループが対象としている動物の保全評価および管理計画ワークショップ（Conservation Assessment Management Plan）を開催した。このワークショップではウシ属およびアジアスイギュウ属のそれぞれ4種の動物が対象とされた。ウシ属についてはガウール（*Bos gaurus*）、バンテン（*Bos javanicus*）、コープレイ（*Bos sauveli*）、そして野生ヤク（*Bos mutus*）の4種、アジアスイギュウ属についてはインド野生スイギュウ（*Bubalus arnee*）、ローランドアノア（*Bubalus depressicornis*）、マウンテンアノア（*Bubalus quarlesi*）、そしてタマラオ（*Bubalus mindorensis*）の4種である。また、このワークショップではフィリピンにおけるこれまでのタマラオ保全の取り組みは高く評価されたものの、引き続き信頼度の高い調査と対策が必要とされた（Heinen & Srikosamatara, 1996）。保全評価および管理計画ワークショップの提言を受け、フィリピン政府は野生生物保全繁殖専門家グループに対してタマラオの個体数および生息域評価（Population and Habitat Viability Assessment: PHVA）の実施を正式要請し、1996年5月15日~17日にPHVAのための会議がフィリピン大学ロスバニオス校で開催された。このPHVAでは以下の4つの目標が掲げられた。（1）野生生息下のタマラオ生存・回復のための実践的管理計画における優

先事項の策定、(2) 調査・管理活動に利用可能なタマラオ個体数モデルのシミュレーション解析およびリスク解析法の開発、(3) 利便性の高い保全技術の選別とトレーニングの実施、そして(4) 保全プログラムへの協力者の公募と選任である。PHVAの参加者はその専門性を考慮して「野生集団」、「飼育集団」、「集団生物学およびモデリング」、「住民参加プログラム」の4つのサブグループに分けられ、それぞれが専門的な討議を行って提言をまとめた。

「野生集団」グループでは、イグリット保護区やアルヤン保護区における既知のタマラオ集団を保護するための実行部隊 (Tamaraw Protection Force) の配備、適切なタマラオの調査を行うためのトレーニングコースの開設と組織化、既知のタマラオ生息域におけるより綿密な調査の実施、そして生息地における野生タマラオ集団の現状や絶滅危険度の評価を優先事項として挙げている。また、「集団モデリング」グループでは、最優先事項としてイグリット保護区およびタマラオ生息の可能性のある地域におけるより正確なタマラオ個体数の把握を挙げ、さらにメスの初産年齢、繁殖率、繁殖期間、仔牛の死亡率など、長期間の集団生存率に大きな影響を及ぼすタマラオの生活史データ (Life history data) の集積の必要性を強調した。そして、「住民参加プログラム」では、一般市民を対象としてセミナーやキャンプを行う教育普及事業 (Information, Education and Communication Campaign)、タマラオ生息地の住民、特に先住民の生活改善を促す地域支援事業 (Community Assistance Program) などの住民参加型施策を積極的に取り入れるよう提言がまとめられた。

このようにタマラオの保全についてはIUCNが過去に二度にわたって専門家による提言を行い、それを受けてフィリピン政府や州政府が様々な試みを実施してきたが、人的・財政的基盤が十分でないこと、山間部に生息し個体数の少ないタマラオは発見そのものが困難であること、タマラオに関する科学的知

見が乏しい等の理由により、効果的な保全対策には結びつかなかった。そのため、先述したようにタマラオの個体数はPHVA以降も減少の一途を辿り、2000年にはタマラオはIUCNによってCRに指定されるに至った。

### 第3節 本研究の目的と構成

絶滅危惧種に対する適切な保護対策の施行には、当該種の置かれている正確な現状(個体数・生息環境など)、当該種に対して脅威を与えている要因の分析、および当該種の生物学的・生理学的・生態学的な特徴に関する知見等の集積が必要である。IUCNの種保存委員会は種保全戦略に必要なものとして、状況概観( Status Review)、展望( Vision) および目標( Goal) を挙げ、さらに展望や目標の基盤となる状況概観の把握には当該種に関する形態学的要素、行動学的要素、遺伝学的要素などの様々な客観的情報が必要であるとしている

(IUCN/SSC, 2008)。前節で述べたとおり、タマラオに関する保全生物学的な知見は非常に限られており、適切なタマラオの保護対策を構築するためには、個体数や分布に関する確度の高い情報に加え、繁殖や行動習性などの生理生態学的情報の集積が何よりも重要である。

そこで、本研究ではタマラオ保全のための状況概観の把握に必要な基盤情報を得ることを目的として、以下に述べる一連の調査研究を行った。まず、タマラオの生息個体数を正確に把握するため、現存するタマラオの90%以上を占めるとされるイグリット保護区のタマラオ集団を対象として6年間にわたる定時個体数調査を実施し、個体数変動、年齢構成、性比、繁殖率等の解析を行うとともに、生息環境情報の一部としてタマラオが常食とする草本の栄養成分分析およびタマラオの排泄糞を用いた内部寄生虫感染の分析を行った(第2章第1節)。また、上記に関連してタマラオの行動習性を把握するため、定時個体数調査に

平行して行動的要素に関するデータを収集し、タマラオのグループ構成、単独行動、グループ行動等について解析を行った（第2章第2節）。次いで、イグリット保護区以外でのタマラオの生息状況を把握するため、IUCNのレッドリストでタマラオの生息が推定されている2つの保護区（アルヤン保護区とカラビテ保護区）において生存確認調査を行った（第3章第1節、第2節）。さらに、DNAは生態情報の解析に極めて有用であることから、野外でも比較的容易に採取できる糞中DNAを用いたタマラオ判別法を確立するとともに（第4章第1節）、状況概観に必要な遺伝学的要素の把握を目的として、糞由来のミトコンドリアDNA（mtDNA）を用いたタマラオ集団の遺伝的多様度の評価を試みた（第4章第2節）。また、最終章の総合考察では、野生動物の保全をめぐる世界の動向や課題と関連づけながら本研究の成果と経験が今後のタマラオ保全活動にどのように活用できるのかについて論考した。

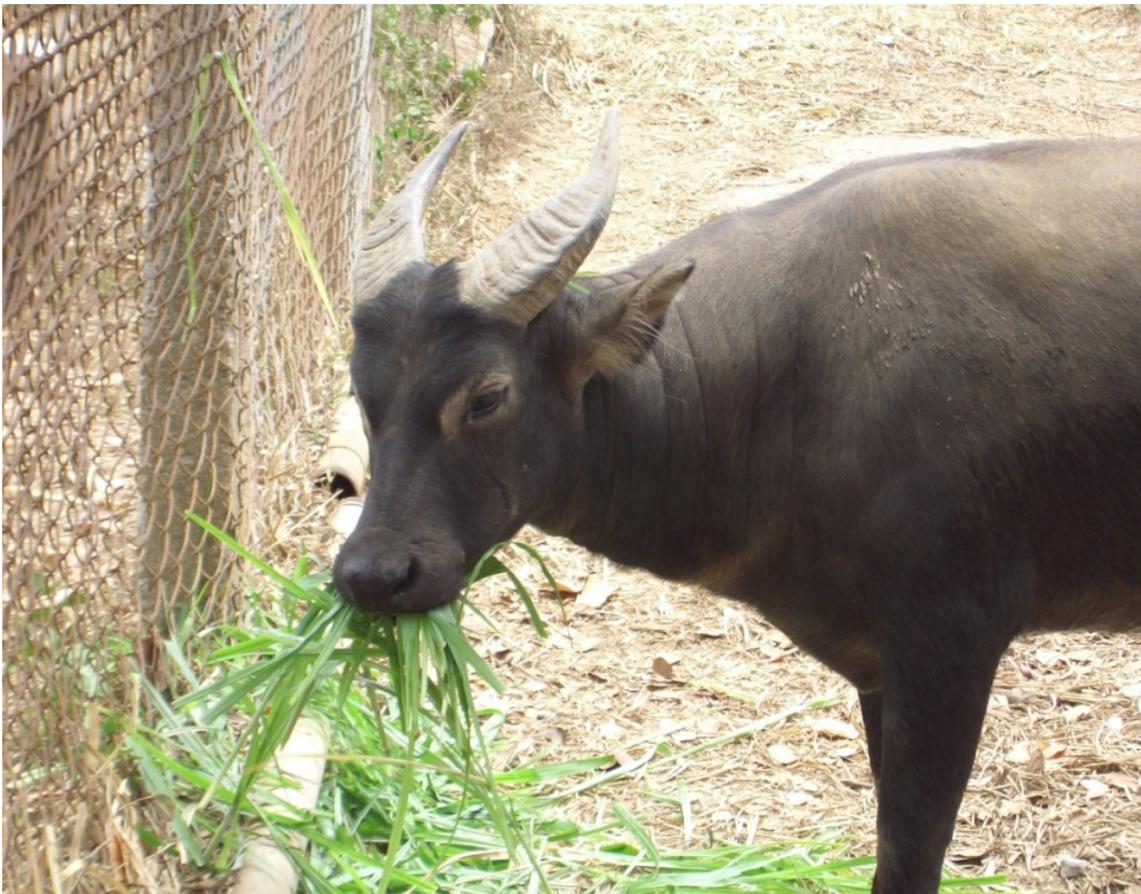


図1-1. タマラオ(*Bubalus mindorensis*). 写真はミンドロ島マヌート (Manoot) の増殖場 (Gene pool) で飼育されているオスのタマラオ. (撮影: 金井 2005年5月).

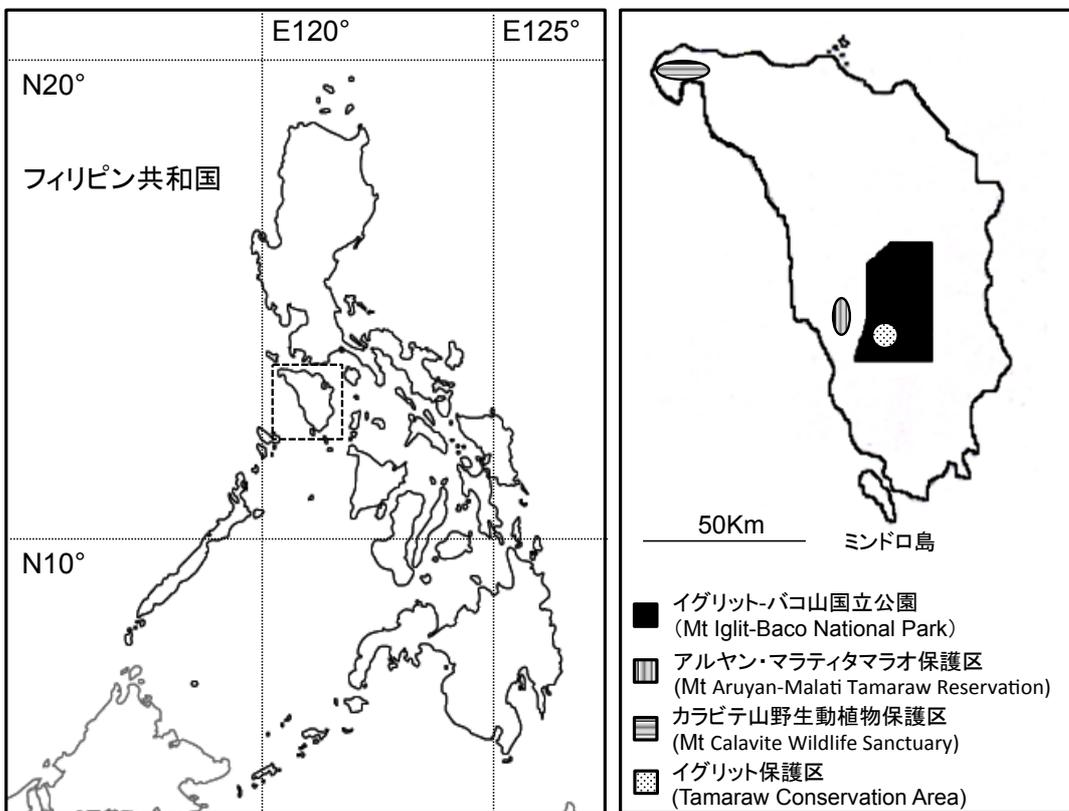


図 1-2. フィリピン共和国におけるミンドロ島の位置 (左) および IUCN レッドリストに記載されているミンドロ島内のタマラオの生息域 (右) .

## 第2章 イグレット保護区におけるタマラオの生態調査

### 第1節 イグレット保護区におけるタマラオの個体数変動

#### 2-1-1 目的

野生動物の保護計画の策定には、保全の対象となる当該種の基盤情報が必要不可欠であり、特に信頼度の高い方法によって計測された個体数は当該種の現状を理解する重要な基本的情報となる (Primack, 2006)。また、個体数変動の把握は当該種が減少する原因を究明する上で欠かせない。IUCN は種の保全戦略として状況概観の必要性を提唱しており、さらに、状況概観は精度の高い個体数情報に基づき実施されるべきであるとしている (IUCN/SSC, 2008)。しかしながら、これらの情報は絶滅危惧種においてはしばしば乏しく、特に熱帯や発展途上国においてその傾向が顕著である (Collen et al., 2008)。第1章で述べたようにタマラオは過去に何度かその個体数が報告されているものの、いずれも正確度の高い情報とはいえず、タマラオの個体数を包括的に把握することは難しい。1996年のタマラオ PHVA レポートでは、タマラオの習性や生息地の地勢を踏まえた信頼度の高い個体数評価方法として複数地点からの同時定点直接観察法 (Simultaneous Multi Vantage Point Counts) が推奨され、TCP はこの提言に基づいて2000年からイグレット保護区において毎年4月に同時定点直接観察法による全頭計測を行っている。しかしながら、この TCP の全頭計測では総個体数の把握のみが目的とされ、個体群変動の解析に必要な年齢構成、性比、繁殖率などの生活史データについては信頼に足る情報が全く得られていない。

そこで本研究では、野生タマラオ集団のより正確な現状把握を目的として、タマラオの生息が確認されているイグレット保護区を調査地として、4月(乾季

の末期)におけるタマラオ個体数を 2006 年から 2011 年の 6 年間にわたり調査し、年齢別および性別の個体数変動の解析を試みた。さらに、個体数変動に影響を及ぼす要因としてタマラオ保護区域における草本の栄養価、タマラオの内部寄生虫感染についても調査を実施した。

## 2-1-2 材料および方法

### (1) 調査地

調査はイグリット保護区(北緯 12° 40' ~12° 44'、東経 121° 02' ~121° 06'、推定面積 16,000 ha)において行った。このイグリット保護区はタマラオの目撃情報、足跡、食痕、そして糞等の観察結果に基づいて TCP によって設定されたものであり、標高 300m~1,000m の起伏に富んだ丘陵地帯に位置する(図 2-1-1)。ミンドロ島は熱帯モンスーン地帯に位置し、島全体の気候は雨期(6~11 月)と乾期(12~5 月)に分かれている。イグリット保護区に限定した気象データはないが、定点気象観測地サンホセ(San Jose)のデータでは最低気温は 24.2°C、最高気温 32.1°C、年間降水量 2,287.3mm となっている。イグリット保護区内の標高が高い場所では多年生草本に覆われた草地が広がり(図 2-1-2-a, b)、谷部では小川の周辺に二次林が点在している(図 2-1-2-c, d)。本調査地の大部分を占める草地における優占種はチガヤ(*Imperata cylindrica*, 現地名は Cogon)、ワセオバナ(*Saccharum spontaneum*, 現地名は Talahib)、メカルガヤ(*Themeda triandra*, 現地名は Themeda)の 3 種である(図 2-1-3)。また、後述する 18 の観察地の眼下に広がる草地では、草地の更新および視界の確保を目的として毎年 2 月から 3 月にかけて TCP による火入れが行われている。なお、本調査地ではタマラオ以外の大型哺乳類としてフィリピン・スポッテッド・ディア(*Cervus alfredi*)、オリバーイボイノシシ(*Sus oliveri*)の生息が確認さ

れているが、タマラオを捕食する肉食動物の存在は確認されていない。

## (2) ボランティア観察者の公募

本研究では、複数地点からの同時観察を行うためにボランティア観察者を公募した。ボランティア観察者は学校教師、地元公務員、NGO 職員などから幅広く集められた。実際のフィールド調査に先立って計 20~30 名のボランティア観察者にはタマラオの個体数計測、年齢および雌雄の判別方法、双眼鏡、地図、コンパスの使い方を訓練するための事前ワークショップを実施した。さらに彼らを後述する 18 の観察地に配置する際に、少なくとも 1 名の観察の経験を積んだタマラオレンジャーあるいは TCP スタッフを各観察地に配置することで観察の習熟度による誤差を減らした。タマラオレンジャーおよび TCP スタッフを含めた合計人数は平均約 50 人/年であった。

## (3) 観察方法

タマラオ PHVA の推奨により TCP が 2000 年から実施している同時定点直接観察法に準拠し、2006 年から 2011 年までの 6 年間にわたり年 1 回のタマラオ観察を行った。定点観察地点は DENR-TCP の調査により設置された 18 か所 Loibfo, Magawang, Bayokbok, Bato fidel, Inobon, Miblun, Nagbobong, Fangandatan, Anyayos, Lanas I, Lyan, Tarzan, Talafu East, Talafu West, Malitwang, Lanas II, Malibayong, Saligi East) である (図 2-1-1)。これらの観察地点からタマラオ保護区域 (山岳地帯を含めて推定約 16,000 ha) のおよそ 8,000 ha を観察することが可能であり、その中に草地のほとんどが含まれている。

個体数調査は 6 年間とも 4 月 22 日から 4 月 26 日の 5 日間とした。飼育下

での行動観察から、タマラオは早朝（午前 6 : 00 頃）と夕刻（午後 6 : 00 頃）に最も頻繁に採餌することが報告されている（Momongan & Walde, 1993）。そこで個体数調査は 1 日 2 回、タマラオがよく採餌する時間帯（午前 5 : 30~7 : 00 および午後 5 : 00~6 : 30）に全観察地点で同時に行い、観察された全てのタマラオについて時刻、場所、行動（徒歩中、休息中、警戒中、採食中など）、および移動方向等を記録した。また、観察可能な場合には、次項で述べる方法で年齢および性別を記載した。

#### （4）タマラオの年齢と性の判別

TCP では長年の経験に基づいて、体躯、毛色および角の大きさと形状を指標としてタマラオを 5 つの年齢階層に区分している。すなわち、当歳（推定 1 歳未満）、1 歳齢（推定 1 歳以上~2 歳未満）、若齢（推定 2 歳以上~3.5 歳未満）、亜成獣（推定 3.5 歳以上~5 歳未満）および成獣（推定 5 歳以上）の 5 つである。その具体的な判別基準はおおよそ以下のとおりである。当歳：毛色は赤みがかかった茶色である。角はまだ生えていないか、あるいはわずかに生えている（図 2-1-4）。1 歳齢：毛色は赤みがかかった茶色から明るい茶色に徐々に変化し、背中にうっすらと黒い毛の線が見えるようになる。角はまだ耳よりも短い。若齢：毛色は明るい茶色で、背中に黒い毛の線がはっきり確認できる。角はスパイク状で耳よりも長くなっている（図 2-1-4）。亜成獣：毛色は徐々に焦茶色に変化し、若齢よりも体格が大きい。背中の黒い線はまだ残っているものの薄くなっている。角はさらに長くなるがまだスパイク状である。成獣：毛色は焦茶色あるいは灰黒色となり、背中の線は毛色と同化し完全に消失している。どちらの性別においても V 字型の大きな角が頭上にある（図 2-1-4）。

しかしながら、毛色や角の形状の違いはタマラオの成長に伴う連続的な変化

であり、年齢区分の境界を客観化することは難しい。例えば、生後数ヶ月以上を経過した当歳の個体と1歳齢に達したばかりの個体、あるいは若齢期後半の個体と比較的若い亜成獣を短時間の目視で区別することは非常に難しい。さらに、タマラオは観察地点から遠く離れていることが多いため、タマラオの観察に熟練したTCPレンジャーでもタマラオの年齢を明確に判別できないことがある。一方、1歳齢と若齢の区別については、明瞭な背中黒い線の有無、角の長さが耳の先端を超えるか否かの2点で比較的容易に判別が可能である。同様に亜成獣と成獣の区別については、成獣では亜成獣に見られる背中黒い線が完全に消失し、さらにははっきりと大きな角を持つため亜成獣との区別が容易である。そこで、本研究ではTCPの5段階年齢区分を改め、0歳齢~2歳齢未満の「幼獣」、2歳齢~5歳齢未満の「若齢」および5歳齢以上の「成獣」の3つのグループに分類した。

一方、性判別については、性的特徴が顕著でない幼獣を除く若齢および成獣のみを対象として、体躯、角の大きさ、性器の有無などに基づいて、オス、メス、判別不能の3つに分類した。オスの角はメスの角よりも根元の部分が大きく、角表面がごつごつしているのに対し、メスの角表面は滑らかである(Suchomel, 2005)。体躯についてもオスはメスよりもがっしりとしている。

#### (5) データ集計

5日間の野外観察終了後に全観察地点の観察データを照合し、各地区の観察データにおいて2か所以上の観察点から同時刻、同地点に観察されたタマラオは観察時の年齢、性別、グループ行動あるいは単独行動などの行動形態を考慮し、重複観察の可能性のあるものは調整し、最終的な確認個体数を算出した。

成獣グループと若齢グループの性比については、判別不能個体を除外して性

比を計算し、性比の偏りについては二項検定、年度間の差については、カイ二乗検定により有意性の検定を行った。

繁殖率については、Ong et al. (1996) の報告に基づきタマラオの初産年齢を5歳 (=成熟メス) として推定値を求めた。すなわち、各調査年度における幼獣グループの半数を各調査年度に新たに生まれた個体とし、さらに成獣グループの中の性判別不能個体の半数をメスと仮定した上で、推定繁殖率を計算した。

#### (6) タマラオが常食とする草種の栄養成分分析

食痕および目視観察によりタマラオが常食としている主な草種はチガヤ (*Imperata cylindrica*)、ワセオバナ (*Saccharum spontaneum*)、メカルガヤ (*Themeda triandra*) の3種であることが確認できた (図 2-1-3)。火入れを行った区域 (火入れ区)、火入れを行っていない区域 (非火入れ区) のそれぞれにおいて、1m × 1m のコドラートを用いて全草種の地上部を刈取り、チガヤ、ワセオバナ、メカルガヤの3草種に分けて重量を計測した。さらに、草種ごとに緑色の茎葉部を可食部位として分別し、再度、重量を計測し分析サンプルとした。サンプル採取は、火入れ区および非火入れ区のそれぞれ4カ所で行った。栄養成分の分析は、AOAC (1990) の一般成分分析法に従った。概略すると以下のとおりである。

粗灰分の定量：ろ紙で包み、アルミ秤皿に入れて乾燥 (135°C、2時間) したサンプルを、あらかじめ恒量を求めてあるるつぼにろ紙ごとに入れて予備灰化し、マッフル炉で灰化 (600°C、2時間) した。灰化後るつぼと灰化したサンプルの重量を定量し、るつぼの恒量を差し引いて灰分量を求めた。

粗タンパク質：タンパク質の窒素量測定にはケルダール法を使用した。常法に従い、測定値を6.25倍したものを粗タンパク質含有率とした。

粗脂肪：あらかじめ脂肪ビンを乾燥させ、恒量を求めた。サンプル約 2g を秤量し、円筒ろ紙に移した後、脱脂綿を詰めて栓とし、乾燥（100℃、2 時間）させた後、放冷した。サンプルを入れた円筒ろ紙をソックスレー抽出装置のサイフォンに入れ、脂肪ビンにエーテルを入れて接続し、16 時間エーテル抽出を行った。抽出後円筒ろ紙を抜き取り、再び加温し、エーテルを回収した。この時エーテルが少量残る状態で脂肪ビンを外し、温浴で残ったエーテルを飛散させ、脂肪ビンの外側をガーゼでふき取り、乾燥（100℃、3 時間）させた後、放冷し秤量した。そこから脂肪ビンの恒量を差し引いて粗脂肪とした。

粗繊維：サンプル 2 g をるつぼに正確に秤量し、1.25%硫酸液 200ml および 1.25%水酸化ナトリウム液 200ml にて煮沸した後熱水で洗浄し、乾燥放冷後、重量を測定する。次いで 500℃のマッフルにて加熱灰化して乾燥、放冷後、重さを量り粗繊維量を算出した。

採取されたそれぞれの草種について火入れ区および非火入れ区における栄養成分を比較するために t 検定を行った。

#### (7) 内部寄生虫感染の検査

タマラオ保護区域にて新鮮なタマラオの糞を 27 個採取し、それぞれ 10%ホルマリンを入れた 50ml チューブに保存した。虫卵検査は Hendrix (1998) の沈降集卵法に基づいて行った。概略は以下のとおりである。

2gの糞を水に浸した後、混合物を遠心チューブに移し、1,500 rpm で遠心分離を行った。上澄みを沈殿に触れないよう注意しながら除いた。沈殿物の表層をスライドガラスに移し、顕微鏡を用いて観察を行った。

### 2-1-3 結果

各調査年度におけるタマラオの全頭個体数、年齢区分毎の個体数を表 2-1-1 に示した。6 年間の平均値としてタマラオは 271.2 頭観察された。2007 年に最小値として 239 頭、2010 年に最大値として 314 頭が観察され、イグリット保護区におけるタマラオ個体数に大きな変動は見られなかった（変動係数=0.09）。年齢別に見ると、成獣の割合は平均 57.7%、若齢および幼獣の割合はそれぞれ 21%、21.3%で、年度による有意な違いは認められなかった（カイ二乗値=15.945、自由度=10）。成獣グループでは、いずれの年度もメスがオスよりも多く、性に有意な偏りがみられ、6 年間を通算した性比（オス：メス）は 1：1.86（表 2-1-2、 $P<0.05$ ）であった。一方、若齢グループでは各年度とも有意な性比の偏りは見られなかった（表 2-1-2）。また、成獣についてはほとんどの個体の性別を判別することができたが、若齢では判別不能個体が全体の約半分を占めた（表 2-1-2）。各年度の推定繁殖率は 20.6%から 37.3%の範囲で変動したが、年度による差は有意ではなく（カイ二乗値=5.923、自由度=5）、6 年間を通算した推定繁殖率は 29.1%であった（表 2-1-3）。

火入れ区および非火入れ区における各草種の可食部位の栄養成分を表 2-1-4 に示した。火入れは総生産量を減少させる一方で、可食部の割合を増加させた。また、可食部分の粗タンパク含量は火入れ区で高い傾向が認められ、その差はチガヤおよび全草種合計で有意であった（ $P<0.05$ ）。

内部寄生虫感染の分析結果を表 2-1-5 に示す。27 サンプルのうち 21 サンプル（77.8%）には虫卵や寄生虫は検出されなかった。一方で、6 サンプル（22%）から 4 属の寄生虫感染が検出された。すなわち 2 サンプルから肝蛭（*Fasciola* sp., 7.4%）、2 サンプルからアイメリア（*Eimeria* sp., 7.4%）、1 サンプルから円虫

(*Strongylus* sp., 3.7%)、そして1サンプルから回虫 (*Ascaris* sp., 3.7%) の感染が認められた。ただし、2種以上の寄生虫による重複感染は見られなかった。

#### 2-1-4 考察

第1章で述べた通り、絶滅危惧種タマラオに対する効果的な保全対策の策定には現存する野生集団について信頼に足る個体数の推定および個体数変動の解析に必要な年齢構成や繁殖率などの生活史データの把握が必要である。そのため、本調査では現存するタマラオのほとんどが生息するイグリット保護区において6年間にわたり同時定点観察による全頭計測を行うとともに、体躯、毛色、角の特徴から個体の年齢および性を判別して集団の年齢構成比（成獣、若齢、幼獣の百分率比）を求め、さらにその結果から周年繁殖率（成獣メスに対する当歳の比率）を推定した。その結果、イグリット保護区のタマラオ集団は239頭から314頭の範囲で安定的に維持され、集団の年齢構成比（平均で58:21:21）および周年繁殖率（平均で29%）に年による有意な変動はみられないこと、成獣ではメス個体数がオスに比べ有意に多いことが明らかになった。そこで本項では、まずこれらの調査結果の信頼度について検証し、その上でイグリット保護区のタマラオ集団における個体数変動に関与する要因について論考することにする。

野生動物の個体数計測は、対象地域に生息するすべての個体を一括計測する全頭計測、対象地域を幾つかの区域に分割しその一部の区域内に生息する個体数を計測するサンプル計測、当該種の生息状況を反映すると思われる指標を利用する指標計測の3種に大別され、どの方法を選択するかは、対象動物の特徴（体の大きさや行動習性など）、生息地の地形や面積、野外調査に投入できる資金や機材の質と量などを勘案し、個々の事例ごとに最善の方法を選択するの

が一般的である (WWF, 2004)。本研究で用いた同時定点観察による全頭計測は、タマラオの行動習性や生息地の地形を考慮した上で IUCN のタマラオ PHVA が推奨した方法であり、設置した 18 カ所の観察地点は木、草、丘、および谷などによる死角を極力なくすように高い標高に設置され、高い精度でタマラオの全頭観察が可能である。さらに、火入れによりタマラオが好んで採餌する草本の更新を促し、観察区域にタマラオを誘引する工夫を凝らしている。この方法による全頭計測は 2000 年から TCP の活動の一部に組み込まれ、毎年 DENR のホームページ上に計測結果が公表されている。その結果によれば、イグリット保護区の集団サイズは 2000 年から 2002 年にかけて 154 頭から 253 頭に漸増し、以後 2005 年まで 250 頭前後で推移している (DENR, 2012)。同時定点観察法では限られた時間内にすべての個体を目視できるとは限らないため真の集団サイズより常に小さい値を示す (WWF, 2004) ことを考慮した上で、これらの先行調査と本研究の調査結果を重ね合わせると、TCP および本研究で用いている全頭計測法は 2002 年以降の計測結果の年次間変動が小さいことから一定程度の精度が担保されていると考えられ、イグリット保護区では少なく見積もって 250 頭程度の集団サイズが維持されていると判断して良いと推察される。しかしながら、一般に全頭計測法はフェンスなどで囲まれた生息地を対象とする場合が多く、観察地域に出入りする個体が存在する場合には計測結果の確度と精度が低下するという点に配慮する必要があるだろう。本研究による全頭計測の観察区域は約 8,000 ha で、推定 16,000 ha の面積を有するイグリット保護区全体をカバーしているわけではない。したがって、観察区域外にもタマラオの生息域が広がっている可能性は否定できず、計測結果の年次による変動の一部は観察区域に出入りするタマラオの存在を反映している可能性がある。ただし、本研究の観察区域は過去のタマラオ生息調査 (Kuehn, 1986; Callo,

1996) でタマラオが目視された地域 (約 2,000 ha) に加え、その後の TCP による糞や食痕の調査によりタマラオの生息が間接的に確認された地域を含めて設定されたものであること、保護区の中の主要な草地のほとんどが観察地域に含まれていることなどを考慮すれば、観察区域外に生息するタマラオの数はそれほど多くないとも推察できる。いずれにせよ、イグリット保護区におけるタマラオの生息域が観察区域外に及んでいるかどうかについては検証の余地が残されている。

本研究における他の重要な成果は、これまで全く未知であったタマラオ集団の年齢構成に関する定量的データが得られ、これにより周年繁殖率が推定できたことである。タマラオの成長に伴う身体的特徴の変化は連続的であり、遠距離からの目視観察で正確に年齢を判定することは難しいが、本研究では、方法の項で述べたように、どの観察者にとっても目視観察が容易でしかも判別基準が明確な二つの指標、すなわち“耳または頭部に対する相対的な角の長さ”と“明瞭な黒い背線の有無”により、年齢を“幼獣 (2 歳未満) ”、“若齢 (2 歳以上、5 歳未満) ”および“成獣 (5 歳以上) ”の 3 つに区分した。周年繁殖率の正確な推定には当歳 (1 歳未満) の個体数を知る必要があるが、短時間の目視観察で 1 歳未満と 1 歳以上の個体を区別することは非常に難しいことから、本研究では両者を含めた“幼獣”区分を設け、その半数を当歳と仮定した。この仮定は幼獣の死亡率を無視しているので、後述するように推定繁殖率は実際より低く見積もられることに留意する必要があるが、タマラオ集団の年齢構成比が各年度でほぼ一定の値を示したことから (表 2-1-1)、本研究で採用した年齢区分法および観察法は十分な精度 (再現性) を持ち、今後タマラオ集団の動態解析に有益な指標として活用できると思われる。

本研究では、成獣オスは 6 年間にわたりほぼ同数が観察されたが、常に成獣

メスに比較して有意に少なく ( $P < 0.05$ )、性比はメス側に偏っていた (平均で 1 : 1.86)。一般的な法則として、オスの生存率はメスより低いと言われており、例えば偶蹄目ではトナカイ (*Rangifer tarandus*, Alendal et al., 1979)、ムース (*Alces alces*, Boer, 1988) などで性比の偏りが報告されている。また、オスとメスではそもそも代謝速度や免疫抵抗性の強さも異なるとされ (長谷川, 2004)、その背景としてオスはメスを巡るオス同士の争いによる損耗のリスクが大きいこと、メスと比較して体格が大きくエネルギー必要量が大きいといったことが挙げられている (Demment & Van Soest, 1985)。Tulloch (1979) は再野生化した家畜スイギュウ (*Bubalus bubalis*) でオス同士がメス獲得のために激しく争うことを報告し、タマラオにおいても飼育化でオス同士がメス獲得のために争い、成獣オスが死亡したことが報告されている (Maala, 2001)。オス同士の争いがどれほどタマラオの生存率に影響を及ぼしているかを本研究の結果だけから判断することは難しいが、性比の偏りが成獣のみで観察され、若齢グループで認められなかったことから、繁殖活動に関係するオス同士の争いが成獣の性比に影響を及ぼしていることは間違いないと考えられる。

本研究では、成獣メスに対する当歳個体の比率から周年繁殖率を推定したが、その結果は平均 29.1% であり、全個体数と同様に 6 年間を通じて安定していた。このことは、本調査地におけるタマラオ集団の出生率と死亡率がほぼ等しく、かつ環境収容力の限界値に達している可能性を示唆している。狩猟による人為的なタマラオの減少と観察区域外へのタマラオの移動がないと仮定した場合、集団全体の死亡率は各年度の出生率 (当歳個体数/全個体数) に等しいと考えられ、死亡率は表 2-1-1 および表 2-1-3 から 10.7% と推定される。この数値はオグロヌー (*Connochaetes taurinus*) で報告されている 10% (Hillman & Hillman, 1977) にほぼ等しいが、家畜スイギュウおよびアフリカスイギュウ (*Syncerus*

*caffer*) で報告されている 18%および 33% (Ong et al., 1996) と比較するとかなり低い。これは、本研究で推定した周年繁殖率 (29%) および上記の死亡率の算出では新生仔の死亡率を考慮していないことに起因する可能性がある。多くの偶蹄類では出生後 1 年以内に 50%が死亡するといわれている (Spinage, 1972)。したがって、実際には毎年もっと多くのタマラオが出生し、真の繁殖率と死亡率は本研究の推定値より高い可能性が考えられる。一方、本研究における年齢区分ごとの個体数分布をみると若齢 (1 年齢あたり 19 頭) と幼獣 (1 年齢あたり 28.9 頭) の間に明らかな差があった。もし、生後の死亡率が一定であり毎年、幼獣の半数が若齢に成長するのであれば、若齢グループの 1 年齢あたりの死亡率は 19.8%になると試算される。この値は、先述の当歳個体における死亡率の試算とは逆に、家畜スイギュウやアフリカスイギュウで報告された値 (それぞれ 4.6%および 6–8%: Ong et al., 1996) より高くなる。通常、個体の死亡率は出生直後に高く、成長に伴って徐々に低くなることを考えると (Spinage, 1972)、本研究で用いた年齢区分 (3 区分) では死亡率の推定に限界があり、正確な死亡率の推定にはより緻密な年齢区分に基づく個体数分布データが必要であることを意味している。野生動物の正確な年齢推定は容易なことではないが、例えば、タマラオと同じくウシ科に分類されるカモシカでは樹木と同じように、一年ごとに角輪ができ、その数で年齢が分かるとされている (Miura et al., 1986)。タマラオは年齢と角輪の数が一致する訳ではないが、近縁種であるフィリピン水牛では角輪の数 (X) と年齢 (Y) が  $Y = 1.2232503 + 0.264245856 (X)$  の式に従うという報告もある (De Ocampo & David, 1993)。この式をタマラオに直接応用できる訳ではないがタマラオの角に関しても同様の知見を集積することで今後の年齢推定に応用することが期待される。あるいは、タマラオに有効な個体識別法を検討し、一定数の成獣メスについて個体識

別と周年継続観察を組み合わせるにより、より正確な繁殖率と幼獣死亡率を推定するなどの取組みが期待される。さらに、本節では調べていないが現存タマラオ集団における近交弱勢の可能性についても注意が必要である。近交弱勢が進むと遺伝的多様性が減少し、新生仔の生存力・適応力が低下することが報告されている (Pusey & Wolf, 1996)。タマラオは非常に個体数の少ない絶滅危惧種であり、その生息域も孤立しているため、近親交配によるいわゆる絶滅の渦に巻き込まれてしまう要件を十分に満たしている。毎年一定数の繁殖は得られているものの全体の個体数が増えない原因として幼獣期の高い死亡率があるのかも知れない。

個体数の増減には生息環境の環境収容力が大きく関わり、この環境収容力は一般的に資源の利用性およびその質に依存するとされている (Hobbs & Swift, 1985)。イグリット保護区におけるタマラオ生息地は推定 16,000 ha で、その大部分が草地である。観察区域では年に一度の個体数調査の精度を向上させるために草地の火入れが行われ、この火入れによる資源利用性への影響が懸念されるが、本研究におけるサンプリングおよび一般成分分析から、火入れによって全体のバイオマス量は減少するものの、可食部位の割合や栄養成分含有率は向上することが示唆された。また、タマラオが火入れ前の成長した草本よりも火入れ後に生える新芽を好んで採餌していること、観察されたタマラオの体格から推定される栄養状態は良好と考えられること等から、火入れによって草地の環境収容力に負の影響があったとは考えられなかった。しかしながら、近年の研究によると、ある生息域に収容可能な最大個体数は、突発的な環境変動、個体による生息域の選択行動、資源分布の不均一性といった様々な要因によって左右されることが報告されている (Morgan et al., 2009)。イグリット保護区におけるタマラオの生息域利用、生息域選択、資源利用性や資源の質についての

知見は限られており、今後これらについてより詳細な研究を実施することでタマラオ生息地の環境収容力を推定することが可能になると考えられる。特に、タマラオの生息域選択や縄張りを始めとする種内競争行動を解明することは、より効果的なタマラオの保全対策を構築するために重要である。

最後に寄生虫感染について言及する。寄生虫（病原菌含む）感染は絶滅危惧種の絶滅に大きく関与するとされている（Smith et al., 2006）。今回調べた糞便サンプルからはイグリット保護区のタマラオ集団に重篤な虫卵感染は検出されなかったが、Anunciado et al. (1994) はアルヤン保護区で捕獲されマヌートの増殖場で飼育されていた 8 頭のタマラオを調査し、すべてが吸虫 (*Trematoda*) に対して陽性であり、75%が円虫 (*Strongylida*)、50%が肝蛭 (*Fasciola*)、そして 12.5%が鞭虫 (*Trichuris*) に感染していたと報告している。Anunciado et al. (1994) の報告と比較すると本研究における感染は軽度であると思われる。しかしながら、Anunciado et al. (1994) が年間を通じてサンプルを採取したのに対し、本研究におけるサンプル採取はすべて乾期の終わりである 4 月期に行われた。多くの寄生虫感染に関する先行研究において雨期には乾期よりも有意に高い感染率が報告されている (Fritche et al., 1993; Moyo et al., 1996; Tembely et al., 1997; Kuchai et al., 2011)。したがって、本研究の結果だけからイグリット保護区におけるタマラオの寄生虫感染の重篤度を結論づけることは適当ではなく、雨期についても調査を実施する必要があると考えられる。

#### 2-1-5 小括

本節では、イグリット保護区におけるタマラオ保全の基礎情報として 2006~2011 年までのタマラオの個体数変動解析を実施した。本節の結果から、タマラオは毎年一定の繁殖率を維持し、タマラオの全個体数は平均 270 頭程度

で、大きな個体数変動はないことが明らかとなった。また、成獣の性比はメスに偏っており、若齢については雄雌間で性比の偏りはなかった。これらのデータは IUCN の推奨する状況概観のための基盤となるものでありタマラオの保全管理を考える上で基礎となるものである。しかしながら、今後の課題として、タマラオの個体数が増加しない原因を明らかにする必要がある。個体数が増加しない理由として様々な原因が考えられるが、特に今回の調査結果から、オスが高い死亡率を有する可能性、若齢オスのタマラオが保護区域の外に移動する可能性が示唆された。

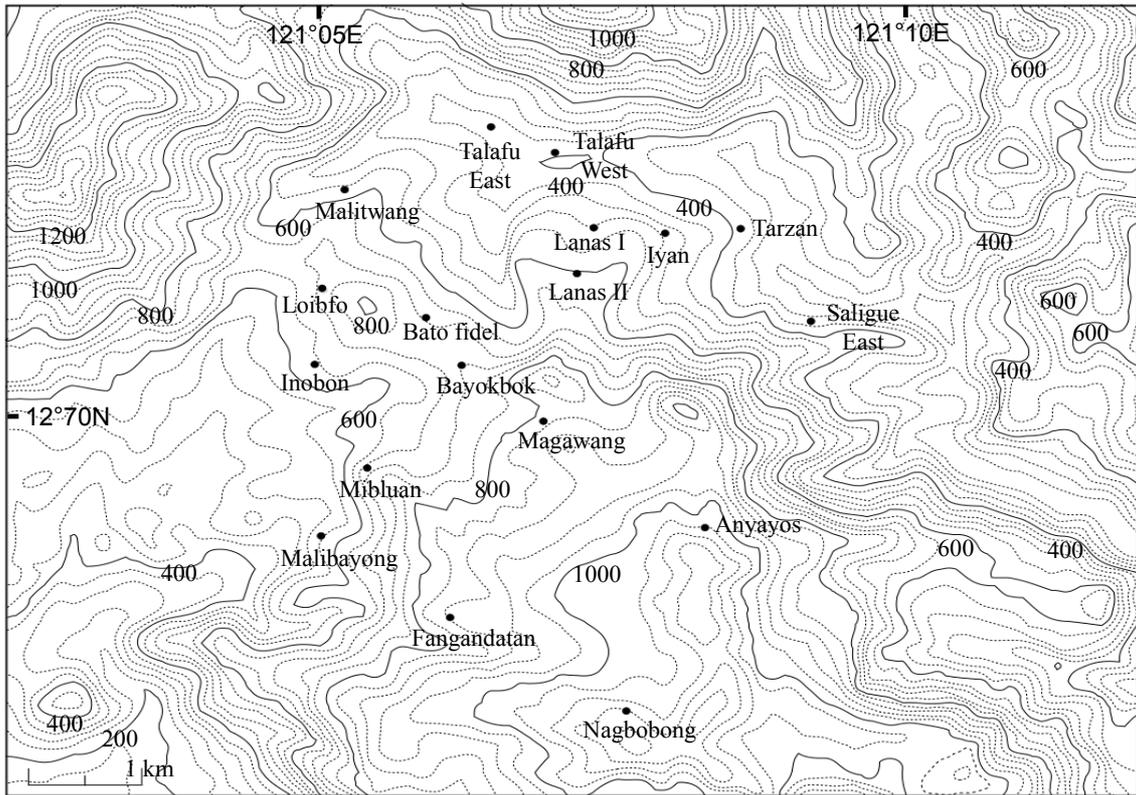


図 2-1-1. イグリット保護区内に設置した 18 カ所の観察地点. Loibfo, Magawang, Bayokbok, Bato fidel, Inobon, Mibluan, Nagbobon, Fangandatan, Anyayos, Lanas I, Lyan, Tarzan, Talafu East, Talafu West, Malitwang, Lanas II, Malibayong, Saligi East は現地呼称名.



図 2-1-2. イグリット保護区の景観. a と b は調査地の代表的な植生、c と d は谷部の景観. (撮影：石原 2006 年 4 月) .



図 2-1-3. イグリット保護区における代表的な草種. a : チガヤ (*Imperata cylindrica*, 現地名は Cogon)、b : ワセオバナ (*Saccharum spontaneum*, 現地名は Talahib)、c : メカルガヤ (*Themeda triandra*, 現地名は Themeda) を示す. (撮影 : 石原 2006 年 4 月) .



図 2-1-4. 角のサイズによるタマラオの年齢区分.

a : 幼獣 (推定 0-2 歳未満) ; 角がスパイク状でサイズが耳よりも短い, b : 若齢 (推定 2-5 歳未満) ; 角がスパイク状で耳よりも長い, c : 成獣 (推定 5 歳以上) ; V 字型の大きな角がある (撮影 : 松林 2007 年 4 月) .

表 2-1-1. イグリット保護区におけるタマラオの全頭計測結果と年齢別個体数

年度	全頭個体数	成獣個体数	若齢個体数	幼獣個体数
2006	263	162 (61.6)	52 (19.8)	49 (18.6)
2007	239	132 (55.2)	48 (20.1)	59 (24.7)
2008	263	155 (58.9)	66 (25.1)	42 (16.0)
2009	274	151 (55.1)	51 (18.6)	72 (26.3)
2010	314	172 (54.8)	74 (23.6)	68 (21.6)
2011	274	166 (60.6)	51 (18.6)	57 (20.8)
平均値 ± SE	271.2 ± 10.0	156.3 ± 5.7 (57.7)	57.0 ± 4.2 (21.0)	57.8 ± 4.6 (21.3)

括弧内の数値はそれぞれ全頭個体数に対する割合を示す。

成獣、若齢、幼獣の割合に年度間で有意差なし。(カイ二乗値=15.945, 自由度=10,

P>0.05) .

表 2-1-2. イグリット保護区における成獣および若齢の性別個体数と性比

年度	成獣				若齢			
	オス	メス	性別不明 <sup>1</sup>	オス:メス	オス	メス	性別不明 <sup>1</sup>	オス:メス
2006	53	102	7	1:1.92	8	12	32	1:1.50
2007	53	79	0	1:1.49	13	20	15	1:1.53
2008	49	98	8	1:2.00	16	9	41	1:0.56
2009	49	99	3	1:2.02	9	12	30	1:1.33
2010	60	108	4	1:1.80	23	19	32	1:0.82
2011	50	99	17	1:1.98	13	12	26	1:0.92
合計	314	585	39	1:1.86 <sup>2</sup>	82	84	176	1:1.02 <sup>2</sup>

<sup>1</sup>性別不明個体については性比の算出から除外した。

<sup>2</sup>全体の成獣性比はオス:メス=1:1.86 であり成獣メスが有意に多かった ( $P<0.01$ )。一方、若齢ではオス・メス間に有意差なし ( $P>0.05$ )。

成獣性比は年度間で有意差なし (カイ二乗値=2.171, 自由度=5,  $P>0.05$ )。

若齢性比は年度間に有意差なし (カイ二乗値=9.655, 自由度=5,  $P>0.05$ )。

表 2-1-3. イグリット保護区におけるタマラオ集団の推定繁殖率.

年度	成獣メス個体 <sup>1</sup>	当歳個体数 <sup>2</sup>	推定繁殖率(%)
2006	105.5	24.5	23.2
2007	79.0	29.5	37.3
2008	102.0	21.0	20.6
2009	100.5	36.0	35.8
2010	110.0	34.0	30.9
2011	107.5	28.5	26.5
平均値 ± SE	100.8 ± 4.6	28.9 ± 2.3	29.1 ± 2.8

<sup>1</sup>表 2-1-2 における性別不明成獣の性比を 1:1 と仮定した.

<sup>2</sup>表 2-1-1 における幼獣個体の半数を 1 歳未満の当歳とした.

成獣メスおよび当歳の個体数に年度間で有意差なし(カイ二乗値=5.923, 自由度=5, P>0.05) .

表 2-1-4. 火入れの有無による草の生産量および栄養成分.

草種	火入れの有無	生産量: g/m <sup>2</sup>	可食部位の割合: g/m <sup>2</sup> (%)	可食部位の栄養成分: %乾物重, 平均±SE				
				粗タンパク質	粗繊維	粗脂肪	可溶無窒素物	灰分
チガヤ ( <i>Imperata cylindrica</i> )	有	2,144	1,233 (57.5)	7.33±0.09*	33.76±0.55*	1.12±0.12	51.34±1.01	6.45±0.40
	無	7,395	2,825 (38.2)	4.12±0.28	36.57±0.53	1.62±0.17	51.38±0.36	6.31±0.59
ワセオバナ ( <i>Saccharum spontaneum</i> )	有	3,381	1,805 (53.4)	7.49±0.22	35.24±0.34	2.69±0.74	42.27±1.57	7.31±0.36
	無	4,968	845 (17.0)	5.66±0.92	34.41±0.41	1.13±0.19	49.48±0.41	9.32±0.99
メカルガヤ ( <i>Themeda triandra</i> )	有	316	165 (52.2)	7.98±0.81	33.69±0.56	1.19±0.57	46.85±0.60	9.57±0.18
	無	1,230	153 (12.4)	7.19±0.23	31.86±0.76	1.47±0.30	47.93±1.50	11.55±0.79
全草種合計	有	5,841	3,201 (54.8)	7.53±0.02*	34.34±0.37	1.90±0.39	48.86±1.01	7.37±0.43
	無	13,593	3,820 (28.1)	5.13±0.47	34.45±0.71	1.43±0.14	50.21±0.66	8.78±0.83

\*は火入れがなかった区と比較して有意差あり (P<0.05) .

表 2-1-5. イグリット保護区におけるタマラオ糞から検出された内部寄生虫と感染頻度.

寄生虫の種類	陽性サンプル数	感染率 (%)
肝蛭 ( <i>Fasciola sp.</i> )	2	7.4%
アイメリア ( <i>Eimeria sp.</i> )	2	7.4%
円虫 ( <i>Stringylus sp.</i> )	1	3.7%
回虫 ( <i>Ascaris sp.</i> )	1	3.7%
未検出	21	77.8%
合計	27	100.0%

## 第 2 章

### 第 2 節 イグリット保護区におけるタマラオの行動習性調査

#### 2-2-1 目的

前節においてイグリット保護区におけるタマラオの個体数変動を明らかにした。行動生態学で扱われる野生動物の行動・習性の理解は、保全対策の構築に対する重要な生理学的・生態学的情報となる。保全生態学では、保全すべき動物の動向を追跡調査し、個体群の個体数変動を測定し、保全に有効な保護区の設定や管理を行う必要がある。そのためには対象となる動物の採餌行動、繁殖の行動生態、捕食-被食関係、社会行動、出生地からの分散、親からの子育てについて知る事が重要である（長谷川, 2004）。近年では動物行動学を保全に結び付ける研究が盛んになってきており（Caro, 1999）、特に、繁殖行動を知ることには当該種の増殖手段を知ることに等しく、個体数の少ない絶滅危惧種の保全を考える上で重要性が高い。

野生動物の保全方法として、対象種を本来の生息地内で保全する生息域内保全が挙げられる、一方、生息域内保全の補完的措置として対象種を生息域外保全も野生動物の保護において重要な役割を担うが、この場合も野生動物を適切に飼育・管理するために当該種の行動習性を正確に把握することが必要となる。

このように行動習性のような生理生態学的な特徴の解明は、野生動物保護における保全・増殖計画の基盤情報となる。しかしながら、タマラオの行動特性についての研究は Kuehn (1986) が報告しているのみであり十分な情報量とは言い難い。そこで本研究ではタマラオの生態情報の基礎データの蓄積を目的として、イグリット保護区におけるタマラオの行動特性を明らかにすることを目

的とした。

#### 2-2-2 材料および方法

前章における個体数変動の調査と同様にイグリット保護区域内に設置した複数の観察地点から観察を行い、タマラオのグループ行動を解析した。

観察されたタマラオについて単独行動をとっている個体、グループ行動している個体に分類し、さらに、単独行動をとっているタマラオ、グループ行動をとっているタマラオごとに年齢別・性別に分類した。また、グループ構成については、成獣オス、メスの有無、仔の有無について分類し、解析を行った。

なお、本研究では複数のタマラオが観察された場合、それぞれの個体が推定10m程度の距離以内に存在し、行動を共にしているものを同じグループに所属している個体として扱った。

また、単独行動およびグループ行動の割合について年度ごとに差があるかどうかについてカイ二乗検定を用いて解析を行った。

#### 2-2-3 結果

イグリット保護区のタマラオ集団全体において単独行動をとっている個体数およびグループ行動をとっている個体数を表 2-2-1 に示した。2006年から2011年までの6年間の平均値として全体の $10.0 \pm 1.6\%$ のタマラオが単独行動個体として観察された。一方、残りの $90.0\%$ のタマラオがグループ行動をとり、グループのサイズは2頭のものから12頭のものに及んだ(表 2-2-2)。1グループは平均3.57頭のタマラオによって構成されていた(表 2-2-2)。単独行動のタマラオに関して $62.0 \pm 8.0\%$ は成獣オスであった(表 2-2-3)。タマラオ

はしばしば日没時間付近に森林あるいは谷から草地へと出現し、日の出時間付近に森林あるいは丈の高い草の中へと入って行くのが観察された。ほとんどのタマラオグループは5日間の観察においてそれぞれほぼ同じ場所で観察された。図2-2-1は代表的なタマラオグループを示しており、5頭の個体から構成される。別のグループを構成しているタマラオグループが異なる日時で同じ場所（沼田場）で確認された（図2-2-2）。

6年間の観察において、オス同士の争いが2例観察された。1例目では争いに負けたオスが深刻な怪我を負い、2例目では成獣オスが別の成獣オスに追われ崖から落下する様子が目撃された。さらに、2011年には若いオス（推定4歳程度）の死体が発見された。死体は首に他のオスから攻撃を受けた後があり、その傷が死亡原因と考えられた（図2-2-3a, b）。

グループの構成はグループ内の成獣オスの数および成獣メスの数に基づき12タイプに分類された（表2-2-4）。6年間の平均では、観察されたグループ数66のうち、ほとんどのグループは1頭（59.1%）ないしは2頭（31.3%）の成獣メスを含んでおり、少数ではあるものの成獣メスがいないグループや成獣メスが3頭以上いるグループも確認された。一方で、グループ内の成獣オスの数に関しては大きく2つのタイプに分けられた。一つはグループ内に成獣オスが1頭いるタイプ（ $52.8 \pm 4.4\%$ ）、もう一つは成獣オスがいないタイプ（ $46.7 \pm 6.4\%$ ）である。前者（66グループ中34.8グループ）のうち1頭の成獣メスを伴うグループ、2頭以上の成獣メスを伴うグループはそれぞれ27.5%（ $18.2/66$ ）、20.3%（ $15.2/66$ ）であった。稀な例として若齢および幼獣のみで構成されるグループも観察された。

#### 2-2-4 考察

本節では、タマラオ野生集団の行動特性を明らかにすることを目的として、タマラオの単独行動およびグループ行動について分類した。単独行動をとる個体については性別、年齢毎に分類し、グループ行動についてはグループ内の成獣オスおよび成獣メス個体数にしたがって分類した。その結果、90%のタマラオがグループ行動をとっている一方で、一部のタマラオ（10%）は単独行動をとり、その大部分（62%）が成獣オスであることが明らかとなった。また、グループの構成として成獣オスがいるグループといないグループに大別できた。これに対し、1972~1974年のMt. Iglit Game Refuge and Bird Sanctuary 東部での通年にわたるタマラオの観察では、観察された218頭の成獣オスのうち179頭（82%）が単独であったことが報告されている（Kuehn, 1986）。この違いは観察の期間および時期の違いが大きな原因と考えられるが、本研究では火入れの実施により丈の高い草を除くことで、観察されたタマラオの近辺にいる別のタマラオを発見しやすかったことも一要因として考えられるかもしれない。

本節の目的で既に述べたように行動特性は生態情報として非常に有用である。例えば、前節においてタマラオのイグリット保護区への出入りが不明であるために全頭計測の精度に影響を及ぼし得ることが考えられた。また、次節で詳しく述べるが、タマラオはアルヤン保護区において Mangyan と行動圏が重複しており、人と野生動物の確執があると考えられる。タマラオの行動を理解することで、タマラオの保全や現地住民を始めとするステークホルダーとの確執について解決策を提示する糸口になることが期待される。偶蹄類は年間を通じてグループ行動のパターンが変化することが知られており（Turner et al., 2005）、タマラオについても他の偶蹄類と同様に通年で行動のパターンが変化すると考

えられる。本研究で得られた結果は乾期の末期である 4 月後半に限定されたものであるため、タマラオが 1 年間を通じてどのような行動習性を示すかを考察するために十分なデータとは言い難いが、イグリット保護区において、雨期にはイネ科の草本が 2m から 3m まで成長し、タマラオを目視観察することすら困難になること、タマラオの生息域が山奥にあり、これまでタマラオの行動に関する研究がほぼ皆無であったことを考慮すると限定的であるとはいえ、今後より詳細なタマラオの行動研究をする上で貴重な情報であると言える。本項では乾期の末期である 4 月後半に限定されたものであることを踏まえた上で、本研究から得られた結果よりタマラオの行動特性を考察する。

本研究は前節と同様に同時定点観察法を用いたものである。前節で考察したように、この年齢区分法および観察法は十分な精度（再現性）を持ち、本研究で得られた結果はタマラオ集団の動態解析に有益な指標として活用でき、さらに信頼性の高いものであると考えられる。しかしながら、本研究では比較的近くで行動しているタマラオ集団をひとつのグループとして扱ったが、実際にタマラオがひとつのグループの中でどれくらいの距離をおいて行動するのかについては明らかではなく、また本研究の観察が限られた時間内に行われたことから、ひとつのグループに所属する全てのタマラオを観察できていたとは限らない。例えば、成獣オスが観察されなかったグループの近くに、実際はそのグループに所属する成獣オスが存在していた可能性を否定することはできず、同様に単独行動をとっていた個体の近くに別の個体が隠れていた可能性も否定はできない。しかし、本研究で得られた結果は、少なくとも観察されたタマラオグループは同じグループ構成で同じ地域にて複数回観察されているため、グループ構成についての誤差は少ないと考えられる。今後、通年を通じてタマラオの

行動パターンを分析する場合、雨期にはイネ科草本がより高く伸長し、タマラオの目視観察が難しくなること、観察のために頻繁に火入れをすることはタマラオの生息環境に影響を及ぼし得ることなどから、より精確な情報のためにはGPS/VHF首輪の装着による行動追跡などの方法が必要であろう。

多くの偶蹄類は非繁殖期にオスとメスが別々に行動する (Ruckstuhl & Neuhaus, 2002)。オーストラリアの再野生化スイギュウにおいて、成熟オスはメスの発情期 (雨期) のみ群れに合流すること (Tulloch, 1979)、またアノアも繁殖期のみオスがメスに合流することが報告されている (Pujaningsih et al., 2007)。成獣オスが非繁殖期に単独行動をとることは多くの野生偶蹄類においても知られている。この場合、特に成獣オスは単独行動をとる。例えば、アフリカのクーズー (*Tragelaphus strepsiceros*: ウシ科ブッシュバック属の動物) では成獣オスは単独行動を好み、繁殖期になると若齢オスも成獣オスもメスに近づく (Owen-smith, 1992)。また、タマラオと近縁の家畜スイギュウにおいても同様の行動が報告されている (Tulloch, 1969)。タマラオの繁殖期は明確には知られていないが、タマラオの出産時期は餌の豊富な7月から11月の雨期の間であると報告されている (Kuehn 1977, 1986; Talbot & Talbot, 1966)。また、妊娠期間は飼育下のタマラオで317日と報告されている (Masangkay et al., 1996)。ここから推定するとタマラオの繁殖期は8月から12月であると考えられる。本研究の観察期が繁殖期であったか非繁殖期であったか正確にはわからないが、本研究で4月末に観察されたタマラオの単独行動を示した成獣オスは2006~2011年までに合計314頭中101頭であり、成獣オスの32%が単独行動であったこと、ほとんどの成獣メス (94.7%) はグループ内に観察され、そのうちのグループの  $52.8 \pm 4.4\%$  に成獣オスが観察されたことはタマラオが繁殖期、非

繁殖期といった季節的な要因以外によって単独行動、グループ行動（メスグループへの合流）を選択している可能性を示唆している。事実、アフリカスイギュウのような熱帯の偶蹄類では繁殖期が長いため、繁殖期においてもメスグループから離れる成獣オス個体、メスグループに合流しているオス個体がいる (Turner et al., 2005)。さらに、この要因として繁殖行動には時間およびエネルギー投資が大きいため、繁殖期であってもメスグループから離れるという可能性が考えられている (Turner et al., 2005)。ミンドロ島も気温の安定した熱帯気候であることからタマラオの繁殖期も温暖な地域に比べ長くなっており、その期間中における繁殖に費やす時間、採餌効率、メスを取り合うための種内闘争などの要因を反映し、本研究のような結果に至ったのではないかと推測される。

#### 2-2-5 小括

本研究ではタマラオの生態情報として行動習性を明らかにすることを目的として調査を行った。本研究から、タマラオは大部分が 2 頭~12 頭の群れを形成すること、ほとんどのグループ内には 1 頭以上の成獣メスがいること、一部の個体は単独行動をとり、そのうち半数以上が成獣オスであることが明らかになった。第 1 節の結果と合わせ本研究で得られた結果は乾期である 4 月に限定されたものではあるものの IUCN/SSC (2008) の推奨する種の状況概観として重要な情報である。

表 2-2-1. イグリット保護区のタマラオ集団における単独行動個体およびグループ形成個体の割合.

年度	単独行動個体数 (%)	グループ形成個体数 (%)
2006	29 (11.0)	234 (89.0)
2007	12 (5.0)	227 (95.0)
2008	19 (7.0)	244 (93.0)
2009	26 (9.5)	248 (90.5)
2010	33 (10.5)	281 (89.5)
2011	44 (16.1)	230 (83.9)
合計	163 (10.0)	1464 (90.0)

単独行動個体数およびグループ形成個体数の割合に年度間で有意差あり  
(カイ二乗値=22.985, 自由度=5,  $P<0.01$ ) .

表 2-2-2. イグリット保護区のタマラオ集団におけるグループ構成.

年度	グループ数 の合計	グループの 平均サイズ (頭)	サイズ毎のグループの数							
			2	3	4	5	6	7	8	12 頭
2006	71	3.3	23	21	17	6	1	3	0	0
2007	59	3.85	12	13	16	12	2	4	0	0
2008	62	3.94	14	15	12	10	5	5	1	0
2009	72	3.44	24	22	10	7	5	3	1	0
2010	73	3.85	21	19	11	7	8	5	1	1
2011	76	3.03	31	23	13	8	0	1	0	0
合計	413	3.57	125	113	79	50	21	21	3	1

表 2-2-3. イグリット保護区のタマラオ集団における単独行動個体の性別および年齢別  
 個体数.

年度	成獣オス	成獣メス	判別不明	若齢	幼獣	合計
2006	15	9	1	3	1	29
2007	10	0	0	1	1	12
2008	13	1	1	3	1	19
2009	19	5	0	2	0	26
2010	19	9	1	4	0	33
2011	25	7	6	6	0	44
平均±SE	16.8±2.2 (62.0±8.0%)	5.2±1.6 (19.0±5.9%)	1.5±0.9 (5.5±3.4%)	3.2±0.7 (11.7±2.6)	0.5±0.2 (1.8±0.8%)	27.2±4.5

括弧内の数値は全体に対する割合を示す.

表 2-2-4. 成獣オスおよび成獣メスの個体数によって分類したグループ数.

グループ内の成獣 メスの個体数	グループ内の成獣オスの個体数			合計(%)
	0	1	2	
0	1.5±0.6 (2.3±0.9%)	1.5±0.4 (2.3±0.7%)	0 (0%)	3.0±1.0 (4.6±1.5)
1	20.7±3.1 (31.2±4.7%)	18.2±1.3 (27.5±1.9%)	0.2±0.2 (0.3±0.3%)	39.0±2.4 (59.1±3.6%)
2	7.5±1.5 (11.4±2.3%)	13.0±1.9 (19.7±2.9%)	0.2±0.2 (0.3±0.3%)	20.7±1.1 (31.3±1.6%)
3-4	1.2±0.4 (1.8±0.6%)	2.2±1.0 (3.3±1.5%)	0 (0%)	3.3±1.3 (5.1±1.9)
合計	30.8±4.2 (46.7±6.4%)	34.8±2.9 (52.8±4.4%)	0.3±0.2 (0.5±0.3%)	66.0±2.9

グループ数は 2006 年から 2011 年の平均値±SE を示す.

括弧内の数値は全体に対する割合を示す.



図 2-2-1. タマラオグループの 1 例. 1 頭の成獣オス (中央上部)、2 頭の成獣メス (右端および左から 2 番目)、1 頭の若齢 (中央下部) 1 頭の幼獣 (左端). (撮影: 松林 2007 年 4 月).



図 2-2-2. イグリット保護区域の同じ沼田場で観察された異なるタマラオグループ。 a : 6 頭のグループ、 b : 2 頭のグループ、 c : 単独行動。（撮影：石原 2011 年 4 月）。



図 2-2-3. イグリット保護区において 2011 年に発見された若齢オスタマラオの死体. a は全体像、b は死亡原因と考えられる頸部の傷の拡大写真. (撮影：石原 2011 年 4 月) .

### 第3章 イグリット保護区以外の地域におけるタマラオの生息状況

#### 第1節 アルヤン保護区におけるタマラオの生息調査

##### 3-1-1 目的

前章では、イグリット保護区におけるタマラオの個体数変動、およびその生態情報としてタマラオの行動習性を明らかにした。IUCN/SSC (2008) では、状況概観の項目の一つとして対象種の現在の分布状況が挙げられている。これまでのTCPの取り組みによりイグリット保護区においてはタマラオが存在することが確認されており、前章の研究においてタマラオ個体数を推定したが、イグリット保護区以外の地域においてタマラオの調査は十分に為されていない。IUCNの報告では、イグリット保護区以外に、アルヤン保護区およびカラビテ保護区においてもタマラオが生息するとされ、近年の目撃情報により、アルヤン保護区ではタマラオは15から20頭と推定されている (Hedges et al., 2013)。また、カラビテ保護区においては糞や動物の痕跡から15頭程度と推測されている (Hedges et al., 2013)。総合的にタマラオの保全管理を考える上でミンドロ島全土におけるタマラオの分布状況を把握することは非常に重要である。

特にアルヤン保護区はDENRによる飼育計画のため過去に20頭のタマラオを捕獲した地でもあり、イグリット保護区から約20kmしか離れていない場所であるためタマラオが生息している可能性が高いと考えられる。イグリット保護区は現地住民 (Mangyan) の居住が控えられているが、アルヤン保護区においてはTCPが実行された時から既にMangyanが居住しており、数百の断片化したMangyanの村が存在する。したがって、アルヤン保護区におけるタマラオの保全を保証するためには、この区域における人とタマラオの軋轢を理解することが要求される。

本節では、アルヤン保護区におけるタマラオの生存調査を目的とし、アルヤン保護区における人とタマラオの軋轢を含めたタマラオの現在の状況を調査した。

### 3-1-2 材料および方法

#### (1) 調査地

アルヤン保護区は北緯 $12^{\circ}46'$ ~ $12^{\circ}50'$ 、東経 $120^{\circ}54'$ ~ $120^{\circ}56'$ に位置し、Occidental Mindoro から100kmほど離れている(図2-1-1)。もともとあった低地のフタバガキの森は伐採や火入れによってなくなり、自然遷移によって草原植生となった(Custodio et al., 1996)。面積はおよそ3,600 haで石炭岩の低地、フタバガキ、うるし、イネ科が優占種の森に覆われている(図3-1-1, 図3-1-2)。

アルヤン保護区を4つの3km × 3kmのグリッドにわけ、それぞれの区画を調べた(図3-1-1)。本調査地では、2007年7月5日~17日の13日間、TCPにより徒歩と車で現地住民への聞き取り調査が行われ(Rodel, unpublished)、21人中10人のMangyanがGrid1、Grid2およびGrid3でタマラオを目撃している(図3-1-1)。その時の目撃情報は、1頭の成獣、1頭の成獣メスと1頭の幼獣および5頭のグループであった。これらの先行調査の結果を踏まえ、本調査ではタマラオの目撃情報が多かったBuayanやKapihan溪谷付近のアルヤン保護区東部をカメラトラップの調査地として選定した(図3-1-1)。

#### (2) 方法

2008年2月20日から3月2日の12日間、生存個体、種を確認するためにカメラトラップ調査、徒歩によるルートセンサスおよび聞き取り調査を行った。

BuayanやKapihan溪谷付近の主要な獣道を対象に9地点をカメラトラップの設

置場所とした。赤外線カメラトラップ (Sensor camera Field Note II Marif, Yamaguchi, Japan) を、各地点に設置した。また、人とタマラオとの軋轢の存在・現状を理解するため、6グループのMangyan入植者を対象として火入れ農法や狩猟について聞き取り調査を実施した。糞DNAについては第4章で扱う方法に準じた。

### 3-1-3 結果

BuayanやKapihan溪谷付近に設置した9個のカメラトラップから合計9枚の写真が撮影された。合計5種の哺乳類が撮影され、それらはカニクイザル (*Macaca fascicularis*, Primates)、オリバーイボイノシシ (*Sus oliveri*)、2種のげっ歯類 (*Rattus* spp.)、そしてタマラオであった (図3-1-3)。タマラオは1つのカメラトラップ設置地点で3回撮影され、撮影された個体はいずれも成獣オスであった。

ルートセンサスでは、火入れによる農場の近くの川の端で動物の足跡、食痕、新しい糞が当区域で確認された (図3-1-4)。草地における食痕については、ワセオバナ (*Saccharum spontaneum*) に確認された。また糞は端の区域で発見・採取された。この地域で採取された糞からDNAを抽出し、第4章第1節で開発した種判別技術を用いたところ採取された糞はタマラオと同様のバンドパターンを示した (図3-1-5)。

BuayanやKapihan溪谷周辺では、約6家族からなる村が4つ以上あり、そこで聞き取り調査の結果、タマラオの生息地とMangyanの居住区は完全に重複していた。一日一回の頻度で、Mangyanが農場に移動するためにタマラオ生息域を通過するのが目撃された (図3-1-6)。また、Mangyanは乾期に焼き畑農法を行うことが確認された。彼らはバナナ、キャッサバ、さつまいも、じゃがいも、

様々な品種の米、トウモロコシ、たばこを1年毎に約2 haの区域で栽培し、火入れのサイクルは5年から6年であった。さらに、Mangyanは食料として中型の動物を狩猟するという情報が得られた。彼らは槍トラップ、スネアトラップといった伝統的な狩猟方法を用い、また狩猟は雨期にのみ行われることがわかった。

#### 3-1-4 考察

IUCN/SSC (2008) は、対象種の現在の分布レベルとして確実に生息する (Definite)、おそらく生息する (Probable)、生息している可能性がある (Possible)、生息が疑わしい (Doubtful)、絶滅している (Extirpated)、再導入している (Reintroduced)、不明 (Unknown) などのカテゴリーに分けることを推奨している。本調査において、タマラオ成獣オスの個体がカメラトラップによって撮影された。本研究で発見された動物の足跡については様々なサイズがあり、成獣タマラオと思われるものも含んでいた。さらに、4章で開発した種判別法を本調査で採取した糞に実施したところ、糞がタマラオ由来であるということが証明された。これらの結果から、アルヤン保護区におけるタマラオの存在がDefiniteであることがわかった。しかしながら、TCPによる聞き取り調査では複数のタマラオ個体の存在は示唆されているものの (Rodel, unpublished)、カメラトラップではわずか1個体のみの撮影であり、比較的採取しやすい糞についてもわずか1サンプルしか採取されなかったことからアルヤン保護区におけるタマラオ個体数は非常に少ないことが推測される。集団を維持するためには有効集団サイズとして50個体存在すれば短期的な近親交配は回避されると報告されている (Franklin, 1980; Soule, 1980)。本研究の結果からアルヤン保護区に50個体のタマラオが生存しているとは考え難く、この地域におけるタマラオは近交退化が進み集団の維持が困難になっていると可能性が

高いと考えられる。小集団としてアルヤン保護区のタマラオ個体群を維持するために、270頭程度のタマラオが生息しているイグリット保護区においてタマラオを捕獲し、アルヤン保護区に移住させるという方法も考えられるが、イグリット保護区のタマラオ個体数も依然として十分ではないため、現時点ではイグリット保護区における保護対策の推進を優先すべきかもしれない。

本調査からアルヤン保護区において、タマラオとMangyanが非常に近い区域で生活していることが明らかになった。Mangyan が乾期に行う火入れ農法は非常に短いサイクルであり、タマラオの生息域において資源利用性、隠れ場所を減少させる可能性が考えられる。さらに、その結果として、タマラオはしばしば耕作地に入り込むと考えられる。しかしながら、Mangyanはタマラオを保護する法律が存在することを知っており、タマラオを狩猟することは控えている。結果として、Mangyanによるタマラオに対する狩猟の圧は比較的軽微であると考えられる。一方で、外部からの人間による銃を用いた狩猟は非常に大きな問題である。アルヤン保護区の北部に位置するBarriosの狩猟者はカニクイザル、ジャコウネコ、イノシシ、シカを狩猟する一方で、南部の狩猟者の多くはタマラオをターゲットにする。闇市場においてタマラオの肉は1kgあたり300ペソ（1ペソはフィリピン共和国の通貨；1ペソあたり2円~3円程度である）である。この価格はスイギュウ（1kgあたり120ペソ）、家畜牛（1kgあたり180~200ペソ）、イノシシ（1kgあたり120ペソ）のような他の動物よりも高い。

アルヤン保護区はイグリット保護区のタマラオ保護区域から約20kmしか離れておらず、イグリット保護区-アルヤン保護区間をタマラオが行き来している可能性が考えられる。前章の研究により、一部のタマラオがタマラオ保護区域外に移動する可能性が示唆された。タマラオ保護区域-アルヤン保護区間について大きな地理的隔離もないためタマラオは2点間を行き来することができる

考えられる。しかしながら、タマラオ保護区域-アルヤン保護区間の地域については生息調査を実施していないため、タマラオの移動の有無についてはわからない。系統地理学的解析法としてミトコンドリアDNAを用いた解析が知られている。ミンドロ島全域での生息調査を実施するには人的にも財政的にも困難であるが、今回アルヤン保護区において糞サンプルを得られたことから、DNA解析によってイグリット保護区-アルヤン保護区間におけるタマラオの関係性を明らかにすることができるかもしれない。

### 3-1-5 小括

本研究により、アルヤン保護区におけるタマラオが確かに存在することが明らかになった。しかしながら、タマラオ生息域が **Mangyan** 生活区域と完全に重複おり、同保護区におけるタマラオ個体数は非常に少ないと推察された。また、タマラオが直面している最も大きな危機は銃による狩猟である可能性が示唆された。

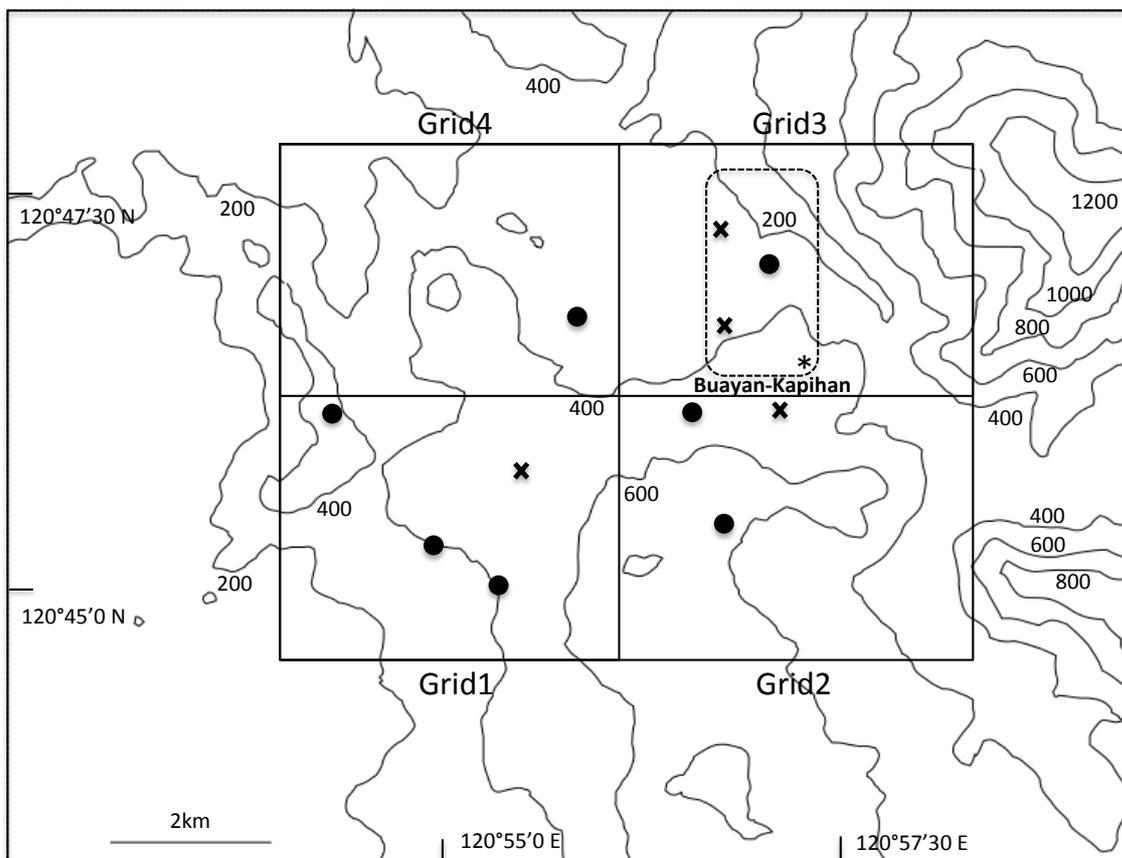


図 3-1-1. アルヤン保護区における調査地点.

地図内の数値は標高を示す。●は現地住民 Mangyan の居住区，×は聞き取り調査によるタマラオの目撃位置，\*はカメラトラップによるタマラオ撮影位置を示す。



図 3-1-2. アルヤン保護区の景観；フタバガキ、うるし、イネ科が優占種の森（撮影：松林 2008年2月）。



図 3-1-3. アルヤン保護区においてカメラトラップ法により撮影されたタマ  
ラオの成獣オス. (撮影：松林 2008年2月) .



図 3-1-4. アルヤン保護区で発見されたタマラオの足跡. (撮影:松林 2008年2月).

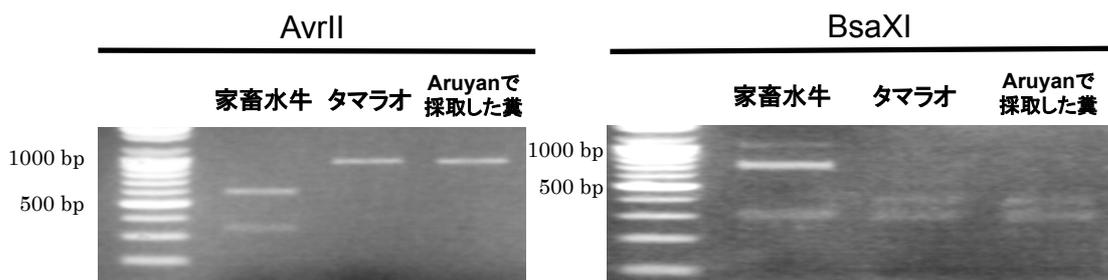


図 3-1-5. アルヤン保護区において採取した糞 DNA に対しスイギュウ属特異的プライマーと 2 種の制限酵素を用いた PCR-RFLP 産物の 2%アガロースゲル電気泳動像.



図 3-1-6. アルヤン保護区における Mangyan の活動. a : タマラオ生息域を移動する Mangyan、b : Mangyan 居住区、c : 焼き畑（撮影：松林 2008 年 2 月）.

## 第3章

### 第2節 カラビテ保護区におけるタマラオの生息域調査

#### 3-2-1 目的

第2章においてイグリット保護区の個体数調査、また、前節においてアルヤン保護区におけるタマラオの生息調査を行った。IUCNによるとカラビテ保護区もタマラオの生息地とされているが科学的な調査は実施されていない。また、第4章1節の研究により、糞を用いたタマラオの同定が可能となった。この技術によって、タマラオの存在確認は個体そのものを発見しなくても糞が見つかりさえすれば可能となった。そこで、聞き取り調査、ルートセンサスおよび糞採取により、カラビテ保護区におけるタマラオの存在調査を行った。

#### 3-2-2 材料および方法

##### (1) 調査地

カラビテ保護区はミンドロ島パルアン市に属しており、北緯13°24'00"~13°28'00"および東経120°17'00"~120°23'00"に位置し、全体で18,016 haの面積を有する(図3-2-1)。カラビテ保護区は最も高い位置の標高は1,520mで大半が急な斜面かつ凹凸の激しい地形である(図3-2-2)。気候はイグリット保護区やアルヤン保護区と同じ熱帯モンスーン気候に属し、雨期(6月~11月)と乾期(12月~5月)がある。

この地域にはフィリピン・スポッテッド・ディア (*Cervus alfredi*)、オリバーイボイノシシ (*Sus oliveri*)、ミンドロ皇帝ハト (*Ducula mindorensis*)、

といったミンドロ島固有種が生息している。近年これらの固有種は開発、放牧、焼き畑などによる人間活動によって危機に直面しているとされている。かつては密度が高い森林地帯でパッチ状に草地があったが、今は伐採や放牧、焼き畑農法、入植地の拡大によって森林地帯が20%以下の草地となっている。

本調査を行うにあたり聞き込み調査によって近年のタマラオ目撃情報を収集した。この際、PAWBのTCPによる2004年の調査による報告が基礎情報として使用された。それらの情報をもとにカラビテ保護区における調査区域を選定した。結果としてTower, Bunuagan, Maduron, Itobo, Ramosの5つの地域を調査地とした(図3-2-1)。

## (2) 方法

タマラオの生存個体、痕跡を確認、さらにカラビテ保護区の環境を理解するため徒歩によるルートセンサス、Mangyanへの聞き取り調査を2010年3月15日から24日の10日間行った。調査には5人のグループを2つ作り、また、カラビテ保護区の山麓の村で案内人を雇いそれぞれのグループに案内人を2人加え7名ずつのグループとした。調査地を区画に分け、1日毎にそれぞれの区画を各グループがジグザグに歩き調査することで見落としを少なくした。

聞き取り調査については、カラビテ保護区に居住しているMangyanおよびカラビテ保護区の近隣住民9名に対してカラビテ保護区内でタマラオを目撃したことがあるかを質問した。目撃したことがある場合、その時期、場所について、さらにタマラオはどのような行動をしていたかを確認した。また、タマラオについて何か知っていることがあるかについても質問した。糞DNAについては第4章で取り扱う方法に準じた。

### 3-2-3 結果

カラビテ保護区において、タマラオの生体は発見されなかったものの、タマラオ由来と考えられる角と糞が確認され、どちらも脱落してから時間が経過したものであった（図 3-2-3, 図 3-2-4）。角は開けた 1 年生草本がまだらに生育している斜面、糞は竹が密集した林の区域で発見された。イノシシ、シカに関しては糞以外に生体も確認された。しかしながら、遺伝的解析の結果、採取された糞の DNA バンドパターンは家畜スイギュウと同様であった。

カラビテ保護区には現地住民 Mangyan の 7 つある部族のうち一つ Iraya が居住していた（図 3-2-5）。また、この地域において非常に広範に焼き畑が行われていた（図 3-2-5）。

聞き取り調査の結果、9 名中 8 名がカラビテ保護区でタマラオを目撃していたが調査から 1 年以内の目撃情報はなく、最新のタマラオの目撃情報は、約 1 年以上前の Itobo 近辺でのものであった（図 3-2-1）。しかしながら、本調査ではこの地区でのタマラオの痕跡は認められなかった。他の目撃情報はすべて調査から 4 年以上前のものであった。また、カラビテ保護区の近隣住民から、“昔からタマラオを神聖な動物としており狩猟は行っていない”、“オスのタマラオが近隣の放牧地にいる家畜スイギュウに攻撃を仕掛けた” という目撃情報もあった。

### 3-2-4 考察

本研究ではカラビテ保護区におけるタマラオの生存の有無を明らかにするために調査を行った。角などのタマラオが存在した痕跡が確認され、さらに最

新の目撃情報が 1 年前にあったことから、同保護区におけるタマラオの生存が示唆された。本調査でタマラオの生体は確認することができず、また採取された糞は、DNA 分析の結果、タマラオ由来ではなく家畜スイギュウのものであった。これらのことから、現段階でタマラオは痕跡を残さないほど個体数が極少であるか、あるいは絶滅してしまっている可能性が示唆された。

かつては生息していたタマラオが絶滅、あるいはほぼ絶滅してしまった理由はいくつか考えられる。第一にアルヤン保護区と同様に人間活動による開発の可能性がある。家畜スイギュウの糞がかなり標高の高い区域で採取されたことから、非常に広範囲で開発が進んでいると考えられる。カラビテ保護区の近隣にあるハリソン村から得られた情報によると、牛の放牧が保護区の中央部で盛んなのに対し、焼き畑は非常に広い区域に広がっているとのことである。また個人の家畜所有者らは占有している区域以外も短期的な放牧地として使用している。さらに、カラビテ保護区にはパッチ状に現地住民のMangyanが居住しており、彼らは焼き畑を基本とする農業を行うためタマラオの生息域が圧迫され、高地に追いやられた可能性が考えられる。

イグリット保護区とアルヤン保護区が比較的近くに位置しているのに対し、カラビテ保護区はミンドロ島の北端に位置しており二つの保護区から大きく離れている。本研究において、カラビテ山にタマラオが生存していた痕跡が確認されたことは、かつてはミンドロ島中にタマラオが生息していたという報告を裏付けるものではあるが、タマラオ由来の糞サンプルが回収できなかったため、タマラオのミンドロ島における分散過程などを推測することは難しい。

本研究の結果は、タマラオがカラビテ保護区において絶滅したことを示すものではない。しかしながら、10日間に亘るカラビテ保護区調査でタマラオの生

存痕跡が全く確認されなかったことから仮にタマラオが生存していたとしても、この地において継続的にタマラオが種として存続していくことは難しいと考えられる。一方でタマラオ以外にシカ、イノシシについては生存が確認されたこと、これらの種も希少な固有種であることから、カラビテ保護区における野生動物保全のための環境を整備することは重要であると考えられる。

### 3-2-5 小括

本節ではカラビテ保護区におけるタマラオの生息域調査を実施した。本研究の結果から本章第 1 節の結果と合わせて、アルヤン保護区、カラビテ保護区にはタマラオがほとんど生息していない可能性が示唆された。

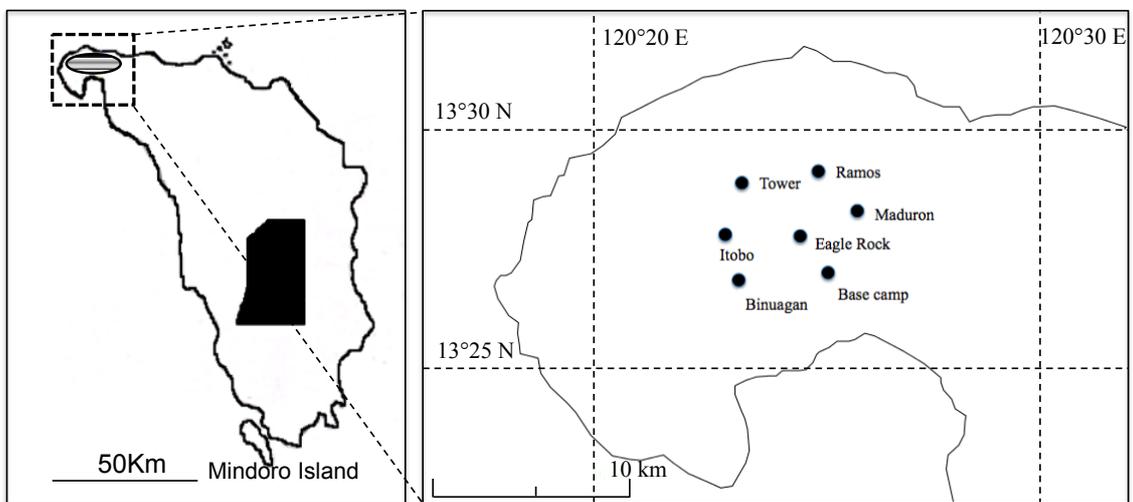


図 3-2-1. カラビテ保護区における調査地.

Tower, Bunuagan, Maduron, Itobo, Ramos は現地呼称名.



図 3-2-2. カラビテ保護区の景観.

(撮影：石原 2010 年 3 月) .



図 3-2-3. カラビテ保護区で発見されたタマラオの角. (撮影：石原 2010 年 3 月) .



図 3-2-4. カラビテ保護区で発見された動物の糞. a : シカ、b : イノシシ、c : スイギュウ型の糞. (撮影 : 石原 2010 年 3 月) .



図 3-2-5. カラビテ保護区における焼き畑の跡(左)、およびMangyan 居住区(右).  
(撮影：石原 2010 年 3 月) .

## 第4章 糞 DNA を用いたタマラオの生態情報調査

### 第1節 糞から抽出した DNA を用いたタマラオ同定法の検討

#### 4-1-1 目的

第2章の調査において、タマラオが保護区域の外に移動している可能性が示唆された。この可能性を検証するためには保護区域外でタマラオの存在を同定しなければならないが、タマラオは非常に用心深く、また個体数も極端に少ないため保護区域外でタマラオを発見することはほとんど不可能に近い。個体そのものを発見することと比較して、糞であれば容易に発見することができる。しかし、保護区域の外には家畜化されたウシ、スイギュウが飼育されている場合もあり、またタマラオの糞はウシ、スイギュウの糞と形状的に類似しており外見からタマラオの糞であることを同定することは難しい。

近年の分子生物学的技術の発展に伴い、遺伝子を用いた解析技術は、保全生物学や野生動物管理においても、行動、生態的特色といった多くの情報を DNA から読み取ることができるという点で非常に有用なツールとなってきている。とりわけ、mtDNA は核 DNA と比較してより早い進化速度を持つこと、配列内に多型をより多く持つことが知られており、近縁種を同定することに使用可能である (Brown et al., 1979, 1982)。特にシトクロム *b* をコードする塩基配列は種間で多くの変異を有し、分子系統学的調査、法生物学的種判別に用いられている (Kocher et al., 1989; Smith & Patton, 1991; Bartlett & Davidson, 1991; Irwin et al., 1991; Paxinos et al., 1997; Cespedes et al., 1998)。

Paxinos et al. (1997) は同所性のイヌ科動物種の糞から DNA を抽出し、PCR 法で増幅したシトクロム *b* 遺伝子に 3 種類の制限酵素 (Alu I, Hinf I, お

よび Taq I) を用い、切断することでそれぞれのイヌ科動物種間に異なる電気泳動パターンを検出することでこれらの種を判別した。一方 Kurose et al. (2005) は対馬半島における肉食獣に対し、種特異的なプライマーを用いた PCR を行うことで糞から種を判別した。そこで本研究では、糞から抽出した DNA をタマラオ特異的なプライマーを用いた PCR および制限酵素断片長多型 (PCR-RFLP) によって解析し、タマラオ由来の DNA を同定する方法を確立することにした。

#### 4-1-2 材料および方法

##### (1) サンプル採取

本研究では、イグリット保護区で採取したタマラオと思われる糞に加え、比較対象として由来の明らかな沼沢スイギュウ、交雑スイギュウ (河川型×沼沢型：河川型が父系、沼沢型が母系)、およびウシの糞を用いた。タマラオの糞サンプルに関してはイグリット保護区のタマラオ保護区域にて合計 18 サンプルを採取した。糞の表層上の腸管上皮細胞を除菌綿棒で擦り取り、1ml の lysis buffer (White & Densmore, 1992) を入れた 1.5ml マイクロチューブで保存した。Lysis buffer の組成は 0.5% SDS、100 mM EDTA (pH 8.0)、100 mM Tris-HCl (pH 8.0)、そして 10 mM NaCl である。沼沢スイギュウ、交雑スイギュウ、ウシの糞由来の腸管上皮細胞に関してはフィリピン大学ロスバニオス校フィリピンカラバオセンターにてタマラオと同様の方法を用いて回収した。これらの 3 種に関しては排便を確認した後に採取した。

##### (2) DNA 抽出

DNA 抽出は Protease K 処理およびフェノール・クロロホルム法にて行った。

50mg/ml の Protease K および 5M NaCl をサンプルチューブに加え、55°Cにて 1 時間インキュベートし、インキュベート後、37°Cで 16 時間インキュベートした。4°C、25,000 (× g) にて 5 分間遠心し、糞の残さを取り除いた上清を DNA 抽出に用いた。DNA 抽出は初めにサンプルと等量のフェノールを加え、室温、25,000 (× g) にて 5 分間遠心を行った。遠心後、上清を回収し、新しいチューブに移した。次に上清の入ったチューブに、上清と等量のフェノールとクロロホルムを 1 : 1 で混ぜ室温、25,000 (× g) にて 5 分間遠心を行った。遠心後、上清を回収し、新しいチューブに移した。最後に上清と等量のクロロホルムを加え、室温、25,000 (× g) にて 5 分間遠心を行った。遠心後、上清を回収し新しいチューブに移した。上清の入ったチューブに 750ml の 100%エタノールを加え室温にて 15 分間放置し、室温、25,000 (× g) にて 30 分間遠心した。

### (3) プライマー設計

糞中 DNA からタマラオ由来の DNA を同定する方法を確立するため、スイギュウ属特異的プライマーペアおよびタマラオ特異的プライマーペアを mtDNA のシトクロム *b* の塩基配列に基づいて新たに設計した。タマラオ、家畜スイギュウ、牛のシトクロム *b* 配列に関しては Genbank データベースを参照した (GenBank accession: *Bos Taurus*, D34635; *Bubalus bubalis*, D82892–D82894, D88633–D88637; *Bubalus mindorensis*, D82895)。スイギュウ属特異的プライマーペアおよびタマラオ特異的プライマーペアは各種間において塩基変異の多い配列上に結合するように設計した (図 4-1-1)。スイギュウ属特異的プライマーペアの配列は 5'-CATTCATTGACCTCCCTGCT-3' (Forward) と 5'-GGCTGTCCTCCAATTCATGT-3' (Reverse) 、タマラオ特異的プライマー

ペアの配列は 5'-GCACAAACCTAGTTGAGTGA-3' (Forward) と  
5'-ACATGAATTGGAGGACAGCC-3' (Reverse) である。これらのプライマー  
ペアにより増幅が期待される産物のサイズはそれぞれ約 1,000 bp である。また  
ダイレクトシーケンスにはスイギュウ特異的プライマーである  
5'-CATTCATTGACCTCCCTGCT-3' (Forward) のプライマーおよび  
5'-GGCTGTCCTCCAATTCATGT-3' (Reverse) のプライマーをそれぞれ使用  
した。

#### (4) PCR

PCR 反応には EX Taq polymerase (Takara Bio 社) を使用した。10 倍希釈  
の EX taq buffer を  $2\ \mu\text{l}$ 、 $10\ \mu\text{M}$  のプライマーペアを  $1.2\ \mu\text{l}$ 、 $1.6\text{ng}/\mu\text{l}$  DNA  
サンプルを  $1\ \mu\text{l}$  使用し、純水で希釈し合計  $20\ \mu\text{l}$  とした。反応には自動 DNA  
サーマルサイクラー (TP600, Takara Bio 社) を使用した。プログラムは初め  
に  $98\ ^\circ\text{C} \cdot 10$  秒、その後以下の過程；熱変性に  $98\ ^\circ\text{C} \cdot 30$  秒、アニーリングに  
 $65\ ^\circ\text{C} \cdot 30$  秒、伸長反応に  $72\ ^\circ\text{C} \cdot 2$  分間の 3 段階の反応を 30 サイクル行った。  
PCR 産物  $9\ \mu\text{l}$  を 1.0%アガロースゲルにて 100V で 20 分間電気泳動を行い、エ  
チジウムブロマイドによって染色した後、紫外線化にて可視化したものを撮影  
した (Syngene; Synoptics Ltd, Cambridge, UK)。

#### (5) ダイレクトシーケンス

イグリット保護区のタマラオ保護区域で採取した糞便サンプルがタマラオ  
由来であることを確認するため、シトクロム *b* 配列をシーケンスした。シー  
ケンスには、まず、スイギュウ特異的プライマーを用いた PCR (上記の方法

と同様) を行い、PCR 産物を PCR 用チューブから 1.5  $\mu$ l チューブに移し、エタノール沈澱を行った。エタノール沈澱した PCR 産物に 50  $\mu$ l の純水を加え、そのうち 6.5  $\mu$ l をシーケンス用サンプルとした。シーケンス用サンプルを 1  $\mu$ l の Big Dye (Applied Biosystems, Cheshire, UK)、1  $\mu$ l のプライマー (3  $\mu$ M)、1.5  $\mu$ l のシーケンス用バッファーに混ぜ、計 10  $\mu$ l とした。ダイレクトシーケンスのための PCR プログラムは初めに 96 °C・30 秒、その後以下の過程 ; 熱変性に 98 °C・10 秒、アニーリングに 50 °C・5 秒、伸長反応に 60 °C・4 分間の 3 段階の反応を 25 サイクル行った。終了後 PCR 産物を PCR 用チューブから 1.5  $\mu$ l チューブに移し、エタノール沈澱を行った。沈澱後、チューブに HiDi-Formamide を 20  $\mu$ l 加え、十分にピペッティングし沈澱を溶かし、95 °C にて 3 分間、氷上にて 2 分間インキュベートした。その後、ABI Prism 310 genetic analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA) に供した。シーケンス終了後、読んだ配列をデータベース上に存在する、タマラオのシトクロム *b* 配列と照らし合わせることで、採取した糞がタマラオ由来であることを確認した。

#### (6) PCR-RFLP

PCR-RFLP には 2 種類の制限酵素、A<sub>vr</sub>II (Takara Bio 社) および B<sub>sa</sub>XI (Biolabs 社) を使用した。A<sub>vr</sub>II は 5'-CCTAG-3' の塩基配列を認識・切断し、B<sub>sa</sub>XI は 5'-<sub>9</sub> (N) AC (N) <sub>5</sub>CTCC (N) <sub>10</sub>-3' の塩基配列を認識・切断する (図 4-1-1)。PCR (上記の方法と同様) にて増幅後、PCR 産物の 5  $\mu$ l に 1.2 U の制限酵素、5  $\mu$ l の 10 倍希釈制限酵素用バッファーを加え、最終反応量を 50  $\mu$ l とし、37 °C で 4 時間反応させた。制限酵素による産物は 2% アガロースゲル

に 100V にて 30 分間電気泳動した。これをエチジウムブロマイドによって染色した後、紫外線により可視化した。

#### 4-1-3 結果

採取した 18 個のタマラオの糞サンプルのすべてから DNA を抽出し、スイギュウ属特異的に設計したプライマーペア、タマラオ特異的に設計したプライマーペアによって増幅したそれぞれの PCR 産物のバンドパターンを図 4-1-2 に示す。スイギュウ特異的プライマーペアを用いた PCR の結果、沼沢スイギュウ、交雑スイギュウ、そしてタマラオに関しては約 1,000 bp のシトクロム *b* がアガロースゲル上に観察されたが、ウシのシトクロム *b* に関しては増幅されなかった。一方、タマラオ特異的に設計したプライマーペアでは、ウシのシトクロム *b* は増幅されなかったが、タマラオおよび一部の交雑スイギュウについては約 600 bp のシトクロム *b* 断片が増幅された。

PCR-RFLP の結果を (図 4-1-3) に示す。A<sub>vr</sub>II は沼沢スイギュウ、交雑スイギュウの PCR 産物から 387 bp の断片と 589 bp の断片の 2 つのバンドパターンを示した。しかし、A<sub>vr</sub>II の認識部位はタマラオには存在しないため、タマラオのシトクロム *b* は断片化されなかった。一方、B<sub>sa</sub>XI にて処理した沼沢スイギュウ、交雑スイギュウの PCR 産物は 267 bp と 679 bp の 2 つのバンドパターンを示した。一方、タマラオの PCR 産物は 367 bp と 267 bp–282 bp の 2 つのバンドを示した (図 4-1-3)。

#### 4-1-4 考察

PCR 解析において、タマラオのシトクロム *b* 遺伝子および家畜スイギュウ

のシトクロム *b* 遺伝子はスイギュウ属特異的プライマーペアによって増幅が確認されたが、ウシのシトクロム *b* は増幅されなかった。一方、タマラオ特異的プライマーペアを使用した PCR 解析では、タマラオのシトクロム *b* 遺伝子だけではなく一部の交雑スイギュウのシトクロム *b* 遺伝子も増幅された。一方、2 種類の制限酵素 *AvrII*・*BsaXI* を用いた PCR-RFLP では家畜スイギュウとタマラオ間で明瞭に異なるバンドパターンを示した。

シトクロム *b* 遺伝子におけるタマラオ特異的プライマーを設計するにあたり、2 カ所の家畜スイギュウおよびウシとは異なるタマラオの塩基配列を選択した。新たに設計したこれらのプライマーは 18 個すべてのタマラオ糞から抽出した DNA を増幅することに成功したものの、4 つのうち 1 つの家畜スイギュウ糞から抽出した DNA にも反応した。種特異的プライマーはしばしば 3'末端に変異を持つ塩基配列を用いる。しかしながら、本研究においては 2 種間の 3'末端に変異がなく、タマラオ特異的プライマーの特異性が低下した。これについてはさらなる検討が必要である。糞 DNA の劣化も PCR の精度が下がった原因かもしれない。ダメージを受けた DNA が DNA ポリメラーゼの精度を下げることは過去に報告されている (Sikorsky et al., 2007)。Kurose et al. (2005) はベンガルヤマネコ (*Felis bengalensis*)、テン (*Martes melampus*)、チョウセンイタチ (*Mustela sibirica*)、そしてイエネコ (*Felis catus*) の 4 種の肉食動物の糞 DNA シトクロム *b* 配列に対し種特異的プライマーを用いた PCR 法にて判別した。彼らは少数のサンプルについて、種特異的プライマーが異なる種のバンドを増幅してしまったため、複数の種特異的プライマーを同時に使用することで精度を高めることを推奨している。それでも、タマラオはほとんど家畜スイギュウとその生息域が重複していないため、タマラオ特異的プライマーを用い

シトクロム *b* 配列を特異的に増幅する PCR 法は非常に有効であると言える。このことは第 3 章 1 節より、近隣に居住している Mangyan が家畜動物を飼養せず、焼き畑によって生計を営んでいる聞き取り調査の結果からも裏付けられる。

糞から種を判別する方法は高い精度を要求される。制限酵素を用いた種特異的な mtDNA を同定する方法はイヌ科の動物 (Paxinos et al., 1997)、カレイ目魚類 (Cespedes et al., 1998)、ヨウスコウワニ (*Alligator sinensis*; Yan et al., 2005) など、広く使用されてきた。本研究でスイギュウ属特異的に増幅した 976 bp のシトクロム *b* 配列によって家畜ウシとスイギュウ属は判別できた。PCR 産物を *AvrII* および *BsaXI* を用いて切断した結果家畜スイギュウの糞 DNA とタマラオ由来と思われる糞 DNA を判別することができた。このように本研究によって開発された方法によって野外で採取されたタマラオ糞を高い精度で同定することが可能である。本研究における野外で採取された糞は、Kurose et al. (2005) によって報告されている 4 種の肉食動物 (80%, 24/30 samples) の糞の同定よりも高い割合 (100%, 18/18 samples) で PCR に成功している。糞 DNA は紫外線によるダメージをしばしば受けているため、サンプリングされる前の時間経過、そして環境が PCR の成功率に影響を及ぼしているかもしれない。本研究では、比較的新しい糞を採取することで DNA へのダメージを最小限にした。今後、時間経過や環境が PCR 増幅にどのように影響を及ぼすかを明らかにすることが期待される。

糞 DNA 解析は絶滅危惧種に対し、例えば系統解析 (Irwin et al., 1991; Smith & Patten, 1991; Hammond et al., 2001)、集団遺伝学的解析 (Constable et al., 1995; Nielsen, 2008)、個体の分布把握 (Kurose et al., 2005)、そして採餌行動調査 (Höss et al., 1992) などに対して有用な情報獲得の技術として利用されて

きている。現在、タマラオの生息は、ミンドロ島内のイグリット保護区とアルヤン保護区のみで確認され、最も大きな集団はイグリット保護区に確認されている。イグリット保護区では第 2 章でも述べたように TCP により継続的な個体数調査が行われている。しかしながら、アルヤン保護区、カラビテ保護区については、本研究でも調査を行ったものの依然として情報が限られている。本研究で開発された糞 DNA を用いたタマラオ同定法は糞を集めることで、タマラオの存在確認を広い区域で実施することが可能となる。実際、本研究においてアルヤン保護区で採取された糞はタマラオ由来であることが明らかになった。加えて、我々がアルヤン保護区で採取した糞のシトクロム *b* の塩基配列が Tanaka et al. (1996) の報告と完全に一致することを確認した。一方イグリット保護区で採取された糞サンプルにおいてはシトクロム *b* の 255 bp 上においてチミンがシトシンへと置換していた。Tanaka et al. (1996) はアルヤン保護区で捕獲したタマラオの血液を使用していた。これらの結果はイグリット保護区とアルヤン保護区でタマラオは異なるハプロタイプのシトクロム *b* を有することを示唆している。この点については多数の糞サンプルを用いた研究で検証する必要がある。

タマラオは非常に少ない個体数であることから、ボトルネック効果や近親交配によって遺伝的多様性に影響を受けていることが考えられる。糞から種が同定できれば、野外採取の糞を用いて、例えば 12sRNA、D-loop、そしてマイクロサテライト配列などを利用する事で当該種の遺伝的多様性を解析することも可能である。実際に糞 DNA を用いた遺伝的多様性解析は過去にアフリカにおけるクロサイ (*Diceros bicornis*) とシロサイ (*Ceratotherium simum*) やアムールトラ (*Panthera tigris*) の研究で報告されている (Russello et al., 2004;

Nielsen, 2008)。遺伝子多様性の解析に糞を使用することは、糞が個体に比べ比較的容易に発見できるという点、個体にストレスを与えることなく非侵襲的に DNA を採取できることから非常に役立つ技術になると考えられる。

土着の民族ではなく外部からの密猟者も依然としてタマラオにとっての脅威である。前章で述べたように、タマラオの肉は闇市でスイギュウ肉の 2 から 3 倍の価格で取引されていると言われている。本研究における種判別法は理論的にはタマラオの組織にも応用が可能である。したがって、他の絶滅危惧種にも応用されているように (Fang & Won, 2002; Yan et al., 2005)、タマラオの密猟やタマラオの肉の密輸を規制するのにも役立つかもしれない。

#### 4-1-5 小括

本節では、タマラオの DNA を利用する手段として、糞から抽出した DNA を用いた種判別法の開発を行った。PCR 解析および 2 種類の制限酵素 *AvrII*・*BsaXI* を用いた PCR-RFLP によって糞の形態が類似している家畜スイギュウとタマラオ間で明瞭に異なるバンドパターンを示し、本方法を用いることで糞からタマラオを判別することが可能となった。

```

1. atgaccaaca tccgaaaatc ccaccactg ataaaaattc taacaatgc attcattgac ctccctgctc
2. ....a.....
3. ....t....t....g....a.....g.....c...t..a..c.
Buffalo forward primer⇒

1. catcaaacat ctcatcatga tgaactttg gctctctcct aggcatctgc ctaattctgc aaatcctcac
2. ....t.....
3. ....t....t....c..t..c....g..a.....c..a.....

1. cggcctattc ctagcaatac actactcatc cgacacaaca acagcattct cctccgtcgc ccacatctgc
2. ....a.....
3. a.....a.....t..ta.....t.....

1. cgggacgtga actatggatg aattatccga tacatacacg caaatggagc ttcaatattt tcatctgct
2. ....t.....c.....
3. ..a.....c..c....c.....c.....g...t.....

1. tatatataca cgtaggacga ggcatatact acggatcata tacctttcta gaaacatgaa atatcggagt
2. ....c.....
3. ....g....t....t....g..t..c..t.....t.....

1. aatcctatta ttcacagtaa tagccacagc atttatagga tacgtactgc catgaggaca aatatcattc
2. ....c....g.....
3. ....t..c..g..c.....c..a.....
BsaXI
Tamaraw forward primer⇒

1. tgaggagcaa cagtcatcac caaccttctc tcagcaatcc catacattgg cacaacctag ttgagtgaa
2. ....g.....ct..a.....c.....t...g..g.....
3. ....t.....ct..a.....c.....t...c..a.....

1. ttgagggggg attctcagta gacaaagcaa cctcaccgg attcttcgca tttcacttca tcttccatt
2. ....c.....
3. ..c....c....t.....t.....t..c..t..t....t.....

1. cattatcgca gcacttgcaa tagtccactc atttattctc cacgaaacag gatccaacaa cccaacagga
2. ....c.....
3. t..c...at...a...c.....c...c.....c.....

1. atctcatcag acacagacaa aatcccattc caccctact acaccattaa agacattcta ggcgcctgc
2. ....c.....a.....
3. ..t..c....gt.....c.....g.....ct...g....ct
AvrII

1. tattaatcct agccctaata ctattagtac tattcacacc cgacctctc ggggaccag acaactacac
2. ....c.....g.....a.....
3. ..c....t....t.....c.....g.....a.....t.....

1. cccagcaaac ccaactcaaca cacctcccca tatcaaactc gaatggactc tcctattcgc atacgcaatc
2. ....c.....g.....
3. ....c..t.....c..t..c.....c..g..a.....t...t.....

1. ttacgatcag ttcctaacaa actaggaggg gttctagccc tagttctctc catcctaate ctcatttca
2. ....a.....t.....
3. ....a..c..c.....a..a.....cct...t.....t..tgc...a..

1. tgcccctatt acatacatcc aaacaacgaa gtatgatgtt cgggccattc agccaatgcc tattctgaat
2. ....gc.....
3. ..c....c....c..c.....c..a..a..a..c.....g..c

1. cctagtagca aacctgctaa cactcacatg aatggagga cagccagtcg aacacccata tattaccatc
2. t.....g.....g.....g.....a.....c.....t.....t.....
3. ....g....a..g.....a.....a.....c.....c.....
←Buffalo reverse primer
←Tamaraw reverse primer

1. ggacaactag catctatcac atacttctc ctcatcctag tgctaatacc aacggccagc ataatcgaaa
2. ....g.....t.....g.....c.....
3. ....g....ct.....t.....g...c.....

1. ataatctctt aaaatgaaga
2. ....
3. ..c..at..ac.....

```

図 4-1-1. タマラオ、家畜スイギュウおよびウシのシトクロム *b* 塩基配列とプライマーの設計箇所および制限酵素認識部位. 1 はタマラオ、2 は家畜スイギュウ、3 はウシの塩基配列を示す.

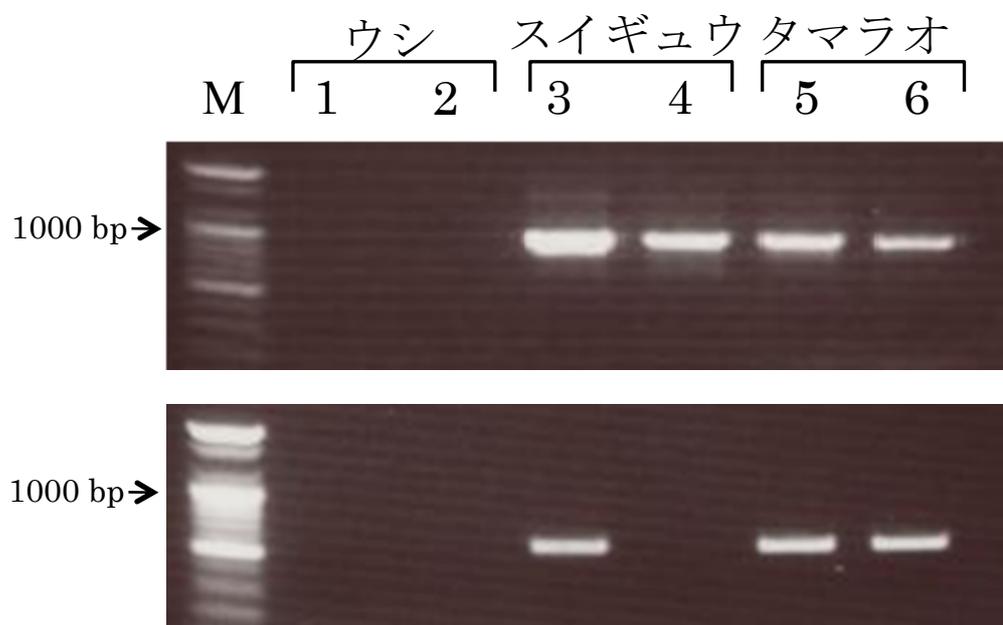


図 4-1-2. スイギユウ属特異的プライマーペアを用いて増幅した PCR 産物（上側）およびタマラオ特異的プライマーペアによって増幅した PCR 産物(下側)の 1%アガロースゲル電気泳動像. M：分子マーカー、1、2：ウシ、3：交雑スイギユウ（沼沢スイギユウ×河川スイギユウ）、4：沼沢スイギユウ、5、6：タマラオ.

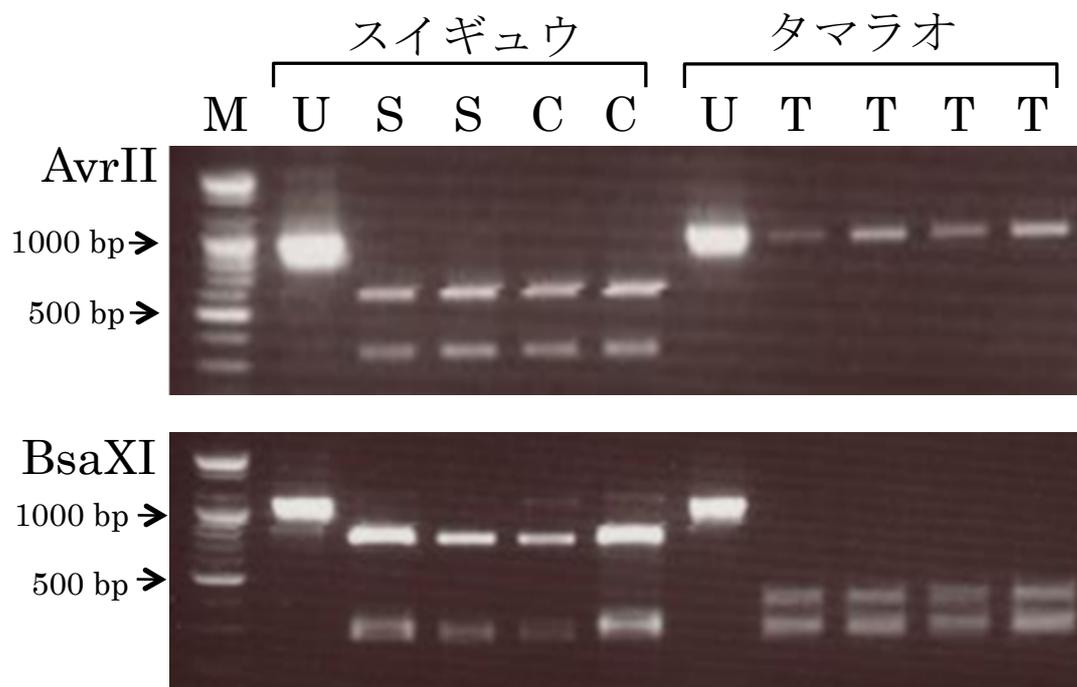


図 4-1-3. スイギユウ属特異的プライマーペアと 2 種類の制限酵素を用いた PCR-RFLP 産物の 2%アガロースゲル電気泳動像. M: 分子マーカ、U: 切断していない PCR 産物、S: 沼沢スイギユウ、C: 交雑スイギユウ、T: タマラオ.

## 第 4 章

### 第 2 節 タマラオ集団の mtDNA 上の D-loop 配列を用いた遺伝子多様性解析

#### 4-2-1 目的

前節の研究によって糞 DNA をタマラオ由来のものとして使用することが可能となった。DNA 解析によって得られる情報は様々であるが、糞など抽出 DNA 量が非常に少ない場合、核 DNA では結果がでにくいことあるといわれている (Butler, 2009)。一方、mtDNA は劣化したサンプルでも使用可能であることが多い。mtDNA は前節でも述べたように種特異的な情報を有しており個体レベルでの解析には向かないが分子系統解析などで野生動物の分野においてしばしば利用されている。

そこで、本研究では、イグリット保護区のタマラオ集団における遺伝的多様性を解明することを目的として、糞 DNA に由来する mtDNA の D-loop を用いてタマラオ集団内の遺伝子多様性の指標であるハプロタイプ多様度および集団の分化の度合いを示す塩基多様度を算出した。さらにアルヤン保護区で採取されたタマラオ糞 (第 3 章第 1 節) も同様に解析し、イグリット保護区の D-loop との比較を行った。

#### 4-2-2 材料および方法

##### (1) サンプル採取および DNA の精製

糞便サンプルは前節で用いたタマラオの糞と同じもの、すなわち既に本研究において DNA 精製まで完了しているものを使用した。これらの糞便サンプルはイグリット保護区の 11 の観察地点で 2007 年の 4 月 22 日~4 月 25 日の間に得られ

たもので、採取地および個数の内訳は、Magawang (6 サンプル)、Loibfo (5 サンプル)、Fangandatan (3 サンプル)、Bayokbok (2 サンプル)、Bato fidel (2 サンプル)、Inobon (2 サンプル)、Iyan (2 サンプル)、Tarzan (2 サンプル)、Talafu East (2 サンプル)、Lanas II (2 サンプル)、Nagbobong (1 サンプル) の計 29 サンプルである。さらに第 3 章第 1 節のアルヤン保護区における現地調査で採取されたタマラオの糞サンプルを加え計 30 サンプルとした。

## (2) プライマーの設計

タマラオの D-loop 配列に関する報告はないため、mtDNA の D-loop 配列がプロリン t-RNA をコードする領域とフェニルアラニン t-RNA をコードする領域に挟まれて位置することから、この 2 つの配列上にプライマーをそれぞれ設計した。プライマーの配列はプロリン t-RNA 配列上に

5'-CCAAAGCTGAAGTTCTATT-3' (Forward)、フェニルアラニン t-RNA 配列上に 5'-ATTTTCAGTGCCTTGCTTTG-3' (Reverse) を設計した。また、D-loop 上には種間を超えて保存性の非常に高い領域が存在する。そこで、シーケンスの精度を高めるため、D-loop 上にある種間で保存性の高い配列上に

5'-TCTTCTCGCTCCGGGCCCAT-3' (Forward) および

5'-ATCGAGATGTCTTATTTAAG-3' (Reverse) の 2 つのプライマーを設計した。さらに、これらのプライマーから読み取れた配列を比較し、タマラオの D-loop 間で共通の配列を検索し 5'-TTAACTGCATCTTGAGCACCA-3' (Forward) および 5'-CTTGCTTATATGCATGGGGTA-3' (Reverse) の 2 つのプライマーを設計した。これらの計 6 つのプライマーを使用しタマラオ D-loop 配列の解析を行った。

### (3) PCR

PCR 反応には前節と同様に Takara Bio 社の EX Taq polymerase を使用した。10 倍希釈の EX taq buffer を  $2\mu\text{l}$ 、 $10\mu\text{M}$  のプライマーペアを  $1.2\mu\text{l}$ 、 $1.6\text{ng}/\mu\text{l}$  DNA サンプルを  $1\mu\text{l}$  使用し、純水で希釈し合計  $20\mu\text{l}$  とした。反応には自動 DNA サーマルサイクラー (TP600, Takara Bio 社) を使用した。プログラムは熱変性に  $98^\circ\text{C}\cdot 30$  秒、アニーリングに  $55^\circ\text{C}\cdot 30$  秒、伸長反応に  $72^\circ\text{C}\cdot 2$  分間で行った。

### (4) ダイレクトシーケンス

シーケンスは前章 4-1 で用いた方法と同様の方法で行った。まず、設計したそれぞれのプライマーを用いた PCR を行い、PCR 産物を PCR 用チューブから  $1.5\mu\text{l}$  チューブに移し、エタノール沈澱を行った。エタノール沈澱した PCR 産物に  $50\mu\text{l}$  の純水を加え、そのうち  $6.5\mu\text{l}$  をシーケンス用サンプルとした。シーケンス用サンプルを  $1\mu\text{l}$  の Big Dye (Applied Biosystems Cheshire, UK)、 $1\mu\text{l}$  のプライマー ( $3\mu\text{M}$ )、 $1.5\mu\text{l}$  のシーケンス用バッファーに混ぜ、計  $10\mu\text{l}$  とした。ダイレクトシーケンスのための PCR プログラムは初めに  $96^\circ\text{C}\cdot 30$  秒、その後以下の過程；熱変性に  $96^\circ\text{C}\cdot 10$  秒、アニーリングに  $50^\circ\text{C}\cdot 5$  秒、伸長反応に  $60^\circ\text{C}\cdot 4$  分間の 3 段階の反応を 25 サイクル行った。終了後 PCR 産物を PCR 用チューブから  $1.5\mu\text{l}$  チューブに移し、エタノール沈澱を行った。沈澱後、チューブに HiDi-Formamide を  $20\mu\text{l}$  加え、十分にピペッティングし沈澱を溶かした。ヒートブロック上で  $95^\circ\text{C}$  にて 3 分間、氷上にて 2 分間インキュベートした。その後、ABI Prism 310 genetic analyzer (Applied Biosystems, Foster

City, CA) に供した。各プライマーにつき 3 回シーケンスを行い反復とした。シーケンス終了後、ClustalW (Thompson et al., 1994) を用いて配列のアライメントを行い、それぞれの配列間での不一致を確認し、さらに不一致のあった箇所におけるシーケンスの波形を Sequence Scanner (Applied Biosystem) を用いてチェックした。その上でミスリードと考えられる箇所を修正し、D-loop の配列を最終決定した。

#### (5) 配列解析

D-loop のハプロタイプ決定には ClustalW を用いた。手動で各ハプロタイプの頻度を決定し、ハプロタイプ多様度を Nei (1973) によって定義された計算式を用いて決定した。塩基多様度は遺伝子解析ソフト MEGA5 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 5) を使用し、プログラム内に含まれる Tajima 検定を行い、決定した。さらに TCS (Clement et al., 2000) を用いてハプロタイプネットワーク図を、近隣接合法 (Saitou & Nei, 1987) を用いて系統樹を作成した。

#### 4-2-3 結果

採取した 30 個のタマラオ糞 DNA について、D-loop 領域 922–924bp の塩基配列を決定した (Accession No, AB905444–AB905452)。全塩基配列を表に示す。それぞれ解読した塩基配列を比較したところ、18 ヶ所のサイトで変異が確認され、うち 9 ヶ所のサイトは置換、9 ヶ所のサイトでは挿入・欠失による変異であった。ハプロタイプはアルヤン保護区で採取した糞を含めて 9 種類 (表 4-2-1) あり、ハプロタイプ頻度に関して、ハプロタイプ 1 は 0.37、ハプロタイプ 2 は 0.17 で、

残りのハプロタイプはすべて 0.03 であった (表 4-2-2)。また、ハプロタイプ多様度は 0.802 であり、塩基多様度は 0.0027 であった (表 4-2-3)。また、糞を採取した地域と得られたハプロタイプを照らし合わせたところ、保護区域内複数の地点に跨って、ハプロタイプ 1 は確認された。アルヤン保護区で採取された糞の D-loop はハプロタイプ 1 から 1 塩基置換が生じた塩基配列となっていた。タマラオのハプロタイプネットワーク図および系統樹を図 4-2-1, 図 4-2-2 に示す。アルヤン保護区のタマラオはイグリット保護区のタマラオと近いグループに位置していた。

#### 4-2-4 考察

本研究では糞由来のミトコンドリア DNA 内 D-loop 配列を用いてイグリット保護区およびアルヤン保護区のタマラオ集団におけるハプロタイプ数、ハプロタイプ多様度、塩基多様度を解析した。その結果、タマラオのハプロタイプは 9 種確認されたが、その頻度には偏りがあった。これはイグリット保護区内においてハプロタイプ 1 の系統を持つタマラオが多いことを示唆している。採取された糞の形態・状況だけでは糞をした個体を区別することができないため、本研究で解析した糞の中に同じ個体から採取された糞が存在する可能性が考えられる。しかしながら、本研究で採取した糞は第 2 章で設置した 18 カ所のタマラオ観察地点のうち 11 カ所で採取されたものであり、それぞれの観測地点で 2007 年の 4 月 22 日から 25 日に集中的に採取したものである。タマラオの 1 日の移動距離についてはこれまでに報告はないが、短い期間で複数の地点から採取したことにより同一個体の糞を採取した可能性は低いと考えられる。

タマラオの塩基多様度は 0.0027 であった。この値は他の野生動物で報告され

ている塩基多様度、アフリカスイギュウ (*Syncerus caffer*; 0.05, Simonsen et al., 1998)、アフリカゾウ (*Loxodonta Africana*; 0.02, Nyakaana et al., 2002) などと比較しても低い値であった。また、タマラオのハプロタイプ間の塩基置換数はわずか 1~4 塩基であり、検出されたハプロタイプが遺伝的に近い関係にあることを示唆している。一方、ハプロタイプ多様度は 0.802 であり、強いボトルネックがかかったとされるラッコ (*Enhydra lutris*) のハプロタイプ多様度 0.338 (Cronin et al., 1996) と比較してもかなり高かった。一般に、塩基多様度が低く、ハプロタイプ多様度が高いことは、集団が一度ボトルネックにかかり有効集団サイズの低い期間を経た後、集団サイズが回復したことを示唆している (Grant & Bowen, 1998)。本研究の結果から、イグリット保護区におけるタマラオが過去の個体数の減少を経たのちに、個体数が回復した可能性が示唆された。

アルヤン保護区で採取された糞 DNA をイグリット保護区で最も多く確認されたハプロタイプ 1 と比較したところ 1 塩基の置換のみ検出されたことから、イグリット保護区およびアルヤン保護区におけるタマラオは非常に近い年代にそれぞれの集団に孤立したことを示唆しているのかもしれない。しかしながら、3 章の研究でアルヤン保護区において一つの糞サンプルしか採取できなかったためイグリット保護区-アルヤン保護区間における遺伝距離を包括的に解析することはできない。また、3 章でイグリット保護区-アルヤン保護区間の地域をタマラオが行き来している可能性が考えられたが、このことについてもアルヤン保護区のサンプル数が少なく検証することはできない。今後、アルヤン保護区における DNA のサンプル数を蓄積していくことでイグリット保護区のタマラオ保護区域とアルヤン保護区のタマラオの関係性を明らかにすることが可能になると考えられる。

第 2 章のタマラオ個体数変動の調査結果において、タマラオは幼獣期から若

齢期にかけて個体数が減少していることが示唆され、その原因として若齢期のオスが保護区域外に移動する可能性ならびに集団内で近交弱勢が進み生存率が低下している可能性が考えられた。遺伝的多様性が著しく減少している動物は、飼育下個体、あるいは他の個体群との交換繁殖を行わなければならないが、その前提として、対象種について種内の遺伝的多様性を把握しなければならない。mtDNA内に存在する D-loop は非常に進化速度が速いことから、特に種内の遺伝的多様性解析に適するとされている (Lau et al., 1998)。しかしながら、Bazin et al. (2006) は集団サイズがアロザイム多型と比較して mtDNA の遺伝的多様性に影響しないことを報告している。これは D-loop がタンパク質非コード領域であるため、適応度を反映しないためである。Solis et al. (1995) が 12 種の血液タンパク座位を用いて河川スイギュウ、沼沢スイギュウ、そしてアルヤン保護区にて捕獲されたタマラオ間での多様性を解析した結果、河川スイギュウおよび沼沢スイギュウのヘテロ接合度がそれぞれ  $H=0.071$ 、 $H=0.076$  だったのに対し、タマラオは  $H=0.025$  であった。このことはタマラオ集団の遺伝的多様性が既に少なくなっていることを示唆している。しかしながら、第 2 章第 1 節の結果から繁殖率・個体数は安定しており、現在の段階では遺伝的多様性の減少による生存への影響は出ていないように思える。

本研究ではイグリット保護区から 29 個の糞サンプル、アルヤン保護区から 1 個の糞サンプルを採取し、DNA 解析に供した。本研究と同様に D-loop 多型を検証している研究においてプルゼワルスキーガゼル (*Procarpra przewalski*) では 29 サンプル (Lei et al., 2003)、ソデグロヅル (*Grus leucogeranus*) では 17 サンプル (Ponomarev et al., 2004)、ハンドウイルカ (*Tursiops truncatus*) では 29 サンプル (Parsons et al., 2002)、そしてマレーグマ (*Helarctos malayanus*)

では 21 サンプル (Onuma et al., 2006) を用いて解析していた。これらの研究と比較すると、本研究における解析サンプル数は十分であると考えられるが、本研究で得られたサンプルは大部分がイグリット保護区のものであるためタマラオの遺伝的な分化を明らかにするにはアルヤン保護区など他の生息域からより多くのサンプルが使用できるのが望ましい。しかしながら第 3 章で示した通り、アルヤン保護区ではわずか一つの糞サンプル、カラビテ保護区にいたってはタマラオの DNA サンプルを得ることはできなかった。より詳細な DNA の解析データを得るためにも今後は、現在、Manoot のジーンプールで飼育されている 1 頭のタマラオの D-loop、およびイグリット保護区以外にも生存すると考えられるタマラオの DNA サンプルを可能な限り検索・蓄積し、D-loop 配列を解読することで今回明らかにした結果との比較を行う必要がある。また同時に、D-loop と同様に多様性解析によく用いられるマイクロサテライトを使用してより詳しくタマラオ集団内の多様性を把握する必要がある。今後は、前節で開発した種判別法を用いてミンドロ島全体でタマラオの現存生息地を特定すると同時に、広域にわたる糞の採取を実施して、地域集団ごとの遺伝子多様性を把握するなどの取り組みが必要である。

#### 4-2-5 小括

本節では、糞などの劣化した DNA サンプルからでも比較的に利用しやすい mtDNA を用いて、タマラオの種内多型解析を実施した。ハプロタイプ多様度は 0.802 と高く、塩基多様度は 0.0027 と低い値であり、イグリット保護区におけるタマラオ集団が過去に個体数の減少を経たのちに個体数が回復した可能性が示唆された。しかしながら、D-loop は非コード領域であるため、本研究の結果はタマ

ラオの適応度を反映するものではない。今後、アルヤン保護区を始めイグリット保護区のタマラオ保護区域以外の地域から、多く DNA 源としてタマラオの糞を採取することができればタマラオの分布情報の蓄積に加え、タマラオのより詳細な系統地理学的解析も可能になると考える。次章では、2~4 章で得られた知見をもとにタマラオ保全のための総合考察を実施する。

表 4-2-1. タマラオ D-loop 中ハプロタイプ間での変異を持つ塩基.

	1	1	1	2	2	3	4	5	5	5	6	6	6	7	8	9	9	
塩基配列中変	3	4	5	5	0	1	0	8	3	9	9	0	3	3	5	3	2	2
異があった箇所	8	4	4	5	9	4	6	7	3	3	5	7	2	4	6	7	6	7
ハプロタイプ 1	T	A	A	C	A	A	-	T	T	-	T	T	G	A	A	C	G	-
ハプロタイプ 2	·	·	·	·	·	·	C	-	·	A	·	·	·	·	G	·	·	·
ハプロタイプ 3	·	G	T	·	·	·	·	·	A	·	·	·	·	·	·	G	A	G
ハプロタイプ 4	·	·	·	·	-	·	·	·	·	·	G	·	·	·	·	·	A	G
ハプロタイプ 5	-	·	·	·	·	·	·	·	·	·	G	·	·	·	·	·	A	G
ハプロタイプ 6	·	·	·	·	·	-	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·
ハプロタイプ 7	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	-	T	G	·	·	·	·
ハプロタイプ 8	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	A	G
ハプロタイプ 9*	·	·	·	T	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·

上部の数字は変異のあったサイトを示している。・はハプロタイプ 1 と同じ塩基であったことを示し、塩基がハプロタイプ 1 と異なった場合にその変異を示している。- は塩基の欠損を示す。

\*アルヤン保護区で採取されたサンプル。

表 4-2-2. タマラオの D-loop ハプロタイプ頻度.

	サンプル数	ハプロタイプ頻度
ハプロタイプ 1	11	0.37
ハプロタイプ 2	5	0.17
ハプロタイプ 3	3	0.1
ハプロタイプ 4	3	0.1
ハプロタイプ 5	2	0.07
ハプロタイプ 6	2	0.07
ハプロタイプ 7	2	0.07
ハプロタイプ 8	1	0.03
アルヤン	1	0.03

表 4-2-3. イグリット保護区におけるタマラオの D-loop 配列を用いたハプロタイプ多様度および塩基多様度

サンプル数	ハプロタイプ数	ハプロタイプ多様度	塩基多様度
29	8	0.802	0.0027

塩基多様度の計算は MEGA5 を用いて行った.

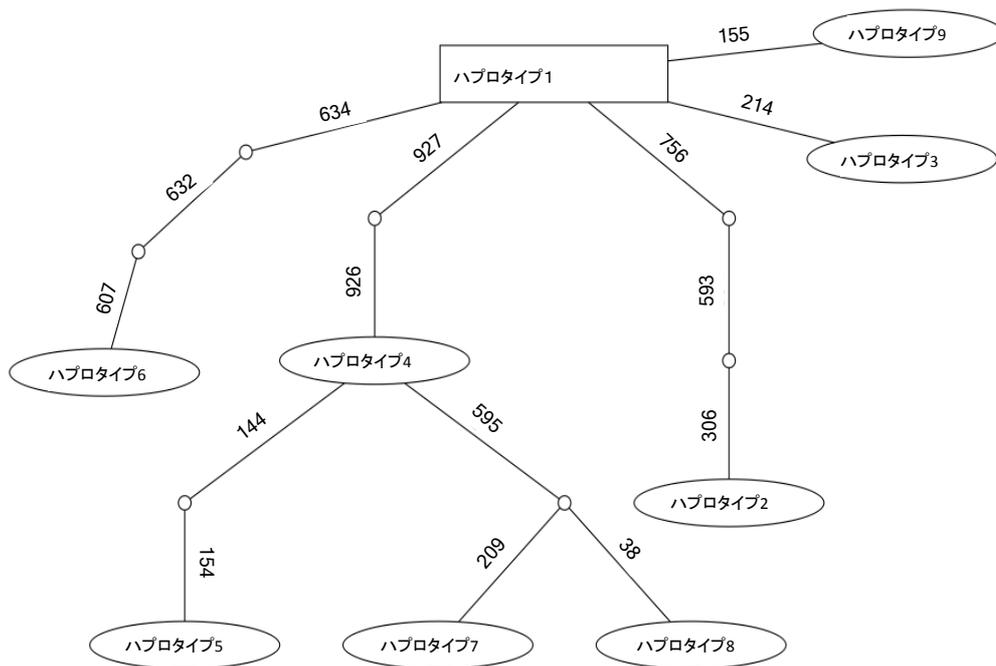


図 4-2-1. タマラオ D-loop 間の変異より作成したハプロタイプネットワーク.  
 ハプロタイプ 9 はアルヤン保護区で採取されたサンプルを示す. ○は1塩基  
 変異、線上の数字は変異のあった箇所を示す. ハプロタイプネットワーク作  
 成は TCS を用いて行った.

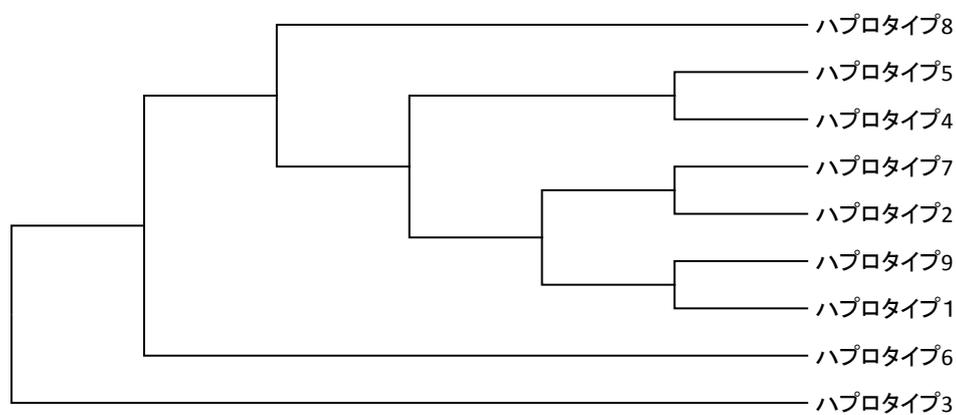


図 4-2-2. 近隣接合法によるタマラオの系統樹. 解析には 9 塩基配列を含み, 塩基のずれ, 欠失については除外している. ハプロタイプ 9 はアルヤン保護区で採取されたサンプルを示す. 系統樹作成は MEGA5 を用いて行った.

## 第5章 総合考察

絶滅危惧種に対する適切な保護対策には当該種の個体数、分布、生活史、生息環境などに関する詳細かつ正確な情報に基づく状況外観の把握が必要不可欠である。そこで本研究ではIUCNのレッドリストで絶滅危惧IA類に分類されるフィリピン・ミンドロ島の固有種タマラオについて、現存する唯一の生息確認地であるイグリット保護区を調査地として6年間にわたって個体数変動および行動習性の解析を行うとともに（第2章）、目撃情報等からタマラオの生存が期待される他の二カ所の保護区における生息確認調査を実施した（第3章）。さらに野外採取糞からタマラオの遺伝情報を収集するDNA分析手法を確立し、イグリット保護区におけるタマラオ集団の遺伝的多様度の評価を試みた（第4章）。その結果、1) イグリット保護区ではタマラオの全個体数は約270頭（239~314）、成熟個体数は約156頭（132~176）で集団は安定的に維持されているものの、過去に相当数のタマラオの生息が報告されていたアルヤン保護区およびカラビテ保護区の2地域ではタマラオの生存は極めて限定的もしくは絶滅に近い状況にあること、2) イグリット保護区におけるタマラオの多くは1頭の成熟オスと1~3頭の成熟メスおよびその子供からなる小さな群れで行動し、成熟オスと成熟メスの間には繁殖季節に関係すると思われるオスの単独行動および成獣オスがいないグループが見られること、3) イグリット保護区のタマラオ集団におけるmtDNAのD-loopハプロタイプ多様度は過去に決定的なボトルネックの影響を受けた動物種で報告されている値ほど低くないが、塩基多様度はアフリカスイギュウやアフリカゾウの報告値より低く、過去の深刻な個体数減少によりタマラオの遺伝的多様性が低下しているかどうかについてはさらに検証が必要なこ

と等が明らかになった。これらの結果は、IUCNがタマラオを絶滅危惧種IA類に分類した際の根拠とした“繁殖可能な成熟個体数(集団サイズ)が250頭以下で、今後も継続的な個体数の減少が予想され、しかも90%以上の個体がひとつのサブ集団に集中している”というリスク評価(Hedges et al., 2013)を直ちに覆すものではないが、イグリット保護区ではタマラオ集団が安定的に維持されていること、集団の年齢構成、成熟個体の性比、周年繁殖率、繁殖様式と密接な関わりを持つ行動習性など、これまで未知であったタマラオの生活史に関する計量的データが得られた。その一方で今後の個体数変動の予測については再検討の余地があることを示している。本研究で得られたタマラオの生活史に関する新規データの信頼度や保全生物学的な意義については、それぞれの章または節で一通りの検証を終えているので、本章では野生動物の保全をめぐる世界の動向や課題と関連づけながら、本研究の成果と経験が今後のタマラオ保全活動にどのように活用できるのかについて考察することにする。

### 種の保全をめぐる世界の動きとタマラオ保全

現在、地球上で数多くの動植物種が絶滅の危機に瀕しており、これに伴う生物多様性の消失と人間社会への負の影響が危惧されている。生物多様性

(biodiversity) という用語は、1980年代後半、野生生物が直面する危機的状況や保全の緊急性を広く社会に訴えるために、生命現象を示す様々な側面の多様性を包括的に表す言葉としてつくられたものであるが(石井, 2010)、1992年にブラジルのリオデジャネイロで開催された国連環境開発会議(地球サミット)で用語としての概念が整理され、この会議で採択された生物多様性条約では“生物多様性とは、すべての生物(陸上生態系、海洋その他の水界生態系、これら

が複合した生態系その他生息又は生育の場のいかんを問わない) の間の変異性をいうものとし、種内の多様性、種間の多様性及び生態系の多様性を含む”と定義された。野生動植物は我々の生活圏と離れたところにあり、野生動植物が絶滅の危機に瀕したとしても人間活動に影響はないように思えるが、

Frankham et al. (2002) は生物多様性の保全は4つの理由から正当化されるとした。すなわち、生物資源の経済的価値、生態系サービス、審美的価値、生物の生きる権利である。例えば、薬として幅広く使用されているアスピリンはヤナギの樹皮から抽出されものであり、虫による花粉の媒介や鳥類による種子の散布などの恩恵は計り知れず、さらに自然の中で野生動物に出会う感動に価値はつけられない。これらの身近な例が示すとおり、生態系、種、遺伝子の各レベルにおける生物多様性の保全は人類共通の課題であるという考え方は、今日では政治や経済の動向にも影響力をもつ世界共通の概念として広く世の中に定着し、我が国では「絶滅のおそれのある野生動植物の種の保存に関する法律」の第一条において野生動植物を保全する理由を以下のように述べている。“この法律は、野生動植物が、生態系の重要な構成要素であるだけでなく、自然環境の重要な一部として人類の豊かな生活に欠かすことのできないものであることにかんがみ、絶滅のおそれのある野生動植物の種の保存を図ることにより良好な自然環境を保全し、もって現在及び将来の国民の健康で文化的な生活の確保に寄与することを目的とする。”

現在、世界の200近い国あるいは地域が生物多様性条約に加盟し、多くの国々が生物多様性の保護に関する指針や行動規範を制定している。このことから明らかなように、生物多様性は人間の生存に不可欠なもの、あるいは生物多様性は人間の生存基盤であるとする考え方は世界共通のものになっているが、

その一方で、地球上では生物多様性の消失が依然として進行しているという現実がある。絶滅の危険に曝されている生物種をとりまとめたIUCNのレッドリスト初版は1966年に刊行され、2006年から毎年改訂版が公表されているが、絶滅危惧種の数増加の一途をたどっている。動物種に限定して2014年の状況を見ると、ごく近い将来における野生での絶滅の危険性が極めて高い絶滅危惧IA類に分類される種数はタマラオを含めて2,444種にも上る (IUCN, 2014)。絶滅危惧種の増加はレッドリストの改訂の度に評価の対象となる種数が増えていることとも関係しているが、人口増加や経済発展による生息環境の悪化が主な要因である。こうしたジレンマに対し、Myer et al. (2000) は、絶滅が危惧される生物種のすべてを救うことは資金的にも難しく保全には優先順位が必要であるとし、最小のコストでより多くの種を救済するためのひとつの方法として固有種がきわめて多数集中している生物多様性のホットスポットのうち生息域が急速に消失している地域を特定することの重要性を提唱した。このMyer et al. (2000) の論文では、早急な保全対策が必要なホットスポットとして世界全体で25カ所が選定されるとともに、アジア地域、特に熱帯雨林を有した東南アジアは生物多様性に富む地域とされ、この地域からフィリピン (Philippines)、スンダランド (Sundaland)、ワラセア (Wallacea) の3つの生物地理学的地域が選定されている。

当然のことながら、保全の優先順位が高いホットスポットとして選定された地域には多数の絶滅の危機に瀕する固有種が存在する。ちなみに、生物地理学的地域としてのフィリピンには地球上で確認されている脊椎動物27,298種のうち518種の固有種が存在する (Myer et al., 2000)。こうした地域で効率的に保全対策を実施するには、その地域の生物多様性の状態を全体的に表すと考えら

れる特定の種（代替種：Surrogate Species）に対策を集中することが保全の近道であるとされ（Favreau et al., 2006）、代替種の具体例として食物連鎖の上位に位置するアンブレラ種（Umbrella species）や生物量としては小さいが生態系全体に大きな影響力を持つキーストーン種（Keystone species）などが知られている。また、これとは若干ニュアンスが異なるが、地域における生物多様性保全活動の啓蒙や資金集めを目的として選定されるフラッグシップ種

（Flagship species）がある。一般に、フラッグシップ種は個体数の減少がしていること（Dietz et al., 1994）、その地域の固有種で絶滅の危機に瀕していること（Kleiman & Mallinson, 1998）などを条件にして選定される。タマラオはこれらの条件を満たし、かつ国内最大の野生動物で国民的関心も高いことから、フィリピン政府およびDENRの生物多様性保全対策ではタマラオがフラッグシップ種として位置づけられている。ミンドロ島にはタマラオの他にもフィリピンジカ（*Rusa Marianna*）、フィリピン・スポッテッド・ディア（*Cervus alfredi*）、オリバーイボイノシシ（*Sus oliveri*）、ミンドロキノボリネズミ（*Anonymomys mindorensis*）、ミンドロ皇帝ハト（*Ducula mindorensis*）、ミンドロコノハズク（*Otus mindorensis*）などの多数の固有種が生息していること、草食動物は草地の多様性を維持するために重要であること（Olf & Ritchie, 1998）等を考えると、タマラオをフラッグシップ種として地域全体の生物多様性保全対策を推進しようとするフィリピン政府の保全戦略は妥当な選択であり、タマラオの保全活動はミンドロ島全体の自然環境、生態系の保全にとっても重要な意味を持っている。

## タマラオの保全に関する今後の展望と課題

野生動物の生存にとって最大のリスクは狩猟や開発といった人間活動であるが (Redford, 1992; Mace & Reynolds, 2001)、2050年には96億人に達すると予測される急激な人口増加 (Population Division of the Department of Economics and Social Affairs of the United Nations Secretariat, 2012) を背景にして、人間と野生動物の軋轢は回避できない状況が続いている。第1章で詳述したとおり、タマラオもまた人口増加に伴う開発と過度の狩猟により危機に瀕した動物であり、生息地の破壊や密猟が今でも完全には抑止できていない状況下で即効性のある保護対策を提示することは大変難しい。以下では他の野生動物の例を参考にしながら、ミンドロ島の現状に即してタマラオの絶滅リスクを如何にして最小化できるかを論考することにする。

様々な分野の専門家で構成される IUCN の種保存委員会は、種の保全対策の基本的枠組みとして、客観的情報に基づいて絶滅のリスクを評価する「状況概観」、適切な保護対策が行われた場合に期待される状況を表す「展望」、そのために必要な保護対策の方向を示す「目標」の設定が必要であると、さらに「展望」と「目標」を達成するための具体的な行動指針の作成が重要であるとされている (IUCN/SSC, 2008)。この提言にしたがい、東南アジアの希少偶蹄類については種保存委員会に設置されるアジア野生牛専門家グループによって“我々は、野生牛および野生水牛が生存可能であり、これらの機能的集団は人類からその価値を正当に認められることを思い描く。これらの集団は、管理の行き届いた環境、すなわち元からある当該種の生態環境を再現した環境およびすべての環境において、当該種の遺伝的多様性を象徴する状態を示すだろう”という「展望」を提示している (IUCN/SSC/AWCSG, 2010)。一方、「目標」につ

いては種ごとに細かく設定され、タマラオについては“フィリピンのミンドロ島で、これまでにタマラオ生存の報告のある 3 地域において、現地住民および利害関係者 (Stakeholder) とともにタマラオの機能的集団を生態的に保護すること”としている。タマラオの保護に関するこれらの「展望」および「目標」は、1996 年のタマラオ PHVA の提言とほぼ同じである。すなわち、生息地の保全や修復によってタマラオは保全可能であり、そのためにはまず生息地におけるタマラオと人間との軋轢の解消 (リスク回避) が必要との認識である。フィリピン政府および DENR は、PHVA の報告を受けて 1999 年にタマラオ保護政策の優先度をこれまでの生息域外保全から生息域内保全に転換し、TCP の活動を生息地の保護に重点化するとともに、第一章で既に述べたように教育普及事業や地域支援事業などの住民参加型の施策を積極的に取り入れるようになった。これらの取組みは特にイグリット保護区で重点的に推進されている。イグリット保護区ではタマラオ集団が安定的に維持されているのに対し、アルヤン地区とカラビテ地区ではタマラオの生存が危機的な状況にあるという本研究の調査結果は、直接的にはイグリット保護区では人の居住が控えられているのに対し、その他の地区ではそうしたリスク回避が十分に機能していないことに帰結すると考えられるが、その背景には教育普及事業や地域支援事業を含む TCP の取組みがイグリット保護区でより活発に推進されたことが関係しているように思える。もし、そうであるとすれば、アルヤン地区とカラビテ地区での TCP の取組みを強化することにより、多少の個体数回復が期待できるかも知れない。この場合、もっとも重要なのは Mangyan に対する配慮であろう。何故なら、タマラオと同様、Mangyan もミンドロ島における森林伐採や鉱山開発によってその生活圏を追われた存在であり (Castillo & Alvarez-Castillo, 2009)、その結果

として生活圏が重複し限られた環境資源をタマラオと競合し、軋轢が生じていると考えられるからである。

リスク評価が適正に実施され、リスク回避の方向性に一定の理解や進展が見られたとしても、実際に絶滅危惧動物の保護の最終目的をどう設定するかは難しい問題である。日本において CR に指定されている哺乳類であるツシマヤマネコ (*Prionailurus bengalensis euptilura*) の例では、短期目標として 2020 年までに個体数の減少傾向を食い止めること、CR から Endangered (絶滅危惧 IB 類) への格付けの引き下げ、中期目標として 2035 年までに生息域の拡大、長期目標として 2060 年までにさらなる生息域の拡大、そして最終目標として自然状態において安定して生存持続可能な状態の維持が挙げられている (ツシマヤマネコ保護増殖連絡協議会, 2010)。これに照らし合わせると、タマラオはイグリット保護区において個体数は維持できているものの依然として CR であることから、個体数が増えない要因を究明しつつ、CR 基準の一つである“成獣個体数が 250 頭以下”を解消する水準まで個体数を増加させ、IUCN のレッドリストの分類を Endangered に引き下げることが短期目標とすべきであると考えられる。野生生物の保全で重要なのは生息域内保全であるが、生物多様性条約第 9 条でも“締約国は、可能な限り、かつ、適当な場合には、主として生息域内における措置を補完するために生息域外保全の措置をとる”とされているように、将来的にわたってタマラオを種として維持するためには、飼育による個体数の増加は重要な選択肢のひとつかもしれない。しかしながら野生動物の適切な人工飼育のためには、1 種あたり年間 50 万ドルもの資金が必要であると報告されており (Derrickson & Snyder, 1992)、経済基盤が十分でない発展途上国においては難しい側面がある。また、生理生態情報の乏しい野生動物では、

飼育繁殖そのものが難しいケースも知られている。例えば、スマトラサイでは1984~1993年にかけて35頭が捕獲されたが飼育下で出産に成功したのは捕獲時に妊娠していたメス1頭であったと報告されている(Rabinowitz, 1995)。前述したとおり、タマラオでも1980年代に生息域外での繁殖が試みられたが、2012年現在で飼育下には1頭のタマラオが生存しているのみである。幸いにしてイグリット保護区のタマラオ集団は一定の繁殖率を維持しているため、生息域内管理を徹底して個体数を増やし、他の地域に移住させる方が生息域外保全より効率的かもしれない。そのためには、第一にイグリット保護区における野外調査を継続し、タマラオの生息地選択や死亡率を把握して個体数増加の制約要因を明らかにすること、第二にアルヤン保護区およびカラビテ保護区の2地域においても住民参加型プログラムの充実を図り、Mangyanをはじめとする地域住民の生活圏と切り離れたタマラオ保全のためのコアエリアを確保するなどの対策が必要であると考えられる。

野生動物、特に絶滅危惧種では、保全対策に必要な当該種的生活史情報や生息地の生態情報が不足していることが多く、発展途上国ではとくにその傾向が顕著である(Collen et al., 2008)。その理由は、これらの地域では調査研究費や専門家といった資源の絶対的不足に加え、限られた資源を効果的に保全への取り組みに投入する基本戦略が欠如している場合が多いからである(Sheil, 2008)。こうした現実に対し、Danielsen et al. (2005, 2009)は、地域の人材や資源を活用した地域密着型モニタリング(Locally-based monitoring)の有効性を提唱している。地域に居住し野生動物の保護に関わりを持つ人々は、科学的ではないにしろ当該種の生息場所や習性に対して相応の知識や情報を持っているので、そうした地域資源を専門家が上手に活用することにより、少ない資金で信頼性

の高い情報収集が可能であるという主張である。Burton (2012) は、西アフリカの動物保護区における野生動物のモニタリング（観察できる動物種の種類、頻度、生息密度など）について、カメラトラップによるモニタリング（Professional monitoring）と保護区の監視員による定期周回モニタリング（Locally-based monitoring）の精度を比較し、事前に調査の目的および手段が適切に設定された場合には後者は前者と同様に信頼性の高いデータを提供できると結論した。TCP によるイグリット保護区におけるタマラオの個体数調査は2000年から実施されており、現地社会に基礎をおいた TCP の定期的活動となっているが、これまでは総個体数の把握だけが調査の目的にされていた。本研究では、タマラオレンジャーに教師、NGO、地方自治体職員などのボランティア観察者が参加するこの地域密着型の個体数調査を基礎として、事前に TCP の責任者（保全生態学専門家）と協議し、調査目的にタマラオの年齢構成比や生活史関連データの収集を加えること、各調査項目の観察方法と判別基準等を観察者に周知することなどの調整を行った上で野外調査を実施した。本研究で得られたタマラオ集団の年齢構成、周年繁殖率、行動習性等の生活史関連データは、そのほとんどが新規データであり、改めて地域密着型モニタリングの有用性が実証されたといつてよいであろう。とはいえ、本研究で得られたデータはタマラオの生活史の一端を明らかにしたに過ぎず、繁殖率から推定される死亡率の信憑性、若齢オスの生息域外移動の可能性、成熟オスの性的分離と繁殖季節の関係など、個体数変動の全容把握には至っていない。したがって、今後も継続してイグリット保護区タマラオ集団の保護と野外調査を継続する必要があるが、その場合、地域密着型モニタリングの特質を踏まえ地域ボランティア観察者と専門家集団の緊密な連携を強化することが重要である。専門家は保全生

物学あるいは保全生態学の観点から優先順位の高い調査項目を選定するとともに、その理由や必要性を地域ボランティア観察者に分かりやすく説明する。一方、地域ボランティア観察者は専門家の提案を十分理解した上で現場からより正確な情報を集める。こうした役割分担と連携が機能することにより、Danielsen et al. (2005) や Burton (2012) が主張する地域密着型モニタリングの有効性が担保され、枚挙的な現場情報を保全生物学の理論に集約する道が開けるからである。

最後に国際協力の観点からタマラオの保全戦略に言及してみたい。我が国では1995年に策定した第一次生物多様性国家戦略を根本的に作り変えた新・生物多様性国家戦略を2004年に提唱した。この戦略における基本的視点の一つとして国際的認識、生物多様性保護のための国際協力、特に日本と関係の深いアジア地域における協力の重要性が挙げられている。また、2010年10月に愛知県名古屋市で開催された生物多様性条約第10回締結国会議(COP10)では今後10年間に国際社会が取るべき道筋である戦略計画2011-2020が採択された。この戦略計画2011-2020は、2002年の生物多様性条約第6回締結国会議(COP6)で採択された“2010年までに生物多様性の損失速度を顕著に減少させる”という「2010年目標」が達成されなかったことを受け、2011年に新たに採択されたものであり、新・生物多様性国家戦略と同様に開発途上国への国際協力を提案している(環境省, 2012)。このような生物多様性の保全に関する世界や日本の対応に照らしてタマラオの保護に関する国際協力の歴史を概観すると、アジアの希少野生動物保護に関心を寄せる専門家による情報収集と警告(Harrisson, 1969; Kuehn, 1977; Custodio et al., 1996)、IUCNの専門家による提言もしくは勧告(IUCN/SSC/AWCSG, 2010)などが散見されるが、組織的もしくは継続

的な国際共同研究については捕獲したタマラオについてフィリピン大学が学術研究を行った時に名古屋大学の研究チームが遺伝学的研究に参画した Namikawa et al. (1995) および Tanaka et al. (2000) の他には実績が見当たらない。我が国では絶滅の危機に瀕する大型の哺乳動物が少ないという事情もあって大型動物を専門とする保全生物学者はあまり多くないが、近年では耕作放棄地の増加や野生動物保護に対する意識の高まりなどを背景としてイノシシ、シカ、クマの生態などを扱う調査研究が増えつつあり、カメラトラップ、静止衛星を利用する遠隔テレメトリー、個体数変動モデルを用いたシミュレーション解析など、最新の保全生物学的手法を駆使する研究者が育っている。また、野生動物や生物多様性の問題は人間活動と密接不可分の関係にあり、これらの問題に社会生態学の視点から取組む研究者も多数存在する。先述した「戦略計画 2011-2020」に基づき、我が国の野生動物や社会生態学の専門家がタマラオの保全に協力できる環境が整備されることを期待したい。

## 摘要

タマラオ (*Bubalus mindorensis*) はフィリピンのミンドロ島のみに生息する小型のスイギュウで、国際自然保護連合によって最も絶滅の危険性の高い **Critically Endangered** に指定されている。タマラオは 20 世紀以降の狩猟や開発によってその個体数が激減し、フィリピン政府はタマラオの捕獲や殺生を禁止する法の整備や住民参加による保護区のモニタリングなど、タマラオ保護のための様々な施策を進めてきたが、これまで具体的な効果は得られていない。野生動物の有効な保護政策を立案するためには対象種の個体数変動や習性などの生態情報が必要であることから、本研究ではイグリット・バコ山国立公園 (総面積 75,445ha) の中のイグリット地区に設置されたタマラオ保護区 (16,000ha; 以下、イグリット保護区) におけるタマラオ個体数および行動習性調査、イグリット保護区に隣接するアルヤン・マラティ山タマラオ保護区 (以下、アルヤン保護区) およびミンドロ島北部に位置するカラビテ山野生動植物保護区 (以下、カラビテ保護区) における生存確認調査を実施するとともに、野外採取糞からのタマラオ判別法を確立し、タマラオ集団の遺伝的多様度の評価を試みた。その概要は以下のとおりである。

イグリット保護区において、乾期の末期 (毎年 4 月末の 5 日間) に 18 カ所から定点同時観察を行い、この地域におけるタマラオ個体数を推定したところ、タマラオ個体数は 239~314 頭 (平均 271 頭) であった。また角の形および身体的特徴から年齢と性別を区分したところ、成獣 (推定 5 歳以上) : 若齢 (推定 2~5 歳) : 幼獣 (推定 2 歳以下) の構成比は 57.8 : 21.0 : 21.3% で、観察年の違いに有意差はなかった。成獣の性比はオス : メス = 1 : 1.86 でメスが有意に多かったが、若齢ではオス : メス = 1 : 1.02 で性比に偏りはなかった。さらに、成獣メスおよび幼獣の割合から繁殖率を算出したところ、推定繁殖

は 29.1% (23.2~37.3) であった。これらの結果から、イグリット保護区におけるタマラオ全体個体数は安定しており、同様に年齢別の個体数および繁殖率も安定していることが示唆された。

次いで、イグリット保護区におけるタマラオの行動習性を分析したところ、成獣オスの 32.2%が単独行動であるのに対し、成獣メスは全体の 94.7%が 2~12 頭のグループを形成していた。また、このグループのうち成獣オスがいないグループといないグループの割合はそれぞれ 53.4%、46.6%であった。これらの結果から、乾期に限れば、タマラオは大多数の個体がグループを形成するが、一部の個体は単独行動をとりその大部分は成獣オスであることが明らかとなった。

アルヤン保護区でのタマラオ生存確認調査 (2008 年実施) では、カメラトラップ法で成獣オス 1 頭が撮影され、さらにルートセンサスによりタマラオの糞と複数の足跡が観察された。一方、カラビテ保護区でのルートセンサス (2010 年実施) では脱落したタマラオの古い角が確認されたものの生体は確認できなかった。また、周辺住民に対する聞き取り調査では 8 件の目撃情報が得られたが、1 年以内の目撃例はなかった。以上の結果から、アルヤン保護区ではタマラオが限定的に生存するが、カラビテ保護区ではタマラオは既に絶滅している可能性が高いこと示唆された。

タマラオの種判別法を確立するため、イグリット保護区でタマラオ由来の糞を採取し DNA を抽出した。ミトコンドリア DNA 上のシトクロム b 配列を対象としてスイギュウ属特異的プライマーおよびタマラオ特異的プライマーを用いて PCR で解析を行い、さらに PCR 産物を *AvrII* および *BxaI* で処理した後、PCR-RFLP 法を行った。その結果、タマラオとスイギュウで明瞭に異なるバンドパターンが得られ、糞中 DNA からタマラオを同定すること

が可能となった。

次いで、イグリット保護区で採取されたタマラオ糞 29 個およびアルヤン保護区から採取されたタマラオ糞 1 個を供試し、ミトコンドリア DNA 上の D-loop 配列をダイレクトシーケンス法で解析した。その結果、922~924bp の D-loop 塩基配列が得られ、この配列を比較したところ、9 タイプのハプロタイプが得られた。ハプロタイプ多様度は 0.802、塩基多様度は 0.0027 であった。これらの結果からタマラオのハプロタイプ多様度は他の野生動物と比較して低くはないが、塩基多様度は低く、イグリット保護区におけるタマラオが過去に個体数減少を経たのちに、個体数が回復した可能性が示唆された。

以上、本研究全体を通じて、現存するタマラオの大多数が生息するイグリット保護区における個体数変動、タマラオの行動習性と社会構造および遺伝的多様性の指標となる DNA 情報の一部が明らかとなり、タマラオの効果的な保全対策の構築に有益な知見が得られた。

## 英文要約

The tamaraw (*Bubalus mindorensis*), or wild dwarf buffalo is endemic to Mindoro Island in the Philippines. The population of tamaraws decreased due to hunting and exploitation during the 20<sup>th</sup> century and the buffalo has been classified as critically endangered by the International Union for Conservation of Nature and Natural Resources. The government of the Philippines has developed a tamaraw conservation strategy, which includes the enactment of a law and the Tamaraw Conservation Program (TCP); however, the specific effects of these efforts remain to be documented. To devise an effective approach for tamaraw conservation, ecological information on tamaraws, such as population dynamics (e.g. distribution, sex ratio, and age structure), social behavior, and genetic information, is required. In the present study, a comprehensive survey of tamaraws was conducted, including: 1) a population census and social behavior survey within a tamaraw conservation area (ca. 16,000 ha) in Mount Iglit–Baco National Park (75,445 ha); 2) a distribution survey of tamaraws in the Mount Aruyan–Malati Tamaraw Reservation (Aruyan) and Mount Calavite Wildlife Sanctuary (Calavite); and 3) fecal DNA analysis to develop a method of species identification and to assess genetic diversity.

During 2006–2011, we used community-based monitoring to examine the population status and fundamental ecology of tamaraws in the species' core habitat of Mount Iglit–Baco National Park (Iglit Range). Each year, for 5 consecutive days at the end of the dry season (in April), trained local

volunteers and rangers or project staffs were dispersed to 18 vantage points in the Iglit Range. Tamaraws were categorized as adults (>5 years), juveniles (2–5 years), or calves (<2 years), and sexed when possible. During the study period, the population ranged from 239 to 314 (mean of 271), with no significant fluctuations in either age structure (percentages of adults, juveniles, and calves: 57.8, 21.0, and 21.3%) or estimated adult female reproductive rates (29.1%; range: 23.2–37.3%). In adults, but not juveniles, the sex ratio was biased towards females (1:1.86,  $P < 0.01$ ). These results indicate that the population remained relatively stable, maintaining a constant age structure and reproductive rate.

The social behavior of tamaraws was also surveyed in Mount Iglit–Baco National Park. Bulls were often solitary (32.2% of sightings), whereas the majority of cows (94.7%) formed small groups of 2–12 individuals of different ages, with or without bulls (53.4 and 46.6%, respectively). These findings revealed that most tamaraws formed groups, but some adult males were solitary at the end of dry season.

In Aruyan, a field survey was conducted using camera traps, route censuses, and interviews with the local Mangyan. One adult male was identified using a camera trap, while some individuals were identified by signs such as footprints, foraging prints, and fresh feces. Meanwhile, in Calavite, a field survey was conducted using route censuses and interviews with the Mangyan. Tamaraw horns were found, but no other evidence of tamaraws was apparent in this area. In addition, only one sighting of tamaraws within 1 year was reported via interviews conducted

in eight neighborhoods. These results indicate that some tamaraws still exist in Aruyan, but most are extinct in Calavite.

To establish a method for identifying tamaraws from fecal DNA, 18 tamaraw fecal samples were collected from Mount Iglit-Baco National Park, and DNA was extracted. Based on DNA sequence data previously reported, genus *Bubalus*- and tamaraw-specific primers for PCR of the cytochrome *b* gene were newly developed. The *Bubalus*-specific primer yielded a 976 bp fragment of cytochrome *b* from all fecal samples from tamaraw and domestic buffaloes, but not samples from cattle, whereas the tamaraw-specific primer yielded a 582 bp fragment from all tamaraw fecal samples and from one of the four domestic buffalo samples. PCR-RFLP (restriction fragment length polymorphism) analysis of the 976 bp PCR fragment using *AvrII* or *BsaXI* revealed distinct differences between tamaraw and domestic buffalo. Thus, fecal DNA analysis enables the identification of tamaraw from fecal samples.

Preliminary molecular analysis using mtDNA from 30 fecal samples of tamaraw was conducted to elucidate phylogeographic information. Tamaraw fecal samples were collected (29 samples in the Iglit Range and one sample in Aruyan), and all D-loop sequences (922–924 bp) of mitochondrial DNA were examined. The haplotype diversity was 0.802, and nucleotide diversity within populations was 0.0027. These results suggest that the tamaraw population has experienced past declines followed by recent increases in abundance.

Thus, the present study documented the population status, ecological

information, and distribution of the tamaraw on Mindoro Island; and obtained preliminary DNA information on tamaraws. These results will be especially valuable for developing effective conservation programs for tamaraws.

## 謝辞

本研究に着手する機会を与えて頂き、現地調査の実施からデータ解析まで終始懇切丁寧なご指導を賜りました金井幸雄・筑波大学名誉教授（元筑波大学大学院生命環境科学研究科教授）に深甚なる感謝を捧げます。

田島淳史教授（筑波大学生命環境系）には遺伝子多様性の解析および学位論文のとりまとめについて懇切なご指導・ご支援を賜りました。心より深く感謝申し上げます。

大澤良教授（筑波大学生命環境系）、増田美砂教授（筑波大学生命環境系）、藤岡正博準教授（筑波大学生命環境系）には、本学位論文の執筆に際して数々の有益なご批判・ご助言を頂戴いたしました。ここに記して、厚く御礼申し上げます。

前筑波大学大学院・生命環境科学研究科の平林美穂講師には遺伝子解析の実験遂行に際して懇切丁寧なご指導を頂き、石川尚人助教（筑波大学生命環境系）には研究について貴重なご助言を頂戴しました。また、牛谷敦子技官（筑波大学生命農林学系）には研究の遂行に際して多岐にわたるご支援を賜りました。心より感謝申し上げます。

本研究の現地調査を遂行するにあたり、東京農業大学・森林総合科学科・森林生態学研究室の松林尚志准教授には共同研究者として参画して頂き、そのデータと写真を学位論文に使用することを快諾していただきました。厚く御礼申し上げます。

筑波大学畜産研究室の井尻大地氏（現鹿児島大学助教）には種判別の実験の遂行および本研究に対する貴重なご意見と丁寧なご指導を頂きました。また、同研究室の学生の皆様には有形無形の様々なご支援・ご協力を頂きました。ここに改めて感謝申し上げます。

6年に亘る現地調査の実施に際し、Tamaraw Conservation Program の Rodel Boyles 氏には非常に多くの協力と助言を頂き、フィリピンカラバオセンター・フィリピン大学ロスバニオス校の Arnel Del Barrio 所長および Rosalina M. Lapitan 博士には飼料分析および寄生虫感染検査について多くのご指導・ご協力を頂きました。また、現地調査では約 30 名の国立公園レンジャーの他、フィリピン環境省第 4 管区事務所およびフィリピンカラバオセンターのスタッフを含め、総勢 50 名を超える方々の協力を仰ぎました。これらの方々に改めて感謝申し上げます。

タマラオレンジャーの故 Rommel Fantuyaw 氏にはフィールドでのサンプル採取や山中での生活場面で終始心温まるご支援を頂きました。ご冥福をお祈りするとともに深く感謝いたします。

最後に、これまでの学生生活を支援してくれた父と母に心より感謝の意を捧げます。

## 引用文献

Alendal, E., de Bie, S., van Wieren, S.E. (1979) Size and composition of the wild reindeer *Rangifer tarandus platyrhynchus* population in the Southeast Svalbard Nature Reserve. *Ecography*, 2, 101–107.

Anunciado, R.V.P., Eduardo, S.L., Momongan, V.G., Escalada, R.F. (1994) Parasites of the captive tamaraw, *Bubalus mindorensis* (Heude, 1988) (Mammalia: Ruminantia). *Philippine Journal of Veterinary Medicine*, 31, 5–10.

Association of Official Analytical Chemists (AOAC). (1990) *Official Methods of Analysis*, 15th ed. Association of Official Analytical Chemists, Washington DC.

Bartlett, S.E., Davidson, W. (1991) Identification of *Thunnus tuna* species by the polymerase chain reaction and direct sequence analysis of their mitochondrial cytochrome b genes. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 48, 309–317.

Bazin, E., Glémin, S., Galtier, N. (2006) Population size does not influence mitochondrial genetic diversity in animals. *Science*, 312, 570–572.

Boer, A.H. (1988) Mortality rates of moose in New Brunswick: a life table analysis. *The Journal of Wildlife Management*, 52, 21.

Brown, W.M., George, M., Wilson, A.C. (1979) Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 76, 1967–1971.

Brown, W.M., Prager, E.M., Wang, A., Wilson, A.C. (1982) Mitochondrial DNA sequences of primates: tempo and mode of evolution. *Journal of Molecular Evolution*, 18, 225–239.

Butler, M.J. (2009). DNA 鑑定とタイピング –遺伝学・データベース・計測技術・データ検証・品質管理–. (福島 弘文, 五條堀 孝, 藤宮 仁, 玉田 一生, 福間 義也, 長崎 華奈子 訳) 共立出版. ミトコンドリア DNA の分析, pp. 209–256.

Burton, A.C. (2012) Critical evaluation of long-term, locally-based wildlife monitoring program in West Africa. *Biodiversity and Conservation*, 21, 3079–3094.

Callo, R.A. (1996) Population biology and simulation modeling, in: J. de Leon, N. Lawas, R. Escalada, P. Ong, R. Callo, S. Hedges, J. Ballou, D. Armstrong, U.S. Seal. (Eds.), *Tamaraw Population and Habitat Viability*

Assessment, Conservation Breeding Specialist Group/SSC/IUCN, Apple Valley, MN, USA, pp. 125–136.

Caro, T. (1999) The behaviour-conservation interface. *Trends in Ecology & Evolution*, 14, 366–369.

Castillo, R.C.A., Alvarez-Castillo, F. (2009) The law is not enough: protecting indigenous peoples' rights against mining interests in the Philippines, in: Wynberg, D.R., Schroeder, P.D., Chennells, R. (Eds.), *Indigenous Peoples, Consent and Benefit Sharing*. Springer Netherlands, pp. 271–284.

Cespedes, A., Garcia, T., Carrera, E., Gonzalez, I., Sanz, B., Hernandez, P.E., Martin, R. (1998) Identification of flatfish species using polymerase chain reaction (PCR) and restriction analysis of the cytochrome b gene. *Journal of Food Science*, 63, 206–209.

Clement, M., Posada, D., Crandall, K. (2000) TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology*, 9, 1657–1660.

Collen, B., Ram, M., Zamin, T., McRae, L. (2008) The tropical biodiversity data gap: addressing disparity in global monitoring. *Tropical Conservation Science*, 1, 75–88.

Constable, J.J., Packer, C., Collins, D.A., Pusey, A.E. (1995) Nuclear DNA from primate dung. *Nature*, 373, 393.

Cronin, M.A., Bodkin, J.L., Ballachey, B.E., Estes, J.A., Patton, J.C. (1996) Mitochondrial DNA variation among subspecies and populations of sea otters (*Enhydra lutris*). *Journal of Mammalogy*, 77, 546–557.

Custodio, C.C., Lepiten, M.V., Heaney, L.R. (1996) *Bubalus mindorensis*. *Mammalian Species*, 520, 1–5.

Danielsen, F., Burgess, N.D., Balmford, A. (2005) Monitoring matters: examining the potential of locally-based approaches. *Biodiversity and Conservation*, 14, 2507–2542.

Danielsen, F., Burgess, N.D., Balmford, A., Donald, P.F., Funder, M., Jones, J.P., Alviola, P., Balete, D.S., Blomley, T., Brashares, J., Child, B., Enghoff, M., Fjeldsa, J., Holt, S., Hubertz, H., Jensen, A.E., Jensen, P.M., Masso, J., Mendoza, M.M., Ngaga, Y., Poulsen, M.K., Rueda, R., Sam, M., Skielboe, T., Stuart-Hill, G., Topp-Jorgensen, E., Yonten, D. (2009) Local participation in natural resource monitoring: a characterization of approaches. *Conservation Biology*, 23, 31–42.

Demment, M.W., Van Soest, P.J. (1985) A nutritional explanation for body-size patterns of ruminant and non-ruminant herbivores. *The American Naturalist*, 125, 641–672.

De Ocampo, G.D., David, O.M.C. (1993) The modified horn ring method as a tool in determining the age of carabao (*Bubalus bubalis*). *NRCP Research Journal*, 3, 191–200.

Department of Environment and Natural Resources Region 4B (MIMAROPA). (2012) Tamaraw Population Counting.

<<http://mimaropa.denr.gov.ph/index.php/tamaraw-population-counting>>.

Downloaded on July 15, 2014.

Derrickson, S.R., Snyder, N.F.R. (1992) Potentials and limits of captive breeding in parrot conservation, in: S.R. Beissinger, N.F.R. Snyder. (Eds.), *New World parrots in crisis: solutions from conservation biology*. Smithsonian Institution Press, Washington, D. C., pp. 133–163.

Dietz, J.M., Dietz, L.A., Nagagata, E. (1994) The effective use of flagship species for conservation of biodiversity: the example of lion tamarins in Brazil, in: P.J.S. Olney, G.M. Mace, A. Feistner, (Eds.), *Creative Conservation: Interactive Management of Wild and Captive Animals*. Chapman & Hall, UK, pp. 32–49.

Everett, A.H. (1878) Mr. A.H. Everett on *Anoa depressicornis*. Proceedings of the Zoological Society of London, 1878. 5, 792.

Fang, S., Wan, Q. (2002) A genetic fingerprinting test for identifying carcasses of protected deer species in China. *Biological Conservation*, 103, 371–373.

Favreau, J.M., Drew, C.A., Hess, G.R., Rubino, M.J., Koch, F.H., Eschelbach, K.A. (2006) Recommendations for assessing the effectiveness of surrogate species approaches. *Biodiversity Conservation*, 15, 3949–3969.

Frankham, R., David A.B., Ballou, J.D. (2002) Introduction to Conservation Genetics. Cambridge University Press, pp. 1–18.

Franklin, I.R. (1980) Evolutionary change in small populations, in: M.E. Soule, B.A. Wilcox (Eds.), *Conservation Biology: An Evolutionary-Ecological Perspective*. Sunderland, Mass, Sinauer Associates, pp. 135–140

Fritsche, T., Kaufmann, J., Pfister, K. (1993) Parasite spectrum and seasonal epidemiology of gastrointestinal nematodes of small ruminants

in the Gambia. *Veterinary Parasitology*, 49, 271–283.

Grant, W.S., Bowen, B.W. (1998) Shallow population histories in deep evolutionary lineages of marine fishes: insights from sardines and anchovies and lessons for conservation. *Journal of Heredity*, 89, 415–426.

Hammond, R.L., Macasero, W., Flores, B., Mohammed, O.B., Wachter, T., Bruford, M.W. (2001) Phylogenetic reanalysis of the Saudi gazelle and its implications for conservation. *Conservation Biology*, 15, 1123–1133.

Harrisson, T. (1969) The tamaraw and its survival. *IUCN Bulletin (New Series)*, 2, 85–86.

長谷川真理子. (2004) 動物の行動と生態. 放送大学教育振興会, pp. 117–130.

Hedges, S., Duckworth, J.W., de Leon, J., Custodio, C., Gonzales, J.C. (2013) *Bubalus mindorensis*. IUCN 2014. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2014.1. <[www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org)>. Downloaded on 14 July 2014.

Heinen, J.T., Srikosamatara, S. (1996) Status and protection of asian wild cattle and buffalo. *Conservation Biology*, 10, 931–935.

Hendrix, C.M. (1998) Diagnostic veterinary parasitology. Mosby, St. Louis, Missouri, pp. 253–256.

Hillman, J.C., Hillman, A.K. (1977) Mortality of wildlife in Nairobi National Park, during the drought of 1973–1974. *African Journal of Ecology*, 15, 1–18.

Hobbs, N.T., Swift, D.M. (1985) Estimates of habitat carrying capacity incorporating explicit nutritional constraints. *The Journal of Wildlife Management*, 49, 814–822.

Höss, M., Kohn, M., Pääbo, S., Knauer, F., Schröder, W. (1992) Excrement analysis by PCR. *Nature*, 359, 199.

Irwin, D.M., Kocher, T.D., Wilson, A.C. (1991) Evolution of the cytochrome b gene of mammals. *Journal of Molecular Evolution*, 32, 128–144.

石井信夫. (2010) 絶滅のおそれのある種の保全. 野生生物保護学会(編), 野生生物保護の事典, 朝倉書店, pp. 10–16.

IUCN. (2014) IUCN Red List of Threatened Species. Version 2014.1. <[www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org)>. Downloaded on 14 July 2014.

IUCN Species Survival Commission (SSC). Species Conservation Planning Task Force. (2008) Strategic planning for species conservation: a handbook, version 1.0., pp. 21–46.

IUCN Species Survival Commission (SSC), Asian Wild Cattle Specialist Group (AWCSG). (2010) Regional Conservation Strategy for Wild Cattle and Buffaloes in South-east Asia, pp. 27–39.

環境省. (2012)「生物多様性国家戦略 2012-2020 ~豊かな自然共生社会の実現に向けたロードマップ~」, pp. 218–230.

Kleiman, D.G., Mallinson, J.J.C. (1998) Recovery and management committees for lion tamarins: partnerships in conservation planning and implementation. *Conservation Biology*, 12, 27–38.

Kocher, T.D., Thomas, W.K., Meyer, A., Edwards, S.V., Pääbo, S., Villablanca, F.X., Wilson, A.C. (1989) Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86, 6196–6200.

Kuchai, J.A., Tak, H. Chishti, M.Z., Rasool, M. Dar, S.A. Ahmad, J. (2011) Impact of season, sex, age, and agro-ecology on the prevalence of

fascioliasis in buffalos of Ladakh. *Online Journal of Animal and Feed Research*, 1, 263–266.

Kuehn, D.W. (1977) Increase in the tamaraw. *Oryx*, 13, 453.

Kuehn, D.W. (1986) Population and social characteristics of the tamarao (*Bubalus mindorensis*). *Biotropica*, 18, 263–266.

Kurose, N., Tatara, M., Masuda, R. (2005) Fecal DNA analysis for identifying species and sex of sympatric carnivores: a noninvasive method for conservation on Tsushima Islands, Japan. *Journal of Heredity*, 96, 688–697.

Lau, C.H., Drinkwater, R.D., Yusoff, K., Tan, S.G., Hetzel, D.J., Barker, J.S. (1998) Genetic diversity of Asian water buffalo (*Bubalus bubalis*): mitochondrial DNA D-loop and cytochrome b sequence variation. *Animal Genetics*, 29, 253–264.

Lawas, N.R., de Leon, J. (1996) The tamaraw conservation program: past, present and future thrusts and direction, in: J. de Leon, N. Lawas, R. Escalada, P. Ong, R. Callo, S. Hedges, J. Ballou, D. Armstrong, U.S. Seal (Eds.), *Tamaraw Population and Habitat Viability Assessment*, Conservation Breeding Specialist Group/SSC/IUCN, Apple Valley, MN,

USA, pp. 119–123.

Lei, R., Hu, Z., Ziang, Z., Yang, W. (2003) Phylogeography and genetic diversity of the critically endangered Przewalski's gazelle. *Animal Conservation*, 6, 361–367.

Maala, C.P. (2001) Endangered Philippine wildlife species with special reference to the Philippine eagle (*Pithecophaga Jefferyi*) and tamaraw (*Bubalus Mindorensis*). *Journal of International Development and Cooperation*, 8, 1–17.

Mace, G.M., Reynolds, J.D. (2001) Exploitation as a conservation issue, in: Reynolds, J.D., Mace, G.M., Redford, K.H., Robinson, J.G. (Eds.), *Conservation of Exploited Species*. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 4–15.

Masangkay, J.S., Esclada, R.F., Palad, O.A., Momongan, V.G., Flor, J.A.C.G., Maala, C.P., Ducusin, R.J.T., Matsuda, Y., Armstrong, D.L. (1996) Captive population and management, in: J. de Leon, N. Lawas, R. Escalada, P. Ong, R. Callo, S. Hedges, J. Ballou, D. Armstrong, U.S. Seal (Eds.), *Tamaraw Population and Habitat Viability Assessment*, Conservation Breeding Specialist Group/SSC/IUCN, Apple Valley, MN, USA, pp. 79–92.

Miura, S., Kita, I., Sugimura, M. (1986) Horn growth and reproductive history in female Japanese serow. *Journal of Mammalogy*, 68, 826–836.

Momongan, V.G., Walde, G.I. (1993) Behavior of the endangered tamaraw (*Bubalus mindorensis* Heude) in captivity. *Asia Life Sciences*, 2, 241–250.

Morgan, S., Mackey, R.L., Slotow, R. (2009) A priori valuation of land use for the conservation of black rhinoceros (*Diceros bicornis*). *Biological Conservation*, 142, 384–393.

Moyo, D.Z., Bwangamoi, O., Hendrikx, W.M.L., Eysker, M. (1996) The epidemiology of gastrointestinal nematode infections in communal cattle and commercial beef cattle on the highveld of Zimbabwe. *Veterinary Parasitology*, 67, 105–120.

Myers, N., Mittermeier, R.A., Mittermeier, C.G., Fonseca, G.A.B. da., Kent, J. (2000) Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*, 403, 853–858.

Namikawa, T., Masangkay, J.S., Maeda, K.I., Escalada, R.F., Hirunagi, K., Momongan, V.G. (1995) External characters and karyotypes of the captive

tamaraws, (*Bubalus mindorensis*), at the Gene Pool in the island of Mindoro, Philippines. *Journal of Animal Genetics*, 23, 19–28.

Nei, M., (1973) Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 70, 3321–3323.

Nielsen, L., Meehan-Meola, D., Kilbourn, A., Alcivar-Warren, A. (2008) Characterization of microsatellite loci in the black rhinoceros (*Diceros bicornis*) and white rhinoceros (*Ceratotherium simum*): their use for cross-species amplification and differentiation between the two species. *Conservation Genetics*, 9, 239–242.

野村 こう. (2009) スイギュウ –2 大系統の起源と地域分化–. 在来家畜研究会(編). アジアの在来家畜 –家畜の起源と系統史–. 名古屋大学出版会, pp. 161–185.

Nyakaana, S., Arctander, P., Siegismund, H.R. (2002) Population structure of the African savannah elephant inferred from mitochondrial control region sequences and nuclear microsatellite loci. *Heredity*, 89, 90–98.

Olf, H., Ritchie, M.E. (1998) Effects of herbivores on grassland plant diversity. *Trends in Ecology & Evolution*, 13, 261–265.

Oliver, W.L.R. (1993) Threatened endemic artiodactyls of the Philippines: status and future priorities. *International Zoo Yearbook*, 32, 131–144.

Ong, P., Sarabia, A., Quimbo, M., Bravo, M., Rubio, R., Tanaka, K., Solis, C., Rizaldo, L., Ballou, J. (1996) Population biology and simulation modeling, in: J. de Leon, N. Lawas, R. Escalada, P. Ong, R. Callo, S. Hedges, J. Ballou, D. Armstrong, U.S. Seal (Eds.), *Tamaraw Population and Habitat Viability Assessment, Conservation Breeding Specialist Group/SSC/IUCN*, Apple Valley, MN, USA, pp. 51–79.

Onuma, M., Suzuki, M., Ohtaishi, N. (2006) Possible conservation units of the sun bear (*Helarctos malayanus*) in Sarawak based on variation of mtDNA control region. *The Japanese Journal of Veterinary Research*, 54, 135–9.

Owen-smith, N. (1992) Age, size, dominance and reproduction among male kudus: mating enhancement by attrition of rivals. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 32, 177–184.

Paxinos, E., McIntosh, C., Ralls, K., Fleischer, R. (1997) A noninvasive method for distinguishing among canid species; amplification and enzyme restriction of DNA from dung. *Molecular Ecology*, 6, 483–486.

Parsons, K.M., Noble, L.R., Reid, R.J., Thompson, P.M. (2002) Mitochondrial genetic diversity and population structuring of UK bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*): is the NE Scotland population demographically and geographically isolated? *Biological Conservation*, 108, 175–182.

Ponomarev, A.G., Tatarinova, T.D., Bubyakina, V.V., Smagulova, F.O., Morozov, I.V., Kashentseva, T.A., Solomonov, N.G. (2004) Genetic diversity in Siberian crane (*Grus leucogeranus*) based on mitochondrial DNA D-loop polymorphism. *Doklady Biological Sciences*, 397, 321–323.

Population Division of the Department of Economic and Social Affairs of the United Nations Secretariat. (2012) *World population prospects: the 2008 revision. Highlights*. New York, United Nations, pp. 1–6.

Primack, R.B. (2006) *Essentials of Conservation Biology*, 4th ed. Sinauer Associates, Inc. Sunderland, MA, USA, pp. 243–313.

Pujaningsih, R.I., Malik, A., Pudyatmoko, S. (2007) Comparison study progress on anoa's behaviour prior to conservation program. *Journal of Agriculture and Rural Development in the Tropics and Subtropics* (Supple. 90), 160–167.

Pusey, A., Wolf, M. (1996) Inbreeding avoidance in animals. *Trends in Ecology & Evolution*, 11, 201–206.

Rabinowitz, A. (1995). Ayudando a una especie a extinguirse: El Rinoceronte de Sumatra en Borneo. *Conservation Biology*. 9, 482–488.

Redford, K.H. (1992) The empty forest. *BioScience*, 42, 412–422.

Rodel, M.B. (unpublished) Tamaraw population survey, Mt. Aruyan-Malati Tamaraw Reservation Sablayan, Occidental Mindoro, July 4-20, 2007.

Ruckstuhl, K.E., Neuhaus, P. (2002) Sexual segregation in ungulates: a comparative test of three hypotheses. *Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society*, 77, 77–96.

Russello, M.A., Gladyshev, E., Miquelle, D., Caccone, A. (2004) Potential genetic consequences of a recent bottleneck in the Amur tiger of the Russian far east. *Conservation Genetics*, 5, 707–713.

Saitou, N., Nei, M. (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4, 406–425.

Sheil, D. (2001) Conservation and biodiversity monitoring in the tropics: realities, priorities, and distractions. *Conservation Biology*, 15, 1179–1182.

Sikorsky, J.A., Primerano, D.A., Fenger, T.W., Denvir, J. (2007) DNA damage reduces *Taq* DNA polymerase fidelity and PCR amplification efficiency. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 355, 431–437.

Simonsen, B.T., Siegismund, H.R., Arctander, P. (1998) Population structure of African buffalo inferred from mtDNA sequences and microsatellite loci: high variation but low differentiation. *Molecular Ecology*, 7, 225–237.

Smith, K.F., Sax, D.F., Lafferty, K.D. (2006) Evidence for the role of infectious disease in species extinction and endangerment. *Conservation Biology*, 20, 1349–1357.

Smith, M.F., Patton, J.L. (1991) Variation in mitochondrial cytochrome b sequence in natural populations of South American a kodontine rodents (Muridae: Sigmodontinae). *Molecular Biology and Evolution*, 8, 85–103.

Solis, C.D., Kawamoto, Y., Tanaka, K., Masangkay, J., S., Maeda, K., Namikawa, T. (1995) The tamaraw (*Bubalus (B.) mindorensis*) hemoglobin phenotype and comparison among the asian buffaloes based on isoelectric focusing. *Animal Science and Technology*, 66, 1014–1018.

Soule, M.E. (1980) Thresholds for survival: maintaining fitness and evolutionary potential, in: M. E. Soule, B.A. Wilcox. (Eds.), *Conservation Biology: An Evolutionary-Ecological Perspective*. Sunderland, Mass, Sinauer Associates, pp. 151–169.

Spinage, C.A., (1972) African ungulate life tables. *Ecology*, 53, 645–652.

Steere, J.B. (1888) Letter to the secretary. *Proceedings of the Zoological Society of London*, 29, 413–415.

Suchomel, J. (2005) Some notes relating to the observation of tamaraw (*Bubalus mindorensis*) in the Mt. Iglit-Baco National Park, the Philippines, in 2003. *Lynx (Praha)*, 36, 103–110.

Talbot, L.M., Talbot, M.H. (1996) *The Tamaraw (Bubalus Mindorensis (Heude). Observations and Recommendations*. *Mammalia*, 30, 1–12.

Tanaka, K., Matsuda, Y., Masangkay, J.S., Solis, C.D., Anunciado, R.V.P.,

Kuro-o, M., Namikawa, T. (2000) Cytogenetic analysis of the tamaraw (*Bubalus mindorensis*): A comparison of R-banded karyotype and chromosomal distribution of centromeric satellite DNAs, telomeric sequence, and 18S-28S rRNA genes with domestic water buffaloes. *Journal of Heredity*, 91, 117–121.

Tanaka, K., Solis, C.D., Masangkay, J.S., Maeda, K., Kawamoto, Y., Namikawa, T. (1996) Phylogenetic relationship among all living species of the genus *Bubalus* based on DNA sequences of the cytochrome b gene. *Biochemical Genetics*, 34, 443–452.

Tembely, S., Lahlou-kassi, A., Rege, J.E.O., Sovani, S., Diedhiou, M.L., Baker, R.L. (1997) The epidemiology of nematode infections in sheep in a cool tropical environment. *Veterinary Parasitology*, 70, 129–141.

Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22, 4673–4680.

ツシマヤマネコ保護増殖連絡協議会. (2010) ツシマヤマネコ保護増殖事業実施方針 本編, pp. 13–14.

Tulloch, D.G. (1969) Home range in feral water buffalo, *Bubalus bubalis* Lydekker. Australian Journal of Zoology, 17, 143–152.

Tulloch, D.G. (1979) The water buffalo, *Bubalus bubalis*, in Australia: reproductive and parent-offspring behavior. Australian Wildlife Research, 6, 265–287.

Turner, W.C., Jolles, A.E., Owen-Smith, N. (2005) Alternating sexual segregation during the mating season by male African buffalo (*Syncerus caffer*). Journal of Zoology, 267, 291–299.

White, P.S., Densmore, III, L.D. (1992) Mitochondrial DNA isolation, in: A.R. Hoelzel, (Ed.), Molecular Genetic Analysis of Population: A practical approach. IRL Press Oxford, pp. 29–58.

World Wildlife Fund (WWF). (2004) Counting Wildlife Manual - Mozambique Wildlife Management Series. WWF-Southern Africa Regional Office (SARPO), Harare, Zimbabwe, pp. 9–20.

Yan, P., Wu, X.-B., Shi, Y., Gu, C.-M., Wang, R.-P., Wang, C.-L. (2005) Identification of Chinese alligators (*Alligator sinensis*) meat by diagnostic PCR of the mitochondrial cytochrome b gene. Biological Conservation, 121, 45–51.