

Environment Research and Technology Development Fund

環境省環境研究総合推進費終了研究等成果報告書
(分担研究者用編集版)

クマ類の個体数推定法の開発に関する研究
(S2-10)

平成 21～23 年度

Research on Estimating Population Size of Bears in Japan

財団法人 自然環境研究センター
独立行政法人 森林総合研究所
岩手大学
山形大学
横浜国立大学
日本大学
早稲田大学
地方独立行政法人 北海道立総合研究機構
岩手県環境保健研究センター
株式会社 野生動物保護管理事務所
<研究協力機関>
独立行政法人 国立環境研究所
新潟大学
慶應義塾大学

環境省
総合環境政策局総務課環境研究技術室
環境保健部環境安全課環境リスク評価室
地球環境局総務課研究調査室

平成 23 年度環境研究総合推進費

クマ類の個体数推定法の開発に関する研究（課題番号：S2-10）
2011 年度（平成 23 年度）研究グループおよびアドバイザー

- (1) ヘア・トラップ法による個体数推定法の確立（ヘア・トラップ研究班）
米田 政明（自然環境研究センター、研究代表者）
常田 邦彦（自然環境研究センター）
間野 勉（北海道立総合研究機構）
佐藤 喜和（日本大学生物資源学部）
- (2) 個体数推定に関わる DNA 分析法の確立（DNA 研究班）
玉手 英利（山形大学；DNA 分析研究班代表者）
釣賀 一二三（北海道立総合研究機構）
近藤 麻実（北海道立総合研究機構）
山内 貴義（岩手県環境保健研究センター）
湯浅 卓（株式会社野生動物保護管理事務所）
- (3) 補完法・代替法の開発（補完法・代替法研究班）
三浦 慎悟（早稲田大学；補完法・代替法研究班代表者）
青井 俊樹（岩手大学）
- (4) 個体群モデルによる生息数及び生息動向分析法の確立（個体群モデル研究班）
松田 裕之（横浜国立大学；個体群モデル研究班代表者）
堀野 眞一（森林総合研究所）

ポスドクフェロー・院生研究員

鵜野 レイナ（慶応大学先端生命科学研究所）
東出 大志（新潟大学大学院）

アドバイザー

大井 徹（森林総合研究所）
梶 光一（東京農工大学）
山村 光司（農業環境技術研究所）

研究代表機関

財団法人 自然環境研究センター
〒110-8676 東京都台東区下谷 3-10-10
Tel.03-5824-0960（代表）、Fax.03-5824-0961（事務局）

平成 21～23 年度：主要イベント

平成 21 年度（2009 年度）

- 第 1 回打合せ会議（東京）：2009 年 9 月 25 日
- 日本哺乳類学会 2009 年度大会（自由集会における本研究発表）（台北）
：2009 年 11 月 23 日
- 現地打合せ会議：2009 年 11 月 26-28 日
- 第 2 回打合せ会議（東京）：2010 年 2 月 15 日

平成 22 年度（2010 年度）

- 第 1 回アドバイザーボード（AD）会合（東京）：2010 年 6 月 14 日
- 現地検討会（北上山地）：2010 年 7 月 24-25 日
- 現地説明会（岩手県岩泉町）：2010 年 7 月 25 日
- 中間評価ヒアリング（東京）：2010 年 8 月 3 日
- 日本哺乳類学会 2010 年度大会（自由集会における本研究発表）（岐阜）
：2010 年 9 月 19 日
- 第 2 回アドバイザーボード（AD）会合（東京）：2011 年 2 月 22 日

平成 23 年度（2011 年度）

- 第 1 回アドバイザーボード（AD）会合（東京）：2011 年 6 月 14 日
- 日本哺乳類学会 2011 年度大会（自由集会における本研究発表）（宮崎）
：2011 年 9 月 9 日
- 講演会「ツキノワグマを調べる！～森には何頭のクマさんが？～」(岩手県立博物館) (岩手県立博物館共催)：2011 年 9 月 25 日
- 「クマ類の個体数推定法に関するワークショップ」(富山国際会議場) (富山県自然保護課・環境省中部地方事務所共催)：2011 年 10 月 17 日
- 現地検討会（札幌定山溪地域）：2011 年 11 月 17-18 日
- 第 2 回アドバイザーボード（AD）会合（東京）：2012 年 2 月 29 日
- 平成 23 年度環境研究総合推進費成果報告会（東京）：2012 年 3 月 9 日

クマ類の個体数推定法の開発に関する研究
(S2-10)

1. 成果の概要	i
2. 成果の詳細		
(1) ヘア・トラップ法による個体数推定法の確立に関する研究	1
(財団法人自然環境研究センター、日本大学、地方独立行政法人北海道総合研究機構)		
(2) 個体数推定に関わる効果的な DNA 分析法の確立に関する研究	31
(山形大学、地方独立行政法人北海道立総合研究機構、岩手県環境保健研究センター、株式会社野生動物保護管理事務所)		
(3) 補完法・代替法の開発に関する研究	58
(早稲田大学、岩手大学)		
(4) 個体群モデルによるモニタリング手法及び生息数推定法の確立に関する研究	78
(横浜国立大学、独立行政法人森林総合研究所)		
Research on Estimating Population Size of Bears in Japan	97

課題名 S2-10 クマ類の個体数推定法の開発に関する研究

課題代表者名 米田 政明(財団法人自然環境研究センター 研究部)

研究実施期間 平成21～23年度

累計予算額 95,545千円(うち23年度 31,529千円)
予算額は、間接経費を含む。

研究体制

- (1)ヘア・トラップ法による個体数推定法の確立に関する研究((財)自然環境研究センター、日本大学、(地独)北海道立総合研究機構)
- (2)個体数推定に関わる効果的なDNA分析法の確立に関する研究(山形大学、(地独)北海道立総合研究機構、岩手県環境保健研究センター、(株)野生動物保護管理事務所)
- (3)補完法・代替法の開発に関する研究(早稲田大学、岩手大学)
- (4)個体群モデルによるモニタリング手法及び生息数推定法の確立に関する研究(横浜国立大学、(独)森林総合研究所)

研究協力機関

(独)国立環境研究所、新潟大学、慶応義塾大学

研究概要

1. はじめに(研究背景等)

クマ類(ツキノワグマとヒグマ)は、生態系のアンブレラ種であり、その生息状況は森林生態系の健全性指標の一つと見なすことができる。種子分散や河川魚類の捕食を通じた河畔生態系の物質循環における生態系エンジニアとしての役割も注目されている。産子数が少なく隔年出産のため、相対的にクマ類の個体群増加率は低い。日本では伝統的狩猟獣であり、年平均ツキノワグマは2,000頭前後、ヒグマは500頭程度が捕獲されている。ただし、近年の捕獲数の7割程度は狩猟でなく許可捕獲(主には有害捕獲)となっている。クマ類の捕獲数は、年間捕獲数が20万頭を越えるシカやイノシシに比べ2桁少ない。また、クマ類の地域個体群のうち、ヒグマでは2地域個体群が、ツキノワグマでは6地域個体群が、環境省の哺乳類レッドリスト(2007年版)において絶滅のおそれのある地域個体群に指定されており、その地域的絶滅の防止が課題となっている。一方、自然環境保全基礎調査によると、1978年に比べ2003年のクマ類生息確認区画は、全国平均で5.7%増加した。クマ類の捕獲数も1990年代に比べ、2000年代は増加傾向にある。特に、ツキノワグマでは2000年代になって捕獲数の年変動が大きくなり、2004年度、2006年度、2010年度には大量出沒ー大量捕獲が報告された。ヒグマでも、2009年度や2011年度には600頭以上の捕獲と、平年に比べ捕獲数が大きく増加した。大量出沒ー大量捕獲年には人身被害も増加し、ヒグマとツキノワグマをあわせて、2006年度には5名、2010年度には3名の死亡事故が報告されている。また、農作物や特にツキノワグマによる植林木への加害も地域によっては深刻な問題となっている。クマ類をとりまくこのような状況から、捕獲を極力抑制すべきとする意見と、特に人身被害防止のため許可捕獲をさらに強化すべきとの意見の対立がある。クマ類は日本の野生動物の中でも、その生物学特性および人身被害・農林産物被害防止への社会的要請から、その保護管理に特に注意が必要な狩猟獣である。

2. 研究開発目的

クマ類の保護管理のためには、適正な捕獲数設定あるいは絶滅のおそれのある地域個体群の状況把握のため、その個体数あるいは個体数動向把握が欠かせない。クマ類の個体数推定のため、これまでも直接観察法や標識再捕獲法による調査、あるいは捕獲数と出生数の均衡仮説による推定などが試みられてきた。しかし、森林性のクマの直接観察は困難であり、捕獲数はエサ資源量の年変動などによる変化が大きいため、観察や統計的手法による生息数推定には困難な点も多い。近年、微量DNA分析の技術進歩により、クマ類体毛の遺伝標識に基づく個体識別による個体数推定法(ヘア・トラップ法)が試みられ始めた。また、センサーとデジタルカメラの発達により、これらを組み合わせた自動撮影カメラによる個体識別(カメラトラップ法)も実用化の段階に入った。しかし、ヘア・トラップ法ではトラップの構造や設置方法、DNA分析では毛根の微量DNA分析の手順および分析エラー対策、カメラトラップ法では、有効な生体標識あるいは撮影法が確立されていなかった。また、ヘア・ト

ラップ法あるいはカメラトラップ法を適用する場合、地形やアクセス条件からトラップを均一に設定することが困難な場合が多いが、不均一なトラップ配置では従来の標識-再捕獲法による推定では誤差が大きいことが指摘されていた。地形・植生が細分されている日本のランドスケープに適用可能でかつ地方自治体等で実施可能なクマ類の個体数推定およびモニタリング手法の開発を目的として、DNA標識・再捕獲法を応用したヘア・トラップ法による個体数推定法の確立および補完法・代替法としてのカメラトラップ法の開発に重点をおいて、相互に関連する次の4つのサブ・テーマに関する研究を行った。

- (1) ヘア・トラップ法による個体数推定法の確立に関する研究(ヘア・トラップ班)
- (2) 個体数推定に関わる効果的なDNA分析法の確立に関する研究(DNA班)
- (3) 補完法・代替法の開発に関する研究(カメラトラップ班)
- (4) 個体群モデルによるモニタリング手法及び生息数推定法の確立に関する研究(モデル班)

研究に際しては、クマ類を対象とした特定鳥獣保護管理計画を策定している都道府県が、開発した個体数推定技術を適用し高精度で効率的な個体数推定を行うことで、クマ類のより科学的・計画的な保護管理の推進と社会的合意形成に貢献することを意識して行った。

3. 研究開発の方法

(1)ヘア・トラップ法による個体数推定法の確立に関する研究

ツキノワグマとヒグマの両種を対象とした。ツキノワグマでは岩手県北上山地にモデル調査地(図1)を設定し、2009年度に予備調査、2010年度に245基のトラップによる大規模ヘア・トラップ調査、2011年度にカメラトラップ法との比較を含む手法の検証調査を行った。また、ヘア・トラップに自動撮影カメラ(HTC)を併設した、体毛採取状況进行分析した。採取した体毛試料は、DNA分析試料としてDNA班に送付した。また、トラップ位置や試料の採取データをモデル班に送付した。ヒグマでは、北海道浦幌地域、札幌市定山溪地域、渡島半島上ノ国地域の3カ所で、誘引物試験、試料採取の季節性、およびHTC併設による体毛捕捉率に注目したヘア・トラップ調査を行った。ヒグマではさらに、背擦り木による体毛採取の可能性も試みた。ヒグマの体毛採取試料も、DNA班の分析試料とした。

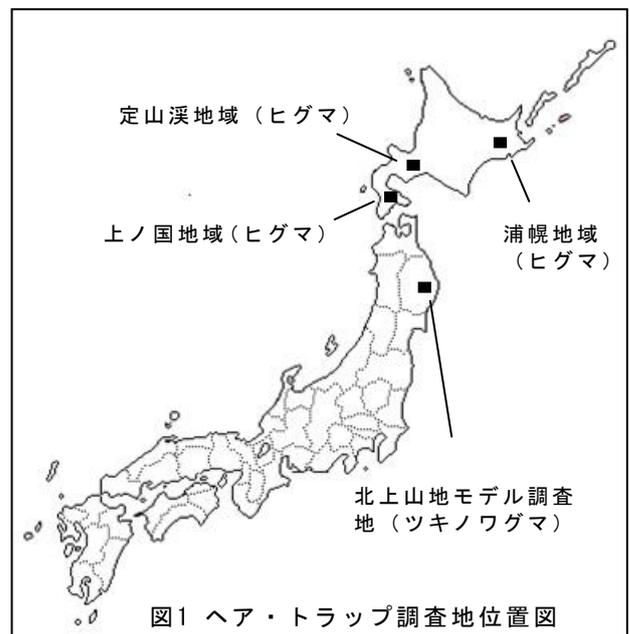


図1 ヘア・トラップ調査地位置図

(2)個体数推定に関わる効果的なDNA分析法の確立に関する研究

ヘア・トラップ法で採取したツキノワグマとヒグマの体毛計約3100試料、および狩猟と有害駆除で捕獲されたクマ類を分析試料としてDNA法の開発を進めた。最初に、既存報告と本研究における新たなDNA分析から、異なる2個体が同一の遺伝子型を持つ確率である*P_{id}*指標および遺伝子増幅後の波形データの判別の容易さに注目して、DNA個体識別に適したマイクロサテライト遺伝マーカーを検索した。遺伝マーカーの選定では、従来から使われていた2塩基反復多型に加え、4塩基反復配列多型のマーカーにも注目した。次ぎに、効率的なDNA分析のため、いくつかの試薬および酵素の組合せによるPCRの反応条件を比較し最適条件を探った。本研究では、同一のヘア・トラップ調査で採取された試料を複数の機関が並行してDNA分析を行った。機関間の分析誤差をなくすため、標準試料によるマイクロサテライト反復長較正を行った。ヘア・トラップ調査試料から得られた遺伝子型の誤判定を避けるため、6遺伝マーカーのうち1遺伝子座あるいは2遺伝子座のみ異なっている分析試料に関しては、繰り返し分析の手順を定めた。また、特に体毛本数の少ない試料のDNA分析エラー率を見るため、有害捕獲個体筋肉から抽出したDNA分析結果との比較による適合度検討を行った。さらに、山形県において有害捕獲で捕獲されたツキノワグマ117頭を材料に、遺伝子頻度の時間的変動(TM法)および連鎖不平衡(LD法)に注目して、有効集団サイズの推定を行った。

(3)補完法・代替法の開発に関する研究

補完法・代替法としてカメラトラップ法と、食跡DNA分析による個体識別法に注目して研究を行った。カメラトラップ法では、2009年度には2つのクマ牧場における写真撮影から、個体識別に有効な生体標識を検索した。次ぎに、ヘア・トラップ法を行った北上山地モデル調査地において、2010年度に2種類のカメラトラップを計40基設置し、生体標識の有効な撮影方法を検討した。そして、2011年度には、北上山地モデル調査地において80基のカメラトラップをヘア・トラップに隣接して設置し、ヘア・トラップ法とカメラトラップ法による生息数推定の比較を行った。

食跡DNA分析では、岩手県遠野市における農作物食害跡から採取したDNAに基づく個体識別法のレビューを行った。

(4) 個体群モデルによるモニタリング手法及び生息数推定法の確立に関する研究

従来の閉鎖個体群モデルによる生息数・密度推定では、トラップ有効面積の設定が恣意的になるといった課題があった。このため、標識再捕獲法における空間情報から生息密度を推定する方法として、(i) 平均最大移動距離法、(ii) 空間明示最尤法、(iii) ベイズ空間明示型標識再捕モデル、の3つの生息密度推定手法の精度比較を行った。精度比較は、北上山地モデル調査地を対象に、ダミーデータを用いた仮想個体群をシミュレーションによって再現することで行った。空間明示最尤法およびベイズ空間明示標識再捕モデルを北上山地モデル調査地におけるヘア・トラップ法で採取した体毛DNA分析による個体識別結果およびカメラトラップ法による個体識別結果に適用し、調査地の生息密度を推定した。さらに、ヘア・トラップ法の調査設計に資するため、北上山地モデル調査地のデータを使って、トラップ密度および調査セッション数と密度推定結果のばらつきを検証した。

4. 結果及び考察

(1) ヘア・トラップ法による個体数推定法の確立に関する研究

ツキノワグマを対象としたヘア・トラップ調査として、本研究では内部対角線にも有刺鉄線を設置する1段張のトラップを開発した(図2)。北上山地モデル調査地における2010年度の大規模ヘア・トラップ調査で採取したツキノワグマの体毛の約半数は内部対角線で採取しており、本研究で開発したヘア・トラップ構造は試料採取数を増やす上で有効であった。ヒグマでも、トラップ内部対角線の設置により採取試料数を増やすことができた。一方、ヒグマは、個体サイズのバラツキが大きいため、有刺鉄線1段張では体毛を採取できない場合があるため、外周は2段張構造とする必要が示唆された。北上山地モデル調査地では、2010年度調査では、245基のトラップを設置し10日を1セッションとする6セッション(のべ1,470トラップ・セッション)のヘア・トラップ調

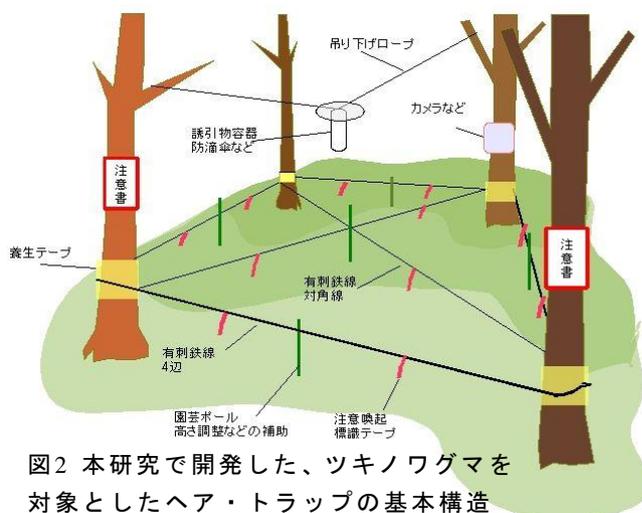


図2 本研究で開発した、ツキノワグマを対象としたヘア・トラップの基本構造

査において、329トラップ・セッションから計2,048の体毛試料を採取した。補完法・代替法としてのカメラトラップ法との比較に注目した北上山地モデル調査地における2011年度調査では、80基のトラップによる5セッションの調査を行い、のべ127トラップ・セッションから1,120試料を採取しDNA分析試料とした。体毛試料採取においては、季節差とトラップごとの採取率の違いが認められた。採取した試料のうち個体識別エラーが少ないと考えられた体毛数10本以上の試料分析結果として、北上山地モデル調査地における2010年度調査では157個体、2011年調査では64個体が識別された。ヘア・トラップに併設したHTC調査では、ヘア・トラップに侵入しても体毛が採取できない場合、あるいは体毛が採取されたにもかかわらずHTCによる撮影がない事例が、それぞれトラップ・セッション単位として15%程度あった。ヒグマの背擦り木からの体毛回収が可能であることを確認した。しかし、背擦り木の利用個体は成獣オスが多いなど偏りがあることを前提とした調査設計が必要である。

(2) 個体数推定に関わる効果的なDNA分析法の確立に関する研究

ヘア・トラップ法で採取した体毛試料の遺伝マーカーとして50種類の遺伝子を検索し、*Pid*が低い遺伝子座としてツキノワグマで6遺伝子マーカーが有効と判断した。ヒグマでも同様に*Pid*の低い12遺伝子を判別した。効率的なPCRのために、選定した遺伝子から3つの遺伝子を組み合わせた2セットのmultiplex PCRとし、性判別のためのアメロゲニン遺伝子分析も同時行う分析法を開発した。PCR反応条件の予備試験から、市販の2つの酵素で分析成績のよいことを確認した。

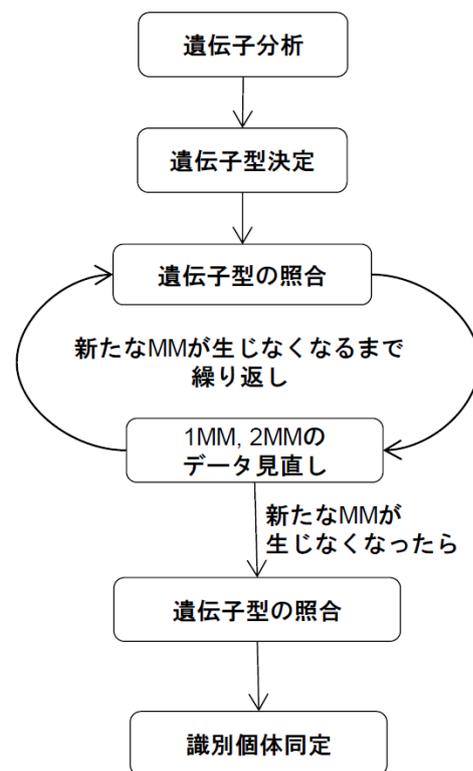


図3 体毛DNA分析フローチャート

北上山地モデル調査地で採取した試料に関しては、最初に1トラップ・セッションから1試料のみ分析し、次ぎに体毛数が10本以上の試料について分析した。十分なDNA量を抽出することができた有害捕獲個体筋肉DNA分析結果と、体毛数10本以下の試料のDNA分析結果の適合度検定から、体毛数10本以下の試料では分析エラー率が高いことがわかった。これらのDNA分析結果から、最終的に遺伝子型(個体識別)を決定する手順として、特に1遺伝子あるいは2遺伝子のみミスマッチの場合繰り返し分析を組み込んだ分析手法を開発した(図3)。有効集団サイズに関しては、有害捕獲個体の年齢査定を行い数年間隔のサンプリング試料に基づき、TM法による中長期の変動を記録することが示唆された。

(3) 補完法・代替法の開発に関する研究

ツキノワグマでは胸部斑紋(月ノ輪紋)が、普遍性、唯一性、持続性および簡便性の観点から、個体識別のためのすぐれた生体標識であることを確認した。北上山地モデル調査地における2010年度の生体標識撮影方法の検討から、カメラトラップ法における個体撮影方法として、誘引物を横木に設置してクマが立ち上がったところを撮影する図4-1、4-2に示す方法が適していることを確認した。ヘア・トラップ法との比較に注目して北上山地モデル調査地で2011年度に行ったカメラトラップ調査では、80基のトラップによる5セッション調査から53頭を識別した。同一のトラップ設置条件では、識別個体数としてはヘア・トラップ法が少し多いものの、空間明示モデルによる解析では、カメラ

トラップ法とヘア・トラップ法で推定生息密度に大きな違いはなく、適切な調査設計に基づくカメラトラップ法はヘア・トラップ法の代替法となりうることを確認した。食跡DNA分析による個体識別法では、分析エラーを少なくする手順を含め、食跡DNA分析マニュアルとしてとりまとめた。



図4-1 カメラトラップによる撮影例

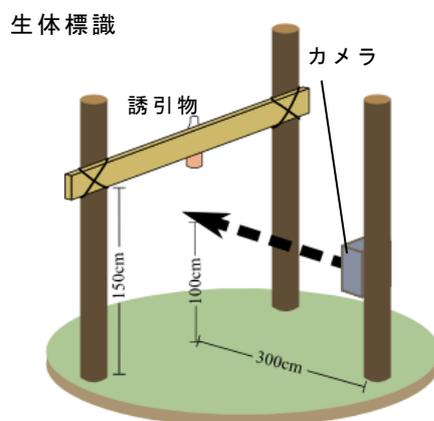


図4-2 カメラトラップの設置

(4) 個体群モデルによるモニタリング手法及び生息数推定法の確立に関する研究

北上モデル調査を対象としたダミーデータによるシミュレーションの結果、均一トラップ配置・非空間明示モデル、トラップ設置位置・非空間明示モデル、均一トラップ配置・空間明示モデル、トラップ設置位置・空間明示モデル、そして本研究で開発したベイズ空間明示標識再捕モデルの順で、生息密度推定精度が高いことが明らかになった(図5)。空間情報として有効トラップ面積を考慮した3つのモデルの比較では、ベイズ空間明示型標識再捕モデルが最も推定精度が高いと判断された。空間明示最尤法も同様に比較的高い推定精度を示した。しかし、平均最大移動距離法(MMDM)による推定では、ダミーデータに比べ低い推定密度を示し、他の2つのモデルに比べ精度が劣る可能性が示された(図6)。

統計ソフトRのパッケージである“SPACECAP”は、本研究で開発した空間明示モデルと同等の機能を持っている。北上山地モデル調査地における2010年度の大規模ヘア・トラップ調査による試料採取位置情報、および採取試料のDNA分析による再捕獲を含む個体識別結果に空間明示モデルを適用し、ツキノワグマの生息密度として0.400(0.340-0.489)頭/km²の推定値を得た。北上山地モデル調査のデータを使ったトラップ配置および調査セッション数の検証結果として、4

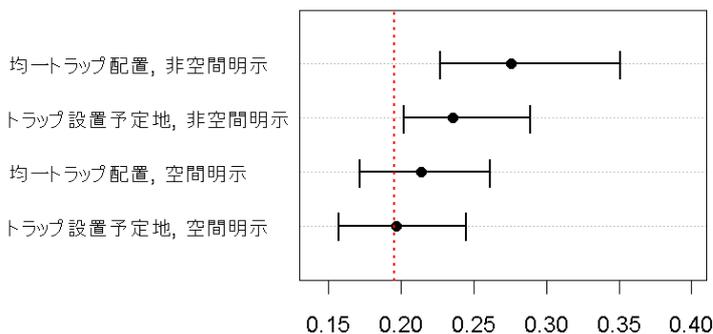


図5 トラップ設置予定地、均一トラップ配置における、空間明示モデルと空間非明示モデルの生息密度推定値。黒点は事後分布中央値、エラーバーは95%信用区間を示す。赤破線は真の個体密度(0.195/km²)

km²に1基(0.25基/km²)よりも高い密度でトラップを設置すれば密度推定値の変動は少ないこと、調査セッション数は3セッション以上であれば密度推定のばらつきが少ないことを確認した。一方、地方自治体によるヘア・トラップ調査の先行事例分析から、トラップ数が50基程度以下の場合、生息密度推定に失敗するケースが多く、50基以上のヘア・トラップ設置が望ましいことを確認した。

5. 本研究により得られた主な成果

(1) 科学的意義

ヘア・トラップ法における、トラップ標準構造と配置方法の提示、エラーを最小化する採取体毛のDNA分析プロトコルの確立、および個体数推定における空間明示モデルの開発により、高精度で効率的なクマ類の個体数推定が可能となった。また、カメラトラップ法では生体標識の確実な撮影と個体識別法を確立し、空間明示モデルとの組み合わせによる、ヘア・トラップ法の代替法・補完法としての個体数推定技術を開発した。

(2) 環境政策への貢献

本調査研究を通じて開発した手法が、都道府県におけるクマの今後の生息数調査に具体的応用されるよう、調査・分析手法等を解説した以下の手引きを作成し、ウェブサイト(<http://www.bear-project.org/>)での公開および統合版の印刷配布を行った。

- (i) クマ類の個体数を調べる：ヘア・トラップ法とカメラトラップ法の手引き(統合版)
- (ii) ヘア・トラップの設置・見回り・試料回収作業の手引き
- (iii) ヘア・トラップ試料のDNA分析マニュアル
- (iv) カメラトラップ調査マニュアル
- (v) 食跡DNA分析マニュアル

(vi) クマ生息地において安全な調査・作業を進めるために：ヘア・トラップの現場にて体毛DNA分析に関し上記のウェブサイト上に次の共有プラットフォームを提供した。

遺伝子分析データの精度管理と標準化のためのデータ解析環境

(URL：<http://www.bear-project.org/DNA/platform/PlatformTop.html>)

また、都道府県鳥獣担当部署へのアンケート調査により、13府県が今後のクマ類の個体数調査にヘア・トラップ法を適用する計画があることを確認した。

6. 研究成果の主な発表状況

(1) 主な誌上発表

<査読付き論文>

- 1) 間野 勉・佐藤 喜和：哺乳類科学 50: 95-97 (2010)
「クマ類の個体群モニタリング手法の確立に向けて. 2009年度大会自由集会記録」
- 2) 米田 政明・間野 勉：哺乳類科学 51: 79-95 (2011)
「クマ類の個体数推定および動向把握方法の現状と課題」
- 3) Uno, R., Kondo, M., Yuasa, T., Yamauchi, K., Tsuruga, H., Tamate, H.B., and Yoneda, M.: Population Ecolog 54: 509-519 (2012) DOI: 10.1007/s10144-012-0328-3, "Assessment of genotyping accuracy in a non-invasive DNA-based population survey of Asiatic black bears (*Ursus thibetanus*): lessons from a large-scale pilot study in Iwate prefecture, northern Japan."
- 4) Higashide, D., Miura, S. and Miguchi, H.: Journal of Zoology, (2012) DOI: 10.1111/j.1469-7998.2012.00942.x, "Are chest marks unique to Asiatic black bear individuals?" (in press, online first)
- 5) Ohta, U., Jusup, M., Mano, T., Tsuruga, H. and Matsuda, M.: Ecological Modelling, (2012) DOI: 10.1016/j.ecolmodel.2012.05.011, "Adaptive Management of the Brown Bear Population in Hokkaido, Japan." (in press, online first)

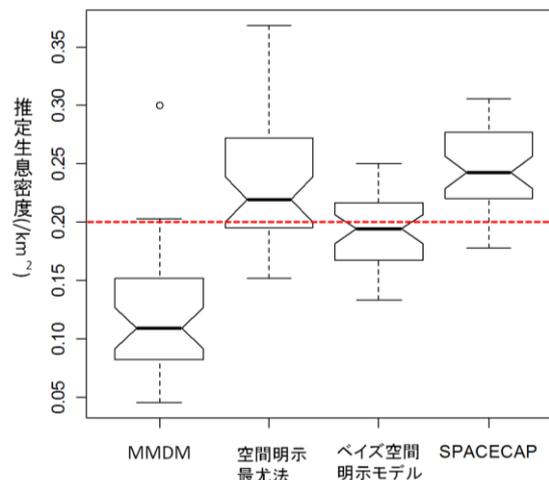


図6 ダミーデータによる生息密度推定モデルの推定結果。箱ひげ図は、内側から中央値、四分位点、四分位点×1.5の範囲の最大値を示し、○はそれより外側の値を示している。赤点線は真の推定密度0.2頭/km²を示す。

(2) 主な口頭発表(学会等)

- 1) Uno, R., Higashi, H., Tamate, HB: Parentage analysis revealed solitary life of an orphaned cub of the black bear (*Ursus thibetanus*). International Symposium on Conservation of Asian Black bear. Taipei, Taiwan, 2009.11.17-18.
- 2) 近藤麻実・山内貴義・辻本恒徳・玉手英利・米田政明・浅野玄・鈴木正嗣:ヘア・トラップによって回収されるツキノワグマ(*Ursus thibetanus*)体毛タイプの季節変化と遺伝子解析成功率の検討. 日本哺乳類学会2009年度大会(2009年11月、台北)
- 3) 東出 大志・三浦 慎悟・箕口 秀夫・青井 俊樹. 2010. 斑紋パターンによるツキノワグマの個体識別と野外撮影手法の検討. 第16回野生生物保護学会・日本哺乳類学会2010年度大会(2010年9月、岐阜).
- 4) 深澤圭太・太田海香・松田裕之. 2010. 空間明示型Capture-Recaptureモデル:個体密度はどのように計算すべきか. 第16回野生生物保護学会・日本哺乳類学会2010年度大会(2010年9月、岐阜)
- 5) 山内貴義・鞍懸重和・深澤圭太・米田政明.ヘア・トラップ法を用いた岩手県北上高地北部地域個体群に生息するツキノワグマの生息数推定. 第17回日本野生動物医学会(2011年9月、東京)

7. 研究者略歴

課題代表者: 米田 政明

1950年生まれ、北海道大学農学部卒業、農学博士、現在財団法人自然環境研究センター研究主幹
研究参画者

(1) 米田 政明 (サブ・テーマ1、ヘア・トラップ研究班代表) 同上

(2) 玉手 英利 (サブ・テーマ2、DNA分析研究班代表)

1954年生まれ、東北大学理学部卒業、理学博士、現在山形大学理学部教授

(3) 三浦 慎悟 (サブ・テーマ3、補完法・代替法研究班代表)

1948年生まれ、東京農工大学卒業、理学博士、現在早稲田大学人間科学部教授

(4) 松田 裕之 (サブ・テーマ4、個体群モデル班代表)

1957年生まれ、京都大学理学部卒業、理学博士、現在国立横浜大学環境情報研究院教授

S2-10 クマ類の個体数推定法の開発に関する研究：概要図

クマ類の個体数把握は、捕獲数上限設定や絶滅のおそれのある地域個体群の保護管理に不可欠



【目的】個体数調査法としてのヘア・トラップ法（遺伝マーカーによる個体識別）、代替法・補完法としてのカメラトラップ法による高精度の個体数推定法の開発

関連する4つのサブテーマ実施

ヘア・トラップ法研究

大面積ヘア・トラップ
(構造、配置、試料採取法検討)

補完法・代替法研究

カメラトラップによる個体識別・痕跡DNA

DNA分析プロトコル研究

採取試料（体毛）DNA分析による個体識別

個体群モデルアプローチ

個体数推定式改良

【成果】クマ類の科学的・計画的保護管理：地方自治体向け個体数調査法情報提供、手引き配布



ウェブ情報提供
<http://www.bear-project.org/>

ヘア・トラップの設置・見回り・試料回収作業の手引き

平成24年3月
 (財)自然環境研究センター
 クマ類の個体数推定法に関する研究チーム

ヘア・トラップ試料のDNA分析マニュアル
 -DNA抽出、PCR、ジェノタイプング、精度検証の方法-

目次

- はじめに
- 作業手順
 - 体毛サンプルの確保
 - 体毛からのDNA抽出
 - 遺伝子増幅反応
 - 遺伝子型の判別 (ジェノタイプング)
- 個体識別
 - 精度の検証
 - アミノグリニン遺伝子による性別判別
- 参考

カメラトラップ調査の手引き
 一ツキノグマの個体数推定へ向けて

S2-10 クマ類の個体数推定法の開発に関する研究

(1) ヘア・トラップ法による個体数推定法の確立に関する研究

財団法人自然環境研究センター 研究事業部

米田 政明

常田 邦彦

地方独立行政法人 北海道総合研究機構

間野 勉

日本大学 生物資源学部

佐藤 喜和

平成21～23年度累計予算額：44,838千円（うち、平成23年度予算額：11,892千円）

予算額は、間接経費を含む。

[要旨] クマ類の個体数推定法の一つとしてのヘア・トラップ法は、多数のトラップを比較的容易に設置できること、非侵襲的方法で多くの体毛試料を採取できること、直接観察法などに比べDNAによる個体識別能が高いこと、などから他の方法に比べ調査面積あたりの識別個体数の精度は高い。ただし、現状では調査コストも高いため、効率的なトラップの設置などの調査設計、分析対象とする試料の選択およびDNA分析技術の確立が重要である。平成21年度研究では、ヘア・トラップ法先行事例のレビューを行うとともに、北上山地青松葉山周辺にツキノワグマ (*Ursus thibetanus*) を対象としたモデル調査地を設定し予備調査を行った。平成22年度は実証研究として、北上山地モデル調査地において大規模ヘア・トラップ調査を実施した。平成23年度研究では、調査法の検証として、カメラトラップ併設によりヘア・トラップの利用と体毛捕捉率の関係を分析し、さらに補完法・代替法としてのカメラトラップ法による識別個体数との比較を行った。北上山地モデル調査地における試料採取効率は、国内のツキノワグマを対象とした先行研究に比べ高い割合であった。このことから、ツキノワグマを対象に本研究で開発した、トラップ構造、誘引物、設置方法、試料採取およびデータ記録などは、今後標準法として採用可能なことを確かめた。ただし、試料採取率には、トラップ位置および季節による差が見られた。カメラトラップ併設調査では、調査トラップ・セッションの約12%で体毛採取と画像記録に違いが見られた。カメラトラップ法との識別個体数の差は少なかった。ヒグマ (*U. arctos*) において、ツキノワグマで用いられたヘア・トラップ構造を用いた場合の体毛捕捉率を、カメラトラップ併設により検討した。その結果、ヒグマに対してもトラップ構造が有効であることが確かめられた。ただし、ツキノワグマに比べて年齢や性別による体サイズのばらつきが大きいと、体毛捕捉率や採取試料数を高めるためには、有刺鉄線を2段張りにするなどの工夫が必要である。

[キーワード] ヘア・トラップ、クマ類、個体数推定、モニタリング、保護管理

1. はじめに

クマ類は、地域個体群の維持と人身被害および農林産物被害防止への社会的要請から、保護管理に特に注意が必要な狩猟獣である。近年増加している人間居住地へのクマ類の大量出没と、それに伴う大量捕獲の要因解明と対策も求められている¹⁾。保護管理では、個体数あるいは個体群動向に関する情報が不可欠である。環境省（2010）の特定鳥獣保護管理計画作成のためのガイド

ライン（クマ類編）²⁾では、地域個体群の個体数水準区分に基づき、個体数に対する捕獲数割合の上限を段階的に設定している。クマ類の個体数推定法の一つとして、ヘア・トラップ法による個体数推定が、近年、国内でも導入が試みられている³⁾。米国でヒグマおよびアメリカクロクマ（*U. americanus*）を対象に開発されたヘア・トラップ法は、DNA個体識別能が高い、DNAが永久標識となる、非侵襲的方法で試料採集が可能、といった利点がある。また、他の調査法に比べ比較的容易に多数のトラップを広範囲に設置でき、結果として多くの試料を採取することができる。しかし、日本の急峻な地形や多様な植生および複雑な土地利用といった環境条件、あるいはツキノワグマの生態・生息状況特性に対応したヘア・トラップの標準設置デザインは示されていない。また、これまでの国内のヘア・トラップ調査先行事例は、小規模な調査が多かった^{3) 4)}。小規模調査では、トラップ設置域の周辺効果あるいは体毛試料採取率の不安定さなどにより、個体数推定における誤差が大きくなる。一方、大規模ヘア・トラップ調査では、トラップの設置、試料採取およびDNA分析コストが増大する。クマ類個体数調査において、地方自治体などで実施可能なヘア・トラップ法の標準化のためには、簡便かつ試料採取率の高いトラップ構造および効果的な誘引物を開発し、適切な設置面積およびトラップ密度などを検討する必要がある。さらに、分析効率を高めDNA分析のエラーを低減するため、体毛試料の適切な採取、記録、保管方法などの開発も重要である、このため、本研究では、ツキノワグマでは北上山地中央部を、ヒグマでは北海道札幌市定山溪地域、渡島半島上ノ国、および白糠丘陵浦幌地域を対象地域としてヘア・トラップ調査を実施した。

2. 研究開発目的

クマ類の個体数推定におけるヘア・トラップ法の標準化、DNA個体識別のためサブテーマ2「個体数推定に関わるDNA分析法の確立に関する研究」（DNA班）への体毛試料提供、およびサブテーマ4「個体群モデルによる生息数および生息動向分析法の確立に関する研究」（個体群モデル班）への試料採取に関するデータ提供を目的として、ツキノワグマおよびヒグマを対象としたヘア・トラップ調査を実施した。さらに、サブテーマ3「補完法・代替法の開発に関する研究」（代替法班）における、カメラトラップ法による生息数推定との精度比較のためのデータを代替法班および個体群モデル班に提供した。ヘア・トラップ法の標準化では、効率的なヘア・トラップの構造と配置に注目して研究を行った。ツキノワグマでは、北上山地モデル調査地において、2009年に予備調査、2010年に大規模ヘア・トラップ調査を実施し、2011年には再現性およびカメラトラップ法との比較に注目した検証調査を行った。ヒグマでは定山溪地域、上ノ国地域および浦幌地域においてヘア・トラップ調査を実施し、ヒグマへの適用方法を検討した。また、北上山地、上ノ国地域および浦幌地域では、ヘア・トラップに併設した自動撮影カメラ（ヘア・トラップ・カメラ：HTC）により、ツキノワグマおよびヒグマのヘア・トラップ利用状況と体毛採取の関連を分析した。さらにヒグマに関しては、誘引物を用いずに行うヘア・トラップとして背擦り木を用いた体毛採取法の開発を試みた。これらの調査結果を踏まえ、クマ類生息数調査のためのヘア・トラップ法のマニュアルとして取りまとめた。

3. 研究開発方法

（1）調査地

1) 北上山地モデル調査地

半閉鎖環境に一定規模のツキノワグマ地域個体群が生息する岩手県北上山地⁵⁾を、本研究におけるツキノワグマの調査対象地とした(図(1)-1)。北上山地モデル調査地は、盛岡市の東部、北上山地のほぼ中央部に位置する。行政区域としては、岩手県下閉伊郡岩泉町、盛岡市、宮古市川井(旧川井村)、宮古市新里地区にまたがる。調査地の外周は、河川や道路など明確な境界で区切れるよう、南縁を閉伊川、東縁を刈屋川、北縁を小本川と三田貝川および西縁を軽松沢川と県道171号線に囲まれた地域に設定した。モデル調査地(2010年調査)中央部の位置は、北緯39°46′、東経141°33′、トラップ設置位置の最外周を結ぶ面積は2010年調査では606 km²、2011年調査では336 km²であった(図(1)-3参照)。調査地は、北上山地中央部の外山高原と早坂高原の延長にあり、青松葉山(1,365 m)から堺の神山(1,315 m)、御大堂山(1,196 m)周囲を含む標高1,000 m以上の高標高地の稜線には平坦部や緩斜面の高原地帯が多い。しかし、高原地帯の周辺の斜面中腹部から河川沿いは起伏の多い急峻な地形となっている。モデル調査地の最低標高は、調査地南東部の宮古市茂市地区の標高約60 m、最高標高は青松葉山頂の1,366 mであった。高原地帯の一部に放牧地が、また低標高地の川沿いには民家、耕作地も見られるが、北上山地モデル調査地域の大部分は森林である。北上山地はブナクラス域自然・代償植生(落葉広葉樹林(太平洋型))⁶⁾が成立する地域であり、モデル調査地でも、低標高地から山地帯にかけて、コナラ群落、クリ-ミズナラ群落、ブナ-ミズナラ群落、チシマザサ-ブナ群落、の落葉広葉樹林植生帯の垂直変化が見られる⁷⁾。植林地では、標高200 mより低いところではアカマツおよびスギ植林があり、カラマツ植林はスギ植林地の上部、標高800 mあたりまで広範囲に分布する。調査地の主要範囲をしめる岩泉町の人工林率は38%である(世界農林業センサス2000⁸⁾)。これより高標高地では植林地は少なく、落葉広葉樹の自然林と二次林が優占する。標高700 mから1,000 m付近に多い高原地帯で、放牧場や萱場として利用されているところは、ススキ草原やシバ草原地となっている。調査地内の川沿いと主要道路沿いには、民家と耕作地が点在している。森林所有形態別では、モデル調査地の約4割が国有林、1割が市町村有林、残りが民有林であった。

北上山地調査地における既存資料によるツキノワグマ生息状況調査として、岩手県資料からこれまでの推定生息数および捕獲数推移を整理した。



図(1)-1 ヘア・トラップ調査地位置図

2) 定山溪地域

北海道札幌市南区定山溪地域に位置する国有林(以下、定山溪地域とする)においてヒグマ調査を実施した。調査地域は豊平川、新川、張碓川および朝里川水系の森林であり、標高は約210 mから余市岳山頂の1,488 mまで及ぶ。森林はトドマツ、アカエゾマツ、イタヤカエデ、ミズナラ、ハルニレなどからなる針広混交林を主体とし、一般に林床はチシマザサ、クマイザサが優先し、

特に標高が高く積雪の深い場所は背丈を超えるチシマザサに覆われる。ヘア・トラップを設置した最外郭面積は243 km²である。なお、定山溪地域における現地調査およびデータのまとめは、本サブテーマ分担研究者の他、DNA分析班分担研究者の近藤麻実、釣賀一二三（北海道総合研究機構環境科学研究センター）も参加して行った。

3) 上ノ国地域

北海道檜山郡上ノ国町に位置する北海道渡島総合振興局西部森林室の管理する道有林（以下、上ノ国地域とする）において調査を実施した。調査地域は石崎川水系を中心とした標高100～1000 mの山地で構成されており、ブナを優占種とする落葉広葉樹林に覆われている。峡谷にはトチノキ、サワグルミ、オヒョウ等で構成される河畔林が発達する。人工林は、比較的緩やかな地形で標高の低いところに多く、植栽樹種はトドマツ、スギ、カラマツである。なお、上ノ国地域における現地調査およびデータのまとめは、本サブテーマ分担研究者の他、DNA分析班分担研究者の近藤麻実、釣賀一二三（北海道総合研究機構環境科学研究センター）も参加して行った。

4) 浦幌地域

北海道十勝郡浦幌町、釧路市音別町、白糠郡白糠町に位置する北海道十勝総合振興局森林室の管理する道有林（以下、浦幌地域とする）において調査を行った。阿寒湖から連なる白糠丘陵の南端に位置し、標高100～600 mほどの丘陵・山地で構成されている。主な植生はミズナラ、イタヤカエデ、シナノキ、トドマツ、などからなる針広混交林とトドマツ、カラマツを中心とした人工林からなる。なお、浦幌地域における現地調査およびデータのまとめは、本サブテーマ分担研究担当者の他、小泉 沙奈恵、宮脇 有里（日本大学生物資源科学部）、浦田 剛（浦幌ヒグマ調査会）が行った。

(2) 本研究で開発したツキノワグマのヘア・トラップの構造と空間配置

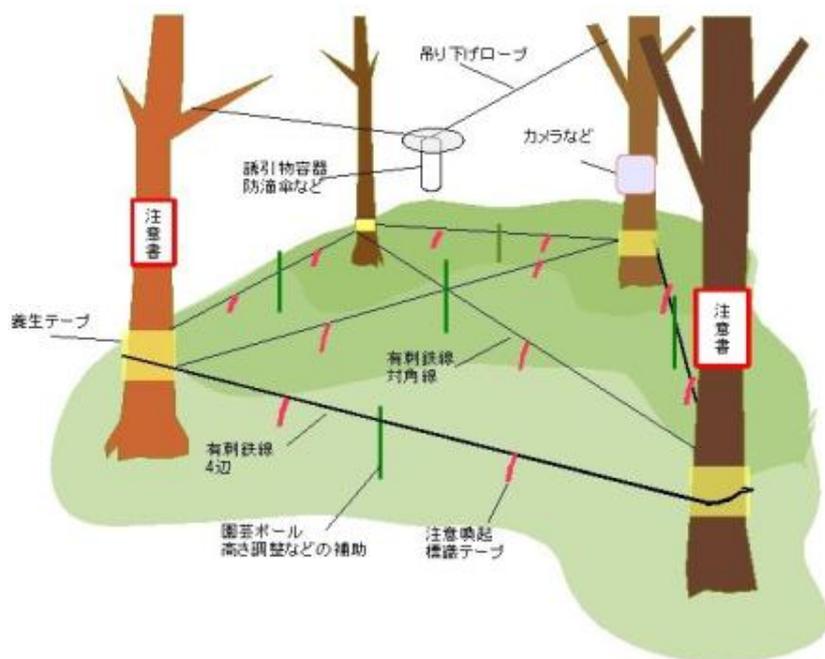
1) ヘア・トラップの構造と設置

ツキノワグマを対象とした北上山地モデル調査において、本研究では次の構造のヘア・トラップを開発した（図(1)-2）。

- (i) 有刺鉄線（16番線）による3 m × 3 mの囲いを基本形とする。体毛採取率を高めるため、内部対角線にも有刺鉄線を張る。有刺鉄線（周囲および対角線）は地上45 cmの一段張りとする（トラップ1カ所当たりの有刺鉄線の総延長は約20 mとなる）。
- (ii) 支柱は、現地に適当な立木がある場合は、布テープなどによる幹への養生措置を行った上で、立木を利用する。適当な立木がない場合は、長さ1.5 mの園芸用ポールを使う。
- (iii) 体毛の見落としと下草と触れることによる劣化を防止するため、必要に応じてトラップ設置場所の下草刈り取りを行う。
- (iv) 誘引物として、500 mlのペットボトルに約200 mlのハチミツを入れる。誘引物利用の学習効果を避けるため、ロープと立木を使いハチミツを入れたペットボトルを高さ2 m程度に吊し容易には取れないようにする。ハチミツが減ったら適宜補給する。
- (v) ニオイが拡散するよう、ペットボトルの上部に16カ所以上の穴をあける。雨水侵入防止のため、ペットボトルの上に円盤状のカバーをつける。

(vi) トラップ設置の注意標識および有刺鉄線注意喚起のための標識テープを適宜つける。

トラップ設置に投入した作業量は、2010年度調査が245基の設置に64人日（7.7基/2人組・日）、2011年度が80基の設置に24人日（6.7基/2人組・日）であった。試料採取のためのトラップ見回りに必要な作業量は、トラップ設置場所のアクセス条件により異なったが、平均8.4基/2人組・日であった。なお、調査期間中のヘア・トラップの移動は本調査では行っていない。



図(1)-2 本研究で開発した、ツキノワグマを対象としたヘア・トラップの基本構造（周囲は3 m×3 m、有刺鉄線の地上からの高さは45 cmを基準とする）

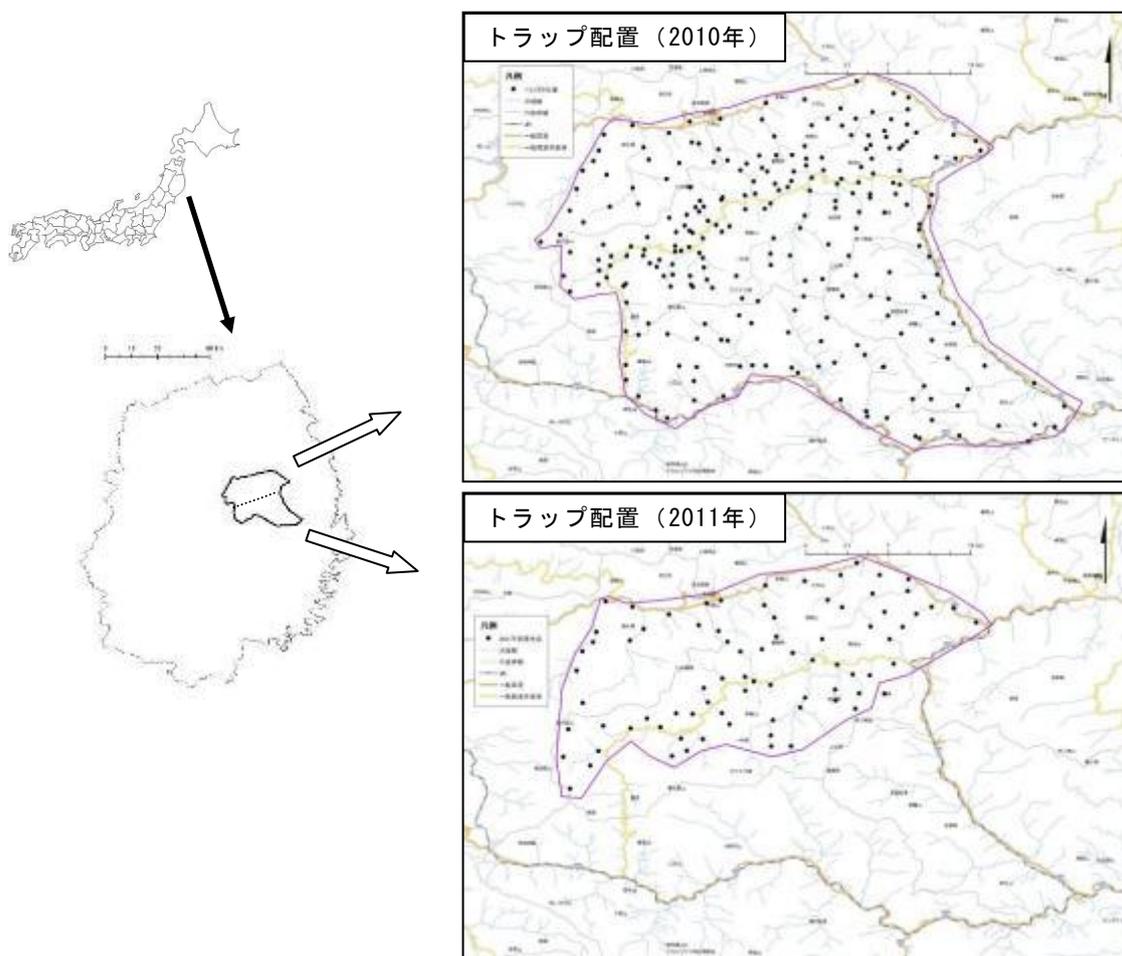
2) ヘア・トラップの空間配置

北上山地モデル調査地において、2010年調査ではヘア・トラップを高密度（1基/km²）と低密度（0.25基/km²; 1基/4-km²）の2通りの密度で計245基を2010年6月6日から6月17日の間に設置した（図(1)-3上）。ただし、地形やアクセス条件により等間隔設置は困難であったため、小地域ごとの実際の設置密度はこの値と少し異なる。トラップ設置位置は配置計画と、現地の植生、地形およびアクセス条件を総合的に判断して決定した。トラップ設置位置の最外周を結ぶ面積は606 km²であった。体毛試料採取は、10日を1セッションとした6セッションの調査を2010年6月20日から8月20日にかけて行った。再現性およびカメラトラップ法との比較に注目した2011年調査では、東日本大震災（2011年3月11日）および2011年1月の大雪による林道のアクセス条件の悪化を受けて、2010年調査地の北半分に相当する336 km²の地域に、低密度（0.25基/km²）で80基のトラップを2011年6月25日から6月28日の間に設置した（図(1)-3下）。この際、ツキノワグマのトラップへの侵入と体毛採取の関係を見るため20基のヘア・トラップには自動撮影カメラを併設した。さらに、10 mから20 mの間において、代替法・補完法調査のための自動撮影カメラを80基設置した。体毛試料採取は、10日を1セッションとした5セッションの調査を2011年7月5日から8月19日にかけて行った。

3) 試料採取と記録

北上山地モデル調査地のヘア・トラップにおける試料採取は、次のような手順で行った。

- (i) 10日を1セッションとして試料回収を行う。
- (ii) 有刺鉄線上の棘毎に（内部対角線を含めた総延長20 mの有刺鉄線には約200の棘がある）異なった試料として採取し、個別に試料封筒に入れて保管する。
- (iii) 試料汚染を防ぐため、試料採取の際は、手袋を着用しピンセットを使用する。
- (iv) 採取できなかった体毛によるその後の試料混在を防ぐため、試料採取後は、試料のあった棘をバーナなどで焼く。
- (v) 採取直後の試料は、雨や露で湿っている状態のものが多いため、簡易乾燥装置により移動中の車内で乾燥化を進める。
- (vi) 試料採取封筒は、乾燥剤を入れたビニール袋内で常温保管し、DNA分析機関へ送付する。試料採取と保管の詳細手順に関しては、「ヘア・トラップ調査マニュアル」に取りまとめた。



図(1)-3 北上山地モデル調査地におけるツキノワグマのヘア・トラップ配置（2010年、2011年）

4) 捕獲記録分析

採取した体毛試料は、DNA個体識別のためDNA班に送付した。DNA班では、*Pid*（調査対象集団が大集団で任意交配している場合に、任意に抽出された異なる2個体が偶然に同一の遺伝子型を持つ確率を表す指標）が低い6つの遺伝子座のマイクロサテライトマーカを用いて個体識別（Genotypeの判別）を、またアメロゲニン遺伝子分析から性判別を行った（詳細はDNA班報告参照）。DNA分析は、4つの機関が並行して実施した。機関間におけるマイクロサテライトマーカの一の分析誤差を最小化するため、標準サンプルによる較正を行うとともに、分析データを持ち寄り、識別個体のすり合わせを行った。体毛試料のDNA分析結果に基づく個体識別と試料の採取記録から、再捕獲に注目した捕獲個体記録分析を行った。捕獲個体記録は、個体数推定法の開発のため、個体群モデル班と共有した。

5) ヘア・トラップ併設カメラトラップ調査

北上山地モデル調査地における2011年のツキノワグマを対象としたヘア・トラップ調査では、ヘア・トラップの利用個体と体毛採取の関係を見るため、80基のトラップのうち20基に自動撮影カメラ（Bushnell Trophy Com XLT）（ヘア・トラップ・カメラ：HTC）を併設した。撮影条件として、ビデオモード（640×480画素）、30秒の動画撮影、撮影後の休止時間を10秒とした。カメラトラップはヘア・トラップの外周全体をカバーできるよう設置した。ヘア・トラップ内部において、体毛採取位置とカメラトラップによる撮影位置の対応をとるため、ヘア・トラップの有刺鉄線外周部を8セクター、内部対角線部を4セクター、計12セクターに区分して、体毛採取と撮影位置を記録した。ヘア・トラップに接近しカメラトラップで撮影されたが、ヘア・トラップ内部に入らなかった場合は、トラップ外撮影として記録した。

（3）ヘア・トラップのヒグマへの適用

1) 定山溪地域におけるヒグマのヘア・トラップ調査

ヒグマを対象としたヘア・トラップ調査において、体毛試料採取率の季節的な変動について検証することを目的として、2010年7月13日から10月17日の約3ヶ月間にわたり定山溪地域において調査を実施した。トラップは1辺約5 mの多角形で、地上約50 cmの高さに有刺鉄線を1段張る構造とし、対角線には張らないものとした。誘引物にはサケの切り身を不織布の袋に入れて利用した。誘引物は立木とロープを利用して地上約3 mの高さに吊るし、クマによって利用されないよう設置した。ヘア・トラップの見回り（体毛の採取と誘引物の交換）はおおよそ10日間に1回とし、次回の見回りまでの期間を1セッションとした。全8セッションの調査を実施し、第1～5セッションについては35基、第6～8セッションについては15基のヘア・トラップを設置した。体毛は有刺鉄線の刺ごとに別々の封筒に回収し、そのそれぞれを1試料とした。

2) 上ノ国地域における自動撮影カメラを併設したヘア・トラップ調査

体毛採取率の季節的な変動をさらに詳しく検証するため、自動撮影カメラを併設したヘア・トラップ調査を実施した。併せて、自動撮影カメラをカメラトラップとして今後利用可能かの評価も行った。2011年7月21日から10月19日の約3ヶ月間にわたり、調査地域内に10基のヘア・トラップを設置した。ヘア・トラップの構造および誘引物は定山溪地域と同様にした。併せて、可能な限

りヘア・トラップ全体が映るよう自動撮影装置（Bushnell Trophy Com XLT、または森林総合研究所北海道支所 YoyShot）を併設した（ヘア・トラップ・カメラ：HTC）。1～2週間で1セッションとし、全10セッションの調査を実施した。体毛試料の回収も定山溪地域調査と同様に行った。

3) 浦幌地域における自動撮影カメラを併設したヘア・トラップ調査

ツキノワグマで開発したヘア・トラップのヒグマへの適用可能性および利用状況と体毛採取の関連を、浦幌地域にて検討した。2011年7月3日から11月27日の約5ヶ月間にわたり、調査地域内に6基のヘア・トラップを設置した。ヘア・トラップはツキノワグマで開発された構造を基本的に用い、体サイズの違いを考慮して有刺鉄線の地上高は約50 cmの一段張（周囲および対角線）とした。また誘引物には、調査地の特性やヒグマの食性、および誘引物の入手しやすさを考慮して^{9) 10)}、骨付シカ肉（一回につき2～3 kg程度）を市販の土のう袋に入れて使用した。ツキノワグマ同様に、誘引物利用の学習効果を避けるため、ロープと立木を使い誘引物を高さ3 m程度に吊し容易には取れないようにした。セッション毎に誘引物を交換または追加した。併せて、ヘア・トラップの利用状況および体毛採取との関連を明らかにするため、可能な限りヘア・トラップ全体が映るようヘア・トラップ・カメラ（HTC）（Bushnell Trophycam XLT、またはRecon Outdoors Extreme 5.0MP）を併設した。

トラップの見回り（体毛の採取と誘引物の交換）は1～4週間に1回とし、一度見回りをしてから次回の見回りまでを1セッションとした（S1～S9）。体毛は有刺鉄線の刺ごとに別々の封筒に回収し、そのそれぞれを1試料とした。なお、誘引物の誘引効果を明らかにするため、トラップ設置後1-2週間程度は誘引物を設置しないプレ・セッション（PS）を設けた。

4) 背擦り木を用いたヘア・トラップ（背擦り木トラップ）調査

ヘア・トラップ法は誘引物を用いた体毛回収法が一般的な方法であるが^{11) 12)}、これに変わる方法として、背擦り木やフェンスなどの構造物を利用したトラップが知られている。すなわち、ヒグマは立木や木製の電柱、フェンスなどへ体を擦りつける行動を頻繁に行うため、こうした構造物に有刺鉄線を巻き付けることで、体毛回収を行う方法である^{13) 14)}。北海道においても浦幌地域では高頻度に背擦り木が分布することが知られており、体毛の回収が試みられている¹⁵⁾。こうした体毛回収トラップの利点としては、誘引物を用いることなく試料が得られること、設置および誘引物交換の労力がほとんどかからないことがあげられる。一方欠点としては分布に偏りが予想されること、背擦り行動を行う個体に偏りがある可能性があること、1本の木に複数個体による繰り返し背擦り行動が行われる可能性があること、地域による背擦り木の分布頻度に違いがある可能性があること^が考えられる。これらの予想されるデメリットを検討することで、簡易ヘア・トラップとしての背擦り木（以下、背擦り木トラップとする）の有効性を評価しておくことは、今後ヘア・トラップ法を広域的に実施していくための一つのオプションとして重要であると考えられる。そこで本研究では、背擦り木トラップを設置し、それをカメラトラップで監視することにより、ヒグマの背擦り頻度、トラップによる体毛回収頻度、トラップ見回り頻度と背擦り頻度の関係、背擦り個体の体サイズによる違いの有無を検討した。

調査地内で、これまで先行研究において発見されていた背擦り木のうち、機材の設置位置や距離などが撮影に適しており、1998年6月～2011年6月までの期間で背擦りの頻度が高かった木を選

び、有刺鉄線を巻き付け、背擦り木トラップとした。さらにトラップを訪問し、背擦りしたヒグマを撮影するために自動撮影装置を設置した。撮影装置はトレイルD55-R（ファームエイジ）、FieldNote DCs700（麻里府商事）、FieldNote II-a（麻里府商事）、Trophycam XLT（Bushnell）を用いた。設置後は約1ヶ月間隔でトラップおよびカメラの点検を行い、体毛の採取状況および映像の撮影状況を確認した。背擦り行動を行う個体の体サイズを推定するため、トラップに地面から50cmごとに目印を付けその場で同機材を用いて撮影を行った。この指標をもとに、背擦りした個体の身長（立ち上がり高さ）を推定した。

4. 結果及び考察

（1）北上山地ツキノワグマ生息状況と捕獲数

北上山地モデル調査地と周辺地域におけるツキノワグマの生息状況資料として、岩手県による生息密度推定結果を表(1)-1に、年度別捕獲数を表(1)-2に、それぞれ奥羽山地の状況とあわせて示した。岩手県⁵⁾によれば、北上山地のツキノワグマ平均生息密度は約0.2頭/km²、狩猟と許可捕獲を合わせた捕獲数は北上山地全域で年間109頭（2004年-2010年平均）となっている。モデル調査地とその周辺に限ると捕獲数は約10頭/年である。

表(1)-1 岩手県奥羽山地と北上山地のツキノワグマ推定個体数と生息密度

地域区分	最小推定(頭)	最大推定(頭)	平均(頭)	生息域(区画数)	生息密度(頭/km ²) ¹⁾
奥羽山地	325	562	448	436	0.159
北上山地	1,018	1,535	1,267	1,081	0.195
合計	1,343	2,097	1,720	1,517	0.189

岩手県（2007）⁵⁾より作成

1)平均生息数を分布面積（生息区画数×600ha）で除した値として求めた。

表(1)-2 岩手県奥羽山地と北上山地別のツキノワグマ捕獲数(頭)（2004-2010年、狩猟と許可捕獲の合計）

年度	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	計
奥羽山地	40	33	143	49	57	66	107	70.7
北上山地	68	91	135	121	97	147	107	109.4
（モデル調査地周辺） ¹⁾	(10)	(11)	(8)	(16)	(8)	(14)	(6)	(10.4)
計	108	124	278	170	154	213	214	180.1

岩手県自然保護課資料より作成

1) 北上山地の内数。モデル調査地を含む国土数値情報2次メッシュ区画で12区画の範囲の捕獲数を示す

（2）ヘア・トラップの構造・配置と試料採取（ツキノワグマ）

1) ヘア・トラップの構造

ツキノワグマとヒグマを対象とした日本国内におけるヘア・トラップでも、さまざまなトラップが工夫されている（表(1)-3）。有刺鉄線囲い型が多いが、山形県では中に体毛採取のためのバネを設置したドラム缶タイプのトラップも試みられた。岩手大学御明神演習林では、ヘア・トラッパーと呼ぶ、樹上設置簡易型トラップが設置された¹⁶⁾。ただし、宮城県で使用された簡易型のトラップは、体毛の採取効率が低かった¹⁷⁾。有刺鉄線の2段張りとは1段張りを比較検討した山形県における調査では、2段張りトラップでの採取効率が低い傾向にあったが明確な差はなかった¹⁸⁾。一方、2段張りとするクマがトラップを忌避する割合が高くなることも示唆されている¹⁹⁾。これ

ら先行研究などからは、有刺鉄線の段数よりも、クマが有刺鉄線をすり抜け体毛を残さずに誘引物に接近することがないよう、(i) 囲い内の内部対角線にも有刺鉄線を設置する、(ii) 有刺鉄線と地面との平行性を微地形にあわせ調整する、ことの有効性が示唆されている。

表(1)-3 国内で使用されたヘア・トラップの構造と誘引物の事例

対象種	タイプ (調査地)	外周有刺鉄線の地上高あるいは構造	誘引物	備考 (出典)
ツキノ ワグマ	1段張り囲い型 (北上)	内部対角線にも有刺鉄線設置	ハチミツ	本研究
	1段張り囲い型 (北上)	地上35-50cmに設置	リンゴ	Miura & Oka 2003 ²⁰⁾
	ヘア・トラッパー(岩手)	樹上設置簡易型	リンゴ	山内 (2009) ¹⁶⁾
	2段張り囲い型 (宮城県)	下段は地上30-50cm、上段は地上50-70cm。一辺3-5m。	蜜蝋	人が立ち入る可能性のあるところ避ける
	簡易型A (宮城県)	小型囲い型 (一辺150cm程度)		民家から1-km以上離す ¹⁷⁾
	簡易型B (宮城県)	幹型：大木幹にバラ線を巻き付ける		
	2段張り囲い型 (山形県)	下段は地上35cm、上段は地上70cm		植生タイプ別に、林道近くに設置 ¹⁸⁾
	1段張り囲い型 (山形県)	地上50cmに設置	ハチミツ	
	バネ式ヘア・トラップ (山形県)	ドラムカンタイプ、中に体毛採取のためのバネ設置		
	1段張り囲い型 (富山県内2カ所)	16番有刺鉄線利用、高さ40~50cm、周囲長8m~16m	ハチミツ	野生動物保護管理事務所 (2007) ²¹⁾
1段張り囲い型 (奈良県)	カメラトラップを併設	ハチミツ	環境省 (2009c) ¹⁹⁾	
ヒグマ	1段張り囲い型 (北海道)	地上50cm、周囲長20-30m	サケ科魚	釣賀 (2008) ²²⁾

2) 北上山地モデル調査地におけるヘア・トラップによる試料採取結果

本研究で開発したツキノワグマを対象としたヘア・トラップを2010年度調査における試料採取率(毛根確認試料採取があったトラップ数/トラップ・セッション数(TS))は、2010年度が22.4%(329トラップ/1,470TS)(表(1)-4)、2011年度が32.5%(127トラップ/400TS)(表(1)-5)であった。有刺鉄線1棘の体毛のまとまりを1試料として区分した採取した試料総数は、2010年調査が2,048試料、2011年が1,120試料であった。ただし、DNA分析段階で1本以上のツキノワグマ毛根が確認された試料数は2010年調査で1,845試料であった(2011年試料については、DNA全数分析を行ってないため毛根のあった試料総数は求めてない)。トラップ・セッション(TS)あたりの平均試料採取率(毛根のない試料を含む)は、2010年調査が1.39試料/TS(2,048試料/1,470TS)、2011年が2.80試料/TS(1,120試料/400TS)であった。DNA分析におけるエラーを低減するための二次サンプリングの基準とした1試料あたり10本以上の体毛があった試料数は、2010年調査が769試料、2011年調査が399試料であった。また、試料採取があったトラップあたりの平均試料数は6.2試料/トラップ(2,048試料/329トラップ)、2011年調査では8.6試料/トラップ(1,120試料/130トラップ)であった。試料採取率およびトラップあたり平均試料数が、2010年に比べ2011年調査で高くなったことの要因は不明である。

トラップ・セッションあたりの採取試料数を指標とした試料採取率は、従来のクマ類のヘア・トラップ調査と比べても高い割合であった(表(1)-6)。また、ヘア・トラップの構造と試料採取位置に注目すると、2010年調査では支柱上で採取された試料を除く1,961試料中1,058試料(54%)が、また、2011年調査では同じく1,152試料中545試料(47%)が、内部対角線の有刺鉄線上で採取された。これらの結果から、本研究で開発した内部対角線にも有刺鉄線を設置したヘア・トラップの構造は採取試料数を増やす上では有効なものと考えられた。また、ツキノワグマを対象と

した場合、今回使用したハチミツ入りのペットボトルを誘引物として空中に吊すことで十分な誘引効果がある判断できた。ただし、クマが支柱の立木に登るあるいはロープを引っ張ることで、空中に吊したハチミツを採食するケースも多くみられた。ヘア・トラップ1基あたりの資機材費の合計金額は約3,300円であった。そのうち有刺鉄線（約2,500円/基）と補助ポール（約600円/基）が費用の多くをしめた。立木を使い補助ポールの使用を減らすと、ヘア・トラップの資材経費を下げることができる。

表(1)-4 北上山地モデル調査地2010年の調査における調査セッション毎のツキノワグマ体毛試料採取

区分	セッション						計
	S1	S2	S3	S4	S5	S6	
試料採取トラップ数（基）	45	43	37	63	59	82	329
採取試料総数*	254	183	208	446	319	638	2,048
体毛数 \geq 10本試料数	105	79	80	141	119	245	769

調査実施：2010年6月20日～8月20日、トラップ数245基（* 全試料数。毛根が確認された試料総数は1,845試料）

表(1)-5 北上山地モデル調査地2011年の調査における調査セッション毎のツキノワグマ体毛試料採取

区分	セッション					計
	S1	S2	S3	S4	S5	
試料採取トラップ数（基）	12	14	29	32	44	127
採取試料総数*	113	157	251	372	227	1,120
体毛数 \geq 10本試料数	42	75	83	155	94	449

調査実施：2011年7月5日～8月19日、トラップ数80基（*DNA分析班による毛根付着確認前の全試料数）

3) トラップ密度と試料採取率

ヘア・トラップ密度に関して、高密度に設置したトラップと低密度に設置したトラップで試料採取率に違いがあるのかどうか分析するために、2010年北上山地モデル調査地において、高密度と低密度で設置したトラップ別の試料採取率を表(1)-7に示した。平均試料採取率はほぼ同じだが、念のため高密度と低密度に設置したトラップ間の平均試料採取率のFisherの正確確率検定を行った。この結果、採取率の差が偶然でも説明できるとする仮説が採択され（P値=0.707）、本研究で採用したトラップ密度の違いでは試料採取率に差をもたらさないことがわかった。

表(1)-6 ヘア・トラップ調査における試料（体毛）採取効率の比較

対象種	対象地域	報告者	採取試料数	トラップ・セッション数(TS)*	試料数/TS	セッション日数
ツキノワグマ	北上山地	本研究(2010年)	2,048	1,470	1.39	10日
	北上山地	本研究(2011年)	1,120	400	2.80	10日
	北上山地	Miura and Oka (2003) ²⁰⁾	247	301	0.82	3週間
	岩手県遠野市	環境省(2005) ²³⁾	957	321	0.68	1ヶ月
	関東山地	WMO (2005) ²⁴⁾	332	1,400	0.13	6～7日
	石川県 ⁶⁾	上馬ら(2006) ²⁵⁾	124	80	0.81	7日
	富山東部	WMO (2007) ²¹⁾	274	200	0.5	7日
	奈良県	環境省(2009c) ¹⁹⁾	31	141	0.08	7日
	福井県	野生動物の会(2007) ²⁶⁾	234	1,260	0.04	7-10日
	ヒグマ	北海道	釣賀(2008) ²²⁾	301	87	1.81
イタリア		Gervasi et al. (2008) ²⁷⁾	61	876	0.03	14日
アメリカ	カナダ	Woods et al. (1999) ²⁸⁾	1548	2653TN*	0.11/TN	Trial 3
クロクマ	アラスカ	Robinson et al.(2009) ²⁹⁾	345	660	0.29	10日

* TS = トラップ数(T)×セッション数(S)、ただし、Wood et al. (1999)はトラップ・ナイト(TN)として示す

表(1)-7 トラップ設置密度と試料採集状況（北上山地モデル調査地2010年調査）

区分	トラップ数	セッション数	試料採取トラップ数 ¹⁾	平均試料採取率 ²⁾
高密度トラップ (1基/km ²)	105	6	142	0.225
低密度トラップ (0.25基/km ²)	140	6	197	0.235

1) DNA分析における試料の毛根付着確認前の値であり、合計数は表(1)-4の試料採取トラップ数とは一致しない

2) 平均試料採取率=試料採取トラップ数/トラップ・セッション数 (TS)

4) セッション別の試料採取率

試料採取の季節変化として、セッション別の試料採取率を検討した。表(1)-4に示すように、2010年試料採取トラップ数は、8月10-20日の第6セッションが最大、7月10-19日の第3セッションで最小であり、7月下旬から8月に試料採取トラップ数が増える傾向が見られた。セッション間（季節間）での試料採取トラップ数に変動があるかどうか調べるために χ^2 検定を行った。その結果、2010年調査においてセッション間で試料採取トラップ数が同じであるとは言えないということがわかった（ $\chi^2=22.4$ 、自由度=5、P値 < 0.01）。表(1)-5に示すように、2011年調査でも、5セッションの調査中、7月25日から実施した第3セッション以降に試料採取トラップ数が増えた。セッション間（季節間）での試料採取トラップ数に変動があるかを調べるため χ^2 検定を行った結果、2011年調査においてもセッション間で試料採取トラップ数が同じであるとは言えないということがわかった（ $\chi^2=25.9$ 、自由度=4、P値 < 0.01）。このように、北上山地モデル調査地におけるヘア・トラップ調査では、2010年、2011年調査とも調査セッション間で試料採取トラップ数の割合に有意な差がみられ、6月から8月にかけての調査では後半のセッションで試料採取率が高いという季節差があることがわかった。試料採取率の季節差の要因分析は今後の課題である。

クマ類とヘア・トラップの出会い確率が、トラップ設置位置の一定のセル内でも偶然性に左右されるとすると、トラップを定期的にセル内で移動すれば試料採取率が向上することが期待できる。北米のヒグマ調査²⁹⁾では、サンプリングのセッション間に、ヘア・トラップ設置単位としたセル内トラップ移動を行った場合、採取試料が増えトラップ固定方式に比べ推定個体数が多くなったこと、特にメスでは15%から25%多く推定されたことを報告している。一方、トラップ移動を行うと作業量が多くなる。特に、トラップ数が多い場合、全トラップを移動するには多くの労力が必要となる。本研究ではトラップのセル内移動は行なわなかった。しかし、調査後半のセッションでも一定の割合で試料採集があったことから、ツキノワグマを対象とした北上モデル調査地に類似した条件の地域においては、トラップのセル内移動がなくてもよいと考えられた。

5) トラップによる試料採集の違い

北上山地モデル調査地の2010年調査における、全調査セッションを通じたトラップあたりの平均試料採取回数は1.38（のべ試料採取トラップ数（339基）/トラップ数（245基））であった（のべ数にはDNA班による毛根付着確認前の試料採取トラップを含む）。しかし、6セッションを通じて1度も試料が採取されなかったトラップが245基のうち90基（36.7%）あった一方、6セッションとも試料採取があったトラップが2基あった（表(1)-8）。トラップ別の試料採取回数の空間分布を見るため、図(1)-4に6セッションをとおしての各トラップの空間配置と試料採集回数を地図上に示した（試料採取回数にはDNA班による毛根付着確認前の試料採取を含む）。試料採取があ

ったトラップは、調査地東部に比べ西部で多かった。調査地全体を北西、北東、南西、南東の4地域に区分し、地域間の試料採取回数についてFisherの正確確率検定を行ったところ、地域間で差があるということが分かった（P値<0.01）。2011年調査における、全調査セッションを通じたトラップあたりの平均試料採取回数は1.59（127基/80基）であった（表(1)-9）。全セッションを通じて1度も試料採取がなかったトラップは80基のうち24基（30.0%）あった一方、2トラップでは5セッションで5回とも試料採取があった。この2011年調査におけるトラップ別試料採取回数の空間分布を図(1)-5に示した。試料採取があったトラップは、2010年と同様に調査地西部に多かった。西部と東部での試料採取率についてFisherの正確確率検定を行ったところ地域間で差があるという結果になった（P値<0.01）。

表(1)-8 北上山地モデル調査地2010年の調査における試料採取トラップ数の頻度分布

	6セッションを通じた試料採取回数						
	0回	1回	2回	3回	4回	5回	6回
試料採取トラップ数*（基）	90	64	42	24	18	5	2

*全トラップ数：245基

表(1)-9 北上山地モデル調査地2011年の調査における試料採取トラップ数の頻度分布

	5セッションを通じた試料採取回数					
	0回	1回	2回	3回	4回	5回
試料採取トラップ数*（基）	24	15	19	11	9	2

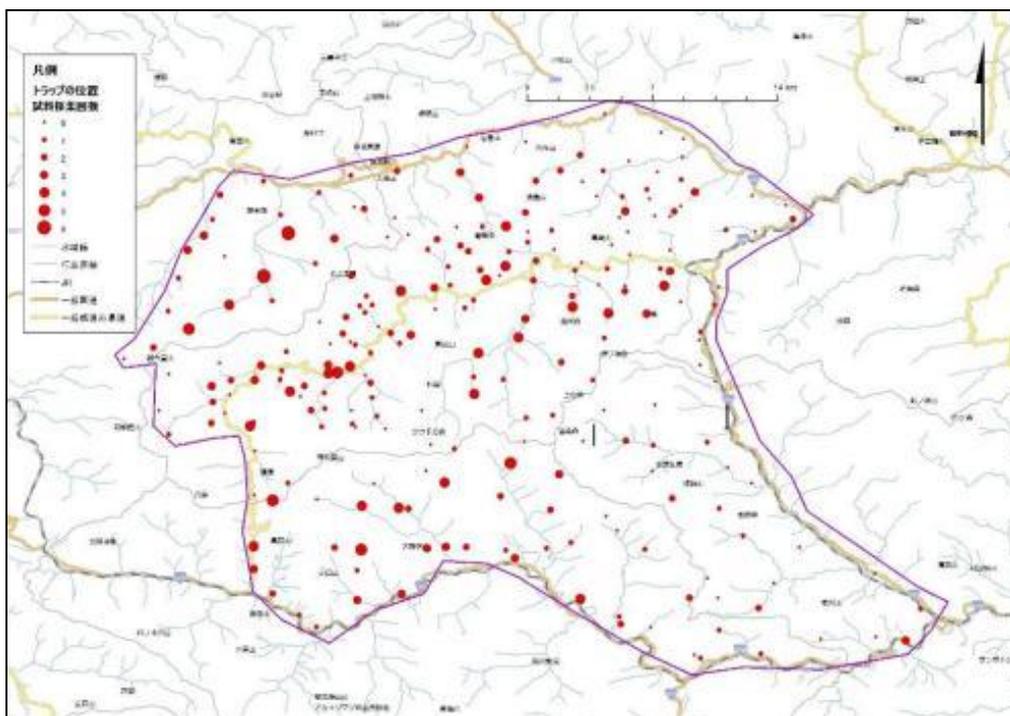
*全トラップ数：80基

6) トラップ設置位置の植生と標高

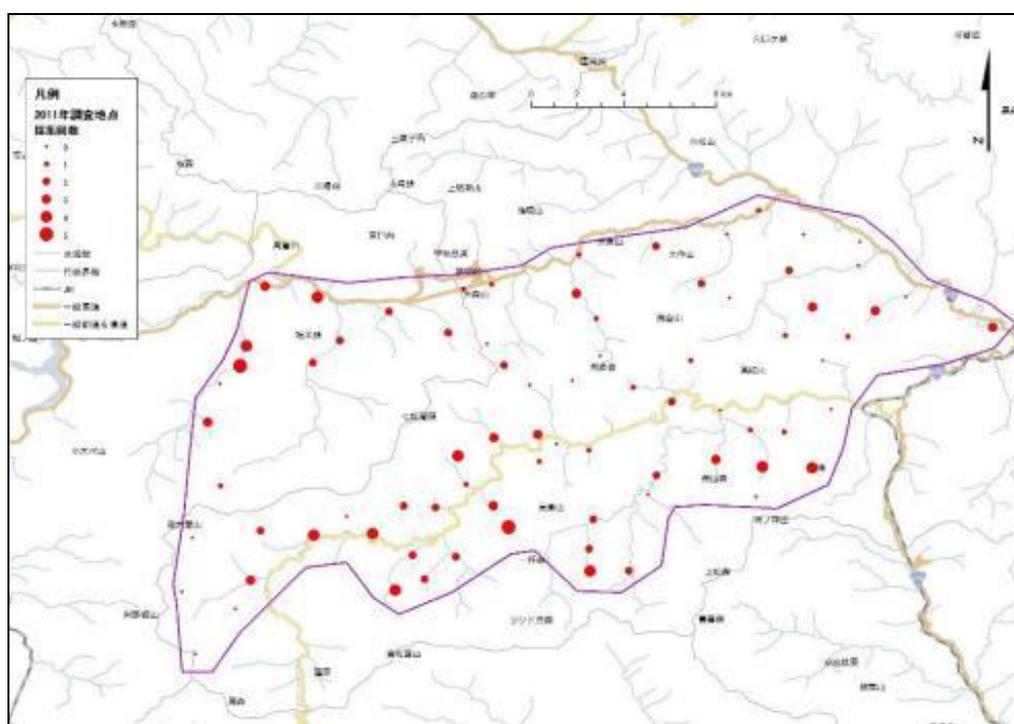
トラップ位置の植生がトラップの試料採取回数に影響しているかを見るため、試料採取トラップと植生の関連を分析した。トラップ設置位置の植生は、現地で落葉広葉樹、落葉針葉樹（カラマツ）、常緑針葉樹（スギ、ヒノキ造林地）の3つに区分した（ただし、植林木へのトラップ影響をさけるため大部分のトラップは各植生区分の中にパッチ状に存在する落葉広葉樹林に設置した）。それぞれの植生区分ごとに採集試料回数に違いがあるのかどうかを2010年と2011年調査結果について分散分析したところ、両年とも植生とトラップ試料採集回数には差がないという結果が出た（2010年:自由度=2、F値=0.49、P値=0.61；2011年:自由度=2、F値=0.17、P値=0.843）（試料にはDNA班による毛根付着確認前の試料を含む）。また、調査セッション間で試料採集トラップの割合と標高に違いがあるかを見るため、年度別に試料採取トラップのセッション間における標高差に注目して分析した。この結果、セッション間で試料採集があったトラップの平均標高に変化があるとは言えないことが分かった（2010年:自由度=5、F値=0.79、P値=0.553；2011年:自由度=4、F値=1.56、P値=0.194）。

7) 試料採取に影響する要因分析

北上山地モデル調査地におけるヘア・トラップごとの試料採取状況の差の要因のまとめとして、試料採取回数を応答変数として、標高のみ、植生のみ、標高と植生、説明変数なし、の4つの説明変数別のAIC（赤池情報量基準）を2010年と2011年調査についてそれぞれ求めた（表(1)-10）。この結果、標高のみを説明変数とした場合にAICが最も低く、植生よりも標高によって試料採取率が影響を受ける可能性が高いことがわかった。



図(1)-4 北上山地モデル調査地2010年調査のトラップ位置とトラップごとの試料採取回数



図(1)-5 北上山地モデル調査地2011年調査のトラップ位置とトラップごとの試料採取回数

表(1)-10 AICによる試料採取率のトラップごとの差の要因分析

説明変数	2010年調査			2011年調査		
	自由度	残差	AIC	自由度	残差	AIC
標高のみ	239	482.8	820.7	75	173.4	290.0
植生のみ	242	522.3	854.2	77	184.6	297.0
標高と植生	237	483.3	824.2	73	172.4	293.0
説明変数なし	244	524.2	852.1	79	185.3	293.9

(3) ヘア・トラップ採取試料のDNA分析に基づく捕獲歴分析（ツキノワグマ）

北上山地モデル調査地における、2010年と2011年のヘア・トラップ調査で採取された試料のDNA分析による識別個体数を表(1)-11に示した。DNA分析は、2010年試料に関しては3区分分析（1試料/トラップ・セッション（TS）、体毛数10本以上の全試料分析、および全試料分析）、2011年試料に関しては、2区分分析を行った（1試料/TSおよび体毛数10本以上の全試料分析）（詳細はサブテーマ2、DNA班報告参照）。2010年調査の試料からは、1試料/トラップ・セッション分析では識別個体として155個体、体毛数10本以上の全試料分析では157個体、そして全試料分析では202個体との結果を得た。2011年調査の試料からは、1試料/TSでは識別個体として60個体、体毛数10本以上の全試料分析では64個体であった。

標識再捕獲法を応用したヘア・トラップ法によるクマ類の個体数推定では、個体別捕獲歴も重要な変数となる。DNA分析エラー率が低い体毛数10本以上の全試料分析結果によるセッション別の識別個体数を、2010年調査について表(1)-12に、2011年調査結果について表(1)-13に示した。表に示すように、後半セッションでも新規捕獲個体数が多く、両年とも累積識別個体数カーブが頭打ちになる傾向は見られなかった。しかし、試料採取トラップ当たりの新規識別個体数の調査セッション別推移を見ると、2010年、2011年調査とも調査後期ほど試料採取トラップ当たりの新規識別個体数は減少した。

表(1)-11 北上山地モデル調査地で採取した体毛試料のDNA分析に基づく識別個体数

試料分析区分	2010年			2011年*		
	分析試料数	分析成功試料数	識別個体数（頭）	分析試料数	分析成功試料数	識別個体数（頭）
1試料/TS	413	258	155	163	109	60
≥10本全試料	769	561	157	399	312	64
全試料	1845	991	202	-	-	-

分析結果の詳細はDNA班報告に示されている（*2012年の全試料分析は実施していない）

表(1)-12 体毛数10本以上の全試料のDNA分析によるセッション別識別個体数（北上山地、2010年）

区分	調査セッション						計
	S1	S2	S3	S4	S5	S6	
1. 分析試料数	105	79	80	141	119	245	769
2. 分析成功試料数	94	57	56	106	94	154	561
3. セッション識別個体数(頭)	37	33	19	34	40	52	215*
4. 新規識別個体数(頭)	37	28	15	26	23	28	157
5. 新規識別/識別個体数	1.00	0.85	0.79	0.76	0.58	0.54	
6. 再捕獲個体数(頭)	-	5	4	8	17	24	58
7. 累積識別個体数(頭)	37	65	80	106	129	157	

* 全セッションを通じたのべ識別個体数

表(1)-13 体毛数10本以上の全試料のDNA分析によるセッション別識別個体数（北上山地、2011年）

区分	調査セッション					計
	S1	S2	S3	S4	S5	
1. 分析試料数	42	72	70	136	77	399
2. 分析成功試料数	39	60	57	104	52	312
3. セッション識別個体数(頭)	15	17	20	29	22	103*
4. 新規識別個体数(頭)	15	16	10	16	7	64
5. 新規識別/識別個体数	1.00	0.94	0.50	0.55	0.32	
6. 再捕獲個体数(頭)	-	1	10	13	15	39
7. 累積識別個体数(頭)	15	31	41	57	64	

* 全セッションを通じたのべ識別個体数

(4) HTC（ヘア・トラップ・カメラ）結果の分析（ツキノワグマ）

北上山地モデル調査地2011年において、ヘア・トラップに併設した自動撮影カメラ（HTC）による、ツキノワグマのトラップ内侵入確認例を図(1)-6に示した。表(1)-14に、2011年調査においてHTCを併設した20基、5セッションの調査による、撮影記録と体毛採取状況を示した。自動撮影カメラの作動不良を除いたのべ91トラップ・セッション（TS）のうち、38TS（41.8%）では、体毛採取、撮影ともなかった。体毛採取がありかつカメラトラップによる撮影は、42TS（33.0%）で記録された。ただし、このうち12TSはトラップ外での撮影であった。体毛採取はあったが撮影記録がないケース、逆に体毛採取はなかったが撮影記録があったケースのように、体毛採取と撮影記録が一致しないケースが計11TS（12.1%）あった。



図(1)-6 ツキノワグマによるヘア・トラップ利用状況（2011年、岩手県北上山地モデル調査地）

体毛採取とカメラトラップによる撮影状況の対応として、ヘア・トラップのセクター別の体毛採取位置とカメラトラップによる撮影位置の対応の分析から、体毛採取があり且つトラップ内での撮影が確認された、30TSにおけるのべ360トラップ・セクター（30トラップ×12セクター）に関して分析した。この結果、体毛採取とカメラトラップの撮影セクターが対応するものが84トラップ・セクター（23.3%）、両方とも記録されなかったものが164トラップ・セクター（45.6%）で、両方をあわせると体毛採取セクターと画像撮影位置セクターは248トラップ・セクター（68.9%）で対応していた。HTCは、トラップに入った多くのツキノワグマはトラップ内で広い範囲を動き回ること、また、撮影イベント数と採取試料数から、同一個体のトラップ内滞在時間が長い場合により多くの体毛が採取される傾向があることを示した。しかし、体毛採取があったにもかかわらず撮影がなかったものが55トラップ・セクター（15.3%）、逆に体毛採取がなかったが画像記録があったものが57トラップ・セクター（15.8%）と、トラップ・セクター別分析では体毛採取位置と画像記録位置は全体の31%で対応しなかった。

代替法・補完法班が開発した胸部斑紋を生体標識としたHTCによるトラップ・セッション（TS）

単位の最小識別個体数と、ヘア・トラップで採取した体毛DNA分析による識別個体数の対応を表(1)-15に示した。画像撮影がありかつ体毛採取があった30TSにおいて、27TSでは30秒単位の画像による最小識別個体数は1頭であった。残りの3TSでは、2頭が2TS、3頭（親子）が1TSにおいて記録された。一方、採取試料によるDNA分析では30TS中4TSで個体識別データを得ることができなかった。HTC画像と体毛DNA分析結果が得られた26TSについて見ると、26例中18例では画像とDNA識別個体数がどちらも1頭で一致した。HTC画像解析では1頭のみでの識別だったが、採取体毛のDNA分析では2頭（4例）あるいは3頭（1例）とより多く識別された事例が5例あった。HTC画像では2頭識別、DNA分析では3頭識別が1例あった。一方、HTC画像では2頭（1例）あるいは3頭（1例）と識別されたが、DNA分析では1頭のみでの事例が2例あった。ただし、HTC画像による3頭の確認例は0歳と推定された2頭の子連れ親子グマであり、子グマは地上45 cmに設定した有刺鉄線の下をくぐり抜けたと考えられた。全体として、HTC画像による個体識別に比べ、同じトラップ・セッションで採取した体毛DNA分析ではより多くの個体が識別された。

表(1)-14 HTCを併設したヘア・トラップにおける体毛試料採取と画像撮影（2011年）

セッション	有効トラップ数	体毛採取・トラップ内撮影	体毛採取・トラップ外撮影	体毛採取・撮影なし	体毛採取なし・撮影成功	体毛採取・撮影両者なし
S1	11	1	2	0	2	6
S2	20	3	3	1	1	12
S3	20	7	4	0	1	8
S4	20	8	2	1	3	6
S5	20	11	1	2	0	6
計	91	30	12	4	7	38
%		33.0%	13.2%	4.4%	7.7%	41.8%

表(1)-15 HTCによるトラップ・セッション単位の最小識別個体数と体毛試料DNA分析による識別個体数

		HTC画像による最小識別個体数			計
		1頭	2頭	3頭	
採取体毛DNA	1頭	18	1	1	20
分析による識別個体数	2頭	4	-	-	4
	3頭	1	1	-	2
	分析データなし	4	-	-	4
	計	27	2	1	30

（5）ヘア・トラップのヒグマへの適用

1）定山溪地域におけるヒグマのヘア・トラップ調査の結果および考察

2010年の全8セッション調査でクマ体毛176試料が採取された。第3セッションを除き、クマ体毛を採取できたトラップの割合は期間を通して一定（20%前後）であった（表(1)-16）。しかし、第1セッションから第8セッションまでを通して設置した15トラップについて見てみると、調査期間の前半で体毛の採取が多かったトラップ（Kan、Zen、KHZ、ToyUなど）と後半でのみ体毛が採取されたトラップ（SRT、Osh、Oma6、NNなど）とが存在し、季節によって利用されるトラップには偏りがあることが示唆された。このことはクマが季節によって利用する環境を変えることと関連があるものと考えられた。例えば、トラップNNはミズナラのほぼ純林の中に位置するため、9月頃からクマの利用が多くなったものと推測される。また、全体として、クマの体毛試料が採取

されたトラップは調査地域の東半分によく偏っていた。この理由は現時点では明らかではないものの、調査地域全体の中でもクマの分布には偏りがあることが示唆された。

表(1)-16 各トラップで回収された試料数, 2010年7~10月, 定山溪地域

HT ID	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8
	7/21-30	8/3-9	8/13-18	8/23-27	9/2-8	9/26-27	10/6-7	10/16-17
Kan	0	0	4	1	0	0	0	0
Zen	18	0	0	5	0	0	0	0
SRT	0	0	0	0	0	0	0	9
KHZ	4	1	0	1	0	0	0	0
Ten	0	5	0	0	0	0	0	1
Ota	0	11	0	0	4	0	0	0
Kob	2	0	0	0	0	0	0	0
Osh	0	0	0	0	0	1	0	3
Usu	0	1	0	0	0	0	0	0
HiyM	0	0	0	0	0	4	1	0
SRM	0	0	0	0	0	0	0	0
ToyU	4	0	5	2	0	0	0	0
Oma6	0	0	0	0	0	0	0	7
NK1	0	1	0	0	2	0	4	0
NN	0	0	0	0	0	13	1	0
Asa	0	1	0	0	0	-	-	-
May	12	0	0	0	0	-	-	-
Nam	0	0	0	0	0	-	-	-
SIK	0	0	0	0	0	-	-	-
TNG	0	0	0	0	0	-	-	-
Tom	0	0	0	0	0	-	-	-
HyaM	0	11	0	0	12	-	-	-
Hor	0	0	0	0	0	-	-	-
Kot	0	0	0	0	7	-	-	-
Ban	0	0	0	1	0	-	-	-
NKR	0	0	0	2	0	-	-	-
Num	0	0	0	0	0	-	-	-
Omi	2	0	0	0	0	-	-	-
Ohu1	2	0	0	0	7	-	-	-
KitT	0	0	0	0	0	-	-	-
OkIz	0	0	0	0	0	-	-	-
Ohu6	0	0	0	1	0	-	-	-
NK12	0	0	0	0	0	-	-	-
OkJ	0	0	0	0	3	-	-	-
Iza	0	0	0	0	0	-	-	-
試料数 合計	44	31	9	13	35	18	6	20
体毛試料あり HT数/ 全HT数	7/35	7/35	2/35	7/35	6/35	3/15	3/15	4/15

-: トラップを設置しなかったセッション

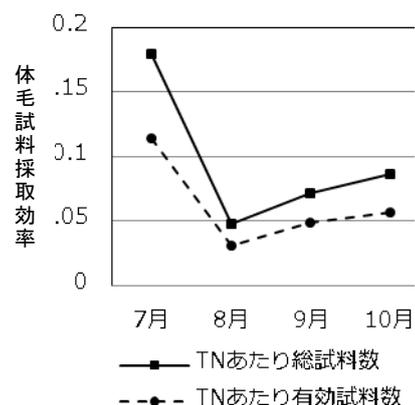
ヒグマを対象としたヘア・トラップ調査における体毛試料採取効率を以下のように評価した。第1~5セッションと第6~8セッションとは設置トラップ数が異なること、各セッション間隔は少しずつ異なることを考慮し、各セッション間隔（日数）と設置トラップ数を掛け合わせたものをトラップナイト（TN）として、総試料数と有効試料数（1本以上の毛根が確認された試料数）をそれぞれTNで除して体毛試料採取効率を求めた。その結果、サンプル全体の採取効率も有効試料の採取効率も同様の傾向を示し、7月が最も高く、8月で急激に低下した後、9月・10月で徐々に回復した（図(1)-7）。このことから、効率的な試料採取に適した時期は7月頃であることが示唆さ

れた。しかしながら、体毛試料が採取できなかったトラップについては、クマが利用しなかったために体毛試料が採取されなかった場合と、クマが利用したにも関わらず有刺鉄線に触れず試料が採取されなかった場合とが考えられる。トラップの設置方法を評価するためには、クマが利用したトラップで確実に体毛試料を採取できているかどうか、自動撮影カメラを用いて検証する必要があるだろう。

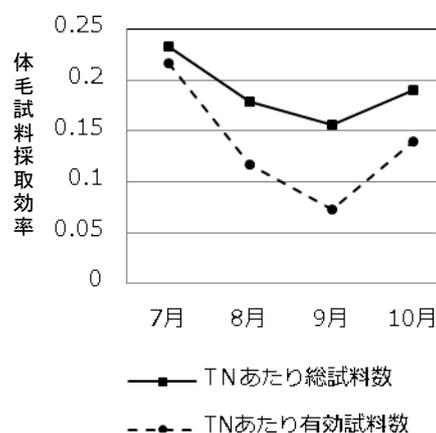
2) 上ノ国地域におけるヒグマのHTC（ヘア・トラップ・カメラ）結果の分析

2011年の全10セッション調査で157試料が採取された。試料数は第2セッション（7月下旬～8月上旬）、第8・9セッション（9月中旬～10月中旬）で多かった（表(1)-17）。自動撮影カメラによる撮影結果と体毛試料採取の有無とを比較したところ、クマが写っていても体毛試料が採取できなかったトラップや、体毛試料が採取されても自動撮影装置にクマが写っていないトラップがあった。1セッション1トラップを1トラップセッション（TS）として、TSごとに写真および体毛試料の有無を集計した結果、10トラップ×10セッション＝100 TSのうち、37TSで写真が撮影され、そのうち34TSにおいて、クマがトラップ内に進入したことを写真で確認した。クマがトラップ内に進入した34TSのうち、28TS（82.4%）で体毛試料が採取されたことから、クマがトラップに進入した場合は、概ね体毛試料の採取に成功していたと考えられた。また、体毛試料採取効率を定山溪地域と同様にして求めたところ、7月が最も高く、8・9月で低下し10月で回復した（図(1)-8）。特に9月では、毛根のある試料が総試料数の半分程度しかなく、試料採取効率は低い結果となった。これらのことから、ヒグマのヘア・トラップ調査において効率的に体毛試料を採取できる時期は7月であることが示された。また、定山溪地域と同様に、調査期間後半に初めて体毛試料が採取されたトラップ（151、GG）や、調査期間の前半によく採取されて後半には採取されなくなったトラップ（KAT、IM）が見られ、クマが季節によって行動圏面積や利用環境を変えることを反映したものと推察された。つまり、個体数モニタリング調査を実施する際には、季節による行動変化の影響を考慮した調査デザインを構築する必要性が示された。

クマが進入したトラップでは概ね体毛試料の採取に成功していたが、確実に体毛試料を採取するため、写真によりクマの進入が確認されたにも関わらず体毛が採取されなかった6TSについてその原因を考察した。自動撮影の結果を精査したところ、体毛試料が採取できなかった原因として考えられたのは、ヒグマの体サイズの問題と、ヘア・トラップ立地の問題であった（表(1)-18）。



図(1)-7 定山溪地域における調査月別体毛試料採取効率, 2010年7～10月.



図(1)-8 上ノ国地域における調査月別体毛試料採取効率, 2011年7～10月.

ヒグマはツキノワグマと比較して体サイズのバラツキが大きく、有刺鉄線1段張りでは小型の個体から大型の個体までをカバーすることは困難であることが示唆された。

表(1)-17 各トラップで回収された試料数と自動撮影写真の有無（2011年7～10月、上ノ国地域）

HT ID	S1		S2		S3		S4		S5		S6		S7		S8		S9		S10	
	hair	photo	hair	photo	hair	photo	hair	photo	hair	photo	hair	photo	hair	photo	hair	photo	hair	photo	hair	photo
IM	2	x	1	x	0	x	1	o	0	x	6	o	0	x	0	x	0	x	0	x
OIK	9	x	2	o	0	o	0	x	0	x	0	x	2	o	1	x	0	x	0	x
GG	0	x	0	x	0	x	0	x	0	x	0	x	0	x	9	o	7	o	1	o
GS	0	x	17	o	0	o	0	x	0	o	0	x	0	x	6	o	20	o	1	o
151	0	x	0	x	0	x	0	x	0	x	0	x	0	x	4	o	0	x	0	x
OG	0	x	3	o	0	o	0	x	0	o	4	o	2	o	0	x	4	o	2	o
SK	0	x	4	o	1	x	0	x	0	x	0	x	0	o	0	x	2	x	0	x
KAT	3	x	1	x	3	o	0	x	0	x	0	x	0	x	0	x	0	x	0	o
DO	0	o	8	o	1	o	3	o	0	x	5	o	1	x	1	o	0	x	0	x
UT	0	o	0	o	1	o	4	o	2	o	0	x	5	o	7	o	1	o	0	x
試料数 合計	14		36		6		8		2		15		10		28		34		4	
体毛試料あり HT数	3		7		4		3		1		3		4		6		5		3	

hair: ヘア・トラップによって採取された試料数
photo: 自動撮影によるヒグマ撮影の有無

表(1)-18 クマがトラップ内に進入したが体毛試料のなかったトラップ・セッションとその理由（推定）

セッション	HT ID	写真および現地状況から推定された理由
3	OIK	個体が大きく、有刺鉄線に触れずにまたぐことができた
3	OG	ガレ地で地面の凹凸が多いトラップサイトだったため、進入しやすい部分からトラップ内に進入できた
5	GS	個体が小さく、有刺鉄線に触れずにくぐることができた
5	OG	個体が小さく、有刺鉄線に触れずにくぐることができた
7	SK	個体が大きく、有刺鉄線に触れずにまたぐことができた
10	KAT	個体が小さく、有刺鉄線に触れずにくぐることができた

トラップ内への進入が確認された34TSのうち、複数個体によって利用されたのは8TSであった（表(1)-19）。したがって、複数個体による同一TS利用の割合は8TS / 34TS（23.5%）であった。この結果から、1TSにおいて複数個体の同一トラップ利用による体毛試料のコンタミネーションが一定の割合で起こる可能性があることが示された。ただし、今回は独立した撮影イベントをすべて別個体としており、実際はこの中に同一個体による複数回の訪問も含まれている可能性がある。コンタミネーションについて厳密に評価をするためには、画像による個体識別が必要であるが、現状では困難である。

体毛試料が採取されたTSは全部で39TSであり、うち自動撮影されなかったのは10TSであった。一般に、自動撮影されない理由としては、インターバル間隔が長いこと、カメラの感度が低いこと、センサー反応範囲が狭いことなどが考えられる。今回のカメラの設定は、インターバルを10秒とした。撮影イベントは全部で58イベントであったが、そのほとんど（50イベント: 86.2%）で複数枚撮影されていた。したがって、今回の設定ではインターバルの間に動物が通り過ぎてしまった可能性は低かったものと推定された。一方で自動撮影されなかった10TSには、体毛試料採取位置がカメラから最も遠い箇所であった、画角の外であったなどの共通点が見られた。今回撮影されなかったイベントに関しては、カメラの設置方法の問題であり、カメラの角度や距離等を適切に調整することで、ほとんどの訪問は撮影可能であると考えられた。このことから、ヘア・ト

ラップの構造と体毛試料採取の有無との関係や、コンタミネーションの有無の確認などに、カメラトラップは有用である可能性が示された。その一方で、外見上ヒグマを個体識別するには体格と体色のバリエーションを利用する方法が考えられるが、夜間の撮影では体色を把握できない。したがって、現時点では自動撮影結果を利用して個体識別をすることは困難であり、カメラトラップはヘア・トラップの代替法としては適さないと考えられる。ヒグマにおけるカメラトラップの活用方法は、ヘア・トラップの捕捉効率確認など、他調査の補助的な役割を担うことが現状では適当であると考えられる。

表(1)-19 同一TS内における複数個体の訪問数とその内訳

セッション	HT ID	のべ進入個体数	撮影イベント数と個体内訳
2	GS	2	親子1
6	IM	3	単独3
7	OIK	2	単独2
	UT	6	親子2
8	GG	2	単独2
	UT	3	親子1、子1
9	GG	6	単独4、兄弟？1
10	OG	2	単独2

3) 浦幌地域におけるヒグマのHTC（ヘア・トラップ・カメラ）結果の分析

調査の結果を表(1)-20に示した。誘引物を設置しないプレ・セッションでは、どのトラップからも体毛は採取されず、またトラップ内に侵入した映像も確認されなかった。トラップ付近を通り過ぎるヒグマの映像が1箇所を確認されたが、トラップには関心を示していなかった。このことから、トラップのみの設置によるクマの誘引はないものと考えられた。ただし、今回は誘引物を用いたセッションの前段に1回のみ実施しており、後述するように後半のセッションになるほど捕捉率が上昇することから、今後も継続的な検討が必要である。全9セッションにおいて、延べ有効トラップ数は38、体毛採取成功トラップ数は15、映像撮影成功トラップ数は10トラップ、採取できた体毛サンプル数は112だった。

表(1)-20 各トラップで回収されたサンプル数と自動撮影写真の有無(2011年7月～11月, 北海道東部浦幌地域)

トラップ名	PS(no baits)		S1		S2		S3		S4		S5		S6		S7		S8		S9	
	hair	photo	hair	photo	hair	photo	hair	photo	hair	photo	hair	photo	hair	photo	hair	photo	hair	photo	hair	photo
LP	0	x	0	x	0	x	13	o	0	x	6	o	0	x	2	x	—	—	14	x
ST	0	x*	0	x	0	x	0	x	0	x	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
19	0	x	0	x	0	x	0	x	0	x	—	—	3	o	4	x	—	—	17	x
TZ	0	x	6	x	0	x	0	x	0	x	0	x	0	x	—	—	—	—	28	o
PS	0	x	—	—	—	—	—	—	8	o	0	x	0	x	2	o	2	o	3	x
PN	0	x	—	—	—	—	—	—	0	o	2	o	0	x	2	o	0	x	0	x
成功数	0	0	1	0	0	0	1	1	1	2	2	2	1	1	4	2	1	1	4	1
体毛サンプル数	0		6		0		13		8		8		3		10		2		62	

—: 試験実施せず

*: 付近を通り過ぎるヒグマの映像あり

体毛が採取されているのに、映像が得られない事例が5例見られた（表(1)-20）。これには、トラップ全体を撮影するために距離を離れた結果フラッシュが届かずに撮影できなかった場合（2例）、カメラの動作不良（3例）があった。体毛採取成功トラップ数よりも映像撮影成功トラップ数の方が低かったことから、機器の不具合がありえる自動撮影よりは、ヘア・トラップの方が安定した試料採取が可能であると考えられた。ヒグマの場合、映像だけから個体識別することは困難であり、カメラトラップだけでヘア・トラップの代替法とするのは現段階では無理であろう。

逆に映像は確認されたが体毛が採取されなかった事例が1例見られた（9.1%、S4-PN）。映像から、当歳子1頭がトラップ内に侵入している様子が確認された。1段張りの有刺鉄線をくぐっていた。また大型個体がトラップ内に侵入した場合、一段張りの有刺鉄線をまたいでしまい、採取された体毛試料数が少ない事例も見られた（S8-PS）。このことから、（前節に示した上ノ国地域における試験結果と同様に）有刺鉄線一段張りでは、小型個体から大型個体までをカバーすることは困難であることが示唆された。

ヘア・トラップ構造として、ツキノワグマの試験と同様に、外周と対角線に有刺鉄線を設置した。体毛が捕捉された延べ15トラップのうち、外周と対角線の両方で捕捉されたのは延べ10トラップ、外周のみで捕捉されたのがのべ4トラップ、対角線のみで捕捉されたのが1トラップ（6.7%）だった（表(1)-21）。試料数で見ると、全112試料のうち、外周で捕捉されたのが77試料、対角線で捕捉されたのが35試料であった。対角線のみで体毛捕捉された割合は小さかったことから、外周のみでも体毛捕捉には支障がないと考えられた。ただし試料数で見ると約3割が対角線で採取された試料となることから、分析成功率を上げるための保険としては、対角線も有効であると考えられる。さらに、以下に示すように1TS内で複数個体が利用することを考えると、対角線にも有刺鉄線を設置するなど有刺鉄線距離を長くした方が試料数が増加し、1頭だけの毛を残した試料が採れる可能性が高くなると考えられる。

表(1)-21 ヘア・トラップにおける体毛捕捉位置

セッション	トラップ	採取サンプル数	
		外周	対角線
S1	TZ	4	2
S3	LP	5	8
S4	PS	8	0
S5	LP	0	6
	PN	2	0
	19	3	0
S7	LP	2	0
	19	3	1
	PS	1	1
	PN	1	1
S8	PS	1	1
	LP	11	3
S9	19	12	5
	TZ	23	5
	PS	1	2

HTCで映像が撮影された10トラップ・セッション（TS）のうち、複数個体のトラップ内侵入が確認されたのは、4TS（40%）と高い割合を示した。その内訳は、親子連れが3例、兄弟が1例であ

った(表(1)-22)。複数個体がトラップ内に侵入する際の通過場所は同じことが多かった。ヘア・トラップで採取された体毛を用いてDNA解析による個体識別を行う際には、1TSあたり1試料の分析では、トラップ侵入個体数を過小評価する可能性が高いと考えられる。

今回の試験では、セッション間隔を変えて、誘引期間と体毛捕捉率との関係を検討した。その結果、セッション間隔と体毛捕捉率には有意な関係は見られなかった($r = 0.314$ 、 $P = 0.411$)。一方セッション回数と体毛捕捉率には有意な正の相関が見られ、9月下旬以降に体毛捕捉率が高くなることが示された($r = 0.726$ 、 $P = 0.027$)。この原因として、浦幌地域では7-8月にはヒグマが農地や集落付近をよく利用しており、有害捕獲が多く行われていること、秋になると森林内にヒグマが戻ってくることが関係していると思われた。ただし、セッション日数、セッション実施時期を説明変数とした重回帰分析では有意なモデルは得られなかった($R^2 = 0.548$ 、 $P = 0.092$)。この関係を明らかにするためには、セッション日数と実施時期の組み合わせを増やした検討をする必要がある。

表(1)-22 同一TS内における複数個体の訪問数とその内訳

セッション	トラップ	延べ侵入個体数	撮影個体内訳
S3	LP	2	1才兄弟
S4	PS	2	1才1頭連れ親子
S6	19	3	0才2頭連れ親子
S9	TZ	5	0才2頭連れ親子, 1才1頭連れ親子

4) 背擦り木トラップ調査の結果

浦幌地域において、2011年4月30日～2011年10月9日の期間に調査を行った。調査対象木として10本を選び、有刺鉄線を巻き付けて背擦り木トラップとした。さらにトラップを訪問し、背擦りしたヒグマを撮影するために自動撮影装置11台を設置した(表(1)-23)。なお、撮影は調査期間中連続して行ったが、カメラ不具合などによる無効撮影期間が生じた。

調査対象木10本で確認された背擦り頻度を、有刺鉄線上の体毛確認回数および自動撮影装置による映像確認回数として示した(表(1)-24)。背擦り木トラップ10本中6本で延べ13回の体毛付着を確認した(図(1)-9)。最も多く体毛付着を確認できたのは、ID3とID0801の3回だった。また自動撮影装置による映像として確認された背擦り行動は、3本の木について延べ6回だった(図(1)-10)。



図(1)-9 背擦り木トラップに付着したヒグマの体毛



図(1)-10 背擦りをするヒグマ

表(1)-23 各撮影対象木における設置期間と撮影機材についてのまとめ。

木ID	樹種	胸高直径 (cm)	背擦り確認 初年度	設置 日	機材名	機材 交換日	機材名	回収 日	有効撮影期間
ID3	トドマツ	45	1998	4/30	トレイルD-55			10/6	4/30-10/6
ID63	トドマツ	49	1998	5/2	トレイルD-55			10/6	5/2-10/6
ID153	トドマツ	48	1999	4/30	FildNoteDCs700	8/27	TrophycamXLT	10/6	4/30-7/4, 7/17-30, 8/12, 8/27-10/6
ID202	トドマツ	37	2002	4/30	トレイルD-55	8/27			4/30-10/6
ID227	トドマツ	17	2003	4/30	FildNoteDCs700	8/27	TrophycamXLT	10/6	4/30-7/30, 8/12-16, 8/27-10/6
ID205	アカエゾ マツ	23	2000	5/2	トレイルD-55	9/8			5/2-10/9
ID244	トドマツ	28	2005	4/30	トレイルD-55	8/27			4/30-10/6
ID258	トドマツ	31	2005	6/5	FildNote II-a	8/27	TrophycamXLT	10/6	6/5-7, 6/19-7/4, 7/16-10/6
ID801	トドマツ	58	2008	6/6	FildNoteDCs700	9/4	TrophycamXLT	10/8	6/6-7/1, 7/18-8/12, 9/4-10/8
ID110	アカエゾ			5/5	FildNoteDCs700	9/9	TrophycamXLT	10/5	5/5-7/2, 7/17-10/5
504B	マツ	21	2011	6/6	FildNote II-a			9/9	6/6-10/5
M-3B									

背擦り行動は、有刺鉄線上の体毛付着として確認された回数の方が、映像によって確認された回数よりも多かった。以下に体毛付着は確認されたが映像が確認されなかった事例を個別に検討していく（表(1)-24）。調査対象木ID3の1回目、ID258の1回目、ID801の2回目に体毛付着した背擦り行動の3例については、背擦り行動が行われた期間中に背擦り行動以外のクマの映像が撮影されていること、この期間中にカメラのバッテリー切れやメモリーカード容量不足はなかったことから、背擦り行動にいたる以前の活動が撮影された後の待機時間中に背擦り行動が行われた事例と判断した。ID3における2、3回目、ID63における2、3回目、ID801における2回目に体毛付着した背擦り行動については、カメラの動作不良による無効撮影期間であったためである。

背擦り行動を利用したモニタリングとしては、映像による確認よりも体毛付着確認の方が多くのイベントを観察できることが考えられた。ただし、背擦り木トラップ周辺におけるヒグマの確認回数では、背擦り以外の行動を含め47件あり、個体識別はできないものの、ヒグマの存在確認という点では、映像の方が多くのイベントを記録することができた。

映像により確認された6回の背擦り行動は、5～7月に多く確認された（表(1)-24）。この季節はヒグマの繁殖期に一致する³¹⁾。今回確認された背擦り行動のピークは、先行研究で体毛付着から確認された事例¹⁵⁾と一致し、また海外での報告例とも一致する^{32) 33)}。この行動は繁殖期の個体間コミュニケーションに役立っていると考えられている³²⁾。

撮影された6回の背擦り映像から、ヒグマの後肢立ち時の身長を推定した。その結果6回の全てが2 m以上の大型個体によるものであり、2 m以下の個体の背擦り行動は本研究では撮影されなかった。後肢立ち時の身長が2 mを超えることから、これらは全て成獣オスであると考えられる^{34) 10)}。なお、背擦り行動以外で撮影された映像からは、2 m以下の小型個体と推定された個体も撮影された(13回中5回)。このことから、背擦り行動はオス成獣に偏った行動であり、個体数推定や個体群動態モニタリングのための体毛回収法としては、従来のヘア・トラップ法よりも劣る可能性がある。ただし、頻度は低下するものの繁殖期以降にも背擦り行動が観察されること、この季節にはメスの体毛付着も確認されているとの報告がある^{35) 36)}。今回の試験では評価できなかったが、今後の継続試験が必要であろう。

今回の試験では、約1ヶ月間隔での見回りを行った。体毛付着確認ができ、かつ自動撮影装置による撮影が有効だった事例5回のうち、4回は、1回だけ背擦り行動が確認された。しかしID0801の1回目については、6月9日と6月23日の2回の別個体による背擦り映像が確認された。このことは、背擦り木トラップにおいても、複数個体からのサンプルを区別できずに回収してしまう危険があることを示している。繁殖期においては特に高頻度に背擦り行動が行われるため、1ヶ月に1回程度の見回りではコンタミネーションのリスクがあることを考慮しておくべきであろう。見回り頻度を上げるか、または繁殖期以外にサンプリングを行う必要がある。

表(1)-24 背擦り木トラップにおけるヒグマの体毛付着確認事例と自動撮影装置による背擦り行動確認事例、北海道東部浦幌地域，2011年4-10月

背擦り木トラップ	トラップあたり体毛確認イベント数	体毛付着期間	映像による背擦り行動の確認	備考
ID3	1	5/8-6/5	—	背擦り行動以外のクマ画像3回(5/14, 5/21, 5/26)
	2	6/5-6/11	—	無効撮影期間(カメラ動作不良)
	3	6/11-6/18	—	無効撮影期間(カメラ動作不良)
ID63	1	7/3-7/18	—	無効撮影期間(カメラ動作不良)
	2	7/18-7/31	—	無効撮影期間(カメラ動作不良)
ID227	1	5/8-6/18	1回(6/7)	背擦り行動以外のクマ画像1回(6/12)
	2	7/5-7/31	1回(7/26)	
ID258	1	6/5-6/18	—	背擦り行動以外のクマ画像1回(6/7)
ID0801	1	6/6-7/2	2回(6/9, 6/23)	背擦り行動以外のクマ画像6回(6/12, 6/18, 6/22, 6/23, 6/25, 6/30)
	2	8/13-9/4	—	無効撮影期間(カメラ動作不良)
	3	9/4-10/8	1回(9/13)	背擦り行動以外のクマ画像1回(9/29)
ID110504BM3	1	5/5-6/3	1回(5/31)	
	2	6/3-6/19	—	背擦り行動以外のクマ画像2回(6/7, 6/8)

(5) まとめ—本研究で開発したヘア・トラップの評価

1) ツキノワグマ

北上山地モデル調査地において、ツキノワグマを対象として本研究で開発したヘア・トラップの構造および誘引物は、試料採取率が高いことから今後のヘア・トラップ調査において標準的手法となりうるものとする。ヘア・トラップ調査に必要な作業量(人日)は、調査地へのアクセス条件、トラップ設置密度および採取試料数に大きく左右されるが、北上山地モデル調査地における、トラップ設置効率は2人1組で作業を行った場合で7基~8基/2人組日、試料採取の見回り効率は8基~10基/2人組日、が標準的な作業効率見積となると考える。調査セッション数は5セッション(1セッション10日)程度でも十分であるが、ツキノワグマの体毛試料を効率的に採取するには、夏期(7-8月)を調査セッションに組み入れることが重要である。また、面積600 km²程度の調査地でも、その内部で生息地利用密度には局所的差があることを前提とした調査設計とする必要がある。一方、ヘア・トラップ設置位置の植生、標高、および設置密度が0.25基/km²(1基/4-km²)以上であれば、これらの要因は試料採取率に影響しないと考えられた。また、ヘア・トラップの空間配置に関しては、個体群モデル班により開発された、ベイズ空間明示標識再捕獲モデルにより、トラップを等間隔で配置しなくても十分な精度をもった推定が可能である。ただし、トラッ

プ設置密度などは、先行調査および調査地における再捕獲個体の捕獲位置から、調査地ごとに検討するのが望ましい。

ヘア・トラップに併設したヘア・トラップ・カメラ（HTC）記録と採取試料のDNA分析から、同一個体のトラップ内滞在時間が長い場合により多くの体毛が採取される傾向があること、一方、この時に採取された体毛によるDNA識別個体においても同一個体と判別されたケースが多いことから、同一トラップ・セッションにおいて大量の体毛が採取された場合、全試料分析の必要性は少ないことを示唆している。また、画像撮影はヘア・トラップに入った同一のクマ個体はトラップ内で広い範囲を動くことを示し、トラップ・セクター別に分析対象体毛を抽出する必然性も少ないことを示唆している。サブテーマ1の本研究のみで、ヘア・トラップで採取した試料のうち、サブサンプリングとしてどれだけの試料数どのように選定して分析することが妥当かの明確な結論を示すことは困難である。サブサンプリングの方法は、DNA分析結果とあわせて検討する必要がある。しかし、サブテーマ1の研究からは、同一セッション・トラップにおいて大量の体毛試料が採集された場合、全試料分析の必要性は少ないと結論づけられる。

2) ヒグマ

ヘア・トラップのヒグマへの適用については、3地域の試験から、基本的にはツキノワグマで用いているヘア・トラップ構造でも良好な結果が得られることが確かめられた。ただし、ヒグマ独自の問題点として、体サイズのバラつきが大きいことから、トラップ内に侵入しているにもかかわらず、体毛が捕捉できない、または採取試料数が少ない例が見られた。体毛捕捉率および採取試料数を上げるためには、有刺鉄線を上下2段張りにするなど構造上の工夫が必要であろう。また調査地域の特性と、それに応じたヒグマの生息地利用パターンにより、ヘア・トラップの利用には季節変化が見られた。調査対象地域のヒグマの生態に関する情報を考慮した調査時期やトラップ設置位置の工夫が必要であろう。カメラトラップに関しては、確実な個体識別ができないためにヘア・トラップの代替法とはなり得ないが、ヘア・トラップにおける訪問個体数の把握、成獣と幼獣の区別、一腹産子数など、DNAによる個体識別では得ることのできない情報を得ることができ、両方の方法を併用することにより、補足的に重要な役割を果たすことができると考えられた。

また、背擦り木トラップに関しては、体毛回収が可能であることは確認されたが、背擦り行動には季節性があり、繁殖期にオス成獣によって行われる例が多いことが確認され、体毛回収トラップとしてはモニタリング対象に偏りが生じる可能性が示唆された。また体毛見回り期間を1ヶ月とすると、1本の背擦り木トラップに複数回の背擦り行動が行われる事例が確認されたことから、見回り頻度を上げるか、繁殖期以外にサンプリングを行うなどの工夫が必要であると考えられた。従来のヘア・トラップ法と比べ設置や維持管理が容易な背擦り木トラップは、これらの欠点を考慮した上で、利用が検討されるべきだろう。

5. 本研究により得られた成果

(1) 科学的意義

ツキノワグマを対象とした場合、本研究で開発したハチミツを誘引物とし、内部対角線をもつ有刺鉄線1段張りの簡便なヘア・トラップ体毛試料の採取効率は高く、体毛DNA分析による個体

数推定に必要な試料を採取できることがわかった。トラップ地点ごとに試料採取効率に差があるが、北上山地の事例ではトラップ設置密度が0.25基/km² (1基/4-km²) 以上であれば、トラップ密度による試料採取効率に差は少ない。試料採取率は7月下旬から8月下旬が高い。

ヒグマに関する広域的な検討はできなかったが、ツキノワグマで開発されたヘア・トラップで十分な体毛が採取できることが確認された。ただし、ツキノワグマに比べると幼獣から成獣まで体サイズにばらつきが大きいため、体毛捕捉率および採取試料数を上げるためには、有刺鉄線の2段張りなどの工夫が必要であることが分かった。

(2) 環境政策への貢献

本調査で開発したトラップ構造と設置方法は、簡便で試料採取率も高いことから、今後、地方自治体によるツキノワグマのヘア・トラップ調査の標準法となることが期待できる。岩手県におけるヘア・トラップ調査では、本研究の成果が応用されている。

研究成果を自治体等が利用する際の参照とするため、下記のマニュアル・手引きを作成した。統合版マニュアルは、都道府県鳥獣保護部局へ配布した。また、ウェブサイトで電子版マニュアルを提供した。

- クマ類の個体数を調べる：ヘア・トラップ法とカメラトラップ法の手引き（統合版）（印刷配布）
URL：<http://www.bear-project.org/pdf/Tebiki/tebiki-tougou.pdf>
- ヘア・トラップの設置・見回り・試料回収の手引き（電子版のみ提供）
URL：<http://www.bear-project.org/pdf/Tebiki/HTmimawari4th.pdf>
- クマ生息において安全な調査・作業を進めるために：ヘア・トラップの現場にて（電子版のみ提供）
URL：<http://www.bear-project.org/>

6. 国際共同研究等の状況

特に記載すべき事項はない

7. 研究成果の発表状況

(1) 誌上発表

<論文（査読あり）>

- 1) 米田 政明・間野 勉. 2011. クマ類の個体数推定および動向把握方法の現状と課題. 哺乳類科学 51:79-95.

<その他誌上発表（査読なし）>

- 1) Yoneda, M. and Mano, T. 2010. Estimating population size of bears in Japan. International Bear News 19(4): 17.

(2) 口頭発表（学会等）

- 1) 間野 勉・佐藤 喜和・米田 政明・釣賀 一二三. 2009. クマ類の個体群モニタリング手法の確立にむけて. 日本哺乳類学会2009年大会自由集会（2009年11月、台北）

- 2) 米田 政明・間野 勉. 2010. クマ類の個体数を推定する : DNAマーカ个体識別の有効性と課題. 2010年度日本哺乳類学会自由集会 (2010年9月、岐阜)
- 3) 米田政明. ツキノワグマの大規模ヘア・トラップ調査の実施状況. クマ類の個体数推定法の開発 : 環境省究総合推進費プロジェクトから. 2011年度日本哺乳類学会自由集会 (2011年9月、宮崎)

(3) 出願特許

特に記載すべき事項はない

(4) シンポジウム、セミナーの開催 (主催のもの)

- 1) 「クマの毛からわかること」、岩手県岩泉町町民会館 (岩泉町共催) (2010年7月25日)
- 2) 「ツキノワグマを調べる! ~森には何頭のクマさんが?~」、岩手県立博物館 (岩手県立博物館共催) (2011年9月25日)
- 3) 「クマ類の個体数推定法に関するワークショップ」、富山国際会議場 (富山県自然保護課・環境省中部地方事務所共催) (2011年10月17日)

(5) マスコミ等への公表・報道等

特に記載すべき事項はない

(6) その他

特に記載すべき事項はない

8. 引用文献

- 1) 環境省自然環境局. 2007. クマ類出没対応マニュアルクマが山から下りてくる. (<http://www.env.go.jp/nature/choju/docs/docs5-4a/index.html>)
- 2) 環境省. 2010. 特定鳥獣保護管理計画作成ガイドライン (クマ類編). (<http://www.env.go.jp/nature/choju/plan/plan3-2c/index.html>)
- 3) 森光 由樹. 2008. 各都道府県のヘア・トラップ調査の実施状況と長野県における実施例. 哺乳類科学 48:133-38.
- 4) 米田 政明・間野 勉. 2011. クマ類の個体数推定および動向把握方法の現状と課題. 哺乳類科学 51:79-95.
- 5) 岩手県. 2007. 第2次ツキノワグマ保護管理計画 (巻末参考資料; ツキノワグマの生息数の推定について). 岩手県.
- 6) 環境庁自然保護局・アジア航測株式会社. 1999. 第5回自然環境保全基礎調査植生調査報告書. (http://www.biodic.go.jp/reports2/5th/vgt_en/5_vgt_en.pdf)
- 7) 環境庁. 1981. 第2回自然環境保全基礎調査 (植生調査) 現存植生図、岩手県大川 (http://www.biodic.go.jp/kiso/fnd_f_vg.html)
- 8) 世界農林業センサス2000 都道府県別統計書ー林業編, 岩手県 (<http://www.e-stat.go.jp/SG1/estat/List.do?bid=000001013258&cycode=0>)

- 9) Sato, Y. 2002. An ecological study on human-bear conflicts in Urahoro, Hokkaido. Ph.D thesis. The University of Tokyo. 91pp.
- 10) Sato, Y., Aoi, T., Kaji, K. and Takatsuki, S. 2004. Temporal changes in the population density and diet of brown bears in eastern Hokkaido, Japan. *Mammal Study* 29: 47-53.
- 11) 佐藤 喜和・湯浅 卓. 2008. ヘア・トラップを用いたクマ類の個体数推定法: 概要と注意点. *哺乳類科学* 48: 101-107.
- 12) 湯浅 卓・佐藤 喜和. 2008. ヘア・トラップ法を用いたクマ類の個体数推定法における課題～国内外の事例の比較検討～. *哺乳類科学* 48: 109-118.
- 13) Karamanlidis, A.A., Youlatos, D., Sgardelis, S. and Scouras, Zacharias. 2007. Using sign at power poles to document presence of bears in Greece. *Ursus* 18: 54-61.
- 14) Kendall, K.C., Stetz, J. B., Boulanger, J., Macleod, A.C., Paetkau, D. and White, G. C. 2009. Demography and genetic structure of a recovering grizzly bear population. *Journal of Wildlife Management* 73:3-17.
- 15) 佐藤 喜和. 2004. ヒグマの背擦り. *浦幌町立博物館紀要*, (4): 11-16.
- 16) 山内貴義. 2009. 遺伝子解析法を用いたツキノワグマのモニタリング調査手法の開発. *岩手県環境保健研究センター年報 第8号* (平成20年度).
- 17) 環境省自然環境局・生物多様性センター, 2009a) 環境省自然環境局・生物多様性センター, 2009a. 平成20年度自然環境保全基礎調査、種の多様性調査(宮城県)報告書. 環境省自然環境局生物多様性センター.
- 18) 環境省自然環境局・生物多様性センター. 2009b. 平成20年度自然環境保全基礎調査、種の多様性調査(山形県)報告書. 環境省自然環境局生物多様性センター.
- 19) 環境省自然環境局・生物多様性センター. 2009c. 平成20年度自然環境保全基礎調査、種の多様性調査(奈良県)報告書. 環境省自然環境局生物多様性センター.
- 20) Miura, S. and Oka., T. 2003. Evaluation of apple bait hair-traps for genetic tagging of Asiatic black bears in the Kitakami Highland, northern Honshu, Japan. *Mammal Study* 28: 149-152.
- 21) 野生動物保護管理事務所(WMO). 2007. 平成18年度ツキノワグマ個体数調査報告書(富山県).
- 22) 釣賀 一二三. 2008. 北海道渡島半島地域におけるヘア・トラップ調査の実施例. *哺乳類科学* 48: 119-123.
- 23) 環境省自然保護局・生物多様性センター. 2005. 第6回自然環境保全基礎調査、種の多様性調査(岩手県)報告書. 環境省自然環境局生物多様性センター.
- 24) 野生動物保護管理事務所(WMO). 2005. 緊急地域雇用創出特別基金事業(狩猟規制基礎調査)業務委託報告書.(長野県におけるヘア・トラップ調査)
- 25) 上馬 康生・中谷内 修. 2007. 石川県におけるツキノワグマのヘアートラップ調査(2006年)石川県白山自然保護センター研究報告 33: 33-40 (2006)
- 26) 福井県野生動物の会. 2007. ツキノワグマ生息数調査報告書(ヘア・トラップ調査). 特定鳥獣保護管理計画モニタリング手法調査.
- 27) Gervasi, V., Ciucci, P., Boulanger, J., Posillico, M., Sulli, C., Focardi, S., Randi, E. and Boitan, L. 2008. A preliminary estimate of the Apennine brown bear population size based on hair-snag

- sampling and multiple data source mark-recapture. *Ursus* 19(2):105-121.
- 28) Woods, J.G., Paetkau, D., Lewis, D., McLellan, B. N., Proctor, M. and Strobeck, C. 1999. Genetic tagging of free-ranging black and brown bears. *Wildlife Society Bulletin* 27 (3) :616-627.
- 29) Robinson, S. J., Waits, L. P., and Martin, I. D. 2009. Estimating abundance of American black bears using DNA-based capture-mark-recapture models. *Ursus* 20 (1) :1-11.
- 30) Boulanger, J., Proctor, M., Jimmer, S., Stenhouse, G., Paetkau, D. and Cranston, J. 2006. An empirical test of DNA mark-recapture sampling strategies for grizzly bears. *Ursus* 17 (2) :149-158.
- 31) 坪田 敏男・金川 弘司・高橋 健一・安江 健・福永 重治. 1985. エゾヒグマの飼育条件下における性行動の観察. *家畜繁殖誌* 31:203-210.
- 32) Green, G. I. and Mattson, D. J. 2003. Tree rubbing by Yellowstone grizzly bears *Ursus arctos*. *Wildlife Biology* 9:1-9.
- 33) Puchkovskiy, S.V. 2009. Selectivity of tree species as activity target of brown bear in taiga. *Contemporary Problems of Ecology* 2:260-268.
- 34) Maeda, N. and Ohdachi, S. 1994. Growth and body measurement of Hokkaido brown bear in captivity. *Proceedings of the Second East Asiatic Bear Conference* 68-76.
- 35) Karamanlidis, A. A., Drosopoulou, E., de Gabriel Hernando, M., Georgiadis, L., Krambokoukis, L., Pillaha, S., Zedrosser, A. and Scouras, Z. 2010. Noninvasive genetic studies of brown bears using power poles. *European Journal of Wildlife Research* 56:693-702.
- 36) Stetz, J. B., Kendall, K. C. and Servheen, C. 2010. Evaluation of bear rub surveys to monitor grizzly bear population trends. *Journal of Wildlife Management* 74:860-870.

(2) 個体数推定に関わる効果的な DNA 分析法の確立に関する研究

山形大学理学部	玉手 英利
地方独立行政法人 北海道立総合研究機構	釣賀 一二三
	近藤 麻実
岩手県環境保健研究センター	山内 貴義
株式会社野生動物保護管理事務所	湯浅 卓
<研究協力者>	
慶應義塾大学（ポスドク研究員）	鶴野 レイナ
財団法人自然環境研究センター 第一研究部	諸澤 崇裕

平成21～23年度累計予算額：42,683千円（うち、平成23年度予算額：15,467千円）
 予算額は、間接経費を含む。

【要旨】 ヘア・トラップ法によるクマ類の個体数推定における最重要の技術的課題は、体毛から得られる微量DNAを効率的に利用した高精度な個体識別法を確立することである。この課題を解決するために、本研究では、ツキノワグマおよびヒグマを対象として、まず、体毛試料の処理方法、遺伝マーカーの種類、遺伝子増幅反応条件、遺伝子型判定基準等の分析工程について、最適条件を網羅的に検討し、効率的に個体識別を行う標準的分析法を確立した。次に、同分析法を用いて平成22・23年度の実地調査で採取した体毛試料の遺伝子型判定を行い、得られた個体識別データを、本推進費サブテーマ1「ヘア・トラップ法による個体数推定の確立に関する研究」とサブテーマ4「個体群モデルによる生息数および生息動向分析法の確立に関する研究」に提供した。同データの統計学的解析によって、分析成功率を高めるサンプリング条件が明らかになった。さらに、遺伝子型の誤判定率の最尤推定によって、使用する体毛の本数が分析精度に影響を及ぼすことが示された。DNA分析の別法である「有害捕獲個体を利用した有効集団サイズの推定法」のツキノワグマ集団への適用可能性を検討する遺伝子分析を行った結果、調査対象集団の有効集団サイズは100以下となり推定値幅が大きいことが示された。以上の結果を基に、日本産クマ類のDNA分析による個体数推定における分析精度管理の方法として、個体識別の効率的な再分析手順を定め、誤判定データを検出する新たな方法を開発した。以上の成果を基に、ツキノワグマとヒグマの個体数推定に用いる標準的DNA分析法をマニュアル化し、誤判定データ検出方法等と共にウェブで公開した。

【キーワード】 遺伝子分析、ヘア・トラップ、分析効率、分析精度、マイクロサテライト

1. はじめに

(1) 研究背景：個体数推定に関わるDNA分析法の技術的課題

野生動物の個体数推定を目的としたヘア・トラップ法は90年代に欧米で開発され、最近ではわが国でも導入が進み、環境省の種の多様性調査¹⁾²⁾³⁾⁴⁾⁵⁾や自治体が行うクマ類の生息調査等で利用されている。日本のツキノワグマやヒグマを対象種とするヘア・トラップ法については様々な

方法論的検討がなされてきたが⁶⁾⁷⁾⁸⁾⁹⁾¹⁰⁾¹¹⁾、信頼性の高い生息調査方法として実用化するためには、未だ、以下のような課題が残されている。

- (i) 各試験研究機関で用いる遺伝マーカー（遺伝子座）の種類や分析条件が異なるので、各道府県の調査で得られた遺伝子データの互換性が保証されない。そのため、メタ解析を行うことが困難で、複数の自治体にまたがる広域的な個体数推定ができない。
- (ii) サンプリング時期や遺伝子増幅反応の条件の違いにより、遺伝子分析の成功率が大きく左右されることが経験的に知られているが、最適な分析条件が定まっていない。
- (iii) 多数の試料を効率的に処理して精度管理を適切に行う方法が確立されていない。

わが国では既に20件を超えるヘア・トラップ調査が実施されているにもかかわらず、いずれの調査においても、分析効率や分析精度を検証するためにはサンプル数が不十分で、上述の課題を検討することができなかつた。そこで本研究では、まず、多数の遺伝子マーカーを対象として網羅的な分析条件の検討を行い、大規模実地調査で採取した多数の分析試料を使用して、統計学的解析により分析成功率や分析精度に影響を及ぼす要因を特定し、開発手法の有効性を検証することを計画した。

（２）研究の年度進行

本研究では、平成21年度にツキノワグマのサンプリング時期、DNA抽出方法、遺伝子増幅反応の条件、遺伝マーカーの種類、精度管理方法について、室内実験と野外実験とを行って分析効率を比較検討し、標準的な分析条件を定めた。遺伝マーカーの選択では49種類の2～4塩基反復配列多型を示す候補遺伝子について、ツキノワグマ42個体の組織試料を材料とした分析を実施した。ヒグマに関しては、既報の遺伝マーカーに関する分析結果のレビューと、新規に報告のあった遺伝マーカーの分析試行による評価を行い、マーカー選択のための情報収集を行った。

平成22年度は、前年度に確立したDNA分析方法を用いて、岩手県北上山地における大規模ヘア・トラップ調査により得られた、大量のツキノワグマの体毛試料を分析し、サブテーマ1「ヘア・トラップ法における個体数推定法の確立に関する研究」とサブテーマ4「個体群モデルによるモニタリング手法および生息数推定法の確立に関する研究」のための識別個体データを提供した。また、大規模調査で得られる多数の試料を効率的に分析するために、複数の試験研究機関が分担して分析を行う体制を整備した。ヒグマについては、北海道札幌市において小規模な野外調査を実施して、DNA分析効率の季節性に関する検討を行った。

平成23年度は、同年度に採取された新たな体毛試料を分析し、サブテーマ1とサブテーマ4のための識別個体データを提供した。また、平成22年度調査で個体識別を行った試料の分析精度を検証するために再解析を行い、遺伝子型誤判定率の最尤推定を行った。さらに、識別個体の遺伝子型頻度から、誤判定データの存在を検出する新たな方法を開発した。また、遺伝子型判定の成功率に影響を与える諸要因を明らかにするために、PCR成功率を応答変数、環境要因等を説明変数とする一般化線形モデルによる解析を行った。ヒグマを対象とした研究では、23種類の4塩基反復配列多型を示す候補遺伝子について、ヒグマ45個体の組織試料を材料とした分析を実施した。既報の遺伝マーカーと今回分析を実施したマーカーに関する分析結果をもとに、Probability of Identity (Pid)、PCR増幅率および対立遺伝子サイズの判定の容易さ等を評価基準として、有効なマーカーを選択した。また、北海道上ノ国町にて平成22年度と同様に小規模な野外調査を実施し、

DNA分析効率の季節性に関する検討を行い、調査実施に最適な時期を明らかにした。最後に、研究成果である精度管理の技術情報と標準分析試料をウェブ上で提供し、標準的分析法を記載した標準工程マニュアルを公開した。

2. 研究開発目的

クマ類の個体数推定に関わる遺伝子分析法の効率と精度管理を向上させるための諸条件を検討し、標準的分析法を確立することを上位目的とした。

研究開発の第1段階として、DNA分析条件の標準化を行うため、(i) ツキノワグマおよびヒグマの個体識別を効率的に行う遺伝マーカーの選択、(ii) 遺伝子増幅反応条件の最適化、(iii) 複数機関での分析手法・条件の標準化を具体的な目的として標準的分析法を開発した。第2段階では、北上山地の実地調査で採取された試料を分析して、サブテマ1および4に識別個体データを提供することを目的とした。第3段階では、DNA分析成功率に影響を及ぼす要因の調査と、遺伝子型の誤判定の検討とを具体的な目的とし、効率的な精度検証方法を開発した。

上述の各分析と並行して、有害捕獲や狩猟で得られる組織試料から個体数に関する情報を得ることを目的として、有効集団サイズ (Ne: effective population size) を推定する方法の有効性を検討した。

3. 研究開発方法

(1) DNA分析手法の標準化

1) ツキノワグマの遺伝マーカーの選択

国内でヘア・トラップ調査が始められた90年代は、利用できる遺伝マーカーがPaetkauらのG series¹²⁾; KitaharaらのMSUT series¹³⁾; TaberletらのUarMU series¹⁴⁾などに限られていた。そのため現在でも多くの自治体では、これらの90年代に開発されたマーカーが主に用いられている。しかし、これらの遺伝子座の変異は2塩基反復配列多型であるため、対立遺伝子の判別を注意深く行う必要がある。それに対し、対立遺伝子の読み取りがより容易な3塩基および4塩基反復配列多型のUT series¹⁵⁾、UA series¹⁶⁾、Uam series¹⁷⁾が、新たなクマ類のマイクロサテライトマーカーとして開発された。そこで本研究では、新たに開発されたUT、UAおよびUamの各マーカーから、原報で多型性が高いことが記載されている遺伝子座で対立遺伝子サイズが250 bpより小さいものを選び、従来用いられてきたG、UarMUおよびMSUTマーカーと合わせて、個体識別効率を比較する基準となる対立遺伝子数および*Pid*と*Pid-sib*を測定した。*Pid*は調査対象集団が大集団で任意交配している場合に、任意に抽出された異なる2個体が偶然に同一の遺伝子型を持つ確率を表す指標である。一方、*Pid-sib*は血縁個体の存在を考慮した*Pid*で、小集団では*Pid*に比べてより実用的な指標とされる¹⁸⁾。試料として、2003年から2008年の間に岩手県で捕獲されたツキノワグマ42個体の筋肉から抽出したDNAを用いた。PCR等の条件は、それぞれのマーカーを記載した原著論文に従って設定した。

個体数推定のために遺伝子分析を行う場合、どれくらいの数の遺伝子座を用いるべきかについては、データの正確性と費用対効果の両面から論議されている^{19) 20) 21)}。使用する遺伝子座の数が少ない場合には異なる個体を同一個体と誤判定する可能性が増える。一方、遺伝子座の数が多き場合には、遺伝子型の読み取り間違いによって同一個体を異なる個体と誤判定する可能性が増え、

分析コストも増加する。本研究では上述の先行研究を参考にして、国内のヘア・トラップ調査で使用されている遺伝子座が6~9種類であること、一調査当たり数百以上の試料を処理することを考慮して、使用する遺伝子座数を6と定めた。さらに、調査対象地域の遺伝的多様性が低く6遺伝子座では個体識別が困難な場合には、必要に応じて3種類の遺伝子座を追加で分析することとした。

最初に分析する6遺伝子座としては、地域集団において*Pid*が低い遺伝子座から順に選び、3遺伝子座を1セットとするmultiplex PCRにより遺伝子型を判定する手順とした。Multiplexの構成については、すべての遺伝子座が良好に増幅される組み合わせを選択し、調査地域の地域個体群内で一定の個体識別精度を確保できる数値（概ね 1.0×10^{-5} ）よりも低い*Pid*が得られるように、遺伝マーカーのセットを設定した。

2) ヒグマの遺伝マーカーの選択

これまで、国内におけるヒグマの個体識別には、Paetkauらの提唱するG series^{12) 22)}やTaberletらのUarMU series¹⁴⁾などが用いられてきた。これらの2塩基反復配列多型マーカーに対して、対立遺伝子の読み取りがより容易と考えられる4塩基反復配列多型のUT series¹⁵⁾、UA series¹⁶⁾およびUam series¹⁷⁾が、新たなクマ類のマイクロサテライトマーカーとして開発された。そこで、本研究ではツキノワグマの場合と同様に、新たに開発されたUT、UAおよびUamの各マーカーから、原報で高い多型性が記載されている遺伝子座のうち対立遺伝子サイズが250 bpより小さい23遺伝子座を選び、個体識別効率を比較する基準となる対立遺伝子数および*Pid*と*Pid-sib*¹⁸⁾の測定を試みた。それぞれの数値の測定には、1996年から2008年の間に北海道石狩西部地域で採取された捕獲個体等45個体の組織試料を用いた。ここで選択されたマーカーは、multiplexの検討に供されることから、PCR反応はすべて同一の条件で行うこととし、DNA polymerase (AmpliQ Gold, ABI) に添付の反応液組成で、基本的に30サイクルのPCR反応（95°C 30秒、50°C 20秒、72°C 20秒）を実施した。

次に、検討を行った23遺伝子座のうち*Pid*および*Pid-sib*の低いもので、かつ対立遺伝子のサイズを表すピークの判読が困難でないものを12遺伝子座程度選択し、*Pid*の低い3~4遺伝子座を軸にmultiplex PCRにおける組み合わせの相性を検討した。Multiplex PCRの反応条件は、ツキノワグマと同様の条件で行った。

3) 遺伝子増幅反応の最適化

体毛から得られるDNAは微量であり、回収状況によっては劣化している場合もある。そのため、PCRに使用する耐熱性DNA polymeraseの種類によって、遺伝子型判定の成功率は大きく左右される可能性がある。現在、国内のヘア・トラップ調査で用いられている耐熱性DNA polymeraseは、Ex Taq (TaKaRa)、Ex Taq HS (TaKaRa)、PrimeSTAR GXL (TaKaRa)、KOD FX (TOYOBO)、Ampli Taq Gold (Applied Biosystem Inc)などであるが、それらの酵素の性能に関する網羅的な比較は行われていなかった。そのため本研究では、上述の6種類の酵素に加えて、Blend Taq-Plus- (TOYOBO)、AccuPrime GC-Rich (Invitrogen)の酵素と、マイクロサテライト分析用試薬キットとして市販されているQIAGEN Multiplex PCR Kit (QIAGEN)の合計8種類の酵素を用いて、微量DNAを分析対象試料にした場合のPCR成功率を比較した。PCR増幅効率を調べるための標準DNA試料として、山形県で捕獲されたツキノワグマ8個体の筋肉から抽出したDNAを用いた。ヘア・トラップでは、PCRに用いる試料のDNAの量が数pgのオーダーになることを考慮して、標準DNA試料を1反応あたり

10 ng、1 ng、100 pgの3段階に希釈したものを用いた。PCR成功率の比較は、マイクロサテライトマーカーG1Aのsingle PCRによる増幅と表(2)-3（後述）に示したmultiplexセットを用いたPCRによって実施した。全試料のPCR産物を対象として2% Ultra low range agarose gel（BioRad社）を用いた電気泳動を行い、PCR反応産物の有無を確認して増幅成功率を求めた。

4) 複数機関での分析手法・条件の標準化

ヘア・トラップ試料の遺伝子分析を複数の試験研究機関で分担する場合、分析機関によって読み取られる対立遺伝子サイズが異なることがある。この原因としては、各分析機関で使用しているサーマルサイクラーやジェネティックアナライザ、サイズスタンダードの違いなどが考えられる。同じ対立遺伝子を複数の分析機関で異なるサイズとして読み取った場合には、正しく個体識別が行われない。そのため本研究では、分析機関間の読み取りサイズの違いについて、標準試料を用いた較正を行った。標準試料は、ツキノワグマ8個体（2006年から2009年にかけて山形県鶴岡市および酒田市で捕獲されたオス3個体、メス5個体）の筋肉から抽出したDNAを使用した。この標準試料を用いて、後述の表(2)-3で定めたマイクロサテライト6遺伝子座（G10C、UarMU23、UarMU05、UamD103、UamD2、UamD118）すべてについて、分析機関ごとに増幅およびフラグメント解析を実施し、機関間で生じた対立遺伝子サイズの差を記録した。この後のすべての遺伝子分析作業では、対立遺伝子サイズ較正後のデータを使用した。

体毛から抽出したDNAの量は乏しいことが多く、allelic dropout（片側対立遺伝子の欠落；以下、ADO）やfalse allele（偽対立遺伝子；以下、FA）といった分析エラー²³⁾が一定の確率で生じる。信頼性の低いデータを個体数推定に用いた場合は、推定精度も低いものとなるため、信頼性の高いデータのみを抽出することが重要である。本研究では分析精度を一定に保つため、また、分析機関間および年度間での分析結果の比較を可能にするため、明確な遺伝子型判定ルールを定めることとした。岩手県北上山地周辺で有害捕獲されたツキノワグマ42個体分の筋肉および2010年度北上山地にて実施された大規模ヘア・トラップ調査によって採集された体毛試料を対象とし、遺伝子分析を実施した。筋肉試料からのDNA抽出にはDNeasy Blood & Tissue Kit（QIAGEN）を用いた。体毛試料については10本程度を上限として毛根部のみを切り取り、DNA extractor FM kit（和光純薬株式会社）を用いてDNAの抽出を行った。上述の6つの遺伝マーカーを用いてDNAを増幅しフラグメント解析を行った。フラグメント解析によって得られた波形を精査して、典型的な波形を基本波形とし、基本波形と異なる波形の取り扱いについて定めた。分析にかける努力量を一定にするため、再分析を行う基準や再分析回数の上限を定めた。併せて、GeneCap²⁴⁾を用いて遺伝子型を照合した際に生じるミスマッチ（6遺伝子座分析のうち1あるいは2遺伝子座のgenotypeが異なることで別個体として扱われる試料）および1試料のみから得られた遺伝子型の取り扱いについても定めた。これらを総合して遺伝子型判定ルールとして整理した。このルールに従って2010年度試料の分析を行い、その結果を用いてルールの妥当性について評価した。評価は、ルール策定前後でミスマッチを生じたデータ数の比較によって行った。

(2) ヘア・トラップ試料の個体識別

北上山地ヘア・トラップ試料を対象として、6つのマイクロサテライトマーカー（G10C、UarMU23、UarMU05、UamD103、UamD2、UamD118）を用いて個体識別を行った。体毛10本程度を上限とし

て毛根部のみを切り取り、DNA extractor FM kit（和光純薬株式会社）を用いてDNAを抽出した。抽出したDNAを増幅しフラグメント解析を行い、後述の図(2)-2に示した方法で波形を読み取ることによって遺伝子型を決定した。また、個体識別の際の補足的なデータとして、性判別も併せて実施した。遺伝マーカーを用いたクマ類の性判別では、SRY遺伝子、ZF遺伝子、アメロゲニン遺伝子を用いる方法がある^{25) 26)}。本研究では、PCR産物のサイズがマイクロサテライトマーカーとほぼ同じ範囲にあり、フラグメント長の違いで雌雄が区別できるという点に着目し、アメロゲニン遺伝子を採用した。DNA polymerase（TaKaRa Ex Taq, AmpliTaqGold等）に添付の反応液組成を全量15 μ lになるように調整し、30サイクルのPCR反応（97 $^{\circ}$ C30秒、55 \sim 65 $^{\circ}$ C90秒、72 $^{\circ}$ C30秒）を実施した。ジェネティックアナライザを用いてPCR産物のフラグメント解析を行い、大小2つのフラグメントサイズの波形が得られたものをオス、フラグメントサイズが大きい方の波形のみが得られたものをメスとし、それ以外は性別不明とした。マイクロサテライト6遺伝子座すべての遺伝子型が決定したデータのみを抽出し、GeneCap²⁴⁾によって識別個体の照合を行った。2010年度試料の分析の結果1試料のみから得られた遺伝子型については、4 \sim 6遺伝子座でホモ接合であったものとミスマッチのチェック以外で再分析歴のあるものとをデータセットから除去した。分析試料のサブサンプリングによって識別個体数にどの程度の違いが出るのか検証することを目的として、2010年度試料のデータセットを(i) 1試料/トラップ/セッション（以下、1試料/TS）、(ii) 体毛10本以上試料（以下、10本以上試料）および(iii) 全試料の3つの分析区分に分け、個体識別結果を比較することとした。(i) 1試料/TSのデータセットは各トラップ・セッションの中で最も体毛本数の多い試料のデータを抽出して作成した。最も体毛本数の多い試料で個体識別結果が得られなかった場合は、個体識別ができるまで体毛本数の多い試料から順に遺伝子分析を行ったこととした。2011年度の試料については、2010年度の結果を受け、(i) 1試料/TSおよび(ii) 10本以上試料の2つの分析区分のみ遺伝子分析を行った。2011年度試料は全試料分析を実施せずサブサンプリングによって遺伝子分析を実施したため、1試料のみから得られた遺伝子型については、5・6遺伝子座でホモ接合であったもののみをデータセットから除外した。

（3）DNA分析成功率と誤判定率の検討

1) ツキノワグマのDNA分析成功率に影響を及ぼす要因の調査

2010年の北上山地モデル調査におけるヘア・トラップ調査により採取された体毛試料の遺伝子分析結果のうち、体毛の本数情報が記録されている1,831試料分のデータを用いて、体毛本数および調査の実施時期と分析成功率との関係について解析を行った。遺伝子分析に供した試料（以下、分析試料）のうち、個体識別に至ったものを遺伝子分析成功試料（以下、成功試料）とし、成功試料数を分析試料数で除したものを遺伝子分析成功率とした。まず各分析試料について、その体毛本数別に遺伝子分析成功率を算出し、体毛本数との相関係数を求めた。次に、全分析試料数に対する体毛本数別分析試料数の割合を調査季節区分ごとに算出した。調査季節区分は、体毛試料の回収日を元に、6月下旬、7月上・中・下旬、8月上・中旬の6区分とした。最後に、応答変数には分析結果を成功（1）、失敗（0）とした二値データを、説明変数には調査季節区分を用いて、一般化線形モデル（GLM）によって調査時期と分析成否との関係について検討した。リンク関数はlogit link、誤差構造は二項分布とした。

2) ヒグマのDNA分析成功率に影響を及ぼす要因の調査

2010年7月から10月にかけて札幌市定山溪地域の国有林（以下、定山溪地域）において、2011年7月から10月にかけて上ノ国町内の道有林（以下、上ノ国地域）において、それぞれヘア・トラップ調査を実施した（調査地域の概要および調査方法については、ヘア・トラップ班報告参照）。各ヘア・トラップから回収された体毛試料のうち、1本以上の体毛で毛根が確認された試料を対象として、遺伝子分析および個体識別を行った。2010年に採取された試料の分析には、それまで北海道で一般的に用いられてきたマイクロサテライト8遺伝子座（G1A、G10B、G10P、G10X、UarMU05、UarMU23、UarMU50、UarMU51）を、2011年に採取された試料の分析には、後述する表(2)-6で選択したマイクロサテライト9遺伝子座（G1A、G10B、G10P、G10X、UarMU09、UarMU23、UarMU50、UarMU51、UarMU59）を用いた。個体識別できた試料を分析成功試料として、分析成功試料数を遺伝子分析に供した試料数で除して調査実施時期ごとに分析成功率を求めた。

3) ツキノワグマの遺伝子型誤判定率の推定

微量DNAを用いてマイクロサテライトDNAを増幅する場合にはADOやFAなどの遺伝子型の誤判定が生じる場合がある。このことを検証するために、同一試料について2回、独立したPCRを行って得た2組の遺伝子型データを比較することによって、遺伝子型の誤判定率を推定することができる。ADOとFAそれぞれの誤判定率を推定するプログラムとして、PEDANT²⁷⁾を用いた。PEDANTにより誤判定率を求めるため、PCRから遺伝子型の決定までの作業を北上山地で2010年に採取したツキノワグマの1,245試料を対象に2回行った。1回目と2回目のデータを比較して、遺伝子型が異なる試料をもとに、遺伝子座と各対立遺伝子の誤判定率を推定した。遺伝子分析に供した体毛本数をもとに4つのサブグループに分類した（全試料、10本以上、5～9本、1～4本）うえで、遺伝子座ごとに誤判定率を推定した。

4) ツキノワグマDNA試料の適合度検定：遺伝子型誤判定の検出方法の開発

ヘア・トラップでは、ADOのためヘテロ接合の遺伝子座を誤ってホモ接合として判定し、別個体としてしまうことから個体数を過剰に見積もる場合がある。このような誤判定が生じている可能性を検証するために統計学的検定（適合度検定）を用いた。適合度検定を行うためには、調査対象地域集団の対立遺伝子頻度のデータが必要となる。そのため、北上山地における有害捕獲や狩猟で集められた組織試料から十分な量のDNAを得て、遺伝子分析により42個体の遺伝子型を決定し、母集団の対立遺伝子頻度を推定した。適合度検定では、母集団の対立遺伝子頻度から求めたサンプル集団におけるホモ接合体の出現数の期待値に対して、サンプル集団におけるホモ接合体の出現数（観察値）を比較する χ^2 検定を行った。帰無仮説（適合性）が棄却された場合には、ホモ接合となった個体の遺伝子データを再確認して、誤判定の有無を個別に検証した。ADOの可能性を検証するため、同個体群内で有害捕獲された個体の筋肉試料の遺伝子頻度を期待値とし、体毛試料の遺伝子頻度を実測値として両者の比較を行った。

（4）有効集団サイズ（Ne）を推定する方法の検討

分析対象試料として、山形県で2004年から2008年までに有害捕獲で捕獲されたツキノワグマ117個体の筋肉から抽出したDNAを用いた。年ごとの個体数は、それぞれ11（2004年）、22（2005年）、

56 (2006年)、61 (2007年)、27 (2008年) である。2004年~2006年の試料については、G1A、G10B、G10L、G10M、G10X、MSUT1、MSUT6のマイクロサテライト7遺伝子座の遺伝子型を決定した。2007年の試料については、G1A、G10L、G10M、MSUT1、MSUT6の5遺伝子座、2008年の試料についてはG1A、G10L、G10M、MSUT1の4遺伝子座について、それぞれ遺伝子型を決定した。PCR等の条件は、それぞれのマーカーを記載した原著論文に従って設定した。全試料について遺伝子型が決定されたので、欠測値を含まないデータセットをNeの推定に用いた。Neの推定は、Temporal method (TM法)とLinkage disequilibrium method (LD法)を用いて行った。TM法²⁸⁾²⁹⁾は、Neが小さいほど遺伝子頻度の時間的変動が大きくなる関係に基づいてNeを推定する方法で、1世代以上の間隔をおいて複数回、遺伝子頻度を測定する必要がある。本研究で用いた試料は2004年から2008年までの捕獲個体に限られていたので、仮に2005年を第1世代、2008年を第2世代としてNe推定を行った。マイクロサテライト4遺伝子座 (G1A、G10L、G10M、MSUT1) のデータセットをもとに、Andersonらの方法³⁰⁾により、Ne=30からNe=600まで10の増分で、それぞれのNeの尤度を計算した。LD法³¹⁾は、小集団ではより連鎖不平衡が生じることを利用した推定方法で、TM法よりも精度が低いとされるが³²⁾、TM法とは異なり1回のサンプリングで推定値が得られる。各年度で分析された遺伝子座数が異なるので、それぞれ別にNeを推定した。

4. 結果及び考察

(1) DNA分析手法の標準化

1) ツキノワグマの遺伝マーカーの選択

対立遺伝子サイズが250 bpより小さい2塩基反復配列多型マーカー26種に4塩基反復配列多型マーカー23種を加えた合計49種類のマーカーについて検討を行った結果、*P_{id}*が0.25以下となるマーカーが25種類見られた (表(2)-1、表(2)-2)。これまでのヘア・トラップ調査で用いられてきた2塩基反復配列多型マーカーの中には、比較的高い*P_{id}*値を示す遺伝子座が見られた一方、4塩基反復配列多型マーカーの中には、*P_{id}*値が0.1以下と特に低いマーカーが4種類確認された (表(2)-1)。

この結果をもとに、multiplex PCRで使用するマーカーの組み合わせを2組 (multiplex set 1, 2) 作成することとした。片方のmultiplexについては、これまでの各試験研究機関の調査においてデータが蓄積されてきたG、MSUT、UarMU seriesの中から、比較的*P_{id}*が低いマーカーの組み合わせを採用した。その結果、*P_{id}*が十分に低く、かつ遺伝子増幅が良好でピークの判別が容易な遺伝マーカーの基本セットとして、MU05、MU23、G10Cからなるmultiplex set 1とD2、D103、D118からなるmultiplex set 2を選択した (表(2)-3)。これらのセットは、従来の調査で得られたデータとの継続性を考慮したものである。これらは岩手県における北上個体の個体識別を行うために*P_{id}*の低い組み合わせから選択されたものであるため、他地域の個体群では調査地域周辺での有害捕獲個体などで事前に*P_{id}*が低いことを確認する必要がある。

表(2)-1 ツキノワグマにおける4塩基反復配列多型マイクロサテライトマーカ－の対立遺伝子数、対立遺伝子サイズ、*Pid* および *Pid-sib*

Marker	No. allele	Allele size	<i>Pid</i>	<i>Pid-sib</i>	Reference*
UT1	1	170	1.000	1.000	1
UT4	6	145-162	0.088	0.387	1
UT29	6	170-214	0.301	0.562	1
UT35	6	198-218	0.124	0.420	1
UT38	10	166-210	0.053	0.350	1
UA-BM3-P1B05U	9	224-250	0.097	0.405	2
UA-BM4-P1H10U	3	258-266	0.203	0.480	2
UA-BM4-P2A03U	6	250-270	0.250	0.542	2
UA-BM4-P2E11U	6	236-256	0.290	0.548	2
UA-RM3-P2H03U	6	108-179	0.202	0.495	2
UamA107	5	156-174	0.317	0.563	3
UamD2	5	212-228	0.188	0.480	3
UamD102	5	190-206	0.150	0.448	3
UamB2	4	173-197	0.319	0.566	3
UamB5	3	148-164	0.262	0.531	3
UamB103	3	115-123	0.334	0.596	3
UamC11	2	160-168	0.729	0.856	3
UamD1a	6	123-144	0.283	0.566	3
UamD3	3	229-237	0.665	0.819	3
UamD103	7	214-238	0.091	0.388	3
UamD112	6	141-160	0.114	0.411	3
UamD113	3	151-159	0.341	0.606	3
UamD118	4	190-202	0.205	0.487	3

*1: Shin et al. 2009¹⁵⁾, 2: Sanderlin et al. 2009¹⁶⁾, 3: Meredith et al. 2009¹⁷⁾

表(2)-2 ツキノワグマにおける2塩基反復配列多型マイクロサテライトマーカ－の対立遺伝子数、対立遺伝子サイズ、*Pid* および *Pid-sib*

Marker	No. allele	Allele size	<i>Pid</i>	<i>Pid-sib</i>	Reference*
G1A	7	199-227	0.138	0.432	4
G1D	2	192-196	0.910	0.954	4
G10B	5	147-165	0.277	0.567	4
G10C	5	112-124	0.171	0.457	4
G10J	5	81-97	0.225	0.511	6
G10L	3	134-150	0.531	0.734	4
G10M	5	199-209	0.135	0.432	4
G10P	4	168-188	0.122	0.414	4
G10X	4	186-202	0.211	0.487	4
UarMU05	4	146-156	0.182	0.463	5
UarMU09	3	118-126	0.361	0.587	5
UarMU10	3	137-141	0.373	0.610	5
UarMU15	4	128-138	0.364	0.617	5
UarMU23	6	118-134	0.072	0.371	5
UarMU26	2	186-188	0.442	0.662	5
UarMU50	7	216-232	0.174	0.465	5
UarMU51	4	117-125	0.179	0.459	5
UarMU59	4	249-257	0.211	0.499	5
UarMU61	2	208-212	0.954	0.977	5
UarMU64	3	185-191	0.259	0.527	5
MSUT-1	3	175-179	0.273	0.543	7
MSUT-2	5	86-98	0.212	0.506	7
MSUT-4	4	93-99	0.570	0.765	7
MSUT-5	1	126	1.000	1.000	7
MSUT-6	3	184-190	0.207	0.483	7
MSUT-7	3	110-121	0.484	0.700	7

*4: Paetkau et al. 1995¹²⁾, 5: Taberlet et al. 1997¹⁴⁾, 6: Paetkau et al. 1998²²⁾, 7: Kitahara et al. 2000¹³⁾.

表(2)-3 ツキノワグマの個体識別に有効なマイクロサテライトマーカーと multiplex PCR を実施する際の適切な組み合わせ例（岩手県北上山地）

	Marker 1	Marker 2	Marker 3
Multiplex 1 (dinucleotide)	G10C	UarMU05	UarMU23
Multiplex 2 (tetranucleotide)	UamD118	UamD103	UamD2

2) ヒグマの遺伝マーカーの選択

今回検討を行った4塩基反復配列マイクロサテライト23遺伝子座のうち、2遺伝子座（UT38およびUA-BM4-P2E11U）に関しては、増幅が悪く対立遺伝子のサイズを決定することが困難であったため、以降の検討から除外した。また、本来4塩基反復配列多型であるにもかかわらず、1塩基あるいは2塩基異なるサイズの対立遺伝子が多数確認され、対立遺伝子サイズの決定の際に混乱を招く可能性の高い4遺伝子座（UT1、UT35、UA-RM3-P2H03U、UA-BM4-P1H10U）についても除外した。表(2)-4に、これら6遺伝子座を除く17遺伝子座のマイクロサテライトマーカーについて、対立遺伝子数、対立遺伝子サイズ、*Pid*および*Pid-sib*を示した。なお、本研究で用いたプライマーは、すべてテイルドプライマーであり、非蛍光標識側に7塩基のテール配列を付加している。

表(2)-4 ヒグマにおける4塩基反復配列多型マイクロサテライトマーカーの対立遺伝子数、対立遺伝子サイズ、*Pid* および *Pid-sib*

Marker	No. allele	Allele size	<i>Pid</i>	<i>Pid-sib</i>	Reference*
UT4	14	136-254	0.031	0.324	1
UT29	4	170-182	0.216	0.495	1
UA-BM3-P1B05U	4	215-231	0.214	0.491	2
UA-BM4-P2A03U	7	239-263	0.090	0.389	2
UamA107	1	109	1.000	1.000	3
UamD1a	7	108-125	0.162	0.462	3
UamD2	5	195-211	0.097	0.397	3
UamD102	6	179-188	0.077	0.374	3
UamD103	5	165-180	0.181	0.478	3
UamD112	8	123-144	0.091	0.393	3
UamB2	3	162-170	0.211	0.485	3
UamB5	3	152-160	0.190	0.468	3
UamB103	3	111-119	0.228	0.507	3
UamD3	4	221-233	0.426	0.667	3
UamC11	3	148-157	0.674	0.826	3
UamD113	5	142-160	0.248	0.536	3
UamD118	3	182-190	0.248	0.522	3

*1: Shin et al. 2009¹⁵⁾, 2: Sanderlin et al. 2009¹⁶⁾, 3: Meredith et al. 2009¹⁷⁾

17遺伝子座のマーカーのうち、*Pid*が0.2以下となるマーカーとして8遺伝子座が確認されたが、これらのうち5遺伝子座（UT4、UamD1a、UamD102、UamD103、UamD112）については、1塩基あるいは2塩基異なるサイズの対立遺伝子がいくつか観察されたことから、multiplexの候補から除外し、残りの3座を以降の検討に用いることとした。

表(2)-5には、これまでのヘア・トラップ調査で用いられてきたGおよびUarMUの各マーカーについて、本研究で用いたものと同じヒグマ試料を用いて分析を行った結果に関する報告を示した³³⁾。18遺伝子座のマーカーのうち、*Pid*が0.2以下のものが10遺伝子座存在し、これらのうち*Pid*の

低い順に9遺伝子座を選択してmultiplexの検討を実施した。

Multiplexの検討では、先行研究^{19) 20) 21)}を参考にしてデータの正確性と費用対効果の両面を考慮し、9遺伝子座のマーカを用いた3つの有効なmultiplexPCRのセット作成を目指した。また、2010年に本研究で実施した、岩手県における大規模ヘア・トラップ調査で得られたツキノワグマ体毛試料の分析過程において、4塩基反復配列多型のマーカを用いた場合の対立遺伝子を表すピークの読み取りが、2塩基反復配列多型マーカの場合とは異なり、ある程度の習熟が必要であることが明らかになった。このことから、3つめのmultiplexの組み合わせについては、2塩基配列と4塩基反復配列多型の両方を用意することとし、2塩基配列と4塩基反復配列多型のマーカを同一のセットに含めることはしなかった。まず、*Pid*が最も低いものから順にG10B、G10P、G1AおよびUA-BM4-P2A03U（4塩基反復配列多型マーカで最も*Pid*が低い）の4種を選択し、これらを軸に他のマーカとの組み合わせを検討した。組み合わせを検討する際には、マーカ同士でピークパターンに影響を与えないように、できる限り対立遺伝子サイズの範囲が重複しないように配慮した。その結果、表(2)-6に示した組み合わせによって十分な解析結果が得られることを確認し、ヒグマにおける適切なマイクロサテライトマーカと、multiplex PCRの組み合わせとして提示した。それぞれのマーカに使用する蛍光色素によって、ジェネティックアナライザによる分析時に対立遺伝子サイズを表すピークの高さに、マーカ間の大きな差が生じる可能性がある。これはPCRによる増幅のされやすさと蛍光色素の蛍光強度の違いによって起こるので、それぞれの組み合わせを検討し、すべてのマーカで同等の高さのピークが得られるように調整することが望ましい。

表(2)-5 ヒグマにおける2塩基反復配列多型マイクロサテライトマーカの対立遺伝子数、対立遺伝子サイズ、*Pid*および*Pid-sib*

Marker	No. allele	Allele size	<i>Pid</i>	<i>Pid-sib</i>	Reference*
G1A	6	175-187	0.086	0.384	4
G1D	4	171-179	0.561	0.760	4
G10B	6	138-165	0.069	0.367	4
G10C	3	95-103	0.318	0.574	4
G10H	6	212-248	0.216	0.508	6
G10J	2	76-90	0.715	0.848	6
G10L	6	157-167	0.191	0.481	4
G10M	4	199-211	0.214	0.491	4
G10P	7	132-163	0.073	0.373	4
G10X	4	131-139	0.165	0.453	4
UarMU05	4	125-131	0.214	0.490	5
UarMU09	5	122-138	0.174	0.459	5
UarMU10	2	117-129	0.388	0.609	5
UarMU23	8	111-125	0.123	0.428	5
UarMU50	9	191-217	0.099	0.399	5
UarMU51	5	104-112	0.154	0.444	5
UarMU59	5	99-117	0.175	0.468	5
UarMU61	4	199-205	0.303	0.583	5

*4: Paetkau et al. 1995¹²⁾, 5: Taberlet et al. 1997¹⁴⁾, 6: Paetkau et al. 1998²²⁾.

鈞賀ら（2011）より引用、一部データを追加して改変

表(2)-6 ヒグマの個体識別に有効なマイクロサテライトマーカーと multiplex PCR を実施する際の適切な組み合わせ例

	Marker 1	Marker 2	Marker 3
Multiplex 1 (dinucleotide)	G10B	UarMU09	UarMU59
Multiplex 2 (dinucleotide)	G1A	G10P	UarMU51
Multiplex 3 (dinucleotide)	G10X	UarMU23	UarMU50
Multiplex 4 (tetranucleotide)	UA-BM4-P2A03U	UamD2	UamB5

本研究において選択されたマーカーは、個体識別に十分な多型を示しており、今回分析対象とした石狩西部地域のヒグマがほぼ隔離された個体群で生息密度が低いことを考慮した場合^{34) 35)}、道内各地のヒグマに対して有効であると考えられる。マイクロサテライトマーカーの示す多型の程度は、北海道内のいくつかの地域において同じ傾向を示すことがわかっている³⁶⁾。したがって、調査対象地域の遺伝的多様性に関する背景が不明な場合は、表2-(6)に示した組み合わせは初期の選択肢になり得ると考えられる。浦幌地区や渡島半島地域では、これらのマーカー以外にUarMU05が高い多型性を示しており^{11) 33)}、過去に得られたデータとの比較を考慮した場合は、UarMU05をmultiplexのセットに加えることも有用であると考えられる。

3) 遺伝子増幅反応の最適化

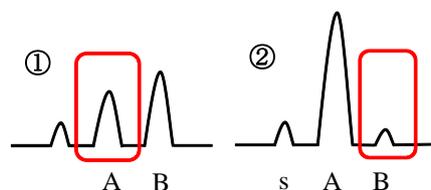
ツキノワグマ試料のsingle PCRにおいては、TaKaRa Ex TaqおよびQiagen microsatellite kitの増幅成功率が最も高く、PrimeSTAR、TaKaRa Ex Taq HS、Blend Taq-Plus-がそれに次ぐ結果となった。また、multiplex set2を用いて行ったmultiplex PCRでは、PrimeSTARの成績が最も良く、次いでTaKaRa Ex Taq、KOD FX、Blend Taq-Plus-の成績が良かった。TaKaRa Ex Taqの増幅成功率は高いが、非特異的増幅（スメア）が確認されることから、必ずしもマイクロサテライト分析に適するとは結論づけられなかった。一方、PCR開始時に94℃5分以上の熱変性を行うことで抗体が非活性化して反応が開始されるTaKaRa Ex Taq HSでは、PCR産物にスメアは確認されないが、PrimeSTARと比較した場合、増幅成功率は低かった。本研究の結果では、ヘア・トラップ調査で得られるクマ類の微量DNAの増幅には、single PCRとmultiplex PCRのいずれでも、PrimeSTAR、Blend Taq-Plus-が安定した結果を与えることが明らかになった。

4) 複数機関での分析手法・条件の標準化

標準試料を用いて、遺伝子座ごとに対立遺伝子サイズの補正を行った結果、機関間で最大9bpのサイズの差が確認された。この結果をもとに、岩手県環境保健研究センターの対立遺伝子サイズに統一することとした。

次に、筋肉試料および体毛試料の分析によって、マイクロサテライト6遺伝子座に共通する基本波形を定めた。遺伝子型がホモ接合の場合、基本波形に合致するもののみを対象として遺伝子型を決定・記録し、合致しない試料は再分析を行うこととした。再分析を実施しても基本形に合致する波形が得られない場合は、記録できるデータは得られないため、そのデータを破棄することとした。遺伝子型がヘテロ接合で、その2つの対立遺伝子同士が隣り合っていない（2塩基配列反復の場合は4塩基以上、4塩基配列反復の場合は8塩基以上離れている）場合は、ホモ接合の場合と

同じ手順で遺伝子型の決定・記録を行った。隣り合った遺伝子型の場合で、基本波形との照合に迷う場合には以下の2つのパターンが考えられた：①サイズの小さい対立遺伝子のピーク（A）が、サイズの大きい対立遺伝子のピーク（B）より低いケース、②サイズの大きい対立遺伝子のピーク（B）が極端に低いケース（図(2)-1）。①の場合は、サイズの小さい対立遺伝子（A）の高さがサイズの大きい対立遺伝子（B）の80%以上の場合のみヘテロ接合として遺伝子型を決定・記録し、80%未満の場合はホモ接合として記録することとした。②の場合は、サイズの大きい対立遺伝子のピーク（B）がサイズの小さい対立遺伝子のスタッターピーク（s）よりも大きく、サイズの小さい対立遺伝子のピーク（A）の50%以上である場合には遺伝子型の決定・記録を行うこととした。サイズの大きい対立遺伝子のピーク（B）がサイズの小さい対立遺伝子のスタッターピーク（s）よりも小さい場合には、このピーク（B）は記録せず小さい対立遺伝子（A）のホモ接合として遺伝子型の決定・記録を行うこととした。これらの条件に合致しない場合は再分析を実施し、それでも結果が変わらなければ、明確に記録できるデータは得られないためその試料のデータを破棄することとした。

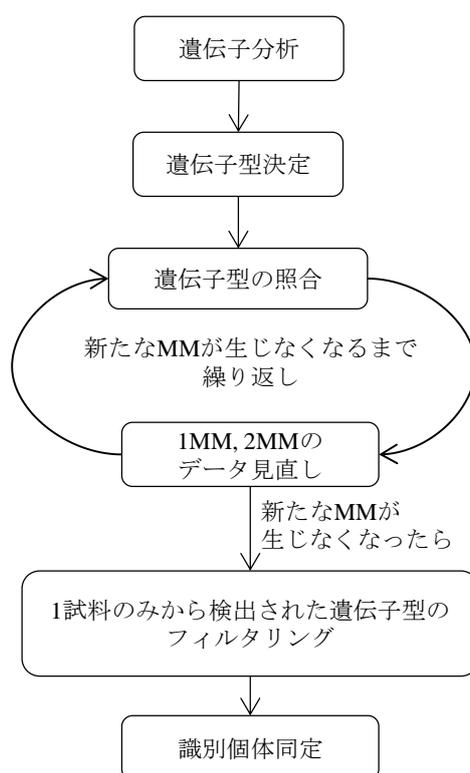


図(2)-1 基本波形と異なる場合のヘテロ接合のパターン

このようにして決定・記録したすべての遺伝子型データについてGeneCapを用いて遺伝子型を照合した。照合の結果、分析した全遺伝子座のうち1対立遺伝子のみ不一致である組み合わせ（1MM）および2対立遺伝子のみ不一致である組み合わせ（2MM）についてデータの精査を行った。ミスマッチを生じている試料のうち、遺伝子型の判読に迷う試料は再分析を実施し、再分析後も迷う状況に変化が無ければ、そのデータを破棄した。ミスマッチを生じている試料の双方について、その信頼性が高いと考えられる場合（波形が明確、同一の遺伝子型が他に複数存在するなど）は、どちらのデータも破棄せずそれぞれ別個体とした。ミスマッチの精査をした後、再びすべてのデータについて遺伝子型の照合を行い、新たに1MM, 2MMが生じた場合はさらにデータを精査することとした。以降、新しく1MM, 2MMが生じなくなるまで同様の作業を続けた。新しくMMが生じなくなった時点で、1試料のみから検出された遺伝子型のフィルタリングを行うこととした。フィルタリングのルールは、体毛試料の分析結果を精査することにより決定することとした。最後に、再度遺伝子型の照合を実施し、識別された個体にそれぞれIDをつけて最終データセットとした（図(2)-2）。

このルールに従い2010年度の北上山地大規模ヘア・トラップ調査によって回収された体毛試料を分析した。ホモ接合数の多い遺伝子型データは分析エラーによって生じた可能性が高いことが明らかとなった（後述の図(2)-8, 9参照）こと、再分析を繰り返した後に得られた遺伝子型は信頼性が低いと考えられたことから、1試料でのみ検出された遺伝子型のうち、4～6遺伝子座でホモ接

合であったデータおよびミスマッチのチェック以外で再分析歴のある試料のデータを最終的なデータセットから除外することをフィルタリングのルールとした。これらのルール策定前の分析結果における1MMおよび2MMのペア数は、それぞれ1,057および2,231ペアだったのに対し、ルール策定後ではそれぞれ447および1,236ペアとなった（表(2)-7）。遺伝子分析に用いた6遺伝子座は多様性の高い遺伝子座の組み合わせであり、1MMや2MMの生じる確率は統計上非常に低い。つまり、ミスマッチのペアのうちいくつかのペアには分析エラーが含まれる可能性がある。厳密な分析ルールを策定したことで、ミスマッチのペア数が大幅に減少したことが示唆され、本研究で定めた遺伝子型判定ルールによって、より精度の高い分析結果を得ることができたと考えられた。



図(2)-2 遺伝子型判定ルールに従った作業の流れ

表(2)-7 遺伝子型判定ルール策定前後の分析結果*

	ルール策定前	ルール策定後
分析成功率	67.4%	53.7%
(成功数/分析総数)	(1,245/1,845)	(991/1,845)
識別個体数	295	202
1MM	1,057 ペア	447 ペア
2MM	2,231 ペア	1,236 ペア

*2010年北上山地ツキノワグマのヘア・トラップ調査採取試料

(2) ヘア・トラップ試料の個体識別

北上山地モデル調査地において、2010年6月から8月にかけて設置された245基のヘア・トラップから、2,048のツキノワグマ体毛試料が採取された。このうち1本以上の体毛で毛根が確認された

1,845試料すべてを対象として実施した遺伝子分析結果を表(2)-8に示した。1試料/TS区分では、413試料中258試料で遺伝子分析に成功し、155個体が識別された。10本以上区分では、769試料中561試料で分析に成功した結果、157個体が識別され、これら2つの分析区分間では識別個体数に大きな差は生じなかった。しかし、それぞれの識別個体数にはそれぞれの分析区分でのみ識別された個体が含まれていることから、1試料/TSと10本以上試料のデータとを合わせて新たに集計したところ、939試料中625試料で個体識別に成功し、182個体が識別された。したがって、1試料/TS区分のみ、および10本以上区分のみでは、それぞれ約25個体を識別できなかったことになる。全試料区分では1,845試料のうち991試料で個体識別に成功し、202個体が識別された。これらすべての遺伝子分析結果について、分析エラーが含まれる可能性を完全に排除することはできないが、表(2)-7で示したとおり、厳しい遺伝子型判定ルールを定めたことによって、これらの識別個体数は一定の信頼性があるものと考えられた。これらの結果をサブテーマ1「ヘア・トラップ法による個体数推定の確立に関する研究」、サブテーマ4「個体群モデルによる生態数および生息動向分析法の確立に関する研究」へ提供した。

本研究において、補完法・代替法班によってカメラトラップがヘア・トラップ近傍に設置されていたが、1トラップ・セッション中に複数個体が同一のカメラトラップで確認される事例があった。このことから、1トラップ・セッション中に複数個体によって利用された同一のヘア・トラップが存在する可能性は十分に考えられ、1試料/TS区分ではその複数個体を識別しきれないことが示唆された。また、クマがうまく有刺鉄線をすり抜ける場合や、有刺鉄線にクマが触れたとしても体毛が十分に採取されないことがあることは、これまでの調査から明らかとなっている^{9) 37)}。本研究でも、クマ体毛がヘア・トラップに付着していたことから、クマがトラップを利用したと確実に判断できた場合であっても、分析区分を10本以上とすると1試料も分析されないトラップ・セッションが生じた。このことから、10本以上区分もヘア・トラップを利用した全個体を識別しきれないことが示された。一方、全試料区分では、1試料/TSと10本以上区分とを合わせた区分(182個体)よりもさらに30個体多い202個体が識別された。1試料/TS区分や10本以上区分では、すべての個体を識別しきれないことが明らかとなったため、識別個体数をより実際にトラップを利用した個体数に近づけるためには、全試料分析が望ましいと考えられる。しかしながら、遺伝子分析に供する体毛本数と分析成功率には高い相関があることがわかっている(図(2)-3、後述)。全試料区分には体毛10本未満の試料が多く含まれることから、分析作業コストや労力の制限があるなど、採取した全試料を分析できない場合には、1試料/TSと10本以上区分とを合わせた区分となるようサブサンプリングをした上で遺伝子分析をすることが選択肢の一つとして示された。

表(2)-8 2010年度試料分析結果

分析区分	分析試料数	分析成功試料数	識別個体数
1 試料/トラップ/セッション	413	258	155
毛根 10 本以上	769	561	157
1 試料/トラップ/セッション+毛根 10 本分以上	939	625	182
全試料	1,845	991	202

北上山地調査地において2011年7月から8月にかけて設置された80基のツキノワグマのヘア・トラップから、1,120の試料が採取された。2010年度試料の分析結果を受け、2011年度試料に関して

は1試料/TSおよび10本以上区分についてのみ遺伝子分析を行うこととし、その結果を表(2)-9に示した。1試料/TS区分では163試料中109試料で遺伝子分析に成功し、60個体が識別された。毛根10本以上区分では399試料中312試料から64個体が識別された。1試料/TSと10本以上区分とを合わせたデータを集計したところ、449試料中324試料で分析に成功し、70個体が識別された。これらの結果をサブテーマ1および4へ提供した。

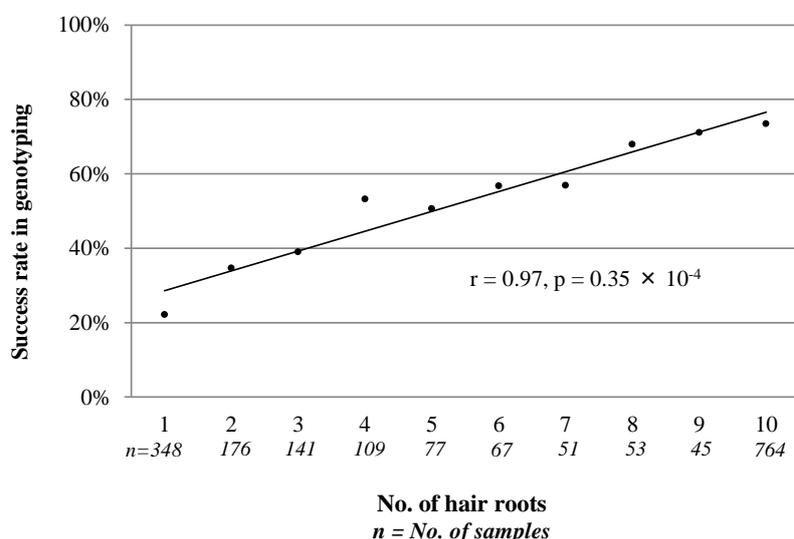
表(2)-9 2011年度試料分析結果

分析区分	分析試料数	分析成功試料数	識別個体数
1試料/トラップ/セッション	163	109	60
毛根10本以上	399	312	64
1試料/トラップ/セッション+毛根10本分以上	449	324	70

(3) DNA分析成功率と誤判定率の検討

1) ツキノワグマのDNA分析成功率に影響を及ぼす要因の調査

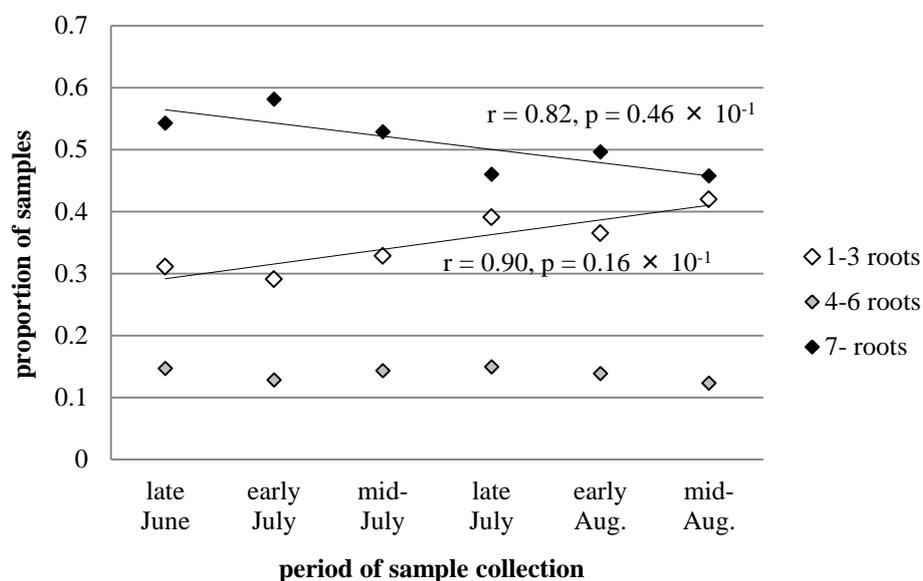
2010年北上山地モデル調査地において採取した体毛試料の遺伝子分析結果のうち、体毛の本数情報が記録されていた1,831試料分のデータを統計解析に用いた。なお、1,831試料中の分析成功試料数は986であった。体毛本数別の分析成功率は1本の試料で最も低く、10本以上の試料で最も高かった。体毛本数と分析成功率の相関係数は0.97であり、強い正の相関が見られた(図(2)-3)。遺伝子分析に供する体毛本数は多いほど得られるDNAも多くなると推測され、この結果と矛盾しない。体毛本数の多い試料では、効率的に遺伝子分析を行えることが示された。



図(2)-3 体毛本数別遺伝子分析成功率

全分析試料を体毛本数によって1~3本、4~6本および7本以上のグループに分け、それぞれのグループの試料数が全分析試料中に占める割合を図(2)-4に示した。調査時期が遅くなるにつれて、試料数割合は体毛7本以上試料で減少、1~3本試料で増加した(図(2)-4)。4~6本試料は期間を

通して顕著な変動は見られなかった。調査季節区分と体毛7本以上および1~3本試料数割合との相関係数はそれぞれ0.82および0.90であり、ともに強い相関が見られた。このことから、効率よく遺伝子分析を行うことのできる体毛本数の多い試料は6月から8月にかけて徐々に減少していくことが示唆された。

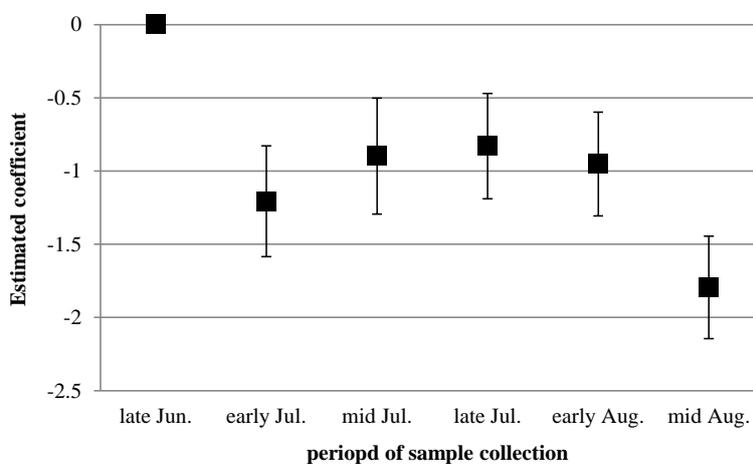


図(2)-4 体毛本数別試料数の推移（体毛1-3本、4-6本、7本以上の3グループに分けて示した）

図(2)-3の結果から、ツキノワグマ体毛試料の遺伝子分析成功率は体毛本数の影響を強く受けることが明らかとなったため、調査季節区分と分析成否との関係性については、10本以上試料のデータのみを利用してGLMによって解析した。6月下旬を基準にした場合、各調査区分の回帰係数はすべてマイナスの値をとり、7月以降の調査区分では6月下旬と比較してすべて分析成功率は低いという結果になった（表(2)-10）。特に、8月中旬の回帰係数は他の調査季節区分の2倍近く低い値であった（図(2)-5）。このことから、同じ体毛本数であっても、調査季節区分によって分析成否には差があり、分析成功率は8月中旬において特に低下することが明らかとなった。このことについて現時点で明確な理由は不明であるが、効率良く遺伝子分析を行うことのできる体毛本数の多い試料は6月から8月にかけて確保しにくくなること、およびツキノワグマの換毛は8月頃に起こる³⁸⁾ことを考慮すると、クマの体毛状態の変化が遺伝子分析の成否に何らかの影響を及ぼしている可能性がある。また、6月から8月にかけて気温および湿度は上昇し、一年の中で8月頃に最高値となる。DNA分解酵素の至適温度は37度であること、湿度の高い条件下ではDNAの断片化が起こりやすいことから、春から夏にかけての外部環境の変化も分析成功率を低下させる要因のひとつであるだろう。遺伝子分析を効率よく行うためには、8月上旬までに体毛の回収を終える調査デザインが最適であると考えられる。

表(2)-10 10本以上試料データにおける調査季節区別の分析成功率

coefficient	Estimate	Pr(> z)
Intercept	2.06	1.88×10^{-11}
late June	0.00	-
early July	-1.21	1.43×10^{-3}
mid-July	-0.90	2.32×10^{-2}
late July	-0.83	2.13×10^{-3}
early Aug.	-0.95	7.25×10^{-3}
mid-Aug.	-1.79	2.78×10^{-7}



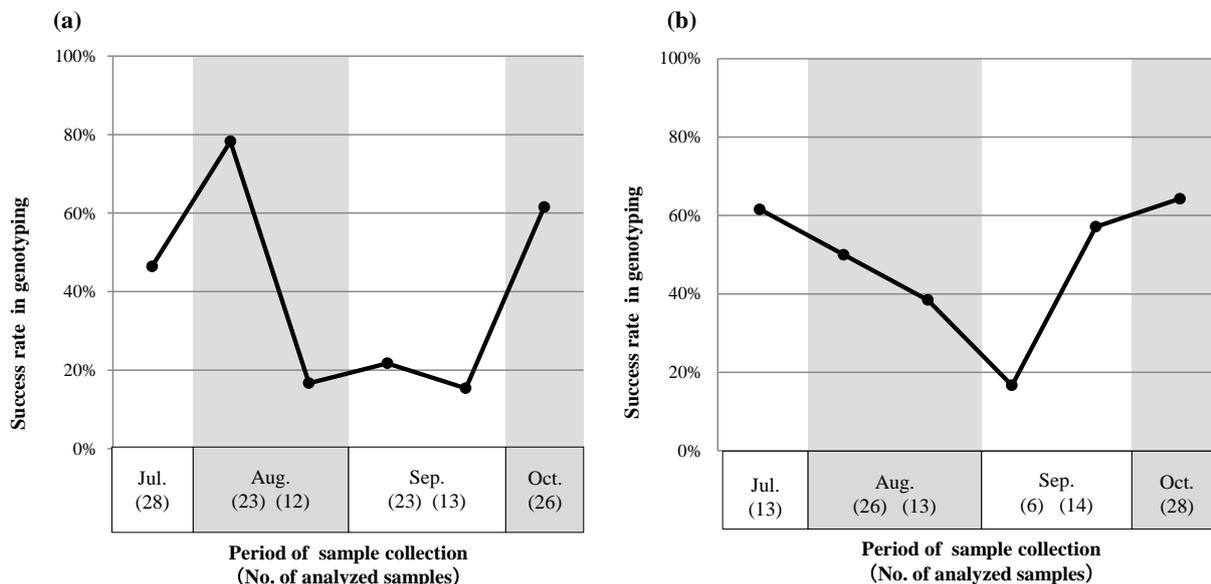
図(2)-5 10本以上試料データにおける各調査季節区分の回帰係数（推定値±SE）

2) ヒグマのDNA分析成功率に影響を及ぼす要因の調査

2010年に定山溪地域において実施したヘア・トラップ調査では、全8セッションでクマ体毛176試料が採取された。体毛1本以上で毛根が確認された125試料すべてについて遺伝子分析を行い、分析に成功した56試料から28個体が識別された。2011年に上ノ国地域において実施されたヘア・トラップ調査では、全10セッションで157試料が採取された。体毛1本以上で毛根が確認された100試料すべてについて遺伝子分析を行い、分析に成功した53試料から21個体が識別された。

2010年、2011年ともに調査実施時期を7月下旬、8月上・下旬、9月上・下旬、10月の6つに区分して時期区分ごとに分析成功率を求めた。10月下旬に採取された試料は両年ともに数試料のみであったため、10月は上下旬に区切らないこととした。2010年に定山溪地域にて採取された試料の分析成功率を図(2)-6(a)に示した。分析成功率は8月上旬が最も高く、次いで10月および7月下旬で高かった。8月上旬から下旬にかけて分析成功率は急激に低下し、8月下旬～9月下旬まで20%前後で推移した。また、2011年に上ノ国地域にて採取された試料の分析成功率については図(2)-6(b)に示した。分析成功率は10月で最も高く、7月下旬は2番目に高い結果となった。7月から9月上旬にかけて成功率はしだいに低下し、9月上旬で20%を切った。一方、9月下旬には急激に上昇した。2010年と2011年ではやや傾向は異なるものの、8月下旬から9月上旬にかけて分析成功率が低下す

ることは共通していた。このことから、ヒグマにおいても分析成功率に季節的な変化が生じることが示唆された。

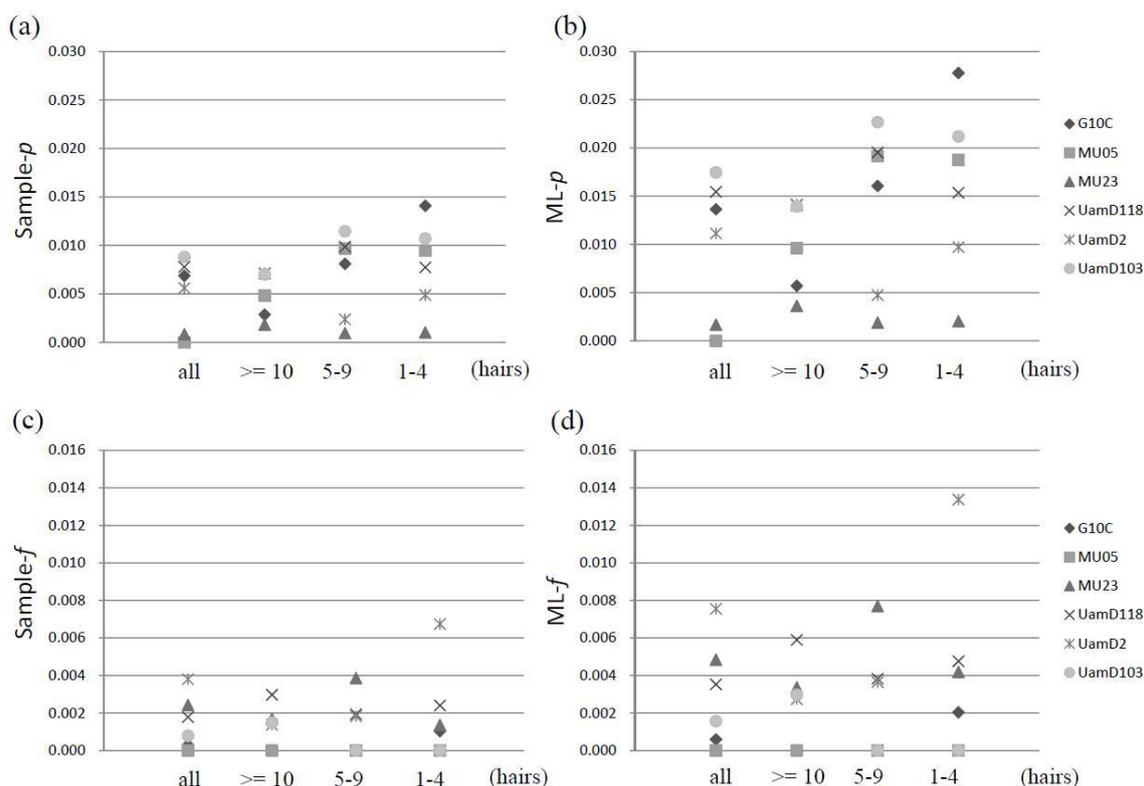


図(2)-6 定山溪地域(a)および上ノ国地域(b)において実施されたヘア・トラップ調査で採取された体毛試料の月別遺伝子分析成功率。調査月の下のカッコ内は分析に供した試料数を示す。8月および9月はそれぞれ上旬・下旬に分けて試料数を示した。

3) ツキノワグマの遺伝子型誤判定率の推定

ツキノワグマ6遺伝子座全てのPCRが成功し、遺伝子型判定を行った1,245試料のみを扱って遺伝子座誤判定率の推定を行った。

マーカーG10Cは本数が少なくなると、ADO率が高くなっている（図(2)-7 (a) (b)）、また図(2)-7 (c) (d)からは、UamD2ではFA率が高いことが示される。全てに共通の傾向として、遺伝子分析に供した体毛本数により、誤判定率に違いが見られる。10本以上の体毛を用いた場合、誤判定率は低く抑えられることがわかる。このことから、多くの試料が得られた場合や予算が限られている場合など、10本以上の体毛が含まれる試料を選択的に分析した方が結果的にPCRエラーは少なく抑えられ、個体数推定時のエラーによる過大評価の影響が少ないことが示された。



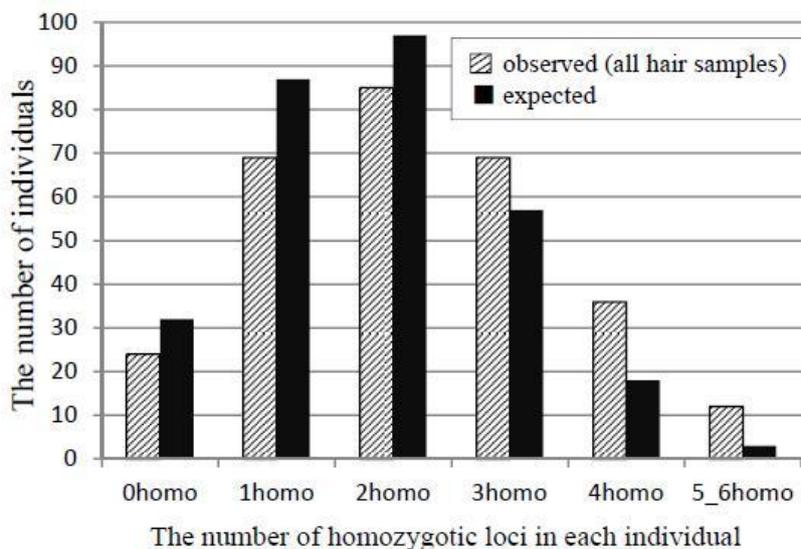
図(2)-7 遺伝子座ごとの誤判定率

各遺伝子頻度から算出される ADO 率(a), ADO による誤判定率の最尤推定値(b), 各遺伝子頻度から算出される FA 率(c), FA による誤判定率の最尤推定値(d)

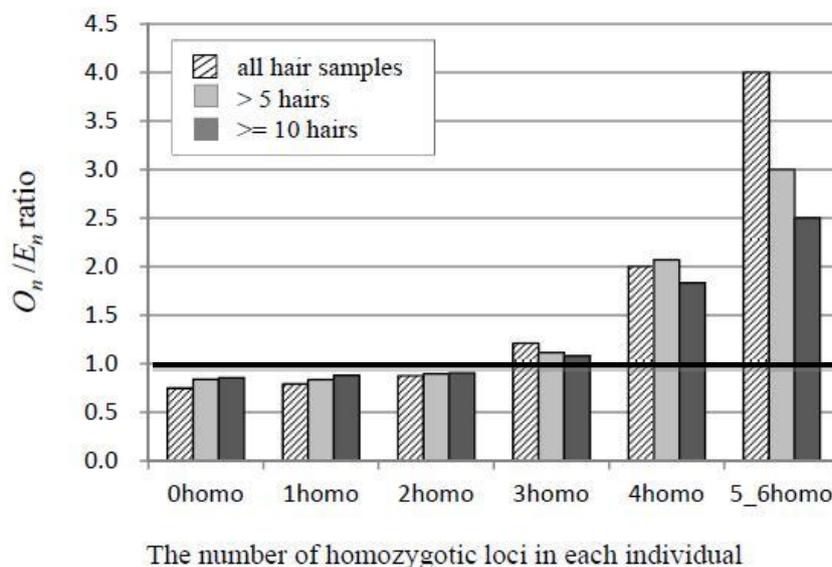
4) ツキノワグマ DNA 試料の適合度検定：遺伝子型誤判定の検出方法の開発

遺伝子型の誤判定率が生じている可能性を検証するために、ツキノワグマ 42 個体の筋肉試料によって算出されたホモ接合体の期待値と、体毛試料によって得られた実測値を比較した (図(2)-8)。6 遺伝子座すべてがホモ接合体である個体は北上山地の集団内で存在し得ないと算出され、6 遺伝子座中 5 遺伝子座でホモ接合となる個体の期待値は 1 個体であった。しかし、実際の体毛からの遺伝子型判定の結果では 5 および 6 遺伝子座がホモ接合であった個体は合計 13 個体となっていた。これらは ADO の可能性が高いと考えられる。図(2)-9 に期待値 (筋肉試料個体遺伝子頻度) と実測値 (体毛試料個体遺伝子頻度) を割り算した値を示す。1.0 のラインが「期待値 = 実測値」を表している。

ホモ接合の遺伝子座が 0~3 遺伝子座の場合は、観察値は期待値とほぼ同じであった。6 遺伝子座全て、もしくは 5 遺伝子座がホモ接合となる期待値は著しく低いにもかかわらず、実際の体毛分析では数個体確認された。このことから、ホモ過剰な遺伝子型は分析エラーによる誤判定の可能性が高いと考えられた。これら誤判定の可能性である遺伝子型データに対しては、期待値では少ない 5 および 6 遺伝子座がホモ接合となった個体をフィルタリングして排除するなどの方法がある。さらに PCR 時に使用する体毛本数が少ないほど ADO が生じやすいことが示された。試料が多く手に入る場合は、体毛本数の多い試料を選択的に利用することで、効率的かつエラーの生じにくい結果が得られると考えられる。



図(2)-8 全ての遺伝子型決定後に個体ごとの適合度検定
体毛試料（観察値：斜線）と筋肉試料（期待値：黒）



図(2)-9 試料の体毛本数ごとにサブグループ化した適合度検定。期待値（筋肉試料個体遺伝子頻度）と実測値（体毛試料個体遺伝子頻度）を割算した値を示す。On/En ratio = 1.0 の太実線が「期待値と実測値の完全一致」を表す。

(4) 有効集団サイズ (Ne) を推定する方法の検討

山形県で2004年から2008年までに有害捕獲されたツキノワグマ117頭の筋肉から抽出したDNAに基づくTM法による推定では、 $N_e=90$ が最尤値となった ($\log \text{likelihood}=-149.3$)。TM法による推定値は、各世代の N_e の平均値（調和平均）と考えられる。一方、LD法では表(2)-11の結果が得

られた。TM法とLD法のいずれでもNe推定値は100以下となった。TM法は不連続世代からのサンプリングを前提としているが、連続世代でも齢査定が可能な場合やサンプリング間隔が長い場合には適用可能とされている²⁹⁾。したがって、TM法により中長期のNe変動を記録するためには、有害捕獲個体の齢査定を必ず行い、数年間隔でサンプリングを行うことが望ましいと考えられる。LD法については、試料数が少ない場合に精度が大きく低下することが指摘されている³⁹⁾。本研究においても試料数や遺伝子座が少ない場合に信頼区間の上限が定まらなかった。また、TM法とLD法のいずれもランダムサンプリングを前提としているが、有害捕獲個体は比較的狭い地域で集中的に捕獲されることがあるので⁴⁰⁾、この前提条件が満たされない可能性もある。これらの問題に対しては、捕獲個体の齢査定や有害捕獲個体の組織試料の提出を義務づけるなどの対処が必要と考えられる。

表(2)-11 LD法で推定したツキノワグマの有効集団サイズ

Year	2004 (n=11)	2005 (n=22)	2006 (n=56)	2007 (n=61)	2008 (n=27)
7loci data	20.7 (9.9-171.8)	32.0 (19.1-74.4)	33.1 (24.1-48.4)	ND	ND
5loci data	24.2 (8.0-infinity)	58.3 (20.5-infinity)	26.2 (17.8-41.4)	26.3 (18.6-38.8)	ND
4loci data	12.4 (9.2-infinity)	59.7 (16.7-infinity)	35.2 (19.4-81.9)	22.6 (14.9-36.3)	95.3 (22.6-infinity)

5. 本研究により得られた成果

(1) 科学的意義

1) ヘア・トラップ調査の分析精度を初めて実証的に検証した

日本のツキノワグマおよびヒグマを対象としたヘア・トラップ調査は既に多くの自治体で実施されており、環境省の「種の多様性調査」でも採用されている。しかし、得られたデータの精度を検証する研究は行われていない。一般に、ヘア・トラップを用いた個体数（個体密度）推定法では、直視法や痕跡調査法等の従来法よりも、より大きい推定値が得られる傾向がある。例えば、平成20年度環境省自然環境保全基礎調査（山形県）のヘア・トラップ調査では、従来法の2倍以上の推定値が得られている。そのためDNA分析を用いたクマ類の個体数推定では、過剰推定の可能性を検証することが研究上の課題となっていた。それに対して、本研究では大規模調査で多数のサンプルを得ることにより、これまで実現できなかった分析精度の推定と、誤判定データ（エラーデータ）の検出を統計学的に行ない、過剰推定がどのように生じるのかを実証データを用いて示した。以上の成果は、個体群生態学および分子生態学上の新知見として、ヘア・トラップ調査の分析技術の信頼性向上に大きく資するものである。

2) ツキノワグマとヒグマの生態研究の新展開をもたらす標準的分析法を確立した

わが国のクマ類の調査・研究では、研究機関によって遺伝マーカーや分析条件が異なり、データの互換性がないために、大規模な共同研究や複数の地域個体群を対象としたメタ解析ができないという問題点があった。この問題を解決するために本研究では、標準的分析手法を確立し、複

数機関でのデータ校正用の標準分析サンプル（標準DNA）を無償で供与する体制を整備した。これにより、過去の研究も含め国内各研究機関が所有するクマ類の遺伝子データを統合的に利用する新たな研究展開が可能となった。

（２）環境政策への貢献

1) クマ類生態調査における費用対効果の改善

ヘア・トラップを用いた個体数推定は多くの場合、1調査あたり数百万円以上の費用を要するので、コスト削減が大きな課題となっている。本研究では、特にDNA分析の工程に関して、費用対効果を改善する次のような具体的方策が得られた。

改善策として、先ず、分析試料数が予算上で制限される場合には、10本以上の試料を選択的に分析することが推奨される。実際に、本研究の平成22年度の北上山地におけるヘア・トラップ調査では、10本以上の試料は全体の約30%であったことを考慮すると、10本以上の試料を優先的に分析することによるコスト低減効果は大きいと考えられる。ただし、その場合でも標識捕獲法の前提となる無作為抽出の条件に抵触しない選択方法を採用することが望ましい。

二番目の改善策として、試料採取を遅くとも8月上旬までに終わることが、成功率の上昇につながり、分析費用の削減に効果的であることが示された。自治体を実施するフィールド調査は予算執行の時期が年度後半になることが多い。しかし、本研究の結果は、ヘア・トラップ調査は初夏には着手すべきであることを明確に示す事例として、自治体が調査計画を策定する際に参考となると考えている。

以上の改善策に加えて、DNA分析の費用が増加する一因である再分析の回数を最小にするための効率的分析手順をマニュアル化して公開した（事項参照）。

2) “公定法”の役割を果たす標準的分析法の公開

本研究では、自治体等がヘア・トラップ調査を実施する際のガイドラインとなる標準的分析法を定めた。特に、個体数推定のためのDNA分析に関して、遺伝マーカーの選択方法、遺伝子増幅反応条件、遺伝子型の判定基準、分析精度の検証方法について、本研究で具体的な指針が提示された。以上の成果をクマ類のヘア・トラップ調査におけるDNA分析に関する技術情報と共に、ウェブ上の共有プラットフォームとして一般に公開した。

- クマ類の個体数を調べる：ヘア・トラップ法とカメラトラップ法の手引き（統合版）（印刷配布） URL：<http://www.bear-project.org/pdf/Tebiki/tebiki-tougou.pdf>
- ヘア・トラップ試料のDNA分析マニュアル（電子版のみ提供）
URL：<http://www.bear-project.org/>
- 遺伝子分析データの精度管理と標準化のためのデータ解析環境：共有プラットフォーム
URL：<http://www.bear-project.org/DNA/platform/PlatformTop.html>

6. 国際共同研究等の状況

特に記載すべき事項はない。

7. 研究成果の発表状況

(1) 誌上発表

< 論文 (査読あり) >

- 1) Uno, R., Kondo, M., Yuasa, T., Yamauchi, K., Tsuruga, H., Tamate, H.B., and Yoneda, M. 2012. Assessment of genotyping accuracy in a non-invasive DNA-based population survey of Asiatic black bears (*Ursus thibetanus*): lessons from a large-scale pilot study in Iwate prefecture, northern Japan. *Population Ecology*, 54: 509-519 (2012), DOI: 10.1007/s10144-012-0328-3.

< その他誌上発表 (査読なし) >

特に記載すべき事項はない。

(2) 口頭発表 (学会等)

- 1) Uno, R., Higashi, H., Tamate, H.B. Parentage analysis revealed solitary life of an orphaned cub of the black bear (*Ursus thibetanus*). International Symposium on Conservation of Asian Black bear. Taipei, Taiwan, 2009年11月.
- 2) 近藤麻実・山内貴義：DNAマーカーによる個体識別法 分析成功率に何が影響するか. 日本哺乳類学会2010年度大会、岐阜大学. 2010年9月.
- 3) 鶴野レイナ・玉手英利・釣賀一二三・湯浅卓・山内貴義・近藤麻実：DNAマーカーによる個体識別法 精度管理をどうするか. 日本哺乳類学会2010年度大会、岐阜大学. 2010年9月.
- 4) 齊藤正恵・青井俊樹：食痕からのDNA採取 加害個体判別の課題. 日本哺乳類学会2010年度大会、岐阜大学. 2010年9月.
- 5) 近藤麻実・鶴野レイナ：DNA分析における精度管理と効率化. クマ類の個体数推定法の開発環境省究総合推進費プロジェクトから. 日本哺乳類学会2011年度大会、宮崎. 2011年9月.

(3) 出願特許

特に記載すべき事項はない。

(4) シンポジウム、セミナーの開催 (主催のもの)

- 1) 「クマの毛からわかること」、岩手県岩泉町町民会館 (岩泉町共催) (2010年7月25日)
- 2) 「ツキノワグマを調べる! ~森には何頭のクマさんが?~」、岩手県立博物館 (岩手県立博物館共催) (2011年9月25日)
- 3) 「クマ類の個体数推定に関するワークショップ」、富山国際会議場 (富山県自然保護課・環境省中部地方事務所共催) (2011年10月17日)

(5) マスコミ等への公表・報道等

特に記載すべき事項はない。

(6) その他

特に記載すべき事項はない。

8. 引用文献

- 1) 環境省. 2005. 平成17年度 自然環境基礎調査 種の多様性調査 (岩手県) 報告書. 環境省自然保護局生物多様性センター, 富士吉田. 43pp.
- 2) 環境省. 2009a. 平成20年度 自然環境基礎調査 種の多様性調査 (宮城県) 報告書. 環境省自然保護局生物多様性センター, 富士吉田. 100pp.
- 3) 環境省. 2009b. 平成20年度 自然環境基礎調査 種の多様性調査 (山形県) 報告書. 環境省自然保護局生物多様性センター, 富士吉田. 73pp.
- 4) 環境省. 2009c. 平成20年度 自然環境基礎調査 種の多様性調査 (山梨県) 報告書. 環境省自然保護局生物多様性センター, 富士吉田. 111pp.
- 5) 環境省. 2009d. 平成20年度 自然環境基礎調査 種の多様性調査 (奈良県) 報告書. 環境省自然保護局生物多様性センター, 富士吉田. 76pp.
- 6) 森光由樹. 2008. 各都道府県のヘア・トラップ調査の実施状況と長野県における実施例 哺乳類科学 48 : 133-138.
- 7) 佐藤喜和・湯浅卓. 2008. ヘア・トラップを用いたクマ類の個体数推定法: 概要と注意点 哺乳類科学 48 : 101-107
- 8) 釣賀一二三・間野勉. 2008. 北海道渡島半島におけるヒグマ保護管理計画とモニタリング 哺乳類科学 48 : 91-100.
- 9) 山内貴義・齊藤正恵. 2008. 岩手県におけるヘア・トラップの実施状況と今後の課題. 哺乳類科学 48 : 125-131.
- 10) 湯浅卓・佐藤喜和. 2008. ヘア・トラップを用いたクマ類の個体数推定法における課題—国内外の事例の比較検討— 哺乳類科学 48 : 109-118.
- 11) Itoh, T., Sato, Y., Mano, T. and Iwata, R. 2009. Estimating a suitable microsatellite marker set for individual identification and parentage tests of brown bear (*Ursus arctos*) in the Akan-Shiranuka region, eastern Hokkaido, Japan. Journal of Forest Research 14: 117-122.
- 12) Paetkau, D., Calvert, W., Stirling, I. and Strobeck, C. 1995. Microsatellite analysis of population structure in Canadian polar bears. Molecular Ecology 4: 347-354.
- 13) Kitahara, E., Isagi, Y., Ishibashi, Y. and Saitoh, T. 2000. Polymorphic microsatellite DNA markers in the Asiatic black bear *Ursus thibetanus*. Molecular Ecology 9: 1661-1662.
- 14) Taberlet, P., Camarra, J. J., Griffin, S., Uhres, E., Hanotte, O., Waits, L. P., Dubois-Paganon, C., Burke, T. and Bouvet, J. 1997. Noninvasive genetic tracking of endangered Pyrenean brown bear population. Molecular Ecology 6: 869-876.
- 15) Shih, C. C., Huang, C. C., Li, S. H., Hwang, M. H. and Lee, L. L. 2009. Ten novel tetranucleotide microsatellite DNA markers from Asiatic black bear, *Ursus thibetanus*. Conservation Genetics 10: 1845-1847.
- 16) Sanderlin, J. S., Faircloth, B. C., Shamblin, B. and Conroy, M. J. 2009. Tetranucleotide microsatellite loci from the black bear (*Ursus americanus*). Molecular Ecology Resources 9: 288-291.
- 17) Meredith, E. P., Rodzen, J.A., Banks, J. D. and Jones, K. C. 2009. Characterization of 20 tetranucleotide microsatellite loci in black bear (*Ursus americanus*) for used in forensic and population applications. Conservation Genetics 10: 693-696.

- 18) Waits, L. P., Luikart, G. and Taberlet, P. 2001. Estimating the probability of identity among genotypes in natural populations: cautions and guidelines. *Molecular Ecology* 10: 249-256.
- 19) Creel, S., Spong, G., Sands, J. L., Rotella, J., Zeigle, J., Joe, L., Murphy, K. M. and Smith, D. 2003. Population size estimation in Yellowstone wolves with error-prone noninvasive microsatellite genotypes. *Molecular Ecology* 12: 2003-2009.
- 20) McKelvey, K. S. and Schwartz, M. K. 2004. Genetic errors associated with population estimation using non-invasive molecular tagging: problems and new solutions. *Journal of Wildlife Management* 68: 439-448.
- 21) Paetkau, D. 2004. The optimal number of markers in genetic capture-mark-recapture studies. *Journal of Wildlife Management* 68: 449-452.
- 22) Paetkau, D., Shields G.F. and Strobeck, C. 1998. Gene flow between insular, coastal and interior populations of brown bears in Alaska. *Molecular Ecology* 7: 1283-1292.
- 23) Taberlet, P., Griffin, S., Goossens, B., Questiau, S., Manceau, V., Escaravage, N., Waits, L.P. and Bouvet, J. 1996. Reliable genotyping of samples with very low DNA quantities using PCR. *Nucleic Acids Research* 24: 3189-3194.
- 24) Wilberg, M. J. and Dreher, B. P. 2004. GENECAP: a program for analysis of nuclear data for capture-recapture population estimation. *Molecular Ecology Notes* 4: 783-785.
- 25) Yamamoto, K., Tsubota, T., Komatsu, T., Katayama, A., Murase, T., Kita, I. and Kudo, T. 2002. Sex identification of Japanese black bear, *Ursus thibetanus japonicus*, by PCR based on amelogenin gene. *Journal of Veterinary Medical Sciences* 64: 505-508.
- 26) Pages, M., Maudet, C., Bellemain, E., Taberlet, P., Hughes, S. and Hanni, C. 2009. A system for sex determination from degraded DNA: a useful tool for palaeogenetics and conservation genetics of ursids. *Conservation Genetics* 10: 897-907.
- 27) Johnson, P.C.D. and Haydon, D.T. 2007. Maximum-likelihood of allelic dropout and false allele error rates from microsatellite genotypes in the absence of reference data. *Genetics* 175: 827-842.
- 28) Waples, R. S. 1989. A generalized-approach for estimating effective population-size from temporal changes in allele frequency. *Genetics* 121: 379-391.
- 29) Waples and Yokota M 2007. Temporal estimates of effective population size in species with overlapping generations. *Genetics* 175: 219-233.
- 30) Anderson, E.C., Williamson, E.G. and Thompson, E.A. 2000. Monte Carlo evaluation of the likelihood for N-e from temporally spaced samples. *Genetics* 156: 2109-2118.
- 31) Hills W.G. 1981. Estimation of effective population size from data on linkage disequilibrium. *Genetical Research*. 38: 209-216.
- 32) Wang, J. 2009. A new method for estimating effective population sizes from a single sample of multilocus genotypes. *Molecular Ecology* 18: 2148-2164.
- 33) 釣賀一二三・間野勉・近藤麻実. 2011. 積丹・恵庭（石狩西部）地域ヒグマ個体群の遺伝的多様性の評価. 北海道生物多様性保全モニタリングに関する研究報告書. 北海道環境科学研究センター・北海道立林業試験場・北海道中央農業試験場・札幌市立大学. pp. 167-176.
- 34) 北海道生活環境部自然保護課. 1986. 野生動物分布等実態調査報告書ーヒグマ・エゾシカアン

- ケート調査報告書一. 北海道生活環境部自然保護課. 115pp.
- 35) 北海道環境科学研究センター. 2000. ヒグマ・エゾシカ生息実態調査報告書IV. 北海道環境科学研究センター. 118+21pp.
- 36) 玉手英利・釣賀一二三・山内貴義・湯浅卓・鶴野レイナ・近藤麻実. 2010. 2.1個体数推定に関わるDNA分析法の確立. 平成21年度環境研究・技術開発推進費, クマ類の個体数推定法の開発に関する研究平成21年度報告書. 自然環境研究センター・森林総合研究所・北海道立総合研究機構・山形大学・岩手大学・横浜国立大学・早稲田大学・日本大学・岩手県立環境保健研究センター・野生動物保護管理事務所. pp. 68-81.
- 37) 米田政明・常田邦彦・間野勉・佐藤喜和. 2012. (1) ヘア・トラップ法による個体数推定法の確立に関する研究. (平成23年度環境研究・技術開発推進費, クマ類の個体数推定法の開発に関する研究成果報告書, pp.1-30 自然環境研究センター・森林総合研究所・北海道立総合研究機構・山形大学・岩手大学・横浜国立大学・早稲田大学・日本大学・岩手県立環境保健研究センター・野生動物保護管理事務所).
- 38) 中下留美子・鈴木彌生子・林秀剛・泉山茂之・中川恒祐・八代田千鶴・浅野玄・鈴木正嗣. 乗鞍岳畳平で人身事故を引き起こしたツキノワグマの食性履歴の推定-安定同位体分析による食性解析-. 2010. 哺乳類科学 50: 43-48.
- 39) England, P.R., Cornuet, J.M., Berthier, P., Tallmon, D.A. and Luikart, G. 2006. Estimating effective population size from linkage disequilibrium: severe bias in small samples. *Conservation Genetics* 7: 303-308.
- 40) 鶴野レイナ・東英生・玉手英利. 2009. 親子判定で明らかになったツキノワグマ幼獣の単独行動. 哺乳類科学 49: 217-223.

(3) 補完法・代替法の開発に関する研究

早稲田大学 人間科学部

三浦 慎悟

岩手大学 農学部

青井 俊樹

<研究協力者>

新潟大学大学院（院生フェロー研究員）

東出 大志

平成21～23年度累計予算額：6,513千円（うち23年度予算額：3,656千円）

予算額は、間接経費を含む。

【要旨】 クマ類の個体数推定法としてヘア・トラップ法が定着しつつあるが、この方法には試料採取過程、DNA分析過程に多くの問題点が指摘されてきた。ここでは、ヘア・トラップ法に変わる新たな方法の提案を主要な課題とし、カメラトラップと生体標識を用いたツキノワグマ個体数推定手法の開発に向けて、4つのテーマに取り組んだ。まず (i) ツキノワグマにおける個体識別部位（Natural-marking）の探索を行い、胸部斑紋による個体識別の可能性を確認した。次に (ii) ツキノワグマにおける胸部斑紋を用いた個体識別の信頼性検証において、クマ牧場飼育個体の胸部斑紋を対象に、画像解析やブラインドテストを用いた詳細な検討を行った。その結果、ツキノワグマの胸部斑紋は、普遍性、唯一性、持続性および簡便性を満たす優れた生体標識であり、簡便に高精度の識別が可能であることが確認された。(iii) カメラトラップによる胸部斑紋の撮影手法開発では、野生個体を対象に自動撮影カメラを用いた胸部斑紋撮影手法の開発を実施し、個体識別可能な画像サンプルを安定的に採取可能なカメラトラップを構築した。最終的に (iv) ツキノワグマ個体数推定調査におけるカメラトラップ法の適用として、北上モデル調査地に80基のカメラトラップを設置し個体数推定を実施し、その有用性を示した。今後解決すべき課題もあるが、我々の開発したカメラトラップ法は、ツキノワグマの個体数推定における実用的な調査手法であり、保護管理の現場での活用が期待される。また、個体数推定とともにクマ類の保護管理において重要と考えられる加害個体の特定に向けて、(v) 痕跡からのDNA抽出による個体識別法の開発の現状についてのレビューを実施し、被害作物の食痕からDNAを採取し個体識別を行う手法を示した。

【キーワード】 カメラトラップ、生体標識、胸部斑紋、個体識別、保護管理

1. はじめに

科学的で的確な野生動物の保全や管理にとって正確な個体数の把握は欠かせない。そして標識再捕獲法の原理を用いた正確な個体数推定の実施に際しては、対象とする動物の個体を識別する技術が要求される。近年、個体識別に際しては非侵襲的手法の利用が一般的であり、クマ類の生息数推定にはヘア・トラップ法（遺伝的タギング法）が広く用いられるようになってきた^{1),2)}。だが、この方法には、体毛サンプルの採取過程やDNA分析過程において、コンタミの発生や体毛サンプルの劣化、DNA抽出率の低下、読み取りエラーなど様々な課題も報告されている^{3),4)}。加えて、DNA分析に要する金銭的成本や専門性が、保護管理計画の策定に伴った個体数推定調査の実施に際して障壁となることも多い。したがって、クマ類の個体数推定法の確立には、ヘア・ト

ラップ法にまつわるこれらの問題点を解決すると同時に、それに替わる新たな手法の開発が求められる。現在クマ類ではほとんど用いられていないが、ヘア・トラップと同様の非侵襲的な個体数推定調査手法として、生体標識（natural-marking）による個体識別と、カメラトラップ（CT）によるサンプリングを組み合わせた手法が知られている。動物が持つ模様のパターンなどの生体標識を用いたこの個体識別手法は、毛皮に特徴的な模様を有するネコ科哺乳類をはじめ、様々な動物で古くから利用されてきた^{5),6)}。これに近年利用が盛んな自動撮影カメラを用いたカメラトラップによるサンプリングを組み合わせた調査手法は、様々な動物の個体数推定調査において広く用いられるようになってきている^{7),8)}。この手法には非侵襲性であることに加え、安価で簡便、高精度であるという利点がある。そこで本サブテーマでは、ツキノワグマの個体数推定における新たな方法として、生体標識を用いたカメラトラップによる調査手法の開発を主要な課題として設定した。

また、クマ類の保護管理においては農林業被害や人身被害など、近年増加傾向にある人間との軋轢を軽減することも重要な意味を持つ。こうした軋轢への対処として、多くの自治体では有害捕獲を実施しており、個体数推定値に基づいた捕獲上限が定められている。そのためこれまで数多くの個体が捕殺されてきたが、必ずしもそれが被害低減には繋がっていないのが現状である。したがってクマ類の保護管理においては、個体数推定に基づく保護管理（個体群管理）だけではなく、加害個体を特定したうえでの管理（個体管理）が重要であると考えられる⁹⁾。そこで本サブテーマでは、科学的根拠に基づいた加害個体の特定へ向け、痕跡からのDNA抽出による個体識別法の開発の現状についてのレビューも併せて実施した。

2. 研究開発目的

ツキノワグマの保護管理のため、地方自治体などが実施する個体数推定において利用可能な、安価で簡便、高精度な調査手法を提案することを本サブテーマの上位目的とした。生体標識とカメラトラップを用いたツキノワグマの個体数推定調査手法の確立に向けて、(i) ツキノワグマにおける個体識別部位の探索、(ii) ツキノワグマにおける胸部斑紋を用いた個体識別の信頼性検証、(iii) カメラトラップによる胸部斑紋の撮影手法開発、および (iv) ツキノワグマ個体数推定調査におけるカメラトラップ法の適用、以上4項目を具体的な目標に据えた。また、個体数推定とともにクマ類の保護管理において重要と考えられる加害個体の特定に向けて、(v) 痕跡からのDNA抽出による個体識別法の開発の現状についてのレビューを実施した。

3. 研究開発方法

(1) ツキノワグマにおける個体識別部位（Natural-marking）の探索

頭部形状、鼻紋、胸部斑紋および下顎紋の4部位を対象とし、個体識別への利用可能性を検証した。頭部形状の有効性については、頭骨の計測値を用いて検証を行うこととし、森林総合研究所東北支所所蔵のツキノワグマの頭骨から、様々な年齢階級、性別の82個体のサンプルを選択して計測した。計測に際しては、生体でも特徴が確認できることを前提に、目・鼻・口の3か所を対象とし、両目間・目鼻間・鼻幅・鼻口間・目口間の5項目の長さを測定した後、個体ごとに両目間を1とする相対値を算出し、比較を行った。鼻紋に関しては、秋田県の阿仁熊牧場にて撮影した飼育個体の写真から、鼻部が確認できた数個体の撮影画像を用いて検討した。胸部斑紋および下顎紋

に関しては、秋田県の阿仁熊牧場と岐阜県の奥飛騨クマ牧場において飼育個体の胸部写真を撮影し、その撮影画像を用いた。対象とする生体標識（胸部斑紋）を正確に記録するため、個体が誘引物に誘引されて直立姿勢をとった瞬間になるべく正面から撮影を行うことを原則とした。各牧場において採取されたサンプルは全70個体、計431枚である。

（2）ツキノワグマにおける胸部斑紋を用いた個体識別の信頼性検証

1）撮影方法

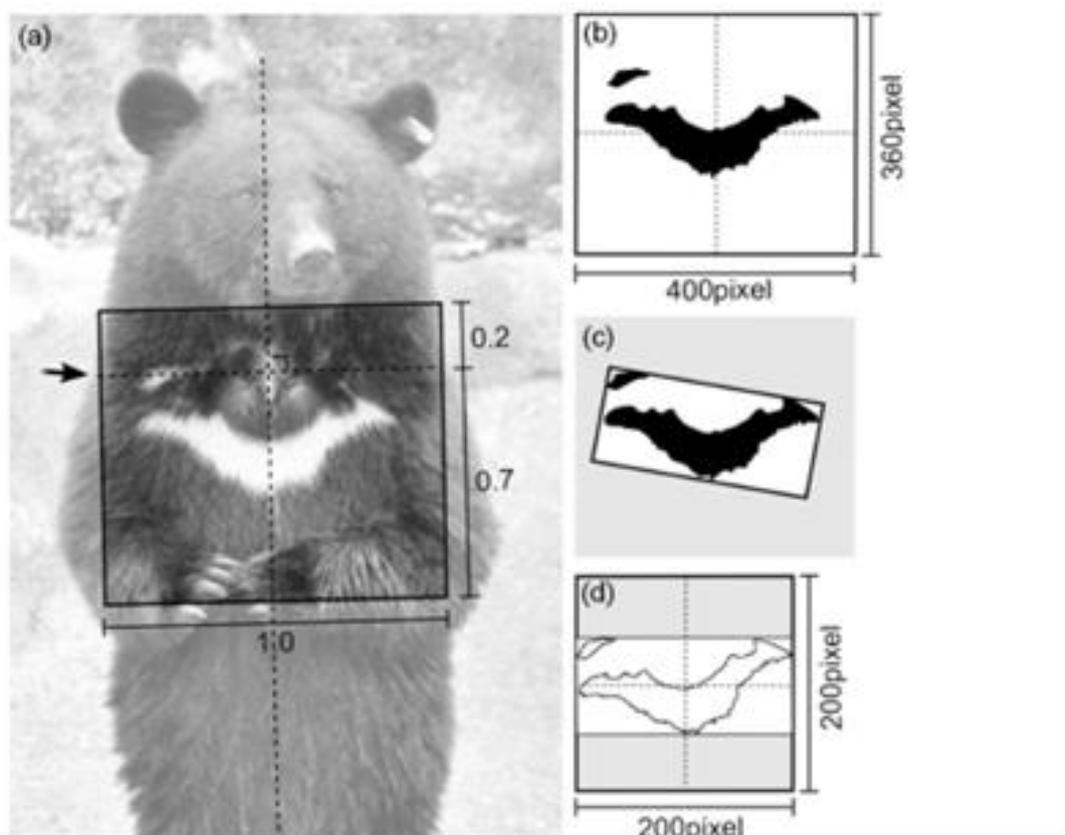
秋田県の阿仁熊牧場において、2009年夏、2010年春と夏の3シーズンにわたって撮影を実施し、これによって得られた飼育個体62頭の胸部画像を基に検討を行った。検討項目は普遍性、唯一性、持続性および簡便性の4項目である。普遍性は、62個体について胸部斑紋の有無を記録し、その発現率を算出した。唯一性は撮影時の角度やクマの姿勢変化がなく、正確に胸部斑紋を撮影できた52個体を、持続性は3シーズンの間継続的に斑紋を撮影できた16個体を対象とし、画像処理・解析を用いた検証を行った。簡便性は62個体の斑紋画像をもとにブラインドテストを実施することで検証した。

2）画像処理・解析

まずクマの毛流や頸部のくびれを参考に画像の正規化を行い（図(3)-1a）、次に正規化画像をグレースケール化、ノイズ除去、背景減算、二値化処理することで、胸部斑紋のみが抽出された比較画像1を作成した（図(3)-1b）。さらに得られた比較画像1の斑紋を左右末端が水平になるように回転させ（図(3)-1c）、その輪郭線のみが抽出された比較画像2を作成した（図(3)-1d）。続いて画像の解析を行い、比較画像1からサイズの指標として斑紋領域のピクセル数、位置の指標として斑紋領域の重心を、傾きの指標として斑紋領域を囲う最適楕円形の角度、比較画像2から形状の指標として輪郭線を構成する各ピクセルの座標を算出した。これら4つの特徴量を基に様々な画像間において斑紋の差異度を算出し、それを比較することで唯一性と持続性を検証した。唯一性の検証に用いた画像の組み合わせは、同一個体から2回の処理を通して得られた画像（52通り）、同一日に撮影された同一個体の異なる画像（43通り）、異なる個体の画像（52個体1,326通り）の3パターンである。持続性の検証は、同一日、2010年春から2010年夏の3か月、2009年夏と2010年春の9か月、2009年夏と2010年夏の12か月の異なる4期間において同一個体の斑紋の相違度を比較することで検証した。なお、すべての画像処理・解析に際してはImageJ（NIH, Bethesda, MD）を用いた。

3）ブラインドテスト

ブラインドテストは、目視による個体識別の精度を検討することを目的とし、新潟大学の学生と教員20名、本プロジェクトの研究者14名の計34名を対象に実施した。このテストは左右2枚の斑紋画像から同一個体か異個体かを判断するものである。各設問は、高品質写真の比較、撮影角度のある写真との比較、クマに姿勢変化がみられる写真との比較、の3通りで構成されており、全36問である。なお、テストに用いた画像は無作為に選択している。



図(3)-1 画像処理手順のイメージ

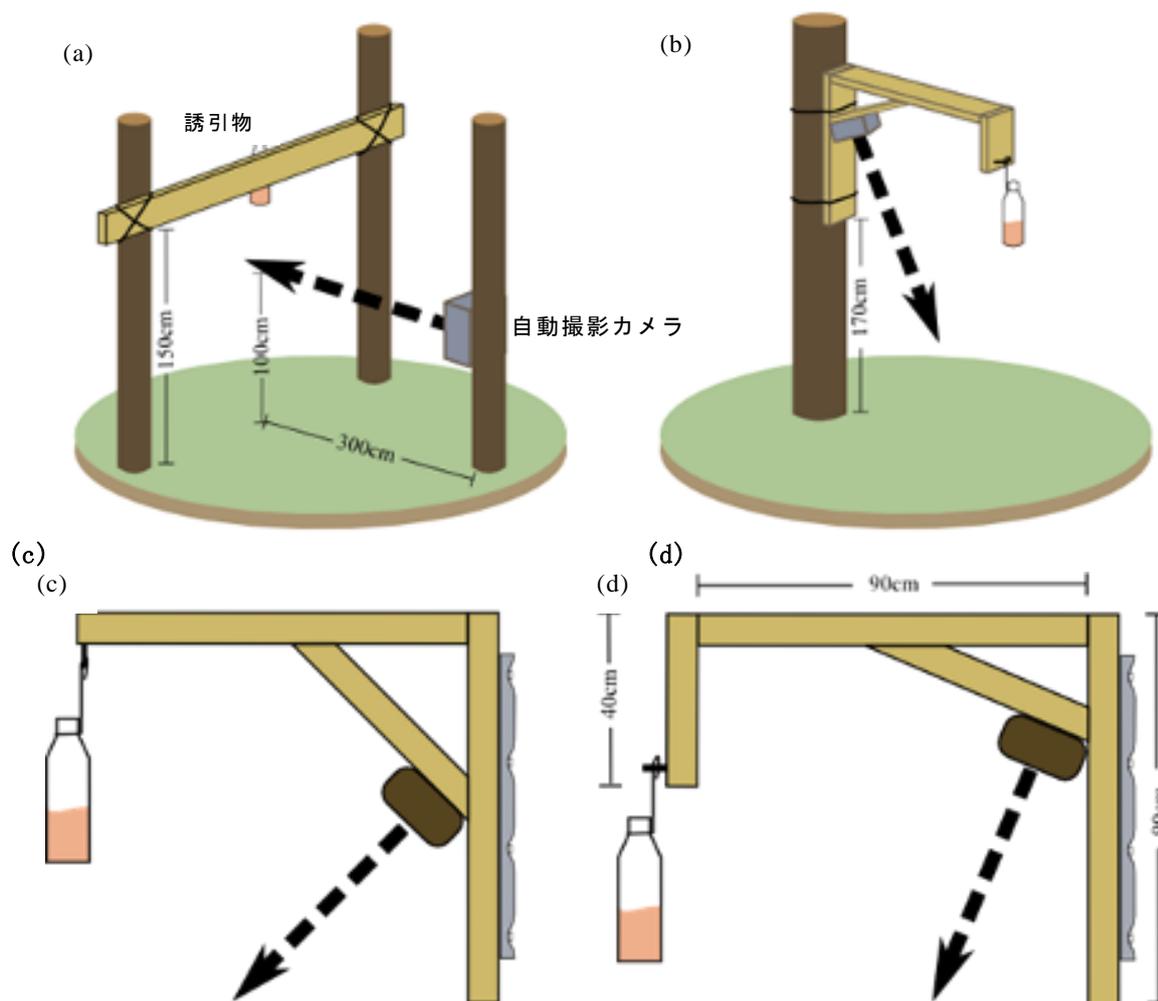
(3) カメラトラップによる胸部斑紋の撮影手法開発

1) カメラトラップの設置

大規模ヘア・トラップ調査地として選定した北上山地モデル地域の北東部、青松葉山の周辺地域 (N39°47', E141°28') において、2タイプのカメラトラップ (図(3)-2) を設置し、野生ツキノワグマ個体を対象とした撮影手法の開発を行った。本調査では斑紋撮影手法の提案を目的とするため、ヘア・トラップ設置点の中から、地形や植生、前セッションでの確認などの情報に基づき、よりツキノワグマの利用が期待される設置点をセッション間で流動的に選択し、カメラトラップを設置した。なお、調査は2010年の6月から8月に6セッション (約10日間/1セッション) 実施した。前半の4セッションは2タイプ (A1、B1) の撮影手法の試験を実施し、これを受けて改良した2タイプ (A2、B2) のカメラトラップについて、後半の2セッションで実用性の検討を行った。表(3)-1 に各調査セッションにおけるカメラトラップの設置地点数を示す。

表(3)-1 カメラトラップタイプと設置数

CTタイプ	セッション						計
	1	2	3	4	5	6	
A1	10	10	5	5			30
A2					20	20	40
B1			8	7			15
B2					20	20	40



図(3)-2 カメラトラップイメージ

2) カメラトラップ構造

斑紋の撮影に用いたカメラトラップはタイプAとタイプBの2種類である。タイプAは立木2本の間に150 cmの高さでSPF材（2×4材:1820×89×38mm）を地面と平行に設置、材の片面中央部に誘引物を取り付け、誘引物設置面の反対側からトラップ全体が撮影できるように自動撮影カメラを設置したトラップ設定である（図(3)-2a）。この設定では、ツキノワグマを直立姿勢に誘導することで斑紋の撮影を試みている。一方タイプBではSPF材で作成したL字型の構造物を170 cmの高さで立木に設置、L字の先端に誘引物を、L字の基部に下向きに自動撮影カメラが設置されている（図(3)-2b）。この設定では、ツキノワグマを樹に登らせ、背筋を反ったような姿勢に誘導することで斑紋の撮影を試みている。なお、前半4セッションの撮影状況を受けて、後半の2セッションではそれぞれの設定に改良を加えたため、これらを区別し、改良前をA1およびB1、改良後の設定をA2およびB2とする。A2における改良点は、誘引物のリングからハチミツへの変更と、誘引トラップとカメラの設置距離を3m以上に設定した点である。B2ではL字型の構造物において、誘引物の設置位置とカメラの設置角度に改良を加えた（図(3)-2c, d）。

自動撮影カメラは焦電型赤外線センサー内臓のBushnell® Trophy Cam (model:119435C)を使用した。カメラは動画撮影モード(サイズ640×480)で撮影時間は30秒または60秒、撮影後の休止時間を10秒、センサー感度をHighに設定して用いた。

3) 解析方法

ツキノワグマがカメラトラップに誘引された時、誘引個体の多くは連続して撮影される。したがって、連続して撮影された動画のうち1回でも斑紋が確認されていれば、個体識別の目的は達成できると考えられる。このような連続した撮影画像の取り扱いについて、撮影枚数を指標とした動物の相対密度の推定に際しては、同一個体の連続撮影による過大評価を防ぐために独立イベントを抽出することで比較が行われており、撮影間隔が30分以上である場合を独立イベントと判断している¹⁰⁾。そこで便宜的に30分を閾値として撮影をイベントごとに整理し、その中で誘引物が利用可能な状態であるイベント(有効イベント)を抽出した。この有効イベントを対象に各CT設定における撮影枚数や斑紋撮影率、斑紋写真の質などについて比較を行った。なお、斑紋撮影率=斑紋撮影イベント数/有効イベント数である。撮影斑紋の質は3段階で評価し、体勢変化やブレがなく斑紋全体が明瞭に撮影されている場合をA、ブレや形の変化は多少見られるが全体を撮影できているものをB、姿勢変化などにより一部しか撮影されなかった場合をCとした(図(3)-3)。

(4) ツキノワグマ個体数推定調査におけるカメラトラップ法の適用

1) 北上山地調査地カメラトラップ設置

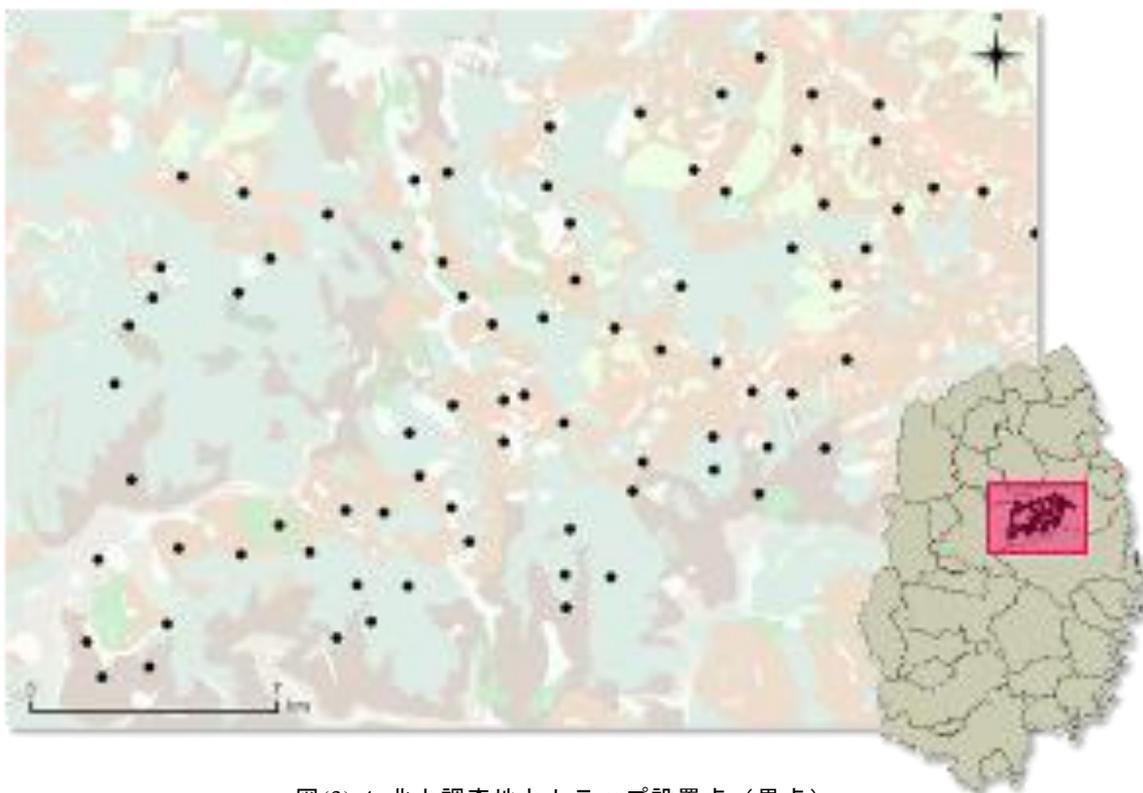
2010年北上モデル調査地北部の約340km²の範囲を調査地とし、2011年の6月末から8月末にかけて5セッション(10日間/1セッション)の調査を実施した。調査には前年度開発したカメラトラップ(タイプA)を用い、調査地内80地点に設置した(図(3)-4,(3)-5)。2010年と同様、誘引物はハチミツであり、匂い拡散のため上部に複数の穴をあけたペットボトルに200ml程度を入れて使用した。自動撮影カメラはBushnell® Trophy Cam(2010年および2011年モデル)を使用し、動画撮影モード、撮影時間30秒、休止時間1秒、センサー感度をHighに設定した。

2) 動画サンプル整理

撮影動画をすべて確認し、クマが撮影されているものについては斑紋の撮影状況と、その時点における誘引物の有無を記録した。斑紋が撮影された場合、動画内で最も正確に斑紋を捉えた瞬間を静止画として切り出し、前年度同様に斑紋の撮影品質に従い3段階に分類した(図(3)-3)。また、斑紋が撮影されなかった動画については、その時のツキノワグマの行動を記録した。



図(3)-3 胸部斑紋の撮影品質



図(3)-4 北上調査地とトラップ設置点（黒点）



図(3)-5 トラップ設置状況

3) 個体識別

胸部斑紋の撮影品質がAおよびBの画像を対象に実施し、品質がCの画像については、明らかに異なる特徴を有していると判断できる場合のみで利用した。個体識別は、斑紋の大きさや分裂の有無、凹凸形状とその位置などの情報を基に目視で行った。また、下顎紋や傷などそのほかの特徴を有する個体についてはこれらを補助的に用いた。

4) 個体数推定

第2セッション目以降の個体識別データを基に、統計解析ソフトRのパッケージとして公開されている、空間明示型標識再捕獲モデルのSPACECAPを用いて推定を行った。

(5) 痕跡からのDNA抽出による個体識別法の開発

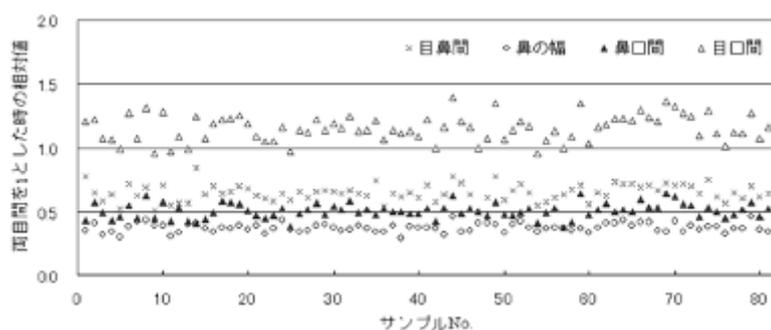
ツキノワグマの口腔内剥離細胞を採取するため、食害発生地に残された食痕試料の表面を滅菌した綿棒で拭い、綿棒の先をDNAの安定剤（EDTA）を添加したDNA抽出バッファーの中に折り入れた。DNAの抽出は、綿棒を入れたまま行なった。まず、フェノール・クロロフォルム抽出を行い¹¹⁾、続いて植物由来のポリフェノールや多糖類を除去するためにCTAB処理¹²⁾を行った。回収したDNAは水で溶解し分析に供した。個体識別用のマイクロサテライト配列¹³⁾のうち6座位と、性別用のアメロゲニン遺伝子¹⁴⁾を増幅した。これら手法詳細は齊藤¹⁵⁾にとりまとめられている。

4. 結果及び考察

(1) ツキノワグマにおける個体識別部位（Natural-marking）の探索

1) 頭部形状

両目間の距離を1とした時の各項目の相対値は、個体毎に異なる値を示した（図(3)-6）。特に目口間で変異が大きいのが、鼻幅では変異が小さい事がわかる。これは、基準とした両目間の距離が横方向の変化であるのに対し、目口間は縦方向、鼻の幅は横方向の変化であることによると考えられる。この結果は方向性の異なる測定値の比率を用いることで、より大きな変異が抽出されることを示唆している。各項目では変異が認められたものの、今回用いた特徴だけでは個体識別を行うには不十分であった。しかし、これ以上の特徴を生体の頭部から抽出することは難しいため、現時点では個体識別における頭部形状の利用は難しく、その有効性は低いと考えられる。



図(3)-6 各個体における頭骨計測値の相対値分布

2) 鼻紋

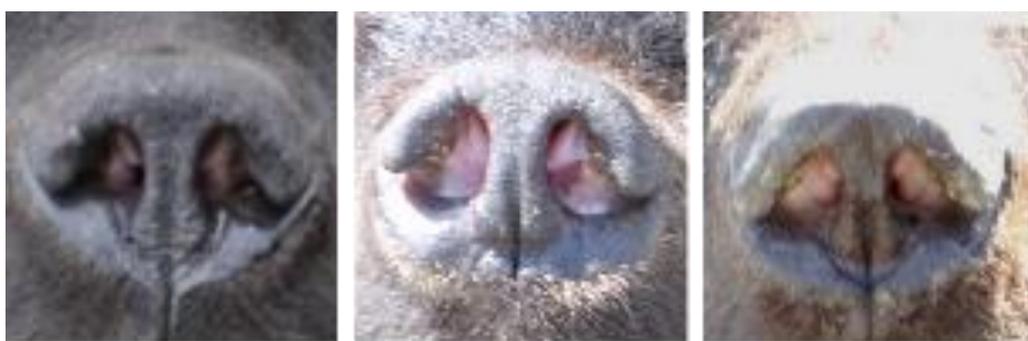
いずれの個体においてもほとんど鼻紋は確認されなかった（図(3)-7）。唯一明瞭な特徴は、鼻の中心部に見られる筋と、それと交差するように左右の鼻の穴にかけて見られる筋の2つであるが、この特徴は複数個体で共通して確認された。また、それ以外に鼻紋らしき特徴は撮影画像からは確認できなかったため、個体識別における鼻紋の有効性は低いと考えられる。

3) 胸部斑紋（月の輪紋）

分析対象とした70個体のうち、胸部に月の輪紋が確認されたのは68個体であり、全体の97%であった（表(3)-2）。この68個体はいずれも異なる斑紋パターンを有しており、特にその大きさ、位置、分裂の有無および極端な凹凸形状などによって容易に識別が可能であった（図(3)-8）。斑紋が分裂した個体の識別が最も容易であり、他の特徴を用いずとも分裂の位置関係だけで識別は可能である（図(3)-8b）。ツキノワグマ胸部の月の輪紋は個体間でその形状に大きな変異があり、サイズに関する項目としては特に長さや太さが、形状に関しては月輪紋の分裂や特徴的な凹凸形状などが識別に際して有効な指標であると考えられる。なお、一部個体では月の輪紋が認められなかったが（図(3)-8c）、97%と大多数の個体で月の輪紋が確認されたため、識別に際し十分に指標として利用可能であると判断した。

4) 下顎紋

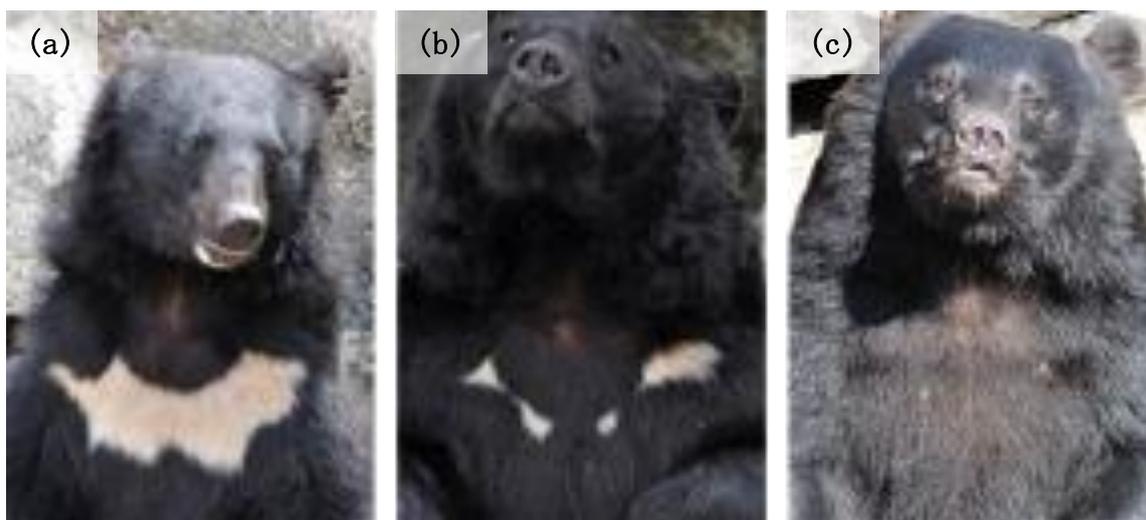
全70個体のうち28個体、40%と比較的多くの個体で下顎紋が確認された（表(3)-3）。下顎紋の形状は把握が難しい上に、サイズが小さいこともあって胸部斑紋ほど形状に変異が見られないが、位置情報は容易に得る事が可能である。例えば図(3)-9aの個体では、下顎紋が左側に寄っていることがわかる。同様に図(3)-9bの個体は中央、図(3)-9cの個体は右側と、位置情報によって大きく3パターンに分類が可能であった。比較的多くの個体で確認でき、数パターンの判別は容易であることから、下顎紋を有する個体においては有効な指標となり得ると考えられる。



図(3)-7 3個体の鼻部画像

表(3)-2 撮影枚数と撮影個体および月の輪紋の有無

	撮影枚数	撮影個体	月の輪紋	
			あり	なし
阿仁熊牧場	308	50	49 (98%)	1 (2%)
奥飛騨クマ牧場	123	20	19 (95%)	1 (5%)
計	431	70	68 (97%)	2 (3%)



図(3)-8 胸部斑紋の一例



図(3)-9 下顎紋の一例

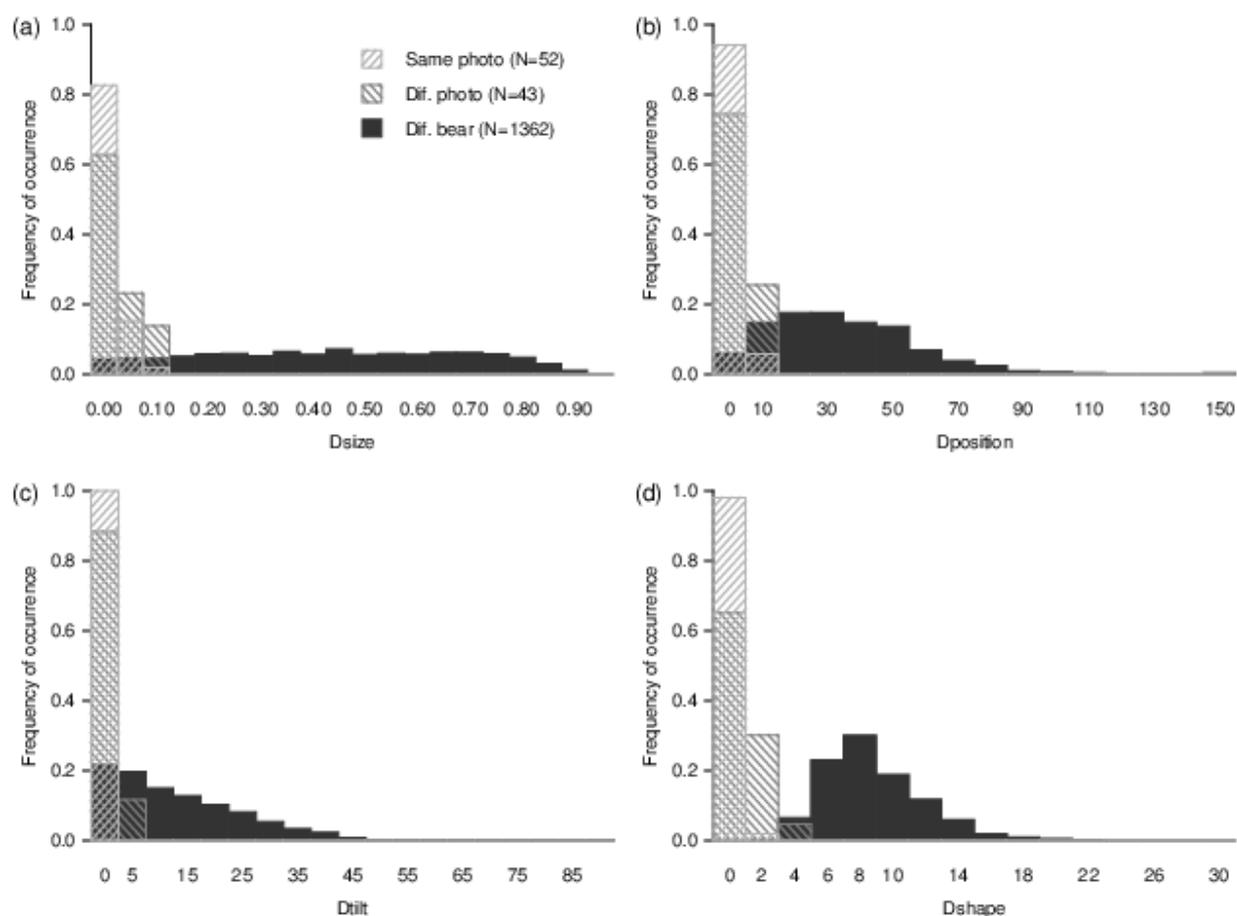
表(3)-3 下顎紋の確認個体と位置情報の内訳

撮影場所	撮影個体	下顎紋確認個体	下顎紋の位置		
			左側	中央	右側
阿仁熊牧場	50	22	5	13	4
奥飛騨クマ牧場	20	6	0	5	1
計	70	28 (40%)	5 (18%)	18 (64%)	5 (18%)

(2) ツキノワグマにおける胸部斑紋を用いた個体識別の信頼性検証

1) 普遍性

阿仁クマ牧場で飼育されている62個体のツキノワグマのうち、59個体95%の個体で胸部斑紋が確認された。100%ではないものの、胸部斑紋はほぼすべての個体が有する普遍的な特徴であると考えられる。しかし、西日本の個体群では胸部斑紋を持たない個体が多いとの報告もある。これは個体群縮小による多様性低下の結果とも考えられるが、今後野生個体を対象とした調査を実施する上で、各地域個体群を対象とした胸部斑紋の発現率の調査も必要となるかもしれない。



図(3)-10 画像間におけるツキノワグマ胸部斑紋相違度の頻度分布

2) 唯一性

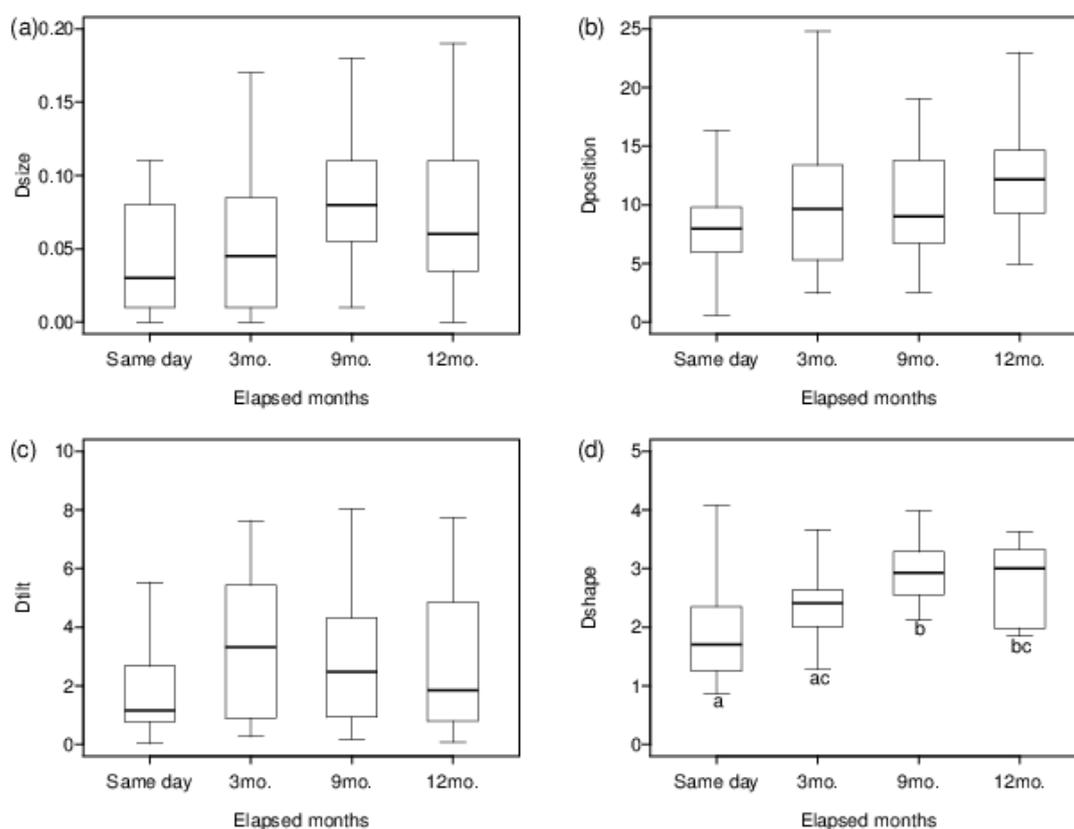
胸部斑紋における面積、位置、角度および形状、4つの特徴はいずれも個体間で大きく異なっていた(図(3)-10)。面積の相違度は一様に分布(range: 0.00-0.94)しており、個体間において斑紋サイズの変異が大きいことがわかる(図(3)-10a)。重心の差もばらつきがあり(range: 1.8-135.9)、個体間の斑紋発現位置に変異が認められるが、分布は40ピクセルを中心とした山型であり、僅かながら差が小さい側に偏っている(図(3)-10b)。同様に傾きの差も値はばらついており(range: 0.0-57.3)、個体間の斑紋角度に変異が認められるが、その分布は5°をピークに右肩下がりの傾向を示す(図(3)-10c)。輪郭線のズレの平均値も大きくばらついており(range: 12.7-66.1)、その分布は10ピクセルを中心とした一山型である(図(3)-10d)。

一方で同一個体の画像間の比較においては、同じ写真を用いた場合にも僅かな差が検出された(図(3)-10: 薄灰斜線部)。同一写真において斑紋の持つ特徴は同じであるため、この画像間の差は、写真から比較画像を生成する際の正規化および斑紋抽出過程に生じた人為的誤差と捉える事ができる。また、同様に同一日に撮影された同一個体の画像比較でも差が検出され、同一写真における差よりも大きな値を示した。これは上記誤差に加え、撮影時の微妙なアングルやピントの違い、個体の姿勢変化が生じた影響であると考えられる。個体識別においては、個体間の差異が、これら個体内の相違よりも大きいことが前提となる。つまり、個体内の差よりも大きな相違

度が検出された場合には、2枚の画像は別個体のものであると判定できるが、個体間の差異が個体内の差異と重複する場合、その識別は不可能となる（または誤って同一個体と判定される）。このような重複が起こる頻度（つまり異なる2個体が同一個体であると誤って判定される確率）はDNA解析においても P_{id} (Probability of identity)として算出されており、個体識別の精度の評価や、用いるマイクロサテライトの選定に利用されている。4つの胸部斑紋の特徴においてこの P_{id} を算出した結果を表(3)-4に示す。 P_{id} は傾きで最も高く、形状で最も低い値であった。つまり、個体識別において形状が最も有効な特徴であり、傾きにはほとんど個体差がなく個体識別における有用性は低いと考えられる。なお、52個体1326通りの組み合わせのうち、4つの特徴すべてが一致し、同一個体と誤判別された事例はなく、胸部斑紋を用いた個体識別の P_{id} は0.00075以下であると考えられた。胸部斑紋の特徴は個体ごとに著しく異なっており、唯一性を満たす有用な個体識別標識であることが明らかとなった。

表(3)-4 各特徴における相違度の範囲と P_{id}

特徴	相違度の範囲		重複数	P_{id}
	個体内	個体間		
サイズ	0.00 - 0.15	0.00 - 0.94	178	0.134
位置	0.18 - 16.36	1.79 - 135.86	194	0.146
傾き	0.02 - 9.82	0.04 - 57.32	537	0.405
形状	0.21 - 4.25	3.17 - 23.57	6	0.005



図(3)-11 各画像間における相違度の頻度分布

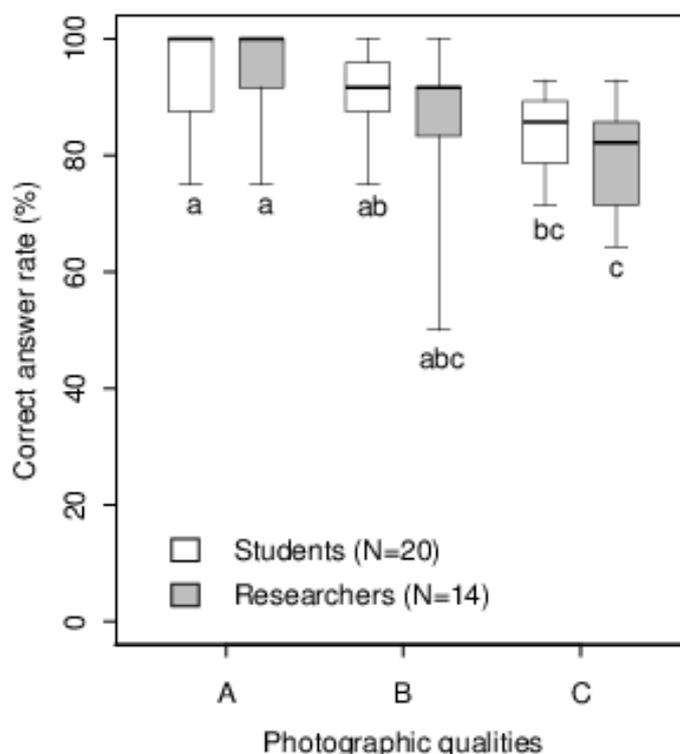
箱内部の太線は中央値、箱の上下は四分位点、上下に伸びる棒はそれぞれ最大値と最小値を示す。棒の下に付された異なるアルファベットは多重比較において有意な差が認められたことを示す。

3) 持続性

Kruskal-Wallis test の結果、胸部斑紋のサイズ、位置および傾きの3つの特徴量においては、4期間において相違度の分布に有意な差は認められなかった（図(3)-11a, b, c）。一方、形状においては各期間で相違度の分布に有意な差（Kruskal-Wallis test: $P = 0.0015$ ）が認められた。多重比較の結果、同一日と9か月（ $P = 0.009$ ）、同一日と12か月（ $P = 0.045$ ）および3か月と9か月の相違度（ $P = 0.040$ ）に有意な差が認められた（図(3)-11d）。これは、胸部斑紋の形状が時間の経過とともにわずかに変化する可能性を示唆するものである。しかし、これらの変化は非常に微量であり、個体識別にはほとんど影響しなかった。したがって、1年間であれば胸部斑紋の特徴はほとんど変化しないと考えられる。今後は斑紋の持続性に関して、より長期的な検討が必要である。

4) 簡便性

正確に撮影された斑紋写真を用いた場合、個体識別の正答率は非常に高く、被験者の半数以上が100%の正答率を示す結果となった（図(3)-12）。一方、撮影アングルやクマの姿勢変化を伴う写真においては識別率の低下が認められた。特に正確な写真を用いた場合に比べ、姿勢変化を伴う写真の正答率は有意に低く（Wilcoxon rank sum test: $P < 0.05$ ）、その平均値は約85%であった。なお、学生とクマ研究者の正答率に差は認められなかった。識別に用いる画像の質が悪いときには識別率が低下するため十分注意が必要であるが、ツキノワグマの胸部斑紋に基づく個体識別は、目視で正確に実施可能であり、また識別に際して特にクマに関する専門的な知識を必要としないため、簡便で高精度な手法であると考えられる。



図(3)-12 斑紋写真の品質と個体識別の正答率

箱内部の太線は中央値、箱の上下は四分位点、上下に伸びる棒はそれぞれ最大値と最小値を示す。棒の下に付された異なるアルファベットは多重比較において有意な差が認められたことを示す。

(3) カメラトラップによる胸部斑紋の撮影手法開発

北上山地モデル調査地における2010年の調査期間中に撮影されたツキノワグマの動画数は361であり、そのうち179の動画で斑紋の撮影に成功した（表(3)-5）。これらを撮影イベントで整理し、斑紋撮影率を算出したところ、タイプA2で87%、タイプB2で95%とどちらも非常に高い値を示した。トラップタイプごとに比較を行うと、撮影枚数、斑紋撮影率ともにタイプBの設計においてタイプAよりも高い結果であった。タイプBでは樹に登るようにクマの行動を誘導しており、誘引物を取りにくかったために撮影枚数が増え、斑紋の撮影機会が増加したものと考えられる。なお、各タイプとも斑紋撮影率は改良後（A2、B2）の設計において、改良前（A1、B1）より高くなっており、改良により性能が向上した事がわかる。

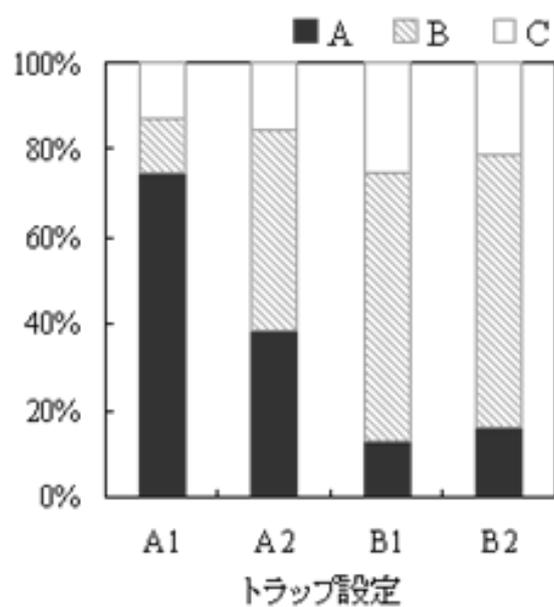
撮影された斑紋の質はタイプAで高い結果となった（図(3)-13）。タイプAにおいては、誘引物を取るためにクマが手を挙げてしまい、斑紋がうまく撮影されないこともあるが（図(3)-14b）、比較的安定して高品質の斑紋画像を得ることが可能である（図(3)-14a）。加えて、ツキノワグマの全身が撮影されるため、体サイズからの年齢級区分や親子関係の把握、生殖器官が確認できれば性別も可能であるという利点もある。一方、タイプBは対象との距離が近く、斑紋の形状を細部まで把握できる利点はあるものの（図(3)-14c）、斑紋が撮影範囲内に収まらず一部しか撮影できないことも多く、クマの激しい動きによって斑紋がぶれてしまうこともあった（図(3)-14d）。なお、本手法では斑紋を撮影するために、誘引物を用いてツキノワグマの姿勢を誘導しているが、各動画において斑紋をカメラに向けた姿勢を長時間維持することはほとんどなかった。動画撮影では静止画よりも画質が低下するというデメリットがあるが、現時点ではこの少ない機会を逃さず斑紋を撮影するためには、動画で撮影を行うのが最善と考えられる。

本研究により、高確率で正確にツキノワグマの胸部斑紋を撮影するための手法が概ね確立され、野外調査における有効性も示された。今後は得られる情報量が多く、より正確に斑紋の撮影が可能なタイプAをベースに、誘引物の固定方法を改良するなど、より安定的な斑紋の撮影に向けた検討を続ける所存である。また、自動撮影カメラは日々高性能になっており、本手法における課題のいくつかは機材の技術進歩によって改善される可能性もあるため、調査機材の選定を含めた手法の継続的改良も必要と考える。

表(3)-5 カメラトラップタイプと撮影状況

CTタイプ	クマ動画数	斑紋撮影動画数	撮影イベント数	*撮影枚数/イベント	斑紋撮影率
A1	39	27	12	1.5	67%
A2	97	43	15	3.0	87%
B1	50	20	10	2.0	80%
B2	175	89	20	4.0	95%
計	361	179	57		

*すべて中央値



図(3)-13 各トラップ設定における斑紋撮影品質

A1: タイプA (改良前) A2: タイプA (改良後) B1: タイプB (改良前) B2: タイプB (改良後)
 A: 高品質 B: 斑紋全体撮影だがAに劣る C: 低品質 (一部撮影やぶれなど)



図(3)-14 カメラトラップによる撮影画像1 (動画からの切り出し)

(4) ツキノワグマ個体数推定調査におけるカメラトラップ法の適用

1) 撮影状況

北上山地モデル調査地における2011年調査ではヘア・トラップ調査と並行して、カメラトラップ80基による調査を5セッション実施した。のべ調査努力量は400TS（トラップ・セッション）であった。このうちカメラが正常に動作した有効TS数は333である（表(3)-6）。正常に動作しなかった原因としては、カメラの誤作動や人為的ミス（電源入れ忘れ、設定ミス、設置ミス）、クマの攻撃による破損などが挙げられる。特に第1セッションで有効トラップ数が低い値となったが、これはすべてカメラの誤作動によるものである。本調査に用いた自動撮影カメラはすべて同様のモデルであるが、前年度に用いた2010年製造機体と同様の設定で2011年製造機体を用いたところ、2～3時間で記録容量を使い切るほどの連続撮影状態となった。特に仕様書に変更点はないものの、センサーの感度に何らかの設定変更があったことが原因として考えられる。市販の自動撮影カメラを利用する場合、新しく購入した機材は事前に動作確認を行う必要があるだろう。

有効333TSのうち、クマが撮影されたのは113TS（34%）であり、クマの撮影率はセッションの経過とともに増加していた（表(3)-6）。これは各セッションにおける誘引物量の変化や気温変化などによる誘引物の誘引効果の違いや、ツキノワグマの利用環境・行動圏の違いが反映された結果と考えられる。本調査によって得られたクマ撮影動画数は1,024であり、トラップあたりのクマ動画数は10程度とセッション間での違いは確認されなかった。

表(3)-6 各セッションにおけるカメラトラップの撮影状況（2011年北上山地調査地）

トラップ数・サンプル数	調査セッション					計
	S1	S2	S3	S4	S5	
設置トラップ数	80	80	80	80	80	400
有効トラップ数	35	74	74	76	74	333
クマ撮影トラップ数	6	16	23	30	38	113
クマ撮影率（／有効トラップ）	17%	22%	31%	39%	51%	34%
サンプル数	65	168	246	370	355	1,204
サンプル数／トラップ	10.8	10.5	10.7	12.3	9.3	10.7

2) 斑紋撮影状況

撮影した1,204の動画において斑紋が撮影できたのは592であり、斑紋撮影率は49%となった（表(3)-7）。撮影された斑紋の質に注目すると、個体識別可能な品質で撮影された動画（A+B）は27%であった。本手法では誘引物によってツキノワグマの姿勢を誘導しているため、トラップに誘引物がある状態と、誘引物がなくなって以降の撮影率に着目した。すると、誘引物ありでは斑紋撮影率が67%と高い値を示したのに対し、誘引物なしでは34%に低下した。個体識別可能な斑紋の撮影に限ると、これらの値はそれぞれ37%と18%である。これは本手法を用いた斑紋の撮影に際して、誘引物が重要な要素となっていることを示す結果である。したがって、できる限り誘引物を取られないようにトラップの構造を改良することによって、より多くのサンプルを得ることが可能と思われる。なお、この値は1動画あたりの撮影率を示したものである。基本的に訪問個体がトラップに滞在中、複数枚の動画が得られることを考慮すると、個体あたりの撮影率はさらに高

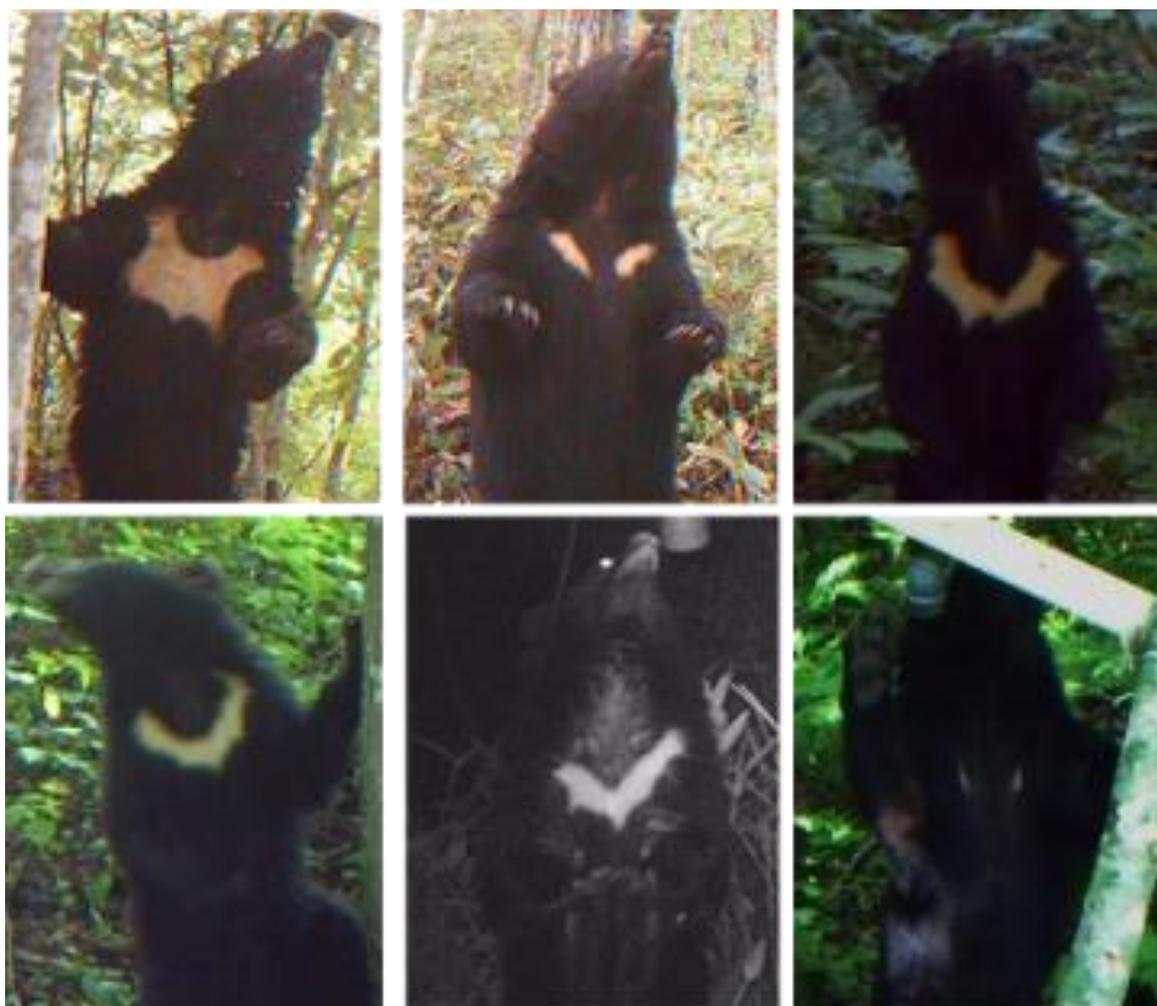
いと考えられる。たとえば5つの動画が連続して得られた場合、そのうち少なくとも1回で斑紋が撮影できる確率は90% ($1 - 0.63^5 = 0.9$) となる。したがって、本手法を用いることにより、トラップ訪問個体の大部分の斑紋が撮影可能であると考えられる。

3) 個体識別

撮影された斑紋動画のうち、主にその品質がA・Bのものを対象として個体識別を行った。本調査において得られた野生個体の斑紋画像の一部を示す(図(3)-15)。これらの画像から、野生個体においても、斑紋の持つ特徴は多様であり、個体ごとに著しく異なっていることは明らかである。我々は胸部斑紋の特徴から、調査期間中に53個体のツキノワグマを識別した。そのうち複数TSにわたって識別された再確認個体は25個体となった。

表(3)-7 カメラトラップによる斑紋撮影状況

	クマ動画数	斑紋動画数	斑紋撮影率	品質別斑紋撮影率 (／クマ動画数)		
				A	B	C
誘引物あり	552	370	67%	11%	26%	33%
誘引物なし	652	222	34%	5%	13%	16%
計	1,204	592	49%	8%	19%	23%



図(3)-15 カメラトラップによる撮影画像2 (動画からの切り出し)

4) 個体数推定

カメラトラップによる4セッションの調査によって得られた個体データに基づき、SPACECAPを用いて推定された生息密度は0.193頭/km² (95%信用区間: 0.132-0.262) である。この値は並行して実施したヘア・トラップを用いた個体数推定値とほとんど同じであり、本手法によってもHTと同程度の精度で個体数推定が可能であると考えられる (詳細はサブテーマ4報告を参照)

(5) 痕跡からのDNA抽出による個体識別法の開発

事例分析は、モデル地域とした岩手県遠野市の東部一帯の圃場におけるツキノワグマ最少加害個体数とその性別を調査対象としている。デントコーン、スイートコーンおよびプラムを作付けた22圃場から、新鮮な食痕試料を計143試料採取しDNA分析を行った¹⁶⁾。分析成功率は47.6%(68/143)であり、モデル地域全体で少なくとも42個体が食害していた。同地域で、同期中に有害捕獲された個体数は計17頭であったが、実際には少なくとも2.5倍のツキノワグマが食害を与えていたことが判明した。加害個体の性比(オス/メス)は5.0であり、性別が判定できなかった6個体をメスと仮定しても同2.5となり、これは有害捕獲個体(同2.0)と比べても更にオスに偏っていた(二項検定, $P < 0.05$)。

5. 本研究により得られた成果

(1) 科学的意義

これまで定量的に評価されることのなかったツキノワグマの胸部斑紋に対して、画像解析を用いた検討により、個体識別における生体標識としての有効性が提示された。特に斑紋の持つ形状は個体特有のものであり、胸部斑紋を用いた個体識別に際して誤識別の起こる確率も極めて低いことが明らかとなった。加えて、目視による識別は非常に容易であり、高精度に実施可能である事が示された。野生個体を対象とした検討を基に、カメラトラップを用いた斑紋パターンの安定的な撮影手法を開発した。カメラトラップは今後様々な動物種の研究における主要なツールとしての活用が期待されており、本研究はクマ類における先進的事例として重要な成果を示したものとする。個体数推定のみならず、野生動物の研究に際して個体識別が必要となる場面は多く、様々な研究において本手法の応用が可能である。また、食痕という一般的なフィールドサインを加えることによりヘア・トラップ法を補完できる手法も示された。

(2) 環境政策への貢献

鳥獣保護法に基づく第11次鳥獣保護事業計画や、特定鳥獣保護管理計画策定に向けて、鳥獣生息状況調査等を行うことが都道府県には求められている。カメラトラップと生体標識を用いた本調査手法は、都道府県等が実施するクマ類の個体数調査や、長期の個体群動向モニタリングに際しての活用が期待される。今後、自動撮影方法の開発により、より安価でより簡便な個体数推定法を提供できると考える。食痕からのDNA抽出による個体識別手法により、これまで明らかにならなかった加害個体数やその性比など被害状況を把握する手法として有効であることが示された。本手法を用いることで加害個体の特定が可能となるため、有害鳥獣駆除に際しての利用が期待される。このための情報提供として、本研究の成果をクマ類のカメラトラップ調査法として

次のようにマニュアルにまとめ、ウェブ上で一般に公開した。

- クマ類の個体数を調べる：ヘア・トラップ法とカメラトラップ法の手引き（統合版）（印刷配布） URL：<http://www.bear-project.org/pdf/Tebiki/tebiki-tougou.pdf>
- カメラトラップ調査の手引き（電子版のみ提供）
URL：[http://www.bear-project.org/pdf/Tebiki/Camera_trap_manual\(rev\).pdf](http://www.bear-project.org/pdf/Tebiki/Camera_trap_manual(rev).pdf)
- 食跡DNA分析マニュアル（電子版のみ提供） URL：<http://www.bear-project.org/>

6. 国際共同研究等の状況

特に記載すべき事項はない

7. 研究成果の発表状況

（1）誌上発表

<論文（査読あり）>

- 1) Higashide, D., Miura, S. and Miguchi, H. 2012. Are chest marks unique to Asiatic black bear individuals? *Journal of Zoology*, DOI: 10.1111/j.1469-7998.2012.00942.x. (in press, online first)

<その他誌上発表（査読なし）>

特に記載すべき事項はない

（2）口頭発表（学会等）

- 1) 齊藤正恵・山内貴義・青井俊樹・梶光一：農業被害を起こしたツキノワグマの特定手法の確立とその野外応用. 日本哺乳類学会2009年度大会（2009年11月、台湾）
- 2) 東出 大志・三浦 慎悟・箕口 秀夫・青井 俊樹. 2010. 斑紋パターンによるツキノワグマの個体識別と野外撮影手法の検討. 日本哺乳類学会2010年度大会（2010年9月、岐阜）
- 3) 東出 大志. 2011. カメラトラップを用いた個体識別手法の開発. 自由集会F-8「クマ類の個体数推定法の開発：環境省環境研究総合推進費プロジェクトから」. 日本哺乳類学会2011年度大会（2011年9月、宮崎）

（3）出願特許

特に記載すべき事項はない

（4）シンポジウム、セミナーの開催（主催のもの）

- 1) 「クマの毛からわかること」、岩手県岩泉町町民会館（岩泉町共催）（2010年7月25日）
- 2) 「ツキノワグマを調べる！～森には何頭のクマさんが？～」、岩手県立博物館（岩手県立博物館共催）（2011年9月25日）
- 3) 「クマ類の個体数推定法に関するワークショップ」、富山国際会議場（富山県自然保護課・環境省中部地方事務所共催）（2011年10月17日）

（5）マスコミ等への公表・報道等

特に記載すべき事項はない

(6) その他

特に記載すべき事項はない

6. 引用文献

- 1) Woods, J. G., Paetkau, D., Lewis, D., McLellan, B. N., Proctor, M. and Strobeck, C. 1999. Genetic tagging of free-ranging black and brown bears. *Wildlife Society Bulletin* 27(3):616-627.
- 2) Miura, S., and Oka, T. 2003. Evaluation of apple bait hair-traps for genetic tagging of Asiatic black bears in the Kitakami Highland, northern Honshu, Japan. *Mammal Study* 28:149-152.
- 3) 佐藤喜和・湯浅卓. 2008. ヘア・トラップを用いたクマ類の個体数推定法：概要と注意点. *哺乳類科学* 48(1):101-107.
- 4) 湯浅卓・佐藤喜和. 2008. ヘア・トラップを用いたクマ類の個体数推定法における課題～国内外の事例の比較検討～. *哺乳類科学* 48(1):109-118.
- 5) Ashton, D.G. 1978. Marking zoo animals for identification. In *Animal markings*: 24-34. Stonehouse, B. (Ed.). London: MacMillan.
- 6) Nietfeld, M.T., Barret, M.W. and Silvy, N. 1994. Wildlife marking techniques. In *Research and management techniques for wildlife and habitats*: 147-159. Bookhout, T.A. (Ed.). Bethesda, MA: The Wildlife Society.
- 7) Foster, B.J. and Harmsen, B.J. 2012. A critique of density estimation from camera-trap data. *Journal of Wildlife Management* 76(2): 2224-236.
- 8) O'Connell, A. F., Nichols, J. D. and Karanth, K. U. 2011. *Camera trap in animal ecology*. Springer, 271pp.
- 9) Oi T. and Yamazaki, K. 2006. The status of Asiatic black bears in Japan. pp.122-133. *Understanding Asian Bears to Secure Their Future*. Edited by Japan Bear Network. Ibaraki, 145pp.
- 10) O'Brien, T.G., Kinnaird, M.F. and Wibisono, H.T. 2003. Crouching tigers, hidden prey: Sumatran tiger and prey populations in a tropical forest landscape. *Animal Conservation* 6:131-139.
- 11) Sambrook J. and D.W. Russel. 2001. *Molecular Cloning vol. 2. A laboratory manual*. 3rd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.999pp.
- 12) Murray M.G. and W.F. Thompson. 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Research*,8(19):4321-4326.
- 13) Paetkau D. and C. Strobeck. 1994. Microsatellite analysis of genetic variation in black bear population. *Molecular Ecology*,3:489-495.
- 14) Ennis S. and T.F. Gallagher. 1994. A PCR-based sex-determination assay in cattle based on the bovine amelogenin locus. *Animal Genetics*,25:425-427.
- 15) 齊藤正恵. 2009. 新たな遺伝子分析手法を用いたツキノワグマの農作物加害個体の特定方法に関する研究－食痕からのDNA採取と野生動物管理への応用－.岩手大学大学院連合農学研究科.学位論文, 139pp.
- 16) Saito M., K. Yamauchi, and T. Aoi. 2008. Individual identification of Asiatic black bears using extracted DNA from damaged crops. *Ursus*,19(2):162-167.

(4) 個体群モデルによるモニタリング手法及び生息数推定法の確立に関する研究

横浜国立大学 環境情報研究院

独立行政法人 森林総合研究所

<研究協力者>

独立行政法人 国立環境研究所

横浜国立大学 環境情報学府

財団法人 自然環境研究センター

松田 裕之

堀野 眞一

深澤 圭太

太田 海香

諸澤 崇裕

平成21～23年度累計予算額：1,511千円（うち、平成23年度予算額：514千円）

予算額は、間接経費を含む。

【要旨】 標識再捕獲法における捕獲の空間情報は対象個体群の移動距離に関する情報を持つ。このため、捕獲の空間情報を活用することで調査地・調査期間に特有な有効トラップ面積を明らかにし、客観的にクマ類の生息密度を推定することができると考えられている。しかしながら、これまでに標識再捕獲法における空間情報から生息密度を推定する手法は複数考案されており、手法によって推定密度がどの程度変化するかについては明らかでない。本研究においては、ダミーデータと本プロジェクトで得られた、岩手県北上山地におけるツキノワグマのDNA標識再捕獲データを用いた解析により、平均最大移動距離法、空間明示最尤法、ベイズ空間明示標識再捕獲モデルの3手法を用いて生息密度推定手法の精度比較を行った。ダミーデータを用いて推定精度の比較を行ったところ、ベイズ空間明示標識再捕獲モデルは設定した密度と近い数値を示し、推定精度が高いと考えられた。また、空間明示最尤法も同様に比較的高い推定精度を示した。一方で、平均最大移動距離法を用いた推定では、設定密度よりも低い値を示し、推定精度は2つの空間明示モデルと比べると劣る可能性があることが示唆された。2010年と2011年に北上山地で行ったヘア・トラップ調査から得られたデータを用いて生息密度推定を行った結果、ベイズ空間明示標識再捕獲モデルと空間明示最尤推定法の生息密度推定値は、平均最大移動距離法に比べると両年もダミーデータの結果と同様に手法間の推定結果の差は小さかった。以上の結果、ベイズ空間明示標識再捕獲モデルと空間明示最尤法は、クマ類の実用的な生息密度推定法であることが示された。

【キーワード】 ベイズ空間明示標識再捕モデル、空間明示最尤法、標識再捕獲法、行動圏、生息密度推定

1. はじめに

マイクロサテライトなどDNAによる個体識別の技術の向上とコストダウンにより、ヘア・トラップによる生息密度推定はクマ類の保護管理の現場においても一般的なモニタリングツールとなりつつある。ヘア・トラップによる生息密度推定は、現地調査、DNA分析、統計解析という3つの段階から成る。日本においてもこれまでに北海道や長野県を中心に20の自治体で取り組まれてきている¹⁾。それにもかかわらず、いずれの段階においても方法論にはさまざまなバリエーショ

ンがあり、最適な選択肢に関するコンセンサスは得られていない。

クマ類の生息数推定においては、これまでLincoln-Petersen法などの閉鎖個体群モデルが一般的に用いられてきた。しかし、この手法で推定された生息数はヘア・トラップからどの程度の範囲に生息する個体を対象としたものであるか自明ではなく、生息密度の算出のためには別途有効トラップ面積を計算する必要がある。従来の日本におけるヘア・トラップ調査においては、有効トラップ面積としてトラップが含まれるメッシュの面積やトラップから発生させたバッファの面積が用いられてきた。しかし、これらの方法はメッシュやバッファのサイズの決め方に科学的な根拠がなく、評価者の主観による影響を強く受ける点で恣意的になるという問題点がある。

標識再捕獲法における有効トラップ面積は、対象生物の行動圏サイズとの関連が古くから議論されてきた²⁾。クマ類の行動圏サイズは堅果類の豊凶など、時空間的に変化する環境条件によって影響を受け、それによって有効トラップ面積も大きく変動すると考えられる。標識再捕獲法における捕獲の空間情報は対象個体群の移動距離に関する情報を持つため、それを活用することで調査地・調査期間に特有な有効トラップ面積を明らかにし、客観的に生息密度を推定することができると考えられる。しかしながら、これまでに標識再捕獲法における空間情報から生息密度を推定する手法は複数考案されており、手法によって推定密度がどの程度変化するかについては明らかでない。このため、実際にどのようなモデルを用いるべきか判断するには、モデルの推定精度を比較する必要がある。

生息密度推定の精度においては、現地調査における試料採取数や再捕獲数の確保も課題として挙げられる³⁾。例えば、現地調査における再捕獲数が多くなるほど推定精度が高くなることが報告されている⁴⁾。しかしながら、現地調査において再捕獲数をコントロールすることは不可能である。したがって、十分な再捕獲数を確保するためには、トラップ数やセッション数を増やすといった努力が必要になる。このようなトラップ設置条件については、様々なトラップ条件のもとで生息密度推定を行い推定結果の変動を調べることによって、密度推定の結果を現地調査にフィードバックできると考えられる。また、ヘア・トラップの設置条件はクマ類の生息密度や環境の時間的、空間的な違いにも依存すると考えられる。様々な地域のデータを用いて生息密度推定を行うことで、より一般性の高いトラップの設置条件が抽出できることが期待できる。

2. 研究開発目的

本研究では、(i) 空間明示型標識再捕獲モデルによる生息密度推定の精度検証および、(ii) より効率的なトラップ設置方法（トラップ配置、トラップ数、セッション数）の検討を目的として以下の検証を行った。まず、空間非明示モデルと空間明示モデルを用いて、均一トラップ配置と不均一トラップ配置のもとの密度推定をダミーデータで行い、推定精度ならびにトラップ配置について検証した。次に、密度既知のダミーデータにより複数の空間明示モデルによる推定値と真の値のずれを検証した。同様の傾向が野外データに対する推定においても見られるかどうかを確かめることで、それぞれの手法の推定バイアスを明らかにすることを試みた。さらに、ダミーデータと岩手県北上山地における大規模調査データを用いた解析により、生息密度推定の精度比較を行った。生息密度推定手法の対象とした手法は下記の3つである。

- (i) 平均最大移動距離に基づく方法⁵⁾
- (ii) 空間明示最尤法 (Program “DENSITY”)⁶⁾

(iii) ベイズ空間明示標識再捕獲モデル^{7,8)}

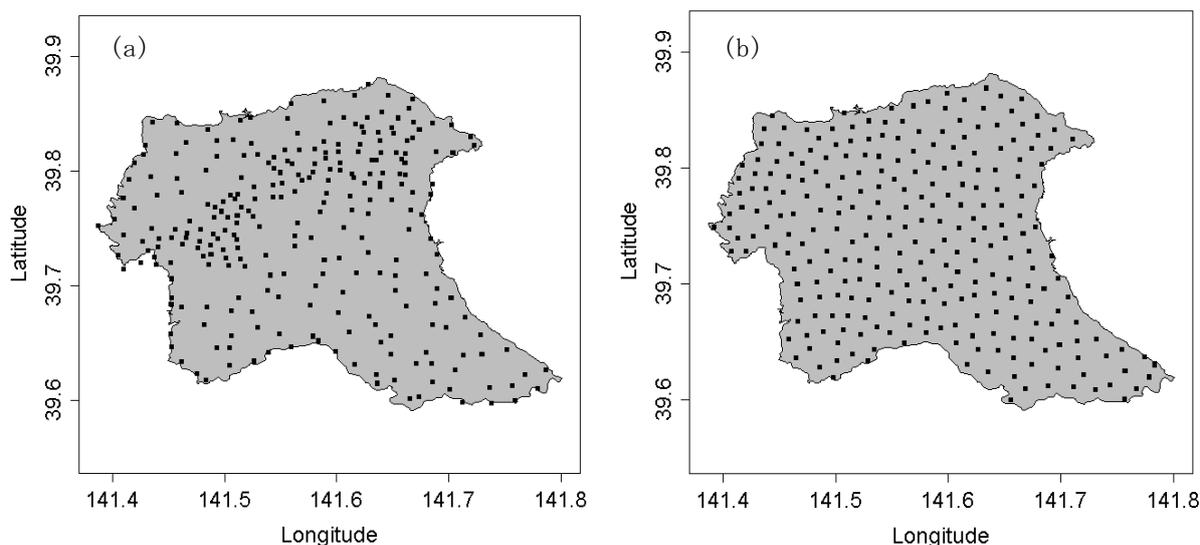
2010年度の大規模調査のデータを用いて、トラップ数、セッション数と密度推定結果のばらつきを検証した。加えて、過去にヘア・トラップ調査が行われた岩手県以外のデータも用いて他の地域への推定方法の適用可能性を検証するため、生息密度推定の成功事例あるいは失敗事例から、再捕獲数やトラップ数、セッション数が密度推定の成否とどのような関係にあるかを分析した。

3. 研究開発方法

(1) 生息密度推定手法の精度検証

1) 空間非明示モデルと空間明示モデルの比較およびヘア・トラップ配置の検討

本サブテーマにおいては、北上山地モデル調査地における大規模ヘア・トラップ試験における2010年のトラップ設置地域（図(4)-1 a）、および同じ範囲に均等に配置した同数のトラップ（図(4)-1 b）という2通りの空間配置のもとでダミーデータを生成した。トラップ数は262基、試験地の面積は674.74km²であり、セッション数は6とした。この地域におけるツキノワグマの生息密度は知られていないため、過去のヘア・トラップ調査⁹⁾に基づく北上山地の推定生息密度0.195個体/km²を真の値と仮定した。ダミーデータから推定された生息密度がこの値に近いほど望ましい結果であるということになる。



図(4)-1 (a)北上山地モデル調査地における大規模ヘア・トラップ試験のトラップ設置地域、および(b)均等に配置した仮想的なトラップ位置図。黒い点がトラップの位置、灰色は調査地の範囲(674.74km²)を示す。

大規模ヘア・トラップ試験のトラップ設置地域と均一トラップ配置の下で生成された2種類のダミーデータを用いて、Gardner et al.(2009)⁷⁾の空間明示モデル（詳細は後述）と従来の空間非明示捕獲率均一モデルによる生息密度の推定精度を比較した。空間非明示モデルはOtis et al.(1978)¹⁰⁾のM₀モデルを使用した。このモデルは初回の捕獲と再捕獲が同じプロセスによって行われた標識再捕獲データの解析に適した方法であり、ヘア・トラップによる標識再捕獲データはそれに合致

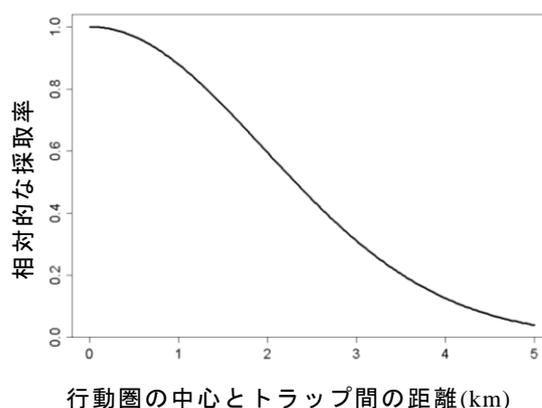
していると考えられる。

空間明示モデルを用いると任意の長方形の範囲における生息数が算出されるため、生息密度は自然に導出される。一方、 M_0 をはじめとする空間非明示モデルでは、推定された個体数がどの範囲に生息する個体群を対象としたものなのかは自明ではない。これまでの生息密度の母数には、トラップ設置位置の凸包の面積やトラップ設置位置から経験的に決めた距離のバッファに含まれる面積など、さまざまなバリエーションがある。ここでは、便宜的に調査地面積 674.74 km^2 を個体密度計算の際の分母とした。

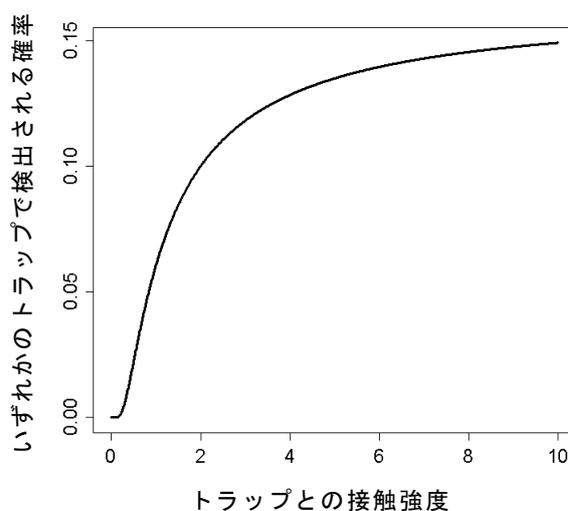
解析に用いるダミーデータの生成においては、Gardner et al. (2009)の空間明示型標識再捕獲モデルを用いた。このモデルはクマの各個体が円形の行動圏を持つことを仮定しており、生成されるダミーデータは毛が採取されるトラップが行動圏の中心の周りで空間的に凝集するパターンをもつ。採取率と行動圏中心・トラップ間距離の関係を定めるパラメータ σ 、トラップ接触強度が $+\infty$ のときの採取率 p_0 、各個体の行動圏の中心座標 $s_i = (s_{1i}, s_{2i})$ を与えれば、乱数によりダミーデータを生成することができる。

σ はGardner et al.(2009)がアメリカ・ニューヨーク州のアメリカクロクマのヘア・トラップデータから推定した2.77とした(図(4)-2)。距離による相対的な採取率の変化はクマの利用頻度に相当する。テレメトリー調査による既存の日本におけるツキノワグマの最外殻行動圏の報告は、円形行動圏を仮定した半径に換算すると $1.27 \sim 6.26 \text{ km}^{11,12}$ (季節移動が明らかな例は除いた)の範囲であり、図(4)-2のパターンはその範囲に含まれる。

また、 $p_0 = 0.165$ とした(図(4)-3)。これは、(サンプルが採取されたトラップ・セッション・個体数 / 全トラップ・セッション数)がおよそ0.1になるように調整した値である。実際にはこの値は数倍大きい場合が多い(例えば、Miura & Oka (2003)¹³⁾の北上山地における調査では0.289)。採取率が低い条件下においても正しく個体密度が把握できるならばより採取率が高い状況においてもよい推定が得られると考えられるため、ここではあえて悲観的なシナリオを想定した。各個体の行動圏の中心座標は一樣乱数により決定した。各個体の行動圏の中心座標がとりうる範囲は、ヘア・トラップ位置座標の上限と下限を囲む長方形の上下左右10 kmの内部とした。



図(4)-2 相対的な採取率と行動圏の中心からトラップまでの距離の関係。Gardner et al. (2009)によるアメリカクロクマのデータからの推定値($\sigma=2.77$)に基づく。



図(4)-3 ダミーデータ生成の際に用いた、いずれかのトラップで検出される確率とトラップ接触の強度の関係($p_0=0.165$)。

2) ダミーデータを用いた生息密度推定精度の検証

一般に、生物の行動は2次元ランダムウォークとして記述されるが、クマの場合はその軌跡が行動圏に従うパターンを示すことが多い。それをダミーデータ生成の際に再現するため、以下に示すようなアルゴリズムを考案した。

a. 確率論的行動シミュレーションモデルとトラップにおける捕捉

単純なランダムウォークにおいては、時点 t における個体の位置 \mathbf{u}_t は、 $t-1$ の位置 \mathbf{u}_{t-1} を中心とする2次元正規分布に従うと考えることができる。この分布は、単位時間当たりの個体の移動を規定する移動距離分布である。

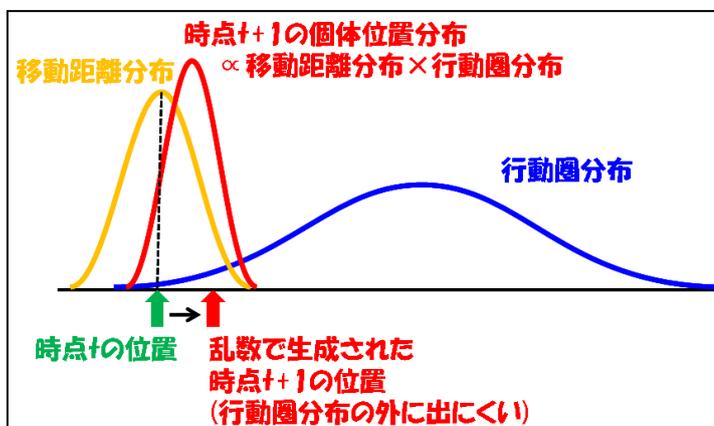
$$p(\mathbf{u}_t; \mathbf{u}_{t-1}, \sigma^2) = N_2(\mathbf{u}_{t-1}, \sigma^2 \mathbf{I})$$

σ^2 は移動距離を決めるパラメータであり、大きな値を取るほど単位時間当たりの移動距離は長くなる。

ここで、このようなランダムウォークモデルに行動圏の制約を組み込むことを考える。一般に、行動圏は十分長い時間行動したときの個体位置の系列が従う分布としてみなされる。ここで、長い時間行動したときの個体位置が従う行動圏分布を任意の確率分布 $p_h(\mathbf{u})$ として定義すると、時点 t における個体の位置 \mathbf{u}_t の分布 $p(\mathbf{u}_t; \mathbf{u}_{t-1}, \sigma^2)$ は次のように記述することができる。

$$p(\mathbf{u}_t; \mathbf{u}_{t-1}, \sigma_m^2) \propto p_h(\mathbf{u}) \times N_2(\mathbf{u}_{t-1}, \sigma^2 \mathbf{I})$$

$t=0$ における個体の位置 \mathbf{u}_0 を与え、そこからこの分布に従う乱数列を逐次発生させることで、行動圏分布に制約される行動シミュレーションを行うことができる。このようなプロセスの模式図を図(4)-4に示した。図のように、時点 t における個体の位置が行動圏分布の外側にある場合、移動距離分布と行動圏分布の積として表わされる時点 $t+1$ の個体位置分布は行動圏分布の中心に偏ったものになる。その結果、個体の軌跡は行動圏分布の確率密度が高い範囲を動くことになる。なお、マルコフ連鎖の収束定理より、初期状態における個体の位置によらずこのプロセスの定常分布はホームレンジ分布 $p_h(\mathbf{u})$ に一致する。



図(4)-4 行動圏分布と移動距離分布による行動シミュレーションの模式図

さらに、個体がトラップに接近したときのトラップの利用と検出についても確率モデルにより表現した。クマ個体とトラップの距離が近いほどトラップにおける検出率は高まるため、位置 $\mathbf{x}_j = (x_{1j}, y_{1j})$ にあるトラップ j に時点 $t+1$ で検出される確率 p_c を個体の位置とトラップの距離の関数として以下のように表わした。

$$p_c(\|\mathbf{u}_t - \mathbf{x}_j\|) = \exp(-(\|\mathbf{u}_t - \mathbf{x}_j\|/\sigma_c)^2)$$

この関数は正規分布と形状が同じであるが、距離0における検出率は1となる。シミュレーションの各時点において最も近くにあるトラップに対して p_c を計算し、ベルヌイ乱数により検出の有無を決定した。

b. ダミーデータの生成

ダミーデータの生成においては、全てのトラップを1週間に1回、計6回の点検を行い、その期間内に検出された個体番号とそのトラップを記録する調査を想定したシミュレーションを行った。その結果、検出個体、トラップ、セッションそれぞれにおける検出の有無を示す3次元の行列が検出履歴として得られる。トラップは、2km格子の交点に $10 \times 10 = 100$ 個を設置したと仮定し、トラップ位置の凸包は20 km四方の正方形となる。

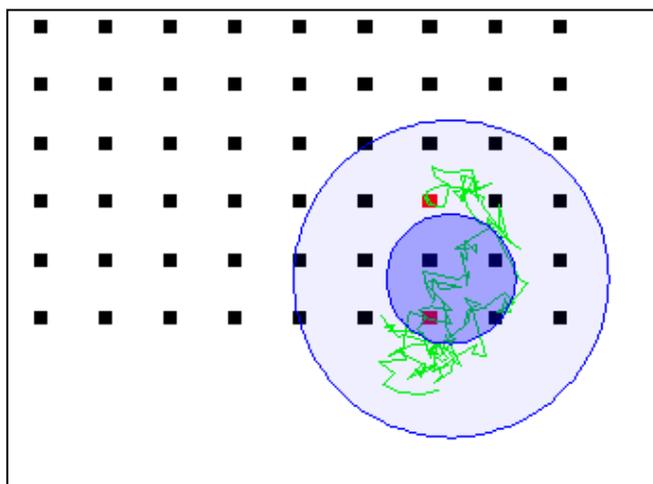
ダミーデータ生成の際のパラメータの設定は下記のとおりである。

- ・ 真の生息密度：0.2個体/km²
- ・ 行動シミュレーションの時間ステップ：10ステップ/日
- ・ 1ステップ当たりの移動距離分布のパラメータ σ ：0.18
 ※この値は、1日の移動距離の平均を1.28 kmとすることに相当する。
- ・ 行動圏分布 $ph(s)$ ：95%確率円の面積が4.85 km²となる2変量正規分布
- ・ 検出確率の距離依存性パラメータ σ_c ：0.02
 ※この値は、検出確率の変曲点が20 mにあることを意味する。

以上の条件を以下の二つのシナリオについて40セットのダミーデータを生成し、検証した。

- ・ シナリオ1：すべての個体の行動圏分布は円形
- ・ シナリオ2：個体ごとに、行動圏分布の長径/短径が1:2でランダムに変化（楕円形）

個体の行動圏の中心は、トラップ設置範囲を中心とした30×30 kmの範囲にランダムに発生させた。シミュレーションの初期状態として、 $t=0$ における個体の位置を各個体の行動圏分布からランダムに発生させ、上記のアルゴリズムに従いデータ生成を行った。1個体についてデータ生成を行った一例を図(4)-5に示した。シミュレートされた行動の軌跡は行動圏分布の中にとどまることがわかる。また、一般的な標識再捕獲調査は短期間のうちに行われるため、その間で個体は行動圏分布全体をくまなく利用できるとは限らない。シミュレーションが生成する行動パターンはそのような性質も再現している。



図(4)-5 データ生成シミュレーションの1例。青色の同心円は内側が行動圏分布の標準偏差半径円、外側が95%確率円、緑色の折れ線はシミュレートされた行動軌跡、■は非検出トラップ、■は検出トラップを示す。

c. 密度推定手法の比較

本研究においては、(i) 平均最大移動距離法、(ii) 空間明示最尤法、(iii) ベイズ空間明示標識再捕獲モデルの推定精度の比較を行った。ダミーデータを用いた比較においては、それぞれのモデルにおいては40回の繰り返しを行い、推定値と真の値のずれを95%CI coverage（95%CIが真の値を含む割合）と平均95%CI幅により評価した。下記にそれぞれの推定手法の概要を示した。

(i) 平均最大移動距離法(MMDM)⁵⁾

この手法は、複数回検出された個体ごとに検出トラップ間の距離の最大値を計算し、その平均値の半分をホームレンジ円の半径 r とみなすものである。トラップから生成した半径 r のバッファに含まれる範囲の面積を有効トラップ面積とし、任意の閉鎖個体群モデル(例えば、Otis(1978)の捕獲率均一モデル M_0 や不均一モデル M_h)による生息数推定値とあわせて生息密度を計算する手法である。この方法は簡便であるが、有効トラップ面積の計算方法はアドホックであり統計学的な根拠に乏しいとされる。なお、今回の評価における生息数の推定には、捕獲率均一モデル M_0 を用いた。

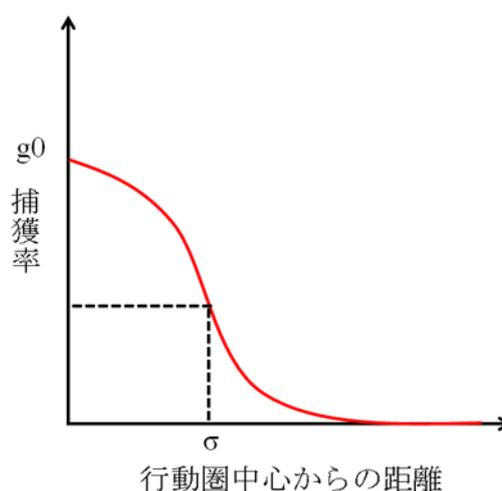
(ii) 空間明示最尤法 (Program “DENSITY”)⁶⁾

空間明示最尤法は、トラップ設置範囲を含めた十分に広い空間 S 内において動物の行動圏中心の空間分布を記述するサブモデルと、特定のトラップにおける捕獲確率と個体と行動圏中心からトラップまでの距離からなるモデルの二つのサブモデルから生息密度を推定する手法である。行動圏中心の位置は実際にはわからないため、行動圏中心の位置をポアソン過程にしたがってランダムに発生させた状態において、1個体ずつ行動圏中心と各トラップにおける捕獲確率の尤度計算を行う。

各個体は円形の行動圏中心を持ち、行動圏中心からの距離が遠くなればなるほど低下すると考える。このため、トラップにおける捕獲率は多くの場合ガウス分布（図(4)-6）を仮定し、捕獲率は、以下のように記述される。

$$p = g_0 \times \exp\left(-\frac{d^2}{2\sigma^2}\right)$$

p はトラップにおける捕獲確率、 g_0 は行動圏中心における捕獲率、 σ が距離に対する捕獲確率の減衰、 d が行動圏中心からあるトラップまでの距離を表す。つまり、 g_0 と σ の2つのパラメータによってトラップにおける捕獲確率が推定されることにより、設定した空間 S 内の行動圏中心の数が推定される。さらに、生息密度については、推定された行動圏中心の数を空間 S の面積で割ることで算出することができる。



図(4)-6 捕獲確率と行動圏中心の関係

(iii) ベイズ空間明示標識再捕獲モデル⁷⁾⁸⁾

生息密度、各個体の行動圏の位置、トラップでの捕獲の関係を階層ベイズモデルとして記述し、検出位置情報から各個体の行動圏の中心、捕獲率と距離の関係、生息密度推定を同時に推定する手法である。行動圏の中心とトラップの距離が大きいほど捕獲される確率は低下すると考えられるため、距離 r と捕獲確率 p の関係を下記のように定式化している。

$$p = p_0 \times \exp(-(r/\sigma)^2)$$

このモデルでは、捕獲確率は距離に対して釣鐘型(ガウス型)に減衰すると仮定されている。 p_0 は距離0の時の捕獲確率、 σ は釣鐘型曲線の変曲点までの距離で表わされる捕獲確率の減衰を決めるパラメータであり、これらはデータから推定される。Tセッションの標識再捕獲調査は、この確率を期待値とする繰り返しTの2項過程とみなすことができる。

$$Y_{ij} \sim \text{Binomial}(p, T)$$

Y_{ij} は個体 i のトラップ j における捕獲回数である。

各個体 i の行動圏の中心 s_i は未知であり、これもデータから推定する必要がある。そこで、トラップを含む任意の長方形の空間 S を設定し、 s_i に対して S の範囲に関する一様事前分布を与える。調査において1度も検出されなかった個体に対しても s_i を定義するが、それによって s_i の長さは生息数によって変化することになる。推定には、パラメータ値を確率的探索的に変化させながら、データに対して当てはまりのよいパラメータ値のセットを得るマルコフ連鎖モンテカルロ法(MCMC法)を用いる。それにより、少なくとも1回検出された個体の s_i はトラップの周囲

を動き、1度も検出されなかった個体の s_i は消失・生成を繰り返しながら S の中をほぼ自由に動き回ることになる。個体群中に一度も採取されなかった個体がどの程度存在するかはData Augmentation（データ付加）という手法により、逆算することができる。MCMC法の過程で得られる s_i の数は、空間 S 内の生息数 N とみなすことができる。したがって、生息密度は N を S の面積で割った値となる。

また、ベイズ空間明示標識再捕獲モデルを統計解析環境RのGUI上で操作が可能なパッケージSPACECAPについても評価を行った。上記のベイズ空間明示標識再捕獲モデルと異なる点として、例えば行動圏中心を1000 m間隔といったように格子状に配置する点があげられる。本研究においては、行動圏中心は500 m間隔として密度推定を行った。

3) 野外データおよび他地域のデータを用いた推定精度の検証

ダミーデータと同様に平均最大移動距離法、空間明示最尤法とベイズ空間明示標識再捕獲モデルを用いて、2010年と2011年の野外データ用いた密度推定値を比較することで推定手法のバイアスの検討を行った。さらに、2010年と2011年ではトラップ数や配置など違いがあるため、2010年と2011年で共通な3次メッシュにおける80基のトラップから採取されたデータを用いて、生息密度推定を行った。なお、2010年と2011年のデータは同じ基準で識別されたDNAデータを解析に用いた。

(2) トラップ配置の検証

1) 北上山地のデータを用いた解析

単位面積当たりのヘア・トラップ数、セッション数と生息密度推定値の関係を検証するため、ヘア・トラップ数、セッション数を変化させた場合の生息密度推定値の変動を調べた。ヘア・トラップ数については、約2.5、3、4、5、6、8 km²あたり1基のヘア・トラップ密度とした場合の生息密度推定を行った。245基のヘア・トラップによる標識再捕獲のデータを用い、設置したトラップの中から、上記のトラップ密度になるようにランダムにトラップを抽出して解析に用いた。ただし、トラップの位置に空間的な偏りが無いデータを使用した。セッション数については、ヘア・トラップ数と同様に6セッションからランダムに3、4、5セッションを抽出したデータセットを作成し、生息密度推定を行った。このような解析をそれぞれのトラップ密度、セッション数において20回行い、平均値、95%上限値、下限値の平均値をそれぞれ算出した。このように、実際の調査より努力量が低い場合の推定精度については、実証的に評価することができる。

2) 他の地域の事例を用いた解析

岩手県の事例以外でも推定方法の適用が可能であるかを検証するため、ヘア・トラップ先行調査事例（富山、奈良、滋賀（2007年、2008年）、神奈川、京都、福井、山梨）のデータを用いて、生息密度の推定と分析成功率に影響するパラメータの評価を行った。生息密度推定には空間明示最尤法⁶⁾とHartstack et al.(1971)¹⁴⁾の空間明示モデルを用いた。なお、再捕獲数が0または、同じトラップのみでしか再捕獲がなかったデータについては解析を行わなかった。次に、上記の7地域8サンプルに北上山地における2010年と2011年のデータを加えて生息密度推定の成功率（分析成功率）を推定した。データは生息密度推定が成功したか否か、トラップ数、再捕獲数、セッション

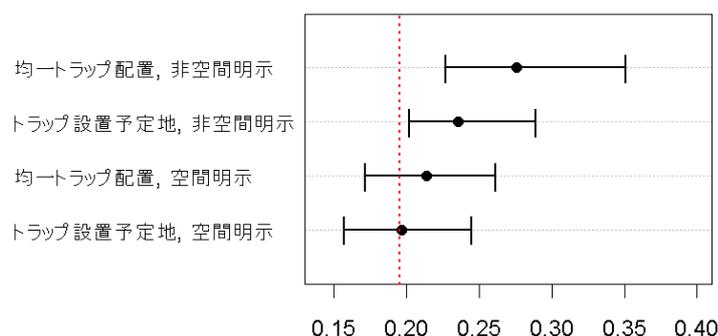
数、トラップ間の距離を用いた。生息密度推定の成否を目的変数、それぞれのパラメータを説明変数としたロジスティック回帰を行い、生息密度推定の成否とトラップ数、再捕獲数、セッション数、トラップ間の距離との関係性を評価した。

4. 結果及び考察

(1) 生息密度推定手法の精度検証

1) 空間明示モデルと空間非明示モデルおよびトラップ配置ごとの推定値の比較

均一配置と北上山地モデル調査地における実際の配置である2種類のトラップの配置、および空間非明示モデルと空間明示モデルの組合せによる過去のヘア・トラップ調査データに基づく生息密度推定結果を図(4)-7に示した。トラップの配置によらず、空間非明示モデルは実際よりも高い生息密度が推定された一方、空間明示モデルの推定値は真の値に近い推定が得られた。また、空間非明示モデルを用いた場合、均一トラップ配置ではトラップ設置予定地よりも大きな生息密度が推定された。従来手法における生息密度の算出においては、母数となる調査地面積の決め方によって誤った生息密度を導いてしまう可能性があることが明らかとなり、空間非明示のモデルは推定精度が低い可能性が示された。一方で、空間明示モデルは真の値に近い推定値を示し、推定精度が高い可能性が示された。



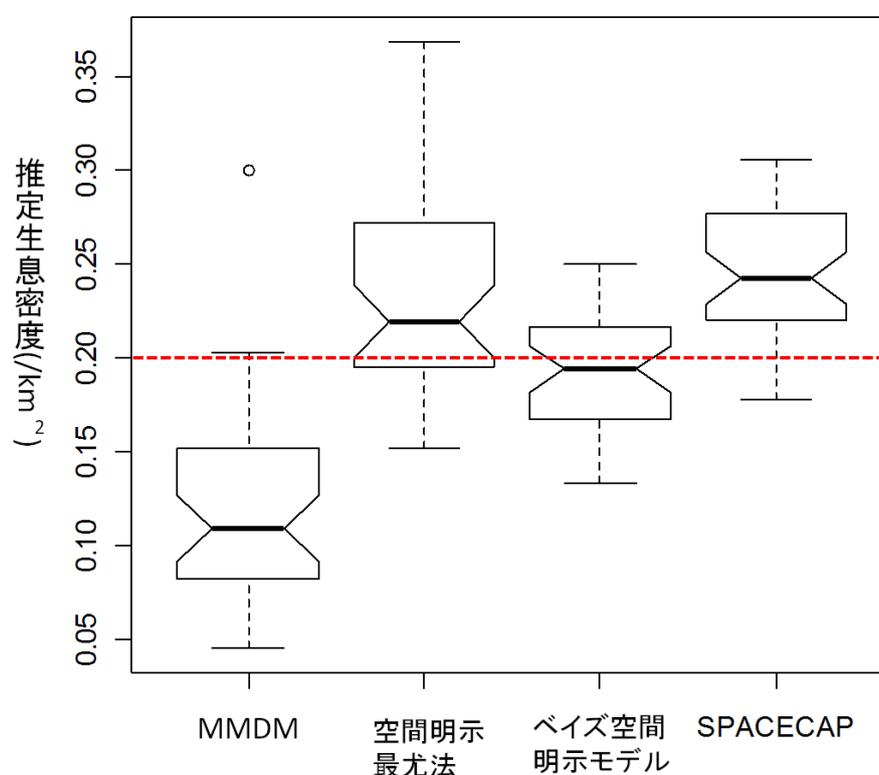
図(4)-7 トラップ設置予定地、均一トラップ配置における、空間明示モデルと空間非明示モデルの生息密度推定値。黒点は事後分布中央値、エラーバーは95%信用区間を示す。赤破線は真の個体密度(0.195/km²)を示す。

2) ダミーデータを用いた推定精度の検証

行動圏を円形と仮定したダミーデータによる推定結果を図(4)-8、それぞれのモデルの95%CI幅、相対バイアスと95%CI coverageを表(4)-1に示した。平均最大距離法は生息密度を過小評価する傾向があったが、少数のケースで真の値よりも高い値を示していた。平均的に95%CIの幅は小さく、coverageは24%であった。空間明示最尤法の推定値は真の値に近かったが、平均95%CIの幅が広く、真の値よりも大きい方へ偏りがみられた。ベイズ空間明示標識再捕獲モデルは4つのモデルの中で95%CI coverageが高くかつ、平均95%CI幅も狭く、精度の高い推定手法であることが明らかとなった。Coverageでは空間明示最尤法とベイズ空間明示標識再捕獲モデルではほぼ同等の評価であったが、空間明示最尤法は95%CI幅が4つのモデルの中で最も大きかった。SPACECAPは、25%点が真の値を上回っており、過大評価の傾向がみられた。さらに、95%CI幅は比較的狭かったものの、coverageはやや低い結果となった。また、真の値よりもやや高い推定結果となる傾向があった。行動圏を楕円形としたダミーデータによる推定結果では、空間明示最尤法、ベイズ空間明示標識再捕獲法ともに若干高い値を示したものの、円形行動圏のシナリオと同様の傾向が見られた。

表(4)-1 円形を仮定したダミーデータ解析における各密度推定手法の95%CI幅と95%CI coverage

手法	平均95%CI幅 (95%区間)	95%CI coverage
平均最大距離法 (n=40)	0.06 (0.02-0.15)	0.225
空間明示最尤法 (n=40)	0.26 (0.15-0.42)	1.00
ベイズ空間標識 再捕獲モデル (n=40)	0.13 (0.09-0.15)	0.975
SPACECAP (n=40)	0.19 (0.06-0.32)	0.375



図(4)-8 ダミーデータによる生息密度推定モデルの推定結果。箱ひげ図は、内側から中央値、四分位点、四分位点×1.5の範囲の最大値を示し、○はそれより外側の値を示している。赤点線は真の推定密度0.2頭/km²を示す。MMDMは平均最大移動距離法を示す。

3) 野外調査データを用いた精度検証

北上山地における野外調査を4つのモデルで解析した結果を表(4)-2に示した。ベイズ空間明示標識再捕獲モデルを用いて生息密度推定を行なったところ、2010年は0.400 (0.340-0.489) 個体/km²となった。2011年のデータを用いた推定結果は、0.188 (0.147-0.235) 個体/km²であった。空間明示最尤法による生息密度推定では、2010年と2011年の推定値は、それぞれ0.403 (0.329-0.493)、0.185 (0.139-0.245) 個体/km²であった。SPACECAPを用いた生息密度推定値は2010年と2011年の

それぞれで0.374 (0.298-0.437)、0.173 (0.139-0.213) 個体/km²であった。一方で、平均最大移動距離法を用いた推定結果は、2010年が0.309 (0.261-0.381)、2011年が0.191 (0.165-0.242) となった。2010年と2011年では様々な条件の違いがあったものの、ベイズ空間明示標識再捕獲モデルと空間明示最尤法、それぞれの年で近い推定結果を示した。SPACECAPについてはやや推定値が低くなる傾向があったが、ベイズ空間明示標識再捕獲モデルと空間明示最尤法と近い値を示した。一方で、平均最大距離法では、2011年は他の手法との差がほとんどなかったが、2010年においてはダミーデータほど極端ではないものの、他の手法よりも低い推定値を示した。野外データを用いた結果においてもダミーデータによる推定結果と類似した結果が得られた。以上の結果から、野外において標識再捕獲データを用いた生息密度推定においてもベイズ空間明示標識再捕獲モデルと空間明示最尤法、SPACECAPは生息密度推定に有用な手法である可能性が示唆された。

表(4)-2 北上山地のデータにおける各手法による推定生息密度

手法	2010年推定生息密度 (95%CI) (頭/km ²)	2011年推定生息密度 (95%CI) (頭/km ²)
平均最大距離法	0.309 (0.261-0.381)	0.191 (0.165-0.242)
空間明示最尤法	0.403 (0.329-0.493)	0.185 (0.139-0.245)
ベイズ空間明示標識再捕獲モデル	0.400 (0.340-0.489)	0.188 (0.147-0.235)
SPACECAP	0.374 (0.298-0.437)	0.173 (0.139-0.213)

2010年と2011年の密度推定結果の違いを検証するため、2011年と同じ3次メッシュ内に位置する80基のトラップを用いて、ベイズ空間明示標識再捕獲モデルにより生息密度推定を行った。その結果、2010年の密度推定値が0.323 (0.232-0.489) 個体/km²、2011年の密度推定値が0.188 (0.147-0.235) 個体/km²であり、同じ3次メッシュに設置されていた80基のトラップデータを用いても2010年の方が2011年よりも推定値が大きくなった。推定されたパラメータ値については2010年と2011年では2011年に捕獲確率がほぼ2倍となった(表(4)-3)。さらに、2011年は σ が2010年に比べ1.4倍ほど大きい値となっている。つまり、1個体あたりの行動圏が2011年の方が広く推定され、生息密度が低く推定されたことになる。2010年の245基と80基のデータでは、80基のデータの方がやや σ が大きかったが、その他のパラメータはほぼ同様の値を示した。

表(4)-3 ベイズ空間明示標識再捕獲モデルによるパラメータ推定値。中央値および括弧内に95%CIを示す

	2010年	2010年80トラップ	2011年
密度	0.400 (0.340-0.489)	0.323 (0.232-0.489)	0.188 (0.147-0.235)
捕獲確率 (p)	0.044 (0.033-0.059)	0.044(0.025-0.066)	0.090 (0.064-0.124)
行動圏中心から変曲点 までの距離 (σ)	1.76 (1.59-1.98)	2.15(1.82-2.63)	2.39 (2.09-2.81)
トラップでの検出個体 の割合 (Ψ)	0.498 (0.419-0.610)	0.496 (0.352-0.756)	0.181 (0.136-0.236)

ダミーデータと野外データによる推定精度比較の結果においても、ベイズ空間明示標識再捕獲モデルと空間明示最尤法は平均最大移動距離法よりも推定精度が高いと考えられた。平均最大移動距離法による有効トラップ面積の計算は再捕獲の回数に影響を受けやすく、再捕獲が少ないと有効トラップ面積は小さくなり、密度を過大評価することがあると知られている⁵⁾。また、生息数の推定に用いたM₀モデルは、個体ごとの行動圏の位置などに起因する検出率の違いがある状況

では、生息数を過小評価する傾向がある。ダミーデータ解析の結果から明らかになった平均最大距離法の推定生息密度の過小評価およびばらつきの大さは、これらのバイアス要因が複合的に作用した結果であると考えられる。空間明示最尤法は、距離に依存する捕獲率を明示的に扱っているモデルであるが、そのような空間構造は空間明示最尤法においては平均移動距離として集約されてしまい、各個体の捕獲位置に関する情報は考慮されない。そのことがダミーデータ解析における95%CI幅の広さにつながったと考えられる。その点で、捕獲位置に関する情報を最大限に活用しているベイズ空間明示標識再捕獲モデルはより優れていると考えられる。

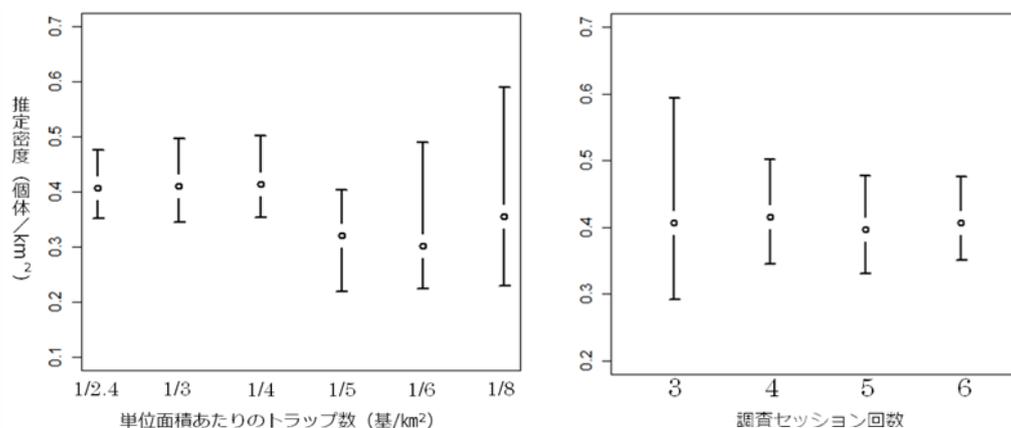
空間明示最尤法のメリットとしては、計算時間の短さとAICによるモデル選択が可能である点が挙げられる。北上山地のデータを用いた場合、ベイズ空間明示標識再捕獲モデルは推定値を得るまでに数日を要した（Core2 DUO E8600搭載のPCを使用）。一方、空間明示最尤法では10分程度で結果を得ることができた。多数の場所、または広域を対象とした標識再捕獲調査を行い、推定に際してさまざまな試行錯誤を行う必要があるときには、ベイズ空間明示標識再捕獲モデルの適用が計算時間の面で非現実的になる場合があるかもしれない。その場合には、空間明示最尤法は比較的よい代替になりえると考えられる。さらに、AICによるモデル選択を行うことで、例えば雌雄差を考慮に入れたモデルと、雌雄差を入れないモデルで推定を行い、推定結果の比較をモデル選択で行うことも可能である。

2010年と2011年の推定値が大きく異なった原因についてははっきりしないものの、すべての手法において2011年の方が低い傾向を示したことから推定手法の問題というよりもデータに起因している可能性が高いと推測される。2010年と2011年ではトラップを設置した空間スケールの違いなど調査デザインの違いばかりでなく、体毛サンプルの試料採取率や再捕獲率（ヘアトラップ班報告）、さらには、捕獲確率や σ のパラメータ推定値にも違いが見られた。調査動物の行動圏に対する調査面積¹⁵⁾や再捕獲個体の不均質性（性別、年齢、経験など）¹⁶⁾によって生息密度推定値がバイアスを受けることが報告されている。2010年と2011年の間で行動圏の違いがある可能性が示唆されたので、上記の要因が複合的に影響したのかもしれない。推定値の違いについては以上のようなことが推察できるものの、今後さらなる精査が必要である。

（2）トラップ配置の検証

1) トラップ数、セッション数の検証

単位面積あたりのヘア・トラップ数とセッション数を変化させ密度推定を行なった結果を図(4)-9に示した。トラップ数においては、4km²に1基まではトラップ密度の変化にも関わらず、推定値の平均値は0.40個体/km²程度の値を示し、変動は小さかった。ただし、95%CIはトラップ数が少ないほど広くなる傾向があった。5 km²あたり1基のトラップ数では中央値が0.320個体/km²とやや推定値が小さくなった。6 km²に1基のトラップ密度では、中央値が0.301個体/km²、8 km²に1基では、0.355個体/km²となり5 km²と同様に4 km²に1基までに比べるとやや低い推定結果となった。セッション数を変えて生息密度推定を行なった結果では、3、4、5セッション共に6セッションでの密度推定値である0.40個体/km²程度と大きくは異ならなかった。ただし、推定値の95%CIはセッション数が少なくなるほど広くなる傾向があった。単位面積あたりのトラップ数は地域ごとのクマの生息密度によって異なると考えられるが、トラップ数が生息密度推定の精度に影響しやすいことが示唆された。



図(4)-9 トラップ数とセッション数と密度推定結果の関係。エラーバーは95%CIを示す

2) 他地域のデータを用いた生息密度推定結果および分析成功率とトラップの関係

他地域のデータを用いて生息密度推定を行った結果を表(4)-4に示した。空間明示最尤法では再捕獲数が5個体以下と少ない地域(奈良、滋賀 2007年)では生息密度を推定することが出来なかった。Hartstack et al.¹⁴⁾の方法では全ての地域で密度を推定することができたが、再捕獲数が少ないほど95%CIが広がる傾向がみられた。特に奈良県の事例では95%CIの下限と上限の値が100倍近く異なり、推定精度が低いと考えられた。以上のことは、再捕獲数の重要性を示唆しており、個体数が少ない地域や再捕獲数の少ない地域では密度推定を行う際に注意が必要である。推定できた地域においては、空間明示最尤法とHartstack et al.の方法で推定結果に大きな違いは見られなかった。

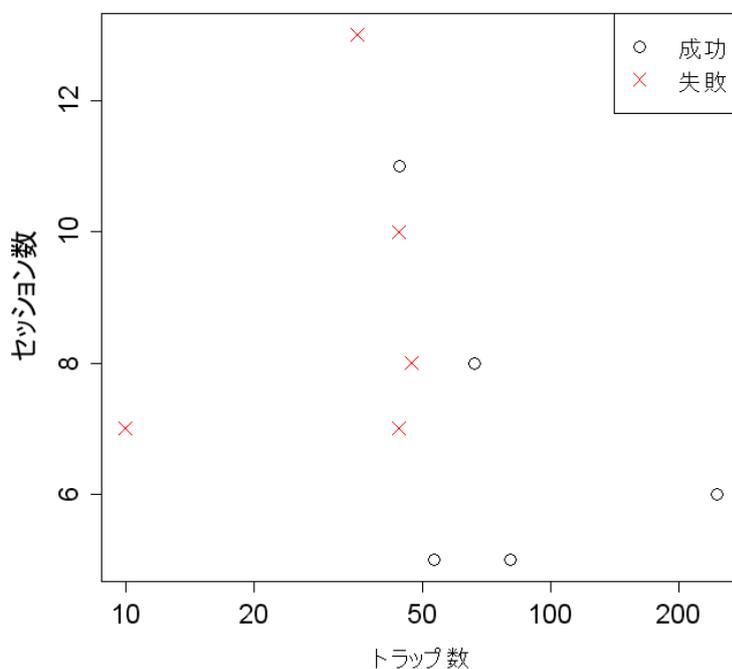
表(4)-4 他地域のデータを用いた個体数推定結果。95%CIを括弧内に示した。

地域	セッション数	再捕数	トラップ数	空間明示最尤法	Hartstack et al.の方法
富山	5	9	53	0.059 (0.029-0.122)	0.087 (0.049-0.164)
奈良	8	2	47	—	1.04 (0.11-10.4)
滋賀 2007年	10	4	44	—	0.001 (0.0003-0.007)
滋賀 2008年	11	7	44	0.1 (0.045-0.26)	0.087 (0.034-0.234)
丹沢	8	9	66	0.016 (0.008-0.031)	0.022 (0.015-0.032)

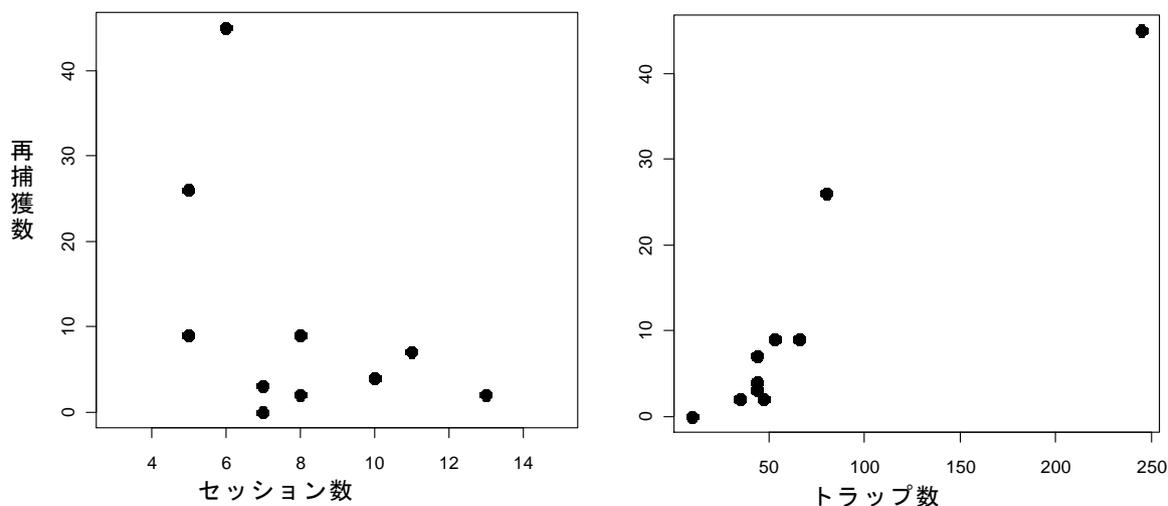
表中の—は生息密度推定ができなかったことを表す

生息密度推定の成否とパラメータの関係を評価したところ、サンプル数、再捕獲数、トラップ数が生息密度推定の成否と関連することが明らかとなった。ロジスティック回帰に用いたサンプル数が少なかったため、推定値の標準誤差が非常に大きいことを考慮に入れる必要があるが、ヘア・トラップでの採取サンプル数の少なさ、再捕獲数やトラップ数の少なさが生息密度推定の失敗に関係することが明らかとなった。また、調査を行う際に考慮ができるトラップ数およびセッション数の関係と分析成功の関係を図(4)-10に示した。セッション数は少なくとも密度推定が出

来ている事例はあるが、トラップ数が少ないと密度推定は失敗する傾向が見られた。さらに、再捕獲数とセッション数、トラップ数の関係を図(4)-11に示した。トラップ数の違いはあるものの、セッション数は再捕獲数と負の相関を示しているのに対し、トラップ数は再捕獲数と正の相関を示した。特に、セッション数が7から11のデータではほとんどトラップ数も変わらないため、セッション数を増やすことが必ずしも再捕獲数の増加にはつながらないかもしれない。トラップ数を可能な限り多くすることで、再捕獲数が確保され、標識再捕獲法を用いた生息密度推定の成功につながると考えられる。



図(4)-10 分析成功とトラップ数およびセッション数の関係。○×が各地域における事例をそれぞれ示す



図(4)-11 再捕獲数とセッション数、トラップ数の関係

(3) まとめ

生息密度推定手法間の精度検証を行った結果、標識再捕獲法による生息密度推定には、ベイズ空間明示標識再捕獲モデルないしは空間明示最尤法を用いることが望ましいと考えられた。今後、標識再捕獲データを用いた生息密度推定において標準的な手法になることが期待される。ベイズ空間明示標識再捕獲モデルはフリーソフトWinBUGS (<http://www.mrc-bsu.cam.ac.uk/bugs/>)により推定が可能であり、フリーの統計解析環境Rからデータおよびモデルコードの読み込み、推定結果の出力までの一連の操作を行うことができる。また、検証を行ったRのパッケージ”SPACECAP”¹は、GUI上での操作で推定を実行することも可能である。空間明示最尤法については、Program “DENSITY”² で実装されており、これについてもGUI上での操作が可能である。また、同様の機能をもつRのパッケージ”secr”も公開されている。このように、すでにソフトやパッケージが開発されていることも空間明示型標識再捕獲モデルの敷居を低くしている。

トラップ設置については、本研究の結果から、不均質なトラップ配置においてもベイズ空間明示標識再捕獲モデルを用いることにより頑健な推定結果が得られる可能性が高いこと、トラップ数が推定精度や推定の成功に重要であることが明らかとなった。これまで、生息密度推定の精度を高めるには、再捕獲数が多いこと⁴⁾やジェノタイプエラーを減らすこと¹⁷⁾などが指摘されてきた。本研究の成果から推定精度や推定の成功にはトラップ数を増やすことが有効であることが示唆された。ただし、実際のヘア・トラップのデータ解析においては、常に空間明示モデルの推定が良い結果を与えるとは限らない。実際の調査においては地形的な要因や季節変化などのさまざまな要因が資料採取率に影響を与えると考えられ、それらの影響については現実を単純化したダミーデータによる検証は不可能である。実際に調査を行う際には、あらかじめ予備調査を行った上で、行動圏サイズ、再捕獲率を考慮に入れ、トラップ数やセッション数を決定する必要があると考えられる¹⁸⁾。その上で、複数年にわたって調査を行うことで、このような不確実性にも対応できるかもしれない。

5. 本研究により得られた成果

(1) 科学的意義

捕獲の空間情報を用いることにより、個体の移動距離の情報を活用し、より客観的な密度推定を行う手法を確立できた。精度が高い生息密度推定法の確立により、クマ類の個体群動態の把握や堅果類の豊凶との関係の解明にも貢献できると考えられる。

(2) 環境政策への貢献

本研究によって、生息密度推定の精度や成功にはトラップ数や再捕獲数が重要であることが明らかとなった。自治体等が密度推定を行う際には、予算や調査面積など状況に応じてトラップ設置方法を決定しなければならない。本研究の結果は精度の高い密度推定を目指してヘア・トラップ設置における予算配分を行うための資料として役立つと期待される。さらに、精度が高い密度推定手法は保護管理において有用な手法であり、クマ類の保護管理政策への貢献が期待される。

¹ <http://cran.r-project.org/web/packages/SPACECAP/index.html>

² <http://www.otago.ac.nz/density/>

研究成果を自治体等が利用する際の参照とするため、下記のマニュアルを作成し、都道府県鳥獣保護部局へ配布した。

- クマ類の個体数を調べる：ヘア・トラップ法とカメラトラップ法の手引き（統合版）（印刷配布） URL：<http://www.bear-project.org/pdf/Tebiki/tebiki-tougou.pdf>

6. 国際共同研究等の状況

特に記載すべき事項はない

7. 研究成果の発表状況

(1) 誌上発表

<論文（査読あり）>

- Ohta, U., Jusup, M., Mano, T., Tsuruga, H. and Matsuda, M. 2012. Adaptive Management of the Brown Bear Population in Hokkaido, Japan. *Ecological Modelling*, DOI: 10.1016/j.ecolmodel.2012.05.011 (in press, online first)

<査読付論文に準ずる成果発表>

特に記載すべき事項はない

<その他誌上発表（査読なし）>

特に記載すべき事項はない

(2) 口頭発表（学会等）

- 深澤圭太・太田海香・松田裕之：第16回野生生物保護学会・日本哺乳類学会2010年度合同大会、自由集会 F-10「クマ類の個体数を推定する：DNA マーカー個体識別の有効性と課題」（2010）「空間明示型 Capture-Recapture モデル：個体密度はどのように計算すべきか」
- 深澤圭太：2011年度日本哺乳類学会自由集会（2011年9月、宮崎）、自由集会「クマ類の個体数推定法の開発：環境省究総合推進費プロジェクトから」、（2011）空間明示型標識再捕獲モデルの密度推定精度の比較検討。
- Ohta, U., Mano, T., Tsuruga, H., Jusup, M. and Matsuda, H.: Session "Wildlife Management Challenges - Bears around the world", 『Pathways to Success 2010 Conference』, (September, 2010, Colorado, USA). 「Adaptive management plan of brown bear (*Ursus arctos*) in Oshima peninsula, Hokkaido, Japan」, (2010).
- 太田海香・間野勉・釣賀一二三・Marko Jusup・松田裕之：第26回個体群生態学会大会(2010年9月、横浜). 北海道渡島半島地域におけるヒグマ個体群の順応的管理手法の開発, (2010)
- 山内貴義・鞍懸重和・深澤圭太・米田政明：2011年度日本哺乳類学会（2011年9月、宮崎）.ヘア・トラップ法を用いた岩手県北奥羽地域個体群に生息するツキノワグマの生息数推定（2011）.
- 山内貴義・鞍懸重和・深澤圭太・米田政明：第17回日本野生動物医学会発表要旨（2011年9月、東京）.ヘア・トラップ法を用いた岩手県北上高地北部地域個体群に生息するツキノワグ

マの生息数推定. (2011) .

(3) 出願特許

特に記載すべき事項はない

(4) シンポジウム、セミナーの開催（主催のもの）

太田海香, 今野建志郎, シンポジウム「現場への適用を目指した個体群管理モデルの展望と課題」, 『第26回個体群生態学会大会』, 横浜, (2010年)

(5) マスコミ等への公表・報道等

特に記載すべき事項はない

(6) その他

特に記載すべき事項はない

8. 引用文献

- 1) 森光由樹. 2008. 各都道府県のヘア・トラップ調査の実施状況と長野県における実施例. 哺乳類科学48:133-138.
- 2) Dice, L. R. 1938. Some census methods for mammals. *Journal of Wildlife Management* 2:119-130.
- 3) Lukacs, P. M. and Burnham, K. P. (2005) Estimating population size from DNA-based closed capture-recapture data incorporating genotyping error. *The Journal of Wildlife Management* 69:396-403.
- 4) Efford, M. G., Borchers, D. L. and Byrom, A. E. 2009. Density estimation by spatially explicit capture-recapture::likelihood-based methods. Pp259-269 in D. L. Thomson, E. G. Cooth, and M. J. Conroy, editors. *Modelling demographic processes in marked populations*. Springer, New York, USA.
- 5) Wilson, K. R. and Anderson, D. R. 1985. Evaluation of two density estimators of small mammal population size. *Journal of Mammalogy* 66:13-21.
- 6) Borchers, D. L. and Efford, M. G. 2008. Spatially explicit maximum likelihood methods for capture-recapture studies. *Biometrics*, 64:377-385.
- 7) Gardner, B., Royle, J. A. and Wegan, M. T. 2009. Hierarchical models for estimating density from DNA mark-recapture studies. *Ecology* 90:1106-1115.
- 8) Royle, J. A., Karanth, K. U., Gopalaswamy, A. N. and Kumar, S. N. 2009. Bayesian inference in camera trapping studies for a class of spatial capture-recapture models. *Ecology* 90: 3233-3244.
- 9) 岩手県. 2007. 第2次ツキノワグマ保護管理計画（巻末参考資料；ツキノワグマの生息数の推定について）. 岩手県.
- 10) Otis, D. L., Burnham, K. P., White, G. C. and Anderson, D. R. 1978. Statistical inference from capture data on closed animal populations. *Wildlife Monographs* 62:1-135.
- 11) 米田一彦. 1990. 秋田県太平山地域におけるツキノワグマの生態・テレメトリー調査. In 人間活動との共存を目指した野生鳥獣の保護管理に関する研究 (eds. 財団法人日本野生生物研究

センター). 環境庁自然保護局, 東京.

- 12) Izumiyama, S. and Shiraishi, T. 2004. Seasonal changes in elevation and habitat use of the Asiatic black bear (*Ursus thibetanus*) in the Northern Japan Alps. *Mammal Study* 29:1-8.
- 13) Miura, S. and Oka, T. 2003. Evaluation of apple bait hair-traps for genetic tagging of Asiatic black bears in the Kitakami Highland, northern Honshu, Japan. *Mammal Study* 28:149-152.
- 14) Hartstack, A. W., Hollingsworth, J. P., Ridgway, R. L. and Hunt, H. H. 1971. Determination of trap spacings required to control an insect population. *Journal of Economic Entomology* 64, 1090-1100.
- 15) Marques, T. A., Thomas, L. and Royle, J. A. 2011. A hierarchical model for spatial capture-recapture data : comment. *Ecology*, 92:526-528.
- 16) Ebert, C., Knauer, F., Storch, I. and Hohmann, U. 2010. Individual heterogeneity as a pitfall in population estimates based on non-invasive genetic sampling: a review and recommendations. *Wildlife Biology*, 16:225-240.
- 17) Knapp, S. M., Craig, B. A. and Waits, L. P. 2009. Incorporating Genotyping Error Into Non-Invasive DNA-Based Mark-Recapture Population Estimates. *Journal of Wildlife Management* 73:598-604
- 18) Foster, R. J. and Harmsen, B. J. 2012. A critique of density estimation from camera-trap data. *Journal of Wildlife Management*, 76:224-236.

Research on Estimating Population Size of Bears in Japan

Principal Investigator: Masaaki YONEDA (myoneda@jwrc.or.jp)

Institution: Japan Wildlife Research Center (JWRC)

Cooperated by: Forestry and Forest Products Research Institute (FFPRI), Hokkaido Research Organization (HRO), Iwate University, Yamagata University, Yokohama National University, Waseda University, Nihon University, Research Institute for Environmental Sciences and Public Health of Iwate Prefecture, and Wildlife Management Office Inc (WMO)

[Abstract]

Key Words: Bear, Hair trap, DNA marker, Camera trap, Bayesian spatially explicit model

Two species of bear, Asiatic black bear (*Ursus thibetanus*) and brown bear (*U. arctos*), inhabit Japan. Appropriate managements are required for both species to maintain effective population size and to minimize bear-human conflict. Population size and their trends are essential information for scientific and strategic management; however, suitable methods of the bear population size estimation with cost efficiency have not yet been developed. We started this study to provide methods for estimating population size of the bears in landscape of Japan for local governments which take on the bear management as game animals. We focused four subjects, (i) hair trapping design, (ii) DNA marker analysis from small quantities hair samples for individual identification, (iii) development of alternative and additional study methods, and (iv) population modeling and monitoring for estimating population size of the bears from the hair trapping, DNA analysis and alternative methods. We conducted large scale hair trap studies in Kitakami Highland in 2010 and 2011, and collected a total of around 3,100 hair samples of the black bears. We also carried out hair trapping in 3 areas in Hokkaido for the brown bear. We demonstrated suitable six genetic markers for the black bears and 12 genetic markers for the brown bears. Amelogenin gene was used for sex determination. The genotyping error rates in the samples with ≥ 10 hairs were found to be lower than those in the samples with < 9 hairs. A procedure for DNA re-analysis of samples which showed uncertain data and mismatch of one or two alleles was developed to reduce genotyping error of allelic dropout and false alleles. We confirmed that chest mark of the black bear is a good natural-marking of individual identification by camera trapping study. We set up 80 camera traps in the Kitakami Highland study area in 2011. The camera trap study showed similar results in the population size estimation of the bears to the hair trap study in the same area. We developed three population models, (i) average maximum movement distance method, (ii) spatially maximum likelihood method, and (iii) Bayesian spatially explicit model, for estimating bear population size. The Bayesian spatially explicit model showed the most accurate estimation using dummy data for the

study area. We also demonstrated that > 0.25 trap/km² is necessary for the hair trap study of the black bear, from analysis of relationship between density of the hair traps and accuracy of population size estimation.

環境省環境研究総合推進費終了研究等成果報告書

(分担研究者用編集版)

クマ類の個体数推定法の開発に関する研究

(課題番号 S2-10)

平成 21～23 年度

研究代表機関

財団法人 自然環境研究センター

〒110-8676 東京都台東区下谷 3-10-10

Tel.03-5824-0960 (代表)、Fax.03-5824-0961 (事務局)

リサイクル適正の表示：紙へリサイクル可

本冊子の表紙・背表紙・裏表紙および製本加工は、グリーン購入法に基づく基本方針における「印刷」に関わる判断の基準に従い、印刷用の紙へのリサイクルに適した材料[Aランク]を用い、報告書本体は、グリーン購入法総合評価値 85(古紙パルプ配合率 100% : 80 (評価値)) の用紙を使用し、富士ゼロックス株式会社 DocuCentre-f1100 適合の乾式トナーを用いて印刷しています。