

カモシカ / シカ糞の簡易 DNA 抽出 – PCR 法による種判別

- 新規プライマーセット・阻害物質抵抗性 DNA 合成酵素による安価・迅速な識別 -

西田伸・岩本俊孝*

Species Identification of Serow or Deer Feces by Simple DNA Extraction-PCR Method -Inexpensive and Rapid Identification Using New Primer Sets with Inhibitor-Resistant DNA Polymerase-

Shin NISHIDA and Toshitaka IWAMOTO*

要 旨

日本固有種で国の特別天然記念物であるニホンカモシカ *Capricornis crispus* (Temminck) において、特に九州個体群はその数を減らしており、環境省のレッドリストにおいても絶滅の恐れのある地域個体群 (LP) とされている。個体数の推定には糞塊法や糞粒法が用いられているが、ニホンカモシカと一部同所的に生息するニホンジカの糞粒の形状は類似する。糞塊 / 糞粒の種の判別はより正確な個体数推定に必須である。近年この種判別において、DNA 解析法が頻用されている。本報告では、簡易かつ迅速でより安価な DNA 種判別の開発を試みた。mtDNA 12S rRNA 領域を対象とした種特異的プライマーセットを新たに設計し、簡易 DNA 抽出法と阻害物質抵抗性 DNA 合成酵素による PCR とを併用することで、作業時間 2.5 時間、かつ従来法の 1/4 のコストでの種判別が可能となった。実際に野外より採取された糞塊試料 (n = 387) についてこの方法を適用したところ、その解析成功率は 92.3% となった。さらに解析困難試料については、DNA 抽出法等を変更することで、最終的に 97.2% の試料について、カモシカ / シカの判別に成功した。

はじめに

国の特別天然記念物であるニホンカモシカ *Capricornis crispus* (Temminck) は、鯨偶蹄目 (Cetartiodactyla) ウシ科 (Bovidae) ヤギ亜科 (Caprinae) カモシカ属 (*Capricornis*) に属する日本固有種である。中国地方を除く本州、四国、九州の低山帯から亜高山帯を中心に分布する^{1,2)}。北限は青森県下北半島、南限は宮崎県綾町とされるが、南限についてはより南側の地域からも目撃情報が寄せられており、分布域が拡大している可能性が示唆されている³⁾。

*宮崎大学名誉教授

近年、東北地方、中部地方を中心に分布域が拡大し、農業被害が深刻化している²⁾。一方で、熊本、大分、宮崎の3県に分布する九州地方のカモシカ個体群については、その数を減らし続けており（1994-1995: 約 2,000 頭、2002-2003: 約 650 頭、2011-2012: 約 810 頭）³⁾、環境省のレッドリストにおいても絶滅の恐れのある地域個体群（LP）とされている⁴⁾。上記3県においてもそれぞれ絶滅危惧 IA 類（CR）（熊本県）⁵⁾、絶滅危惧 II 類（VU）（大分県）⁶⁾、準絶滅危惧（NT-g）（宮崎県）⁷⁾に区分されている。最新の「平成 30・令和元年度 九州山地カモシカ特別調査」の結果は、さらに衝撃的なものであった。推定個体数は約 200 頭となり、これは大型・中型哺乳類において個体群を維持できる最低頭数を大きく下回るものである。さらに山塊ごとに孤立した小集団に分断されていることが示唆された³⁾。

減少原因については様々な要因が考えられているが、疥癬症やワナ・防鹿ネットによる錯誤捕獲とともに、主にはニホンジカ *Cervus nippon* Temminck の分布域の拡大および個体数の爆発的増加が直接的に影響を与えているとされる^{3,8)}。簡単には、狩猟人口の減少、広域伐採などの影響により増加したシカが、本来のカモシカ生息地である高標高域へ侵入することで競合し、カモシカをより低標高域へ追いやったこと、さらにシカが下層植生を食べ尽くすことで広域に両種の餌場が破壊されたことによる。結果、カモシカとシカの分布域の広範囲に渡る重複も生じている。

種や集団の保全を考える上で、その個体数の推定は重要な情報となる。カモシカやシカの個体数・密度の推定には糞密度法（糞塊法 / 糞粒法）^{2,9,10)} が用いられている。これは一定面積の方形区内の糞塊数からその糞塊密度を計算し、それに基づき生息密度を推定するものである。当然、その糞塊がカモシカのものであるかシカのものであるかの判別が必要となる。一般的にカモシカの糞粒はシカのそれに比べてやや小さく細長いとされるが、その形状は類似し、個体差も大きいため、糞の形状から種を判別することは困難である¹¹⁾。糞塊で比べると、カモシカは 200 粒以上のまとまった糞塊を形成するのに対して、シカのそれはバラバラと広範囲に散らばるか、糞塊を形成しても 200-150 粒以下であるとされる。これらが種判別の基準とされてきたが、実際は例外も多い²⁾。

近年、この糞の種判別について DNA 解析が頻用される。糞には排泄種の腸粘膜組織が含まれており、この組織の DNA を解析することで種が判別できる。ミトコンドリア (mt) DNA の cytochrome *b* 遺伝子領域や control region (D-loop 領域) を対象に、その塩基配列を解析し、配列の相同性より種判別を行う方法（塩基配列解析法）が一般的だが、これは解析コストと時間を要する。

Yamashiro et al. (2010)¹²⁾ はより簡便なカモシカ / シカ種判別法として、mtDNA cytochrome *b* 遺伝子を対象に、PCR-RFLP（制限酵素断片長多型解析）法を応用した。糞から DNA を抽出し、PCR で対象領域を増幅したのち、制限酵素で増幅産物を切断する。その切断された断片の長さの違いにより種を判別する。実際にこの DNA 種判別を行った結果では、調査員が目視にてカモシカと判断した糞塊の 41.4% がシカであったと報告されている。

Aikawa et al. (2015)¹³⁾ は、同じく cytochrome *b* 遺伝子を対象として、カモシカとニホンジカのそれぞれに特異的なプライマーセットを用い、LAMP 法により対象領域を増幅し、その増幅の有無を蛍光発色により目視で確認するという画期的な方法を発表した。この方法ではさらに、爪楊枝で糞を拭い、そこに付着した試料を専用の抽出液中で 15 分間加熱するだけの簡易 DNA 抽出法と合わせることで、1.5 時間以下の作業時間での判別を可能とした。

LAMP 法による判別は迅速かつ容易であり非常に有用であるが、試薬キットが受注販売 (2020 年 10 月現在) であること、また解析コストが塩基配列解析と同程度かかることが難点でもある。そこで本報告では、新たに PCR プライマーセットを設計し、簡易 DNA 抽出と阻害物質抵抗性 DNA 合成酵素を用いた PCR を合わせることで、迅速かつより安価なカモシカ / シカ DNA 種判別法の開発を試みた。

試料および方法

・試料採取

解析試料は「平成 30・令和元年度 九州山地カモシカ特別調査」³⁾ およびその関連調査により宮崎県、熊本県、大分県の各調査地より採取されたものとした。調査地にてカモシカ糞塊と判断されたもの、およびシカとカモシカの判別が困難であった糞粒 / 糞塊を解析対象とした。よって明らかなシカ糞は含まれていない。試料数は計 387 である。糞粒の状態は糞粒表面の粘膜がまだ湿り気をもつ新糞から、乾燥や分解が進んだ古糞、さらに分解が進み粒の形が崩れかけているボロ糞と様々なものを含む。糞試料は一つの糞塊より数粒から 10 粒程度を、使い捨ての割り箸等を用いて採取し、15 ml 遠沈管もしくはチャック付きポリ袋に入れて研究室へ持ち帰り、室温もしくは冷蔵 / 冷凍で保管した。

・DNA の抽出

糞粒の内部や表面には個体の腸粘膜が残存しており、この粘膜残渣から個体の全 DNA を抽出した。この糞粒からの DNA の抽出は LAMP 法キット (ニホンジカ・カモシカ識別キット: ニッポンジーン) 付属の抽出液、もしくは MightyPrep reagent for DNA (TaKaRa Bio Inc.) による簡易法で行った。具体的には爪楊枝を用いて糞粒の表面を拭うか、糞粒を突き刺し (< 4 mm)、そこに付着した試料を DNA 抽出試料とした。LAMP 法キット付属の抽出液では、0.2 ml PCR チューブに抽出液を 50 μ l 加え (キット付属マニュアルの半量であることに留意)、そこへ先ほどの試料が付着した爪楊枝の先端をハサミで切り落とした (最新の LAMP 法キット・マニュアル version 8.0.0 では試料のついた先端を液中でかき混ぜ、爪楊枝は抜き取りとされている。本報告ではこの方法について試験をしてない)。その後、サーマルサイクラーにて 60 $^{\circ}$ C 10 分、90 $^{\circ}$ C 5 分の熱処理を加えた後、これを粗抽出 DNA 溶液とした。MightyPrep reagent for DNA 試薬では、1.5 ml スクリューキャップチューブもしくは 0.2 ml PCR チューブに 100 μ l の試薬を加え、そこへ試料が付着した爪楊枝先端を落とし入れた。反応はプロックインキュベーターかサーマルサイクラーにて 95 $^{\circ}$ C 10 分で行った。

簡易抽出法により増幅が認められなかった試料については、DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN) により全 DNA 抽出を行った。まず、糞粒表面を含む数十 mg を取り出し、これを 1.5 ml マイクロチューブに入れ、ATL buffer 270 μ l とタンパク分解酵素である proteinase-K 30 μ l を加えた。その後、56 $^{\circ}$ C で一昼夜の転倒混和にてタンパク質の分解を行った。17,000 G、10 分の遠心操作後、上澄みの 50 μ l ~ 100 μ l を新しいチューブに取り、ATL buffer にて 200 μ l に調整した。その後の操作はキット付属のマニュアルに従い、抽出 DNA は 150 μ l の AE buffer により溶出し、4 $^{\circ}$ C にて保存した。

・LAMP 法による種判別

本解析では、同定結果の正誤の確認と成功率の比較のため、本報による PCR 法による判別に加え、一部試料 (n = 130) については LAMP 法による判別も同時に行った。LAMP 法によるカモシカ / シカの判別はニホンジカ・カモシカ識別キット (ニッポンジーン : NE0181) を用いた。なお用いた試薬量は全て添付マニュアルの半量とした。

・新規 PCR プライマーの設計

一般的に哺乳類の種判別においては、mtDNA cytochrome *b* 遺伝子領域や control region (D-loop 領域) が用いられることが多い。一方でこれらの領域は種内においても多型部位が比較的多く存在する。よって本解析においては、カモシカとシカを正確に判別しつつ、プライミング部位における多型を避けるため、より種内の多型性が低い mtDNA 12S rRNA 領域を対象とした。カモシカもしくはシカをそれぞれ特異的に増幅し、その増幅断片の長さの違いにより種を判別できるように、2つの新規プライマーセットを設計した (表 1)。また分解・断片化した DNA からの増幅を考慮し、増幅断片長は 200 塩基対 (bp) 以下となるようにした。カモシカ増幅用プライマーセット : CapCer-F2 × Cap-R1 はニホンカモシカでのみ 132 bp の増幅バンドを、ニホンジカ増幅用プライマーセット : Cer-F1 × CapCer-R6 は、ニホンジカでのみ 198 bp の増幅バンドを示す (図 1)。

プライマーセットの設計および選定は以下の手順で行った。国際塩基配列データベース (INSDC) より、ニホンカモシカ (Accession No. AP003429; FJ207533) および複数の亜種を含むニホンジカ (AB218689; AB211429; DQ985076; DQ191150; HQ191428; JN389443)、そしてヒトの該当配列を参照とし、Primer 3 Plus¹⁴⁾ (<https://primer3plus.com/>) を用いて複数の候補プライマーを設計した。候補プライマーセットは MEGA ver.7¹⁵⁾ を用いた多重整列による確認、および Amplify 4 (<https://engels.genetics.wisc.edu/amplify/>) による PCR シミュレーション、さらに実際の PCR 実験による増幅確認を行い、有効なプライマーセットの絞り込みを行った (data not shown)。

表 1 mtDNA 12S rRNA 領域に新たに設計された種特異的プライマーセット

増幅対象種	増幅長 (bp)	プライマー名	配列
ニホンカモシカ	132	CapCer-F2	5'-ACAGGAACACGGCGTAAAC-3'
		Cap-R1	5'-GCTATAGTGTGTCAGCTGTTATAGG-3'
ニホンジカ	198	Cer-F1	5'-CCCAGCCTTCCTATTGACCCTT-3'
		CapCer-R6	5'-GCTTAGTCAAACCTTCGTTTATGGC-3'

・PCR 法による種判別

PCR は阻害物質抵抗性の高い Tks Gflex DNA Polymerase (Gflex: TaKaRa Bio Inc.) を使い、反応系量は 25 μ l とした。粗 DNA 抽出液は 0.5 μ l を反応液に加えた。各プライマーの濃度は 0.4 μ M とし、上述の新たに設計した 4つのプライマーを同時に用いた (1 本系 PCR)。反応サイクルは 94°C 1 分ののち、94°C 30 秒、60°C 15 秒、68°C 15 秒を 40 回繰り返した。さらに、この方法により増幅が認められなかった場合は、カモシカ用とニホンジカ用プライマーセットを分け、それぞれ個別に PCR (2 本系 PCR) を行った。また比較のために、異なる PCR 酵

素：TaKaRa Ex Taq Hot Start Version (Ex Taq HS: TaKaRa Bio Inc.) および MightyAmp DNA polymerase Ver.3 (MightyAmp: TaKaRa Bio Inc.) による増幅も試みた。なお反応系量はいずれも 25 μ l とし、プライマー濃度および加えた DNA 抽出液の量は Gflex の場合と同様とした。得られた PCR 産物は 2% アガロースゲルにて 30 分の電気泳動を行い、エチジウムブロマイド (0.5 μ g/ml) にて 10-15 分の染色後、トランスイルミネーターにて増幅バンドの有無およびその長さを確認することで種の判別を行った。

結果および考察

・PCR 酵素の選択

簡易 DNA 抽出試料を鋳型として 3 種の異なる DNA 合成酵素 (Gflex、MightyAmp、Ex Taq HS) を用いて PCR を行った。Gflex (図 1) および MightyAmp においては対象領域 (カモシカ : 132 bp、シカ : 198 bp) の増幅が認められた。一方で、Ex Taq HS においては増幅が確認できなかった。また Gflex は MightyAmp よりも特異性の高い増幅が可能であり、増幅効率もより高かった。一般的に、土壌中には腐植酸等が多く存在し、これが PCR 増幅の強力な阻害剤となる。土壌に接する糞にもこれら PCR 阻害物質が付着しており、本報告でも用いた簡易 DNA 抽出においては、これら阻害物質を排除できない。Gflex および MightyAmp はいずれも PCR 阻害物質に対する抵抗性が高い酵素であり、土壌由来の PCR 阻害物質が含まれる糞試料からのクルードな簡易 DNA 抽出液においても PCR が可能であった。Ex Taq HS も高い増幅効率を持つ酵素であるが、試料中の PCR 阻害物質の影響を受けたと考えられる。

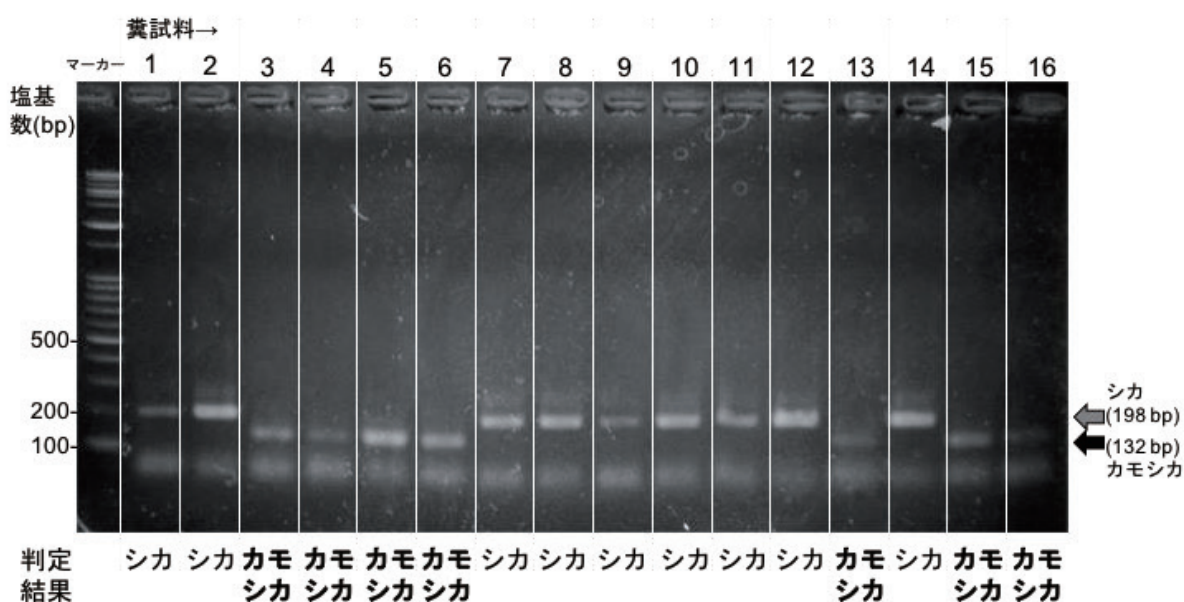


図 1 簡易抽出-PCR 法 (1 本系 PCR : Gflex 酵素) による PCR 産物の電気泳動像。16 試料 (糞試料 1-16) における解析例。左 1 番目のレーンは分子量マーカー。132 bp の増幅バンドはカモシカ (3-6、13、15、16) を、198 bp の増幅バンドはシカ (1、2、7-12、14) を示す。

また図1のGflexによるPCR産物の電気泳動像にあるように、多くの試料において100 bp以下の領域にバンドが検出された。これはプライマーダイマーによるバンドと考えられる。DNA抽出液に含まれる対象種のDNA量が多い、または精製度が高いほどこのダイマーは解消される傾向にあった。この非特異的バンドはその長さが100 bp以下と対象領域の増幅断片長とは明瞭に異なっており、種の判定において影響を与えることはなかった。

・本PCR法の精度およびLAMP法との比較

本PCR法とLAMP法を併用した試料(n = 130)のうち、LAMP法により種が判別できた112試料について双方の結果に矛盾はなかった。よって、本PCR法においてもシカ/カモシカの種判別が正確に行えていることが示された。併用した130試料におけるLAMP法による成功率は80.8%、一方で本PCR法による成功率は96.9% (126/130) とLAMP法より高かった。ただし、本報告ではLAMP法の反応系量を付属マニュアルの半量に調整しており、これがLAMP法の成功率に大きく影響を与えた可能性がある。なお、本PCR法において種が判別できなかった4試料は、LAMP法においては判別に成功した。以上の結果から、本PCR法の判別精度および成功度はLAMP法と同様かそれ以上であると言える。

・本PCR法の判定成功率

本PCR法に供した387試料のうち、簡易DNA抽出-PCR法(1本系PCR)によりカモシカ/シカの判別に成功した試料は357個で成功率は92.3%であった。この方法により判別できなかった30試料の内12試料については、カモシカとシカを別々に増幅する2本系PCRにより判別が可能であった。1本系PCRでは都合4つのプライマーを加えることもあり、プライマー同士が結合するプライマーダイマーの影響が推測される。1本系PCRの成功率は92.3%と高く、多くの試料においては問題とならないようであるが、抽出液中に含まれる対象DNAの濃度が低い場合や、PCR阻害物質の量が多い場合には、2本系PCRが有効だと思われる。

15試料については、PCR阻害物質の排除を目的にDNA抽出方法を簡易法からDNeasy kitを用いた方法に変更した。その結果、1本系PCRで5試料、2本系PCRで2試料が新たに判別可能であった。最終的に簡易DNA抽出-1本系PCR/2本系PCR、DNeasy Kit-1本系PCR/2本系PCRを併用することで97.2% (376/387試料) についてカモシカ/シカの判別に成功した。土壌等からのPCR阻害物質の混入は誤同定の可能性も含めて、判定成功率に大きく影響を与える。増幅が弱く電気泳動像において判別が困難な場合には、DNeasy等による抽出・精製を必要とする。種を同定できなかった11試料のうち、2試料はカモシカもしくはシカではない種と推測されるものであった。残りの試料のうち4試料はいわゆるボロ糞であり、ほとんどが粒の形状も大きく崩れた状態のものであった。概ね、糞粒の形状が維持されている状態であれば同定可能であった。

・コストおよび作業時間の比較

塩基配列解析法、LAMP法および本PCR法による作業時間とコストについて比較する。例えば24試料を一度に解析することを想定した場合、本研究室の塩基配列解析では最短で2日を要する。一方でLAMP法では1.5時間以下、そして本PCR法では2.5時間で完了する。LAMP法との作業時間の1時間の差は、電気泳動および染色に要する時間である。コストに

ついてみると、各キットおよび主要な試薬の定価ベース（消費税 10% を含む：2020 年 10 月現在）で概算した場合、塩基配列解析法（片方の DNA 鎖のみを解析）で ¥1,200（両鎖解析で ¥1,500）、LAMP 法キットで ¥1,100（半量とした場合 ¥550）、そして本 PCR 法（1 本系）で ¥250（2 本系で ¥350）となった。本 PCR 法では従来法のおよそ 1/4 のコストで分析可能である。本 PCR 法は、比較的高価なサーマルサイクラーを必要とするため、LAMP 法よりも多くの初期費用を必要とするが、日頃から PCR を行っているような研究室 / 機関においては、慣れた作業のみで、かつ安価に解析が行えるメリットは大きい。

・カモシカおよびシカ糞塊の糞粒数：九州山地カモシカ特別調査より

「平成 30・令和元年度九州山地カモシカ特別調査」³⁾において、本法による解析を行った 387 試料のうち、カモシカと判定された糞塊は 128、シカと判定された糞塊が 248、不明が 11 であった。

1 糞塊の糞粒数が計数された糞塊のみを用い（227 糞塊：カモシカ 96、シカ 131）、種と糞粒数との関係を比較した（図 2）。カモシカと判定されたものの最少は

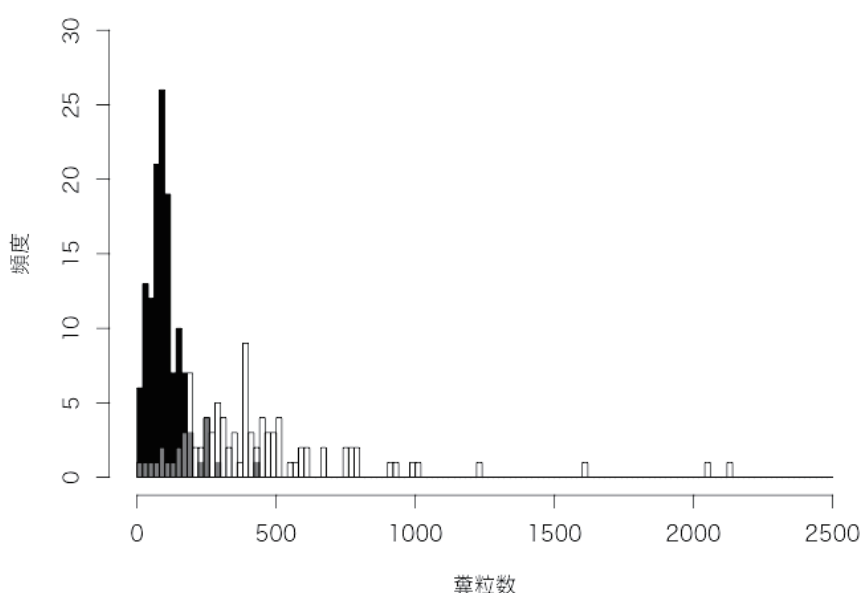


図 2 DNA 種判別された糞塊における 1 糞塊の糞粒数頻度分布。黒：ニホンシカ、白：ニホンカモシカ、両者の分布の重なる部分は灰色で示されている。（平成 30・令和元年度九州山地カモシカ特別調査報告書より転載³⁾）

20 粒で、次いで 30 粒、44 粒、70 粒、82 粒、100 粒と続いた。最大粒数は 2135 粒、平均 ± 標準偏差が 448.4 ± 355.9 粒、中央値が 389.5 粒であった。一方でシカは最少粒数が 11 粒、最大が 436 粒、200 粒を超える糞塊は合わせて 8 糞塊が記録された。平均 ± 標準偏差が 101.2 ± 62.2 粒、中央値が 90 粒であった。ただし本解析では、カモシカ糞および種の判別が困難と判断された糞のみを対象とし、明らかにシカ糞と判定できた試料は含まれていない。よって本調査におけるシカの糞粒数、特に平均および中央値は過大となっていると考えられる。実際に調査地で観察されるシカ糞は糞粒が散らばり糞塊を形成していないことも多い。

調査された糞塊の 450 粒以下において、両種の 1 糞塊中の粒数は重複していた。カモシカと判定された糞塊において、粒数が 20 粒、30 粒と少なかったものは、いずれもボロ糞と記録されており、分解や流出の進んだ糞塊であったことを示唆している。また 70 粒であった糞塊は粒径が小さく、仔カモシカの糞であった可能性がある。頻度分布図（図 2）においてカモシカは 180-200 粒および 380-400 粒でピークを示すものの、180-520 粒までの幅広いレンジでその頻度は比較的高くなっており、標準偏差も ± 355.9 粒と粒数のばらつきが大きかった。これ

は貯め糞の頻度 / 個体数と糞塊の分解・流出の影響を受けた結果と考えられる。また本調査において、一般的にカモシカの最少糞粒数とされてきた 200 粒を超えるシカ糞塊も複数検出された。シカの最大糞粒数である 436 粒、続く 300 粒は偶発的に複数個体が同所的に排泄した可能性や、シカとカモシカの糞塊が混合していた可能性もあり、例外的であると考えられる。一方で、250 粒未満の糞塊（カモシカ・シカの両方を含む）においてカモシカと判定された糞塊（28 糞塊）の割合は 18.1%（28/155 糞塊）、カモシカと判定された全ての糞塊のうち、糞粒数が 250 粒未満であるものの割合は 29.2%（28/96 糞塊）とこれらの割合は大きかった。結果として例外的なシカ糞塊を除き、250 粒未満の糞塊は糞粒数のみでは種の判別は困難であり、DNA 解析による種判別は有効かつ必要な手段であるといえる³⁾。

謝 辞

本解析は、大分県教育委員会、熊本県教育委員会および宮崎県教育委員会の 3 者により、国庫補助を受け、文化庁の指導を得て実施された「平成 30・令和元年度 九州山地カモシカ特別調査」の一環として行われた。具体的には大分県の事業主体である大分県教育委員会、熊本県の事業受託者である株式会社 九州自然環境研究所、および宮崎県の事業受託者である NPO 法人 宮崎野生動物研究会からの依頼を受けたものである。文化庁および上記 3 教育委員会、各県の事業受託者の皆様および関連機関の皆様、そして野外調査に従事された 80 名を超える調査員の皆様のご協力に感謝申し上げます。

引用文献

- 1) 奥村栄朗, 2003. 北限と南限のニホンカモシカ: 生息環境と個体群の状況. 森林科学 38: 59-63
- 2) 落合啓二, 2016. ニホンカモシカ: 行動と生態 (Natural History Series). 東京大学出版会. 東京. 290 pp.
- 3) 大分・熊本・宮崎県教育委員会, 2020. 平成 30 年・令和元年度 九州山地カモシカ特別調査報告書. 大分県教育委員会熊本県教育委員会・宮崎県教育委員会. 140 pp
- 4) 環境省 2020. 環境省レッドリスト 2020.
<http://www.env.go.jp/press/107905.html> (2020 年 10 月 20 日閲覧.)
- 5) 熊本県, 2019. レッドデータブックくまもと 2019.
https://www.pref.kumamoto.jp/kiji_31095.html (2020 年 10 月 20 日閲覧.)
- 6) 大分県, 2011. レッドデータブックおおいた 2011.
<http://www.pref.oita.jp/10550/reddata2011/index.html> (2020 年 10 月 20 日閲覧.)
- 7) 宮崎県, 2015. 宮崎県版レッドリスト.
<https://www.pref.miyazaki.lg.jp/shizen/kurashi/shizen/page00193.html> (2020 年 10 月 20 日閲覧.)
- 8) 安田雅俊, 栗原智昭, 緒方俊輔, 2012. 宮崎県北部におけるカモシカの生息記録の分布の特徴. 哺乳類科学 52: 41-45.
- 9) 小野勇一, 東和敬, 土居昭夫, 山口迪, 1976. 祖母山系 (障子岩, 大障子岳一帯) のニホンカモシカの生息に関する調査報告. 大分県文化財調査報告 36: 1-12.
- 10) 岩本俊孝, 坂田拓司, 中園敏之, 歌岡宏信, 池田浩一, 西下勇樹, 常田邦彦, 土井昭夫, 2000. 糞粒法によるシカ密度推定式の改良. 哺乳類科学 40: 1-17.

- 11) Yamashiro, A., Kamada, M., Yamashiro, T., 2013. A comparative study of the fecal characters of Japanese serow (*Capricornis crispus*) and sika deer (*Cervus nippon*). *Mamm. Stud.* 38: 117-122.
- 12) Yamashiro, A., Yamashiro, T., Baba, M., Endo, A., Kamada, M., 2010. Species identification based on the faecal DNA samples of the Japanese serow (*Capricornis crispus*). *Conservation Genet. Resour.* 2: 409-414.
- 13) Aikawa, T., Horino, S., Ichihara, Y., 2015. A novel and rapid diagnostic method for discriminating between feces of sika deer and Japanese serow by loop-mediated isothermal amplification. *Mamm. Genome* 26: 355-363.
- 14) Untergasser, A., Cutcutache, I., Koressaar, T., Ye, J., Faircloth, B.C., Remm, M., Rozen, S.G., 2012. Primer3-new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Res.* 40: e115.
- 15) Kumar, S., Stecher, G., Tamura, K., 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol. Biol. Evol.* 33: 1870-1874.

(2020 年 10 月 22 日受理)