

Environment Research and Technology Development Fund

環境研究総合推進費 終了研究成果報告書

ニホンライチョウ保護増殖に資する腸内細菌の研究 (4-1604)

平成28年度～平成30年度

Studies on Gut Bacteria of Japanese Rock Ptarmigans for Its Potential Use in In-situ and Ex-situ Conservation
Protocol

〈研究代表機関〉

中部大学

〈研究分担機関〉

東邦大学

日本大学

〈研究協力機関〉

日本動物園水族館協会ライチョウ保護増殖PT

中村浩志国際鳥類研究所

大阪府立大学

東京工業大学

東京理科大学

島津製作所

2019年5月

目次

I. 成果の概要	・・・・・・・・・・	1
1. はじめに（研究背景等）		
2. 研究開発目的		
3. 研究開発の方法		
4. 結果及び考察		
5. 本研究により得られた主な成果		
6. 研究成果の主な発表状況		
7. 研究者略歴		
II. 成果の詳細		
II－1 野生ライチョウの腸内菌叢解析と有用菌分離 （中部大学）	・・・・・・・・・・	10
要旨		
1. はじめに		
2. 研究開発目的		
3. 研究開発方法		
4. 結果及び考察		
5. 本研究により得られた成果		
6. 国際共同研究等の状況		
7. 研究成果の発表状況		
8. 引用文献		
II－2 野生ライチョウの腸内細菌垂直伝播に関する研究 （東邦大学）	・・・・・・・・・・	28
要旨		
1. はじめに		
2. 研究開発目的		
3. 研究開発方法		
4. 結果及び考察		
5. 本研究により得られた成果		
6. 国際共同研究等の状況		
7. 研究成果の発表状況		
8. 引用文献		
II－3 飼育ライチョウの腸内細菌叢再構築に関する研究 （日本大学）	・・・・・・・・・・	43
要旨		
1. はじめに		
2. 研究開発目的		
3. 研究開発方法		

4. 結果及び考察
5. 本研究により得られた成果
6. 国際共同研究等の状況
7. 研究成果の発表状況
8. 引用文献

III. 英文Abstract	 59
-----------------	----------

I. 成果の概要

課題名 4-1604 ニホンライチョウ保護増殖に資する腸内細菌の研究

課題代表者名 牛田一成（中部大学創発学術院教授）

研究実施期間 平成28～30年度

累計予算額 37,849千円

（うち平成28年度：12,830千円、平成29年度：12,830千円、平成30年度：12,189千円）

累計予算額は、間接経費を含む。

本研究のキーワード ニホンライチョウ、生息域外保全、野生復帰、腸内細菌、野生ライチョウ由来有用細菌

研究体制

- （1）野生ライチョウの腸内菌叢解析と有用菌分離（中部大学）
- （2）野生ライチョウの腸内細菌垂直伝播に関する研究（東邦大学）
- （3）飼育ライチョウの腸内細菌叢再構築に関する研究（日本大学）

研究協力機関

日本動物園水族館協会ライチョウ保護増殖PT、中村浩志国際鳥類研究所、大阪府立大学、東京工業大学、東京理科大学、島津製作所

1. はじめに（研究背景等）

国指定特別天然記念物及び国内希少野生動植物種であるニホンライチョウ（*Lagopus muta japonica*）は、近年の生息数減少から絶滅が危惧されており、種の保存法における「ライチョウ保護増殖事業計画」の下、生育域内保全対策に加えて、日本動物園水族館協会との協働による生息域外保全がなされており、27年度と28年度の2回に渡り乗鞍岳での採卵と人工孵化、育雛の試みがなされた。この事業は、平成24年に定められた「ライチョウ保護増殖事業計画」に基づき平成26年に「ライチョウ生息域外保全実施計画」が策定され、野生復帰取組を念頭に置いた生息域外保全計画として実施されたものである。一方で、環境省は「絶滅のおそれのある野生動植物種の生息域外保全に関する基本方針」を策定しており、同方針内で「生息域外において保存される個体は、可能な限り野生復帰させることが期待されるため、野生復帰させうる資質を保つことが原則」としており、生息域内事業で得られる科学的知見を集積することにより、野生復帰を念頭に置いた飼育下個体群の創出が必須となっている。

ライチョウ類は、鳥としては珍しい極めて草食性の強い種であり、とくに高山性のニホンライチョウは、高山植物の葉、茎、枝、花を主食としている。そのため、植物性の難消化性成分を効率よく消化する能力を持つ必要がある。一般に、草食動物は、消化管に常在する繊維分解細菌の力で難消化性成分の分解を行っている。さらに、これらの高山植物の多くには、草食動物による摂食を忌避するための化学物質（タンニン等フェノール系化合物、ベンジル系化合物、アルカロイド類、青酸配糖体など）が含まれており、これらの有毒物に関しても腸内細菌による解毒が行われていると思われる。

我々は平成26年度～27年度に学術振興会科学研究費を受けて、立山の野生ニホンライチョウと飼育スバルライチョウ（*Lagopus muta hyperborea*）の腸内細菌叢を比較したが、飼育下では孵卵器内での孵化、育

雛時の抗生物質および合成抗菌剤や実験動物用飼料の給与等の人工環境を反映して、野生の腸内細菌を完全に失っていることが判明した。さらにこの研究では、野生ニホンライチョウが、有毒物を含む高山植物の消化と解毒を腸内細菌に依存していることも示唆された。従って、有毒物を含む野外の植物を飼育下のライチョウ類に与えること自体が問題である上に、この方式で増殖させたニホンライチョウを野生復帰させても生き残ることはほぼ不可能と予想されるため、野生型腸内菌叢の解明とそれに基づく野生ニホンライチョウ由来有用菌の確保、飼育雛への投与による野生復帰個体の創出が必要であると考えた。

その一方で、ニホンライチョウは生息地域によって遺伝的系統が異なり、土壌や食物の違いも腸内菌叢構成に影響するので、腸内細菌検索を生息地域ごとに実施する必要がある。さらに、野生ニホンライチョウの腸内菌叢が孵化後どのように確立される過程も未解明で、母鳥の盲腸糞を食糞する雛鳥が機会的に観察されているものの、食糞が起こる日齢や頻度、地域差は判明していない。従って、これまでの行動調査に、腸内細菌伝播の観点を加え、野生型腸内細菌検索と併せて解析することが、野生生活に必要な腸内細菌を生息域外保全個体群に投与定着させるために必須である。即ち、野生生活を可能にする野生ニホンライチョウ固有の腸内細菌に関する知見を提供すると共に、その能力活用を取り入れた生息域内保全、生息域外保全及び野生復帰技術の具体的な方法論を提示することが要請されている。

2. 研究開発目的

平成24年に定められた「ライチョウ保護増殖事業計画」に基づき平成26年に「ライチョウ生息域外保全実施計画」が策定され、現在、野生復帰取組を念頭に置いた生息域外保全の計画が進行している。平成27年と28年に乗鞍岳で野生ニホンライチョウの卵を確保し、動物園に移送して、人工孵化と育雛を開始したが、その際には、ノルウェーのトロムソ大学が開発したスバルバルライチョウ「飼育マニュアル」が適用された。この飼育方式は、平成20年に開始されたスバルバルライチョウ試験飼育事業においてライチョウ域外保全PTに標準飼育法として採用され、以来、事業参加園館での利用と習熟が進んできた。この飼育方式では、感染症対策のため孵卵器での人工孵化後1週間の抗生物質（オキシテトラサイクリン）の連続経口投与とニワトリ育雛用飼料やウサギ用ペレット飼料の給与を基本とする。その結果、飼育スバルバルライチョウの腸内細菌は、野生のものとは全く異なったものになっており、この方式でニホンライチョウを飼育すると、そのままでは野生の暮らしに適応することの難しい個体になってしまうと考えられた。さらに、抗生物質および合成抗菌剤の処方による健康保持は、飼育ライチョウ類の腸内に薬剤耐性菌を蔓延させ、今後野生復帰を実施する場合、薬剤耐性菌を環境中に散布する危険性も高いと危惧される。そのため、野生復帰を考えるならば、少なくとも抗生物質および合成抗菌剤の処方を低減ないしは停止する飼育法の確立が必要であると思われる。将来的には、卵や雛による野生復帰（再導入）も考えられるが、この調査研究は、域外飼育個体の抗生物質および合成抗菌剤と家畜飼料への適応と選抜（家畜化）を防ぐために必要な野生の食物への馴致に対しても重要で、今後のニホンライチョウ保護増殖事業における保全技術、とくに野生復帰の方針を決定する際に極めて重要な知見を与えるものである。

3. 研究開発の方法

(1) 野生ライチョウの腸内菌叢解析と有用菌分離

北アルプス及び南アルプス山岳地帯に生息する野生ニホンライチョウの盲腸糞を採取し、次世代シーケンサーを用いた菌叢網羅解析を実施して、野生ニホンライチョウの腸内細菌叢構成の特徴を明らかにする。その情報に基づき、野生ニホンライチョウの盲腸糞から嫌気性腸内細菌を分離する。そこから病原菌に対し、抗菌性を示す有用菌を選抜し、製剤化した後にプロバイオティクスとしてサブテーマ(3)に供給し、飼育スバルバルライチョウに与えられている抗生物質（テトラサイクリン）を代替する飼育実験を行う。野生ニホンライチョウの盲腸糞を地域毎に採集し、盲腸糞のメタボローム解析によって野生ニホンライチョウ腸内の生化学環境を明らかにし、サブテーマ(3)の飼料開発をすすめる基盤情報とする。

(2) 野生ライチョウの腸内細菌垂直伝播に関する研究

南アルプス北岳で実施されるケージ保護事業のなかで、母鳥の盲腸糞に対する雛の食糞行動を詳細に観察記録することで、食糞行動の特異性を発現時期と頻度によって明らかにする。

ケージ保護事業期間中、母鳥と雛の盲腸糞を定期的に採取し、雛の腸内細菌叢の発達を、次世代シーケンサーを用いた菌叢網羅解析で評価し、食糞行動の意義を明らかにする。

ケージ保護個体の体重を経日的に記録することで、野生ニホンライチョウの成長曲線をさだめ、飼育ニホンライチョウの体重管理の指標とする。

(3) 飼育ライチョウの腸内細菌叢再構築に関する研究

サブテーマ(1)で選抜された「感染抵抗性に寄与する野生ニホンライチョウ由来の腸内細菌」を用いて製造されたプロバイオティクスの効果を飼育実験で評価する。具体的には、横浜市繁殖センターおよび那須どうぶつ王国で飼育されているスバルバルライチョウから採卵し、人工孵化させたスバルバルライチョウの雛に、プロバイオティクス製剤を処方し、ニホンライチョウの無薬飼育についてその実現可能性を評価する。プロバイオティクス投与群とトロムソ大学方式の抗生物質(オキシテトラサイクリン)連続経口投与群の2群を設定して、孵化後から90日齢までの成長率と感染症発生率の比較を、特に育雛初期の30日齢までを中心を実施する。また、同時に免疫グロブリンIgAの腸管内濃度を測定し、雛の免疫の発達状況を検査する。

大町山岳博物館飼育の成スバルバルライチョウに非吸収性の消化管内容物マーカーを給与して、マーカー排泄量を毎回の排泄糞ごとに測定し、消化管内容物の滞留時間を測定し、ライチョウ類の消化管運動機構を評価するとともに、飼育下やケージ保護での適正給餌頻度についての基本情報とする。

ライチョウ類の飼育で、しばしば報告される「盲腸糞の崩れ」と飼料摂取に起因する生理性下痢の関連を調べるために、目視による形状判別(水様性便、軟便、正常便)がなされた盲腸糞内の有機酸濃度とpHを測定する。

4. 結果及び考察

(1) 野生ライチョウの腸内菌叢解析と有用菌分離

野生ニホンライチョウの腸内細菌叢構成の特徴を、次世代シーケンサーを用いた細菌16S rRNA遺伝子のメタ解析から明らかにした。網羅解析によって示された野生ニホンライチョウの腸内細菌叢の構成は、地域的な差は認められず、共通した主要腸内細菌種は、*Olsenella* sp., *Shuttleworthia* sp., *Actinomyces* sp., *Megasphaera* sp., *Alkalibaculum* sp., *Slackia* sp., *Robinsoniella* sp., *Bifidobacterium* sp., *Paraprevotella* sp.であった。既存菌種の機能性から推測すると*Olsenella* sp., *Actinomyces* sp., *Bifidobacterium* sp.はいずれも広義の乳酸菌であり、*Megasphaera* sp.は乳酸を利用して酪酸を合成する乳酸資化性菌であることから、野生ニホンライチョウの盲腸内では、乳酸菌と乳酸資化菌の共生系が発達していると推測された。

HPLC-MS/MSおよびイオン排除HPLCポストpH干渉電気伝導度法による腸内環境網羅解析(メタボローム解析)を実施した結果、野生と飼育ニホンライチョウ盲腸糞便のプロフィールが明確に分離し、遊離アミノ酸が飼育ニホンライチョウ腸内に多く、一方で、野生ニホンライチョウの腸内には、ウリジン、アデニン、シチジンが多く含まれることがわかった。乳酸生成菌と乳酸利用菌の共生によって生成するプロピオン酸は、野生ニホンライチョウ腸内に多く含まれた。また、野生ニホンライチョウの主要な食物である高山植物には、摂食忌避のために有毒成分が多く含まれており、こうした化合物の分解を腸内細菌に依存していることが本研究で明らかになった。

現在、進められているライチョウ生息域外保全事業では、感染症対策のため人工孵化後1週間にわたり抗生物質(オキシテトラサイクリン)の連続投与と家禽用育雛飼料とウサギ用ペレット飼料の利用が基本とされており、そのため飼育ニホンライチョウの腸内細菌は、野生のものとは全く異なり、そのままでは野生の暮らしに適応することは難しいことも明らかになった。

本サブテーマでは、「ライチョウの生存を可能にする腸内細菌の解明」と「感染抵抗性と有毒物質の解毒作用を持つ有用菌の確保と野生型腸内菌叢の再構築」を開発目的とし、まず野生ニホンライチョウからできる限り多

数の腸内細菌を分離した。これらの分離菌のなかから抗菌活性や植物二次代謝産物の分解活性を指標として有用菌を確保し、プロバイオティクスとして人工飼育に取り入れることで、抗生物質および合成抗菌剤の使用を大きく低減させるとともに、将来の野生復帰を可能にする解毒力を持った腸内菌叢を再構築することを目標とした。本研究で得られた細菌は、合計1,072株で、そのうち各地の野生ニホンライチョウから共通して検出されたものは、*Lactobacillus apodemi*, *Streptococcus gallolyticus*, *Escherichia fergusonii*および *Escherichia coli*であった。このうち、グラム陽性菌の*Lactobacillus apodemi*と*Streptococcus gallolyticus*は、摂食忌避効果を持つタンニンに対する高分解性を示し、前述のように生息域や宿主の遺伝系統、また季節に関係なく野生ニホンライチョウから分離されるため、ニホンライチョウが高山植物を分解・消化してエネルギーとするためには、腸内細菌の持つタンニン分解能が必須であると推測された。*Escherichia fergusonii*については、グラム陰性菌で、キシラン分解能を持つことが知られているため、飼料消化や腸管免疫刺激に貢献していると考えられた。

選抜したこれら3種の細菌3株のプロバイオティクス製剤化を試み、飼育試験に供試できる散剤の作製法を開発した。飼育試験成績については、サブテーマ(3)で詳述する。

野生ニホンライチョウに寄生するアイメリア原虫2形態それぞれの進化系統関係が、本研究で初めて明らかになった。1種は、ニワトリに寄生する病原性の高い種と近縁で、別の1種は、シチメンチョウから検出されるものと近縁で、それぞれ系統的に異なる種であることが判明した。感染性、病原性については、保護ケージ期間中に死亡したニホンライチョウ雛に原虫感染による腸管への浸潤が認められたことや人工孵化させたスバルバルライチョウに感染が成立した際に沈鬱と下痢症状を呈したことなど、一定の結果を得たものの、2種を区別できていないため、今後の課題としてさらに詳細に検討する必要があることがわかった。

(2) 野生ライチョウの腸内細菌垂直伝播に関する研究

野生型の腸内細菌を飼育個体で再現するためには、野生の雛の腸内細菌叢確立プロセスを明らかにすることが重要である。特に野生ニホンライチョウでは孵化まもない雛が母鳥の盲腸糞をついばむことが視認されており、この行動が腸内細菌叢伝播において重要な役割を果たしていることが予想されていた。

本研究では、南アルプス北岳で実施されるケージ保護事業を利用して母鳥と雛の行動を詳細に観察し、雛が食糞する期間を特定するとともに、生まれて数日から4週齢に至るまでの盲腸糞を採集し、次世代シーケンサーを用いた細菌16S rRNA遺伝子のメタ解析により腸内細菌叢の変化を追跡した。さらに、現行の飼育個体の成長に伴う腸内細菌叢の変化と比較し、現状の飼育方法の問題点について腸内細菌叢発達の観点から明らかにした。

ケージ保護された雛では孵化後3日～18日にかけて継続して母鳥の盲腸糞に対してのみ食糞を行うことが明らかになった。また、食糞を行った雛では孵化1週齢から親と同程度の数の細菌OTU(Operational taxonomic unit＝細菌種とほぼ同義)が検出された。また、母鳥でも主要な腸内細菌であった*Olsenella*, *Actinomyces*, *Alkalibaculum*, *Slackia*といった嫌気性腸内細菌が1週齢の雛からも優占菌種として検出され、食糞が腸内細菌叢伝播に寄与していることが強く示された。一方、飼育個体は人工孵化された、母鳥の盲腸糞を食糞ができない上、孵化後から抗生物質を連続経口投与されているため、1週齢の腸内細菌叢が非常に貧弱であることがわかった。また、その後の成長過程でも*Clostridium*や*Ruminococcus*が多く検出され、野生個体の菌叢とは大きく異なることが明らかになった。

雛の食糞開始タイミングは、雛の腸内へ細菌が定着しやすい母親由来免疫物質の枯渇するタイミングと合致していると考えられるため、飼育個体へ野生ニホンライチョウ由来有用菌を投与するには孵化後18日ごろまでの期間に、継続して行うことが必要であると考えられた。この知見は、サブテーマ(3)の飼育実験に反映した。

29年度と30年度には、秤とトレイルカメラを組み合わせることでケージ保護期間中の雛の体重を自動記録した。とくに30年には、29年度に予備的に行った雛の体重測定をさらに改良したうえで、ケージ内の雛を個体識別することにより、個体ごとの体重変化を記録した。同一家族で、孵化後1週間程度は、ほとんど同じ体重で推移したものの、35日齢前後の放鳥時には、大きな個体と小さな個体の間に30 g以上の体重差があることが明らかになった。特に1週目以降の体重増加の少ない個体は、体格が小さいまま放鳥を迎えることとなった。また、保護期間前期に2羽の雛が衰弱死したが、どちらの雛も死亡数日前から体重減少が始まっていることが分かった。個体ごとの餌の摂取量については、記録が不可能であったため、こうした体重差が餌の摂取量の多少に基づいている

かどうかは判断ができないが、体重増加がないことは、寒冷環境における体温維持に不利であることは容易に想像できるうえ、母鳥と同じ速度で群れの移動についていくことも困難に思われた。そのため、おそらく餌摂取量も少なかったのではないかと推測された。サブテーマ(1)で、ケージ保護期間中に死亡した雛からコクシジウム原虫が検出されたことを考えると、低体重の背景としてコクシジウム感染を考慮すべきであることもわかった。一方、飼育ニホンライチョウが、ケージ保護個体の1.5から2倍近い体重に成長してしまうことが、本研究で明らかになった。サブテーマ(3)の飼育実験でも過体重による脚障害に由来する事故が起こっていたが、同じリスクがニホンライチョウの飼育にも発生する可能性がある。もともと栄養価の低い食物に適応したニホンライチョウは、サブテーマ(1)のメタボローム解析から明らかなように、栄養素の効率的利用、腸内細菌を介した窒素のスカベンジング機能などが働いていると想定されるが、飼育下では、運動量のはるかに少ないうえに、過剰量の高エネルギーかつ高タンパク質の食物を摂取することによる体重増加は、過肥をまねき種々の障害の原因となり得ることが示唆された。

また、このサブテーマで使用したトレイルカメラによって、野外での孵化日の確定ができるようになったほか、捕食者による巣あらしも記録され、捕食者対策の重要性を喚起することになった。

(3) 飼育ライチョウの腸内細菌叢再構築に関する研究

環境省の委託を受けた日本動物園水族館協会加盟の動物園博物館におけるライチョウ人工飼育については、平成19年より同種別亜種であるスバルバルライチョウをノルウェーから導入し、ノルウェー王国トロムソ大学のスバルバルライチョウ飼育マニュアルに従って飼育経験を積んできた。この飼育法式では、孵化後1週間は抗生物質(オキシテトラサイクリン)を経口的に連続投与するとともに、市販ウサギ用ペレットを主体とする飼料で飼育することが基本となっているが、スバルバルライチョウと生育環境の異なるニホンライチョウの飼育には、いくつもの問題点が浮上した。まず、野外にケージが設置されているトロムソ大学にくらべて、はるかに感染症対策を厳密にしたSPF環境におき、かつ抗生物質および合成抗菌剤を孵化後から連続投与しても、人工飼育下での日和見感染菌浸潤を防ぐことが出来ていない。とりわけ、下痢の起因菌となっている病原性大腸菌群やウェルシュ菌に加えて、一部の連鎖球菌や緑膿菌が、飼育ニホンライチョウの体調が悪化した際に腸管等で爆発的に増殖し、感染個体を死に至らしめることが繰り返し経験されてきた。また、動物園の環境は、想像以上に薬剤耐性菌が浸潤しており、多剤耐性化した緑膿菌なども斃死したニホンライチョウ雛から検出された。

費用のかかるSPF環境の整備は、ほとんどの動物園にとって難しく、ニホンライチョウ飼育園館の増加を阻害する最大の要因となっているほか、抗生物質および合成抗菌剤の連続処方によって選抜される薬耐性菌に対する対応も難しい。そこで、本研究では、まず通常環境で無薬あるいは減投薬で飼育を可能にする方法として、家畜や家禽の飼育で成果を上げているプロバイオティクスの利用を試みた。飼育ニホンライチョウには、将来の野生復帰準備個体群の創出という目標もあるため、サブテーマ(1)(2)の結果を受けて、野生型腸内菌叢を同時に確立する方法として利用するために、市販プロバイオ製品ではなく野生ニホンライチョウから分離した腸内細菌からプロバイオティクス細菌を選抜した。選抜の指標には日和見感染菌に対する抗菌性を用い、さらにタンニン分解性や繊維分解力、免疫刺激性に関係するグラム染色性なども加味した。現場での処方が簡便となるように、生菌カクテルではなく、凍結乾燥菌末として製剤化した。

野生ニホンライチョウ由来の*Lactobacillus apodemi*, *Streptococcus gallolyticus*および*Escherichia fergusonii*のそれぞれ1菌株ずつを選抜し、生菌製剤化した。28年度と29年度は、飼料への介入をしなかったが、*Lactobacillus apodemi* + *Escherichia fergusonii*あるいは*Lactobacillus apodemi*単菌から調整したプロバイオティクスを処方することで、抗生物質および合成抗菌剤を使わなくても通常環境で、有意に感染抵抗性を向上させることに成功した。30年度は、*Lactobacillus apodemi* + *Escherichia fergusonii* + *Streptococcus gallolyticus*の三菌種混合生菌剤を用いた。用いた菌株がタンニン分解性に優れているので、それ自身も抗菌性が期待できるタンニン(タンニン源として漢方薬の「柿の葉」を利用)を飼料に添加して、いわゆるシンバイオティクス(プロバイオティクス+プロバイオティクス定着を促進させるプレバイオティクス)として、飼育実験を行い、感染症による死亡ゼロを達成するとともに、人工飼育で問題となる過体重の制御にも成功した。

また本サブテーマでは、飼育スバルバルライチョウを用いて、食物の消化管内滞留時間を測定するとともに、免疫グロブリン濃度の測定を行い成長に伴う粘膜免疫の発達を推定した。その結果、雛の腸管内(糞便中)IgA

濃度は、7日齢で低値を示し、14日齢以降でほぼ5倍程度まで上昇し、以降はほぼ一定の値を取った。ニワトリ雛の腹腔には孵化後3から4日まで卵黄が残留するが、飼育ニホンライチョウや飼育スバルライチョウ雛でも死亡個体の解剖所見から、顕著な残留卵黄がこの時期まで認められることが多い。残留卵黄が消失する時期は、母鳥由来の免疫物質が枯渇する時期に当たり、腸管内IgAが最も低下する時期になる。従って、この時期に死亡事故が多く認められるのは、当然のことと判断される。この時期をくぐりぬけるために速やかに自身の免疫系を発達させることが、感染機会が高山よりも高い人工飼育環境では特に重要と思われる。

ライチョウ類の下部消化管の固液分離の構造は、明らかにされていないが、ほとんど全ての液状部マーカーが盲腸糞から排出されたことから、結腸で内容物の固液分離が起こり、液相が固相部分から分離されて盲腸に逆送される方法を採用していることが明らかとなった。この機構は、ウサギに顕著であるが、コアラやポッサムにも見られるもので、コアラやポッサムとニホンライチョウの腸内細菌の類似性ととも、ライチョウ類の消化戦略がコアラなどと類似していることを改めて示すものである。固形部マーカーの滞留時間が2時間から長い場合でも4時間しかないことは、不消化物を早急に排出していることを示しており、いわゆる腸糞と呼ばれる糞の排出が、夏季のニホンライチョウでは15分から30分に一回観察されることとよく一致する。一方、液状部マーカーは、8時間から12時間の平均滞留時間を示した。8時間から12時間という液状部マーカーの平均滞留時間は、盲腸糞が一日あたりで2回から3回排泄されるという野外の観察結果とよく一致する。これと併せて、飼育スバルライチョウと飼育ニホンライチョウの盲腸糞の肉眼形状(水様性、軟便、正常便)と糞中の有機酸濃度とpHを測定し、飼育ライチョウでしばしば問題となる「盲腸糞の崩れ」とそれを予兆とした体長の悪化や死亡事故について、雛鳥と成鳥では「盲腸糞の崩れ」が発症する機構が異なることを示した。雛では、易発酵性の飼料の過食による異常発酵による可能性が考えられたのに対し、成鳥では、結腸の固液分離と液相の逆送機構の不全によるものと考えられた。この成果によって、飼料への介入(飼料内容や給餌量)等、単純に薬剤を使ってしまう予防対策の考案と導入が期待される結果となった。

5. 本研究により得られた主な成果

(1) 科学的意義

本研究では、これまで大きな謎であった鳥類、とくに草食性(herbivore)で早成性(Precocial)鳥類の腸内細菌叢確立過程をニホンライチョウを題材として、世界で初めて明らかにした。特に、母鳥から雛への垂直的な有用腸内細菌の伝達機構が解明できたことに加え、腸内細菌伝達機構としての特異的食糞行動が起こる期間が決まっていることが発見された意義は極めて大きい。また、こうした行動が起こる理由として、初生雛の腹腔残留卵黄消失時期との関係を明らかにした。腸内細菌の垂直伝達機構としてのニホンライチョウ雛の食糞行動は、草食かつ有毒植物依存するコアラのものと様相が類似しており、収斂進化とよんでよい事象であると考えられた。

本研究では、野生ニホンライチョウの腸内細菌叢の構成も明らかにし、広義の乳酸菌と乳酸利用菌の共生系が骨格をなしていることやその構成は地域を変えても保存されていることを示した。また、野生ニホンライチョウは、食物である高山植物に含まれる繊維成分、有毒物や消化阻害物質を腸内細菌によって分解処理して、野外の厳しい環境で生存していることを明らかにした。そして、そのための特異的な細菌種の一部を分離することにも成功した。この過程で、野生ニホンライチョウ由来の有用菌を多数分離し、その中から日和見感染菌に抗菌性を示す菌株を選別し、プロバイオティクス製剤化することに成功した。この製剤を用いることで抗生物質および合成抗菌剤を使わない飼育方法が確立できたことは、今後、ニホンライチョウ飼育園館で実施される野生復帰準備個体群創出に向けて重要である。なぜなら飼育下のニホンライチョウは、腸内細菌叢の多様性が野生のニホンライチョウと比べて著しく低く、抗生物質および合成抗菌剤の処方が腸内細菌叢の単純化に影響していると示唆されたからである。野生ニホンライチョウ由来プロバイオティクス製剤の処方で、抗生物質および合成抗菌剤がなくても感染症の予防が達成でき、その結果、腸内細菌叢の多様性が向上することも明らかとなった。

また、食物の滞留時間測定により、ライチョウの消化管内容物移動機構が、間接的ではあるが初めて解明された。ライチョウ類の下部消化管の固液分離の構造は、解剖学的にはまだ明らかにされていないが、ほとんど全ての液状部マーカーが盲腸糞に排出されたこと、固形部マーカーのほとんどが腸糞に排出されたことから、結腸

で内容物の固液分離が起こり、液相が固相部分から分離されて盲腸に逆送される機構が存在することが明らかとなった。この機構は、ウサギに顕著であるが、コアラやポッサムに見られるもので、コアラやポッサムとニホンライチョウの腸内細菌叢構成の類似性、腸内細菌を移植する方法としての糞食に見られる共有性ととも、ライチョウ類の生存戦略がコアラなどと類似していることを改めて示した。また、飼育実践に対しては、体調不良の予兆としての「糞の崩れ」がどのような機構で起こるのかを推測する大きな手がかりを得た。

最後に、野生ニホンライチョウに寄生するアイメリア原虫2形態それぞれの進化系統関係が、本研究で初めて明らかになった。1種は、ニワトリに寄生する病原性の高い種と近縁で、1種は、シチメンチョウから検出されるものと近縁で、系統的に異なる種であることが判明した。感染性、病原性については一定の結果を得たものの、それぞれの病原性など、今後の課題として解明する必要がある。

(2) 環境政策への貢献

< 行政が既に活用した成果 >

環境省平成28年度、29年度および30年度に開催されたライチョウ保護増殖検討会において、本研究の成果を域内保全事業と域外保全事業をつなぐ重要要件として発表し、保護増殖事業の進展に貢献した。とくにカラスによるライチョウ卵の捕食を示す画像を資料として提供し、捕食者対策の重要性を喚起した。また、ニホンライチョウの域外保全を担当する日本動物園水族館協会生物多様性委員会ライチョウ域外保全プロジェクトチームに対しては、野生ニホンライチョウの生態データや体重等の情報提供を随時行うとともに、飼育実験のデータをプロジェクトチーム内で公開し、飼育技術の確立に貢献した。

< 行政が活用することが見込まれる成果 >

野生ニホンライチョウの生存に、特定の腸内細菌の存在が必須であることがわかったことから、ニホンライチョウの保全に於ける域外保全による野生復帰個体群の準備には、これらの細菌の腸管への定着を促す技術開発が、域外保全事業の成功に必須であることがライチョウ保護増殖検討会でも了解された。ニホンライチョウ以外の動物種でも、消化困難で有毒物を含むような餌食物に依存する希少動物の場合、保全の手法開発に腸内細菌の研究の重要性が認識されたことは、今後、多くの希少動物保全政策に活用される見込みのある成果である。

ライチョウ保護増殖検討会でも議論された野生個体糞便を用いた飼育個体への糞便移植は、単純な方法で極めて魅力的であるが、野生ニホンライチョウの糞には高頻度でコクシジウム原虫がふくまれており、この問題の解決なくして実施が事実上不可能であることが了解されたことは、今後、別種の野生復帰個体群の作出方法の考案にも大きく貢献すると期待される。

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) S. TSUCHIDA, K. MURATA, M. OHKUMA and K. USHIDA: J. Gen. Appl. Microbiol, 63, 3, 195–198 (2017), Isolation of *Streptococcus gallolyticus* with very high degradability of condensed tannins from feces of the wild Japanese rock ptarmigans on Mt. Tateyama.
- 2) S. TSUCHIDA, Y. OHARA, K. KURAMOCHI, K. MURATA and K. USHIDA: Jpn. J. Zoo Wildlife Med, 22, 3, 41–45 (2017), Effective degradation of phenolic glycoside rhododendrin and its aglycone rhododendrol by cecal feces of wild Japanese rock ptarmigans.
- 3) M. MATSUBAYASHI, S. TSUCHIDA, K. USHIDA and K. MURATA: Int. J. Parasitol. Parasites Wildl, 7, 2, 134–140 (2018), Surveillance of *Eimeria* species in wild Japanese rock ptarmigans, *Lagopus muta japonica*, and insight into parasitic seasonal life cycle at timberline regions of the Japanese Alps or at

the Japanese alpine regions.

- 4) M. MATSUBAYASHI, S. TSUCHIDA, A. KOBAYASHI, T. SHIBAHARA, H. NAKAMURA, K. MURATA and K. USHIDA: Int. J. Parasitol. Parasites Wildl, 7, 2, 243–250 (2018), Molecular identification of two *Eimeria* species, *E. uekii* and *E. raichoi* as type B, in wild Japanese rock ptarmigans, *Lagopus muta japonica*.
- 5) A. UEDA, A. KOBAYASHI, S. TSUCHIDA, T. YAMADA, K. MURATA, H. NAKAMURA, K. USHIDA: Microorganisms 6, 3, 77. <https://doi.org/10.3390/microorganisms6030077>. (2018), Cecal Microbiome analyses on wild Japanese rock ptarmigans (*Lagopus muta japonica*) reveals high level of coexistence of lactic acid bacteria and lactate-utilizing bacteria.
- 6) A. KOBAYASHI, S. TSUCHIDA, A. UEDA, T. YAMADA, K. MURATA, H. NAKAMURA and K. USHIDA: J. Vet. Med. Sci., 81, 9. <https://doi.org/10.1292/jvms.19-0014>. (2019), Role of coprophagy in the cecal microbiome development of an herbivorous bird Japanese rock ptarmigan.

(2) 主な口頭発表(学会等)

- 1) 牛田一成: 平成28年度第1回日本動物園水族館協会生物多様性委員会ライチョウ域外保全研究会 (2016)
「環境省環境研究総合推進費研究中間報告」
- 2) 土田さやか: 平成28年度第1回日本動物園水族館協会生物多様性委員会ライチョウ域外保全研究会(2016)
「野生ニホンライチョウから単離された乳酸菌の特徴」
- 3) 土田さやか、牛田一成: 日本乳酸菌学会2017年度大会(2017)
「様々な野生動物由来乳酸菌の探索」
- 4) A. KOBAYASHI, S. TSUCHIDA, A. UEDA, T. YAMADA, K. USHIDA and H. NAKAMURA. 14th International Grouse Symposium Utah State University (2018)
「The Significance of Coprophagy in Chicks of Japanese Rock Ptarmigan」
- 5) S. TSUCHIDA, A. KOBAYASHI, K. MURATA and K. USHIDA. 14th International Grouse Symposium Utah State University (2018)
「Isolation of Cecal Bacteria from Wild Japanese Rock Ptarmigans and their Functionalities」
- 6) 小林 篤、土田 さやか、上田敦史、山田拓司、長谷川 雅美、村田 浩一、中村 浩志、牛田 一成: 第65回日本生態学会大会(2018)
「ライチョウの雛はなぜ母親の盲腸糞を食べるのか—その適応的意義と保全への応用—」
- 7) 小林 篤、土田 さやか、上田敦史、山田拓司、長谷川 雅美、村田 浩一、中村 浩志、牛田 一成: 日本鳥類学会2018年度大会(2018)
「ライチョウの雛は母親のうんちを食べて腸内細菌を手に入れる」
- 8) 牛田 一成、土田 さやか、小林篤、上田敦史、山田拓司、長谷川 雅美、村田 浩一、中村浩志: 第65回日本生態学会大会(2018)
「野生ニホンライチョウ腸内細菌叢の特徴と地域差」
- 9) 土田さやか、小林篤、長谷川雅美、村田浩一、中村浩志、牛田 一成: 第65回日本生態学会大会(2018)
「ライチョウにはライチョウの乳酸菌！！」
- 10) 服部考成、岡 有香里、川名修一、緒方是嗣、土田さやか、小林 篤、中村隼明、中村浩志、牛田 一成: 第27回環境化学討論会(2018)
「LC-MS/MSによるニホンライチョウ糞便中の代謝物測定—野生・飼育ニホンライチョウの比較—」
- 11) 牛田一成: 第70回日本生物工学会大会(2018)
「野生動物の腸内細菌叢解析と糞便メタボローム解析」
- 12) 松林 誠、土田 さやか、小林 篤、芝原 友幸、中村 浩志、村田 浩一、牛田 一成: 第24回日本野生動物医学会大会(2018)
「ニホンライチョウに寄生するコクシジウムの寒冷地における生存生態およびその分子系統樹解析」

7. 研究者略歴

研究代表者

牛田 一成 京都大学農学部卒業、農学博士、京都府立大学大学院生命環境科学研究科教授を経て、現在、中部大学創発学術院教授

研究分担者

- 1) 長谷川 雅美 東邦大学理学部卒業、博士(理学)、現在、東邦大学理学部教授
- 2) 村田 浩一 宮崎大学農学部卒業、博士(獣医学)、神戸市立王子動物園獣医師、現在、日本大学生物資源科学部、特任教授

II. 成果の詳細

II-1 野生ライチョウの腸内菌叢解析と有用菌分離

中部大学創発学術院	牛田 一成
＜研究協力者＞	
中部大学創発学術院	土田 さやか(平成28年～30年)
大阪府立大学農学部	松林 誠(平成29年～30年)
東京工業大学生命理工学院	山田 拓司(平成29～30年) 上田 敦(平成29～30年)
東京理科大学理工学部	倉持 幸司(平成29～30年)
島津製作所	服部考成(平成28年～30年)

平成28～30年度累計予算額：24,750千円

(うち平成28年度：8,651千円、平成29年度：8,256千円、平成30年度：7,843千円)

累計予算額は、間接経費を含む。

〔要旨〕

野生ニホンライチョウ (*Lagopus muta japonica*) の生存を保証する腸内細菌を明らかにすることは、現在進められている生息域外保全事業における飼育方法の決定に重要である。本研究では野生ニホンライチョウの腸内細菌叢構成の特徴を次世代シーケンサーを用いた細菌16S rRNA遺伝子のメタ解析から明らかにした。網羅解析によって示された野生ニホンライチョウの腸内細菌叢の構成は、地域的な差は認められず、共通した主要菌種は、*Olsenella* sp., *Shuttleworthia* sp., *Actinomyces* sp., *Megasphaera* sp., *Alkalibaculum* sp., *Slackia* sp., *Robinsoniella* sp., *Bifidobacterium* sp., *Paraprevotella* sp. であった。既存菌種の機能性から推測すると *Olsenella* sp., *Actinomyces* sp., *Bifidobacterium* sp. はいずれも広義の乳酸菌であり、*Megasphaera* sp. は乳酸を利用して酪酸を合成する乳酸資化性菌であることから、野生のニホンライチョウの盲腸内では、草食哺乳類によくみられるような乳酸菌と乳酸資化菌の共生系が発達していると推測された。HPLC-MS/MSおよびイオン排除HPLCポストpH干渉電気伝導度法による腸内環境網羅解析を実施した結果、野生と飼育ニホンライチョウ糞便のプロフィールが明確に分離し、遊離アミノ酸が飼育ニホンライチョウ腸内に多く、一方で、野生ニホンライチョウの腸内には、ウリジン、アデニン、シチジンが多く含まれることがわかった。乳酸生成菌と乳酸利用菌の共生によって生成するプロピオン酸は、野生ニホンライチョウ腸内に多く含まれた。

野生ニホンライチョウの主要な食物である高山植物には、摂食忌避のために有毒成分が多く含まれており、こうした化合物の解毒を腸内細菌に依存していることが本研究で明らかになった。現在、進められているライチョウ生息域外保全事業では、ノルウェーのトロムソ大学が開発したスバルバルライチョウ (*Lagopus muta hyperborea*) 「飼育マニュアル」が適用されている。この飼育方式では、感染症対策のため人工孵化後1週間にわたり抗生物質(オキシテトラサイクリン)の連続投与と家禽用育雛飼料とウサギ用ペレット飼料の利用が基本とされている。その結果、飼育下スバルバルライチョウの腸内細菌は、野生のものとは全く異なったものになっており、そのままでは野生の暮らしに適応することは難しいことも明らかになった。本サブテーマでは、「ライチョウの生存を可能にする腸内細菌の解明」と「感染抵抗性と有毒物質の解毒作用を持つ有用菌の確保と野生型腸内菌叢の再構築」を開発目的とし、まず野生ニホンライチョウからできる限り多数の腸内細菌を分離した。これらの単離菌のなかから抗菌活性や植物二次代謝産物の分解活性を指標として有用菌を確保し、プロバイオティクスとして人工飼育に取り入れることで、抗生物質および合成抗菌剤の使用を大きく低減させるとともに、将来の野生復帰を可能にする解毒力を併せ持った腸内菌叢を再構築することを目標とした。本研究で得られた細菌は、合計1,072株で、そのうち各地の野生ニホンライチョウから共通して検出されたものは、*Lactobacillus apodemi*, *Streptococcus gallolyticus*, *Escherichia fergusonii*および *Escherichia coli*であった。

このうち、*Lactobacillus apodemi*と*Streptococcus gallolyticus*は、摂食忌避効果を持つタンニンに対する高分解性を示し、かつ生息域や宿主の遺伝系統、また季節に関係なく野生のニホンライチョウから分離されるため、高山植物を分解・消化してエネルギーとするためには、腸内細菌の持つタンニン分解能が必須であると推測された。*Escherichia fergusonii*は、大腸菌の一種であるが、ゲノム上にキシラン分解酵素遺伝子を持つことが知られており、高山植物食に特化した草食性の強い野生ニホンライチョウにおいても食物中のキシラン分解に必須であると推測される。選抜した細菌3株のプロバイオティクス製剤化を試み、飼育試験に供試できる散剤製作法を開発した。

このほか、将来の糞便移植で問題となる可能性が高いコクシジウム原虫の侵襲率を北アルプス各地と南アルプスで検定した。以前からニホンライチョウには形態の異なる2種のコクシジウム原虫（*Eimeria uekii*およびタイプB）が感染することが知られていたが、前者については、30-40%の個体が感染しており、後者は約20%の感染率であった。これらの試料から、原虫オーシストを実体顕微鏡下で一個ずつ単離し、18S rRNA配列に基づく進化系統解析を行い、タイプBを*Eimeria raichoi*として命名し新種として国際的に承認された。

[キーワード]

ニホンライチョウ、腸内細菌、感染抵抗性、プロバイオティクス

1. はじめに

野生ニホンライチョウの生存を保証する腸内細菌を明らかにすることは、現在、日本動物園水族館協会のライチョウ保護増殖PT加盟園館で進められている生息域外保全事業における飼育方法の決定に重要である。

野生ニホンライチョウは、有毒植物の解毒を腸内細菌に依存していることが示されている。ニホンライチョウの食物であるシャクナゲに含まれる有毒物である配糖体ロドデンドリンとそのアグリコンであるロドデノールは、野生ニホンライチョウの腸内細菌（新鮮盲腸糞懸濁液）によって効率よく分解されるのに対し、飼育ニホンライチョウの新鮮盲腸糞懸濁液ではロドデンドリンは分解できるものの、それによって発生する有毒成分であるロドデノールは、ほとんど分解できなかった(Tsuchida et al. 2017)¹⁾、また、冬季の野生ニホンライチョウから分離された濃縮タンニン分解菌 *Streptococcus gallolyticus* は、すでに報告されているコアラやフクロギツネ由来の分離株と比較してはるかに高いタンニン分解活性を示すことが明らかとなった(Tsuchida et al. 2017)²⁾。これらの腸内細菌は、野生ニホンライチョウの生存を保証するものであると考えられる。

しかし、飼育下のスバルバルライチョウと立山の野生のニホンライチョウの腸内細菌叢を比較すると、抗生物質および合成抗菌剤や実験動物飼料の給与等の人工環境を反映して、飼育下では構成が大きく異なり、野生の腸内細菌を失っていた (Ushida et al. 2015)³⁾。従って、野外の植物を餌として飼育下のライチョウに与えること自体に問題がある上に、この方式で増殖させたニホンライチョウを野生復帰させても、生き残ることがほぼ不可能と推測される。平成27年度より動物園で飼育されているニホンライチョウに対しては、スバルバルライチョウと同じ飼育方法が採用されているため、腸内菌叢が野生と大きく異なっていることが予想され、将来の野生復帰（再導入）を目指すためには飼育方法の大きな改善が必要である。そのために、腸内菌叢の解明とそれに基づく有用菌の確保、野生復帰を予定する雛への投与法の確立が必要である。

2. 研究開発目的

平成27年と28年の二度にわたり、乗鞍岳で野生ニホンライチョウの卵を確保し、動物園に移送して人工孵化と育雛が開始された。その際には、ノルウェーのトロムソ大学が開発したスバルバルライチョウ「飼育マニュアル」が適用されている。この飼育方式は、平成20年に開始されたスバルバルライチョウ試験飼育事業においてライチョウ域外保全PTに標準飼育法として採用され、以来、事業参加園館での利用と習熟が進んだものである。この方式では、感染症対策のため人工孵化後1週間にわたり抗生物質（オキシテトラサイクリン）の連続投与と家禽用育雛飼料とウサギ用ペレット飼料の利用が基本とされている。その結果、飼育下スバルバルライチョウの腸内細菌は、野生のものとは全く異なったものになっており、そのままでは野生の暮らしに適応することは難しいと考えられるのは上述の通りである。さらに、抗生物質および合成抗菌剤の処方による健康保持は、飼育下ライチョウ類の腸内に薬剤耐性菌を蔓延させ、今後野生復帰を実施する場合、薬剤耐性菌を環境中に散布する危険性も高い。そのため、将来的に野生復帰を考えるならば、少なくとも抗生物質および合成抗菌剤の処方を低減ないしは停止する飼育法の確立が必要である。

そのためにサブテーマ（1）では、野生生活を可能にするニホンライチョウ固有の腸内細菌に関する知見を提供すると共に、その能力活用を取り入れた生息域内保全、生息域外保全及び野生復帰技術の具体的な方法論を提示することを目的とする。具体的には、「ライチョウの生存を可能にする腸内細菌の解明」と「感染抵抗性と有毒物質の解毒作用を持つ有用菌の確保と野生型腸内菌叢の再構築」を開発目的としている。

そのため、まず、野生ニホンライチョウからできる限り多数の腸内細菌を分離し、抗菌活性や植物二次代謝産物の分解活性を指標として有用菌を確保し、プロバイオティクスとして人工飼育に取り入れることで、抗生物質および合成抗菌剤の使用を大きく低減させるとともに、将来の野生復帰を可能にする解毒力を併せ持った腸内菌叢を再構築することを目標とした。また、野生ニホンライチョウの盲腸糞を直接飼育個体へ接種する糞便移植法の可否を明らかにするために、野生ライチョウ類の糞中から検出が報告されている腸管寄生虫（コクシジウム原虫 *Eimeria* spp.）の検出を行うこととした。またこの原虫の毒性を調べるためにサブテーマ（2）の研究実施中にケージ保護期間中に死亡したヒナの腸管への侵襲状況を検討するとともに、野生ニホンライチョウの糞便から調整した原虫オーシストをモデル系（ウズラおよびスバルバルライチョウ雛）へ接種して病徴を検査することとした。

サブテーマ（1）では、野生ニホンライチョウの腸内発酵の生化学特性を明らかにするために、盲腸糞の代謝産物を網羅的に解析する。それによって腸内細菌叢の網羅解析結果と単離菌の性状検査による細菌学情報と生化学情報を併せて、野生ニホンライチョウの腸内環境の特徴を明らかにし、飼育ニホンライチョウ飼育の指標とするためである。

3. 研究開発方法

3-1：野生ニホンライチョウの有用細菌分離

北アルプス（立山・乗鞍岳）、南アルプス（北岳）に生息する野生ニホンライチョウの排泄直後の盲腸糞を採取し、野生ニホンライチョウの盲腸に共通して存在する主要な細菌を分離した。野生ニホンライチョウの排泄直後の盲腸糞を採取し、その一部（1-2ループ相当量）を直ちに嫌気性の検体希釈液中に移した。近傍の山小屋に希釈した盲腸糞を移送し、表(1)-1に示す各種の分離培地に塗抹したのち電源が確保できる場合は、コンパクトインキュベーターを用い、確保できない場合は、発泡スチロール箱と簡易カイロを用いて(Ushida et al. 2010)⁴⁾、41℃で48時間嫌気培養を行った。得られたコロニーは、研究室で定法に基づき分離し、純化を確認した後、超低温フリーザー内で安全に保存するとともに、16S rRNA遺伝子塩基配列にもとづく系統解析を行い菌種同定した。

表(1)-1 野生ライチョウ腸内細菌分離に用いた培地と気相

サンプリング地	期間	使用培地	変更した基質	気相
立山	2016年 5/6から5/8	DSMZ110変法培地1	糖質をセロビオースのみに変更	二酸化炭素
		DSMZ110変法培地2	糖質をイヌリンのみに変更。グラム陰性菌を抑制するためにナリジクス酸添加(2ug/ml)	
		DSMZ110変法培地3	糖質をマンニトール・トレハロースに変更。グラム陰性菌を抑制するためにナリジクス酸添加(2ug/ml)	
		ATCC1904培地	なし	
		MRS培地	なし	
乗鞍	2016年 5/28から5/31	DSMZ110変法培地4	糖質をセロビオース・イヌリン・マンニトール・トレハロースに変更。グラム陰性菌を抑制するためにナリジクス酸添加(4ug/ml)	二酸化炭素
		MRS培地	なし	
北岳	2016年 7/6から7/10	DSMZ110変法培地4	糖質をセロビオース・イヌリン・マンニトール・トレハロースに変更。グラム陰性菌を抑制するためにナリジクス酸添加(4ug/ml)	二酸化炭素
		MRS培地	なし	
立山	2016年 11/1から11/3	DSMZ110変法培地5	糖質をセロビオース・イヌリン・マンニトール・トレハロースに変更。グラム陰性菌を抑制するためにナリジクス酸添加(8ug/ml)	二酸化炭素+水素
		YCFA変法培地	糖質をイヌリンのみに変更。	
		BS培地	なし	
		EG培地	なし	
立山	2017年 5/8から5/10	MRS変法培地	グラム陰性菌を抑制するためにナリジクス酸添加(4ug/ml)	二酸化炭素+水素
		EG変法培地1	10%量のライチョウ盲腸希釈液添加。グラム陰性菌を抑制するためにナリジクス酸添加(4ug/ml)	
		DSMZ110変法培地6	10%量のライチョウ盲腸希釈液添加。糖質をセロビオース・イヌリン・マンニトール・トレハロースに変更。グラム陰性菌を抑制するためにナリジクス酸添加(4ug/ml)。	
立山	2017年 6/11から6/13	DSMZ110変法培地6	10%量のライチョウ盲腸希釈液添加。糖質をセロビオース・イヌリン・マンニトール・トレハロースに変更。グラム陰性菌を抑制するためにナリジクス酸添加(4ug/ml)。	二酸化炭素+水素
		EG変法培地2	10%量のライチョウ盲腸希釈液添加。グラム陰性菌を抑制するためにナリジクス酸添加(8ug/ml)。	
		MRS変法培地	グラム陰性菌を抑制するためにナリジクス酸添加(4ug/ml)	
北岳	2017年 8/3から8/6	BS培地	なし	二酸化炭素+水素
		BL培地	なし	
		EG変法培地3	10%量のライチョウ盲腸希釈液添加。選択度を上げるために、コリスチン・バンコマイシン添加(4ug/ml)。	
		DSMZ110変法培地7	10%量のライチョウ盲腸希釈液添加。糖質をセロビオース・イヌリン・マンニトール・トレハロースに変更。選択度を上げるために、コリスチン・バンコマイシン添加(4ug/ml)。	
		EG培地	なし	
立山	2018年 5/7から5/9	BL培地	なし	二酸化炭素+水素
		MRS培地	なし	
		VS培地	なし	
北岳	2018年 8/2から8/4	BS培地	なし	二酸化炭素+水素
		EG変法培地4	10%量のライチョウ盲腸希釈液添加。	
		バクテロイデス変法培地	揮発性脂肪酸添加。ビタミンK添加。	

3-2：分離菌の生理性状解析とプロバイオティクス株の選抜

分離株のなかから「感染抵抗性と有毒物質の解毒作用を持つ有用菌」をサブテーマ3で飼育スバルバルライチョウにプロバイオティクスとして投与するために、分離株の抗菌性とタンニン分解能を調査した。飼育個体に投与することを考え、分離株のうち「広義の乳酸菌」に属し、すべての山域の野生ニホンライチョウから分離されるということを第一選抜基準とした。乳酸菌 (*Lactobacillus apodemi*：全135株)の抗菌性は、上野動物園で死亡した飼育ニホンライチョウから分離された多剤耐性緑膿菌(日和見感染菌)を被攻撃菌とし、*Lactobacillus apodemi*の培養上清および中和培養上清によって発育がどれほど阻害されるかによって評価した。

*Streptococcus gallolyticus*は、サブテーマ(1)の研究グループが、冬季の立山ニホンライチョウ糞便から分離していた菌株が非常に高いタンニン分解性を示すことが本研究で明らかとなったことから(Tsuchida et al. 2017)²⁾、クロウソゴやナナカマドの冬芽のようなタンニン含量の高い食物に依存する冬季の野生ニホンライチョウの生存に必須であると推測され、高山植物に含まれる有毒物質の解毒作用を持つ菌として、プロバイオティクス候補菌種とした。分離された*Streptococcus gallolyticus*306菌株のタンニン分解能を、ブレインハートインフュージョン培地上に形成した縮合タンニンの分解率によって評価した。

*Escherichia fergusonii*は、広義の乳酸菌ではなく、大腸菌の一種であるが、ゲノム上にキシラン分解酵素遺伝子を持つことが知られている。サブテーマ(1)の研究グループが、別の研究で野生ヤクシマザルの新鮮糞便からキシラン分解菌選択培地によって本菌を分離しているため、草食性の強いニホンライチョウにおいても食物中のキシラン分解に必要であると推測される。また、*Lactobacillus apodemi*と*Streptococcus gallolyticus*がいずれもグラム陽性菌であるため、免疫刺激能の異なるグラム陰性菌も必要であると考えた。このことから分離された*Escherichia fergusonii*15株から最も増殖能の優れている菌株を、プロバイオティクス候補菌として選抜した。

3-3：プロバイオティクス調整方法の開発

3-2で選抜されたプロバイオティクス候補菌株3株(*Lactobacillus apodemi*, *Streptococcus gallolyticus*, *Escherichia fergusonii*)を培養し、得られた菌体ペレットを10%スキムミルクに懸濁し、凍結乾燥した。凍結乾燥した菌体をパウダー状に砕き生菌製剤化した。この生菌製剤1g中に生きた

菌がどの程度含まれるかを再度培養して確認を行い、調整方法として適切な条件を調査した。

3-4：次世代シーケンサーを用いた野生ニホンライチョウ固有の腸内細菌解析

北アルプスでは立山、乗鞍岳、大天井岳、御岳、常念岳、焼岳、南アルプスでは北岳に生息する野生ニホンライチョウから新鮮盲腸糞を採取した。腸内細菌のDNA網羅解析のために土壤に触れていない盲腸糞の中心部を滅菌ピンセットで採取し、常温保存可能なDNA保存液中に保存した。実験室に戻った後、DNA保存液中の盲腸糞を遠心洗浄し、得られた糞便塊をビーズビーターを用いて物理的に破碎した。この操作によってDNA抽出液中に遊離した糞便塊中の全DNAを回収し、腸内細菌のDNA網羅解析用のDNA試料とした。これらのDNA試料に含まれる細菌16S rRNA遺伝子をPCR増幅し、BGI社の標準プロトコールに従ってV3/V4領域のライブラリーを調整し、Miseqシーケンサーを用いた配列解読を行った。解読不良の配列を除いた後、残った配列をアセンブルし、RDPデータベースに対して照合した。

3-5：ニホンライチョウ盲腸糞の代謝成分解析

北岳の盲腸糞試料の一部を、採取後直ちに凍結し、北岳山荘で簡易製造したドライアイスとともに実験室に凍結状態で持ち帰った。対照として富山市ファミリーパーク動物園で飼育中のニホンライチョウより採取した盲腸糞も同様に採取後直ちに凍結保存した。凍結試料を、島津製作所（大阪大学・島津分析イノベーション共同研究講座）に送付した。解凍後の糞をリン酸緩衝生理食塩水に懸濁し、遠心分離後の上清を限外濾過したものを試料とした。試料をLC-MS/MSに注入し、代謝成分の網羅解析を行った。LCMS-8050（島津製作所）にDiscovery HS F5-3カラムを装着し、0.1% ギ酸水溶液と0.1% ギ酸メタノール溶液によるグラジエント分析を行った。また、試料の一部を有機酸分析システム（Shim-pack SCR-102H 移動相5 mM p-トルエンスルホン酸 反応相 5 mM p-トルエンスルホン酸/ 20 mM Bis-tris/ 0.1 mM EDTA-4H）に注入し電気伝導度で短鎖脂肪酸などカルボン酸の解析を行った。

3-6：野生ニホンライチョウの寄生虫（コクシジウム原虫）検査と実験感染

野生ニホンライチョウ盲腸糞を飼育ライチョウに直接接種する糞便移植の可能性を検討するために、寄生虫検査が必須であることからコクシジウム原虫オーシストの検査を立山室堂の成ニホンライチョウ、乗鞍岳成ニホンライチョウ、北岳ケージ保護ニホンライチョウ成メスおよび雛から採取した直腸糞に対して行った。検査は、大阪府立大学獣医学類松林誠准教授に依頼し、次に示す方法で実施した。①ショ糖遠心浮遊法によりオーシスト数を計測し、1gあたりのオーシスト数（OPG）を算出した。②新鮮便から多量のオーシストが検出された糞便を選抜し、25℃で培養して孢子形成時間を測定した。③比較的多数のオーシストが回収できた検体から、原虫の長・短直径、内部構造等を詳細観察するとともに、④精製したオーシストから1個のオーシストをマニピレーターにより単離し、*Eimeria* 属の18S rRNA 遺伝子を用いて系統解析を実施した。

立山および乗鞍岳の野生ニホンライチョウ糞便からコクシジウム原虫オーシストを上記の方法で回収した。29年度にはニホンライチョウと同じキジ目に属するウズラ属ウズラの有精卵を購入した。14個を孵卵し、そのうち4羽が17日目に孵化した。この4羽の34日齢時にライチョウ由来*Eimeria* 原虫の精製オーシスト（*Eimeria uekii* 2,000個+, *Eimeria raichoi* 500個/500 μ l）を経口投与した。投与3日目から便を採取し、糞便検査を行った。30年度には長野県茶臼山動物園から提供された飼育スバルバルライチョウ受精卵合計11個を孵卵し、そのうち8羽が孵化した。しかし4羽はオーシスト接種前に死亡したため、4羽が実験可能であった。上述のように、立山および乗鞍岳の野生ニホンライチョウから分離したコクシジウム原虫オーシストをこの3羽に接種し、病徴の観察とともに糞便検査をおこなった。

4. 結果及び考察

4-1: 野生ニホンライチョウの有用細菌分離

採集で得られた細菌は、次の表(1)-2に示すとおり1,072（分離数）株である。用いた培地と培養条件の中で各地の野生ニホンライチョウから共通して検出されたものは、*Lactobacillus apodemi*, *Streptococcus gallolyticus*, *Escherichia fergusonii*, *Escherichia coli*であった。このうち、*Lactobacillus apodemi*及び*Streptococcus gallolyticus*は、タンニン分解性を示すことが明らかとなっている菌種であり（Osawa et al. 2006, Osawa et al. 1995）^{5), 6)}、かつ生息域や宿主の遺伝系統、また季節に関係なく野

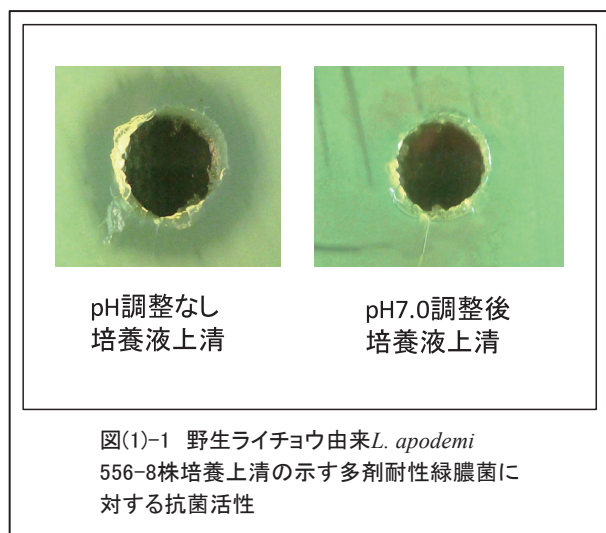
表(1)-2 野生ニホンライチョウから分離した腸内細菌種と分離株数

分類	単離された菌種	分離株数
広義の乳酸菌	<i>Streptococcus gallolyticus</i>	306
	<i>Lactobacillus apodemi</i>	135
	<i>Lactobacillus reuteri</i>	48
	<i>Enterococcus faecalis</i>	30
	<i>Enterococcus thailandicus</i>	30
	<i>Lactococcus garvieae</i>	12
	<i>Pediococcus pentosus</i>	9
	<i>Enterococcus faecium</i>	3
	<i>Enterococcus sanguinicola</i>	1
	<i>Enterococcus villorum</i>	1
大腸菌群	<i>Escherichia coli</i>	405
	<i>Escherichia fergusonii</i>	15
	<i>Cronobacter sakazakii</i>	6
繊維分解菌	<i>Ruminococcus torques</i>	24
	<i>Bacteroides ovatus</i>	12
	<i>Ruminococcus lactari</i>	3
硫酸還元菌	<i>Desulfovibrio fairfieldensis</i>	9
その他	<i>Coprococcus comes</i>	18
	<i>Clostridium nexil</i>	3
	<i>Propionibacterium humerusii</i>	1
	<i>Cutibacterium acnes</i>	1
計		1072 株

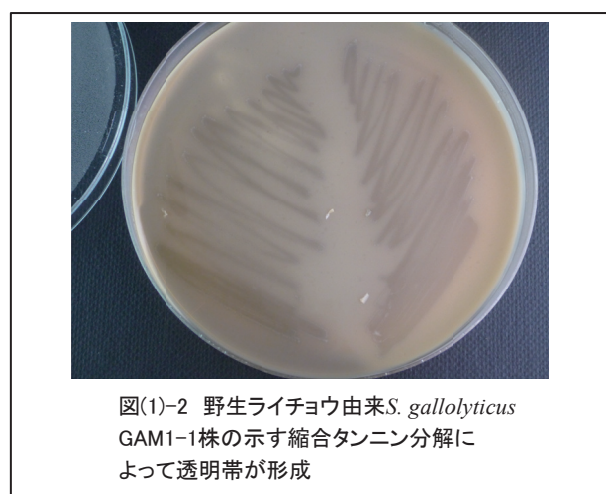
生のニホンライチョウから分離されるため、高山植物を分解・消化してエネルギーとするためには、腸内細菌の持つタンニン分解能が必須であると推測された。さらに、*Escherichia fergusonii*は、大腸菌の一種であるが、ゲノム上にキシラン分解酵素遺伝子を持つことが知られており、高山植物食に特化した草食性の強い野生ニホンライチョウにおいても食物中のキシラン分解に必須であると推測される。また、すべての山城の個体からではないものの、繊維分解能を持つと考えられる*Ruminococcus torques*, *Ruminococcus lactari*に近縁な細菌種が分離されている。いずれの種の分離株も、既存種の16S rRNA遺伝子塩基配列相同性が低く（＜97%）、新種ないしは新亜種であると思われ、野生ニホンライチョウ特異的な腸内細菌である可能性が高いと思われた。いずれもBL寒天培地上で生育させると、特徴的な連鎖形状を形成したが、野生ニホンライチョウの盲腸糞を直接検鏡すると、同様の形態をした連鎖菌が多数認められるため、野生ニホンライチョウの腸内菌叢の中で主要な菌群であると推測される。

培地の成分に関しては、抗生物質を添加せず、アミノ酸及び揮発性脂肪酸の豊富な非選択培地が最も多様な細菌種を得ることができると明らかとなった。しかし、非選択培地を用いることによって、発育の早い細菌種が優先して発育してしまい、発育の遅い繊維分解性の腸内細菌を分離することが困難となった。この問題については、培養条件の気相を二酸化炭素だけではなく、水素を加えることである程度解消することができ、非選択培地を用いても、多様な細菌種を分離できるようになった。

4-2：分離菌の生理性状解析及びプロバイオティクス株の選抜



図(1)-1 野生ライチョウ由来*L. apodemi* 556-8株培養上清の示す多剤耐性緑膿菌に対する抗菌活性



図(1)-2 野生ライチョウ由来*S. gallolyticus* GAM1-1株の示す縮合タンニン分解によって透明帯が形成

分離株のなかからプロバイオティクス候補菌種として選抜された*Lactobacillus apodemi*の全135株の培養上清は、いずれも27年度に上野動物園で斃死した飼育ニホンライチョウ雛より分離された多剤耐性緑膿菌（ペニシリン系・セフェム系・グリコペプチド系・クロラムフェニコール系・マクロライド系・リンコマイシン系抗生物質に耐性）に対する抗菌活性を示した（図(1)-1）。*Lactobacillus apodemi*の培養上清のpHはおよそpH 5.3程度であるため、低pHの影響で多剤耐性緑膿菌の発育増殖が阻害されたと考えられた。しかし、135株中の1菌株（556-8株）は、培養上清pHを中性（pH 7.0）に調整しても、多剤耐性緑膿菌の発育増殖阻害が認められるため、おそらくこの菌株はグラム陰性菌に効果のある、ある種の抗菌性ペプチド類を生産しているものと推測された。この結果より、プロバイオティクスとしてサブテーマ（3）で使用する*Lactobacillus apodemi*は、556-8株（立山個体から分離）とした。

高いタンニン分解能を持つことが知られている*Streptococcus gallolyticus*に関しては、306菌株中、ブレインハートインフュージョン培地上に形成した縮合タンニンを最も効率よく分解したGAM1-1株（立山個体から分離、図(1)-2）をサブテーマ（3）で使用するプロバイオティクス株として選抜した。

草食性の強い野生ニホンライチョウの食物中のキシラン分解が推測される*Escherichia fergusonii*に関しては、最も優れた増殖能を有しているS-6-10株（立山個体から分離）をサブテーマ（3）で使用するプロバイオティクス株として選抜した。

4-3：プロバイオティクス調整方法の開発

プロバイオティクス候補菌株3株（*Lactobacillus apodemi* 556-8株、*Streptococcus gallolyticus* GAM1-1株、*Escherichia fergusonii* S-6-10株）を培養し、得られた菌体ペレットにペレット重量の3倍量もしくは5倍量の10%スキムミルクを加えて凍結乾燥を行なった。通常ヒト用の生菌製剤には 10^8 個/日程度の菌体が含まれているため、サブテーマ（3）で使用するプロバイオティクスも同程度の含有量を目指した。菌体の5倍量の10%スキムミルクを加えて凍結乾燥した粉末は、1gあたり生菌 10^8 個が含まれることがわかったが、ヒナの餌に混ぜるためには量が多すぎると判断した。一方、菌体の3倍量の10%スキムミルクを加えて凍結乾燥した粉末は、1gあたり生菌 10^{10} が含まれており、0.01g/日与えるだけで目標の菌数を与えることができることから、ライチョウ用のプロバイオティクスとしては、培養し、遠心分離で集菌した菌体ペレットに3倍量の10%スキムミルクを加えて凍結乾燥し、調整する方法が望ましいことがわかった。

4-4：次世代シーケンサーによる腸内細菌叢網羅解析

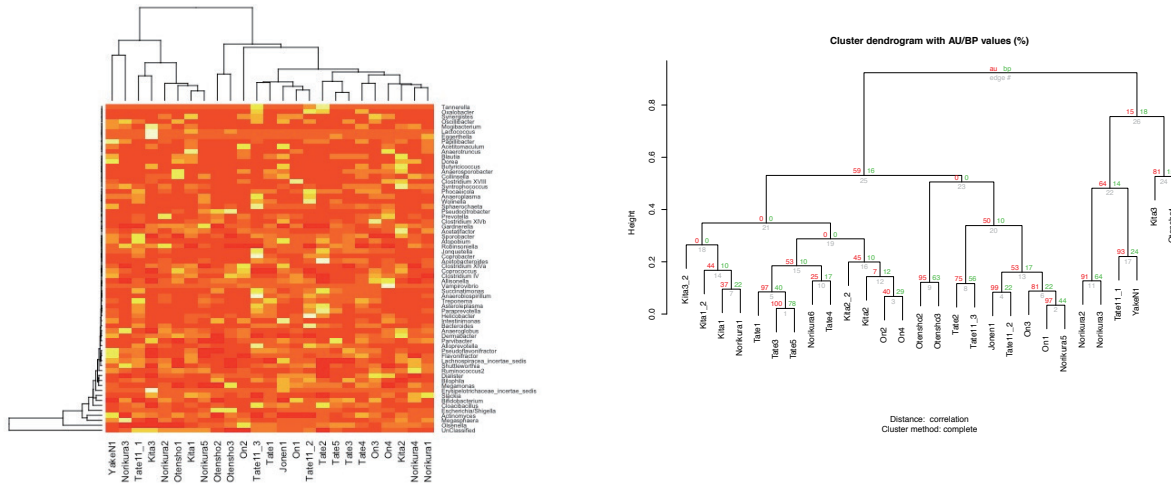
北アルプス（立山、大天井岳、常念岳、焼岳、乗鞍岳、御岳）、南アルプス（北岳）に生息する野生ニホンライチョウから採取した盲腸糞から抽出したDNA試料にもとづいて細菌16S rRNA遺伝子のPCRライブラリーの網羅解析を行った。方法は、Ueda et al. (2018)⁷⁾に記載の通りである。DNA抽出以降は、委託先のBGI社のプロトコールに従った。

網羅解析によって示された野生ニホンライチョウの腸内細菌叢を構成する主要菌種（上位 10 種）を示すと表(1)-3 のようである。*Olsenella* sp., *Shuttleworthia* sp., *Actinomyces* sp., *Megasphaera* sp., *Alkalibaculum* sp., *Slackia* sp., *Robinsoniella* sp., *Bifidobacterium* sp., *Paraprevotella* sp.のうち、既知の菌種との配列一致率が 0.5 を下回るものは、同定が事実上不可能で、野生ニホンライチョウ固有の未知の細菌種であると思われる。1.0 に近い配列一致率で種が推定されたものは、*Olsenella* sp., *Actinomyces* sp., *Megasphaera* sp., *Slackia* sp., *Bifidobacterium* sp. であり、既存菌種の機能性から推測すると *Olsenella* sp., *Actinomyces* sp., *Bifidobacterium* sp. はいずれも広義の乳酸菌であり、*Megasphaera* sp. は乳酸を利用して酪酸を合成する乳酸資化性菌であることから、野生のニホンライチョウの盲腸内では、乳酸菌と乳酸資化菌の共生系が発達していると推測された。

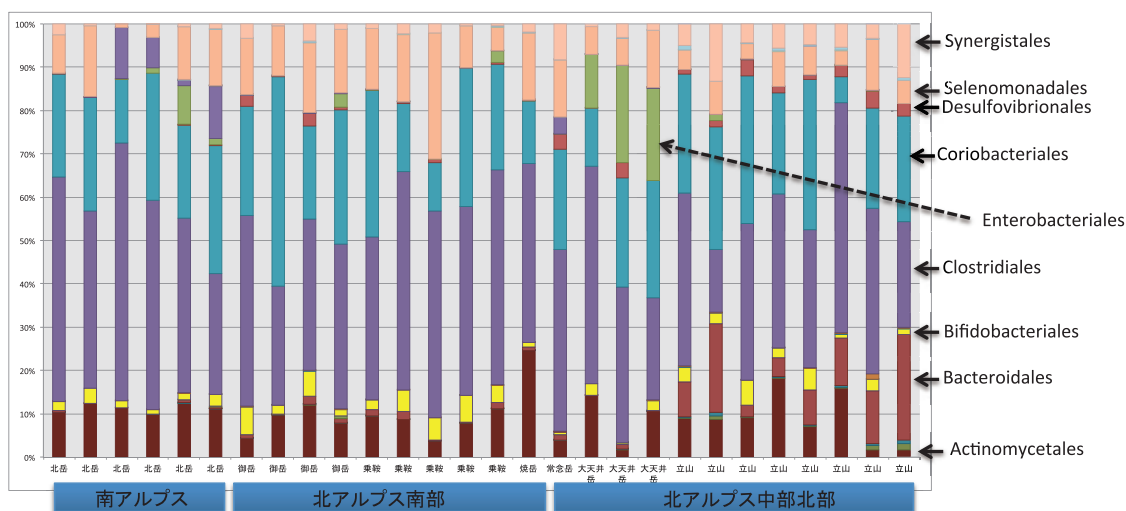
表(1)-3 野生ニホンライチョウ腸内細菌上位10種（数値 配列一致率）

OTU	Code	Domain	Phylum		Class		Order		Family		Genus		
FCAYKGM7		Bacteria	1	Actinobacteria	1	Actinobacteria	1	Coriobacteriales	1	Coriobacteriaceae	1	<i>Olsenella</i>	1
FCAYKGM14		Bacteria	1	Firmicutes	1	Clostridia	1	Clostridiales	1	Lachnospiraceae	1	<i>Shuttleworthia</i>	0.4
FCAYKGM12		Bacteria	1	Actinobacteria	1	Actinobacteria	1	Actinomycetales	1	Actinomycetaceae	0.9	<i>Actinomyces</i>	0.9
FCAYKGM22		Bacteria	1	Firmicutes	1	Negativicutes	1	Selenomonadales	1	Veillonellaceae	1	<i>Megasphaera</i>	0.8
FCAYKGM20		Bacteria	1	Firmicutes	1	Clostridia	0.9	Clostridiales	0.9	Eubacteriaceae	0.2	<i>Alkalibaculum</i>	0.2
FCAYKGM29		Bacteria	1	Actinobacteria	1	Actinobacteria	1	Coriobacteriales	0.9	Coriobacteriaceae	0.9	<i>Slackia</i>	0.7
FCAYKGM30		Bacteria	1	Firmicutes	1	Clostridia	1	Clostridiales	1	Lachnospiraceae	0.4	<i>Robinsoniella</i>	0.2
FCAYKGM50		Bacteria	1	Actinobacteria	1	Actinobacteria	1	Bifidobacteriales	1	Bifidobacteriaceae	1	<i>Bifidobacterium</i>	0.9
FCAYKGM90		Bacteria	1	Firmicutes	0.9	Clostridia	0.9	Clostridiales	0.9	Eubacteriaceae	0.2	<i>Alkalibaculum</i>	0.2
FCAYKGM67		Bacteria	1	Bacteroidetes	1	Bacteroidia	1	Bacteroidales	1	Prevotellaceae	0.4	<i>Paraprevotella</i>	0.3

こうした一般的特徴は、生息する山岳を異にしても一致しており、その結果、図(1)-3に示すように地域毎のクラスターを形成することは無かった。ことに、植生の異なる北アルプスと南アルプスの個体群が分離することはなく、野生ニホンライチョウの腸内菌叢構成は、調査をした範囲ではあるが、ほとんど一致しているものと考えられた（図(1)-4）。この結果は、飼育個体から野生復帰個体を作成する際に、地域毎に腸内細菌を調整する必要の無いことを示している。



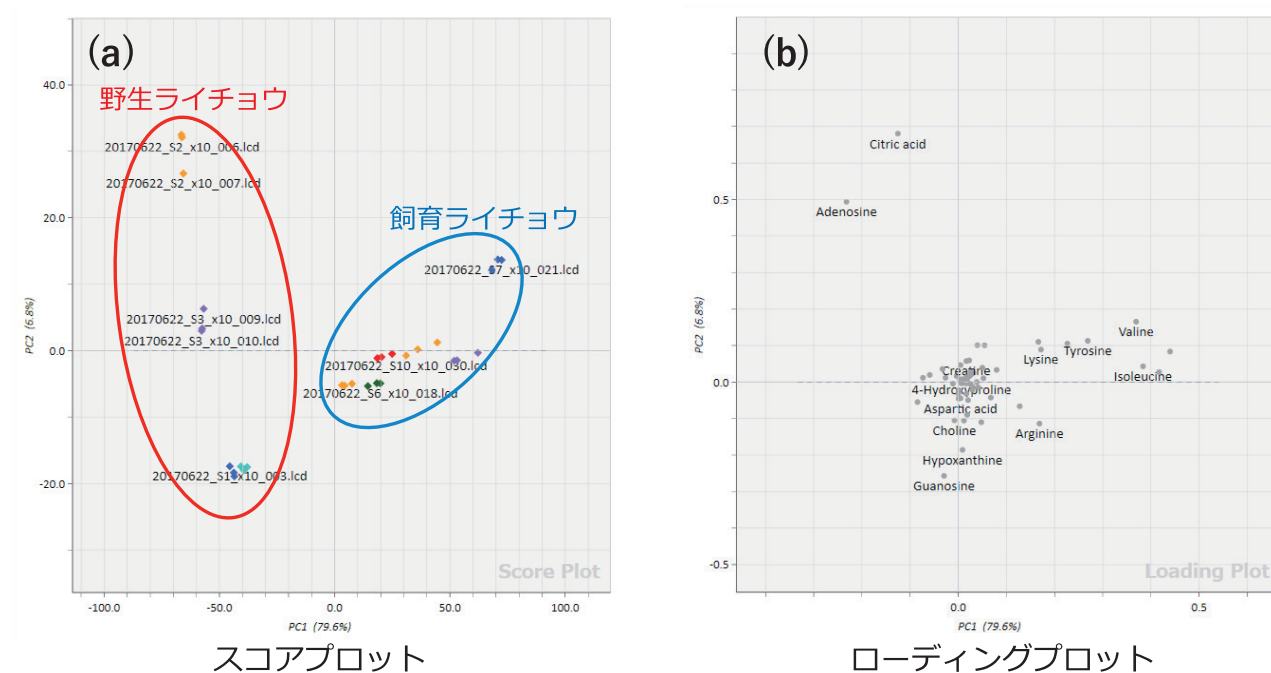
図(1)-3 野生ニホンライチョウ（成鳥）盲腸糞の菌叢解析結果。左図：ヒートマップによる表示；右図：デンドログラムによる試料間の類似性。 Kita,北岳;On,御岳; Norikura,乗鞍岳; Yake,焼岳;Jonen,常念岳;Otensho,大天井岳;Tate,立山



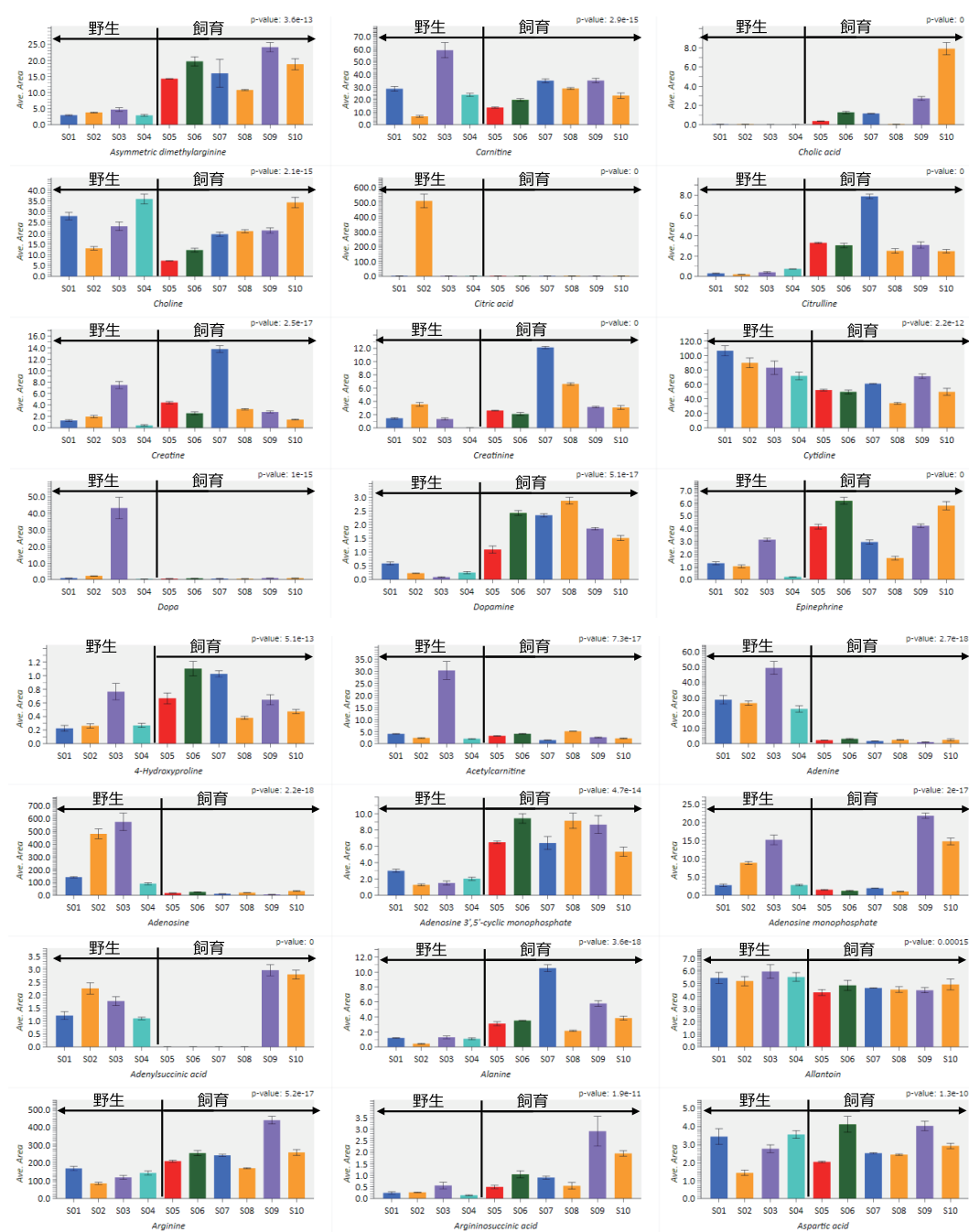
図(1)-4 野生成ニホンライチョウの腸内菌叢

4-5 : HPLC/MS/MSおよびイオン排除HPLCポストpH干渉電気伝導度法による腸内環境網羅解析

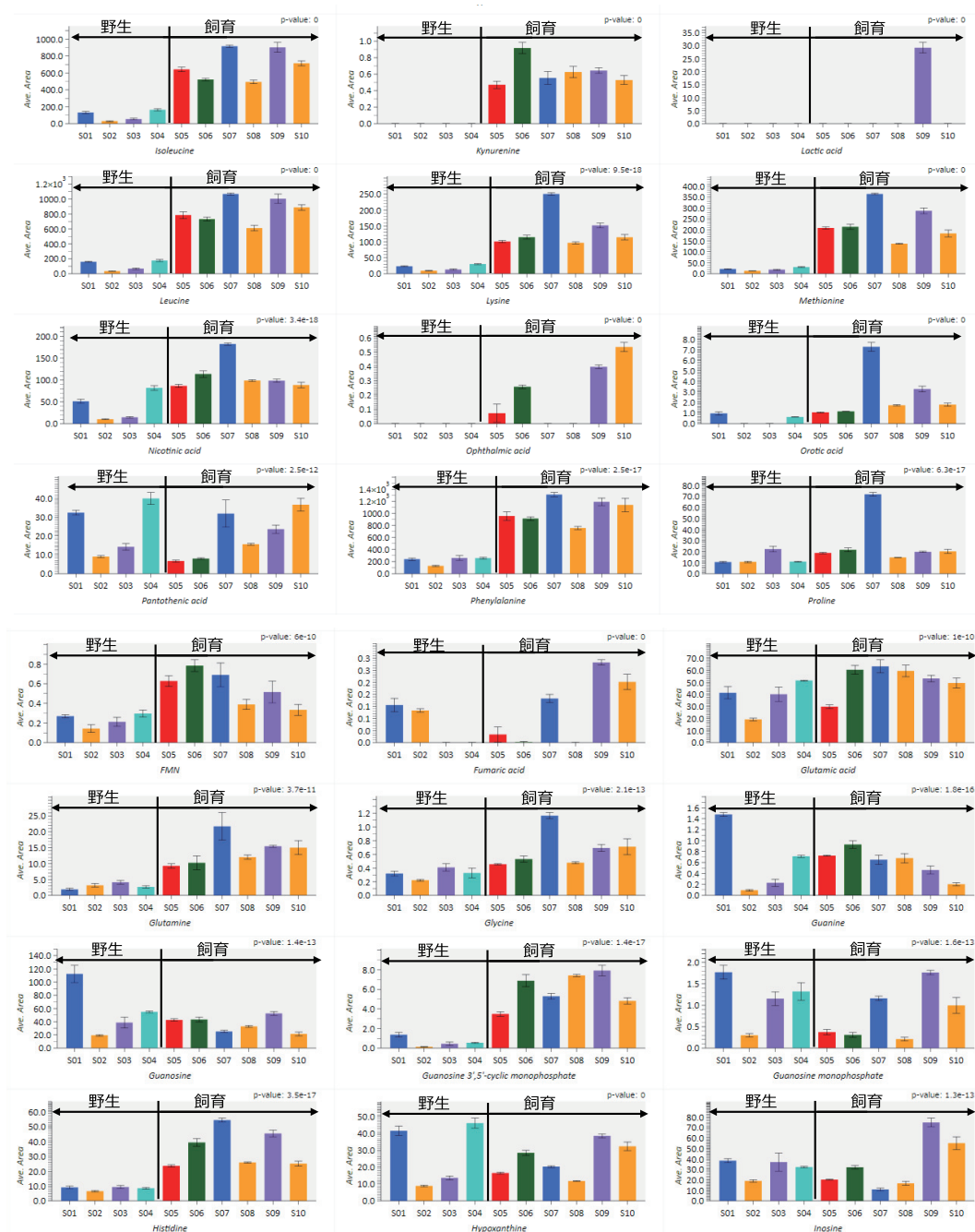
野生および飼育ニホンライチョウ由来の盲腸糞それぞれ4試料、6試料をLC-MS/MSで測定した結果、アミノ酸、ヌクレオチド、ヌクレオシドやTCAサイクルに関わる有機酸等の成分が、平均56および60種類検出された。測定結果を主成分分析した結果、図(1)-5a, bに示すようにScore Plotから野生・飼育ニホンライチョウ糞便が明確に分類された。また Loading Plotから、フェニルアラニン、ロイシン、イソロイシン、バリン、チロシン、メチオニン等のアミノ酸が飼育ニホンライチョウ糞便に多く含まれることがわかった。一方で、野生ニホンライチョウ糞便には、ウリジン、アデニン、シチジンが多く含まれることがわかった。キヌレニン、オフタルミン酸、タウロコール酸の3成分は、野生ニホンライチョウ糞便からは検出されず、飼育ニホンライチョウ糞便からのみ検出された。野生および飼育ニホンライチョウ由来の糞便をLCで測定した結果、こはく酸、乳酸、酢酸、プロピオン酸、酪酸が検出された。プロピオン酸に関しては、野生ニホンライチョウ糞便に多く含まれる傾向が見られた。



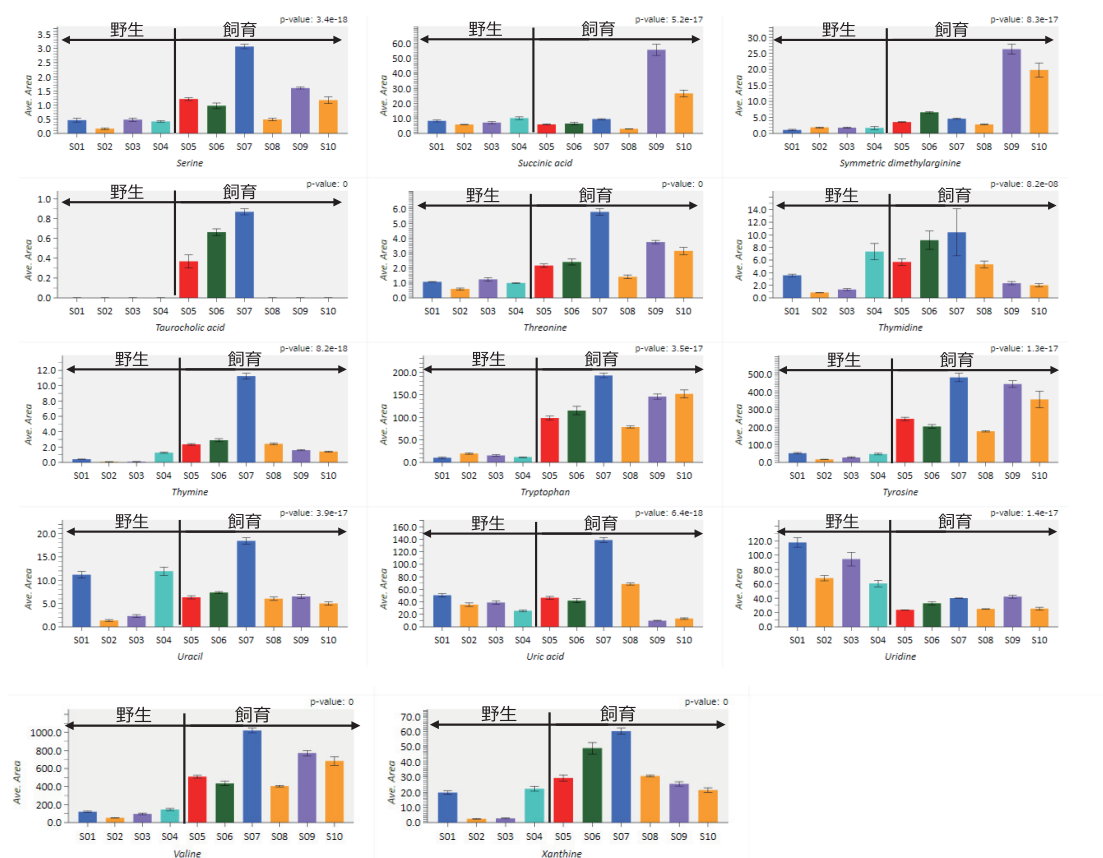
図(1)-5 HPLC/MS/MS 解析値の主成分分析 (a):スコアプロット (b):ローディングプロット



図(1)-6-1 ピーク面積比による各検出成分の濃度比較



図(1)-6-2 ピーク面積比による各検出成分の濃度比較



図(1)-6-3 ピーク面積比による各検出成分の濃度比較

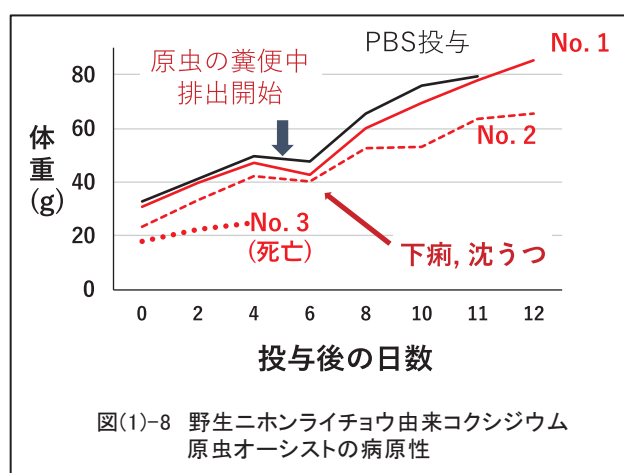
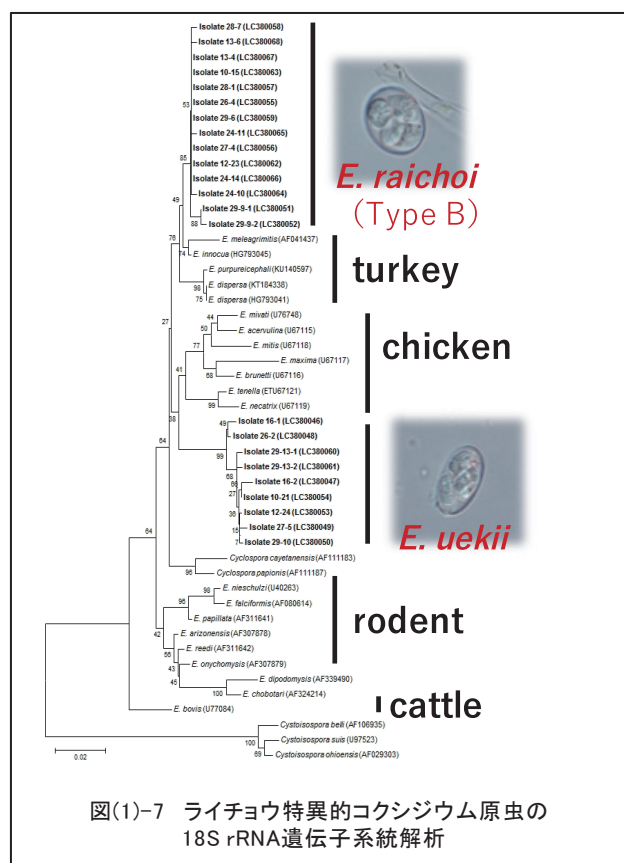
遊離のアミノ酸濃度が飼育下のニホンライチョウで高いことは、給与飼料が高タンパク質であることを示唆している。一方で、野生ライチョウでは、遊離核酸塩基および代謝物（プリン塩基、ピリミジン塩基代謝物）が高濃度であったことから、野生ライチョウの腸管内では、飼料由来の核酸や細菌死菌体由来の核酸の代謝が活発に起こっていることが示唆される(図(1)-6-1～3)。草食家畜が低タンパク質の飼料で飼育される場合、核酸塩基由来の窒素の細菌への供給が、細菌の増殖を支えるために重要であることがわかっている。野生ライチョウの食餌は、基本的に高山植物の葉や茎であるため、主要な飼料から供給されるタンパク質が葉緑体の光合成タンパク質にほぼ限られる上に低値であることから、核酸の窒素源としての有効利用が必要となる。この知見は、現状のニワトリに準じた高エネルギー高タンパク質の飼料を給与している人工飼育の課題を浮き彫りにしており、サブテーマ(3)における飼料開発に極めて重要な情報である。

4-6: コクシジウム原虫の野生ニホンライチョウ侵襲状況と実験感染試験結果

コクシジウム原虫の侵襲率を北アルプス各地と南アルプスで検定した。以前からニホンライチョウには形態の異なる2種のコクシジウム原虫 (*Eimeria uekii*およびタイプB) が感染することが知られていたが、表(1)-4に示すとおり前者については、30-40%の個体が感染しており、後者は約20%の感染率であった(Matsubayashi et al., 2018)⁸⁾。これらの試料から、原虫オーシストを実体顕微鏡下で一個ずつ単離し、18S rRNA配列に基づく遺伝系統解析を行ったところ、図(1)-7に示すように、*Eimeria uekii*とタイプBは、明確に系統が異なることが明らかになった。

表(1)-4 コクシジウム原虫の侵襲率

	<i>E. uekii</i>		<i>E. raichoi</i> (旧Type B)		採材場所
	陽性 / 総数	陽性 (%)	陽性 / 総数	陽性 (%)	
2016	11 / 35	31.4	6/35	17.1	立山, 乗鞍, 北岳
2017	10 / 26	38.5	5 / 26	19.2	
Total	21 / 61	36.1	11 / 61	18.0	

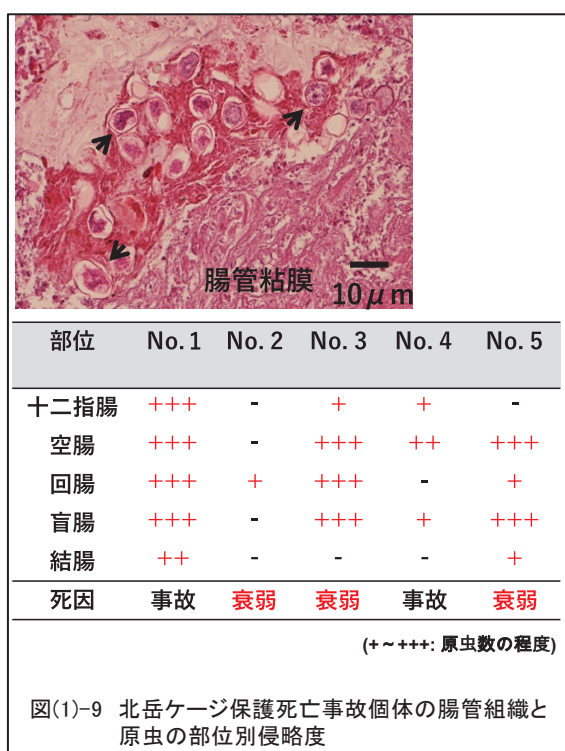


この結果を受けて、従来タイプBとされてきたライチョウコクシジウム原虫を新種アイメリア *E. raichoi*と命名し新種登録した (Matsubayashi et al. 2018)⁹⁾。

*Eimeria uekii*は、ライチョウと同じキジ目のニワトリに感染する高病原性コクシジウムである *Eimeria maxima*, *Eimeria brunette*, *Eimeria tenella*, *Eimeria necatrix* とクラスターを形成するため、系統としては病原性が疑われる。一方、新種として記載した *Eimeria raichoi*は、キジ目のシチメンチョウから検出される *Eimeria innocula*, *Eimeria melaegrimitis*と近縁であった。本種の病原性については、近縁種の病原性の記載が無いため不明である。

野生ライチョウ由来のコクシジウム原虫の病原性を確認するために、ウズラおよびスバルバルライチョウのヒナを用いた感染実験を行った。まず、キジ目の家禽であるウズラ4羽 (34日齢) に対し、野生ニホンライチョウの糞から調整した *Eimeria uekii* (2×10^4 個)と *Eimeria raichoi* (0.5×10^4 個)のオーシストを経口接種した。経口的に糞便検査を行ったが、オーシストの排出は確認できず、臨床観察でも元気消失や下痢は確認されず、感染は成立しなかったものと思われた。なお、2種の原虫を分離して回収することは不可能であったため、2種の混合オーシストとして取り扱った。

次に、スバルバルライチョウの受精卵の提供を受け、人工孵化させた。長野県茶臼山動物園から提供されたスバルバルライチョウ受精卵合計11個から8羽が孵化したが、4羽はオーシスト接種前に死亡したため、4羽が実験可能であった。この実験では3羽を試験群、1羽はPBSを給与する陰性対象とした。3から6日齢で立山および乗鞍岳の野生ニホンライチョウから分離したコクシジウム原虫オーシスト *Eimeria uekii* (2×10^4 個)と *Eimeria raichoi* (0.8×10^4 個)を3羽に経口接種した。図(1)-8に示すように、接種後、5日目からオーシスト排出が観察され、雛は下痢と沈鬱症状を呈したが、死亡には至らなかった。



図(1)-9 に示すように、28 年度 29 年度のケージ保護期間中に死亡したニホンライチョウ雛の検査を行ったところ、28 年度は、5 羽中の 2 羽から、29 年度は 5 羽中の 5 羽から腸管粘膜へのコクシジウム原虫浸潤が認められた。雛の衰弱とコクシジウム原虫感染の関連が示唆されるとともに、原虫に対する免疫機能の発達が、健全な成長に必要であることが強く示唆された。

5. 本研究により得られた成果

(1) 科学的意義

本研究によって、①野生のニホンライチョウは、食物に含まれる繊維成分、さらに有毒物や消化阻害物質を腸内細菌によって処理して、野外の厳しい環境で生存していることが明らかとなった。②そのための特異的な腸内細菌種を分離することに成功し、タンニン分解性などの生理生化学性状を評価できた。③これらの中で、実際に飼育下のニホンライチョウ死亡個体から分離された日和見感染菌に対する抗菌性の強い菌株を選抜した。④これらの候補菌の凍結乾燥後のプロバイオティクス製剤化にも成功し、サブテーマ (3) の飼育試験でその効果を検証した。サブテーマ (3) で詳細に報告するが、ライチョウの腸管での生残性も十分あり、感染防御力も保持していた。

⑤野生ニホンライチョウの腸内環境を網羅的に解析することに成功し、野生ではタンパク質の摂取が少なく、腸内細菌による核酸態窒素の利用が進んでいることが明らかとなった。一方、飼育下ではタンパク質の供給が野生と比べて過剰であることもわかり、ニホンライチョウに適した飼料開発の基盤となった。⑥野生ニホンライチョウに寄生するアイメリア原虫2形態それぞれの系統関係が、初めて明らかになった。1 種は、ニワトリに寄生する病原性の高い種と近縁で、1 種は、シチメンチョウから検出されるものと近縁で、系統的に異なる種であることが判明した。後者については、新種 *Eimeria raichoi* と命名し、国際的に認証された。

ニホンライチョウ由来のアイメリア二種のそれぞれの寄生部位や病原性に関しては今後の詳細検討が必要であるが、比較的近縁のウズラには感染が成立しなかったことから寄主特異性は高いと考えられた。一方で、ニホンライチョウの同種別亜種であるスバルバルライチョウでは感染が成立し、下痢や沈鬱などの臨床症状も認められたが、致死的ではなかった。しかし、北岳保護ケージ期間中に死亡した個体からは、高率に本種の感染が認められたので、野外でも原虫感染が起因する死亡事故もあると判断された。

(2) 環境政策への貢献

<行政が既に活用した成果>

環境省平成28年度29年度ライチョウ保護増殖検討会において、域内保全事業と域外保線事業をつなぐ重要要件として腸内細菌研究の重要性と意義をサブテーマ(3)の内容と併せて発表し、その後の保護事業の進展に貢献した。とくに域外保全事業の将来的方向性について、飼育下のニホンライチョウをそのまま復帰個体群としてハードリリースする手法は取りえない事を明らかにした。この点は、飼育を担当する日本動物園水族館協会生物多様性委員会ライチョウ域外保全プロジェクトチームと共有された。

<行政が活用することが見込まれる成果>

ニホンライチョウの生存に、特定の腸内細菌が必須であることがわかったことから、ニホンライチョウの域外保全事業の目標である野生復帰個体群の準備には、これらの細菌の腸管への定着を促す技術開発が必須であることがライチョウ保護増殖検討会で了解された。ニホンライチョウ以外の動物種でも、消化困難で有毒物を含むような餌食物に依存する希少動物の場合、保全の手法開発に腸内細菌の研究の重要性が認識されたことは、今後、希少動物保全政策に活用される見込みのある成果である。保護増殖検討会でも議論された野生個体糞便を用いた飼育個体への糞便移植は、単純な方法で極めて魅力的であるが、ニホンライチョウ野生個体の糞には高頻度でコクシジウム原虫がふくまれており、この問題の解決無くして実施が事実上不可能であることが了解されたことは、今後、別種の野生復帰個体群の作出方法の考案にも大きく貢献すると期待される。

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) S. TSUCHIDA, K. MURATA, M. OHKUMA and K. USHIDA: J. Gen. Appl. Microbiol, 63, 3, 195-198 (2017), Isolation of *Streptococcus gallolyticus* with very high degradability of condensed tannins from feces of the wild Japanese rock ptarmigans on Mt. Tateyama.
- 2) S. TSUCHIDA, Y. OHARA, K. KURAMOCHI, K. MURATA and K. USHIDA: Jpn. J. Zoo Wildlife Med, 22, 3, 41-45 (2017), Effective degradation of phenolic glycoside rhododendrin and its aglycone rhododendrol by cecal feces of wild Japanese rock ptarmigans.
- 3) M. MATSUBAYASHI, S. TSUCHIDA, K. USHIDA and K. MURATA: Int. J. Parasitol. Parasites Wildl, 7, 2, 134-140 (2018), Surveillance of *Eimeria* species in wild Japanese rock ptarmigans, *Lagopus muta japonica*, and insight into parasitic seasonal life cycle at timberline regions of the Japanese Alps or at the Japanese alpine regions.
- 4) M. MATSUBAYASHI, S. TSUCHIDA, A. KOBAYASHI, T. SHIBAHARA, H. NAKAMURA, K. MURATA and K. USHIDA: Int. J. Parasitol. Parasites Wildl, 7, 2, 243-250 (2018), Molecular identification of two *Eimeria* species, *E. uekii* and *E. raichoi* as type B, in wild Japanese rock ptarmigans, *Lagopus muta japonica*
- 5) A. UEDA, A. KOBAYASHI, S. TSUCHIDA, T. YAMADA, K. MURATA, H. NAKAMURA and K. USHIDA: Microorganisms 6, 3, 77. <https://doi.org/10.3390/microorganisms6030077>. (2018), Cecal

Microbiome analyses on wild Japanese rock ptarmigans (*Lagopus muta japonica*) reveals high level of coexistence of lactic acid bacteria and lactate-utilizing bacteria.

<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) 牛田一成：平成28年度第1回日本動物園水族館協会生物多様性委員会ライチョウ域外保全研究会（2016）「環境省環境研究総合推進費研究中間報告」
- 2) 土田さやか：平成28年度第1回日本動物園水族館協会生物多様性委員会ライチョウ域外保全研究会（2016）「野生ニホンライチョウから単離された乳酸菌の特徴」
- 3) 土田さやか、牛田一成：日本乳酸菌学会2017年度大会（2017）「様々な野生動物由来乳酸菌の探索」
- 4) 牛田一成、土田さやか、小林篤、上田敦史、山田拓司、長谷川雅美、村田浩一、中村浩志：第65回日本生態学会大会（2018）「野生ニホンライチョウ腸内細菌叢の特徴と地域差」
- 5) 服部考成、岡有香里、川名修一、緒方是嗣、土田さやか、小林篤、中村隼明、中村浩志、牛田一成：第27回環境化学討論会（2018）「LC-MS/MSによるニホンライチョウ糞便中の代謝物測定-野生・飼育ニホンライチョウの比較-」
- 6) 牛田一成：第70回日本生物工学会大会（2018）「野生動物の腸内細菌叢解析と糞便メタボローム解析」
- 7) S. TSUCHIDA, A. KOBAYASHI, K. MURATA and K. USHIDA. 14th International Grouse Symposium Utah State University（2018）
“Isolation of Cecal Bacteria from Wild Japanese Rock Ptarmigans and their Functionalities”
- 8) 松林誠、土田さやか、小林篤、芝原友幸、中村浩志、村田浩一、牛田一成：第24回日本野生動物医学会大会（2018）
「ニホンライチョウに寄生するコクシジウムの寒冷地における生存生態およびその分子系統樹解析」

（３）知的財産権

特に記載すべき事項はない。

（４）「国民との科学・技術対話」の実施

- 1) 第8回朝日21関西スクエア賞受賞記念講演「野生動物のおなかの中の秘密をさぐる～共生腸内細菌ハントニング～」（主催：朝日新聞社大阪本社 2017年7月29日、中之島会館、参加者260人）にて、土田さやかが受賞講演として本研究の成果紹介
- 2) 第17回ライチョウ会議長野大会「野生ニホンライチョウおよび飼育下スバルバルライチョウの腸内菌の特徴」（主催：実行委員会、長野県、大町市 2016年10月16日、サン・アルプス大町大会議室、参加者約200人）にて牛田一成が本研究の成果紹介
- 3) 太陽化学メールマガジン
(http://www.taiyokagaku.com/tomorrow_solution/backnumber/20171203.html) 「腸内細菌研究のもう一つのフロンティア 「野生動物の腸内細菌」」(2017)で、牛田一成、土田さやかが本研究の成果紹介
- 4) 第114回サイエンスカフェ in 名古屋「動物の「うんち」の研究から、わかること-野生動物の生存を助ける腸内細菌の世界-」（主催：日本農芸化学会中部支部 2018年6月24日、名古屋市科学館、観客約40人）にて牛田一成が本研究の成果紹介
- 5) 日本哺乳類学会2018年度大会一般公開シンポジウム「動物園動物の比較栄養学と比較細菌学」（主催：日本哺乳類学会 2018年9月10日、信州大学伊那キャンパス、参加者約200人）にて牛田一成が本研

究の成果紹介

- 6) 第70回日本生物工学会大会ランチョンセミナー「野生動物の腸内細菌叢解析と糞便メタボローム解析
(主催：島津製作所 2018年9月5日、関西大学第4学舎、参加者約150人) にて牛田一成が本研究の
成果紹介
- 7) 第18回ライチョウ会議新潟妙高大会「野生ニホンライチョウを特徴付ける腸内細菌とその性質を生か
した飼料開発」(主催：実行委員会、新潟県、妙高市 2018年10月20日、ふれあい会館、参加者約
300人) にて牛田一成が本研究の成果紹介
- 8) ライチョウ基金シンポジウム2019「ライチョウの未来と動物園の役割」(主催：富山市ファミリーパ
ーク 2019年2月3日、富山県総合福祉会館サンシップとやま・福祉ホール、観客約200人) にて牛
田一成が本研究について講演

(5) マスコミ等への公表・報道等

- 1) 朝日新聞 (2016年10月22日、関西版夕刊、連載記事 挑む 腸内細菌ハンター 眼力キラリ)
- 2) 岳人 (2017年3月号、「ライチョウの“うんち”の中にある不思議」)
- 3) 朝日新聞 (2017年3月16日、関西版朝刊、社会面、関西スクエア賞に2氏)
- 4) 朝日新聞 (2017年3月23日、デジタル、新進気鋭の若手研究者、2人に関西スクエア賞)
- 5) 毎日新聞 (2017年12月9日、全国版朝刊社会面、「野生ライチョウ 腸に毒素分解の特有細菌 飼育
種はなし」)
- 6) 岳人 (2018年6月号、「腸内から見えてくる新たな「リアル」」)
- 7) NHKニュース関西 (2018年7月25日、ニホンライチョウに寄生する病原性原虫研究の成果について
5分ほど紹介)
- 8) 成果の記者発表 (2018年7月20日、於大阪府立大学、「(ニホンライチョウに寄生する病原性原虫の
新種を特定一生息数増加に貢献、新種を「ライチョイ」と命名一)
<https://www.osakafu-u.ac.jp/press-release/pr20180720/>)
- 9) 朝日新聞 (2018年9月12日、全国版朝刊教育面、「新鮮なふん 追い求めて」)
- 10) 日本経済新聞 (2018年12月13日、電子版、「ライチョウ繁殖のカギは「腸内」、相次ぐ死防げるか」)

(6) その他

- 1) 2017年3月16日 第8回朝日21関西スクエア賞受賞 土田さやか
- 2) 2018年9月 2018年度日本野生動物医学会論文賞受賞
土田さやか、小原陽子、倉持幸司、村田浩一、牛田一成
「Isolation of *Streptococcus gallolyticus* with very high degradability of condensed tannins
from feces of the wild Japanese rock ptarmigans on Mt. Tateyama」
- 3) 2018年9月 第24回日本野生動物医学会大会 優秀口頭発表賞 松林誠
「ニホンライチョウに寄生するコクシジウムの寒冷地における生存生態およびその分子系統解析」

8. 引用文献

- 1) S. TSUCHIDA, Y. OHARA, K. KURAMOCHI, K. MURATA and K. USHIDA: Jpn. J. Zoo Wildlife Med, 22,
3, 41-45 (2017), Effective degradation of phenolic glycoside rhododendrin and its aglycone
rhododendrol by cecal feces of wild Japanese rock ptarmigans.
- 2) S. TSUCHIDA, K. MURATA, M. OHKUMA and K. USHIDA: J. Gen. Appl. Microbiol, 63, 3, 195-198 (2017),
Isolation of *Streptococcus gallolyticus* with very high degradability of condensed tannins
from feces of the wild Japanese rock ptarmigans on Mt. Tateyama.
- 3) K. USHIDA, T. SEGAWA, S. TSUCHIDA and K. MURATA: J. Vet. Med. Sci, 78, 2, 251-257 (2015), Cecal

- bacterial communities in wild Japanese rock ptarmigans and captive Svalbard rock ptarmigans.
- 4) K. USHIDA, Y. UWATOKO, Y. ADACHI, AG. SOUMAH and T. MATSUZAWA: J. Gen. Appl. Microbiol, 56, 1, 57-60 (2010), Isolation of Bifidobacteria from feces of chimpanzees in the wild.
 - 5) R. OSAWA, T. FUJISAWA and R. PUKALL: Int. J. Syst. Evol. Microbiol, 56, 7, 1693-1696 (2006), *Lactobacillus apodemi* sp. nov., a tannase-producing species isolated from wild mouse faeces.
 - 6) R. OSAWA, T. FUJISAWA and L. SLY: Syst. Appl. Microbiol, 18, 1, 74-78 (1995), *Streptococcus gallolyticus* sp. nov.; Gallate Degrading Organisms Formerly Assigned to *Streptococcus bovis*.
 - 7) A. UEDA, A. KOBAYASHI, S. TSUCHIDA, T. YAMADA, K. MURATA, H. NAKAMURA and K. USHIDA: Microorganisms, 6, 3, 77. <https://doi.org/10.3390/microorganisms6030077>. (2018), Cecal Microbiome analyses on wild Japanese rock ptarmigans (*Lagopus muta japonica*) reveals high level of coexistence of lactic acid bacteria and lactate-utilizing bacteria.
 - 8) M. MATSUBAYASHI, S. TSUCHIDA, K. USHIDA and K. MURATA: Int. J. Parasitol. Parasites Wildl, 7, 2, 134-140 (2018), Surveillance of *Eimeria* species in wild Japanese rock ptarmigans, *Lagopus muta japonica*, and insight into parasitic seasonal life cycle at timberline regions of the Japanese Alps or at the Japanese alpine regions.
 - 9) M. MATSUBAYASHI, S. TSUCHIDA, A. KOBAYASHI, T. SHIBAHARA, H. NAKAMURA, K. MURATA and K. USHIDA: Int. J. Parasitol. Parasites Wildl, 7, 2, 243-250 (2018). Molecular identification of two *Eimeria* species, *E. uekii* and *E. raichoi* as type B, in wild Japanese rock ptarmigans, *Lagopus muta japonica*.

II-2 野生ライチョウの腸内細菌垂直伝播に関する研究

東邦大学理学部

長谷川 雅美

<研究協力者>

東邦大学理学部

小林 篤

中村浩志国際鳥類研究所

中村 浩志

平成28～30年度累計予算額：8,985千円

(うち平成28年度：2,618千円 平成29年度：3,265千円 平成30年度 3,102千円)

累計予算額は、間接経費を含む。

[要旨]

野生型の腸内細菌叢を飼育個体で再現するためには、野生の雛の菌叢確立プロセスを明らかにすることが重要である。特に野生ニホンライチョウ (*Lagopus muta japonica*) では孵化まもない雛が母鳥の盲腸糞をついばむことが視認されており、この行動が腸内細菌叢伝播において重要な役割を果たしていることが予想されていた。本研究では、ケージ保護を利用して母鳥と雛の行動を詳細に観察し、雛が食糞する期間を特定するとともに、生まれて数日から4週齢に至るまでの盲腸糞を採集し、次世代シーケンサーを用いた16S rRNA遺伝子メタ解析により腸内細菌叢の変化を追跡した。さらに、現行の飼育個体の腸内細菌叢の成長に伴う変化と比較し、現状の飼育方法の問題点について明らかにした。

ケージ保護された野生雛では孵化後3日～18日にかけて継続して母鳥の盲腸糞に対してのみ食糞を行うことが明らかになった。また、食糞を行った野生雛では孵化1週齢から親と同程度の数の細菌OTU

(Operational taxonomic unit=細菌種とほぼ同義) が検出された。また、親鳥でも主要な腸内細菌であった *Olsenella*, *Actinomyces*, *Alkalibaculum*, *Slackia* といった嫌気性菌が1週齢の雛からも優占菌として検出され、食糞が腸内細菌叢伝播に寄与していることが強く示された。一方、飼育個体は食糞ができない上、孵化後から抗生物質および合成抗菌剤を連続経口投与されているため、1週齢の腸内菌叢が非常に貧弱であることがわかった。また、その後の成長過程でも *Clostridium* や *Ruminococcus* が野生個体よりも多く検出され、野生個体の菌叢とは大きく異なることが明らかになった。雛の食糞の開始タイミングは、雛の腸内へ細菌が定着しやすい母親由来免疫物質の枯渇するタイミングと合致していると考えられるため、飼育個体へ野生ニホンライチョウ由来有用菌を投与するには孵化後から18日齢ごろまでの期間に、継続して行うことが必要であると考えられた。

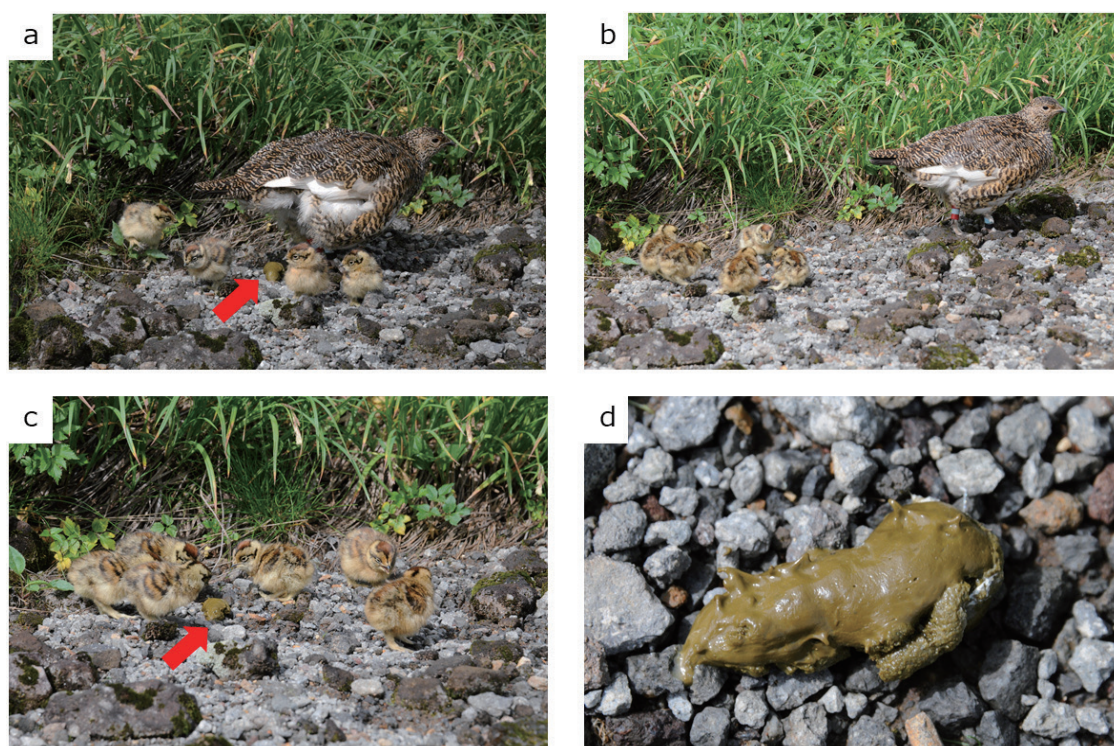
[キーワード]

16Sr RNA遺伝子メタ解析、食糞、腸内細菌叢伝播

1. はじめに

飼育個体における野生型腸内細菌叢の復元に当たっては、野生個体における腸内細菌叢の発達過程を明らかにすることは重要である。特に野生ニホンライチョウは様々な防御物質、とくに毒物を持つ高山植物を消化できるような特殊な腸内細菌叢を持っていることが明らかになっており (Ushida et al. 2015, Tsuchida et al. 2017a, b)^{1), 2), 3)}、このような特殊な役割を持つ腸内細菌をどのようにして次世代に伝え、維持しているのかは生態学的にも興味深い。鳥類は卵で生まれてくるため孵化時の腸内細菌叢は無菌であるか非常に貧弱であるため (Ding et al. 2017, Grond et al. 2017, Ilina et al. 2016)^{4), 5), 6)}、孵化した後に腸内細菌を手に入れているはずである。野生ニホンライチョウは早成性で、孵化後に親からの給餌を受けることなく孵化して間もない時期から親と同じ餌を食べ始める (大町山岳博物館, 1992)⁷⁾。そのため雛は孵化してから直ちに親が持っている腸内細菌を引き継いでいると考えられる。

我々は、この研究に先立ち3日齢の野生ニホンライチョウの雛が母鳥の盲腸糞から排泄される盲腸糞をついばむことを観察した(図(2)-1)。生まれて間もない野生ニホンライチョウの雛は自身で体温調節ができないため(Theberge and West, 1973)⁸⁾、頻繁に母鳥のお腹の下で温めてもらう。この時は、雛が母鳥のお腹の下から出てきた直後に母鳥が盲腸糞をすると(図(2)-1a)、すべての雛が盲腸糞の周りに集まり盲腸糞をついばんだ(図(2)-1bc)。図(2)-1dに示すように、雛の啄み跡は、盲腸糞に小さなツノが立ったように残ることを確認した。盲腸はライチョウにおける飼料発酵槽であり、盲腸から排泄された糞には食物の消化に必要な多くの腸内細菌が含まれる。そのため、我々はこの行動が野生ニホンライチョウの雛における速やかな腸内細菌叢確立に寄与しているかもしれないと考えた。そこで、サブテーマ(2)で野生ニホンライチョウの雛における腸内細菌叢確立過程と食糞の関係を調べた。この行動が野生ニホンライチョウの雛にとって一般的な行動であり、腸内細菌叢の伝播に寄与しているならば、飼育下での野生ニホンライチョウ由来有用菌の与のタイミングや、将来的な野生型腸内細菌叢復元手法の開発において大きな意味を持つ。



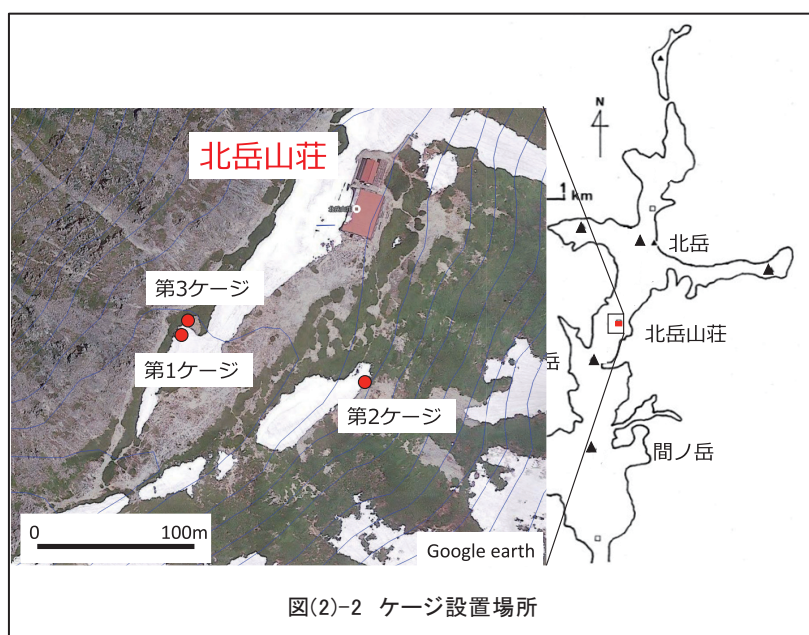
図(2)-1. 野生ニホンライチョウの3日齢雛による食糞 a,母鳥の盲腸糞排泄; b,盲腸糞に集まる3日齢雛; c, 盲腸糞をつつく雛 d, 盲腸糞に残った啄み跡

2. 研究開発目的

以上の点を踏まえ、このサブテーマでは野生ニホンライチョウにおける腸内細菌叢の世代間伝播様式を明らかにすることを目的とした。腸内細菌叢の伝播様式、特に食糞の起こる期間は、サブテーマ(1)によって単離された野生ニホンライチョウ由来の有用菌を、サブテーマ(3)の飼育実験で、飼育個体に投与する際に、何時からどのくらいの期間にわたり投与を行うかを決定する上で非常に重要な情報となる。また、現行の飼育方法で飼育されている雛と野生雛の腸内細菌叢の発達過程を比較し、その違いも明らかにすることで、現行の飼育方法のかかえる問題を明らかにし、野生復帰に資する個体群の確立に向けた基本情報を対策の提案も含めて提供する。またライチョウ研究におけるトレイルカメラの使用方法について検討する。

3. 研究開発方法

南アルプス北岳周辺で野生ニホンライチョウ家族のケージ保護事業がおこなわれており、その過程で野生ニホンライチョウの雛がメス親の盲腸糞を食べる行動（自発的食糞行動）の観察に加えて、雛の盲腸糞の経日的採集を行った。ケージ保護とは、高山帯に設置したケージを使って、悪天候と捕食者から孵化直後の雛を人の手で守る方法である。食糞の観察と盲腸糞のサンプル採集は、28年度と29年度の2期にわたり継続して行った。両年度ともに、3つのケージが北岳山荘周辺に設置されており、なわばり近くで発見した孵化直後の野生ニホンライチョウ家族をこれらのケージまで誘導することでケージに収容してあった(図(2)-2)。



図(2)-2 ケージ設置場所



図(2)-3-1. 保護ケージ内のライチョウの様子

ケージに収容された後は、周辺で採取したクロウスゴ (*Vaccinium ovalifolium*) の新鮮葉および花、イワツメクサ (*Stellaria nipponica*) の新鮮葉および花、オヤマノエンドウ (*Oxytropis japonica*) の新鮮葉および花、オンタデ (*Aconogonon weyrichii*) の新鮮葉、ムカゴトラノオ (*Bistorta vivipara*) の花序が給餌されるとともに、ごく少量の市販ミルワーム (*Tenebrio molitor*) および前年に採取して冷凍保存されたコケモモ (*V. vitisidaea*) の果実が給与された(図(2)-3-1)。この他にも晴れた日には1日2回程度ケージ外に出すことで、家族にはケージ周辺に自生している様々な植物や昆虫を自力で摂取できるように配慮されていた。

それぞれの家族の保護期間を図(2)-4に黄色棒グラフで示した。

ケージ保護期間中は、夜間を除いて、ケージ内およびケージ外で、近接して家族を観察し、母鳥の盲腸糞に残る雛のついでみ跡の有無を記録するとともに、雛の盲腸糞についても経日的に採取を行った。雛がメス親の盲腸糞を食べたかどうかは、メス親の盲腸糞に残された雛のついでみ跡の有無から判断した(図(2)-1d)。

毎日の雛の盲腸糞に加えて保護開始日と終了日の母鳥の盲腸糞を朝のケージ内掃除の際に回収し、サブテーマ(1)と同様の方法で、土壌に触れていない盲腸糞の中心部を滅菌ピンセットで採取し、常温保存可能なDNA保存液中に保存した。また、ニホンライチョウを人工孵化させた上野動物園、富山市ファミリーパーク動物園、大町山岳博物館の3飼育園館から孵化1から4週までと、90日齢においても同様に盲腸

糞サンプルをDNA保存液の中に採取した。実験室に戻った後、DNA保存液中の盲腸糞を遠心洗浄し、得られた糞便塊をビーズビーターを用いて物理的に破碎した。この操作によってDNA抽出液中に遊離した糞便塊中の全DNAを回収し、腸内細菌のDNA網羅解析用のDNA試料とした。これらのDNA試料に含まれる細菌16S rRNA遺伝子をPCR増幅し、BGI社の標準プロトコルに従ってV3/V4領域のライブラリーを調整した後、Miseqシーケンサーを用いた塩基配列の解読を行った。解読不良の配列を除いた後、残った配列をアセンブルし、RDPデータベースに対して照合した。この試験では、得られたリードに関して、3リード以下のRare OUTについては、これらを削除したのちに統計解析を行った。



このほか、電子天秤と自動記録カメラをケージ内に設置し（図(2)-3-2）、雛の体重を経日的に記録し、飼育ニホンライチョウと比較した。

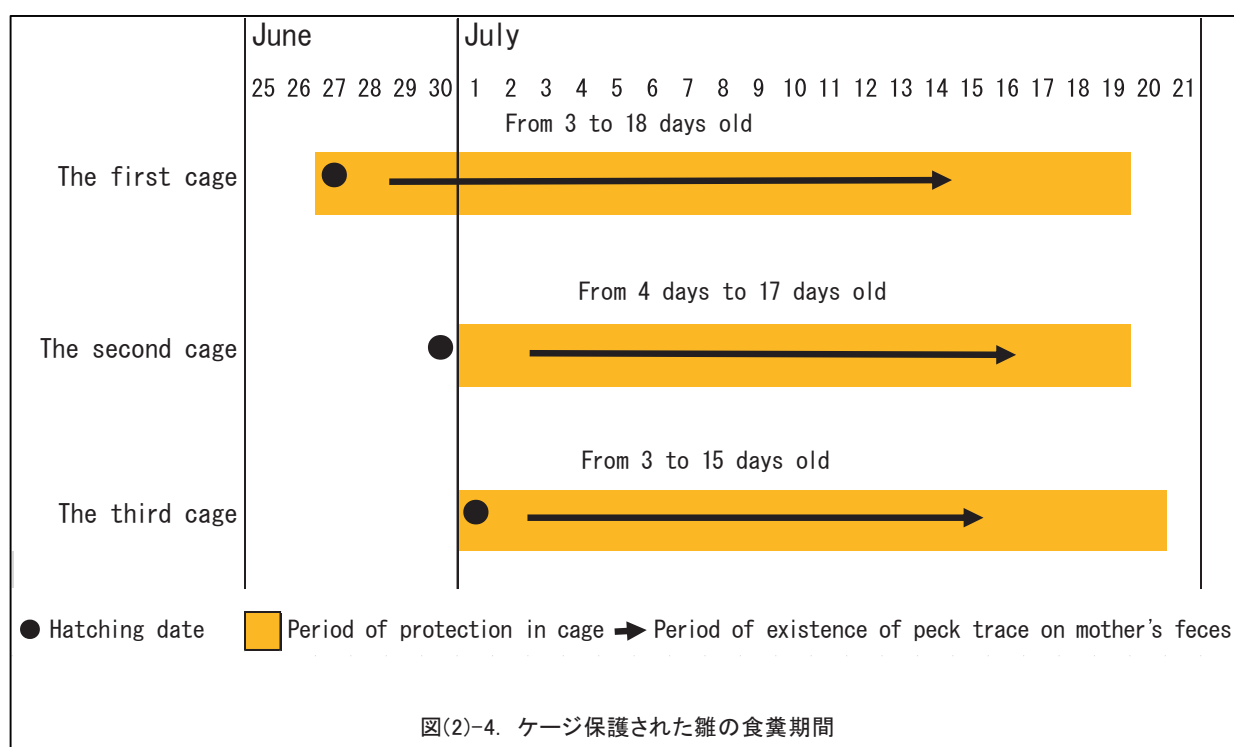
4. 結果及び考察

4-1：食糞期間

28年度に観察調査をした結果、ケージ保護した3家族すべてにおいて雛の食糞行動が観察された（図(2)-4）。母鳥の盲腸糞に対する食糞は、孵化後3日目から始まり、遅くとも孵化後18日までには終了した。

羽田らによって野生ニホンライチョウ研究が開始されて50年あまりがたつが、食糞行動は報告されてこなかった。特に、中村らによって20年以上にわたって実施された詳細な野外調査でも、野生ニホンライチョウの成鳥による食糞行動や孵化後1か月以上たった個体による食糞は観察されていない。類縁のライチョウ類においても食糞行動の報告が全くない。これまでの世界のライチョウ研究で食糞行動が全く報告されていないのは、本研究で明らかになったように、雛の食糞行動自体が孵化後の極めて限られた時期にしかおこなわれないという特性から、観察が不可能であったためと考えられる。本サブテーマでは、ケージ保護を行っている個体群を対象としたため、通常では観察が極めて困難な孵化後の早い時期から雛の行動と、母鳥の盲腸糞を詳細かつ継続的に観察できたため、世界で初めて食糞行動を解明できたと考えられる。

母鳥の盲腸糞に雛の食糞行動の痕跡としての啄み跡が観察されたのに対して、母鳥の腸糞（直腸糞）や雛自身の盲腸糞に対する食糞行動は、認められなかった。過去の研究では、上述のように成鳥の食糞行動が全く確認されていないことから、野生ニホンライチョウにおける食糞行動は、雛に限定された行動で、食糞の対象は、母鳥の盲腸糞に限定されるものと思われる。



雛による母鳥の盲腸糞に対する食糞行動の理由については、栄養摂取と下記「4-2：成長にともなう菌叢構成の変化」にしめす腸内細菌の垂直伝播の二つの理由が考えられる。この二つの理由を考察する上で、食糞行動の発現が、孵化当日でなかったことが注目される。サブテーマ(3)のIgA測定の項とも関連するが、キジ目の雛では、孵化後数日間は、腹腔内に卵黄が残留し卵黄嚢を形成している。卵黄嚢は、腸管に接続しており、残留卵黄内の栄養や免疫グロブリン（IgA）などが腸管内に放出されている。

残留卵黄の免疫グロブリンは、雛の初期感染防御に働くが、その他の脂質やタンパク質などは栄養源として利用される。残留卵黄は、孵化後4～5日を経過すると、次第に吸収されて無くなっていくが、それ以降、母鳥からの移行免疫に入れ替わるように、雛は自身の免疫機能を発達させていく。食糞行動がはじめて観察される孵化後3から4日というのは、残留卵黄の消失過程とよく一致することから、食糞行動の開始時期と母鳥由来の免疫グロブリンの消失時期の両者に何らかの関係のあることが見て取れる。

哺乳類の場合、母胎内での胎盤移行によって免疫グロブリンが胎仔に供給される動物種と胎盤移行のおこらない動物種があるが、いずれも初乳には高濃度の免疫グロブリンが含まれ、出生後の初生仔の免疫を担っている。その後分泌される常乳にも免疫グロブリンが含まれるが、授乳期間が進むにつれて濃度が減少していく。一般に、離乳期が初生仔腸管内の免疫グロブリン濃度が最も低い時期に当たる(Inoue and Ushida, 2003, Ushida et al. 2008)^{9,10)}が、その時期に腸内細菌数および菌種の数(細菌OTU数)が急激に増加する(Inoue and Ushida, 2003, Inoue et al. 2005 ab)^{9,11,12)}。すなわち、腸管内の免疫グロブリン濃度が最も減少する時期に、産仔の腸内細菌叢の急激な発達が起こることになる。そして、母親が哺育を行う場合、子には母親と共通した細菌種の伝達がおこっている(Inoue and Ushida, 2003b)¹³⁾。この時期に腸内細菌の定着が進まないと、産仔の免疫機構は発達が進まない。こうした現象は、無菌動物や抗生物質および合成抗菌剤の使用によって、腸内細菌を除菌した動物の腸管免疫が発達しないことから理解できる。

本研究の対象動物種であるニホンライチョウの場合、雛の腹腔内残留卵黄は哺乳類の免疫グロブリン胎盤移行と初乳による供給と同じ働きを示すと考えられる。卵生の生物の場合、初乳や常乳から母親由来の免疫物質を取り入れることがないので、腹腔内残留卵黄の免疫物質が枯渇すれば、その時点で哺乳類の離乳と同じ状況に至ると考えられる。その際に、母親の糞便を食べることにより生活に必要な腸内細菌を効率よく腸管に定着させることができる。つまり、雛の腹腔内に残留卵黄が存在する孵化直後に雛の食糞行動が起こらないのは、合理的であると考えられる。また、母親の特殊な糞便を若齢の産仔に

食糞させることによって、生活に必要な腸内細菌の垂直伝播を達成するコアラの例は、ニホンライチョウで明らかになった食糞による腸内細菌垂直伝播と極めて類似した戦略であるといえる。

有袋類と鳥類では、進化系統的に遠く離れているが、コアラもニホンライチョウも、有毒な成分を含む食草を主食とする草食動物であるので、極めて類似した生存戦略を取っているものと思われる。その意味で、ニホンライチョウ雛の特殊な食糞行動は、進化的に収斂した行動様式と定義できる。

4-2：成長にともなう菌叢構成の変化

盲腸糞内の腸内細菌叢解析から、飼育（Captiveと表記）とケージ保護（semi-wildと表記）それぞれのニホンライチョウ雛の1週齢から4週齢までと、成鳥（ケージ保護の場合は、同居母鳥、飼育の場合は成鳥生育後の同個体）における、検出OTU数と α 多様性（Shannon Index）を算出した（表(2)-1、表(2)-2）。ケージ保護個体における菌のOTU検出数及び α 多様度は4週齢で最も高く、この傾向は評価する対象を種レベルのOTUから目や科まで分類群を引き上げても変化しなかった。

ケージ保護個体では、1週齢の段階で成鳥とほぼ同じOTU数が検出された。この時、腸内細菌叢の α 多様度については1週齢の個体の方が成鳥よりも高かったが、有意な差は見られなかった。一方、飼育個体では検出OTU数および α 多様度は成長に伴って増加し、90日齢におけるOTU数が野生の成鳥よりも多くなった。しかし、目や科など高次の分類群になればなるほど飼育個体の検出OTU数と α 多様度がケージ保護個体よりも低くなった。

ケージ保護雛に代表される野生ニホンライチョウの場合、食糞によりニホンライチョウの野生生活に必要な腸内細菌が孵化後の早い時期から定着するので、若齢の雛でもすでに成鳥と同じ腸内細菌叢が確立している。これに対して飼育下では、特に孵化後1週間の抗生物質（オキシテトラサイクリン）の連続経口投与が、腸内細菌の定着に介入するので、薬剤耐性（この場合、テトラサイクリン耐性）を持つ周辺環境の細菌（環境には、周辺の動物や飼育者自体も感染源として含まれる）が、腸内でニッチを競合する相手がいないことによって、ライチョウの飼料消化に関与しない細菌ですら容易に腸管に定着してしまうことになる。しかし飼料消化など、ライチョウの生活に役立たない細菌は、その後の生育過程の中で、必要な細菌種によって容易に置き換えられることから、飼育個体であっても成長に伴った検出OTU数や α 多様度の増加が認められたと考えられる。また、高次の分類群の解析結果に傾向の違いが生じた理由は、野生ニホンライチョウの野生生活に必要な腸内細菌は科、目のレベルでも比較的多岐に渡っているのに対し、野生ニホンライチョウの腸内に優占するSynergistetes科や腸管定着性のActinomycetes科などのグループに属する腸内細菌が飼育の周辺環境には存在しないことによって飼育個体では構成が単純化したと考えられた。

表(2)-1. ケージ保護個体と飼育個体における検出された腸内細菌のOTU数の成長に伴う変化

a. Captive individuals

Category	1 week old (7)	2 weeks old(10)	3 weeks old(10)	4 weeks old(11)	90 days old(12)
OTU	127.0±49.3	599.8±252.9	905.0±167.4	1097.5±338.8	1477.0±282.0
Genus	17.1±4.3	46.5±8.6	56.4±6.7	63.4±8.7	84.6±11.6
Family	5.4±2.4	8.6±1.9	10.2±3.6	11.2±4.0	18.3±4.2
Order	4.0±1.1	5.0±0.8	5.5±1.0	5.5±1.2	6.3±1.4

b. Semi-wild individuals

Category	1 week old (17)	2 weeks old (23)	3 weeks old (21)	4 weeks old (17)	Adult (8)
OTU	677±190.2	621.1±192.1	637.9±176.8	736.5±170.9	495.1±109.0
Genus	84.5±11.0	83.5±11.7	83.3±10.1	93.8±16.1	91.9±14.7
Family	28.1±5.7	27.6±4.5	25.3±4.2	29.3±8.0	30.3±6.9
Order	12.3±3.4	11.5±2.5	11.4±1.9	14.3±4.5	13.4±3.7

表(2)-2. ケージ保護個体と飼育個体における α 多様度の成長に伴う変化

a. Captive individuals

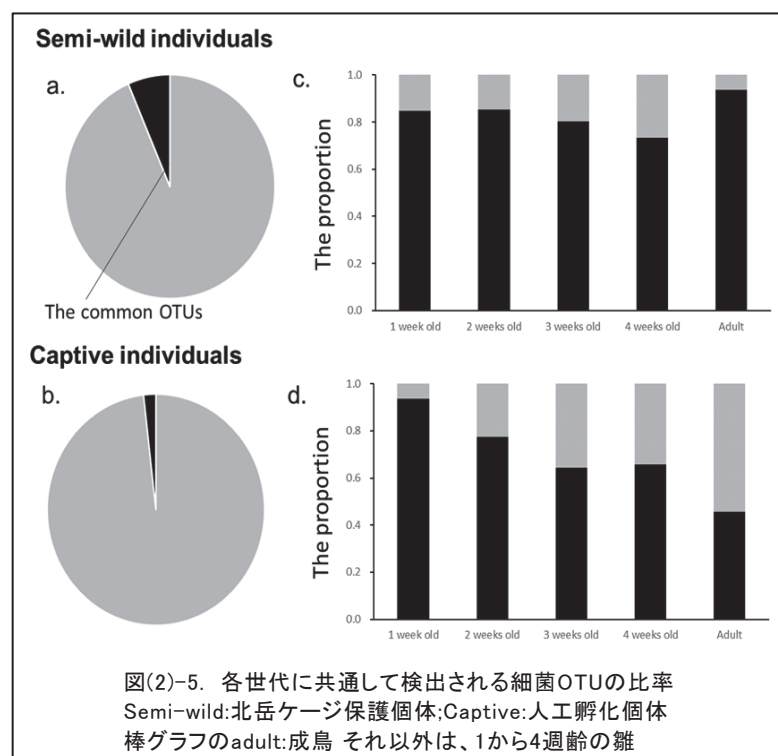
Category	1 week old (7)	2 weeks old(10)	3 weeks old(10)	4 weeks old(11)	90 days old(12)
OTU	2.57±0.83	4.85±1.36	6.23±0.34	6.39±0.39	7.32±0.35
Genus	1.87±0.35	2.88±0.67	3.36±0.24	3.50±0.26	4.00±0.34
Family	0.91±0.25	1.27±0.27	1.29±0.28	1.33±0.09	1.42±0.22
Order	0.87±0.28	0.96±0.27	0.86±0.19	0.90±0.18	0.77±0.14

b. Semi-wild individuals

Category	1 week old (17)	2 weeks old (23)	3 weeks old (21)	4 weeks old (17)	Adult (8)
OTU	6.23±0.85	6.20±0.93	6.34±0.64	6.50±0.68	5.26±0.54
Genus	3.91±0.35	4.09±0.33	4.21±0.28	4.21±0.35	3.82±0.50
Family	2.14±0.35	2.24±0.25	2.31±0.32	2.25±0.49	2.41±0.55
Order	1.53±0.37	1.59±0.29	1.74±0.33	1.72±0.40	1.90±0.51

4-3 : 共通する腸内細菌種と遷移する細菌種

飼育個体から検出された11,755 OTUのうち、すべての生育ステージから検出されたのは1.8%の217 OTUであった。ケージ保護個体から検出された9,449 OTUのうち、すべての生育ステージから検出されたのは6.9%の656 OTUであった(図(2)-5)。ケージ保護個体においては、これら共通のOTUが腸内細菌叢の主要な構成細菌であり、その割合(黒棒グラフで示す)は、成鳥でも1週齢の個体でも検出OTU数の90%を越えていた。成鳥から見つかった主要な細菌OTUのほとんどが1週齢の雛からも主要菌種として検出されており、とくに*Olsenella*, *Actinomyces*, *Slackia*, *Alkalibaculum*などは1週齢から成鳥にかけて常に高い割合を占めていた(図(2)-6)。*Olsenella*は、広義の乳酸菌でありサブテーマ(1)の解析結果からも野生ニホンライチョウの最優占種として検出された菌種に該当する。現在では4種が登録されているが、鳥類から分離された例はない。これまでにヒツジのルーメンやブタの大腸から分離されており、植物食の哺乳

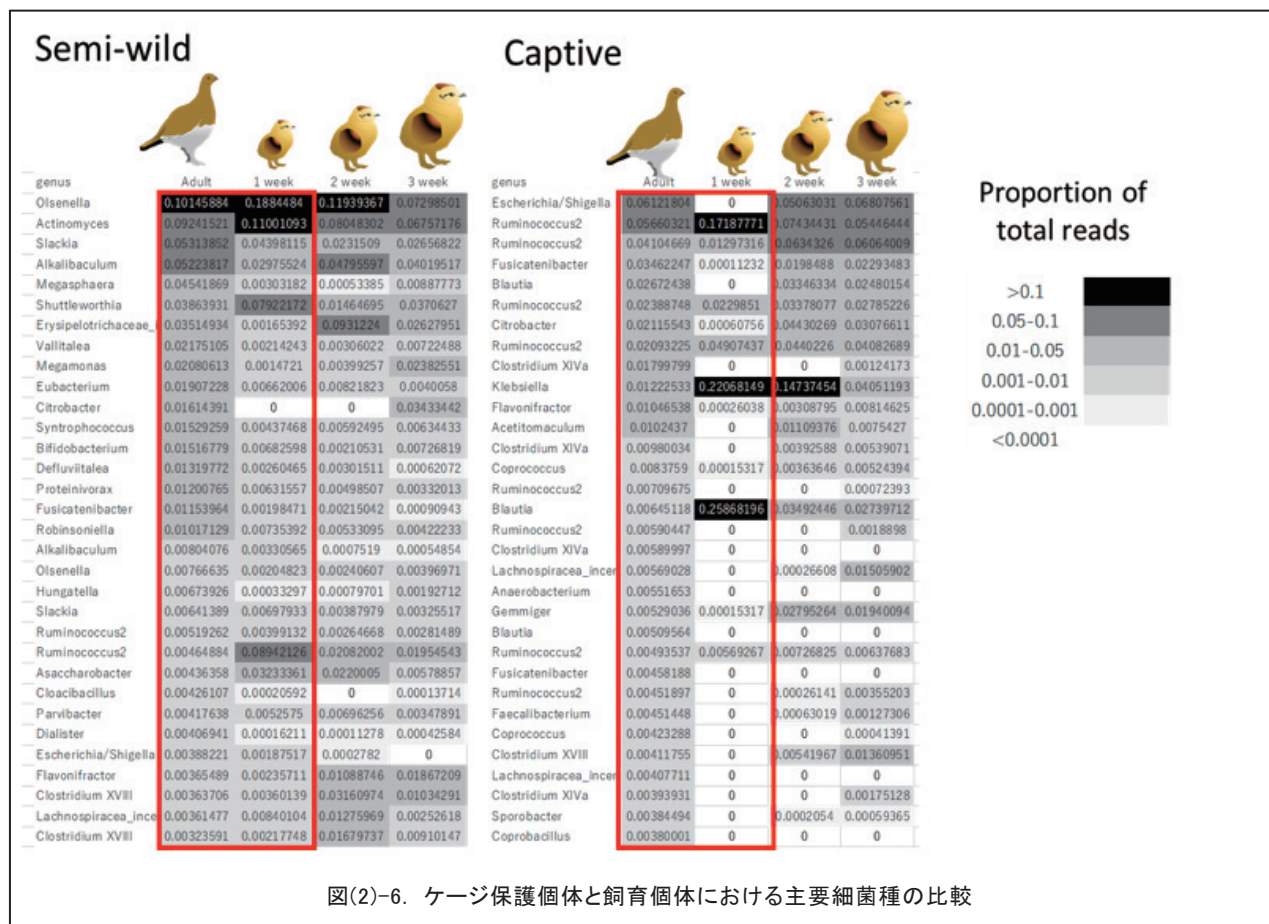


乳類で嫌気度の高い環境から分離されたものである。ニホンライチョウから分離されれば、恐らく新種であると思われる、最優占種であることからライチョウ固有の細菌種として重要であると思われる。

一方で飼育個体は親鳥の糞に対する食糞ができないため、前述のように1週齢でみられた細菌種は周辺環境から機会的に取り入られた細菌だと考えられる。共通する優占種としては、腸内菌科の*E. coli*や*Klebsiella*のほか、*Ruminococcus*と類縁の*Blautia*など哺乳類とくに人間で優占する傾向のある細菌OTUが検出された。この時期は、抗生物質オキシテトラサイクリンが連続して投与されているため、そのほとんどはオキシテトラサイクリンに耐性を

持つと考えられる。

飼育個体でも、1週齢で定着していた腸内細菌の中には、成鳥になるまで常に検出され続けるものがあったが、その割合は成長に伴い減少していったので、初生から幼雛期移行に際する餌の変更やケージから平飼いへの移動等の環境変化に応じて、定着する細菌が変化していった可能性が高い。とくに、成鳥で検出された主要な細菌OTUの多くは、1週齢の個体からは、ほとんど見つかっておらず、1週齢の段階で主要であった細菌OTUは雛の成長に伴い著しく減少していた。



図(2)-6. ケージ保護個体と飼育個体における主要細菌種の比較

4-4：ケージ保護雛と飼育雛の体重増加の比較

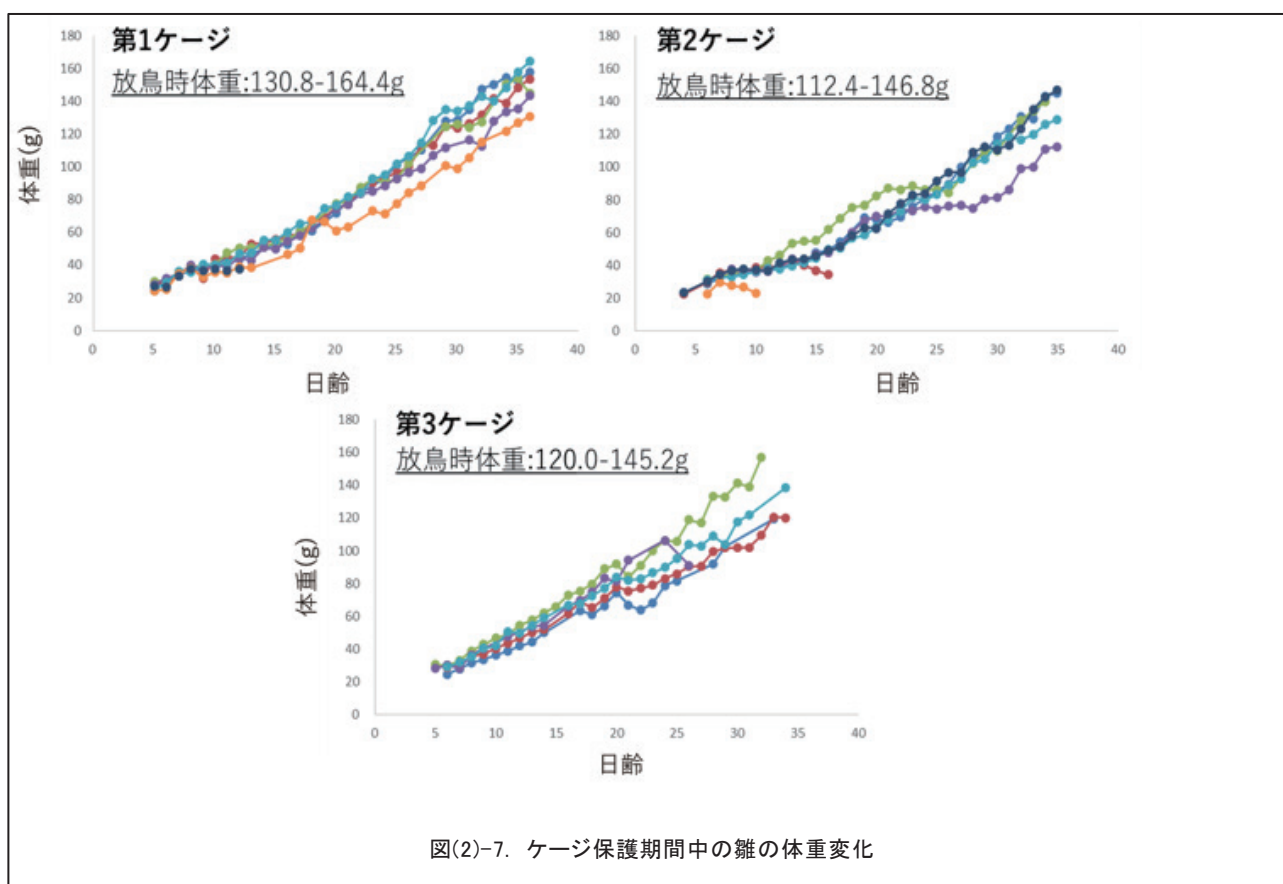
30年度には、29年度に予備的に行った雛の体重測定をさらに改良したうえで、ケージ内の雛を個体識別することにより、個体ごとに経日的体重変化を記録した。

同一家族内の雛で、孵化後1週間程度は、ほとんど同じ体重で推移していたものが、35日齢前後の放鳥時には、大きな個体と小さな個体の間に30 g以上の体重差があることが明らかになった（図(2)-7）。1週目以降の体重増加の少ない個体は、体格が小さいまま放鳥を迎えることとなった。

第2ケージでは保護期間前期に2羽の雛が衰弱死したが、記録を照合すると、どちらの雛も死亡数日前から体重減少が始まっていることが分かった。個体ごとの餌の摂取量については、記録が不可能であったため、こうした体重差が餌の摂取量の多少に基づいているかどうかは判断ができないが、死亡数日前から成長にともなう体重増加がないことは、寒冷環境における体温維持に不利であることは容易に想像できるうえ、親鳥と同じ速度で群れの移動についていくことも困難に思われた。そのため、おそらく飼料摂取量も少なかったのではないかと推測される。その結果、放鳥時までには体重を十分増加させることが難しかったと考えられるが、サブテーマ(1)で、ケージ保護期間中に死亡した雛からコクシジウム感染が検出されたことを考えると、低体重の背景としてコクシジウム感染を考慮すべきであると思われた。コクシジウム感染による元気消失と下痢によって体力を消耗し、飼料摂取が十分でなかった可能性が高

い。低体重で推移した個体に関してはコクシジウム感染抵抗性が弱かった可能性もある。

北岳でケージ保護した雛の35日齢前後の体重は最も軽い個体で112.4 g、最も重い個体で164.4 gだったが、28年度に動物園で孵化した雛の体重は35日齢で200から280gが記録されており、大きな違いがあることが分かった。ケージ保護個体は、ミルワームや冷凍コケモモなどの給餌などがおこなわれており、野生個体よりも良好な栄養状態にあると考えられ、野生個体の体重はこれらの個体よりもさらに軽い可能性もある。飼育下のニホンライチョウが、ケージ保護個体の1.5から2倍近い体重に成長してしまうことは、ライチョウの生理を考えると、大きな問題をはらんでいる。サブテーマ(3)の飼育実験でも過体重による脚障害に由来する事故が起こっていたが、同じリスクがニホンライチョウの飼育にも発生する可能性がある。サブテーマ(1)の野生ライチョウ腸内環境メタボローム解析結果からも明らかなように、飼育下個体では野生個体群と比べて明らかな栄養素の摂取過剰、とくにタンパク質の供給過剰が推測される結果であった。もともと栄養価の低い食物に適応したニホンライチョウは、栄養素の効率的利用、腸内細菌を介した窒素のスカベンジング機能などが働いていると想定されるが、飼育下では、運動量がはるかに少ないうえに、過剰量の飼料を摂取することによる体重増加は、過肥をまねくことも想定できる。一般に、過肥は、飼育下の鳥においても、内科的疾患として心血管系や肝機能の障害につながりやすく、外科的疾患として関節の障害につながる(<https://wagwalking.com/bird/condition/obesity>)。もともと、過肥になることで産卵率の低下がおこることは家禽の場合にはよく知られている。哺乳類でも過肥による繁殖成績の低下は一般的であるため、体重管理、ことに繁殖を考慮した場合の過肥予防は、飼育下においては重要であると思われる。



4-5: カメラトラップと捕食者対策

本サブテーマでトレイルカメラを乗鞍岳と南アルプス北岳周辺に設置した。設置した地点を、図(2)-8および図(2)-9に示す（注：この地図は、国土地理院発行の5万分1地形図を使用したものである）。



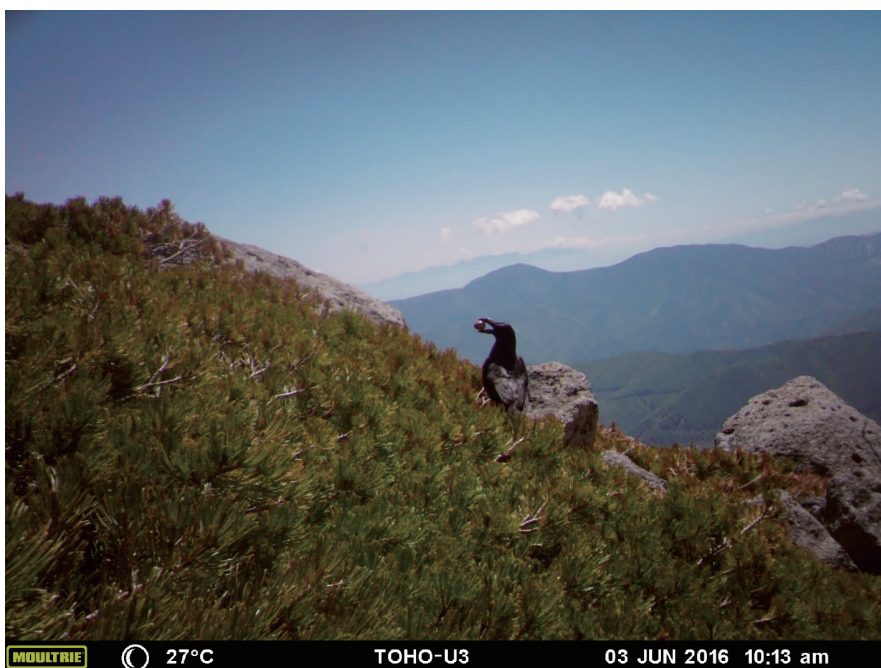
図(2)-8 乗鞍岳に設置したカメラトラップ (2016年6月から8月)



図(2)-9 北岳に設置したカメラトラップ(2016年6月から8月)

乗鞍岳と北岳で、合計5機のカメラをニホンライチョウの巣周辺に設置したが、そのうちの2つの巣は捕食され結果的に巣の放棄が起こった。残り3つの巣のうち1つの巣では、孵化当日に巣から離れる雛と母鳥を撮影することができた。このことから、カメラトラップは巣を連日にわたり直接確認しなくても孵化日を特定することができることが分かった。

卵が捕食された巣の1つでは、ハシブトガラスが卵を食べている姿を撮影することができた(図(2)-10)。これまでハシブトガラスによるニホンライチョウの卵の捕食は撮影されたことがなく、本研究により初めて確認することができた。風衝地やお花畑に設置したカメラトラップでは雛による母鳥盲腸糞の食糞行動は撮影できなかった。これらの結果から、カメラトラップは巣に設置することで孵化日を特定するのに有用であるが、フィールドに設置し、雛の行動を捉えることはかなり困難であることが明らかになった。日齢の正確な把握が重要である本研究テーマにおいて、カメラトラップは有用なツールとして利用できることが確認できた。



図(2)-10 カメラトラップで確認されたニホンライチョウの卵を食べるハシブトガラス(2016.06.13)

5. 本研究により得られた成果

(1) 科学的意義

今回の研究で、最大の成果は、野生ニホンライチョウが食糞行動をおこなうことを明らかにしたことである。とくに、食糞は雛しか行わず、さらに孵化してから3日目から18日目までの、非常に限られた時期でのみ起こることを明らかにしたことである。

これまで雛や成鳥、および自身の糞か他個体の糞かにかかわらずライチョウ類が食糞をするという記録は残っていない(Vispo and Karasov, 1997)¹⁴⁾。また、本課題のアドバイザーである中村浩志氏も20年近く野生ニホンライチョウ研究を行ってきたが、冒頭に記載のように乗鞍岳ケージ保護期間中に偶然、食糞を観察したのが初めての経験であった。本研究では、ケージ保護期間の孵化後1か月という限られた時期しか雛の行動を観察していないが、これらの先行研究および観察結果は、雛による食糞が非常に限られた時期でのみ起こることを支持している。

母鳥の盲腸糞を食糞することができたケージ保護雛と、人工孵化し母鳥から切り離されている飼育雛の腸内細菌叢の発達過程を比較すると、ケージ保護雛は、腸内細菌叢が1週齢の段階で、①すでに親鳥とほぼ同じ細菌OTU数を持つことから②親鳥とほぼ同じ腸内細菌叢の α 多様度を示し、③成鳥の腸内細菌叢の主要菌種の多くをすでに持っていたことが特筆すべき点である。

飼育個体では孵化後1週間にわたり抗生物質が経口投与されていた。そのため、1週齢の飼育雛では、検出された細菌の検出OTU数が少なく、抗生物質の投与が終了してから徐々に検出される細菌OTU数が成長に伴い増加した。飼育個体で検出される腸内細菌種が、雛の成長に伴い大きく変化することは、食糞が観察されていない晩成性鳥類の雛や、親鳥から隔離されて育った早成性鳥類と類似したパターンを示した(van-Dangen et al. 2013, Videnska et al. 2018)^{15), 16)}。

ケージ保護された野生ニホンライチョウ雛の腸内細菌叢の発達過程は、上述の飼育ニホンライチョウを含む食糞がなされない鳥類とくらべると非常に特徴的であった。特に、*Olsenella*, *Alkalibaculum*, *Slackia*などの1週齢の雛から成鳥に至るまで常に高い割合を占めていた腸内細菌種の多くは、北岳以外に生息する野生ニホンライチョウでも主要な腸内細菌種であった(Ueda et al. 2018)¹⁷⁾。絶対嫌気性菌であるこれらの細菌(Pale, 2014)¹⁸⁾は、野生ニホンライチョウに特異的な腸内細菌であると考えられた。

食糞が腸内細菌叢伝播において重要な役割を果たしていることは、ニホンライチョウと同様の後腸発酵性の草食哺乳類でよく知られている (Osawa et al. 1993, Troyer 1984)^{19), 20)}。しかし、親から給餌を受けない草食の早成性鳥類では、孵化時にはほぼ無菌状態である雛が、なぜ自力採餌を孵化後から行えるのか大きな謎であった。今回、ニホンライチョウに代表される草食の早成性鳥類において初めて食糞が観察され、この行動が母鳥から雛へ腸内細菌を垂直伝播させ、草食を可能にする腸内菌叢を早期に確立することに関与していることが強く示唆されたことから、その謎は解明できたと考える。今回の発見で、有毒植物を食物とする哺乳類ばかりか鳥類にいたる幅広い草食動物において、腸内細菌叢垂直伝播の機構としての食糞行動が、収斂進化の一例として定義できることがわかった。今回の野生個体と飼育個体の比較は、与えられている餌の違いや抗生物質および合成抗菌剤の使用の有無などの条件の相違があるため、食糞行動が雛の腸内細菌叢獲得にどれほど寄与しているかを厳密に示したものではないが、食糞が、草食の早成鳥類中でどれほど一般的にみられるかどうかという問題は、食性の特殊化とその過程における宿主と腸内細菌叢の共進化のメカニズムを解く重要なカギとなるかもしれない。今後、ニホンライチョウの飼育実践の中でも食糞行動の許容が雛の健全な発育に必要なことになることも考えられる。

(2) 環境政策への貢献

<行政が既に活用した成果>

環境省平成28年度ライチョウ保護増殖検討会において、域内保全事業と域外保線事業をつなぐ要件として発表し、今後の保護事業の進展に貢献した。とくにカラスによる野生ニホンライチョウ卵の捕食を示す画像を資料として提供し、捕食者対策の重要性を喚起し、捕食者対策が進むこととなった。

また、ニホンライチョウの域外保全を担当する日本動物園水族館協会生物多様性委員会ライチョウ域外保全プロジェクトチームに対しては、野生ニホンライチョウの生態データや体重等の情報提供を随時行うとともに、飼育実験のデータをプロジェクトチーム内で公開し、飼育技術の確立に貢献した。

<行政が活用することが見込まれる成果>

このサブテーマでは、サブテーマ(1)で単離された野生ニホンライチョウ由来有用菌の投与時期と期間の特定が大きな目標であった。これは、サブテーマ(1)で単離した有用菌をサブテーマ(3)で飼育個体に投与する際に重要である。この時期の食糞が雛の腸内細菌叢獲得に関与している可能性が高いことが分かったため、域外保全個体においてもケージ保護個体と同じ時期に有用菌を投与することが最も効率的であると考えられ、今後の野生復帰個体群作出の際に重要な技術的観点となる。

さらに、食糞による腸内細菌叢伝播メカニズムは、野生個体の盲腸糞を飼育個体へ移植するという新たな腸内細菌叢確立手段への道を示した。

また、ケージ保護個体の体重と飼育個体の体重差も今後の域外保全において重要な意味を持つ。今回の調査で、飼育個体はケージ保護個体よりもかなり早いスピードで成長していることが明らかになった。飼育下での過成長は、脚障害等の原因となるため、ケージ保護個体の体重変化は、今後の域外保全事業の中で設定される飼育個体の体重数値目標として重要な指標となる。

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) A. KOBAYASHI, S. TSUCHIDA, A. UEDA, T. YAMADA, K. MURATA, H. NAKAMURA and K. USHIDA: J. Vet.

Med. Sci., 81, 9. <https://doi.org/10.1292/jvms.19-0014>. (2019), Role of coprophagy in the cecal microbiome development of an herbivorous bird Japanese rock ptarmigan.

<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) 牛田一成：平成28年度第1回日本動物園水族館協会生物多様性委員会ライチョウ域外保全研究会（2016）
「環境省環境研究総合推進費研究中間報告」
- 2) A. KOBAYASHI, S. TSUCHIDA, A. UEDA, T. YAMADA, K. USHIDA and H. NAKAMURA. 14th International Grouse Symposium Utah State University (2018)
「The Significance of Coprophagy in Chicks of Japanese Rock Ptarmigan」
- 3) 小林 篤、土田 さやか、上田敦史、山田拓司、長谷川 雅美、村田 浩一、中村 浩志、牛田 一成：第65回日本生態学会大会（2018）
「ライチョウの雛はなぜ母親の盲腸糞を食べるのかーその適応的意義と保全への応用ー」
- 4) 小林 篤、土田 さやか、上田敦史、山田拓司、長谷川 雅美、村田 浩一、中村 浩志、牛田 一成：日本鳥類学会2018年度大会（2018）
「ライチョウの雛は母親のうんちを食べて腸内細菌を手に入れる」

（３）出願特許

特に記載すべき事項はない。

（４）「国民との科学・技術対話」の実施

- 1) 第17回ライチョウ会議長野大会「野生ニホンライチョウおよび飼育下スバルバルライチョウの腸内菌の特徴」（主催：実行委員会、長野県、大町市 2016年10月16日、サン・アルプス大町大会議室、参加者約200人）にて牛田一成が成果紹介
- 2) 第17回ライチョウ会議長野大会「南アルプス北岳におけるケージ保護2年目の試み」（主催：実行委員会、長野県、大町市 2016年10月16日、サン・アルプス大町大会議室、参加者約200人）にて小林篤が成果紹介
- 3) 第17回ライチョウ会議長野大会「ライチョウってどんな鳥？ 現状と課題」（主催：実行委員会、長野県、大町市 2016年10月16日、サン・アルプス大町大会議室、参加者約200人）にて小林篤が成果紹介
- 4) 太陽化学メールマガジン
(http://www.taiyokagaku.com/tomorrow_solution/backnumber/20171203.html) 「腸内細菌研究のもう一つのフロンティア 「野生動物の腸内細菌」」(2017)で、牛田一成 土田さやかが成果紹介
- 5) 第47回鳥のサイエンスカフェ「ライチョウの雛が雌親のうんちを食べた!!-その目的を探る-」（主催：Nature café & dining bar Hidamari 2018年4月15日、東京都八王子市Hidamari、参加者約30人）にて小林篤が成果紹介
- 6) 第114回サイエンスカフェ in 名古屋「動物の「うんち」の研究から、わかること-野生動物の生存を助ける腸内細菌の世界-」（主催：日本農芸化学会中部支部 2018年6月24日、名古屋市科学館、観客約40人）にて牛田一成が成果紹介
- 7) 日本哺乳類学会2018年度大会一般公開シンポジウム「動物園動物の比較栄養学と比較細菌学」（主催：日本哺乳類学会 2018年9月10日、信州大学伊那キャンパス、参加者約200人）にて牛田一成が成果紹介

- 8) 第18回ライチョウ会議新潟妙高大会「野生ニホンライチョウを特徴付ける腸内細菌とその性質を生かした飼料開発」(主催：実行委員会、新潟県、妙高市 2018年10月20日、ふれあい会館、参加者約300人)にて牛田一成が成果紹介
- 9) 第18回ライチョウ会議新潟妙高大会「飼育と野生ライチョウの腸内細菌叢確立過程の比較」(主催：実行委員会、新潟県、妙高市 2018年10月20日、ふれあい会館、参加者約300人)にて小林篤が成果紹介
- 10) ライチョウ基金シンポジウム2019「ライチョウの未来と動物園の役割」(主催：富山市ファミリーパーク 2019年2月3日、富山県総合福祉会館サンシップとやま・福祉ホール、観客約200人)にて牛田一成が講演

(5) マスコミ等への公表・報道等

- 1) 山と溪谷 (2016年12月号、話題、「雷鳥保護の厳しい現実が報告される」)
- 2) 岳人 (2017年3月号、「ライチョウの“うんち”の中にある不思議」)
- 3) 信濃毎日新聞 (2017年12月8日 社会面、34面、「母の贈り物で生き抜く」)
- 4) 岳人 (2018年6月号、「腸内から見えてくる新たな「リアル」」)
- 5) 日本経済新聞 (2018年12月13日、電子版、「ライチョウ繁殖のカギは「腸内」、相次ぐ死防げるか」)
- 6) 山と溪谷Webマガジン (2019年1月31日、電子版、「ライチョウの雛は母親の糞を食べる!? 雷鳥保護を前進させる大きな発見」)

(6) その他

特に記載すべき事項はない。

8. 引用文献

- 1) K. USHIDA, T. SEGAWA, S. TSUCHIDA and K. MURATA: J. Vet. Med. Sci, 78, 2, 251-257 (2015), Cecal bacterial communities in wild Japanese rock ptarmigans and captive Svalbard rock ptarmigans.
- 2) S. TSUCHIDA, Y. OHARA, K. KURAMOCHI, K. MURATA and K. USHIDA: Jpn. J. Zoo Wildlife Med, 22, 3, 41-45 (2017a), Effective degradation of phenolic glycoside rhododendrin and its aglycone rhododendrol by cecal feces of wild Japanese rock ptarmigans.
- 3) S. TSUCHIDA, K. MURATA, M. OHKUMA and K. USHIDA: J. Gen. Appl. Microbiol, 63, 3, 195-198 (2017b), Isolation of *Streptococcus gallolyticus* with very high degradability of condensed tannins from feces of the wild Japanese rock ptarmigans on Mt. Tateyama.
- 4) J. Ding, R. Dai, L. Yang, C. He, K. Xu, S. Liu, W. Zhao, L. Xiao, L. Luo, Y. Zhang and H Meng: Front. Microbiol, 8, 1967 (2017), Inheritance and establishment of gut microbiota in chickens.
- 5) K. Grond, R. B. Lanctot, A. Jumpponen and B. K. Sandercock: FEMS Microbiol. Ecol, 93, fix142 (2017), Recruitment and establishment of the gut microbiome in arctic shorebirds.
- 6) L. A. Iлина, E. A. Yildirim, I. N. Nikonov, V. A. Filippova, G. Y. Laptev, N. I. Novikova, A. Grozina, T. N. Lenkova, V. A. Manukyan, I. A. Egorov and V. I. Fisinin: Dokl. Biochem. Biophys, 466, 47-51 (2016), Metagenomic bacterial community profiles of chicken embryo gastrointestinal tract by using T-RFLP analysis.
- 7) 信濃毎日新聞社, 長野大町山岳博物館編 (1992) ライチョウ生活と飼育への挑戦.
- 8) J. B. Theberge and G. C. West: Arctic, 26, 138-148 (1973), Significance of brooding to the energy demands of Alaskan Rock Ptarmigan chicks.
- 9) R. INOUE and K. USHIDA: FEMS Microbiol. Ecol, 45, 2, 147-153 (2003), Development of the intestinal microbiota in rats and its possible interactions with the evolution of the luminal IgA in the intestine.

- 10) K. USHIDA, C. KAMEUE, T. TSUKAHARA, K. FUKUTA, N. NAKANISHI: J. Vet. Med. Sci, 70, 8, 849-852 (2008), Decreasing traits of fecal immunoglobulin A in neonatal and weaning Piglets.
- 11) R. INOUE, T. TSUKAHARA, N. NAKANISHI and K. USHIDA: J. Gen. Appl. Microbiol, 51, 4, 257-265 (2005). Development of the intestinal microbiota in the piglet.
- 12) R. INOUE, M. OTSUKA and K. USHIDA: Experimental Animals, 54, 5, 437-445 (2005), Development of intestinal microbiota in mice and its possible interaction with the evolution of luminal IgA in the intestine.
- 13) R. INOUE and K. USHIDA: FEMS Microbiol. Ecol, 46, 2, 213-219 (2003), The vertical and horizontal transmissions of the intestinal commensal bacteria in the rat model.
- 14) C. Vispo and W. H. Karasov: Gastrointestinal microbiology (Mackie, R. I., and White, B. A. eds). Springer, Boston, pp. 116-155 (1997), The interaction of avian gut microbes and their host: an elusive symbiosis.
- 15) W. F. van Dongen, J. White, H. B. Brandl, Y. Moodley, T. Merklings, S. Leclaire, P. Blanchard, E. Danchin, S. A. Hatch and R. H. Wagner: BMC Ecol, 13, 11 (2013), Age-related differences in the cloacal microbiota of a wild bird species.
- 16) P. Videnska, M. M. Pahman, M. Faldynova, V. Babak, M. E. Matulova, E. Prukner-Radovicic, I. Krizek, S. Smole-Mozina, J. Kovac, A. Szmolka, B. Nagy, K. Sedlar, D. Cejkova and B. Nagy: PLoS One, 9, e110076 (2014), Characterization of egg laying hen and broiler fecal microbiota in poultry farms in Croatia, Czech Republic, Hungary and Slovenia.
- 17) A. UEDA, A. KOBAYASHI, S. TSUCHIDA, T. YAMADA, K. MURATA, H. NAKAMURA and K. USHIDA: Microorganisms, 6, 3, 77. <https://doi.org/10.3390/microorganisms6030077>. (2018), Cecal Microbiome analyses on wild Japanese rock ptarmigans (*Lagopus muta japonica*) reveals high level of coexistence of lactic acid bacteria and lactate-utilizing bacteria.
- 18) A. C. Pale: LPSN-list of prokaryotic names with standing in nomenclature, (2014), Available online at <http://www.bacterio.net/index> (Accessed March 15, 2019).
- 19) R. Osawa, W. H. Blanshard and P. G. Ocallaghan: Aust. J. Zool, 41, 611-620 (1993), Microbiological studies of the intestinal microflora of the koala, *Phascolarctos cinereus*. 2. Pap, a special maternal feces consumed by juvenile koalas.
- 20) K. Troyer: Behav. Ecol. Sociobiol, 14, 189-193 (1984), Behavioral acquisition of the hindgut fermentation system by hatchling Iguana iguana.

Ⅱ－３ 飼育ライチョウの腸内細菌叢再構築に関する研究

日本大学生物資源科学部

村田 浩一

<研究協力者>

横浜市繁殖センター

白石 利夫 市野瀬 碧 石井 裕之

那須どうぶつ王国

佐藤 哲也 原藤 芽衣

大町山岳博物館

宮野 典夫

上野動物園

高橋 幸裕 小池 奈央子

平成28～30年度累計予算額：4,114千円

(うち平成28年度：1,561千円 平成29年度：1,309千円 平成30年度 1,244千円)

累計予算額は、間接経費を含む。

〔要旨〕

環境省の委託を受けた日本動物園水族館協会加盟の動物園博物館におけるライチョウ人工飼育については、平成19年より同種別亜種であるスバルバルライチョウ (*Lagopus muta hyperborea*) をノルウェーから導入し、ノルウェー王国トロムソ大学のスバルバルライチョウ飼育マニュアルに従って飼育経験を積んできた。この飼育方式では、孵化後1週間は抗生物質（オキシテトラサイクリン）を経口的に連続投与するとともに、市販ウサギ用ペレットを主体とする飼料で飼育することが基本となっているが、スバルバルライチョウのように十分に飼育馴致されていない飼育第一世代ニホンライチョウ (*Lagopus muta japonica*) の飼育には、いくつもの問題点が浮上した。まず、野外にケージが設置されているトロムソ大学に比べてはるかに感染症対策を厳密にしたSPF(特定された感染性微生物や寄生虫が存在しない(Specific Pathogen Free))環境におき、かつ抗生物質および合成抗菌剤を孵化後から連続経口投与しても、人工飼育下での日和見感染菌浸潤を防ぐことが出来ていない。とりわけ、下痢の起因菌となっている病原性大腸菌やウェルシュ菌に加えて、一部の連鎖球菌、緑膿菌は、飼育ライチョウの体調が悪化した際に、爆発的に増殖し死に至らしめることがある。動物園の環境は、想像以上に薬剤耐性菌が浸潤しており、とりわけ多剤耐性化した緑膿菌なども斃死したニホンライチョウ雛から検出されている(サブテーマ(1)参照)。SPF環境の整備は、ほとんどの動物園にとって難しく、ニホンライチョウの飼育園館の増加を阻害する最大の要因となっているほか、抗生物質および合成抗菌剤の連続処方によって選抜される薬剤耐性菌に対する対応も難しい。

そこで、本研究では、まず通常環境で無薬あるいは減投薬で飼育を可能にする方法として家畜や家禽の飼育で成果を上げているプロバイオティクスの利用を試みた。飼育ニホンライチョウには、将来の野生復帰準備個体群の創出という目標もあるため、サブテーマ(1)(2)の結果を受けて、野生型腸内細菌叢を同時に確立する方法として利用するために、市販プロバイオ製品ではなく野生ニホンライチョウから分離した腸内細菌からプロバイオティクス細菌を製剤化した。菌株選抜には主に日和見感染菌に対する抗菌性を指標にした。さらに動物園での処方が簡便となるように散剤として製造した。製剤化した。野生ニホンライチョウ由来の *Lactobacillus apodemi*, *Streptococcus gallolyticus* および *Escherichia fergusonii* のそれぞれ1菌株ずつを選抜し、生菌製剤化した。28年度と29年度は、飼料への介入をしなかったが、野生ニホンライチョウ由来プロバイオティクスを飼育スバルバルライチョウに処方することで、抗生物質および合成抗菌剤を使わなくても通常環境で、有意に感染抵抗性を向上させることに成功した。30年度は、生菌剤に用いた菌株がタンニン分解性に優れていたもので、それ自身が抗菌性を期待できるタンニンを飼料に添加して、いわゆるシンバイオティクス(プロバイオティクス+プロバイオティクス定着を促進させるプレバイオティクス)として、飼育実験を行い、感染症による死亡をゼロにするとともに、人工飼育で問題となる過体重の制御にも成功した。

また本サブテーマでは、飼育スバルバルライチョウを用いて、食物の消化管内滞留時間を測定するとともに、免疫グロブリン濃度の測定を行い、成長に伴う粘膜免疫の発達を推定した。その結果、雛の

腸管内(糞便中)IgA濃度は、7日齢で低値を示し、14日齢以降ではほぼ5倍程度まで上昇し、以降はほぼ一定の値を取った。ニワトリ雛の腹腔には孵化後3から4日まで卵黄が残留するが、飼育ニホンライチョウやスバルバルライチョウ雛でも死亡個体の解剖所見から、顕著な残留卵黄がこの時期まで認められることが多い。残留卵黄が消失する時期は、母親由来の免疫物質が枯渇する時期に当たり、腸管内IgAが最も低下する時期になる。従って、この時期に死亡事故が多く認められるのは、当然のことと判断される。この時期をくぐりぬけるために速やかに自身の免疫系を発達させることが、感染機会が高山よりも高いと考えられる人工飼育環境では特に重要と思われる。

ライチョウの下部消化管の固液分離の構造は、明らかにされていないが、ほとんど全ての液状部マーカーが盲腸糞から排出されたことから、結腸で内容物の固液分離が起こり、液相が固相部分から分離されて盲腸に逆送される方法を探っていることが明らかとなった。この機構は、ウサギに顕著であるが、コアラやポッサムに見られるもので、コアラやポッサムとニホンライチョウの腸内細菌の類似性ととも、ライチョウ類の消化戦略がコアラなどと類似していることを改めて示すものである。固形部マーカーの滞留時間が2時間から長い場合でも4時間であることは、不消化物を早急に排出していることを示しており、いわゆる腸糞と呼ばれる糞の排出が、夏季のニホンライチョウでは15分から30分に一回観察されることとよく一致する。一方、液状部マーカーは、8時間から12時間の平均滞留時間を示した。10月の15-S03に関しては、サンプリング点数の不足が最も顕著に影響した結果であると推測された。8時間から12時間という液状部マーカーの平均滞留時間は、盲腸糞が一日あたりで2回から3回排泄されるという野外の観察結果とよく一致する。これと併せて、飼育ライチョウでしばしば問題となる「盲腸糞の崩れ」とそれを予兆とした体長の悪化や死亡事故について、雛と成ライチョウでは機構が異なることを示した。これによって、対策の導入も進むことが期待される。

[キーワード]

ニホンライチョウ、スバルバルライチョウ、飼育実験、無薬飼育法

1. はじめに



図(3)-1. 人工飼育中のライチョウ
左, 雛ケージでの試料採取 右, 人工孵化個体

特別天然記念物であるニホンライチョウは、生息数が減少していることから絶滅が危惧されており、環境省の主導の下、生育域内の保護徹底に加えて、域外での増殖と野生復帰を目指す取り組みがなされている。域内と域外の保護活動の連携によって、野外での採卵と動物園における人工孵化から構成されるファウンダー確保事業が進められているが、採卵と人工孵化を除いて解決すべき課題が多い。環境省の委託を受けた日本動物園水族館協会加盟の動物園博物館におけるライチョウ人工飼育については、平成19年より同種別亜種であるスバルバルライチョウをノルウェーから導入し、ノルウェー王国トロムソ大学のスバルバルライチョウ飼育マニュアルに従って飼育経験を積んできた。この飼育方式では、孵化後1週間は抗生物質(オキシテトラサイクリン)を経口的に連続投与するとともに、市販ウサギ用ペレットを主体とする飼料で飼育することが基本とされている。27年度よりニホンライチョウを対象として開始された生息域外保全では、感染症予防のため、抗生物質および合成抗菌剤の処方に加えて、飼育施設をSPFと同等に管理する飼育方法が採用されたが(図(3)-1)、孵化後2ヶ月齢で導入した野生由来受精卵から孵化した雛の半数以上が死亡するなど、一定の飼育成果は出ているものの若齢の個体の管理を改善する必要がある。

また、成鳥の繁殖も進められ、これについても一定の繁殖成果が得られているが、有精卵率が低いこと、人工孵化した雛の生存率が著しく低く、成鳥となっても突然死するケースが続出している。

また餌資源は毒性アルカロイド等を含み高タンニン含量の高山植物を主食としている野外個体群と大きく乖離しており、このような飼料に馴致された飼育個体を用いて野生復帰を実施しても野外で生き残れないことは確実である。このように生息地の高山植生環境に配慮した野生復帰方法は、現状の飼育繁殖方式からは開発されず、野生復帰個体群を準備するという目標の達成には、解決すべき課題が多い。

2. 研究開発目的

上記の問題の多くは、野外個体群が本来的に持つ腸内細菌叢の未獲得に起因していると考えられる。孵化後に抗生物質および合成抗菌剤を連続投与することと、SPF水準の管理を続けることは、腸内細菌叢の自然な発達を阻害することで、かえって腸管免疫をはじめとする自身の感染防御機構の未発達を誘導してしまい、これが日和見感染菌によると思われる突然死をまねいている。さらに、毒性アルカロイド等を含む高山植物を解毒、消化するために必須の腸内細菌をもたない個体は、野生復帰させることが困難である。現状の飼育方法では、これらの課題を解決することはできないため、抗生物質や合成抗菌剤を使用しない飼育技術と、野生生活に必要な腸内細菌を生息域外保全個体群に投与定着させる方法の開発と導入が必須となる。とくに抗生物質および合成抗菌剤の連続投与は、孵化後の感染症を予防するためには必要な手法であるが、そのために腸内細菌の腸管への定着が阻害されるので、雛自身の免疫を発達させることで、抗生物質および合成抗菌剤を不要とする飼育方式の開発が必要である。サブテーマ(3)では、まず、サブテーマ(1)で探索開発したプロバイオティクスを導入し、抗生物質および合成抗菌剤の処方を行わない飼育方法の確立を行うことを目的とした。

さらに、サブテーマ(1)のメタボローム解析とサブテーマ(2)の体重比較でも明らかとなったように、現行の飼育飼料は、過剰なエネルギーとタンパク質が供給されており、結果として過体重を誘導し脚障害などを誘発していると考えられた。そのため、サブテーマ(3)では、飼料の改善も同時に試みた。

3. 研究開発方法

3-1：野生ライチョウ由来腸内細菌の投与試験（プロバイオティクス給与試験）

28年と29年は、横浜市繁殖センターおよび那須どうぶつ王国で飼育中のスバルバルライチョウの受精卵を孵卵器で人工孵化させた雛に対して、次に示すプロトコールで飼育を行った。

飼育試験に用いる雛を産生する親鳥として、那須では♂1羽♀3羽、横浜では♂2羽♀2羽を供した。給与するウサギ用ペレットは、抗生物質および合成抗菌剤や乳酸菌などの添加がないRM-4（フナバシファーム）を用いた。添加飼料は有精卵を産生する雌親および雄親に、産卵1カ月前(4月下旬)から給与し、ペレット以外には、1日1羽あたり刻んだ小松菜およそ50gとリンゴンベリー2〜3粒、添加剤としてビタミン剤（ネクトンS）、ボレー粉を与えた。給餌回数については各園の慣行に従う。給餌量は、鳥の体調を見ながら適宜増減するが、ペレットについては混合比率を一定にするため、出来るだけ食べ残さない程度とした。那須、横浜ともに、菌投与群最低3卵、抗生物質投与群最低3卵を孵卵器で人工孵化させた。孵卵条件は、2園の慣行法に従った。

表(3)-1 実験用飼料と処方量(H28年度)						
日齢	基本飼料(1日3回給与)				添加物	
	SDL NO.1	RM-4	青菜	ミルワーム	OTC群	菌投与群
孵化日	0			乾燥餌なし	OTC	乾燥菌体粉末
1						
2						
3						
4	7g/羽	3g/羽	10g/羽	1匹/羽	25-50mg/羽/日	1回分の青菜に1包(府立大で用意)をまぶして給与
5						
6						
7						
8						
9						
10						
11	10g/羽	5g/羽	30g/羽	0		
12						
13						
14						
15						
16						
17						
18					なし	なし
19						
20						
21	<飽食>			0		
22	*SDL NO.1とRM-4を2:1の割合で					
23						
24						
25						
26						
27						
28						

餌の不足が生じたと判断された場合は、比率（SDL:RM:青菜:ワーム）を維持したまま給餌量を増やすことで対応した。

OTC投与群は、孵化後7日齢までオキシテトラサイクリン（オキテラ水溶散25から50mg/羽/日）含有飲水を自由摂取させ、7日齢以降は通常飲水に切り替えて投与を終了した。菌投与群は、孵化後1日～7日まで餌（小松菜）に乾燥菌体（乳酸菌*Lactobacillus apodemi* 556-8株・ 10^8 個、非病原性大腸菌*Escherichia fergusonii* S-6-10株・ 10^6 個）をまぶして与えた。毎日、餌の交換時に体重を測定し、下痢、元気等目視により雛の状態を判定した。

表(3)-2 実験用飼料と処方量(H29年度実施)						
日齢	基礎飼料(1日3回給与)				添加物	
	SDL or ZPC	RM-4	青菜	ミルワーム	OTC群	菌投与群
孵化日	0			乾燥餌なし	OTC	乾燥菌体粉末
1						
2						
3						
4	7g/羽	3g/羽	10g/羽	1匹/羽	25-50mg/羽/日	朝1回分の青菜に1包(府立大で用意)をまぶして給与(1包/1日)
5						
6						
7						
8						
9						
10						
11	10g/羽	5g/羽	30g/羽	0	なし	
12						
13						
14						
15						
16						
17						
18						
19						
20						
21	<飽食>			0	なし	なし
22	*SDL or ZPCとRM-4を2:1の割合で					
23						
24						
25						
26						
27						
28						

相対的な濃度の推移を把握することとした。

29年度は、横浜市繁殖センターおよび那須どうぶつ王国で飼育中のスパーバルライチョウの受精卵を孵卵器で人工孵化させた雛に対して、次に示すプロトコルで飼育を行った。28年度と同じ親鳥から受精卵を得た。

孵化した雛からOTC投与群および菌投与群の2群に各群3羽ずつを配置した。試験中は、雛の体調が悪くなった場合でもできる限り抗生物質および合成抗菌剤やビタミン剤の投与、治療行為は行わないようにしたが、処方が必要になった場合は、試験から離脱させた。試験中の飼料及び添加物は表(3)-2に示す。

孵化した雛は、およそ1日間、孵卵器へ入れたままにして羽毛を乾かし、その後、那須ではプラスチック製の衣装ケースにヒーターを設置して個別飼育を行い、横浜では市販のヒヨコ用育雛箱で実験群ごとの群れ飼育を行った。慣行法である抗生物質（オキシテトラサイクリン（OTC））飲水投与群および、サブテーマ（1）から凍結乾燥菌末として供給された野生ニホンライチョウ由来細菌を投与する菌投与群の2群を設定し、各群3から4羽ずつを配置した。試験中は、雛の体調が悪くなった場合でもできる限り抗生物質および合成抗菌剤やビタミン剤の投与、治療行為は行わないようにしたが、処方が必要になった場合は、試験から離脱させた。雛に与えた基本飼料と添加物は表(3)-1のようである。SDL No.1（抗生剤・乳酸菌・防腐剤無添加幼雛用試験飼料。フィードワン株式会社）、ウサギペレットRM-4、小松菜、ミルワームとし、基本飼料は1日3回給与した。個体差によって、

孵化0日から7日ごとに糞便（できる限り盲腸糞）を採取し、DNA保存液中で解析まで室温保存した。同日の直腸糞をチャック付きビニール袋に採取し、IgA濃度測定に供するまで、凍結保存した。さらに、孵化後7日、21日の糞便の一部をTSA血液加寒天培地、DHL寒天培地、MRS寒天培地に塗抹し、サブテーマ（1）担当へ冷蔵で輸送した。受け取った培地を41℃で培養し、発生したコロニーを分離同定し、投与したプロバイオティクス菌株が実際に飼育個体の糞便から生きて回収できるかを確認した。試験期間中に回収した糞に含まれる分泌型免疫グロブリン（sIgA）の測定は、Bethyl社のニワトリIgA測定キットのプロトコルに従って定量した。ニワトリIgA用の抗体は、ライチョウのIgAと交差反応を示すが、感度が500分の1以下であったので、正確なIgA濃度の測定は困難で、

雛に与える基本飼料は、那須どうぶつ王国では、昨年と同様の飼料内容で飼育を行った。横浜市繁殖センターでは、28年度に雛の脚障害が多発したので、SDS No. 1の粒度に理由があるのではないかと考え、ほぼ同様の栄養成分組成であるキジ用ペレットZPC(オリエンタル)を砕いてより洗い形状の餌として与えた。OTC投与群の抗生物質投与量及び投与日数は28年度と同様とした。菌投与群(野生ニホンライチョウ由来乾燥菌体投与)は、28年度のサブテーマ (2) で得られた野生ニホンライチョウ雛の母鳥の盲腸糞ついでに観察結果を参照し、孵化後 1日～14日まで餌(小松菜)に乾燥菌体(乳酸菌*Lactobacillus apodemi* 556-8株・ 10^8 個)をまぶして与えた。29年度は、単菌の効果を判定するために野生ニホンライチョウ由来乳酸菌*Lactobacillus apodemi*のみの給与とした。毎日、餌の交換時に体重を測定し、下痢、元気等目視により雛の状態を判定した。孵化0日から7日ごとに糞便(できる限り盲腸糞)を採取し、DNA保存液中で解析まで室温保存した。孵化後7日、21日の糞便の一部をTSA血液加寒天培地、DHL寒天培地、MRS寒天培地に塗抹し、サブテーマ (1) 担当へ冷蔵で輸送した。受け取った培地を41℃で培養し、発生したコロニーを分離同定し、投与したプロバイオティクス菌種が実際に飼育個体の糞便から生きて回収できるかを確認した。

3-2：野生ライチョウ由来腸内細菌の投与試験（シンバイオティクス給与試験）

表(3)-3 実験用飼料と処方量(H30年度実施)						
基礎飼料(1日3回給与)				添加物		
日齢	SDL or SDL+ZPC (1/4量柿 の葉添加)	RM-4	青菜	ミルワーム	OTC群	菌投与群
孵化日	0					乾燥菌体粉末
1W	7g/羽	3g/羽	10g/羽	1匹/羽	25-50mg/羽/日	
2W	10g/羽	5g/羽	30g/羽	0	なし	朝1回分の青 菜に1包(中 部大で用 意)をまぶ して給与 (1包/1 日)
3W	<飼食> *SDL or SDL+ZPC (1/4量柿の葉添 加)とRM-4を 2:1の割合で	<飼食>	0	なし		
4W						なし

28年度および29年度アドバイザー会合でアドバイザー一委員より、使用しているプロバイオティクス乳酸菌の生化学性状よりタンニンの高分解力がうかがえることから、タンニン源を飼料に加えて給与することで、相乗効果が期待されるのではないかとコメントがあった。30年度は、このコメントに従い試験飼料にタンニン源として漢方薬材料として市販されている柿の葉乾燥粉末を添加した。

横浜市繁殖センターで飼育中のスバルライチョウの受精卵を孵卵器で人工孵化させた雛に対して、次に示すプロトコルで飼育を行った。OTC投与群6羽および菌投与群4羽の2群を配置した。試験中は、雛の体調が悪くなった場合でもできる限り抗生物質および合成抗菌剤やビタミン剤の投与、治療行為は行わないようにしたが、処方が必要になった場合は、試験から離脱させた。試験中の飼料及び添加物を表(3)-3に示す。雛に与える基本飼料は、SDL

No. 1(抗生剤・乳酸菌・防腐剤無添加幼雛用試験飼料。フィ

ードワン株式会社)、ウサギペレット RM-4(フナバシファーム)、小松菜、ミルワームとし、基礎飼料の25%量の柿の葉乾燥品粉末(自然健康社 国産・柿の葉たんざく刻み、葉のみ)を加えた。基本飼料は1日3回給与した。個体差によって、餌の不足が生じると判断された場合は、餌品目の比率を維持したまま給餌量を増やすことで対応した。OTC投与群の抗生物質投与量及び投与日数は28および29年度と同様とした。

菌投与群(野生ニホンライチョウ由来乾燥菌体投与)は、孵化後1日～14日まで餌(小松菜)に乾燥菌体(*Lactobacillus apodemi* 556-8株・ 10^8 個、*Streptococcus gallolyticus* GAM1-1株・ 10^7 個および非病原性ライチョウ大腸菌*Escherichia fergusonii* S-6-10株・ 10^5 個)をまぶして与えた。

毎日、餌の交換時に体重を測定し、下痢、元気等目視により雛の状態を判定した。孵化0から7日ごとに糞便(できる限り盲腸糞)を採取し、DNA保存液中で解析まで室温保存した。同日の直腸糞をチャック付きビニール袋に採取し、IgA濃度測定に供するまで、凍結保存した。さらに、孵化後7日、21日の糞便の一部をTSA血液加寒天培地、DHL寒天培地、MRS寒天培地に塗抹し、サブテーマ (1) 担当へ冷蔵で輸送した。受け取った培地を41℃で培養し、発生したコロニーを分離同定し、投与したプロバイオティクス菌種が実際に飼育個体の糞便から生きて回収できるかを確認した。試験期間中に回収した糞に含まれる分泌型免疫グロブリン(sIgA)の測定は、28年度と同様に実施した。

3-3：消化管内容物滞留時間測定

ライチョウの消化能力を知るため、大町山岳博物館で飼育されている成スバルバルライチョウの消化管内容物滞留時間を28年度11月と29年度8月の2回、季節を変えて測定した。

大町山岳博物館で飼育中のスバルバルライチョウ成♀3羽の生体重は、それぞれ691g、623g、714gであった。試験時の点灯時間を、8:45～17:30とした。基礎飼料は、ウサギ用RM-4ペレットを用い、小松菜を補給した。水は自由摂取させた。

内容物の固形部(不消化物)のマーカースとしてCr吸着アルファルファ繊維(香川大学川崎浄助教提供)、水溶性画分(微粒子を含む)のマーカースとしてCo(II)-EDTA(同仁化学)を用いた。1羽の1日量としてCr吸着繊維0.2 g、Co-EDTA 0.2 gを30分以内に摂食できる量の飼料に混合し、朝の給餌の際に給与した。マーカース給与終了後から、初めの8時間は1時間毎に、ついで48時間目まで昼間のライチョウ活動時は2時間毎に、深夜は4時間毎に、直腸糞と盲腸糞を区別してチャック付きビニール袋に全量回収し凍結保存した。解凍後、糞の全量を100 mL容コニカルビーカーに回収した後、40℃で風乾した。風乾物に対して硝酸と過塩素酸で湿式灰化を行った後、100 mL容メスフラスコに定容し、ICP-AE(Thermo iCAP7400 Duo MFC)による発光分析を実施して元素濃度を得た。得られた濃度から、採材された糞中のCrおよびCoの総量を求め、採取時間ごとに排出量(mg)をプロットした。最大値を示した時点からの糞中への排出量の減衰を時間(t)の関数モデル $f(t) = ae^{(-kt)}$ に当てはめて、tの係数kを求めた。この式のkの逆数が、内容物の平均滞留時間となる。具体的な方法は、Tsukahara et al. (2005)¹⁾に準じた。

3-4：盲腸糞のpH測定と有機酸分析

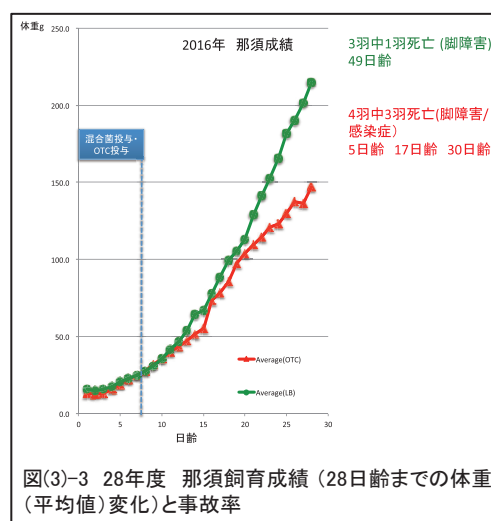
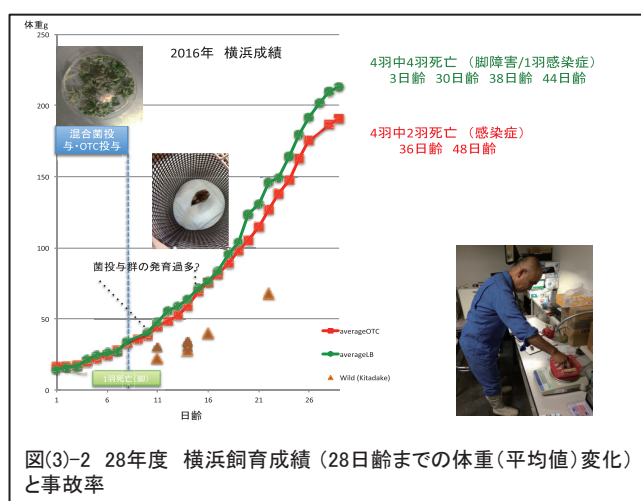
スバルバルライチョウやニホンライチョウの飼育実践の中で、感染症によると思われる死亡事故の場合、数日前から盲腸糞の水様化が体調不良に伴って認められることが多い。以前のブタを用いた研究では、下痢が起こっても病原体が検出されないケースが多く見つかった(Tsukahara and Ushida, 2001, Ushida et al. 2009)^{2), 3)}。非病原性下痢の場合、乳酸やコハク酸の管腔内蓄積が起こっており(Tsukahara and Ushida, 2001)²⁾、とくに抗生物質および合成抗菌剤に起因する下痢の場合、コハク酸の異常蓄積が認められた(Tsukahara and Ushida, 2002)⁴⁾。こうした非病原性の乳酸やコハク酸蓄積性の下痢は、生理性のもので、消化不良性のものと判断された。つまり、過食に伴い、でんぷんやオリゴ糖などの炭水化物が大量に下部消化管に流入することで、発酵が亢進したために下部消化管内のpHが低下し、その結果本来であれば酢酸やプロピオン酸、酪酸などの短鎖脂肪酸が生成し粘膜から効率よく吸収されるところを、pHの低下によって低pH耐性の細菌のみ(その多くが乳酸菌やコハク酸生成菌)が増殖するとともに、乳酸やコハク酸を短鎖脂肪酸に変換する細菌が減少するため、粘膜からの吸収がほとんど起こらない乳酸やコハク酸が貯留し、その結果腸管内容物の浸透圧が上昇することで起きる浸透圧性の下痢になったものと思われる。こうした機構は、人においても乳糖不耐症との機構としてよく知られている。

飼育ライチョウでしばしば観察される「糞の崩れ」は、こうした機構によるものであれば、飼料を減らす、不消化な繊維質を増量するなどの対応が必要で、抗生物質および合成抗菌剤を用いた介入は逆効果の場合が多いと思われる。そのため、飼育ニホンライチョウとスバルバルライチョウを対象として、糞便の状態とpHや有機酸濃度を測定し、生理性下痢の可能性を判定した。

4. 結果及び考察

4-1：野生ライチョウ由来腸内細菌の投与試験（プロバイオティクス給与試験）

28年度の横浜市繁殖センターでは、親鳥の受精率が例年（90%以上）よりも著しく不良（60%程度）なうえ、孵化後の脚状態が不良な個体が多かった。孵化3日後、菌投与群の1羽が、虚弱が原因で死亡した後は、28日齢まで全羽生育したが、菌投与群の1羽は脚不良で30日齢で、別の2羽も脚の不良で、運動機能障害を起こし38日齢、44日齢で死亡した。44日齢の死亡個体は、運動機能障害に感染症の合併が認められた。一方、OTC投与群の2羽は、36日齢、48日齢で水様性の下痢を伴う症状を呈し、いずれも死亡した。平均体重の伸びは、図(3)-2に示すように菌投与群が高かったが、統計的な有意差はn数が少ないため検出されなかった。28年度那須どうぶつ王国では、OTC投与群に4羽、菌投与群に3羽を割り付けた。OTC投与群の1羽が5日齢で、別の1羽が17日齢、さらに別の1羽が30日齢でいずれも脚の不良による運動機能障害で死亡した。菌投与群は、1羽が49日齢で脚の不良による運動機能障害で死亡したが、残りの2羽は、順調に生育した。図(3)-3に示すように、平均体重の伸びは、菌投与群が高かったが、統計処理は同様にn数の不足で実施できなかった。

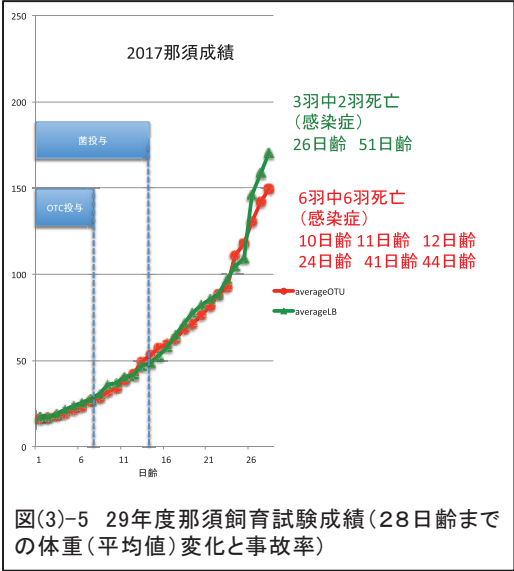
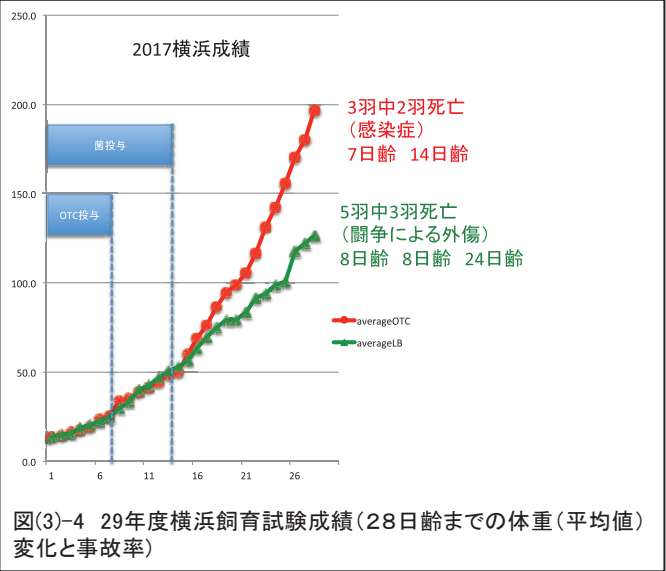


29年度横浜市繁殖センターでの飼育試験は、受精卵率が28年度同様に不良であったが、28年度と異なり孵化後の脚状態が不良な個体はなかった。一方で、軟便状況を示す個体が多く、試験途中でZPC飼料を28年度に使用したSDL No. 1に変更したところ、餌に起因すると思われる生理性の軟便は観察されなくなった。ZPC飼料に関しては、成分組成表と実測した成分値にかなりの隔たりがあり、特にタンパク質が過剰になっていることが指摘された(日獣大：太田能之教授)。SDL No. 1は、微粉末であったため小松菜に付着しやすく、雛の一日あたり摂食量が過剰になった可能性があったため、29年度は、同じ栄養成分組成で粒度の粗い砕いたZPCペレットに変更したが、それにもかかわらず軟便が頻発したことから、おそらく記載の無い何らかの難消化性成分の過剰摂取が理由と考えられた。このように雛の孵化後の栄養管理には、解決すべき課題が大きいことがわかったが、とくに最終年度の30年度は体重の伸びを見ながらSDL No. 1の給与量を微調整する必要があると考えられた。横浜市繁殖センターでの実験では、孵化後2週目と3週目にOTC投与群の1羽ずつが死亡した。菌投与群は、孵化後2週目に2羽が死亡した。そのため、菌投与群に2羽を新たに導入するなどして対応したが、生育時期を揃えることが困難であった。OTC投与群の死亡原因は、いずれも感染症によるものであったが、菌投与群は闘争による外傷に起因する*Proteus mirabilis*感染症によるものだった(図(3)-4)。那須どうぶつ王国では、孵化後1週間までの事故は発生しなかったが、2週目にOTC投与群の3羽が感染症で死亡したため、OTC投与群にあらたに雛3羽を組み込んだが、この3羽も孵化後3週までに1羽、孵化後6週までに2羽が感染症で死亡し、6羽とも生育しなかった。一方、菌投与群では、孵化後3週齢までの死亡はなく、3週目に1羽、7週目に1羽が感染症で死亡した(図(3)-5)。

28年・29年の2回に渡る飼育試験で明らかになったことは、表(3)-4に示すように抗生物質および合成抗菌剤を連続して経口投与しても感染症の発生は予防できないということである。特に、抗生物質の投

与期間を過ぎると、急激に感染症による死亡率が上昇していることは、施設的に病原微生物の管理が難しいことを示している。もちろんニホンライチョウの飼育園館では、SPF環境に準じる施設で飼育を行っているので、通常環境で行なった本試験のように細菌管理を徹底できない開放的な飼育条件ではない。しかしながら、SPFに準じた飼育環境においても、感染症の予防は困難で、育雛中の高い死亡率や成鳥の突然死などが継続して報告されているのが現状である。さらに、こうしたSPF環境の施設を整えることが多くの動物園にとっては負担となっており、その結果、ニホンライチョウの飼育園館数が伸びない原因ともなっている。

本研究の結果、開放的な飼育環境で抗生物質および合成抗菌剤を処方しなくても野生ニホンライチョウ由来の乳酸菌を雛に投与することによって死亡率を半減できることがわかったので、この飼育技術をニホンライチョウの飼育実践へ取り入れることが可能な段階にあると考えられた。なお、28年度・29年度のいずれも投与菌は、投与期間中および投与が終了して2～3ヶ月経過した飼育試験終了時の90日齢でもMRS寒天培地、TSA血液加寒天平板、DHL寒天平板上で検出することができた。この結果より、野生ニホンライチョウ由来の乳酸菌は、投与期間中に飼育スバルバルライチョウの腸内に定着し、投与が終了後も腸管内で増殖しているものと考えられた。



表(3)-4 ライチョウ由来乳酸菌投与の感染症予防効果(2016年2017年2園合計)

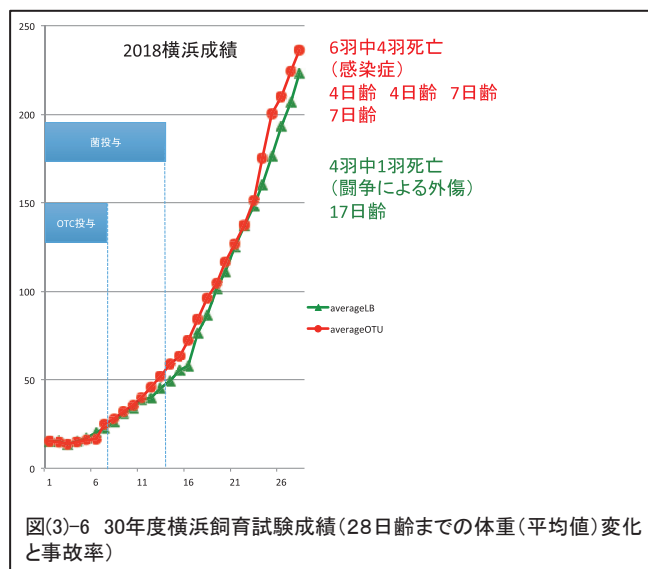
日齢等	乳酸菌 投与群	抗生物質 給与群
供試雛個体数	16	17
総死亡個体数(率%)	7 (43.8%)	12 (70.6%) ①
感染症死亡総個体数(率%)	3 (18.8%)	8 (47.1%) ①
0～7日齢	2 (12.5%)	0 (0.0%) ②
8～14日齢	1 (6.3%)	5 (29.4%) ③
15～30日齢	0 (0.0%)	2 (11.8%) ③
31～60日齢	0 (0.0%)	1 (5.9%)

- ① 抗生物質給与群が約1.6倍高い死亡事故率。感染症による死亡は2.5倍
感染症以外は、脚障害や趾腫瘍症（過体重疑い）、闘争による死亡
- ② 抗生物質給与中の感染症による死亡事故は少ない
- ③ 抗生物質給与終了以降、感染症事故が著しく増加（免疫発達抑制が疑われる）

4-2：野生ライチョウ由来腸内細菌の投与試験（シンバイオティクス給与試験）

横浜市繁殖センターでの30年度飼育試験は、受精卵率が低調であったため、雛の数に不足が生じても補うことができなかった。孵化後1週までにOTC投与群の4羽が感染症疑いで死亡し、最終的に2羽となった。菌投与群は、孵化後3週目に1羽が闘争による外傷が原因となって死亡した。孵化後4週以降は、平飼いのコンクリート舎に移動したが、1羽が移動後に滑ることによって、腱はずれを発症した。

図(3)-6に記載したように、OTC投与群は、28年度29年度と同様に、感染症による高い死亡率を記録した。30年度は、28年度・29年度と飼料が異なり、柿の葉粉末（図(3)-7）をあらたに給与したが、この結果から、柿の葉自体の感染症予防効果は認められなかった。



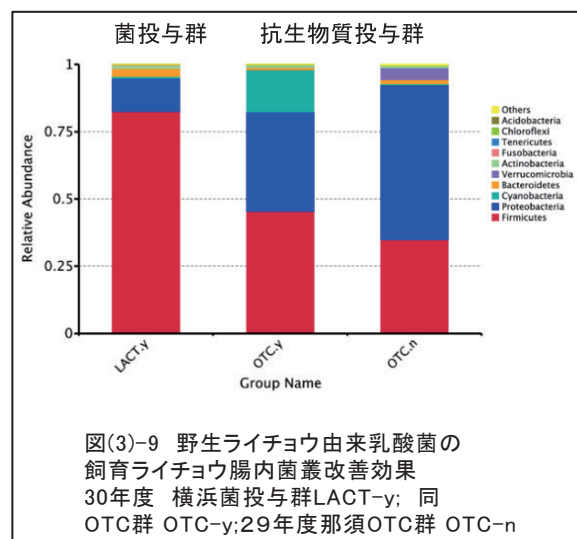
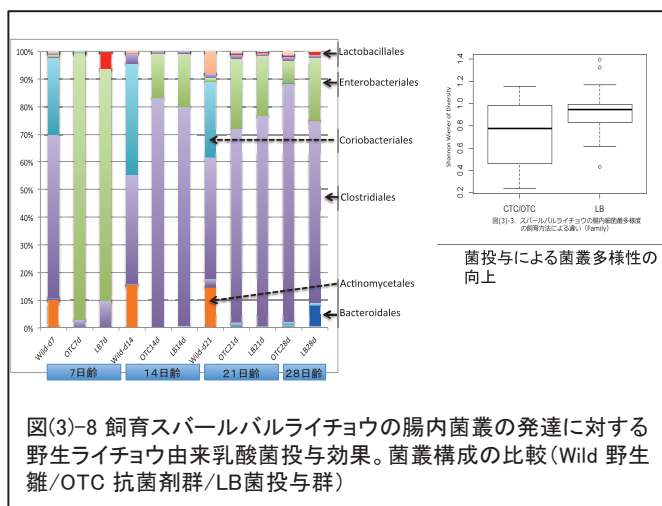
図(3)-7 給与した柿の葉乾燥品(左)と生育後に生の柿の葉を給与されるライチョウ

一方、抗生物質の代わりに野生ニホンライチョウ由来細菌を投与した菌投与群の感染症による死亡率は0%となり、孵化直後から野生ニホンライチョウ由来の乳酸菌を中心とした生菌投与が、感染症を予防できることが明らかとなった。また、25%の柿の葉添加により餌のエネルギー濃度が薄くなったにもかかわらず、28年度29年度に目立った体重の制御不全が30年度は認められず順調な生育を見せた。

4-3：飼育スバルバルライチョウの腸内菌叢に対する野生ライチョウ由来乳酸菌投与効果

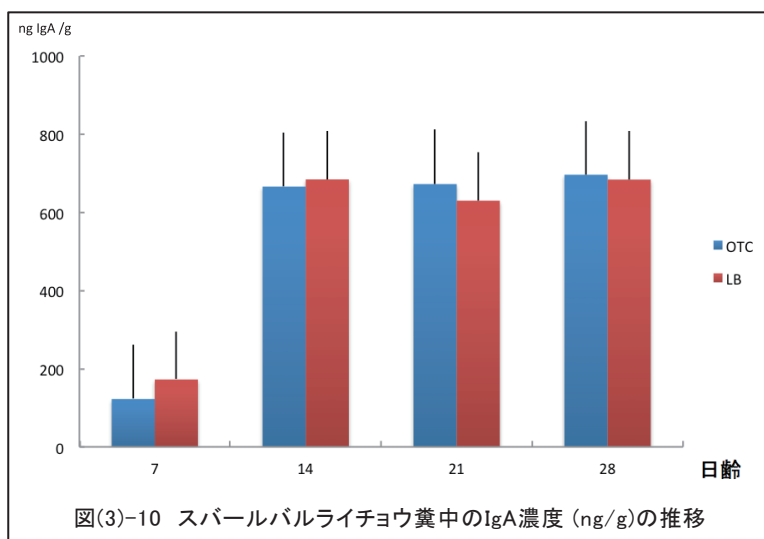
飼育スバルバルライチョウの腸内細菌叢構成を菌投与群とOTC投与群で比較した。28年度の結果を図(3)-8に示す。7日齢においては、いずれの群でも大腸菌群が優勢であるが菌投与群では、OTC投与群と比較して投与菌も含まれるとも思われるLactobacilles目細菌が10%近くを占めるとともに、Clostridiales目細菌も10%程度を占めていた。この時の菌投与群では、野生ニホンライチョウ由来の乳酸菌投与を孵化後7日間しか行っていなかったにもかかわらず28日齢まで主要菌群として検出された。また、特筆すべきことに、28日齢に到達した段階で高い嫌気度を要求するBacterioidales目細菌が10%近くを占めるに至った。こうした状況を反映して、菌投与によって腸内細菌叢の多様性（ α 多様性）が、有意に向上した。

柿の葉を飼料に混ぜた30年の横浜スバルバルライチョウの菌叢構成を図(3)-9に示した。図中でLACT-yが菌投与群、OTC-yがOTC群である。柿の葉の検証のためにOTC-nとして29年の那須動物王国のスバルバルライチョウの検査結果を掲載した。



28年29年の結果と同様に、菌投与群に比べてOTC投与群では大腸菌群が多く検出される傾向にあった。柿の葉給与は、大腸菌群の減少をもたらす可能性が示唆されたが、菌を投与しない限り高い嫌気度を要求する *Bacteroides* 属グループの細菌は増加しないことが再確認された。この現象は、おそらく腸内環境の嫌気度の向上を反映したものと推測される。なぜなら *Bacteroides* 属グループの細菌は絶対嫌気性菌であり、分離の際にも気相に水素を添加するなどの措置が必要だったからである。 *Bacteroides* 属グループの細菌は、繊維分解菌として有力であり、草食性の強いニホンライチョウの野生復帰準備のために、腸内に定着させることが必須の細菌種と考えられる。またサブテーマ（1）で、野生ニホンライチョウの優勢菌としてライチョウ型の *Ruminococcus* 属が分離されたが、これらの菌群も高い嫌気度を必要とするため今後の糞便移植の技術開発にとっても、あらかじめ腸内の嫌気度を高く保つことが重要と思われる。

4-4：飼育スパールバルライチョウの腸管免疫に対する野生ライチョウ由来乳酸菌投与効果



IgAは、一般に粘膜固有層に滞在するIgA分泌B細胞から単量体で放出され、粘膜上皮細胞の輸送機構によって二量体になってから粘膜上皮の管腔側に分泌展開される。粘膜を介した感染が成立するには、病原体が粘膜上皮細胞に付着し、内部に取り込まれそこで増殖するなどの機構が働くが、分泌型IgAは、細菌など微生物の表面に接着し、感染の初期防御として機能する。

管腔内のIgA濃度は、動物の成育に従って推移するが(Ushida et al. 2008)⁵⁾。哺乳動物においては、胎盤移行や初乳による免疫物質供給によって母親から

の移行免疫が成立するとともに、離乳までは常乳を介してIgAなどの免疫グロブリンが幼動物に供給される。鳥類の場合、卵黄中には免疫グロブリンが含まれており、雛の初期防御機構として働くため、哺乳類の移行免疫と同様の機能を持つと考えられる。

哺乳動物では、乳酸菌などのプロバイオティクスの経口給与によって、粘膜免疫の賦活がおこり、管腔内へのIgA分泌量の増加による生体防御の活性化が見込まれる(Ohashi and Ushida, 2009)⁶⁾。

鳥類においても同様の効果が期待されるため、本試験においても糞中のIgA濃度を測定した。その結果を図(3)-10に示す。方法で記載したように、ニワトリIgAの検出キットを使用した。ニワトリIgAとスパーバルライチョウのIgAでは、一次抗体の交差性に問題があり、検出感度がニワトリIgAに比べると500倍以上低かった。そのため、濃度の正確な測定には至らなかったが、7日齢の雛の低値は、特筆するに値する。ニワトリ雛の腹腔には孵化後3から4日まで卵黄が残留するが、ニホンライチョウやスパーバルライチョウ雛でも死亡個体の解剖所見から、図(3)-11に示すように顕著な残留卵黄がこの時期まで認められることが多い。しかし、残留卵黄が消失していく時期には次第に自身の免疫グロブリン生産を高めて、感染防御する必要がある。残留卵黄が消失する時期は、母親由来の免疫物質が枯渇する時期に当たり、感染防御力が最も低下する時期になる。従って、この時期に死亡事故が多く認められるのは、当然のことと判断される。この時期をくぐりぬける



図(3)-11 4日齢で死亡したスパーバルライチョウ雛の消化管
赤矢印:残留卵黄

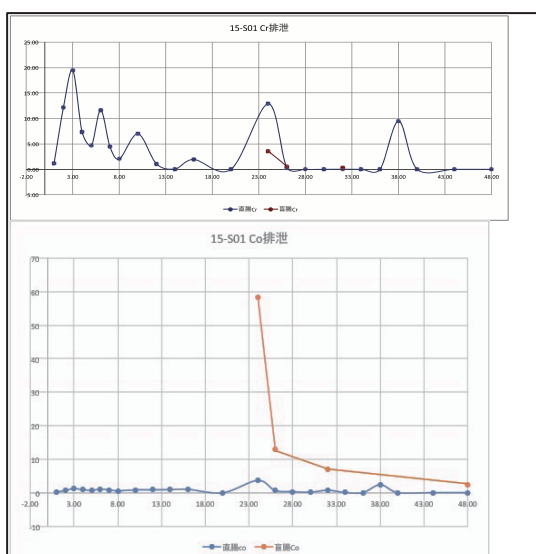
ために速やかに自身の免疫系を発達させることが、感染機会が高山よりも高いと考えられる人工飼育環境では特に重要と思われる。

7日齢の糞中IgA濃度は、菌投与群の方が高く推移する傾向を示したが、上述のように検出感度の問題があり、とくに低値を示した期間の数値には誤差が多くみとめられたため、今後、ニホンライチョウやスパーバルライチョウの免疫グロブリンに対する特異抗体を作製するなどして、再度確認していく必要がある。

4-5：飼育成スパーバルライチョウの消化管内容物滞留時間

大町山岳博物館で飼育されている3羽の成スパーバルライチョウ(15-S01, 15-S03, 15-S06)の消化管内容物滞留時間を示すと表(3)-5のようである。3羽ともメスで、体重は、670 gから700 gの範囲であった。季節差を見る目的で8月と10月の2回にわたって計測した。

図(3)-12に示すように、固形部マーカーのCrは、ほとんどが腸糞とともに排出され、盲腸糞からの排出は極めて少なかった。



図(3)-12 固形部マーカー(Cr)と液状部
マーカー(Co)の盲腸糞と腸糞への排出

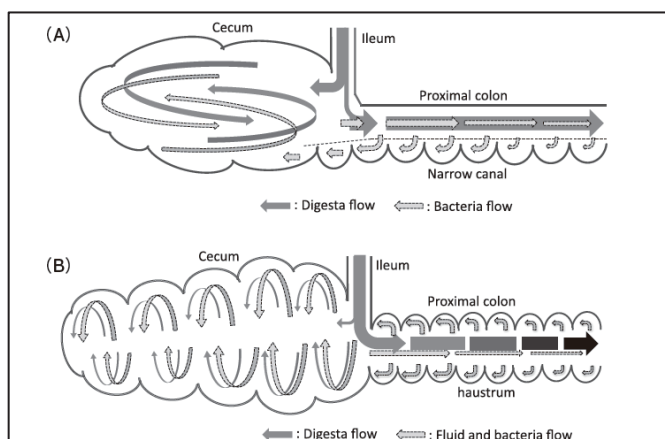


Fig. 1 Schematic models of digesta flow in the cecum and proximal colon.
(A) is the model of no selective retention of digesta. Fluid and particle digesta move together through the whole gut. The colon in the animal adopting this model has a separation mechanism which is called mucus trap type. Bacteria migrate from digesta to mucus, which moves then in to furrow. The mixture of mucus and bacteria in the furrow is transported to oral direction by antiperistaltic movement of the furrow. (B) is the model of selective retention of fluid digesta in the cecum. Fluid digesta is transported from proximal colon to the cecum by the colonic separation mechanism which is called wash-back type. Fine particle digesta and bacteria with fluid phase are squeezed from the large particle phase, then they are transported to the cecum by antiperistaltic activity. The larger particle phase is forced to distal part by peristaltic activity of the colon.

図(3)-13 下部消化管の内容物移動モデル (坂口英 2015)

逆に液状部のマーカーは、ほとんど全てが盲腸糞とともに排出された。ライチョウの下部消化管の解剖学的構造や固液分離の機構は、明らかにされていないが、ほとんど全ての液状部マーカーが盲腸糞から排出されたことから、坂口(2015)⁷⁾に示すタイプBの機構を持っていると推測される(図(3)-13)。すなわち、内容物が回盲弁を通過して盲腸・結腸に入る際に、坂口の示すAのタイプは、モルモット、ヌートリア、マーラ、デグーなどのヤマアラシ科のゲッシ目が多い機構で、内容物の大半が盲腸に直接はいりそこで攪拌される。Bタイプでは、結腸で内容物の固液分離が起こり、液相が固相部分から分離されて盲腸に逆送される。液相には、細菌のほか微粒子状の食餌残渣が含まれる。この機構は、ウサギに顕著であるが、コアラやボッサムに見られるもので、コアラやボッサムとニホンライチョウの腸内細菌の類似性ととも、ライチョウ類の消化戦略がコアラなどと類似していることを改めて示すものである。固形部マーカーの滞留時間が2時間から長い場合でも4時間であることは、不消化物を早急に排出していることを示しており、いわゆる腸糞と呼ばれる糞の排出が、夏季のニホンライチョウでは15分から30分に一回観察されることとよく一致する。一方、液状部マーカーは、8時間から12時間の平均滞留時間を示した。10月の15-S03に関しては、サンプリング点数の不足が最も顕著に影響した結果であると推測された。8時間から12時間という液状部マーカーの平均滞留時間は、盲腸糞が一日あたりで2回から3回排泄されるという野外の観察結果とよく一致する。

表(3)-5 スバルライチョウ 内容物平均滞留時間(h)

2017年8月	Cr (固形部)	Co (液状部)	Cr滞留時間 (固形部)	Co滞留時間 (液状部)
15-S01	$f(t)=31.006e(-0.277)t$	$f(t)=234.87e(-0.119)t$	3.61	8.40
15-S03	$f(t)=1481.2e(-0.546)t$	$f(t)=124.386e(-0.1161)t$	1.83	8.62
15-S06	$f(t)=11.529e(-0.245)t$	$f(t)=114.25e(-0.081)t$	4.08	12.35
2016年10月	Cr (固形部)	Co (液状部)	Cr滞留時間 (固形部)	Co滞留時間 (液状部)
15-S01	$f(t)=54.057e(-0.418)t$	$f(t)=162.96e(-0.083)t$	2.39	12.05
15-S03	$f(t)=69.062e(-0.736)t$	$f(t)=43.816e(-0.016)t$	1.36	62.50
15-S06	$f(t)=49.723e(-0.518)t$	$f(t)=411.79e(-0.099)t$	1.93	10.10

4-6：盲腸糞のpH測定と有機酸分析

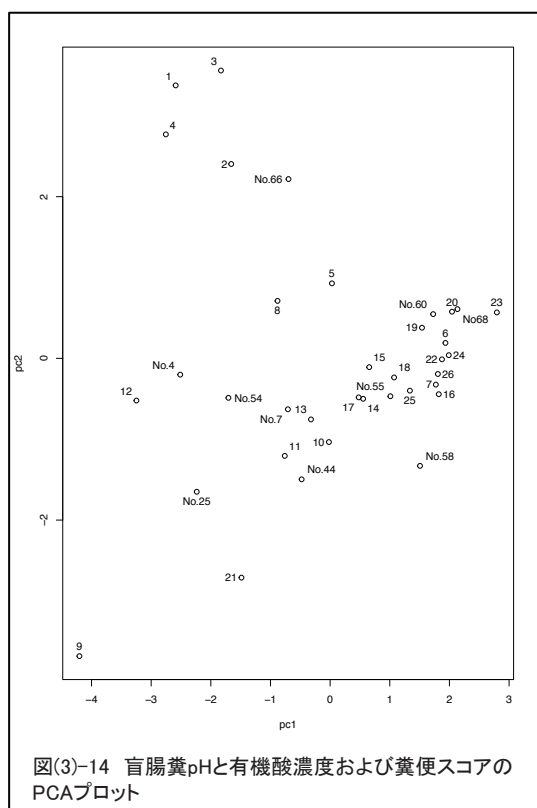
上野動物園で飼育されているニホンライチョウの雛および成体と横浜市繁殖センターで飼育される成スバルバルライチョウの糞便のpHと有機酸濃度を示した（表(3)-6）。また、糞便の性状スコアを目視で判定し水様性便3、軟便2、正常便1の3段階に区分した。

固定識別名	Concentration (mmol/kg feces)										pH	Fecal score
	Succ	Lact	Form	Acet	Prop	iButy	Buty	iVar	Var	Total		
8.29 ヒナN52/55	6.79	9.56	1.28	57.45	1.61	0.00	8.78	0.00	0.00	85.46	5.54	3
9.4 ヒナN52/55	4.87	6.00	2.10	51.75	1.31	0.00	6.75	0.00	0.00	72.79	6.91	2
9.7 ヒナN52/55	7.05	10.61	2.62	46.24	0.97	0.00	3.79	0.00	0.00	71.29	5.93	1
9.12 ヒナN52/55	8.29	6.75	2.06	60.82	1.24	0.37	8.62	0.00	0.00	88.16	5.36	2
9.28ヒナ(N52)	5.06	0.00	1.46	35.96	0.41	0.49	4.57	0.00	0.00	47.96	5.81	1
1.16.2018ヒナ (N52)	0.64	0.82	0.97	13.24	0.37	0.49	0.79	0.00	0.00	17.32	7.10	1
1.25 ヒナ (N52)	0.82	0.00	0.79	15.04	0.79	0.75	1.27	0.00	0.00	19.46	8.06	3
2.8.2018ヒナ(N52)	0.62	0.92	1.71	25.97	1.76	1.65	1.61	0.20	0.56	35.00	7.09	1
3.1.2018ヒナ(N52)	0.36	1.23	1.56	23.49	1.30	1.39	0.91	0.78	0.09	31.12	7.04	1
3.6.2018ヒナ(N52)	0.71	0.04	1.50	21.63	1.15	1.02	1.51	0.00	0.16	27.74	6.94	3
9.4.T-05.N28	0.98	0.00	1.28	57.45	1.61	0.00	8.78	0.00	0.00	70.09	7.27	3
9.7.T-05.N28	2.02	0.90	3.94	59.55	4.39	1.16	7.09	0.30	0.52	79.87	5.48	1
9.12.T-05.N28	0.49	0.00	2.17	35.96	2.70	0.94	3.49	0.00	0.00	45.75	6.14	2
9.4.O-09.N39	1.84	1.05	2.40	33.34	3.71	0.30	1.80	0.19	0.00	44.63	6.89	1
9.7.O-09.N39	8.85	0.00	3.56	55.72	2.59	1.01	5.62	0.00	0.49	77.85	5.53	1
9.12.O-09.N39	1.95	0.00	2.32	35.81	3.79	0.60	2.25	0.00	0.00	46.72	6.69	1
12.12.O-09.N39	1.69	0.00	1.91	19.76	1.31	0.97	4.42	0.00	0.00	30.07	7.29	3
1.16.O-09.(N39)	2.47	0.56	1.12	28.20	2.10	0.60	1.57	0.00	0.00	36.64	7.37	3
1.25.O-09(N39)	0.49	0.00	0.82	14.32	1.12	0.71	0.79	0.00	0.00	18.26	7.36	1
2.8.O-09(N39)	0.85	1.11	1.84	26.02	2.28	0.75	1.17	0.17	0.00	34.18	6.84	1
3.1.O-09(N39)	1.43	2.07	2.14	22.96	2.08	1.25	0.88	0.34	0.06	33.22	7.05	1
1.16.No.1.(N10)	1.61	0.94	1.72	25.80	2.36	0.79	2.02	0.00	0.00	35.25	6.57	1
1.25.No.1(N10)	2.21	0.82	1.09	16.31	1.95	0.71	1.31	0.00	0.00	24.41	7.40	1
2.8.No.1(N10)	2.87	0.93	1.69	26.85	2.52	0.89	1.48	0.09	0.04	37.36	7.29	1
3.1.No.1(N10)	1.99	1.09	1.79	21.57	2.26	0.69	1.32	0.37	0.06	31.14	6.93	1
1.16.No.2.(N11)	0.52	0.00	1.80	15.19	1.12	0.00	1.12	0.00	0.00	19.76	7.37	1
1.25.No.2(N11)	0.49	0.79	0.86	9.56	0.86	0.00	0.56	0.00	0.00	13.12	7.60	3
2.8.No.2(N11)	1.79	0.85	1.40	23.19	2.11	0.71	1.76	0.00	0.00	31.82	7.37	1
2.26.N11	1.28	0.80	2.60	56.91	4.18	1.16	5.60	0.17	0.43	73.12	6.63	2
3.1.No.2(N11)	1.50	0.82	1.38	24.52	1.67	1.81	1.89	0.22	0.09	33.91	7.47	1
3.6.No.2(N11)	No peak	No peak	No peak	No peak	No peak	No peak	No peak	No peak	No peak	0.00	7.5	3
9.12.No.3(N12)	0.30	0.34	3.34	38.06	4.50	0.60	2.25	0.30	0.00	49.69	6.87	1
1.16.No.4.(N13)	0.22	0.60	0.97	15.56	0.86	0.45	0.45	0.00	0.00	19.12	7.30	3
2.8.No.4(N13)	0.47	0.84	1.59	24.18	1.71	0.40	0.87	0.00	0.15	30.20	6.95	1
1.19.No.4(N13)	0.00	0.00	0.49	2.70	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	3.19	7.14	3
1.25.No.4(N13)	0.60	0.71	0.86	12.26	0.75	0.49	0.26	0.00	0.00	15.94	7.50	3
3.1.No.4(N13)	0.40	1.37	1.46	18.98	1.14	0.69	0.72	0.00	0.32	25.08	7.2	1
3.6.No.4(N13)	0.47	0.82	1.34	16.74	1.07	0.49	0.35	0.20	0.00	21.50	7.14	3
1.16.U-07.(N27)	0.82	0.00	1.50	18.00	1.61	0.60	0.97	0.00	0.00	23.51	7.08	1
1.25.U.07.(N27)	0.90	0.00	0.97	11.10	1.31	0.49	0.64	0.00	0.00	15.41	7.49	1
2.8.U-07(N27)	1.50	1.15	2.60	23.88	2.60	1.25	1.49	0.56	0.54	35.58	7.23	1
3.1.U-07(N27)	1.20	1.09	1.63	26.37	2.94	1.15	2.12	0.42	0.04	36.97	7.19	1
Yokohama Svalbard												
No.44	0.40	1.06	0.46	29.54	1.95	0.40	3.86	0.10	0.56	38.31	-	1
No.54	0.59	2.51	0.48	52.60	3.19	0.31	7.74	0.00	0.42	67.85	-	3
No.58	0.07	0.09	1.08	13.68	0.92	1.21	1.21	0.02	0.11	18.39	-	3
No.68	0.48	1.12	1.21	6.05	0.37	0.04	0.11	0.00	0.04	9.44	-	3
No.25	0.59	1.89	0.35	59.82	4.38	0.79	7.19	0.00	0.51	75.53	-	1
No.4	2.05	1.58	0.31	69.76	5.26	0.11	8.91	0.00	0.15	88.13	-	2
No.7	0.48	0.77	0.68	40.37	2.73	0.02	5.74	0.11	0.20	51.11	-	1
No.55	0.33	0.13	0.18	29.92	1.94	0.57	2.64	0.00	0.04	35.75	-	1
No.66	3.53	7.13	3.66	37.13	1.02	0.00	1.45	0.00	0.00	53.92	-	2
No.60	0.22	0.88	0.51	18.59	1.10	0.00	1.39	0.00	0.00	22.68	-	1
Fecal score: 3:水分過多; 2: 中間; 1:正常												

PCAプロット図中（図(3)-14）の1から7は、ニホンライチョウ雛であり、8から26までは成ニホンライチョウである。その他N0のついた表示は成スバルバルライチョウになる。表(3)-6および図(3)-14から明らかなように、雛と成体の盲腸糞化学組成は区分される。

成体の糞便スコアとpH、有機酸濃度の関係は、糞便スコアが悪いほどpHが高く有機酸濃度も低いことを示している。糞便スコア3(水様性)の平均値はpHが7.44と高く、総有機酸濃度が26 mmol/kgと極めて低いことから、4-5に示す内容物移動の機構から判断して、結腸に入った回腸内容物が盲腸に逆送されることなく、そのまま排泄されたと思われる。従って、成鳥の下痢の要因として結腸の運動障害が想定される。いっぽう、雛の場合は、これとは様相が異なっており水様性下痢の場合、低いpHと高濃度の有機酸を特徴とする。したがって、雛の場合は、消化不良性下痢と同様のメカニズムが想定され、飼料摂取量が上部消化管での消化能力を超えてしまったことを示唆している。

成鳥の結腸運動障害が何に起因しているかは、不明であるが、病原菌の感染以外にも、ストレスなど環境的な要因も考慮する必要がある。



一方、雛の場合の下痢は、感染症以外に生理性の下痢である可能性が高く、餌の消化性を低下させるなどの方法も有効であると考えられる。従って、pHの測定による下痢の性状判定も病状の診断として有効と思われる。

5. 本研究により得られた成果

(1) 科学的意義

野生ニホンライチョウ由来の腸内細菌を用いたプロバイオティクス開発に成功した。プロバイオティクスに用いた細菌は、日和見感染菌に対する抗菌性に優れており、この製剤で抗生物質であるオキシテトラサイクリンを代替することが可能であることがわかった点は特筆に値する。とくに、近い将来の野生復帰準備にむかって抗生物質および合成抗菌剤の使用は大きな問題となるため、本研究の成果は域外保全技術の革新的技術となりうると考える。さらに、飼育下で様々な問題の原因となる過肥についても、プロバイオティクス細菌の機能を生かすタンニン源として漢方の柿の葉を飼料に混ぜることで解決が可能であったことは重要な成果である。

加えて、本研究では、ライチョウの消化管内容物の移動に関して新しい知見が得られた。ライチョウの消化管内容物移動は、ウサギやコアラやポッサムに見られるものと同様の機構が働いていると推測された。コアラやポッサムとニホンライチョウの腸内細菌の類似性ととともに、ライチョウ類の消化戦略がコアラなどと類似していること、すなわち収斂進化を示すものとして重要な知見である。

(2) 環境政策への貢献

＜行政が既に活用した成果＞

環境省平成28年度29年度ライチョウ保護増殖検討会において、域内保全事業と域外保線事業をつなぐ重要要件として腸内細菌研究の重要性と意義をサブテーマ(1)の内容と併せて発表し、その後の保護事業の進展に貢献した。とくに域外保全事業の将来的方向性について、飼育下のニホンライチョウをそのまま復帰個体群としてハードリリースする手法は取りえない事を明らかにした。この点は、飼育を担当する日本動物園水族館協会生物多様性委員会ライチョウ域外保全プロジェクトチームと共有した。ニホンライチョウの生存に、特定の腸内細菌が必須であることがわかったことから、ニホンライチョウの保全に於ける域外保全による野生復帰個体群の準備には、これらの細菌の腸管への定着を促す技術開

発が、とくに域外保全に必須であることがライチョウ保護増殖検討会でも了解された。それを受けて飼育個体でも抗生物質および合成抗菌剤を利用しない飼育方法の取り組みがはじまろうとしている。

平成30年度のライチョウ保護増殖検討会とそれに先立つ野生復帰検討委員会で、具体的なリリース法の検討が始まったが、その議論の基盤として本研究の成果が活用された。

＜行政が活用することが見込まれる成果＞

ニホンライチョウ以外の動物種でも、消化困難で有毒物を含むような餌食物に依存する希少動物の場合、保全の手法開発に腸内細菌の研究の重要性が認識されたことは、今後、希少動物保全政策に活用される見込みのある成果である。保護増殖検討会でも議論された野生個体糞便を用いた飼育個体への糞便移植は、単純な方法で極めて魅力的であるが、ニホンライチョウ野生個体の糞には高頻度でコクシジウム原虫がふくまれており、この問題の解決無くして実施が事実上不可能であることが了解されたことは、今後、別種の野生復帰個体群の作出方法の考案にも大きく貢献すると期待される。

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）＞

特に記載すべき事項はない。

（２）口頭発表（学会等）

- 1) 牛田一成：平成28年度第1回日本動物園水族館協会生物多様性委員会ライチョウ域外保全研究会（2016）
「環境省環境研究総合推進費研究中間報告」
- 2) 土田さやか、小林篤、長谷川雅美、村田浩一、中村浩志、牛田一成：第65回日本生態学会大会（2018）
「ライチョウにはライチョウの乳酸菌！！」

（３）知的財産権

特に記載すべき事項はない。

（４）「国民との科学・技術対話」の実施

- 1) 第17回ライチョウ会議長野大会「野生ニホンライチョウおよび飼育下スバルバルライチョウの腸内菌の特徴」（主催：実行委員会、長野県、大町市 2016年10月16日、サン・アルプス大町大会議室、参加者約200人）にて成果紹介
- 2) 太陽化学メールマガジン
(http://www.taiyokagaku.com/tomorrow_solution/backnumber/20171203.html) 「腸内細菌研究のもう一つのフロンティア 「野生動物の腸内細菌」」（2017）で、牛田一成 土田さやかが成果紹介
- 3) 第114回サイエンスカフェ in 名古屋「動物の「うんち」の研究から、わかること-野生動物の生存を助ける腸内細菌の世界-」（主催：日本農芸化学会中部支部 2018年6月24日、名古屋市科学館、観客約40人）にて牛田一成が成果紹介
- 4) 日本哺乳類学会2018年度大会一般公開シンポジウム「動物園動物の比較栄養学と比較細菌学」（主

催：日本哺乳類学会 2018年9月10日、信州大学伊那キャンパス、参加者約200人)にて牛田一成が成果紹介

- 5) 第18回ライチョウ会議新潟妙高大会「野生ニホンライチョウを特徴付ける腸内細菌とその性質を生かした飼料開発」(主催：実行委員会、新潟県、妙高市 2018年10月20日、ふれあい会館、参加者約300人)にて牛田一成が成果紹介
- 6) 第18回ライチョウ会議新潟妙高大会「飼育と野生ライチョウの腸内細菌叢確立過程の比較」(主催：実行委員会、新潟県、妙高市 2018年10月20日、ふれあい会館、参加者約300人)にて小林篤が成果紹介
- 7) ライチョウ基金シンポジウム2019「ライチョウの未来と動物園の役割」(主催：富山市ファミリーパーク 2019年2月3日、富山県総合福祉会館サンシップとやま・福祉ホール、観客約200人)にて牛田一成が講演

(5) マスコミ等への公表・報道等

- 1) 岳人 (2017年3月号、「ライチョウの“うんち”の中にある不思議」)
- 2) 毎日新聞 (2017年12月9日、全国版朝刊社会面、「野生ライチョウ 腸に毒素分解の特有細菌 飼育種はなし」)
- 3) 岳人 (2018年6月号、「腸内から見えてくる新たな「リアル」」)
- 4) 日本経済新聞 (2018年12月13日、電子版、「ライチョウ繁殖のカギは「腸内」、相次ぐ死防げるか」)

(6) その他

特に記載すべき事項はない。

8. 引用文献

- 1) T. TSUKAHARA, W. BUKAWA, T. KAN and K. USHIDA: Microb. Ecol. Health Dis, 17, 107-113 (2005), Effect of a cell preparation of *Enterococcus faecalis* strain EC-12 on digesta flow and recovery from constipation in a pig model and human subjects.
- 2) T. TSUKAHARA and K. USHIDA: J. Vet. Med. Sci, 63, 12, 1351-1354 (2001), Organic acid profiles in feces of pigs with pathogenic or non-pathogenic diarrhea.
- 3) K. USHIDA, A. KISHIMOTO, S.J. PIAO, M. ITOH, A. SHIGA, N. NAKANISHI and T. TSUKAHARA. Anim. Sci. J, 80, 5, 556-561 (2009), An epidemiological survey on pigs showing symptoms of infectious enteric diseases and dyspepsia in Japan.
- 4) T. TSUKAHARA and K. USHIDA: J. Gen. Appl. Microbiol, 48, 3, 143-154 (2002), Succinate accumulation in pig large intestine during antibiotic-associated diarrhea and the constitution of succinate-producing flora.
- 5) K. USHIDA, C. KAMEUE, T. TSUKAHARA, K. FUKUTA and N. NAKANISHI: J. Vet. Med. Sci, 70, 8, 849-852 (2008), Decreasing traits of fecal immunoglobulin A in neonatal and weaning piglets.
- 6) Y. OHASHI and K. USHIDA: Anim. Sci. J. Review, 80, 4, 361-371 (2009), Health-beneficial effects of probiotics: Its mode of action.
- 7) 坂口英: 岡山大学農学部学術報告, 104, 23-34 (2015), ウサギはなぜ糞を食べる?

III. 英文Abstract

Studies on Gut Bacteria of Japanese Rock Ptarmigans for Its Potential Use in In-situ and Ex-situ Conservation Protocol

Principal Investigator: Kazunari USHIDA

Institution: Chubu University, Academy of Emerging Sciences (CUAES)
1200 Matsumoto-cho, Kasugai-City, Aichi 487-8501, JAPAN
Tel: +81-568-51-9520 / Fax: +81-568-51-6496
E-mail: k_ushida@isc.chubu.ac.jp

Cooperated by: Toho University, Nihon University

[Abstract]

Key Words: Japanese rock ptarmigans, Ex-situ protection, Re-introduction, Intestinal microbes, Beneficial microbes of wild rock ptarmigans

Japanese rock ptarmigans (*Lagopus muta japonica*) are birds that only inhabit the alpine areas of Japan's main island. The birds are recognized as endangered, prompting the endorsement of their national conservation program. We conducted a series of studies to contribute to the conservation program in particular their ex-situ protection.

The birds have a pair of big ceca, in which dense bacterial populations efficiently ferment the food consumed by the host. We established that the anti-herbivory chemicals, synthesized by the alpine plants, were efficiently degraded by these intestinal bacteria thus promoting the birds' survival in the alpine environment.

Therefore, we analyzed the cecal microbial composition of wild living Japanese rock ptarmigans, and also their dominant cecal microbial structure was defined. The mechanisms to maintain these important gut microbes for generations are evolutionarily advantageous. Coprophagy is one effective way to transmit microbes across generations. We observed the coprophagous habits exhibited by the Japanese rock ptarmigan chicks feeding on their mothers' cecal feces. In 2016 and 2017, this study succeeded in defining the coprophagy period manifested by chicks and the developmental process of the cecal microbiome in chicks under an in-situ protection.

Amongst all chicks, coprophagy was only done between 3 and 18 days of age. The number of bacterial species at 1-week-old chicks was the same as that of the adults. Most of the predominant species in the adult individuals were already existent in the 1-week-old chicks. These results indicate that coprophagy in this precocial bird contributes to early colonization of cecal bacteria that are essential for the digestion of food and, hence, survival of the chicks. We have successfully isolated 1,024 strains from the wild Japanese rock ptarmigans and selected one *Lactobacillus apodemi*, one *Streptococcus gallolyticus* and one *Escherichia fergusonii* as our probiotic candidates. Feeding of these probiotics to the chicks from 1 to 14 days old was a successful substitute for antibiotic use in terms of disease prevention. In addition, dried leaves of persimmon of high tannin content were supplemented to their diet stimulate the growth of the probiotic strains, because *L. apodemi* and *S. gallolyticus* were characterized as potent tannin degraders, and *E. fergusonii* as xylanolytic. The supplementation also reduced excessive body weight gain, which often caused leg problems under captivity.