

Environment Research and Technology Development Fund

環境研究総合推進費 終了研究成果報告書

4-1903 ライチョウの再導入に必要な腸内環境整備に関わる技術開発

(J P M E E R F 2 0 1 9 4 0 0 3)

令和元年度～令和3年度

Improvement of Intestinal Environments to Facilitate Reintroduction of Japanese Rock Ptarmigans

〈研究代表機関〉

大阪府立大学

〈研究分担機関〉

中部大学

東邦大学

東京理科大学

〈研究協力機関〉

環境省信越自然環境事務所

公益社団法人日本動物園水族館協会

信州大学

令和4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. 研究目標		
4. 研究開発内容		
5. 研究成果		
5－1. 成果の概要		
5－2. 環境政策等への貢献		
5－3. 研究目標の達成状況		
6. 研究成果の発表状況		
6－1. 査読付き論文		
6－2. 知的財産権		
6－3. その他発表件数		
7. 国際共同研究等の状況		
8. 研究者略歴		
II. 成果の詳細		
II－1 アイメリア感染を防除するワクチン開発 （大阪府立大学）	・・・・・・・・・・	9
要旨		
1. 研究開発目的		
2. 研究目標		
3. 研究開発内容		
4. 結果及び考察		
5. 研究目標の達成状況		
6. 引用文献		
II－2 感染抵抗性をもつ野生型腸内細菌叢の解明と利用 （中部大学）	・・・・・・・・・・	16
要旨		
1. 研究開発目的		
2. 研究目標		
3. 研究開発内容		
4. 結果及び考察		
5. 研究目標の達成状況		
6. 引用文献		

Ⅱ－3 野生型腸内環境を誘導する飼料開発 (東邦大学・東京理科大学)	29
---------------------------------------	----

要旨

- 1. 研究開発目的
- 2. 研究目標
- 3. 研究開発内容
- 4. 結果及び考察
- 5. 研究目標の達成状況
- 6. 引用文献

Ⅲ. 研究成果の発表状況の詳細	45
-----------------	----

Ⅳ. 英文Abstract	48
---------------	----

I. 成果の概要

課題名 4-1903 ライチョウの再導入に必要な腸内環境整備に関わる技術開発

課題代表者名 松林 誠 (大阪府立大学大学院 生命環境科学研究科 獣医学専攻 獣医免疫学教室 教授)

重点課題 主：【重点課題12】生物多様性の保全とそれに資する科学的知見の充実に向けた研究・技術開発
副：【重点課題12】生物多様性の保全とそれに資する科学的知見の充実に向けた研究・技術開発

行政要請研究テーマ（行政ニーズ） 非該当

研究実施期間 令和元年度～令和3年度

研究経費

43,953千円（合計額）

（各年度の内訳：令和元年度：15,561千円、令和2年度：14,521千円、令和3年度：13,871千円）

研究体制

（サブテーマ1）アイメリア感染を防除するワクチン開発（大阪府立大学）

（サブテーマ2）感染抵抗性をもつ野生型腸内細菌叢の解明と利用（中部大学）

（サブテーマ3）野生型腸内環境を誘導する飼料開発（東邦大学・東京理科大学）

研究協力機関

環境省信越自然環境事務所、公益社団法人日本動物園水族館協会、信州大学

本研究のキーワード アイメリア、高山植物、飼料、腸内環境、腸内細菌叢、ニホンライチョウ

1. はじめに（研究背景等）

2012年に環境省により公表された第4次レッドリストにおいて、ニホンライチョウは絶滅危惧Ⅱ類（VU）から絶滅危惧ⅠB類（EN）に引き上げられた。これに伴い、環境省では「ライチョウ保護増殖事業計画」が策定された。同計画では、達成目標として「自然状態で安定的に存続できる状態とする」が掲げられ、保護増殖計画に基づくライチョウ保護増殖事業を効果的に実施することが求められている。本事業計画に基づき、2014年に「第一期ライチョウ保護増殖事業実施計画」が策定され、2020年まで様々な関係者が参画する形でライチョウの保全活動が行われた。さらに、2020年度からは、「第二期ライチョウ保護増殖事業実施計画」が策定され、ライチョウ保全の具体的な目標や実施方針に基づき、継続して事業がすすめられている。

第一期ライチョウ保護増殖事業実施計画の中で、生息域内保全として野外でニホンライチョウの家族を一定期間、ケージ内で保護する活動が実施されてきた。このケージ保護活動では一定の成果が得られ、野生復帰の際の雛のソフトリリース法としても有効であるとされている。しかし、一方でケージ保護期間中に雛の衰弱死が起こっている。また、生息域外保全では一定の飼育、繁殖成果は出ているが、雛の生存、成育率が低い。そして、飼育の際の餌資源は、毒性アルカロイド等を含む高山植物を主食としている野外個体群と大きく乖離し、野生復帰を実施しても野外で生き残れない可能性が高いと考えられた。

上記の新たな課題については、本来的に野外個体群が持つ腸内細菌叢の未獲得に起因していると考え

られた。本研究領域については、我が国のみならず世界的にも希少種保全分野では未検討であったが、「ニホンライチョウ保護増殖に資する腸内細菌の研究」（平成28～30年度環境研究総合推進費、代表：牛田一成）を実施することで初めて明らかにされた。また、同時にアイメリア原虫の感染がケージ保護中の雛の死亡原因であること、生き残って成鳥になる個体は原虫への免疫を獲得していること、その腸内細菌叢や餌に含まれる化学成分の一部に原虫の腸管内増殖に抑制効果があることも推測された。防御的腸内細菌叢をもたず、アイメリア原虫の感染機会が無く免疫を獲得できていない域外保全個体の野外放鳥は、事実上不可能であるとの仮説に至った。

本研究では、野生復帰させ得る資質を持つ生息域外個体群の創出と野生復帰法の確立を目的として、①本来の腸内細菌叢およびアイメリア原虫への抵抗力の獲得プロセスを再現した野生復帰個体の育成、②生息地の高山植生環境に配慮したソフトリリース方法の開発に向けて研究を実施する。鳥獣類の野生復帰への取組は基礎技術確立の後に、実地での野外試験段階が必須となる。そのため、さらに高まる気候変動や環境変動によるリスクに対応するためにも、本研究は緊急的な対策として位置づけられる。

2. 研究開発目的

本研究は、『ニホンライチョウに寄生するアイメリア原虫の病原性、感染性の解明と感染を防御する腸内細菌叢の解明と利用』というコンセプトにより、横断的に本種保全の課題解決の道筋を示すことにある。以下に、その目的の概要を示す。

①アイメリア原虫の病態解明および腸内細菌叢を活用した制御法の開発

野外個体群は、生息域内の広いエリアで高率にアイメリア原虫と呼ばれる消化管寄生原虫に感染していることが知られており、雛死亡の要因の一つと考えられる。しかし、人工繁殖個体は、衛生的な環境下で飼育されており、本原虫には未感染の状態である。したがって、野生復帰後において、野外で本原虫に感染する可能性が高く、生息域外個体群に抵抗性を持たせる必要があると考えられた。本研究では、アイメリア原虫のエリア別の感染動態およびその病原性、感染性を解明する。また、ニホンライチョウと同種別亜種となるスバルバルライチョウの雛にて、アイメリア原虫の低濃度経口感作により抵抗性を獲得させる技術を開発するとともに感染を防御する腸内菌叢を明らかにすることを目的とした。

②飼育下における野生型腸内環境の再現とこれを支持する人工飼料の抜本的な改良

動物園等におけるニホンライチョウの飼育ではウサギ用ペレットが主食とされている。しかし、野外個体群が主食とする高山植物は毒性アルカロイド等を含み、この分解にはライチョウ特有の腸内細菌叢が関与している。また、母鳥の盲腸糞の食糞により雛へ腸内細菌が伝播されていることが確認されているが、野外個体の盲腸糞中にはアイメリア原虫が存在するため、単純に飼育下で野外盲腸糞を食糞させる方法はとれない。このため、飼育下の雛の野生型腸内菌叢の確立を安全性をもって促し、野生の腸内環境を再現する人工飼料を開発することで、雛の生存率の向上を狙うと共に、野生復帰させ得る資質を持つ生息域外個体群の創出技術を開発する。同時に、野外型の腸内環境の獲得に適した人工飼料開発は、今後想定されるケージ保護による生息域内保全に活用する事により、この保護飼育に必要な高山植物の採取を減らし、生息地の高山植生環境への影響を最小限に抑える効果が期待される。

3. 研究目標

全体目標	ニホンライチョウ寄生性原虫の病態を明らかにし、その防除技術を提示すると共に、腸内細菌叢の構築により野生復帰させ得る資質を持つ生息域外個体群創出のための方策を提示する。
------	---

サブテーマ1	アイメリア感染を防除するワクチン開発
サブテーマリーダー /所属機関	松林 誠／大阪府立大学
目標	実験的感染によりニホンライチョウ寄生原虫の病原性を明らかにし、生息域内

	におけるアイメリア原虫の感染特性を提示し、野生復帰させ得る原虫耐性個体創出のための技術を提案する。
--	---

サブテーマ2	感染抵抗性をもつ野生型腸内細菌叢の解明と利用
サブテーマリーダー /所属機関	牛田一成／中部大学
目標	野生型腸内細菌叢の特性解析を行い、原虫感染抵抗性をもつ腸内細菌を同定し、野生型腸内環境構築に向けて、飼育下個体への糞便移植技術を開発し、その利用法を提示する。

サブテーマ3	野生型腸内環境を誘導する飼料開発
サブテーマリーダー /所属機関	長谷川雅美／東邦大学
目標	野生型腸内細菌叢の定着を支持し、野生下の食餌成分解析により科学的データをもとにした人工飼料の作成方法を提示し、生息域外における健全飼育を行うための方策を提示する。

4. 研究開発内容

サブテーマ1：アイメリア感染を防除するワクチン開発

生息域内で広く蔓延しているアイメリア原虫について、ニホンライチョウに代わる非絶滅危惧種鳥類をモデル生物として評価系を構築し、本原虫の病原性等の特性を明らかにするため、以下の解析を行った。ニホンライチョウと同じキジ目ライチョウ科のスパールバルライチョウを用いて原虫の感染病態を解析した。原虫の投与後、経口的に下痢や血便、沈うつ等の臨床症状の有無および増体を評価した。同時に、各種臓器、特に消化管を採取し、感染実験個体の全臓器の薄切標本を作製し、病理組織学的な解析を行い、病態をミクロレベルで評価した。さらに、野外株を用いた計画感染により獲得免疫の有効性を確認するため、以下の解析を行った。スパールバルライチョウによる病態基盤データから、原虫数を減らし投与することで免疫を惹起し、その後、症状を発現する原虫数により攻撃投与し、防御効果を評価した。野生復帰個体への原虫ワクチン株の安定的供給のために、ワクチン株の維持生産方法として発育鶏卵による原虫培養を実施し、その有用性を評価した。

サブテーマ2：感染抵抗性をもつ野生型腸内細菌叢の解明と利用

安全な糞便移植を行うため、日本アルプスに生息する野生ニホンライチョウの盲腸糞を採取し、フィルター濾過等を組み合わせることでアイメリア原虫の完全な除去法を構築した。鶏に寄生する原虫感染モデル系を用いて、除去後の糞液を投与したところ感染は確認されず、有用細菌のみを効果的に回収する手法を確立することができた。毒性化合物の分解能を有する等の有用細菌種のうち、5群（乳酸菌群、乳酸利用菌群、腸球菌群、連鎖球菌群そして大腸菌群）から細菌種を選抜した。上記の鶏感染モデル系において、原虫を含まない野生ライチョウ由来の有用細菌をあらかじめ鶏に経口接種し、定着能を確認したうえで、アイメリア原虫による攻撃試験を行った。その結果、細菌の定着により雛の体重減退を改善できる可能性が示された。

サブテーマ3：野生型腸内環境を誘導する飼料開発

野生と飼育個体の餌内容の栄養解析と腸内細菌が担う代謝経路を推定するため、日本アルプスの乗鞍岳や北岳においてライチョウの主要な餌植物を春、夏、秋そして冬に分けて採集した。これらの植物の一般栄養成分解析を行うとともに、NMR、LC/MSやGC/MSを用いて化学成分を同定し、含有する特異な化合

物のリストを構築した。また、野外個体が摂取している栄養成分を基に、一般的に流通し、入手が容易なものをベースとして代替飼料となるものを提示した。また、ライチョウが好んで摂取する高山植物には、抗原虫作用を有する二次代謝産物が含有されることを明らかにした。そして、ケージ保護を行ったニホンライチョウの新鮮盲腸糞について、LC/MSやGC/MS およびCE/MSによるメタボローム解析を行い、飼育下のライチョウとの成分含量を比較し、タンパク質の給餌過多である等、科学的論拠をもって現行の給餌方法の問題点を明らかにし、改善方法を提示した。

5. 研究成果

5-1. 成果の概要

生息域内のニホンライチョウの糞便調査から、現在もなお広い範囲でアイメリア原虫が存在することが分かった。スパーバルライチョウを用いた感染実験により、消化管内での本原虫の寄生増殖部位を特定できた。また、ライチョウが20,000個以上の原虫を摂取した場合、その個体は下痢、沈うつそして致死する事が分かった。しかし、摂取量が4,000個以下であった場合にはライチョウは発症せずに耐過し、獲得免疫が誘導され、その後に病態発現量の原虫に感染しても防除可能であることを明らかにした。これにより、少量感染によるワクチン防除技術の開発に向け、根拠となる基盤情報を得ることができた。生息域内の土壤環境中からは原虫は検出されなかったが、生息域内で実施された保護ケージ内の土壤は重度に汚染され、ケージ保護中に死亡した雛の消化管には多数の原虫が認められた。これらの知見をもとに生息域内、域外における保護活動での重度感染を防ぐための基本指針を提示できた。また、アイメリア原虫のワクチン株の安定供給に鶏卵による培養が有用である可能性を示す結果が得られた。令和3年度には、繁殖に向けて中央アルプスからニホンライチョウの2家族が2園館に移動された。2家族は既にアイメリア原虫に感染していたが、園館で衛生的な環境管理のもとで飼育されており、今後は生息域内と同様の感染状況を維持しつつ、繁殖後に家族内での自然伝播を誘導する計画である。一方で、個体の健康状態が悪化した場合を想定して駆虫薬の評価試験を行い、候補薬剤を選定できた。

これまでの解析により、野生下のニホンライチョウは特異な腸内細菌叢を有していることを明らかにした。野生復帰個体を作成するには、人工繁殖個体に野生下での生存に不可欠である腸内細菌叢を付与する必要がある。しかし、野生のニホンライチョウの腸内細菌を移植するためには、糞便中よりアイメリア原虫を取り除く必要がある。そこで、メンブレンフィルターを活用することにより細菌の損失を抑え、かつ原虫を簡便に除去できる手法を開発した。鶏の実験モデルにおいて、この原虫除去法により処理した糞液を生体の実験投与しても原虫感染が生じない事を確認し、安全性を実証することができた。また、野生ニホンライチョウの盲腸糞から、高山植物に含有される毒性化合物に耐性を有し、また難消化性食物繊維を分解できる腸内細菌を複数種単離することができた。これら有用細菌の分子生物学的解析により、新種となる細菌が含まれることが判明した。そして、これらの有用細菌の培養に適した培地組成も決定できた。この培養に必要な成分は、有用細菌の消化管内での定着にも必須である可能性が考えられた。ニホンライチョウより分離した有用細菌の一部を鶏の原虫感染モデルにより、その病態発現状況を評価した。その結果、本菌は原虫感染による体重減少を抑止できる可能性が示唆された。そして、ニホンライチョウの腸内有機酸解析により、野生下のライチョウは飼育下のものとは異なり、乳酸菌と乳酸利用菌の共生系が発達しており、酢酸とプロピオン酸濃度が高いことを明らかにした。これは、ライチョウの飼育において飼料の適正を判断できる有効な指標となることが分かった。

生息域内での行動分析により、ライチョウが好んで摂取している高山植物を選定し、1日当たりの栄養摂取量を算出することができた。そして、これら高山植物の栄養成分量を解析した結果、一次栄養解析については、ライチョウが好む高山植物は野菜よりも水分量が少なく、タンパク質や脂質等の一次代謝産物が多く含まれることが分かった。また、これらの植物は二次代謝産物として脂質、テルペン類、フェノール類、糖類を含有していたが、他の植物と比較してその含有量は少ない傾向があることを明らかにした。また、冬季の野生下のライチョウは体重減少がみられず、これは好んで摂取するダケカンバの冬芽が高栄養価であり、限られた採餌時間の中で効率よく栄養を取得していることが理由であることを

明らかにした。二次代謝産物であるトリアシルグリセリド、脂肪酸、フラボノイドそして植物ステロールの含有量から考察し、これら高山植物と類似する成分を有し、平地で栽培が可能な植物を選定し、提示した。野生型の腸内細菌叢の定着を支持するためにも、これらの成分が必須である可能性が考えられた。さらに、高嗜好性の高山植物には抗原作用を有する化合物が複数種含まれていることが明らかとなった。これらの摂取成分量を飼育下のライチョウの給餌内容と比較した。その結果、飼育下のライチョウはタンパク質を過剰に摂取していることが明らかとなり、飼育環境下での消費エネルギー量等も勘案したうえで、繊維量を高くする等、給餌量の調整を行う必要があることを提示した。以上の結果をふまえ、日本動物園水族館協会の協力を得て、副食の候補となる野菜について飼育下のライチョウへの給餌試験を実施し、キャベツや小松菜等の野菜が採餌行動において良好であることが分かった。野生復帰個体を創出する際に人工飼料の配合法の確立は極めて重要な項目であり、これらの研究成果は、ライチョウの適正な飼育状況を維持し、適正な腸内環境を構築するうえで、重要な科学的基盤情報となった。

5-2. 環境政策等への貢献

<行政等が既に活用した成果>

令和元年、2年そして3年度のライチョウ野生復帰検討ワーキンググループおよびライチョウ保護検討会において、本研究で実施した最新の成果を提示し、中央アルプスにおけるライチョウの野生復帰実施計画（令和3年4月）の作成に反映され、生息域内および域外保全方法の改善に大きく貢献した。特に、アイメリア原虫の実験感染による病態について解説を行い、生息域内での感染状況や保護ケージ内や飼育環境中での汚染状況を報告し、その対策の必要性を喚起した。また、腸内細菌叢の構築に向けた有用細菌の飼育現場での試験的投与を提案し、さらに野生復帰個体の創出のための飼育方法について給餌内容の問題点を提示し、改善策を示した。域外保全を担当する日本動物園協会生物多様性委員会のライチョウ域外保全プロジェクトチームには、飼育下での調査や試験について提案し、そのデータをプロジェクトチーム内で迅速に公開し、情報を共有することで飼育技術の確立に向けて大きく貢献することができた。さらに、令和4年度以降に実施予定のライチョウの野生復帰事業において、飼育個体の事前チェック項目は本課題の成果が基準となっている。

<行政等が活用することが見込まれる成果>

ニホンライチョウの野生復帰個体の創出には、野生型の腸内細菌叢の構築、そしてアイメリア原虫に対する防除能の付与が必要である。この必要性は令和3年度のライチョウ保護増殖検討会において議論され、了承された。本研究課題は令和3年度で終了となるが、令和4年度には動物園に移動させたライチョウの家族を繁殖させ、復帰個体群として生息域内に移送することが計画されている。この移送事業は初めての試みとなるが、当研究課題で開発した技術や情報が最大限、活用される見通しである。また、本研究により明らかにした野生個体が保有する腸内環境、再構築の必要性、そして希少動物の保全に繋げる試みは、今後、世界の別種動物の復帰個体創出においても活用されると期待できる。

5-3. 研究目標の達成状況

全体目標として、生息域内でのケージ保護および生息域外における飼育において、ライチョウ雛の成育効率および生存率を向上させるべく、雛の腸内環境整備を行い、野生復帰させ得る資質を持つ生息域外個体群の創出と野生復帰法を確立する、と設定した。本目標は、3つのサブテーマに大別され、研究が実施された。サブテーマ1では、「ニホンライチョウ特異的アイメリア原虫の病原性、感染性の解明とワクチンを利用した防御法の開発を行う」ことを目標としたが、これまで不明とされていたニホンライチョウに寄生するアイメリア原虫の病態を同種別亜種の実験モデルにより明らかにし、ワクチンとして活用できる投与量を決定し、野生復帰個体への免疫付与の必要性和野生下の状況を模倣した飼育形態による軽度感染の実施指針を提唱できた。サブテーマ2では、「野外個体由来の腸内細菌の

原虫感染防除効果を実験感染系で判定し、感染抵抗性に関与する腸内細菌の移植法を確立する」を目標とした。野生型の腸内細菌叢を移植し、構築するため、糞便中のアイメリア原虫を除去する方法を開発することができた。野生下のニホンライチョウから複数種の有用細菌を分離し、さらにその培養法を構築する等、想定以上の成果を捻出することができた。サブテーマ3では、目標として、「ニホンライチョウの健全飼育のため、腸内細菌叢の定着を維持促進し、アイメリア原虫の感染を防除する最適な給餌成分の解明とその評価を行う」と設定した。ニホンライチョウが好んで喫食する高山植物の成分分析により、その組成を明らかにし、その中には抗原虫作用を有する化合物が複数種含まれている事を明らかにした。また、適正な人工飼育のため、現行の給餌法の問題点を提示し、成分が類似する代替餌となりえる野菜や人工配合飼料を提示する等、野生復帰個体の創出に向け大きく貢献することができた。以上より、達成状況としては、想定以上の成果をえることができたと考えられた。

課題管理については、環境省主催のライチョウ野生復帰検討ワーキンググループやライチョウ保護増殖検討会、そして動物園水族館協会主催のライチョウ飼育管理検討会議等に積極的に参加し、最新の情報を収集することに努めた。また、これらの会議において、当研究課題の最新の成果を提示し、多様な分野の専門家そして環境省の担当者から意見や助言を聴取し、より深い考察に活用し、また適時、適切に研究実施内容に盛り込み、より効率的な成果の捻出のために改善を行った。研究体制については、これらの各種会議において意見を取り入れるのみならず、複数の専門家に研究協力者として参画頂き、最適な実験材料の準備と提供を頂き、最良の方法で研究を遂行した。日本動物園水族館協会には多大な協力を頂き、研究実施場所や研究材料を無償で提供頂く等、研究資金の効率的な運用、節減にも貢献頂いた。

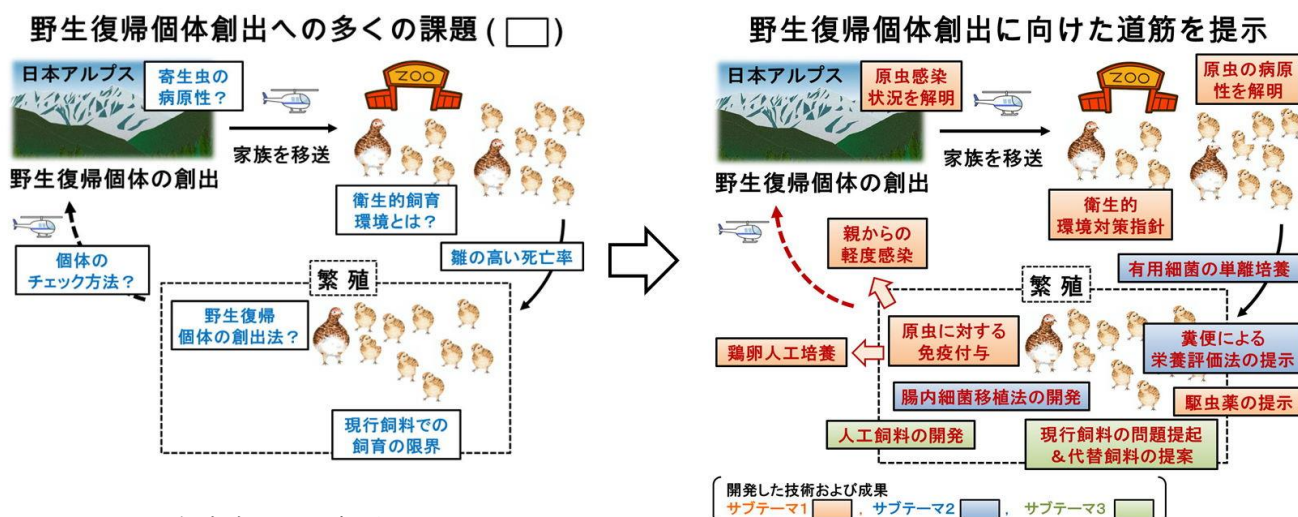


図0. 1 研究達成状況の概略図

6. 研究成果の発表状況

6-1. 査読付き論文

<件数>

4件

<主な査読付き論文>

- 1) M. MATSUBAYASHI, A. KOBAYASHI, M. KANEKO, M. KINOSHITA, S. TSUCHIDA, T. SHIBAHARA, M. HASEGAWA, H. NAKAMURA, K. SASAI, and K. USHIDA: Int. J. Parasitol. Parasites Wildl. 15, 225-230 (2021) (IF:2.7) Distribution of *Eimeria uekii* and *Eimeria raichoi* in cage protection environments for the conservation of Japanese rock ptarmigans (*Lagopus muta japonica*) in the Japanese Alps.

- 2) M. MATSUBAYASHI, M. KINOSHITA, A. KOBAYASHI, S. TSUCHIDA, T. SHIBAHARA, M. HASEGAWA, H. NAKAMURA, K. SASAI, K. USHIDA: Int. J. Parasitol. Parasites Wildl. 12, 19-24 (2020) (IF:2.7) Parasitic development in intestines and oocyst shedding patterns for infection by *Eimeria uekii* and *Eimeria raichoi* in Japanese rock ptarmigans, *Lagopus muta japonica*, protected by cages in the Southern Japanese Alps.
- 3) S. OKA, R. KUNIBA, N. TSUBOI, S. TSUCHIDA, K. USHIDA, S. TOMOSHIGE, and K. KURAMOCHI: Biosci. Biotechnol. Biochem. 84 (1), 31-36 (2020) (IF:2.0) Isolation, synthesis, and biological activities of a bibenzyl from *Empetrum nigrum* var. *japonicum*.
- 4) A. KOBAYASHI, S. TSUCHIDA, A. UEDA, T. YAMADA, K. MURATA, H. NAKAMURA, and K. USHIDA: J. Vet. Med. Sci. 81 (9), 1389-1399 (2019) (IF:1.3) Role of coprophagy in the cecal microbiome development of an herbivorous bird Japanese rock ptarmigan.

6-2. 知的財産権

特に記載すべき事項はない。

6-3. その他発表件数

査読付き論文に準ずる成果発表	8 件
その他誌上発表（査読なし）	6 件
口頭発表（学会等）	8 件
「国民との科学・技術対話」の実施	9 件
マスコミ等への公表・報道等	3 件
本研究に関連する受賞	2 件

7. 国際共同研究等の状況

Dr. Karl Skirnisson（アイスランド大学・アイスランド）をカウンターパートとし、北欧のライチョウで病害が報告されているアイメリア原虫とニホンライチョウの同原虫について、遺伝子解析により塩基配列を明らかにすることより分子系統解析を実施した。その結果、両地域のアイメリア原虫は遺伝子学的に同種または極めて近縁であることを明らかにした。これにより、ニホンライチョウを用いた感染試験による病態解析には限界があるため、北欧における同原虫の病態を考察することができた。ニホンライチョウにおいて対策を講じるうえで、重要な根拠の一つとなった。今後は、新型コロナウイルスが落ち着けば、北欧のライチョウをニホンライチョウの感染モデルとして詳細な病態解明に向けた解析を行うことを計画している。

8. 研究者略歴

研究代表者

松林 誠

大阪府立大学農学部獣医学科卒業、博士（獣医学）、大阪夕陽丘学園短期大学 准教授、独立行政法人 農業食品産業研究機構 動物衛生研究所 主任研究員を経て、現在、大阪府立大学大学院 生命環境科学研究科 獣医学専攻 教授。

研究分担者

1) 笹井和美

大阪府立大学農学部獣医学科卒業、農学博士、大阪府立大学大学院助手、講師、助教授を経て、現在、同大学大学院 生命環境科学研究科 獣医学専攻 教授。

2) 牛田一成

京都大学農学部卒業、農学博士、京都府立大学教授を経て、現在、中部大学創発学術院兼務、応用生物学部教授。

3) 土田さやか

京都府立大学大学院 生命環境科学研究科 応用生命科学専攻 博士後期課程修了、博士（農学）、京都府立大学特任講師、中部大学創発学術院特任講師を経て、現在、創発学術院兼務、応用生物学部講師。

4) 長谷川雅美

東邦大学理学部卒業、博士（理学）、千葉県立中央博物館上席研究員を経て、現在、東邦大学理学部教授。

5) 倉持幸司

東京理科大学薬部卒業、農学博士、京都府立大学准教授を経て、現在、東京理科大学理工部教授。

Ⅱ．成果の詳細

Ⅱ－１ アイメリア感染を防除するワクチン開発

大阪府立大学大学院 生命環境科学研究科

松林 誠

＜研究分担者＞

大阪府立大学大学院 生命環境科学研究科

笹井和美

＜研究協力者＞

信州大学

中村浩志

東邦大学理学部

小林 篤、飯島大智

富山市ファミリーパーク公社

秋葉由紀

長野市茶臼山動物園

田村直也、山上達彦

那須どうぶつ王国

佐藤哲也、原藤芽衣

〔要旨〕

サブテーマ1では、生息域内に広く存在するアイメリア原虫についてその病態を明らかにし、防御免疫による発症予防効果およびその方法を確立し、病害を制御した人工繁殖による野生復帰個体の創出への道筋を示すことにある。生息域内での調査の結果、野生下のライチョウは現在もなお、広い範囲でアイメリア原虫に高率に感染していることが明らかとなった。生息域内の土壌の汚染状態は極めて軽度であり、感染は雛の直接および間接的な接触を含む糞口感染が主な経路である可能性が示唆された。スーパーバルライチョウを用いた感染実験では、おおよそ 10^4 個以上の原虫を摂取した場合、下痢や沈うつが生じ、場合により致死することが分かった。一方、 10^2 – 10^3 個の原虫による感染では雛は耐過し、その後、病態発現量を摂取しても発症せず、獲得免疫が防除に有効であることが分かった。また、ライチョウに寄生するアイメリア原虫は冬季においても感染し続けており、夏季に向けて体内で増殖を開始する可能性が示され、園館内での繁殖期以後の原虫の感染動態は注視する必要がある。野生復帰個体への軽度感染を行うためのワクチン株の調整には鶏の有精卵が有効であると考えられた。以上より、野生復帰個体の創出に向けた原虫対策に関わる一連の防除方法を科学的データをもって提示することができた。

1. 研究開発目的

日本アルプスに生息するニホンライチョウには、アイメリア原虫と呼ばれる寄生虫が感染していることが過去に報告されていた^{1, 2)}。このアイメリア原虫は牛や鶏等の家畜および野生動物等、数多くの動物種から報告されている。一般には、アイメリア種により感染する動物種は限られている。感染した個体は、下痢や血便等の消化器症状を呈し、幼若獣では増体が低下する等の健康被害が生じ、病原性の高い種ではそれは致死となる。例えば、鶏に寄生するアイメリア原虫は全7種存在し、養鶏産業において最も重要な寄生虫とされている。アイメリア原虫は感染個体から糞便と共に排出され、これを経口的に摂取することで感染する。排出された原虫は長期間、感染源として環境中で生存することができ、各種消毒薬に対して極めて強い耐性を有する。一旦、アイメリア原虫に飼育環境が汚染された場合、完全に清浄化することは極めて困難となる。

これまでに我々はニホンライチョウの生息域内において調査を実施し、ライチョウは2種類のアイメリア原虫に高率に感染しており、これは地域差はなく幅広いエリアにおよぶこと、さらに成鳥よりも雛において重度に感染していることを明らかにしてきた³⁾。そして、これらのアイメリア原虫は、ライチョウが生息する寒冷地に適応した特性を有することが分かった。分子系統樹解析において、2種のアイメリア原虫のうち*E. uekii* は鶏のアイメリア種と遺伝的に近縁であり、もう1種は新種として*E. raichoi* と命名し、シチメンチョウに寄生する種と近縁であることを明らかにした⁴⁾。第一期ライチョウ保護増殖事業実施計画において、生息域内でケージ保護が実施されていたが、例年、保護中に雛の死亡が確認され、病理組織解析においてアイメリア原虫による感染が直接または間接的な要因の1つである可能性が示唆された⁴⁾。

以上の所見は、今後、ニホンライチョウの保全活動を実施していくうえで、アイメリア原虫への対策の重要性を示唆するものである。そこで、サブテーマ1においては、まずは野生復帰個体の生息地となる日本アルプスにおいて、アイメリア原虫の経年的な感染および汚染状況を把握するため、野生個体および環境中の土壌の検査を実施した。また、ライチョウ家族の保護および繁殖個体の確保、そして放鳥時のソフトリリースの要となるケージ保護について、保護中のライチョウの感染動態およびケージ内の土壌の調査を行った。また、アイメリア原虫の病原性を明らかにするために、ニホンライチョウと同種別亜種となるスバルバルライチョウを用いて病態を解析した。また、同実験モデルを用いて、スバルバルライチョウにアイメリア原虫を軽度感染させ、免疫付与を行い、その後、病態発現量の実験投与により免疫獲得効果を検討した。そして、園館内での繁殖に際し、アイメリア原虫の他種展示鳥類へ拡散するリスクを評価し、またアイメリア原虫のワクチン株の確保のために他種鳥類の活用を検討するため、複数種の鳥類で感受性試験を行った。また、生体を使用せずにアイメリア原虫株を増殖させ、ワクチン株を安定的に確保するために、鶏の有精卵を用いて同原虫の培養を試みた。

2. 研究目標

ニホンライチョウ寄生性原虫の病態を明らかにし、その防除技術を提示すると共に、腸内細菌叢の構築により野生復帰させ得る資質を持つ生息域外個体群創出のための方策を提示する。サブテーマ1の目標は、実験的感染によりニホンライチョウ寄生原虫の病原性を明らかにし、生息域内におけるアイメリア原虫の感染特性を提示し、野生復帰させ得る原虫耐性個体創出のための技術を提案する。

3. 研究開発内容

3-1 生息域内でのアイメリア原虫調査（野生個体および土壌環境）

生息域内の野生個体；2019年4月-10月、乗鞍岳他に生息するニホンライチョウの糞便237検体、5-6月に中央アルプスで生息が確認されている1個体（飛来雌1個体）8検体の計245の糞便検体を採取した。2020年は5月-10月に乗鞍岳他のニホンライチョウの糞便48検体と中央アルプス（飛来雌1個体および乗鞍移植家族）の7検体、計55検体を採取した。2021年は5-8月に乗鞍岳のニホンライチョウの糞便34検体、4-5月には中央アルプスで10検体（飛来雌1個体を含む）を採取した。検査方法は、ショ糖遠心浮遊法により糞便検査を実施し、陽性検体についてはOPG（Oocyst per gram；糞便1gあたりに含まれる原虫数）を計測した。

生息域内の環境調査；ニホンライチョウに寄生するアイメリア原虫の環境分布状況を調査するため、2019年5-6月に魔王岳、高天原他、乗鞍岳の土壌、9検体を採取した。2020年には、5-8月に中央アルプスの4箇所のエリアで43検体を採取した（エリアA 4検体；2020年に雌個体が確認された場所、エリアB 16検体；2018年まで雌個体の生息が確認された場所、エリアC 9；かつては生息したと推測されるが2018-2020年には雌個体の生息が確認されなかった場所、エリアD 14検体；個体の生息が確認されていない場所）。方法は5-80gの土壌を用いてTween 20 水で30分間攪拌し、金メッシュで濾過した後、ショ糖遠心浮遊法により原虫を精製、濃縮し、顕微鏡下で原虫の有無を検査し、1g当たりの原虫数を計測した。

3-2 ケージ保護におけるアイメリア原虫調査

ケージ保護家族の調査結果；2019年7-8月の北岳でケージ保護を実施した3家族の92検体を採取し、同様に原虫感染を調査した。2020年度は3家族で25検体、2021年度は5ケージ6家族で102検体を調査した。2021年にはこのうち2家族を茶臼山動物園と那須どうぶつ王国にそれぞれ移送した。

ケージ内の土壌調査；2019年度はケージ保護期間中にケージ内の土壌13検体を採取した。2020年度は、乗鞍および中央アルプス（8月1日に乗鞍から家族を移送）の2個所に設置した3つのケージ内でそれぞれ10検体、その周辺の土壌13検体、合計73検体を採取した。原虫の分布状況をより詳細に解析するためにケージ内を10区画に分けて採材した。

3-3 2園館に移送後のアイメリア原虫調査

ケージ保護家族の調査結果；2021年に茶臼山動物園、那須どうぶつ王国に移送した2家族について、移送した8月3日以後、継続的に糞便を採取し、原虫感染動態を調査した。

ケージ内の土壌調査；移送家族のアイメリア原虫による重度感染を防除するため、茶臼山動物園の飼育環境から13検体、那須どうぶつ王国から10検体を採材し、2園館での飼育環境の衛生状態を調査した。

3-4 感染モデルを用いたアイメリア原虫の病態解析

スパーバルライチョウの雛にアイメリア原虫を実験投与し、その病態解析を実施した。雛の確保は、2019年度、孵卵開始前に卵を輸送した場合、孵化率が著しく低い結果となった。そこで2020年度は、動物園館で孵卵を開始し、孵卵開始後18日齢までに卵を携行式孵卵器により陸路にて移動させることとした。野生のニホンライチョウの感染便より精製したアイメリア原虫を10%の次亜塩素酸ナトリウム溶液で5-10分間処理し、オーシスト以外の微生物を処理した。この精製原虫を孵化したスパーバルライチョウの雛、5-6日齢時に投与した。感染試験群は以下、表1. 1の通りである。

表1.1 スパーバルライチョウによる感染評価試験

投与条件	羽数	16日目までに死亡 (その内、足奇形等)	臨床症状等
<i>E. uekii</i> (<i>E. raichoi</i>)			
4×10^4 群 ($17-0.2 \times 10^3$)	5	4 (1)	増体減、下痢
2×10^4 群 (8×10^3)	3	1 (0)	増体減、下痢、沈うつ
4×10^3 群 ($17-0.2 \times 10^2$)	4	2 (1)	活発に活動
4×10^2 群 ($17-0.2 \times 10$)	4	1 (0)	活発に活動
<i>E. raichoi</i>			
4×10^4	2	2 (2)	活発に活動
PBS	4	1 (1)	活発に活動

3-5 アイメリア原虫の軽度感染による防除効果試験

アイメリア原虫に軽度に感染し、耐過した個体の免疫獲得能を評価した。評価は、スパーバルライチョウを用いて行った。ワクチン群としては、5-6日齢時にアイメリア原虫(2羽は*E. uekii*； 4×10^3 、*E. raichoi*； $17-2 \times 10^2$ 、1羽は*E. uekii*； 4×10^2 、*E. raichoi*； 2×10^1)を計3羽に投与した。非ワクチン群としては、5-6日齢時にPBSを投与した2羽を比較対象とした。その後、攻撃試験として、32-33日齢時にアイメリア原虫を(*E. uekii*； 4×10^4 、*E. raichoi*； $1.7-2.6 \times 10^4$)を5日間連続で投与した。臨床症状および体重測定を実施した。

3-6 他種動物を用いた交差感染試験

ライチョウに寄生するアイメリア原虫について、園館内での繁殖時、他種の展示動物への感染リスクを評価する必要がある。また、ライチョウ以外での鳥類での感染が確認できれば、その鳥種で原虫株を維持し、ワクチンとしての供給ができる。そこで、本試験では、主にキジ目の他種鳥類、各種鶏、ウズラおよびキジ等、合計38羽の孵化後の雛にニホンライチョウ由来のアイメリア原虫(*E. uekii*； 2×10^4 、*E. raichoi*； $1.2-8.3 \times 10^3$)を経口投与し、糞便検査により感染性を調査した。

3-7 ライチョウ由来アイメリア原虫の駆虫薬の選定

野生復帰個体の創出に向けた繁殖の際、アイメリア原虫に感染している個体の健康状態が悪化した場合を想定し、鶏等で使用されているいくつかの駆虫薬を用いた評価試験を行った。*E. uekii* (2×10^4 個)および*E. raichoi* (3.2×10^3 個)を7-8日齢のスパーバルライチョウの雛に投与した。使用した薬剤は、トルトラズリル (0.25mg/羽、原虫投与2日後に1日おきに3回経口投与)、エクテシン (0.05%で原虫投与2日以後、8日間飲水投与)そしてラサロシド (200ppmとして原虫投与2日以後2週間飼料添加)とし、各群1羽を使用した。評価は、増体および糞便中の原虫数により行った。

3-8 鶏の有精卵を用いたアイメリア原虫培養法

これまでの解析により、野外復帰個体の創出にはこのアイメリア原虫に対する耐性を付与する必要があることが示唆された。しかし、人工的に軽度に感染させる原虫株の入手は、今のところ、生息域内で採取した便に依存している。そこで、実験室内で時期を選ばず柔軟に対応でき、安定的に原虫ワクチン株を入手するため、以下の解析を実施した。鶏の有精卵を37.5℃で孵卵を開始し、9日目で游出処理後の

アイメリア原虫の虫体を 10^3 個および 10^4 個を尿漿膜腔内に接種し、10、11、12日目に割卵し、発育の有無を顕微鏡下で確認した。なお、虫体接種後は、 39°C または 41°C で培養した。

4. 結果及び考察

4-1 生息域内でのアイメリア原虫調査

生息域内の野生個体；2019年度の調査では、乗鞍岳等のライチョウの原虫陽性率は35.1%-54.3%であった。中央アルプスの飛来1個体も陽性であることが分かった。4月-10月の月別では夏季に向けて陽性率は上昇した。中央アルプスの1個体については、*E. uekii* および*E. raichoi* の2種類共に検出され、OPGは夏季に向け上昇し、6月には最高で*E. uekii*で 1.5×10^5 個、*E. raichoi* では 1.3×10^4 個となった。中央アルプス由来のアイメリア原虫の遺伝子解析が成功し、決定できた18S rRNA 遺伝子領域の部分塩基配列を比較した結果、その配列は日本アルプスの他の生息地のものと100%一致した。2020年度の調査結果は、80検体中55(68.8%)でアイメリア原虫が確認された。乗鞍の個体では7/18 (38.9%)、立山では14/18 (77.8%)、乗鞍のケージ保護個体は25/25 (100%)、中央アルプスでは3/7(42.9%) (飛来雌1個体の3検体で陽性は0、乗鞍移植家族の5羽の群れ4検体中陽性は3)、そして情報不明個体は5/12(41.7%)であった。2021年度の結果は、4-5月の中央アルプスでは10検体中5検体(50.0%)、5-8月の乗鞍岳では34検体中5検体(14.7%)でアイメリア原虫による感染が陽性であった。これらの陽性率は過去の調査結果と比べてほぼ同様であり、直近の3年間に於いても、生息域内の個体で現在もなおアイメリア原虫が高率にかつ広く蔓延していることが分かった。人工繁殖個体を導入した後、これらの原虫に感染することが想定される。原虫の病態を明らかにし、その高低により繁殖個体への対策を講じる必要があると考えられた。

生息域内の環境調査；2019年の魔王岳等の土壌9検体中2検体で原虫が検出された。しかし、1gあたりの原虫数は0.06~0.25個とごく少量であり、形態的に原虫の内部構造は不明瞭で完全に成熟しておらず、感染性はないものと推測された。2020年度に中央アルプスで採材した土壌は、全43検体全て原虫は確認されなかった。以上より、調査した範囲において、土壌中に原虫が混在し、ライチョウの感染源となる可能性は低いことが示唆された。

4-2 ケージ保護におけるアイメリア原虫調査

ケージ保護家族の調査結果；2021年、北岳でケージ保護を実施した3家族の92検体を調査した結果、84検体(91.3%)が陽性であることが分かった。特に*E. uekii* で陽性率が高く、雛は孵化後3日目より原虫が検出され、その後、OPGは徐々に上昇し、最高で 2.5×10^6 に達した。*E. raichoi* は*E. uekii* と比較して検出率は低く、OPGも低値であった⁵⁾。2019年度は例年と異なり、死亡個体は出なかった。スバルバルライチョウを用いた実験感染において(後述)、下痢や沈うつ、死亡がみられたが、今回のケージ保護と実験感染の発症の違いを考察すると、親鳥の食糞による腸内細菌叢の構築、さらに餌である高山植物が異なっており、これらの要因が原虫の増殖または病態に関連している可能性が考えられた。これら3つの腸内環境が整った場合、発症が防げる可能性があると考えられた。

2020年度は3家族で25検体を検査したが、全検体で原虫が確認された(100%)。OPGは親鳥で最大 2.4×10^5 (*E. uekii*)、雛で 2.7×10^4 (*E. uekii*)であった。2020年度、ケージ保護された22羽の雛のうち、6羽が死亡し、4羽を病理組織解析に供した。死後変化が重度に起こっており、詳細な病理学的所見は得られなかったが、免疫染色の結果、2羽の雛で消化管のほぼ全域にわたって重度の原虫感染が認められた⁶⁾。

2021年度は中央アルプスでケージ保護された6家族について、合計102検体の糞便の検査を行った。その結果、41検体(40.2%)が陽性であり、全家族において原虫による感染が確認された。先に親鳥が感染しており、その後、遅れて雛が感染していた。感染後、糞便中の原虫数は徐々に増加してピークとなり、その後、下降した。移送前のケージ保護期間中に計10羽の雛が死亡しており、うち8羽の消化管からアイメリア原虫の感染が確認された。一般的に、原虫感染による病態発現は摂取した原虫数と相関すると考えられ、ケージ内で原虫の重度感染が起こった可能性があると考えられた。その後、2園館に移送する2家族の移送時のOPGは、約100前後と低下していた。

ケージ内の土壌調査；2019年度に採取したケージ内の土壌全13検体から原虫が検出された。OPGは3ケ

ージ共に8-9月において最高となり、 10^3 個以上であった。検出された原虫は成熟しており、形態的に内部構造が明瞭に確認でき、感染性は維持されていると考えられた。2020年に採材したケージ内の土壌の検査結果は、60検体中全て陽性であり、全ケージの土壌から原虫が検出された。一方、ケージ外の土壌では検出率は低く、13検体中3検体が陽性であったがOPG (1-2)は低値であった。乗鞍のケージと中央アルプスのケージ内の比較では、いずれのケージにおいても後者で平均OPGは低下したものの、感染性を有する孢子形成後のオーシストの割合は上がっていた。中央アルプスでは採材日まで天候が良好で気温が上昇していたことが理由と考えられた。ケージ内の場所別では、ケージの奥、特にねぐらにしていたエリアにおいて多量の原虫が検出される傾向にあった。また、検出されたオーシストは形態的に変形等が見られず、明瞭な形態を維持しており、感染性を有していると考えられた。

4-3 2園館に移送後のアイメリア原虫調査

ケージ保護家族の調査結果；2021年に2園館に移送した2家族は、移送後も継続して、原虫に感染していることが確認されたが、安定して低値で推移した。この結果から、ニホンライチョウに感染したアイメリア原虫は、これまでの概念を覆し、陰転することなく、冬季においても感染が継続していることが初めて明らかとなった。

これまで実施した野生下のニホンライチョウの調査では、夏季に向けて感染率およびOPGが増加することが分かっている^{3, 4)}。来年度、2園館で繁殖を行うことが計画されているが、繁殖家族のOPGの動態を継続して監視する必要がある、またOPGが高値となる、または個体の健康状態が悪くなった場合に備え、駆虫薬の選定を行っておく必要がある（後述）。

生息域内のニホンライチョウはアイメリア原虫に高率に感染していることを考慮すると、野生下で感染しても生存できる個体の創出には、原虫に軽度感染し、免疫を獲得している必要があると考えられる。理想としては生息域内に近い状況に配慮して繁殖を行う場合、重度感染を防止しつつ、親鳥となるライチョウが継続して軽度感染した状態が維持され、雛に伝播することが望ましい。しかし、飼育下で感染の程度を制御することは実際には難しい場合があり、アイメリア原虫を適時、安定的に供給する意味では生息域内からその都度、糞便を採取し調整する手法はリスクもある。そのため、アイメリア原虫のワクチン株の安定供給および維持管理のため、他種鳥類または鶏卵培養による技術開発に向けた解析を実施した（後述）。

ケージ内の土壌調査；2園館での飼育環境中の土壌を検査した。その結果、茶臼山動物園の土壌13検体中6検体、那須どうぶつ王国で10検体中8検体で陽性であった。しかし、茶臼山ではOPGは2以下、那須どうぶつ王国では植木の下あたりで324.9と高値であったが、それ以外では1以下と低値であり、比較的、衛生状態は良好に保たれていることが確認できた。

4-4 感染モデルを用いたアイメリア原虫の病態解析

E. uekii を 10^4 個以上投与した群では増体減や下痢、沈うつ等の症状が確認された。 4×10^4 投与群5羽中4羽(内1羽は足が奇形)、 2×10^4 投与群3羽中1羽が死亡した。それ以外の投与群では、足の奇形や原因不明の死亡はみられたが、いずれも死亡前日までは活発に活動していた。計日的な増体を図1. 1

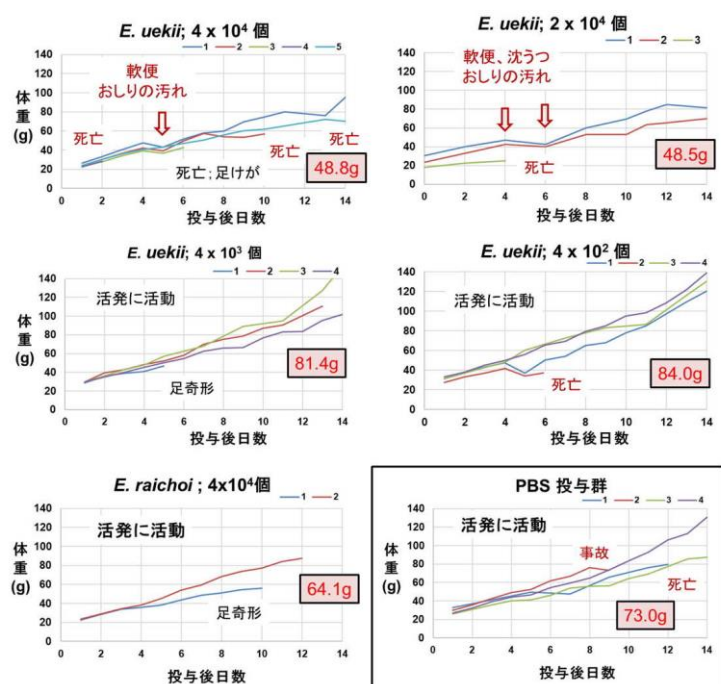


図1.1 アイメリア投与群別の増体

*表中の赤数字は
投与後12日目の増体平均

に示す。投与後12日目の平均は、*E. uekii* を 10^4 個以上投与した群では40g台であり、それ以外では、64.1-84.0gという結果であった。2羽のみの結果であり、確定には再実験が必要であるが、 10^3 個および 10^2 個投与群で増体は最も大きかった。

病理組織解析については、*E. uekii* を 10^4 個以上投与した群では、十二指腸から回腸、そして盲腸に増殖中の多数の原虫が確認された。寄生部位は、腸管粘膜上皮細胞そして上皮に近い粘膜固有層であった。ニホンライチョウを十分な羽数を用いて感染実験を行うことは困難であるため、スパーバルライチョウによる感染実験では、*E. uekii* をおおよそ 10^4 個以上摂取した場合、増体減、下痢そして沈うつ等の症状が発現し、場合により致死する可能性が示唆された。

4-5 アイメリア原虫の軽度感染による防除効果試験

ワクチンによる効果試験の結果、図1. 2に示す通り、非ワクチン群では2羽共に連続投与後に泥状の下痢便および軟便を呈し、死亡した。一方、少数投与群においては、*E. uekii* の 10^2 個投与では攻撃投与直後は増体に影響は出たものの、3羽共に活発に活動し、その後も生存した。組織切片の観察では、非ワクチン群では消化管全域に増殖中の原虫が多数確認されたが、少数投与群では増殖が抑えられ、軽度の感染であった。以上の結果は、限られた羽数での試験結果である点には留意する必要があるものの、少数投与により、原虫に対する防御免疫が誘導され、その後、病態を発現する量の原虫を接種しても耐過できることが示唆された。

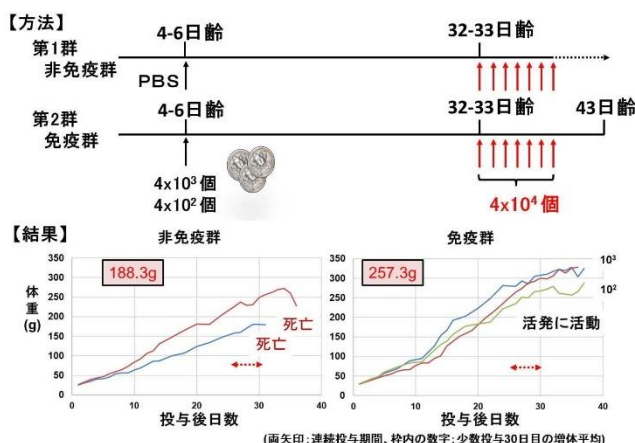


図1.2 スパーバルライチョウでの軽度感染によるワクチン効果試験

4-6 他種動物を用いた交差感染試験

交差感染試験の結果、*E. raichoi* のみシチメンチョウに感染が成立し、遺伝子解析の結果、投与したニホンライチョウのものと一致した。遺伝子学的に*E. raichoi* はシチメンチョウのアイメリア種と近縁であることが分かっている⁴⁾。しかし、オーシストの排出量は最大でも2,000個/gであり、感受性が低い可能性が示唆された。*E. uekii* については、供試鳥類においては感染は確認されなかった。以上の結果から、ニホンライチョウに寄生するアイメリア原虫は、シチメンチョウを除き今回調査した鳥類には感染しないことが明らかとなり、他種鳥類への感染リスクは低い可能性が考えられた。

4-7 ライチョウ由来アイメリア原虫の駆虫薬の選定

駆虫試験の結果、増体はトルトラズリルが最も良く、ラサロシドとエクテシンで悪かった。しかし、トルトラズリルではOPGにほぼ変化がなく高値を示し、殺虫効果が低い事が分かった。ラサロシドはピークのOPGはトルトラズリルの約1/2に減少し、エクテシンでは投与期間中は最も低値であった。以上の結果から、エクテシンまたはラサロシドは腸内細菌にも作用するとされるが、ライチョウの健康状態が悪化した場合には、抗原虫薬としては両薬剤が有効であることが示唆された。

4-8 鶏の有精卵を用いたアイメリア原虫培養法

10、11、12日目に割卵し、尿漿膜内、尿漿膜腔液、卵黄および卵白を個別に採取し、原虫の発育の有無を顕微鏡下で確認した。 10^3 個投与群では、いずれの部位にも虫体は確認できなかった。しかし、 10^4 個投与群では、 41°C 、 39°C 群で尿漿膜内の血管周囲において発育する原虫様の虫体を確認することができた。今後、免疫染色および遺伝子解析により確認が必要であるが、ニホンライチョウへの原虫ワクチン株に人工培養に鶏卵が有用である可能性が示唆された。

5. 研究目標の達成状況

サブテーマ1の目標は、「ニホンライチョウ特異的アイメリア原虫の病原性、感染性の解明とワクチンを利用した防御法の開発を行う」とした。本研究期間において、アイメリア原虫の病原性は経口的に摂取した原虫量に依存すること、また軽度な感染により防御免疫能を獲得できることを具体的な原虫数をもって提示できた。科学的論拠を提示すると共に、繁殖個体創出のための感染防除指針および免疫獲得法を提示することができた。アイメリア原虫のワクチン株として、野生ライチョウ由来のみならず鶏の精卵による培養法を提案することができた。以上より、想定していた目標以上の成果が得られたと評価した。

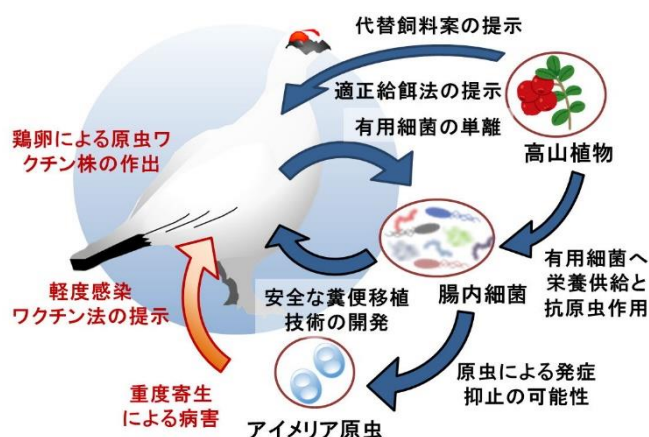


図1. 3 サブテーマ1の研究目標の達成状況の概略図

6. 引用文献

- 1) K. KAMIMURA, H. KODAMA (1981) *Eimeria uekii* sp. n. from *Lagopus mutus japonicus* (Clark) in Mts. Tateyama, the Japan Alps. Jap. J. Parasitol. 30, 467-470.
- 2) ISHIHARA S, SHIIBASHI T, SATO Y, MURATA K, NOGAMI S. (2006) Two *Eimeria* species isolated from wild Japanese rock ptarmigans (*Lagopus mutus japonicus*) in Japan. J Vet Med Sci. 68(9), 991-993.
- 3) M. MATSUBAYASHI, S. TSUCHIDA, K. USHIDA, K. MURATA (2018a) 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. Int. J. Parasitol. Parasites Wildl. 7(2), 134-140.
- 4) M. MATSUBAYASHI, S. TSUCHIDA, A. KOBAYASHI, T. SHIBAHARA, H. NAKAMURA, K. MURATA, K. USHIDA (2018b) Molecular identification of two *Eimeria* species, *E. uekii* and *E. raichoi* as type B, in wild Japanese rock ptarmigans, *Lagopus muta japonica*. Int. J. Parasitol. Parasites Wildl. 7(3), 243-250.
- 5) M. MATSUBAYASHI, M. KINOSHITA, A. KOBAYASHI, S. TSUCHIDA, T. SHIBAHARA, M. HASEGAWA, H. NAKAMURA, K. SASAI, K. USHIDA. (2020) Parasitic development in intestines and oocyst shedding patterns for infection by *Eimeria uekii* and *Eimeria raichoi* in Japanese rock ptarmigans, *Lagopus muta japonica*, protected by cages in the Southern Japanese Alps. Int. J. Parasitol. Parasites Wildl. 12, 19-24.
- 6) M. MATSUBAYASHI, A. KOBAYASHI, M. KANEKO, M. KINOSHITA, S. TSUCHIDA, T. SHIBAHARA, M. HASEGAWA, H. NAKAMURA, K. SASAI, and K. USHIDA: Int. J. Parasitol. Parasites Wildl. 15, 225-230 (2021) Distribution of *Eimeria uekii* and *Eimeria raichoi* in cage protection environments for the conservation of Japanese rock ptarmigans (*Lagopus muta japonica*) in the Japanese Alps.

II-2 感染抵抗性をもつ野生型腸内細菌叢の解明と利用

中部大学 創発学術院

牛田一成

〈研究分担者〉

中部大学 創発学術院

土田さやか

〔要旨〕

飼育下のライチョウはウサギ用ペレットや小松菜が主に給餌されており、野生下での採食物とは大きく異なっている。野生個体群が主食とする高山植物は毒性アルカロイドやタンニン等の反栄養物質を含み、この分解には本種特有の腸内細菌叢が大きく貢献している。加えて先行研究によって、生息域外保全で実施されてきたケージ保護事業で、保護雛の死亡原因がアイメリア原虫による感染が一因であることが明らかになってきた。しかし、一方で野生下で生き残り成鳥となる個体はアイメリア原虫と共存している可能性もあることから、これら成育した野生個体は原虫への免疫を獲得していること、その腸内細菌叢や餌に含まれる化学成分の一部に原虫の腸管内増殖に抑制効果があることが推定され、野生個体は野生環境に適応した「野生型腸内細菌」を有していると考えられる。このような野生での生存を支持する野生型腸内細菌は、雛による母鳥の盲腸糞の食糞により腸内細菌が伝播されていることが確認されている。飼育個体に野生型腸内細菌を再構築するためには、野生個体の糞便移植が極めて有効であると考えられるが、野生個体の盲腸糞中にはアイメリア原虫が存在するため、アイメリア原虫への免疫を獲得していない飼育個体に対し、野外盲腸糞を単純に移植する方法はとれない。このためサブテーマ2では、飼育下の雛に対して原虫感染を防除しつつ野生型腸内細菌叢の確立を促し、野生個体由来の腸内細菌の原虫感染防除効果を実験感染系で判定し、感染抵抗性に関与する腸内細菌の移植法を確立すること、加えて野生型有用細菌を分離し飼育個体へ利用することを目的とし、研究を実施した。

野生由来糞便の飼育下個体への移植技術を開発するため、野生個体の糞便を安全に飼育下の個体に移植することができる「フィルター法」の開発に成功した。飼育個体に安全に移植できるアイメリア原虫除去糞便の作製は、希釈糞便をポアサイズ5 μ mのフィルターで濾過することにより、細菌数の減少を抑えつつ、アイメリア原虫を完全に除去できることが明らかになった。また、フィルターで濾過した糞便液を鶏雛に投与し、アイメリア原虫が糞中に検出されるか否かを14日間、継続的に糞便検査を実施した。その結果、投与した鶏からはアイメリア原虫は検出されず、ポアサイズ5 μ mのフィルターで濾過することにより完全にアイメリア原虫オーシストが除去されることが生体を用いた実験でも確認できた。

感染防御に有効な腸内細菌の同定と利用法の提案では、野生個体固有の乳酸菌である *Lactobacillus apodemi* によるアイメリア原虫の病態抑制試験（鶏の感染実験モデルによる投与試験）を行った。その結果、OPGは減少しなかったが、増体が改善される結果を得た。この結果は、*L. apodemi* が腸管粘膜および腸内環境を改善している可能性があり、これにより原虫の増殖できる環境が提供され、その結果、原虫の増殖が減少しなかったことが考えられた。また、本乳酸菌を飼育個体に与える方法についても検討を行った。本菌を用いて調整した小松菜サイレージもしくは乾燥柿の葉と凍結菌末をシンバイオティクスとして、同時に給与した。その結果、いずれもライチョウの嗜好性は良好であり、投与期間中の下痢やその他の感染症が確認されなかったことから、野生型腸内細菌の利用法として活用することができると考えられた。しかし、同細菌の定着および維持は認められなかったため、慣行飼料として常に投与し続ける必要があることも明らかになった。また、野生型の有用腸内細菌を分離する中で、野生ライチョウの腸内細菌はビタミンBの添加によって発育が促進されることが分かった。これは、野生型腸内細菌の特徴として、ビタミンBを合成する細菌と栄養共生している細菌種が優勢であることを示唆する結果であり、また、ビタミンB以外にもルーメン液に含まれる微量成分（微量元素Co、Mo、Zn等の他、イソカルボン酸やその他のエサ植物由来の未知成分）を必要とする細菌種が優勢であることも明らかになった。これらの成分は野生型腸内細菌を誘導する飼料を開発する上で、含有要素として重要であると考えられた。

1. 研究開発目的

これまでの解析により、アイメリア原虫による感染がケージ保護された雛の死亡原因であること、野生下で生き残り成鳥になる個体は原虫への免疫を獲得していること、その腸内細菌叢や餌に含まれる化学成分の一部に原虫の腸管内増殖に抑制効果があることが推定されている。原虫に対する防御免疫をもたず、高山植物に含まれる毒性のあるアルカロイド等を分解する腸内細菌叢を保有しない生息域外保全個体の野外放鳥は、事実上不可能である。原虫感染症対策がニホンライチョウの保護増殖に必須であることから、本来、野生個体が有する生息域内での生存能力を賦与するという目的に加え、雛における原虫感染症に対する防御的腸内細菌叢の構築という考え方を新たに追加し、導入することを目的とした。本サブテーマでは、生息域内に共生または生存する腸内細菌を飼育環境下で再構築し、原虫感染抵抗性や毒物代謝能を付与することで、飼育個体の生体防御能力の向上を図った上で野生環境への適応を進めることを目的とする。

2. 研究目標

ニホンライチョウ寄生性原虫の病態を明らかにし、その防除技術を提示すると共に、腸内細菌叢の構築により野生復帰させ得る資質を持つ生息域外個体群創出のための方策を提示する。サブテーマ2の目標は、野生型腸内細菌叢の特性解析を行い、原虫感染抵抗性をもつ腸内細菌を同定し、野生型腸内環境構築に向けて、飼育下個体への糞便移植技術を開発し、その利用法を提示する。

3. 研究開発内容

3-1 野生由来糞便の飼育下個体への移植技術の開発

3-1-1 糞便移植法の開発：フィルター法による原虫除去と腸内細菌の残存数調査

飼育下のニホンライチョウに野生型の腸内細菌叢を確立するための最も確実な方法は、野生個体から飼育個体への糞便移植である。しかし、この技術の導入を妨げる要因は、野生個体が極めて高率に保有しているアイメリア原虫の存在であった。そこで、安全に糞便移植を行うため、アイメリア原虫のオーシスト除去方法について検討した。まず野生下のニホンライチョウ固有のアイメリア原虫を除去できるおおよそのフィルターポアサイズを決定するため、原虫のオーシストのみが含まれる溶液を用いて濾過により除去できるフィルターポアサイズを調査した。ライチョウの精製オーシスト液 7×10^5 /3.5ml (*E. uekii* および *E. raichoi* の2種混合溶液) を $10 \mu\text{m}$ のフィルターで濾過を行った。

次にライチョウ糞便を $10 \mu\text{m}$ 以下のポアサイズでフィルター濾過することによる、腸内細菌の残存数を調査した。横浜市繁殖センターで飼育しているスバルバルライチョウ10羽およびニホンライチョウ2羽の盲腸糞を材料とし、リアルタイムPCRを用いた細菌16S rRNA遺伝子の検出により細菌の残存率を評価した。各糞便を蒸留水で100倍希釈し、濾過しないサンプルと0.45、1.2、5、 $10 \mu\text{m}$ の4種類のフィルターで濾過したサンプルを遠心分離し、沈殿物を回収した。得られた沈殿物から、KURABO核酸分離システムQuickGeneを用いてDNA抽出を行い、リアルタイムPCR（細菌16S rRNA遺伝子プライマー27Fおよび520R）によって沈殿物に含まれる細菌数を算出した。細菌16S rRNA遺伝子量から細菌数を産出するためのスタンダードとして、既知の菌数に調整した大腸菌を用いたために菌数は大腸菌数換算とした。

3-1-2 糞便移植法の開発：フィルター法による原虫除去の開発

上記予備試験により、腸内細菌をできるだけ残した状態でアイメリア原虫を除去できるフィルターのポアサイズは $5 \mu\text{m}$ であると推測された。しかし、この結果は、原虫のオーシストのみ、腸内細菌のみを濾過した場合に得られた結果から推測されたフィルターポアサイズである。したがって、原虫オーシストと腸内細菌が混在する状態での原虫除去率を確認する必要があった。本来は野生ライチョウに寄生する野生ニホンライチョウ固有 *E. uekii* および *E. raichoi* の2種混合を用いた原虫オーシスト除去試験を行うべきであった。しかし、コロナ禍のためにフィールド調査が制限されたことにより、解析を行える

十分量のライチョウ由来のアイメリア原虫を確保することができず、得られた原虫はすべてサブテーマ1の感染実験に用いられた。そのため、サブテーマ2では、同サイズの家禽に寄生する*E. tenella* を用いて実験を行うこととした。*E. tenella* (22 x 19 μ m) は、*E. uekii* (23-24 x 15-16 μ m) および *E. raichoi* (20-21 x 18-19 μ m) と比べて同形またはやや小型であるため、*E. tenella* を除去できるフィルターポアサイズであれば、*E. uekii* および *E. raichoi* も除去できると考えられた。

上野動物園から提供を受けた飼育ライチョウの盲腸便を蒸留水で100倍希釈し、そこに*E. tenella* が 2.4×10^4 個/mlになるように加えた。この糞便希釈液1 mlをポアサイズ5 μ mのフィルターで濾過し、遠心分離により10 μ lに濃縮した後、スライドガラスに塗抹し、位相差顕微鏡下 (40 x 10) で全量観察を行った (図2. 1)。このフィルター試験を1,000回反復し実施し、100回中の除去精度を算出した。



図2. 1 スライドガラスに塗抹したフィルター後の糞便希釈液

3-1-3 糞便移植法の開発：フィルター法を用いた濾過糞便の鶏への感染試験

糞便からアイメリア原虫のみを除去する「フィルター法」により、濾過した糞便液を鶏雛に投与し、生体においてアイメリア原虫が検出されるか否かを検討した。茶臼山動物園より提供を受けた飼育下のニホンライチョウの糞便を蒸留水で100倍希釈し、鶏の雛および鶏に寄生する高病原性のアイメリア原虫 (*Eimeria tenella*) を 2.4×10^4 個/mlになるよう添加し、糞便希釈液を作製した。そのフィルター濾過した糞便希釈液、約900 μ lを、2日齢の4羽の鶏雛に投与し、14日間、糞便検査を実施した。

3-2 感染防御に役立つ腸内細菌の同定と利用法の提案

3-2-1 野生ニホンライチョウの有用腸内細菌の分離同定と保存

①植物に含まれる毒素分解に関与する腸内細菌の分離と同定

立山室堂の野生ニホンライチョウ (2019年5月)、乗鞍岳 (2019年5-6月ライチョウ採卵事業の作業中)、北岳でケージ保護されている3家族のニホンライチョウ (2019年7月) の盲腸糞を採取し、表2. 1 に示すようにPYセロビオース/キシロース培地を基礎とし、植物に含まれる毒素 (アミグダリン・サリシン・マンデロニトリル・安息香酸/各1%) を添加したPY変法培地 (表2. 1) に塗抹し、アネロパウチ法で嫌気培養を行った。室堂の場合は雷鳥荘に設置した簡易インキュベーター内で41℃で48時間培養した。乗鞍岳および北岳では、アフリカ等で実施している簡易カイロを用いた培養法を実施した。

②保健効果を持つ腸内細菌の分離と同定

立山室堂の野生ニホンライチョウ (2020年5月)、乗鞍岳 (2020年7月ケージ保護個体)、中央アルプス (2020年8月ケージ保護個体) の盲腸糞を採取し、*Bifidobacterium* の分離を試みた。乳酸菌である *Bifidobacterium* を選んだ理由は以下の3点である。

1. これまでの腸内細菌網羅解析によってライチョウの腸内最優勢種であることがわかっている。
2. 一定の保健効果が明らかになっている有用菌であるため。
3. 病原性がなく、飼育下個体への投与が現実的であるため。

表2. 2 に示すように *Bifidobacterium* 選択培地のTOSプロピオン酸寒天培地を基礎とし、ビタミンB群 (B1:チアミン、B2:リボフラビン、B6:ピリドキシン、B7:D-ビオチン、B12:シアノコバラミン、パントテン酸) を添加したTOS変法培地に塗抹しアネロパウチ法で嫌気培養を行った。

③植物の難消化性成分を分解する腸内細菌の分離と同定

立山室堂の野生ニホンライチョウ (2021年5月) の盲腸糞を採取し、昨年度に引き続き野生ライチョウ腸内細菌の分離を試みた。培養には表2. 3 に示すように非選択培地であるブレインハートインフュージョン寒天培地を基礎とし、還元剤、ビタミンB群および糖質としてイヌリン、ペクチンに加え、ルー

メン液を30%量添加したBHI変法培地を使用した。

①～③の培地より得られたコロニーを、中部大学創発学術院もしくは応用生物学部の実験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（-80℃）内で安全に保存するとともに、細菌16S rRNA遺伝子塩基配列にもとづく系統解析により分離菌の種同定を行った。

表2. 1 植物に含まれる毒素分解に関与する腸内細菌の分離に用いた培地

サンプリング地	採取期間	使用培地	変更した基質
立山	5月	PY変法アミグダリン培地	糖質はセロビオース・キシロース。アミグダリンを1%添加。
		PY変法サリシン培地	糖質はセロビオース・キシロース。サリシンを1%添加。
		PY変法マンデロニトリル培地	糖質はセロビオース・キシロース。マンデロニトリルを1%添加。
		PY変法安息香酸培地	糖質はセロビオース・キシロース。安息香酸を1%添加。
乗鞍	5-6月	PY変法アミグダリン培地	糖質はセロビオース・キシロース。アミグダリンを1%添加。
		PY変法サリシン培地	糖質はセロビオース・キシロース。サリシンを1%添加。
		PY変法マンデロニトリル培地	糖質はセロビオース・キシロース。マンデロニトリルを1%添加。
		PY変法安息香酸培地	糖質はセロビオース・キシロース。安息香酸を1%添加。
北岳	7月	PY変法アミグダリン培地	糖質はセロビオース・キシロース。アミグダリンを1%添加。
		PY変法サリシン培地	糖質はセロビオース・キシロース。サリシンを1%添加。
		PY変法マンデロニトリル培地	糖質はセロビオース・キシロース。マンデロニトリルを1%添加。
		PY変法安息香酸培地	糖質はセロビオース・キシロース。安息香酸を1%添加。
※分離菌の機能		難消化性の植物由来糖および植物毒素分解嫌気性菌	

表2. 2 保健効果を持つ腸内細菌の分離に用いた培地

サンプリング地	採取期間	使用培地	変更した基質
立山	5月	TOSプロピオン酸寒天培地	糖質はガラクトオリゴ糖。
		変法TOSプロピオン酸寒天培地1	糖質はガラクトオリゴ糖。ビタミンB1、B2、B6、B7、B12添加。
		変法TOSプロピオン酸寒天培地2	糖質はガラクトオリゴ糖。ビタミンB1、B2、B6、B7、B12、パントテン酸添加。
乗鞍	7月	TOSプロピオン酸寒天培地	糖質はガラクトオリゴ糖。
		変法TOSプロピオン酸寒天培地1	糖質はガラクトオリゴ糖。ビタミンB1、B2、B6、B7、B12添加。
		変法TOSプロピオン酸寒天培地2	糖質はガラクトオリゴ糖。ビタミンB1、B2、B6、B7、B12、パントテン酸添加。
中ア	8月	TOSプロピオン酸寒天培地	糖質はガラクトオリゴ糖。
		変法TOSプロピオン酸寒天培地1	糖質はガラクトオリゴ糖。ビタミンB1、B2、B6、B7、B12添加。
		変法TOSプロピオン酸寒天培地2	糖質はガラクトオリゴ糖。ビタミンB1、B2、B6、B7、B12、パントテン酸添加。
※分離菌の機能		Bifidobacterium 属細菌・保健効果	

表2. 3 植物の難消化性成分を分解する腸内細菌の分離に用いた培地

サンプリング地	採取期間	使用培地	基礎培地	添加物
立山	5月	BHI変法培地	BHI寒天培地	L-システイン塩酸塩一水和物（還元剤）
				ビタミンB
				・ B1：チアミン
				・ B2:リボフラビン
				・ B6:ピリドキシン
				・ B7:ビオチン
				・ B12:シアノコバラミン
				・ パントテン酸
				イヌリン
				ペクチン
				ウシルーメン液
※分離菌の機能			植物に含まれる難消化性成分の分解	

3-2-2 鶏の実験モデルを用いた乳酸菌の定着および原虫の病態発現抑制試験

ニホンライチョウが保有する特異な腸内細菌叢が原虫感染および病態発現を抑制している可能性を検証するため、鶏に寄生する高病原性のアイメリア原虫 (*E. tenella*) を用いて評価試験を行った。

まず、3日齢の鶏雛に 2.8×10^8 個の*Lactobacillus apodemi* を投与し、その後、1、4、6そして8日目に糞便を採取し、排菌状況を検査した。その結果、8日目においても同菌は検出されていることが確認された。また、比較のためにICR マウスにも*L. apodemi* を投与したが、投与1日目以後で同菌の排出および定着は確認できなかった。以上より、鶏の実験系では、1回の投与により同菌の定着が可能であることが分かった。また、鶏において*L. apodemi* は伝播力が強く、別ケージ、別の隔離棚で飼育しても同菌は他の鶏に定着することが分かった。次に、*L. apodemi* の投与菌数を $10^7 \sim 10^{10}$ 個の2羽ずつの群に分け、2週間、増体および下痢などの臨床症状を評価した。その結果、非投与群での平均増体量は95.1gに対し、投与群では95.6g～122.4gといずれも高い結果となり（図2. 2）、下痢などの異常はみられなかった。そのため、以下の原虫投与実験では、 10^9 個の菌数を投与することにした。

コンタミを防ぐために実施月を分けて、*L. apodemi* 投与による*E. tenella* の病態発現について、各群3羽にて増体量およびOPG により評価した。

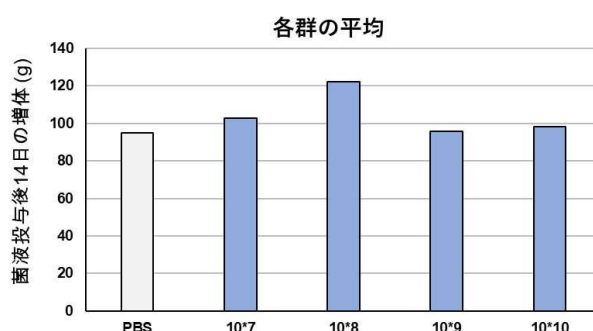


図2. 2 菌液投与後の増体

3-2-3 野生ライチョウの乳酸菌を用いたサイレージの嗜好性調査

令和2年度のケージ保護では高山植物に加えて野菜が補助食として用いられたが、ケージ保護用に搬入された生野菜は保存ができなかった。悪天候等の交通事情により常に新鮮な餌植物を補給することが困難となる事が想定された。そこで、例えば、サイレージのように保存を可能とする野菜加工品をライチョウが摂取すれば、このような問題を解決することが可能である。そこで、2020年6月から7月にかけて、富山市ファミリーパークで飼育しているスバルバルライチョウを対象に、野生ライチョウ由来の乳酸菌を用いて作製したコマツナサイレージの嗜好性調査を行なった。野生ライチョウ由来の*Streptococcus gallolyticus* および*Lactobacillus apodemi* を用いて小松菜を発酵させてサイレージ化した。室温(25℃)では、うまく発酵が進まなかったため、37℃で一晩培養し、その後に室温で数日発酵させたのち、計9羽のスバルバルライチョウに給餌試験を行なった。

3-2-4 飼育下自然育雛個体へのシンバイオティクス試験

先行研究により、飼育下で抗生物質を使用せずに感染症を防ぐには、野生ライチョウの腸内細菌を用いたシンバイオティクス (*Lactobacillus apodemi*、*Streptococcus gallolyticus*、*Escherichia furgusonii* の3菌種混合+柿の葉 (タンニン源)) が有効であることが示唆された。シンバイオティクスを投与している期間は生菌として効果を発揮するものの、定着が困難であり、投与を停止するとこれらの菌が検出されなくなるという問題が生じている。原因の1つとして、通常、与えている幼雛飼料に抗生物質や抗原虫薬が含まれており、こうした物質に耐性のある菌のみが定着できる可能性が考えられた。そこで、いしかわ動物園にご協力頂き、抗生物質が添加されていない飼料を用いた自然育雛個体へのシンバイオティクス試験を行い、定着性を確認した。これまでの野生および飼育下のライチョウの観察から、雛は母鳥の盲腸糞を摂取することがわかっているため、母鳥の盲腸糞からのシンバイオティクス菌摂取も考え、母鳥には孵化予定日2日前からシンバイオティクス (3菌種混合+柿の葉) を投与した。雛

へは孵化後から21日齢まで餌にシンバイオティクスを投与した。定着性を確認するために、投与終了後10日、1ヶ月、2ヶ月そして3ヶ月の雛の盲腸糞を培養し、シンバイオティクスとして投与した菌が検出されるかを確認した。

3-3 野生型腸内環境を表す指標の探索：ニホンライチョウ盲腸糞の有機酸組成分析

これまでの研究(推進費研究4-1604)では、飼育下ニホンライチョウと野生下のニホンライチョウの盲腸糞の細菌組成を次世代シーケンサーによるアンプリコンシーケンス法で網羅的に解析した。その結果、両者にはその組成に大きな差があり、とくに広義の乳酸菌群と乳酸利用性菌群の共生系が野生ニホンライチョウの盲腸細菌叢を特徴づけていることが分かった。野生と飼育下の個体において菌叢組成の差は、(1)人工孵卵のため、母鳥の盲腸糞を摂食することがない、(2)孵化後1週間にわたる抗菌薬剤の連続投与、(3)ニワトリ幼雛用のマッシュ飼料やウサギ飼育用のペレット飼料を主食とした給与に由来する、ことが考えられた。盲腸内で発酵により発生する栄養成分にも大きな差が認められており、これらの要因が雛の体重増加速度や成体の体重に大きな違いをもたらす原因となっている可能性がある。

先行研究4-1604では、ケージ保護ヒナの腸内細菌叢の発達を検索したが、機材の関係で盲腸糞の成分分析が実施できていなかった。今回の推進費研究4-1903では、発酵産物の生成パターンの差が生育の早い時期から起こっているのかどうかを検討した。

2019年7月から開始された北岳のケージ保護で、3家族の母鳥と雛のそれぞれの盲腸糞を可能な限り経日的に21日齢まで採取した。雛の盲腸糞は、最低でも各ケージから1検体の採取を試みたが、孵化後4日までは、盲腸糞排泄の頻度が低く全ケージからの採取はできなかった。1日齢の検体数2を除き最低3検体を確保した。母鳥に関しては期間中に3回の採取を行った。比較のために、いしかわ動物園で孵化した雛3羽の盲腸糞を経日的に21日齢まで採取した。こちらも混合飼育のためケージ保護と同様に個体識別はされていないが、各日齢で最低2検体の採取を行った。採取した盲腸糞を過塩素酸溶液で除タンパクし、遠心分離後の上清をイオン排除HPLCによる有機酸分析に供した。

4. 結果及び考察

4-1 野生由来糞便の飼育下個体への移植技術の開発

4-1-1 糞便移植法の開発：フィルター法による原虫除去と腸内細菌の残存数調査

0.45、1.2、5そして10 μm の4種類のフィルターで濾過した際の腸内細菌の残存数は表2.4に示すとおり、フィルターろ過なしと、5および10 μm のフィルターで濾過したサンプルを比較すると、沈殿物に含まれる細菌数にはほとんど違いがなく約1,600,000から2,500,000個であった。しかし、1.2 μm のフィルターで濾過したサンプルに含まれる細菌数は約770,000個と一桁少ないということが明らかとなった。本結果より腸内細菌をできるだけ残した状態でアイメリア原虫のオーシストを除去できるフィルターのポアサイズは5 μm であると推測された。

表2.4 各ポアサイズのフィルター濾過糞便希釈液中に含まれる細菌数

		菌数 (大腸菌数換算)		
フィルターなし	(n=3)	6.4	±	0.2
10 μm フィルター	(n=7)	6.2	±	0.4
5 μm フィルター	(n=12)	6.3	±	0.4
1.2 μm フィルター	(n=12)	5.9	±	0.4
0.45 μm フィルター	(n=12)	フィルター後、沈殿物得られず		

※菌数は対数表記 ($\log_{10}$ 個 / ml)

4-1-2 糞移植法の開発：フィルター法による原虫除去の開発

フィルター法の1,000回の反復試験のうち、原虫オーシストが観察されたのは1回だった（アイメリア原虫の検出率0.001%）が、この1回の検査で確認されたオーシスト数は3個と極めて少なかった。オーシストが観察されたスライドは、他のサンプルよりもフィルター後の糞便希釈液が濃かったため（図2. 3）、フィルターあるいはフィルターハウジングに何らかの不具合があったと考えられる。この試験の結果から、ポアサイズ5 μ mのフィルターを用いれば、腸内細菌をできるだけ残した状態で、ライチョウ糞便からアイメリア原虫（*E. uekii* および *E. raichoi*）をほぼ完全に除去できると考えられた。

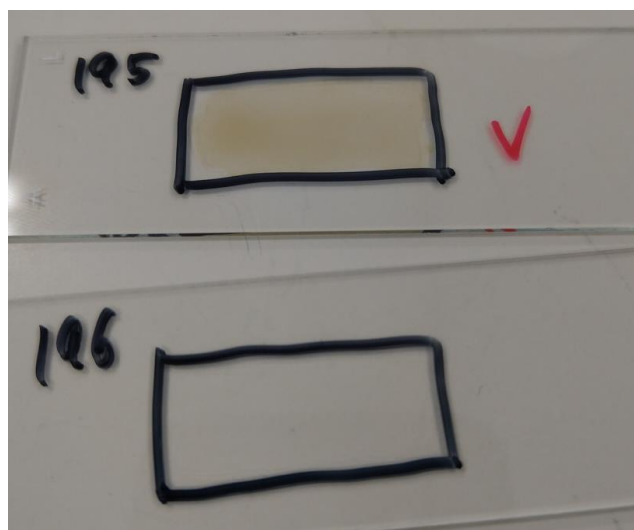


図2. 3 オーシストが確認されたスライドガラス（NO. 195）

注）他の塗抹（No. 196）と比較して色が濃く、濾別が不十分であったと考えられる。

4-1-3 糞移植法の開発：フィルター法を用いた濾過糞便の鶏への感染試験

フィルター濾過糞便希釈液、約900 μ lを、2日齢の4羽の鶏雛に投与し、14日間、継時的に糞便検査を実施した結果、いずれの糞便においてもアイメリア原虫は検出されず、フィルター法によって完全にアイメリア原虫オーシストが除去されることが生体を用いた実験でも明らかになった。

4-2 感染防御に役立つ腸内細菌の同定と利用法の提案

4-2-1 野生ニホンライチョウの有用腸内細菌の分離同定と保存

①植物に含まれる毒素分解に関与する腸内細菌の分離と同定

分離された細菌種同定の結果、得られた植物に含まれる毒素を分解、もしくはこれらの毒素に耐性のある野生ニホンライチョウ盲腸内細菌は、表2. 5 に示すとおり96（分離数）株であった。また、立山と乗鞍個体から分離された菌種は類似していたが、北岳のケージ保護個体から分離された菌種は全く異なることから、山域によって野生ニホンライチョウの採食物が異なり、解毒に寄与する盲腸内細菌種が異なる可能性が考えられた。

②保健効果を持つ腸内細菌の分離と同定

分離された細菌種同定の結果、添加物に対する発育応答は表2.6 に示すとおりであり、野生ライチョウから分離された腸内細菌は、ビタミンB群の添加によって発育が促進されることが明らかとなった。この結果から野生型腸内細菌の特徴として、ビタミンB群を合成する細菌種が多いと推察され、今後野生型腸内細菌を誘導する飼料を開発するうえで、ビタミンB群は重要な成分の1つであると考えられる。*Bifidobacterium* は分離されなかったものの、野生ライチョウに特徴的な *Escherichia furgusonii* や *Streptococcus gallolyticus* に加え、新菌種と考えられる *Ruminococcus* 属細菌（最近縁種は、*Ruminococcus torques*）が分離された（図2. 4）。*Ruminococcus* 属細菌は野生ニホンライチョウから優

勢菌種として検出されており、一般に他の動物で知られる *Ruminococcus* 属細菌とは異なり長鎖の連鎖状をしめす特徴がある。現在、系統や生理性状、特に保健効果及び植物二次代謝産物の分解について検討中である。本新種の *Ruminococcus* 属細菌に *Bifidobacterium* 属細菌のような保健効果があるか、現在継続して調査中である。

③植物の難消化性成分を分解する腸内細菌の分離と同定

分離された細菌種同定の結果を表2.7に示す。本培地を使用することにより、野生ライチョウに特徴的な *Escherichia fergusonii* や *Streptococcus gallolyticus* が多数分離できたことはもちろん、②の培地では分離数が非常に少なかった新菌種と考えられる *Ruminococcus* 属細菌の分離数が増加し、安定的に継代培養を行うことが可能になった。また本培地からの分離結果より、新菌種と考えられる *Coprococcus* 属細菌（最も近縁な種は *C. comes*）も分離された（図2.5）。現在、系統や生理性状、特に保健効果及び植物二次代謝産物の分解について詳細を調査中である。

これまで我々が実施してきた野生ライチョウの盲腸細菌16S rRNA網羅解析では、*Ruminococcus* や *Coprococcus* を主要な菌群として含む Ruminococcaceae および Lachnospiraceae が最優勢の細菌群（科）として検出されていた。飼育個体と比較すると、これらの細菌は飼育下では減少するか、仮に維持されていても別種に菌交代が生じているため、野生復帰を準備する際には、一定の菌数を維持しておく必要があると考えられてきた。しかし、これまで *Ruminococcus* や *Coprococcus* の単離と維持には成功していなかったが、本試験で使用した変法BHI培地はこれらのライチョウ特異的細菌の分離・継代培養に極めて有効であることが明らかとなった。加えて、野生ライチョウ盲腸糞（中央アルプス・ケージ保護個体）を複数種の嫌気性液体培地に接種し現地で培養したところ、この変法BHI液体培地からのみメタンガスの生成が確認された（表2.8）。メタンガスはメタン菌の存在を示すものであるが、メタン菌だけではメタンガスが生成されない。メタン菌に水素（あるいはギ酸）を供給する発酵性細菌が共生する必要がある、変法BHI液体培地によって、メタン菌と共生するライチョウの腸内環境をさせる主な発酵性細菌の活性が維持された可能性があると推測している。

これらの培養結果より野生ライチョウの腸内細菌は、ビタミンBの添加によって発育が促進され、野生型腸内細菌の特徴として、ビタミンBを合成する細菌と栄養共生している細菌種が優勢である他、ビタミンB以外にもルーメン液に含まれる微量成分（微量元素Co、Mo、Zn等の他、イソカルボン酸やその他のエサ植物由来の未知成分）を必要とする細菌種が優勢であると考えられる。つまり野生型腸内細菌を誘導する飼料を開発する上で、ビタミンBおよびルーメン液成分は重要であると考えられる。

表2.5 植物の難消化性成分を分解する腸内細菌種

サンプリング地	期間	使用培地	単離された菌種	分離株数
立山	5月	PY変法アミグダリン培地	<i>Escherichia coli</i>	19
			<i>Escherichia fergusonii</i>	9
		PY変法サリシン培地	<i>Escherichia coli</i>	15
			<i>Escherichia fergusonii</i>	9
		PY変法マンデロニトリル培地	<i>Streptococcus gallolyticus</i>	2
乗鞍	5-6月	PY変法安息香酸培地	/	0
		PY変法アミグダリン培地	<i>Escherichia coli</i>	6
		PY変法サリシン培地	<i>Escherichia coli</i>	14
		PY変法マンデロニトリル培地	/	0
		PY変法安息香酸培地	/	0
北岳	7月	PY変法アミグダリン培地	<i>Enterococcus hirae</i>	6
			<i>Enterococcus gallinarum</i>	5
			<i>Enterococcus hirae</i>	5
		PY変法サリシン培地	<i>Enterococcus gallinarum</i>	3
			<i>Enterococcus faecium</i>	1
			<i>Enterococcus durans</i>	1
			<i>Enterococcus casseliflavus</i>	1
		PY変法マンデロニトリル培地	/	0
		PY変法安息香酸培地	/	0

表2. 6 TOS変法培地を用いて分離された腸内細菌種

単離された菌種	培養培地	発育
<i>Escherichia coli</i>	TOSプロピオン酸寒天培地	+++
	変法TOSプロピオン酸寒天培地1	+++
	変法TOSプロピオン酸寒天培地2	+++
<i>Escherichia fergusonii</i>	TOSプロピオン酸寒天培地	w
	変法TOSプロピオン酸寒天培地1	++
	変法TOSプロピオン酸寒天培地2	++
<i>Streptococcus gallolyticus</i>	TOSプロピオン酸寒天培地	+
	変法TOSプロピオン酸寒天培地1	++
	変法TOSプロピオン酸寒天培地2	++
<i>Ruminococcus torques</i>	TOSプロピオン酸寒天培地	w
	変法TOSプロピオン酸寒天培地1	++
	変法TOSプロピオン酸寒天培地2	++

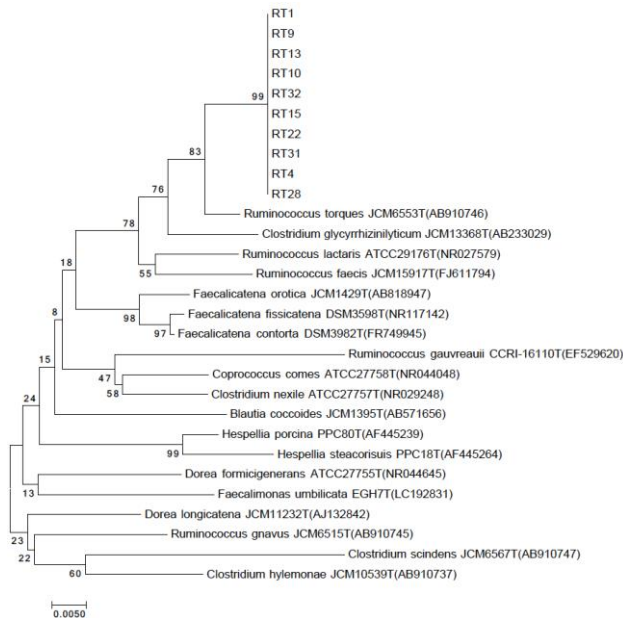


図2. 4 野生ライチョウから分離された*Ruminococcus* 属細菌の系統樹 (NJ法)

表2. 7 植物の難消化性成分を分解する腸内細菌種

単離された細菌種	<i>Coprococcus comes</i> に近縁な新種
	<i>Cronobacter sakazakii</i>
	<i>Cutibacterium acnes</i>
	<i>Escherichia fergusonii</i>
	<i>Escherichia coli</i>
	<i>Lactobacillus apodemi</i>
	<i>Ruminococcus torques</i> に近縁な新種
	<i>Streptococcus gallolyticus</i>

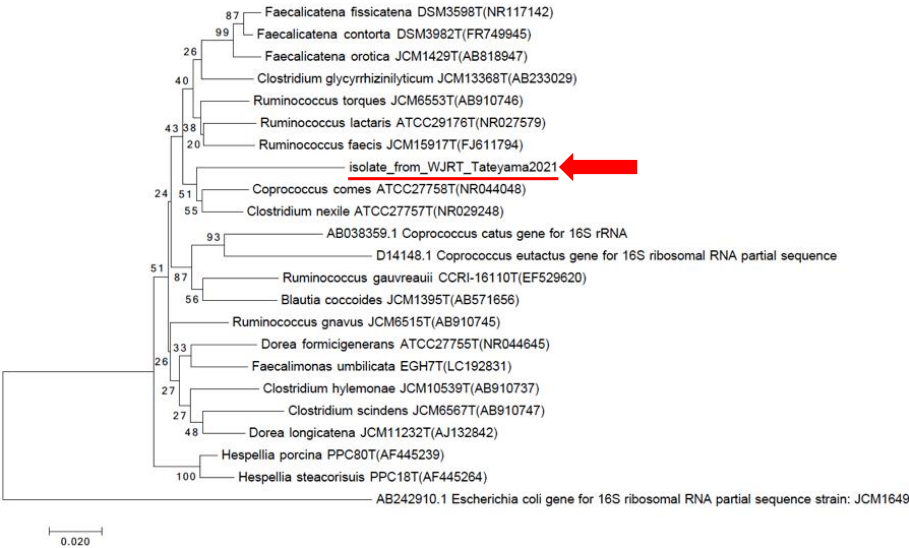


図2. 5 野生ライチョウから分離された新種*Coprococcus* 属細菌の系統樹 (NJ法)

表2. 8 野生ライチョウ (中央アルプス・ケージ保護個体) 盲腸糞のガス生成能

Sample	Cage	Bird age	Medium	CO2	H2	O2	N2	CH4
1	C3	hen	mGAM	60.17	8.34	5.27	26.22	-
2	C5	hen	mGAM	62.47	15.14	1.38	21.02	-
3	C1	hen	mGAM	33.3	10.16	0.12	1.89	-
4	C2	chick	mGAM	68.09	26.57	N/A	5.34	-
5	C3	chick	mGAM	75.9	19.3	N/A	4.8	-
6	C4	hen	mGAM	83.76	13.76	-	2.48	-
7	C2	hen	mGAM	86.48	11.82	0.07	1.64	-
8	C2	hen	mBHI	70.7	0.07	3.68	25.46	0.09

4-2-2 鶏の実験モデルを用いた乳酸菌の定着および原虫の病態発現抑制試験

乳酸菌によるアイメリア原虫の病態抑制試験の結果、コントロールとしたPBS投与群の14日間の増体が109.0gであり、PBSおよび*E. tenella* 投与群では94.8gであったのに対し、*L. apodemi* のみの投与群では107.0g、*L. apodemi* および*E. tenella* 投与群では97.6gと減少した。しかし、極端に増体が悪い1羽を除くと113.3gとなり、その増体は対象群との差異がないことが分かった(図2. 6)。*E. tenella* の投与群のOPGは、*L. apodemi* 投与群の方が高い傾向が見られた(図2. 7)。いずれの投与群においても血便の発現がみられた。以上の結果を考察すると、今回の試験では*E. tenella* の投与数は致死量に近い値であり、実際の摂取量はこれよりも少なく、効果が表れな

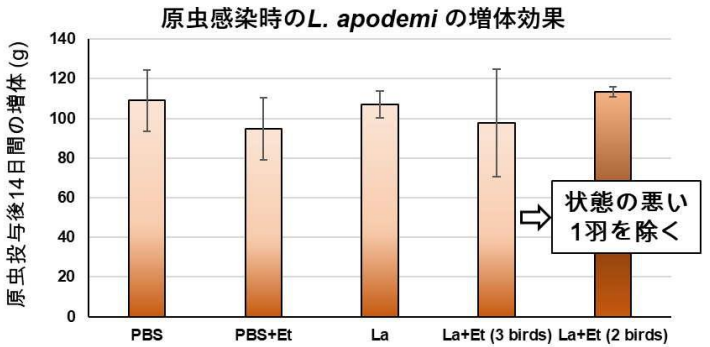


図2. 6 原虫感染時の*L. apodemi*の増体効果

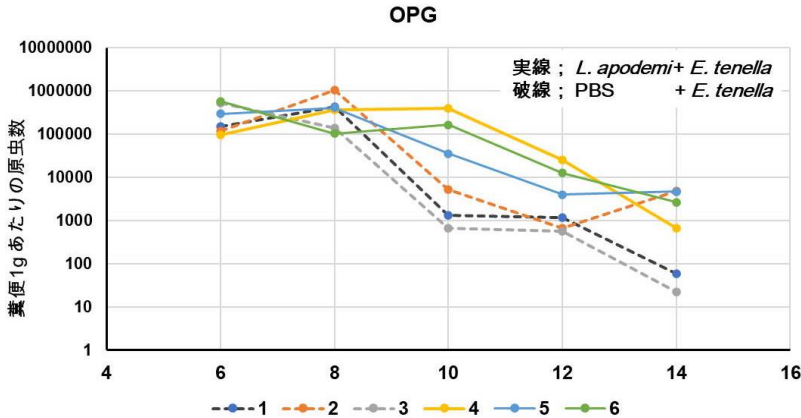


図2. 7 原虫感染試験期間のOPG数推移

かった可能性がある。また、*L. apodemi* 投与群2羽において、OPGは減少しなかったが、増体が大きく改善されていた。この結果は、*L. apodemi* が腸管粘膜および腸内環境を改善している可能性があり、またその結果、原虫の増殖できる環境が提供され、その結果、原虫の増殖が減少しなかったことが考えられた。

4-2-3 野生ライチョウの乳酸菌を用いたサイレージの嗜好性調査

野生ニホンライチョウ由来の乳酸菌を用いて調整したサイレージへの嗜好性調査の結果、生の小松菜と同様に採食した個体が6羽、サイレージを好んで採食した個体が3羽であった。本結果より、ライチョウ乳酸菌を用いたサイレージは、ケージ保護における保存食として使用可能であると考えられた。

4-2-4 飼育下自然育雛個体へのシンバイオティクス試験

抗生物質無添加飼料を用いたシンバイオティクスの結果を表2.9に示す。投与終了後10日では、投与菌は3菌種とも検出されたが、1-3ヶ月後には*Escherichia fergusonii* のみが検出され、他2種の乳酸菌は確認できなかった。つまり、野生ライチョウに特徴的な大腸菌群である*Escherichia fergusonii* は、抗生物質無配合飼料であれば、飼育ライチョウの腸管に定着することが明らかになった。野生ライチョウに特徴的な乳酸菌である*Lactobacillus apodemi* や*Streptococcus gallolyticus* の定着に関しては、餌成分等の抗生物質以外の要因が関わっていると考えられた。したがって、単に無薬で飼育するのみでは野生型の腸内細菌を構築、維持することが不可能であることが示唆された。

表2.9 シンバイオティクス終了後の投与菌の検出

投与終了後10日程度	投与終了後1ヶ月程度
<i>Lactobacillus apodemi</i>	<i>Escherichia fergusonii</i>
<i>Streptococcus gallolyticus</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>Escherichia fergusonii</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
<i>Enterococcus gallinarum</i>	<i>Enterococcus gallinarum</i>
<i>Enterococcus casseliflavus</i>	<i>Enterococcus casseliflavus</i>
投与終了後2ヶ月程度	投与終了後3ヶ月程度
<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia fergusonii</i>
<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
<i>Enterococcus gallinarum</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
<i>Enterococcus casseliflavus</i>	<i>Enterococcus gallinarum</i>

注) 青ハイライトが投与菌を示す。

4-3 野生型腸内環境を表す指標の探索：ニホンライチョウ盲腸糞の有機酸組成分析

盲腸糞の有機酸組成分析の結果、図2.8に示すように食糞を行うケージ保護ヒナは、その濃度に変動(50%から90%)はあるものの、生育初期から比較的高い濃度を示しており、21日齢には親鳥とほぼ同様(95%)の値に到達した。一方で飼育下の雛では、全体として低濃度で推移し、21日齢に示した最大値でも母鳥の65%程度に留まった。飼育雛では、抗菌剤処方期間中には母鳥の30%以下と低値であったが、その後上昇に転じて65%まで到達した。したがって、抗菌剤処方によって抑制されていた腸内菌叢の発達、その後、一定程度回復されたために、相対濃度の上昇が起こったものと考えられる。この状況は、先行研究で観察された菌叢構成の α 多様性の推移とよく一致する。

短鎖脂肪酸の組成比を見ると図2.9のように、飼育雛はケージ保護ヒナと比べ、プロピオン酸濃度が低く、酢酸濃度をプロピオン酸濃度で割った商(酢酸/プロピオン酸比)が高く推移した。北岳ケージ保護雛の糞中有機酸組成は、比較的安定的でオヤとほぼ同値で推移したのに対して、飼育の母鳥、雛とも

に、ケージ保護の母鳥、雛よりも酢酸/プロピオン酸比が高く推移した。また、日間変動が比較的大きいことも特徴的で腸内菌叢の不安定さを示唆している。

プロピオン酸の濃度比が大きいことは、先行研究においても観察されており、菌叢構成の差が反映したものともみられる。ケージ保護の雛では、乳酸菌と乳酸利用菌の共生系によって、前者の作った乳酸が後者によってプロピオン酸に変換される代謝系が発達しているのに対し、飼育雛ではこのような細菌の共生系が発達しないことが原因であると思われる。

酢酸やプロピオン酸は大腸から吸収され、門脈系で肝臓に送達される。酢酸はアセチルCo-Aとして脂肪合成の材料となるほかアセト酢酸などケトン体に代謝され、細胞のエネルギーとして利用される。一方、プロピオン酸は肝臓で糖新生によってグルコースに変換される。野生の食物では、漿果以外から得られる糖質は極めて制限的であるため、ライチョウの体細胞がグルコースを必要とする場合、アミノ酸やプロピオン酸から糖新生を行うことが野生下では常態と考えられる。乳酸も糖新生に利用可能であるが、腸で発生した乳酸は吸収されにくいいため、大腸発酵からの乳酸供給は期待できない。したがって、プロピオン酸生成の意義は、野生ニホンライチョウの栄養要求にとって極めて重要である。そのため、人工飼育下のライチョウの腸内菌叢再構築においても、乳酸菌と乳酸利用菌の組み合わせを考慮する必要がある。

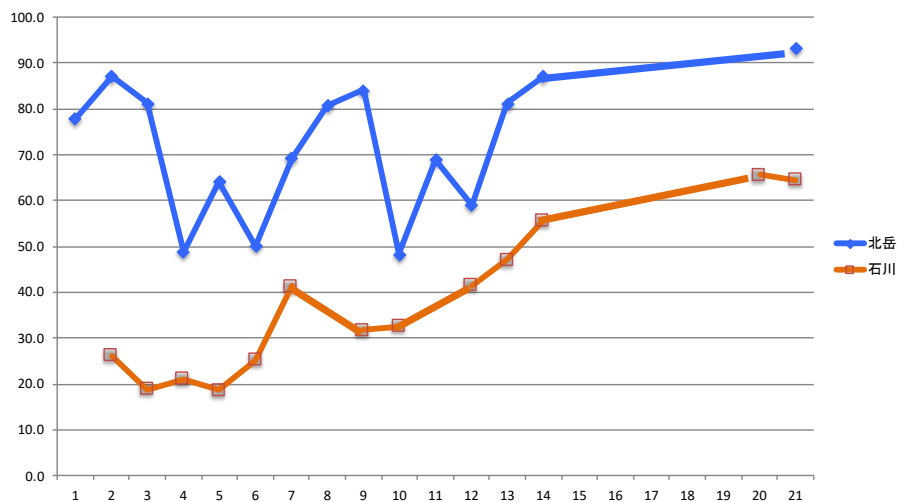


図2.8 北岳ケージ保護ヒナおよびいしかわ動物園飼育ヒナの糞中有機酸濃度の推移
親鳥の濃度を100とした相対値
(親鳥の糞中濃度 北岳 61.4 mmol/kg いしかわ 137.9 mmol/kg)

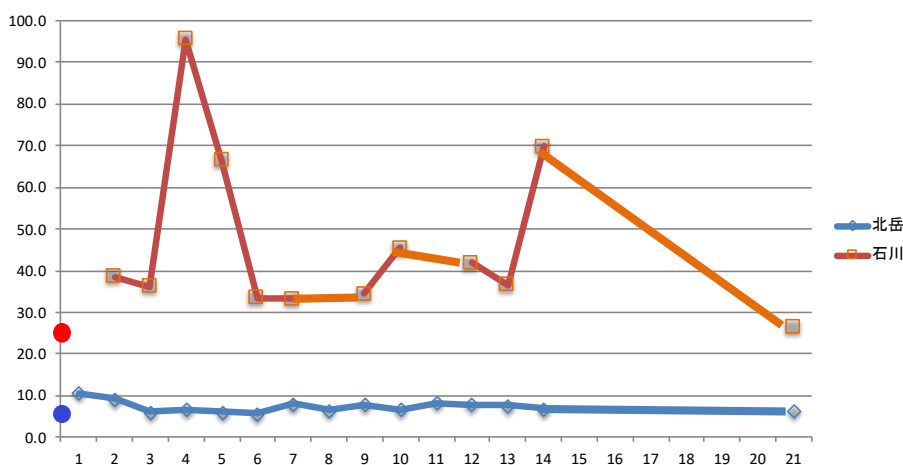


図2.9 北岳ケージ保護ヒナおよびいしかわ動物園飼育ヒナの糞中
酢酸/プロピオン酸濃度比の推移
親鳥の糞中濃度比 北岳 5.8(●) いしかわ 25.0(●)

5. 研究目標の達成状況

サブテーマ2では、野生個体由来の腸内細菌の原虫感染防除効果を実験感染系で評価し、感染抵抗性に関与する腸内細菌の移植法を確立することを目標とした。具体的には「野生由来糞便の飼育下個体への移植技術の開発」と「感染防御に役立つ腸内細菌の同定と利用法の提案」を行うこととした。本研究期間において、野生個体の糞便移植の妨げとなっていたアイメリア原虫の除去について、可能な限り腸内細菌を残したまま原虫を完全に除去する「フィルター法」を開発した。この方法を用いることにより、飼育個体にはほぼ完全な野生型腸内細菌を移植できると期待される。また野生個体由来の有用腸内細菌利用に関しては、野生型乳酸菌数種を凍結乾燥、またはサイレージ加工を施し、すでに多くの動物園に提供しており、抗生物質の代替として慣行飼料として使用されている。以上より、研究期間中に達成する目標を大きく上回る成果が得られたと評価する。

6. 引用文献

特に記載すべき事項はない。

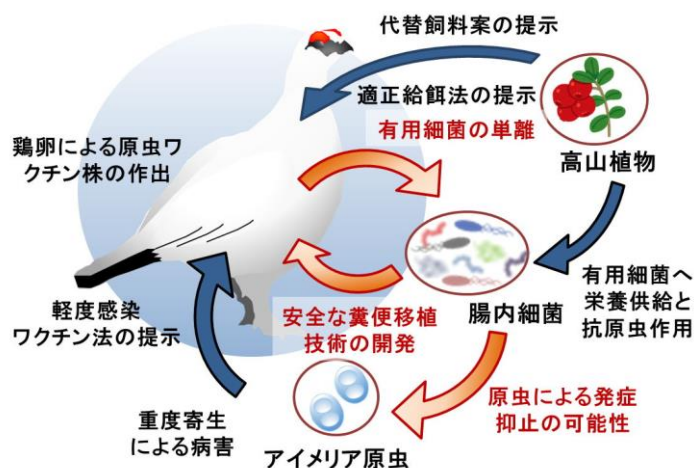


図2.10 サブテーマ2の研究目標の達成状況の概略図

Ⅱ－３ 野生型腸内環境を誘導する飼料開発

東邦大学 理学部

長谷川雅美

〈研究分担者〉

東京理科大学 理工学部 応用生物科学科

倉持幸司

〔要旨〕

ニホンライチョウの健全飼育のため、腸内細菌叢定着を維持促進し、アイメリア原虫の感染を防除する最適な給餌成分の解明とその評価を行った。ライチョウの餌植物14種類について一般栄養分析、およびNMR、LC/MSやGC/MSを用いて化学成分の同定を行った結果、ライチョウが好む植物は、糖や脂質などの一次代謝産物を大量に含み、トリテルペンやフラボノイドなどの二次代謝産物を少量含むことが分かった。餌植物の化学成分の多くは試薬会社から入手できるが、入手困難な化合物もあり、それらに関しては化学合成法を確立して、物量を確保した。高山植物の二次代謝産物の抗アイメリア原虫活性を評価したところ、サンプルK22、K25、K27がアイメリア原虫に殺虫活性を示し、サンプルK15が原虫感染を抑制することを見出した。リンゴの皮にはこれら抗アイメリア原虫活性を有する化合物が含まれているため、人工飼育のライチョウの最適な餌候補であることがわかった。また、植物の成分分析とビデオ映像による行動解析から行った野生個体の摂取栄養量の推定、飼育および野生ライチョウ糞便のメタボローム解析から、現行の飼育飼料と給餌方法はタンパク供給過多であることが示唆された。これらの結果をふまえ、本課題では現行飼料よりもタンパク含有量が低く繊維量が高いライチョウ専用ペレットを作製した。ライチョウ専用ペレットは飼育個体の給餌試験において現行の飼料給餌時よりも体重を野生個体に近づける効果が認められたものの、飼育下に導入した野生個体に給餌した際には菌叢を維持する効果は低くなり、さらなる改良の必要性が示唆された。

1. 研究開発目的

動物園の飼育ではウサギ用ペレットが主食とされているが、野外個体群が主食とする高山植物は毒性アルカロイド等を含み、この分解には本種特有の腸内細菌叢が関係している。このため、本研究では飼育下の雛の野生型腸内菌叢の確立を促し、野生の腸内環境を再現する人工飼料を開発することにより、雛の生存率向上を狙うと同時に、野生復帰させ得る資質を持つ生息域外個体群の創出技術を開発する。同時に、野外型の腸内環境の獲得に適した人工飼料開発は、今後想定されるケージ保護を活用した野生復帰に活用する事により、飼育に必要な高山植物の採取を減らし生息地の高山植生環境への影響を最小限に抑える効果が期待される。

2. 研究目標

ニホンライチョウ寄生性原虫の病態を明らかにし、その防除技術を提示すると共に、腸内細菌叢の構築により野生復帰させ得る資質を持つ生息域外個体群創出のための方策を提示する。サブテーマ3の目標は、野生型腸内細菌叢の定着を支持し、野生下の食餌成分解析により科学的データをもとにした人工飼料の作成方法を提示し、生息域外における健全飼育を行うための方策を提示する。

3. 研究開発内容

3-1 高山植物の一般栄養分析

乗鞍岳や北岳において採取したライチョウの餌植物（表3. 1）について、以下の方法にて水分含有量、粗タンパクそして粗脂肪及び粗繊維量を測定した。まず乾燥させた植物体を粉碎し、80℃で恒量になるまで置き水分含量を測定し乾物量を求めた。粗タンパク量は凍結粉末をケールダール法にて定量した。粗脂肪はジエチルエーテルによるソックスレー法でエーテル抽出物として定量した。ケールダール法では動物が栄養素として利用できない植物のクチクラ層も粗脂肪として定量される。そのため、クチクラが発達した常緑低木等では脂肪量が過推定であることを考慮する必要がある。粗繊維は酸・アルカリ処理残渣として定量化した。粗繊維についても今回の解析では可溶性炭水化物、ヘミセルロース、リグニン、ペクチン、有機酸デンプンやヘミセルロースなどを含んだNFE（可溶性窒素物）として算出した。

表3. 1 成分解析を実施した高山植物（*下線は、部位により嗜好が異なる）

○ライチョウが好む植物（種名および部位）

常緑落葉低木

1	ガンコウラン	茎葉・実
2	ミネズオウ	茎葉・花
3	コケモモ	茎葉
4	コメバツガザクラ	茎葉
5	アオノツノガザクラ*	花

落葉低木

6	クロウスゴ	葉・花
7	レンゲイワヤナギ	葉

○ライチョウが好まない植物（種名および部位）

常緑落葉低木

1	アオノツノガザクラ*	茎葉
---	------------	----

草本

8	イワツメクサ	葉
9	オンタデ	葉
10	オヤマノエンドウ	葉・花
11	ムカゴトラノオ*	ムカゴ

草本

2	ムカゴトラノオ*	葉
3	ハクサンイチゲ	葉

3-2 ライチョウが1日に必要とする栄養素推定

北岳におけるケージ保護中にライチョウの採餌行動を撮影した。合計8本、868秒の動画から、育雛中の雌成鳥の採食時間と移動時間の割合や1秒あたりのついでみ回数を算出した。これにより、警戒、移動などの時間を除いた雌のついでみ回数は1秒あたり0.65回と算出された。雛を連れた雌は10分間の抱雛の後、5分間程度のついでみ行動を繰り返すため、1時間当たりの採餌可能時間は20分と推測され、1日当たりのついでみ回数は3,660回となった。一方、2010年に実施した縄張り行動中の成雄の行動記録から推定された1日当たりのついでみ回数は966回であった。ビデオ映像から主要な植物種についてついでみ1回当たりの採餌量を表3. 2の通り推定した。さらに、1ついでみあたりの各高山植物の栄養素量を合わせ、1日当たりの栄養摂取量を計算した。

表3. 2 1回のついでみあたりの各植物の採餌数

植物名	1ついでみからの採餌数	採餌枚数（最小）	採餌枚数（最大）
ダケカンバ冬芽	1個	966	3,360
ガンコウラン茎葉(立山)	10枚	9,660	33,600
ガンコウラン茎葉(乗鞍)	10枚	9,660	33,600
コメバツガザクラ茎葉	1枚	966	3,360
コケモモ茎葉	0.25枚	242	840
ミネズオウ茎葉	1枚	966	3,360
クロウスゴ茎葉	0.25枚	242	840

3-3 餌植物の成分解析とリスト化

表3. 1で示した植物について、NMR、LC/MSやGC/MSを用いて化学成分を同定し、化合物のリスト化をおこなった。ここでは、ライチョウが好む植物と好まない植物に分けて成分解析を行い、ライチョウの嗜好性も調査した。さらに野生ライチョウの餌として特殊な化合物については、化学合成も行った。

3-4 糞中に含まれる化合物及びライチョウの餌植物のメタボローム分析

ライチョウ糞便は、排泄後直ちに現場で凍結し、前処理・分析を行う前まで-80℃で冷凍保管した。糞便100 mgにリン酸緩衝生理食塩水（PBS）500 μLを添加後、攪拌し、その上清を遠心分離、限外濾過した。その後、濾液を超純水で10倍に希釈し、LC/MS/MS用の分析サンプルとした。LC/MS/MS分析は、LCMS™-8060で分析しアミノ酸、有機酸、ヌクレオシド、ヌクレオチド等の親水性代謝物97成分の一斉分析を行った。HPLCおよびMSの分析は表3. 3の通りであった。

これとは別に、上記で栄養成分分析を行った高山植物と8種の市販野菜についてメタノール抽出物のLC-MS/MSによる網羅解析を行い相対的な成分について比較を行った。

3-5 高山植物に含まれる二次代謝産物の抗アイメリア原虫活性評価

スバルライチョウにニホンライチョウ由来のアイメリア原虫を試験投与した場合、下痢や沈うつ症状が発現し、死亡する個体もみられた。野生下のニホンライチョウも同様の病態が出ている可能性はあるが、実験個体と野生個体では亜種レベルの違いはあるものの、感染しても生存または病態を低減できる何らかの素因を有している可能性も否めない。そこで、実験下の飼育環境との差異の1つとして餌が考えられた。つまり、高山植物に含まれる化合物がいわゆる薬草的な役割を担い、原虫との共生に成功しているのではないかと考えた。そこで、ニホンライチョウが好む6種の高山植物（ガンコウラン、ミネズオウ、コケモモ、クロウスゴ、オヤマノエンドウおよびオンタデ）由来の化合物、計23種の化合物、また嗜好性の低い高山植物（アオノツガザクラおよびハクサンイチゲ）由来の化合物、計4種について、1～100 μ Mの濃度にて侵入型虫体を暴露し、24時間後にトリパンブルーにより生死を判定した。

3-6 ライチョウ専用飼料の開発

得られた結果を基に一般的に流通しており入手が容易なものを基本としてライチョウ専用ペレットを作製した。さらに野生ライチョウの餌に特異的な化合物については、合成品の導入の検討を行った。これらの飼料については飼育ライチョウ及びケージ保護したライチョウに給餌して嗜好性を確認した。特に飼育ライチョウにおいては日本動物園水族館協会加盟園館に協力を依頼し、給餌量と個体の体重について測定した。

3-7 動物園導入後の細菌叢の変化

令和3年度に中央アルプスから動物園に導入した個体について16S rDNA領域について網羅解析を行い菌叢の変化を追跡した。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、常温で保存可能なDNA保存液中に混和した。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にて物理的に破砕した。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。

4. 結果及び考察

4-1 高山植物の栄養分析

ライチョウが餌とする植物およびあまり好まない植物11種15部位について一般成分分析による水分、タンパク質、脂質含有量を計測した（図3. 1）。タンパク質の含有量は種や部位により大きく異なっていたが、市販野菜と比較すると全体的にタンパク、および脂肪ともに高い傾向にあった。特にケージ保護で7月中旬頃まで主要な餌として給餌していたクロウスゴは、解析した種の中でタンパク質の含有量が最も高かった。また、冬季の主食であるダケカンバの冬芽は脂肪の含有量が非常に高く、タンパク質についても含有量が高い傾向にあることが分かった。ライチョウが好む植物と好まない植物について栄養面的な比較では大きな違いはなかった。

表3. 3 HPLCおよびMS 分析条件

[HPLC conditions] (Nexera™ X2)	
Column	: Reversed-phase column
Mobile phases	: A) 0.1% Formic acid in water B) 0.1% Formic acid in acetonitrile
Mode	: Gradient elution
Flow rate	: 0.25 mL/min
Injection volume	: 3 μ L
[MS conditions] (LCMS-8060)	
Ionization	: ESI (Positive and negative mode)
Mode	: MRM
Nebulizing gas flow	: 3.0 L/min
Drying gas flow	: 10.0 L/min
Heating gas flow	: 10.0 L/min
DL temp.	: 250°C
Block heater temp.	: 400°C
Interface temp.	: 300°C

これらの高山植物の栄養成分を市販の野菜と比較すると、高山植物、特に矮性常緑低木で水分含有量が非常に低く、高山植物と野菜を同量摂取した場合には得られる栄養素が少ないことが明らかになった（図3. 2）。ケージ保護など半野生個体に利用する場合は水分の少ないペレットなどと併用し、水分量を調整する必要があることが示唆された。また、飼育環境では水差しを利用した水分の給与についても今後、改善する必要があるかもしれない。

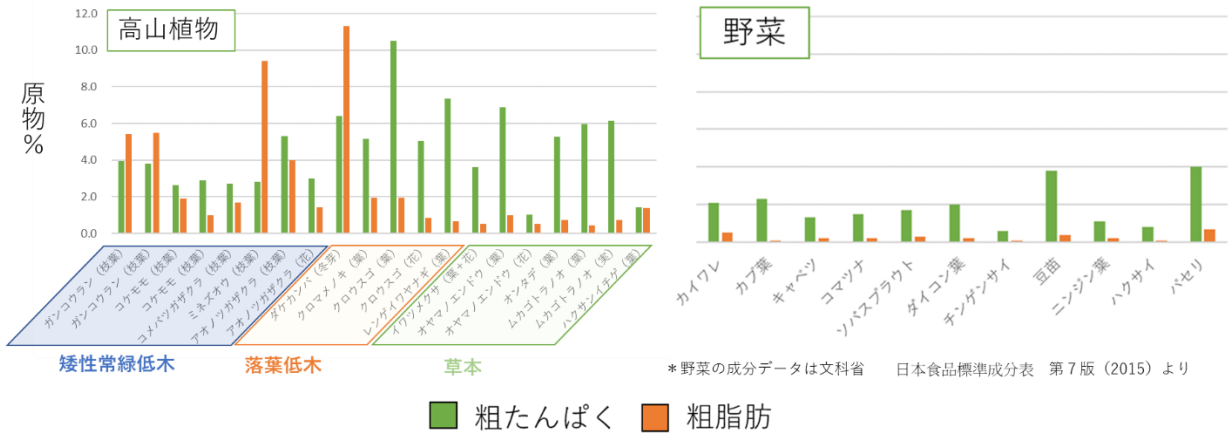


図3. 1 ライチョウの餌植物と市販野菜の粗タンパクおよび粗脂肪含有量の比較

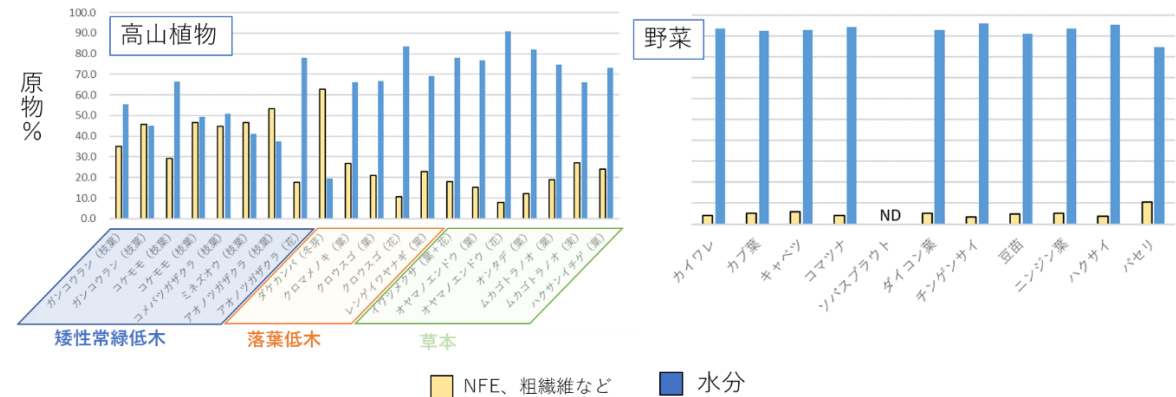


図3. 2 ライチョウの餌植物と市販野菜のNFE及び粗繊維等、水分含有量の比較

4-2 ライチョウが1日に必要とする栄養素推定

これらの栄養成分と、ビデオ映像によるついでみ回数の計測をもとに、雛を連れたライチョウの雌がついでみ1日あたりの栄養価の総量を推定した（表3. 4）。この推計と現在飼育個体で給餌されているペレット飼料の栄養価を比較すると、タンパク質が摂取過多であることが明らかになった。特に、ダケカンバの冬芽は栄養価が極めて高く、雌のついでみ回数から推定したタンパク質および脂質摂取量は飼育個体を越えることが分かった。しかし、気象条件が厳しく日照時間も限られる冬季は採餌行動時間が非常に限られているため、今回推定されたついでみ回数よりも少ないと予想される。そのため、冬季のニホンライチョウは短い採餌時間の中で効率よく、栄養価の高い餌を食べる必要があるため、冬芽はその時期に応じた好適な食物であると考えられる。極域に生息するスバルライチョウは、秋には体重を大きく増加させ、冬季は蓄えたエネルギーを消費する。しかし、ニホンライチョウはスバルライチョウとは異なり、冬季に目立った体重減少は見られない。栄養価の高いダケカンバの冬芽が積雪期においても容易に摂食できることが、体重維持にとって重要であることが明らかとなった。

一方、春から秋の主食である高山植物については粗脂肪の1日摂取量は飼育下の個体と大きくは変わらないものの、タンパク質の1日摂取量はペレット飼料の5～10分の1であることが分かった。先行研究[4-1604]で実施された野生と飼育下の成鳥の盲腸糞内のメタボローム解析では、飼育個体の盲腸糞には

アミノ酸代謝産物が多く含まれ、野生下の個体の盲腸糞では核酸の代謝産物が多いことが明らかとなっている。飼育下の個体において、盲腸にアミノ酸やその代謝物がみられたことは、小腸におけるタンパク質の消化吸収能力を超えたタンパク質が摂取されていることを示唆しており、人工飼料のタンパク質供給量がニホンライチョウの消化力に対して過剰であることを意味している。一方、下記に示すように核酸の代謝産物が顕著に検出された野生下の個体では、低タンパク質飼料で飼育された反芻動物の胃内で起こる核酸代謝と同じように、腸管内でおこる核酸代謝によって非タンパク態窒素を循環させ細菌体のタンパク合成に用いている可能性がある。今回の比較で餌に含まれるタンパク量に顕著な違いがみられたことは、この推測を支持するものである。

表3. 4 ビデオ解析から推定した育雛期の雌における1日あたりのついでみ回数を元にした各高山植物1日当たりの摂取栄養素比較（単位はg）

品目	水分	粗タンパク質	粗脂肪
ダケカンパ冬芽（1）	34.66	11.38	20.16
ガンコウラン茎葉（2）	14.19	1.11	2.17
ガンコウラン茎葉（3）	10.19	1.13	1.11
コメバツガザクラ（3）	13.29	0.69	0.45
コケモモ茎葉（3）	17.38	1.02	0.35
ミネズオウ茎葉（3）	4.07	0.28	0.93
クロウスゴ葉（3）	20.47	0.82	0.30
オンタデ葉	251.27		1.32
アオノツガザクラ葉	26.78		0.36
オヤマノエンドウ葉	28.15	2.45	
RM-4 40g+ミルワーム1匹	0.32	5-6	1

4-3 糞中に含まれる化合物のメタボローム分析

野生ライチョウと飼育ライチョウの糞に含まれている成分についてメタボローム解析を行った結果、糞中に含まれる成分が大きく異なることが明らかとなった（図3. 3）。特に、野生個体では核酸代謝産物が多く検出された傾向があったが、飼育個体では核酸代謝産物が少なくアミノ酸が多く排泄されていた。野生個体では、他の草食動物でも見られるように、餌に含まれる低タンパクな餌に対応するため、核酸の分解物からタンパク質の新生が行われていることを示唆している。一方で、飼育個体では上記ついでみ回数から推定した野生個体の栄養摂取量からも考えられたように、タンパク質が供給過多ですべてを利用してきかず、盲腸内にも流れ込んできていると考えられた。

成分分析でも明らかになっているように、飼育個体に給餌している小松菜はタンパクを中心とした栄養成分は多くないため、現行のペレット飼料がタンパク過多に寄与していると考えられた。飼育ライチョウは野生個体に比べて体重が重くなってしまう傾向にあるため、タンパク質含有量が低く、カロリーの引く餌の開発を行う必要があることが明らかになった。

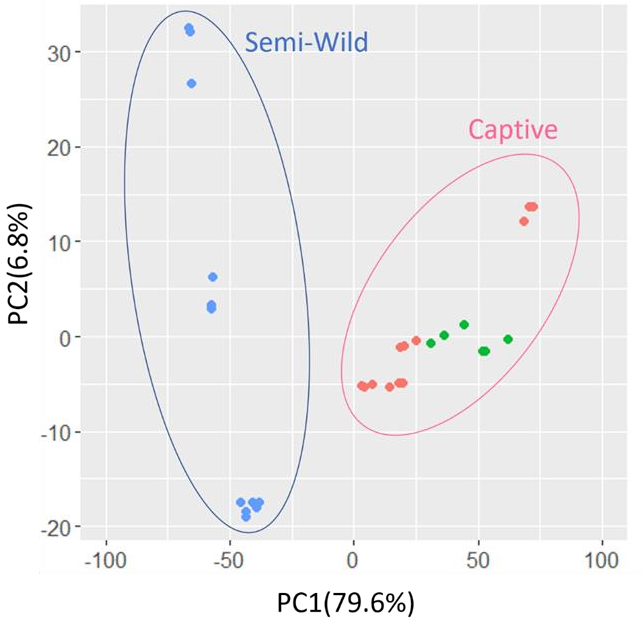


図3. 3 野生個体と飼育個体における盲腸糞内のメタボローム解析の結果。青色のプロットが野生個体、赤が飼育雛、緑が飼育親の結果を示している。

高山植物と8種の市販野菜についてメタノール抽出物のLC—MS/MSによる網羅解析を行った。この結果コマツナ、カイワレ、ブロッコリースプラウト、キャベツ、チコリなどの野菜が、ライチョウが好む高山植物の一部（オンタデ葉、コケモモ葉、ムカゴトラノオ葉および実）と相対的に類似した成分組成比を持っていることが示唆された（図3. 4）。

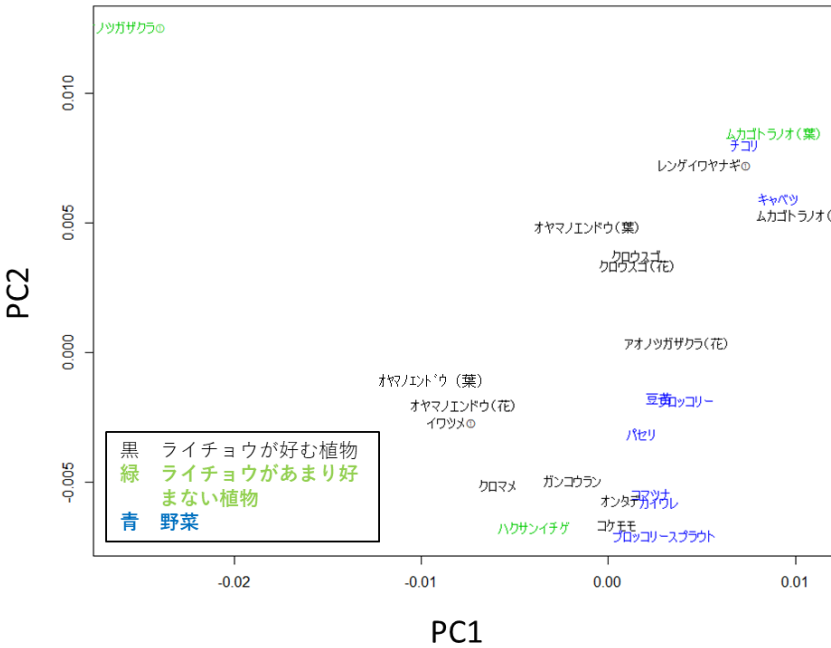


図3. 4 ライチョウの餌植物と市販野菜の相対的な成分比較

4-4 餌植物の成分解析とリスト化

餌植物の成分解析を完了し、化合物のリスト化に成功した。また、ライチョウが好む植物とあまり好まない植物の成分傾向を明らかにした。

○ライチョウが好む植物（種名および部位）の成分解析の結果

野生ニホンライチョウが好む高山植物の成分解析結果を表3. 5 ～表3. 19 に示す。ライチョウが好む植物には、主成分として一次代謝産物（糖や脂質などの栄養源となる成分）を含み、少量の二次代謝産物（栄養源以外の化学成分）が含まれていることが分かった。

表3. 5 ガンコウランの茎葉の成分とその含有率（g/g 茎葉重量 パーセント）

化合物名	種類	含有率（％）
トリアシルグリセリド	中性脂肪	2.5
エピカテキン	フラボノイド	2.0
安息香酸	シキミ酸経路由来	～0.9
ウルソール酸	テルペノイド	0.6
α、β-アミリン	テルペノイド	0.6
イソクエルシトリン	フラボノイド配糖体	0.5
ピノシルビン	スチルベン	0.4

表3. 6 ガンコウランの実の成分とその含有率（g/g 茎葉重量 パーセント）

化合物名	種類	含有率（％）
マルトース	糖質	6.3
オレイン酸	脂肪酸	0.4
トリアシルグリセリド	中性脂肪	0.4

表3. 7 ミネズオウの茎葉の成分とその含有率 (g/g 茎葉重量 パーセント)

化合物名	種類	含有率 (%)
トリロバチン	配糖体	5.3
スクロース	糖質	3.8
トリアシルグリセリド	中性脂肪	2.9
グルコガリン	配糖体	1.4
リノレン酸	脂肪酸	0.7
β -アミリン	テルペノイド	0.6
リノール酸	脂肪酸	0.5
8-デメチルユーロカリプチン (メチル化フラボノイド)	フラボノイド	0.3

表3. 8 ミネズオウの花の成分とその含有率 (g/g 花重量 パーセント)

化合物名	種類	含有率 (%)
フロリジン	配糖体	3.7
マルトース	糖質	2.0
トリアシルグリセリド	中性脂肪	0.4
リノレン酸	脂肪酸	0.7
リノール酸	脂肪酸	0.2

表3. 9 コケモモの茎葉の成分とその含有率 (g/g 茎葉重量 パーセント)

化合物名	種類	含有率 (%)
アルブチン	配糖体	3.3
スクロース	糖質	1.4
α -リノレン酸	脂肪酸	0.7
カテキン	フラボノイド	0.7
トリアシルグリセリド	中性脂肪	0.5
β -アミリン	テルペノイド	0.1

表3. 10 コメバツガザクラの茎葉の成分とその含有率 (g/g 茎葉重量 パーセント)

化合物名	種類	含有率 (%)
スクロース	糖質	6.9
タキシフォリン-3-O- β -グルコシド	フラボノイド配糖体	2.8
イソラムネチン-3-O- β -グルコシド	フラボノイド配糖体	0.8
α 、 β -アミリン	テルペノイド	0.7
リノール酸	脂肪酸	0.5
トリアシルグリセリド	中性脂肪	0.5
オレイン酸	脂肪酸	0.3
糖脂質	糖脂質	0.2

表3. 11 アオノツガザクラの花の成分とその含有率 (g/g 花重量 パーセント)

化合物名	種類	含有率 (%)
マルトース	糖質	2.6
カテキン, エピカテキン, ガロカテキン	フラボノイド	1.2
ウバオール、 β -アミリン	テルペノイド	0.3
トリアシルグリセリド	中性脂肪	0.1
リノール酸	脂肪酸	0.1

表3. 12 クロウソゴの葉の成分とその含有率 (g/g 茎葉重量 パーセント)

化合物名	種類	含有率 (%)
グルコース、スクロース、フルクトース	糖	6.0
モノガラクトシルジアシルグリセロール (MGDG)	糖脂質	0.2
14, 16-ノナコサンジノン	脂質	0.2
ウルソール酸	テルペノイド	0.2
β -シトステロール	テルペノイド	0.2
ナリンゲニン	フラボノイド	0.1

表3. 13 クロウスゴの花の成分とその含有率 (g/g 茎葉重量 パーセント)

化合物名	種類	含有率 (%)
グルコースとスクロース	糖	4.2
フルクトース	糖	0.5
オレイン酸	脂肪酸	0.1
トリリノレン	脂質	0.04
ナリンゲニン	フラボノイド	0.5
オレアノール酸とウルソール酸	テルペノイド	0.06

表3. 14 レンゲイワヤナギの葉の成分とその含有率 (g/g 茎葉重量 パーセント)

化合物名	種類	含有率 (%)
スクロースとマルトース	糖	2.7
モノガラクトシルジアシルグリセロール	糖脂質	0.7
リノレン酸	脂肪酸	0.1
リノール酸	脂肪酸	0.02
オレアノール酸	テルペノイド	0.3

表3. 15 イワツメクサの葉の成分とその含有率 (g/g 茎葉重量 パーセント)

化合物名	種類	含有率 (%)
リノレン酸	脂肪酸	0.6
糖の混合物	糖	0.3
オレイン酸	脂肪酸	0.3
モノガラクトシルジアシルグリセロール (MGDG)	糖脂質	0.1
トリリノレン	脂質	0.1
リノール酸	脂肪酸	0.1

表3. 16 オンタデの葉の成分とその含有率 (g/g 茎葉重量 パーセント)

化合物名	種類	含有率 (%)
スクロース	糖	1.6
フルクトース	糖	0.5
グルコース	糖	0.3
リノレン酸	脂肪酸	0.3
クロロフィル	光合成色素	0.3

表3. 17 オヤマノエンドウの葉の成分とその含有率 (g/g 茎葉重量 パーセント)

化合物名	種類	含有率 (%)
糖の混合物	糖	3.9
β -メチルグルコース	糖	0.8
グルコース	糖	0.6
リノレン酸	脂肪酸	0.3
ガロカテキン	フラボノイド	0.3
トリアシルグリセリド	中性脂肪	0.2
オレイン酸	脂肪酸	0.1

表3. 18 オヤマノエンドウの花の成分とその含有率 (g/g 茎葉重量 パーセント)

化合物名	種類	含有率 (%)
マルトース	糖	4.1
β -メチルグルコース	糖	0.8
ガロカテキン	フラボノイド	0.6
トリアシルグリセリド	中性脂肪	0.1

表3. 19 ムカゴトラノオのムカゴの成分とその含有率 (g/g 茎葉重量 パーセント)

化合物名	種類	含有率 (%)
マルトース	糖	3.3
糖脂質	糖脂質	0.7
リノール酸	脂肪酸	0.7
エピカテキン	フラボノイド	0.4
オレイン酸	脂肪酸	0.1

○ライチョウが好まない植物（種名および部位）

ライチョウが好まない高山植物の成分解析結果を表3. 20～表3. 22 に示す。アオノツガザクラとハクサンイチゲの葉には、二次代謝産物（栄養源以外の化学成分）が多く含まれることがわかった。ライチョウはこれら二次代謝産物の摂取を拒んでいる可能性が示唆された。

表3. 20 アオノツガザクラの茎葉の成分とその含有率（g/g 茎葉重量 パーセント）

化合物名	種類	含有率 (%)
スクロース	糖質	2.0
3-メトキシ-5-メチルフェノール	ポリケチド	1.5
ガロカテキン	フラボノイド	1.4
タキシフォリン-3-O-β-グルコシド	フラボノイド配糖体	1.4
モノガラクトシルジアシルグリセロール (MGDG)	脂質	0.4
リノール酸	脂肪酸	0.4
5-メトキシベンゼン-1,3-ジオール	ポリケチド	0.3

表3. 21 ムカゴトラノオの葉の成分とその含有率（g/g 茎葉重量 パーセント）

化合物名	種類	含有率 (%)
マルトース	糖	4.2
糖脂質	糖脂質	0.7
クロロフィル	光合成色素	0.2
オレイン酸	脂肪酸	0.2

表3. 22 ハクサンイチゲの葉の成分とその含有率（g/g 茎葉重量 パーセント）

化合物名	種類	含有率 (%)
マルトース*	糖	2.0
フルクトース	糖	1.5
リノール酸	脂肪酸	1.4
アラニンとその誘導体	アミノ酸	1.4
リノレン酸	脂肪酸	0.4
トリリノレン	脂質	0.4
カウロシドG	サポニン	0.3

【特殊な化学成分の化学合成】

・ビベンジルの化学合成

ガンコウランの葉から得られたビベンジルは市販されておらず、入手が困難であったため、化学合成に取り組んだ（図3. 2. 1）。フェニル酢酸誘導体とシリングアルデヒドを縮合させて、ラク톤を合成した。このラク톤をエチレングリコール中、水酸化カリウムで処理することで、*trans*-アルケンを合成した。そして、二重結合に水素を添加し、目的のビベンジルを合成することに世界ではじめて成功した。この研究成果を日本農芸化学会の英文誌 *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* に発表したところ、その成果が高く評価されBBB論文賞を受賞した。

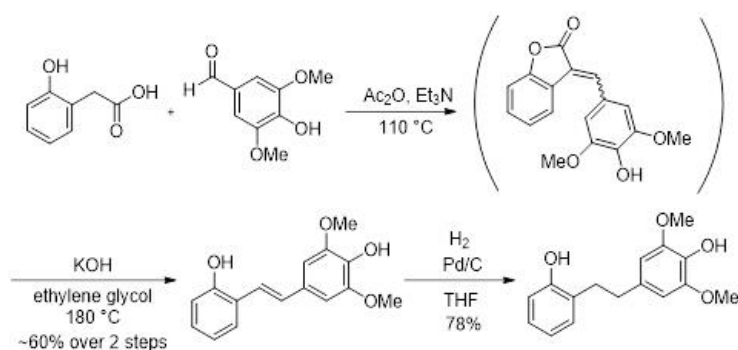


図3. 5 ビベンジルの化学合成

・メチル化フラボノイドの化学合成

ミネズオウの葉から単離した6-メチル化フラボノイドも入手困難であったため、化学合成による供給を試みた（図3. 6）。市販のトリメチルアピゲニンに三塩化ホウ素を作用させ、ジメチルアピゲニンを得た。ジメチルアピゲニンにベンジルトリメチルアンモニウムジクロロヨーゾドを反応させたところ、6 位に選択的にヨウ素を導入することに成功した。5 位のフェノール性ヒドロキシ基をメチル基で保護し、パラジウム触媒を用いたクロスメチル化反応に付したところ、目的のメチル化フラボノイドを合成することに成功した。現在、この研究成果を論文にまとめ、投稿する段階である。

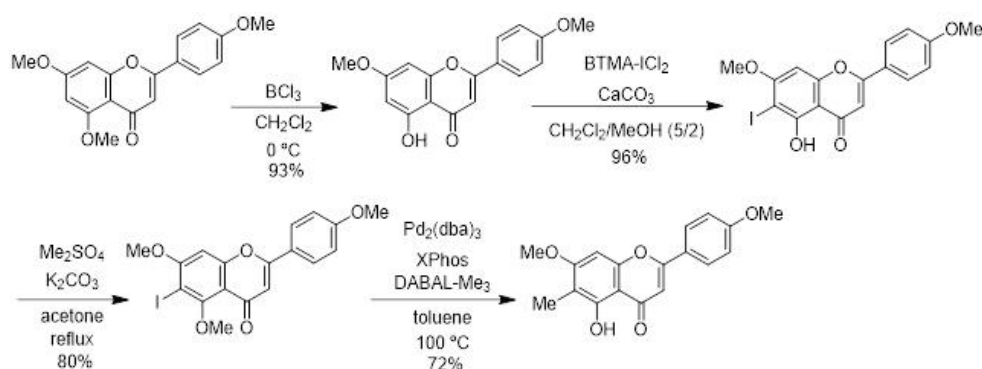


図3. 6 メチル化フラボノイドの化学合成

4-5 高山植物に含まれる二次代謝産物の抗アイメリア原虫活性評価

ニホンライチョウが好む6種の高山植物（ガンコウラン、ミネズオウ、コケモモ、クロウソグ、オヤマノエンドウおよびオンタデ）由来の化合物、計23種の化合物、また嗜好性の低い高山植物（アオノツガザクラおよびハクサンイチゲ）由来の化合物、計4種について、1～100 μ Mの濃度にて侵入型虫体を暴露し、24時間後にトリパンプルーにより生死を判定した（表3. 23）。その結果、3種の高嗜好性植物の8種の化合物で有意に原虫の生存を低下させた。特に、K22、K25、K27 では極めて強い殺虫効果がみられた。また、同侵入型虫体をそれぞれの化合物に浮遊し（細胞生存率に影響のない最高の濃度）、牛腎由来株化細胞（MDBK細胞）に接種し、24時間培養後、侵入している虫体数を計測した。その結果、有意差がみられたのはK15ひとつのみであった。以上の結果から、ニホンライチョウが好んで食する高山植物には、抗原虫作用を有する化合物が含まれることが示唆され、その作用は、消化管内で直接、侵入型虫体に作用して殺滅し、重度感染のリスクを低減させている可能性が示唆された。

表3. 23 抗アイメリア原虫活性評価を行った化合物群（注）

サンプル番号	由来	嗜好性
K1	ガンコウラン（葉茎）	高
K2	ミネズオウ（葉）	高
K3	コケモモ（葉）	高
K4	オンタデ（葉）	高
K5	コケモモ（葉）	高
K6	ガンコウラン（葉茎）	高
K7	ミネズオウ（葉）	高
K8	ガンコウラン（葉茎）	高

K9	オヤマノエンドウ（花）	高
K10	ミネズオウ（葉）	高
K11	ガンコウラン（葉茎）	高
K12	アオノツガザクラ（葉茎）	低
K13	アオノツガザクラ（葉茎）	低
K14	オヤマノエンドウ（花）	高
K15	ミネズオウ（花）	高
K16	ガンコウラン（葉茎）	高
K17	コケモモ（葉）	高
K18	—	—
K19	アオノツガザクラ（葉茎）	低
K20	ミネズオウ（葉）	高
K21	—	—
K22	アオノツガザクラ（花）	高
	ガンコウラン（葉茎）	高
K23	クロウスゴ（葉）	高
K24	サンプル22を再精製	高
K25	レンゲイワヤナギ（葉）	高
K26	クロウスゴ（葉）、（花）	高
K27	クロウスゴ（葉）	高
K28	ハクサンイチゲ（葉茎）	低
K29	化学合成品	—

（注）未発表データであるため、各サンプルの化合物名は番号にて記載する。

4-6 ライチョウ専用飼料の開発

現在ライチョウの飼育で使用されているウサギ用ペレットのRM-4およびメンテナンスの成分を確認すると粗タンパクの割合（原物%）は15%程度であったため、環境省、日本動物園水族館協会、イースター株式会社と共にタンパク含有量の低いライチョウ専用ペレットの試作品を作成した。試作ペレットの成分については令和2年12月18日に開催された野生復帰ワーキンググループにおいて承認を受けた上で作製した（表3. 24）。

表3. 24既存の飼育ライチョウへの給餌飼料及び新たに作成したライチョウ専用ペレットの成分比較

商品名	RM-4	メンテナンス	ライチョウ専用ペレット
会社	船橋農場 (オリエンタル)	イースター	イースター
粗タンパク質%	16.5	>13	9
粗脂肪%	4.2	>2	1.5
粗繊維%	13	<22	25
粗灰分%	8.8	<11	7.5
水分%	8	<10	10
可溶無窒物%	49.5		
カルシウム%	1.54	>0.6	0.55
リン%	0.86	>0.4	0.25
ME cal/100g	365	>235	230
梱包量kg	20	6.5	8
費用¥	6682	6000	3200
1kgあたりの値段¥	334	923	400
原材料 (表記してあるものだけ)	アルファルファ、脱脂大豆、大麦、ふすま、ホワイトフィッシュミール、大豆油、糖蜜、食塩など	チモシーミール、小麦粉、アルファルファミール、小麦ふすま、脱脂大豆、ホミニーフード、植物抽出発酵エキス、コーングルテンフィード、殺菌処理乳酸菌、ミネラル類 (食塩、硫酸亜鉛、硫酸銅、硫酸コバルト、ヨウ素酸カルシウム)、アミノ酸類 (DL-メチオニン)、ビタミン類 (コリン、ナイアシン、B6、E、パントテン酸、A、B2、葉酸、ビオチン、D3)、甘味料 (ソーマチン)	チモシー、アルファルファ、ふすま、デンプンなど、このほかにタンポポとオオバコなどの粉末も使用する

○飼育個体 (保険個体群) への給餌試験

[給餌園館；那須どうぶつ王国、いしかわ動物園、恩賜上野動物園]

元々ライチョウ飼育で使用されていたペレット飼料2種のうちタンパク量が多かったのはRM-4であった (表3. 24)。給餌試験を実施した3園館のうちRM-4を主として利用していたのはいしかわ動物園のみであった。いしかわ動物園ではライチョウ専用ペレット給餌開始から徐々に割合を増やし、1か月程度で全てのペレットを新ペレットに交換していった。この園では新ペレットに切り替え後、顕著に体重が減少した個体がみられた (図3. 7)。一方、那須どうぶつ王国や上野動物園では現行飼料の中でタンパク量が低かったメンテナンスを使用していた。上野動物園ではライチョウ専用ペレットの給餌割合も全体の4分の1程度までしか交換しなかったためかペレット切り替えによる体重の変化はあまり見られなかった。

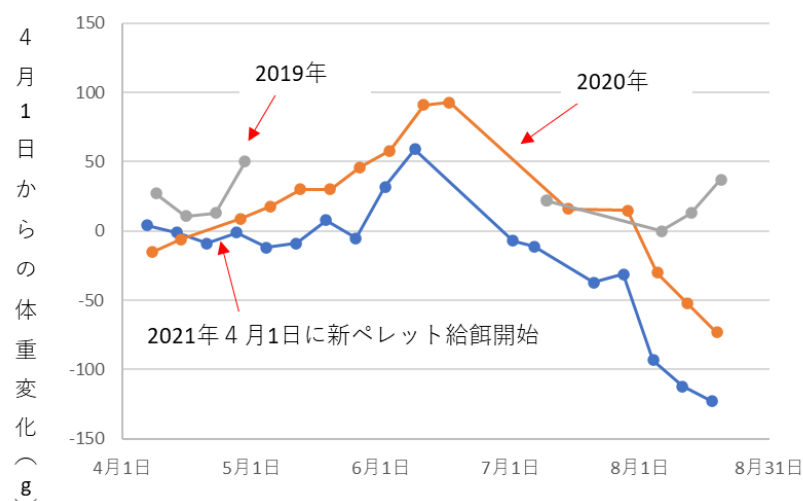


図3. 7 いしかわ動物園の雌個体の新ペレットに切り替えた後の体重変化と過去の体重変化の比較

RM-4からライチョウ専用ペレットに変更したいしかわ動物園では、ライチョウ専用ペレット給餌個体の糞の繊維量が増え、色は薄くなる傾向があった。RM-4給餌個体は給餌量を制限することも多かったため矮小糞等がよく見られたが、専用ペレット給餌個体はほぼ飽食したと考えられ、糞のサイズや形状が安定したとの観察記録を得ている。正常小腸糞のサイズや形では、両者に差異はみられなかった。盲腸糞についても安定して良好な性状を保っており、今のところ大きな健康被害は観察されていない。

○ケージ保護個体及び動物園導入個体への給餌試験

令和3年には中央アルプスで実施したケージ保護事業においても専用ペレットの給餌を試みた。なお、本年度はケージ保護した家族のうち2家族を8月3日に那須どうぶつ王国、茶臼山動物園にそれぞれ1家族導入した。これは翌年以降に飼育下導入個体を繁殖させて再び中央アルプスに野生復帰させ、個体数増加に寄与させるためである。中央アルプス現地でケージ保護していた際には砕いたペレットをミルワームに振りかけるなどして給餌した。ペレット飼料に退位する嗜好性は主に雌親に依存しており、家族間で大きく異なっていた。しかし、比較的ペレットを食べた家族においてもペレットのみを皿に入れて給餌しても多くは食べなかった。

飼育下に導入した家族についてはライチョウ専用ペレットを基本に給餌を行っている。茶臼山動物園に導入した家族、特に雌親についてはケージ保護していた時からペレット飼料への食いつきが悪く、動物園導入後も市立大町山岳博物館が独自作成したペレット飼料の方が嗜好性が高いことが報告されている。一方で、那須どうぶつ王国では動物園導入直後からライチョウ専用ペレットへの食いつきがよくなったことが報告されている。現在まで両園において健康的な問題は明らかになっていない。

4-7 動物園導入後の細菌叢の変化

ライチョウの腸内細菌叢は、ケージ保護から動物園移送の過程において変化していることが分かった(図3. 8-3. 13)。一般的な野生成ニホンライチョウの腸内細菌叢は、Clostridiales, Coriobacterialesが主な構成要素となっており乳酸生成菌と乳酸利用菌の共生も報告されている¹⁾のに対し、動物園移送後のニホンライチョウの腸内細菌叢は、LachnospiralesとOscillospiralesが主な構成要素になっていた。さらに、動物園移送前のケージ保護期間では、野生成ニホンライチョウと同様にCoriobacterialesが大きな割合を占めていた。茶臼山移送個体は、那須移送個体に比べると1ヶ月あまりケージ保護の状態を維持したが、2ヶ月が経過すると両園の個体群ともに比較的類似した菌叢構成を示すようになった。

ケージ保護期間中と動物園移送後の腸内細菌叢が異なる理由として、餌の違いが考えられる。ケージ保護期間中は高山植物(オンタデ、イワツメクサ、ガンコウラン、チングルマ、クロウスゴの葉およびコケモモ果実)に、ミルワーム、野菜(小松菜、セロリ)およびブルーベリーやリンゴ果実を与えられていたのに対し、動物園移送後はライチョウ用ペレット、小松菜、ミルワーム、野菜(小松菜、セロリ、ブロッコリースプラウト)およびブルーベリーやリンゴ果実を給餌していた。

その後、移送先の2動物園で与えられたエサは異なっており、茶臼山では、イワツメクサやオンタデなど高山植物の給与が比較的長く続けられた。また、茶臼山に導入された個体は、移送前からライチョウ専用ペレットへの食いつきが悪かったことが報告されていた。一方那須に導入された個体はライチョウペレットへの食いつきが移送前から良かった家族であり、高山植物の供給についても茶臼山動物園よりも少なかった。このような餌環境の違いが菌叢変化のスピードに影響を与えたものと考えられる。

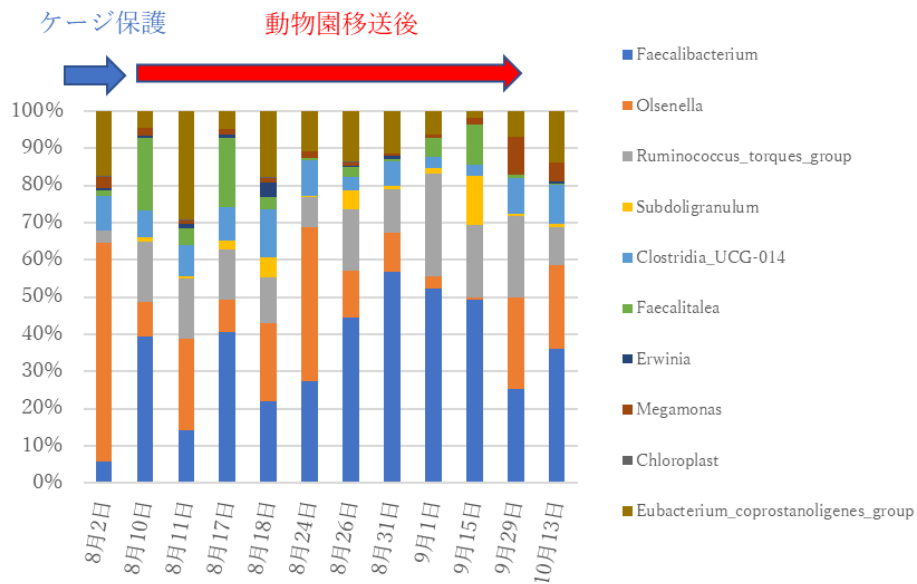


図3. 8 茶臼山移送個体（オヤ）盲腸細菌 Genusレベルの解析

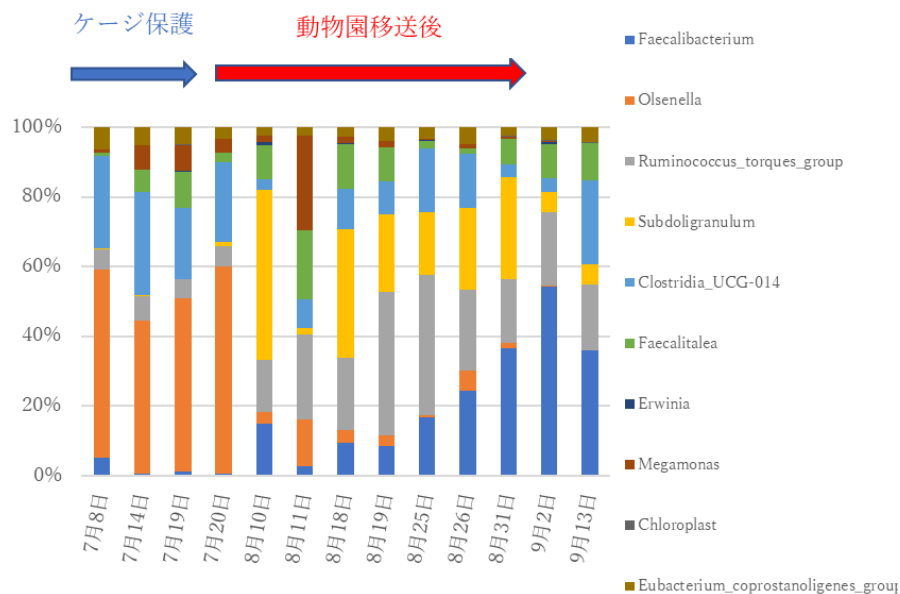


図3. 9 茶臼山移送個体（ヒナ）盲腸細菌 Genusレベルの解析結果

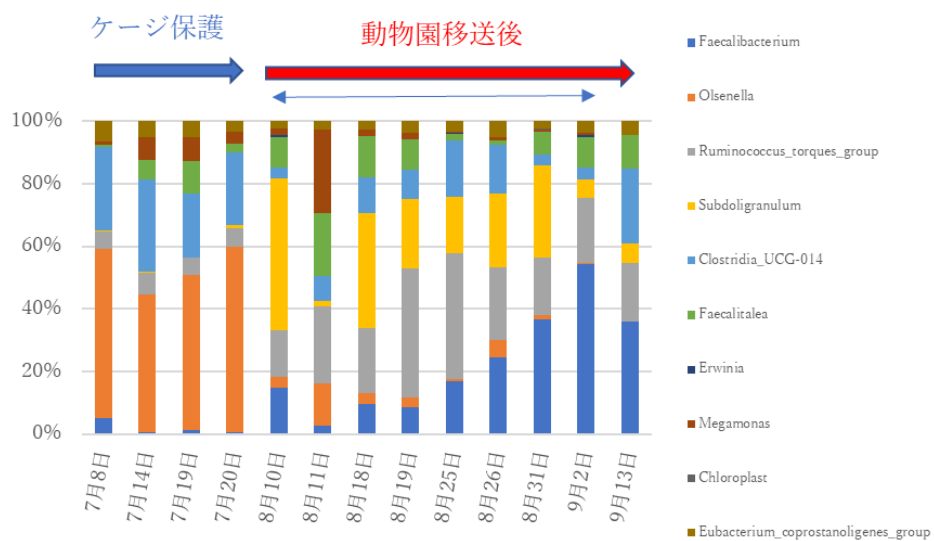


図3. 10 那須移送個体（オヤ）盲腸細菌Genusレベルの解析.

(⇄区間は、オヤヒナの区別が不明)

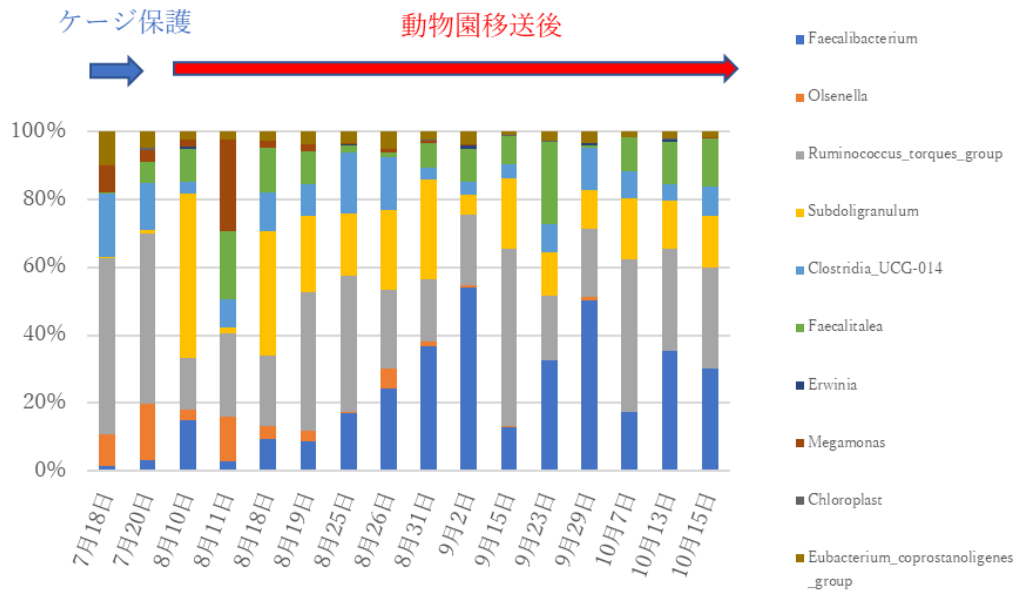


図3. 11 那須移送個体（ヒナ）盲腸細菌Genusレベルの解析。
 (←区間は、オヤヒナの区別が不明)

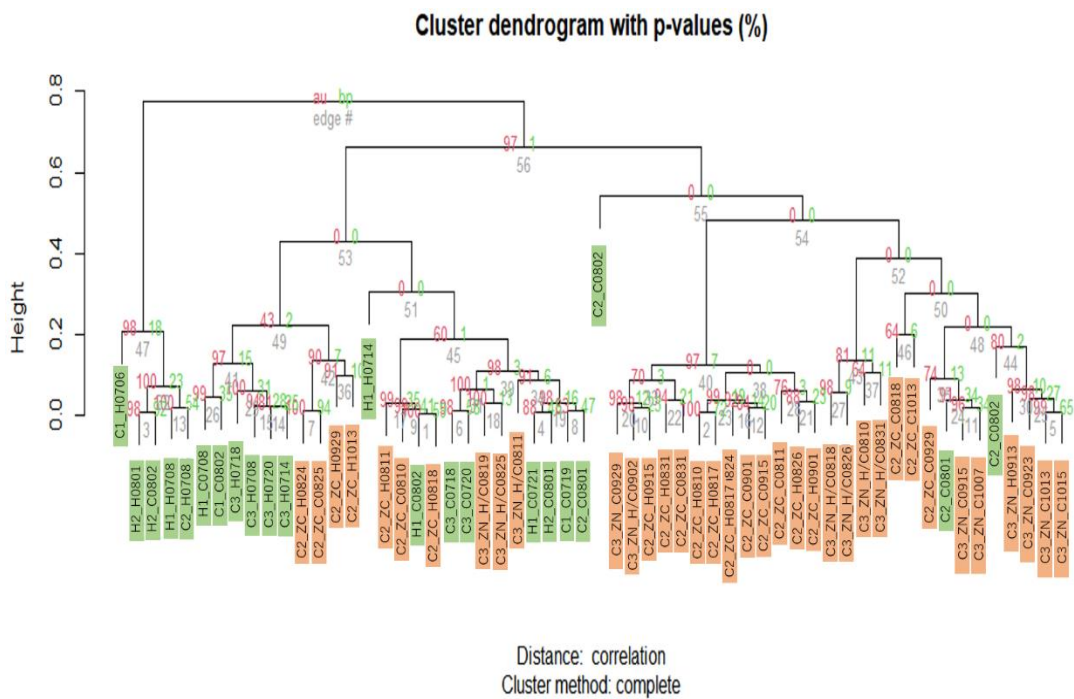


図3. 12 得られた腸内細菌のクラスター解析

H1（宝剣1）やC2（頂上ケージ2）は、ケージ番号を、ZC（茶臼山）とZN（那須どうぶつ王国）は移送先を示し、つづくHあるいはCは、オヤ（Hかヒナ（C）を表す。最後の数値は日付を示す。

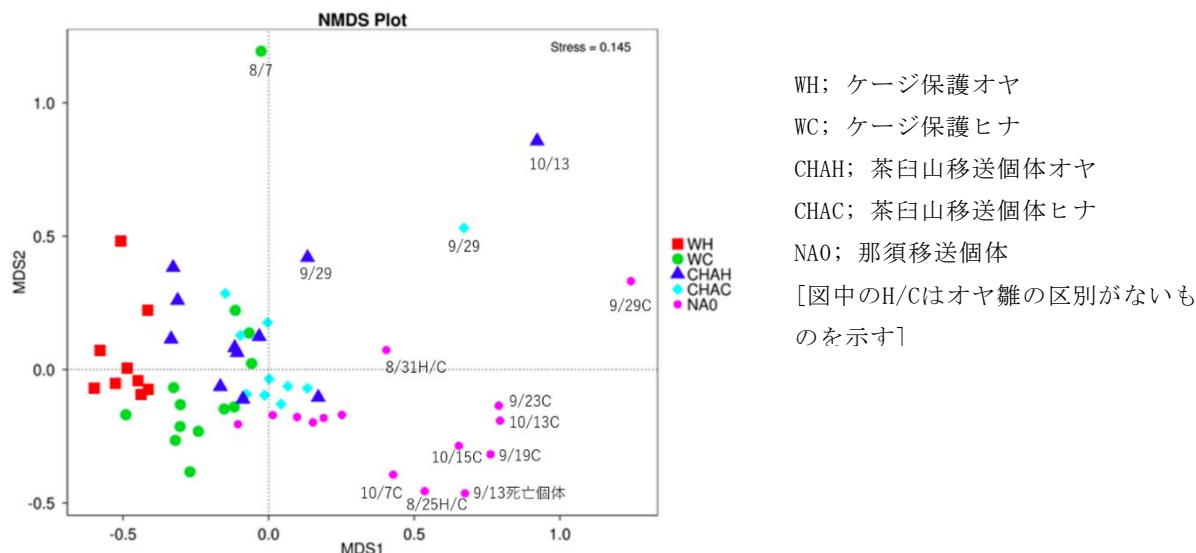


図3. 13 動物園に導入した中央アルプス産家族の腸内細菌叢の変化

5. 研究目標の達成状況

ライチョウが餌としている高山植物の一般栄養成分分析を実施し、ライチョウ専用ペレットを作成できた。本新飼料について実施した給餌試験から、過タンパクによる体重超過が懸念されていた飼育個体において特にRM-4から切り替えた場合には体重が減少した個体が多くみられた。一方で、野生個体を飼育下導入した後に腸内細菌叢の変化が確認され、その原因として高山植物供給不足やペレット飼料の影響が考えられた。今後、生合成に成功した高山植物の二次代謝産物を飼料に添加することで菌叢維持への寄与が期待される。また、ライチョウの主要な餌植物の化学成分の解明とリスト化は、当初の計画通りに成功した。一連の研究を通じて「ライチョウの嗜好性」と「植物に含まれる二次代謝産物の含有率」との相関性を見出した。また、ライチョウが好む植物に含まれる二次代謝産物から、以下のものが挙げられる²⁾。これらの餌には高山植物と同じ成分を含むため、人工飼育のニホンライチョウを野に帰す際に、食事トレーニングとしても利用できる可能性がある。特にリンゴの皮には抗原虫活性を有するK22、K25、K15が含まれているので^{2,3)}、アイメリア原虫感染防除する最適な餌候補として提案できる。

・リンゴ、ブドウ、トマトの皮・オリーブ、ブルーベリー、ラズベリー、リンゴンベリー・ブロッコリー、ソバ、セリ、セロリ、レタス、シソ、キャベツ、芽キャベツ・オレンジ、ブルーベリー。

今回特定できた高山植物に含まれる多くの化学成分は試薬会社から入手可能であったが、入手困難な化学成分に関しては化学合成法を確立し、安定的な供給を可能にした。さらに抗アイメリア原虫活性を有する化学成分を明らかにして、理想的な餌候補を提案することができ、想定以上の成果が得られたと評価する。

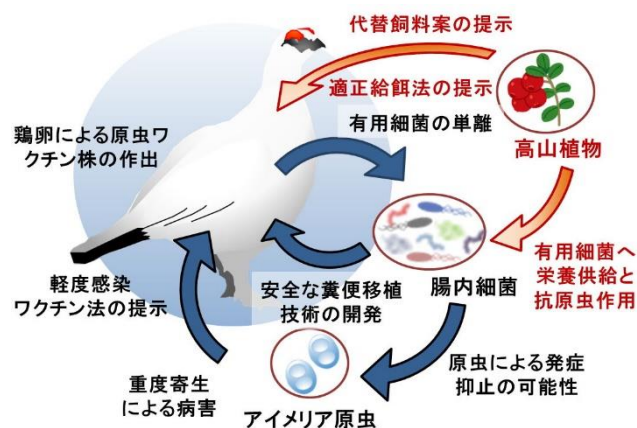


図3. 14 サブテーマ3の研究目標の達成状況の概略図

6. 引用文献

- 1) A. UEDA, A. KOBAYASHI, S. TSUDHIDA, T. YAMADA, K. MURATA, H. NAKAMURA and K. USHIDA (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. *Microorganisms*, 6(3), 77.
- 2) 食品成分データベース : <https://fooddb.mext.go.jp/index.pl>
- 3) A. SZAKIEL, C. PACZKOWSKI, F. PENSEC and C. BERTSCH (2012) Fruit cuticular waxes as a source of biologically active triterpenoids. *Phytochem. Rev.* 11, 263-284.

Ⅲ. 研究成果の発表状況の詳細

(1) 誌上発表

<査読付き論文>

【サブテーマ1】

- 1) M. MATSUBAYASHI, A. KOBAYASHI, M. KANEKO, M. KINOSHITA, S. TSUCHIDA, T. SHIBAHARA, M. HASEGAWA, H. NAKAMURA, K. SASAI, and K. USHIDA: Int. J. Parasitol. Parasites Wildl. 15, 225-230 (2021) (IF:2.7) Distribution of *Eimeria uekii* and *Eimeria raichoi* in cage protection environments for the conservation of Japanese rock ptarmigans (*Lagopus muta japonica*) in the Japanese Alps.
- 2) M. MATSUBAYASHI, M. KINOSHITA, A. KOBAYASHI, S. TSUCHIDA, T. SHIBAHARA, M. HASEGAWA, H. NAKAMURA, K. SASAI, K. USHIDA: Int. J. Parasitol. Parasites Wildl. 12, 19-24 (2020) (IF:2.7) Parasitic development in intestines and oocyst shedding patterns for infection by *Eimeria uekii* and *Eimeria raichoi* in Japanese rock ptarmigans, *Lagopus muta japonica*, protected by cages in the Southern Japanese Alps.

【サブテーマ2】

特に記載すべき事項はない。

【サブテーマ3】

- 1) S. OKA, R. KUNIBA, N. TSUBOI, S. TSUCHIDA, K. USHIDA, S. TOMOSHIGE, and K. KURAMOCHI: Biosci. Biotechnol. Biochem. 84 (1), 31-36 (2020) (IF:2.0) Isolation, synthesis, and biological activities of a bibenzyl from *Empetrum nigrum* var. *japonicum*.
- 2) A. KOBAYASHI, S. TSUCHIDA, A. UEDA, T. YAMADA, K. MURATA, H. NAKAMURA, and K. USHIDA: J. Vet. Med. Sci. 81 (9), 1389-1399 (2019) (IF:1.3) Role of coprophagy in the cecal microbiome development of an herbivorous bird Japanese rock ptarmigan.

<査読付論文に準ずる成果発表>

【サブテーマ1】

- 1) 楠田哲士編：神の鳥ライチョウの生態と保全-日本の宝を未来へつなぐ-、緑書房、224-225 (2020)「ライチョウのコクシジウムと寄生原虫の新種発見（執筆担当：松林誠）」

【サブテーマ2】

- 1) 楠田哲士編：神の鳥ライチョウの生態と保全-日本の宝を未来へつなぐ-、緑書房、229-231 (2020)「野生復帰に向けた野生型の体づくり-腸内細菌の役割（執筆担当：牛田一成）」
- 2) 楠田哲士編：神の鳥ライチョウの生態と保全-日本の宝を未来へつなぐ-、緑書房、231-233 (2020)「野生復帰に向けた野生型の体づくり-野生型腸内環境を誘導するライチョウ用飼料の開発-（執筆担当：土田さやか）」
- 3) 土田さやか、牛田一成：生物の科学 遺伝、74, 2 (巻, 号), 202-210 (2020)「ライチョウの腸内細菌叢と動物園で飼って増やす取り組みの課題-野生復帰技術の確立に向けた取り組み」
- 4) 土田さやか、牛田一成、村田浩一、宮野典夫：市立大町山岳博物館研究紀要、5 (号), 19-24 (2020)「成スバールバルライチョウの消化管内容物滞留時間測定」
- 5) 土田さやか：Journal of Policy Studies、60 (号), 85-88 (2020)「希少野生動物保全のための腸内細菌研究」

【サブテーマ3】

- 1) 楠田哲士編：神の鳥ライチョウの生態と保全-日本の宝を未来へつなぐ-、緑書房、28-43 (2020)「ニホンライチョウの1年の生活（執筆担当：小林篤）」

- 2) 楠田哲士編：神の鳥ライチョウの生態と保全-日本の宝を未来へつなぐ-、緑書房、107-109 (2020)「野生ライチョウの現状と課題-北アルプス・乗鞍岳のライチョウ-（執筆担当：小林 篤）」

＜その他誌上発表（査読なし）＞

【サブテーマ 1】

特に記載すべき事項はない。

【サブテーマ 2】

- 1) 土田さやか：モンキー：霊長類学からワイルドライフサイエンスへ、6巻3号（2021）「野生動物のおなかの中の秘密 パート2 第5回：ライチョウの腸内細菌の不思議」
- 2) 牛田一成：月刊「日本の学童保育」、8（2021）「野生動物の「腸」能力のふしぎ-その1」
- 3) 牛田一成：月刊「日本の学童保育」、9（2021）「野生動物の「腸」能力のふしぎ-その2」
- 4) 牛田一成：AACK Newsletter、99（2021）「ニホンライチョウの保護事業」
- 5) 牛田一成：先生、ウンチとれました、さ・え・ら書房（書籍）（2019）「野生動物のウンチの中にある秘密」
- 6) 牛田一成：地域文化、131（2019）「母鳥から雛への贈り物」

【サブテーマ 3】

特に記載すべき事項はない。

（2）口頭発表（学会等）

【サブテーマ 1】

- 1) 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162回日本獣医学会（2019）「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態および分子系統樹解析」

【サブテーマ 2】

- 1) 井端隆太郎、小林篤、土田さやか、牛田一成：飼育野生動物栄養研究会（2019年）「野生ニホンライチョウの栄養摂取量の推定」
- 2) K. USHIDA: The 14th International Conference on Environmental Enrichment, Kyoto, Japan (2019) 「Ex-situ conservation of endangered animal species and the role of zoos for future re-introduction」
- 3) S. TSUCHIDA, A. KOBAYASHI, K. MURATA, H. NAKAMURA and K. USHIDA: The 14th International Conference on Environmental Enrichment, Kyoto, Japan (2019) 「Ex-situ conservation protocol of Japanese Rock Ptarmigans based on their natural intestinal environment」

【サブテーマ 3】

- 1) 小林 篤：国のライチョウ保全事業と中央アルプスでの野生復帰事業（2022）「ライチョウ基金シンポジウム：ライチョウの魅力とこれからの保全」
- 2) 倉持幸司、岡咲幸、國場遼、坪井希、保坂啓介、土田さやか、小林篤、松林誠、牛田一成：日本農芸化学会（2021）「有機化学・天然物化学的アプローチによるニホンライチョウの保全研究」
- 3) 小林 篤：鳥学会2021年度大会 自由集会：野外鳥類学とメタゲノム解析 鳥類の餌組成や腸内細菌叢を解明する（2021）「草食性鳥類における腸内細菌の重要性を考える」
- 4) 倉持幸司：日本農芸化学会（2020）「有機合成から生命科学へのアプローチ」

（3）「国民との科学・技術対話」の実施

【サブテーマ 1】

- 1) 松林誠：第19回ライチョウ会議ぎふ大会 「ニホンライチョウに寄生するアメリカ原 虫の病原性と発症を予防するワクチン開発」(2020年11月7日～8日、参加者約500名)

【サブテーマ 2】

- 1) 土田さやか：第19回ライチョウ会議ぎふ大会 「野生復帰に向けた飼育ライチョウへの「野生型腸内細菌」移植」(2020年11月7日～8日、参加者約500名)
- 2) 牛田一成：第19回ライチョウ会議ぎふ大会 「野生型腸内環境を誘導するライチョウの飼料開発」(2020年11月7日～8日、参加者約500名)
- 3) 牛田一成、中部大学春日丘中学校における特別講義「野生動物の腸内細菌研究について」(2019年12月9日、聴講者約30名)

【サブテーマ 3】

- 1) 小林 篤：八十二文化財団教養講座：ライチョウと共に生きる(2022)「ライチョウから学ぶ自然保護」(2022年3月27日、参加者約50名)
- 2) 小林 篤：岐阜県立博物館教養講座(2021)「ライチョウ保全の最前線から」(2021年4月25日、参加者約50名)
- 3) 小林篤：第19回ライチョウ会議ぎふ大会(2020)「第二期ライチョウ保護増殖事業とライチョウの未来」(2020年11月7日～8日、参加者約500名)
- 4) 小林篤：第19回ライチョウ会議ぎふ大会「中央アルプスにおけるライチョウの野生復帰及び移植事業の取り組みと今後」(2020年11月7日～8日、参加者約500名)
- 5) 倉持幸司、サイエンス夢工房・公開講座(2019)「化学の視点で生物を研究する～ニホンライチョウの餌の成分解析に基づく保全研究を中心に～」(2019年11月30日、聴講者約80名)

(4) マスコミ等への公表・報道等>

【サブテーマ 1】

特に記載すべき事項はない。

【サブテーマ 2】

- 1) NHK地上波Eテレ「サイエンスZERO」(2022年4月24日、アニマル腸内細菌“腸”能力SPで、ライチョウの保全に役立つ腸内細菌について15分ほど紹介)
- 2) 朝日新聞(2021年9月20日、「ひとライチョウの腸内細菌研究をするノルウェー人留学生 アンネ・マーリット・ヴィークさん」)
- 3) 牛田一成、土田さやか：教育学術新聞(2019年10月2日、全国版、「高等教育の明日 われら大学人」)

【サブテーマ 3】

特に記載すべき事項はない。

(5) 本研究費の研究成果による受賞

- 1) 土田さやか：2021年度伊藤早苗賞(若手女性研究者部門)受賞
- 2) S. OKA, R. KUNIBA, N. TSUBOI, S. TSUCHIDA, K. USHIDA, S. TOMOSHIGE, and K. KURAMOCHI: Biosci. Biotechnol. Biochem. 84 (1), 31-36 (2020) (IF:2.0) Isolation, synthesis, and biological activities of a bibenzyl from *Empetrum nigrum* var. *japonicum*. : BBB論文賞受賞(2020年)

IV. 英文Abstract

Improvement of Intestinal Environments to Facilitate Reintroduction of Japanese Rock Ptarmigans

Principal Investigator: Makoto MATSUBAYASHI

Institution: 1-58 Rinku Ourai Kita, Izumisano City, Osaka, JAPAN

Tel: 072-463-5713 / Fax: 072-463-5093

E-mail: matsubayashi@omu.ac.jp

Cooperated by: Chubu University and Toho University

[Abstract]

Key Words: Alpine plant, *Eimeria*, Rock ptarmigan, Feed, Intestinal environment, Intestinal flora

Japanese rock ptarmigans exclusively inhabit the timberline region of the Japanese alpine zone. Recently, the ptarmigan population has been declining and the species is currently listed as vulnerable in the Japanese Red Data Book. The Ministry of the Environment has promoted various conservation strategies, including *in situ* cage protections and artificial propagation in zoos. However, for the production of birds than can be successfully returned to their habitats, it is essential to create wild intestinal flora in chicks to enable digestion of indigestible plants and their toxic compounds. Furthermore, it has been reported that the protozoan parasite *Eimeria* spp. highly infect Japanese rock ptarmigans and thus, it is thought that tolerance against *Eimeria* parasites is needed in artificially propagated birds. First, the pathogenicity of *Eimeria* spp. infecting ptarmigans, *E. uekii* and *E. raichoi*, was clarified, namely diarrhea, depression, growth reduction and death. Based on our analyses, low dose inoculation in chicks could be effective to raise the immunity against *Eimeria* spp. infection. Chicken embryos were found to be capable of being utilized to produce the parasites for vaccination. Second, we successfully developed a filtration technology to remove *Eimeria* parasites from feces of wild rock ptarmigans in order to reduce the risk of parasite infection by safely transplanting the wild intestinal flora into artificially propagated birds. Furthermore, some useful bacteria, including newly identified species that could be effective for digestion of Alpine plants and resolution of toxic compounds, were isolated and successfully cultured. At least, one species of bacteria was found to be capable of reducing the pathogenicity of *Eimeria* spp. in the birds. Finally, primary and secondary metabolites in the Alpine plants were analyzed to produce appropriate artificial feeds for the rock ptarmigans. Based on the analysis, including the amount of daily intake, we were able to suggest breeding improvements for the birds and propose suitable feeding formulations. These findings can contribute to the generation of artificially propagated chicks that can be released into the wild for conservation strategies. The new strategy described herein, including understanding intestinal environments of wild animals and their composition, can improve conservation of endangered species worldwide.