

環境研究総合推進費 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 終了報告

研究組織

研究代表者：牛田一成(中部大)

サブテーマ1 牛田一成 協力)土田さやか(京府大) 倉持幸司(東京理科大)

松林誠(大阪府大) 上田敦(東工大) 山田拓司(東工大)

サブテーマ2 分担) 長谷川雅美(東邦大) 協力)小林篤

サブテーマ3 分担)村田浩一(日大)協力) 日本動物園水族館協会ライ

チョウ保護増殖PT 鈴木亮彦(日大) 日置あや(日大)

アドバイザー 中村浩志(元信大)園山慶(北大)R. A. Ims(トロムソ大)

プログラムオフィサー 松本和馬 (H28,30) 原島省 (H30)

様式D 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

ニホンライチョウ
(*Lagopus muta japonica*)



国指定特別天然記念物
国内希少野生動植物種

近年の生息数減少
約3000羽 → 1700羽
絶滅(地域絶滅)が危惧

ライチョウ保護増殖事業計画

- ▶ 生息域内保全対策
ヒナ保護ケージの導入
キツネ・テンなど捕食者対策

▶ 生息域外保全対策
将来の野生復帰個体群の確立を目指す取り組み
ニホンライチョウの人工孵化と飼育

**野生生活: 腸内菌による感染抵抗性・毒物
分解能力で生存**
飼育ライチョウ: 必須の腸内細菌を喪失

現状の課題

生息域外保全個
体の野生復帰には、
野生型腸内菌叢の
再構築が絶対に必要

現状の飼育技術
では、対応できな
い

- 無投薬飼育、腸内細菌叢再構築は、野生復帰を目指す生息域外保全事業成功の必須項目
- 生息域内研究と生息域外研究の有機的連携の鍵

サブテーマ2

腸内細菌
垂直伝播
様式の解明

サブテーマ1

有用腸内菌の
分離と確保

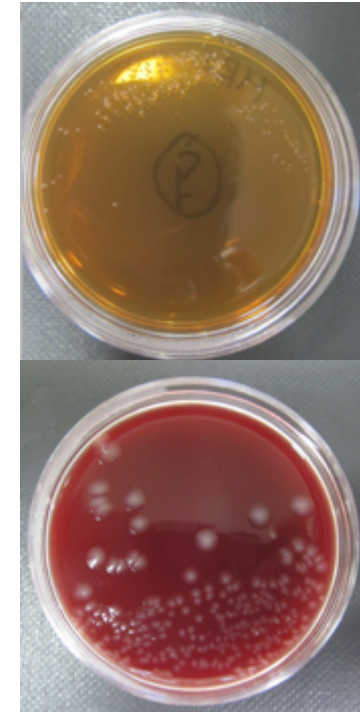
サブテーマ3

有用菌の飼育下
ライチョウへの投与
試験

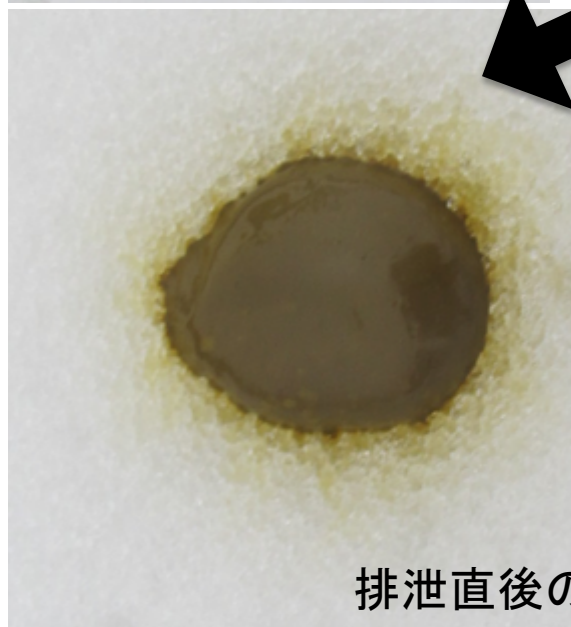
サブテーマ 1 野生ライチョウの腸内菌叢解析と有用菌分離



ライチョウの搜索



嫌気培養と単離/同定/
機能評価



排泄直後の盲腸糞の採取



菌叢網羅解析

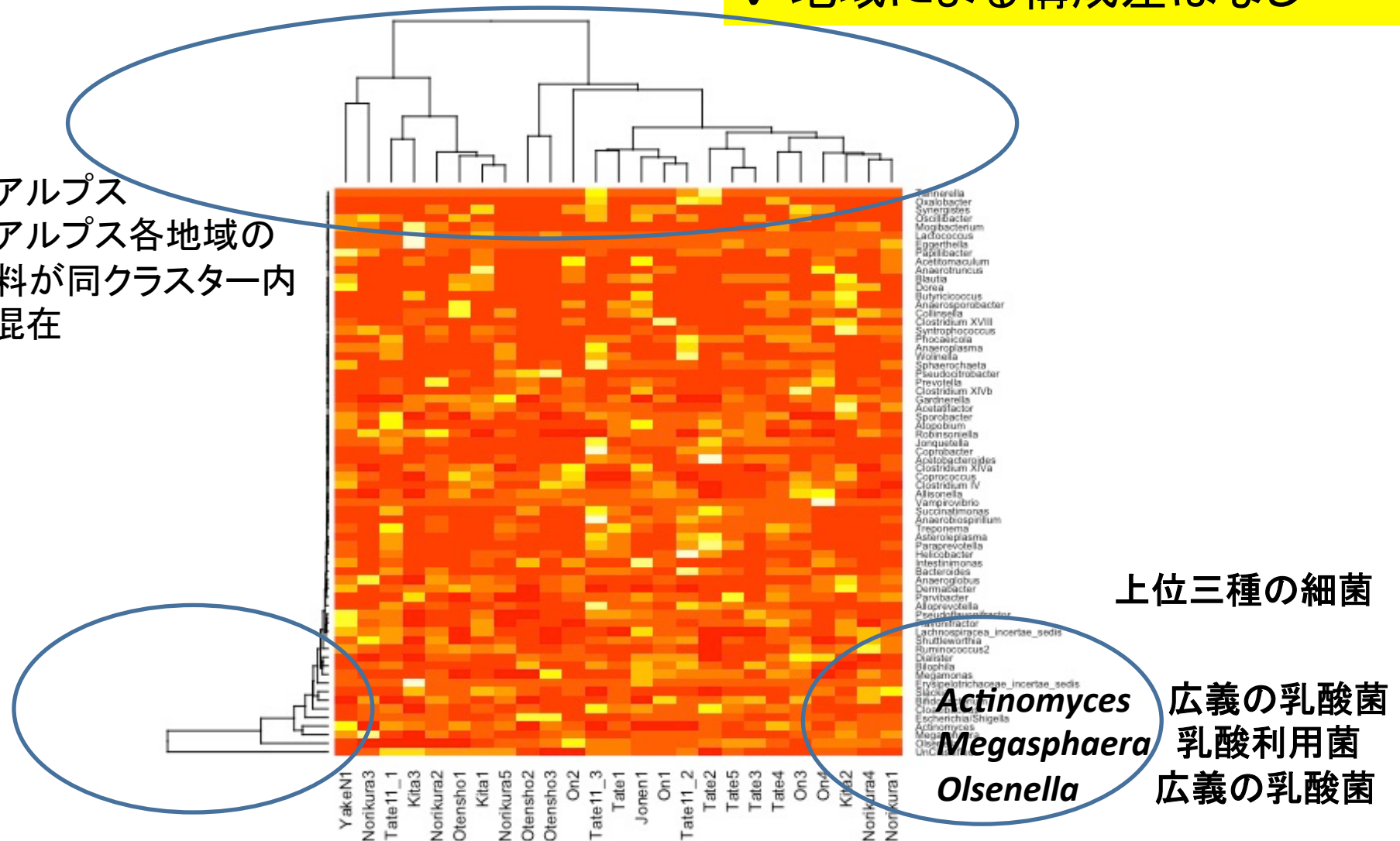
野生ニホンライチョウの腸内細菌構成の特徴

Ueda et al 2018 *Microorganisms* 6(3):77

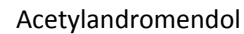
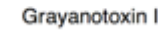
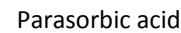
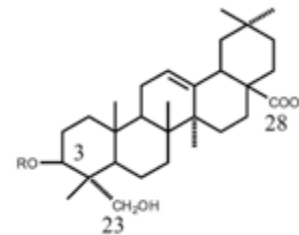
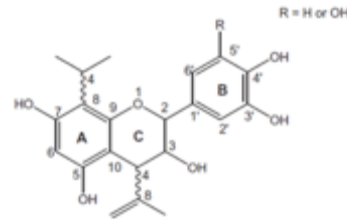
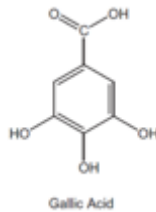
菌叢の特徴

- ✓ 乳酸菌＋乳酸利用菌の共生
(草食哺乳類に類似)
- ✓ 地域による構成差はなし

南アルプス
北アルプス各地域の
試料が同クラスター内
に混在

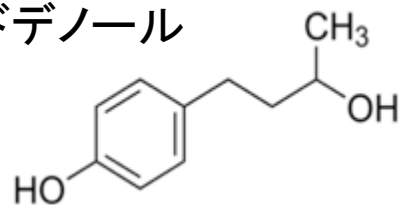


A photograph of a flowering plant, likely a species of Salix (willow), showing dense green foliage with serrated leaves and clusters of small, bright red flowers. The image is positioned on the right side of the page, partially overlapping the text.

O=C(O)C(=O)O

解毒機能の必要性 = 共生腸内細菌の解毒作用

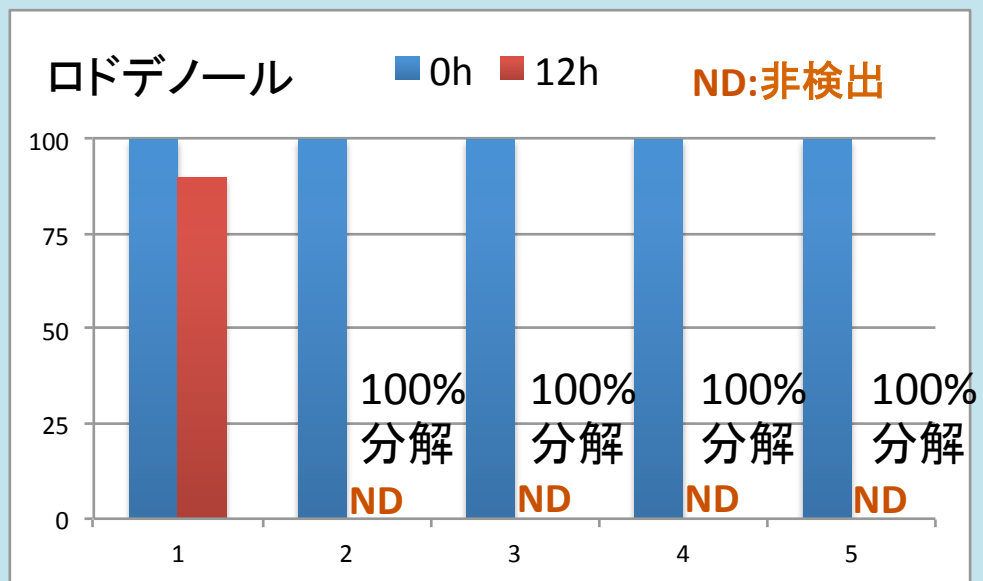
ロドデノール



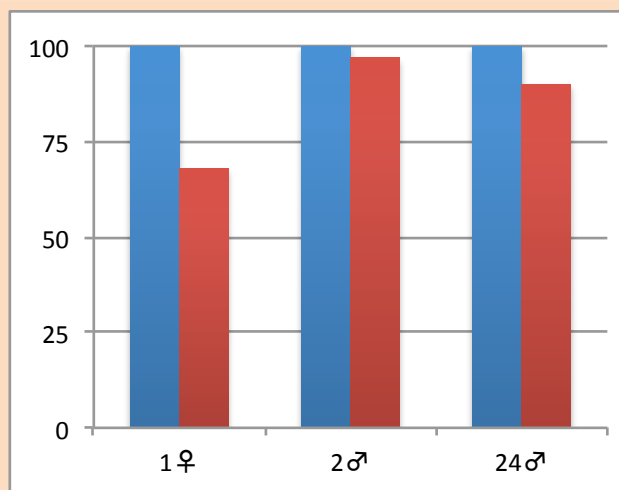
安息香酸などを経由してコハク酸などへ分解



野生ニホンライチョウ



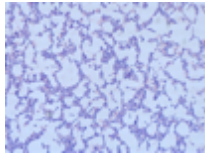
飼育スバルバルライチョウ



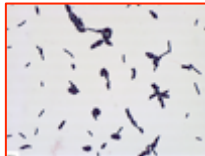
Tsuchida et al.
2017 JJZWM 22:41



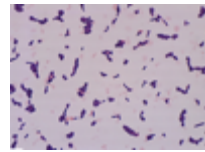
野生ライチョウから優勢に分離される乳酸菌



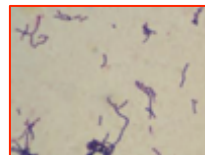
Lactobacillus plantarum
環境循環性



Lactobacillus apodemi
タンニン高度分解性
抗菌性



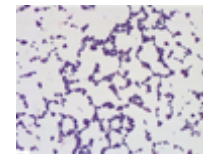
Lactobacillus reuteri
広宿主域



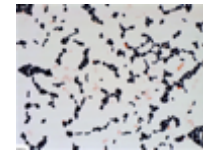
Streptococcus gallolyticus
タンニン高度分解性



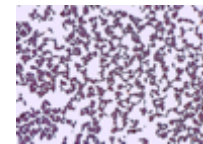
Streptococcus macedonicus
タンニン高度分解性



Enterococcus gallinarum



Enterococcus hirae
広宿主域



Enterococcus mundti
抗サルモネラ感染能



投与試験供試菌

約1,000株の確保
(プロバイオ開発に中心的に用いる
広義の乳酸菌群およびmeta16Sでの優占種)

細菌画像一部、JCM微生物材料開発室HPより引用

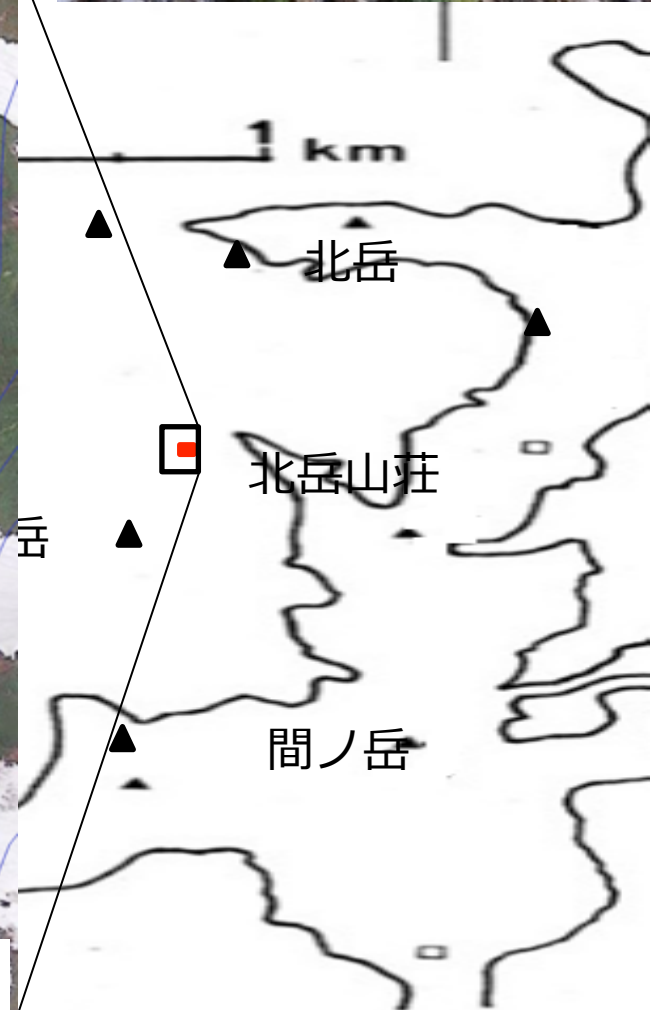
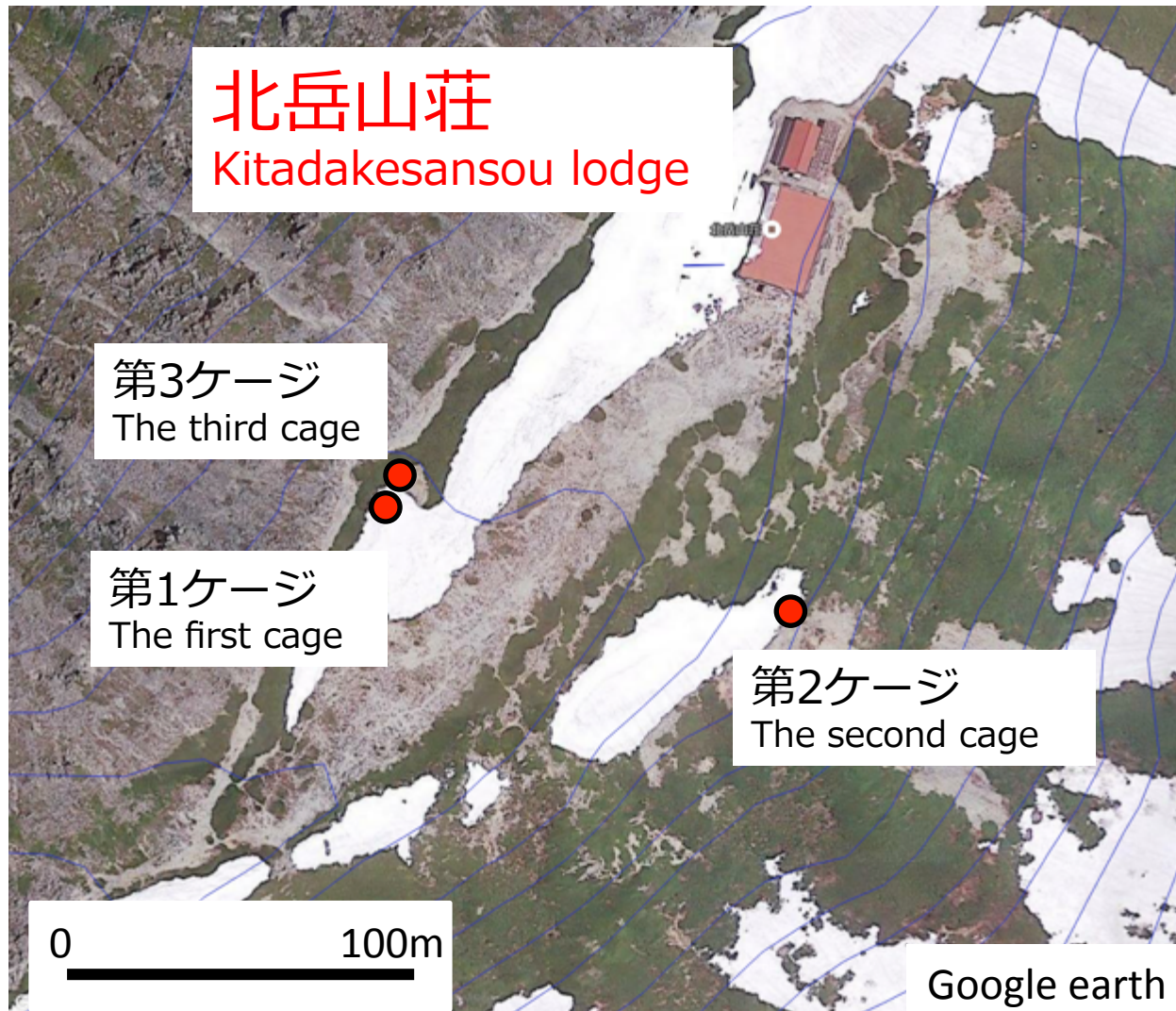
サブテーマ 2 野生ライチョウにおける腸内細菌の垂直伝搬の研究

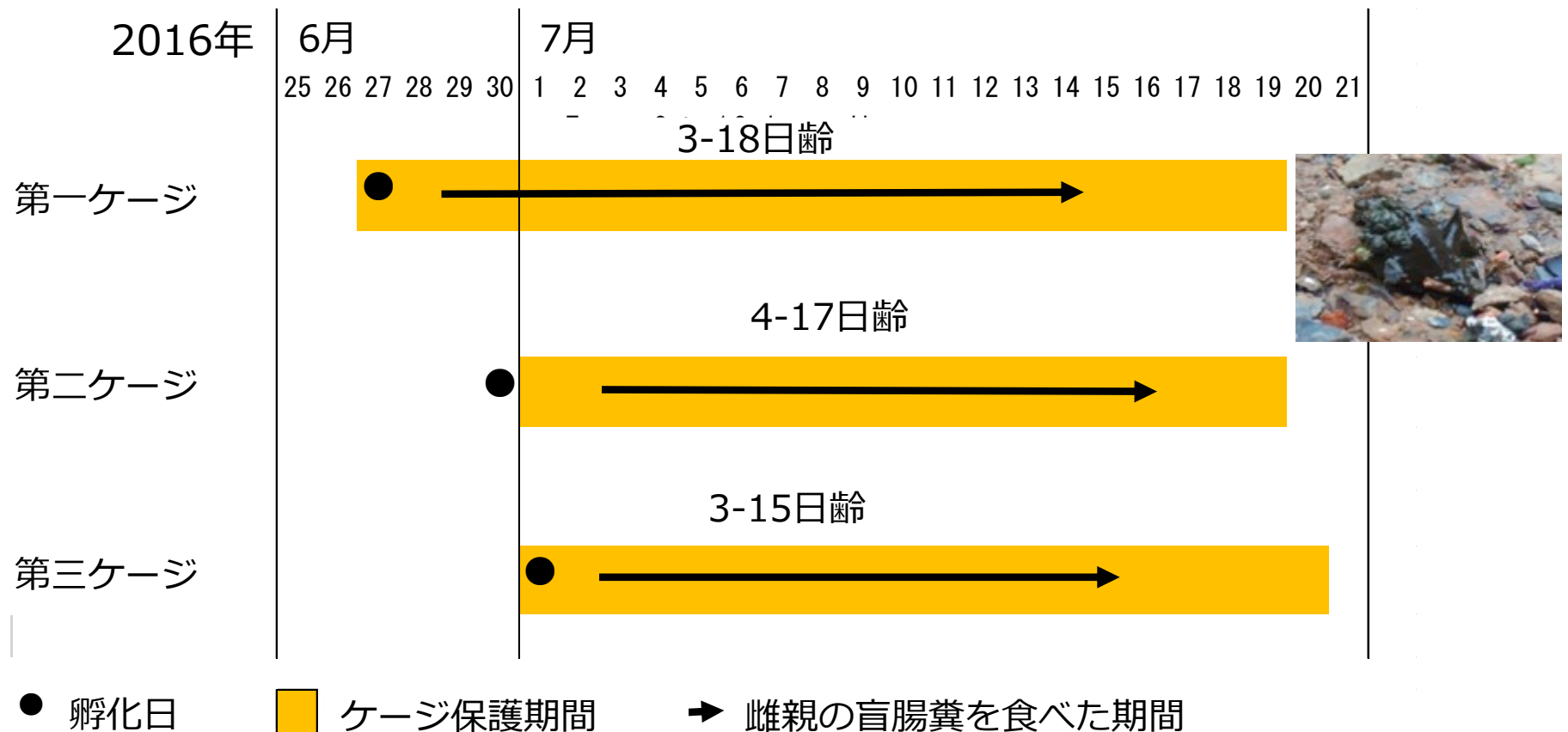
母鳥の盲腸糞を摂食するライチョウ雛 (Kobayashi et al. 2018 Kobayashi et al. 投稿中)

雛の日齢、頻度、母鳥盲腸糞の特殊性等の説明 → 摂食痕からの時期と頻度推定
菌叢発達解析 糞成分解析



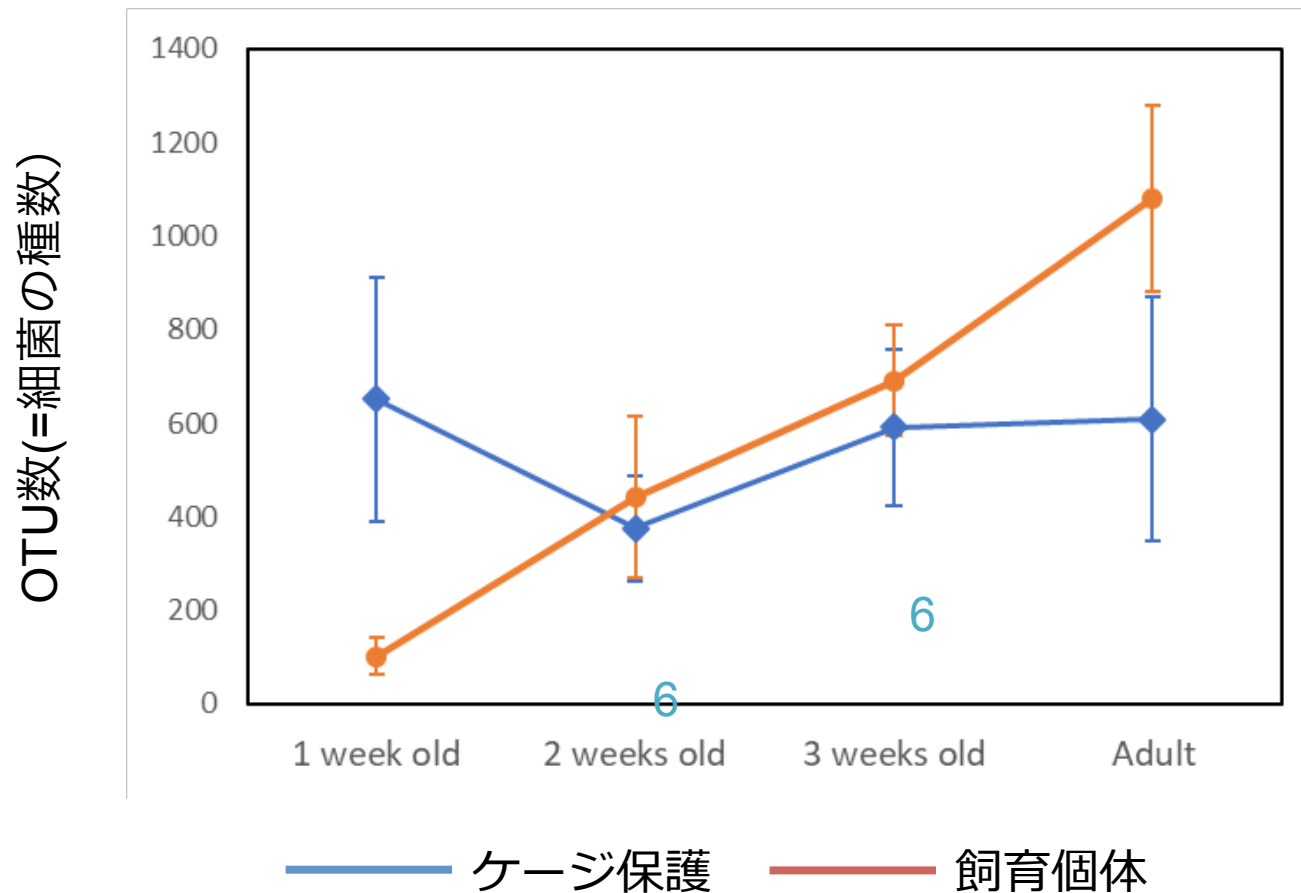
ケージの設置場所とケージの形状





ケージ保護期間と雛による盲腸糞の食糞が観察された期間

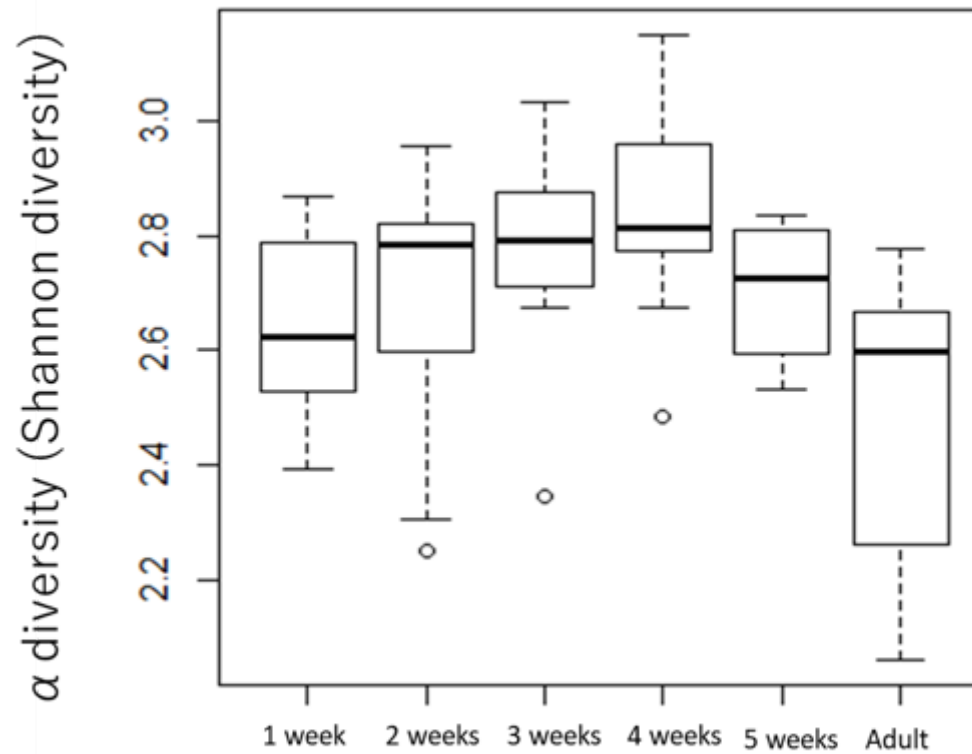
すべての家族群で雛による親の盲腸糞のついばみ跡が観察できた。
 盲腸糞を食べる行動はどの家族でも3週間以内で終了した。
 (Kobayashi et al. 2018, Kobayashi et al.投稿中論文)



食糞の効果：発育当初から親と同じ細菌の定着

食糞したケージ保護個体は1週齢から成鳥とほぼ同じ数の菌が検出された。
飼育個体では成長に伴い菌数が増加した。

(Kobayashi et al. 2018, Kobayashi et al.投稿中論文)



菌叢の α 多様度の成長に伴う変化

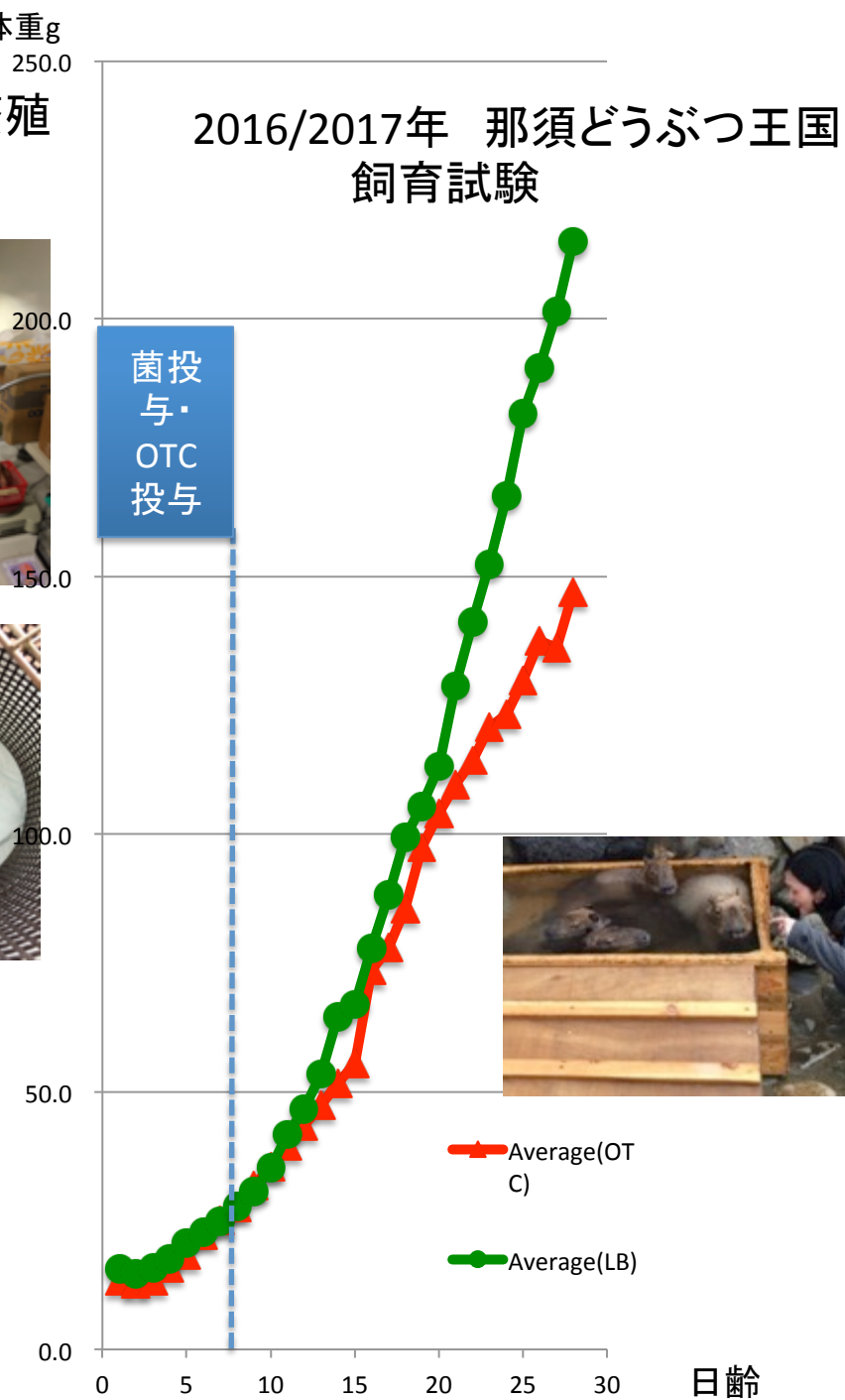
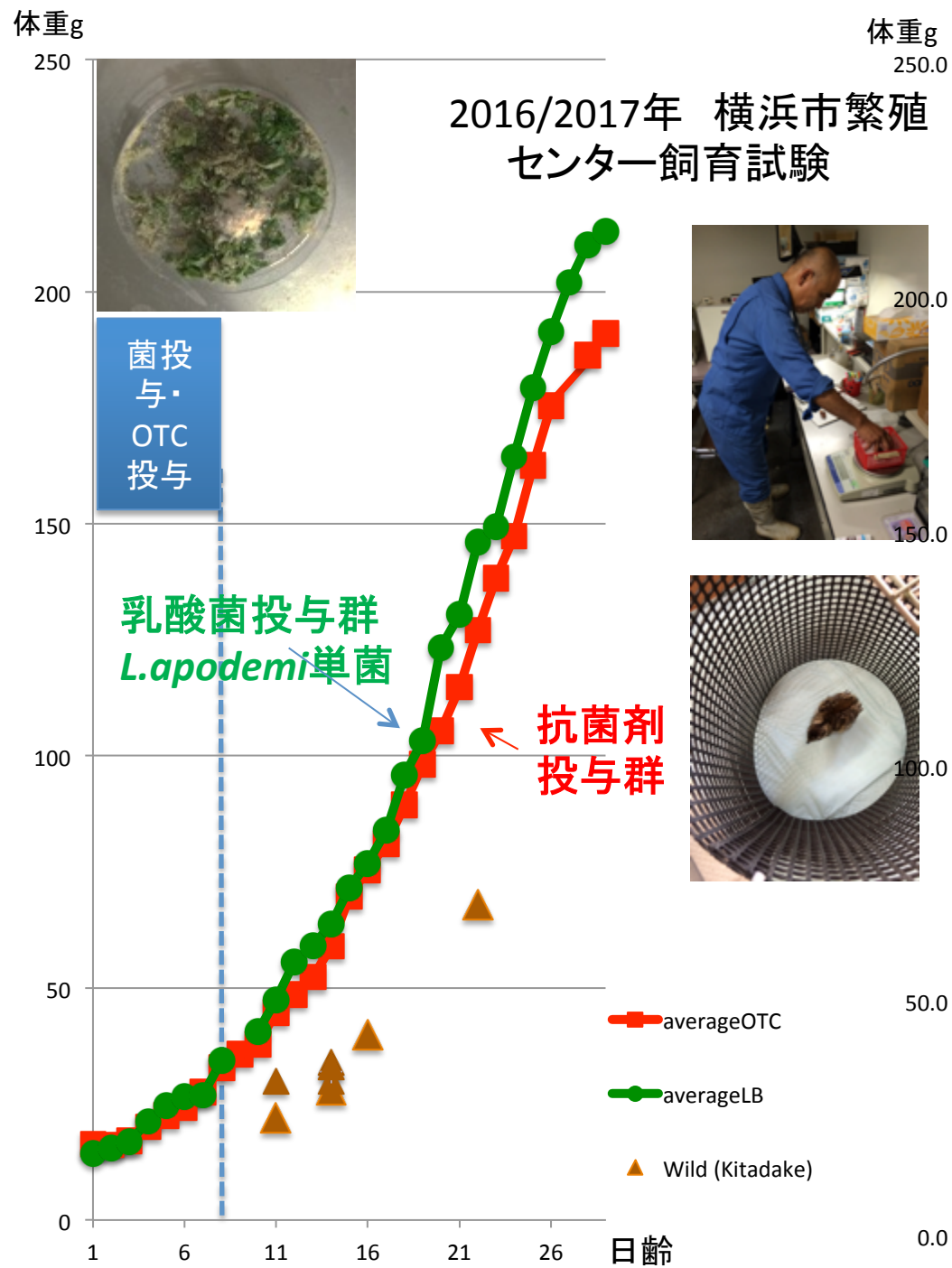
検出OTU数の変化とほぼ同じパターンを示した。

盲腸糞の食糞による親の腸内菌移植の効果=生存に必須の行動

サブテーマ 3 飼育ライチョウの腸内細菌叢再構築の研究

- ✓ 野生ライチョウ由来 有用細菌の人工飼育個体への接種方法の確立
- ✓ 抗生物質を使わない飼育方式の確立
- ✓ 野生生活に耐えられる個体群創設のための腸内細菌再構築





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)

野生ライチョウ由来乳酸菌の飼育ライチョウ腸内菌叢改善効果

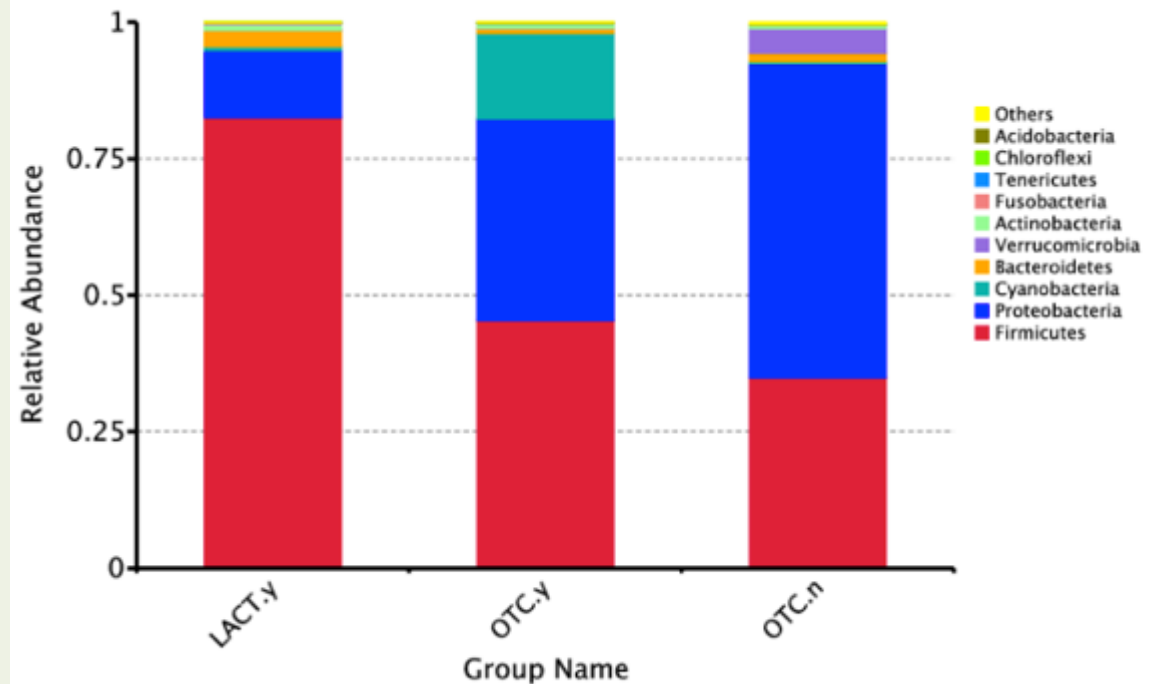
- ✓ 嫌気性菌
菌投与群 > 抗生物質群
とくに
Bacteroides など繊維分解菌
乳酸菌や *Ruminococcus* 等の
Firmicutes 門細菌

逆に、

- ✓ 大腸菌群
菌投与群 < 抗生物質群
- ✓ 周辺環境由来細菌
菌投与群 < 抗生物質群

菌投与群

抗生物質投与群



2018年度： 野生ライチョウ腸内環境特性に応じた飼料開発

野生雛 低タンパク質食物への適応 補助資料3-1～3-5参照
(タンニンなど抗菌性を持つ化合物の摂取)
(感染症)抗菌性乳酸菌で対応、(過体重、脚部異常、翼形成異常)タンニン添加
による栄養希薄化

VS

飼育雛 ニワトリに準じた高エネルギー高タンパク質飼料の給与
(感染症)抗生物質で対応、(過体重、脚部異常、翼形成異常)対応策なし

タンニン源を豊富に含む飼料の開発へ
高タンニン分解ライチョウ乳酸菌＋タンニン源



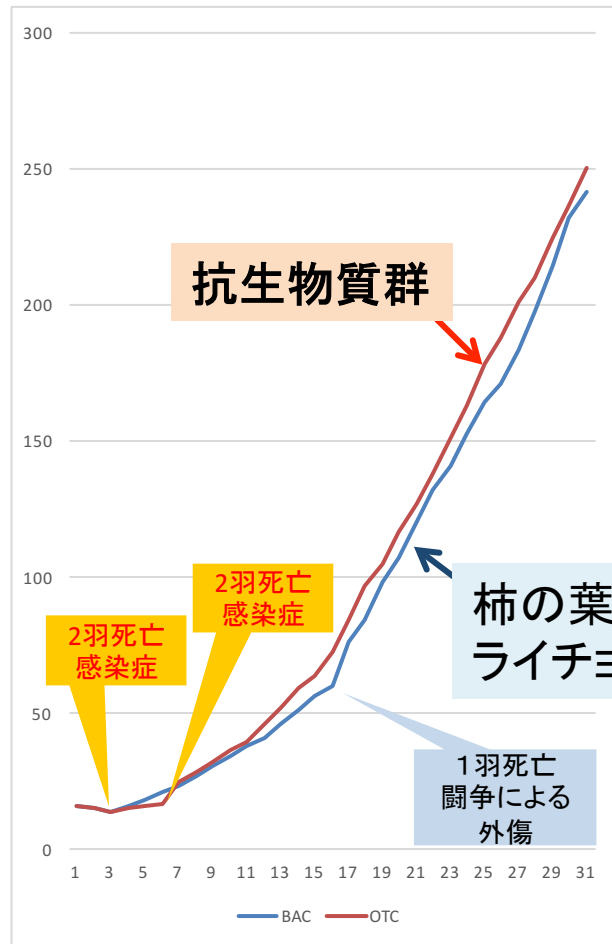
シンバイオティクスの概念

使用した野生ライチョウ細菌

Lactobacillus apodemi
Streptococcus gallolyticus
Escherichia fergusonii

使用したタンニン源
漢方用柿の葉乾燥品
飼料の25%量添加

2018年 横浜市繁殖 センター飼育試験



ライチョウ雛飼育試験結果 体重(g)

柿の葉混合飼料と野生ライチョウ細菌の組み合わせ

OTC: 抗菌剤給与群 6羽
BAC: 野生ライチョウ由来細菌群 4羽

7日齢まで 死亡事故率 OTC 66.7% BAC群 0%
(感染症疑い)

28日齢まで 死亡事故率 OTC 66.7% BAC群 25%
(闘争による外傷)

表Ⅱ-4 投与乳酸菌の検出状況

実験群	個体番号	7 day	21 day	28 day	60 day	90 day
BAC	67	○●	○●	○●	○	○●
	68	○●	○●	○●	○●	○●
	70	○●	○●	○●	○	○●
	71	○●	-	-	-	-
OTC	72	-	-	-	-	-
	73	-	-	-	-	-
	74	-	-	-	-	-
	75	-	-	-	-	-
	76	-	-	-	-	-
	77	-	-	-	-	-

* ○ = *L. apodemus*, ● = *S. gallolyticus*

柿の葉混合飼料＋野生ライチョウ細菌給与

1. 雛の感染防御に成功
2. 過剰な体重増加の制御に成功

4-1604

H28～ H30年度 まとめ

- ✓ 野生ニホンライチョウに固有なコア腸内細菌判明
- ✓ 野生下での世代を超えたコア細菌伝達機構解明
- ✓ 有用菌の単離と飼育実験への投入
- ✓ 野生ニホンライチョウの高いコクシジウム感染
単純な糞便移植が不可能（＝新たな課題）

ニホンライチョウ域外保全
事業の進捗状況

- ✓ 高い感染症事故率
- ✓ 低い有精卵率
- ✓ 感染防御の必要性
- ✓ 野生と比べ重い体重

短期的目標と長期的目標

短期的目標：人工飼育下での予防的抗菌薬剤
投与をやめることを可能にする技術開発。

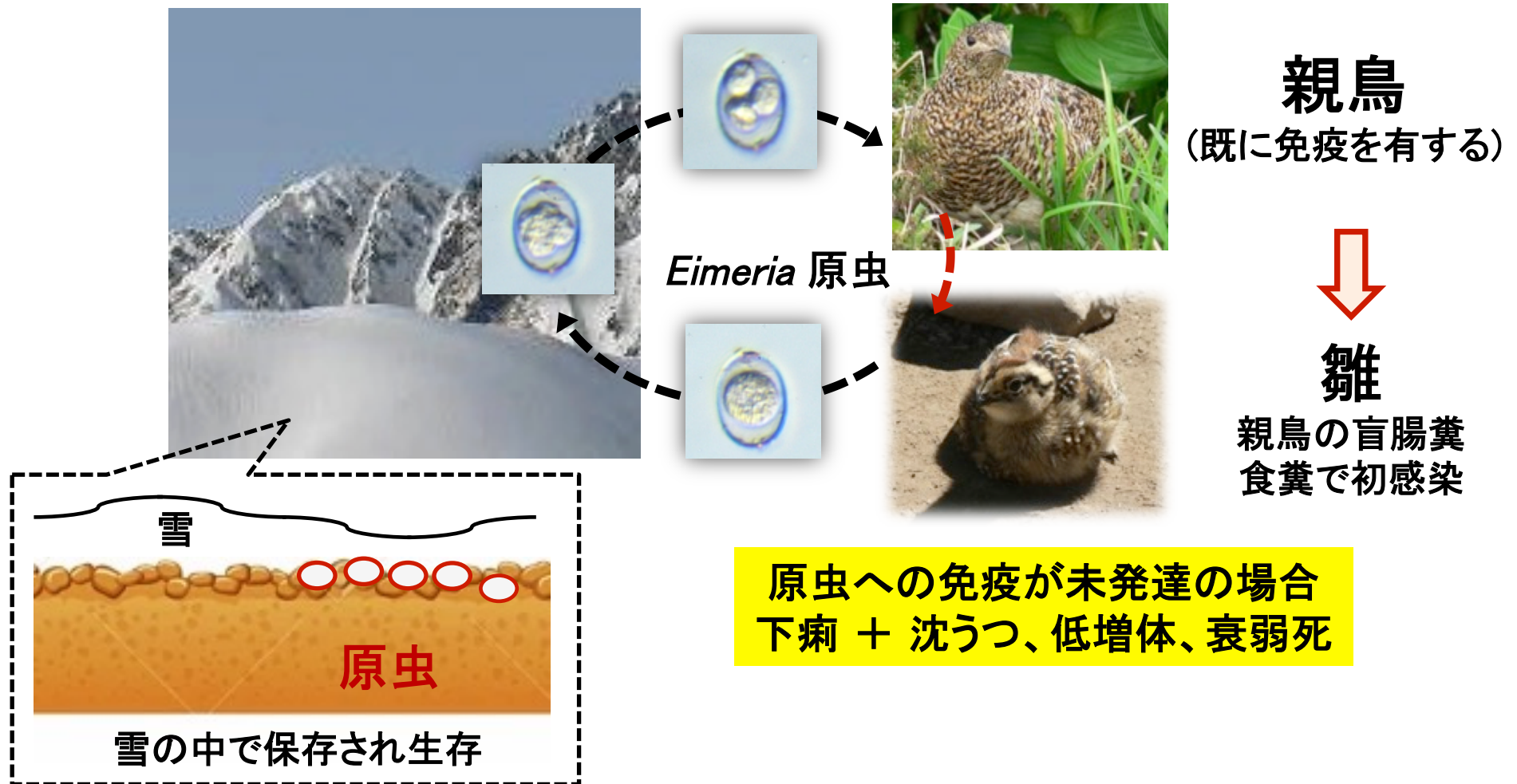
→達成

長期的目標：生息域再導入のため、野生環境
で生きていける(野生の食物を食べても平気、
感染に対する抵抗力)状態のライチョウを増殖
する方法の提案。

→一部未達成



単純な糞便移植が不可能な理由 アイメリア原虫対策の必要性



- ・野生型腸内細菌確立に向けた糞便移植の大きな弊害
- ・野生復帰個体群への免疫賦活の必要性

4-1604に関わる業績

原著論文

- 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. doi.org/10.1016/j.ijppaw.2018.03.004 (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. doi.org/10.1016/j.ijppaw.2018.06.005(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.

学会発表

- 1) 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
- 2) 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
- 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) 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) 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！！

「国民との科学・技術対話」の実施

- 1) 牛田一成 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, 参加者約200人)
- 2) 小林 篤 第18回ライチョウ会議新潟妙高大会 (2018)「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 妙高市, 2018年10月19日妙高市文化ホール (参加者約1000人))
- 3) 土田さやか・牛田一成 第18回ライチョウ会議新潟妙高大会 (2018)「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 妙高市, 2018年10月19日妙高市文化ホール (参加者約1000人))
- 4) 牛田一成・土田さやか 第17回ライチョウ会議長野大会 (2016)「野生ニホンライチョウおよび飼育下スバルライチョウの腸内菌の特徴」(主催 長野県 大町市ほか 2016年10月16日 サン・アルプス大町 参加者約400人)
- 5) 小林篤 第17回ライチョウ会議長野大会 (2016)「南アルプス北岳におけるケージ保護2年目の試み」(主催 長野県 大町市ほか 2016年10月16日 サン・アルプス大町 参加者約400人)