

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

研究代表者 松林 誠（大阪府大）

サブテマリーダー

- 1；松林 誠（大阪府立大学）
[分担；笹井和美 (大阪府立大学)]
- 2；牛田一成（中部大学）
[分担；土田さやか (中部大学)]
- 3；長谷川雅美（東邦大学）
[分担；倉持幸司 (東京理科大学)]

【環境省推進戦略における重点課題】

4. 自然共生領域（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

- 1. 絶滅危惧種に関する、効率的な個体数推定法及び分布推定手法、
地域が主体となった生息地の保全・再生手法の開発
- 2. 野生復帰を見据えた生息域外保全における飼育繁殖・栽培技術の開発

1. はじめに

野生ニホンライチョウの現状と課題

○2012年より環境省保護増殖事業

- ▶生息域内保全（ケージ保護, 捕食者対策）
→ 2018年、なわばりは**23ヶ所**に回復

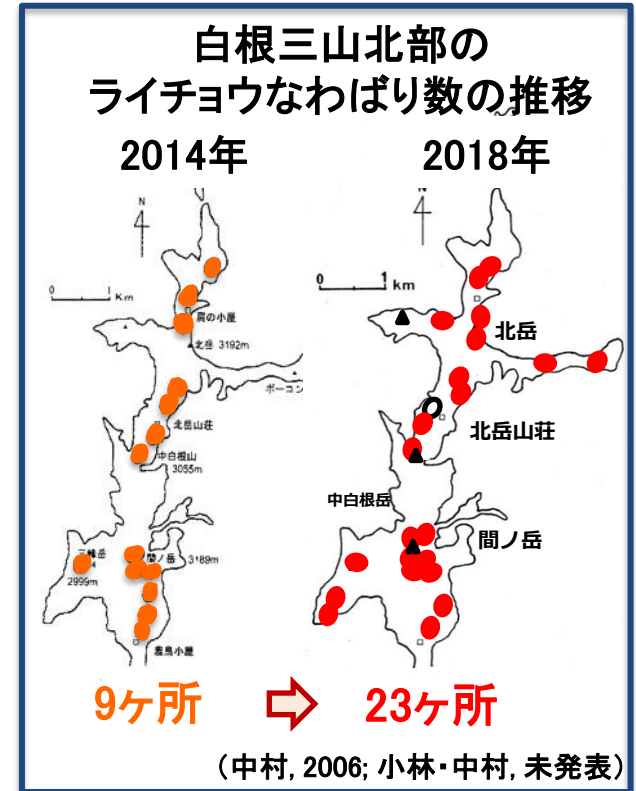
問題点

- ・ケージ保護中の雛が死亡（約20%）

- ▶生息域外保全（人工孵化および繁殖）
→ 一定の孵化率を維持

問題点

- ・抗菌物質の使用が必須
- ・人工配合飼料による飼育の限界



生息域内保全および野生復帰個体群の創出に向けて新たな課題

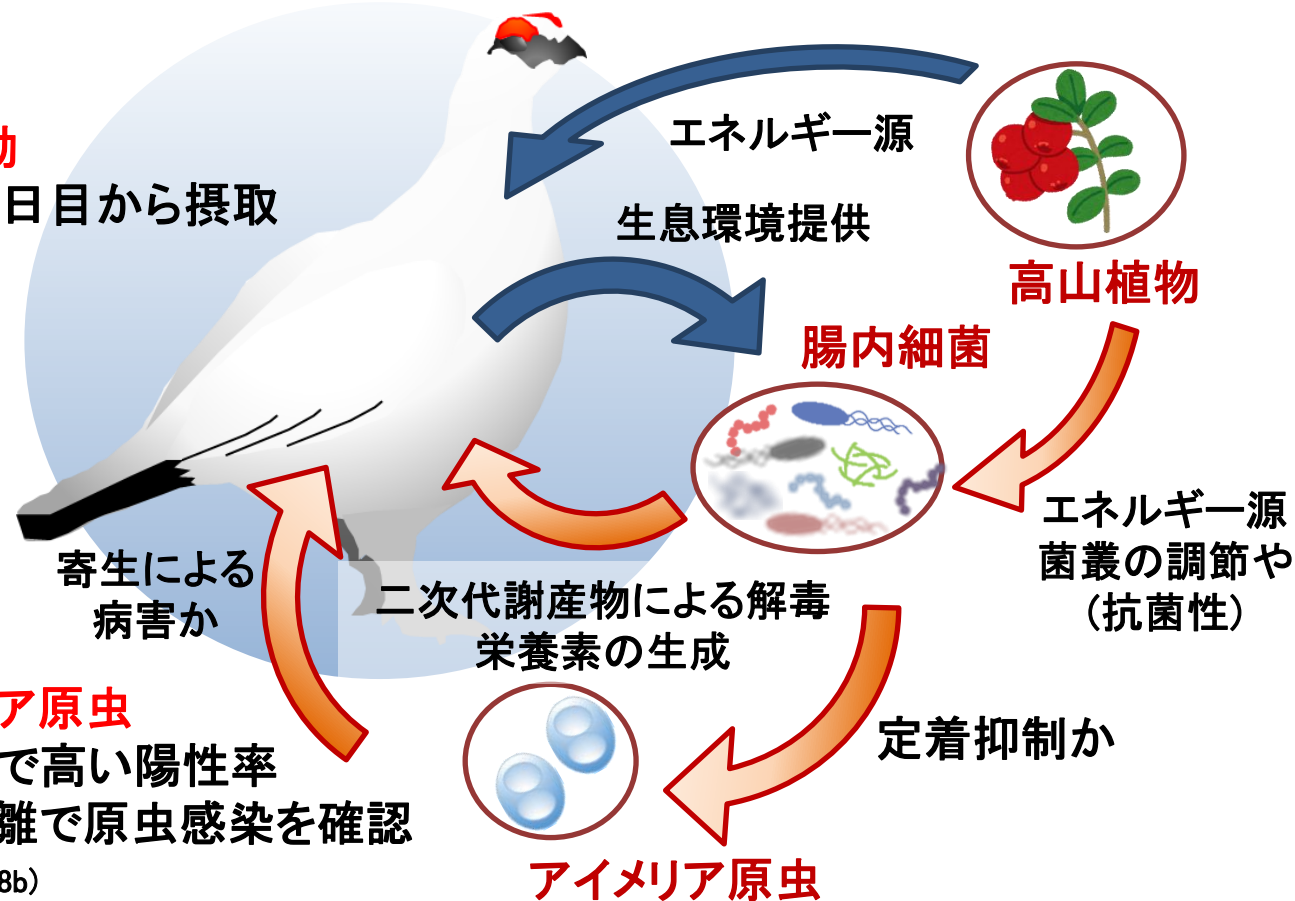
これまでの研究成果の概要

▶野生ニホンライチョウが有する特異的な腸内細菌叢

- 乳酸菌と乳酸利用菌の共生系 (Ushida et al. 2015; Ueda et al. 2018)
- 毒性アルカロイドやタンニンを分解可能 (Tsuchida et al., 2016 & 2017)

▶重要な孵化後雛の食糞行動

- 親鳥の盲腸糞を孵化4日目から摂取 (Kobayashi et al., 2019)



▶野外に広く存在するアイメリア原虫

- 生息域内の広いエリアで高い陽性率
- ケージ保護で死亡した雛で原虫感染を確認

(Matsubayashi et al., 2018a & 2018b)

野生下での生存には腸内細菌、餌、そして原虫感染を含む腸内環境整備が必要不可欠

2. 研究開発目的

『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』に向けて、横断的に本種保全の課題解決の道筋を示すこと

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

生息域外個体群にアイメリア原虫に対する抵抗性を持たせる必要があると考えられる。アイメリア原虫のエリア別の感染動態および病原性等を解明し、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。

2. 飼育下での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改良

高山植物に含まれる毒性アルカロイド等を分解するライチョウ特有の腸内細菌叢が確立するため、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。

3. 研究目標 および 4. 開発内容

サブテーマ1

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。

- 野外およびケージ保護における原虫分布動態
- スパールバルライチョウを用いた病態解析と免疫賦活能評価
- 人工培養法による抗原作製法の開発

大阪府立大学
松林・笹井

サブテーマ2

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開発する。

- 野生個体の便からの有用菌の分離と原虫除去法の開発
- 有用菌の特性解析と単離培養法の確立
- 原虫除去便の接種と病態評価

中部大学
牛田・土田

サブテーマ3

ニホンライチョウの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提示する。

- 餌となる高山植物の摂取量の測定および成分分析
- 高山植物成分を模倣した人工飼料の開発
- 人工飼料給餌による野生型腸内環境確立

東邦大学
長谷川
東京理科大学
倉持

研究成果の概要

感染実験用の *Eimeria* 野外株の確保および原虫調査

2006年	217/520 (41.7%)
2007年	177/308 (57.5%)

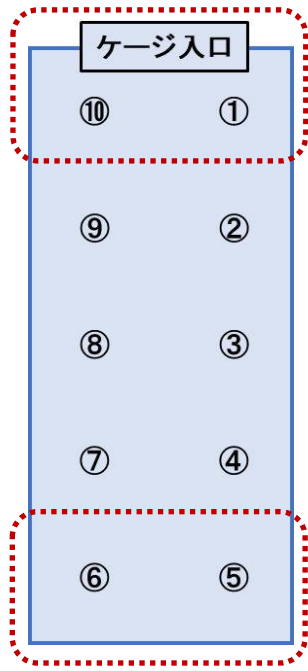
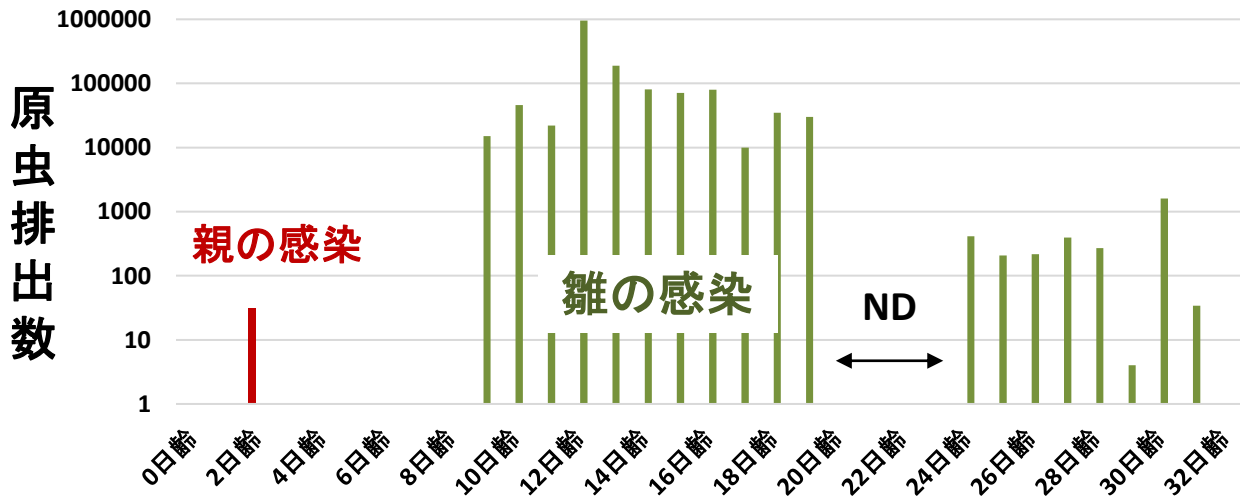


2016年	12/35 (34.3%)
2017年	10/26 (38.5%)
2018年	6 /17 (35.3%)



2019年	117/245 (47.8%)
2020年	55 / 80 (68.8%)
2021年	10 / 44 (22.7%)

ケージ1 (2019年度)



入り口と寝床
高度の汚染

現在もなお、生息域内の広い範囲で原虫感染が存在し、ケージ保護の土壌は、高度に原虫に汚染されている ⇒ 生息域内での衛生対策指針を提示

軽度感染によるワクチン効果試験

【方法】

第1群
非免疫群

4-6日 齢

PBS

32-33日 齢

第2群
免疫群

4-6日 齢

4×10^3 個
 4×10^2 個

32-33日 齢

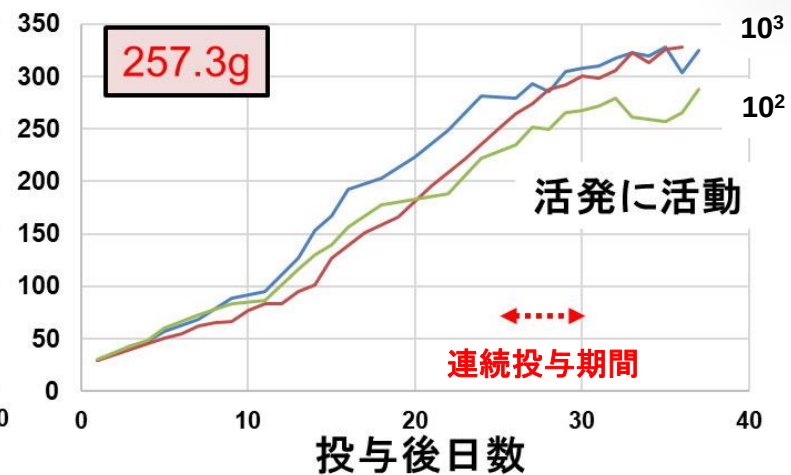
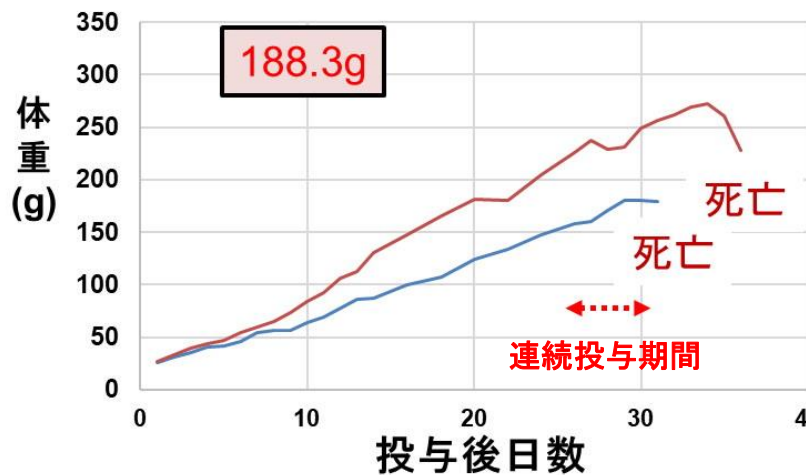
43日 齢

4×10^4 個

【結果】

非免疫群

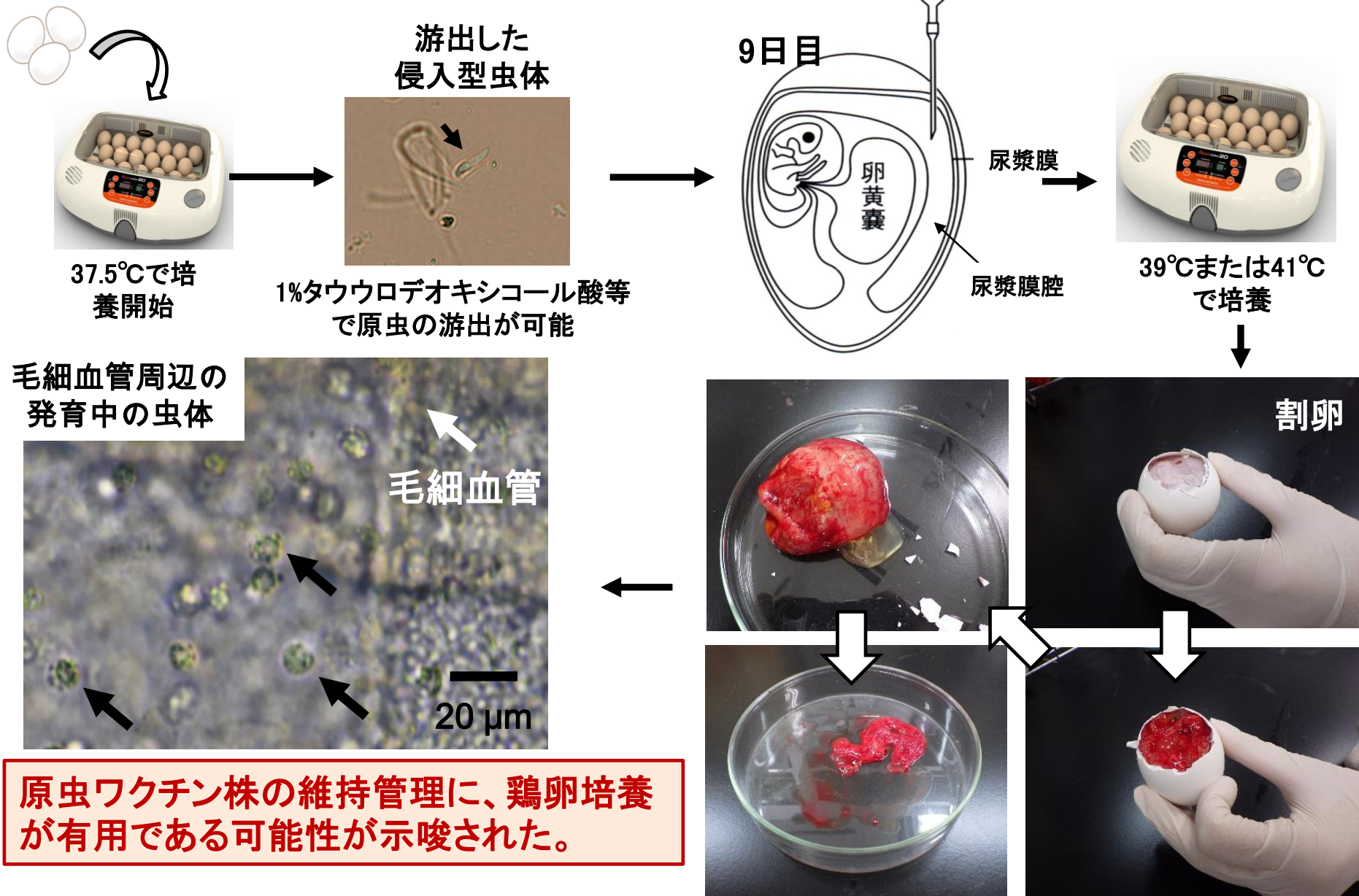
免疫群



(枠内の数字; 少数投与30日目の増体平均)

重度感染により下痢や沈うつ、死亡が確認され、軽度獲得免疫が原虫感染を排除している ⇒ 軽度感染による免疫付与が必要

鶏卵培養法の確立

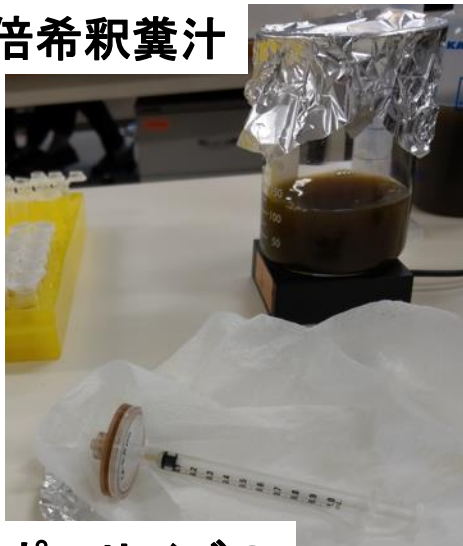


生息域外での野生復帰個体群の創出に向けた鍵『野生型腸内細菌』

⇒高山植物に含まれるアルカロイドやタンニン等の分解

課題; 野生ニホンライチョウの糞便にはアイメリア原虫が高率に含まれ、
飼育下個体への野生個体糞便移植は不可能

100倍希釈糞汁



フィルター後の糞便液

腸内細菌の損失を防ぎ、
オーシストをほぼ100%除去
生体に投与し、安全性も確認

5 μ mポアサイズの
シリンジフィルター

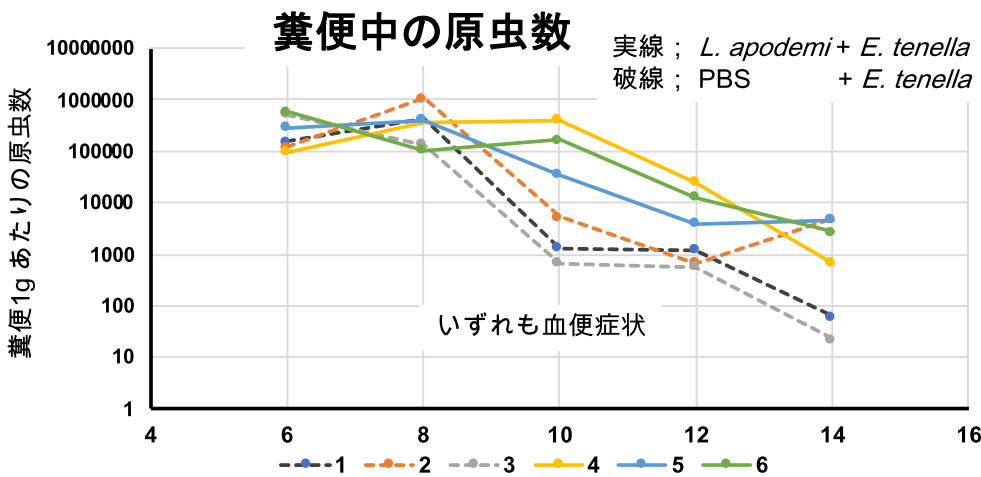
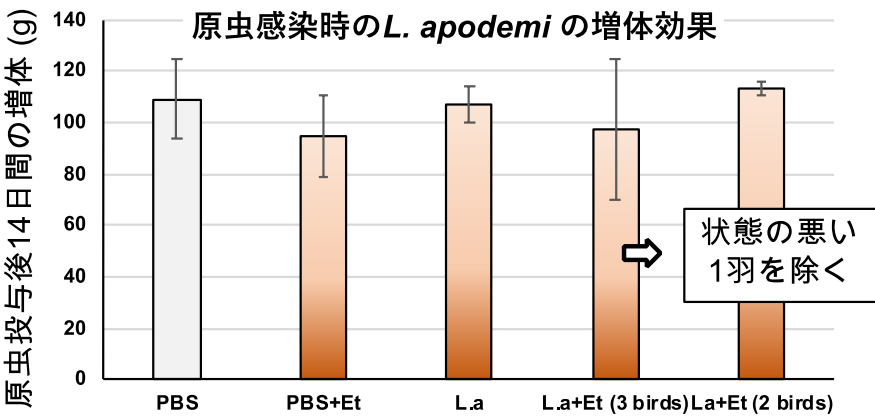
野生ライチョウの糞便を飼育個体に移植する安全な
「糞便移植法」の開発に成功

原虫の病態発現防御に役立つ腸内細菌の同定と利用法の提案

Lactobacillus apodemi

※野生ライチョウ固有の乳酸菌、抗日和見感染菌作用を有する

2日齢の鶏の雛に 10^9 個の*L. apodemi*を投与し、アイメリア原虫を 2×10^4 個を経口投与



菌液投与群で原虫の排出量は減少しなかったが、増体が大きく改善されていた。*L. apodemi*はアイメリア原虫感染を抑止しないが、病態発現を抑制している可能性が示唆された。

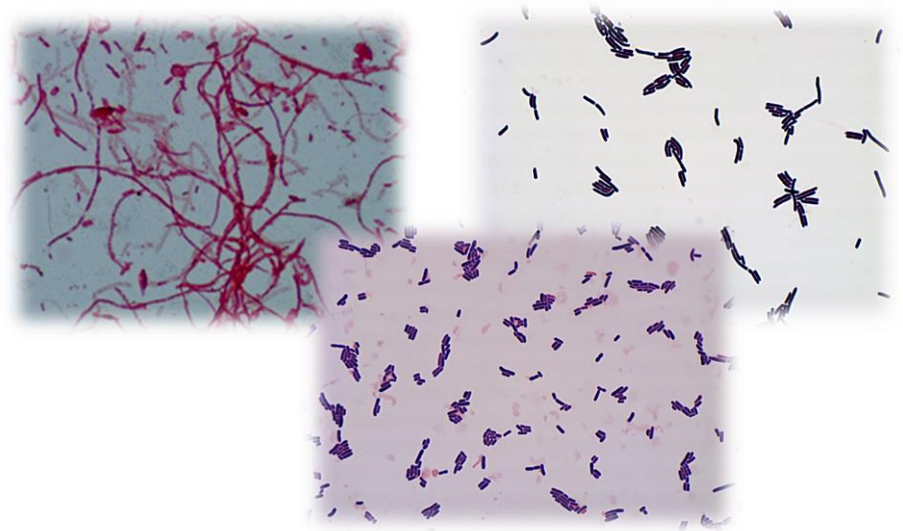
野生ライチョウからの有用腸内細菌探索により見えてきた 「野生型腸内細菌」の特徴

基礎培地	添加物
BHI 培地	L-システイン塩酸塩
	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
	ペクチン
	牛ルーメン液

野生ライチョウ
腸内細菌
発育促進

培養必須要素とし
て新たに同定

- ・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。
- ・ルーメン液に含まれる微量成分(微量元素 Co, Mo, Zn 等、イソカルボン酸やその他の植物由来の成分)を必要とする細菌種が優勢である。



飼育個体に野生型腸内細菌を誘導し、定着・維持させるためには、
ビタミンBおよびルーメン液中微量成分が重要であると考えられる

研究成果の概要

餌となる高山植物の摂取量の測定および成分分析

育雛期の野生ニホンライチョウメスの1日の摂取栄養素推定 (1日3,660ついばみ)

品目	水分	粗タンパク質	粗脂肪	(g)
RM-4 40g+ミルワーム1匹	0.32	5 - 6	1	
ガンコウラン茎葉	14.19	1.11	2.17	
ガンコウラン茎葉	10.19	1.13	1.11	
コメバツガザクラ	13.29	0.69	0.45	
コケモモ茎葉	17.38	1.02	0.35	
ミネズオウ茎葉	4.07	0.28	0.93	
クロウスゴ葉	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		
ダケカンバ冬芽	34.66	11.38	20.16	← 冬季の主食

冬季の主食であるダケカンバの冬芽を除き、飼育個体は、タンパクを多く摂取していることが分かった。

ライチョウ専用ペレットの作製

(%)

	A社ウサギ用ペレット	B社ウサギ用ペレット	新ライチョウ用ペレット
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
可溶無窒素	49.5		
カルシウム	1.54	>0.6	0.55
リン	0.86	>0.4	0.25
ME	365	>235	230
1kgあたりの価格	334円	923	400
原材料	アルアルファ、脱脂大豆、大麦等	チモシーミール、小麦粉、アルファミール、脱脂大豆等	チモシー、アルアルファ、ふすま、デンプン等、オオバコ、タンポポ粉末等

日本動物園水族館協会、イースター株式会社、環境省と協力し、このペレットはチモシー(イネ科草本)主体でグルテンフリーの「ライチョウ専用ペレット」を開発した。給餌試験では、忌避行動はなく、糞の形や形状も安定し、健康被害も出ていない。

ライチョウ高嗜好性高山植物の成分分析

ライチョウが好む植物 (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

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

ライチョウが好まない植物 (部位)

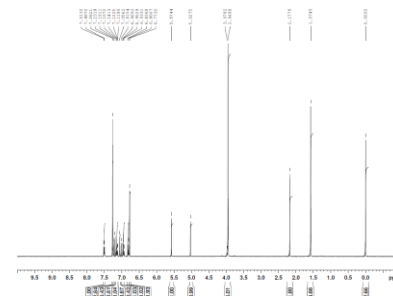
常緑落葉低木

1	アオノツガザクラ	茎葉
---	----------	----

草本

2	ムカゴトラノオ	葉
3	ハクサンイチゲ	葉

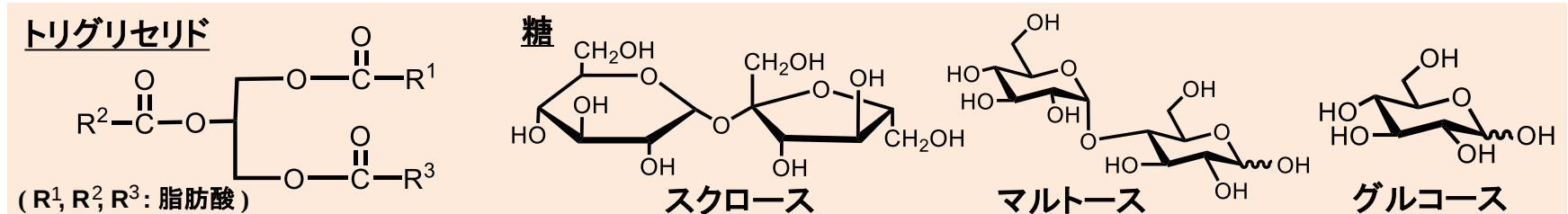
餌植物の化学成分と嗜好性の調査を目的とし、
合計 14 種類の植物の成分解析を行った。



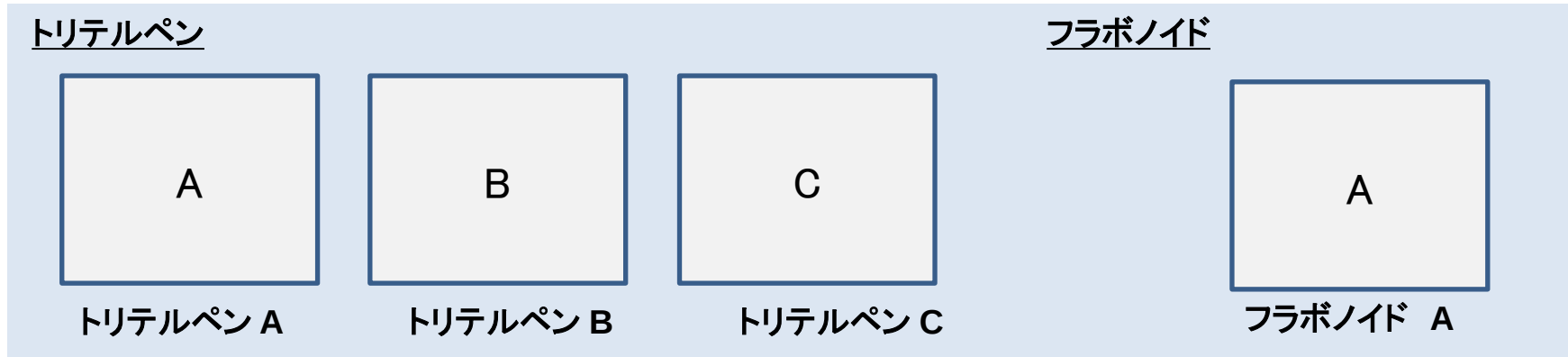
NMR&MS解析等

ライチョウ高嗜好性高山植物の成分分析結果

一次代謝産物(=栄養源)



二次代謝産物(=栄養源以外の成分)



* 未発表の研究成果のため、化合物名と構造式は非公開とします。

類似する植物
を提案

リンゴ、キャベツ、ブロッコリー、セロリ 等
オレンジ、プルーン等

高嗜好性高山植物成分の抗原虫効果

原虫に対する殺虫活性示す成分

由来	化合物名
アオノツガザクラ(花)、ガンコウラン(葉茎)	トリテルペン A, B
クロウスゴ(葉)	トリテルペン C, D
レンゲイワヤナギ(葉)	トリテルペン E
クロウスゴ(葉)	トリテルペン F

果実の皮;
トリテルペン類
や配糖体含有

原虫の感染を抑制する成分

由来	化合物名
ミネズオウ(花)	配糖体 A

野生型腸内環境を支持する飼料開発を行い、ライチョウの高嗜好性餌成分には、原虫の病態を抑制する化合物が含まれることを明らかにした。