

28年度 環境省環境総合研究推進費研究
Environment Research and Technology Development Fund of
Ministry of Environment

ニホンライチョウ保護増殖に資する腸内細菌の研究
Studies on Gut Bacteria of Japanese Rock Ptarmigans for Its
Potential Use in In-situ and Ex-situ Conservation Protocol

1) 野生ライチョウの腸内菌叢解析と有用菌分離

Analyses on the structure of intestinal (Cecal) microbiota of wild Japanese rock ptarmigan and isolation and identification of potentially beneficial bacteria

2) 野生ライチョウの腸内細菌垂直伝播に関する研究

Vertical transmission of intestinal microbes between hens and chicks

3) 飼育ライチョウの腸内細菌叢再構築の研究

Reconstruction of intestinal microbiota of captured raised Svalbard rock ptarmigans

研究組織

研究代表者: 牛田一成

分担者・協力者

サブテーマ1 牛田一成 土田さやか (京都府立大学)

サブテーマ2 分担) 長谷川雅美 小林篤 (東邦大学)

サブテーマ3 分担) 村田浩一 鈴木亮彦 日置あや (日本大学)

アドバイザー 中村浩志 (信州大学名誉教授 国際鳥類研究所) 園山慶 (北海道大学)
R. A. Ims (トロムソ大学)

A

プログラムオフィサー 松本和馬 (国際環境協会)

協力 日本動物園水族館協会ライチョウ保護増殖PT
松林 誠 (大阪府立大学)

野生ライチョウの生存を保証する腸内細菌

Intestinal bacteria essential for the life of wild rock ptarmigan

1) 生体防御 (in Host defense mechanism)

食物に含まれる毒物の分解

Degradation of plant toxic compounds

病原体に対する感染抵抗性

Defense against infection



2) 消化機能の向上 (Improve digestibility)

反栄養物質の分解による消化の促進

Degradation of anti-nutritional compounds

研究のストラテジー

野生復帰 Re-introduction



⑥

有用菌の探索 Bacteria
行動観察



①



②

③



⑤

飼育下個体群への接種

保健効果
(下痢・シュウ酸による障害)
野生食物の毒物への適応

Inoculation to captive chicks
=> health beneficial effect

④



有用菌の選抜と増殖
保存
Collection of beneficial
bacteria

メタゲノム情報に基づく有用菌の推定と
分離培地の確立 Metagenomic analyses



採材場所
Sample collection site
in this study



ニホンライチョウ
生息場所
registered habitats



プロジェクト協力園
スバルバル-
ライチョウ 飼育
Zoos in cooperation
Feeding trials



プロジェクト協力園
飼育ニホンライチョウ
試料提供

Zoo in cooperation
Samples from
Japanese rock
ptarmigans



Ueno Zoo



Yokohama Zoo



Sub-theme 1

野生ニホンライチョウ由来の有用細菌分離

Analyses on the structure of intestinal (Cecal) microbiota of wild Japanese rock ptarmigan and isolation and identification of potentially beneficial bacteria

採集地域 立山室堂 乗鞍岳 北岳

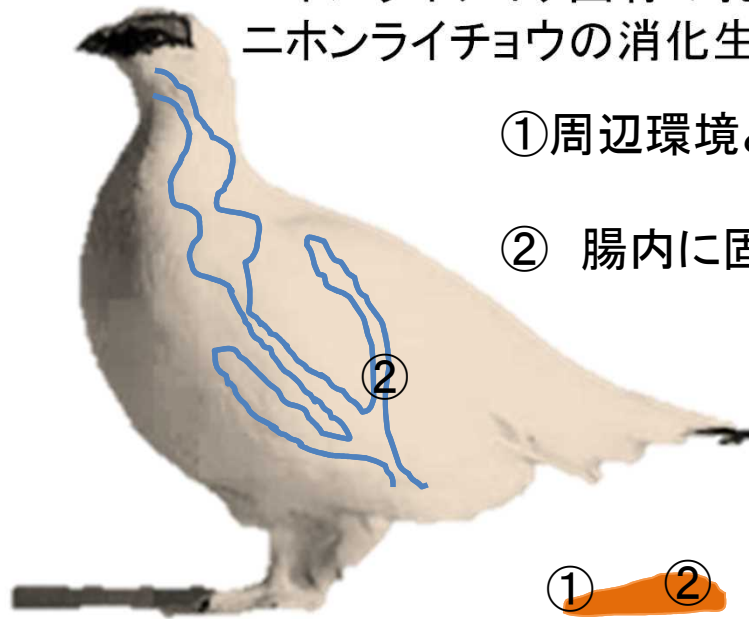
分離対象

ニホンライチョウ固有の乳酸菌

ニホンライチョウの消化生理に貢献する嫌気性菌

① 周辺環境と腸内を循環する細菌

② 腸内に固有に定着する細菌





ライチョウの搜索

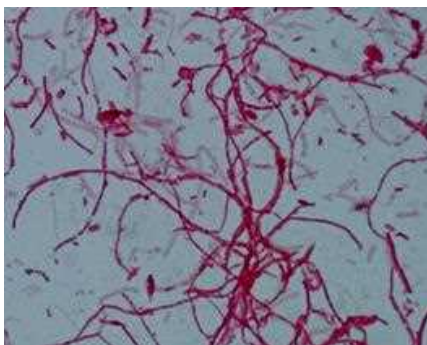


排泄直後の盲腸糞の採取

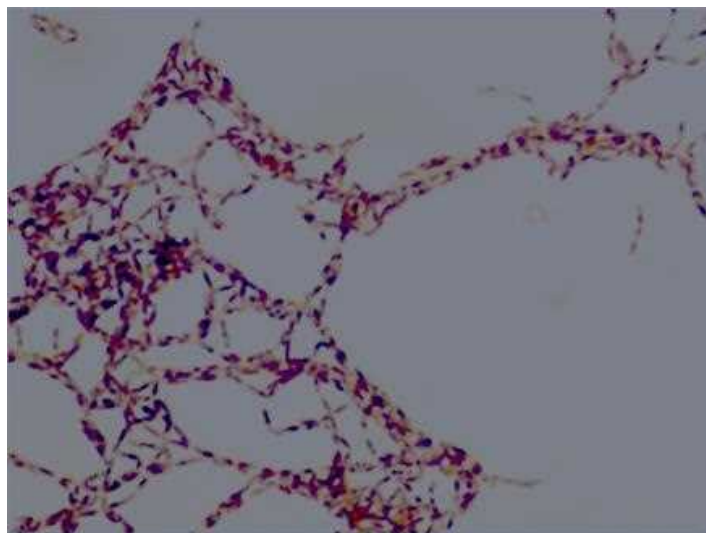


2014/5 糞便スメア像

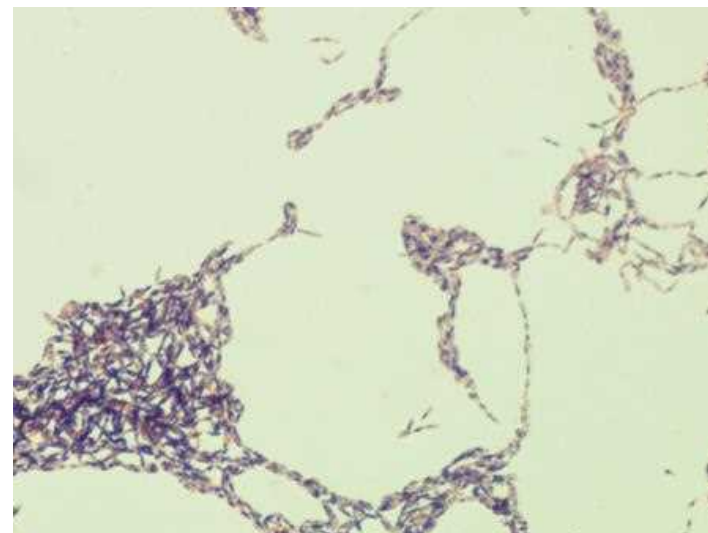
Feces Gram stain



2016/5 単離株
Isolates

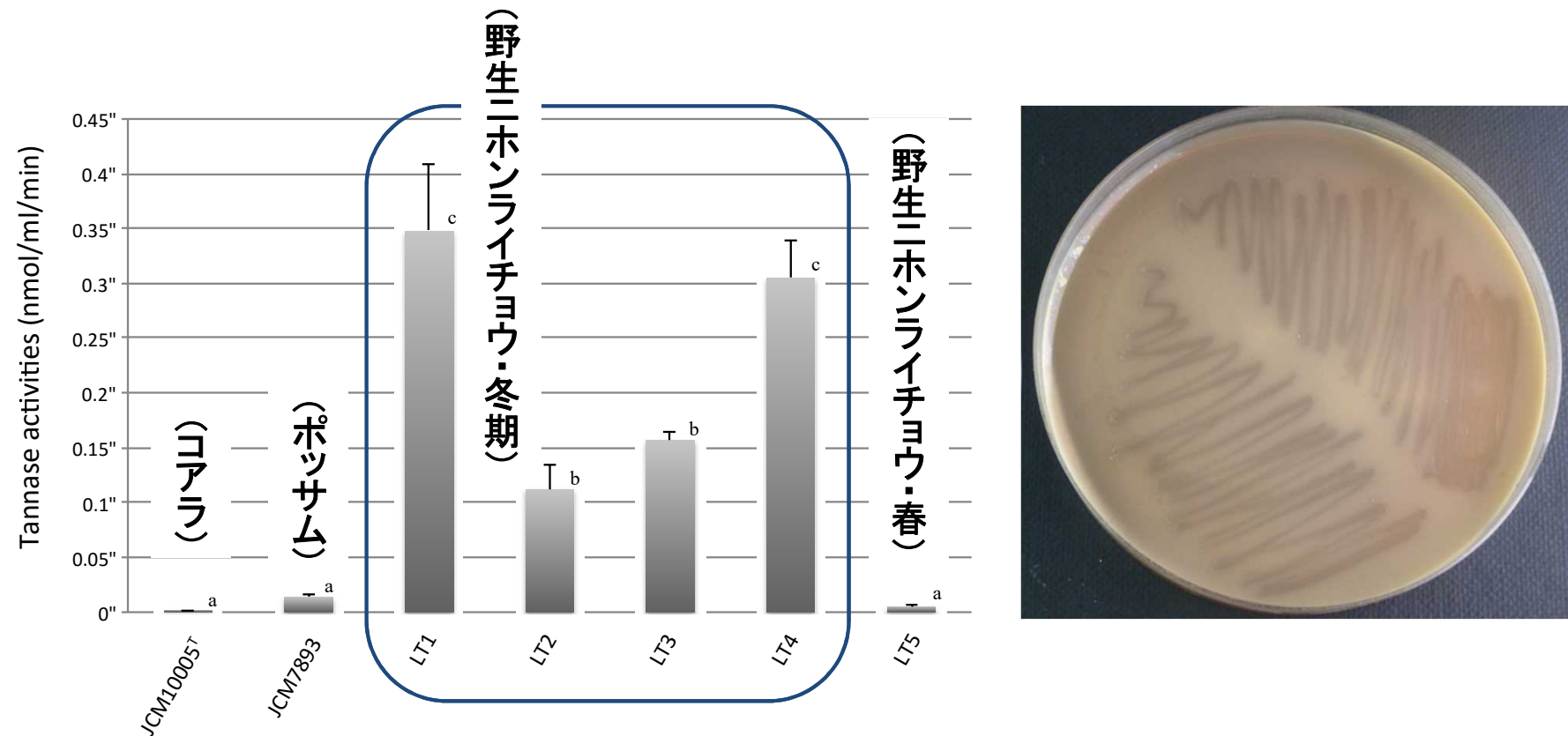


S-4-15 *Ruminococcus torques* / 96.93%
(novel species or subspecies)



S-4-16 *Coprococcus comes* / 92.4%
(novel genera or species)

- *Streptococcus gallolyticus*

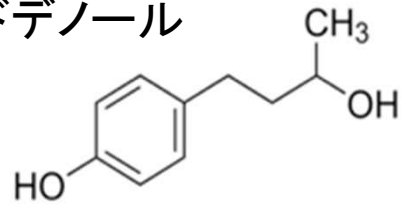


野生ニホンライチョウから分離した*Streptococcus gallolyticus*のタンナーゼ活性の比較
Tannase activities of isolates from wild Japanese rock ptarmigans. (Tsuchida et al. 2016)



ただし、ニワトリの心内膜炎の患部から分離されたという報告 (Sekizaki et al., 2008) があり、サブテーマ3の投与菌として使用しないという結論に至った

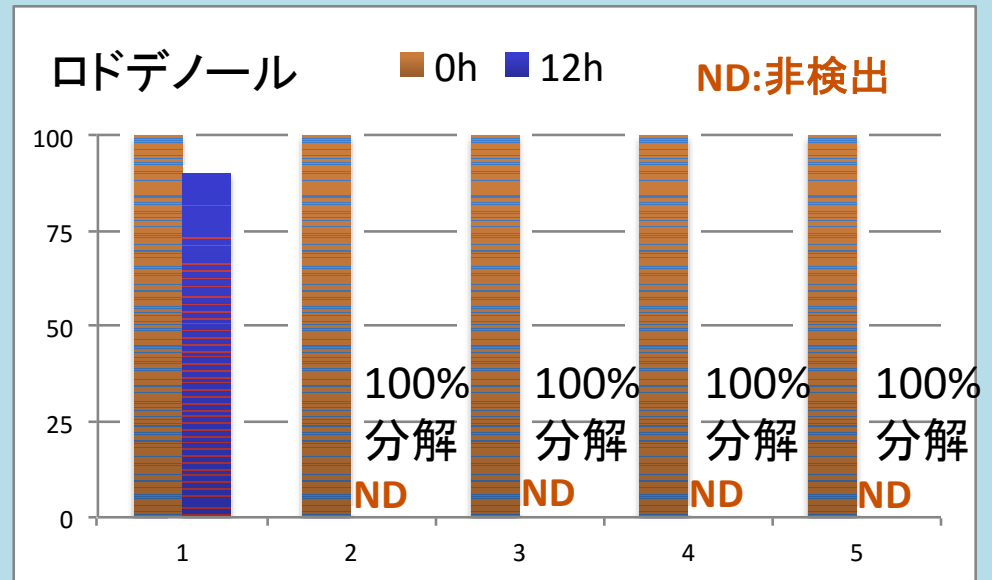
ロドデノール



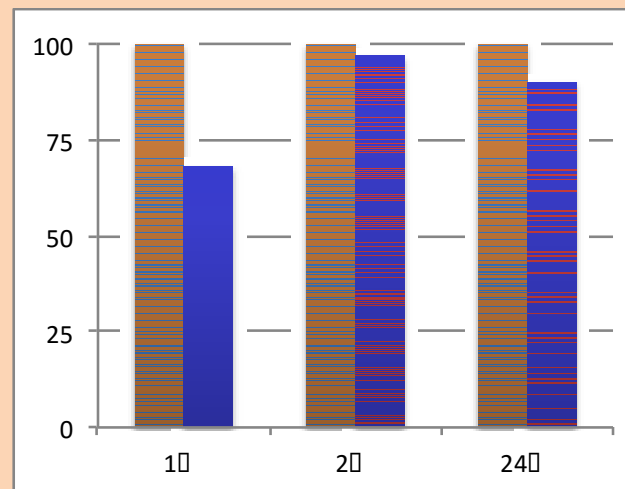
安息香酸などを経由してコハク酸などへ分解



野生ニホンライチョウ



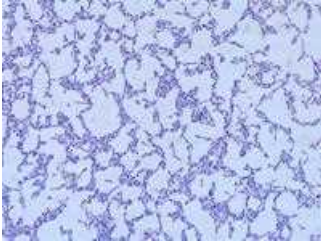
飼育スバルバルライチョウ





ライチョウから分離される乳酸菌

Lactic acid bacteria from wild rock ptarmigan at Tateyama and Kitadake



Lactobacillus plantarum

(2015.5.13 立山分離株) 20株 at Tateyama

環境循環性 Circulating between environment and intestine

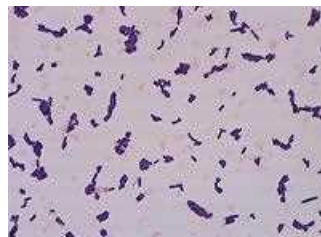


Lactobacillus apodemi

(2016.5.7 室堂分離株) 8株 at Tateyama

ライチョウ特異性? Host-specific?

グラム陰性菌に対する抗菌性 Antibacterial peptide to G(-)



Lactobacillus reuteri

(2016.7.8 北岳分離株) 5株 at Kitadake

広宿主域 (Broad host range)

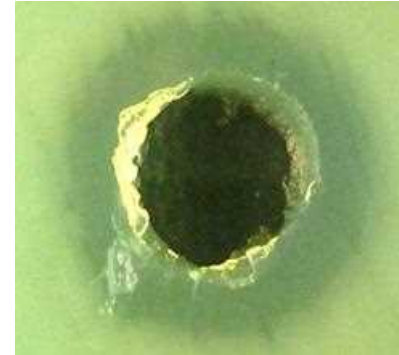
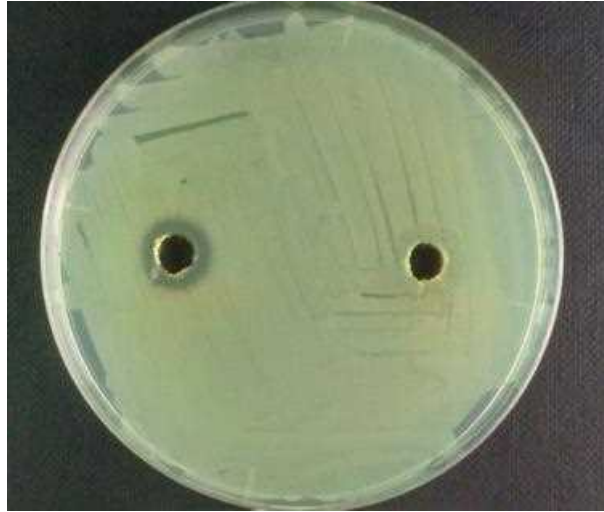


Streptococcus gallolyticus

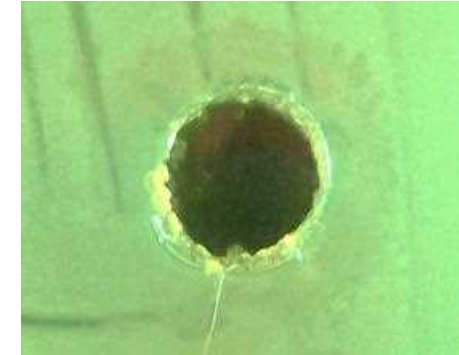
(2014.11.6 2015.5.7 2015.11 2016.5 立山分離株) 10株

(2016.7.8 北岳分離株) 3株 Beneficial for digestion of tannin rich food

- *Lactobacillus apodemi*



pH調整なし
培養液上清



pH7.0調整後
培養液上清

緑膿菌に対する抗菌活性試験

Antibacterial activities of *L. apodemi* (target pathogenic bacteria is *Pseudomonas aeruginosa*).



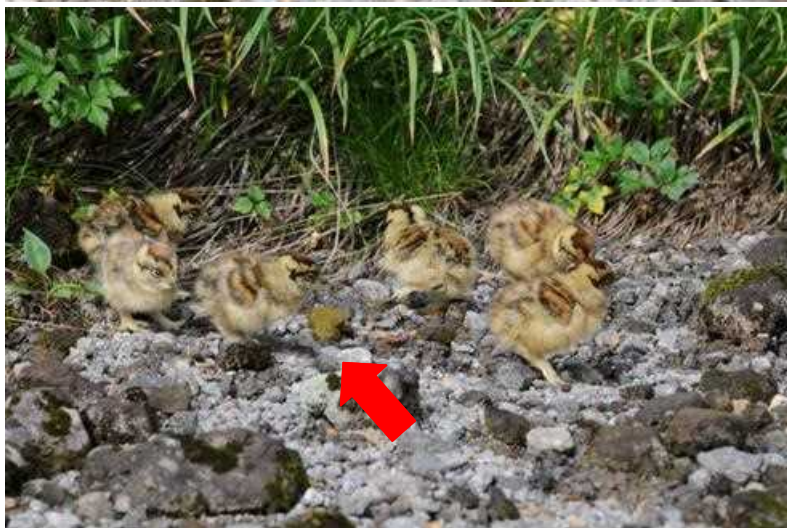
飼育スバルバルライチョウから分離された多剤耐性緑膿菌(6剤耐性)に対して、抗菌活性を示した。また、pH7.0に調整した培養上清にも抗菌活性が認められたため、抗菌ペプチドを有する可能性が示唆された。

→サブテーマ3の投与菌として使用

Sub-theme 2 野生ライチョウにおける腸内細菌の垂直伝搬の研究

Vertical transmission of intestinal microbes between hens and chicks

母鳥の盲腸糞を摂食するライチョウ雛(画像 中村浩志 未発表) Picture: H. Nakamura
雛の日齢、頻度、母鳥盲腸糞の特殊性等の解明 → 摂食痕からの時期と頻度推定
GC-MSによる化学組成解析



雛が母親の盲腸糞を食べた!!

2013年7月26日 乗鞍岳 ケージ保護事業中





クロウスゴ



オヤマノエンドウ



イワツメクサ



ムカゴトラノオ



オンタデ

今年北岳で採取し、給餌した主な餌植物



ミルワーム

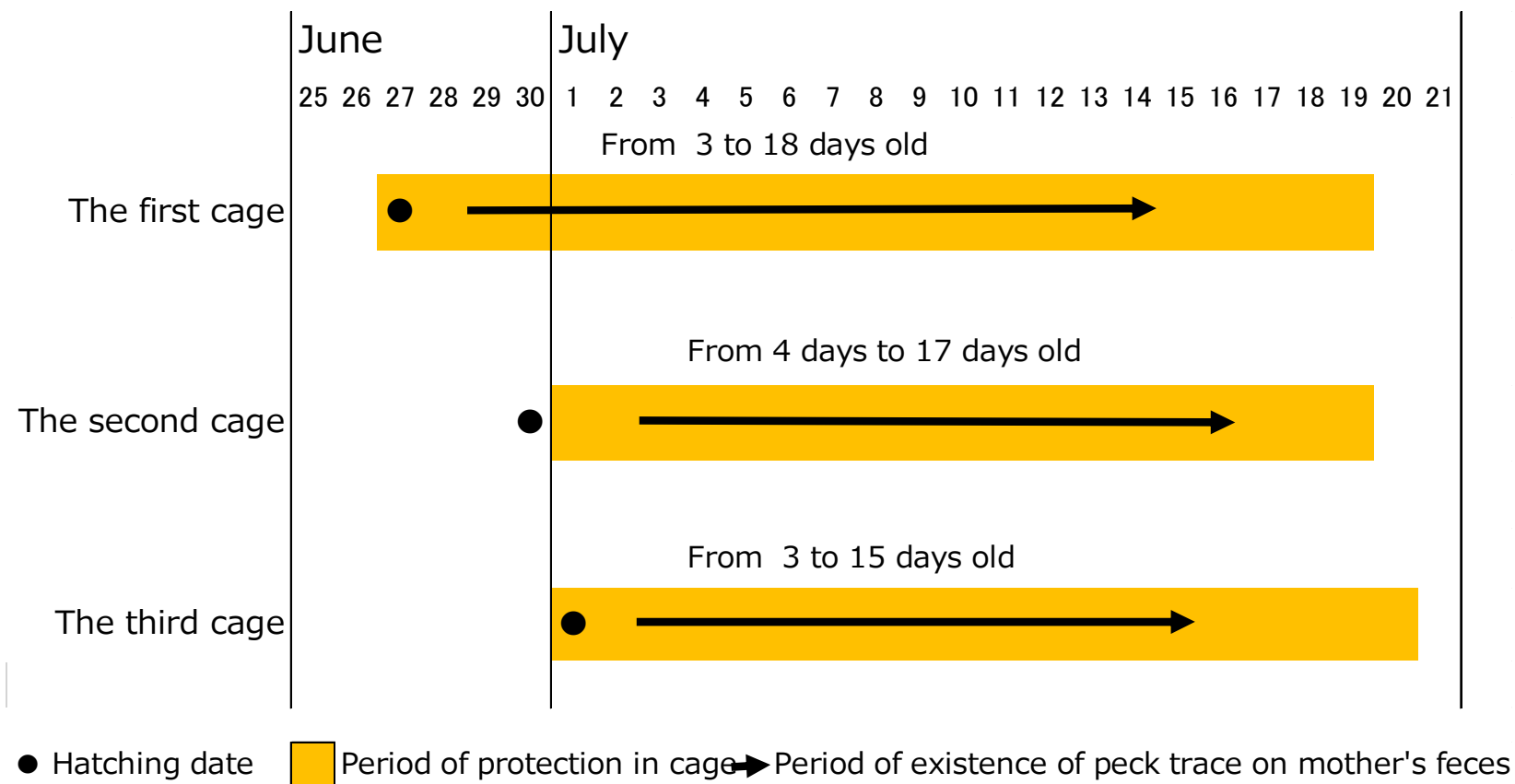


前年に採取したコケモモの実

予め用意していた餌



雛がついばんだ親の盲腸糞



雛がついばんだ跡のある盲腸糞が発見された期間

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。

野生ニホンライチョウの腸内寄生性コクシジウム原虫検査（大阪府大 松林誠准教授）

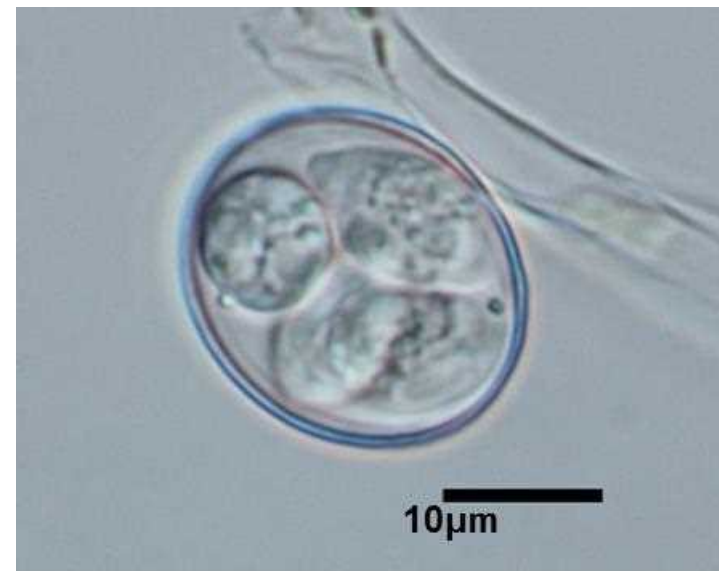
立山室堂の成ニホンライチョウ（5月、7月、11月）、

乗鞍岳成ニホンライチョウ（6月）、

北岳ケージ保護ニホンライチョウ成メスおよび雛（7月）



E. uekii (Type A)



Type B

表2 コクシジウム原虫オーシスト検査

通しNo.	受け取り日	採取場所	No.	Sample No.	Results <i>Eimeria</i> spp.
1	2016.5.12	立山/室堂	1	551	-
2	"		2	552	-
3	"		3	553-1	-
4	"		4	553-2	-
5	"		5	ウ34	-
6	"		6	オ36	-
7	"		7	オ36-2	-
8	"		8	カ36	-
9	"		9	サ36	-
10	2016.6.14	乗鞍岳	1	ピンクテープNo.1	+
11	"		2	ピンクテープNo.2	+
12	"		3	ピンクテープNo.3	+
13	"		4	ピンクテープNo.4	+
14	"		5	ピンクテープNo.5	+
15	"		6	ピンクテープNo.6	-
16	"		7	ピンクテープNo.7	+++
17	"		8	ピンクテープNo.8	-
18	"		9	ピンクテープNo.9	-
19	"		10	ピンクテープNo.10	-
20	2016.7.14	北岳 (ケージ 保護)	1	781C (雛)	+
21	"		2	781M (親)	-
22	"		3	783C (雛)	-
23	"		4	783M (親)	-
24	"		5	784C (雛)	+
25	"		6	784M (親)	-
26	2016.8.2	立山/室堂	1	729-1	+
27	"		2	729-2	+
28	"		3	729-3	+++
29	"		4	729-4	++
30	"		5	729-5	-
31	2016.11.8	立山/室堂	1	1101-2	-
32	"		2	1102-1K	-
33	"		3	1102-1S	-
34	"		4	1102-3S	-
35	"		5	1102-4S	-

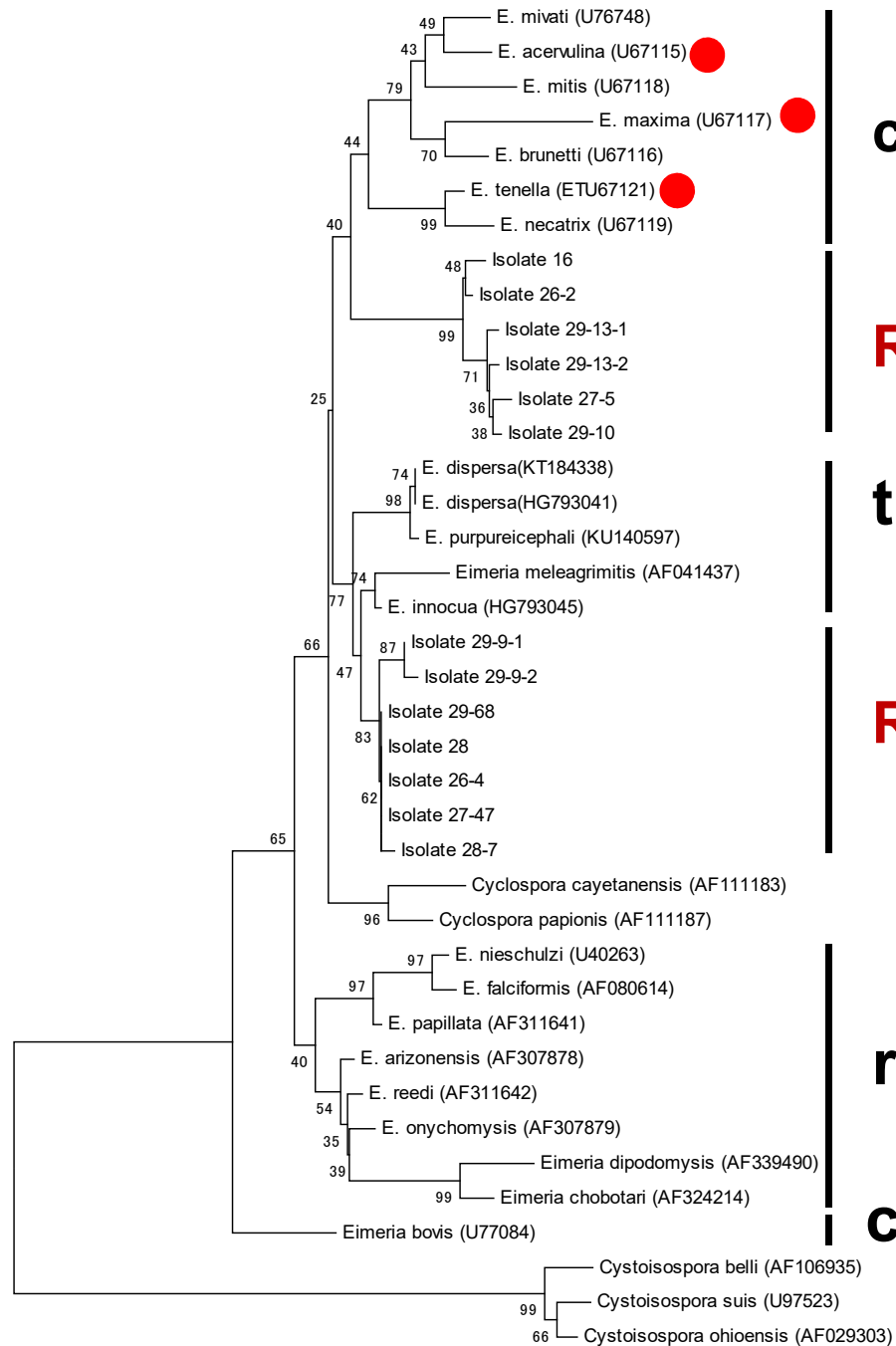
無雪期 高検出
積雪期 非検出

Snow season Low (no) prevalence
Summer season High prevalence

ライチョウから検出された *Eimeria* spp. 比較表

	This study (通しNo. 16)	This study (通しNo. 28)	<i>E. uekii</i>	<i>Eimeria</i> Type A	<i>Eimeria</i> Type B	<i>E. muta</i>	<i>E. rjupa</i>	<i>E. brinkmanni</i>	<i>E. fanthami</i>	<i>E. lagopodi</i>
Oocysts										
Length	23.65 (20.0-27.14)	20.57 (18.64-21.82)	24 (19-29)	23.7±1.6 (20.2-28.8)	21.3±2.3 (13.6-25.9)	24.9±2.2 (19.5-30)	24.7±2.1 (20-28)	28.6 (26.0-29.7)	28.3 (27.0-29.2)	24
Width	15.25 (13.33-18.10)	17.45 (14.55-19.09)	16 (13-21)	15.6±1.2 (13.7-18.8)	19.1±2.1 (13.1-24.5)	16.6±0.8 (14.5-19)	22.2±1.5 (18-24.5)	18.8 (18.0-19.6)	18.8 (18.0-20.1)	15
L/W	1.56 (1.26-1.89)	1.18 (1.08-1.26)	1.5 (1.2-1.7)	1.5 (1.2-1.7)	1.1 (1.0-1.4)	1.5 (1.2-1.8)	1.1 (1.0-1.3)	1.52 (1.4-1.6)	1.52 (1.4-1.6)	ND
Micropyle	±	—	+	±	—	+	—	—	—	ND
Oocyst residuum	—	—	—	—	—	—	—	—	—	ND
Polar granules	one to two	one	2x1	1.5-3.1	1.5-2.8	one to three PGs	one to two PGs	one to two PGs	one to three PGs	ND
Sporocyst										
Length	11.67 (9.05-14.29)	11.75 (10.00-13.64)	12 (11-15)	12.4±0.8 (9.7-14.4)	12.1±1.0 (9.6-13.7)	14.3±0.9 (12-16.5)	14.4±0.6 (12-15.5)	13	ND	ND
Width	6.85 (5.71-8.10)	7.13 (5.91-8.18)	6 (5-7)	6.7±0.4 (5.8-7.8)	7.4±0.6 (5.8-9.2)	6.3±0.4 (5.5-7)	8.0±0.6 (6.5-9)	7	ND	ND
L/W	1.71 (1.29-2.25)	1.65 (1.38-2.00)	ND	1.8±0.1 (1.4-2.3)	1.6±0.1 (1.2-2.0)	2.3 (1.9-2.7)	1.8 (1.6-2.2)	ND	ND	ND
Stieda body	+	+	+	+	+	+	+	+		
Refractile body	ND	ND	2.2-3	1.3-4	1.4-4	3.9 (3-5)- 2.9 (2-4)	3.9 (3-5) x 2.9 (2-4)		ND	ND
Sporocyst residuum	ND	ND	+	+	+	+	+	—	—	
Sporulation time	(通しNo. 24; 24-48hr)	(通しNo. 28; 24hr)	24hr	<24hr	<48hr	ND	ND	ND	ND	ND
References			Kamimura et al., 1981	Ishihara et al., 2006	Ishihara et al., 2006	Skirnisson et al., 2007	Skirnisson et al., 2007	Levine, 1953	Levine, 1953	Galli- Valerio, 1929
Country	Japan	Japan	Japan	Japan	Japan	Iceland	Iceland	Canadian arctic	Canadian arctic	Switzerland
Notes	E. Uekii と一致と記述									

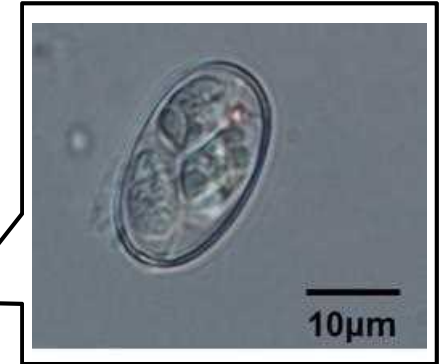
(単位μm)



● Toxic spp.

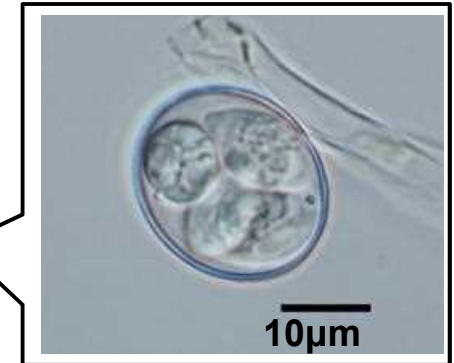
chicken

Rock ptarmigan



turkey

Rock ptarmigan



rodent

cattle

盲腸糞のメタボローム解析（HPLC, LC/MS?MSおよびGC/MSによる糞中成分網羅解析）

→ 消化の特性や糞食を誘因する物質の推定

（島津製作所/大阪大学 服部考成）

北岳野生ライチョウ親鳥盲腸糞

- 1: ケージ1母鳥 7月8日午前採取
- 2: ケージ1母鳥 7月8日午後採取 (1と同じ個体)
- 3: ケージ2母鳥 7月8日午前採取
- 4: ケージ3母鳥 7月9日午前採取

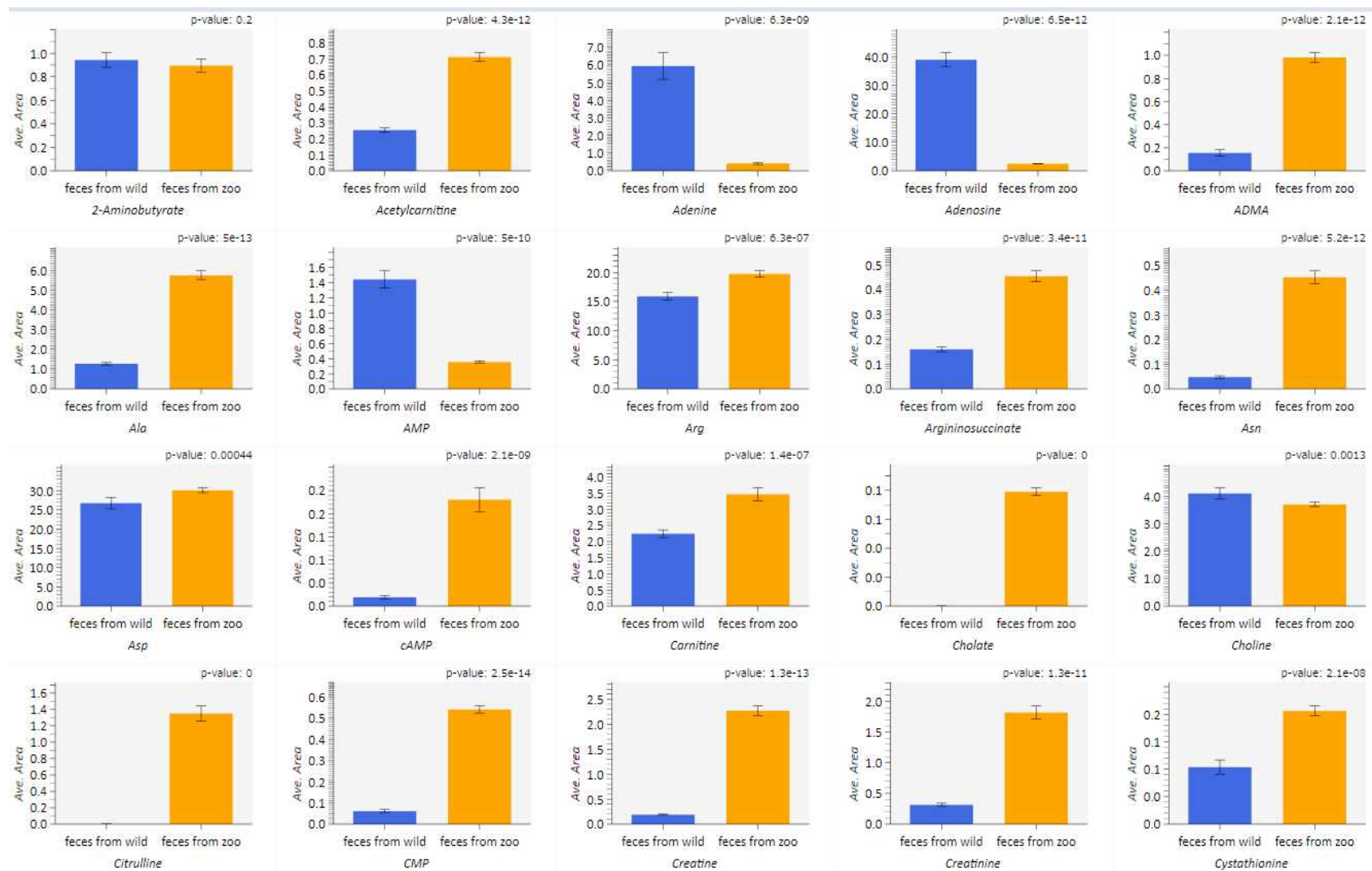
富山市ファミリーパーク飼育ライチョウ

- 5: オス成鳥No9 7月28日採取
- 6: オス成鳥No9 7月28日採取 (5と同じ個体)
- 7: オス成鳥No6 7月28日採取
- 8: オス成鳥No10 7月28日採取
- 9: 2016孵化ヒナ1(ケージ左)
- 10: 2016孵化ヒナ2(ケージ右)

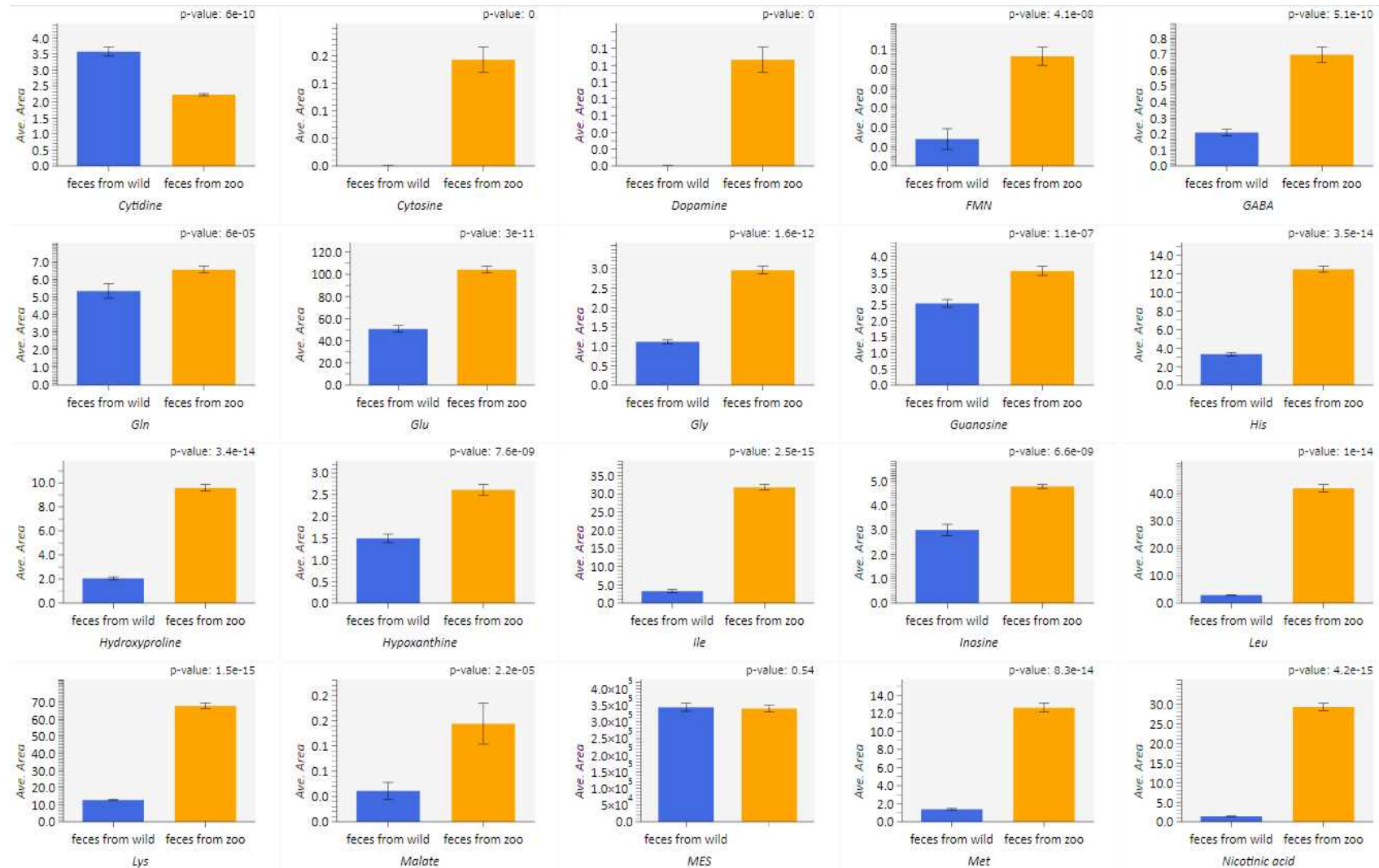
野生ニホンライチョウの食草の化学成分分析と園芸品種との比較（東京理科大 倉持幸司准教授）

室堂で採取したガンコウランと富山市ファミリーパークで栽培中の
ガンコウランの比較 TLCおよび $^1\text{H-NMR}$ $^{13}\text{C-NMR}$
有毒物質バタタシンの有無など検討中

検出成分の相対濃度比較



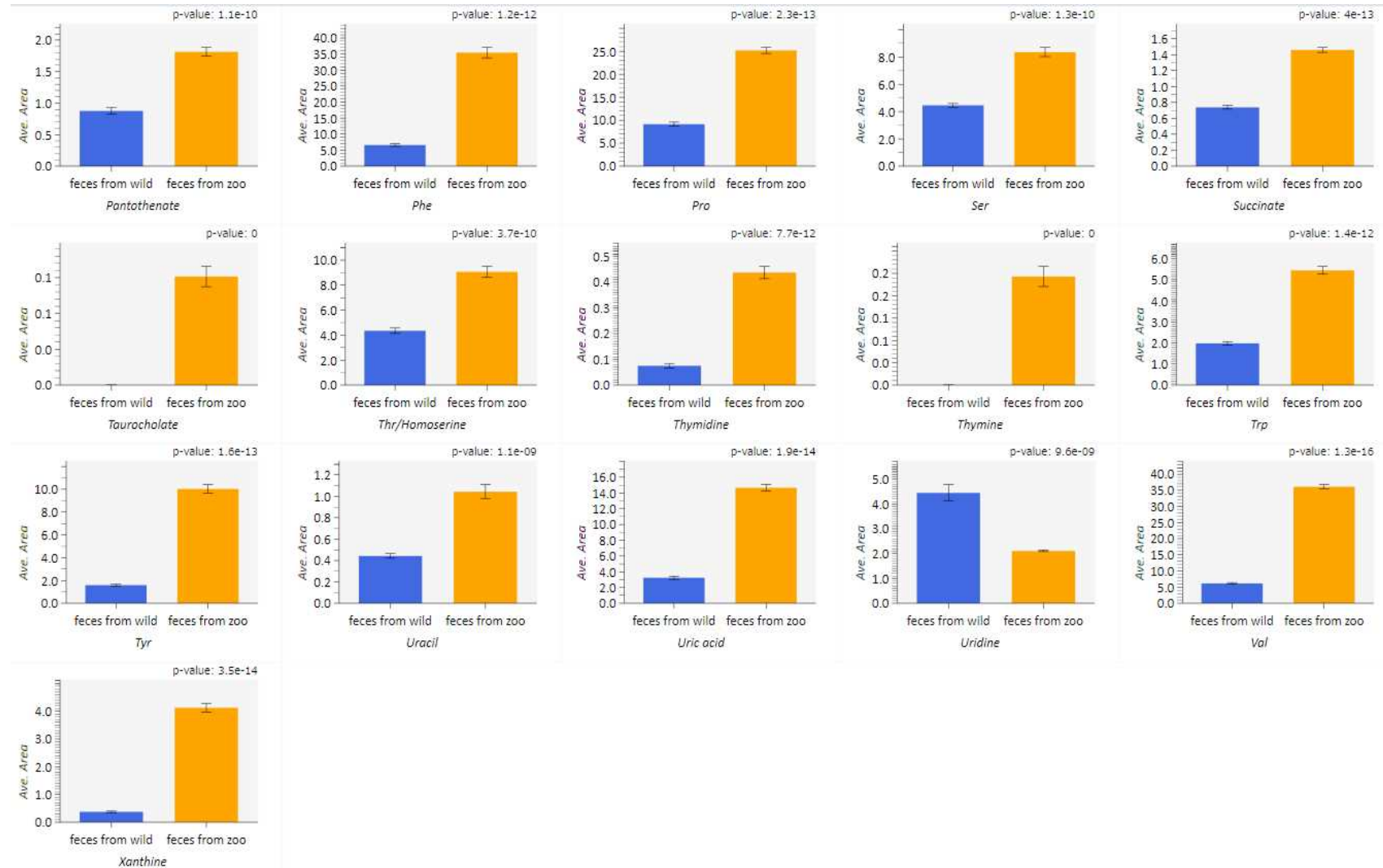
検出成分の相対濃度比較



△0

* ピーク面積比で比較

検出成分の相対濃度比較



* ピーク面積比で比較

Sun-theme 3 飼育試験

Reconstruction of intestinal microbiota of captured raised Svalbard rock ptarmigans

実施園館 横浜市繁殖センター Yokohama Zoo
那須どうぶつ王国 Nasu animal kingdom zoo

採卵用親鳥の飼育

横浜 ♂2羽 ♀2羽

那須 ♂1羽 ♀3羽

飼料: RM-4: 日獣大調整飼料 (3:1), 小松菜 リンゴンベリー
ビタミン剤(ネクトンS), ボレー粉

孵卵

孵卵器による人工孵化

ヒナ試験群 基本飼料 SDL No.1 formula feed, fresh vegetables, worms

OTC投与群: オキテラ水溶散100 (力価100 mg/L)水溶液を
飲水として孵化後7日間給与

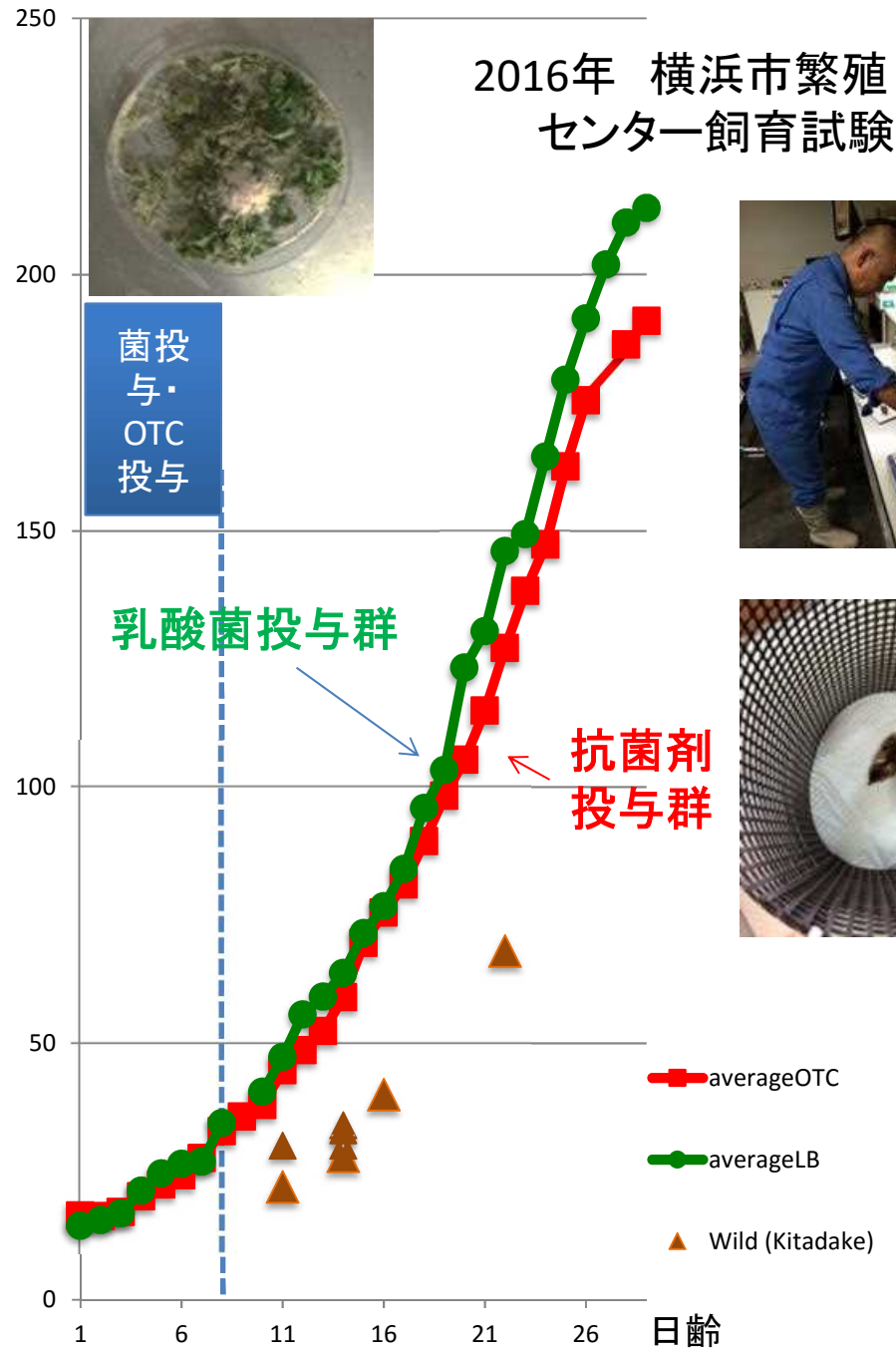
ライチヨウ細菌投与群: *Lactobacillus apodemi* (5×10^8 /dose) および
Escherichia fergusonii (1×10^5 /dose) の乾燥菌体
1日3回、7日間、餌にまぶして給与 feed with 2-3 meals/d

測定

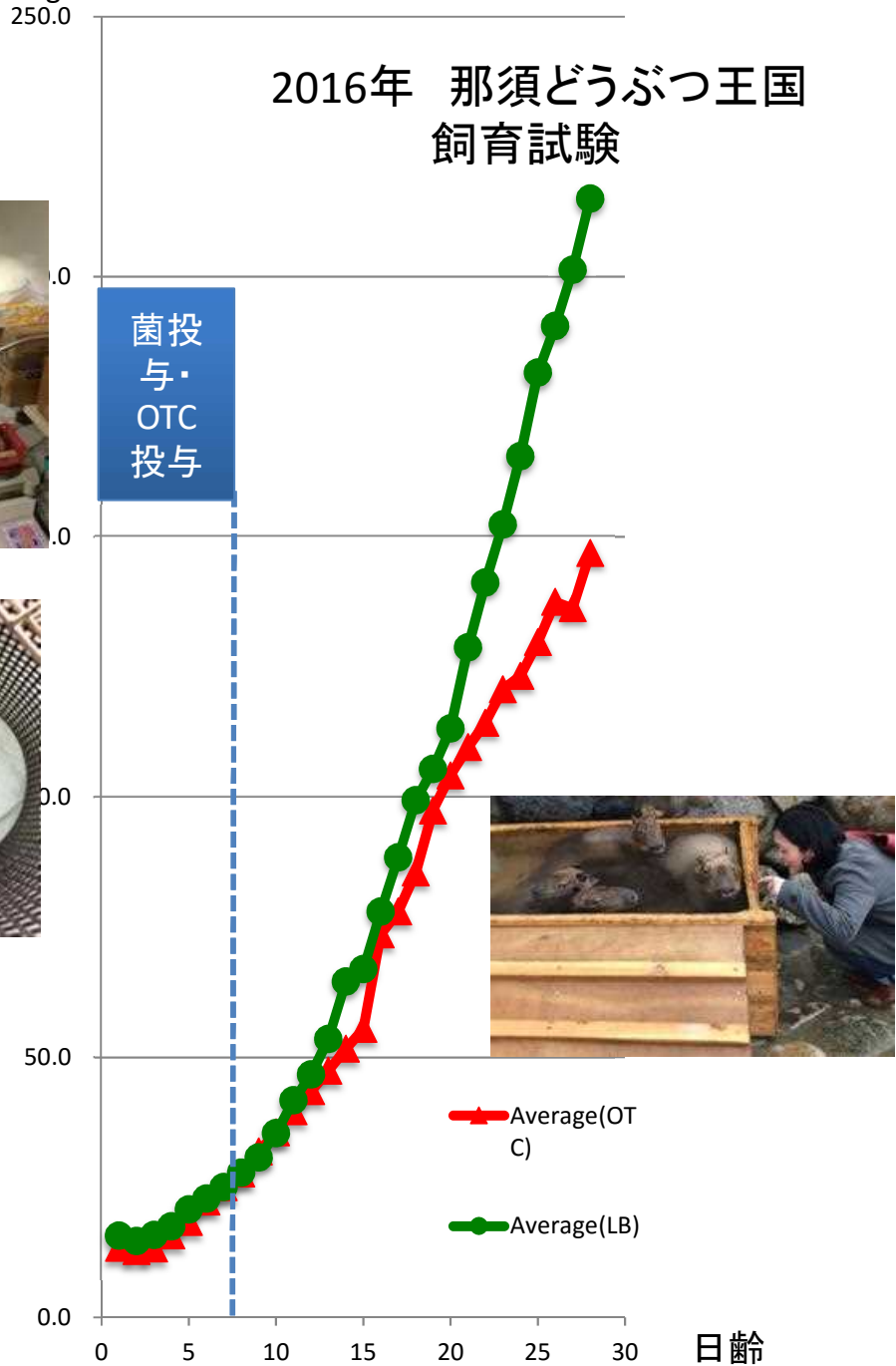
体重 元気

糞採取 (細菌DNA検査、IgA濃度測定、生菌分離)

体重g



体重g



体重g

250

200

150

100

50

0

1

6

11

16

21

26

日齡



混合菌投与・OTC投与



菌投与群の発育過多?

1羽死亡(脚)

—■— averageOTC

—●— averageLB

▲ Wild (Kitadake)

2016年 横浜(Yokohama) 成績

4羽中4羽死亡 (脚障害4羽/感染症1羽)

3日齡 30日齡 38日齡 44日齡

3 of 4 chicks were killed by weak leg problem and 1 was killed by infection

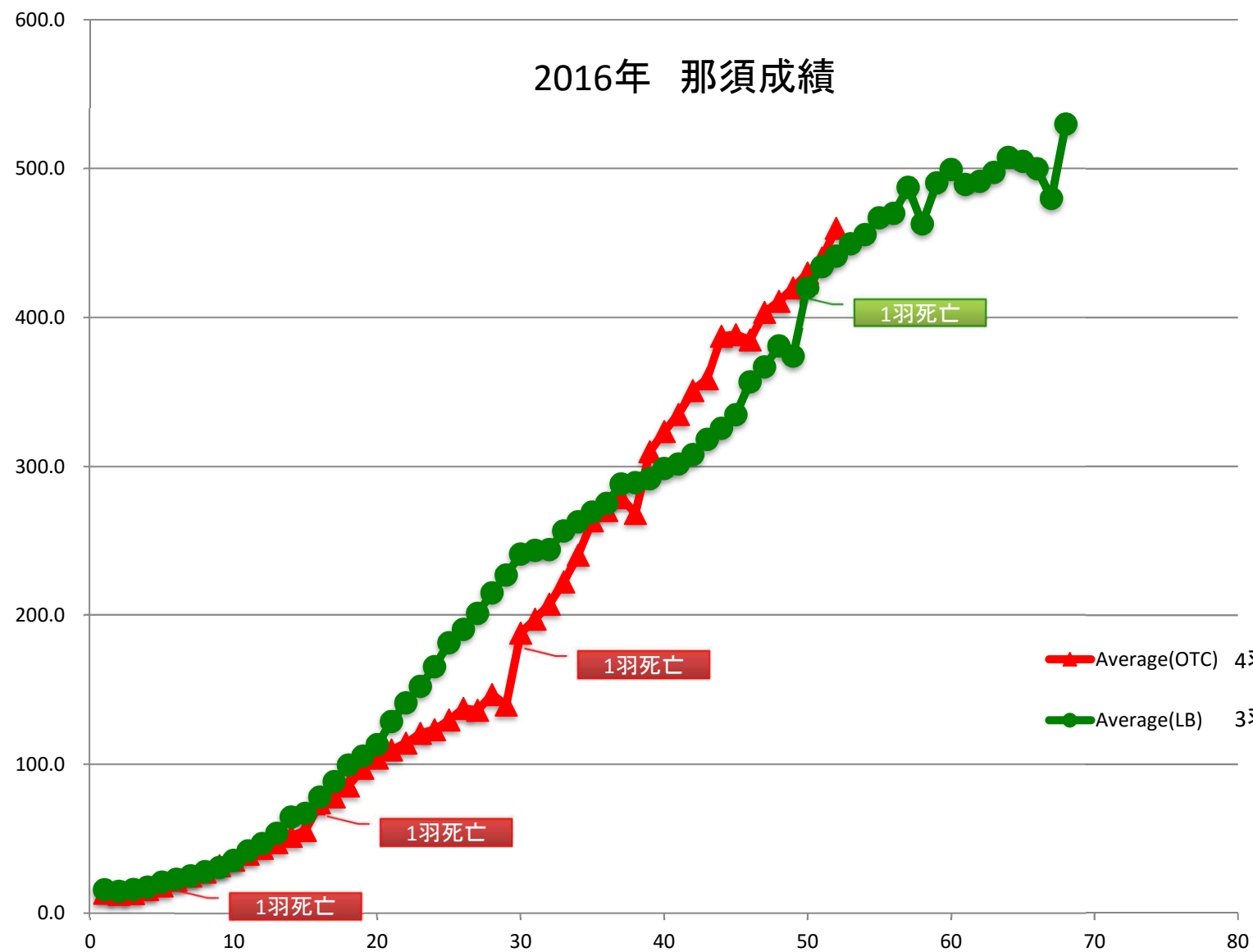
4羽中2羽死亡 (感染症)

36日齡 48日齡

2 of 4 were killed by infection

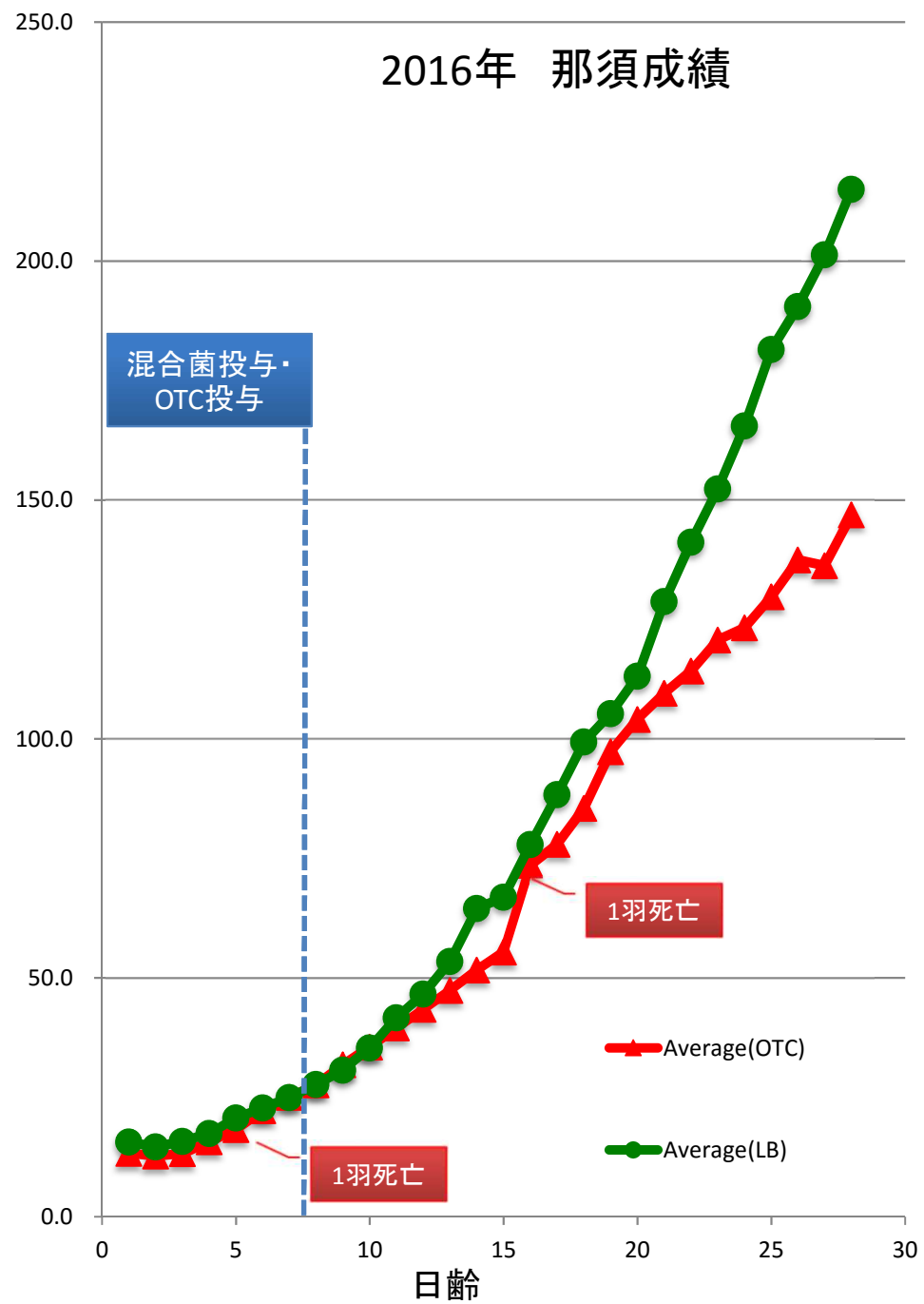


体重g

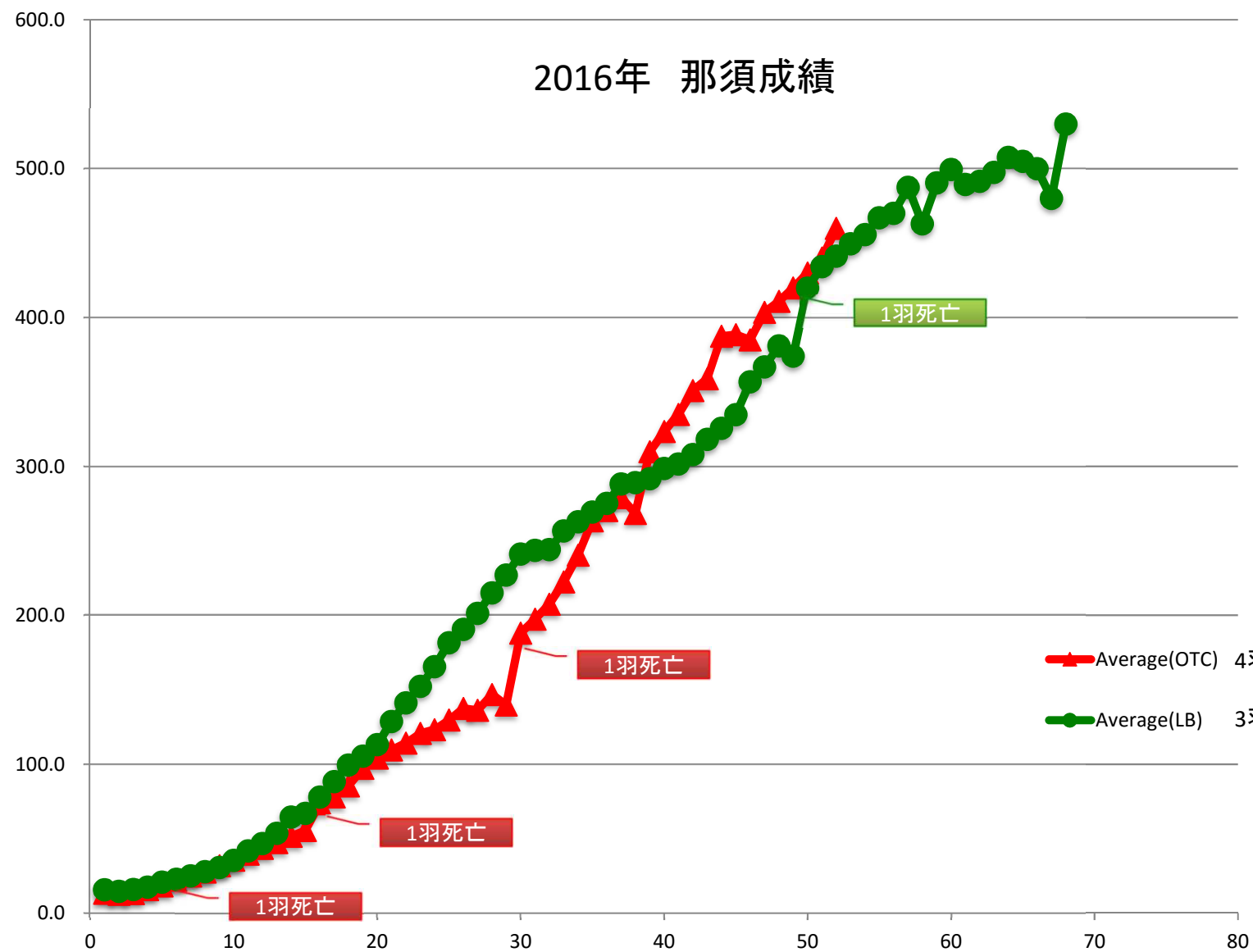


日齡

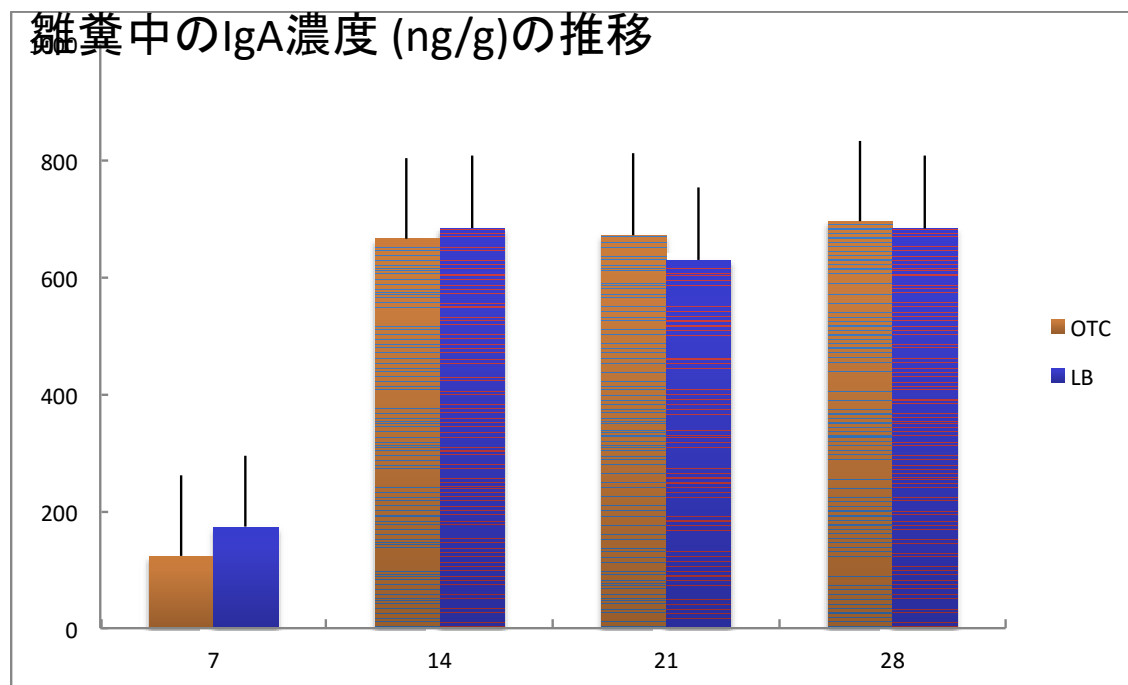
体重g



体重g



日齡



雛糞便(腸糞)を採取し、凍結保存

↓

融解

↓

Bethyl Chicken IgA ELISA

Quantitation Setで定量

7日齢から14日齢にかけての増加

● 雛の免疫機能の発達を示す。

● 飼育下の感染症の多発時期

(14年15年 0-7日齢 24羽中

15羽感染症による死亡)

表2 スパールバルライチヨウ雛糞中IgA濃度(ng/g)

個体番号	群	7日齢	14日齢	21日齢	28日齢
ヨコハマ46	OTC	193.7	—	—	—
ヨコハマ52		118.7	622.7	649.7	737.4
ヨコハマ53		125.3	707.0	674.1	674.1
ヨコハマ54		115.0	633.5	759.7	690.5
ヨコハマ48	LB	354.9	693.2	566.8	704.2
ヨコハマ49		246.5	704.2	622.7	679.6
ヨコハマ51		124.1	674.1	588.0	649.7
ナスC14	OTC	121.9	641.6	839.3	862.4
ナスB11		91.2	687.8	679.6	966.4
ナスNo.1	LB	102.7	804.9	668.7	674.1
ナスNo.2		97.3	674.1	701.5	799.2
ナスNo.3		108.1	676.8	723.5	734.6

ライチヨウのIgAは、抗ニワトリIgA抗体によって認識されるが、感度は、数百分の一のため、相対評価のみ可能。

消化管内容物の滞留時間測定

飼育上、いつ食べたものが排泄されたかというのは、重要な情報。

実験プロトコール (Protocol)

大町山岳博物館飼育スバルバルライチョウの成鳥3羽(メス) 体重600-700 g
給与飼料 RM-4 (ウサギ用ペレット) 10L 14D 自由採食。

固形部マーカー Cr吸着アルファルファ繊維
液状部マーカーCo-EDTA

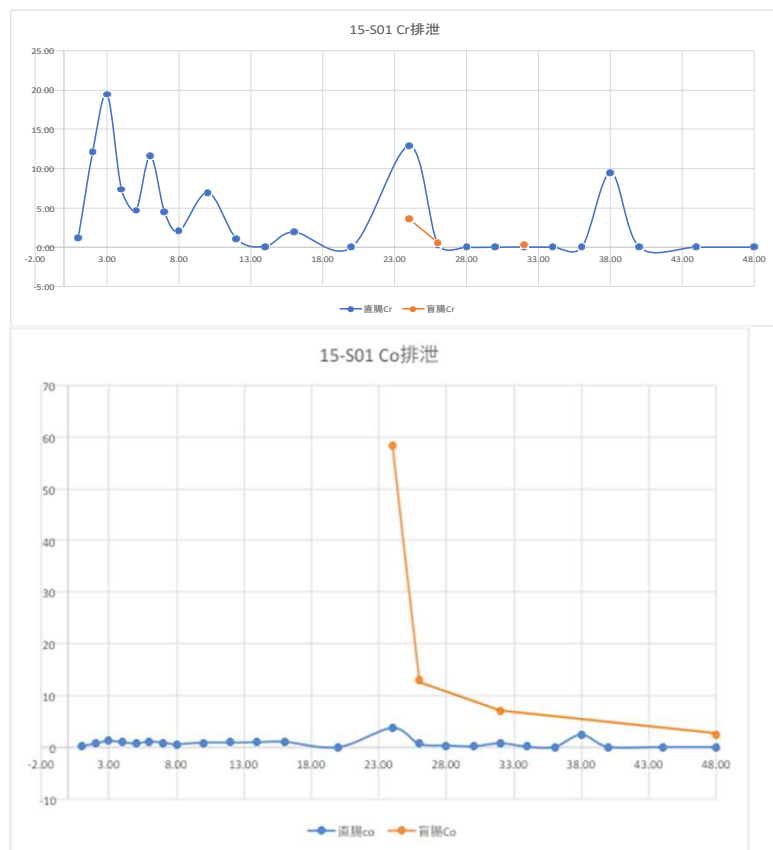
Cr吸着繊維0.2g/d、Co-EDTA 0.2 g/d
30分以内に摂食できる量の飼料に混合、朝の給餌時に給与

直腸糞と盲腸糞を区別して全量回収

初めの8時間は1時間毎

48時間目まで昼間のライチョウ活動時は2時間毎 深夜 4時間毎

湿式灰化後、ICP発光分析で定量



2016年度の結果

不消化固形部 滞留時間 2時間前後
 液上部(盲腸経由)滞留時間 8-10時間

表4 内容物平均滞留時間(h)

	Cr (固形部)	Co (液状部)	Cr滞留時間 (固形部)	Co滞留時間 (液状部)
15-S01	$f(t)=54.057e(-0.418)t$	$f(t)=162.96e(-0.083)t$	2.39	8.06
15-S03	$f(t)=69.062e(-0.736)t$	$f(t)=43.816e(-0.016)t$	1.36	62.50
15-S06	$f(t)=49.723e(-0.518)t$	$f(t)=411.79e(-0.099)t$	1.93	10.10

28年度飼育試験中間総括と29年度試験計画

28年度協力園館

横浜市繁殖センター 那須どうぶつ王国

1. 親鳥の飼料 各園の慣行飼料 → アルギニン強化飼料の導入

横浜繁殖センター 受精卵率の低下

那須どうぶつ王国 受精卵率の変化なし

29年度 横浜 : 27年度までの慣行飼料へ復帰

那須どうぶつ王国 アルギニン強化飼料を維持

2. 雛用飼料 各園の慣行飼料 → 日配 ニワトリ雛用試験飼料 SDL No.1

横浜繁殖センター 脚障害 体重増加速度と脚の発達不良

那須どうぶつ王国 脚障害 個別飼育による運動不足の可能性

横浜繁殖センター SDL No.1を粒度の粗い餌へ変更

那須どうぶつ王国 SDL No.1を維持し、運動を負荷

3. 野生ニホンライチョウ由来腸内菌投与

L. apodemus (多剤耐性緑膿菌に対する抗菌性あり)

OTC投与に比して、3週齢以降の感染症による死亡率の低下

28年度 野生ライチョウ乳酸菌の回収率から、29年度投与期間の決定

28年度 野生ライチョウ雛の行動観察も参考
(4日齢から21日齢にかけて食糞確認)