

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

サブテーマ1 牛田一成 (協力)土田さやか 倉持幸司 松林誠 上田敦 山田拓司

サブテーマ2 分担) 長谷川雅美 (協力)小林篤

サブテーマ3 分担)村田浩一 (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 日置あや

アドバイザー 中村浩志 園山慶 R. A. Ims

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

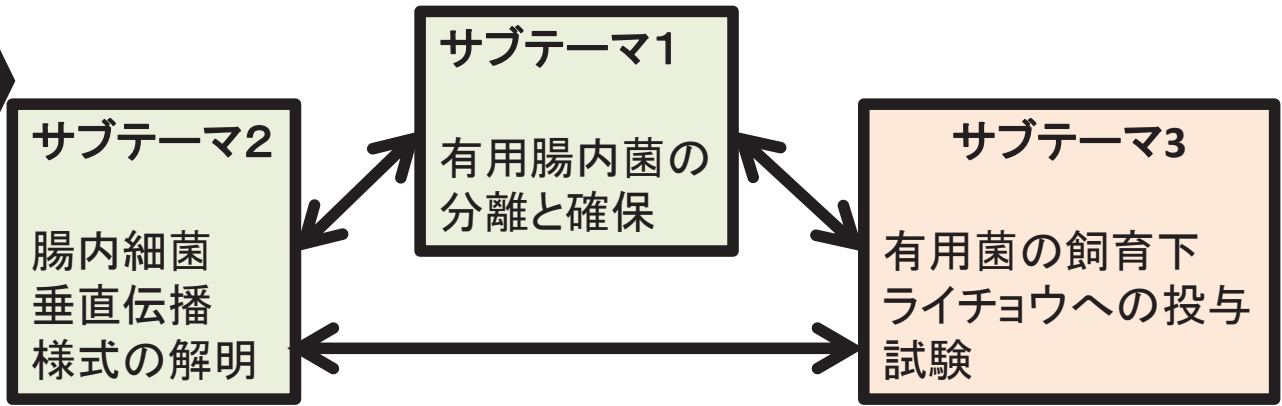
野生生活: 腸内菌による感染抵抗性・毒物分解能力で生存
飼育ライチョウ: 必須の腸内細菌を喪失

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

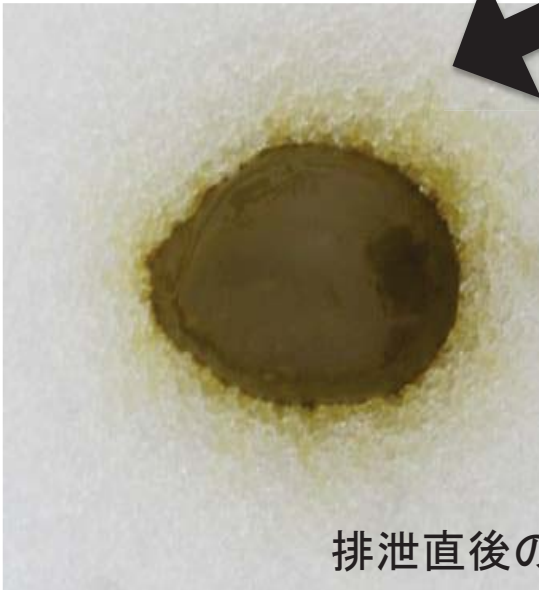
現状の飼育技術では、対応できない

- ・ 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



補助資料0-1, 2, 3

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



嫌気培養と単離/同定/
機能評価



菌叢網羅解析

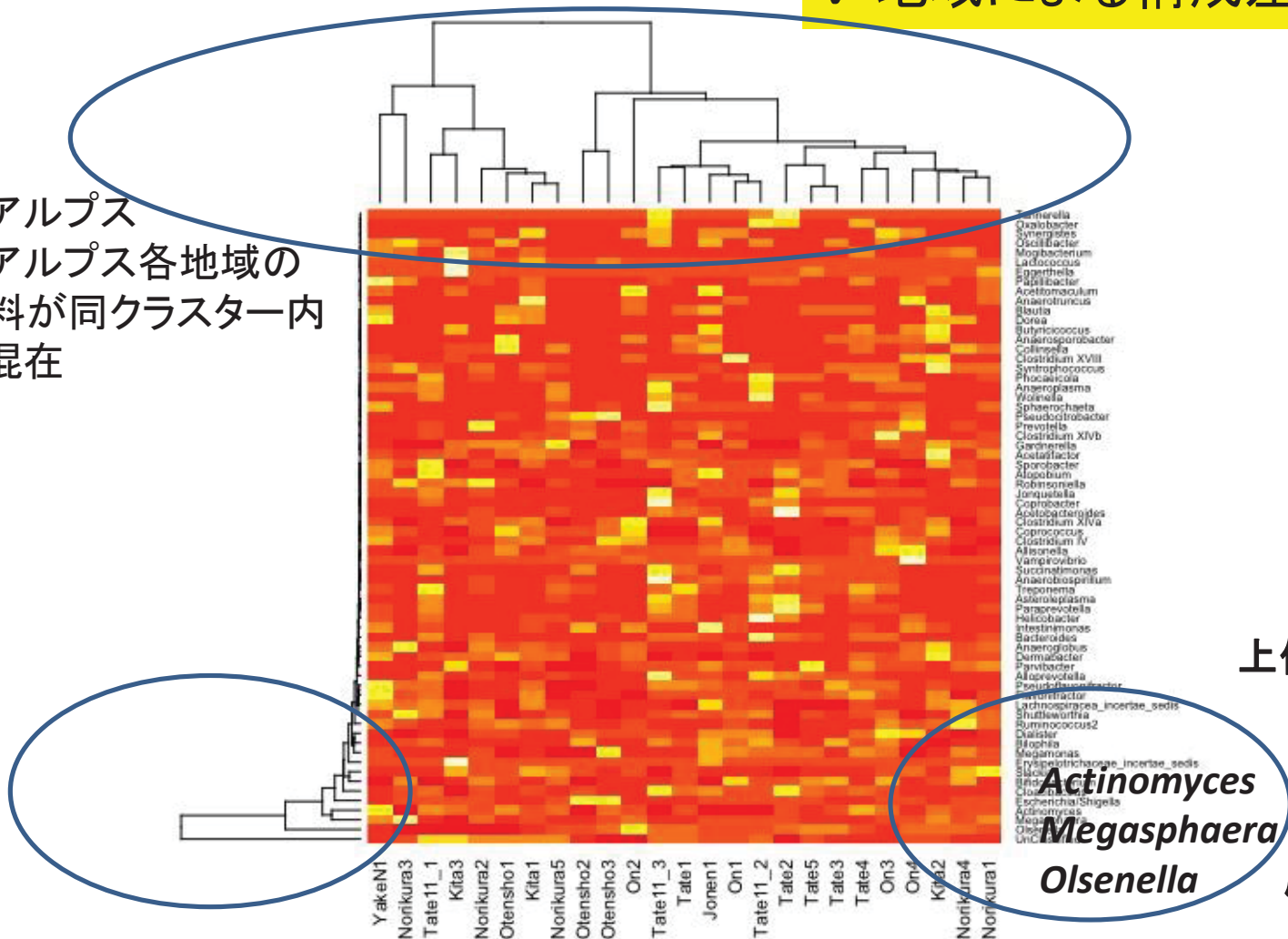
野生ニホンライチョウの腸内細菌構成の特徴

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

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

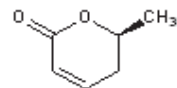
南アルプス
北アルプス各地域の
試料が同クラスター内
に混在



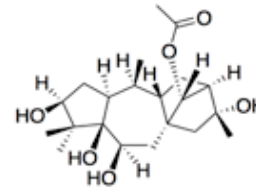
上位三種の細菌

Actinomyces 広義の乳酸菌
Megasphaera 乳酸利用菌
Olsenella 広義の乳酸菌

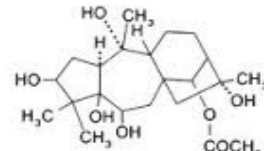
ライチョウの主食 高山植物には有毒物が含まれる



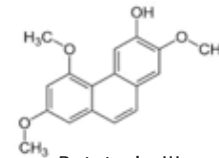
Parasorbic acid



Grayanotoxin I

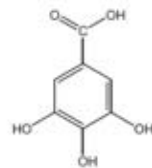
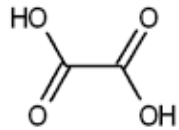


Acetylandromendol

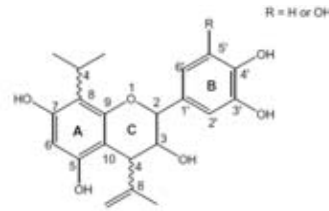


Batatasin-III

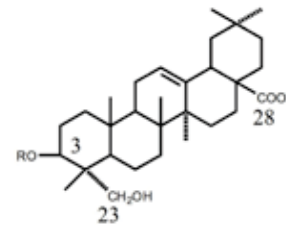
このほか、シュウ酸、タンニン、サポニン類などの消化を妨げる化合物



Galic Acid

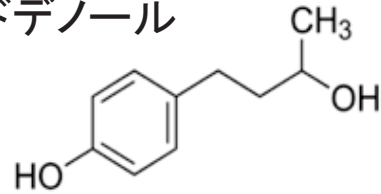


R = H or OH



解毒機能の必要性 = 共生腸内細菌の解毒作用

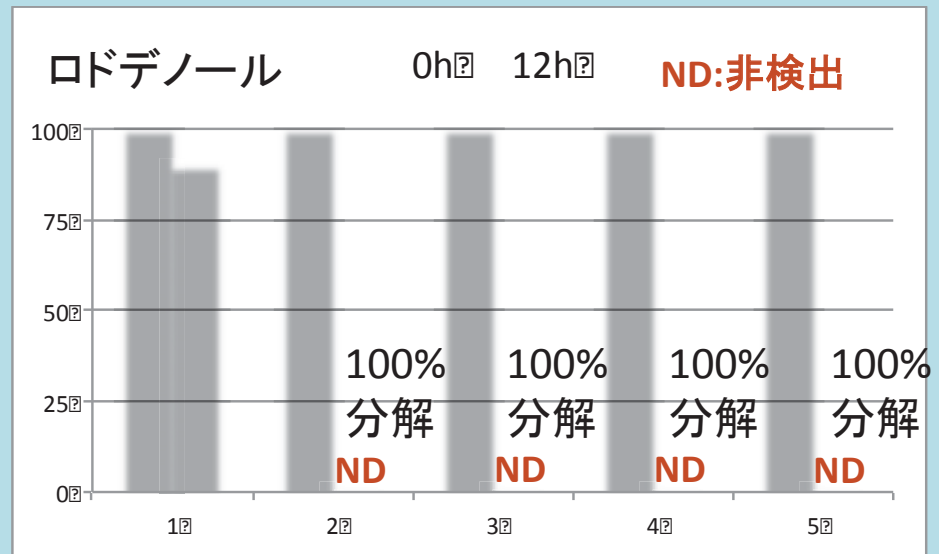
ロドデノール



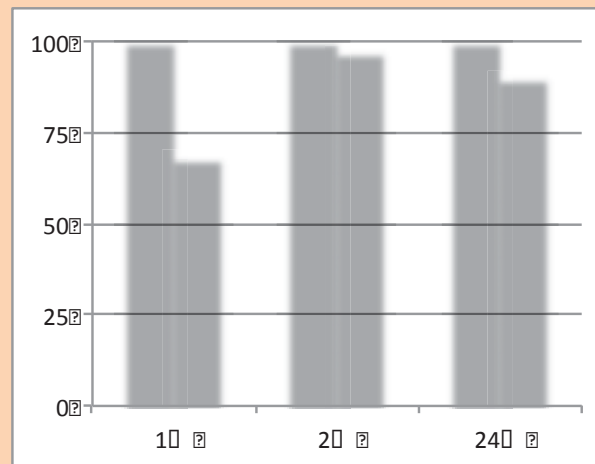
安息香酸などを経由してコハク酸などへ分解



野生ニホンライチョウ



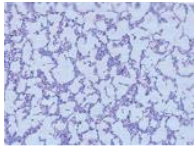
飼育スバルバルライチョウ



Tsuchida et al.
2017 JJZWM 22:41



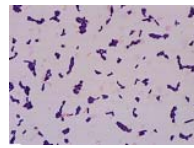
野生ライチョウから優勢に分離される乳酸菌



Lactobacillus plantarum
環境循環性



Lactobacillus apodemi
タンニン高度分解性
抗菌性



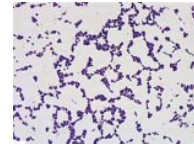
Lactobacillus reuteri
広宿主域



Streptococcus gallolyticus
タンニン高度分解性



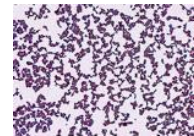
Streptococcus macedonicus
タンニン高度分解性



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

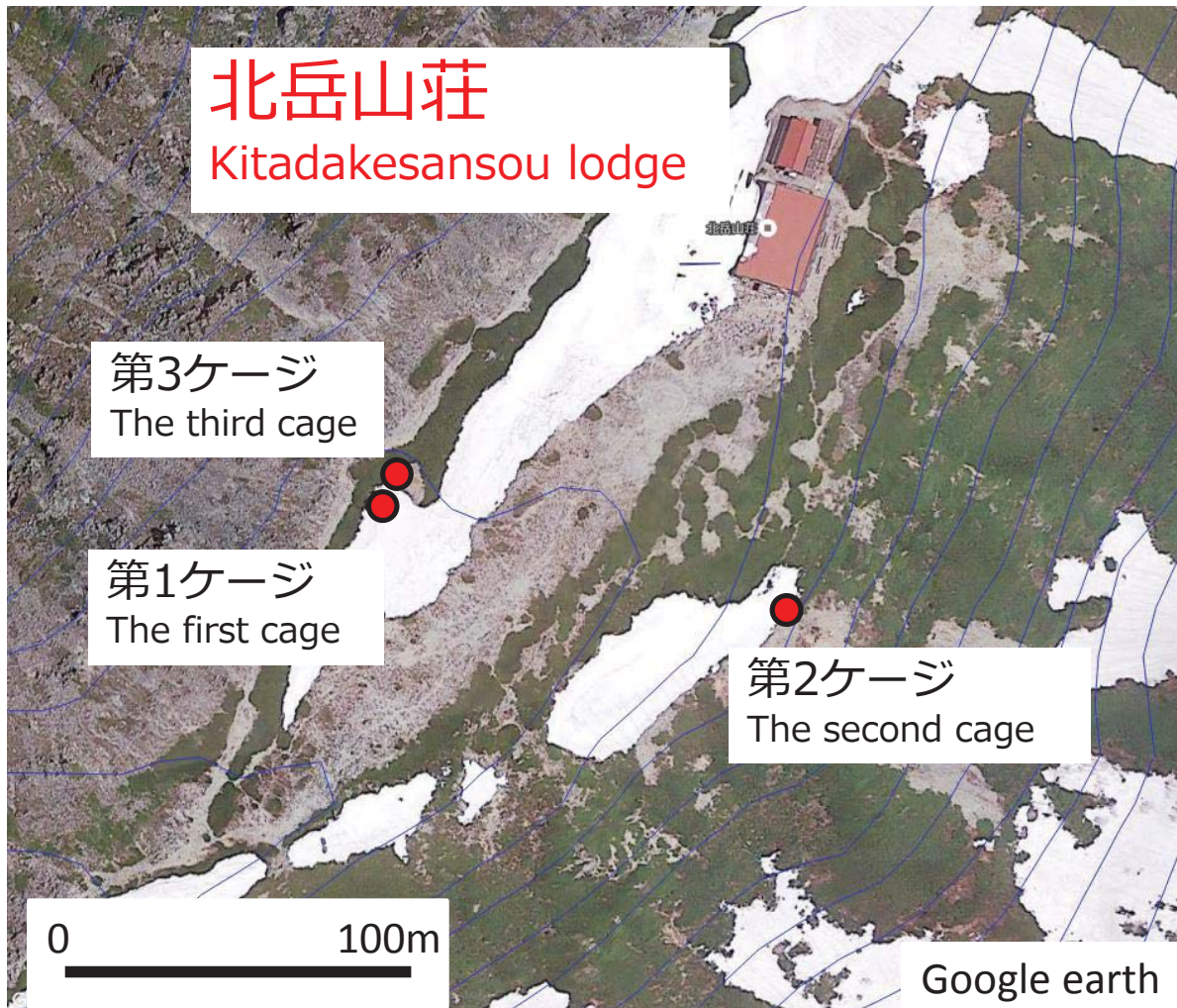
サブテーマ 2 野生ライチョウにおける腸内細菌の垂直伝搬の研究

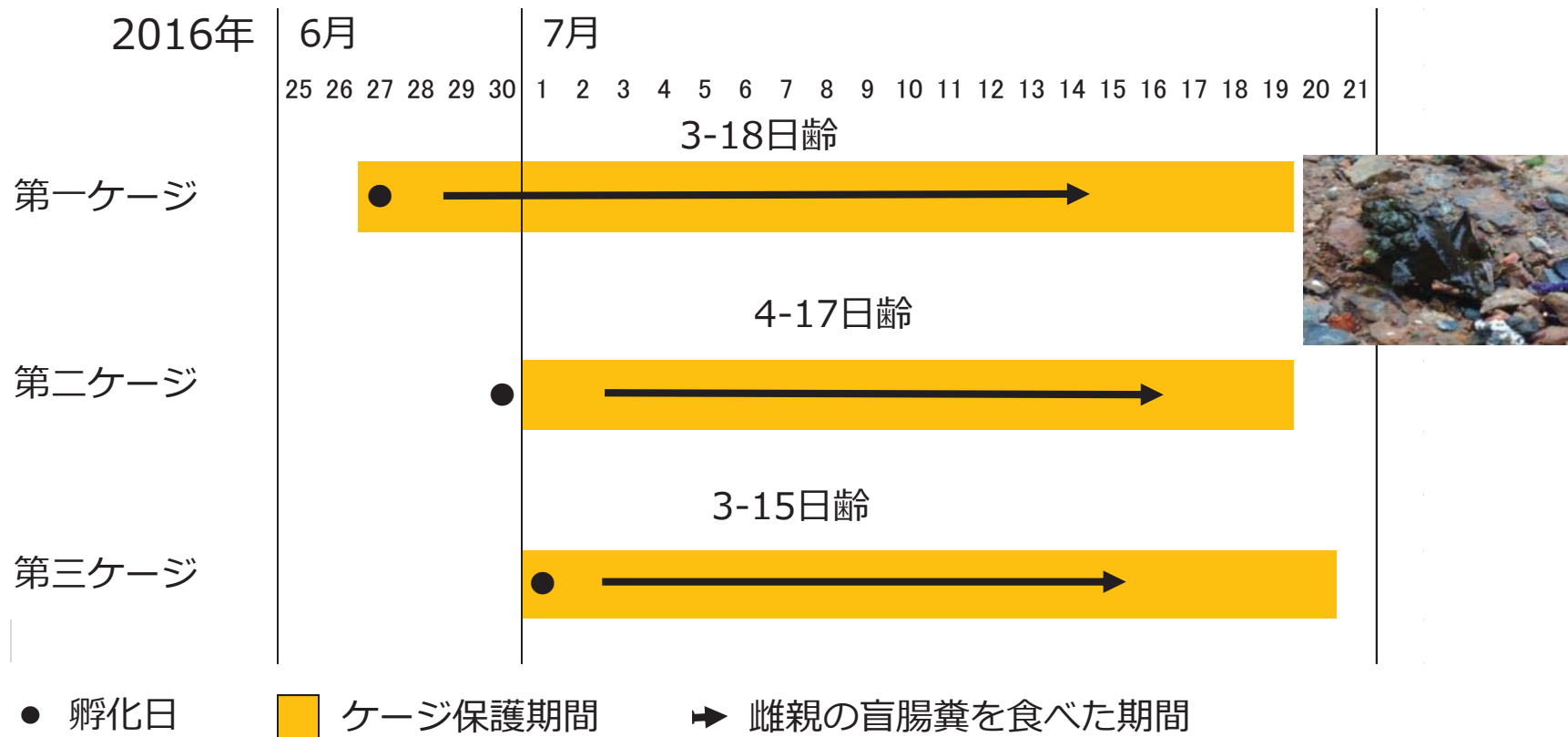
母鳥の盲腸糞を摂食するライチョウ雛 (Kobayashi et al. 2018 Kobayashi et al. 投稿中)

雛の日齢、頻度、母鳥盲腸糞の特殊性等の解明 → 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

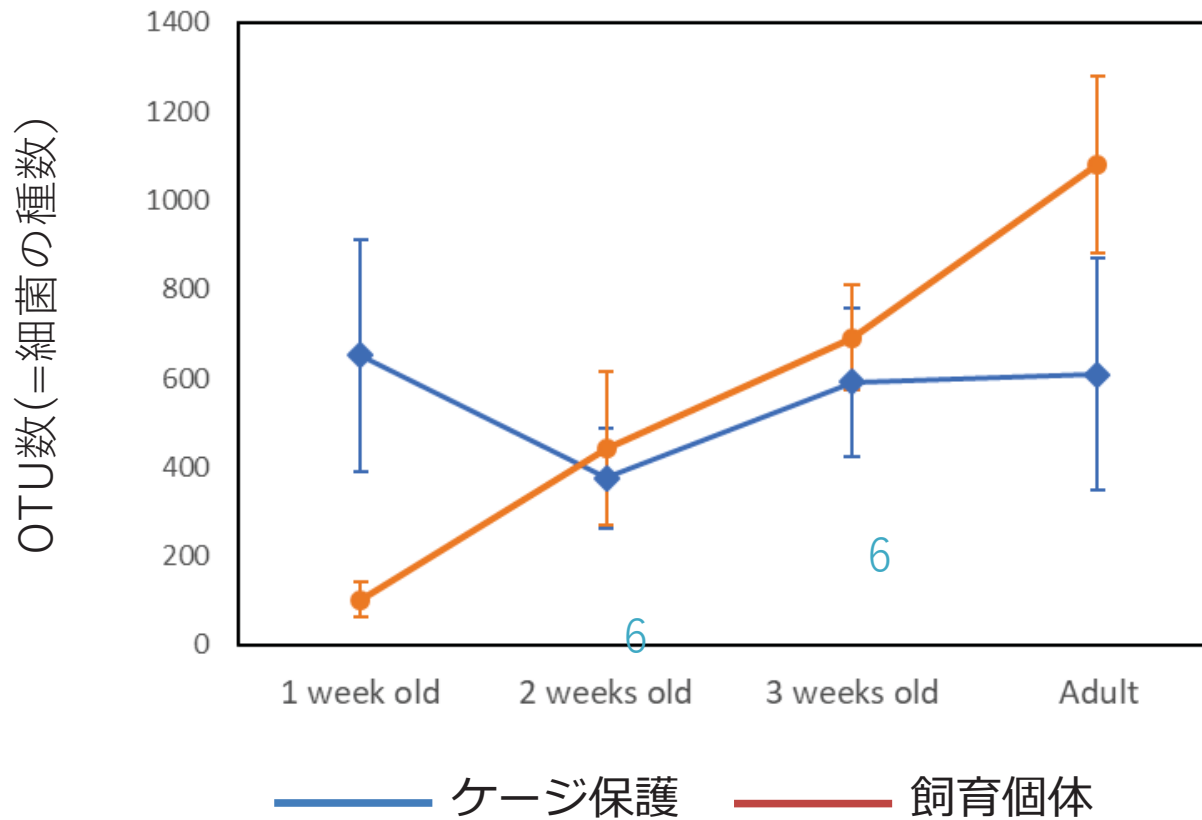




ケージ保護期間と雛による盲腸糞の食糞が観察された期間

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)

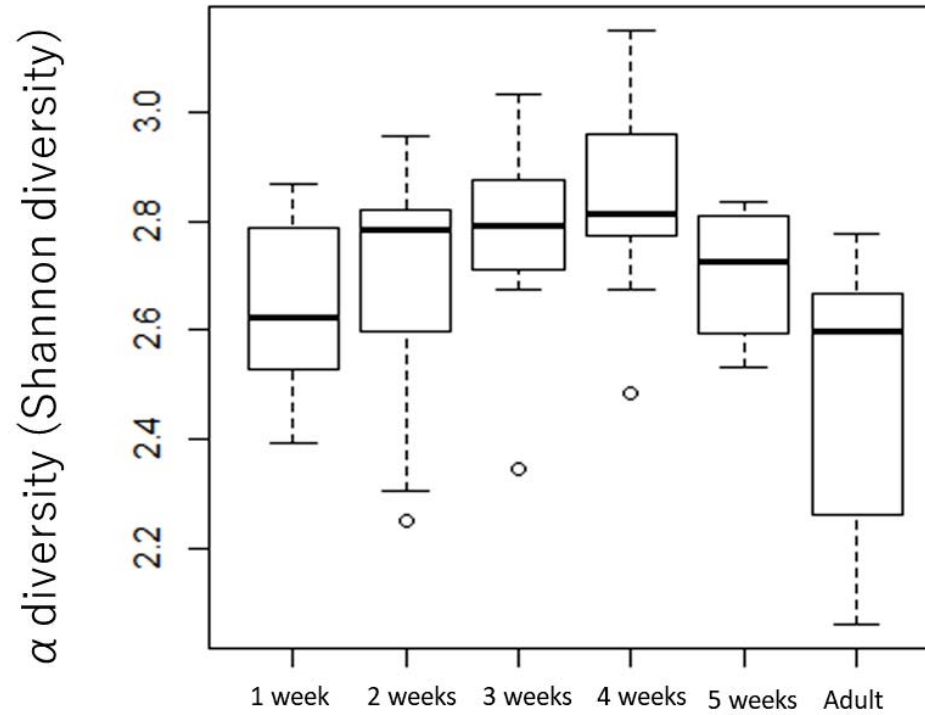


食糞の効果：発育当初から親と同じ細菌の定着

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

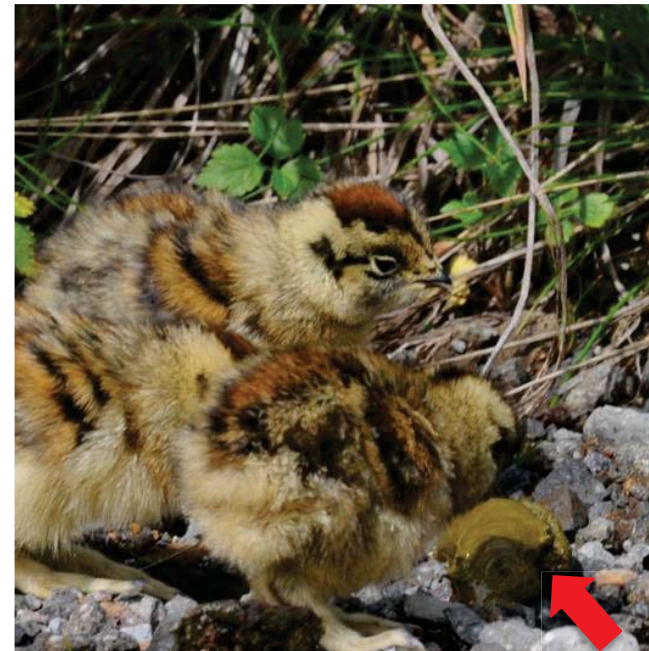
検出OTU数の変化とほぼ同じパターンを示した。

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

有毒難消化性植物(ユーカリ)をたべるコアラとライチョウの類似点



母親の盲腸糞を食べる子供



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



体重g

250

200

150

100

50

0



2016/2017年 横浜市繁殖センター飼育試験

菌投与・OTC投与

乳酸菌投与群
*L.apodemi*単菌

抗菌剤投与群

averageOTC

averageLB

Wild (Kitadake)

日齢

体重g

250.0

200.0

150.0

100.0

50.0

0.0



2016/2017年 那須どうぶつ王国飼育試験

菌投与・OTC投与

Average(OTC)

Average(LB)

日齢



ライチヨウ由来乳酸菌投与の感染症 予防効果(2016年2017年2園合計)

齢 等	乳酸菌 投与群	抗生物質 給与群	
供試雛個体数	16	17	
総 亡 個体数 率 %)	7 (43.8%)	12 (70.6%)	①
感染症 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%)	

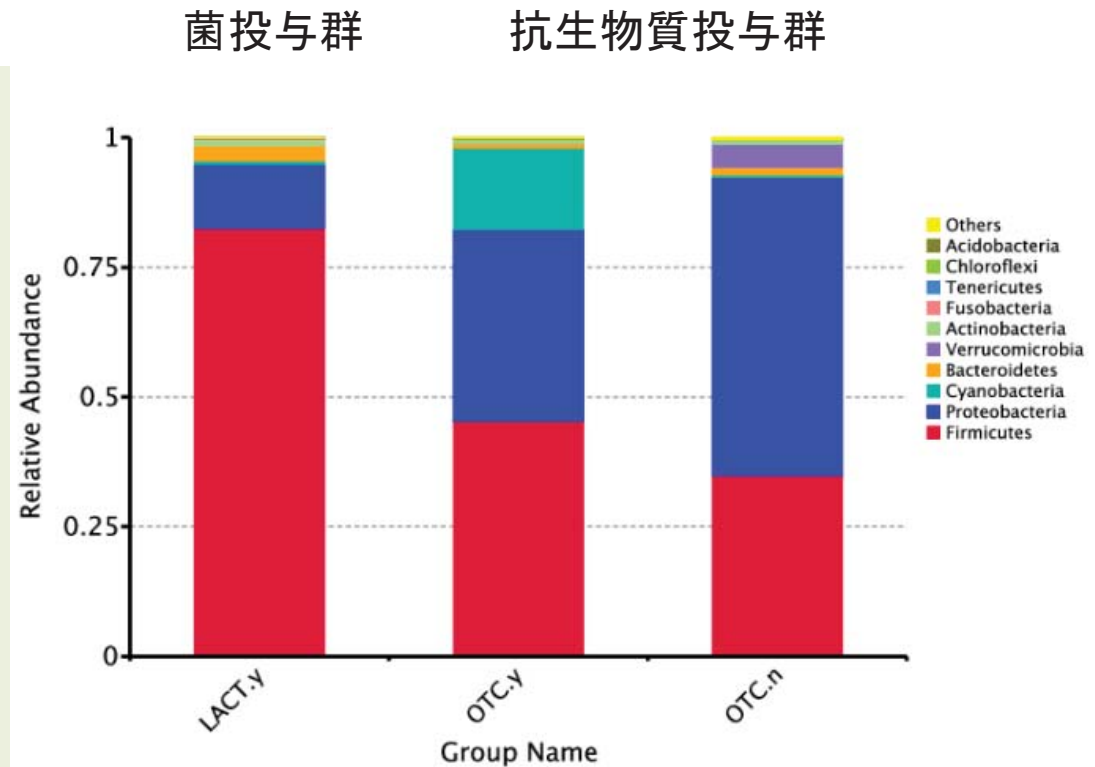
- ① 抗生物質給与群が約1.6倍高死亡率。感染症によ死亡は2.5倍
感染症 以外は、脚障害や趾腫瘍症（過体重疑い）、闘争によ死亡
- ② 抗生物質給与中の感染症 によ死亡 事故は少ない
- ③ 抗生物質給与終了以降、感染症 事故が著しく増加(免疫発達抑制が疑われる)

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



補助資料3-7参照

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

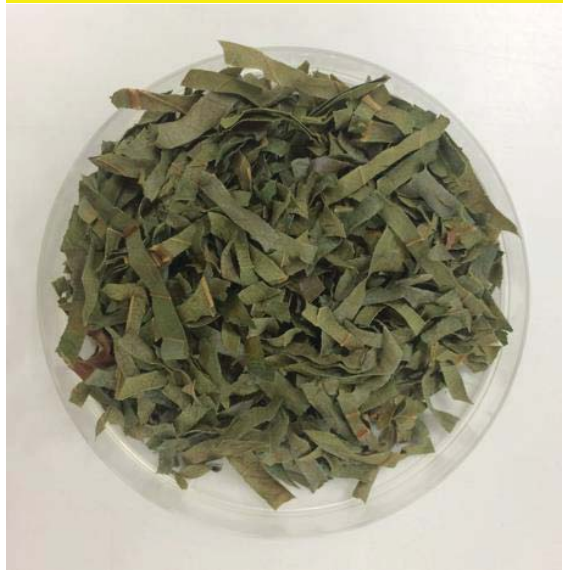
タンニン源を豊富に含む飼料の開発へ
高タンニン分解ライチョウ乳酸菌＋タンニン源

シンバイオティクスの概念

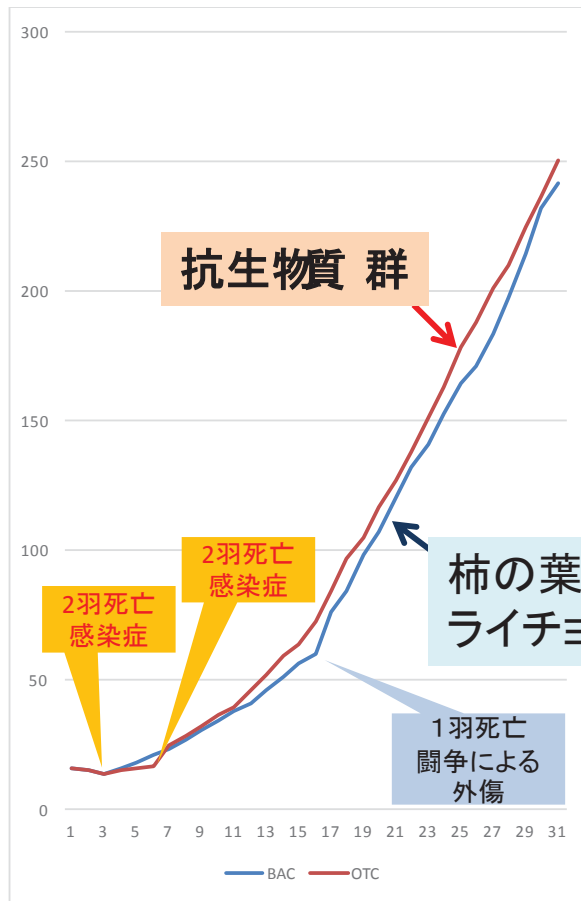
使用した野生ライチョウ細菌

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



ライチヨウ雛飼育試験結果 体重(g)

柿の葉混合飼料と野生ライチヨウ細菌の組み合わせ

OTC:抗菌剤給与群 6羽
BAC:野生ライチヨウ由来細菌群 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. apodemi*, ● = *S. gallolyticus*

柿の葉混合飼料+野生ライチヨウ細菌給与

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)

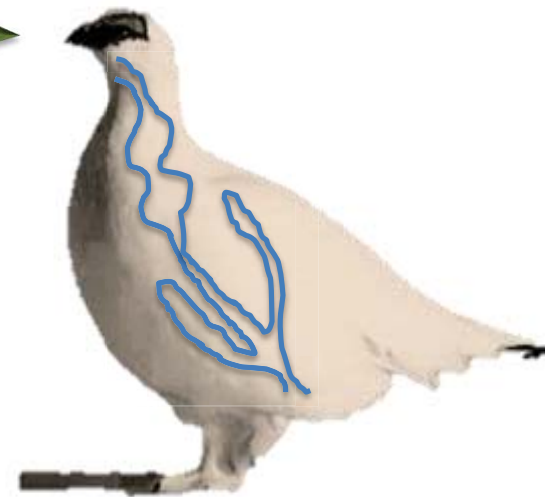
ニホンライチョウ域外保全
事業の進捗状況

- ✓ 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

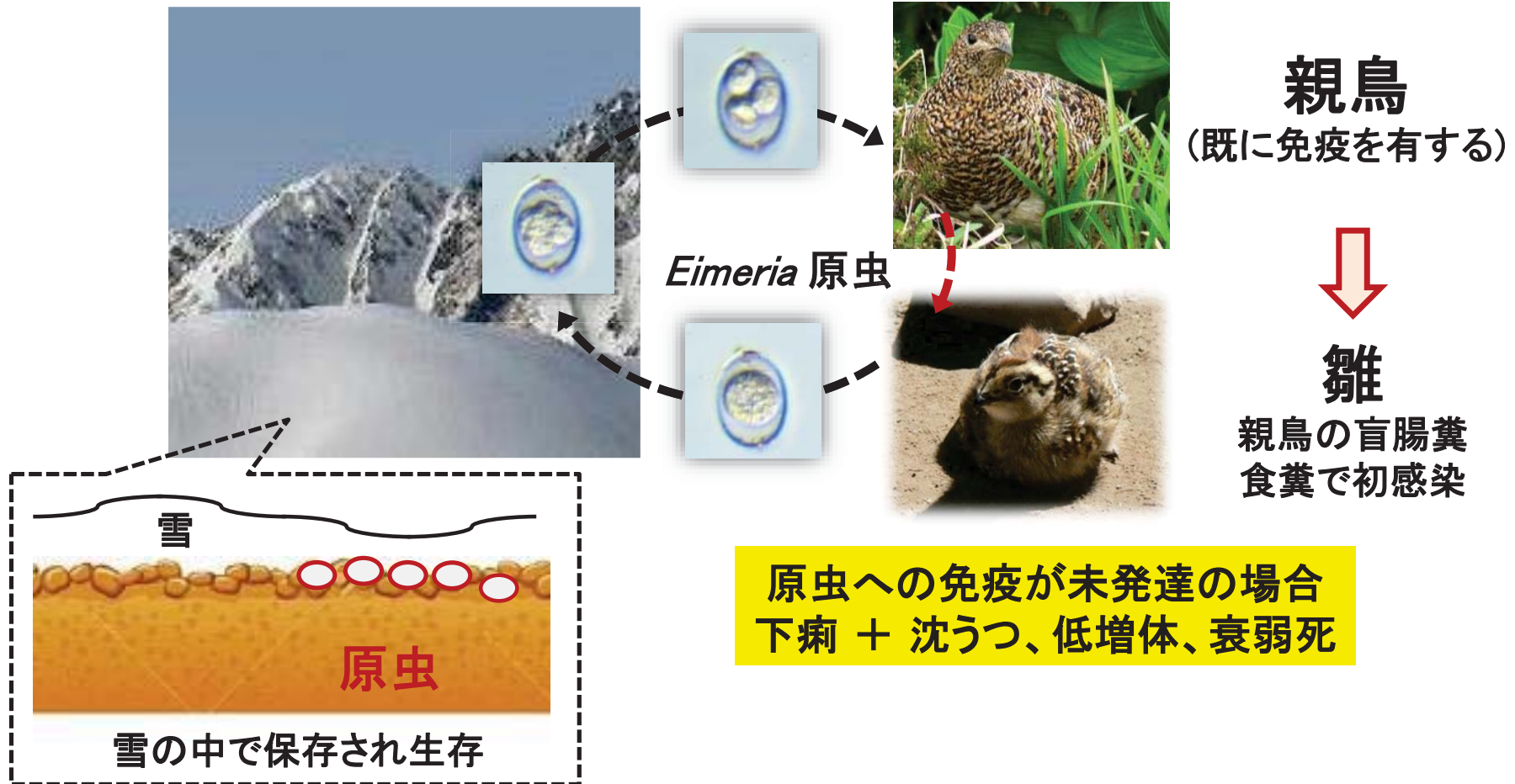
短期的目標と長期的目標

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。

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。

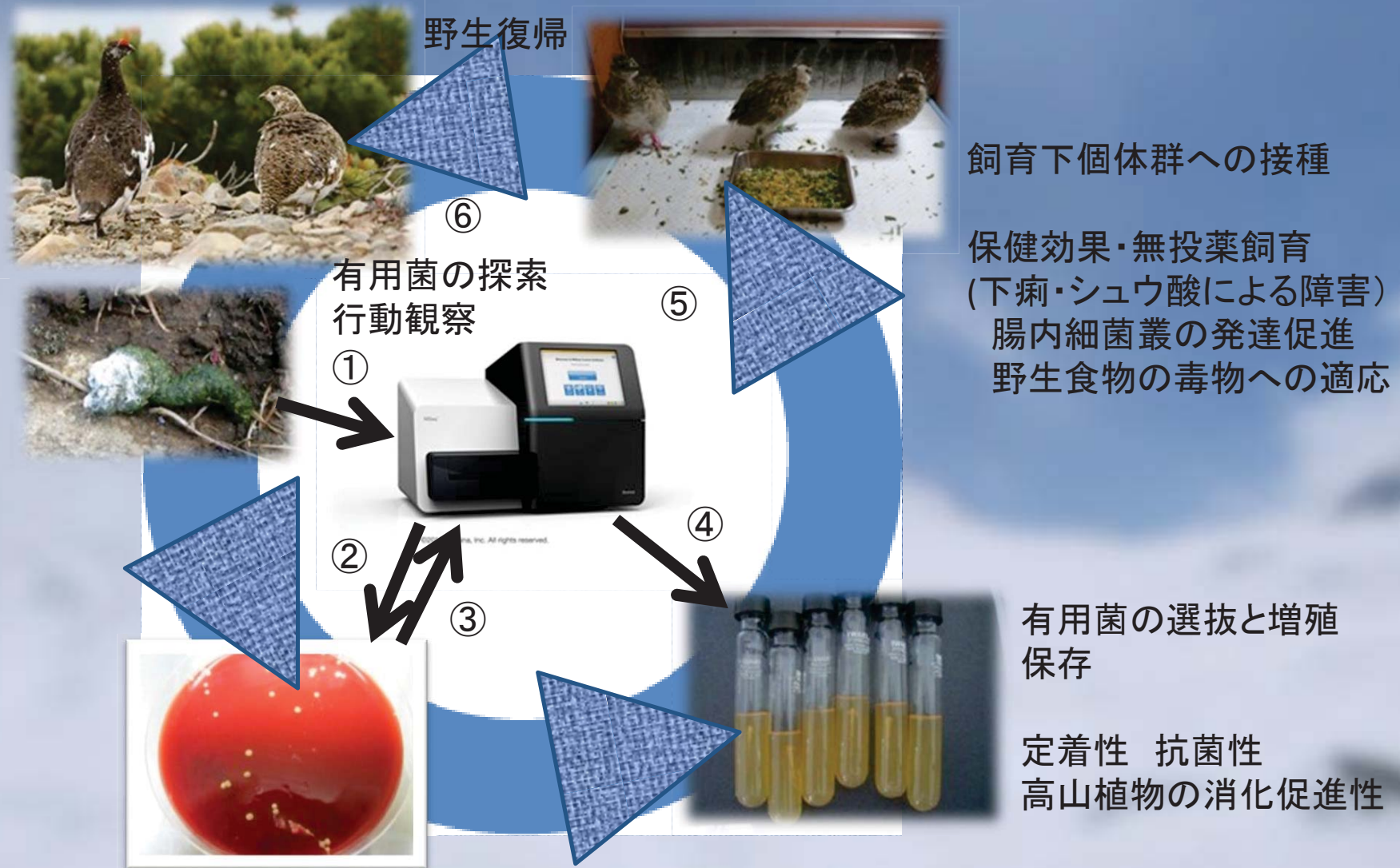


単純な糞便移植が不可能な理由 アイメリア原虫対策の必要性



- ・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

研究のストラテジー：域内保全と域外保全をつなぐ腸内細菌研究



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

補助資料0-2



採材場所
Sample collection site
in this study



ニホンライチョウ
生息場所
registered habitats

補助資料0-3



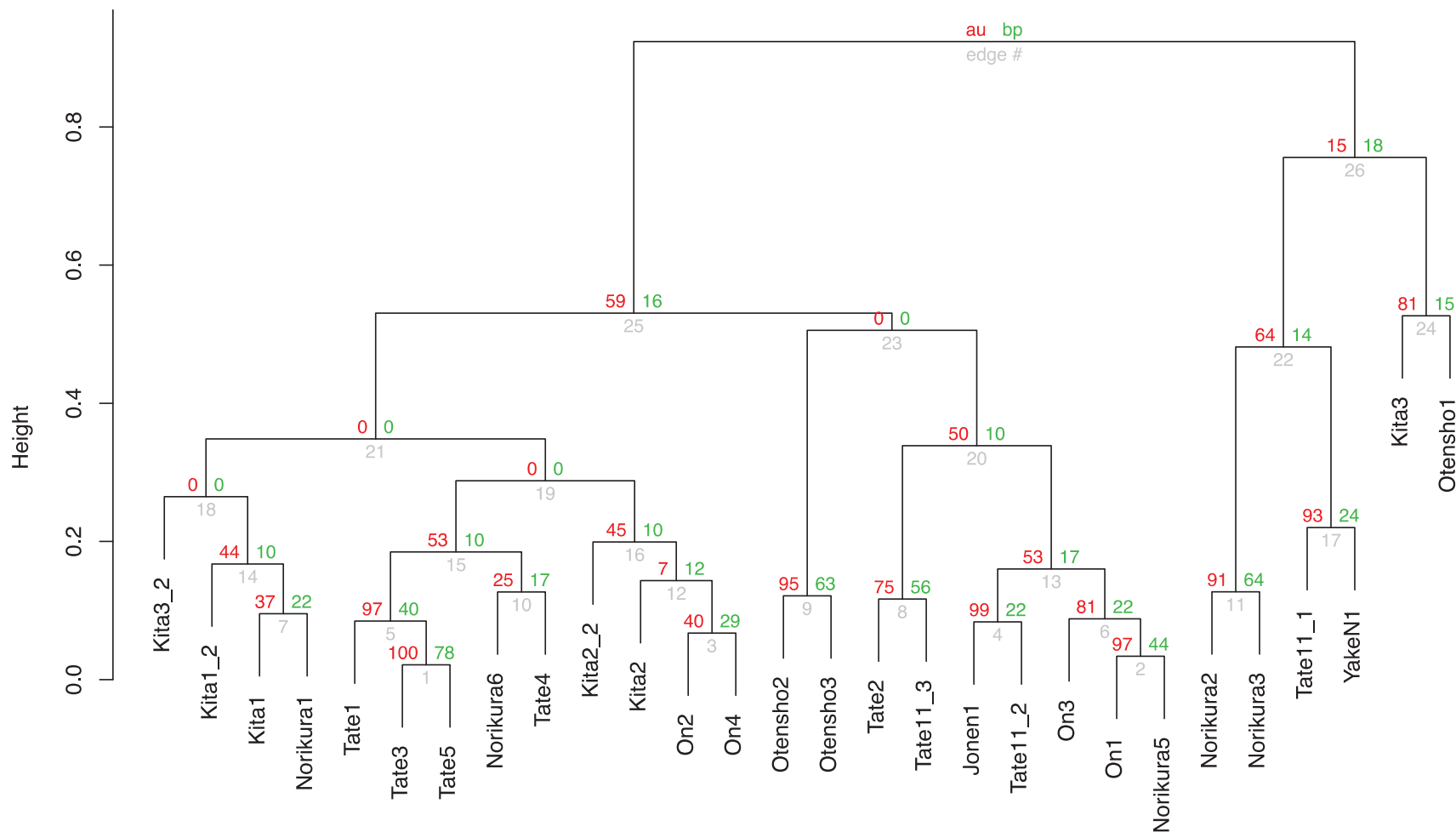
プロジェクト協力園
スバルバル-
ライチョウ 飼育



プロジェクト協力園
飼育ニホンライチョウ
試料提供

補助資料1-1

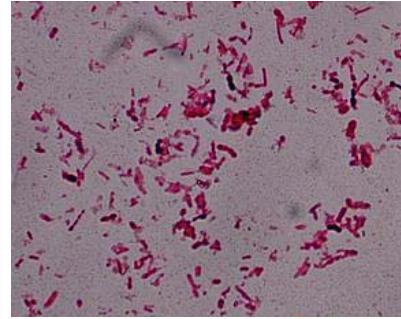
Cluster dendrogram with AU/BP values (%)



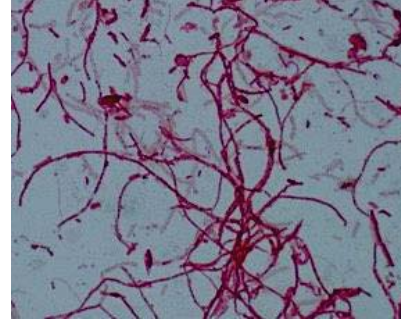
野生ライチョウ盲腸糞細菌16S rRNA遺伝子OTU分布によるクラスター解析
 (北岳、御岳、乗鞍岳、焼岳、大天井岳、常念岳、立山試料)

Distance: correlation
 Cluster method: complete

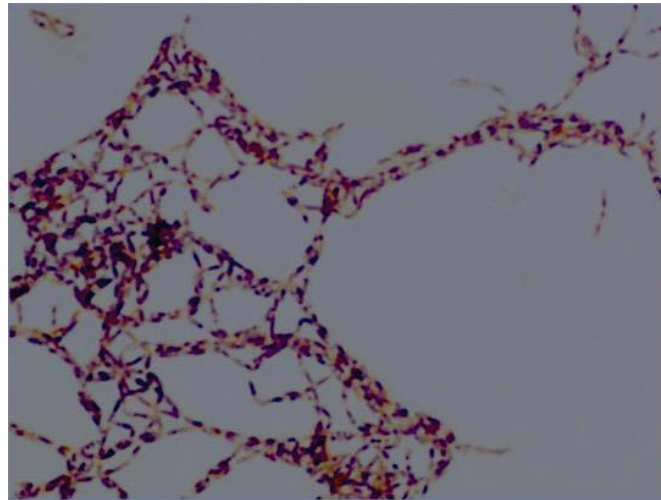
補助資料1-2



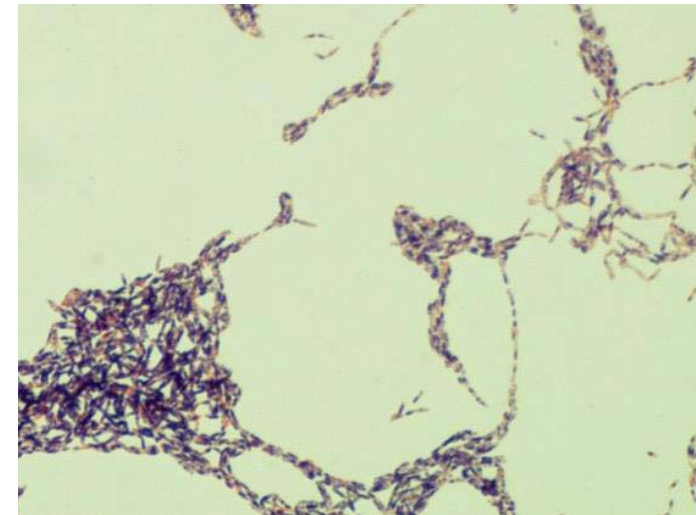
糞便スメア像
野生と飼育の違い



2016/5単離株



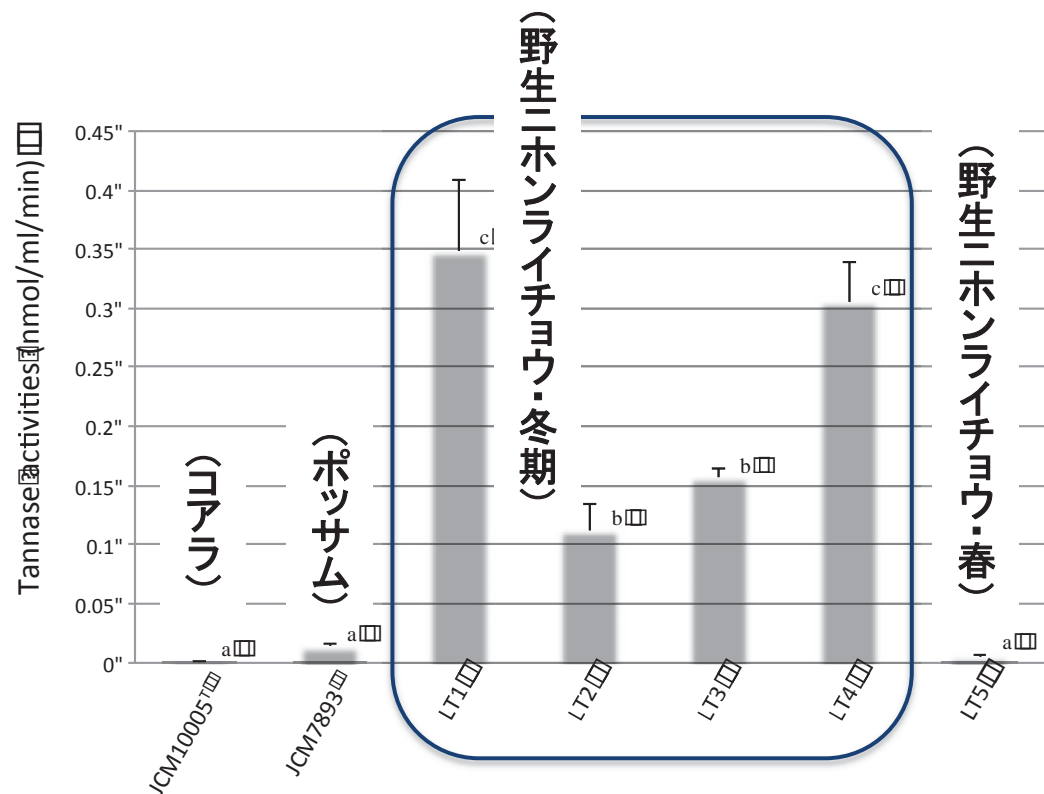
S-4-15 *Ruminococcus torques* / 一致度96.93%



S-4-16 *Coprococcus comes* / 92.4%

補助資料1-3

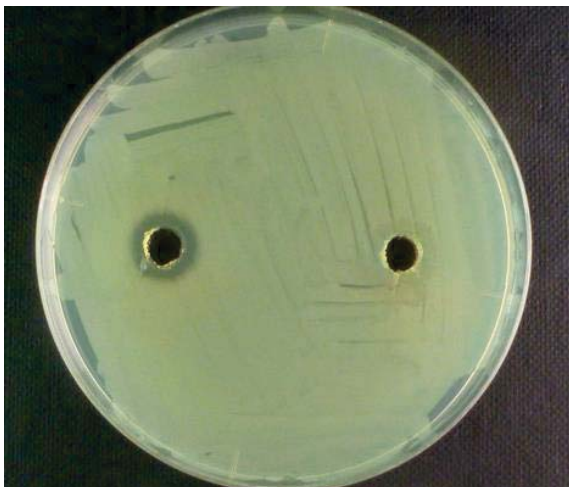
・ *Streptococcus gallolyticus*



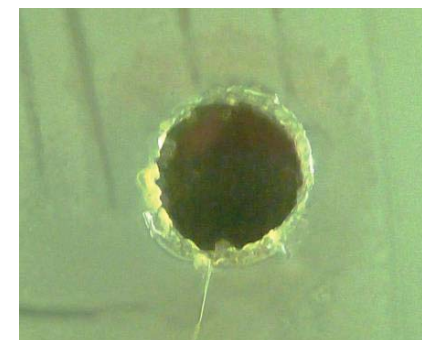
野生ニホンライチョウから分離した*Streptococcus gallolyticus*の高いタンナーゼ活性 (Tsuchida et al. 2016 JGAM 63(3):195)

補助資料1-4

- *Lactobacillus apodemi*



control



pH7.0

緑膿菌に対する抗菌活性試験

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

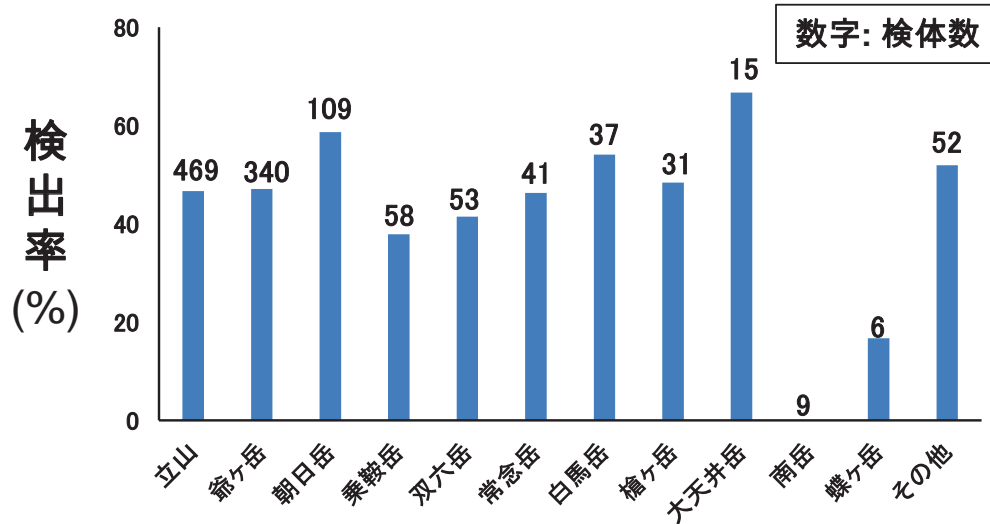
飼育スバルバルライチョウから分離された多剤耐性緑膿菌(6剤耐性)に対して、抗菌活性を示した。また、pH7.0に調整した培養上清にも抗菌活性が認められたため、抗菌ペプチドを有する可能性が示唆された。

→飼育ライチョウ用の生菌剤の主力として利用

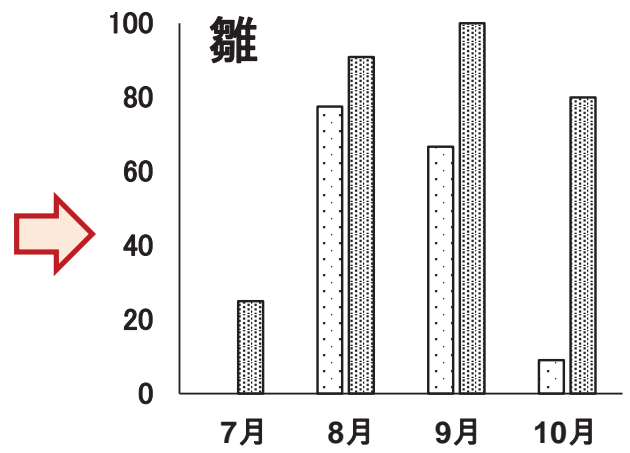
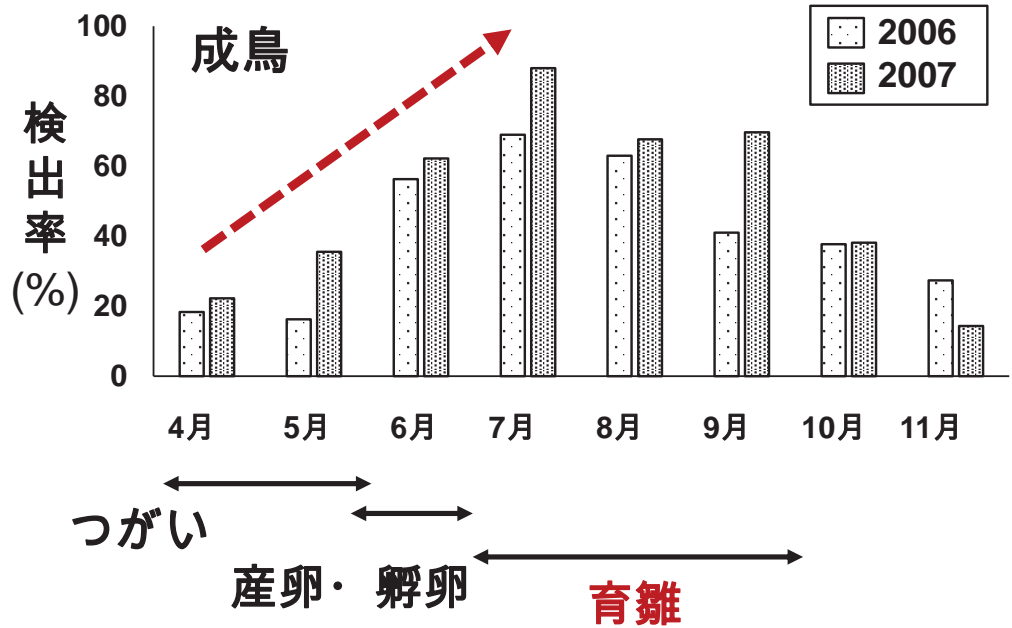
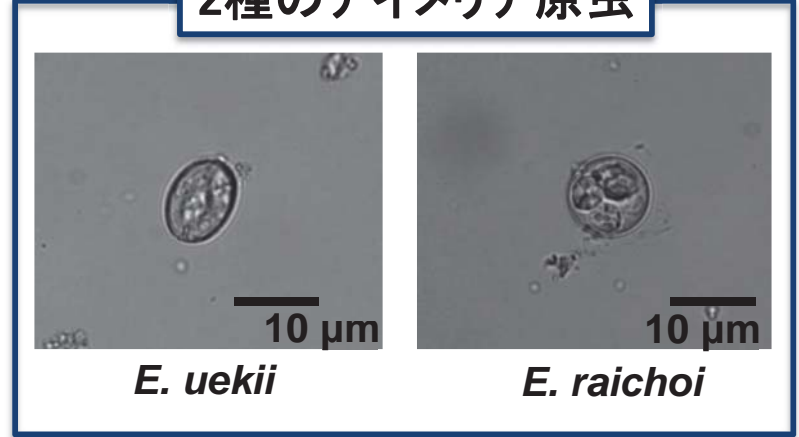
補助資料1-5 野外に広く存在するアイメリア原虫の存在

(Matsubayashi et al. 2018 IJP 7:134)

原虫感染率調査



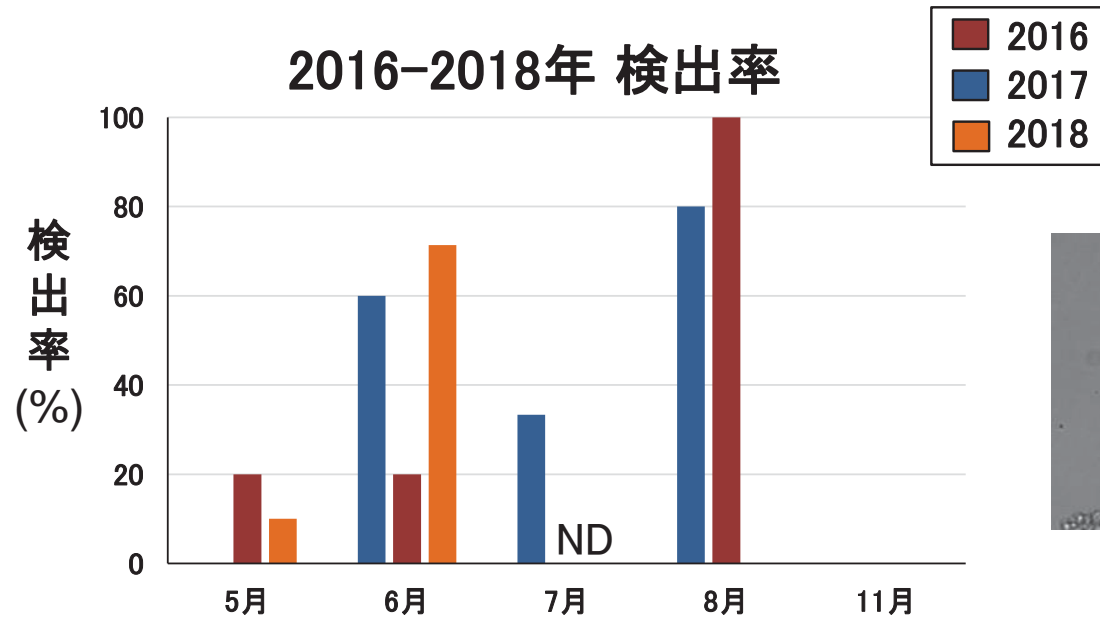
2種のアイメリア原虫



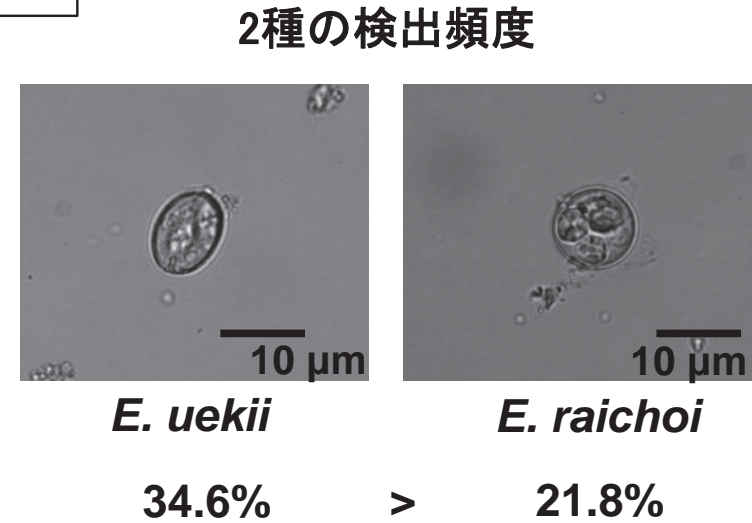
雛の糞便中のオーシスト数は成鳥の約10-16倍以上 (16万個/g)

(Matsubayashi et al., 2018)

補助資料1-6 近年の糞便検査結果 (2016-2018)



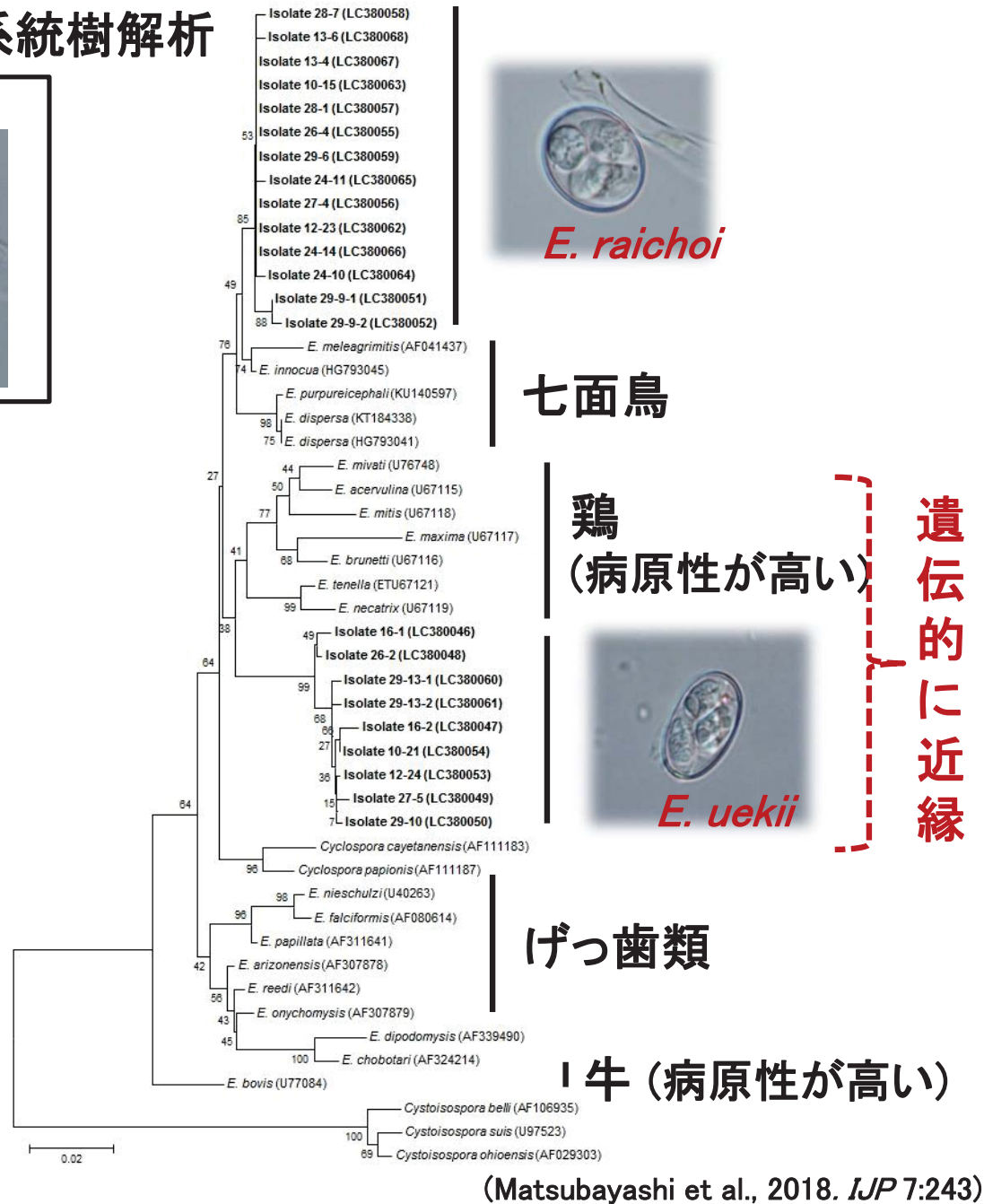
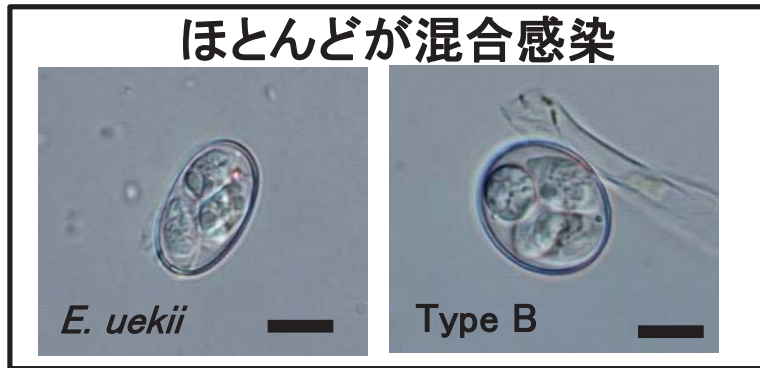
[採材場所;立山, 乗鞍岳, 北岳等]
(ND;採材できず)



- ▶ 近年もアイメリア原虫は高率に検出
- ▶ 夏季に検出率は上昇
- ▶ 1gあたりの原虫数
親鳥; 1,644 < 雛; 12,845
- ▶ *E. uekii* で検出率が高い

(Matsubayashi et al., 2018)

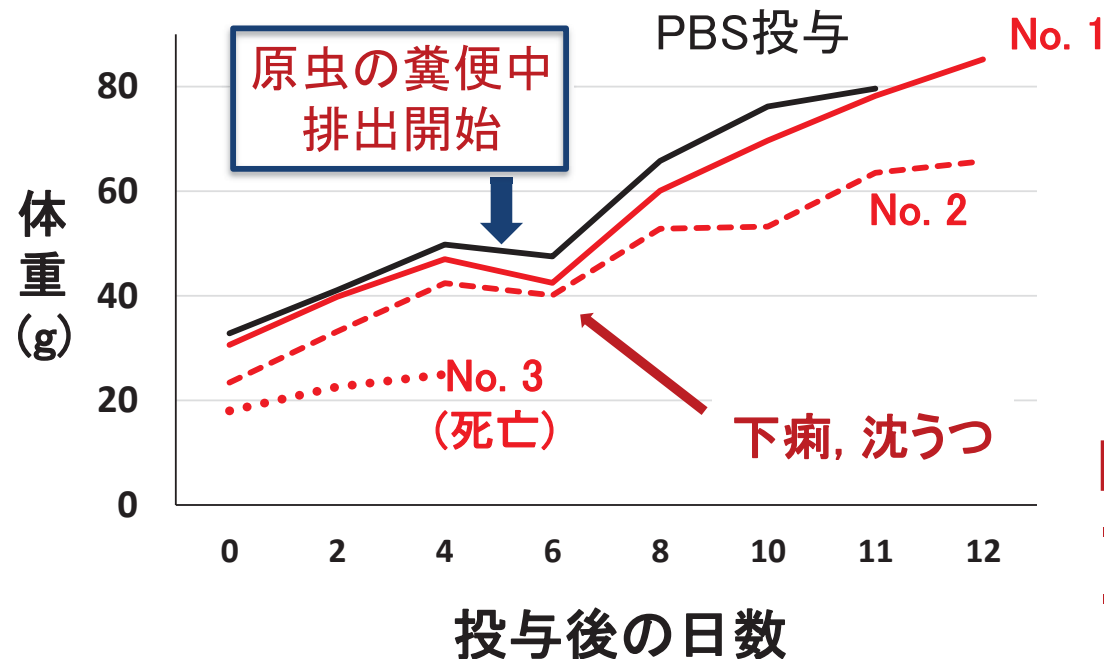
補助資料1-7 病態を裏づける系統樹解析



実験感染による病態解明

▶ 実験感染により見えてきた野外での弊害

→ スバルバルライチョウ (3-6日齢; 3羽)
E. uekii (2×10^4 個) + Type B (0.8×10^4 個)



【課題】

- ・Control 群の設定
- ・餌、温度などの飼育環境の検討

原虫感染により死亡、下痢、沈うつ症状が出ている可能性

補助資料2-1



クロウスゴ
Vaccinium ovalifolium



オヤマノエンドウ
Oxytropis japonica



イワツメクサ
Stellaria nipponica



ムカゴトラノオ
Bistorta vivipara



オンタデ
Aconogonon weyrichii

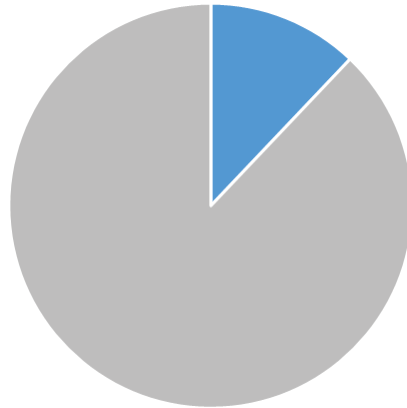
ケージ保護個体に給餌した主な餌植物

補助資料2-2



ケージ保護個体

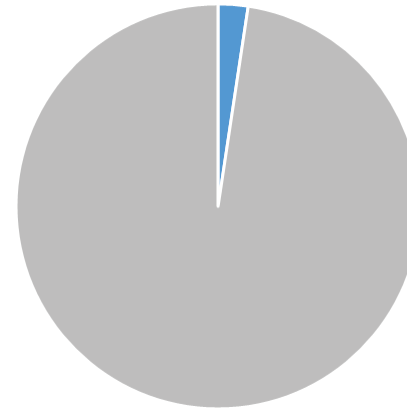
432 OTUs (12%)



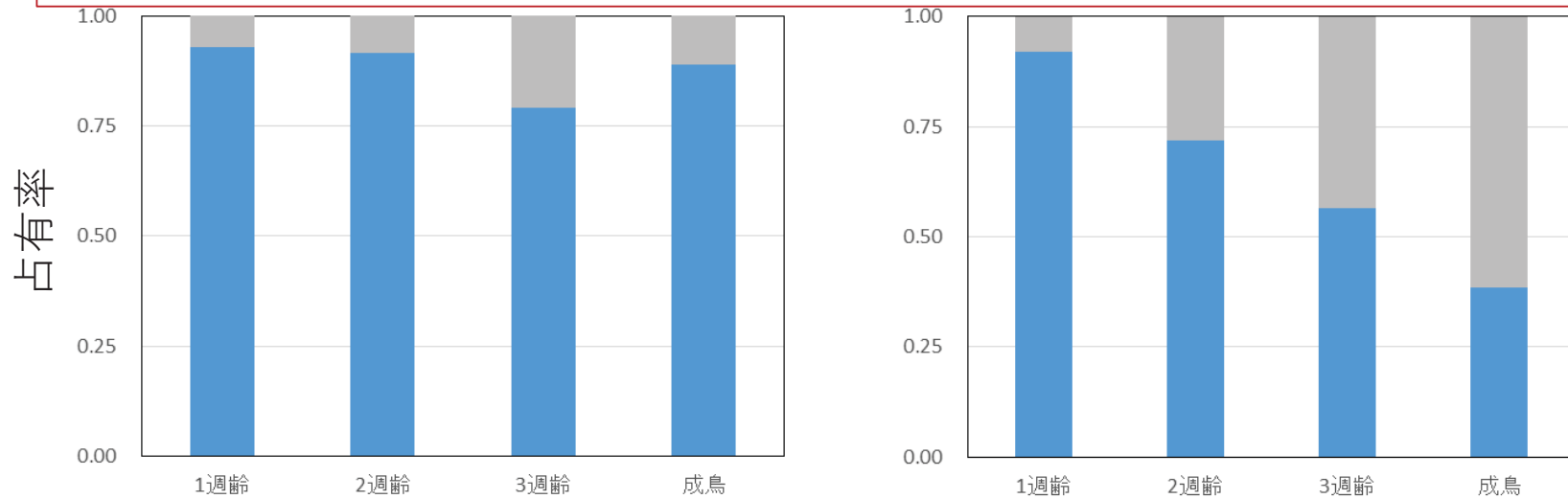
すべてのステージで
検出されたOTU

飼育個体

162 OTUs (2.3%)



野生個体では、すべての成長段階に共通な菌(ライチヨウ固有細菌)が菌叢の主要部分を占めていた。飼育個体は時間がたつにつれて様々な外来性細菌が定着



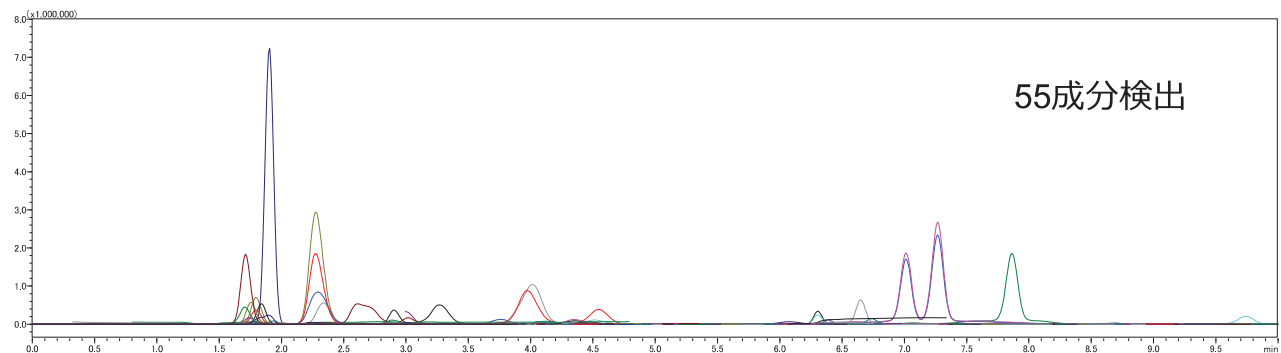
検出されたすべての菌に対する比率

メタボローム解析による野生ライチョウ腸内環境特性の把握と飼料開発

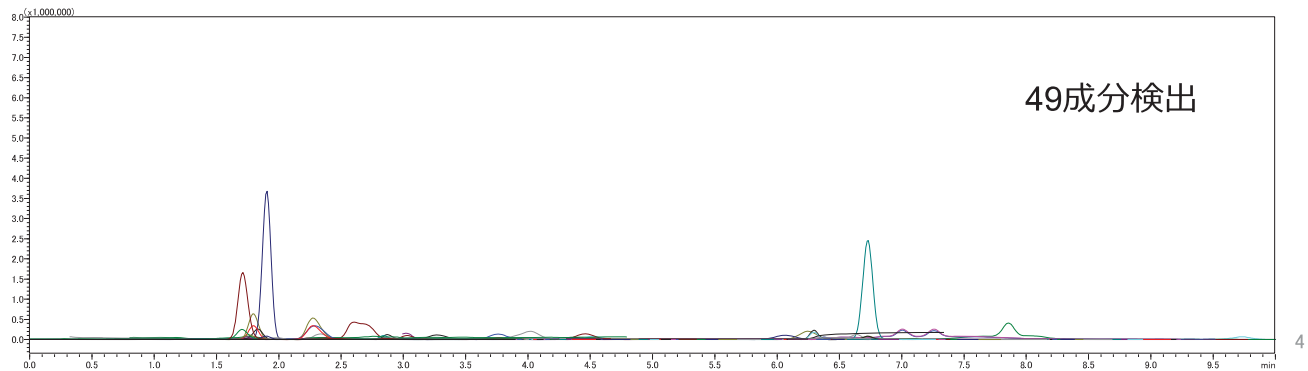
SHIMADZU

MRMクロマトグラム

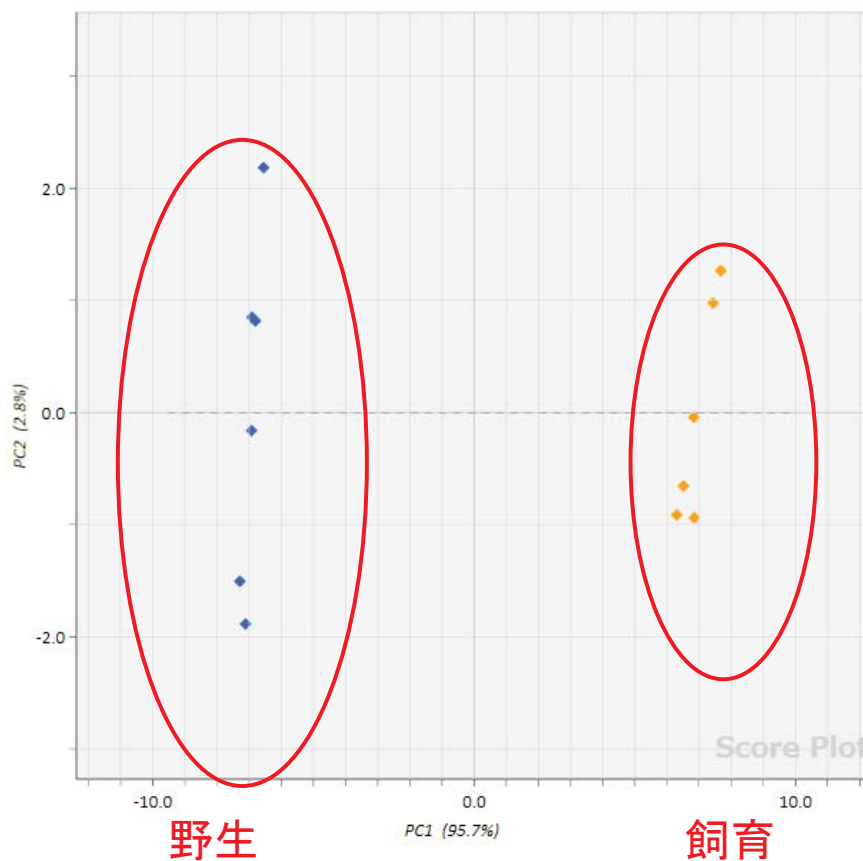
動物園ライチョウ糞便の抽出液



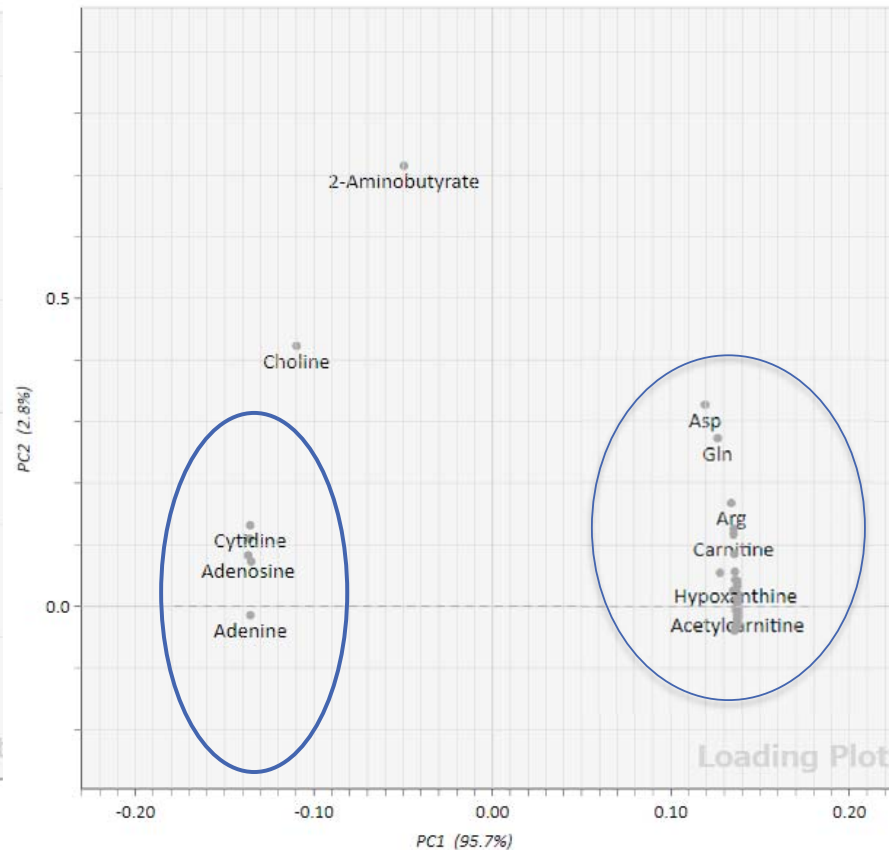
野生ライチョウ糞便の抽出液



補助資料3-2



スコアプロット



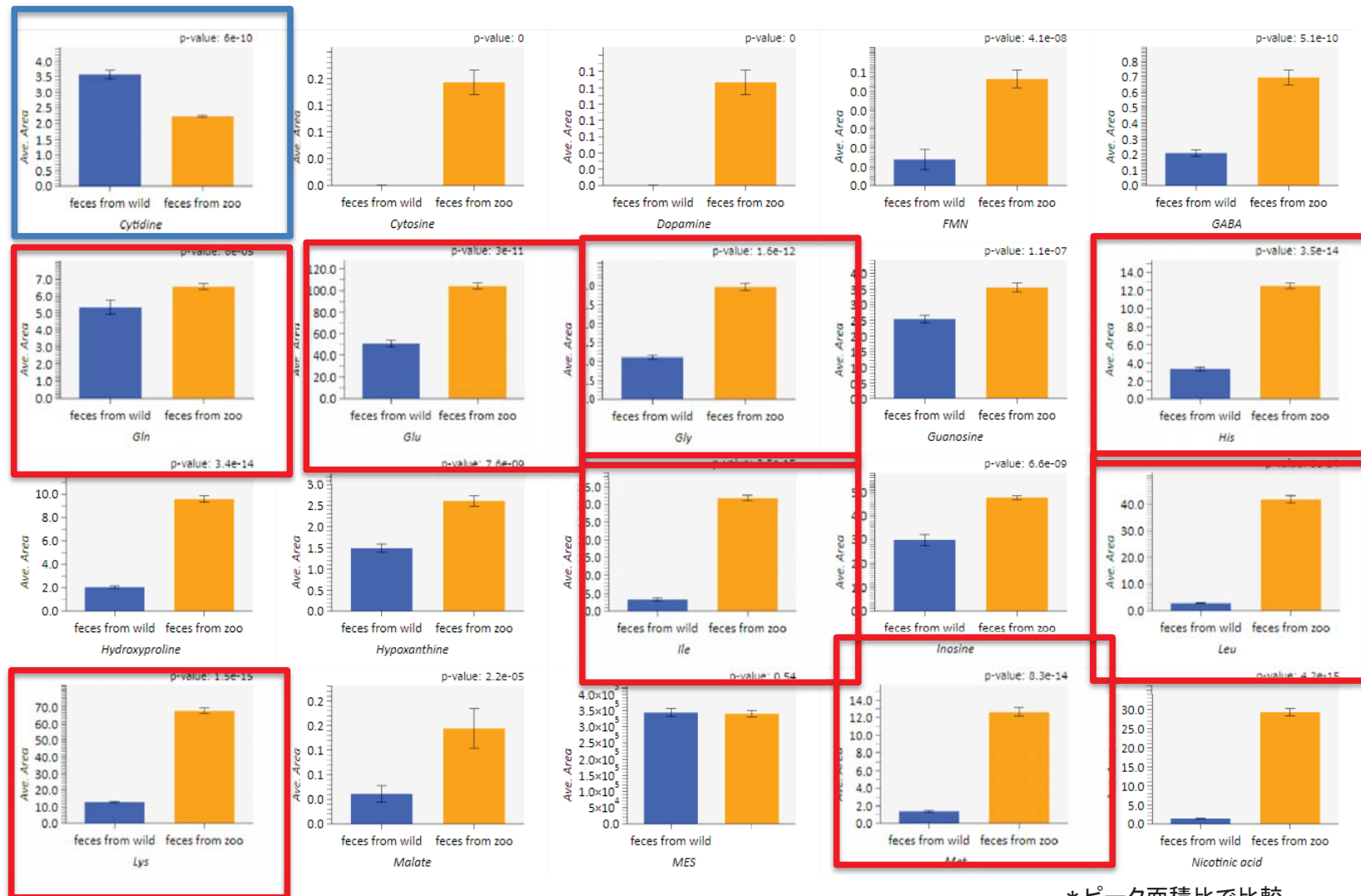
ローディングプロット

野生ライチョウと飼育ライチョウ糞便検出化学成分による分離量の大小が分離に影響した成分: 核酸塩基代謝物 遊離アミノ酸

補助資料3-3

ヒストグラムでの比較

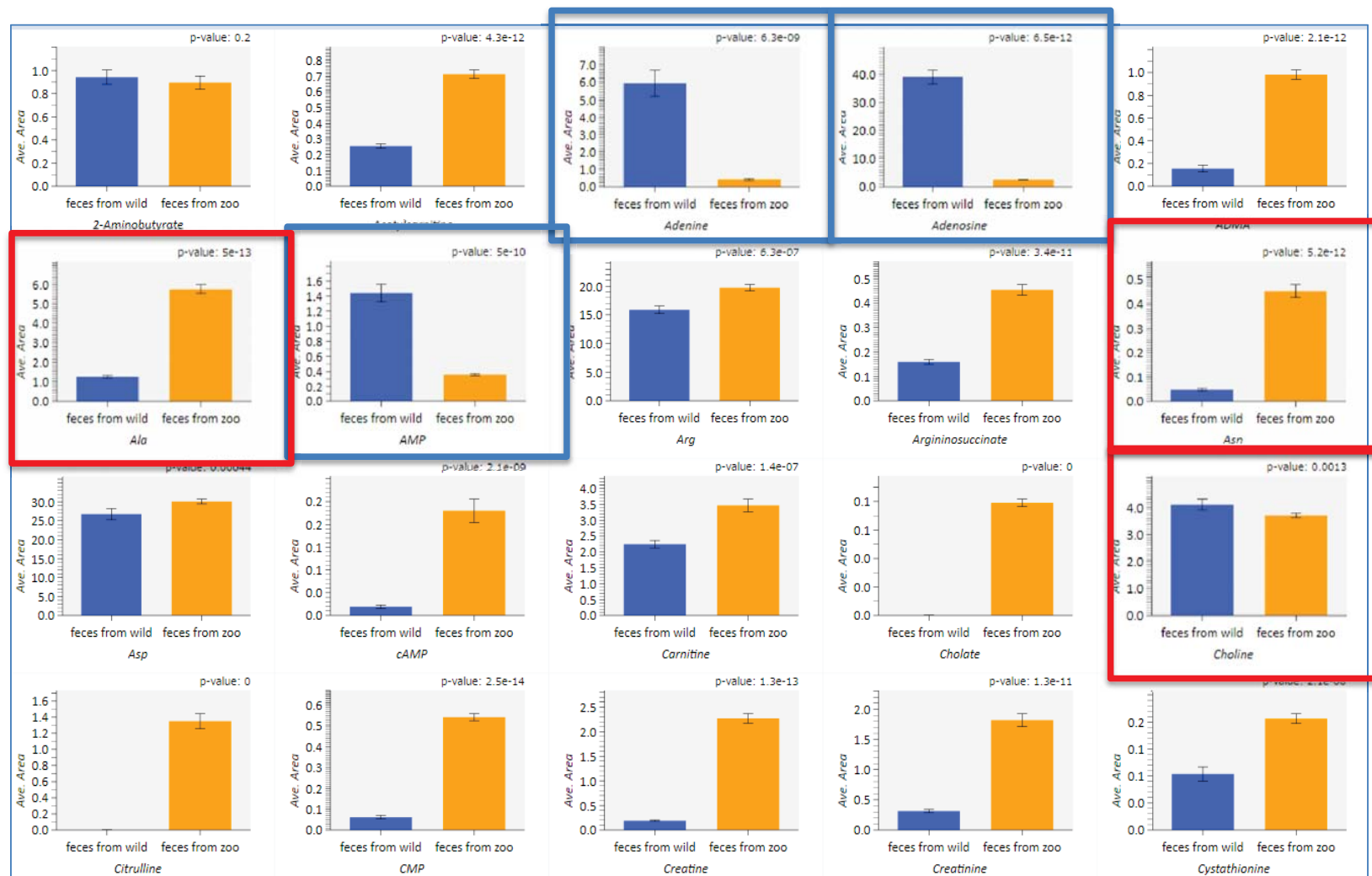
■ 野生 核酸代謝物が多い
 ■ 飼育 アミノ酸が多い



* ピーク面積比で比較

補助資料3-4

ヒストグラムでの比較

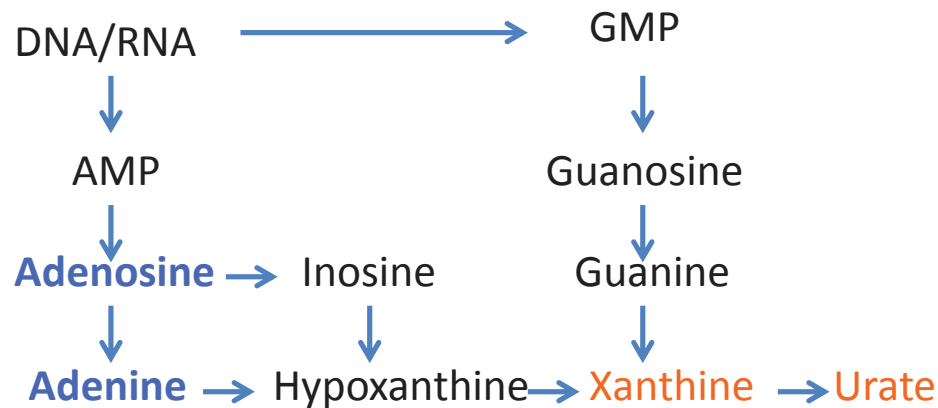


* ピーク面積比で比較

補助資料3-5

腸管内の核酸代謝の意義

草食動物が低タンパク質の飼料で飼育される場合、核酸からの窒素供給は重要
シロアリで証明済 (Potrikus & Breznak 1981)
腸内細菌(死菌体)由来の核酸供給量が相対的に多い



飼育
細菌による尿酸からのアミノ酸新規合成(低い) → 尿酸、キサントシンの相対的高濃度

野生(高) > 飼育(低)

飼育(高) > 野生(低)

野生
細菌による尿酸からのアミノ酸新規合成が盛ん
→ キサンチン 尿酸の相対的低濃度
→ 細菌の増殖 核酸由来窒素の再循環盛ん

補助資料3-6

	2016-2017 死亡事故率	2016-2017死亡日齢内訳		
		14日齢以前	14-28日齢	28日齢以降
野生ライチョウ由来腸内菌投与群	67%	30.0%	20.0%	50.0%
抗生物質(OTC)連投群	76%	38.5%	23.0%	38.5%

飼育ライチョウのエサ(組成比)

ニワトリ雛用飼料	7
ウサギ用ペレット飼料	3
小松菜	10
ミルワーム	1匹

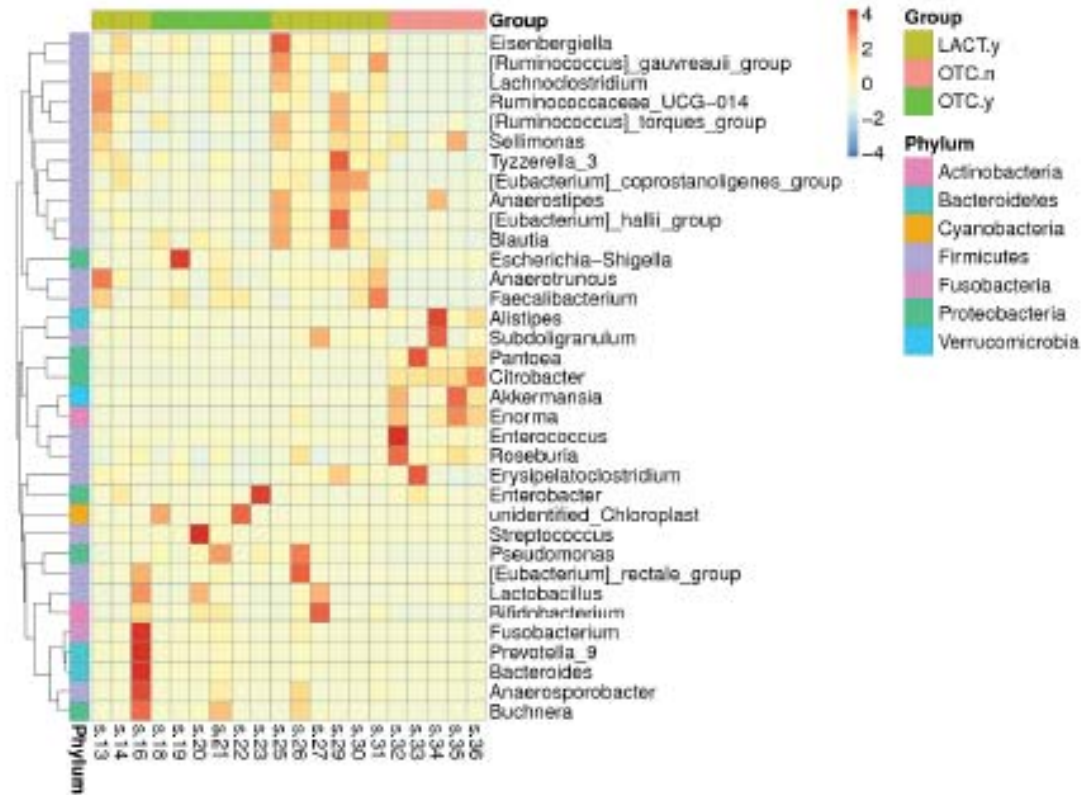
28日齢以降の脚障害多発

旺盛な体重増加が原因？

野生ライチョウの腸内にエサ由来アミノ酸少ない

ニワトリ用飼料による栄養過多？

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



ライチョウ乳酸菌投与群(LACTy)は、2パターンに分かれる
*Ruminococcus*と*Coprococcus*の多い群と*Prevotella*と*Bacteroides*の多い群

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)