

中央アルプスにおける ライチョウ野生復帰家族の移送前チェック項目（案）

1. 野生復帰させる家族のチェックの基本的な考え方

野生復帰させる家族のチェック項目については大きく以下の観点から行い、最終判断は各項目の結果を踏まえて域外、域内研究者や獣医師の助言に基づいて行う。→4.

①野生復帰させるライチョウ自身が高山で生きのびる能力を有するか

- 雌親が正常に子育てをしているか。→2. (1)
- 雛鳥が正常に身体の発達をしているか。→2. (2)
- 野生型に近い腸内細菌叢及び毒素分解能を有しているか。→2. (3)
- 野生ライチョウに特有のアイメリア原虫を保有しているか。→2. (4)

②野生復帰後に同種個体群及び高山環境に生息・生育する野生生物に影響があるか

- 野生復帰後に他のライチョウに伝播する病原性細菌やウイルス、寄生虫を有していないか。→3

2. 野生復帰させるライチョウ自身が高山で生きのびる能力を有するか

(1) 雌親が正常に子育てをしているか

<チェック項目>

- ・自身の作った巣で抱卵を行い、雛鳥を孵化させたか（抱卵放棄しないか）。
- ・野生個体と同じように抱雛や雛鳥の見張りといった雛鳥の世話を行うか（育雛放棄しないか）。

<抱卵放棄、育雛放棄した場合の対応>

○抱卵放棄

卵は人工孵卵に切り替える。これまで飼育個体では抱卵放棄後は孵化した雛鳥を見ても興味を示さず世話を行わなかった事例が観察されているため、雌親に孵化した雛鳥を再び世話させるのは難しい可能性がある。

孵化タイミングが他の野生復帰候補家族と近い場合は、専門家と協議し他の家族への雛付けも検討する。これまでの最大一服卵数が8卵であることから、1家族の雛数が8羽を超えないように雛付けを行う。雛付けについては孵化後2週間以内を目処に実施する。

雛付けが困難と判断された場合には放棄卵から孵化した雛鳥は人工飼育とし、次年度以降の野生復帰個体とするか、アイメリア原虫駆虫試験を行った後保険集団に導入することを検討する。野生復帰抱卵を放棄した雌親については翌年の野生復帰家族の雌親候補として継続飼育を行う。

○育雛放棄

雛鳥が孵化した後に雌親が育雛放棄した場合も野生復帰の対象から外す。育雛放棄した雌親は翌年の繁殖候補として継続飼育を行う。孵化後2週間を目安に雛鳥が8羽を超えない範囲で野生復帰候補家族への雛付けも検討する。雛鳥が2週齢以上で雛付けが困難な場合は、(3)で示す野生型の腸内細菌叢を確認する検査を行いながら次年度の野生復帰候補として継続飼育を行う。

＜雌親が抱卵中や育雛中に死亡した際の対応＞

雛鳥のみでの野生復帰は行わない。基本的な対応は上記項目に準拠する。

（２）雛鳥が正常に身体の発達をしているか

＜チェック項目＞

- ・行動中に他の雛鳥や雌親に遅れずについていくことができるか。
- ・ペローシスなどの先天的な異常やケガなど見られず、観察による行動異常が見られないか。

＜雛鳥に先天的な異常などが見られた場合の対応＞

歩行困難など野生復帰させても死亡してしまう可能性が高いと判断された個体は野生復帰させない。一方で、衰弱やケガなどにより家族から隔離した雛鳥は症状が改善すれば速やかに家族に戻す。しかしながら、これらの個体についても、野外でのケージ保護に耐えられないと判断した場合は野生復帰させない。

（３）野生型の腸内細菌に近い菌叢及び分解能を持っているか

＜チェック項目＞

- ・雛鳥及び雌親について、下記検査において野生個体に優占的な菌が継続的に検出できるか。
- ・雛鳥及び雌親の糞内に含まれる細菌叢が、高山植物及びそこに含まれる毒素等を一定程度分解できるか（整腸機能を要すると判断できるか）。

＜検査方法＞

①腸内細菌叢の遺伝子解析

ア. 腸内細菌叢全体の網羅解析（遺伝子解析）

イ. 野生個体の腸内における優占種の解析（Real-time PCR解析）

②高山植物を想定した各種の化合物を指標とした分解能試験

○検査時期及び回数

①－アの検査 雌親：4月（1回）

①－イと②の検査 雌親：4月、6月、7月上旬（雛鳥10日齢と合わせて）

雛鳥：7月上旬（雛鳥10日齢頃）

7月上旬の検査で陰性だった場合は雛鳥20日齢頃に再検査

＜検査についての考え方＞

ライチョウは主に高山植物を餌資源とし、野生の維管束植物の細胞構造を筋胃で物理的に摩砕したのち腺胃でタンパク質の消化を開始する。つづく小腸でタンパク質に加えてデンプンやスクロースなど可消化糖質を消化酵素で消化し、栄養素として吸収する。その後、盲腸との結合部で不消化物を圧縮して、微粒子をふくむ水溶液を絞り出し、盲腸に送達する。盲腸では、嫌気性細菌の働きで、繊維成分等の不消化物の発酵分解を進める。この発酵作用によって発生した酢酸やプロピオン酸などの短鎖脂肪酸を栄養素として吸収するほか、細菌が合成するアミノ酸も吸収する。ライチョウが食べる各種の高山植物からは毒素や消化を阻害する物質も同時に腸管内に排出されるため、これらの化合物を分解する特有の腸内細菌叢を有しており、この細菌叢がないと野外で長期間生存することは不可能とされている。

一方で、これらの化合物はアイメリア原虫や高山植物を常食しない動物の腸内細菌の増殖阻害物質としても作用することが知られており、高山植物とライチョウ固有の腸内

細菌の組み合わせによる整腸作用があると考えられている。とくに腸内細菌では、これまで発見されていない固有種の存在も確認されていることから、高山植物-ライチョウ-腸内細菌の三者に特別な関係、共生関係があると考えられる。

また、このライチョウ固有の腸内細菌叢は孵化後数日の雛鳥が雌親の盲腸糞を食糞することで定着し、母子間で継承されることが知られている。このため、野生復帰させる家族については野生個体由来の腸内細菌叢を受け継いでおく必要がある。

①腸内細菌叢の遺伝子解析

腸内細菌叢の遺伝子解析を用いた網羅解析は、細菌類の種数が極めて多い上に、また全ての種について分類や機能が解明されている状況にない。また、技術的にも網羅解析には時間を要するため、孵化から野生復帰までの約1か月間の間に検査結果を出すのは困難となる。一方で、飼育下で自然繁殖により家族を形成した雌親と雛鳥と一緒に生活させることで食糞行動はほぼ確実とみられることから、本事業では雌親候補個体の盲腸糞の菌叢解析を事前に実施することを基本とする。

また、ライチョウ野生個体の腸内細菌叢に特異的な種または存在比の多い種で特異的プライマー設計を可能とする遺伝子配列情報が明らか *Olsenella*, *Bifidobacterium*, *Megasphaera* 等については、Real-time PCR 検査により、迅速な判定が可能となる。このため、本遺伝子解析では、4月に雌親による菌叢の網羅解析（①-ア）を実施し、このデータを参考としつつ、雌親については4～7月に3回、雛鳥については7月に1回の主要細菌種の Real-time PCR 検査（①-イ）を実施し、主要細菌種の有無をライチョウの腸内細菌叢の指標として検査評価を実施する。

②各種化合物を指標とした分解能試験

腸内細菌叢が持つ分解能の維持について客観的に評価するために、高山植物に含まれる二次代謝産物のうち、以下の毒素等化合物の分解を指標とした培養試験を実施する。これは、Tsuchida et al. (2017)にて野生ライチョウの糞便から得られた菌叢ではロドデノール分解能を有するが、飼育下のスバルライチョウでは、分解能がなかった結果を受けて実施するものである。また、これらの化合物には分子構造から強い界面活性作用が想定されるものが多く、界面活性作用による溶菌のほか、繊維分解に必須の細菌菌体の繊維表面への接着を阻害することによる繊維発酵分解の抑制が予想される。野生ライチョウ固有の腸内細菌は、これらの高山植物二次代謝産物の悪影響を受けないものが選択された状態にあると考えられるため、飼育によって変遷した腸内菌叢が、どの程度、繊維消化に悪影響を受けているかを判定する。

・試験対象化合物候補は、以下とする。なお、最終的な化合物の選定は5月中旬までに実施する予備試験の結果から判断する。

→ロドデノール：

定量試験法確立済み。シャクナゲ由来の二次代謝産物。細胞障害性がある。

→タンニン：

典型的な摂食忌避物質。強い苦味を呈するほか、タンパク質と結合して、消化抵抗性にするなどタンパク質消化阻害がある。コアアラ、アカネズミなど高タンニン食の動物では、タンニン高度分解細菌が知られており、野生ライチョウからはこれらの動物由来の細菌よりもはるかにタンニンを分解する酵素であるタンナーゼ活性の高い腸内細菌が分離できている(Tsuchida et al 2017)。

→サリチル酸メチル：

高山植物に含まれる。細胞障害性が強い化合物。これらに関しては、分子そのものを

分解する活性を測定。

→オレアノール酸、ウルソール酸、 β -シトステロール：

ライチョウのエサとなる高山植物に著量に含まれる二次代謝産物。ステロール骨格をもち強い界面活性作用がある。量が多いと腸の粘膜上皮を傷害するためライチョウにとっても毒素となるが、少量でも界面活性作用によって繊維分解を阻害する可能性が高い。これらに関しては、食物繊維消化への悪影響を評価する。

・醸造発酵工学モデル から、初発微生物数を 10%まで希釈しても、得られる発酵産物量は、25%以上あることが確認されている。またおなじ醸造発酵工学モデル 1 から、餌資源の資質によって分解能は 10 日程度で十分に回復する見込みがある。翻して、野生個体に比して、野生復帰候補個体の短鎖脂肪酸生産量が 25%以上を保っていれば、本検査としてはクリアとする。

化合物の分解能試験は繁殖を予定している雌親に対しては 4～7 月に 3 回実施する。また、雛鳥が孵化した後は 10 日齢前後で雌親及び雛鳥群について別々に試験を実施する。

＜野生個体の糞便を用いた腸内細菌叢の補強＞

現在、飼育下における野生家族個体では既に腸内細菌叢に变化が生じていることが判明しているため、4 月以降の検査結果にかかわらず、5 月初旬以降に野生個体の糞便を入手し、アイメリア原虫の殺処理もしくは除去処理を行った野生個体の糞便の投与による腸内細菌叢の補強を行う。糞便投与については、凍結によりアイメリア原虫の殺処理を行った糞便の凍結乾燥粉末を餌に振りかける方法、もしくは糞便を希釈し特殊なフィルターを透過させることでアイメリア原虫を物理的に除去した液を餌（ハニーワームのような虫餌を想定）に注入する方法で行う。

基本的には雛鳥が孵化までに雌親の腸内細菌叢をできるだけ野生状態個体に近づけ、食糞を通して介して雛鳥が引き継ぐことを試みる。そのため、糞便移植の実施時期は、5 月初旬から 6 月下旬までに 3 回程度と糞便の投与を実施する。しかしながら、孵化後雛鳥 10 日齢の段階における雛鳥の検査で上記検査をクリアできなかった場合には、雛に対して野生個体の糞便による補強を行った上で 20 日齢前後に再試験を行う。

＜試験結果の判断＞

①及び②の検査結果については、飼育下という特殊環境に野生生物を置く関係で、時間と共に漸次的に移行していく可能性があるため、研究者及び獣医師等の専門家の助言に基づく総合評価の検討を実施する。

＜今後の技術開発＞

本検査については、技術開発途上の状況といえるため、次年度以降の検査精度を向上させるため、今年度の検査とは別に親鳥及び雛鳥の盲腸糞の採取を行って綿密な解析を実施する。

（４）アイメリア原虫

＜チェック項目＞

・個体がアイメリア原虫を保有しているかどうかもしくは過去に感染したことがあるかどうか。

＜検査方法＞

- ・直腸糞に含まれるアイメリア原虫オーシスト¹の排泄量検査

野生復帰候補雄及び雌親： 4月以降 1回/2週、雛鳥孵化後は 1回/週
雛鳥： 1回/週

<検査についての考え方>

野生ライチョウの消化管内には種特異的なアイメリア原虫2種 (*Eimeria uekii*, *E. raichoi*) が寄生しており、雛鳥の時期にほとんどの個体が感染することが明らかになっている。このアイメリア原虫は消化管の細胞内に入って増殖することが知られており、重度感染した場合は消化管の細胞が著しく損傷して死亡することもある。一方で、多くの野生ライチョウは雛鳥の時期の感染を通してアイメリア原虫に対する抵抗性を獲得していると考えられており、野外のライチョウ個体群の生息地では既にアイメリア原虫が確認されていることから、野生復帰個体は放鳥前にこのアイメリア原虫の感染歴を通じて抵抗性を獲得しておく必要があると考えられている。

なお、令和3年度に導入した2家族についてはどちらもアイメリア原虫の排泄が確認されており既にアイメリア原虫に対する抵抗性を獲得していると考えられているが、令和4年度に生まれる雛鳥にもアイメリア原虫を暴露させる必要がある。アイメリア原虫は食糞や雌親との接触を介して雛鳥の経口摂取が行われるため、野生復帰候補となる雌親についてはアイメリア原虫を保持した状態で子育てを始めることが望ましい。

このため、飼育下導入後に定期的実施されている、アイメリア原虫のオーシスト排泄量検査を、4月以降は1回/2週のペースで継続する。

<オーシスト排泄量の検査における陰転時の対応>

生まれてくる雛に対し親からアイメリア原虫を伝播させることを念頭に置き、定期的なモニタリング調査において野生復帰候補の雌親からオーシストの排泄が検出されず、陰転が疑われた場合は検査頻度を1-2日/1回にする。14日間連続でオーシストの排泄が検出されなかった場合は、アイメリア原虫が陰転したと判断し(以下、陰転個体とする)、過去にスバルライチョウの経口摂取試験で健康被害が見られなかった100個-1000個/g程度のアイメリア原虫のオーシストを経口摂取させる。経口摂取については腸内細菌同様、餌に添加することで個体を捕獲及び保定することなく摂取させる。一方で、野生復帰候補の雄個体についてはオーシストの排泄が見られなくなったとしても既にアイメリア原虫に対する抵抗性を有すると考えられるため、追加でのオーシスト摂取は実施しない。

<オーシスト排泄が多かった際の対応>

治療介入についてオーシスト排泄量の上限は設定せず、下痢、衰弱、沈鬱などの症状が出なければ投薬介入は実施しないこととする。

3. 野生復帰させた後の高山環境や野生生物に影響があるかどうか

(1) 病原性ウイルス及び細菌について

<チェック項目>

- ①鳥インフルエンザウイルス
- ②大腸菌 0-78、0-161、0-1、0-2
- ③サルモネラ菌

¹ 原虫の生活環におけるステージの1つ。接合子の周囲に被膜、被殻が形成されたもの。アイメリア原虫はオーシストの形で糞と共に排泄される。糞1g当たりのオーシストの数が体内における感染状況の指標となる。

④多剤耐性緑膿菌

＜検査方法＞

① 鳥インフルエンザ簡易検査キット

野生復帰候補雄及び雌親： 移送前 1 週間前後 1 回のみ

②～④ 糞便を用いた遺伝子検査

野生復帰候補雄及び雌親： 4 月、6 月、7 月上旬（雛鳥 10 日齢と合わせて）

雛鳥： 7 月上旬（雛鳥 10 日齢頃）

7 月上旬の検査で陰性だった場合は雛鳥 20 日齢頃に再検査

①については検査に保定を伴うため、雌親のみで実施する。

＜検査の考え方＞

一度飼育下に導入した個体は、標高の低い施設で飼育することで、放鳥に際して本来高山帯には存在しない病原体を含む微生物やウイルス等を持ち込む可能性がある。一方で、中央アルプス駒ヶ岳周辺は、年間を通してロープウェーが運航しているため登山者が多く、既に一定程度の微生物やウイルス等は人為的に運び込まれているものと考えられている。実際に、立山など登山者が多い地域に生息する野生ライチョウの一部では既に大腸菌 (*Escherichia coli*) 等が検出されていることが明らかになっている。これらのことから、個体に影響のある病原性細菌以外の一般細菌やウイルスについて 2. (3) で実施する事前検査以外には行わない。

一方で、高山にライチョウ家族を野生復帰した後に、他のライチョウへの伝播の可能性があるウイルスや病原性細菌については検査対象とする。特に、飼育ライチョウで死亡個体から検出されたサルモネラ菌や病原性大腸菌について重点的に検査を行う。また、複数の抗生物質に対して抵抗性を持つ多剤耐性細菌についても、野外環境への持ち込みについては留意すべきであり、飼育ライチョウで検出された例のある多剤耐性緑膿菌についても事前検査の対象とする。

飼育下に導入する際には野生から飼育下に導入することで人間へ伝染する可能性のある感染症（人畜共通感染症）の検査を行ったが、放鳥させる個体の場合は、これらについては検査を行わない。

＜陽性時の対応＞

鳥インフルエンザについては陽性判定が出た場合には施設ごと野生復帰を中止する。病原性細菌（検査項目②～④）が検出された場合は、個体が衰弱していなければ菌叢の攪乱を防ぐために抗生剤での治療介入は実施しない。個体が衰弱している場合など各園の獣医師の判断で治療介入が必要と判断された場合には抗生剤による治療介入を実施する。ただし、治療介入した場合は腸内細菌叢が攪乱されている可能性が高いため、野生復帰は困難となる。

4. 野生復帰の最終判断

個別の項目に対応に関する野生復帰の可否の判断基準は以下とするが、複数の項目にまたがる判断を要することが想定されるため、野生復帰させる家族及び個体の最終判断は、域内研究者や獣医師の助言に基づいて検討を行う。

①野生復帰させるライチョウ自身が高山で生きのびる能力を有するか

- ・ 2 (1) 雌親が正常に子育てをしているか

雌親の行動が判断基準となっているため、この項目をクリアしない家族の雌親については野生復帰不可とする。

一方で、その雌親に雛がいた場合、他の家族に合流させることができた雛鳥については、他の項目がクリアすれば野生復帰可能とする。

・ 2 (2) 雛鳥が正常に身体の発達をしているか

各雛鳥単位で判断する。野生復帰不可と判断された個体以外の雛鳥については、他の項目がクリアすれば野生復帰可能とする。

・ 2 (3) 菌叢検査及び 2 (4) アイメリア原虫の検査

雛鳥については、群飼いににより糞サンプルの個体識別が困難なため、体調不良等で個体を隔離飼育しない限り、2つの検査は家族単位で実施する。

野生復帰候補の雄及び雌親候補を対象とした2つの検査は4月以降定期的に行う。雄とのペアリング前に条件がクリアできなかった場合には繁殖個体から外す等を検討するが、繁殖が進行していた場合には糞便希釈液や少量のアイメリア原虫のオーシストを経口摂取による補填を試みる。その後、雛鳥の孵化後の初回検査で雌親及び雛鳥の両方が検査をクリアした場合は野生復帰可能とするが、どちらかが検査をクリアしなかった場合は追加的な経口摂取による補填を試みた後、雛鳥が20日齢程度の時点で、雌親及び雛鳥の検査を実施して野生復帰可否の判断を再度行う。

②野生復帰後に同種個体群及び高山環境に生息・生育する野生生物に影響があるか

・ 3 (1) 野生復帰後に他のライチョウに伝播する病原性細菌やウイルス、寄生虫を有していないか

4月以降定期的な野生復帰候補の雄及び雌親候補の検査を行うが、雛が孵化するまでにクリアしなかった場合には野生復帰の可否の判断は保留し、体調不良にならない限りは検査モニタリングを継続する。

雛鳥については、群飼いににより糞サンプルの個体識別ができないため、体調不良等で個体を隔離飼育しない限り、2つの検査は家族単位で実施する。

雛鳥が20日齢程度の時点で、雌親及び雛鳥の検査を実施し、クリアしなかった場合は野生復帰不可とする。

5. 野生復帰不可個体の取り扱い

野生復帰不可と判断された個体については、基本的に翌年の野生復帰候補家族の親個体候補として動物園において継続飼育を行うが、場合によっては生息域外保全における保険集団への合流も検討する。個別の対応に関する詳細は以下とするが、想定外の事態も起こりうるため、その場合はその都度専門家や各園の獣医らと協議して決定する。

①野生復帰させるライチョウ自身が高山で生きのびる能力を有するか

・ 正常に子育てをしなかった雌親

継続飼育を行い次年度の野生復帰家族の親鳥候補とする。

・ 正常な身体の発達をしていない雛鳥

重度な先天的異常を抱えている等、野外で生存する可能性が低いと判断される雛鳥については、アイメリア原虫の駆虫試験を施した上で保険集団に合流させることを検討する。ケガなどにより放鳥のタイミングでは野生復帰不可と判断したが、その後健康状態が回復した個体については次年度の野生復帰候補家族の親鳥候補とする。

・ 野生型に近い腸内細菌叢を保有していないと判断した個体

飼育下という特殊環境に野生生物を置く関係で、時間と共に漸次的に移行していく

可能性があるため、研究者及び獣医師等の専門家の助言に基づく総合評価の検討を実施するが、上記検査から野生復帰不可と判断された場合には、当該年度の放鳥事業後に、引き続き野生個体の糞便希釈液等による菌叢の補填を行い、野生型の腸内細菌叢の再現を試みる。9月以降の検査にて再び菌叢が回復したと判断した場合は次年度の野生復帰家族の親鳥候補とするが、野生型に近い腸内細菌叢の保有が困難な場合はアイメリア原虫の駆虫試験を施した上で保険集団に合流させることを検討する。

・ **野生ライチョウに特有のアイメリア原虫を保有していないと判断した個体**

令和3年に導入した個体は既にアイメリア原虫を保持しているため、この項目は既にクリアできている。一方、令和4年度に孵化する雛鳥については孵化20日齢前後で実施される最終検査においてアイメリア原虫のオーシストが検出されなくなった場合、8月以降に少量を経口摂取させることでアイメリア原虫の補填を行い、次年度の野生復帰個体の親鳥候補とする。

② **野生復帰後に同種個体群及び高山環境に生息・生育する野生生物に影響があるか**

・ **検査対象の病原性細菌やウイルス、寄生虫が検出された個体**

病原性細菌やウイルスが検出されたことで野生復帰不可とした個体については、体調悪化が見られなければ定期的なモニタリング検査を継続し、その後に該当の菌やウイルスが検出されなくなった場合には次年度の野生復帰家族の親鳥候補として扱う。

一方で、体調不良や該当の菌やウイルスが陰転しないことにより、抗生剤による治療介入を選択する場合は、腸内細菌叢に致命的な影響が出る可能性がある。このため、抗生剤投与後には腸内細菌等の検査を実施し、獣医師や研究者等の専門家と協議の上で、菌叢の再構築について検討する。菌叢の再構築により、9月以降の検査をクリアして再び菌叢が回復したと判断した場合は次年度の野生復帰家族の親鳥候補とするが、野生型に近い腸内細菌叢の保有が困難な場合はアイメリア原虫の駆虫試験を施した上で保険集団に合流させることを検討する。

5. その他

○ **性別判定**

- ・ 性別判定 家族毎の卵殻 1回
雛鳥の羽毛 1回（各個体から羽毛1, 2枚を採取）

野生下導入する家族の性別判定については孵化直後の卵殻を用いて行う。個体別の性別については個体を捕獲する必要があるため、中央アルプスに野生復帰させた後、足輪をつける際に各個体の羽毛を抜くことで実施する。