

乳酸菌選択培地を用いたウシ腸内容物中の 乳酸産生菌の分離と選択性の評価

技術教育支援センター 環境システム支援グループ
技術職員 大塚 恵

1. 背景

腸内細菌叢と宿主との関係について、これまで多くの報告がなされてきた。それらは、腸内細菌叢による腸管の刺激、及びそれによる腸管の重厚化・複雑化、免疫促進効果、腸内細菌叢の定着による感染防御効果など宿主にとって有益な効果から、腸内細菌による有害代謝産物産生まで多岐に渡る²⁾。中でも、この腸内細菌の持つ有益な作用を応用したものにプロバイオティクスがある。これは、“宿主の腸内細菌叢のバランスを改善することにより、宿主にとって有益な作用をもたらさうる生きた微生物”と定義されており³⁾、*Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus*, *Enterococcus* などの乳酸産生菌群が中心に用いられている。これは人のみならず、畜産の分野においても広く利用されている。

これまで、腸内細菌の機能解析、プロバイオティクス開発のための腸内細菌の検索手法として、培養法が用いられてきた。培養法による菌数計測は主に菌群の評価であり、また、ある程度他の菌による混入が起こることは避けられないが、菌叢の概略を把握するには大きな影響はないものと見なされ、腸内細菌の検索手法として有用であると考えられてきた。しかし、培養法は技術が確立している一方で、再現性に問題があること、培養できるのはごく一部の細菌であること、培養・同定に時間がかかることなどが難点であった。また、選択培地培開発当時と比べて人間の食生活・生活スタイルは大きく変遷している。それに伴って飼養環境も変化し、腸内細菌叢への影響も十分予測されるため、選択培地の選択性が開発当時と全く同様であるかに疑問がある。

近年、分子生物学的な腸内細菌の検索手法は、培養法の欠点を補う方法として、培養法に代わって急速に普及しつつある。しかし、これらの手法を用いて量的検索を行うに当たっては、培養法との整合性を整えるために、選択培地の動物種及び構成細菌叢の違いによる影響を明らかにし、選択培地の選択性を明確にする必要がある。

2. 目的

以上の現状を踏まえ、腸内で重要な役割を担う乳酸菌群の分離培地である BS 培地 (*Bifidobacterium* 選択培地)、変法 LBS 培地 (*Lactobacillus* 選択培地)、TATAC 培地 (*Streptococcus*, *Enterococcus* 選択培地) について、その選択性を評価するとともに、これまで明らかにされていない、飼養条件等の違いによるウシ腸内容物中の乳酸産生菌群の構成菌種の差を検索した。

3. 実験方法

供試動物には秋田県畜産試験場（以下、秋田県畜試）、東北大学附属農場（東北大）、山本郡 H 農場（H 農場）の乳牛それぞれ13頭、10頭、10頭を用いた。これらの新鮮直腸便を農場毎に等量混合し、塩類希釈液で10倍階段希釈した後、BS 培地、変法 LBS 培地、TATAC 培地に塗布した。培地の調整・培養方法は光岡らの方法¹⁾に準拠し、BS・LBS 培地は37℃で48h 嫌気培養、TATAC 培地は37℃で24h 好気培養した。培養後、コロニーを釣菌・分離し、コロニー PCR を行った。

PCR 反応は、16S rRNA 遺伝子をターゲットとしたプライマー（LBS・TATAC 培地分離株：27F と p806RP、BS 培地分離株：38F と p806RP）で行った。PCR 産物は精製し、秋田県立大学内生命科学研究支援センターにシーケンス解析を依頼した。データは、修正後、BLAST N 2.2.12を用いて解析を行った。

また、秋田県畜試及び東北大由来 TATAC 培地分離株の一部に対し、*Streptococcus*, *Enterococcus* 同定キット API 20 Strep（バイオメリュール）を用いて生化学的同定も行い、配列解析結果と比較した。

4. 結果及び考察

TATAC 培地分離株では、培地の属レベルの選択

表 1 配列解析及び API 20 Strep による菌属レベルでの一致率の比較

菌種構成	秋田県畜試	東北大	H農場	Avarage	構成菌種
TATAC 培地	100	96.2	96.6	97.6	<i>S. bovis group</i>
BS 培地	79.3	100	76.7	85.3	<i>B. pseudolongum</i> , <i>B. adolescentis</i>
変法 LBS 培地	76.2	100	100	92.1	<i>L. ruminus</i> <i>L. mucosae</i> , <i>L. agilis</i>
API 20 Strep	81.3	84.6	—	82.3	<i>S. bovis group</i>
配列解析との一致率	81.3	84.6	—	82.3	<i>S. bovis</i>

性は非常に高い値を示した（75株/全76株中、平均97.6%）。BS 培地分離株（65株/全78株中、平均85.3%）、変法 LBS 培地分離株（70株/全75株中、平均92.1%）では、培地の選択性は TATAC 培地より低かったが、共に十分高い値を示した（表 1）。BS 培地では、主として抗生物質で培地に選択性を持たせている。しかし、抗生物質の使用状況など、開発当初とは飼養環境が大きく変遷していることから選択性の低減が懸念されていたが、培地の選択性は十分に維持されていると思われた。また、培養による結果（図 1）と配列解析の結果（表 1）を比較すると、両解析法における菌数の差は約1乗程度で、これは培養法における経験的な誤差の範囲内であった。

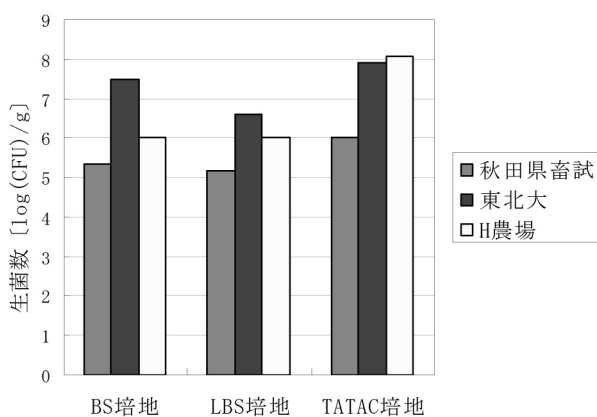


図 1 培養結果

このことから、培養法でも十分ウシ腸内細菌叢の全体像をつかむことが可能であると推察された。各培地における菌種構成は、いずれの農場においても TATAC 培地分離株では *Streptococcus bovis group* が優勢で、そのほとんどを占めていた。一方、BS 培地では、秋田県畜試と H 農場で *Bifidobacterium*

adolescentis が優占種であったが、東北大農場では *B. pseudolongum* が優占種であった。秋田県畜試と H 農場では他菌属の混入も見られたが、その構成菌種は 2 農場で異なっていた。しかし、東北大農場では *Bifidobacterium* 属の菌のみが検出された。変法 LBS 培地では、東北大農場は *L. ruminus*、H 農場は *L. agilis* でそのほとんどが占められていたのに対し、秋田県畜試では *Lactobacillus mucosae* を始めとした 4 菌種が中心であり、また、*Bacillus sp.* などの 5 菌種も検出された。このように、各培地・各農場間で菌種構成に差が見られ、給餌及び飼養環境による違いが示唆された。

API 同定結果及び配列解析結果を比較すると、属レベルでの解析結果及び配列解析結果との一致率は共に平均84.9%（36株/全42株）であった。しかし、現在 *S. bovis* は DNA 解析の結果、*S. bovis* を含む 6 菌種に再分類され *S. bovis group* としてグループ化されているが、API の分類基準は、これらの新しい分類ではなく、旧来の *S. bovis* としての分類となっていることから、ウシ腸内容物培養 TATAC 培地分離株の同定には API 同定キットは適さないと思われた。

以上の結果から、今後、定量 PCR 法によるウシ腸内乳酸菌群の量的検索手法を確立するための条件設定を行う上で、明確な根拠を得ることが出来た。

5. 参考文献

- 1) 光岡知足, 「細菌学技術叢書 3 嫌気性菌の分離と同定法」, 菜根出版, 1982, pp. 63-104の
- 2) 光岡知足編, 「腸内細菌学」, 食生活研究会, 1990, pp. 293-297
- 3) Fuller, R. (ed.). 「Probiotics - the scientific basis」, CHAPMAN & HALL, 1992, pp. 1-9