

腸内細菌叢に基づいた混合飼料の開発 ～飼料添加物の機能性評価～

食品・バイオ応用室 堀中 洸太, 藤枝 正之, 宮崎 浩子, 岡 千寿
千葉県畜産総合研究センター 細野 真司

Evaluation of Feed Additives Based on Intestinal Microflora Studies

Kota HORINAKA, Masayuki FUJIEDA, Hiroko MIYAZAKI, Chitoshi OKA and Shinji HOSONO

離乳期のブタの糞便をサンプルとして, T-RFLP (Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism) 法による腸内細菌叢の解析を行った。ユニバーサルプライマーによる解析では細菌叢全体を把握することが可能であり, 乳酸菌特異的プライマーや *Bifidobacterium* 特異的プライマーによる解析では菌属を限定してその消長を評価できることを示した。

1. はじめに

動物の腸管には様々な細菌が棲みついており, 互いに共生・拮抗しながら絶えず増殖を繰り返し, 複雑な生態系を形成している。腸内細菌叢を構成する細菌の中には, 食物の分解, 免疫賦活, 病原性菌の定着阻止など種々の生理作用を有するものが知られ, 動物の健康と密接に関連している。

一方, 養豚場において出生後しばらくは子豚に母乳が与えられるが, 離乳期を境に固形飼料に切り替えられる。その変化に腸管が適応しにくいため, 病原性菌が付着し下痢等の疾病が発生しやすいと考えられている。対策として抗菌剤が広く使用されているが, 薬剤耐性菌発生への懸念からその使用が控えられる傾向にある。このような背景を受けて, 生菌製剤による生体への保健効果が注目されている。プロバイオティクス資材等の多くの製品が市販されているが, 養豚用資材ではその効果を検証した報告は少ない。

本研究では, これらの効果が期待される資材を科学的に評価することを目標に, T-RFLP法によるブタの腸内細菌叢の解析を行った。

2. 実験方法

2.1 サンプルの回収

離乳期を挟む生後2週目から4週目までのブタを3試験区分に分け, 異なる3種類の飼料を給与した(表1)。給与前, 離乳直前, 離乳直後, 終了時に糞便を回収し解析用サンプルとした(図1)。

表1 試験区分と給与した飼料

試験区分	給与した飼料
対照区	通常飼料
試験区1	通常飼料 + 生菌製剤1
試験区2	通常飼料 + 生菌製剤2

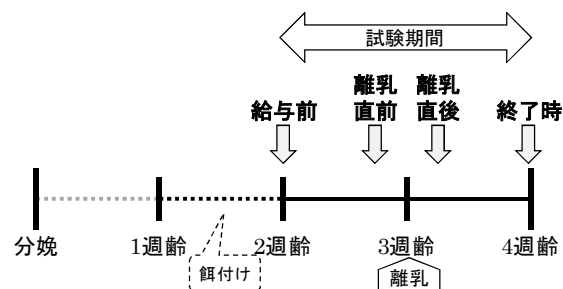


図1 サンプル回収のタイミング

表2 T-RFLP解析にて使用したプライマー

区分	プライマー	蛍光修飾	塩基配列	7-リング温度	PCR サイクル
ユニバーサル	27F	D4	5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3'	50°C	30
	519R	D3	5'-GWATTACCGCGGCKGCTG-3'		
乳酸菌特異的	27F	D4	5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3'	63°C	35
	Lab-677R	D3	5'-CACCGCTACACATGGAG-3'		
<i>Bifidobacterium</i> 特異的	Bif-164F	-	5'-GGGTGGTAATGCCGGATG-3'	62°C	40
	Bif-662R	D4	5'-CCACCGTTACACCGGAA-3'		

2.2 T-RFLP解析

解析は各試験区分につき1頭ずつ、合計3頭について実施した。サンプルから抽出したDNAを鋳型として、PCR反応により16S rRNA遺伝子の前半部分(約0.5k bp)を増幅した。反応液の総量は50 μ Lとし、プライマーはユニバーサル、乳酸菌特異的、*Bifidobacterium* 特異的の各組をそれぞれ用いた(表2)。アガロース電気泳動によりバンドの有無を確認した後、精製キットを用いて40 μ Lで抽出した。抽出液5 μ Lを6Uの制限酵素(*AluI*, *HaeIII*, *HhaI*または *MspI*)で37 $^{\circ}$ C一晩切断した。反応液の総量は100 μ Lとした。エタノール沈殿法により脱塩後、ホルムアミド溶液10 μ Lに再溶解し、2 μ Lを0.5%フラグメントスタンダード600 30 μ Lと混合した。CEQ8000 (BECMAN COULTER)を用いて蛍光検出キャピラリー電気泳動を行い、D4及びD3蛍光標識された末端断片(T-RF)パターンをDNA塩基配列データベースと照合して、主要な細菌を推定した。データベースから得られるT-RFの予測値と、実際の実験から得られる実測値との間には数塩基のずれが生じるため、この点を考慮して推定を行った。

3. 結果及び考察

得られたT-RFパターンの一例を、使用したプライマー、制限酵素、及び検出した蛍光色素の種類毎に示した(図2~4)。個体A(対照区)、個体F(試験区1)、個体H(試験区2)の結果について示した。

3.1 ユニバーサルプライマー

菌叢全体の変遷を把握すべく、ユニバーサルプライマーによる解析を行った。グラム陰性嫌気性菌 *Bacteroides*, *Prevotella*, ならびにグラム陽性嫌気性菌 *Eubacterium*, *Ruminococcus*, *Lactobacillus* と推定されるT-RFが検出された(図2)。A, F, Hのいずれの個体も、離乳直前までに *Bacteroides*, *Prevotella* が腸内細菌叢の主要な構成菌となっており、終了時まで *Eubacterium*, *Ruminococcus*, *Lactobacillus* の割合が増加していることが示唆された。

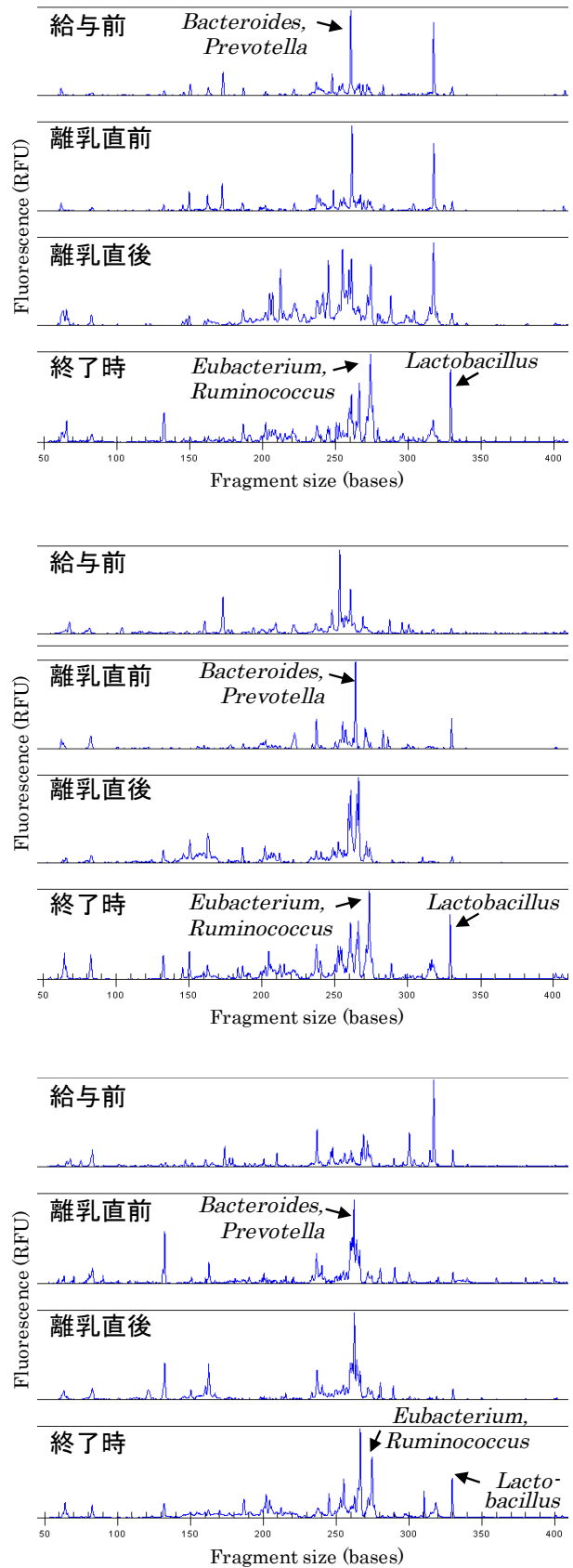


図2 T-RFパターンの変遷 サンプルDNAをユニバーサルプライマーで増幅、*HaeIII*で切断したものを泳動し、D4蛍光色素を検出した。個体A(上)、個体F(中)、個体H(下)

3.2 乳酸菌特異的プライマー

乳酸菌の変遷に着目すべく、特異的プライマーにより乳酸菌を選択的に増幅し解析を行った。*Lb. reuteri*, *Lb. mucosae*, *Lb. gasseri*, *Lb. acidophilus* と推定される T-RF が検出された (図 3)。A, F, H のいずれの個体も、終了時までに乳酸菌のうち *Lb. gasseri* が優勢となっていると考えられた。なお、ユニバーサルプライマーによる解析においても、終了時に *Lactobacillus* と推定される T-RF が検出されたことから、菌叢全体のなかでも *Lb. gasseri* が優勢であると考えられた。

3.3 *Bifidobacterium* 特異的プライマー

Bifidobacterium の変遷に着目すべく、特異的プライマーにより *Bifidobacterium* を選択的に増幅し解析を行った。*B. longum*, *B. pseudolongum*, *B. catenulatum* と推定される T-RF が検出された (図 4)。A, F, H のいずれの個体も、離乳直前までに *Bifidobacterium* の中では *B. longum* が優勢となっていることが示唆された。一方、終了時までに個体 A では *B. longum* の割合が低下したのに対し、個体 F, H では引き続き *B. longum* が優勢になっていると考えられた。

4. おわりに

ユニバーサルプライマーによる解析で得られる T-RF パターンは複雑であり、実測値から菌属の候補を絞り込むことが困難な T-RF も存在した。その一方で、乳酸菌特異的プライマーや *Bifidobacterium* の特異的プライマーによる解析で得られる T-RF パターンは比較的単純であり、菌種レベルまで推定することができた。プライマーの選択によって、菌叢全体や特定菌属の変遷を把握することが可能である。本研究の手法を応用して、腸内細菌叢の変遷という観点から飼料の機能性を科学的に評価できると期待している。

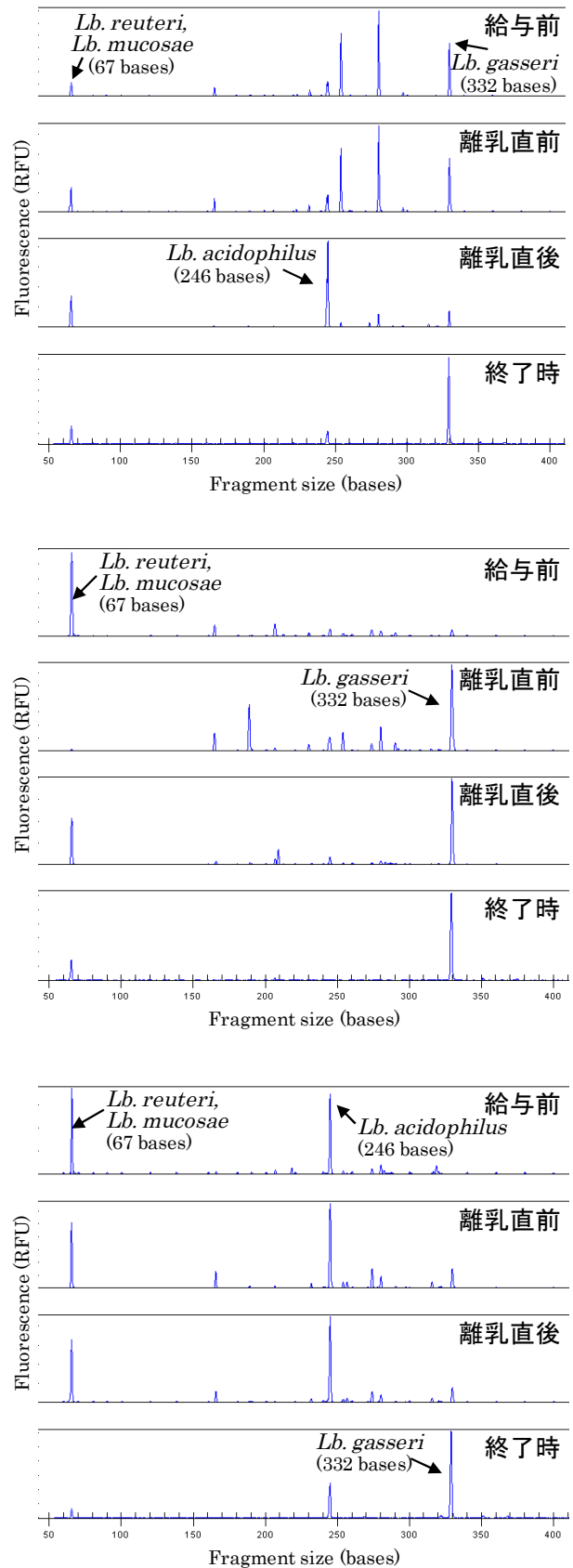


図 3 T-RFパターンの変遷 サンプルDNAを乳酸菌特異的プライマーで増幅、*HaeIII*で切断したものを泳動し、D4蛍光色素を検出した。個体A (上), 個体F (中), 個体H (下)

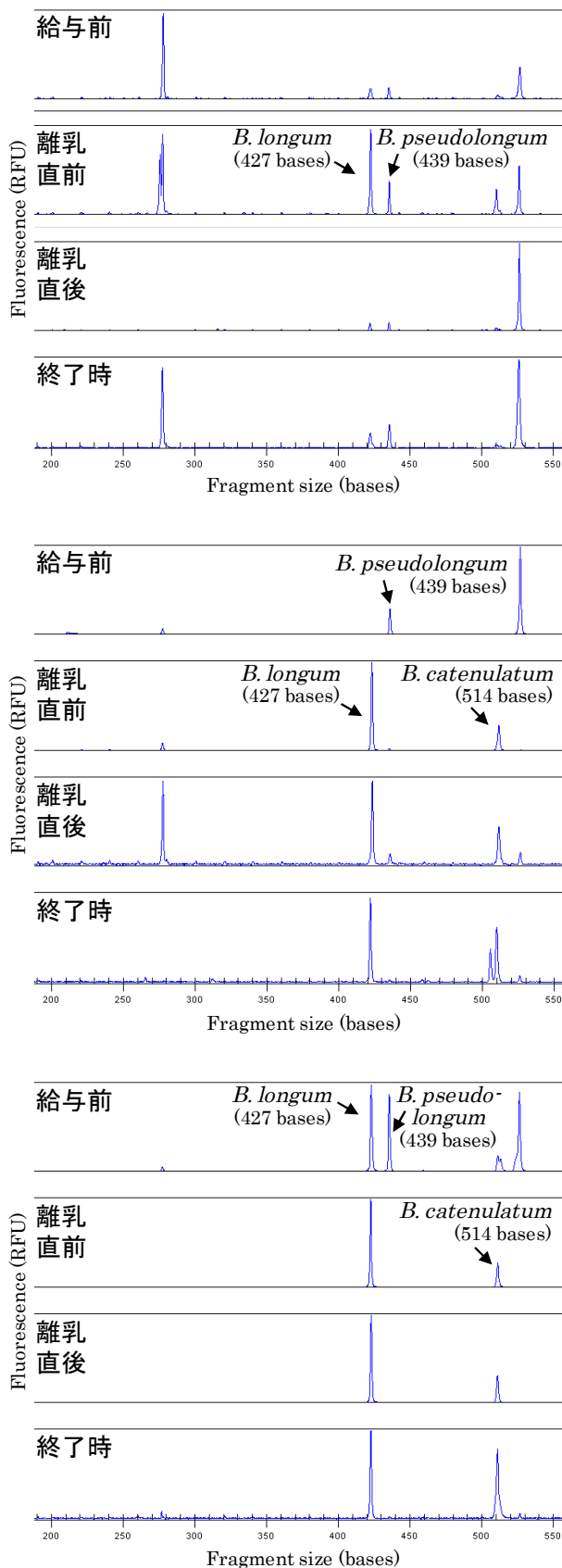


図4 T-RFパターンの変遷 サンプルDNAを *Bifidobacterium* 特異的プライマーで増幅, *AluI* で切断したものを泳動し, D4蛍光色素を検出した。個体A (上), 個体F (中), 個体H (下)

参考文献

- 1) 伊藤喜久治. “腸内フローラとは”. プロバイオティクスとバイオジェニクス. NTS, 2005, p5-10.
- 2) 坂本光央. “腸内フローラの構造解析: T-RFLP法を用いた腸内細菌叢の解析”. 腸内細菌の分子生物学的実験法. 日本ビフィズス菌センター, 2006, p114-118.
- 3) Liu, Wen-Tso *et al.* Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 1997, 63(11), p4516-4522.
- 4) Heilig, Hans G. *et al.* Molecular diversity of *Lactobacillus* spp. and other lactic acid bacteria in the human intestine as determined by specific amplification of 16S ribosomal DNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 2002, 68(1), p114-123.
- 5) Satokari, Reetta M. *et al.* Bifidobacterial diversity in human feces detected by genus-specific PCR and denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.* 2001, 67(2), p504-513.
- 6) Matsumoto, Mitsuharu *et al.* Novel phylogenetic assignment database for terminal-restriction fragment length polymorphism analysis of human colonic microbiota. *J. Microbiol. Methods.* 2005, 61(3), p305-319.
- 7) 長島浩二. “ブタ腸管由来細菌16SリボソームDNA配列のコンピュータ・シミュレーションによる末端制限酵素断片長多型(T-RFLP)解析およびブタとヒトの解析結果の比較”. 北海道立総合研究機構食品加工研究センター研究報告. 2011, No.9, p35-44.