

平成30年6月14日現在

機関番号：82708

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K14808

研究課題名(和文)海産魚類のプロバイオティクス養殖に求められる理想的な腸内細菌叢の検討

研究課題名(英文)Regulation of bacterial flora in marine fish for probiotic aquaculture

研究代表者

安藤 忠 (Andoh, Tadashi)

国立研究開発法人水産研究・教育機構・西海区水産研究所・主幹研究員

研究者番号：20373467

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：マウスやニワトリでは健康な状態でも腸内の細菌侵襲が成長に負の効果を示す。そこで、マダイ幼魚において抗生物質投与により腸内細菌の組成が強く影響される条件で飼育実験を実施し成長を比較した。その結果、有意な成長差は抗生物質不投与群との間で認められなかった。一方で遺伝子解析により腸内細菌組成を群間で比較すると明確に異なった。これらの結果は、抗生物質投与による腸内細菌の組成変化の影響はマダイの成長に対して限定的であることを示している。魚類養殖においてプロバイオティクスにより成長を効率化するには腸内細菌の選択的除去よりも有効な細菌の添加が重要と考えられる。

研究成果の概要(英文)：In mouse and chicken, bacterial infection in intestine induces negative effects in their growth, although they are under healthy condition. In this study, several times of rearing experiment of youngs of seabream was performed using antibiotics for removing intestinal bacteria. No significant difference in growth was observed between antibiotics group and control (no antibiotics). Bacterial flora analysis by 16S RNA sequencing indicated clear difference between groups of antibiotics and control. These results suggest that change of intestinal flora by antibiotics does not affect to growth in youngs in seabream.

研究分野：魚類生理学

キーワード：プロバイオティクス マダイ 成長

### 1. 研究開始当初の背景

近年、飼料用の魚粉の価格が上昇している。しかし、現状以上に飼料中のタンパク質分を他の原料に置換することは難しい。したがって、飼料の消化吸収効率を向上させ、結果的に魚粉の使用量を減少させる手法の開発が重要である。

魚類は、成長や活動の源を炭水化物や脂質よりもタンパク質により高く依存する (Andoh, 2007)。したがって、タンパクの利用効率を上昇させることによって成長速度を改善することは、魚類生理学上、最も合理的な養殖改善の方向性であると考えられる。タンパク質の消化過程では、まず胃・膵臓由来の酵素により大まかな小分子化が起こる。次に、腸上皮細胞の表面にあるアミノペプチダーゼ N などによる終末消化でアミノ酸にまで分解された後、腸上皮細胞から吸収される。この消化・吸収システムは、アミノ酸にまで消化されたタンパク質成分を腸内細菌に「横取り」されないようにするという点で合理的である。

一方で、無菌化が成長速度を改善する現象がマウスやニトリで報告されている (扇元・駒井, 1987)。その理由は、細菌侵襲による腸上皮細胞の消耗が減少し、終末消化とそれに続く吸収の効率が改善されるためと考えられている (松沢, 1972)。海外ではプロイラーに抗生物質を growth promoter として投与することがあるが、その実際は腸内細菌叢を制御し、消化・吸収を効率化することである。そして、これらのことは終末消化が成長に必要な栄養吸収のボトルネックである可能性を示しており、魚類養殖においても終末消化の重要性が考慮されるべきと考えられる。そして、魚類は胃酸分泌が弱い (藤井, 1961)、腸に細菌が容易に侵入し、腸内細菌叢が変化しやすいと考えられる。したがって魚類では、細菌叢制御により腸上皮細胞の消耗を抑制し、成長を改善する効果が、哺乳類やプロイラー等以上に期待できる。

### 2. 研究の目的

本課題では、実験的に抗生物質などで魚類の腸内細菌叢を制御し、成長促進効果や腸上皮細胞の消化酵素活性との関係を解析することにより、健全な消化に理想的な腸内細菌叢を明らかにすることを目的とした。これにより、「プロバイオティクス養殖」を実現する上で求められる適正な腸内細菌叢に係る情報が提供される。将来的には、環境を制御しやすい陸上魚類養殖において、プロバイオティクスによって高効率な養殖を実現する新たな養殖技術の開発に繋げる。

### 3. 研究の方法

(1) マダイの体内で細菌が優占する箇所と同定

稚魚から配合飼料 (日清丸紅おとひめ) のみで育成したマダイの幼魚 (全長 5 cm、4 回

/日給餌、給餌 2 時間後) から胃、幽門垂、腸中部、直腸、体後部側線付近の皮膚を摘出し、DNA を抽出 (Takara Nucleospin 使用、proteinase K 消化あり)、3 組の細菌用ユニバーサルプライマーを使用した PCR により細菌遺伝子の増幅を試みた。プライマーは forward 側が 27F、reverse 側が 1492R、519R、907R であった。サイクル数を 25 回および 30 回、annealing 温度を 60 に設定した。

(2) 抗生物質投与によるマダイにおける成長促進効果の確認

2 群のマダイの幼魚を 200L 円形水槽に收容し、38 日間飼育した。水温は 20、流水飼育とし、給餌は 1 回/日とした。一方の群の飼料には、カナマイシン (1g/kg 飼料)、ストレプトマイシン (1g/kg 飼料)、オキシテトラサイクリン (0.15g/kg 飼料) を添加し、他方は無添加とした。

(3) バンコマイシンを投与したマダイの成長

2 群のマダイの幼魚を 200L 円形水槽に收容し、20 日間飼育した。水温は 25、流水飼育とし、給餌を 1 回/日とした。一方の群の飼料には、バンコマイシン (2g/kg 飼料) を添加し (バンコマイシン投与群)、他方は無添加 (非投与群) とした。

(4) 抗生物質の生物濾過槽の硝化活性に与える影響

100L の角型水槽に、30L の牡蠣殻の粉砕物を満たした生物濾過槽を接続し、海水に 10g の塩化アンモニウムを 2 ヶ月ごとに添加し、ポンプで海水を循環させて 6 ヶ月間熟成させた。濾過槽は山本・安藤 (2008) により作製された。この濾過槽は濾過槽内の水位がサイフォンにより底面から上層まで約 5 分に一度上下するため濾材への酸素供給量が通常の生物濾過槽に比較して格段に高いという特徴を持つ。このような水槽-濾過槽を 3 セット用意し、カナマイシン・テトラサイクリン・ストレプトマイシン添加、バンコマイシン添加、抗生物質無添加として、ろ材の熟成後に抗生物質を添加し、アンモニアの分解活性を測定した。

(5) バンコマイシンを投与したマダイの腸内細菌叢の変化

(3) の実験魚について最終給餌の 24 時間後に直腸から内容物を採取し、凍結乾燥、粉砕後、DNA を抽出し、MiSeq (イルミナ) を使用した細菌の 16S rRNA v3/4 領域のペアエンド解析により腸内細菌の組成を比較した。

### 4. 研究成果

(1) 各器官における細菌生息量

PCR のサイクル数が 25 回の場合、細菌 DNA はいずれのプライマーを使用しても、直腸で多く検出された。皮膚ではプライマーセット 27F-519R でのみ DNA の増幅が検出され、胃、幽門垂、腸中部では検出されなかった (図 1)。そして、PCR のサイクル数を 30 回にした場合、27F-519R ではすべての器官で DNA の増幅が確

認められたが、27F-1492R と 27F-907R では直腸のみで DNA の増幅が確認された(データ省略)。以上のことは、すべての組織で PCR 用試料の調製は成功したこと、マダいの消化管において腸内細菌のほとんどは直腸に生息しており、その量は皮膚よりも多いことを示している。すなわち、腸内細菌が成長に影響するならば着目すべき細菌は直腸に生息する可能性が高い。

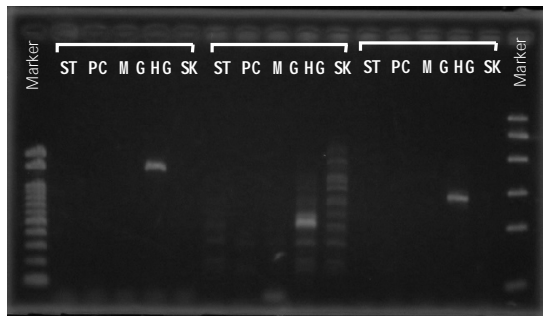


図 1. マダイ幼魚の各器官における細菌の分布状況。PCR で増幅した DNA について電気泳動した。primer set は左から 27F-1492R、27F-519R、27F-907R。ST: 胃, PC: 幽門垂, MG: 腸中部, HG: 直腸, SK: 皮膚

(2) マダいの成長に及ぼす腸内細菌の影響  
群間において実験開始時に有意差は認められず、実験終了時には実験開始時と各群内で有意差が認められた。体重の平均値は各群共に実験終了時に 1.6 倍以上に増加した。しかし、実験終了時の体重に実験群間で有意差は認められなかった(図 2)。このことは、グラム陽性・陰性の両方に作用する抗生物質の混合物の飼料への添加でもマダいの成長に影響しないことを示している。すなわち、マダイでは腸内細菌叢が成長に必ずしも影響しない可能性が高い。

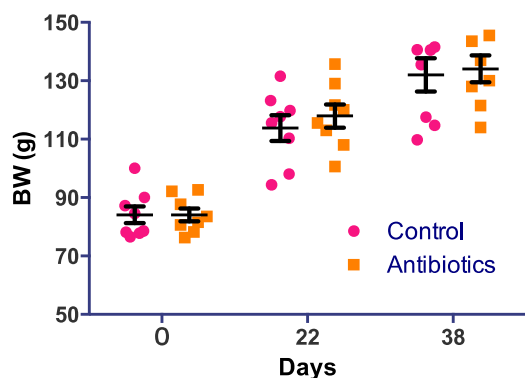


図 2. 抗生物質添加飼料のマダイ幼魚の成長に与える影響。ピンクは対照群、黄色は抗生物質投与群。点は各個体の体重、bar は平均と標準誤差を示す。

(3) バンコマイシン投与の成長に及ぼす影響

(2) と同様に、群間において実験開始時に有意差は認められず、実験終了時には各群内で有意差が認められた。体重の平均値は各群共に実験終了時に 2 倍以上に増加したが、体重に実験群間で有意差は認められなかった(図 3)。バンコマイシンは腸内ではグラム陽性菌に特異的に強く作用する一方、腸上皮細胞を通過しないため体内にほとんど取り込まれない。すなわち、バンコマイシンを飼料添加により投与する場合、腸内細菌のうちグラム陽性菌に対して特異的に近い作用が期待できる。つまり(2)の実験は、多くの腸内細菌を減少させた場合、(3)は腸内のグラム陽性菌を殺菌した場合である。このどちらにおいてもマダいの幼魚では抗生物質無添加群と有意差の間に成長差が認められないことから、マダいの幼魚における飼料の消化吸収に腸内細菌は正負どちらの作用も及ぼさない可能性が考えられる。以上の結果を受けて、腸上皮細胞の終末消化に関わる酵素活性の解析を中止し、バンコマイシンの腸内細菌および濾過槽内細菌への影響を以下で調べることにした。

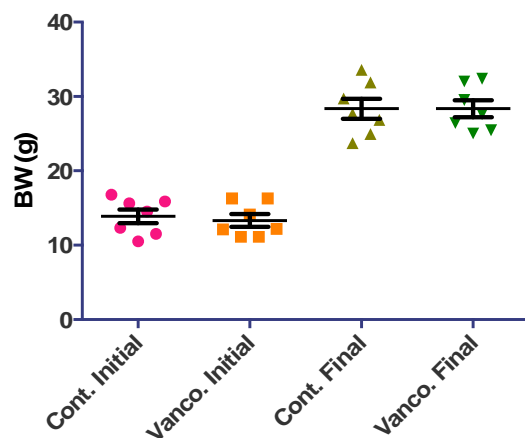


図 3. バンコマイシン添加飼料のマダイ幼魚の成長に及ぼす影響。左 2 群は実験開始時の無添加群とバンコマイシン添加群、右 2 群は実験終了時(20 日後)の各群。

(4) 抗生物質のろ材の硝化活性への影響

塩化アンモニウムで熟成した水槽のろ材について、抗生物質添加前に再び塩化アンモニウムを添加し硝化活性を確認したところ、5 日後にアンモニアの発色がいずれの水槽でも確認されなくなった。このことは 3 水槽ともに強い硝化活性を有することを示している。次に抗生物質を添加したところ、2 つの抗生物質添加槽のろ材は明らかに脱色された。そして、各水槽に塩化アンモニウムを添加し、4 日経過後のアンモニア濃度を測定したところ、無添加とバンコマイシンを添加した水槽では、ほぼアンモニアの発色が認められなかったが、3 種の抗生物質を添加した水槽では高濃度のアンモニアが検出された(図 4)。以上のことは、バンコマイシンは、

生物濾過槽において亜硝酸菌を殺菌せずに、それ以外の多くの細菌を殺菌する抗生物質であることを示している。バンコマイシンはろ材の立ち上げ時など細菌叢が不安定な際の細菌叢制御にも有効かもしれない。



図4. 抗生物質の添加の有無による硝化活性の違い。アンモニア検出試薬を濾過槽内海水に添加した後の発色状況。1: 無添加槽、2: 3種の抗生物質を添加した槽 3: バンコマイシン添加槽。水槽番号の下の数値は 660nmでの吸光度。

#### (5) バンコマイシンの腸内細菌組成への影響

(1)の実験の結果を受けて(3)の実験における直腸の内容物について細菌叢を調べた。対照群(非投与群)では、グラム陽性の Firmicutes 類とグラム陰性の Proteobacteria 類の両細菌が優占した。バンコマイシン投与群では、Proteobacteria 類の細菌が優占し、対照群と細菌組成が明確に異なった。この結果は、腸内のグラム陽性菌を選択的に除去するバンコマイシンの効果が十分に発揮されたことを示す。3(3)で示したバンコマイシン投与でマダいの成長に影響が認められなかったことと併せて考えると、腸内細菌の組成の変化がマダいの成長に与える影響は限定的であると考えられる。

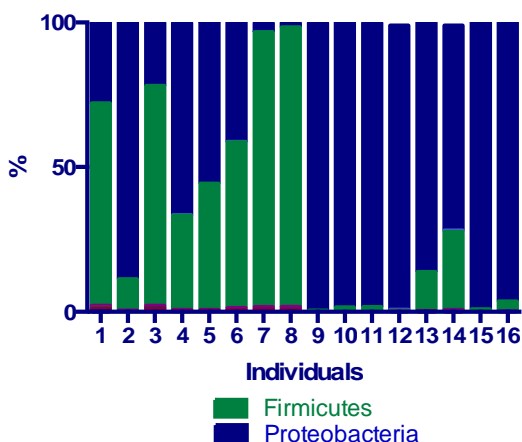


図5. マダイ幼魚におけるバンコマイシン

投与の腸内細菌組成への影響 1~8 は対照群、9~16 はバンコマイシン投与群。緑は Firmicutes、青は Proteobacteria、その他の色は他のバクテリア。

#### (6) まとめ

本研究の結果からは、マダイにおいて抗生物質の投与で腸内細菌叢を大きく変化させても成長に及ぼす影響は正負の両側において確認されなかった。このことは抗生物質の投与量や選択が適切でなかったためでないことは、少なくともバンコマイシンを投与したマダいの直腸の細菌叢解析から明確である。そして、ろ材へのバンコマイシンの投与では、ろ材表面の色が大きく変化したが、硝化活性に変化は認められなかったことから、バンコマイシンの存在は水槽内の細菌叢に大きく影響しながらも飼育水を清浄に保つ効果があることが示唆される。実際、(3)の実験においてバンコマイシン投与群を飼育した水槽の底と壁は非投与群の水槽よりも汚れが少ないことが目視で観察された。バンコマイシンに構造や作用が近似するアポパルシンは海外で豚や鶏の growth promoter として使用されてきた (Bager et al., 1997; 伊原ら 2016)。これらは消化管からほとんど吸収されずにグラム陽性腸内細菌を殺菌し細菌の腸上皮細胞への侵襲を低下させる。マダイにおいて腸内細菌叢を大きく変化させ、水槽内細菌叢についても同様の作用を示すバンコマイシンを使用しても成長促進が確認されないことは、マダイにおいて腸内細菌の成長に及ぼす影響は正負のどちらにおいても限定的であり、プロバイオティクスにより成長促進を実現することの困難性を示唆している。魚類養殖においてプロバイオティクスにより成長を効率化するには腸内細菌の選択的除去よりも有効細菌の添加が重要と考えられる。

#### 引用文献

- Andoh, T. (2007) Gen. Comp. Endocrinol. 151, 308-317.  
 Bager, F., et al. (1997) Prev. Vet. Med. 31, 95-112.  
 藤井実(1961)農水講研報, 11, 1-61.  
 伊原航平ら(2016)東北畜産学会報 65, 41-53.  
 扇元敬司・駒井三千夫(1987)腸内微生物と成長.動物の成長と発育, pp. 219-232, 朝倉書店.  
 松沢大樹(1972)無菌動物におけるエイジング.エイジングの生物学, pp.136-147.岩波書店.  
 山本義久・安藤忠(2008) 循環式の水の濾過装置. 特許第 4670087 号.

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 0 件)

〔学会発表〕(計 0件)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

安藤 忠 (ANDOH, Tadashi)  
水産研究・教育機構 西海区水産研究所  
主幹研究員  
研究者番号：20373467

### (2) 研究分担者

藤原 篤志 (FUJIWARA, Atsushi)  
水産研究・教育機構 中央水産研究所 主  
幹研究員  
研究者番号：30443352

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：

### (4) 研究協力者

( )