

平成21年 5月 1日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）

研究期間：2007～2008

課題番号：19880014

研究課題名（和文）水産養殖におけるプロバイオティクス候補菌の標識化と動態解析

研究課題名（英文） Labeling and tracing of probiotic bacteria for aquaculture

研究代表者 田中 礼士 (TANAKA REIJI)

三重大学・大学院生物資源学研究科・准教授

研究者番号：80447862

研究成果の概要：

本研究では研究室で飼育可能なアワビをモデル生物として、添加するプロバイオティクス菌にあらかじめ標識化した株を作製し、宿主の消化管における動態を解明することを目的とした。

プロバイオティクスの生菌数測定の結果、標識化された2株は投与停止後3日目または5日目まで消化管内から検出された。また、飼育水中では標識化された2株は3日目または7日目まで検出された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,370,000	0	1,370,000
2008年度	1,350,000	405,000	1,755,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,720,000	405,000	3,125,000

研究分野：海洋微生物学

科研費の分科・細目：水産学・水産学一般

キーワード：アワビ プロバイオティクス 養殖 標識 消化管内細菌

1. 研究開始当初の背景

現在、水産養殖におけるプロバイオティクスとして有効な微生物には、乳酸菌のほか、*Streptococcus* 属細菌、もしくは *Bacillus* 属細菌が使用されている。とくに乳酸菌はヒトや動物の消化管に常在しており、宿主の健康に重要な役割を演じていることが明らかに

されてきた。プロバイオティクスに使用されてきた乳酸菌は伝統的に食品として利用されてきたものや、動物の消化管から分離されたものであり、安全性が高いという特性を持っている。実際にこれらのプロバイオティクス菌を飼料に添加することにより対象試験区に比べ、成長率が高くなる、もしくは病気の発生が統計学的に優位に抑えられたとする報告は多数掲載されて

いる。

しかしながら、これらの統計学的調査に比べ、実際の消化管内にそれらのプロバイオティクス菌の付着部位を特定し、菌数を保っているのかを調べた報告に関してはその数が少ないのが現状である。

報告が少ない中、アトランティックサーモン稚魚に *L. plantarum* 添加飼料と無添加飼料を与えると、添加区の魚の消化管内には多数の *L. plantarum* が存在し、*L. plantarum* は胃を通過消化管壁に付着することができると報告されている (Gildberg et al., 1995)。ただし、これらのプロバイオティクス菌の数が、実際に添加されたものか、もともと養殖動物の消化管に存在していたものなのかをはっきり区別できるような特異的な検出法で行われた実験ではないのが現状である。

そこで、本研究では研究室で飼育可能なアワビをモデル生物として、添加するプロバイオティクス菌にあらかじめ標識化した株を作製し、宿主の消化管における動態を解明することを目的とした。

2. 研究の目的

プロバイオティクス標識菌が餌として添加されることにより、宿主消化管内にどれくらいの数が増殖し常在しているのかを把握した。

また、そのうち定着している菌数を把握する。さらに定着せず排出された菌について水槽内での動態解析を行った。

具体的には、

- ①メガイアワビ消化管内の常在菌の特定
- ②常在菌特異検出プローブの作製
- ③メガイアワビ消化管内の各常在菌の定量
- ④プロバイオティクス標識菌の動態解析を行った。

3. 研究の方法

申請者がすでに開発している種特異的なコロニーハイブリダイゼーション法 (Tanaka et al., 2002) を用いてプローブの作製を行い、検出には化学発光法によるコロニー計数により消化管での部位特定および定量化を行った。標識株を用いてトレーサー実験を試みた。水産養殖のモデル生物としてアワビを用い、海水中に添加、もしくは餌料に添加した標識株の挙動を解析した。数日間、標識株を添加し続けたアワビ個体の消化管中に存在する標識株を培養法により正確に計数した。さらにこれらのプロバイオティクス菌の供給を止めた後にいつまで残留するのかを経時的に測定した。

4. 研究成果

①メガイアワビ消化管内の常在菌の特定

摘出した消化管を粉碎し組織液を作成した。組織液を、0.5%アルギン酸含有 ZoBe112216E 平板培地で 20°C、5 日間培養後、ランダムに 30 コロニー釣菌し、オキシダーゼ試験陽性、OF 試験 F (発酵型) の菌株を 16S rRNA 遺伝子系統解析に供し、消化管内の常在菌を特定した。

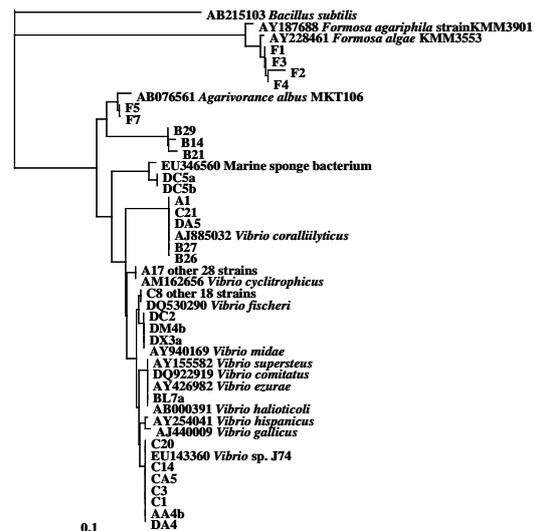


図 1. 16S rRNA 遺伝子系統解析による消化管内細菌相の特定

②常在菌特異検出プローブの作製

コロニーハイブリダイゼーション法 (Tanaka et al., 2002) を用いて常在菌の核酸プローブを作製し、その特異性を検討した。これらの常在菌と考えられる菌の標識を作成し、反応時間 12 時間、反応温度 60°C でハイブリダイゼーションを行うことによりそれぞれの常在菌を検出することが可能であった。

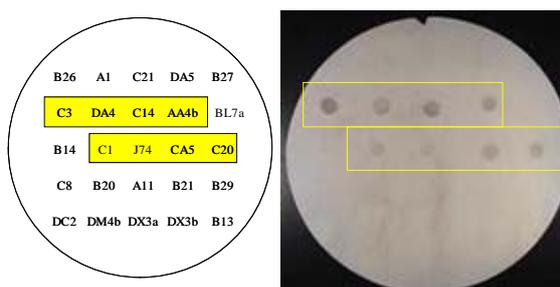


図 2. 反応時間 12 時間、反応温度 60°C にてハイブリダイゼーションを行った時の発色検出結果

③メガイアワビ消化管内の各常在菌の定量

本条件を用いて 2008 年 12 月に採取したメガイアワビサンプルに供したところ、*V. halioticoli* 近縁種が平均で 1.4×10^7 CFU/g (gut waight) 検出された。さらに *V. gallicus* 近縁種および *V. coralliilyticus* 近縁種がそれぞれ約 1.5×10^7 CFU/g、 8.0×10^5 CFU/g 検出された。*Agarivorans albus* 類似菌は検出限界以下であった。ちなみに総生菌数は約 4.5×10^7 CFU/g であった。

対象微生物種	総生菌数(CFU/g)*	対象微生物生菌数(CFU/g)
<i>V. gallicus</i>	4.6×10^7	1.0×10^5
	6.6×10^7	2.0×10^5
	1.0×10^7	5.0×10^4
<i>V. coralliilyticus</i>	7.4×10^6	1.0×10^5
	3.9×10^7	8.0×10^5
	6.3×10^7	8.0×10^5
<i>V. halioticoli</i>	4.4×10^7	1.4×10^7
	9.6×10^7	2.5×10^6
	4.7×10^7	1.6×10^7

* gut-waight

図 3. メガイアワビ消化管内の各常在菌の定量結果

④プロバイオティクス標識菌の動態解析

プロバイオティクス投与停止後の宿主消化管内の消化酵素活性は、そのほとんどがコントロールより高い値を示した。同様に、宿主消化管内での有機酸産生量は、酢酸およびギ酸がコントロールよりも高い値を示した。プロバイオティクスの生菌数測定の結果、宿主消化管内では s6 標識株が投与停止後 3 日目、a3 標識株は 5 日目まで検出された。また、飼育水中では s6 標識株は 3 日目、a3 標識株は 7 日目まで検出された。

これらの結果により、メガイアワビへ投与した乳酸菌 2 株はいずれも消化管内で生存し、プロバイオティクス効果を示すことが示唆された。

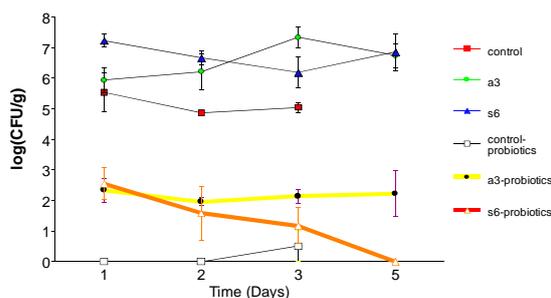


図 4. プロバイオティクス飼料投与停止後の腸内における標識菌数

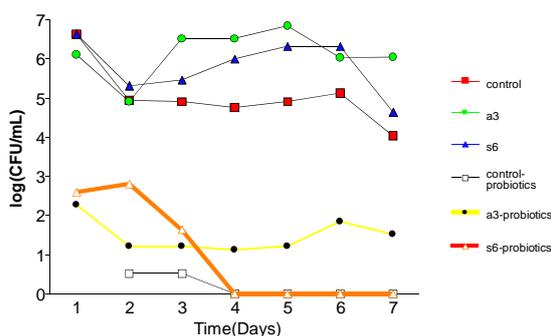


図 5. プロバイオティクス飼料投与停止後の飼育水における標識菌数

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)

[学会発表] (計4件)

1. 家島俊平・田中礼士・前田広人ほか. 乳酸菌によるメガイアワビへのプロバイオティクス効果と消化管内への定着性. 日本水産学会春季大会. 2009年3月30日. 東京海洋大学.
2. 田中礼士・家島俊平・前田広人ほか. メガイアワビ消化管内細菌相のモニタリング. 日本水産学会春季大会. 2009年3月28日. 東京海洋大学.
3. Reiji Tanaka et al. Gut microflora of abalone *Haliotis gigantea*. 5th World fisheries congress 2008. 2008年10月21日. 横浜パシフィコ.

4. Shunpei Iehata, Reiji Tanaka, Hiroto Maeda. Isolation of lactic acid bacterium to applicate as a probiotics in abalone culture. JSPS core university program between university of Philippines and Kagoshima University. 2007年11月16日. 鹿児島大学.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中 礼士 (TANAKA REIJI)

三重大学・大学院生物資源学研究所・准教授
研究者番号：80447862

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者