

平成 30 年 6 月 20 日現在

機関番号：24302

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K18775

研究課題名(和文)おなかエンリッチメント 希少動物の福祉と増殖管理のためのプロバイオ開発

研究課題名(英文)The enrichment of intestinal environment - Development probiotics for endangered species in captivity

研究代表者

土田 さやか(Tsuchida, Sayaka)

京都府立大学・生命環境科学研究科・特任講師

研究者番号：40734687

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：種特異的腸内細菌を用いた新規な採食エンリッチメント法の確立をめざし、ゴリラ特異的乳酸菌の機能解析を行なった。

飼育・野生ニシローランドゴリラおよび野生マウンテンゴリラ由来Lactobacillus gorillae株では、野生マウンテンゴリラ由来株が最も多様な炭素源を分解し、かつ病原性細菌に対する抗菌活性も最も高いということが明らかとなった。本研究によって希少種であるゴリラの飼育現場で安全に採食エンリッチメントを行うためのプロバイオティクスとしての、野生マウンテンゴリラ由来L. gorillae株の有用性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：This study aims to establish new feeding enrichment for captive gorillas using gorilla specific lactic acid bacteria as probiotics that efficiently degrade their native food.

We analyzed the biochemical characteristics and antimicrobial activities of gorilla-specific lactic acid bacteria, Lactobacillus gorillae, from captive and wild western lowland gorillas and wild mountain gorillas. The strains from wild mountain gorillas could degrade most various kind of carbohydrate including D-xylose and cellobiose constitute hemicelluloses and cellulose of the cell walls of plants. Furthermore, the antimicrobial activities of the strains from wild mountain gorillas and western lowland gorillas were significantly higher than those of the strains from captive western lowland gorillas. These results suggest the strains of L. gorillae from wild mountain gorillas are most beneficial strains for probiotics using on the field in captivity.

研究分野：腸内細菌学

キーワード：共生腸内細菌 乳酸菌 プロバイオティクス 採食エンリッチメント 野生動物

1. 研究開始当初の背景

近年の動物園には、動物の展示のほかに絶滅の危険がある希少動物の維持と増殖も期待されるようになった。「環境エンリッチメント」とは、動物福祉の観点から飼育される動物の欲求を満たすように環境を改善し、健康の維持と繁殖成績の向上を促す飼育技術である。採食品目についても、人間の食べる作物の給与に起因する口腔など消化器の障害を防ぐために、野生下での採食物を給与するなどの試みがなされている。一方、野生の植物には難消化性成分や、反栄養成分が多く含まれており、逆に消化不良や中毒による消化器症状を誘発する危険もある。飼育下と野生下では腸内細菌の構成が大きく異なることが知られており、人工環境による腸内細菌の交代が、環境エンリッチメント実践の障害となっている可能性が高いと考えられる。採食エンリッチメント技術に、野生下の採食物の給与を取り入れる場合、飼育下で消失してしまった野生の腸内細菌をプロバイオティクスとして給与することが対応策として有効であると期待される。申請者は、これまでアフリカにおける野生ゴリラやチンパンジーの腸内細菌研究に参加し、これらの動物に特異的な新種乳酸菌の分離に成功してきた。これら分離株の機能評価を行い、飼育霊長類とくに絶滅の危険の高いゴリラやチンパンジーを対象としたプロバイオティクスへの応用可能性を明らかにすることを目的とした本研究を着想した。

2. 研究の目的

動物園では、動物福祉の観点から生活環境を改善する「環境エンリッチメント」という実践方策がとられており、とくに希少動物の維持と増殖への貢献が期待されている。草食動物の飼育では、採食エンリッチメントとして野生下の採食品目である木本の枝葉等を使用するが、こうした「野生」の飼料には、リグニン等の難消化性成分や、防御物質のタンニンや配糖体などの反栄養成分が含まれており、飼育下の動物に消化不良や中毒による下痢を誘発する危険がある。本研究ではもともと動物と固有の共生関係を結んで無毒化や消化率向上をもたらす腸内細菌を特定し、それらをプロバイオティクスとして投与することによって、野生の状態で採食する品目も飼育下で安全に与えることができるようにする新規な採食エンリッチメント法の確立をめざすことを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 乳酸菌の単離・同定

申請者がすでに単離している乳酸菌株に加え、さらに多くの野生由来分離株を確保することを目指し、ウガンダ共和国のブウィンディ原生国立公園に生息するマウンテンゴリラ (*Gorilla gorilla beringei*) 及びガボン共和国のムカラバ・ドウドウ国立公園に生

息するニシローランドゴリラ (*Gorilla gorilla gorilla*) から乳酸菌選択培地 (BS 血液加寒天培地および MRS 寒天培地) を用いて、乳酸菌 (*Bifidobacterium* 及び *Lactobacillus*) を分離した。分離株より DNA を抽出し、16S rRNA 遺伝子配列の系統解析により、乳酸菌種の同定を行なった。

(2) 乳酸菌の生理性状試験

API 50CH に分離乳酸菌株を接種し、37 °C で 48 時間、嫌気培養した後、49 種類の炭素源に対する発酵能を確認した。また、API ZYM に分離乳酸菌株を接種し、37 °C で 4 時間、嫌気培養した後、19 種類の酵素活性の有無を確認した。乳酸菌の系統分類において重要な性状である NaCl 耐性は、嫌気 MRS 液体培地に NaCl を 6.5 %, 8.0 %, 10 % となるように加え、37 °C で 7 日間培養後、分光光度計を用いて増殖性 (630nm における濁度) によって評価した。

(3) 病原性細菌に対する抗菌活性

分離乳酸菌株の腸管出血性大腸菌 (Enterohemorrhagic *Escherichia coli*; EHEC) に対する抗菌活性を、寒天ウェル法を用いて評価した。Mcfarland NO. 0.5 に調整した EHEC をミュラーヒントン寒天培地に接種した後、コルクボーラーで穴をあけた。MRS 液体培地を用いて、分離乳酸菌株を 37 °C で 48 時間培養したのち、遠心分離を行い (12000 rpm, 10 分, 4°C)、培養上清を得た。得られた培養上清を、a) pH 未調整、b) pH 調整 (NaOH を用いて pH 7.0 に調整) の 2 つに分け、それぞれを各 75 µl ずつ培地にあけた穴に分注した。その後、37°C で 18 時間、好気培養を行い、培養上清を分注した穴の周りにできた阻止円 (mm) を測定し、抗菌活性として評価した。

4. 研究成果

(1) 乳酸菌の単離・同定

16S rRNA 遺伝子の系統解析による菌種同定の結果、京都市動物園、東山動物園の飼育ニシローランドゴリラおよび、ガボン共和国の野生ニシローランドゴリラ、ウガンダ共和国の野生マウンテンゴリラは、共通して *Lactobacillus fermentum* に近縁な *L. reuteri* phylogenetic cluster に属する *L. gorillae* を有することが明らかとなった。ニシローランド由来株とマウンテンゴリラ由来株では、同種内でわずかに 16S rRNA 遺伝子配列が異なっており、各亜種間 (ニシローランドゴリラおよびマウンテンゴリラ) で独自のクラスターを形成することも確認された (図 1)。本菌種は「ゴリラ」という動物種と固有の共生関係を結んでいることから、「おなかエンリッチメント」に使用するプロバイオティクス候補菌種として選抜し、(2)

(3) の試験に供試した。

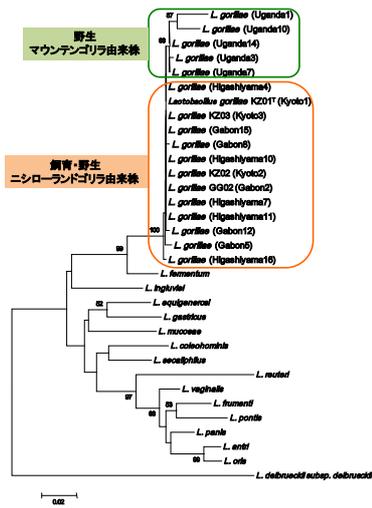


図 1. 16S rDNA 遺伝子による分離乳酸菌株の系統樹 (NJ 法)

(2) 乳酸菌の生理性状試験

49 種類の炭素源のうち、D キシロース、アルブチン、エスクリン、サリシン、セロビオース、ラクトース、トレハロース、グルコネート、2-keto-グルコネートに対する発酵能で、分離乳酸菌株間による差異が確認された。さらに野生由来株で、植物に含まれる難消化性成分や、反栄養成分である D キシロース、アルブチン、サリシン、セロビオースに対する発酵能を持つ株が多いということが明らかとなった。特に、野生マウンテンゴリラ由来株では、すべての分離株で上記基質を分解することが確認された (表 1)。NaCl 耐性試験では、6.5 % NaCl にはすべての分離株が耐性を示したが、10 % NaCl 下においてはすべての分離株で発育が確認できなかった。8.0 % NaCl 下においては、すべての飼育由来株で発育が確認されたのに対し、野生由来株はすべて発育が確認されなかった (表 1)。

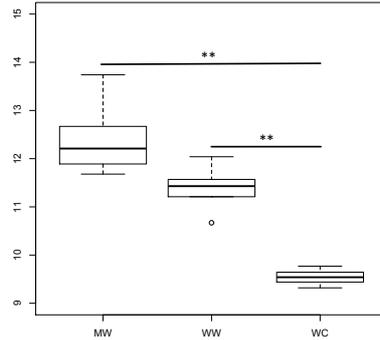
Animal species	Western lowland gorilla										Mountain gorilla							
	captive individuals					wild individuals												
Clonotype	K201	K202	K203	H204	H207	H210	H211	H216	G012	G020	G036	G012	G015	U001	U080	U007	U010	U014
Acid production from (API 50CH)																		
D-xylulose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Arbutin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ficulin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Salicin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cellulose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lactose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Trehalose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gluconate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2-keto-gluconate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
API 50M results:																		
Cysteine arylamidase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Naphthol-AS-BI-phosphohydrolase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
α-glucosidase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
α-galactosidase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Growth in NaCl																		
6.5%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
8%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

表 1. 分離乳酸菌株の生理性状

(3) 病原性細菌に対する抗菌活性

分離乳酸菌全株で、pH 調整培養上清 (pH 7.0) が EHEC に対して抗菌活性 (mm) を持つことが明らかとなった。また、分離乳酸菌株を分離源ごと (飼育ニシローランドゴリラ由来株: CM, 野生ニシローランドゴリラ: WW, 野生マウンテンゴリラ: WM) に群を分けて、各群の抗菌活性を比較したところ、野生ニシローランドゴリラおよびマウンテンゴリラ由来乳酸菌株は、飼育ニシローランドゴリラ

よりも有意に抗菌活性が高いことが明らか



となった (P < 0.01) (図 2)。

図 2. 分離乳酸菌株の病原性に対する抗菌活性 (mm)

(4) プロバイオティクス候補菌の選抜

(1) (2) (3) の結果より、より多くの炭素源を分解し、病原性細菌に対して抗菌活性を持つことから、野生マウンテンゴリラ由来 *L. gorillae* 株が「おなかエンリッチメント」に使用するプロバイオティクスとして最も有効であると考えられた。

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 9 件)

1. Tsuchida S, Maruyama F, Ogura Y, Toyoda A, Hayashi T, Ohkuma M, Ushida K. (2017) Genomic Characteristics of *Bifidobacterium thermacidophilum* Pig Isolates and Wild Boar Isolates Reveal the Unique Presence of Putative Mobile Genetic Element with *tetW* for Pig Farm Isolates. *Front Microbiol.* doi: 10.3389/fmicb.2017.01540. (査読あり)
2. Tsuchida S, Ohara Y, Kuramochi K, Murata K, Ushida K. (2017) Effective degradation of phenolic glycoside rhododendron and its aglycone rhododendrol by feces of wild Japanese rock ptarmigans. *J Zoo Wildl Med.* 22(3):41-45. (査読あり)
3. Hasegawa H, Shigyo M, Yanai Y, MacLennan MR, Fujita S, Makouloutou P, Tsuchida S, Ando C, Sato H, Huffman MA. (2017) Molecular features of hookworm larvae (*Necator* spp.) raised by coproculture from Ugandan chimpanzees and Gabonese gorillas and humans. *Parasitol Int.* 66(2):12-15. doi: 10.1016/j.parint.2016.11.003. (査読あり)
4. Tsuchida S, Murata K, Ohkuma M, Ushida

- K. (2017) Isolation of *Streptococcus gallolyticus* with very high degradability of condensed tannins from feces of the wild Japanese rock ptarmigans on Mt. Tateyama. *J Gen Appl Microbiol.* 63(3):195-198. doi: 10.2323/jgam.2016.09.003. (査読あり)
5. 土田さやか, 牛田一成 (2016) 様々な動物から分離される乳酸菌・ビフィズス菌～ゴリラにはゴリラの乳酸菌？ヒトにはヒトの乳酸菌？～ 日本乳酸菌学会誌 27(1):25-33. (査読あり)
 6. Tsuchida S, Nezu M, Tsukahara M, Ogura Y, Hayashi T, Ushida K. (2015) Draft Genome Sequence of *Lactobacillus gorillae* Strain KZ01T, Isolated from a Western Lowland Gorilla. *Genome Announc.* 3(5). doi: 10.1128/genomeA.01196-15. (査読あり)
 7. Ushida K, Segawa T, Tsuchida S, Murata K. (2015) Cecal bacterial communities in wild Japanese rock ptarmigans and captive Svalbard rock ptarmigans. *J Vet Med Sci.* 78(2): 251-257. doi: 10.1292/jvms.15-0313. (査読あり)
 8. Ushida K, Tsuchida S, Ogura Y, Toyoda A, Maruyama F. (2015) Domestication and cereal feeding developed domestic pig-type intestinal microbiota in animals of Suidae. *Anim Sci J.* 87(6):835-841. doi: 10.1111/asj.12492. (査読あり)
 9. Iwata Y, Nakashima Y, Tsuchida S, Nguema PP, Ando C, Ushida K, Yamagiwa J. (2015) Decaying toxic wood as sodium supplement for herbivorous mammals in Gabon. *J Vet Med Sci.* 77(10):1247-1252. doi: 10.1292/jvms.15-0111. (査読あり)
- [学会発表] (計 5 件)
1. 土田さやか, 丸山史人, Eddie W. Mujjwiga, Pierre P. M. Nguema, 牛田一成 (2017) ゴリラに共通する腸内乳酸菌の宿主による種内変異 第33回日本霊長類学会大会 (コラッセ福島)
 2. 土田さやか, 牛田一成 (2017) 様々な野生動物由来乳酸菌の探索 2017年度乳酸菌学会大会 (玄海ロイヤルホテル)
 3. Sayaka Tsuchida, Edward Wampande, Pierre Philippe Mbehang Nguema, Kazunari Ushida (2016) Characteristics of *Lactobacillus gorilla* isolated from Captive and wild western lowland gorilla (*Gorilla gorilla gorilla*) and wild eastern gorilla (*Gorilla gorilla beringei*) 16th International Primatological Society Congresses (Chicago)
 4. Ushida K., Tsuchida S., Maruyama F. (2015) Domestication developed the pig-type intestinal microbiota. International Symposium on Genome Science 2015 “Expanding Frontiers of Genome Science II” (学術総合センター)
 5. 土田さやか 佐藤康弘 渋谷康 伊東英樹 田中正之 和田晴太郎 長尾充徳 村山美穂 牛田一成 (2015) ゴリラの乳酸菌-野生・飼育・東・西、ゴリラはゴリラ. SAGA18 (京都市動物園)
- [図書] (計 0 件)
- [産業財産権]
- 出願状況 (計 0 件)
- 取得状況 (計 0 件)
- [その他]
- 2017年7月 第33回日本霊長類学会大会 最優秀ポスター発表賞
- 2017年3月 朝日新聞「朝日21関西スクエア賞」
- 2016年4月 2015年度日本獣医学会英文誌JVMS 優秀論文賞
6. 研究組織
- (1) 研究代表者
- 土田 さやか (TSUCHIDA, Sayaka)
 京都府立大学・生命環境科学研究科・特任講師
 研究者番号：40734687