

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 18 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24580401

研究課題名(和文)ブタ、ニワトリの回腸粘膜細菌叢からのイムノバイオティクスの探索と利用

研究課題名(英文)Exploration and utilization of immuno-biotic bacteria from an ileum of pigs and chickens

研究代表者

田島 清(Tajima, Kiyoshi)

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・畜産草地研究所家畜生理栄養研究領域・主任研究員

研究者番号：80343953

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：豚、鶏の回腸末端に付着している細菌を単離し、乳酸生成菌468株のライブラリーを作成した。これとは別に、16S rRNA遺伝子のRT-PCRクローンライブラリー法による回腸粘膜付着菌叢解析を行ったところ、7週齢の子豚、14日齢以降の幼雛でCandidatus Arthromitusが検出され、成長に伴って消失することが示された。IL-1の産生刺激を指標に上記ライブラリーから2菌株を選び、子豚への投与実験を実施したが、飼養成績に有意差はみられず、血液中のIL-1濃度も試験区間で差がなかったことから、投与菌株の効果は明確には示されなかった。

研究成果の概要(英文)：The strain library of lactic acid bacteria was made from the mucosa of terminal ileum of pigs and chickens. A total of 468 strains of lactic acid bacteria were isolated and the species were identified with 16S rRNA gene sequences. In the library, *L. agilis*, *L. johnsonii*, *L. reuteri* and *L. salivarius* were major bacteria in the terminal ileum of pigs. The metabolically active microbiota residing in the mucosa of terminal ileum of piglets was analyzed using the 16S rRNA gene libraries generated by RT-PCR. A total of 1951 sequences were retrieved and the majority (24.8%) displayed the closest similarity to Segmented Filamentous Bacteria (SFB). The two lactobacilli in the strain library stimulated the secretion of Interleukin from the cells of mesenteric lymph nodes. These bacteria were administered to the weaned piglet for 2 weeks. The results of body weight gain and feed efficiency were not differences significantly with and without the strain administration.

研究分野：家畜栄養学

キーワード：回腸粘膜付着細菌 ブタ ニワトリ

1. 研究開始当初の背景

幼若期の家畜、家禽の成長の良し悪しは、その後の生育に影響することから、我が国の畜産物の生産性や経済性に関係する極めて重要な課題である。免疫系が未熟である幼若期の家畜は下痢などの感染症に罹りやすいため、疾病予防と成長促進を目的に飼料中に抗菌性飼料添加物を加えることが多い。しかし、畜産現場における薬剤耐性菌の出現や環境汚染への懸念から、欧州では成長促進を目的とする抗菌薬の使用が全面的に禁止されている。我が国の家畜用抗菌薬の使用量はヒトでの医療用を超えるといわれており、抗菌薬低減を可能とする新規代替技術の開発が不可欠である。

2. 研究の目的

ブタ、ニワトリの回腸粘膜に接着し、腸管免疫を調節するイムノバイオティクスを探索後、宿主に対する作用機序を明らかにすることを第一の目的とし、次いで、幼若期のブタ、ニワトリに利用することで保健効果を高め、抗菌性飼料添加物に依存しない飼養管理技術を確立することを最終的な目的とする。

腸管免疫の発達に腸内細菌が一定の役割を担っていることが明らかにされているが、特に免疫担当細胞が密集している回腸粘膜に特定の菌が接着することがより重要だと考えられる。接着する菌の直接的な作用、複数の菌による相互作用の解明のため、ブタ、ニワトリの免疫が発達する各段階での回腸粘膜を採取し、粘膜に接着する菌叢を培養法と RNA レベル(生菌特異的レベル)で解析する。培養法により単離した菌株は、回腸粘膜接着菌ライブラリーとして保存する。

採取した粘膜試料を用いて宿主側が発現する微生物認識受容体ファミリー等の免疫関連遺伝子発現を定量的に解析し、粘膜接着菌叢の結果と突き合わせることで、腸管免疫の発達に重要な菌、菌群を特定する。

構築した回腸粘膜接着細菌ライブラリーからイムノバイオティクスの候補菌を選定し、器官培養、細胞培養を用いて詳細な作用機序の解明を行う。効果が確認された菌株については、抗菌性飼料添加物を使用しない条件下で幼若期のブタ、ニワトリに投与し、飼養成績、腸内細菌叢、免疫活性への影響を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 供試動物

ブタでは、畜産草地研究所内で生産されている LWD 三元交雑種を使用した。ニワトリはチャンキー種を外導入し、試験に供した。動物実験にあたっては、独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構動物実験等実施規程を遵守し、計画書を該当委員会に提出し、審査、承認を受けてから実施した。

(2) 菌株ライブラリーの作成

ブタ、ニワトリから回腸を採取し、内部を PBS で洗浄後、スライドグラスで粘膜を掻き取った。その粘膜を PBS で懸濁し、希釈系列を作って MRS 寒天培地に塗布し、37℃、嫌気条件下で培養した。

同様に希釈系列を作成した粘膜懸濁液を、CO₂ 吹き込み条件下で GAM 寒天培地に混釈し、ロールチューブを作成、37℃ で培養した。

得られたコロニーは、同様の操作を 3 回繰り返して菌の精製を行い、最終的に 10% グリセロール溶液中に懸濁し、-80℃ で保管した。

(3) 16S rRNA 遺伝子の解析

上記菌株は、16S rRNA 遺伝子の配列を読むことで菌種の推定を行った。16S rRNA 遺伝子の共通配列(27f および 1492r)を用いて PCR 増幅し、得られた産物を精製後、ABI 3730 DNA Analyzer を用いて配列を解読した。

(4) 粘膜付着菌叢の解析

ブタ、ニワトリの回腸粘膜(採取時に RNALater に浸漬保存)を採取し、RNeasy Mini Kit を用いて総 RNA を抽出した。この試料を用い、16S rRNA 遺伝子の共通プライマーを用いて RT-PCR を行い、増幅した 16S rRNA 遺伝子を TOPO TA Cloning kit を用いてクローニングしてライブラリーを作成した。ライブラリーの 16S rRNA 遺伝子配列を解読することで、粘膜に付着している菌叢を明らかにした。

(5) Segmented Filamentous Bacteria の 16S rRNA 遺伝子の系統解析

上記クローニング試料のうち、Segmented Filamentous Bacteria(SFB)特異プライマー(The ISME Journal, 7, 615-621, 2013)に陽性のコロニーからプラスミドを抽出し、16S rRNA 遺伝子約 1500bp を解読した。この配列と遺伝子データベース上に登録されている配列を加えて、最尤法による系統解析を行った。

(6) 免疫刺激菌株のスクリーニング

構築した菌株ライブラリーを含め、免疫刺激菌株のスクリーニングを in vitro organ culture (IVOC) および腸間膜リンパ節細胞との共培養により行った。

ブタ回腸を採取し管腔を PBS で洗浄後、発泡スチロール上で腸管を切開しパイエル版を露出させた。1cm² に細切してバイオプシーパッドに乗せ、1% Glutamine, 1% non essential amino acid, 10% FBS を加えた DMEM 培地を加え、粘膜上に供試菌液(死菌)を 50 μl 滴下し、37℃、5%CO₂ 条件下で培養した。培地は 1 時間ごとに交換し、2 時間目には菌液を再度滴下した。培養 6 時間目にパイエル版を回収し、RNALater 中に浸漬保存した。

ブタ腸間膜リンパ節を採取し、組織破砕機(Miltenyi gentleMACS Dissociator)を用いて細胞を単離し、供試菌液(死菌)を添加して、48 時間後のサイトカイン産生能を測定

した。これらの共培養に用いた供試菌には下記の株を用いた。

Lactobacillus plantarum Lq80, *L. plantarum* T01002, *L. buchneri* IWT192, *L. casei* L00C82, *L. oryzae* SG293, *L. sakei* SG171, *Weissella oryzae* SG25, *W. cibaria* P162, *L. agilis* T1, *L. salivarius* T2。菌株はそれぞれ 2×10^8 cell / 20 μ l の濃度に調整した。

(7) 子ブタへの投与試験

上記スクリーニングで効果が示された菌株の投与試験を実施した。25日齢で離乳したLWD三元交雑種10頭を用い、菌の投与の有無により5頭ずつ2区に分けた。子ブタは単飼、抗菌性飼料添加物を含まない試験飼料は飽食とした。菌は給餌の際に飼料に混合して給与した。試験期間は2週間とし、飼料摂取量は毎日、体重は1週間ごとに測定した。試験終了時に定法にしたがってと畜し、血液および腸管を採取した。血液は血漿を分離して、分析時まで-20℃で保存した。腸管は内容を洗浄後、RNALaterに浸漬し、分析時まで4℃で保存した。

4. 研究成果

(1) 菌株ライブラリーの作成

生後12日、26日、49日、ならびに約180日(110Kg)のLWD種の回腸粘膜から、MRS培養菌を468株、嫌気性菌115株を単離、精製した。16S rRNA遺伝子配列により菌種の推定を行った結果、*Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Weissella*の5属、17菌種が確認され、*L. agilis*, *L. johnsonii*, *L. reuteri*, *L. salivarius*が15-22%の範囲で検出された(表1)。ニワトリでは*L. johnsonii*, *L. reuteri*が主要菌として見出された。嫌気性菌では*Streptococcus*属の菌種が全体の80%を占めた。

表1 回腸粘膜から採取したMRS培養菌株

<i>Enterococcus durans</i>	5
<i>Enterococcus faecalis</i>	3
<i>Enterococcus faecium</i>	2
<i>Lactobacillus agilis</i>	72
<i>Lactobacillus brevis</i>	1
<i>Lactobacillus fermentum</i>	1
<i>Lactobacillus johnsonii</i>	82
<i>Lactobacillus lactis</i>	1
<i>Lactobacillus paraplantarum</i>	4
<i>Lactobacillus plantarum</i>	7
<i>Lactobacillus reuteri</i>	80
<i>Lactobacillus salivarius</i>	107
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	13
<i>Streptococcus alactolyticus</i>	31
<i>Weissella cibaria</i>	17
<i>Weissella confusa</i>	41
<i>Weissella paramesenteroides</i>	1
計	468

(2) 粘膜付着菌叢の解析

RT-PCRによるクローンライブラリーの解

析では、離乳前の子ブタ回腸から

Clostridium disporicum, *C. perfringens*がそれぞれ15%、13%(解析数160、3頭)検出されたが、離乳後49日齢では、マウスやラットでIgA産生を刺激すると考えられているCandidatus Arthromitus(Segmented Filamentous Bacteria, SFB)が解析した個体(45頭)の60%から検出され、全解析数(1951)の約25%で最優勢であることが示された(表2)。

表2 RT-PCRクローンライブラリー法による回腸粘膜付着菌叢の解析結果

推定される近縁種	(%/1951)	Similarity (%)	検出率	(%/45頭)
Candidatus Arthromitus	24.7	90-97	Candidatus Arthromitus	60.0
Helicobacter rappini	7.2	98-100	Clostridium disporicum	51.1
Clostridium colinum	5.5	95-98	Helicobacter rappini	48.9
Clostridium disporicum	5.2	97-99	Clostridium beijerinckii	42.2
Streptococcus alactolyticus	4.8	99	Actinobacillus minor	42.2
Sarcina ventriculi	4.5	99-100	Clostridium mayombi	37.8
Lactobacillus johnsonii	4.2	99-100	Lactobacillus johnsonii	35.6
Lactobacillus amylovorus	4.1	97-100	Lactobacillus amylovorus	31.1
Lactobacillus acidophilus	3.8	99-100	Lactobacillus acidophilus	31.1
Clostridium beijerinckii	3.6	95-96	Lactobacillus reuteri	28.9

供試頭数 45頭(♂23, ♀22) 解析数 1951クローン 解析長 600bp

(3) Candidatus Arthromitusの系統解析

ブタ、ニワトリの回腸粘膜で見いだされたSFBの系統解析結果を図1に示した。

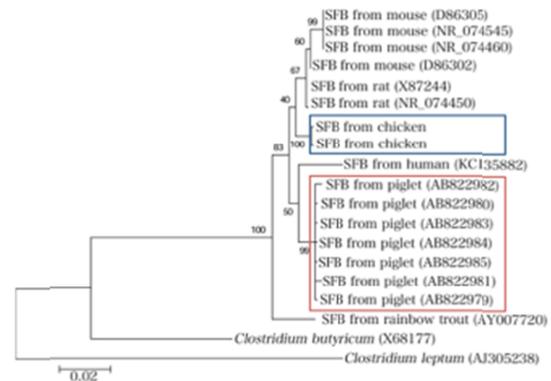


図1 Candidatus Arthromitus (Segmented filamentous bacteria, SFB)の系統解析結果

ブタ、ニワトリのSFBは、ヒト、ラット、マウスから得られているSFBと大きな1つのグループを形成するが、動物種間で独立した枝に分岐することが明らかになり、動物種特異性を反映していると考えられた。

(4) 免疫刺激菌株のスクリーニング

構築したライブラリーから得られた菌株と、それ以外に入手可能な菌株を加えた10菌株を選定し、IVOCによる共培養を行った。培養6時間後の組織から、総RNAを抽出して微生物認識受容体ファミリー(Toll Like Receptor)や抗菌ペプチド等の遺伝子発現を測定した。その結果を図2に示した。測定値のばらつきが大きく、各項目に有意差はみられなかった。

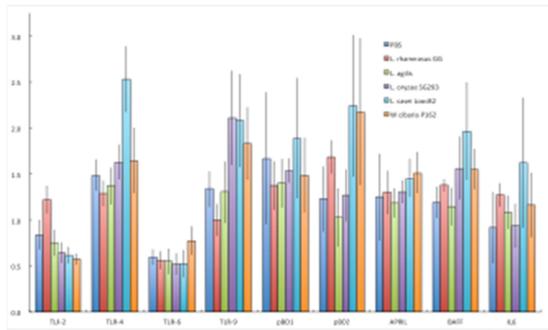


図2 組織と菌株の共培養による、免疫関連遺伝子の発現

そこで、スクリーニングの方法を腸間膜リンパ節の細胞に菌株を添加する共培養に切り替え、48時間後のサイトカイン産生量を測ることで免疫刺激効果を持つ菌株の探索を行った。その結果を図3に示した。

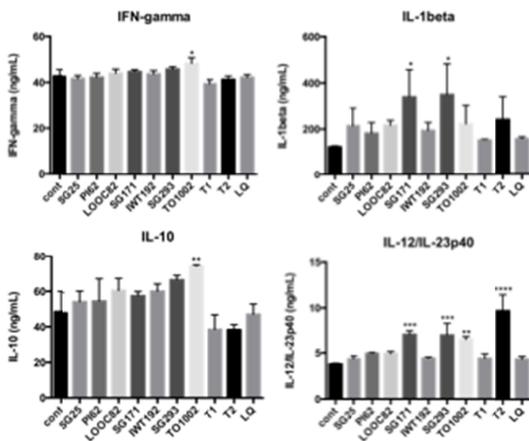


図3 腸間膜リンパ節の細胞と選択菌株の共培養によるサイトカイン産生量(48時間)

本結果から、*L. oryzae* SG293、*L. sakei* SG171の2菌株による刺激は、IL-1bとIL-12/IL-23p40の産生を有意に増加させることが示された。

(5) *L. oryzae* SG293、*L. sakei* SG171の投与試験

L. oryzae SG293、*L. sakei* SG171にサイトカイン産生刺激能がみられたことから、この菌株の投与が離乳子ブタの飼養成績に及ぼす影響について調べた。菌株はMRSで培養後、PBSで洗浄し懸濁した。SG293は 3×10^{10} cell/日/頭、SG171は 1×10^{10} cell/日/頭を1日1回朝9時の飼料給与の際に飼料に飼料に混合して給与した。

SG293とSG171を投与した際の飼養成績と血液中のサイトカイン濃度を表3と4に示した。

表3と4に示した通り飼養成績、血漿中のIL-1b濃度に対照区、菌株投与区の間で明確な差はみられなかった。飼養期間中の下痢の発症等にも、差はみられなかった。

表3 SG293投与試験成績

	対照区	SG293投与区
開始体重(kg)	9.03±0.77	9.34±0.0
終了時体重(kg)	15.07±1.41	15.48±1.68
日増体量(g)		
1週目	198.57±59.42	262.86±136.59
2週目	625.71±61.15	614.29±57.37
全期間	412.14±57.12	438.57±85.99
飼料摂取量(g)		
1週目	260.26±83.03	336.87±99.20
2週目	705.95±107.28	766.39±138.95
全期間	483.10±86.59	551.63±118.91
飼料効率		
1週目	0.780±0.13	0.738±0.25
2週目	0.892±0.06	0.816±0.11
全期間	0.858±0.05	0.798±0.04
血漿中IL-1b濃度(pg/ml)	45.08±8.87	38.46±7.20

表4 SG171投与試験成績

	対照区	SG171投与区
開始体重(kg)	8.82±0.52	8.84±0.78
終了時体重(kg)	14.15±1.32	13.60±1.21
日増体量(g)		
1週目	188.57±68.06	140.00±47.54
2週目	572.86±86.22	540.00±76.20
全期間	381.71±64.71	340.00±56.49
飼料摂取量(g)		
1週目	284.61±44.20	218.46±50.90
2週目	632.17±59.72	613.41±95.46
全期間	458.39±46.88	415.94±64.69
飼料効率		
1週目	0.656±0.17	0.638±0.13
2週目	0.905±0.10	0.883±0.06
全期間	0.828±0.09	0.818±0.06
血漿中IL-1b濃度(pg/ml)	35.86±3.21	36.74±3.17

以上の結果から、幼若期のブタ、ニワトリの回腸粘膜には、SFBの様な宿主の免疫の発達を促すような細菌が生息していることが示された。SFBは成長にしたがっては消失していくこと、粘膜に付着した乳酸生成菌の中には、免疫系の細胞からサイトカイン産生を刺激する菌株が存在することが見いだされた。しかし、これらの菌株を離乳直後の子ブタに経口投与しても、飼養成績には明確な差はみられなかったことから、今後さらに継続して成長促進効果を持つ菌株をスクリーニングしていく必要があると考えられた。

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5件)

Tohno M, Kitahara M, Matsuyama S, Kimura K, Ohkuma M, Tajima K. *Aerococcus vaginalis* sp. nov., isolated from the vaginal mucosa of a beef cow, and emended descriptions of *Aerococcus suis*, *Aerococcus viridans*, *Aerococcus*

urinaeequi, *Aerococcus urinaehominis*,
Aerococcus urinae, *Aerococcus*
christensenii and *Aerococcus sanguinicola*.
Int J Syst Evol Microbiol. (査読有) 64,
1229-1236, 2014
DOI:10.1099/ijs.0.058081-0

Tohno M, Kitahara M, Irisawa T, Inoue H,
Uegaki, R, Ohkuma M, Tajima K.
Lactobacillus oryzae sp. nov., isolated
from fermented rice grain (*Oryza sativa* L.
subsp. japonica). Int J Syst Evol
Microbiol. (査読有) 63, 2957-2962, 2013.
DOI:10.1099/ijs.0.048918-0.

Tajima K, Ohmori H, Tohno M, Ohtsu H,
Tsukahara T, Aminov R. Segmented
filamentous bacteria are a major group in
terminal ileum of piglets. Anaerobe (査
読有) 23,109-111, 2013.
DOI:10.1016/j.anaerobe.2013.07.004.

Tohno M, Kitahara M, Inoue H, Uegaki R,
Irisawa T, Ohkuma M, Tajima K. *Weissella*
oryzae sp. nov., isolated from fermented
rice grains. Int J Syst Evol Microbiol. (査
読有) 63, 1417-1420, 2013.
DOI:10.1099/ijs.0.043612-0.

Tohno M, Kobayashi H, Tajima K, Uegaki R.
Strain-dependent effects of inoculation
of *Lactobacillus plantarum* subsp.
plantarum on fermentation quality of paddy
rice (*Oryza sativa* L. subsp. japonica)
silage. FEMS Microbiol Lett. (査読有) 337,
112-119, 2012.
DOI:10.1111/1574-6968.12014.

〔学会発表〕(計2件)

兼松伸枝, 木元広実, 小林洋介, 田島清. 乳
酸菌の持続的投与が子豚の免疫系へ及ぼす
効果について, 第101回日本養豚学会大会,
2014.10, 宮崎県ニューウェルシティ宮崎

田島清, 大森英之, 大津晴彦, 遠野雅徳. 子
ブタ回腸粘膜中の細菌叢, 日本畜産学会第
117回大会, 2013.09, 新潟大学

〔図書〕(計2件)

Tajima K, Aminov R. Springer, Chapter 5:
Structure and function of a non-ruminant
gut: a porcine model. "Rumen
Microbiology: From Evolution to
Revolution" (Eds, Puniya Anil Kumar,
Singh Rameshwar, Kamra Devki Nandan)
2015.06.

田島 清, 講談社サイエンティフィック, 第4
章「消化と吸収」, 最新畜産ハンドブック
(編: 扇元敬司ら) 2014.07, p222-229

〔産業財産権〕
出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

[http://www.naro.affrc.go.jp/project/res
ults/laboratory/nilgs/2013/nilgs13_s11.
html](http://www.naro.affrc.go.jp/project/results/laboratory/nilgs/2013/nilgs13_s11.html)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田島 清 (TAJIMA KIYOSHI)
独立行政法人農業・食品産業技術総合研究
機構・畜産草地研究所・家畜生理栄養研究
領域・主任研究員
研究者番号: 80343953

(2) 研究分担者

大津 晴彦 (OHTSU HARUHIKO)
独立行政法人農業・食品産業技術総合研究
機構・畜産草地研究所・家畜生理栄養研究
領域・主任研究員
研究者番号: 40455316

(2) 研究分担者

遠野 雅徳 (TOHNO MASANORI)
独立行政法人農業・食品産業技術総合研究
機構・畜産草地研究所・家畜飼養技術研究
領域・主任研究員
研究者番号: 50547718