

## 牛から鶏へ移植した腸内細菌叢の解析

楠本正博<sup>1)</sup>, 岩田剛敏<sup>1)</sup>, 秋庭正人<sup>1)</sup>

### Analysis of intestinal bacterial flora transplanted from bovine to chicken

Masahiro KUSUMOTO<sup>1)</sup>, Taketoshi IWATA<sup>1)</sup> & Masato AKIBA<sup>1)</sup>

#### 背景と目的

腸管出血性大腸菌 (enterohemorrhagic *Escherichia coli*: EHEC) は食品媒介性の人獣共通感染症を引き起こし、1999年4月に感染症法 (感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律) で3類感染症に指定されて以来、本菌感染者の届出数は毎年3,000名を超え<sup>1)</sup>、大きな問題となっている。EHECの主な保菌動物が牛であることから、農畜産物汚染のリスクを低減するためには、牛の生産段階での本菌の効率的な制御技術の開発が必要である。その一つとして、家畜においても乳酸菌を中心とした生菌剤 (プロバイオティクス) の適用が検討されており、*Lactobacillus acidophilus* および *Propionibacterium freudenreichii* の投与により牛の EHEC O157 排菌量が最大1/4程度に減少することが報告されている<sup>2)</sup>。また、同じ菌種でも菌株によって効果がみられない場合があることも報告されており<sup>3)</sup>、生菌剤の効果が菌株または腸内細菌叢に依存していることが考えられる。したがって EHEC 保菌牛を減らすためには、様々な環境で生育し多様な腸内細菌叢を有する牛に対して、より EHEC 排除効果の高い (排菌量をゼロにすることができる) 生菌剤の開発が必要であるが、現状ではハンドリングの容易な実験用小動物を用いた *in vivo* 評価系が確立されていないことが研究の障壁となっている。

実験用小動物として一般的なマウスは EHEC 感染後1~2週間以内に死亡するため、ヒトの治療や感染予防に関する検討には無菌マウス<sup>4)</sup> または specific pathogen free (SPF) マウス<sup>5)</sup> が多く用いられているが、無症状のまま

EHECを保菌する牛のモデルとしては適していない。我々はこれまでに、SPF鶏ヒナの腸管には EHEC O157 がほとんど定着しないが、SPF鶏ヒナへ牛の腸内細菌叢を導入することで定着性が改善され、EHEC O157 の排除効果を有する生菌剤の効果を確認できることを見いだしている (未発表データ)。しかし現状では、牛から鶏への腸内細菌叢の定着性に関するデータがないため、牛の腸内細菌叢を導入した SPF 鶏ヒナの腸内環境が、牛の腸内環境を正しく反映しているのか明らかになっていない。本研究では、EHEC 排除効果の高い生菌剤の開発およびそれに必要な小動物実験系の確立に向けて、次世代シーケンサーを用いた網羅的 16S ribosomal DNA (rDNA) 解析により、牛から SPF 鶏ヒナへ移植した腸内細菌叢の定着性を解析することを目的とした。

#### 研究の概要

##### 1. DNA 調製法の検討

腸内細菌叢には様々な性状の細菌が存在するため、網羅的 16S rDNA 解析では糞便 (牛) または盲腸便 (SPF 鶏ヒナ) からいかに偏りなく細菌由来 DNA を抽出できるかがポイントとなる。そこで、一般的な DNA 抽出法や市販の DNA 抽出キットの他に、網羅的 16S rDNA 解析の文献に記載された改良法を用いて牛糞便からの DNA 抽出を検討したところ、Morita らの方法<sup>6)</sup> が最も DNA 収量が高いことを確認した。糞便 (盲腸便) からの DNA 抽出では溶菌工程が重要と考えられるが、Morita らの方法は溶菌の際にアクロモペプチダーゼを加える点が特徴的であり、これによって特に *Clostridium* 属細菌の DNA 回収率が上がることが示されている<sup>6)</sup>。しかし、本方法により牛糞便から抽出した DNA 溶液は着色しており、これが PCR

1) 農研機構 動物衛生研究所 細菌・寄生虫研究領域

を阻害したため、Morita らの方法に市販のカラムによる DNA 精製を組み合わせることで問題を解決した。この着色は SPF 鶏ヒナの盲腸便から抽出した DNA にはみられないことから、草食動物の糞便に特有の現象かもしれない。

## 2. 網羅的な 16S rDNA 解析

本研究で使用する次世代シーケンサー (Roche 454 GS FLX Titanium) では 500 bp 程度のリード長が期待されるため、16S rDNA の可変領域 3 および 4 を増幅するプライマー<sup>7)</sup>をベースにシーケンス解析用のタグ付きプライマーを設計した。

本研究において牛糞便は、すべてホルスタイン種 29 ヶ月齢 (メス) の直腸便を使用した。(1) 牛糞便, (2) SPF 鶏ヒナ (1 日齢) に牛糞便を投与して 5 日目 (6 日齢) の盲腸便, (3) 牛糞便を投与していない 6 日齢の SPF 鶏ヒナ盲腸便 (動物実験計画書承認番号: 第 09-58 号) について、DNA 抽出および上記のタグ付きプライマーを用いたシーケンス解析を行い、16S rDNA データベースを利用した BLAST 解析により (1) ~ (3) それぞれ約 8,000 リードに対応する菌種を同定した。

網羅的 16S rDNA 解析の結果を門 (phylum) レベルで俯瞰すると、牛糞便を投与した SPF 鶏ヒナの腸内細菌叢の構成は糞便未投与の SPF 鶏ヒナと同様であった (図 1)。これは、1 日齢の SPF 鶏ヒナに導入した牛の腸内細菌叢の大部分が、6 日齢までの間に糞便未投与の SPF 鶏ヒナと同様の腸内細菌叢に置換されたことを示唆する。一方、菌種レベルで細かく見ると、牛糞便を投与した SPF 鶏ヒ

ナの腸内細菌叢における存在量が牛に近い菌種 (図 2A および B)、中間的な菌種 (図 2C)、糞便未投与の SPF 鶏ヒナに近い菌種 (図 2D) など様々であった。

SPF 鶏ヒナにおいて、牛の腸内細菌叢の導入により EHEC O157 の定着性が改善される現象は 6 日齢でも確認され、また、盲腸便の色や臭いなども牛糞便に近いものに変化する (未発表データ)。このような腸内細菌叢の表現型すなわち EHEC O157 の定着性や盲腸便の性状などは、数の上ではマイナーであるが図 2A のように牛の腸内細菌叢に特異的な細菌群を保有すること、または図 2B のように鶏の腸内細菌叢に特異的な細菌群を保有しないこと、あるいは両者の相乗効果により決定されている可能性が考えられる。

### 残された課題

本研究では当初、牛の腸内細菌叢の導入により EHEC O157 の定着性が改善された SPF 鶏ヒナでは、腸内環境が牛に近い状態になっていると予想していた。しかし実際には、その腸内細菌叢の大部分は意外に早い段階で SPF 鶏ヒナ本来の (おそらく食餌など動物の特徴に左右される) 構成に置換されており、牛の腸内細菌叢に特異的な細菌群の残存は少なかった。したがって、牛の腸内細菌叢を導入した SPF 鶏ヒナを (腸管への菌の定着を指標とする) 生菌剤の開発に利用することは可能であるが、牛の腸内環境が反映された小動物モデル実験系としての汎用化は困難と考えられる。

また、本研究の結果は、EHEC など外来性の細菌が腸管へ定着する際には牛の腸内細菌叢に特異的な細菌群が促

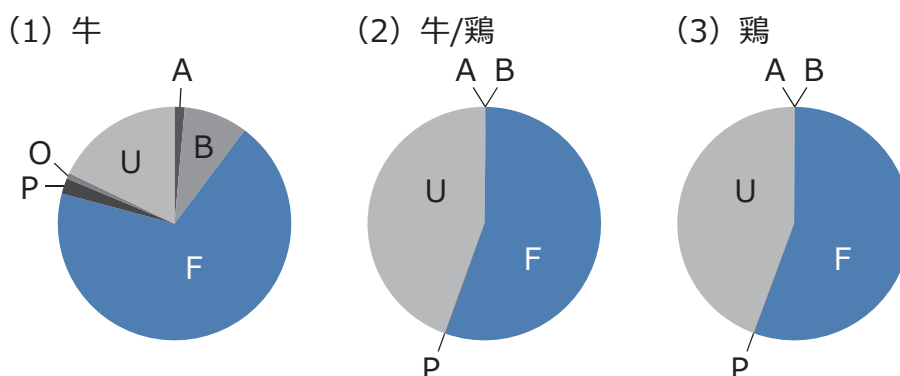


図 1. 腸内細菌叢の構成

(1) 牛糞便 (牛), (2) 牛糞便を投与した SPF 鶏ヒナの盲腸便 (牛/鶏), (3) 糞便未投与の SPF 鶏ヒナの盲腸便 (鶏) それぞれの細菌叢について、門 (phylum) レベルでの存在比率を示す。A, Actinobacteria; B, Bacteroidetes; F, Firmicutes; P, Proteobacteria; O, その他; U, 分類不能。

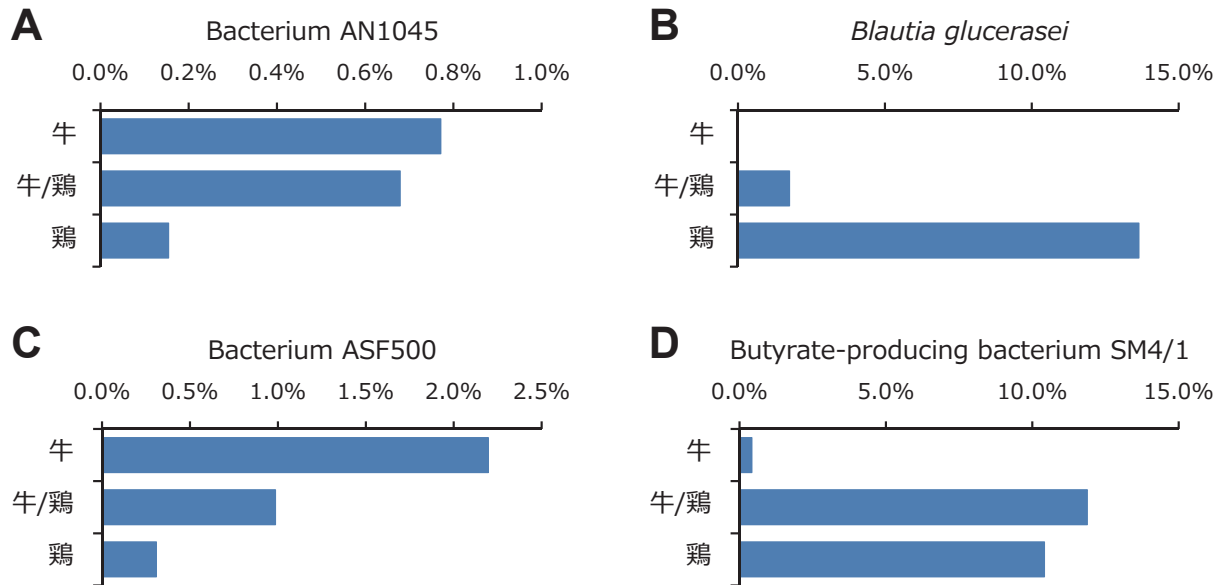


図2. 牛または鶏に特異的な細菌群の分類

細菌叢によって存在量比が特徴的な菌種のうち、代表的なものを示す（%はDNA全体に占める割合）。牛糞便（牛）と糞便未投与のSPF鶏ヒナの盲腸便（鶏）で存在量が大きく異なる、すなわち牛または鶏に特異的な細菌群は、牛糞便を投与したSPF鶏ヒナの盲腸便（牛/鶏）における存在量が牛に近いもの（AおよびB）、中間的なもの（C）、鶏に近いもの（D）に大別される。牛の腸内細菌叢に特異的かつSPF鶏ヒナに定着した細菌群は、Aのパターンを示す。

進的に働く可能性と、鶏の腸内細菌叢に特異的な細菌群が抑制的に働く可能性があることを示唆しており、どちらもEHEC排除効果の高い生菌剤を開発するための重要なヒントになり得る。すなわち、前者の促進的に働く細菌群の働きを抑える仕組みを持つ生菌剤と、後者の抑制的に働く細菌群からなる生菌剤を併用することにより、高いEHEC排除効果が期待できる。今後、品種や生育環境が異なる牛の腸内細菌叢を用いて同様の検討を重ねることで、腸管へのEHECの定着性に影響を与える細菌群を同定することができると考えられる。

### 謝辞

本研究は平成21～22年度動物衛生研究所重点強化研究課題として実施した。

### 引用文献

- 1) 国立感染症研究所病原微生物検出情報 (<http://www.nih.go.jp/niid/ja/iasr.html>)
- 2) Stephens, T.P., Loneragan, G.H., Karunasena, E., et al.: Reduction of *Escherichia coli* O157 and *Salmonella* in feces and on hides of feedlot cattle using various doses of a direct-fed microbial. *J. Food Prot.* 70, 2386-2391 (2007).

- 3) Raeth-Knight, M.L., Linn, J.G. & Jung, H.G.: Effect of direct-fed microbials on performance, diet digestibility, and rumen characteristics of Holstein dairy cows. *J. Dairy Sci.* 90, 1802-1809 (2007).
- 4) 澤村貞昭, 田中和生, 古賀泰裕: 腸管出血性大腸菌 O157 に対する抗生物質の有効性に関する検討 - 無菌マウスを用いた解析 - . *感染症学雑誌* . 73, 1054-1063 (1999).
- 5) Tsutsuki, K., Watanabe-Takahashi, M., Takenaka, Y., et al.: Identification of a peptide-based neutralizer that potently inhibits both Shiga toxins 1 and 2 by targeting specific receptor-binding regions. *Infect. Immun.* 81, 2133-2138 (2013).
- 6) Morita, H., Kuwahara, T., Ohshima, K., et al.: An improved DNA isolation method for metagenomic analysis of the microbial flora of the human intestine. *Microbes. Environ.* 22, 214-222 (2007).
- 7) Nossa, C.W., Oberdorf, W.E., Yang, L., et al.: Design of 16S rRNA gene primers for 454 pyrosequencing of the human foregut microbiome. *World J. Gastroenterol.* 16, 4135-4144 (2010).