

総 説

動物腸内細菌叢の解析と鶏のサルモネラを制菌する生菌剤の開発

稲元 民夫*

秋田県立大学 生物資源科学部
秋田県秋田市下新城野字街道端西 241-438 〒010-0195

2014年1月8日受付, 2014年1月27日受理

はじめに

筆者は、ルーメン上皮の吸収構造について研究していたことから、大学院修了後全国酪農業協同組合連合会に奉職することとなったが、会の方針として獣医師は、一度は臨床の現場を経験することを義務づけていたことから、宮城県小牛田にあった乳業工場の工場付き獣医師として勤務することとなった。学生時代は、自分には臨床など到底無理と考え、国家試験は受験しても免許は申請せず放りばなしになっていたものを慌てて申請し、何もまま農家の中に飛び込んだ訳だが、そんな未熟な若造を農家は暖かく迎えて下さった。それに応えようと先輩獣医師の良い指導を得て牛の診療技術は向上していったが、懸命に努力すればするほど、信頼されるという、こんな喜びを感じることは想像もしていなかったし、大きな自信にも繋がった。小牛田は、ササニシキの本場、大崎平野の縁に位置し、担当酪農家は全て稲作農家でもあった。小さい頃、田植えをした経験はあっても、稲作については全くと言って良いほど無知であり、農家を巡回しても、農業に関する時候の挨拶も出来ない状態であった。しかも、古川市(現大崎市)の4Hクラブの顧問に祭り上げられたことから、日本の農業の中心である稲作を否応なしに知らなくてはならない事となった。獣医学と言えども農学の一部で有り、小牛田での13ヶ月は学生時代の農業に関する勉学の足らなさを反省させられた日々でもあった。この経験が大学に戻っても、農業の現場の役に立つ仕事がしたいという自分のスタンスを決める大きな要因となった。

抗生物質と耐性菌の問題

第二次大戦後、急速に開発の進んだ抗生物質は、その劇的な効果をもって人類の平均寿命を伸ばす大きな原動力となった。これは、畜産においても同様で、クロルテトラサイクリンの鶏に対する成長促進効果が明らかにされて以来、飼料添加剤として畜産の生産性を飛躍的に向上させた。しかし、抗生物質が普及するにつれ、耐性菌の出現という新たな問題が浮かび上がり、アメリカ食品医薬品局(FDA)の長官はかつての「我々は魔法の弾丸を手に入れたから、もう感染症は心配ない」との発言の撤回を余儀なくされている。我が国でも抗菌剤の使用が本格的になってきた1951年の2年後には、耐性赤痢菌が出現し、10年後には、分離頻度は、約20%にも達している。

筆者は、全酪連の技術研究所から1977年に東北大学農学部畜産学科の家畜衛生学研究室の助手として動物用抗生物質の新薬開発に携わることとなったが、安全な畜産物の供給につながる研究として、解剖学から臨床へ、そして酪農全般に関わる試験研究(主に飼養関連)から微生物学への転換も現場の役に立てる仕事と喜んで受け入れた。最初に取り組んだのがチルミコシンで、この過程で、ほとんどの動物病原細菌を扱うこととなり、今に繋がる細菌学の基礎を身につける事となった。その後も、様々な新薬・旧薬の開発・再評価に携わったが、ある時、動物薬に携わっている大学の同級生から薬学の常識にはない組み合わせの抗生物質について、有効性を確認して欲しいとの依頼があった。理由を尋ねると、耐性菌だらけで、こんな組み合わせを試すぐらいしか方策がないと云う。以前から、薬剤の有効性を確認する際に行う耐性化試験で、いとも簡単に耐性菌が作出できることから問題を感じてはいたが、改めて自分がそれまで行った数千

* 連絡者: 稲元 民夫 (いなもと たみお)
(秋田県立大学 生物資源科学部)
〒010-0195 秋田県秋田市下新城野字街道端西 241-438
Tel. 018-872-1576 Fax. 018-872-1676
E-mail: inamoto@akita.pu.ac.jp

株の感受性データを見直してみると、やはり抗生物質開発以前に分離された標準菌株以外の野外分離株の多くが耐性菌であった。

こんな時に起きたのが、1986年の欧州におけるバンコマイシン耐性腸球菌 (Vancomycin Resistant Enterococci, VRE) の出現である。VREはバンコマイシン (メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) の治療に用いられる抗生物質) に対し、耐性を獲得した腸球菌で、発生源としてバンコマイシンと化学構造が類似する家畜用抗生物質アポパルシン使用養鶏場が浮かび、そこで採取されたアポパルシン耐性腸球菌は、全てバンコマイシン耐性であった。腸球菌は、Micrococcus科に属し、その耐性遺伝子 *vanA* はプラスミド、*vanB* は染色体上の動く遺伝子トランスポゾンであることから、他の Micrococcus科細菌、特に MRSA へ伝達が懸念され、当時の医学界からは「飼料添加抗菌剤の使用禁止」の声が上がることとなった。欧州ではその流れから、現在では特定の動物専用抗菌剤を除き、家畜飼料への添加が制限されている。日本でも1987年に耐性菌は養鶏場から検出されなかったが、否定も出来ないとしてアポパルシンとティコプラニンの飼料添加剤承認が取り消された。ウシのルーメン発酵制御にアポパルシンの効果を調べた経験から、耐性化しやすい物質であると認識していたが、こんな事態となっても自分自身でどうすべきか答えは見つからなかった。

サルモネラ食中毒の増加と生菌剤の開発

VREが問題となっていた一方で、1980年代の初めからイギリスでは *Salmonella* Enteritidis (腸炎菌) による卵のサルモネラ汚染が問題となっていた。これは日本にも波及し、それまで食中毒の第一原因であった腸炎ビブリオを抜いて1991年には原因の第一位となっている。その対策として注目されたのが、Nurmi & Rantala (1973) が提唱していた、菌種の明らかになっている成鶏の腸内細菌、または成鶏の盲腸内容物を初生雛に投与してサルモネラの定着を阻止しようとする Competitive Exclusion (CE法、競合排除法) である。サルモネラは細胞寄生性の菌で感染するのは腸内細菌叢が未発達なヒナの時期であり、腸内細菌叢の持つ外来菌排除能を応用して、この時期の感染を防御すれば、卵の汚染を防ぐことが出来る。毎日産卵するレイヤーに抗菌剤を投与することは残留の問題から不可能であるし、耐性菌を作る事にもなる。しかも2500種も血清型のあるサルモネラのワクチンの有効性は限られている。これに対し生菌剤は抗菌剤のように治療効果はないものの、その一つである乳酸菌の長年の使用経験から安全性も確認されており耐

性菌の問題も無い。何よりも汚染農場の清浄化も実証されていることから、世界保健機関 (WHO) も養鶏場におけるサルモネラ対策の基本として推奨しているものである。当時、国内ではすでに Nurmi 博士自身が開発した CE 剤も市販されていたが、多くの組合員を抱える全農では、国産化を検討することになり、耐性菌対策を模索していた筆者らが担当することとなった。以来、腸内細菌のもつその多様性と機能の複雑さの魅力に取り憑かれ、今日に至っている。

腸内細菌叢の解析と生菌剤の改良研究

全農と共同開発した「CE テクト」は、当初、盲腸内容物を1000倍に希釈すると効果が無くなると言われていたヒトのワクチン製造用卵生産のための特定病原菌フリーの SPF 鶏をソースとしなくてはならなかったため、製品化が難航したが、培養法を工夫する事により、採算ベースに乗せることが可能となり、更には、Mead et al. (1989) が標準化していた CE 評価法に用いられているサルモネラよりも強毒な東京都サルモネラ食中毒由来株を完全に防御可能なまでに強化することが出来、2000年4月から発売される事となった。

1995年に秋田県立農業短期大学に移ってからは、CE テクトの骨格がほぼ固まったことから、最終仕様の決定や競合製品との比較試験を行う一方、CE テクトの弱点を克服することと、予想される対抗製品に対処すべく、次期製品の開発に取りかかった。

CE テクトは、ヒトのワクチン製造用の卵を生産する SPF 鶏の盲腸内容物をソースとしているため、コストが高く、増産も容易ではない。また、凍結乾燥処理はされていないため、保存期間が短く受注生産となっている。更に、CE テクトは、サルモネラ排除に関与する有効菌が不明な未同定の盲腸内容物の培養物であり、薬効としてサルモネラ排除効果を謳えず飼料原料扱いとなっていることも問題であった。その解決のためには、有効菌を特定し、既知菌株の組み合わせによる製品を開発しなくてはならないが、有効菌を特定するための指標とすべきものが容易には見つからず、まずは現行製品の凍結乾燥化を目指して、排除能強化を図ることとした。

そんな折り、1999年から現在の秋田県立大学へ移ることとなったが、嫌気性菌の取り扱いには習熟が必要なことから、それまでの培養法による菌叢解析には限界を感じ始めていた。そんなところに、CE テクトの散霧投与による有効性を証明するため、投与後の菌叢の変化を明らかにする必要性に迫られた。日毎の菌叢の変化を15種類の培地を用いて追跡したところ、CE テクト投与

後1日でバクテロイデス, ES, BS培地上に有意な菌数増加を確認し、一般にCE剤の投与効果が見られなくなる4日後まで続いた以降は、無投与対照区と違いが見られなくなった(図1)。この事は、CE剤投与後1日、サルモネラ感染直前に盲腸内で増加している菌が、サルモネラ排除に関与している可能性を示しており、この増加した菌を同定すれば、有効菌を特定出来るものと考えられた。

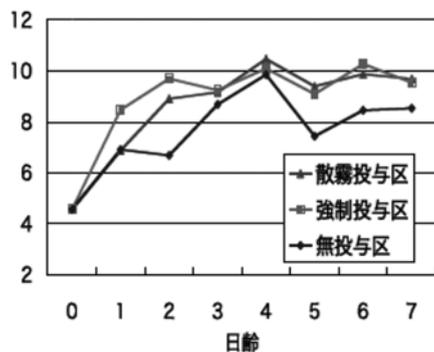
同定するに当たっても従来の生化学的性状試験による菌の同定法では、時間も労力も要し簡単ではないが、幸い、本学には生命科学支援センター(現、バイオテクノロジーセンター)という、DNA塩基配列解析を受託する施設があり、コストも安く効率的に菌種が同定可能な事から、菌叢解析も再現性が高く、斉一性のある16SrRNA遺伝子を解析する手法を培養法と併用することとした。

同定結果は、3培地上の菌は全て、バクテロイデス属であり、少なくともES, BS培地では本来選択されるべき菌種は見られなかった。その後、ウシやブタでも培養法による腸内細菌叢解析結果を16SrRNA遺伝子解析法により検証したところ、ウシ(搾乳牛主体)は各選択培地とも比較的高い選択性を示したが、鶏同様ブタは、抗生物質感受性の差で選択性を付与している培地は、全

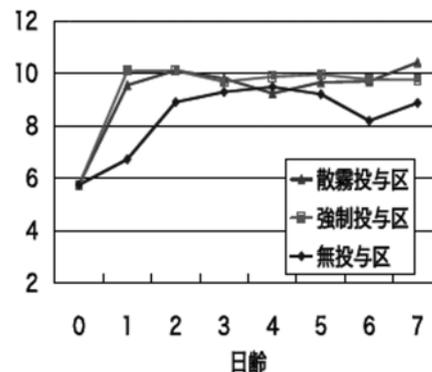
く選択性を示さなかった。筆者が用いている嫌気性菌の選択培地は、昭和20年代に開発されたものであり(上野ら, 1982)、その後の飼料添加剤としての抗菌剤の投与の影響を大きく受け、各菌種の薬剤感受性が違って来たためではないかと考えられる。ここでも耐性菌の問題を思い知らされる事となった訳である。

その後、Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE)法も併用してCEテクトと投与ヒナの菌叢を解析したところ、いずれの場合でも最優占菌はバクテロイデス属で有り、サルモネラ排除の主体であると考えられた。バクテロイデス菌を有効菌として選抜するに当たって、同じ菌株を分離するなら14代継代培養しても有効な通常飼育鶏から分離した方がより効力が強い菌が得られるものと考えた。そこで、この効力確認済みの養鶏場から入手した盲腸内容物でCE剤を試作し、このCE剤中に存在する菌と盲腸内に優占的に定着する菌との共通する菌がサルモネラ排除の主体菌であるとの考えから培養法とDGGE法により解析と菌の採取を行った。その結果、CEテクトの場合と同様、3培地上に菌数の増加を認め、DGGE法ではバクテロイデス属が主体の菌叢であることが明らかとなった。しかし、試作CE剤投与区2日齢の盲腸内容物から菌の単離し同定したところ、CEテクト

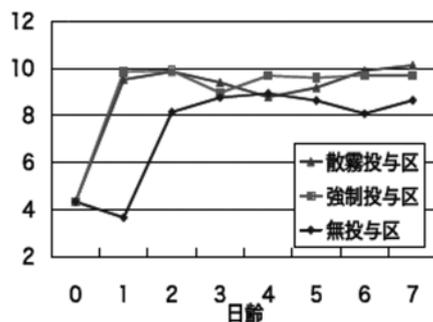
Bifidobacteria 菌数推移 (実験 1)



Bifidobacteria 菌数推移 (実験 2)



Eubacteria 菌数



Bacteroidaceas 菌数

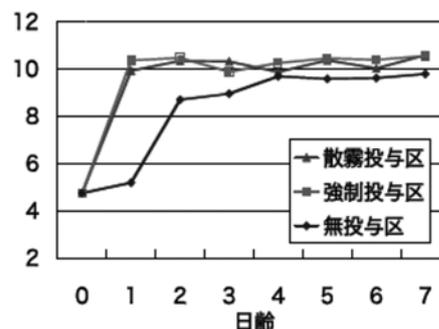


図1. CEテクト散霧投与による各種盲腸内菌数の変化

とは異なり *Enterococcus mundtii* が検出された。得られた菌のサルモネラ排除能を共同研究者である科学飼料研究所で確認したところ、31 株中 16 株に排除能を確認し、3 株は単独で完全な排除能を示すことが明らかとなった。これまで成鶏の盲腸内容物と同等のサルモネラ排除効果を持つ同定済細菌の組成をみても、最小で 28 種類の組み合わせであり、単一菌種で完全な排除が可能なものは報告されていない。そこで、極めて増体効果の高い *E. faecalis* と合わせて、平成 25 年 3 月に特許を申請した。

E. mundtii は、これまで生菌剤として使われたことは無く、その実用化に当たっては、安全性の確認はもちろん、単独菌種の投与による、その後の腸内細菌叢形成への影響を確認することが求められることから、現在、基礎的な確認試験を進めているところである。

腸内細菌叢解析の新しい動き

近年、いわゆる次世代シーケンサーの普及により、農学分野でも様々な解析が行われるようになってきた。本学にも 2011 年度にロングリード型 1 台とショートリード型 2 台が導入され、比較的低コストでの利用が可能となった。そこで、これを中国甘粛省の高原ミニ豚の腸内細菌叢の網羅的解析に応用するに当たり、一般に抽出効率が低いとされるグラム陽性菌主体の菌叢では *E. mundtii* が検出されない場合があった事から、グラム陰性・陽性菌問わず網羅的に抽出が可能な DNA 抽出法を検討した。その結果、改良 Venter 法 (Morita et al., 2007) がグラム陰性菌・陽性菌ともに最も高い DNA 抽出量を示し、DNA 長も長い断片が得られた (河田ら, 2012a)。これにより高原ミニ豚は *Clostridium* 属の中でも *C. disporicum* が主体の特異な菌叢を持つことが明らかとなった (河田ら, 2012b)。従来用いて来た DNA 抽

表 1. 腸内細菌叢に関する遺伝子解析法の比較

	コロニー PCR 法	定量 PCR 法	FISH 法	DGGE/TGGE 法	RISA 法	T-RFLP 法
多様性解析	×	×	×	○	○	◎
簡便性	○	○	○	○	◎	◎
測定時間	3 時間	3 時間	3 時間	12 時間	1 時間以内	1 時間以内
定量性	×	◎	◎	半定量	1 時間以内	1 時間以内
検出限界 (細胞数/g)	10 ²	10 ²⁻³	10 ⁵	無?	無?	無?
データベース化	×	?	?	○	◎	◎
菌株の採取	◎	○	○	×	×	×
同定性	種レベル	種/属レベル	種/属レベル	属レベル	種レベル	種レベル
検索対象	特定の菌種・菌群			単純な微生物叢	単純な微生物叢	複雑な微生物叢

辨野義巳：究極のヨーグルト健康法より改変

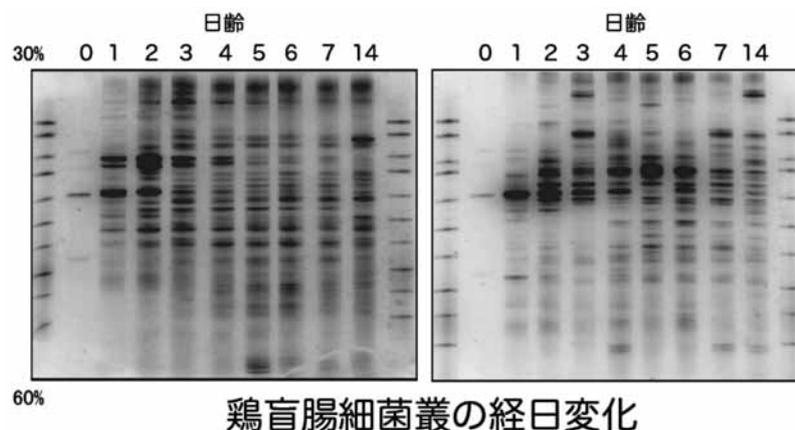


図 2. DGGE 法による鶏盲腸細菌叢解析の例

プライマー：357f-GC/518r (v3 領域)
 タッチダウンPCR
 変性剤：7M 尿素/40% ホルムアミド (100%)

出法は、グラム陰性菌を主体とする菌叢をもつヒトを対象に開発されたキットを用いており、そのためグラム陽性菌主体の菌叢であった試作 CE 剤では、抽出効率が極めて低い *E. mundtii* は検出されなかった事もまた判明した。牛では搾乳牛が主体で、放牧牛はまだ確認していないが、放牧豚や比内地鶏のような放し飼いの鶏では、その腸内細菌叢の主体はグラム陽性菌になっていることが多いので、解析に当たっては注意を要すると思われる。

これまで腸内細菌叢の解析に当たって、様々な 16SrRNA 遺伝子を解析する手法を検討してきたが、簡便性に優れ、定量性が高く、しかも安価で 800 種類も存在すると言われる腸内細菌叢解析に適した方法は無いと云ってよい (表 1)。我々は、今のところ改良 Venter 法による DNA 抽出と DGGE 法の組み合わせが、最も効率的と考えている。DGGE 法は、ゲルが手作りであるため再現性が低く、手間も掛かり、菌の定量性も低いが、視認性が良く、菌叢変化を大まかに掴むことが出来る (図 2)。詳細な解析が必要となれば、次世代シーケンサーによる網羅的な解析を行えば良く、また菌を採取する必要がある場合には、培養法を組み合わせる事としている。

残された時間は少ないが、これらの解析法を駆使して腸内細菌の機能を明らかにするとともに、CE 剤の作用機序の解明に迫りたい。

引用文献

- 上野一恵, 光岡知足, 渡辺国友. 日本細菌学会教育委員会編 細菌学叢書 3 嫌気性菌の分離と同定. 菜根出版. 東京. 1982.
- 河田和, 志村洋一郎, 福島淳, 稲元民夫. 豚腸内細菌叢解析における DNA 抽出法の検討. 第 115 回日本畜産学会大会 (名古屋市). 2012a.
- 河田和, 志村洋一郎, 廬建雄, 福島淳, 稲元民夫. 蕨麻豚における腸内細菌叢の解析. 第 62 回東北畜産学会大会 (秋田市). 2012b.
- Mead GC, Barrow PA, Hinton MH, Humbert F, Impey CS, Lahellec C, Mulder RWA, Stavric S, Stern NJ. Recommended assay for treatment of chicks to prevent *Salmonella* colonization by competitive exclusion. *J.Food Prot.* 52:500-502. 1989.
- Morita H, Kuwahara T, Ohshima K, Sasamoto H, Itoh K, Hattori M, Hayashi T, Takami H. An improved DNA isolation method for metagenomic analysis of the microbial flora of the human intestine. *Microbes Environ.* 22 :214-222. 2007.
- Nurmi E, Rantala M. New aspects of *Salmonella* infection in broiler production. *Nature*, 241 :210-211. 1973.