

糖資化性を利用したマウス消化管内
Lactobacillus 属乳酸菌の簡単な同定方法の構築

端 秀子・竹田保之・大森英晶
安藤功一・菊地政則

Development of a rapid identification method for the resident *Lactobacillus* species in the mouse intestinal tract with the carbohydrates fermentation pattern

Shuko HATA, Yasuyuki TAKEDA, Hideaki OMORI,
Kouichi ANDOH and Masanori KIKUCHI

酪農学園大学紀要 別刷 第31巻 第1号

Reprinted from

”Journal of Rakuno Gakuen University” Vol.31, No.1 (2006)

糖資化性を利用したマウス消化管内 *Lactobacillus* 属乳酸菌の簡単な同定方法の構築

端 秀子・竹田保之*・大森英晶*
安藤功一*・菊地政則*

Development of a rapid identification method for the resident *Lactobacillus* species in the mouse intestinal tract with the carbohydrates fermentation pattern

Shuko HATA, Yasuyuki TAKEDA*, Hideaki OMORI*,
Kouichi ANDOH* and Masanori KIKUCHI*
(June 2006)

緒 言

1960年代初頭より開始されたヒトや動物の消化管内菌叢に関する研究によって、それが宿主の健康と疾病に重要な役割を果たしていることが明らかにされてきた。この研究領域の飛躍的な発展において、消化管内に常在している嫌気性菌の分離培養方法の確立が大きく貢献していることは間違いない。消化管内常在菌の代表的菌種であった大腸菌や、腸球菌から常在乳酸桿菌を含む大多数の偏性・通性嫌気性菌の消化管内における生態が明らかとなり、ヒトおよび動物の消化管内フローラの構成菌種が詳細に解明されるようになった¹⁾。また近年、遺伝子レベルでの研究も急速に進展し、分子生物学の知識と技術が細菌分類学にも適用できるようになり、系統分類と種概念に基づいて分類・同定することができるようになった。特に rRNA は生物全般に共通な分子としてその遺伝子 rDNA の塩基配列が詳細に調べられ、データベース化されることにより、細菌の系統進化、属・種の分類・同定、および識別に広く応用されている²⁾。

消化管内フローラの中でも乳酸菌は、ヒトや動物の健康に重要な役割を果たしている。乳酸菌は特に、整腸作用、免疫賦活、抗腫瘍性、抗変異原性、血清コレステロール低下作用、血圧低下作用など宿主の生体防御機構を活性化する生理効果を持っており、注目を集めている。このような生理効果は食品としてだけでなく、医薬品としての開発の対象とも

なっている。ヒト腸管内における菌叢は出生時から老齢期に至る一生を通じて変動する。通常、腸内菌叢は宿主と強い共生関係の成立している定住性菌叢と弱い共生関係を保っている非定住細菌とに大別される。これらは宿主に対して生体防御と疾患発現の2つの機能を発揮するが、主に定住性菌叢は栄養の争奪によって病原性細菌を主とする非定住性菌叢のコロニー化を防ぎ、外部から侵入する菌群に対して抗菌性物質や静菌性物質を生産して常住化を阻止する働きをする。常住性細菌を構成する細菌のうち、*Bifidobacterium* や *Lactobacillus* 属乳酸菌は宿主の健康維持のうえで欠かすことのできない菌種であり、その菌数の多寡は腸内菌叢の健全さを知る指標になっている³⁾。

このような生理効果をもたらす細菌はプロバイオティクス (probiotics) と呼ばれ、近年その研究が盛んに行われている。プロバイオティクスとは「腸内フローラのバランスを改善することにより、人などに有益な作用をもたらす生きた微生物」と定義されている⁴⁾。中でも、*Lactobacillus* 属、*Bifidobacterium* 属および *Enterococcus* 属などの微生物は、プロバイオティクスとして良く研究されており^{5,6,7,8)}、これらの微生物を利用した製品の開発が盛んに進められている。

プロバイオティクスの条件として望まれるものは i) 宿主の常在性細菌であること、ii) 胃酸や胆汁酸などの消化管上部のバリアー中でも生存できること、iii) 下部消化管で増殖可能なこと、iv) 便性改

酪農学園大学大学院酪農学研究科

Department of Dairy Science Research, Rakuno Gakuen University Graduate School, 582 Bunkiyodai-Midorimachi, Ebetu, 069-8501, Japan

* 酪農学園大学酪農学部食品科学科

Department of Food Science, Faculty of Dairy Science, Rakuno Gakuen University, Ebetu, Hokkaido, 069-8501, Japan

善, 腸内菌叢のバランス改善および腸管内腐敗物質の低下などの有効効果を発揮すること, v) 食品の形態で生菌として維持可能なこと, などが挙げられる⁹⁾。これらの特性の把握には *in vitro* および *in vivo* さらにはヒトを被験者とした試験が利用されている。特にマウスやラットは比較的操作が容易であり, 様々な効果測定系が確立されていることから広く用いられている。

プロバイオティクスや消化管内常在性のプロバイオティック作用を有する微生物を選択的に増殖させる, いわゆるプレバイオティクスの効果判定に際しては, これら微生物の選択的測定や詳細な菌種の把握などが望まれる。これまで行われている培養特性, 生化学的特徴, ならびに 16S rDNA 解析などの手法を組み合わせることで菌数や菌種の把握は確実にできるが, 短時間で多くの試料を処理することは難しいと言える。近年, オリゴヌクレオチドプライマーを用いた PCR や DGGE 法などの分子生態学的手法を用いた菌叢解析方法が開発されてきた²⁾。しかしながら, これらの方法は菌種の同定を正確かつ迅速に行うには非常に有効な手段であるが, 定量的に菌数を把握するには特殊な操作を必要とし, 簡便な方法とはまだ言えない。

そこで本研究では, 消化管内に存在するプロバイオティクス菌の 1 種である *Lactobacillus* 属の菌種解析のための基礎的研究として, 96 ウェルマイクロプレートを用いた糖資化性試験による *Lactobacillus* 属乳酸菌種の簡便かつ迅速な同定方法の構築を試みた。

材料および方法

1. 実験動物

6~9 週齢の雌性 BALB/c マウス(日本エスエルシー株式会社, および日本チャールズ・リバー株式会社) 4 匹を使用した。

2. マウス糞便および胃壁サンプルの調製

マウス糞便は滅菌プラスチックシャーレにて採取し, 採取後 15 ml チューブ(No.2325-015, IWAKI)へ移し重量測定をして 99 倍量の生理食塩水を加え (10^{-2} 希釈), 薬さじで細かく懸濁した後, 懸濁液 0.5 ml を 4.5 ml の生理食塩水で 10^{-7} まで 10 倍毎に希釈した。胃壁は切除後, 内容物を Phosphate-buffered saline (PBS) で洗浄して 99 倍量の生理食塩水を加えホモジナイズし, 同様に 10^{-7} まで希釈した。

3. マウス消化管内 *Lactobacillus* 属乳酸菌の分離と培養方法

Rogosa 寒天培地 (1.05413, MERCK) および Rogosa 寒天培地に Vancomycin (V-2002, SIGMA) を $20 \mu\text{g/ml}$ となるように加えた 2 種類の培地と LBS 寒天培地 (211327, Becton Dickinson and Company) に塗抹した後, アネロパック (三菱ガス化学株式会社) を用い, 37°C で 48 時間嫌気培養を行った。得られたコロニーを正円, 乳白色で表面・周縁とも平滑なコロニー (球形, Smooth) と不定形, 乳白色または乳褐色で表面・周縁とも粗造なコロニー (毛球形, Rough) に分類し¹⁰⁾, 各々菌数を測定した後, 各寒天培地から数コロニーずつ白金耳にて鈎菌し, MRS 液体培地 (No.CM359, OXOID) にて 37°C で 24 時間培養した。

4. マウス消化管内 *Lactobacillus* 属乳酸菌の同定

(1) 形態学的特徴および培養特性

MRS 液体培地にて培養した菌株の生育状態を肉眼で観察するとともに, pH メーター (HM-50S 東亜電波工業株式会社) により培養液中の pH 変化と 660 nm における濁度 (UV-1600 島津製作所) を測定し, 生育の指標とした。寒天培地上でのコロニー形状の観察, グラム染色および顕微鏡による形態観察, カタラーゼ試験, グルコースからのガス発生試験, 生育至適温度試験は, 乳酸菌実験マニュアル¹¹⁾ に従って行った。また, 培養液中に生成される乳酸の旋光性を F-キット D-乳酸/L-乳酸 (ロシユ・ダイアグノスティックス株式会社) で調べた。

(2) 16S rDNA 塩基配列の解析

1) 菌体からの DNA 抽出

対象となる菌株を MRS 液体培地にて培養し, 培養液 1 ml をマイクロチューブに移し, 遠心分離 (5415 R, エッペンドルフ株式会社, 7,600 rpm, 4°C , 10 分間) を行い, 得られた菌体を生理食塩水を用いて同様の条件で洗浄し, 菌体を回収した。最終的に得られた菌体を 20 mg/ml リゾチーム (Merck) を含む TE+Triton X-100 バッファー (20 mM Tris, 2 mM EDTA, 1.2% Triton X-100, pH8.0) $180 \mu\text{l}$ に懸濁した後, 37°C で 30 分~1 時間インキュベートした。以降の DNA 抽出には DNeasy Tissue Kit (No.69504, 株式会社キアゲン) を用いた。得られた DNA 抽出物の濃度および純度を算出するため, サンプル $50 \mu\text{l}$ を採り $1 \times \text{SSC}$ 溶液 (15 mM クエン酸三ナトリウム, 150 mM NaCl) で 20 倍希釈し, 260 nm および 280 nm にお

ける吸光度を分光光度計 (UV-1600 島津製作所) を用いて測定した。

2) PCR

PCR チューブ (Porex Bio Products inc) に 10× PCR バッファー (Promega Corporation) 10 μ l, 25 mM MgCl₂ 6 μ l, NTP 混合溶液 (dATP, dCTP, dGTP, dTTP, 各 1.25 mM) 5 μ l, プライマー-27 f および 1492 r 各 0.6 μ l, 5 U/ μ l *Taq* ポリメラーゼ 0.5 μ l と 75 ng の DNA を含む抽出液を加え、最終的にミリ-Q水で 100 μ l とした。この反応液をサーマルサイクラー (PTC-150 MiniCycler™, MJ Japan) を用いて 94°C で 1 分間予備加熱した後、94°C で 30 秒, 49°C で 30 秒, 72°C で 2 分間の条件下で 30 サイクルさせ、最後に 72°C で 10 分間の加熱で反応を停止させた。PCR 産物の精製には PCR Purification Kit (No.28006, 株式会社キアゲン) を用いた。得られた PCR 産物を 0.2 ng/ml エチジウムブロマイド添加 1% アガロースゲルと 0.8×TAE バッファー (32 mM Tris, 16 mM 酢酸ナトリウム, 1.6 mM EDTA, pH8.0) を用いて電気泳動 (株式会社アドバンス) を行い、トランスイルミネーター (High Performance Ultraviolet Transilluminater フナコシ株式会社) 上で PCR 産物を確認した。

3) 16S rDNA 塩基配列の解析方法

シークエンス用試料は ThermoSequenase™ Cycle Sequencing Kit (USB Corporation) を用いて調製した。すなわち、マスターミックス用チューブに精製した PCR 産物 5 μ l, 1 pmole/ μ l IR 800 色素標識プライマー-27 f 2 μ l, 2.5 mM dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) 各 1 μ l, Reaction バッファー 2 μ l, ThermoSequence™ ポリメラーゼ 2 μ l, ミリ-Q水 2 μ l を調製し、指ではじくように混合した。次に、ターミネーション反应用チューブに A/C/G/T の各ターミネーションミックスチャーを 4 μ l とマスターミックスを 4 μ l 加え、サーマルサイクラーにセットして 95°C で 5 分間の予備加熱を行った後、95°C で 30 秒, 50°C で 15 秒, 70°C で 50 秒の条件下で 30 サイクルさせ、4°C に保持した。その後、各チューブに IR² Stop Solution を 4 μ l 入れ、再度サーマルサイクラーで熱変性 (92°C, 2 分間) させ、直ちに氷上に置いた。

電気泳動はアロカ株式会社の NEN Global Edition IR² System DNA Analyzer を用いた。KB^{PLUS} Gel Matrix 5.5% (LI-COR) 30 ml に 10% APS 200 μ l と TEMED 20 μ l を加え、41 cm のガラスプレー

トを用いてゲルを作製した。2000 V, 25 mA, 50W, 45°C, 9 時間の条件下で 0.8×TBE バッファー (LI-COR) を用いて電気泳動を行った。得られた DNA 配列は DDBJ のデータベースで検索して菌種の同定を行った。

5. 96ウェルマイクロプレートを用いたマウス消化管内 *Lactobacillus* 属乳酸菌の糖資化性試験

(1) 糖添加基質溶液の調製

マウス糞便中に存在が示唆された *Lactobacillus* の糖資化性の報告^{12,13,14)} から、それらを分類可能と思われる 11 種類の糖 (Glucose, Sorbitol, Trehalose [関東化学株式会社], Cellobiose, Rhamnose [キシダ化学株式会社], Mannose, Melibiose, Xylose, Mannitol, Salicin, Arabinose [和光純薬工業株式会社]) を選択した。Bromocresol purple (BCP) を含む基質培養液 (1 L 当たり: Proteose peptone 2.0 g, Yeast extract 1.5 g, Tween20 1 ml, Sodium acetate · 3H₂O 5.0g, Magnesium sulphate · 7H₂O 0.492g, Potassium dihydrogen phosphate 2.0g, Manganese sulphate · 5H₂O 0.08g, BCP 0.22g, 0.3M Na-Phosphate buffer [pH7.5] 40 ml, [pH7.0, 121°C, 15 分間オートクレーブ]) と滅菌済糖液 (0.4%, 121°C, 15 分間オートクレーブ) を 1 : 1 で混合し、11 種類の糖添加基質培養液を調製した。

(2) 分離菌株の培養菌液の調製

マウス糞便中 *Lactobacillus* 分離菌株を LBS 寒天培地に再度線画して 37°C で 48 時間嫌気培養した。形成された単独コロニーを各々 4 個ずつ釣菌し、各ウェルに 800 μ l の MRS 液体培地が入った 48 ウェルマイクロプレートに懸濁して 37°C で 24~48 時間嫌気培養した。MRS 培養液を遠心分離 (RLX-135, 株式会社トミー精工, 1,800 rpm, 4°C, 20 分間) し、上清を吸引除去し、800 μ l の生理食塩水を入れて洗菌後、遠心分離 (1,800 rpm, 4°C, 10 分間) を行った。この操作を 3 回繰り返す、最終的に得られた菌体を 500 μ l の生理食塩水で懸濁して菌液とした。

(3) 糖資化性試験

96 ウェルマイクロプレート (Greiner bio-one) の「1」の列に糖を含まない基質培養液を 160 μ l, 「2~12」の列には 11 種類の糖添加基質培養液 200 μ l を分注した。菌液をピペット操作でよく懸濁し、「1」の列に各々 170 μ l 入れた。連続分注電動ピペット (エッペンドルフ株式会社) を用いて 1 の列に入った

菌液と培養液の混合液を 11 種類の糖が入った各列に 25 μ l ずつ分注した。最後に滅菌ミネラルオイル 50 μ l を重層して嫌気的条件下にし、蒸留水で湿らせたキムワイプを敷いた角型ジャー内にて 37°C で 72 時間培養した。乳酸菌が生育すると、乳酸を生成して pH が低下し、基質培養液に含まれる BCP が青色から黄色に変化する。その特性を利用してマイクロプレートリーダー (Bio-RAD・Model 550) を用いて測定波長 405 nm, 対照波長 655 nm の 2 波長での吸光度を培養開始前と培養 72 時間後に測定した。

結果および考察

1. マウス消化管内からの *Lactobacillus* 属乳酸菌の分離

消化管あるいは糞中には数百種類もの微生物が存在しており、それらを選択的に測定する培地に関する検討は古くからなされている。Rogosa および LBS 寒天培地は糞中からの *Lactobacillus* 属乳酸菌の分離培地として古くから用いられているものであり^{15,16,17}、これらは培地の pH を 5 前後にすることで *Lactobacillus* 属乳酸菌に対する選択性を付加させているが、*Bifidobacterium*, *Enterococcus* あるいは *Streptococcus* に属するものの中には酸性域でも生育するものがあるとの報告がある^{18,19,20}。Vancomycin は細胞壁合成を阻害する抗生物質の一つで、特にグラム陽性細菌に対して強い生育阻害を示すものであるが、*Lactobacillus* 属乳酸菌は他のグラム陽性細菌と比べて耐性が強いことが知られている^{21,22,23}。Hartemink らは^{24,25} Vancomycin を加え pH を 5 まで低下させた MRS 寒天培地を基本とする培地では、多くの *Bifidobacterium*, *Enterococcus* および *Streptococcus* 属の細菌種が生育できないこと、さらに糞便サンプルを用いた実験においても MRS や Rogosa 寒天培地に比べ選択性が大きく上

昇することを報告している。これらの報告を踏まえて、今回 Rogosa ならびに LBS 寒天培地および Rogosa 寒天培地に Vancomycin を終濃度 20 μ g/ml となるように加えた Rogosa+Vancomycin 寒天培地の 3 種類を用いて、マウス消化管内からの *Lactobacillus* 属乳酸菌の分離を試みた。

Rogosa および Rogosa+Vancomycin 寒天培地で測定した糞便の乳酸菌数は、両培地とも糞便 1 g 当たり 10^9 程度で、培地間での差はほとんど見られなかった。しかし、検出されるコロニーの特徴に違いが認められた。Rogosa 寒天培地では球形コロニー (Fig. 1a の A) と毛球形コロニー (Fig. 1a の B) が検出されたが、Rogosa+Vancomycin 寒天培地では球形コロニーのみが検出され、毛球形コロニーの検出は認められなかった (Fig. 1b)。Rogosa 寒天培地でのコロニーの割合は、どのマウスにおいても 6 : 4 ~ 7 : 3 程度で球形コロニーが優勢であった。LBS 寒天培地で測定した胃壁の乳酸菌数は 1 g 当たり 10^7 ~ 10^9 の間で個体差があり、球形および毛球形いずれも認められたが (Fig. 1c)、コロニーの割合も個体差が大きかった。*Lactobacillus* 属乳酸菌は Vancomycin に耐性があることが知られているが、Vancomycin 添加培地では毛球形コロニーが検出されなかった。これらの菌種は、*Lactobacillus* 属乳酸菌の中でも Vancomycin に感受性が強いものと考えられた。

最終的に糞便サンプルを用いて Rogosa 寒天培地から球形、毛球形コロニーを各 13 株、Rogosa+Vancomycin 寒天培地から球形コロニー 26 株、胃壁サンプルを用いて LBS 寒天培地から毛球形コロニー 8 株の計 60 株を分離した (Table 1)。

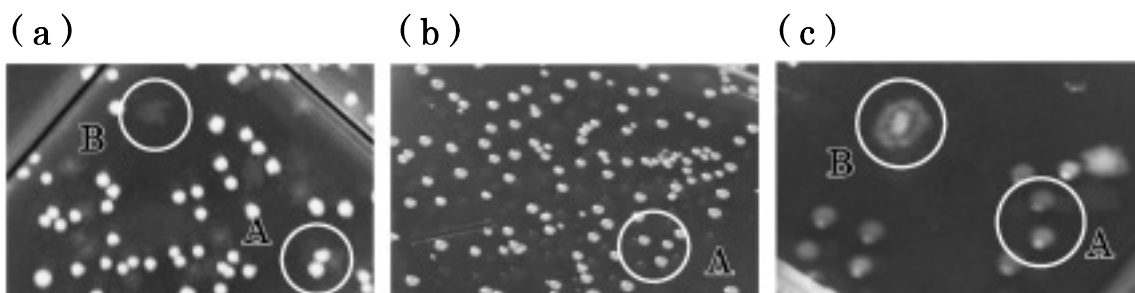


Fig. 1 Colony types isolated from mouse feces and stomach.

The samples were homogenated, and diluted with saline and then spread on Rogosa agar (a), Rogosa + Vancomycin agar (b), and LBS agar (c).

A; Smooth type colonies, B; Rough type colonies.

2. マウス消化管内に存在する *Lactobacillus* 属乳酸菌の同定

分離した 60 株は、顕微鏡下の観察において全てグラム陽性の桿菌で、カタラーゼ陰性であった。従って、今回用いた 3 種の寒天培地上に存在する細菌種はほとんどすべて *Lactobacillus* 属乳酸菌であり、どの培地を用いてもマウス糞便あるいは消化管試料からは *Lactobacillus* 属乳酸菌を高い選択性をもって分離できるものと思われた。分離した 60 菌株はグルコースからのガス発生能、生育温度域および生成乳酸の旋光性から 5 つのグループに分類でき、各グループの特徴を Table 2 にまとめた。一般的に乳酸菌は消費した糖に対して、50%以上の乳酸を生成する細菌としてとらえられている。この時、糖の代謝産物として乳酸のみを生成するものはホモ発酵型に、乳酸のほかにエタノールと二酸化炭素を生成するものはヘテロ発酵型に分類される。今回は生成されるエタノール量を測定していないので厳密な発酵形式の判定はできないが、ガス発生能の有無はその参考になる。また、生成される乳酸は光学異性体であり、D型かL型かあるいは両者を生成するかは菌種によって異なっている。これらの特徴をもとに乳酸菌実験マニュアル¹¹⁾の同定ダイヤグラムに従って分類すると、グループ1および3はホモ型の高温性乳酸桿菌に属し、さらに生成される乳酸の旋光性から、それぞれその中の Group III と Group II に属する菌種であると考えられた。また、グループ2はヘテロ型の高温性乳酸桿菌、グループ5はホモ型の

中温性の乳酸桿菌となった。胃壁より LBS 寒天培地を使ってから分離したグループ4の8株は生育温度域を確認していないため、Table 2 に示した特徴だけからはホモ型の乳酸桿菌としか判定できなかった。尚、LBS 寒天培地上には球形コロニーも分離されたが、予備的な生化学的テストによってグループ2と同種であることが示唆されたので、さらなる同定試験は行わなかった。

菌種レベルでの同定をさらに進めるために Table 2 に示した各グループの分離菌株から数株を選択し、16S rDNA の塩基配列をもとに DDBJ のデータベースより BLAST 解析を行った。その結果、グループ1は *Lb. murinus*、グループ2は *Lb. reuteri*、グループ3は *Lb. johnsonii*、グループ4は *Lb. intestinalis*、グループ5は *Lb. curvatus* であることが確認された (Table 3)。

Itoh らは²⁶⁾ コンベンショナルな環境のマウスに比べて、SPF 環境のマウスでは *Lb. fermentum*、*Lb. reuteri*、*Lb. acidophilus* の検出割合が低く、*Lb. intestinalis* が多く分離されることから、飼育環境により消化管より分離される *Lactobacillus* 属乳酸菌の菌種が異なること認めている。しかしその後、種特異的なオリゴヌクレオチドプローブを用いた同定で、マウスから分離された *Lactobacillus* 属乳酸菌は、*Lb. intestinalis*、*johnsonii*、*murinus*、*reuteri*、*vaginalis* および *johnsonii* / *gasseri* グループであったと再同定しており、かつて *Lb. acidophilus* とされていたもののほとんどが *Lb. johnsonii* であっ

Table 1 Summary of colony isolation from mouse.

Medium for isolation	Source	Shape	No. of strains
Rogosa (R)	Feces	Smooth	13
		Rough	13
Rogosa + Vancomycin (R+V)	Feces	Smooth	26
LBS (L)	Stomach	Rough	8

Table 2 Summary of morphological and biochemical properties of isolated colonies from mice.

Group	No. of isolated colonies from agar plates*				Shape	Gram-Stains	Catalase reaction	Gas production	Growth at (°C)				Optical rotatory of lactic acid
	R	R+V	L	Total					15	20	40	45	
1	2	13	0	15	Smooth	+	-	-	-	-	+	±	L
2	13	13	0	26	Smooth	+	-	+	-	N. T.	N. T.	N. T.	DL
3	10	0	0	10	Rough	+	-	-	-	-	+	+	DL
4	0	0	8	8	Rough	+	-	-	N. T.	N. T.	N. T.	N. T.	N. T.
5	1	0	0	1	Smooth	+	-	-	+	+	±	-	DL

*See Table 1 for agar plate

N. T.; Not tested

R; Rogosa agar, R+V; Rogosa+Vancomycin agar, L; LBS agar.

Table 3 Summary of identification of the isolated lactobacilli by the 16S rDNA gene sequence.

Strain	Group	Closest relative	% Identity	DDBJ/EMBL/GenBank accession number
RV-25	1	<i>Lb. murinus</i>	99%	AB260939
RV-29	1	<i>Lb. murinus</i>	98%	AB260940
R-01	1	<i>Lb. murinus</i>	98%	—
R-02	1	<i>Lb. murinus</i>	98%	—
RV-08	1	<i>Lb. murinus</i>	98%	—
RV-09	1	<i>Lb. murinus</i>	98%	—
RV-13	1	<i>Lb. murinus</i>	98%	—
R-13	2	<i>Lb. reuteri</i>	97%	AB260941
RV-11	2	<i>Lb. reuteri</i>	97%	AB260942
R-16	3	<i>Lb. johnsonii</i>	98%	AB260943
R-28	3	<i>Lb. johnsonii</i>	99%	AB260944
R-18	3	<i>Lb. johnsonii</i>	97%	—
R-26	3	<i>Lb. johnsonii</i>	97%	—
LS-04	4	<i>Lb. intestinalis</i>	99%	AB260945
LS-05	4	<i>Lb. intestinalis</i>	98%	AB260946
LS-01	4	<i>Lb. intestinalis</i>	97%	—
LS-03	4	<i>Lb. intestinalis</i>	97%	—
LS-08	4	<i>Lb. intestinalis</i>	97%	—
R-03	5	<i>Lb. curvatus</i>	98%	AB260947

たことを報告している²⁷⁾。

Fujisawa らは¹⁴⁾ *Lb. intestinalis*, *Lb. murinus*, *Lb. reuteri*, *Lb. animalis* および *Lb. johnsonii* などが, Salzman らは²⁸⁾ C57BL/6 マウスから *Lb. johnsonii*, *Lb. reuteri*, *Lb. murinus* が, また Pena らは²⁹⁾ *Lb. vaginalis* がマウス消化管あるいは糞便に存在することを報告している。培養特性や生化学的特徴からは判別が困難とされる *Lb. animalis* と *Lb. murinus* は別種のものと考えられていたが, いくつかの報告でこの2種が同種に属していることが示唆されている^{27,30)}。

これまで *Lb. curvatus* がマウス消化管に存在するという報告はない。*Lb. curvatus* は発酵ソーセージのスターターとして用いられており, またサワークラウトからも分離されている³¹⁾。これらのことと *Lb. curvatus* は中温性という特徴から, 今回分離された *Lb. curvatus* はマウスにおいて優勢菌種ではなく, 食餌由来で一過性に存在していたのかも知れない。今回糞便および胃壁から分離した *Lactobacillus* 属乳酸菌は, *Lb. murinus*, *Lb. reuteri*, *Lb. johnsonii*, *Lb. intestinalis* および *Lb. curvatus* であったが *Lb. curvatus* 以外の4種は報告されているものと同様な種であり, マウスに広く存在しているものと考えられた。

Lb. johnsonii は, 多種ある *Lb. acidophilus* グループのうちの1つであるが, これまでの報告や今回の16S rDNA塩基配列解析による同定によって

マウスに存在する *Lb. acidophilus* グループは, ほぼ *Lb. johnsonii* であることは間違いないものと思われる。

3. マウス消化管常在性 *Lactobacillus* 属乳酸菌の糖資化性

今回同定されたマウス消化管内 *Lactobacillus* 属乳酸菌を簡便かつ迅速に同定する方法を構築することを目的として, 各 *Lactobacillus* 属乳酸菌の糖資化性を調べた。96 ウェルマイクロプレートとプレートリーダーを用いることで, 増殖の判定は著しく迅速かつ客観的に行える。そこで *Lb. intestinalis* および *Lb. johnsonii* は Fujisawa らの報告を参考に^{13,14)}, それ以外は Burge's マニュアル¹²⁾ を参考に, 今回存在が確認された5種の *Lactobacillus* 属乳酸菌を判別可能な糖類を選択した。尚, 今回の方法では96ウェルマイクロプレートを用いて判定できる糖の数は最大11となる。5種の *Lactobacillus* 属乳酸菌において資化性を示した糖を含む培養時の典型的な吸光度の変化を Fig. 2 に示した。*Lb. murinus* や *Lb. reuteri* では24時間目以降増殖が停止しているが, *Lb. johnsonii* や *Lb. curvatus* では72時間目まで増殖が続いていることから, 糖資化性を正確に判別するためには少なくとも48~72時間培養することが適切だと思われた。*Lb. intestinalis* については, 72時間培養時での吸光度のみで糖資化性を判定した。

Table 4 は今回用いた全ての糖に対する資化性バ

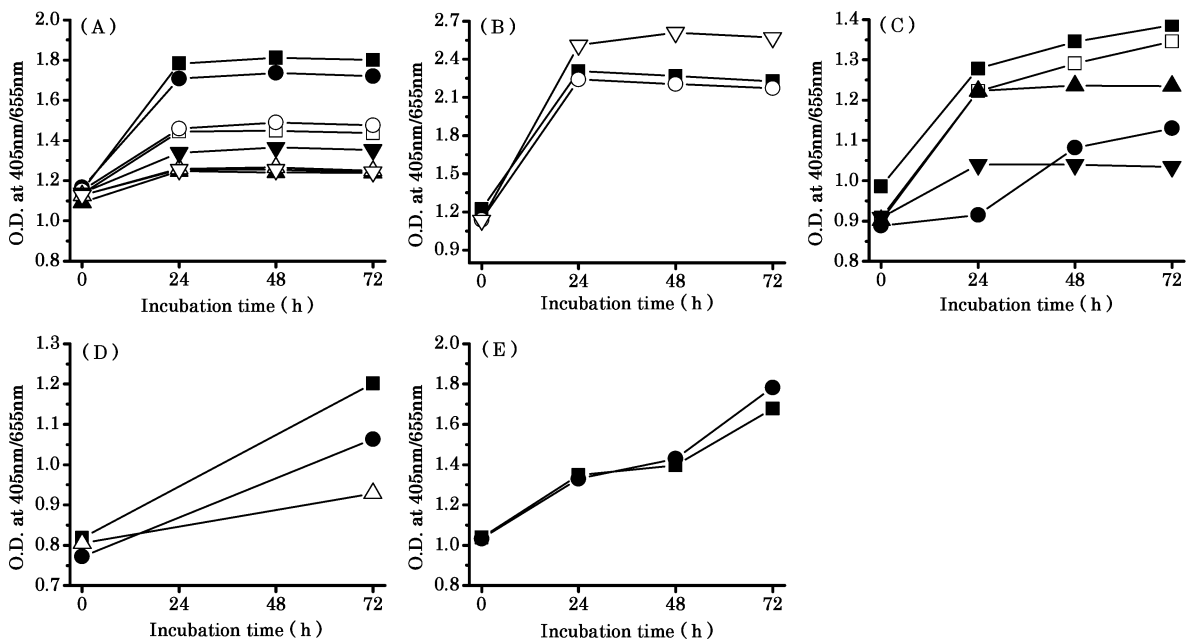


Fig. 2 Growth of lactobacilli in a 96-well microplate.

The isolated colonies were cultured with a sugar and BCP contained medium in a 96-well microplate for 72 hours the optical density (O.D.) at 405nm/655nm was measured by a microplate reader.

■; Glucose, □; Cellobiose, ●; Mannose, ○; Melibiose, ▲; Trehalose, △; Mannitol, ▼; Salicin, ▽; Arabinose. (A); *Lactobacillus murinus*, (B); *Lactobacillus reuteri*, (C); *Lactobacillus johnsonii*, (D); *Lactobacillus intestinalis*, (E); *Lactobacillus curvatus*.

Table 4 Pattern of carbohydrate fermentation of lactobacilli isolated from mice.

<i>Lactobacillus</i> species	Pattern of carbohydrates fermentation										
	Glu	Cel	Man	Mel	Rha	Sor	Tre	Xyl	Mnt	Sal	Ara
<i>Lb. murinus</i>	+	±	+	±	-	-	±	-	±	±	±
<i>Lb. reuteri</i>	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+
<i>Lb. johnsonii</i>	+	+	±	-	-	-	+	-	-	±	-
<i>Lb. intestinalis</i>	+	-	+	-	-	-	-	-	±	-	-
<i>Lb. curvatus</i>	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-

Glu; Glucose, Cel; Cellobiose, Man; Mannose, Mel; Melibiose, Rha; Rhamnose, Sol; Solbitol, Tre; Trehalose, Xyl; Xylose, Mnt; Mannitol, Sal; Salicin, Ara; Arabinose.

ターンをまとめたものである。表中の「+」の表示は Glucose と同様な資化性を示したことを、「±」の表示はそれよりも資化性が弱かったか、株によっては資化性を示さなかったことを、「-」の表示は資化性を示さなかったことを意味している。

Lb. murinus の糖資化性パターンは、報告されているものとはほぼ一致しており¹²⁾、Glucose, Mannose を資化し、Cellobiose, Melibiose, Trehalose, Mannitol, Salicin, Arabinose は資化が弱いもしくは資化せず、Rhamnose, Sorbitol, Xylose は全く資化しなかった。今回得られた *Lb. curvatus* は、Cellobiose と Salicin を資化できず、Burge's マニュアルの記載とは異なっていた¹²⁾。*Lb. reuteri* は、Glucose, Melibiose, Arabinose を資化し、報告さ

れているものと完全に一致していた¹²⁾。一方、*Lb. acidophilus* グループに属する菌種は数種あり、種によって糖資化性パターンが異なるが¹⁴⁾、今回 16S rDNA 解析により *Lb. acidophilus johnsonii* と同定されたグループ 3 の株の糖資化性パターンは、*Lb. johnsonii* とほぼ一致していた^{12,14)}。今回分離した *Lb. intestinalis* は Glucose, Mannose を資化し、報告されているものと一致していたが、Mannitol は資化が弱いもしくは資化せず報告とは異なる結果であった¹³⁾。

これらの糖資化性パターンを比較すると、全菌種で生育が見られる Glucose と全菌種で生育が見られない Rhamnose, Sorbitol, Xylose を除いた最低 7 種類の糖の資化性パターンからこれら 5 つのマウ

ス消化管内 *Lactobacillus* 属乳酸菌が判別可能であることが示唆された。しかしながら、陽性コントロールとしての Glucose と、Burge's マニュアルでも陰性コントロールとして用いられている Xylose は、被験糖類として他の糖類との比較のために少なくとも加えた方が良いと考えられる。液体培地における簡便な菌数増加の測定法として、濁度測定がよく用いられている。しかしながら、増殖時に凝集する乳酸菌では濁度が必ずしも増殖程度を反映しないという危険性を考慮すると、今回用いたように BCP を pH 指示薬として加え、糖が資化されて生じる乳酸による色調変化を測定する方がより客観的な測定が可能となり、信頼性が高いものと思われる。また、プレートリーダーを用いることで一度に多数の菌株の糖資化性パターンを確認することができるとともに、菌種判定に必要な糖類のみを使用することから、市販の糖資化性判定キットよりも非常に簡便で経済的な方法になると思われる。

今回はマウス消化管内 *Lactobacillus* 属乳酸菌に限った判定方法の構築を試みたが、糖資化性パターンがあらかじめ分かっている *Lactobacillus* 属乳酸菌をマウスに与えた場合などでも、適切な糖類を選択し同様な方法で外来性 *Lactobacillus* 属乳酸菌の菌種把握も可能であり、今後さらなる応用が期待できるものと思われる。

要 約

本研究では、消化管内に存在するプロバイオティクス菌の 1 種である *Lactobacillus* 属の菌種解析のための基礎的研究として、96 ウェルマイクロプレートを用いた糖資化性試験によるマウス消化管内 *Lactobacillus* 属乳酸菌種の簡便かつ迅速な同定方法の構築を試みた。

6～9 週齢雌性 BALB/c の糞便および胃壁より Rogosa, Rogosa+Vancomycin (20 μ g/ml) および LBS 寒天培地を用いて *Lactobacillus* 属乳酸菌を 60 株分離した。それらの微生物学および生化学的特徴を調べたところ、5 つのグループに分類することができた。各グループから数株ずつ選択し、16S rDNA 塩基配列解析を行ったところ、*Lb. murinus*, *Lb. reuteri*, *Lb. johnsonii*, *Lb. intestinalis* および *Lb. curvatus* の 5 種が消化管内 *Lactobacillus* 属乳酸菌として同定された。同定された菌種の糖資化性を基に、それらを分類可能と思われる 11 種類の糖 (Glucose, Cellobiose, Mannose, Melibiose, Rhamnose, Sorbitol, Trehalose, Xylose, Mannitol, Salicin, Arabinose) を選択した。これらの糖を

0.2% 添加した BCP 含有液体培地と 96 ウェルマイクロプレートを用いて分離同定した 5 種の *Lactobacillus* 属乳酸菌を 37°C, 72 時間嫌気培養を行った。マイクロプレートリーダーを用いて測定波長 405 nm, 対照波長 655 nm で測定した吸光度を菌の増殖の指標として比較したところ、これら 5 種の *Lactobacillus* 属乳酸菌は異なる資化性パターンを示した。以上の結果から、選択した糖類と BCP 含有培地および 96 ウェルマイクロプレートを用いることでマウス消化管内 *Lactobacillus* 属乳酸菌の菌種把握を簡便かつ迅速に行うことが可能となった。

参考文献

- 1) 辨野義巳：生体における乳酸菌のエコロジー、乳酸菌研究集談会編、"乳酸菌の科学と技術"、学会出版センター、東京、pp.287-309 (1996)。
- 2) Schleifer, K.H., and Wagner, M.: 培養前にできる微生物の検出・同定法、光岡知足編、"腸内フローラの分子生態学"、学会出版センター、東京、pp.5-24 (1998)。
- 3) 細野明義：乳と乳製品の栄養・生理学的効果、山内邦男、横山健吉編、"ミルク総合事典"、朝倉書店、東京、pp.123-129 (1992)。
- 4) Fuller, R., Probiotics in man and animals. *J. Appl. Bacteriol.*, 66, 365-378 (1989)。
- 5) Hamilton-Miller, J.M., The role probiotics in the treatment and prevention of *Helicobacter pylori* infection. *Int. J. Antimicrob. Agents.*, 22, 360-366 (2003)。
- 6) Champagne, C.P., Gardner N.J., and Roy, D., Challenges in the addition of probiotic cultures to foods. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 45, 61-84 (2005)。
- 7) Talwalkar, A., and Kailasapathy, K., The role of oxygen in the viability of probiotic bacteria with reference to *L. acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. *Curr. Issues. Intest. Microbiol.*, 5, 1-8 (2004)。
- 8) Reid, G., and Hammond, J.A., Probiotics. Some evidence of their effectiveness. *Can. Fam. Physician.*, 51, 1487-1493 (2005)。
- 9) Kim, H.S., Characterization of lactobacilli and bifidobacteria as applied to dietary adjuncts. *Cul. Dairy Prod. J.*, 23, 6-9 (1988)。
- 10) 光岡知足：新装改訂版 腸内菌の世界、叢文社、pp.125-126 (1984)。
- 11) 内村泰、岡田早苗：乳酸菌実験マニュアル、小

- 崎道雄監修, 朝倉書店, 東京, pp. 34-35, 41-42, 50-51, 128-131 (1992).
- 12) Kandler, O., and Weiss, N., Regular, Nonsporulating Gram-Positive Rods. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol. 2, 1208-1235 (1986).
 - 13) Fujisawa, T., Itoh, K., Benno, Y. and Mituoka, T., *Lactobacillus intestinalis* (ex Hemme 1974) sp. nov., nom. rev., Isolated from the intestines of mice and rats. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 40, 302-304 (1990).
 - 14) Fujisawa, T., Benno, Y., Yaeshima, T. and Mituoka, T., Taxonomic study of the *Lactobacillus acidophilus* Group, with recognition of *Lactobacillus gallinarum* sp. nov. and *Lactobacillus johnsonii* sp. nov. and synonymy of *Lactobacillus acidophilus* group A3 (Johnson et al. 1980) with the type strain of *Lactobacillus amylovorus* (Nakamura 1981). *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 42, 487-491 (1992).
 - 15) Mituoka, T., Terada, A., and Morishita, Y., Die darmflora von mensch und tier. *Goldschmidt Infoemiert*, 2, 23-41 (1973).
 - 16) Kleessen, B., Bunke, H., Tovar, K., Noack, J. and Sawatski, G., Influence of two infant formulas and human milk on the development of the faecal flora in newborn infants. *Acta Paediatr.*, 84, 1347-1356 (1995).
 - 17) Minelli, E.B., Benini, A., Beghini, A.M., Cerutti, R. and Nardo, G., Bacterial faecal flora in healthy women of different ages. *Microbiol. Ecol. Health Dis.*, 6, 43-51 (1993).
 - 18) Hardie, J.M. and Whiley, R.A., The genus *Streptococcus*, in: Wood, B.J.B, Holzappel, W.H. (Eds.). The genera of lactic acid bacteria. Blackie Academic Press, London, 54-125 (1995).
 - 19) Sgorbati, B., Biavati, B. and Palenzona, D., The genus *Bifidobacterium* in: Wood, B. J. B, Holzappel, W. H. (Eds.). The genera of lactic acid bacteria. Blackie Academic Press, London, 279-306 (1995).
 - 20) Devriese, L.A. and Pot, B., The genus *Enterococcus*, in: Wood, B.J.B, Holzappel, W.H. (Eds.). The genera of lactic acid bacteria. Blackie Academic Press, London, 327-367 (1995).
 - 21) Swenson, J.M., Facklam, R.R. and Thornsberry, C., Antimicrobial susceptibility of vancomycin-resistant *Leuconostoc*, *Pediococcus*, and *Lactobacillus* species. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 34, 543-549 (1990).
 - 22) Holliman, R.E. and Bone, G.P., Vancomycin resistance of clinical isolates of lactobacilli. *J. Infect.*, 16, 279-283 (1988).
 - 23) Lentsner, A.A., Tyuri, M.E., Lentsner, K.P., Mikel'saar, M.E., Shilov, V.M. and Liz'ko, N. N., Antibiotic sensitivity as an additional characteristic for refining the species classification of lactobacilli. *Appl. Biochem. Microbiol.*, 16, 535-538 (1981).
 - 24) Hartemink, R., Domenech, V.R. and Rombouts, F.M., LAMVAB - A new selective medium for the isolation of lactobacilli from faeces. *J. Microbiol. Methods*, 29, 77-84 (1997).
 - 25) Hartemink, R. and Rombouts, F.M., Comparison of media for the detection of bifidobacteria, lactobacilli and total anaerobes from faecal samples. *J. Microbiol. Methods*, 36, 181-192 (1999).
 - 26) Itoh, K., Mituoka, T., Sudo, K. and Suzuki, K., Comparison of faecal lactobacilli in mice of different strains under different housing conditions. *Zeitsch. Versuchstierkund.*, 25, 193-200 (1983).
 - 27) Park, S.H. and Itoh, K., Species-specific oligonucleotide probes for the detection and identification of *Lactobacillus* isolated from mouse faeces. *J. Appl. Microbiol.* 99, 51-57 (2005).
 - 28) Salzman, N.H., Jong, H.D., Paterson, Y., Harmsen, H.J.M., Welling, G.W. and Bos, N.A., Analysis of 16S libraries of mouse gastrointestinal microflora reveals a large new group of mouse intestinal bacteria. *Microbiology*, 148, 3651-3660 (2002).
 - 29) Pena, J.A., Li, S.Y., Wilson, P.H., Thibodeau, S.A., Szary, A.J. and Versalovic, J., Genotypic and phenotypic studies of murine intestinal lactobacilli: species differences in mice with and without colitis. *Appl. Environ. Microbiol.*, 70, 558-568 (2004).
 - 30) Dewhirst, F.E., Chien, C.C., Paster, B.J., Ericson, R.L., Orcutt, R.P., Schauer, D.B. and

- Fox, J.G., Phylogeny of the defined murine microbiota: altered Schaedler flora. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65, 3287-3292 (1999).
- 31) Vogel, R., Lohmann, M., Nguyen, M., Weller, A.N. and Hammes, W.P., Molecular characterization of *Lactobacillus curvatus* and *L. sake* isolated from sauerkraut and their application in sausage fermentation. *J. Appl. Bacteriol.*, 74, 295-300 (1993).

Summary

We developed a rapid screening method to identify *Lactobacillus* species that are resident in the mouse gastrointestinal tract.

We isolated 60 *Lactobacillus* strains from the mouse (female BALB/c, 8-10 weeks old) stomach and feces using Rogosa, Rogosa + Vancomycin (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$) and LBS agar plates. The strains were classified into five groups according to microbiological and biochemical properties. Sequencing analysis of 16S rDNA from several strains in each group led to the identification of *Lactobacillus murinus*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus intestinalis* and *Lactobacillus curvatus*. Each species was distinguished according to its ability to ferment glucose, cellobiose, mannose, melibiose, rhamnose, sorbitol, trehalose, xylose, mannitol, salicin and arabinose. The five species of lactobacilli were cultured in 96-well microplates with liquid medium containing BCP and one of the sugars (0.2%) at 37°C for 72 h under anaerobic conditions. Each species of the lactobacilli showed a different sugar fermentability pattern assessed as growth index determined from the optical density (at 405 nm; reference, 655 nm) measured using a microplate reader.

Our results suggest that *Lactobacillus* species in the mouse gastrointestinal tract can be easily and rapidly analyzed in 96-well microplates using medium containing BCP and selected sugars.