

| | | |
|---------|---------|----------------------------------|
| 氏名(本籍) | すぎむらゆうや | 杉村祐哉(東京都) |
| 学位の種類 | | 博士(農学) |
| 学位記番号 | | 博甲第5724号 |
| 学位授与年月日 | | 平成23年3月25日 |
| 学位授与の要件 | | 学位規則第4条第1項該当 |
| 審査研究科 | | 生命環境科学研究科 |
| 学位論文題目 | | 宿主腸管内への定着性に優れたコイ用プロバイオティクス乳酸菌の開発 |
| 主査 | 筑波大学教授 | 農学博士 星野貴行 |
| 副査 | 筑波大学教授 | 農学博士 内山裕夫 |
| 副査 | 筑波大学准教授 | 博士(農学) 中村 顕 |
| 副査 | 筑波大学准教授 | 博士(農学) 高谷直樹 |

論文の内容の要旨

プロバイオティクスとは「宿主の健康に利益を与える生きた微生物」と定義されており、古くから、人の健康の維持や畜産分野で利用されている。著者の所属する研究室では、プロバイオティクスの水産分野への応用を目指して、霞ヶ浦のコイを対象とした研究を行い、胆汁酸抵抗性や魚類病原菌に対する抗菌活性を指標としていくつかのプロバイオティクス候補株を選択していた。しかしながら、近年特に注目が集まっている菌株の腸管内での定着性については全く検討が行われていなかった。本研究では、まずコイ用プロバイオティクス候補乳酸菌株を用いて、菌体表面の疎水性および試験管内での腸管粘液付着率と生体腸管内における定着性について相関の有無を検討した。さらに、そこで得られた知見に基づき、宿主腸管内への定着性に優れた新規プロバイオティクス候補乳酸菌株の取得に成功した。

(1) プロバイオティクス候補株の菌体表面の疎水性およびコイ腸管粘液に対する付着率の検討

プロバイオティクス候補株8株の菌体表面の疎水性を炭化水素 (n-Hexadecane または Toluene) に対する親和性を指標として測定した。その結果、*Lactococcus (Lc.) raffinolactis* h47 株および R1 株でそれぞれ 80% 前後と最も高い疎水性を示した。逆に最も低い疎水性を示した菌株は *Lc. lactis* h2 株で 5% 程であった。

次に、プロバイオティクス候補株8株のコイ腸管粘液に対する付着率を生体外で測定した。候補株は培養後、集菌し菌数を 5×10^7 CFU/ml に調整した。コイ腸管粘液を固定した 96 well プレートに菌体懸濁液 50 μ l を添加し、30 $^{\circ}$ C にて 1 h インキュベートした。その後、粘液に付着していない菌体を洗浄除去し well 内の残存菌体を回収しプレーティングにより菌数を調べた。その結果、*Lc. raffinolactis* R1 株が粘液に対して 20.7% と最も高い付着率を示した。次に粘液への付着率が高かった株は *Enterococcus (E.) pseudoavium* h50 株で 15.7% であった。低い付着率を示した菌株は *Lc. lactis* h2 株と *Lc. raffinolactis* h47 株でそれぞれ 2.5% と 3.0% であった。

(2) プロバイオティクス候補株のコイ腸管内における定着性の測定

プロバイオティクス候補株の生体外での評価の結果が、コイ生体に投与した際の腸管内定着性と相関を有

するか否かを検討した。疎水性および粘液に対する付着率が様々な値を示した4株 (*Lc. lactis* h2株、*Lc. raffinolactis* h47株およびR1株、*E. pseudoavium* h50株) を選択し、コイ生体に対して各菌株を個別に投与した。試験は、循環式水槽を用いた一次試験と、流下式水槽を用いた二次試験の計2回行った。水温は $23 \pm 1^\circ\text{C}$ で維持し、乳酸菌株を餌1g当り 2×10^7 CFUとなるように添加した餌を魚体重の1.5%となるように毎日投与した。最初の12日間乳酸菌を含む餌を投与し、その後一次試験では14日間、二次試験では21日間乳酸菌を含まない餌を投与し、以後コイの腸管内容物中の一般細菌数と乳酸菌数を計測した。さらに、得られた乳酸菌が投与乳酸菌株と同じであるか否かを、種特異的プライマーを用いたPCRにより検討した。

腸管内容物中の一般細菌数は一次試験、二次試験ともに大きな変動は無く、実験期間を通じておよそ $10^8 - 10^9$ CFU/gだった。乳酸菌数は乳酸菌投与期間中は上昇し、投与終了後には実験開始時点の細菌数と同程度まで減少した。投与乳酸菌の検出数は、乳酸菌投与期間中はどの候補株も高く維持されていた。乳酸菌投与終了後の期間においては、生体外での腸管粘液付着率の低い *Lc. lactis* h2株と *Lc. raffinolactis* h47株が乳酸菌投与終了後ただちに腸管内より失われた。その一方で、試験管内での腸管付着率が高かった *E. pseudoavium* h50株や *Lc. raffinolactis* R1株は、乳酸菌投与終了後も試験終了まで高い割合で検出され続けた。

以上の結果より、*in vitro* でのコイ腸管粘液に対する付着率が、*in vivo* での腸管内定着性と強い相関を有していることが明らかとなった。

(3) 生体外での腸管粘液付着性を指標とした高定着性新規プロバイオティクス候補株の取得

上述の知見に基づき、生体外での腸管粘液付着性を指標として腸管定着性の高い新規プロバイオティクス候補乳酸菌株の取得を試みた。コイの腸管内容物を粘液を固定した96 wellプレートの各wellに分注し、洗浄・回収の行程を3回繰り返したのち乳酸菌コロニーを得た。これらについて、腸管粘液付着性を測定し、付着率の高い(15.7%から44.4%)9株の新規プロバイオティクス候補株を取得した。これらのうちの3株をコイ生体に投与し腸管内定着性を検討した。その結果、3株とも乳酸菌投与終了3週間後でも腸管内から非常に高い頻度で検出された。このことから、生体外における腸管粘液付着性を指標として、腸管内への定着性に優れた乳酸菌株が取得可能なことが明らかとなった。

審査の結果の要旨

プロバイオティクス候補株の生体外でのコイ腸管粘液に対する付着率が、コイ生体での腸管内定着性と強い相関を示すことを明らかにし、生体外での腸管粘液付着性を指標として腸管内定着性に優れた新規プロバイオティクス候補乳酸菌株9株の取得に成功した。本研究の成果は、養殖漁業におけるプロバイオティクス利用の促進に大きく寄与するものと考えられる。

論文審査ならびに最終試験の結果に基づき、著者は博士(農学)の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。