

魚類プロバイオティクスの開発

—コイ幼魚へのプロバイオティクス候補乳酸菌の長期投与の効果—

萩 達朗*・渡辺 直樹**・高島 葉二**・星野 貴行*

1. はじめに

ヒトを含む哺乳類の消化管内には多種の微生物が存在し、その中の一部は宿主と共生関係にあると考えられており、宿主の健康に深く関わっている (Guarnerら, 2003; Hooperら, 2001)。その中でも、乳酸菌は特に重要であり、プロバイオティクス (宿主に有益な作用をもたらす生菌剤) として用いられている (Kaurら, 2002; Salminenら, 1999; Tuohyら, 2003)。乳酸菌を含む魚の腸内細菌については、ヒトなどと同様に複雑な生物相を構成していることが明らかになりつつあり (Asfieら, 2003; Caiら, 1999; Gonzalezら, 2000; Holbenら, 2002; Ringo and Gatesoupe, 1998; Sugitaら, 1990)、数種類の乳酸菌が魚の腸内マイクロフローラの一部を形成していることや、周囲の環境や温度によって乳酸菌の種類が異なることが報告されている (Ringo and Gatesoupe, 1998)。近年では、多量の抗生物質使用による薬剤耐性菌の出現や、養殖魚の体内への抗生物質の残留などから、水産養殖にプロバイオティクスを利用しようとする試みも始められている (Irianto and Austin, 2002)。

魚類プロバイオティクス開発には、魚類消化管内乳酸菌の生態系を詳しく解析し、水温や環境によって魚類消化管内乳酸菌叢がどのように構成され変化するかを明らかにすることが重要である。乳酸菌以外の消化管内菌叢は季節変化 (水温による変化) することが報告されている (Al-harbi and Uddin, 2004)。魚類消化管内乳酸菌叢の季節変化については、我々が最初の報告をした (Hagiら, 2004)。我々はその報告で、霞ヶ浦に生息するハクレン (*Hypophthalmichthys molitrix*),

コイ (*Cyprinus carpio*), アメリカナマズ (*Ictalurus punctatus*), ゲンゴロウブナ (*Carassius cuvieri*) の消化管内乳酸菌叢は夏季に *Lc. lactis*, 冬季に *Lc. raffinolactis* が優占種となることや、コイ消化管内乳酸菌叢の通年変化解析から、乳酸菌叢は水温が13~17℃の間で変化することを明らかにした。このように魚類消化管内乳酸菌が規則的に変化しながら腸内細菌群の一部を構成していることがわかったが、乳酸菌と魚類消化管内細菌群及び宿主である魚類との関係はまったく明らかとなっていない。そこで、魚類プロバイオティクス開発の第一ステップとして、乳酸菌投与が消化管内菌叢及び宿主の生理機能に及ぼす影響を調べるため、霞ヶ浦に生息する魚類よりプロバイオティクス候補乳酸菌の選択を行い、コイ幼魚への長期投与試験を試みた。生理機能については、細菌、原虫、ウイルスなどの感染初期に重要な役割を果たすと言われている非特異的免疫系である補体代替経路 (Yanoら, 1988; Iwama and Nakanishi, 1996) 及び、貪食細胞の活性 (Neumanら, 2001; Sakaiら, 1996) について調べた。

2. 方法

使用した培地 GYP-BCP寒天培地: D-glucose, 10g; yeast extract, 10g; polypepton (Daigo-Eiyo chemical), 5g; nutrient broth, 5g; Na-acetate trihydrate, 2g; nystatin, 0.1g; bromocresol purple, 0.06g; CaCO₃, 5g; 寒天, 12g; salts solution (40m, MgSO₄·7H₂O; 2m, MnSO₄·4H₂O; 7m, FeSO₄·7H₂O; 2m, NaCl; 1ml, 蒸留水), 5ml; Tween 80 solution (50m / ml solution), 10ml; 蒸留水, 1,000ml; pH6.8 オートクレーブ (121℃, 15

*: 筑波大学応用生物化学系, **: 茨城県内水面水産試験場

分間)後に、孔径0.2 μ mのメンブレンフィルターでフィルター滅菌したNa-azide (0.015 g)とCyclohexamide (0.075 g)溶液1 mlを加えた。MRS寒天培地(Difco *Lactobacilli* MRS brothに1.2%寒天を加えたもの)。LB液体培地: glucose, 1g; trypton, 10g; yeast extract, 5g; NaCl, 5g; 蒸留水, 1,000ml; pH7.0 (LB寒天培地はLB液体培地に1.2%寒天を加えたもの)。GYP液体培地: D(+)-glucose, 10g; yeast extract, 10g; bacto-peptone (Difco), 5g; Na-acetate trihydrate, 2g; salts solution, 5ml; Tween 80 solution (50mg/ml solution), 10ml; 蒸留水, 1,000ml; pH6.8。NY液体培地: nutrient broth, 8g; yeast extract, 5g; NaCl, 3g; MgSO₄·7H₂O, 0.2g; 蒸留水, 1,000ml; pH7.2 (NY寒天培地はNY液体培地に1.2%寒天を加えたもの)。いずれの培地も121 $^{\circ}$ C, 15minの加熱滅菌処理したものを用いた。

霞ヶ浦淡水魚からのプロバイオティクス候補株の選定 2000年12月に乳酸菌分離源として、茨城県内水面水産試験場の屋外養魚場で飼育されていたコイ (*Cyprinus carpio*, 魚体重約1,000 g)を用いた。また、2002年6月に、乳酸菌投与実験魚として、屋内養魚場で飼育されていたコイ幼魚(魚体重約80 g)を採取し、乳酸菌の分離を行った。研究室内で魚の表面をよく洗浄し、体表をアルコール殺菌し、滅菌済みピンセット、ハサミ等を用い、腹部を開き、消化管を摘出し、消化管内容物1 g(湿重量)を滅菌生理食塩水10mlに懸濁し、各段階に希釈した(10⁰~10⁶)。これをGYP-BCP寒天培地に塗布し、20 $^{\circ}$ C, 48h, anaerobic jars system (AnaeroPack™, Mitsubishi Gas Chemical)を用いて嫌気培養し、生えてきたコロニーをランダムに分離し、16S rDNA塩基配列解析を行った。

分離株80株について、direct method法(Kekessyら, 1970; Mayr-Hartingら, 1972; Barefootら, 1983)で一般細菌に対する抗菌活性の有無を調べた。GYP固体培地で30 $^{\circ}$ C, 24h, 嫌気培養した乳酸菌をMRS寒天培地, LB寒天培地にそれぞれに爪楊枝でスポットし、これを30 $^{\circ}$ C, 24h, 嫌気培養した。スポットした部分にコロニーが形成されていることを確認した後、この

プレートに指示菌を含んだ軟寒天(寒天0.8%)4 mlを重層した。軟寒天を重層したMRS培地は37 $^{\circ}$ C, 18h, 嫌気培養し、軟寒天を重層したLB培地については37 $^{\circ}$ C, 18h, 好気培養を行い、ハロー形成の有無で抗菌活性を確認した。指示菌を含む軟寒天については以下のよう¹に作製した。*Bacillus brevis* IFO3331, *B. pumilus* JCM 2508, *B. pumilus* JCM2508, *Escherichia coli* MAFF 911145, *Paenibacillus polymyxa* JCM2507についてはLB液体培地で24h, 37 $^{\circ}$ C, 振盪培養を行い、この指示菌生菌体(O.D₆₀₀=1.0)20 μ lを軟寒天4 mlに加えた。*Enterococcus faecium* IFO13712, *E. faecalis* IFO12964, *Lactococcus lactis* IL1403, *Pediococcus acidilactici* TISTR 952はGYP液体培地で37 $^{\circ}$ C, 24h, 静置培養を行い、同様に軟寒天に加えた。

Direct method法で抗菌活性を示した菌株についてはGYP液体培地で30 $^{\circ}$ C, 24h, 静置培養し、培養液を冷却遠心(8,000rpm, 5 min)した後、孔径0.2 μ mのメンブレンフィルター(Pall Corporation)で濾過滅菌して培養上清を得た。この培養上清と、中和した培養上清(培養上清を2 MのNaOHでpH7.0に調整したもの)について、指示菌に対する抗菌活性試験をペーパーディスク法で行った。すなわち、各培養上清をしみこませたペーパーディスク(ADVANTEC 8 mm)を各寒天培地上に重ね、direct method法に準じて指示菌を含む軟寒天を重層し培養後、阻止円形成の有無を確認した。

さらに、分離株80株についてコール酸耐性試験を行った。分離株をGYP寒天培地で30 $^{\circ}$ C, 24h, 嫌気培養後、菌体をかきとり、生理食塩水に懸濁した。この懸濁液(O.D₇₀₀=1.0)を、終濃度が1, 2, 3, 4 mMとなるようにコール酸(Sigma)を添加したGYP-BCP寒天培地に塗布し、30 $^{\circ}$ C, 24h, 嫌気培養を行い、菌が生育するかどうかでコール酸耐性を検討した。淡水魚病原菌に対する抗菌活性及びコール酸耐性を持つ乳酸菌の分離 2002年7月、茨城県内水面水産試験場の屋外養魚場で飼育されていたコイ成魚(魚体重約1,000 g)の消化管全体から内容物を1 g(湿重量)採取した。得られた内容物1 gを生理食塩水で希釈し、

3 mMのコール酸 (Sigma) を含むGYP-BCP寒天培地を用いてanaerobic jar systemで20℃, 48h, 嫌気培養を行った。400株ランダムに単離し, 淡水魚病原菌に対し抗菌活性を有する乳酸菌の分離を試みた。抗菌活性試験方法は, 前節と同様にdirect method法に準じた。指示菌には*A. salmonicida* JCM 7874, *A. hydrophila* JCM 1027, *A. caviae* JCM 1060, *A. sobria* JCM 2139, *A. jandaei* JCM 8316, *A. enteropelogenes* JCM 8355, *Enterococcus faecalis* JCM 7783, *Pseudomonas aeruginosa* JCM 6119を用い, これらについてはNY液体培地及びNY寒天培地で培養を行った。また, 抗菌活性があった菌株については, 前節と同様にペーパーディスク法で培養上清の抗菌活性を調べた。

16S rDNA塩基配列に基づく分子系統解析 分離株の系統分類については, 16S rDNA塩基配列に基づく系統解析を行った。50 μ lの滅菌水に分離株を懸濁し, これを鋳型としてユニバーサルプライマーを用い16S rRNA遺伝子を増幅した。反応液にはTakara Ex Taq (Takara Bio, Otsu, Japan) を用いた。反応液量: 菌懸濁液, 1 μ l; 10 \times Ex Taq buffer, 2 μ l; dNTP mixture, 2 μ l; Eu10F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') (10pmol / μ l), 0.8 μ l; Eu1500R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3') (10pmol / μ l), 0.8 μ l; Ex Taq ポリメラーゼ, 0.1 μ l; 滅菌水, 13.3 μ l。反応サイクルはiCycler (Bio-Rad Laboratories) を用いて, 95℃ \cdot 9 min予熱後, |95℃ \cdot 1 min; 50℃ \cdot 1 min; 72℃ \cdot 2 min| を35サイクル行った。得られたPCR産物はGENE CLEAN III KIT (Q-biogene) で精製した。次にCEQ2000 Dye Terminator Cycle Sequencing with Quick Start KitとCEQ 2000XL DNA Analysis System (Beckman Coulter) を用いて上流約400bpの塩基配列を決定した。決定した塩基配列についてはBLAST search (National Center for Biotechnology Information) で分子系統解析を行った。

乳酸菌投与実験方法 コイ幼魚 (40-50 g) を用いて乳酸菌投与実験を行った。コイ幼魚は, オーバーフロー式ガラス製水槽 (60 \times 24 \times 36cm) を使用し, 水温25℃, 流量7.0 l / minで飼育した。飼育水には地下水を

用いた。検査項目として, 体重増加量 (飼料効率), 消化管内菌叢解析, 生理機能解析 (食細胞の機能測定-NBT還元能, 補体価) を行った。体重測定用として10匹, 菌叢・生理機能解析用として16匹をそれぞれ別の水槽で飼育し, 乳酸菌添加餌を毎日与えた。一方で, コントロールとして市販の餌 (坂本飼料株式会社ドライベレットP5) を毎日投与したものを用了。なお, 摂餌量は魚体重の3%とした。乳酸菌添加餌は次のように作製した。プロバイオティクス候補株を200ml GYP液体培地に接種し, 30℃, 24h, 静置培養した。培養液を8,000rpm, 2 min, 4℃で遠心し, 菌体を回収した。100ml生理食塩水を加えて攪拌後, 8,000 rpm, 2 min, 4℃で遠心し, 上清を完全に取り除いた後, 菌体を約10⁸ / mlとなるように生理食塩水に懸濁した。菌体懸濁液を市販の飼料に1 gあたり約10⁷となるように添加し, 60分間自然乾燥し, これを乳酸菌添加餌とした (添加した食塩水量は飼料量に対し約20%)。なお, 乳酸菌添加餌は4℃で保存し, 1週間ごとに新しい乳酸菌添加餌を作製した。コントロールとして与える餌については, 食塩水量が飼料量に対し約20%となるように作製したものを用了。

体重測定は1週間毎に行い, 消化管内容物・血液のサンプリングは, 水槽よりコイ二匹ずつから採取し, 乳酸菌投与前, 投与期間中の3, 7, 14, 28, 42, 56日目, そして投与を中止して7日後の63日目の計8回にわたって行った。消化管内容物については, 乳酸菌数・全菌数を測定し, 乳酸菌叢については投与株に特異的なプライマーを用いて解析し, 全菌叢についてはDGGE法によって調べた。

特異的プライマーの作製 投与候補株の16S rDNAのほぼ全塩基配列 (1500bp) を決定するためにさらに以下の5つのプライマーを用いて, シークエンスを行った: 500R (5'-GTATTACCGCGGCTGCTGCTGG-3'); 800R (5'-CATCGTTTTACGGCGTGAC-3'); 1,100R (5'-TTGCGCTCGTTGCGGGACT-3'); 1,400R (5'-ACGGGCGGTGTGTACAAG-3'); 1,000F (5'-GTCCC GCAACGAGCGCAAC-3')。投

与候補株の16S rDNA全塩基配列(約1,500bp)を、NCBI (National Center for Biotechnology Information)のBLASTサーチによって相同性検索を行い、各分離株と相同性の高い菌種の16S rDNA全塩基配列をデータベースより得た (Table 1)。

各分離株とデータベースから得た16S rDNA全塩基配列を、GENETIX-MAC ver10を用いてマルチアライメントを行い、投与候補株それぞれに特異的な配列を検索した。さらに Ribosomal database projectII (<http://rdp.cme.msu.edu/html>) で、デザインしたプライマー配列が特異的であることを確認した。特異的な配

列と確認した後、その配列を含む約20bp部分をプライマーの配列とした。作製したプライマーについては、各菌株に対して下記の条件でPCRを行い、投与候補株それぞれのみに対して特異的な増幅が起こることを確認した。PCR条件は以下の通りである (PCR反応液量は、16S rDNA塩基配列に基づく分子系統解析に準じた)。 *Enterococcus pseudoavium* -h50について、用いたプライマーはEu10F, En. pseR (5'CATTTTACTCTCATCCTT 3')。反応サイクルは、96°C・10min予熱後、[95°C・1 min; 55°C・1 min; 72°C・2 min] を30サイクル、さらに72°C・2 minの伸長反応を行った (得られる増幅産

Table 1 特異的プライマーデザインのために塩基配列の比較に用いた菌株

Strain (NCBI database)	Accession No
<i>Enterococcus asini</i>	Y11621
<i>Enterococcus avium</i>	AJ301825
<i>Enterococcus azikeevi</i>	AJ309563
<i>Enterococcus malodoratus</i>	AF061012
<i>Enterococcus pseudoavium</i>	AJ301837
<i>Enterococcus raffinosus</i>	AF061003
<i>Lactobacillus casei</i>	D16553
<i>Lactobacillus curvatus</i>	AY204894
<i>Lactobacillus fuchuensis</i>	AB063479
<i>Lactobacillus sake</i>	M58829
<i>Lactobacillus sakei</i>	AY204895
<i>Pediococcus damnosus</i>	AJ318414
<i>Lactococcus garvieae</i>	AF283499
<i>Lactococcus lactis</i>	X64887
<i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i>	NC002662
<i>Lactococcus piscium</i>	X53905
<i>Lactococcus plantarum</i>	X54259
<i>Lactococcus raffinolactis</i>	X54261
<i>Streptococcus bovis</i>	AF104114
<i>Streptococcus cremoris</i>	M58836
<i>Streptococcus equinus</i>	AF429765
<i>Streptococcus infantarius</i>	AF177729
<i>Streptococcus iniae</i>	Z99176
<i>Streptococcus luteciae</i>	AJ297214
<i>Streptococcus pasteurii</i>	AJ297217
<i>Streptococcus macedonicus</i>	Z94012
<i>Streptococcus waius</i>	AF088900

物は約470bp)。 *Lactococcus lactis* h-2 について、使用したプライマーはLc-02F (5'CTGAAGGTTGGTACTTGT 3'), Lc-02R (5'AGAACTTATAGCTCCCTACAT 3'), 上述したアニーリング温度を62℃とした(約780bp)。 *Lactobacillus fuchuensis* K-11について、アニーリング温度を58℃, サイクルは35回とした(約960bp)。使用したプライマーはLb01-F (5'CCCACCAAGACTGTGATGCA 3'), Lb01-R (TTAGCTTAACCTCGCGGTTT 3')。 *Streptococcus iniae*については、Berridgeらの報告に従った(Berridgeら, 1998)。プライマーは5'114 (5'GGAAAGAGACGCAGTGTCAAAACAC 3'), 3'516 (CTTACCTTAGCCCCAGTCTAAGGAC 3')を用いた。反応サイクルは |94℃・1 min; 60℃・1 min; 72℃・1 min| を35サイクル, 最後に72℃・5 minの伸長反応を行った(増幅産物は約373bp)。

消化管内菌叢解析 内容物0.1 gを生理食塩水に懸濁し, GYP-BCP寒天培地及びNY寒天培地に塗布し, 30℃, 48h, 嫌気培養を行い, 菌数の測定を行った。

乳酸菌叢の解析は, 各サンプルから20株分離し, 各菌株に特異的なプライマーを用いて検出を行った。なお, 特異的なプライマーを用いたPCRで増幅できなかった分離株については, 10株について16S rDNA塩基配列の解析を行った。

消化管内容物の全菌叢の解析はDGGE法(Ishiiら, 2000; Plantら, 2002; Muzerら, 1993)を用いた。DGGEに用いる内容物total DNAの調製はbenzyl chloride法(Zhuら, 1993)に準じた。消化管内容物0.1 gに生理食塩水1 mlを加え, 10,000rpm, 3 min, 4℃で遠心した。上清を取り除いた後, ϕ 0.1mmガラスビーズ0.1 g, extraction buffer (100mM, Tris-HCl; 40mM, EDTA; pH9.0) 375 μ l, benzyl chloride 225 μ l, 10% SDS 75 μ lを加え, 50℃, 30分間激しく振とうした。3 M sodium acetateを225 μ l加え懸濁後, 水上に15分間静置した。これを15,000rpm, 10min, 4℃で遠心し, 上清を回収した。上清に等量のイソプロパノールを加え, 15,000rpm, 15min, 4℃で遠心し, 上清を完全に取り除いた。沈殿物に70%エタノールを加え, 15,000rpm,

15min, 4℃遠心して, 上清を取り除き, 真空乾燥後, TE (Tris, 121mg; EDTA, 37mg; 蒸留水, 100ml) 50 μ lに溶解し, これをPCRテンプレートとした。

PCR反応はtouch down PCR法を用いて行った。反応液量: サンプルテンプレート (total DNA溶液), 2.5 μ l (約1.0ng); 10 \times Ex Taq buffer, 5 μ l; dNTP mixture, 5 μ l; 357F-GC (5'-CGCCC GCCGCGCGGCGGG CGGGCGGGGCACGGGGGGCCTACGGGAGGCAGCAG-3') (10pmol/l), 2.0 μ l; 518R (5'-GTATTACCGCGG CTGCTGG-3') (10pmol/l), 2.0 μ l; Ex Taqポリメラーゼ, 0.25 μ l; 滅菌水, 33.25 μ l。反応時間は, 95℃・9 min予熱後, |95℃・1 min, 65℃・1 min (1サイクルごとに0.5℃下げる), 72℃・2 min| のサイクルを20回行い, 次に |95℃・1 min, 50℃・1 min, 72℃・2 min| のサイクルを20回行った後, 最後に72℃・7 minの伸長反応を行った。PCR産物 (50 μ l) をアガロース電気泳動 (和光純薬 agarose Sを2%, 100Vの定電圧) に供し, 緩衝液には, 1 \times TAE (Tris, 4.84 g; 酢酸, 1.14ml; EDTA・2 Na, 0.15 g; 蒸留水, 1000ml, pH8.0)を用いた。回収した増幅断片はBio-Rad社Quantum Prep Freez N'Squeeze DNA Gel Extraction Spin Columnsを用いて精製した。

DGGEについて, 試薬及びDGGE装置は, Bio-Rad LaboratoriesのD-codeマルチシステムを用いた。DGGE泳動装置の組み立て, ゲル板の作成方法はBio-Rad LaboratoriesのD-code system The D-code Universal Mutation Detection Systemに準じた。使用したDGG溶液は以下の通りである。20% DGG溶液 (urea, 1.51 g; 40% acrylamide, 3.6ml; deionized formamide, 1.44ml; 50 \times TAE buffer, 180 μ l; 蒸留水で18mlにメスアップ), 70%のDGG溶液 (Urea, 5.3 g; 40% acrylamide, 3.6ml; deionized formamide, 5.04ml; 50 \times TAE buffer, 180 μ l; Dye solution, 140 μ l; 蒸留水で18mlにメスアップ)。各DGG溶液にTEMED 16.2 μ lと10%APS 162 μ lを加え, 濃度勾配作製装置を用いて, 速やかにゲル板を作製し, ゲルが完全に固まるまで約3時間室温で放置した。DGGE装置展開槽に71の0.5 \times TAEバッファーを入れ,

65℃に温めておき、作製したゲル板をセットし、注射器でDGGE装置内のバッファーを用いて、ゲルのウェルを洗浄した。サンプル（DNA濃度 約500ng / μ l）をウェルにアプライし、35V, 60℃, 20h, 泳動を行った。泳動後、Molecular Probes社のSYBR Gold-nucleic acid gel stain-（10,000×concentration in DMSO）を、0.5×TAEを用いて10,000倍希釈して作った染色液に、ゲルを30分間浸しDNA染色を行った。DNA染色後、蒸留水で数分間余剰な染色液を洗浄した後、Bio-Rad社のGelDog200を用いて、バンドの撮影を行った。バンドを切り取り、30 μ lのTEバッファーに12時間以上浸してDNAを溶出し、この溶出液をテンプレートとした。このテンプレートを上述のPCR条件とプライマー（357F, 518R）を用いて増幅し、シークエンス反応でも同プライマーを用いてバンドの16S rDNA塩基配列の解析を行った。

血液採取 注射器（1 mlテルモシリンジ, 25Gテルモ注射針）で心臓部より血液を採取した。採取した血液を室温に60分間、次に氷上で60分間静置した。これを遠心し（2,000rpm, 20min, 4℃）、血清を回収して使用時まで-80℃にて保存した。全血については、採取した血液1 mlあたり1.3mgのEDTAを加えて4℃保存し、数時間以内に貪食細胞のNBT還元能について調べた。

補体価（代替経路）の測定（Yanoら, 1988） 10mM EGTA・Mg・GVB（EGTA, 0.95 g ; MgCl₂・6 H₂O, 0.5 g ; NaOH, 0.25 g ; gelatin, 0.25 g に蒸留水200mlを加えてオートクレーブ後、5×veronal bufferを50ml加える, pH7.5）で21倍希釈した血清0.50, 0.40, 0.32, 0.25, 0.20, 0.10mlに同緩衝液をそれぞれ0, 0.10, 0.18, 0.25, 0.30, 0.40ml加えて全量を0.5mlとし、各々にウサギ赤血球浮遊液（2×10⁸ / ml）（日本バイオテスト研究所）0.2mlを加えて、20℃, 90min反応させた。10mM EDTA・GVB液（EDTA, 0.93 g ; gelatin, 0.25 g に蒸留水200mlを加えてオートクレーブ後、5×veronal bufferを50ml加える, pH7.5）を2.8ml加え、3,000rpm, 5 min遠心後上清のOD₄₁₄から溶血率を求め、Yanoらの方法に基づき、ACH50値を求めた。

貪食細胞の機能測定-NBT還元法による活性酸素測定（Sakaiら, 1996） 全血を96穴マイクロプレート（Nunc）の各ウェルに30 μ lずつ分注し、RPMI1640培地（孔径0.2 μ mのメンブレンフィルターでフィルター滅菌したもの）（日本製薬）を170 μ l加えて、20℃, 60min静置後、上清を除きRPMI1640で2回洗浄した。洗浄後、100 μ l ザイモザン-NBT液, 100 μ l RPMI1640を加え、20℃, 60min静置した。RPMI1640で5回洗浄し、乾燥後、100 μ lメタノールを加えて2分間放置（細胞固定）した。メタノールを除去して乾燥後、2 M KOHを120 μ l, DMSOを140 μ l加え、ピペッティングし、OD₆₃₀で測定（ブランク：2 M KOH, 120 μ l ; DMSO, 140 μ l）した。

ザイモザン-NBT溶液（オプソニン化ザイモザン）作製について以下に示す。ザイモザン（5 mg）に魚血清（200 μ l）を加え、20℃, 30min静置した。これを遠心し（2,000rpm, 10min）、血清を除いた後、RPMI1640を500 μ l加え洗浄後、遠心し（2,000rpm, 10min）、上清を除いた。こうして作製したオプソニン化ザイモザンを2 mlのRPMI1640に溶解し、1 mlのNBT溶液（2 mg / ml）に混合し、これをザイモザン・NBT溶液とした。

飼料効率（乳酸菌投与期間中の魚体重増加量）÷（投与期間中の摂餌量）×100%を飼料効率とした。

3. 結果

プロバイオティクス候補株の選択 我々はコイ消化管内乳酸菌叢の通年解析を行い、夏季に*Lactococcus lactis*, 冬季に*Lc. raffinolactis*が優占種となることを報告したが（Hagiら, 2004）、*Lactococcus*属以外にもコイ成魚より*Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Leuconostoc*属乳酸菌も分離した。また、実験魚として用いたコイ幼魚の消化管内乳酸菌叢を解析した際に、優占乳酸菌として*Streptococcus iniae*を分離した。これらの分離株の中から、1. 優占種であること、2. 広い抗菌スペクトルを有していること3. コール酸耐性を有していることを指標としてプロバイオティクス候補株の選択を行った。

Direct method法による抗菌活性試験及びコール酸耐性試験の結果をTable 2に示した。*En. pseudoavium* h-50について、グラム陰性菌である大腸菌や、グラム陽性菌である乳酸菌や枯草菌などに対し抗菌活性が確認でき、非常に幅広い抗菌スペクトルを示した。コール酸耐性については、*Le. mesenteroides*と*Lc. lactis*が4 mMのコール酸に対する耐性を示し、他の分離株よりも強いコール酸耐性を有していた。これらの結果より、優占種でありコール酸耐性の強かった*Lc. lactis*、抗菌スペクトルが最も広がった*En. pseudoavium* h-50、を投与候補株として選択した。*Lc. lactis*と同定された乳酸菌については異なる3株を用いて性質の検討を行ったが、抗菌スペクトルが2パターンに分かれた。そこで、最も抗菌スペクトルの広がった*Lc. lactis* h-2株を選択した。また、*St. iniae* I-1については、抗菌スペクトルはそれほど広くなく、コール酸耐性は2 mMまでと低いが、コイ幼魚で優占種であったため投与候補株として選択した。

一方で、コール酸を含むGYP寒天培地より多くの乳酸菌を分離し、魚の病原菌に対する抗菌活性を有する乳酸菌の選択を行った結果、17株を選択した。16S rDNA塩基配列解析の結果、17株すべてが*Lb. fuchuensis*であった (Table 3)。近縁種である*En. faecalis* JCM 7783に対して抗菌活性が無かったが、病原菌である*Aeromonas* 属、*Pseudomonas* 属に対して抗菌活性を示した。17株の中から抗菌スペクトルの最も広がった*Lb. fuchuensis* K-11株をプロバイオティクス候補株として選択した。

培養上清による抗菌活性を検討したところ、未処理のもの (培養上清のpHが4.0程度) では抗菌活性が確認されたものの、中和処理したものについては活性が確認されなかった。このことから指示菌に対する抗菌活性はバクテリオシン等によるものではなく、分離株の培養に伴うpHの低下が抗菌活性の要因の一つであることが強く示唆された。しかし、*Lc. raffinolactis*については抗菌スペクトルが*Lc. raffinolactis*-1、*Lc. raffinolactis*-2、*Lc. raffinolactis*-3、*Lc. raffinolactis*-

4と4パターンに分かれたが (Table 2)、それぞれの培養上清のpHは約4.5とほぼ同じであり、*Lb. fuchuensis* (Table 3)についても、抗菌スペクトルが4パターンに分類されたが、いずれも培養上清のpHは約3.6であった。このように、同じ属種で培養上清のpHもほぼ同じであるが、抗菌スペクトルに大きな違いが見られたことから、pH低下以外にも抗菌活性の要因がある可能性も考えられた。

乳酸菌投与による消化管内菌数・菌叢変化 コイ幼魚に、*Lc. lactis* h-2、*St. iniae* I-1、*En. pseudoavium* h-50、*Lb. fuchuensis* K-11を投与して、消化管内乳酸菌数・全菌数・菌叢の変化を調べた。

乳酸菌を投与しなかったコントロールでは、解析期間中は全菌数が約 10^8 / g (湿重量)、乳酸菌数は約 $10^3 \sim 10^4$ / gと一定であった (Fig. 1-E)。乳酸菌叢については、投与期間中を通して*St. iniae*が優占であった (Table 4)。また、経口投与前の各水槽のコイも菌数 (Fig. 1(A)-(D)) 及び乳酸菌叢 (Table 4) はコントロールとほぼ同じであった。

Lc. lactis h-2を投与した場合 (Fig. 1-(A))、投与期間中の乳酸菌数は $10^7 \sim 10^8$ / gでほぼ一定で、全菌数についても $10^8 \sim 10^9$ / gとほぼ一定であった。投与期間中に分離した乳酸菌20株すべてが投与株である*Lc. lactis*であり、消化管内で優占種であった。投与を中止して一週間後の63日目には、乳酸菌数は投与前と同じ 10^4 / g程度になり投与株はまったく検出されず (Fig. 1-(A))、乳酸菌叢も投与前と同じ*St. iniae*のみ分離できたことから (Table 4)、長期投与を行っても、投与中止後に継続的な効果は得られないことがわかった。*En. pseudoavium* h-50株を投与した場合 (Fig. 1-(B))、投与期間中の乳酸菌数が $6.0 \times 10^6 \sim 7.0 \times 10^7$ / gであり、全菌数も7日目を除き $10^8 \sim 10^9$ / gとほぼ一定であった。投与期間前半 (3, 7, 14日目) では乳酸菌数の割合が数%程度だが、後半 (42日目, 56日目) では10%程度まで上昇した。なお、投与期間中は投与株のみ分離され、優占種であった。しかし、投与を中止して一週間後の63日目では、*Lc. lactis* h-2

Table 2 Direct method法による抗菌活性試験及びコール酸耐性試験結果

分離株 (株数)	相同性(%)	指示菌									コール酸 (mM) ^(a)
		T ₁	T ₂	T ₃	T ₄	T ₅	T ₆	T ₇	T ₈	T ₉	
<i>Le. mesenteroides</i> (2)	98~99	-	-	-	-	+	+	+	-	+	4
<i>Lc. lactis</i> h-2 (2)	99	-	-	-	+	+	+	-	-	+	4
<i>Lc. lactis</i> -2 (1)	99	-	-	-	-	+	+	-	-	+	4
<i>Lb. maltaromicus</i> (4)	98~100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2
<i>Lc. raffinolactis</i> -1 (44)	97~98	-	-	-	-	+	+	-	-	+	2
<i>Lc. raffinolactis</i> -2 (17)	97~98	-	+	-	-	+	+	-	-	+	2
<i>Lc. raffinolactis</i> -3 (5)	97~98	-	-	+	-	+	+	-	-	+	2
<i>Lc. raffinolactis</i> -4 (2)	97~98	-	+	+	-	+	+	-	-	+	2
<i>En. pseudoaerium</i> h-50 (1)	98	+	+	+	+	+	+	-	-	+	3
<i>En. asinus</i> (2)	97~98	-	-	-	-	+	+	-	-	+	3
<i>St. iniae</i> 1-1	99	-	-	-	-	+	+	-	-	+	2

^(a) コール酸に対する分離株の生育限界値。

Le., *Leuconostoc*; *Lc.*, *Lactococcus*; *Lb.*, *Lactobacillus* and *En.*, *Enterococcus*. T₁, *Bacillus brevis* IFO3331; T₂, *Bacillus pumilus* JCM2508; T₃, *Escherichia coli* MAFF911145; T₄, *Paenibacillus polymyxa* JCM 2507; T₅, *Enterococcus faecium* IFO13712; T₆, *Enterococcus faecalis* IFO12964; T₇, *Pediococcus acidilactici* TISTR952; T₈, *Lactococcus lactis* IL1403; T₉, *Aeromonas salmonicida* JCM 7874. +; 抗菌活性を示す, -; 抗菌活性を示さない。

Table 3 Direct method法による魚病原菌に対する抗菌活性試験

分離株	指示菌							
	T ₁	T ₂	T ₃	T ₄	T ₅	T ₆	T ₇	T ₈
<i>Lactobacillus fuchuensis</i> K-1	+	+	+	+	-	-	-	++
<i>Lactobacillus fuchuensis</i> K-2	++	+	+	+	-	-	-	++
<i>Lactobacillus fuchuensis</i> K-3	++	+	+	+	-	-	-	++
<i>Lactobacillus fuchuensis</i> K-4	++	+	+	+	-	-	-	++
<i>Lactobacillus fuchuensis</i> K-5	++	+	+	+	-	-	-	++
<i>Lactobacillus fuchuensis</i> K-6	++	+	+	+	-	-	-	+
<i>Lactobacillus fuchuensis</i> K-7	++	+	+	+	-	-	-	+
<i>Lactobacillus fuchuensis</i> K-8	+	-	+	-	-	-	-	+
<i>Lactobacillus fuchuensis</i> K-9	+	-	+	-	-	-	-	+
<i>Lactobacillus fuchuensis</i> K-10	+	-	+	-	-	-	-	+
<i>Lactobacillus fuchuensis</i> K-11	++	++	+	+	+	+	-	+
<i>Lactobacillus fuchuensis</i> K-12	+	-	+	+	-	-	-	+
<i>Lactobacillus fuchuensis</i> K-13	+	-	+	+	-	-	-	+
<i>Lactobacillus fuchuensis</i> K-14	+	-	+	+	-	-	-	+
<i>Lactobacillus fuchuensis</i> K-15	+	-	+	+	-	-	-	+
<i>Lactobacillus fuchuensis</i> K-16	+	-	+	+	-	-	-	+
<i>Lactobacillus fuchuensis</i> K-17	+	-	+	+	-	-	-	+

T₁, *Aeromonas salmonicida* JCM 7874; T₂, *A. hydrophila* JCM 1027; T₃, *A. sobria* JCM 2139; T₄, *A. caviae* JCM 1060; T₅, *A. enteropeiogenes* JCM 8355; T₆, *A. jandaei* JCM 8316; T₇, *Enterococcus faecalis* JCM 7783; T₈, *Pseudomonas aeruginosa* JCM 6199. +; 抗菌活性を示す (++)は+よりも抗菌活性がより強いことを示す, -; 抗菌活性を示さない。

株を投与した場合と同様に、菌数は投与前のレベルに下がり (Fig. 1-(B)), 乳酸菌叢も *St. iniae* が優占であった (Table 4)。*St. iniae* 1-1株を投与した場合 (Fig. 1-(C)), 投与期間中の乳酸菌数は $5.0 \times 10^6 \sim 6.0 \times 10^7 / g$ で、全菌数は $10^8 \sim 10^9 / g$ とほぼ一定であった。全菌数に対する乳酸菌数の割合を見ると、28日目では20%程度になっており、消化管内でかなり優勢であると考えられる。乳酸菌叢については、実験魚に元々 *St. iniae* が存在していたため当然の結果とも言えるが、投

与期間中も投与後も *St. iniae* が優占であった (Table 4)。乳酸菌数をみると投与を中止して一週間後の63日目には投与前と同じレベルに下がっていたことから、優占種を継続的に投与してもその菌数増加効果は継続しないことが確認できた (Fig. 1-(C))。 *Lb. fuchuensis* K-11株を投与した場合 (Fig. 1-(D)), 乳酸菌数は $10^7 \sim 10^8 / g$ でほぼ一定で、全菌数については $10^9 / g$ 程度と他の菌株を投与した場合よりも若干高いレベルであった。投与期間中は投与株である *Lb.*

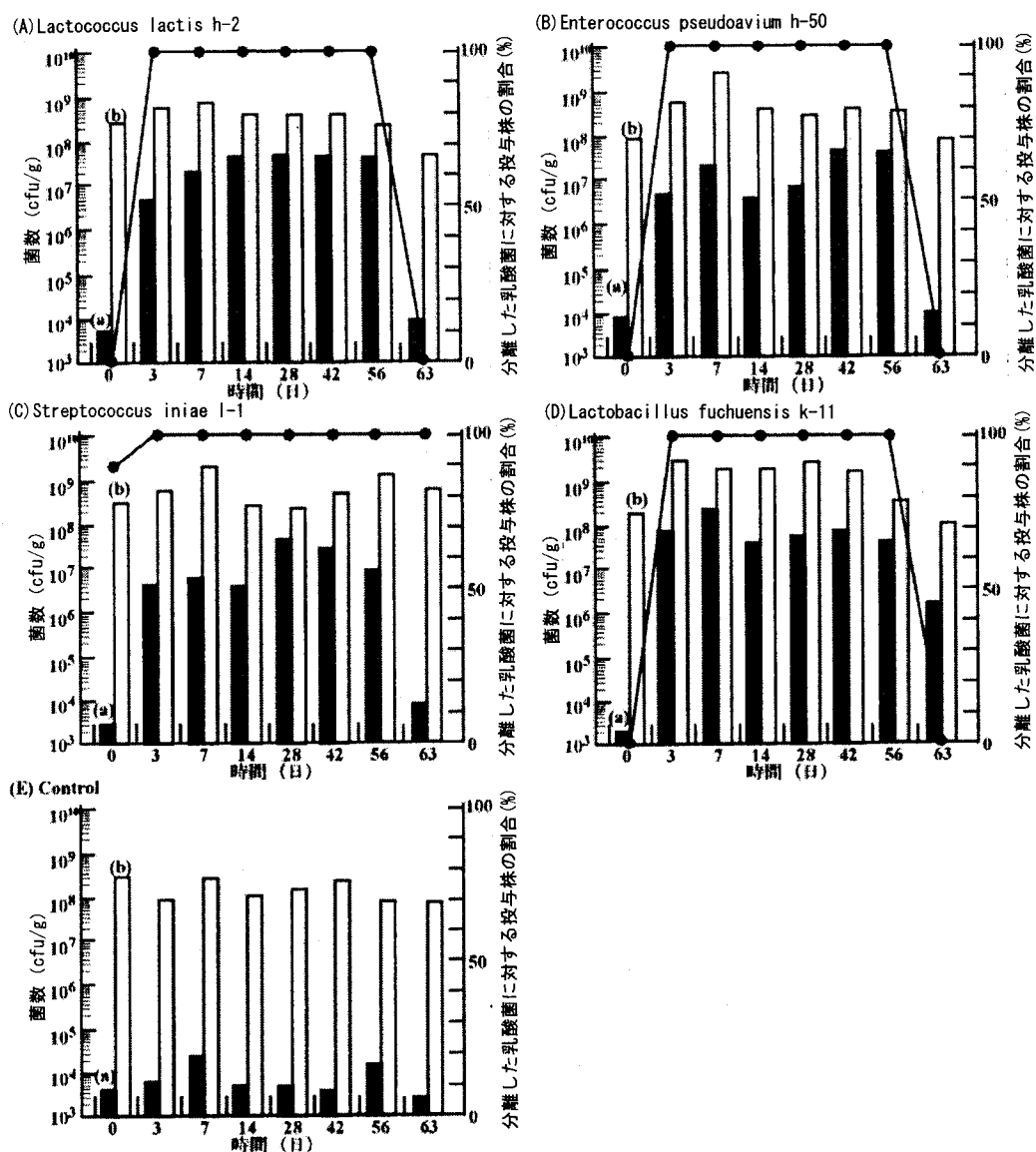


Fig. 1 投与期間中におけるコイ消化管内菌数及び乳酸菌叢の変化。

(A)は *Lactococcus lactis* h-2株を投与した場合、(B) *Enterococcus pseudoavium* h-50、(C)は *Streptococcus iniae*、(D)は *Lactobacillus fuchuensis* k-11、(E)は乳酸菌を投与しない場合の結果。棒グラフの (a) は乳酸菌数、(b) は全菌数を示す。折れ線は、分離した乳酸菌に対する投与株の割合を示す (n=2)。

Table 4 投与試験期間中の消化管内乳酸菌叢の変化

時間 (日)		0	3	7	14	28	42	56	63
投与株	分離した菌種	分離数							
h-2	<i>Lc. lactis</i>		20	20	20	20	20	20	20
	<i>Lc. raffinolactis</i>	1							
	<i>St. iniae</i>	9							10
h-50	<i>En. pseudoavium</i>		20	20	20	20	20	20	20
	<i>St. iniae</i>	10							10
I-1	<i>St. iniae</i>	8	20	20	20	20	20	20	10
	<i>Lc. raffinolactis</i>	1							
	<i>Lb. fuchuensis</i>	1							
K-11	<i>Lb. fuchuensis</i>		20	20	20	20	20	20	20
	<i>En. pseudoavium</i>								19
	<i>St. iniae</i>	9							1
control	<i>St. iniae</i>	10	10	9	10	10	8	10	10
	<i>Lc. raffinolactis</i>						1		
	<i>En. pseudoavium</i>			1			1		

Lc., *Lactococcus*; *Lb.*, *Lactobacillus*; *En.*, *Enterococcus*; *St.*, *Streptococcus*. h-2; *Lactococcus lactis* h-2, h-50; *Enterococcus pseudoavium* h-50, I-1; *Streptococcus iniae* I-1, K-11; *Lactobacillus fuchuensis* K-11, control; 乳酸菌投与しない場合(n=2)。

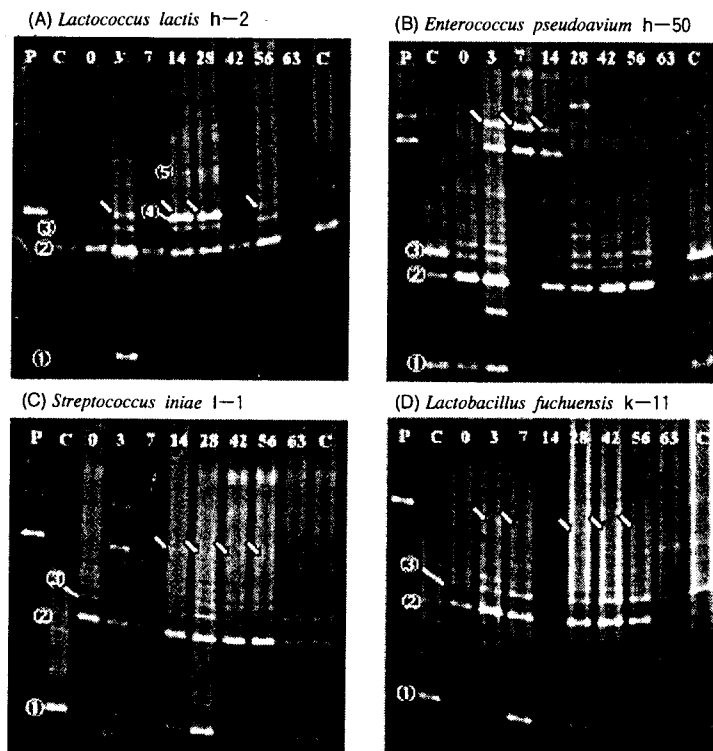


Fig. 2 乳酸菌投与後のコイ幼魚消化管内全菌叢の変化をDGGEプロファイルによって示したもの。
 (A)は*Lactococcus lactis* h-2株, (B)は*Enterococcus pseudoavium* h-50, (C)は*Streptococcus iniae* I-1, (D)は
Lactobacillus fuchuensis k-11を投与した場合を示す。Cは乳酸菌を投与していないコントロール, 0~63はサン
 プル採取日, Pは投与株を純粋培養した場合のプロファイルを示す。矢印は投与株のバンドを示す。①*Aeromonas*
veronii (相同性99%), ②*Anaerobic bacterium* G1 (100%), ③*Anaerobic bacterium* (100%), ④*Anaerobic bacterium*
 G1, *Anaerobic bacterium* AG2, *Anaerobic bacterium* ANA 6に近縁 (99%), ⑤*Anaerobic bacterium* に近縁 (99%)。

fuchuensis K-11が優占であった。投与を中止した63日目でも、乳酸菌数は 10^6 / g (Fig. 1-(D)) と、高いレベルに維持されていた。乳酸菌叢について解析した結果、K-11株ではなく*En. pseudoavium*が優占種として分離された (Table 4)。K-11株の継続投与により、投与終了後に乳酸菌数・叢が大きく変化したことは、他の菌株を投与した場合とは全く異なるものであり、注目される結果であった。

乳酸菌投与による消化管内全菌叢の変化をDGGE法で調べた (Fig. 2)。コントロール及び投与前のコイ幼魚消化管内からは、主要なバンドとして①*Aeromonas veronii* (相同性99%)、②*Anaerobic bacterium* G1 (100%)、③*Anaerobic bacterium* (100%) が共通して確認できた。*Anaerobic bacterium*は魚の消化管から分離されたもので、多種に渡りデータベースに登録されているが16S rDNAの部分配列が載せられているだけである。

Lc. lactis h-2を投与した場合 (Fig. 2-A)、上記の3つのバンド以外に、いくつかバンドがはっきりと現れ、投与によって菌叢が変化することが明らかとなった。新しく検出されたバンドのうち、2種類のバンドについて解析した結果、④*Anaerobic bacterium* G1、*Anaerobic bacterium* AG2、*Anaerobic bacterium* ANA6に近縁なもの (99%) と⑤*Anaerobic bacterium*に近縁 (99%) であった。

St. iniae I-1、*En. pseudoavium* h-50を投与した場合には、投与前のものと同様にプロファイルに差がほとんどみられず、新しく確認できたバンドは投与株自身であった (Fig. 2(B)-(C))。このことから、これら乳酸菌の投与による消化管内菌叢への影響はほとんどないものと考えられた。*Lb. fuchuensis* K-11を投与した場合、投与期間中は消化管内菌数が増加し (Fig. 1-(D))、投与を中止した63日目でも、乳酸菌数は 10^6 / g (Fig. 1-(D)) と高いレベルに維持された。さらに、乳酸菌叢について、投与前とは異なる*En. pseudoavium*が優占種として分離され (Table 4)、乳酸菌叢の変化が起こったが、DGGEのプロファイルは投与前のものと同様に差がなかった。このことから、*Lb. fuchuensis*

K-11の投与は、消化管内菌数や乳酸菌叢に対して影響があるが、全菌叢に対する影響はほとんどないものと考えられた。

補体価 (代替経路) の測定 非特異的免疫系である補体代替経路の補体価について調べた (Fig. 3)。*En. pseudoavium* h-50株を投与した場合には、投与期間中を通してコントロールとほぼ同じ値であった。*St. iniae* I-1を投与した場合、投与期間中の3、14、28、42、56日目は補体価の上昇が確認できた。しかし、投与を中止して一週間後の63日目には補体価は減少し、コントロールとほぼ同じ値になったことから、投与中止後に継続的な効果は得られないことがわかった。*Lb. fuchuensis* K-11については、3日目に補体価の大幅な上昇が確認でき、7日目に大幅に減少したが、14、28、42日目にわずかだが補体価の上昇がみられた。しかし、投与期間中の56日目には補体価の上昇がみられなかったことから、継続して補体価を上昇させることができないと考えられる。*Lc. lactis* h-2を投与した場合、補体価が低下傾向であったが、投与を中止して一週間後の63日目には補体価はコントロールとほぼ同じ値となった。

貪食細胞のNBT還元能 非特異的免疫系である貪食細胞のNBT還元能について調べた (Fig. 4)。*Lc. lactis* h-2株を投与した場合、3日目にNBT還元能の上昇がみられたが、その後の7日目についてはコントロールと類似した値に低下した。しかし、14、28、42、56日目には貪食細胞の活性化がみられた。また、投与を中止して一週間後の63日目ではコントロールと類似した値となった。*En. pseudoavium* h-50株、*St. iniae* I-1、*Lb. fuchuensis* K-11についてはコントロールとの差はほとんど見られなかったことから、これらが貪食細胞に及ぼす影響はほとんど無いと考えられた。

飼料効率 各水槽に飼育したコイ幼魚の平均体重の変化については以下に示した。*Lc. lactis* h-2株投与水槽：|投与前：43.3 g, 56日目：79.0 g|、*En. pseudoavium* h-50投与水槽：|投与前：42.2 g, 56日目：80.3 g|、*St. iniae* I-1投与水槽：|投与前：43.2 g, 56日目：87.5

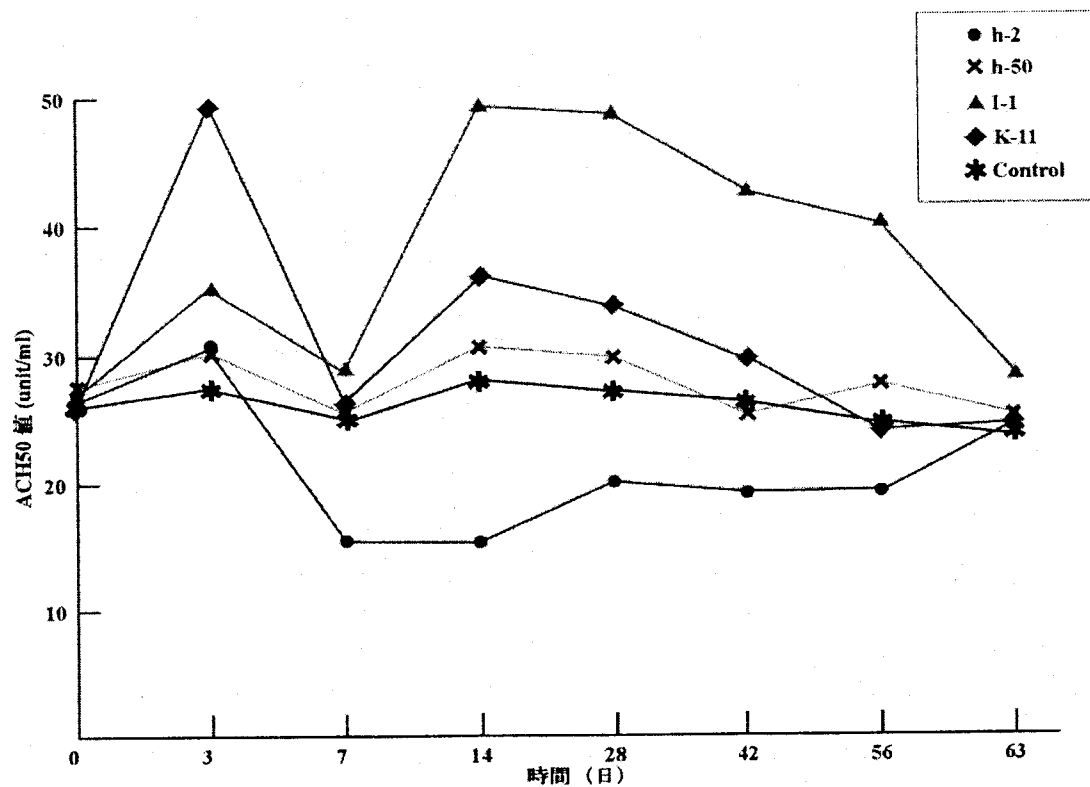


Fig. 3 乳酸菌投与による補体価 (代替経路) の変化。

h-2 : *Lactococcus lactis* h-2, h-50 : *Enterococcus pseudoavium* h-50, I-1 : *Streptococcus iniae* I-1, k-11 : *Lactobacillus fuchuensis* k-11, control : 乳酸菌を投与しない場合を示す (n = 2)。

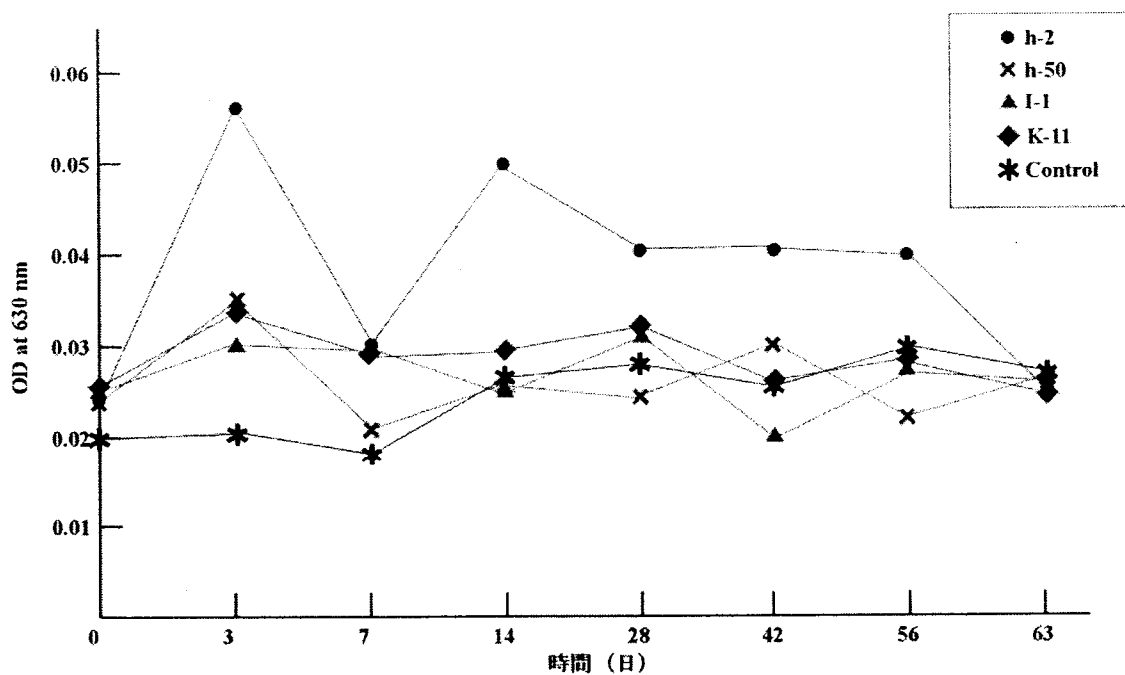


Fig. 4 貪食細胞の機能測定-NBT還元能試験。

h-2 : *Lactococcus lactis* h-2, h-50 : *Enterococcus pseudoavium* h-50, I-1 : *Streptococcus iniae* I-1, k-11 : *Lactobacillus fuchuensis* k-11, control : 乳酸菌を投与しない場合を示す (n = 2)。

g|, *Lb. fuchuensis* K-11: |投与前: 42.3 g, 56日目: 90 g|, コントロール水槽: |投与前: 45.0 g, 56日目: 89.0 g|。 *Lb. fuchuensis* K-11を投与した場合, 体重増加量が最も多く, コントロールに比べて約10%もの飼料効率の上昇がみられた (Fig. 5)。

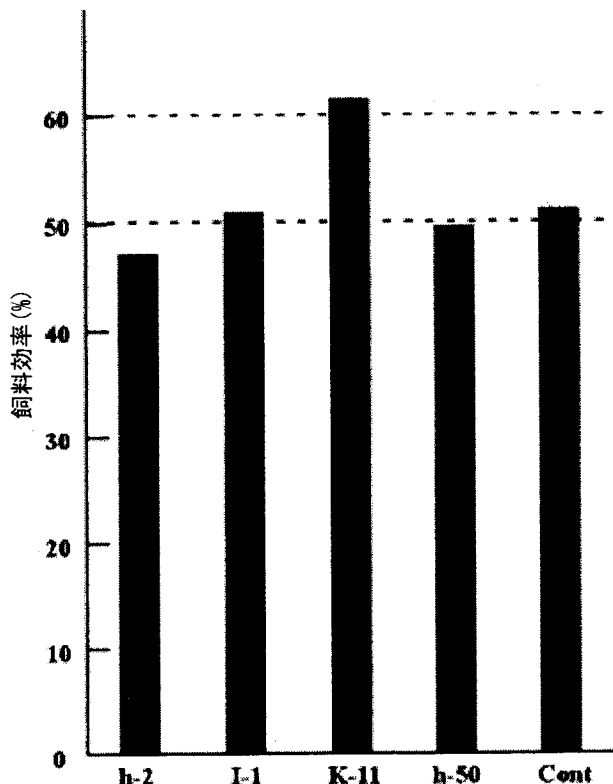


Fig. 5 飼料効率。

h-2: *Lactococcus lactis* h-2, h-50: *Enterococcus pseudoavium* h-50, I-1: *Streptococcus iniae* I-1, k-11: *Lactobacillus fuchuensis* k-11, cont: 乳酸菌を投与しない場合を示す (n=10)。

4. 考 察

本実験で, *Lc. lactis* h-2, *St. iniae* I-1, *En. pseudoavium* h-50, *Lb. fuchuensis* K-11の4株をプロバイオティクス候補株として選択し, コイ幼魚への長期投与試験を行った結果, *Lactococcus lactis* h-2株, *Streptococcus iniae* I-1株を投与した場合について, 非特異的免疫機能の上昇が確認できた。

Lactococcus lactis h-2株を投与した場合については, 消化管内全菌叢の変化, 補体価の低下, 貪食細胞の活

性化が確認できた。補体代替経路は, ウサギ赤血球により補体成分C3が活性化され, ついでC5~C9が活性化されて膜侵襲複合体を形成する (細胞溶解経路)。補体価 (ACH50) は, これら補体成分の総合的な細胞溶解の強さをウサギ赤血球の溶血率から求めたものである。つまり, 補体価の低下は, *Lc. lactis* h-2株を投与することによって補体成分が活性化され補体成分が減少したために, 補体価の低下が生じたと考えられる。補体はLipopolysaccharide (LPS) や β 1,3-グルカンなど細胞外多糖や細胞壁成分によって活性化されることから (Iwama and Nakanishi, 1996), *Lc. lactis* h-2株の膜や多糖類が補体価低下の要因の1つであると考えられる。マクロファージについても, LPSや β 1,3-グルカンが活性化することから (Iwama and Nakanishi, 1996), *Lc. lactis* h-2株の膜成分や多糖類などが, 補体価の低下とマクロファージ活性化の要因である可能性が考えられる。また, 菌叢変化と生理機能の変化が同時に確認できたことから, 投与した乳酸菌だけでなく, その他の腸内細菌も宿主生理機能に影響を及ぼしている可能性も示唆された。*Lc. lactis* h-2を投与することによって, 新たに*Anaerobic bacterium*に近縁なバンドやそれ以外のバンドがいくつか現れたことから, これらも宿主に対し影響を及ぼしているのではないかと考えられる。

Streptococcus iniae I-1を投与した際, 補体価の大幅な上昇が確認できた。*St. iniae* I-1の持つ何らかの因子によって, 補体成分が増加されたことが補体価上昇の要因の1つであると推測される。また, 我々は以前にコイ成魚の消化管内乳酸菌叢を調べており, 夏季に*Lc. lactis*, 冬季に*Lc. raffinolactis*が優占であることを報告している。しかし, コイ幼魚の腸内乳酸菌については優占乳酸菌として*St. iniae*が存在し, コイ成魚とコイ幼魚で乳酸菌叢が異なることが考えられる。一方で, コイ成魚は霞ヶ浦の水, 幼魚は井戸水で飼育されていたことから, 飼育条件の違いによって乳酸菌叢に差がみられたという可能性も考えられる。*Lb. fuchuensis* K-11株を継続投与した場合, 飼料効率の大幅な上昇

がみられた。飼料効率上昇の要因として、菌体成分が宿主の栄養源となったということや、消化管内菌数の増加があげられる。*Lb. fuchuensis* K-11株を投与した場合、他の菌を投与した時に比べて、消化管内乳酸菌数及び全菌数が多い。魚の腸内にいる数種類の菌はビタミンを生産することから (Sugitaら, 1991), 菌数増加に伴うビタミンなどの宿主成長補助因子の生産量増加や腸内細菌による餌成分の分解促進が飼料効率の増加に繋がったと考えられる。

今回の結果から、免疫賦活作用のある*Lc. lactis* h-2, *St. iniae* I-1, そして飼料効率を上昇させる*Lb. fuchuensis* K-11株が魚類プロバイオティクスとして適していると考えられた。それぞれ魚に対する免疫賦活作用が異なることから、これらを混合して用いることで、ウイルスや細菌などの魚病原菌感染に対する抵抗性がより強くなることも期待される。また、飼料吸収の効率化は、飼料量の低減につながるものであり、養殖場の水質・底質の改善にも寄与すると考えられる。

また、免疫系に作用した*Lc. lactis* h-2と*St. iniae* I-1は、いずれも消化管内で優占種だった菌株である。このことは、常在菌が宿主とコンタクトしていることを示唆し、いわゆる宿主と腸内細菌の「クロストーク」(Uzzauら, 2000) が存在するのではないかと考えられ非常に興味深い。

5. 要 約

プロバイオティクスとして用いる菌株については、消化管内菌叢改善や宿主の免疫賦活効果が重要となるが、魚類については乳酸菌投与が消化管内菌叢や宿主に及ぼす影響についてはほとんど明らかにされていない。そこで本研究では、乳酸菌を中心に魚類と消化管内微生物の関連性を解明することを目的とし、コイ幼魚に対する長期的な乳酸菌経口投与実験を行い、消化管内菌叢解析、生理機能変化の解析を行った。

投与候補株として、コイ成魚で優占種であった*Lactococcus lactis* h-2, コイ幼魚で優占であった*Streptococcus iniae* I-1, 一般細菌に対する抗菌活性ス

ペクトルの広い*Enterococcus pseudoaerium* h-50と魚病原菌に対し強い抗菌活性を示す*Lactobacillus fuchuensis* K-11を選択した。これら4株の投与試験を行い、消化管内菌叢、生理機能の変化(補体価、貪食細胞の機能測定-NBT還元能)を調べた。その結果、h-2株を投与した場合、貪食細胞の活性がみられ、I-1株を投与した際には補体価の上昇が確認できた。また、K-11株を投与することによって、飼料効率が約10%上昇した。

引用文献

1. Al - Harbi, A. H. and Uddin, M. N. (2004) : Seasonal variation in the intestinal bacteria flora of hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus* × *Oreochromis aureus*) cultured in earthen ponds in Saudi Arabia. *Aquaculture*, 229, 37 - 44.
2. Asfie, M., T. Yoshijima and H. Sugita 2003 : Characterization of the goldfish fecal microflora by the fluorescent in situ hybridization method. *Fish. Sci.* 69, 21 - 26.
3. Barefoot, S. F. and Klaenhammer, T. R. (1983) : Detection and activity of Lactacin B, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 45, 1808 - 1815.
4. Berridge, B. R., Fuller, J. D., Joyce de Azavedo, Low, D. E., Bercovier, H., Frelier, P. F. (1998) : Development of specific nested oligonucleotide PCR primers for the *Streptococcus iniae* 16S - 23S ribosomal DNA intergenic spacer. *J. Clin. Microbiol.*, 36, 2778 - 2781.
5. Cai, Y., Suyanandana, P., Saman, P., and Y. Benno (1999) : Classification and characterization of lactic acid bacteria isolated from the intestine of common carp and fresh water prawns. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 45, 177 - 184.
6. Gonzalez, C. J., Encinas, J. P., Garcia - Lopez, M. L. and Otero, A. (2000) : Characterization and identification of lactic acid bacteria from fresh water fishes. *Food Microbiol.*, 17, 383 - 391.
7. Guarner, F. and Malagelada, J. R. (2003) : Gut flora in

- health and disease. *Lancet*, 361, 512 - 519.
8. T. Hagi, D. Tanaka, Y. Iwamura, T. Hoshino (2004) : Diversity and seasonal changes in lactic acid bacteria in the intestinal tract of cultured fresh water fish. *Aquaculture*, available online.
 9. Holben, W. E., Williams, P., Saarinen, M., Sarkilahti, L. K. and Apajalahti, J. H. A. (2002) : Phylogenetic analysis of intestinal microflora indicates a novel *Mycoplasma* phylotype in farmed and wild salmon. *Microb. Ecol.*, 44 (2), 175 - 185.
 10. Hooper, L. V., Wong, M. H., Thelin, A., Hansson, L., Falk, P. J. and Gordon, J. I. (2001) : Molecular analysis of commensal Host - Microbial relationship in the intestine. *Science*, 291, 881 - 884.
 11. Irianto, A. and Austin, B. (2002) : Probiotics in aquaculture. *J. Fish Dis.*, 25, 633 - 642.
 12. K. Ishii, T. Nakagawa, M. Fukui (2000) : *Microbes and Environments*, Vol.15, No.1, 59 - 73.
 13. Iwama, G. and T. Nakanishi. (1996) : The fish immune system, *Fish physiology* 15, Academic press, 63 - 140.
 14. Kaur, I. P., Chopra, K. and Saini, A. (2002) : Probiotics: potential pharmaceutical applications. *Eur. J. Pharmaceutical Sciences*, 15, 1 - 9.
 15. Kekessy, D. A. and Piguet, J. D. (1970) : New method for detecting bacteriocin production. *Applied Microbiology*, Aug, 282 - 283.
 16. Mayr - Harting, A., Hedges, A. J. and Berkeley, R. C. W. (1972) : Methods for studying bacteriocins. *Method in microbiology*, vol.7A, Academic Press, Inc., New York, 315 - 422.
 17. Muzer, G., Waal, E. C. and Uitterlinden, A. G. (1993) : Profiling complex of microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction - amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.*, 59, 695 - 700.
 18. Neumann, M. N., Stafford, J. L., Barreda, D., Ainsworth, A. J. and Belosevic, M. (2001) : Antibacterial mechanisms of fish phagocytes and their role in host defense. *Dev. Comp. Immunol.*, 25, 807 - 825.
 19. Plant, L., Lam, C., Conway, P. L. and O'Riordan, K. (2002) : Gastrointestinal microbial community shifts observed following oral administration of a *Lactobacillus fermentum* strain to mice. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 1428, 1 - 8.
 20. Ringo, E. and Gatesoupe, F. J. (1998) : Lactic acid bacteria in fish. *Aquaculture*, 160, 177 - 203.
 21. M. Sakai, M. Kobayashi and H. Kawauchi. (1996) : In vitro activation of fish phagocytic cells by GH, prolactin and somatolactin. *J. Endocrinol.*, 151, 113 - 118.
 22. Salminen, S., Ouwehand, A., Y. Benno and Lee, Y. K. (1999) : Probiotics: how should they be defined? *Trends Foods Sci. Technol.*, 10, 107 - 110.
 23. H. Sugita, C. Miyajima, Y. Kobiki and Y. Deguchi (1990) : The daily fluctuation and inter - individual variation of the faecal flora of carp, *Cyprinus carpio* L. *J. Fish Biol.*, 36, 103 - 105.
 24. H. Sugita, C. Miyajima and Y. Deguchi (1991) : The vitamin B12 - producing ability of the intestinal microflora of freshwater fish. *Aquaculture*, 92, 267 - 276.
 25. Tuohy, K. M., Probert, H. M., Smejkal, C. W. and Gibson, G. R. (2003) : Using probiotics and prebiotics to improve gut health. *Drug Discov. Today*, 8 (15), 692 - 700.
 26. Uzzau, S. and Fasano, A. (2000) : Microreview Cross - talk between enteric pathogens and the intestine. *Cellular Microbiol.*, 2 (2), 83 - 89.
 27. T. Yano, Y. Hatayama, H. Matsuyama and M. Nakao (1988) : Titration of the alternative complement pathway activity of representative cultured fishes. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 54 (6), 1049 - 1054.
 28. Zhu, H., Qu, F. and Zhu, L. (1993) : Isolation of genomic DNAs from plants, fungi and bacteria using benzyl chloride. *Nuc. Acids Res.*, 21, 5279 - 5280.