

遺伝子機能解析を志向したヒト由来ビフィズス菌 *Bifidobacterium longum* 105-A の通常飼育マウス腸内での定着飼育系の確立

共生基盤学専攻 食品安全・機能性開発学講座 胃腸内圏微生物学 川瀬 陽平

1. 背景と目的

ビフィズス菌の腸内での活動の分子機構を明らかにすることは、宿主-ビフィズス菌間の共生関係や健康増進効果の理解に重要である。この分子機構を解明するためには、それに寄与すると推定される遺伝子の欠損株を構築し、マウスへの投与試験を行う必要がある。しかし、ヒト由来ビフィズス菌は通常飼育マウスの腸内には定着しにくいことが知られているため、腸内細菌叢存在下での当該遺伝子の重要性の評価は困難である。そこで本研究では、ビフィズス菌が示す多様な糖の資化性に着目し、ヒト由来ビフィズス菌を通常飼育マウス腸内に2週間程度定着させる飼育試験系の確立を試みた。

2. 方法

投与したビフィズス菌が糞便1g当たり 1×10^6 colony-forming unit (cfu) 以上の生菌数で2週間程度維持できる飼育試験系の構築を目指した。① ヒト由来ビフィズス菌 *Bifidobacterium longum* 105-A (以下105-A株) を、14種類の糖を各々単一糖源とした1/2MRS培地で37°C、24時間嫌気培養し、OD₆₆₀を測定することにより生育を評価した。② マウスへの投与試験において、投与株の腸内への定着を評価するためには、糞便中から投与株を選抜する必要があるため、クロラムフェニコール耐性遺伝子を持つベクターをエレクトロポレーション法によって105-A株に導入した。③ 7週齢のBALB/c雌マウスを、AIN-93G準拠食(基準食)を与えた対照群と、①で選抜した各糖を3%または6%となるように基準食に添加した飼料を与えた群に分け、②で構築した株 (10^9 cfu) を1日1回、3日間連続で経口投与した。最初の投与開始から24時間毎に糞便を回収し、糞便希釈液をクロラムフェニコール含有1/2MRS寒天培地に塗抹して37°Cで3日間嫌気培養を行い、コロニー数から投与株の生菌数を算出した。④ ③で得られた結果を基に、目標に適した条件群に対して③と同様の実験を再度行い、再現性を評価した。

3. 結果と考察

①の生育評価の結果、グルコースを単一糖源とした場合と同等の生育量を示したラフィノース、1-kestoseおよびラクトースを候補糖源として選抜した。②で構築したクロラムフェニコール耐性105-A株を用いて、③の投与試験を行った結果、ラフィノースまたは1-kestose 6%添加飼料群において、それぞれ11日間または10日間、 1×10^6 cfu/g糞便以上の生菌数を維持することができた。④ ③の結果に基づいて、6%ラフィノース添加飼料群 ($n=6$)、6%1-kestose添加飼料群 ($n=5$) に対して再度行った投与試験の結果、両群とも14日間、 1×10^6 cfu/g糞便以上の生菌数を維持することができた。これにより、両添加飼料群における105-A株の腸内定着の再現性を得ることができた。以上の結果から、105-A株を投与しマウス腸内への定着を促す飼育条件として、ラフィノースまたは1-kestoseを6%含有する飼料をマウスに与えることが有効であることが示された。

4. 今後の課題

今後は、6%ラフィノースおよび6%1-kestose添加飼料条件下で105-A株を投与した場合のマウス腸内の細菌叢の変化を検証するため、盲腸内容物中の菌叢構造、糞便中の有機酸を分析する。