

培養法とPCR-DGGE法による現役競走馬（サラブレッド）の腸内フローラ解析

Analysis of gastrointestinal flora of active racehorses (thoroughbreds) determined by culture method and PCR-denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE)

遠藤明仁¹, 岩本浩昭², 白鳥千春², オカタニ A. トモミツ²,
村上 賢², 加藤行男², 長山昌広³, 岡田早苗¹, 森田英利²

¹東京農業大学菌株保存室, ²麻布大学獣医学部, ³高知県競馬組合競走馬診療所

Akihito Endo², Hiroaki Iwamoto¹, Chiharu Shiratori¹, Okatani A. Tomomitsu¹,
Masaru Murakami¹, Yukio Kato¹, Masahiro Nagayama³, Sanae Okada² and Hidetoshi Morita¹

¹ School of Veterinary Medicine, Azabu University,

² NODAI Culture Collection Center, Tokyo University of Agriculture,

³ Kochi Racing Association

Abstract. We analyzed the gastrointestinal flora of active racehorses by culture method and determined by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). One active racehorse feces was analyzed by using 17 selective media as the culture method. The bacterial flora, and *Lactobacillus*, *Enterococcus* and *Bifidobacterium* flora in the feces of 6 healthy, actively racing Thoroughbreds were used by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) with primer sets universal and specific for each group, respectively. PCR-DGGE analyses of the feces showed that *Lactobacillus equi*, an organism phylogenetically related to *Lactobacillus salivarius*, and a strain phylogenetically related to *Lactobacillus gastricus* were present in almost all of the fecal samples tested, and *Streptococcus bovis*/*Streptococcus equinus* was the predominant representative of the *Enterococcus* group. Single PCR of the samples failed to detect any members of the *Bifidobacterium* group, but nested PCR identified *Bifidobacterium boum*, two isolates phylogenetically related to *Bifidobacterium urinatis*, and *Parascardovia denticolens* in 3 of the 6 horses tested. *B. boum* was isolated by the culture method, although the population of *Bifidobacterium* was very low. On the other hand, *L. equi*, *L. salivarius*, *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus ruminis*, *Lactobacillus mucosae*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus jonsonii*, *Lactobacillus thermotolerans*, *Lactobacillus delbrueckii* and *Lactobacillus vitulinus* were isolated as *Lactobacillus* group from the feces of 3 healthy, actively racing Thoroughbreds. These results indicate that the lactic acid bacterial and bifidobacterial distributions in horse feces are unique because of the presence of species specific to horses and because of the dearth of *Bifidobacterium* isolates.

1. 目的:

サラブレッドは、感染症、ストレス、環境変化などが原因で容易に下痢を発症する。そして、腸ねん転や疝痛（腹痛）によって死亡することもしばしば

見受けられる。しかし、ウマの健常時の腸内フローラ解析に関し培養法での報告¹⁾がある程度で、健常なサラブレッドを特定した腸内フローラ解析はほとんど行われていない。

以前より、培養法では検出できない細菌が非常に

多いことが提唱されており、最近では、遺伝学的手法を用いたフローラ解析が盛んになってきている。糞便や腸管内容物を対象にしたPCR-変性剤濃度勾配ゲル電気泳動（DGGE）法²⁾やメタゲノム解析法³⁾がその主な手法となる。しかし、

本研究では、健常な現役競走馬のサラブレッドの糞便を、培養法とPCR-変性剤濃度勾配ゲル電気泳動（DGGE）法に供した。2頭の競走馬について、17種類の選択培地⁴⁾を用いて培養法による腸内フローラ解析を行った。それら2頭のウマを含む6頭については、細菌に対するユニバーサルプライマーと、*Lactobacillus*属、*Enterococcus*属および*Bifidobacterium*属特異的プライマーを用いたPCR-DGGE法での腸内フローラ解析を行った。

2. 方法：

糞便サンプル：6頭（年齢が2～7歳、そして1頭の牝馬と5頭の牡馬）の健常な現役競走馬、サラブレッドA～Fの糞便を、2003年10月～12月にサンプリングした。サラブレッドAは、実際のレースの出走前後の4回（A¹：10月3日、A²：10月24日、A³：11月12日、A⁴：12月18日）のサンプリングを行った。その他のウマは、1回のサンプリングを行った。その間、どのウマも消化管疾患はなく、プロバイオティクスやプレバイオティクスの投与はな

かった。糞便は、排泄後すぐに嫌気状態、4℃で輸送後、培養法に供した。PCR-DGGE法へのサンプルは、研究室内で-80℃以下に凍結し一括して解析した。

DNA抽出とPCR増幅：糞便（100 mg）からの細菌DNAの抽出は、Matsuki *et al.*⁵⁾の方法に従って行った。最終的なDNAは50 μlのTE bufferに懸濁して凍結保存した。使用前には、TE bufferで10倍に希釈してPCR等に用いた。用いたプライマーとその対象（ターゲット）菌属の情報は、Table 1に示した。PCR増幅の装置は、PTC-200 DNA Engine（MJ Japan, Tokyo, Japan）を用いた。*Bifidobacterium*フローラについては、nested PCR解析を行った。Satokari *et al.*の方法⁶⁾に従って、first-round PCRにはTable 1のIm26-fとIm3-rプライマーを用い、second-round of PCRにはBif164-fとBif662-GC-rプライマーを用いた。first-roundのPCR産物は、Wizard SV GelとPCR Clean-up system（Promega, Madison, Wis.）により精製した。精製したPCR産物は、second-round PCRに用いる際にはTE bufferで10倍に希釈しその1 μlをPCRのテンプレートに用いた。

DGGE解析とゲルからのDNAフラグメントの切り出し：PCR産物のDGGE解析の装置は、DCode System（Bio-Rad, Hercules, Calif.）を用いた。DGGE解析において、8%（wt/vol）polyacrylamide gelを用

Table 1. Primers used in this study

Primer	Sequence (5' to 3')	Target	Reference
UniversalF	GC clamp-CCTACGGGAGGCAGCAG	All the bacteria	1)
UniversalR	ATTACCGCGGCTGCTGG		
Lac1	AGCAGTAGGGAATCTTCCA	<i>Lactobacillus</i> group 16S rDNA	8
Lac2GC	CGCCCGGGGCGCGCCCGGGCGGCCCGGG GGCACCGGGG ATTYCACCGCTACACATG	Lactic acid bacterial 16S rDNA	8
Lac3	AGCAGTAGGGAATCTTCGG	<i>Enterococcus</i> group 16S rDNA	9
Lac2	ATTYCACCGCTACACATG	Lactic acid bacterial 16S rDNA	8
Bif164 f	GGGTGGTAATGCCGGATG	<i>Bifidobacterium</i> group 16S rDNA	12, 13
Bif662 GC r	CGCCCGCGCGCGCGGGCGGGGCGGG GGCACGGGGG CCACCGTTACACGGGAA	<i>Bifidobacterium</i> group 16S rDNA	12, 13
Im26 f	GATTCTGGCTCAGGATGAACG	<i>Bifidobacterium</i> group 16S rDNA	14
Im3 r	CGGGTGTCTICCACTTTCATG	<i>Bifidobacterium</i> group 16S rDNA	14

1) The approximately 200 bp of *E. coli* No. 341-534 of 16S rDNA amplified by PCR as the universal primers.

い、変性剤濃度は35%～50% (*Lactobacillus* 属), 37.5%～52.5% (*Enterococcus* 属), そして45%～60% (*Bifidobacterium* 属) を用いた。その他の操作は、DCode System に付属の説明書どおりに行った。30分の電気泳動後、ゲルの染色は、SYBR green I nucleic acid gel stain (BioWhittaker Molecular Applications, Rockland, MD) を用いた。ゲルからのDNAフラグメントの切り出しは、滅菌した爪楊枝で行った。そのフラグメントは、各プライマーで再度増幅し、次の実験に供した。

DNAの配列決定: DGGEバンドから切り出したPCR産物は、Wizard SV Gel and PCR Clean-up system (Promega, Madison, Wis.) により精製した。そのDNA断片は、BigDye Terminator cycle sequencing kit (Applied Biosystems Japan, Tokyo, Japan) により配列決定した。BLAST解析⁷⁾とGenBankに登録の配列との同源性検索を行い、98%以上の同源性を示した場合はその菌種と同定し、98%以下の同源性の場合は最も上位の“近縁種”と記載した。

3. 結果と考察:

ウマ糞便中の腸内フローラのDGGE解析: 動物種にもよるが、哺乳動物の腸内細菌は数百種類いると考えられている。16S rDNAのユニヴァーサルプライマーを用いて、PCR-DGGE解析を行った。その対象はサラブレッドAの2つのサンプルA¹とA²とし、そのDGGEの泳道結果をFig. 1に示した。非常にたくさんのバンドが確認され、多くの哺乳動物同様、多くの細菌で腸内フローラが形成されていることが認められた。各バンドが重なっているため、切り出しのシーケンスと菌種の同定は行わなかった。

ウマ糞便中の*Lactobacillus*属フローラのDGGE解析: プライマーLac1とLac2GCを用いてPCR増幅すると、*Lactobacillus*属、*Leuconostoc*属、*Pediococcus*属および*Weissella*属⁸⁾の16S rDNAが増幅される。サラブレッドAの経時的な4つのサンプルは、Fig. 2のA¹レーン～A⁴レーンに示した。A², A³, A⁴は似たDGGEパターンを示したが、A¹のDGGEパターンは少し違っていた。そして、特徴的なバンドを切り出して菌種を同定した。その詳細な情報はTable 2のとおりであるが、*Lactobacillus salivarius* 近縁種、*Weissella confusa*/*Weissella cibaria*, *Lactobacillus*



Fig. 1 DGGE analysis of PCR products of bacteria amplified by using universal primers from horse feces. Lanes A1 and A2 correspond to sample A¹ and A² correspond to fecal samples of thoroughbreds A.

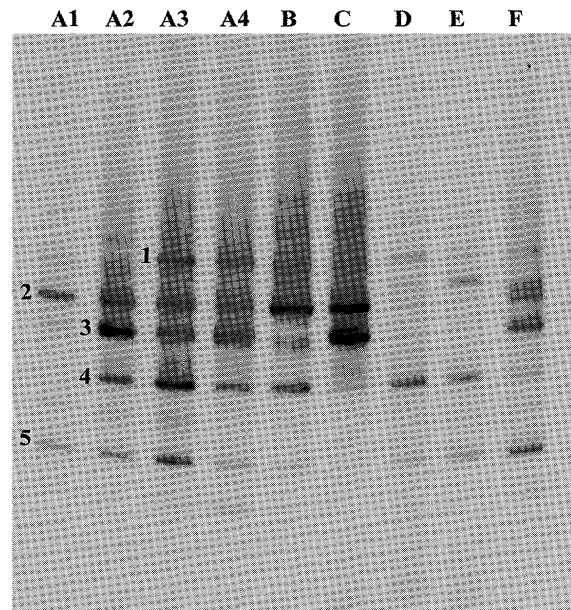


Fig. 2 DGGE analysis of PCR products of *Lactobacillus* group amplified by using Lac1 and Lac2GC primers from horse feces. Lanes A1 to A4 correspond to sample A¹ to A⁴, and lanes B to F correspond to fecal samples of thoroughbreds B to F, respectively. The bands labeled 1 to 5 are described in Table 2.

johnsonii, *Lactobacillus equi*, *Lactobacillus gastricus* 近縁種が同定された。サラブレッドBとFは、似たようなDGGEパターンを示した。*L. gastricus* 近縁種

Table 2 Similarities of bands obtained by DGGE analyses of horse feces

Figure	Band	Closest relatives	% similarity	Accession no.
1	1	<i>L. johnsonii</i>	99	AB250236
	2	<i>L. equi</i>	100	AB250237
	3	<i>W. confusa</i> , <i>W. cibaria</i>	99	AB250238
	4 ¹⁾	Uncultured eubacterium clone (AY212750)	99	AB250239
		<i>L. salivarius</i>	95	
	5	<i>L. gastricus</i>	98	AB250240
2	6 ²⁾	Not identified		AB250241
	7	<i>E. casseliflavus</i>	99	AB250242
	8 ²⁾	Not identified		AB250243
	9	<i>S. bovis</i> , <i>S. infantarius</i> , <i>S. criceti</i> ,	96	AB250244
	10	<i>S. hyointestinalis</i>		
		<i>S. bovis</i> , <i>S. macedonicus</i> , <i>S. alactolyticus</i> ,	96	AB250245
	11	<i>S. gallolyticus</i> , <i>S. intestinalis</i> , <i>S. pasteurii</i>		
	12	<i>S. equi</i>	99	AB250246
	13	<i>S. bovis</i> , <i>S. equinus</i>	99	AB250247
	14	<i>S. bovis</i> , <i>S. equinus</i>	100	AB250248
	<i>S. bovis</i> , <i>S. equinus</i>	99	AB250249	
15				
3	16	<i>B. urinalis</i>	97	AB250250
	17	<i>B. urinalis</i>	97	AB250251
	18	<i>P. denticolens</i>	99	AB250252
	19	<i>P. denticolens</i>	99	AB250253
		<i>B. boum</i>	99	AB250254

L.: *Lactobacillus*, W.: *Weissella*, E.: *Enterococcus*, S.: *Streptococcus*, B.: *Bifidobacterium*, P.: *Parascardovia*

The numbers of the bands correspond to those in Figure 1 through 3.

¹⁾ As the closest relatives in GenBank was an uncultured eubacterial clone (AY212750), similarity to *L. salivarius*, which was the most-related known species, was also shown.

²⁾ The closest relatives and sequence similarity were not able to be shown because of too low similarity with all sequences in DataBase.

は、すべてのウマに存在する *Lactobacillus* 属であった。

ウマ糞便中の *Enterococcus* 属と *Streptococcus* 属フローラの DGGE 解析：プライマー Lac3 and Lac2GC により 16S rDNA を増幅すると、*Enterococcus* 属、*Lactococcus* 属、*Streptococcus* 属、*Tetragenococcus* 属および *Vagococcus* 属⁹⁾ が増幅される。Fig. 3 の A1 レーン～ A4 レーンに示したとおり、サラブレッド A の 4 つのサンプルでほぼ安定して同じ菌種がみられた。シークエンスと相同性検索の結果 (Table 2)、*Streptococcus bovis*/*Streptococcus equinus* がサラブレッド A の主要菌種であったが、*Enterococcus* 属は検出されていない。*S. bovis*/*S. equinus* は、その他すべてのサラブレッドから検出された (Fig. 3)。*Enterococcus* 属は、培養法により分離されることもあった。*Enterococcus* 属の構成比は少なく PCR バイアスのた

め、PCR-DGGE 法で検出できなかったと思われる。ウマ糞便中の *Bifidobacterium* 属フローラの DGGE 解析：プライマー Bif164-f と Bif662-GC-r を用いた single-PCR では、*Bifidobacterium* 属を検出できなかった。そこで、菌数が少ない場合の検出感度を上げるために nested-PCR¹⁰⁾ を行った。すなわち、first-round PCR でプライマー Im26-f と Im3-r を使い、second-round PCR でプライマー Bif164-f と Bif662-GC-r を用いた。その結果、9 サンプルから 6 つにおいて 16S rDNA 断片の増幅を認めた。そして、PCR-DGGE 法に供し、Fig. 4 に示した。その菌種の同定結果は、Table 2 に示した。その 1 つである *Parascardovia denticolens* は、元々 *Bifidobacterium denticolens*¹¹⁾ と称された菌種である。そして、*Bifidobacterium urinalis* 近縁種と *Bifidobacterium boum* が検出された。*B. boum* は生菌での分離にも成功した。

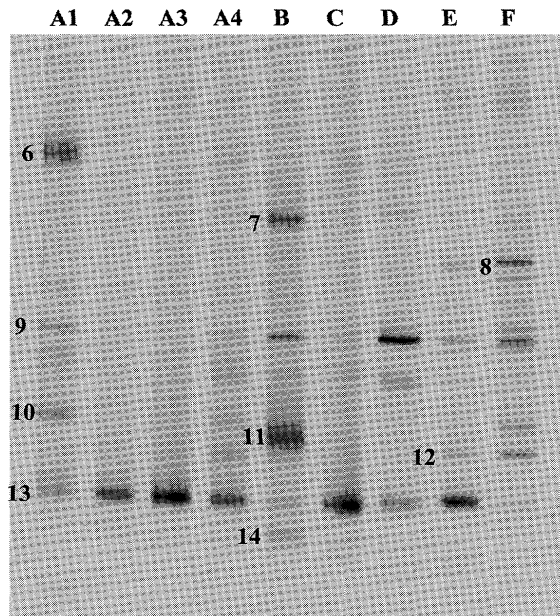


Fig. 3 DGGE analysis of PCR products of *Enterococcus* group amplified by using Lac3 and Lac2GC primers from horse feces. Lanes A1 to A4 correspond to sample A¹ to A⁴, and lanes B to F correspond to fecal samples of thoroughbreds B to F, respectively. The bands labeled 6 to 14 are described in Table 2.

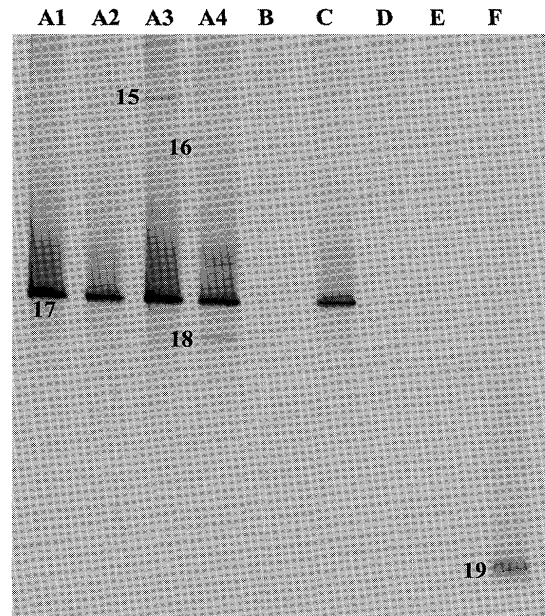


Fig. 4 DGGE analysis of PCR products of *Bifidobacterium* group amplified by nested-PCR using Im26-f and Im3-r primer set and Bif164-f and Bif662-GC-r primer set from horse feces. Lanes A1 to A4 correspond to sample A1 to A4, and lanes B to F correspond to fecal samples of thoroughbreds B to F, respectively. The bands labeled 15 to 19 are described in Table 2.

菌数の明らかな対象に対する nested-PCR の測定限界から、サラブレッド A の糞便 1 g 当たりの *Bifidobacterium* 属の菌数は、 $10^3 \sim 10^5$ CFU と見積もられた。

4. 要約:

本研究では、培養法と PCR - 変性剤濃度勾配ゲル電気泳動 (DGGE) 法を用いて、健全なサラブレッドの腸内フローラを解析した。2頭の競走馬について、17種類の選択培地を用いて培養法による腸内フローラ解析を行った。それら2頭のウマを含む6頭については、細菌に対するユニバーサルプライマーと、*Lactobacillus* 属、*Enterococcus* 属および *Bifidobacterium* 属特異的プライマーを用いた PCR-DGGE 法での腸内フローラ解析を行った。PCR-DGGE 解析により、すべてのウマから *Lactobacillus equi*, *Lactobacillus salivarius* 近縁種、*Lactobacillus gastricus* 近縁種、*Streptococcus bovis*/*Streptococcus equinus* が検出された。single PCR では、PCR バイアスの関係から *Bifidobacterium* 属を検出できなかった。そこで、すべてのウマに対し nested PCR を試みたと

ころ、3頭のウマで *Bifidobacterium boum*, *Bifidobacterium urinalis* 近縁種と *Parascardovia denticolens* を検出した。*B. boum* は、培養法で生菌として分離した。一方、3頭のウマから *Lactobacillus* 属として、*L. equi*, *L. salivarius*, *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus ruminis*, *Lactobacillus mucosae*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus jonsonii*, *Lactobacillus thermotolerans*, *Lactobacillus delbrueckii* と *Lactobacillus vitulinus* 近縁種を分離した。これらの結果から、現役競走馬の特異的フローラとして、*Bifidobacterium* 属の構成比が他の哺乳動物に比べて低いことが示された。

5. 謝辞:

現役競走馬の糞便のサンプリングに協力いただいた厩舎関係各位に敬意を表す。

文献

- 1) Mitsuoka, T. and Kaneuchi, C., Ecology of the bifidobacteria, Am. J. Clin. Nutr. 30, 1799-1810 (1977).

- 2) Favier, C.F., Vaughan, E.E., de Vos, W.M. and Akkermans, A.D.L., Molecular Monitoring of Succession of Bacterial Communities in Human Neonates, *Appl. Environ. Microbiol.*, 68, 219-226 (2002).
- 3) Venter, J.C., Remington, K., Heidelberg, J.F., Halpern, A.L., Rusch, D., Eisen, J.A., Wu, D., Paulsen, I., Nelson, K.E., Nelson, W., Fouts, D.E., Levy, S., Knap, A.H., Lomas, M.W., Nealson, K., White, O., Peterson, J., Hoffman, J., Parsons, R., Baden-Tillson, H., Pfannkoch, C., Rogers, Y.H. and Smith, H.O., Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea, *Science*, 304, 66-74 (2004).
- 4) 光岡知足, 腸内菌の世界 (改訂版), p.234-256, 叢文社, 東京 (1984).
- 5) Matsuki, T., Watanabe, K., Fujimoto, J., Miyamoto, Y., Takada, T., Matsumoto, K., Oyaizu, H. and Tanaka, R., Development of 16S rRNA-gene-targeted group-specific primers for the detection and identification of predominant bacteria in human feces. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 5445-5451 (2002).
- 6) Satokari, R. M., Vaughan, E. E., Akkermans, A. D. L., Saarela, M., de Vos, W. M., Bifidobacterial diversity in human feces detected by genus-specific PCR and denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 504-513 (2001).
- 7) Altschul, S.F., Gish, W., Miller, E., Myers, E.W. and Lipman, D.J., Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215, 403-410 (1990).
- 8) Walter, J., Hertel, C., Tannock, G.W., Lis, C.M., Munro, K. and Hammes, W.P., 2001. Detection of *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, and *Weissella* species in human feces by using group-specific PCR primers and denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 2578-2585.
- 9) Endo, A., and Okada, S., Monitoring the lactic acid bacterial diversity during shochu fermentation by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis. *J. Biosci. Bioeng.* 99, 216-221 (2005).
- 10) Nielsen, D.S., Moller, P.L., Rosenfeldt, V., Parregaard, A., Michaelsen, K.F. and Jakobsen, M., Case study of the distribution of mucosa-associated *Bifidobacterium* species, *Lactobacillus* species, and other lactic acid bacteria in the human colon. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 7545-7548 (2003).
- 11) Crociani, F., Biavati, B., Alessandrini, A. Chiarini, C. and Scardovi, V., *Bifidobacterium inopinatum* sp. nov. and *Bifidobacterium denticolens* sp. nov., two new species isolated from human dental caries. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 46, 564-571 (1996).
- 12) Kok, R.G., de Waal, A., Schut, F., Welling, G.W., Weenk, G. and Hellingwerf, K.J., Specific detection and analysis of a probiotic *Bifidobacterium* strain in infant feces. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 3668-3672 (1996).
- 13) Langendijk, P.S., Schut, F., Jansen, G.J., Raangs, G.C., Kamphuis, G.R., Wilkinson, M.H. and Welling, G.W., Quantitative fluorescence in situ hybridization of *Bifidobacterium* spp. with genus-specific 16S rRNA-targeted probes and its application in fecal samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 3069-3075 (1995).
- 14) Kaufmann, P., Pfefferkorn, A., Teuber, M. and Meile, L., Identification and quantification of *Bifidobacterium* species isolated from food with genus-specific 16S rRNA-targeted probes by colony hybridization and PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 1268-1273 (1997).