

# 下痢を発症した仔馬（サラブレッド）の免疫系評価と腸内フローラ解析

*Immunity of Thoroughbred foals of diarrhea, and analysis of gastrointestinal flora of Thoroughbreds*

森田英利, 白鳥千春, オカタニ トモミツ, 加藤行男

麻布大学獣医学部

Hidetoshi Morita, Chiharu Shiratori, Alexandre T. Okatani, Yukio Kato

School of Veterinary Medicine, Azabu University

**Abstract.** More than 70 % foals experience a gastrointestinal disease until 6 months after birth. The IgE was not detected, because three foals, from which the feces were collected, were healthy until 6 months after birth. In *Lactobacillus* isolated from Thoroughbred feces, *Lactobacillus* sp. KBL13 as new species was found. *Lactobacillus salivarius* JCM 1150 (accession no. M59054) is the most closely related species in the phylogenetic tree and showed the highest 16S rRNA sequence homology (96 %). DNA-DNA hybridization analyses were performed, including the two most closely related species, *L. salivarius* JCM 1231<sup>T</sup> and *L. aviarius* subsp. *araffinosus* JCM 5667<sup>T</sup> based on 16S rRNA gene sequence analysis. DNA-DNA relatedness values between KBL13<sup>T</sup> and *L. salivarius* JCM 1231<sup>T</sup>, *L. aviarius* subsp. *araffinosus* JCM 5667<sup>T</sup> were 15.8 and 7.9 %, respectively. DNA-DNA reassociation experiments with the three phylogenetically closest *Lactobacillus* species confirmed that KBL13<sup>T</sup> (= JCM 14209<sup>T</sup> = DSM during registration) represents the type strain of a novel species. These species tends to be isolated from Thoroughbred intestinal tracts widely. We will research the relation with horse intestinal immune system and intestinal flora.

## 1. 目 的

仔馬（サラブレッド）の消化管疾患や下痢は、頻繁に起こるため問題視されている。サラブレッドの場合、*Salmonella* spp., *Clostridium perfringens*, *Clostridium difficile* やノロウイルスが原因である報告<sup>1,2)</sup>もある。一方、原因不明の下痢の場合は、抗生剤治療でも症状はなかなか改善せず、長期にわたる下痢によって体重が増加しないため競走能力の低下が懸念され、死亡することもある。仔馬は、生後すぐから数ヶ月間、一般の動物で考えられる以上に、日和見細菌やストレスなどに過敏に反応している可

能性がある。本研究では、その初期的な研究としてIgEモノクローナル抗体を用いて、経時的に血液中のIgE含量を検討した。

また、免疫系の発達に及ぼす腸内フローラの影響は、さまざまな生物種で論じられている。胎便や生後すぐの便は無菌であることから、生後早い時期の腸管免疫への腸内細菌の影響が重要であると考えられている。腸内フローラは、最初にフローラが形成されるとなかなか排除できないという考え方と、腸管付着性の観点からフローラ構成菌は宿主特異性が高いという見方がある。親から子へのフローラ構成菌の垂直伝播は否定される場合が多いが、畜種ごと

に特異な腸内フローラが形成されており、数百種類にも及ぶ腸内細菌がどこから来るのか不明な点も多い。

一方、動植物・微生物の“生物個体”のバイオリソースは極めて重要視されている。地球上には数多くの細菌が棲息しているが、現在、培養してその存在が認識されている細菌は、全体の1～2%であるともいわれている。近年、細菌についてもバイオリソースの重要性が唱えられ、現在までに分離・培養できていない種々の細菌を分離同定していくことが、ますます重要視されている。歴史的にヒトの乳酸菌フローラについては様々な方面からの研究が進んでいるが、ウマの腸内フローラに関する研究報告は少なく、とりわけ競走馬の乳酸菌フローラに関する報告はほとんどない。そこで、サラブレッドの腸管から新規バイオリソースの獲得を目的に、*Lactobacillus* 属を対象に新菌種の検索を行った。

## 2. 方法

生後すぐのサラブレッドの♂3頭について、生後2日目から、その後は1ヵ月ごと18ヶ月までの血液を採取し血清を得た。Wagner<sup>3)</sup> から分譲を受けたウマ IgE 抗体である anti-IgE 176 を用いて、彼らの報告に基づいて ELISA 法にて IgE を検出した。20 ng/ml 以上の IgE が検出可能であるとされている。

ウマ糞便を平板培養法に供試し、選択培地により *Lactobacillus* 属と思われる菌株を分離し、菌株を凍結保存した。それら菌株は 16S rDNA 配列の BLAST により菌種の判定を行なった。この判定作業により

既知の菌株との相同性の低かったものを新菌種候補と考え、16S rDNA 全配列 (約 1,500 bp) のシーケンス、G + C 含量測定、DNA-DNA ハイブリダイゼーション<sup>4)</sup> を行い、新菌種かどうかの解析を行なった。新菌種であることが確認された菌株は詳細な性状試験を行い、データベースや公的菌株保存センターへの寄託を行った。

## 3. 結果と考察

3頭の仔馬の経時的な IgE の変動は、Fig. 1 に示したとおりである。IgE モノクローナル抗体は、ウマの異なるアレルギー疾患または寄生性感染症を検証するのに役立つと考えられる。仔馬の場合、生後6ヶ月までに7割以上が消化管疾患にかかると言われている。今回サンプリングした仔馬は3頭とも健常であったので、その間の IgE 量はほとんど検出されなかった。健常時に予め下痢を発症するウマを選択できなかったため、今後は頭数を増やす対応で、後に下痢を発症する仔馬の IgE 量を検討してみたい。また、他の抗体が入手できるようであれば、今回のサンプルで検討を行うことも必要である。

我々は、以前より、ガスパック法にて嫌気したサラブレッドの糞便から BL 寒天培地、BS 寒天培地、LBS 寒天培地を用いて、グラム陽性のカタラーゼ陰性細菌を分離してきた。その中から、*Lactobacillus* 属に相当する菌種を同定した結果、菌数はそれほど多くないが、1頭から10菌種を超える *Lactobacillus* 属が検出されるサラブレッドもいた。2006年12月現在、*Lactobacillus* 属は135菌種の登録がある。*Lactobacillus*

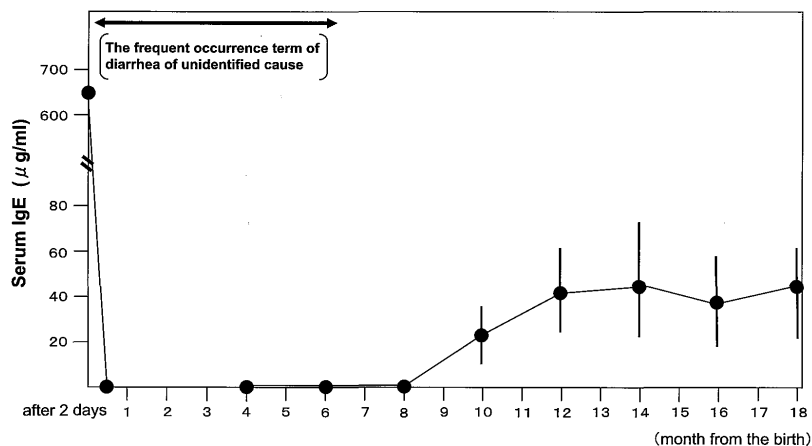


Fig. 1 Determination of total foal serum IgE by ELISA using anti-IgE 176 (n = 3).

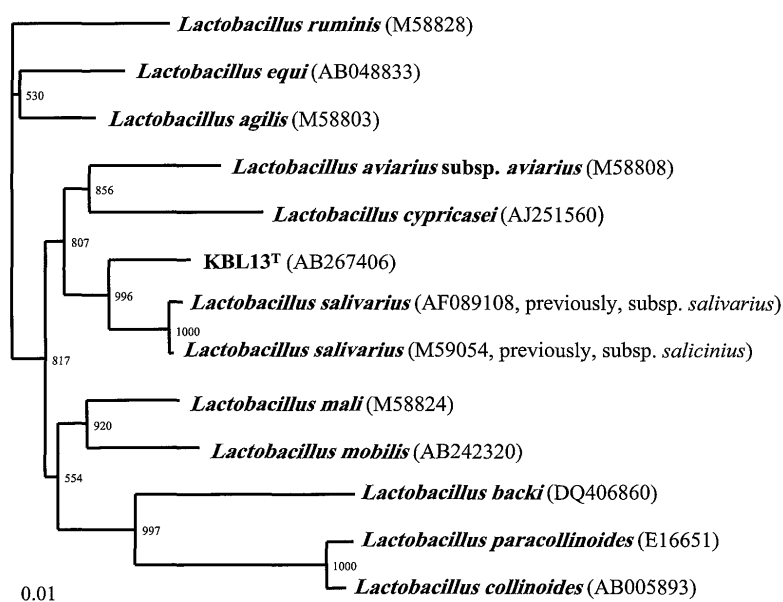


Fig. 2 Unrooted phylogenetic tree based on 16S rRNA comparisons showing the relationships of strain LBL13 to other *Lactobacillus* strains. Bootstrap confidence values obtained with 1000 resamplings are given at the branch points (only values "500 are shown). Accession numbers are given in parentheses. The bar indicates a genetic distance of 0.01. An expanded version of this tree with more taxa is available as supplementary data in IJSEM Online (<http://ijs.sgmjournals.org/>).

属は、カタラーゼ陰性、運動性は通常なく、内生胞子は形成せず、ブドウ糖の50%以上を乳酸に転換する従属栄養の細菌で、桿状細胞（桿菌）であり、ホモ発酵型のものとはヘテロ発酵型の両者がある。発酵によって産生される乳酸の光学異性体はホモ発酵型にはL (+), D (-), DLと菌種ごとに異なり、ヘテロ発酵型ではそのほとんどがDL乳酸を産生する。

我々がサラブレッドの糞便から分離されたものの中に、新菌種と思われるものが数株あり、これは、分離源としてほとんど研究対象にされていないこと、嫌気性を厳密にした結果であると思われる。ここでは、同定を進めた1菌種 (*Lactobacillus* sp. KBL13) について、その詳細を述べる。

16S rDNA配列 (1,484 bp) の同一性検索の結果、最も近縁であった *Lactobacillus salivarius* JCM 1150 (accession no. M59054) と96%の同一性しかない。そこで、Fig. 2のとおり CLUSTAL W<sup>5)</sup> により系統樹を作製した。その系統樹をもとに、近縁の *L. salivarius* JCM 1231<sup>T</sup> および *L. aviarius* subsp. *araffinosus* JCM 5667<sup>T</sup> とのDNA-DNAハイブリダイゼーション<sup>4)</sup> を行った。その結果、*Lactobacillus* sp. KBL13と *L. salivarius* JCM 1231<sup>T</sup> では14.2%、

*Lactobacillus* sp. KBL13と *L. aviarius* subsp. *araffinosus* JCM 5667<sup>T</sup> では7.9%であった。同一性が70%以下であれば別菌種との提唱があり<sup>6)</sup>、*Lactobacillus* sp. KBL13は新菌種であることを確認した。理化学研究所への寄託は完了し、JCM No.は14209となり、DDBJに16S rDNA配列を登録し、accession no. AB267406に決定した。その他の *Lactobacillus* sp. KBL13 (= JCM 14209) の性状や情報に関しては、Table 1に示したとおりである。Table 1には、別のウマから採取した同菌種のGBL13株の性状も記載した。現在、本菌株の新菌種を提唱し (投稿中)、菌種名を打診中である。

異なる7つの牧場・厩舎の12頭すべてからPCR-DGGE法で検出した。本菌種は、広くサラブレッドの腸管から分離される傾向にあった。北海道の大規模牧場にて、本菌種の経口投与を始めたので、免疫系への影響なども視野に入れて検討していく予定である。

#### 4. 要約

仔馬の場合、生後6ヶ月までに7割以上が消化管疾患にかかると言われている。今回サンプリングし

Table 1 Physiological characteristics of strain KBL13, strain GBL13, *L. salivarius* JCM 1231<sup>T</sup>, *L. salivarius* JCM 1150, *L. aviaris* subsp. *aviarius* JCM 1150<sup>T</sup>, *L. aviaris* subsp. *araffinosus* JCM 5667<sup>T</sup>

Characteristic	Strain KBL13	Strain GBL13	<i>L. salivarius</i> JCM 1231 <sup>T</sup>	<i>L. salivarius</i> JCM 1150	<i>L. aviaris</i> subsp. <i>aviarius</i> JCM 1150 <sup>T</sup>	<i>L. aviaris</i> subsp. <i>araffinosus</i> JCM 5667 <sup>T</sup>
Lactic acid isomers	L	L	mainly L	mainly L	DL	DL
Fermentation of:						
Galctose	-	-	+	+	+	-
Rhamnose	-	-	+	-	ND	ND
Sorbitol	-	-	+	+	ND	ND
N Acetyl Glicosamine	+	-	+	+	ND	ND
Amygdalin	w	w	-	-	-	-
Arbutin	+	-	+	+	ND	ND
Esculin	+	+	-	+	+	-
Salicin	+	+	-	+	+	-
Cellobiose	+	+	-	-	+	-
Lactose	-	-	+	+	-	-
Melibiose	-	-	+	+	+	-
Trehalose	-	-	+	+	+	+
Raffinose	w	-	+	+	+	-
Gentiobiose	+	+	-	-	ND	ND
Growth on MRS medium at:						
45°C	+	+	+	+	ND	ND
DNA G+C content (mol%)	34.3	34.8	ND	ND	38.7	41.3

Data for *L. aviaris* subsp. *aviarius* JCM 1150<sup>T</sup> and *L. aviaris* subsp. *araffinosus* JCM 5667<sup>T</sup> are from Fujisawa *et al.* (1984).

+, Positive reaction; -, negative reaction; w, weakly positive reaction; ND, no date available. All strains were positive for the following characters: fermentation of glucose, fructose, mannose, maltose, sucrose; growth in MRS broth at 37°C, and no growth in MRS broth at 15°C. G+C contents were determined by HPLC.

た仔馬は3頭とも健常であったので、その間のIgE量はほとんど検出されなかった。胎便は無菌であることから、生後すぐの腸管免疫への腸内細菌の影響が重要であると考えられている。

サラブレッドの糞便から分離された *Lactobacillus* 属の中に、新菌種の *Lactobacillus* sp. KBL13 が分離された。16S rDNA 配列 (1,484 bp) の BLAST の結果、最も近縁であった *Lactobacillus salivarius* JCM 1150 (accession no. M59054) と 96% の相同性しかない。系統樹から近縁の *L. salivarius* JCM 1231<sup>T</sup> および *L. aviarius* subsp. *araffinosus* JCM 5667<sup>T</sup> との DNA-DNA ハイブリダイゼーションを行った。その結果、*Lactobacillus* sp. KBL13 と *L. salivarius* JCM 1231<sup>T</sup> では 14.2%、*Lactobacillus* sp. KBL13 と *L. aviarius* subsp. *araffinosus* JCM 5667<sup>T</sup> では 7.9% であり、*Lactobacillus* sp. KBL13 は新菌種であることを確認した。16S rDNA 配列の登録は accession no. AB267406、理化学研究所へ寄託し *Lactobacillus* sp. KBL13 (= JCM 14209) と決定した。本菌種は、広くサラブレッドの腸管から分離される傾向にあり、免疫系への影響なども視野にいれて検討していく予定である。

#### 文 献

- 1) Perrin J., Cosmetatos I., Gallusser A., Lobsiger L., Straub R., Nicolet J., *Clostridium difficile* associated with typhlocolitis in an adult horse. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 5: 99-101 (1993).
- 2) Netherwood T., Wood J.L., Townsend H.G., Mumford J.A., Chanter N., Foal diarrhoea between 1991 and 1994 in the United Kingdom associated with *Clostridium perfringens*, rotavirus, *Strongyloides westeri* and *Cryptosporidium* spp. *Epidemiol. Infect.*, 117: 375-383 (1996).
- 3) Wagner B., Radbruch A., Rohwer J., Leibold W., Monoclonal anti-equine IgE antibodies with specificity for different epitopes on the immunoglobulin heavy chain of native IgE. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 20: 45-60 (2003).
- 4) Ezaki T., Hashimoto Y., Yabuuchi E., Fluorometric deoxyribonucleic acid-deoxyribonucleic acid hybridization in microdilution wells as an alternative to membrane filter hybridization in which radioisotopes are used to determine genetic relatedness among bacterial strains. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 39, 224-229 (1989).
- 5) Thompson J.D., Higgins D.G., Gibson T.J., clustal w: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.*, 22, 4673-4680, 1994.
- 6) Stackebrandt E.G. and Goebel B.M., Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 44, 846-849 (1994).