

2 調査・研究

サラブレッドにおける下痢発症の抑制に対する *Lactobacillus* 属 (乳酸菌) の投与効果

麻布大学 獣医学部准教授 森田 英利

1. サラブレッド腸内フローラの概要

現在までに生菌分離されている細菌は、地球上に存在する細菌全体の 0.1% 未満～数% にすぎないと考えられている。そこで、環境細菌フローラのゲノム DNA を用い、菌種を同定できる 16S rRNA 遺伝子や特定遺伝子の DNA 配列をシークエンスすることにより、菌種を推定する研究が進んでいる。すなわち、培養できない細菌であっても、環境中のすべての細菌の細胞内に存在するゲノム DNA の獲得が可能であるからである。それら分子レベルの手法に基づくと、土壌中で同定できている菌種は約 0.3%、海洋中では約 0.001%、ヒト腸内では 60~70% というのが、現在の認識である。ヒト腸内細菌が他の環境に比べて多くの菌種が分離されているのは、腸内細菌は宿主免疫系と強い相互関係があり、消化・吸収の促進、アレルギー抑制など、健康志向や予防医学において重要だからである。現在、健常なヒトの腸内フローラ構成細菌は 500~1,000 種という見解がだされた。また、シロアリ、マルカメムシやシラミなどでは特有の腸内フローラ (共生細菌) が明らかにされ、実験動物のマウスやラット、産業動物のウシやブタについても、手法は様々であるが腸内フローラの研究実績がある。これらの研究から、生物種ごとに、腸内フローラを構成する菌種とその構成比がまったく違っていることがわかってきた。生物種が多様化すると、腸内フローラはそれに並行して個別化し、両者にとって辿り着いた組み合わせかもしれない。

サラブレッドに関して、感染症による病原細菌の研究や疝痛の際の臨床的な治療法は基礎研究や臨床報告はあるものの、細菌学的な観点からの腸内フローラ研究はほとんどみられない。我々は、継続的に調教を行っている健常なサラブレッド (5歳・牡) の腸内フローラに対し 16S rRNA 遺伝子配列を用いた解析を行った。すなわち、このウマの糞便から腸内細菌のゲノム DNA の抽出を行い、それを鋳型に 16S rRNA 遺伝子配列の universal primer E. coli 27F および 1492R による PCR 増幅を行った。その増幅産物から 16S プラスミドライブラリーを作出し 192 クローンの 16S rRNA 遺伝子配列を決定した。解析手法は、99% 類似度でクラスタリングした後に 1,350 bp 以上のものを用い、各クラスターを BLASTN で RDP II を検索し、97% 以上の類似度でマッチのものを既知の属として認定した。ヒトでは、乳児を除く大人や子供の腸内フローラにおいて *Bacteroides* 属と *Bifidobacterium* 属 (ビフィズス菌) が構成菌種の 40% 近くを占め、その他に *Eubacterium* 属、*Ruminococcus* 属および *Clostridium* 属が主要で、腸内細菌全体の構成菌種の 60~70% 近くまで同定されている。サラブレッドでは、*Bacteroides* 属や *Bifidobacterium* 属はほとんど検出されず、*Oscillospira* 属が 2.2%、*Sporobacter* 属が 1.9% および *Lactobacillus* 属 (乳酸菌) が 0.8% の割合で検出されたが、属レベルで大きな比率を占めるものはなかった。どの属由来か同定できない 16S rRNA 遺伝子配列が 82% 以上を占めており、サラブレッドの腸内フローラには未分離・未同定の菌種が多く存在していた。この結果は、複数頭のサラブレッドにおいて類似の結果を得ており、細菌学の観点からサラブレッドの腸内フローラは興味深い 1 つの “環境” といえる。一方で、健常にサラブレッドが生きる腸内フローラについ

ては不明な点が多いことになる。疝痛、腸炎や腸捻転は、サラブレッドにとって頻繁に起こる症状であるが、良好な腸内フローラとの関係についてほとんど知見がない。

2. 子馬の下痢発症の背景

仔牛や仔豚と同様に、サラブレッドも仔馬の時期の下痢発症率は非常に高いものがあり、重篤になると死亡したり、その後の発育に悪影響を及ぼす危険性がある。サラブレッドの場合は、そのほとんどが競走馬になるので、食肉用動物と異なり、重篤な下痢や感染症の後、単に体重が増えれば良いというわけではない。仔馬の時期の発育障害やストレス負荷が競走能力に影響する可能性が示唆される。

仔馬が誕生した年には、一般に2度の下痢が多発する時期が知られる。まず、生後10~20日間に起こる“発情下痢”であり、原因が特定できないので臨床的な治療が施しにくい状況がある。そして、仔馬の生後3~4ヵ月後である。この時期は6~7月にあたり、ロタウイルスや細菌感染などが主な原因であるため、病原微生物に対する抗生剤を投与することで治癒するようである。しかし、発情下痢の頃にしても、病原微生物感染の時期であっても、下痢をしない仔馬はいるのは、抵抗力の個体差が大きいと思われる。

哺乳動物の場合、小腸や大腸は絶えず消化される前後の食べ物が流動し、腸管表面の組織は痛みやすい状況にある。最近、腸管のバリア機構が明らかになってきた。つまり、腸管表面の細胞は、病原微生物に対して選択的にその侵入を阻止しており、バリア機構が弱くなると、病原微生物の侵入を許し感染症にかかりやすくなる。そのバリア機能保護効果のある物質が明らかになってきた。臨床現場では、炎症起因性細菌やロタウイルスなどが検出されず、原因不明の下痢発症に悩まされている場合も多い。炎症性腸疾患や重篤な下痢の発症は、微生物的要因のほか、ストレス（環境的要因）や*NOD2*遺伝子の点突然変異（遺伝的要因）、そして免疫的要因も考えられる。近年、免疫的要因に分類される健常腸内フローラに対する免疫寛容の破綻（バリア損傷）やヘルパーT細胞（*Th*）17活性亢進による炎症性腸疾患発症メカニズムが注目を集めている。我々は、仔馬への下痢抑制に対する乳酸菌投与効果（後述）の他に、仔馬への下痢発症率低下のメカニズム解明の一助として粘膜免疫機構に着目し、投与試験に用いた各菌株の粘膜バリア保護効果や*Th*17細胞の制御効果について検討した。それらの機能は*Lactobacillus*属の細胞壁のペプチドグリカンに起因することがわかってきた。以前より、*Lactobacillus*属の免疫賦活効果は菌種レベルではなく、菌株レベルでその違いが指摘されてきたが、ペプチドグリカンの構造は同菌種でも菌株ごとに異なるため、菌株ごとに上記の効果が違う結果と一致する。

3. 仔馬への *Lactobacillus* 属（乳酸菌）の投与試験

Lactobacillus 属は“乳酸菌”と呼ばれる細菌群の1つであり、120菌種以上が登録されている。乳酸菌は安全性の高い細菌群であるため、日本を含む世界各国において、厳選された菌株がヨーグルト製造のスターターとして利用されている。我々は、9頭の健常なサラブレッドの腸内フローラから *Lactobacillus* 属の生菌分離を試みた結果、18菌種が分離された。他の論文を含めると *Lactobacillus* 属が19菌種も分離され（表1）、哺乳動物の腸内フローラでは最も多い分離例であり、サラブレッド消化管内では *Lactobacillus* 属が種レベルで多様化していた。

表1 サラブレッド消化管から分離された既知の *Lactobacillus* 属

菌種	我々が生菌分離した馬の頭数	他の文献での生菌分離例
<i>Lactobacillus crispatus</i>	4	有
<i>Lactobacillus reuteri</i>	4	有
<i>Lactobacillus salivarius</i>	3	有
<i>Lactobacillus mucosae</i>	3	有
<i>Lactobacillus equi</i>	4	有
<i>Lactobacillus ruminis</i>	3	有
<i>Lactobacillus agilis</i>	2	有
<i>Lactobacillus amylovorus</i>	1	有
<i>Lactobacillus vitulinus</i>	1	未見
<i>Lactobacillus hayakitensis</i>	1	新菌種
<i>Lactobacillus johnsonii</i>	2	有
<i>Lactobacillus coleohominis</i>	1	未見
<i>Lactobacillus oris</i>	1	未見
<i>Lactobacillus equigenerosi</i>	3	新菌種
<i>Lactobacillus vaginalis</i>	1	未見
<i>Lactobacillus buchneri</i>	1	未見
<i>Lactobacillus saerimneri</i>	1	未見
<i>Lactobacillus equicarsoris</i>	1	新菌種
<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	0	有

「新菌種」の表記は、我々が IJSEM に提唱した菌種

ヒトや他の哺乳動物で生菌投与が試みられている乳酸菌で、我々がサラブレッド消化管から分離した *Lactobacillus reuteri* K K 18、*L. ruminis* K K 14、*L. johnsonii* K K 21 および *L. equi* K K 15 を仔馬に経口投与し、その後の下痢の発症率について検討した。

その結果、非投与群 24 頭では 75.9% が下痢を発症し、これは一般的に知られている仔馬の下痢発症率と類似していた。一方、同じ環境下で飼育した生菌投与群 101 頭については下痢発症率が 30.7% であり、非投与群との有意差がみられた。特筆すべきは、下痢を発症したそれぞれの馬における平均加療日数（平均 ± 標準誤差）が、生菌投与群は 7.4 ± 0.8 日であったのに対し、非投与群では 11.9 ± 3.2 日という結果が得られ、下痢を発症しても生菌投与群の方が症状（ストレス）も軽かったと思われる。

生後すぐの仔馬の消化管内は無菌で、経口投与した菌株が糞便から回収され消化管内での増殖が示唆された。しかし、サラブレッドの腸内フローラにおいて *Lactobacillus* 属は非常に構成比の低い細菌であり、経口投与した生菌が、仔馬の消化管で主要な構成菌となり腸内環境を良好にしたとは考え難い部分がある。そこで、上記 *in vivo* での下痢発症抑制効果のメカニズムを解明するために、培養細胞を用いた *in vitro* 試験を行った。

免疫系細胞の中で、ヘルパー T 細胞は免疫調節において重要な役割を担っている。Th 17 の活性亢進による炎症性腸疾患発症メカニズムが注目を集めている。仔馬に投与した *Lactobacillus* 属のすべての菌株はトランスフォーミング増殖因子（TGF- β ）とインターロイキン（IL）-6 で刺激したマウス脾細胞からの IL-17 産生を有意に抑制し（図 1）、抑制能が高かったのは *L. reuteri* K K 18 と *L. equi* K K 15 であった。また、上皮バリアに損傷を与えた Caco-2 細胞においても、

図 2 のとおり本菌株は経上皮電気抵抗値（バリア強度の指標）を有意に回復していた。仔馬の下痢抑制効果は、これらのメカニズムによる可能性が示唆された。Th1 と Th2 のバランス改善についても、良いデータが得られている。

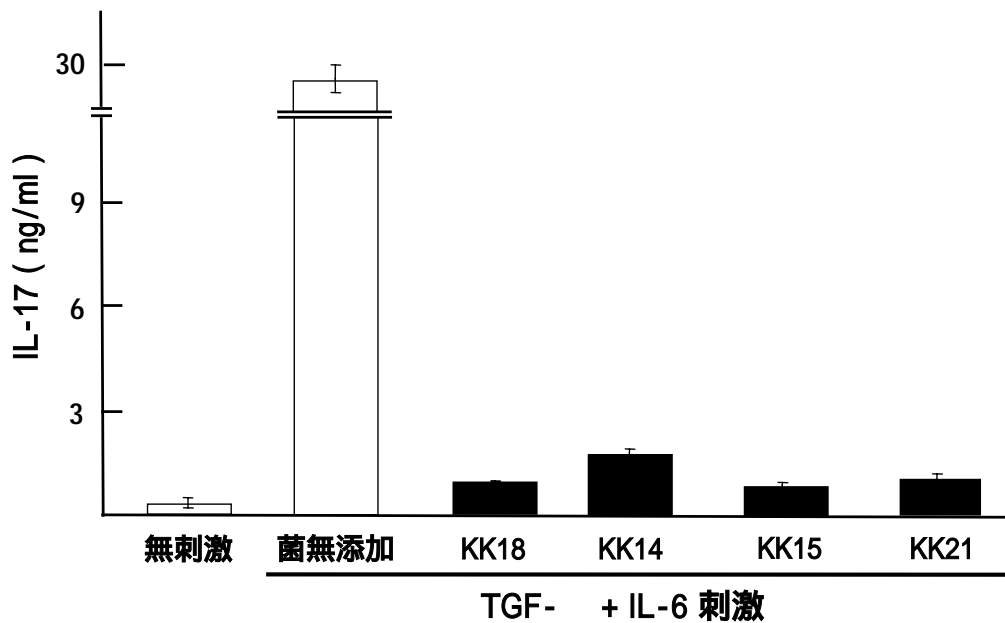


図 1 サラブレッド消化管から分離した *Lactobacillus* 属（乳酸菌）の Th17 抑制効果

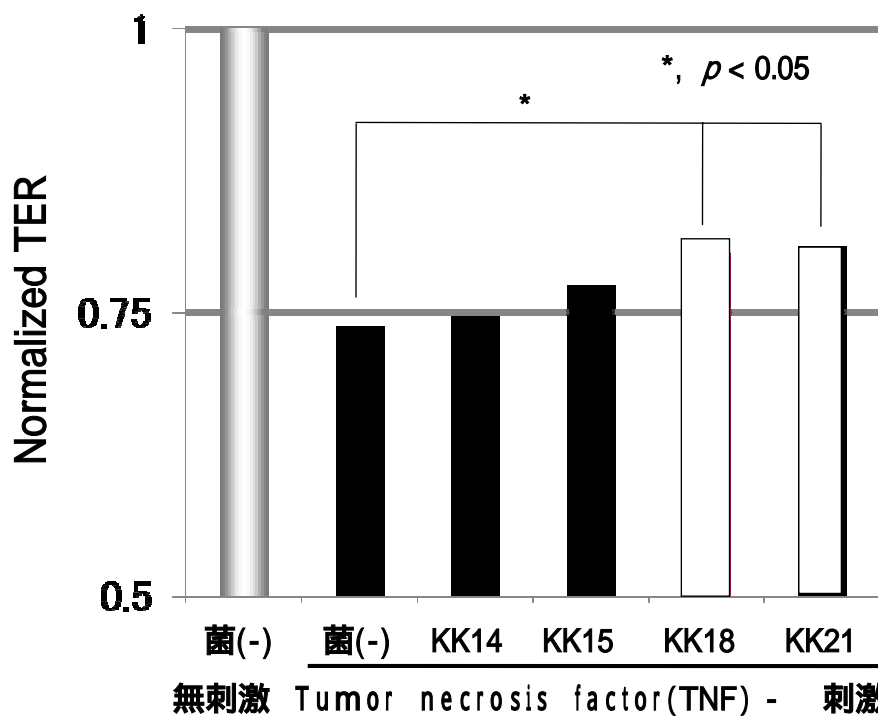


図 2 *Lactobacillus* 属（乳酸菌）による腸管タイトジャンクションの保護効果
TNF - は腫瘍壊死因子のひとつ

4 . 最後に

本研究で用いた *Lactobacillus* 属を仔馬に投与した際に、ストレス軽減効果を認めた。サラブレッドは、早い時期の母親との離別に始まって、馴致、調教、レースや輸送により、絶えずストレスに晒されている。ウシやブタなどは、ストレスを受けると下痢を発症するといわれる。ストレスによる下痢は感染症ではないので病原細菌などは見つからず、抗生剤などの効き目は一般には期待できない。仔馬の“発情下痢”は、原因物質が特定できない場合が多く、ストレスによって引き起こされると考えられないか。ストレスは、脳で感じるものであるが、腸内フローラとの関連が報告されている。図3のとおり、神経系や液性経路を介して、神経伝達物質やインターロイキンなどが脳と腸管(腸内細菌)を繋げている。*Lactobacillus* 属の経口投与は、Th17 抑制効果、消化管上皮バリア保護効果と併せて、*Lactobacillus* 属の菌体成分によるストレス軽減効果も下痢発症抑制に一役かっているという推察が、今後、さらなる研究データで裏付けられることを期待している。

5 . 謝辞

仔馬への投与試験と臨床診断はノーザンファームの秋田博章場長と中島文彦獣医師、DNA配列決定は東京大学大学院の服部正平教授と大島健志朗技術補佐員、および、仔馬へのストレス軽減効果は日高育成牧場の朝井洋場長と井上喜信獣医師との共同研究によるものである。本研究の一部は、(社)日本競走馬協会の平成19~20年度競走馬生産育成研究基金により実施した。

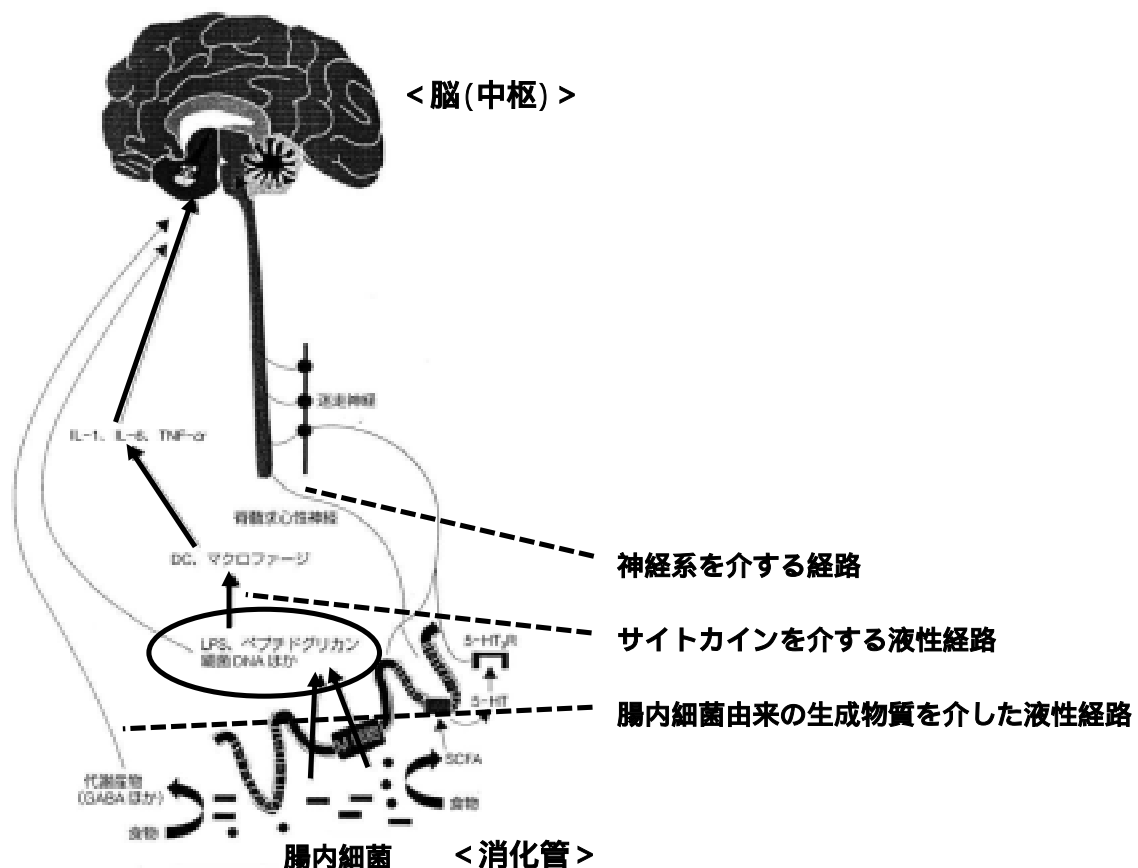


図3 消化管内因子が脳(中枢)のストレス反応へ影響を及ぼす伝達経路(須藤信行、2005)