〔微探収報 24: 43–49, 2011〕

乳児糞便からの乳酸菌の分離・同定と特性解析

鈴木 チセ
農業・食品産業技術総合研究機構　畜産草地研究所
［〒305-0901　つくば市池ノ台２］

Isolation, identification and characterization of lactic acid bacteria from infant feces

Chise SUZUKI
National Institute of Livestock and Grassland Sciences,
National Agriculture and Food Research Organization

1. 目的

乳酸菌は我々にとって非常に身近な微生物である．自家製の漬け物，天然酵母，自家製味噌などには自然に混入した乳酸菌が含まれる．ヨーグルト，チーズなどの発酵乳製品，漬け物，味噌，ワイン醸造には安定した品質が得られる市販のスターターを用いていることが多い．乳酸菌が用いられる目的は生産する乳酸などによって腐敗を防ぐことの他，発酵によって得られる酸味，香味成分が好まれてきたからに他ならない．乳酸菌は，糖から乳酸を作る特性をもつ細菌の総称であり，最近の分類ではグラム陽性（低 GC グループ）の桿菌または球菌で，胞子を形成せず，通性嫌気性，カタラーゼ陰性の特徴をもつと表示されている(Ludwig et al.，2009)．一方，ヒトの腸内には一人当たり 100 種類以上，100 兆個以上の細菌が住んでいる．腸内における細菌同士の相互作用，あるいは菌と腸管上皮との相互作用についてその重要性が認識されるようになり，近年，健康への関心の高まりから，乳酸菌の健康効果については高い関心が寄せられている．プロバイオティクスは「適量摂取したときに宿主に有益な効果をもたらす生きた微生物」と定義されており，整腸作用だけでなく免疫賦活，アレルギーや高血圧予防等，さまざまな効果が動物実験やヒト試験によって明らかにされつつある．プロバイオティクスの条件として，「安全性が十分保証されていること」「腸内フローラの一員であること」「胃酸，胆汁酸に耐えて腸内に到達できること」等の条件が挙げられる（細野，2004）．したがって，ヒトに有用なプロバイオティクス探索のためにはヒト由来株を収集する必要があり，ジーンバンク事業の一環として乳児糞便からの乳酸菌の収集を行った．

2. 材料および方法

1）糞便の採取

生後約１か月から１才８か月までの健康な乳幼児（日本人）５名の糞便の供与について，母親に

研究の主旨, 実験方法を説明して協力の依頼を行った. 糞便は自宅にておむつごと氷冷してもらい, そのまま研究室に持ち帰ってただちに乳酸菌の分離を行った．リン酸緩衝液に懸濁，希釈後，炭酸カルシウムを含むMRS平板培地（1.6%寒天含有Lactobacilli MRS broth, Difco）に塗布して，37℃にて嫌気培養を行った．周囲に炭酸カルシウムのクリアゾーンをみとめたコロニーを分離し，以下の実験に供した.

2）菌種の同定

（1）グラム染色

MRS培地で24時間培養した菌懸濁液をスライドガラスに伸ばし，風乾後，火炎固定した．フェイバー・GセットF（ニッスイ）により，グラム染色を行った後，顕微鏡により観察した.

（2）カタラーゼ試験

MRS 培地で一晩培養した菌体を集菌し，菌体に 3%過酸化水素水を注いで発泡を観察した.

（3）16S リボソーム RNA 遺伝子（16S rDNA）および RNA ポリメラーゼ α サブユニット遺伝子（*rpoA*）配列解析

菌体からDNAを抽出し, 16S rDNAをプライマー27F (5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3') およびプライマー1406R (5'-ACG GGC GGT GTG TAC-3'), *rpoA* を rpoA-2F (5'-ATG ATY GAR TTT GAA AAC C-3') および rpoA-22R (5'-ACY TTV ATC ATN TCW GVY TC-3') を用いて PCR で増幅した後，得られた PCR 産物の配列分析により菌種同定を行った（鈴木, 2008）.

（4）種特異的 PCR

Enterococcus faecalis と *Enterococcus faecium* を識別するため２対のプライマー$ddl_{E.faecalis}$ E1 (5'-ATC AAG TAC AGT TAG TCT-3'), E2 (5'-ACG ATT CAA AGC TAA CTG-3') および $ddl_{E.faeciuim}$ F1 (5'- TAG AGA CAT TGA ATA TGC C-3'), F2 (5'-TCG AAT GTG CTA CAA TC-3') を用いた PCR を行い，*E. faecalis* は 941bp のバンド，*E. faecium* は 550bp のバンドの生成で判定した (Dutka-Malen et al, 1995).

3）特性解析

（1）生育特性

前培養は MRS 培地で 37℃一晩行い，以下のように調製した培地にそれぞれ 1%（アルカリ性培地は 0.1%）となるように植菌した. アルカリ性（pH9.6）における生育は，pH9.6 に調整した Elliker broth (Difco)を用い 37℃，48 時間後の生育を観察した．ガス生成はダーラム管入りの MRS 培地を用い，37℃，24 時間培養後，ダーラム管中のガスの捕捉を観察した．食塩耐性は，それぞれ 0，3，6，9，12%の NaCl を加えた MRS 培地を用い，37℃，48 時間培養後の生育を観察した．胆汁酸耐性は，それぞれ 0，0.3，0.6，1%の胆汁酸(Oxgall, Difco)を加えた MRS 培地を用い，37℃，48 時間培養後の生育を観察した. メチレンブルー耐性は 0.02%メチレンブルー含有(MBA)平板培地（1%ペプトン，1%トリプトン，1%グルコース，0.4%K_2HPO_4，0.15%KH_2PO_3，0.5%NaCl，0.25%グリセロール，0.02%メチレンブルー，1.5%寒天）(Smith and Bodily, 1967)に前培養した乳酸菌液を

スポットし，37℃，48 時間培養後の生育を観察した.

（2）抗生物質耐性

各エリスロマイシン（20μg/ml），テトラサイクリン（3μg/ml)を含む MRS 平板培地に各菌株をスポットし，37℃にて嫌気培養を行った後の生育を調べた.

（3）抗菌活性クロステスト

分離した各菌株を一晩培養後，MRS 平板培地に塗布し，その表面に菌株を 2.5μl ずつスポットした．37℃にて一晩嫌気培養を行った後，スポットした菌の周囲において塗布した菌の生育が阻害されるかどうかを観察した.

3. 結果

1）乳酸菌の分離

生後約１か月から１才８か月までの健康な乳幼児 5 名からそれぞれ乳酸菌を分離した（表 1）．炭酸カルシウムの溶解によりクリアゾーンを形成したコロニーを釣菌し，グラム染色陽性，カタラーゼ反応陰性を示したものを乳酸菌株として保存した.

表１．乳幼児糞便からの乳酸菌の分離

採取対象	採取年度	月齢	分離株数	優先菌種
乳児A	2004	11	22	*Streptococcus lutetiensis*
幼児B	2006	20	18	*Enterococcus* sp.
乳児C	2006	7	5	*Streptococcus* sp.
乳児D	2006	3	3	*Enterococcus* sp.
乳児E	2009	1	24	*Enterococcus faecalis*

2）菌種の同定

乳酸菌の同定は主に 16S rDNA および *rpoA* の配列解析により行った．乳児 A から分離した 22 株はすべて *Streptococcus lutetiensis*に属していた（表2）. *S. lutetiensis*は2002年に *Streptococcus bovis* 等の性質を整理して分類し直された菌種である(Poyart, 2002)（MAFF 400441 はジーンバンク登録時に *Streptococcus bovis* として登録したが，現在は *S. lutetiensis* に属する）．乳児 A，幼児 B，乳児 E からは 20 株前後のコロニーを分離したが，乳児 A および乳児 E から分離した菌すべてが優先菌種に属していた．幼児 B からは優先菌種の *E. faecium* の他，他の *Enterococcus* 属の菌株や *Weissella confusa* が分離された．幼児 B，乳児 D，乳児 E の糞便から分離したジーンバンク寄託株について同定結果を示した（表 3）． *E. faecium* と *E. faecalis* に関しては 16S rDNA の配列では判別がつきにくいため， *rpoA* およびフェニルアラニン tRNA 合成酵素 α サブユニット遺伝子（*pheS*）の配列解析および種特異的 PCR やその他の特性から最終的な同定を行った．本課題を通して 9 株をジーンバンクに移管した.

3）特性解析

（1）生育特性

生育試験としてはpH9.6のアルカリ性培地での生育，グルコースからのガス生成，45℃における高温耐性，食塩耐性，胆汁酸耐性等を調べた（表2，表3）．これらは分類上の指標になる．プロバイオティクスとして利用するには胆汁酸耐性であることが望ましいが，糞便から分離された菌株は高い胆汁酸耐性を有していた．MBA平板培地上で*E. faecalis*に属する菌株は濃青色のコロニーを生じたが，*E. faecium*に属する菌株はほとんど生育しなかった．

表２．乳児Ａから分離された乳酸菌の同定と特性

Strains	Species	Gram stain	Catalase	45℃	pH9.6	NaCl 6.5%	Oxgall 1%	Erythromycin 20mg/ml	Tetracyclin 3mg/ml
MAFF 400441	*Streptococcus lutetiensis*	+	−	r	r	s	r	nt	nt
S1	*Streptococcus lutetiensis*	+	nt	r	r	s	nt	r	r
S2	*Streptococcus lutetiensis*	+	nt	r	s	s	nt	s	s
S3	*Streptococcus lutetiensis*	+	nt	r	r	s	nt	r	r
S4	*Streptococcus lutetiensis*	+	nt	r	r	s	nt	r	r
S5	*Streptococcus lutetiensis*	+	nt	r	r	s	nt	+/−	+/−
S6	*Streptococcus lutetiensis*	+	nt	r	r	s	nt	+/−	+/−
S7	*Streptococcus lutetiensis*	+	nt	r	r	s	nt	+/−	+/−
S8	*Streptococcus lutetiensis*	+	nt	r	s	s	nt	+/−	+/−
S9	*Streptococcus lutetiensis*	+	nt	r	s	s	nt	r	r
S11	*Streptococcus lutetiensis*	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt
S12	*Streptococcus lutetiensis*	nt	nt	nt	nt	nt	nt	+/−	+/−
S13	*Streptococcus lutetiensis*	nt	nt	nt	nt	nt	nt	+/−	s
S14	*Streptococcus lutetiensis*	nt	nt	nt	nt	nt	nt	+/−	− s
S15	*Streptococcus lutetiensis*	nt	nt	nt	+	nt	nt	+/−	+/−
S17	*Streptococcus lutetiensis*	nt	nt	nt	nt	nt	nt	+/−	+/−
S18	*Streptococcus lutetiensis*	nt	nt	nt	nt	nt	nt	r	r
M7	*Streptococcus lutetiensis*	+	−	r	r	s	r	s	s
M8	*Streptococcus lutetiensis*	+	−	r	r	s	r	s	s
MO2	*Streptococcus lutetiensis*	+	−	r	r	s	r	s	s
MO8	*Streptococcus lutetiensis*	+	−	r	r	s	r	+/−	+/−
MO9	*Streptococcus lutetiensis*	+	−	r	r	s	r	+/−	+/−

−：陰性，+：陽性，r：耐性，s：感受性，+/−：弱い耐性，nt：試験せず．

（2）抗生物質耐性

同一分離源から分離された同一種の菌株であってもエリスロマイシン(Em)耐性およびテトラサイクリン(Tet)耐性の違いにより菌株の分類が可能であった．表2の*S. lutetiensis*の菌株の中ではEmとTet双方に強い耐性をもつ菌株と双方に感受性の菌株および弱い耐性をもつ菌株の3グループに類別できた．一方，同じ*E. faecalis*であってもMAFF 400507はEm耐性でTetに弱い耐性を示し，MAFF 400505とMAFF 400508はEmとTetの双方に耐性，MAFF 400506はどちらにも感受性という違いがあった．乳児Eから分離した24菌株（*E. faecalis*）はEm，Tetに対して菌株による耐性の有無があったが，カナマイシンに対してはすべてが耐性，リファンピシン，ストレ

表 3. ジーンバンク寄託株の特性

Strains	分離源	Species	Gram stain	Catalase	Gas	45℃	pH9.6	NaCl 6.5%	Oxgall 1%	Methylene blue 0.02%	Erythromycin 20mg/ml	Tetracyclin 3mg/ml
MAFF 400507	乳児D	*Enterococcus faecalis*	+	−	−	r	r	r	r	r	r	+/−
MAFF 400506	乳児E	*Enterococcus faecalis*	+	−	−	r	r	r	r	r	s	s
MAFF 400505	乳児E	*Enterococcus faecalis*	+	−	−	r	r	r	r	r	r	r
MAFF 400508	乳児E	*Enterococcus faecalis*	+	−	−	r	r	r	r	r	r	r
MAFF 400605	幼児B	*Enterococcus* sp.	+	−	−	r	r	r	r	s	s	s
MAFF 400609	幼児B	*Enterococcus faecium*	+	−	−	r	r	r	r	s	s	s
MAFF 400610	幼児B	*Enterococcus faecium*	+	−	−	r	r	r	r	s	s	s
MAFF 401805	幼児B	*Weissella confusa*	+	−	+	r	s	r	r	s	s	r

−：陰性, +：陽性, r：耐性, s：感受性, +/−：弱い耐性.

プトマイシン，ペニシリン，クロラムフェニコールに対してはすべてが感受性であった．これら抗生物質耐性の原因遺伝子は特定していないが，プラスミドにコードされていることも多く，遺伝資源として有用であると考えられる．

(3) 抗菌活性クロステスト

表 2，表 3 の菌株についてお互いの菌株に対する抗菌活性を調べた．1 菌株を塗布した MRS 平板培地にその他の菌株をスポットして周囲に塗布した菌の生育を抑制するクリアゾーンの有無を判別した(表 4)．クリアゾーンができる理由はバクテリオシンなどの抗菌物質の産生の他，酸生成が多ければ周囲の菌の生育を抑制する．今回のクロステストではそれらの活性物質については調べていない．相互の抗菌スペクトルから S1，S3，S4，S9 はエリスロマイシン耐性，テトラサイクリン耐性の性質も含めて類似の特性を有すると考えられる．S18 はエリスロマイシン耐性，テトラサイク

表 4. 抗菌活性クロステスト

テスト株/標的菌	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S11	S12	S13	S14	S15	S17	S18	M7	M8	MO2	MO8	MO9
S1(EmR, TetR)	−	+/−	−	x	+/−	+/−	−	+	x	+	+/−	+	−	+	−	+/−	−	+	−	+	−
S2	x	−	−	x	x	+/−	−	−	x	+/−	x	−	−	+/−	−	+/−	−	−	−	−	−
S3(EmR, TetR)	−	+	−	x	+/−	+	+/−	+/−	x	+	+/−	+	+/−	+	+/−	+/−	−	+/−	+/−	+	+/−
S4(EmR, TetR)	+/−	+	−	−	+	+	+	+	x	+	+/−	+	+/−	+	+/−	+/−	−	+	+/−	+	+/−
S5	x	x	−	x	−	+/−	−	+/−	x	+/−	+/−	+/−	−	+/−	−	+/−	−	+/−	+/−	−	−
S6	x	x	−	x	−	−	−	−	x	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	+/−	−
S7	x	x	−	x	−	−	−	−	−	−	−	+/−	−	+/−	−	−	x	−	−	−	−
S8	x	x	−	x	x	−	−	−	−	−	−	+/−	−	−	−	−	x	−	−	−	−
S9(EmR, TetR)	+/−	+	−	x	+	+	+	+	−	+	+	+/−	+/−	+/−	+/−	+/−	x	+	+	+	+/−
S11	−	x	−	x	x	−	+/−	x	−	−	−	x	x	−	x	−	x	x	x	+/−	x
S12	−	x	−	x	x	−	−	−	−	−	−	x	x	−	x	−	x	x	x	−	x
S13	−	x	−	x	x	−	−	−	−	−	−	−	x	−	x	−	x	x	x	−	x
S14	x	x	−	x	x	+/−	x	−	−	−	−	−	−	+/−	x	x	x	−	x	x	x
S15	x	x	−	x	x	−	x	x	−	−	x	−	x	−	x	x	x	x	x	x	x
S17	x	x	−	x	x	+	x	x	−	−	x	−	x	x	−	x	x	x	x	x	x
S18(EmR, TetR)	x	x	−	x	x	+	x	x	−	−	x	x	x	x	x	−	x	x	x	x	x
M7	x	x	−	x	x	+	x	x	−	−	x	x	x	x	x	x	−	−	x	x	x
M8	x	x	−	x	x	−	x	−	−	−	−	x	x	−	x	x	x	−	x	x	x
MO2	x	−	−	x	−	−	−	−	−	−	−	−	x	−	x	x	x	−	−	−	x
MO8	x	−	−	x	x	x	−	x	−	−	−	−	x	−	x	x	x	−	x	−	x
MO9	x	−	−	x	x	x	−	x	x	−	−	−	x	−	x	x	x	−	x	−	−
MAFF 400507	x	+	x	−	+	+	+	+	x	+	+	+	+	+/−	+	+/−	+	+/−	+	+/−	+/−
MAFF 401805	−	+	−	−	+	+	+	+	−	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
MAFF 400609	−	+	−	−	+	+	+	+	−	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
MAFF 400610	−	+	−	−	+	+	+	+	−	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

+ ： 標的菌に対し生育阻止円形成，+/−：弱い阻止円形成，−：阻止円形成なし，x：テスト菌が生育阻害.

リン耐性を有するが，抗菌スペクトルではS17，M7と類似の性質を有している．MAFF 400507，MAFF 401805，MAFF 400609およびMAFF 400610は*S. lutetiensis*のS1，S3，S4，S9以外に対して抗菌性を示し，このことからもS1，S3，S4，S9が他と異なる特性をもつことが明らかになった．この抗菌活性クロステストは標的菌を塗布してテスト菌をスポットするだけの簡単なアッセイであるが同一菌種内の異なる特性をもつ株を判別するのに有効な方法と考えられる．

4. 考察

乳児の腸内細菌叢はアレルギーとの関連性から非常に多くの研究がなされており，最近はDGGE法，定量PCR法，ランダムシーケンス法など分子生物学的手法を取り入れた多くの腸内細菌叢解析法が利用されている．いずれも難培養性細菌を含む菌叢をいかに正確に解析できるかでその一長一短があるが，実際に菌株の利用を行う場合はコロニーとして単離することが必要となる．乳児A，幼児B，乳児EからはMRS平板培地を用いて20株以上のコロニーを分離したが，その大部分は優先菌種であり，*Lactobacillus* 属の菌やビフィズス菌は全く分離されなかった．平板培地上100～200のコロニーの大部分が同じ菌種であるため，1/100以下の存在比の菌種を得るためには，何らかの選択的手法をとる必要があることが示唆された．実際，乳児Aの場合，糞便由来の粘液画分を精製し，これに付着する菌株を分離した（詳細省略，表2のM番号株）．しかしながら，これらも優先種と同じ*S. lutetiensis*に同定された．したがって，大幅に成分の異なる培地や異なる温度など優先種の生育を抑える条件で分離しない限り少ない菌数の菌種を得るのはむずかしいと思われる．

乳児の腸内菌叢は時間とともにダイナミックに変化し，また個体間の差も激しいことが知られているため（中山ら，2007），月齢や離乳の程度の異なる乳幼児3名の優先菌種が異なっていることは不思議ではない．幼児Bは糞便採取の時点で抗生物質の飲用経験はなく，砂糖を含む菓子類も摂取していない食経験であり，その腸内細菌には興味がもたれ，今後免疫賦活活性など調べていく予定である．

細菌類の同定はいくつかのハウスキーピング遺伝子の配列を比較して決めるのが一般的となっている．本研究で分離した株も16S rDNAの配列解析のみでは同定がむずかしい．*rpoA*と*pheS*の配列解析を行った．また種特異的PCRも行ったが，条件によりバンドの出現が安定せず，同定の参考とした．MBA平板培地上*E. faecalis*に属する菌株は濃青色のコロニーを生じたが，*E. faecium*に属する菌株はほとんど生育しなかった．この選択性は*E. faecalis*の簡易同定に有効であった．

抗生物質耐性は多くの場合，プラスミド上の遺伝子にコードされており，接合伝達により同種あるいは異種の菌に伝達される．乳幼児であってもEmやTetに耐性菌が検出されており，どのような種類の耐性遺伝子によるものか興味がもたれる．

5. 謝辞

本研究を行うに当たり快く乳幼児糞便の提供をいただいた方々に心から御礼申し上げる．また畜産草地研究所畜産物機能研究チーム木元広実主任研究員，青木玲二研究員にはジーンバンク事業遂行にあたりご協力ご支援を賜ったことに心から感謝申し上げる．

6. 参考文献

Dutka-Malen, S. Evers, S. and Courvalin, P. (1995). Detection of glycopeptide resistance genotypes and identification to the species level of clinically relevant Enterococci by PCR. J. Clinical Microbiol. 33: 24-27.

細野明義（2004）. ヨーグルトの科学, 八坂書房, 東京.

Ludwig, W. et al. (2009). Order II "*Lactobacillales*" *In* "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2nd ed. Vol. 3" (De Vos, P., Garrity, G., Jones, D., Krieg, N.R., Ludwig, W., Rainey, F.A., Schleifer, K.-H., and Whitman, W.B. eds.) . pp. 464-735, Springer, New York.

中山二郎・田中重光・Songjinda, P.・立山敦・坪内美樹・清原千香子・白川太郎・園元謙二 (2007). 各種分子生物学的手法による乳児腸内細菌叢の解析—幼児アレルギー発症ハイリスク原因究明の大規模疫学調査にむけて—. 腸内細菌学雑誌 21: 129-142.

Poyart, C. et al. (2002). Taxonomic dissection of the *Streptococcus bovis* group by analysis of manganese-dependent superoxide dismutase gene (*sodA*) sequences: reclassification of '*Streptococcus infantarius* subsp. *coli*' as *Streptococcus lutetiensis* sp. nov. and of *Streptococcus bovis* biotype 11.2 as *Streptococcus pasteurianus* sp. nov. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 52: 1247-1255.

Smith, R. F. and Bodily, H. L. (1967). Use of a methylene blue azide medium for isolation of Enterococci. Appl. Microbiol. 15: 1087-1090.

鈴木チセ (2009). 食品からの乳酸菌の分離・簡易同定に関する操作, 食品機能性評価マニュアル集第 III 集, pp.41-48. 日本食品科学工学会, つくば.

Summary

To explore probiotics valuable for human health, it is necessary to collect strains from human, as a part of the activities of exploratory collections of The NIAS (National Institute of Agrobiological Sciences) Genebank, strains of lactic acid bacteria from the feces of infants were collected. Among isolated colonies from feces, strains that were Gram-positive and catalase-negative and acid-production-positive were judged as lactic acid bacteria. The strains were identified by analysis of bacterial 16S ribosomal RNA gene sequences. Growth in an alkaline medium (pH9.6), growth at 45 ℃, resistance against NaCl and bile and production of gas from glucose were examined. Resistance against various antibiotics enabled the strains belonging to the same species to be categorized into several groups. Mutual antibacterial activity also enabled the strains to be categorized in to several groups. Through this study, 9 strains were registered in NIAS Genebank.