

## T-RFLP 法による豚の腸内フローラ解析

○堀中 洸太<sup>\*1)</sup>、宮崎 浩子<sup>\*1)</sup>、岡 千寿<sup>\*1)</sup>

## 1. はじめに

養豚場では出生後しばらくは子豚に母乳が与えられるが、離乳期を境に固形飼料に切り替えられる。その変化に腸管が適応しにくいため、病原性菌が付着し下痢等の疾病が発生しやすいことが知られている。対策として抗菌剤が給与されているが、薬剤耐性菌発生への懸念からその使用が控えられる傾向にある。このような背景を受けて、生菌製剤などの資材による生体への保健効果が注目されている。本研究では、これらの資材を評価することを目標に、T-RFLP (Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism) 法による腸内フローラの解析を行った。

## 2. 実験方法

離乳期を挟む生後2~4週目の期間、子豚に生菌製剤を含む飼料を給与し、給与前・離乳直前・離乳直後・終了時に糞便を回収した。糞便から細菌叢のトータルDNAを抽出後、蛍光修飾したプライマーを用いて16S rRNA遺伝子の前半部分(約0.5kbp)をPCR増幅した(表1)。増幅産物を制限酵素(*AluI*、*HaeIII*、*HhaI*または*MspI*)で切断後、CEQ8000(BECMAN COULTER製)を用いてキャピラリー電気泳動を行い、末端断片(T-RF)の蛍光を検出した。T-RFをDNA塩基配列データベースと照合して主要な細菌の推定を行った。

## 3. 結果・考察

解析結果の一例を図1、2に示す。ユニバーサルプライマーを用いて解析した結果、離乳直前・離乳直後・終了時に *Bacteroides*、*Prevotella* と推定される T-RF が主要なピークとして検出された。終了時には *Eubacterium*、*Ruminococcus*、*Lactobacillus* と推定される T-RF が検出された(図1)。

乳酸菌特異的プライマーを用いて解析した結果、給与前・離乳直前・離乳直後に *Lb. reuteri*、*Lb. mucosae*、*Lb. acidophilus*、終了時に *Lb. gasseri* と推定される T-RF が主要なピークとして検出された(図2)。

## 4. まとめ

ユニバーサルプライマーによる解析では、腸内フローラの多様な構成菌を反映して複雑な T-RF パターンが得られた。一方、乳酸菌特異的プライマーによる解析では、菌属を限定することで比較的単純な T-RF パターンが得られた。プライマーの選択により、巨視的に腸内フローラの変遷を把握したり、微視的に特定の菌属の変遷を評価できることを示した。

表1. 解析に用いたプライマー

名称	塩基配列	備考
27F	5'-AGAGTTTGATCMGGCTCAG-3'	ユニバーサル
519R	5'-GWATTACCGCGKCGCTG-3'	ユニバーサル
Lab677R	5'-CACCGCTACACATGGAG-3'	乳酸菌特異的

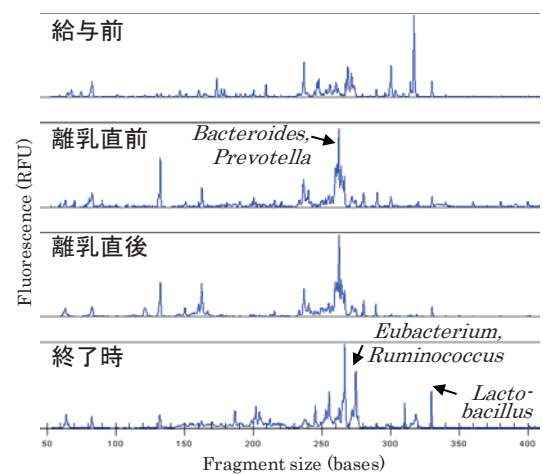


図1. ユニバーサルプライマーによる解析

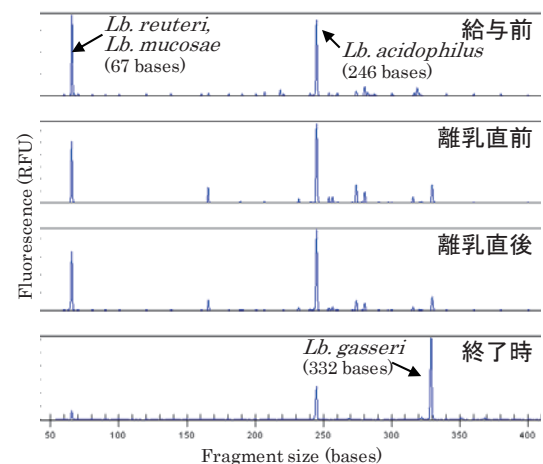


図2. 乳酸菌特異的プライマーによる解析

\*1)千葉県産業支援技術研究所