

M04**腸管系乳酸菌の定着性の検査実験系に関する研究**

(北九州高専) ○石場 まどか・石原 雅人・(正)水野 康平*

【緒 言】

私たちの腸内には、複雑に多様化した 500~1,000 種もの腸内細菌が 10^{12} 個/ml の密度で生息しており、消化能力や免疫力の増進に寄与している。しかし、全ての菌が有益ではなく、一般に善玉菌、悪玉菌、日和見菌のバランスが重要とされている。これを腸内細菌叢といい、その安定性を維持することは健康維持につながる。しかし、その機構はほとんど分かっていない。

腸管内壁は、粘膜細胞から分泌されるゲル状の粘膜層によって覆われている。この粘膜層の主成分はムチンという巨大糖タンパク質である。現在、多くの研究者が指摘しているように腸内細菌は、この粘膜層で定着性を発現して菌叢を形成していると考えられている。しかし、腸管内における個々の菌体に関する研究は多数あるが、異菌種同士の認識についてのデータはこれまで報告がない。そこで、ムチン存在下で、異種の腸内細菌がどのように定着するかを調べる単純なモデル実験を構築した。その結果、大腸菌とプロバイオティクスで知られる *Lactobacillus* 属の菌種が接着性の共凝集体を形成することを見出した。(図 1)

本研究では、どのような条件で接着性の共凝集体形成を発現するか、また、共凝集体形成の因子はどのようなものか検討することを目的とする。

【方 法】

(使用菌株) 腸管系乳酸菌として知られる *Lactobacillus* 属である *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* NBRC 3831、大腸菌である *Escherichia coli* JM109 を用いた。
(使用培地) 乳酸菌専用培地である MRS 培地と、汎用培地である LB 培地を用いた。

(複合培養方法) 凍結保存の *L.casei* NBRC 3831 を MRS 培地に接種し静置で、*E.coli* JM109 を LB 培地に接種し振盪で 37°C、24 時間、前培養した。次に、各前培養液を、0.3% ムチン(和光純薬、ブタ胃由来)を底面に固定化したポリスチレン製ペトリディッシュ上で混合した。この複合培養系は、同一菌数 (1.4×10^9 cells/ml) の乳酸菌と大腸菌(それぞれ 1 ml と 2 ml)から成り、37°C、24 時間、静置培養したものである。培養後、培地成分と浮遊している菌体をピペットで取り除き、40°C に調整したリン酸緩衝液を 3 ml 加え、120 rpm、10 分間振盪した。表面に定着していた菌量を濁度測定により調べた。(Reference=ムチン溶液、λ=600nm)

(共凝集体観察) 目視による観察、または光学顕微鏡

(Nikon Eclipse 80i) を用いて観察を行った。その際のグラム染色においてはキット(和光純薬)を用いた。

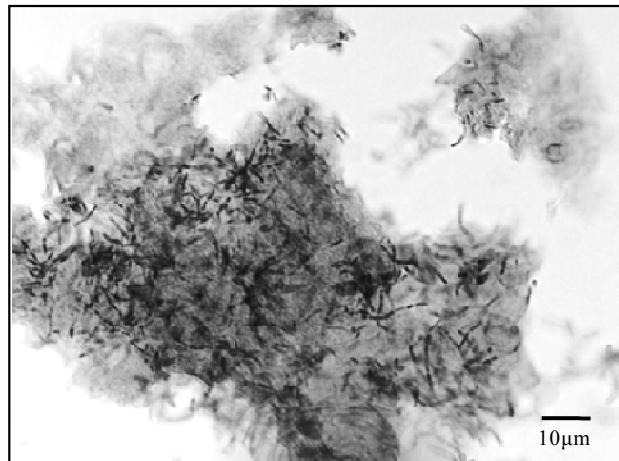


図 1. 共凝集体のグラム染色写真 (×1000)
濃く染色しているものがグラム陽性菌の乳酸菌で、薄く染色しているものがグラム陰性菌の大腸菌である。

【結 果】

(複合培養条件の予備検討)

これまでに、前培養や複合培養を行う温度(30~40°C)や時間(20~24h)、pH(3.0~9.0)などの条件を変化させて観察してきた。また、固定化するムチンの代替物質としてグルコースやオリゴ糖等 10 種の糖類を用いて検討を行った。様々な条件において共凝集体形成への影響について調べてきた。

(共凝集体のムチンへの定着性の確認)

複合培養を行った結果、ムチンの固定化、無固定化の双方で共凝集体の形成を確認した。ムチン上で形成される凝集体は比較的大きく(直径 2~3mm)、多くが接着性を示した。双方の培養液を取り除き、リン酸緩衝液を加え振盪し、濁度測定により表面に定着していた菌体量を調べた。なお、単独培養液ではほとんど接着性を示さないが、共凝集体はムチン表面上へ接着することが示唆された。

【結 論】

Lactobacillus 属と大腸菌がムチン上で接着性のある共凝集体を形成することがわかった。

* Tel&Fax 093-964-7303

E-mail : mizuno@kct.ac.jp