

## 研究ノート

野生エゾシカ (*Cervus nippon yesoensis*) のルーメン内容物から  
分離された乳酸生成菌の特徴

仲田 弘明・田村 雅彦

日本甜菜製糖株式会社

〒080-0831 北海道帯広市稲田町南 9 線西13番地 総合研究所第2グループ

Characteristic of lactic acid producing bacteria isolated from rumen content of  
wild yeso sika deer (*Cervus nippon yesoensis*)

Hiroaki NAKATA, Masahiko TAMURA

Nippon Beet Sugar MFG., CO., LTD.

Inada-cho, Obihiro, Hokkaido 080-0831 JAPAN

キーワード: エゾシカ, ルーメン, ルーメン内微生物, 乳酸

Key word: yeso sika deer, rumen, rumen bacteria, lactic acid

## 要約

産業利用に有用な微生物を取得する目的で、2009年2月から3月にかけて釧路市周辺で捕獲された野生エゾシカのルーメン内容物を微生物分離源として使用し、乳酸生成菌に焦点を当てて菌株の分離を実施した。分離された菌株全61株にグラム染色を施し形態観察を行ったところ、グラム陽性菌は47株、グラム陰性菌は14株であり、全て球菌であった。これらの菌株を液体培地にて培養し、培地中に生成された有機酸（乳酸、ギ酸、酢酸）の生成量を測定したところ、全ての菌株において乳酸および酢酸の生成が確認されたが、ギ酸を生成する菌株は61株中43株であった。乳酸と酢酸の生成量が共に多かった菌株を1株選び、16SリボソームRNA遺伝子に基づく相同性検索を行い微生物の同定を実施したところ、本菌株は *Staphylococcus aureus* と同定された。

## 緒言

冬期から春期にかけて、野生エゾシカ (*Cervus nippon yesoensis*) は採食物が乏しい環境下で生活している。積雪量が少ない地帯では落葉を採食し、積雪により落葉が埋もれてしまう地帯では、飢えをしのぐために樹皮、枝といった部位を採食することが知られている。1991年3月に網走市で採取された野生エゾシカ

のルーメン（第一胃）内容物からは、草本類、クマイザサの葉、小枝、樹皮が検出されている（増子ら、1996）。

一方、野生エゾシカのルーメンにおける発酵状態や微生物叢については、ICHIMURA *et al.* (2004) の報告が詳しい。ICHIMURA *et al.* は、知床半島に生息する野生エゾシカのルーメンの季節間の挙動について調査した結果、夏期や秋期と比較して冬期のルーメンではpHが高くVFA（揮発性脂肪酸）含量が少ないこと、秋期と比較して冬期のルーメンでは細菌数が少ないことを述べている。

筆者らは、産業利用に有用な微生物を取得する目的で、野生エゾシカのルーメン内容物から微生物の分離を試みた。2009年2月から3月にかけて釧路市周辺で捕獲された野生エゾシカのルーメン内容物を微生物分離源として使用し、乳酸生成菌に焦点を当てて菌株の分離を実施することとした。

ルーメンと乳酸生成菌の関係について、反芻家畜のルーメンを例に挙げると、*Streptococcus bovis* が代表的な乳酸生成菌として知られている。ルーメン内では、乳酸は吸収されにくい解離型の酸として留まりpHの急速な低下を引き起こすため、乳酸生成菌による乳酸の生成が激しいと乳酸アシドーシスの発症に繋がる。しかし、基本的には *Megasphaera elsdenii* や *Selenomonas ruminantium* などの有機酸資化性菌により乳酸が代謝され、新たにプロピオン酸などの有機酸が生成されるため、乳酸生成菌はルーメンの発酵パターンの一部を司っているものと考えられている（梶川博、2003）。

本報告では、ルーメン内容物より分離された乳酸生

成菌について、グラム染色を施し形態観察を行ったのち、液体培地で培養し有機酸（乳酸、ギ酸、酢酸）の生成量を測定した。さらに特徴の見られた菌株について、16SリボソームRNA遺伝子に基づく相同性検索を行い微生物の同定を実施したので、その詳細を報告する。

## 材料および方法

### 1. 野生エゾシカのルーメン内容物の調整方法

射殺後に開腹したエゾシカ個体よりルーメン部分を摘出し、内容物のみをプラスチックバッグに採取し、-20℃に凍結したものを凍結状態のまま粉碎した。ここから約5gを採取し、生理食塩水30mlを加えてホモジナイザー（日本理化学器械、HM-25型）にて5,000 rpmで1分間破碎し、均質化した。均質化後に残存する植物切片等を除外したのち、溶液部分をルーメン内容物懸濁液とした。

### 2. 乳酸生成菌の分離および形態観察

ルーメン内容物懸濁液を、乳酸菌分離培地（BCP加プレートカウントアガール、日水製薬）に一白金耳塗抹し、使用法に従い37℃で72時間培養を行い、単一コロニーの乳酸生成菌を分離した。分離された菌株について、グラム染色を施し光学顕微鏡にて形態観察を行った。

### 3. 有機酸の測定

分離された菌株を液体培地{グルコース2%（以下w/v）、ポリペプトン0.5%、酵母エキス0.5%、硫酸マグネシウム7水和物0.1%、pH6.5~6.8}に植菌し、37℃で48時間静置培養を行った。培養後、培養液中に生成された有機酸量をHPLCにより測定した。HPLCは名倉ら（1996）の方法を参考に、下記の条件にて実施した。

カラム：Shodex Ionpac KC-811×2（昭和電工）

溶離液：2 mM 過塩素酸溶液

カラム温度：45℃

検出器：紫外可視検出器445 nm

### 4. 菌株の同定

菌株の16SリボソームRNA遺伝子をPCRにより増幅し、そのDNA塩基配列の解読を行いDNAデータベース上にて相同性検索を行った。一連の試験は、株式会社テクノスルガ・ラボにて下記の条件により実施した。

DNA抽出：InstaGene Matrix（BIO RAD）

PCR：PrimeSTAR HS DNA Polymerase（タカラバイオ）

サイクルシーケンス：BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit（Applied Biosystems）

配列決定：ChromasPro 1.4（Technelysium Pty Ltd.）  
解析ソフトウェア：アポロン2.0（テクノスルガ・ラボ）  
検索データベース：アポロンDB-BA5.0（テクノスルガ・ラボ）

## 結果および考察

乳酸生成菌の分離源として用いた野生エゾシカの性別、捕獲時期、捕獲場所について、個体別に表記した（表1）。2009年2月に厚岸町および釧路町にて雌5頭が、2009年3月に厚岸町にて雄1頭が捕獲された。

表1 野生エゾシカの性別、捕獲時期、捕獲場所

個体別	性別	捕獲時期	捕獲場所	分離された菌株の数
エゾシカA	雌	2009/2/12	厚岸町上尾幌	12
エゾシカB	雌	2009/2/12	厚岸町上尾幌	15
エゾシカC	雌	2009/2/15	釧路町浦雲泊	10
エゾシカD	雌	2009/2/28	釧路町昆布森来止臥	10
エゾシカE	雌	2009/2/28	釧路町昆布森幌内	10
エゾシカF	雄	2009/3/1	厚岸町上尾幌	4

乳酸菌分離培地を用い、野生エゾシカA~Fのルーメン内容物より乳酸生成菌を合計61株分離した。これらの菌株にグラム染色を施し形態観察を行ったところ、全61株中グラム陽性菌は47株、グラム陰性菌は14株であり、個体別に見るとエゾシカD以外の個体でグラム陽性菌の割合が高かった（表2）。また、形態は全て球菌であり、連鎖状やブドウの房状などが観察された。ICHIMURA *et al.* (2004) が冬期エゾシカのルーメン内の細菌を調査した報告によると、桿菌も幾らか検出されているが、筆者らは乳酸菌分離培地により菌株を分離したため、特定の種や属の細菌がある程度選択的に取得された可能性が考えられた。

表2 分離された乳酸生成菌の菌株数およびグラム染色

個体別	菌株数	グラム染色	
		陽性	陰性
エゾシカA	12	9	3
エゾシカB	15	13	2
エゾシカC	10	8	2
エゾシカD	10	4	6
エゾシカE	10	9	1
エゾシカF	4	4	0
合計	61	47	14

これらの菌株を液体培地にて培養し、培養液中の乳酸、ギ酸、酢酸の生成量をHPLCにより測定した。乳酸、ギ酸、酢酸の生成量について、エゾシカの個体ごとに分けて平均値と標準偏差を求めた（表3）。61株全ての菌株において乳酸および酢酸の生成が確認されたが、ギ酸を生成する菌株は61株中43株であった。

一般的に、微生物は生息する環境により代謝産物も大きく変化し、また他の微生物との相互作用によっても代謝が変動するため、今回の液体培地で生成された代謝産物の傾向がルーメン内における微生物の挙動を再現しているとは言いがたい。しかし、自然界より分離された微生物の特徴を調査する上で、微生物の代謝産物を把握しておくことは必要である。

表3 乳酸生成菌により培養液中に生成された乳酸、ギ酸、酢酸の生成量

個体別	菌株数	乳酸 (mg/dl)	ギ酸 (mg/dl)	酢酸 (mg/dl)
エゾシカA	12	312 ± 92	1.5 ± 1.9	28 ± 19
エゾシカB	15	313 ± 47	1.9 ± 0.8	32 ± 11
エゾシカC	10	358 ± 96	4.1 ± 2.2	14 ± 20
エゾシカD	10	287 ± 39	4.1 ± 2.4	17 ± 22
エゾシカE	10	231 ± 41	1.1 ± 1.4	35 ± 18
エゾシカF	4	335 ± 94	3.6 ± 2.1	24 ± 33

平均値±標準偏差

分離された菌株のうち、他の菌株と比較し乳酸と酢酸の生成量が共に多かった菌株を1株選び(エゾシカFから分離された菌株)、16SリボソームRNA遺伝子の塩基配列を解読した。DNAデータベース上による相同性検索の結果、本菌株は*Staphylococcus aureus* と同定された(表4)。

表4 エゾシカFから分離された乳酸生成菌菌株の相同性検索

近縁種	Accession No.	相同率 (%)
<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	D83357	100.0
<i>Staphylococcus simiae</i>	AY727530	98.8
<i>Staphylococcus caprae</i>	AB009935	97.6
<i>Staphylococcus saccharolyticus</i>	L37602	96.8

*Staphylococcus aureus*はグラム陽性の球菌であり、和名を黄色ブドウ球菌と言う。ヒトの鼻腔や表皮などに常在する細菌で、動物の腸管などにも広く分布しており、ダマジカのルーメン内容物から分離された報告例もある(LAUKOVÁ, 1993)。*Staphylococcus aureus*などの*Staphylococcus*属の細菌は、多種類の細菌とともにルーメン上皮固着菌群を構成している(三森と湊, 2004)。*Staphylococcus*属の細菌の中には尿素分解酵素(ウレアーゼ)を生産するものも存在し、これらウレアーゼ生産菌によりルーメン内の尿素はアンモニアへと分解される。さらに、アンモニアはタンパク質合成のための窒素源として、ルーメン内に生息する多くの細菌に利用されている(BARR *et al.*, 1980)。このように、*Staphylococcus*属の細菌は、ルーメン内における物質循環の役割の一端を担っている。

近年、野生エゾシカの個体数増加に伴い、エゾシカの飼養管理やエゾシカ肉の特性に関する食品化学的研

究など、エゾシカの有効活用に関する研究が盛んに行われている(増子ら, 2008)。その一端として、筆者らはエゾシカのルーメン内容物を微生物分離源として利用することが可能ではないかと考えている。一例を挙げると、ダマジカのルーメン内容物を微生物分離源とし、抗菌活性物質を生産する細菌を多数取得した報告がある(LAUKOVÁ, 1993)。これは、ルーメン内に数多く生息する*Enterococcus*属や*Staphylococcus*属が、抗菌活性物質であるバクテリオシン様物質やランチビオティックを生産することに着目した例である。

エゾシカのルーメン内容物を微生物分離源として利用する際、例えば夏期、秋期と比較して冬期ではグラム陰性球菌の数が多く、グラム陰性湾曲桿菌の数が少ないといった季節間での菌叢変化の特徴(ICHIMURA *et al.*, 2004)を把握し、サンプリングの時期を考慮した上で様々な微生物を分離すれば、目的に適った微生物のスクリーニング効率が上がるものと考えられる。

増加の一途をたどる野生エゾシカのルーメン内容物から有用な微生物を分離し、北海道の産業に貢献することが出来ればと考えている。

## 謝辞

野生エゾシカのルーメンサンプル提供先をご紹介頂いた釧路短期大学講師岡本匡代氏と、サンプルをご提供頂いた北海道猟友会釧路支部常任理事佐藤満氏に厚く御礼を申し上げます。

## 文献

- BARR, M. E. J., S. O. MANN, A. J. RICHARDSON, C. S. STEWART, and R. J. WALLACE (1980) Establishment of ureolytic staphylococci in the rumen of gnotobiotic lambs. *Journal of Applied Bacteriology*, 49:325-330
- ICHIMURA, Y., H. YAMANO, T. TAKANO, S. KOIKE, Y. KOBAYASHI, K. TANAKA, N. OZAKI, M. SUZUKI, H. OKADA and M. YAMANAKA (2004) Rumen microbes and fermentation of wild sika deer on the Shiretoko peninsula of Hokkaido Island, Japan. *Ecological Research*, 19:389-395
- 梶川博(2003)ルーメン7。“ルーメンの中をのぞいてみようの項執筆”。13-14。デーリィ・ジャパン社。東京。
- LAUKOVÁ, A. (1993) Enterococci and staphylococci isolates from rumen of fallow deers and their antimicrobial activity. *New Microbiologica*, 16:351-357

増子孝義・相馬幸作・石島芳郎（1996）野生エゾシカ（*Cervus nippon yesoensis*）の胃内容物重量. 日本草地学会誌, 42:176-177.

増子孝義・相馬幸作・岡本匡代・関川三男（2008）エゾシカの有効活用に関する研究. 北畜会報, 50:29-35.

三森眞琴・湊一（2004）新ルーメンの世界. “ルーメ

ン細菌の種類と生態の項執筆”（小野寺良次監修・板橋久雄編）. 第1刷. 80-81. 農山漁村文化協会. 東京.

名倉泰三・清水洋介・佐山晃司・辨野義己（1996）ヒトの糞便内フローラ, とくに *Bifidobacterium* 属の構成および糞便性状に及ぼすメリビオースの影響. ビフィズス, 9:151-159