

次世代シーケンサーを用いた豚腸内細菌叢の16S rRNA
メタゲノム解析

藤井勇紀, 鹿島悠幹, 都筑智子, 川上純子, 大内義尚

茨城県北家畜保健衛生所

はじめに

次世代シーケンサーの登場により, 16S rRNA メタゲノム解析による腸内細菌叢の把握が可能となったが, 国内の野外豚における腸内細菌叢データの報告は少ない. 今回, 管内の複数養豚場の健康豚糞便, および大腸菌症発症豚の糞便を用いて, 豚腸内細菌叢の比較解析を実施したのでその概要を報告する.

材料および方法

管内養豚場の健康豚から, 離乳期 (40~60日齢), 肥育前期 (90~120日齢), 肥育後期 (150~180日齢), 繁殖母豚の4ステージの直腸便 (19農場349検体) と, 病性鑑定で採材した大腸菌症発症豚から, 直腸便 (21農場43検体) を供試した. DNA抽出後, 16S rRNA 遺伝子のV3-V4領域のPCR増幅を行い, ライブラリー調

整を行った試料について、次世代シーケンサー MiSeq (Illumina 社) を用いて塩基配列を決定し、腸内細菌叢構成について、ステージ間、農場間、農場内個体間、大腸菌症の発症の有無での比較を行った。なお、解析は CLC genomic workbench, Metagenome@kin (共に WF 社) と Bionumerics (インフォコム社), R (フリーソフト) を用いて実施し、ランダムサンプリングで各検体を 15000 リードに揃え、細菌属の構成率の算出、主座標分析、階層型クラスタリング解析、細菌種数カウント、 α 多様性解析を実施した。

成 績

1. ステージ間での比較：主要細菌属の平均構成率は、離乳期から繁殖母豚までの4ステージについて、*Prevotella* 属菌 (10.5% → 5.2% → 4.9% → 0.9%) や *Lactobacillus* 属菌 (15.1% → 13.9% → 11.6% → 3.7%) で減少し、*Clostridium* 属菌 (7.15% → 12.1% → 16.4% → 26.7%) や、*Turicibacter* 属菌 (0.2% → 0.5% → 1.6% → 8.2%) で増加するなど、ステージ間で差が見られた。主座標分析、階層型クラスタリング解析でも、ステージごとにクラスタリングされる傾向にあった。OTU 数の平均値は離乳期 → 肥育 → 肥育後期 → 繁殖母豚の順に、362.5 → 405.7 → 467.4 → 441.5 であり、離乳期から肥育後期にかけて増加し、繁殖母豚では若干の減少が見られた。また大腸菌症発症豚での平均値は 282.3 であり、健康豚4ステージよりも低値であった。Shannon Index の値は、5.71 → 5.83 → 6.08 → 5.53 で、離乳期から肥育後期にかけて増加し、繁殖母豚では大きな減少が見られた。また大腸菌症発症豚での平均値は 5.07 であり、こちらも健康豚4ステージよりも低値であった。
2. 農場間・農場内個体間での比較：主要細菌属の平均

構成率は、いづれのステージにおいても農場間で異なり、農場内個体間は類似していた。主座標分析、階層型クラスタリング解析では、離乳期と肥育後期については、農場間で別のクラスターに分かれたが、繁殖母豚では農場間で類似していた。

3. 大腸菌発症豚と健康豚の比較：主要細菌属の平均構成率は、*Prevotella* 属菌が大腸菌症発症豚で 1.4%、離乳期健康豚で 10.5% であり大きな差が見られた。*Escherichia* 属菌の平均構成率は大腸菌症発症豚で 6.14%、離乳期で 0.55%、肥育前期で 0.17%、肥育後期で 0.04%、繁殖母豚で 0.25% であり、大腸菌症発症豚で有意に高かった (U 検定, $P < 0.01$)。主座標分析、階層型クラスタリング解析では、大腸菌症発症豚と離乳期健康豚がそれぞれ別のクラスターに分類された。

考 察

今回の結果から、本県の健康豚の腸内細菌叢は、ステージ間、農場間では異なり、農場内個体間では類似することが示唆された。また、 α 多様性は肥育後期までは月齢とともに増加していくが、繁殖母豚では低下するなど、発育ステージによって腸内細菌構成は変化していくことが確認された。大腸菌症を発症すると *Escherichia* 属菌が有意に増加し、その他の細菌属も構成率が大きく変化し、 α 多様性の低下も見られるなど、疾病発症時にも菌叢パターンに変化があることを確認された。今後はさらにデータを積み重ね、健康豚の腸内細菌叢に影響を与える要因の解明と、大腸菌症の発生状況、または抗菌剤の使用状況で農場を分類し、その菌叢パターンを比較することで、疾病発症素因のある菌叢パターンや抗菌剤の腸内細菌叢への影響についても解明を行っていきたい。