

タマゴ感受性腸内常在菌 (ESIB) ーその増減は宿主の健康に寄与するのー

東京海洋大学学術研究院食品生産科学部門・准教授 久田 孝

■ 緒 言

日本では高齢化(65歳以上の人口割合27.7%)や食事バランスのくずれにより、生活習慣病患者とその予備軍が増加しており、悪性新生物(がん)も含めた生活習慣病の医療費全体に占める割合は1/3以上、死因全体に占める割合は半分以上になる¹⁾。その予防・改善には食生活の改善、適度な運動が重要であるが、機能性食品の効果も期待されている。

健康成人の大腸内には500-1000種の細菌類が、百兆個も存在しているとされ、菌体そのものや代謝活動が宿主の健康に影響を及ぼすことが知られている²⁾。これまで一般的に、ヒトではビフィズス菌、マウス等では乳酸桿菌が腸内常在の有用菌(善玉菌)と認識され、その割合を増加させる(probiotics 性)食品成分の探索が続けられている³⁾。しかし、各食品成分により増加する感受性腸内常在菌=Susceptible indigenous bacteria : SIBが宿主(種、系統あるいは個体)ごとに特異的であるのか、また、その増加が実際に宿主の健康に影響するのかを明らかにすることも重要と考えられる。

申請者らは、高脂肪食、高ショ糖・低食物繊維食および炎症性大腸炎(IBM)モデルICRマウスにおいて、通常食と比べ盲腸内の乳酸菌のOTU、特に*Lactobacillus reuteri*が減少することを認めた⁴⁾。また、*in vitro*で選抜した*Lactobacillus plantarum*をIBMモデルマウスに投与した場合、IBMの抑制とともに、腸内在性の*L. reuteri*の増加が認められた⁵⁾。本研究においてはタンパク質および脂質源を、牛乳(ミルクカゼイン)+牛脂、または全卵で調製した食餌をマウスに投与し、特にタマゴ食により多くなる菌種(=ESIB)を次世代シーケンサー(NGS)を用いて特定し、さらに、分離および同定を試みた。

■ 方 法

動物実験

本研究における動物実験は文部科学省「研究機関等における動物実験の実施に関する基本指針」に沿って、東京海洋大学動物実験委員会による承認(H30-4)を得て行った。5週齢の雄ddYマウス14匹を東京実験動物から購入し、20-24℃でAIN-76および蒸留水を自由摂取させた。6日間予備飼育後、無作為に2群($n=7$)に分け、3大栄養素量をほぼ当量にした20%ミルクカゼイン+17%牛脂(CT)食、または40%全卵(Egg)食(Table 1)で飼育した。ミルクカゼインおよび牛脂は富士フィルム和光純薬(株)から、乾燥全卵はキューピータマゴ(株)から入手し用いた。飼育13日後に糞便を回収し、ESIBの分離に供した。また、飼育2週間後、麻酔下で腹部大動脈より全採血致死させ、盲腸を摘出した。

盲腸内細菌叢の解析

摘出後水冷した盲腸から内容物を無菌的に粉碎ビーズ入りチューブに移し、-80℃で凍結した。16S rDNA(V4)領域のアンプリコンシーケンスおよび解析は、株式会社ファスマックで、Illumina社のNGS: MiSeqシステムを用いて既報^{4,5)}と同様の条件で行われ、得られた240-260塩基配列について97%相同性を閾値とし、OTU(operational taxonomic unit)解析した。 α -多様性は、全OTUのShannon-Wiener index(H')で示し、 β -多様性は占有率0.1%以上のOTUの主成分分析(PCA)で示した。

SIBの分離および同定

新鮮糞便および盲腸内容物を0.1%寒天を含むリン酸緩衝生理食塩水(PBS)で常法通り段階希釈し、BL寒天培地(ニッスイ製薬)に塗抹後、アネロパック(三菱ガス化学)を用いて37℃、48h嫌気培養した。光岡の方法⁶⁾に沿って出現したコロニーを形態ごとに計数し、3~5個ずつ同寒天培地を用いて分離した。グラム染色性、細胞形態およびカタラーゼの有無を確認後、代表的な分離菌について、16S rDNA塩基配列のBLAST検索により同定した。また、 10^{-4} 希釈液中の総菌数を誘電泳動インピーダンス(DEPIM)式の細菌カウンタ(パナソニック)を用いて測定した。

統計処理

群間の平均値の差は EXCEL 統計 Ver.6.0(エスミ)を用いて Student's *t*-test で検定し、値に 0 を含む場合は Wilcoxon の符号付順位和検定を行い、 $p < 0.05$ を有意差ありとした。

■ 結 果

盲腸内菌叢の多様性

体重および盲腸重量には有意な差は見られなかったが、盲腸内容物重量が Egg 群で高い傾向であった (Table 2)。Egg 群で盲腸内総菌数が高い傾向で、糞便中総菌数は有意に高かった (Table 3)。

NGS 解析でのリード数に有意差はなかったが、Egg 群で高い傾向であった。OTU 数および α -多様性を示す Shannon-Wiener H' 指標は Egg 群で低い傾向であった。Fig. 1 の PCA ($PC1$ vs. $PC2$) に示すように盲腸内菌叢は 2 群間で異なることが示された。

門、科および属レベル

Fig. 2A に示すように、門レベルの占有率では Firmicutes が最優勢で、Actinobacteria、Proteobacteria も両群で優勢であった。一方、Bacteroidetes は CT 群で優勢 (占有率 6.3%) で、Egg 群で 0.7%、Verrucomicrobia は Egg 群で 1.9% で、CT 群では 0.1% しかなかった。

科レベルでは、Firmicutes 門の Erysipelotrichaceae が最優勢で、Clostridiales、Lachnospiraceae および Lactobacillaceae も優勢菌群であった。このうち Erysipelotrichaceae と Lactobacillaceae が Egg 群で多い傾向であった (Fig. 2B)。Erysipelotrichaceae の多くは *Allobaculum* 属であった (Fig. 2C)。Egg 群の Lachnospiraceae の多くは *Ruminococcus* で、CT 群では他の属が優勢であった。Desulfovibrionaceae は Egg 群では *Desulfovibrio*、CT 群では他の属が優勢であった。CT 群で優勢菌群のひとつであった Ruminococcaceae の多くは *Oscillospira* であった。

OTU レベル

Fig. 3 に占有率 0.2% 以上の OTU ヒートマップを示す。図中の Taxonomy は NGS 解析システムで得られた菌名で、最優勢あるいは群間で有意差のある OTU の denovo シーケンス (約 250b) について DDBJ において BLAST 検索した結果を示す。最優勢 OTU であった *Allobaculum*; s は BLAST 検索では *Faecalibaculum rodentium* (相同性 100%) で、次に優勢な OTU も *Faecalibaculum* 類縁菌 (90%) で、その他は *A. stercoricanis* 類縁菌 (92-94%) であった。これらの OTU の占有率は Egg 群で有意に高い、あるいは高い傾向を示した。その他、*Clostridium lavalense* 類縁 (94%)、*Cl. glycyrrhizinilyticum* (99%)、*Olsenella profusa* 類縁 (94%) が Egg 群で高かった。一方、CT 群で有意に高い OTU は *Clostridium scindens* 類縁、Desulfovibrionaceae 科細菌 (89%)、*Flintibacter butyricum* 類縁 (98%) であった。また、属レベルで CT 群で優勢であった *Bacteroides*; s は *B. massiliensis* 類縁 (98%) で、Egg 群で多い傾向の *Lactobacillus* は *L. murinaus* (100%) であった。今回の実験では、CT 群と比較して Egg 群で特異的に占有率の高い *F. rodentium* と属レベルで有意に低かった *Bacteroides* を ESIB とした。

ESIB の分離および同定

BL 寒天培地上のコロニー形態とそれぞれの生菌数を Table 4 に示す。最も多いコロニー形態 (Small/white) は Egg 群の糞便中で有意に高く、盲腸内でも多い傾向であった。しかし分離された菌株はグラム染色で異なるものがあり、それぞれ BLAST 検索した結果、グラム陽性菌が *F. rodentium* (100%)、もう一方は *Bacteroides caecimuris* (99%) と同定された (Fig. 4)。その他のコロニーは乳酸菌 3 種 (*Lactobacillus reuteri*, *L. johnsonii*, *L. murinus*) および *Bifidobacterium pseudolongum* であった。

■ 考 察

盲腸内容物の重量 (Table 2)、総菌数 (Table 3) および BL 寒天培地上の生菌数 (Table 4) は Egg 群で高い傾向であったが、この傾向は発酵性の食物繊維を投与した場合にも認められる⁷⁾。本実験ではタマゴに含まれるオボムチンなどの影響により⁸⁾、脂質その他の栄養成分の吸収が抑制され、盲腸内菌叢の餌になった可能性が考えられる。

Fig. 2A に示される Firmicutes と Bacteroidetes の比が肥満や腸炎などと正の相関があると報告されてきたが⁹⁾、最近の報告ではその傾向が認められない場合もあり、種、株レベルの検討も必要と考えられる。また、Egg 群で少ない Bacteroidetes や Proteobacteria は腸炎と相関することが報告されている¹⁰⁾。今回 Egg 群で高い傾向であった *Lactobacillus* も Firmicutes 門に属するが、抗肥満、抗炎症など

様々な効果が報告されている¹¹⁾。最優勢でEgg群でより多い*Allobaculum*もIBDマウスでは減少することが報告されている⁴⁾。

Egg群で最優勢でCT群と比較してOTU占有率の高い*Faecalibaculum*を本研究では典型的なESIBとして、BL寒天培地を用いて*F. rodentium*の分離に成功した。*F. rodentium*は腸内での乳酸生成菌と考えられており¹²⁾、さらに*Allobaculum*と近縁種であるが、カロリー制御と相関することが報告されている¹³⁾。また、Egg群で少なかった*Bacteroides*は*B. caecimuris*に相当すると考えられるが、*B. caecimuris*の宿主との関連についてはほとんど報告がない。OTU解析で最優勢ではないが、CT群で有意に多かった*Flintibacter butyricus*は高脂肪食との相関が報告されているが¹⁴⁾、今回の条件では分離できなかった。

今回、分離されたこれらのESIB 2株について、現在、機能性(抗酸化性、抗炎症性、抗糖化性、胆汁酸低減能)を*in vitro*で検討している。また、OTU解析で有意差がみられたものの分離できなかった菌種については今後、分離、培養条件の検討が必要である。

■ 要 約

本研究ではタマゴ成分に対する感受性腸内常在菌(ESIB)の存在と、その増減の宿主への影響を明らかにすることを目的に、ddYマウスに20%ミルクカゼイン+17%牛脂食あるいは40%全卵食を投与し、特異的に変動する菌種をESIBと特定し、BL寒天培地を用いて分離および同定を試みた。盲腸内容物の16S rDNAアンプリコンシーケンス解析の結果、タマゴ食で占有率の高いESIBとして*Faecalibaculum*他いくつかのOTUが特定された。BL寒天培地を用いて分離された優勢菌は*F. rodentium*と同定された。今後、分離ESIB株の機能性の検討と、その他のESIBの分離の検討が必要である。

■ 文 献

- 1) 内閣府. 平成30年度高齢化白書.
- 2) Marchesi JR, et al. The gut microbiota and host health : a new clinical frontier. *Gut* 2016 ; 65 : 330-339.
- 3) Fernández J, et al. Colon microbiota fermentation of dietary prebiotics towards short-chain fatty acids and their roles as anti-inflammatory and antitumour agents. *J Funct Foods* 2016 ; 25 : 511-522.
- 4) Kuda T, et al. Dietary and lifestyle disease indices and caecal microbiota in high fat diet, dietary fibre free diet, or DSS induced IBD models in ICR mice. *J Funct Foods* 2017 ; 35 : 605-614.
- 5) Yokota Y, et al. *Lactobacillus plantarum* AN1 cells increase caecal *L. reuteri* in an ICR mouse model of dextran sodium sulphate-induced inflammatory bowel disease. *Int Immunopharm* 2018 ; 56 : 119-127.
- 6) Mitsuoka T. Establishment of intestinal bacteriology. *Biosci Microbiota Food Health* 2014 ; 33 : 99-116.
- 7) Nakata T, et al. Inhibitory effects of laminaran and alginate on production of putrefactive compounds from soy protein by intestinal microbiota in vitro and in rats. *Carbohydr Polym* 2016 ; 143 : 61-69.
- 8) Nagaoka S, et al. Egg ovomucin attenuates hypercholesterolemia in rats and inhibits cholesterol absorption in Caco-2 cells. *Lipids* 2002 ; 37 : 267-272.
- 9) Koliata A, et al. Association between body mass index and *Firmicutes/Bacteroidetes* ratio in an adult Ukrainian population. *BMC Microbiol* 2017 ; 17 : 120.
- 10) Shibayama J, et al. Effects of rice bran and fermented rice bran suspensions on caecal microbiota in dextran sodium sulphate-induced inflammatory bowel disease model mice. *Food Biosci* 2015 ; 25 : 8-14.
- 11) McFarland LV, et al. Strain-specificity and disease-specificity of probiotic efficacy. A systematic review and meta-analysis. *Front Med* 2018 ; 5 : 124.
- 12) Chang DH, *Faecalibaculum rodentium* gen. nov., sp. nov., isolated from the faeces of a laboratory mouse. *Antonie van Leeuwenhoek* 2015 ; 108 : 1309-1318.
- 13) Wang S, et al. Gut microbiota mediates the antiobesity effect of calorie restriction in mice. *Sci Rep* 2018 ; 8 : 13037.
- 14) Just S, et al. The gut microbiota drives the impact of bile acids and fat source in diet on mouse metabolism. *Microbiome* 2018 ; 6 : 134.

Table 1 Composition of the test diets(grams per 100g)

	Test diets	
	Casein-tallow	Egg
Whole egg powder		40.0
Milk casein	20.0	
DL-Methionine	0.3	0.3
Corn starch	15.0	12.0
Sucrose	38.0	38.0
Cellulose	5.0	5.0
Beef tallow	17.0	
Vitamin mix (AIN-76*)	1.0	1.0
Mineral mix (AIN-76*)	3.5	3.5
Choline choline bitartrate	0.2	0.2
Protein	19.0	18.7**
Lipid	16.4	16.1**
Carbohydrate	59.4	59.5**
Calorie (kCal/100g diet)	443	443

* The American Institute of Nutrition.

** Standard Tables of Food Composition
in Japan.

Table 2 Body and caecal weights of mice fed the test diet

	Casein-tallow	Egg
Body weight (g)		
Initial	28.6 ± 0.4	28.7 ± 0.3
After 14 days	35.9 ± 1.4	35.4 ± 1.6
Gain/14 days	7.3 ± 1.0	6.7 ± 1.3
Caecal weight (g)		
Whole	0.276 ± 0.041	0.358 ± 0.039
Tissue	0.132 ± 0.014	0.145 ± 0.007
Content	0.144 ± 0.030	0.213 ± 0.032

Values are mean and SEM ($n = 7$).

Table 3 Caecal and faecal bacterial counts, numbers of reads for bacterial genes according to next-generation sequencing and their α -diversity in the caecal caecal of mice fed test diets

	Casein-tallow	Egg
Total cell counts with DEPIIM (Log cells/g) ^a		
Caecal content	10.73 ± 0.10	10.82 ± 0.04
Faeces	10.92 ± 0.09	11.18 ± 0.05*
NGS analysis		
Number of reads	86114 ± 5532	89089 ± 4619
Number of OTU	1992 ± 158	1791 ± 91
Shannon-Wiener H'	3.188 ± 0.173	2.942 ± 0.096

^a With dielectrophoretic impedance measurement.

Values are mean and SEM ($n = 7$). * $p < 0.05$.

Table 4 Colony morphology on BL blood agar of dominant caecal and faecal lactic acid bacteria from mice fed the CT diet or Egg diet.

Colony morphology/ colour	Colony forming units/g				Gram stain	Strain name	Definition by 16S rDNA-BLAST (Similarity %)	Accession number
	Caecal content		Faeces					
	Casein-tallow	Egg	Casein-tallow	Egg				
Small/white	9.35 ± 0.23 (7)	9.56 ± 0.12 (7)	9.08 ± 0.11 (7)	9.80 ± 0.13 (7)**	+	Egg-1	<i>Faecalibaculum rodentium</i> (100)	LC416469
					-	Egg-2	<i>Bacteroides caecimuris</i> (99)	LC416470
Smooth/white	7.41 ± 0.59 (2)	7.95 ± 0.59 (3)	8.40 ± 0.04 (3)	8.01 ± 0.15 (5)	+	Egg-3	<i>Lactobacillus reuteri</i> (100)	LC416471
Blurry/marron	8.22 ± 0.62 (7)	8.30 ± 0.70 (2)	8.38 ± 0.20 (7)	8.15 ± 0.26 (3)	+	Egg-4	<i>L. johnsonii</i> (100)	LC416472
Small/red	8.65 ± 0.40 (3)	7.88 ± 0.37 (4)	8.60 ± 0.15 (7)	8.16 ± 0.40 (5)	+	Egg-5	<i>Bifidobacterium pseudolongum</i> (99)	LC416473
Smooth/brown	8.12 ± 0.31 (5)	8.00 ± 0.18 (7)	8.46 ± 0.21 (6)	8.38 ± 0.08 (7)	+	Egg-6	<i>L. murinus</i> (100)	LC416474
Total	9.45 ± 0.25	9.63 ± 0.11	9.42 ± 0.09	9.92 ± 0.11*				

Values are mean and SEM. (): detected mice / 7 mice. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

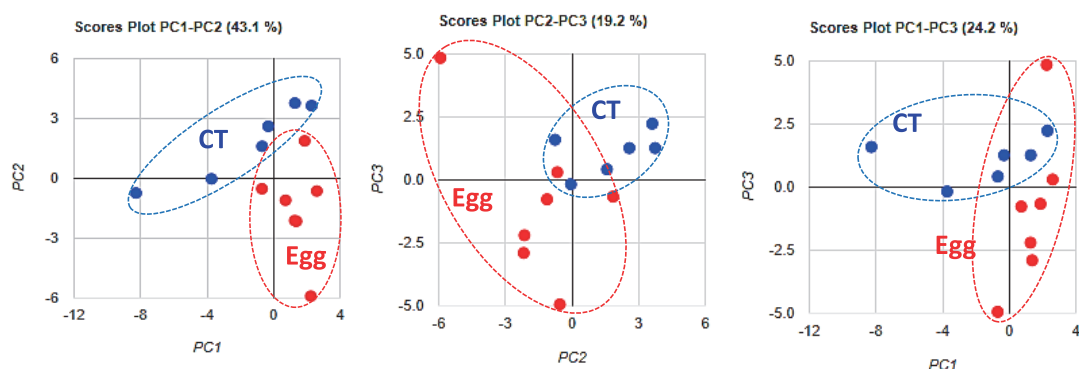


Fig. 1 Principal component analysis (PCA) of the caecal-microbiota OTUs (filtered by 0.1% of the count of all OTUs) in mice fed a casein-tallow diet (CT) and whole-egg diet (Egg).

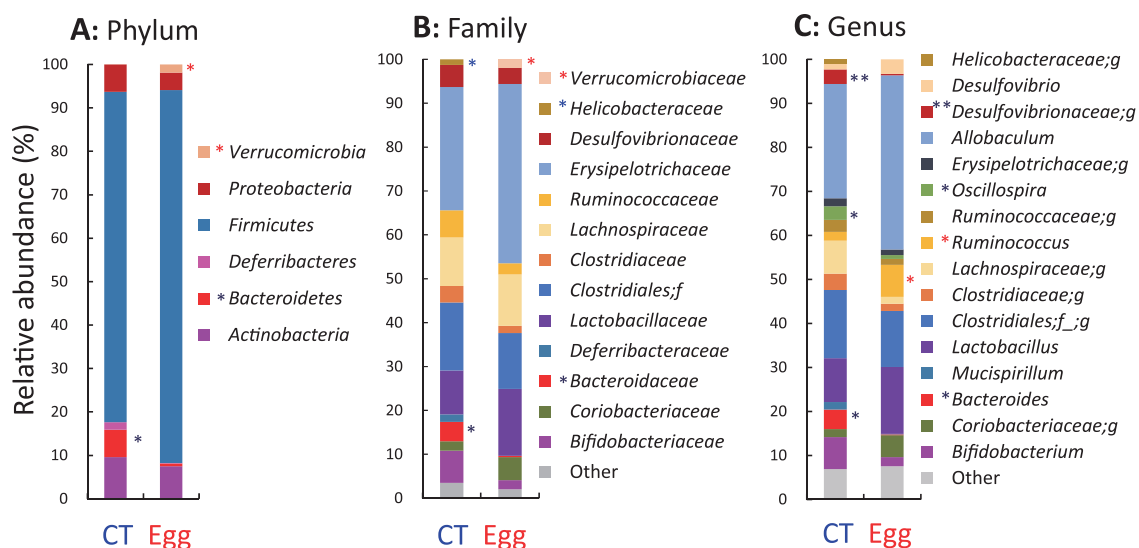


Fig. 2 Relative abundance of the caecal microbiota at the phylum, family, and genus levels in mice fed the casein-tallow diet (CT) or whole-egg diet (Egg). Significant differences between the two mouse groups : * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

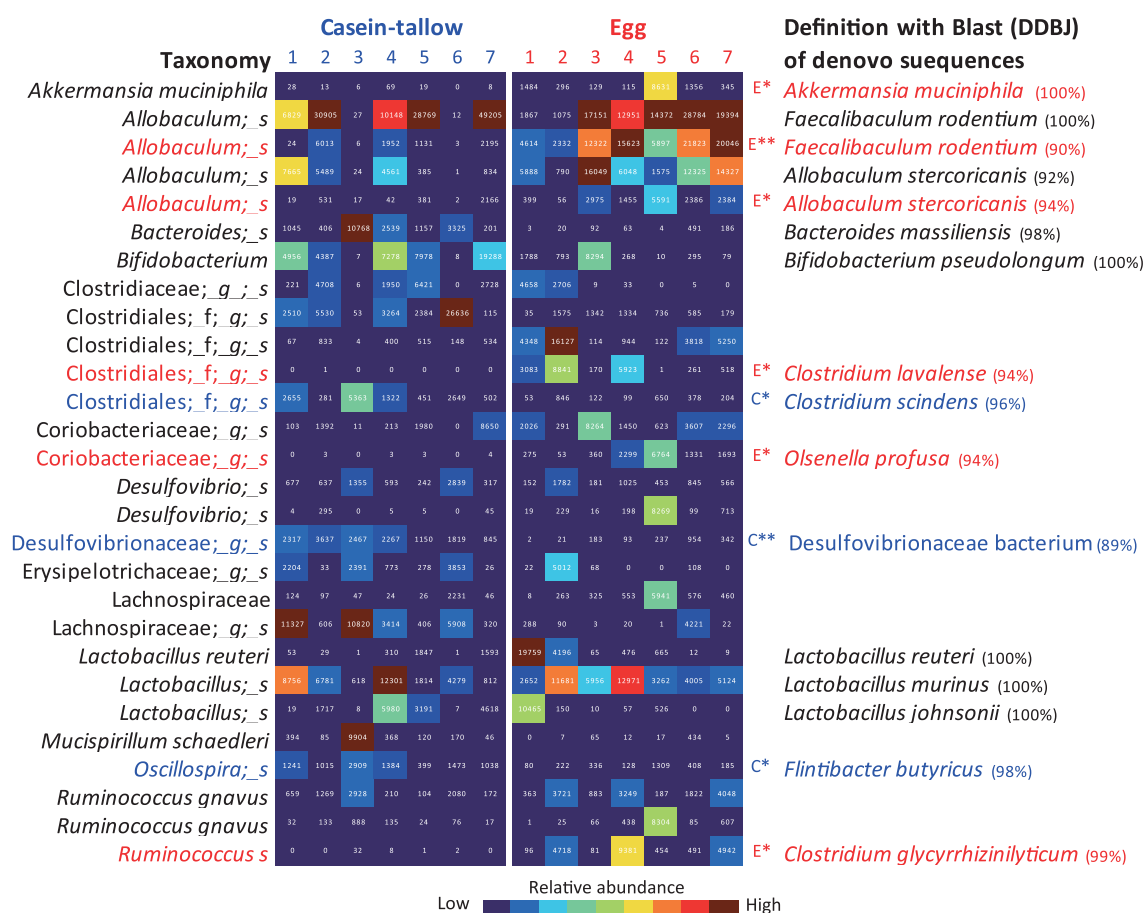


Fig. 3 A heatmap showing the relative abundance of the identified OTUs (filtered by 0.2% of the count of all OTUs) in the caecal microbiota in the mice fed the casein-tallow diet (CT) or whole-egg diet (Egg). C*, C** : abundant in group CT. E*, E** : abundant in group Egg. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

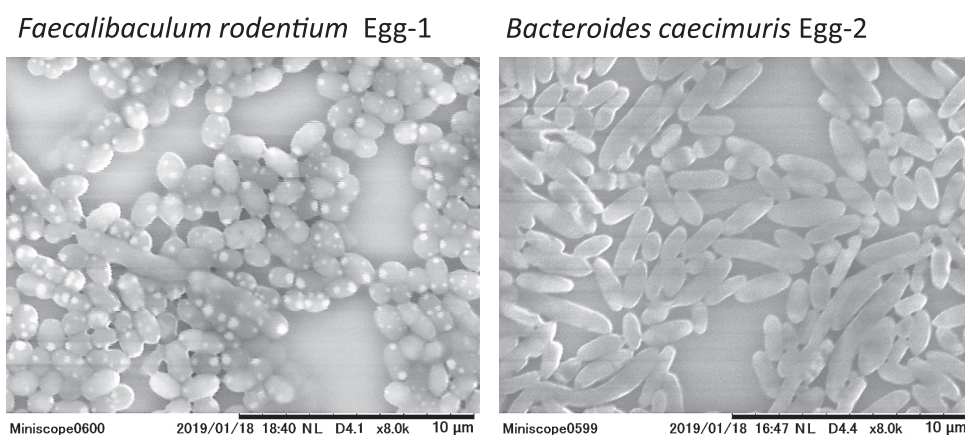


Fig. 4 Images of *Faecalibaculum rodentium* Egg-1 and *Bacteroides caecimuris* Egg-2 cells observed under a table top SEM (Miniscope TM3030, Hitachi-High-technology, Tokyo) without any treatment.