

令和 4 年 5 月 16 日現在

機関番号：32669

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2021

課題番号：17K08111

研究課題名(和文) 犬における糞便マイクロバイーム解析を活用した新規肥満治療の検討

研究課題名(英文) Evaluation of canine newly developed obesity treatment using fecal microbiome analysis

研究代表者

森 昭博 (Mori, Akihiro)

日本獣医生命科学大学・獣医学部・准教授

研究者番号：60549559

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：健康な犬の腸内細菌叢に対する4つの市販の療法食の影響を検討した。使用した療法食は減量食、低脂肪食、腎臓病食および抗アレルギー食であった。結果として、市販の療法食が健康な犬の糞便微生物叢に大きな影響を与えることを示した。次に消化酵素剤単独および市販のプロバイティクス/消化酵素剤投与が11頭の健康な家庭犬の糞便マイクロバイームに及ぼす影響について検討した。消化酵素剤単独および市販のプロバイティクス/消化酵素剤は健康な家庭犬の糞便マイクロバイームに影響を与え、吸収を上昇させるような腸内細菌叢へと変化した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では様々な市販の療法食が健康な犬の腸内細菌叢に与える影響について調査した。療法食には様々な組成のものがあり、それぞれの療法食が特徴的な腸内細菌叢に変化させることがわかった。これは、食事やプロバイティクスおよびプレバイティクスを給与することにより、犬の腸内細菌叢をコントロールできる可能性を示した。消化器疾患やアレルギー疾患などの犬に多いとされる疾患を腸内細菌叢に着目することにより、未然に予防ができるかもしれないということを示した、最初の研究になると考えられる。

研究成果の概要(英文)：The impact of four commercially available prescription diet regimens on the fecal microbiome in healthy dogs were evaluated. The diet regimens used were as follows: weight-loss diet, low-fat diet, renal diet, and anallergenic diet. In the results, commercial prescription diet influences the fecal microbiome in healthy dogs. Next, this study investigated the effect of a commercially available digestive enzyme and probiotic preparation on fecal microbiomes of 11 healthy, client-owned, pet dogs. We have found that a digestive enzyme and probiotic preparation can influence the fecal microbiomes of healthy, client-owned, pet dogs.

研究分野：動物栄養学

キーワード：糞便 マイクロバイーム 犬 プロバイティクス プレバイティクス

1. 研究開始当初の背景

糞便のマイクロバイームは、食生活、生活環境、ストレスおよび栄養状態などで変化することが報告されている。また、糞便マイクロバイームは善玉菌、悪玉菌および日和見菌など様々な菌が存在しそれらの菌がバランスよく含まれていることが良いとされている。そのため、糞便中に含まれる細菌は単一の菌種が増えているよりも多様性に富む方が良いとされている。糞便中の細菌組成を調べる方法として従来では培養法が主であったが、近年では次世代シーエンサーを用いて、ほとんどすべて腸内細菌の解析が可能となった。細菌の分類法は門構成、科構成、属構成および種構成など様々なレベルで比較されるが、糞便のマイクロバイームでは門構成や属構成で議論されることが多い。ヒトや犬において門構成の中で主要なものは、Firmicutes 門 (*Lactobacillus* 属が含まれる)、Bacteroidetes 門 (*Bacteroidetes* 属が含まれる)、Actinobacteria 門 (*Bifidobacteriu* 属が含まれる)、Proteobacteria 門 (*Escherichia* 属が含まれる) および Fusobacteria 門である。一般的に Firmicutes 門および Bacteroidetes 門は日和見菌が多く含まれ、Actinobacteria 門には善玉菌が多く含まれ、Proteobacteria 門および Fusobacteria 門は悪玉菌が多く含まれるとされている。実際に医学領域では痩せているヒトでは糞便中の Bacteroidetes 門が上昇し、Firmicutes 門が低下する (痩せ形の腸内細菌) ことが知られている。また肥満患者では上記の腸内細菌の構成が痩せ形のヒトと逆転する。ヒトと同様に犬においても肥満は重要な問題であり、おやつが多給および運動不足などにより肥満の犬は増加が続いている。犬の肥満は膵炎、眼病、運動器疾患、呼吸器疾患および循環器疾患など、様々な病態の発症や増悪因子となるため是正が必要となる。しかしながら、肥満を体重減量食で改善させたという報告はあるものの、腸内細菌の観点から肥満改善の効率などを科学的に証明した研究はこれまでにない。

2. 研究の目的

近年、医学領域において腸内細菌叢 (糞便のマイクロバイーム) に注目が集まっている。しかしながら犬においてはあまり研究が行われていない。本研究では腸内細菌に影響を与えると考えられる、プロバイオティクス (乳酸菌製剤など) およびプレバイオティクス (食物繊維など) およびその併用 (シンバイオティクス) を本学で健康な犬に投与し、血液代謝産物および糞便のマイクロバイームにどのような影響を与えるのか基礎的に検討することを第一の目的とする。続いて、それらの結果をもとに次に肥満犬および消化器疾患を持つ犬において上記のような治療介入を行う。治療介入の臨床症状に対する変化と、腸内細菌叢に与える影響を評価し、考察を行う。

3. 研究の方法

まず、本試験では健常犬 6 頭を用いた。食事には直接獣医臨床分野に本研究の結果が還元できるように、市販のフードを用いた。そのため市販の体重減量用の療法食である満腹感サポート (以下すべてロイヤルカナン社) 消化器サポート低脂肪、腎臓サポートおよびアミノペプチドフォーミュラを用いた。これらのフードはそれぞれ特別療法食であるが、腸内細菌にどのような影響を与えるかはわかっていない。本研究では健常犬の理想体重を維持できるように給与量を調整しながら 4 種類のフードをそれぞれ 3 週間 (21 日間) ずつラン

ダムに与えた。食事は1日2回(午前8-9時および午後4-5時)給与で、カロリー摂取量は $1/2 \times 1.1 - 2.1 \times \text{RER}$ ($\text{BW}^{0.75} \times 70$) と設定した(RERは安静時エネルギー要求量、BWは体重を意味する)。理想体重かどうかの判断は毎週の体重測定と獣医師(申請者)の触診によるボディコンディションスコアの判定で判断した。一頭の犬に対して3週間ずつ4種類のフードを与えるので、合計12週間(84日間)の研究となる。糞便中の菌数は経時的に増加するため、糞便採取日の三日間は15分おきに糞便をしていないかチェックを行い新鮮糞便を採取した。採取した糞便は糞便量と糞便スコアを記録し直ちに80℃で保存した。

4種類のフードにおいて糞便の解析を行った。冷凍した糞便からDNAを抽出し、16SrRNA系統解析を用いて、4種類のフード給与後の糞便中の細菌叢の変化を比較検討した。

次にプロバイオティクスが腸内細菌叢に与える影響についても検討した。使用する製剤は市販品であるピオイムバスター(獣医医療開発)を用いた。ピオイムバスターは乳酸菌と消化酵素剤を含む。様々な家庭で飼育されている健康犬11頭において繊維源の少ないフード(消化器サポート低脂肪)を用いて追加でピオイムバスターを処方し、その後の食事量、体重の変動および糞便マイクロバイオームの解析を行い、プロバイオティクスが腸内細菌に与える影響について考察した。

4. 研究成果

6頭の健康犬に高たんぱく、低炭水化物、低脂肪および高繊維の食事を与えると、やせ型の糞便マイクロバイオームになることが認められた。また、4種類のフードは腸内細菌叢を大きく変化し、それぞれの療法食に適した腸内環境にすることが示唆された。上記の研究結果は研究論文にまとめ、獣医系学術雑誌にアクセプトされた[1]。上記の結果をもとに、11頭の家犬に2種類のフードを給与し給与前後の糞便マイクロバイオームを比較検討した。家犬においてもフードはきちんと与えられ、糞便も問題なく予定通りに回収できた。家犬を用いることでより、臨床に即した実用的な研究結果になると考えた。結果として1つのフード(アミノペプチドフォーミュラ)は糞便マイクロバイオームを均一化し、様々な家庭環境で飼育されている犬でも、糞便マイクロバイオームを均一化することが分かった。もう一方のフード(消化器サポート低脂肪)は糞便マイクロバイオームを均一化することはできなかった。この研究結果は学術雑誌にアクセプトされた[2]。最後に消化酵素剤単独および市販のプロバイオティクス/消化酵素剤投与が11頭の健康な家犬の糞便マイクロバイオームに及ぼす影響について検討した。次世代シーケンスの結果、Firmicutes門、Clostridia綱、Clostridiales目、Clostridiaceae、Clostridium属およびBlautia属の割合がプロバイオティクス投与により有意に上昇した。消化酵素剤単独および市販のプロバイオティクス/消化酵素剤は健康な家犬の糞便マイクロバイオームに影響を与えることを示した。この研究結果は学術雑誌にアクセプトされた[3]。

<引用文献>

1. Mori A, et al. J Vet Med Sci. 2019, 81, 1783-1790.
2. Onozawa E, Mori A et al. Pol. J. Vet. Sci. 2022, 25, 93-101
3. Onozawa E, Mori A et al. Effects of a digestive enzyme versus a commercially available probiotic/digestive enzyme preparation on the fecal microbiomes of healthy, client-owned dogs. 日本ペット栄養学会誌 2022 印刷中

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 MORI Akihiro, GOTO Ai, KIBE Ryoko, ODA Hitomi, KATAOKA Yasushi, SAKO Toshinori	4. 巻 81
2. 論文標題 Comparison of the effects of four commercially available prescription diet regimens on the fecal microbiome in healthy dogs	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Veterinary Medical Science	6. 最初と最後の頁 1783~1790
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1292/jvms.19-0055	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Sawada Harumi, Mori Akihiro, Lee Peter, Sugihara Shiho, Oda Hitomi, Sako Toshinori	4. 巻 118
2. 論文標題 Pituitary size alteration and adverse effects of radiation therapy performed in 9 dogs with pituitary-dependent hypercortisolism	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Research in Veterinary Science	6. 最初と最後の頁 19~26
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.rvsc.2018.01.001	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 ODA Hitomi, MORI Akihiro, ISHII Satoko, SHONO Saori, ONOZAWA Eri, SAKO Toshinori	4. 巻 80
2. 論文標題 Time-action profiles of insulin degludec in healthy dogs and its effects on glycemic control in diabetic dogs	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Veterinary Medical Science	6. 最初と最後の頁 1720~1723
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1292/jvms.17-0714	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 E. Onozawa, A. Goto, H. Oda, S. Seki, T. Sako, A. Mori	4. 巻 25
2. 論文標題 Comparison of the effects of two commercially available prescription diet regimens on the fecal microbiomes of client-owned healthy pet dogs	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Polish Journal of Veterinary Science	6. 最初と最後の頁 93-101
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.24425/pjvs.2022.140845	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Eri Onozawa, Akihiro Mori, Kaoru Koyama, Aiko Haga, Hitomi Oda, Takumi Komiya, Seri Seki, and Toshinori Sako	4. 巻 -
2. 論文標題 Effects of a digestive enzyme versus a commercially available probiotic/digestive enzyme preparation on the fecal microbiomes of healthy, client-owned dogs.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 日本ペット栄養学会誌	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------