

令和 6 年 6 月 4 日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K06095

研究課題名(和文)食糞行動様式に基づく小型哺乳類の腸内細菌叢の違いとディスバイオシスからの回復方法

研究課題名(英文)Differences of microbiota and development of recovery methods from dysbiosis of small mammals with different styles of coprophagy

研究代表者

篠原 明男 (Shinohara, Akio)

宮崎大学・フロンティア科学総合研究センター・准教授

研究者番号：50336294

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：腸内細菌叢は哺乳類にとって重要な役割を果たしており、現在では「もう一つの臓器」と呼ばれている。小型哺乳類は食糞によって栄養を獲得するだけでなく、腸内細菌叢が伝達することが明らかになりつつある。そこで本研究では小型哺乳類の腸内細菌叢を食糞行動様式に着目して解析するとともに、腸内細菌叢が乱れたディスバイオシスから食糞を利用して回復させる方法を検討した。抗菌薬投与によるディスバイオシスモデルを用いて検証したところ、健康な個体の糞を給餌するだけでなく、糞溶解液を毛皮に塗布することも毛繕いによって腸内細菌叢が取り込まれて回復させられることを示した。本手法は多くの種に利用可能な簡便な回復方法になり得る。

研究成果の学術的意義や社会的意義

小型哺乳類の腸内細菌叢との共生は、栄養利用のみならず、植物の防御物質である二次代謝産物を解毒するなど生存と直結している。しかし絶滅危惧種の救護や域外保全時などでは抗菌薬を使用せざるを得ない場合もあり、腸内細菌叢が攪乱することが懸念される。本研究では、健康な個体の糞を給餌する、もしくは溶解して塗布する方法で腸内細菌叢を回復させた。後者は毛繕い行動によって腸内細菌叢が取り込まれたと考えられる。これらの手法は簡便で、準備する健康な個体が少なく済む点において優れている。小型哺乳類の腸内細菌叢が乱れた場合の回復方法だけでなく、腸内細菌叢の乱れを防止するための保全方法としても応用利用することが出来る。

研究成果の概要(英文)：The gut microbiota plays an important role in mammals and is now called as "the hidden organ". It is well known that small mammals have get nutrition through coprophagy, but recently, it is becoming clear but also the intestinal microbiota is transmitted by coprophagy. In this study, we analyzed the intestinal microbiota of several small mammal species with a focus on the mode of their coprophagic behavior, and we examined methods to recover from dysbiosis, in which the intestinal microbiota is disrupted, by using coprophagy. We used dysbiosis model, which is induced by antimicrobials, and showed that not only feeding feces from healthy individuals but also applying fecal lysate to their fur can recover the gut microbiota. This technique is very simple and could be applied for many small mammalian species.

研究分野：野生動物学

キーワード：腸内細菌叢 ハムスター ハタネズミ モグラ ディスバイオシス 齧歯類 食虫類 食糞

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

腸内細菌叢が宿主の栄養利用に寄与していることは古くから知られていた。一方で次世代シーケンサーによる網羅的解析により腸内細菌叢の詳細なプロファイリングが可能になり、腸内細菌叢が宿主との相互作用を通じて、免疫・疾病・恒常性維持など極めて多くの役割を担っていることが明らかになった。その結果、腸内細菌叢は現在では「もう一つの臓器」と呼ばれるに至っている。腸内細菌叢は宿主が提供する環境と何百～何千という細菌種の代謝産物によって構成される生態系のバランスのもとに維持されている。しかし、長期間の抗菌薬投与などによって腸内細菌叢は量的もしくは質的に攪乱される。この状態をディスバイオシスと呼ぶ。ヒトでは炎症性腸炎疾患や過敏性腸症候群などの消化管疾患のみならず、肥満、糖尿病、自閉症など、様々な疾病がディスバイオシスと関連していることが示されている。

近年、絶滅危惧種の救護や域外保全のための飼育時に腸内細菌叢が攪乱されて宿主の健康状態に影響を及ぼす例が報告され始めている。現在の絶滅危惧種の保全戦略は、病原菌や寄生虫などから隔離することで対象を病気等から保護することに主眼が置かれており、動物救護の現場では抗菌薬が日常的に使用されている。しかし、この戦略は同時に、宿主に密接に関与している腸内細菌叢の複雑性を攪乱し、宿主の生存に必要な共生微生物をも排除する。実際に飼育下のライチョウ (*Lagopus muta*) では、餌に含まれる二次代謝産物の解毒作用を担う細菌の消失が野生復帰を妨げている可能性が報告されている。したがって、今後の絶滅危惧種の保全においては保護対象種だけでなく、その腸内細菌叢を含めて保護する新たな保全戦略を確立するという新しいパラダイムへの転換が必要となる。

一般的に哺乳類の腸内細菌叢は母親からの垂直伝搬によって構築されるが、環境中からの水平伝搬によっても獲得される。実際に実験動物のマウスでは同居個体の腸内細菌叢が均一化することが知られ、その水平伝搬を担っているのは食糞行動と推測されている。哺乳類における食糞行動は、栄養学的な意義や、常同行動(強迫性障害)としての研究が伝統的に行われてきたが、近年では食糞が腸内細菌叢の水平伝搬を担う重要な機能を担っているのではないかと考えられ始めたことから再注目されている。

そこで本研究では、未だ不明な点の多い小型哺乳類の腸内細菌叢を明らかにしたうえで、抗菌薬による腸内細菌叢への影響を解明する。さらに抗菌薬によって腸内細菌叢が乱れた場合の対策として、食糞や毛繕いなどの習性を利用したディスバイオシスからの簡便な回復方法を構築することを目標とした。

2. 研究の目的

本研究では、腸内細菌叢が乱れた場合に、より多くの小型哺乳類に適応可能な回復手段を探る。マウスを用いた先行研究では、同居個体の腸内細菌叢が均一化するが、その要因は食糞のせいであると考えられている。しかし小型哺乳類の食糞行動は種によって様式が大きく異なる。マウスやアカネズミ (*Apodemus speciosus*) など雑食性齧歯類の殆どの種は落ちていた糞を拾い食する。一方で、ハムスターや草食傾向の強い一部の齧歯類は糞を肛門から直接に抜き取って採取する。また食虫性の種は食糞行動を基本的にしない。同居法による水平伝搬は糞を拾い食する種には有効であると考えられるものの、絶滅危惧種では同居させる健康な個体を複数用意することそのものが難しいことも想定される。

そこで本研究では腸内細菌叢の異なる水平伝搬様式を検討した。同居させなくても、拾い食いをする種では餌に糞を混ぜるだけで腸内細菌叢が回復する可能性がある。また哺乳類は毛皮が汚れると毛繕い行動を行うことから、同居させなくても毛皮に糞溶解液を塗布するだけで腸内細菌叢が回復する可能性もある。これらの手法は簡便であるだけでなく、準備する健康な個体が少なく済む点において同居法よりも優れている。さらに同居法では健康であった個体の腸内細菌叢が乱される可能性もあるが、糞だけを用いることでそのリスクを回避出来る。本研究で検討する手法は小型哺乳類の腸内細菌叢が乱れた場合の回復方法としてだけでなく、腸内細菌叢の乱れを防止するための保全方法としても応用利用することが出来る。

3. 研究の方法

本研究では、まず健康な飼育動物から得られた消化管内容物や糞、および収集済みの絶滅危惧種を含む小型哺乳類の消化管内容物や糞を用いて腸内細菌叢を明らかにした(実験1)。次に抗菌薬によって腸内細菌叢を破壊するディスバイオシスモデルを検討した(実験2)。最後に構築したディスバイオシスモデルを用いて、その回復を試みた(実験3)。全ての実験において腸内細菌叢の同定は、糞および消化管内容物から全DNAを抽出し、PCR法で16S rRNA領域を増幅させ、次世代シーケンサーを用いてアンプリコン解析することで行った。

【実験1】食糞行動様式の違いに着目した腸内細菌叢の解明

研究開始当初は新型コロナウイルスの影響で野外フィールドでのサンプリングが出来なかったことから、宮崎大学および岡山理科大学にて維持されているバイオリソースおよび凍結保存していたサンプル類を用いて研究を開始した。新型コロナウイルス禍が落ち着いて来た頃にフ

フィールドワークを始め、野外で捕獲した種についても解析を行った。食糞行動様式の違いに注目し、拾い食いをする対照群の種としてヨーロッパモリネズミ (*Apodemus sylvaticus*) およびマウス (*Mus musculus*) を用い、糞を肛門から直接食べる種として、ヒメキヌゲネズミ (*Phodopus sungorus*)、キャンベルキヌゲネズミ (*P. campbelli*)、ロボロフスキーハムスター (*P. roborovski*)、チャイニーズハムスター (*Cricetulus griseus*)、アルメニアンハムスター (*C. migratorius*)、シリアンハムスター (*Mesocricetus auratus*)、ギュンターハタネズミ (*Microtus guentheri*)、ロシアハタネズミ (*Microtus levis*)、ユーラシアハタネズミ (*M. arvalis*)、プレーリーハタネズミ (*M. ochrogaster*)、ニホンハタネズミ (*M. montebelli*)、ステップレミング (*Lagurus lagurus*)、拾い食いをしない食虫性の種としてコウベモグラ (*Mogera wogura*)、サドモグラ (*M. tokudae*)、エチゴモグラ (*M. etigo*)、スルクス (*Suncus murinus*)、ワタセジネズミ (*Crocidura watasei*)、ヒミズ (*Urotrichus talpoides*) の合計 20 種を用いた。実験 1 では糞だけでなく、採取可能であった消化管部位 (前胃、盲腸、小腸、大腸など) ごとに腸内細菌叢を解析した。

【実験 2】腸内細菌叢への抗菌薬の影響

実験 1 の結果から、実験は頭数の確保が容易な拾い食いをする対照群として用いたヨーロッパモリネズミに決定し、抗菌薬の投与による腸内細菌叢を破壊するディスバイオシスモデルの構築を検討した。実験群として、ポジティブコントロール群 (マウスにおける先行研究と同様: ストレプトマイシン硫酸塩、ネオマイシン硫酸塩、バシトラシンの 3 種の各抗菌薬カクテルの経口投与)、ネガティブコントロール群 (何も投与しない群)、エンロフロキサシン経口投与群 (40mg/BW/Day)、エンロフロキサシン皮下投与群 (20mg/BW/Day)、テラマイシン/ゲンタマイシン (各約 0.05g) 塗布群の合計 5 群を検討した。定期的に糞便を採取し、次世代シーケンサーにて腸内細菌叢を解析し、ディスバイオシスモデルを検討した。

【実験 3】腸内細菌叢の回復手段の検討

実験 2 の結果から、腸内細菌叢の回復手段の検討するためのディスバイオシスモデルとして、ストレプトマイシン硫酸塩、ネオマイシン硫酸塩、バシトラシンの抗菌薬カクテル (各 200mg/BW/Day) の 3 日間経口投与と決定した。ディスバイオシスを生じさせた後に、何も処置をせずに経過観察を行う群 (対照群)、健康個体の糞便を給餌する群 (糞便給餌群: 図 1 左)、健康個体の糞便を溶解して毛皮に塗布する群 (糞便塗布群: 図 1 右) の 3 群を設定し、腸内細菌叢が回復するかどうかを検討した。糞便サンプルの採取は、実験 1 日目 (抗菌薬投与前)、実験 4 日目 (抗菌薬投与終了翌日)、実験 6 日目、実験 9 日目、実験 14 日目、実験 28 日目 (実験最終日) に採取した。実験 28 日目の糞便採取後に解剖し、盲腸内容物を採取した。得られた糞便および盲腸内容物から腸内細菌叢を解析した。

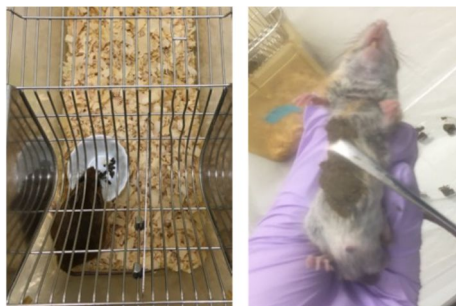


図1：ヨーロッパモリネズミの糞便給餌(左)と糞便塗布(右)の様子：糞便給餌群ではドナー由来の糞便をケージ内の小皿(直径約5cm)に給餌した。糞便塗布群ではドナー由来の糞便をすり潰し、スラリー状にしたものをレシピエントの腹部に滅菌したスパーテルで塗付した。

4. 研究成果

実験 1 の結果から、腸内細菌叢の多様性指数を Chao1 指数によって比較すると、拾い食いをする種の糞便 (287 ± 33)、拾い食いをする種の盲腸内容物 (296 ± 28)、肛門から糞を直接食べる種のうちハムスター類の盲腸内容物 (682 ± 147)、大腸内容物 (645 ± 192)、前胃内容物 (406 ± 151)、肛門から糞を直接食べる種のうちハタネズミ類の盲腸内容物 (379 ± 55)、前胃内容物 (258 ± 67) は高い値が観察され、多様な細菌叢が共生していることが明らかとなった。一方で、食糞をしない昆虫食性の種では、大腸 (143 ± 102)、小腸 (242 ± 222) と大きなばらつきが観察された。

実験 2 では、ポジティブコントロール群では抗菌薬投与 3 日間で体重の有意な減少が見られ、多様性が有意に減少した。また興味深いことに、エンロフロキサシン経口投与群では Chao1 指数は投与 7 日目で有意に低下したものの、投与 15 日目に回復した。エンロフロキサシン皮下投与群は、Chao1 指数は実験 7 日目に有意に低下し、その後実験 15 日目も有意に低いままで回復しなかった。また、テラマイシン/ゲンタマイシン塗布群は、7 日目に有意に低下し、その後は実験 15 日目まで有意に低いままであった。以上の結果から、ディスバイオシスモデルとして、ストレプトマイシン硫酸塩、ネオマイシン硫酸塩、バシトラシンの抗菌薬カクテル (各 200mg/BW/Day) の 3 日間経口投与と決定した。

実験 3 では、抗菌薬カクテルを投与した全ての実験群では 3 日間で有意な体重の減少が見られた。対照群では 25 日間の経過観察期間を儲けたが、有意な体重の回復は観察されなかった。糞便給餌群は、11 日間の糞便給餌期間にも有意な体重減少が観察され、糞便給餌終了後の 14 日間の回復確認期間においては、体重は減少せずに維持された。糞便塗布群では 11 日間の糞便塗

布期間において体重減少は止まり、糞便塗布終了後の14日間の回復確認期間では、有意な体重増加が観察された。全ての実験群における抗菌薬投与前（実験1日目）の糞便サンプルのChao1指数は 269 ± 50 であった。抗菌薬投与後の腸内細菌叢のChao1指数は、対照群で6日目（ 30 ± 17 ）9日目（ 94 ± 88 ）14日目（ 124 ± 99 ）28日目（ 147 ± 97 ）と徐々に回復した。経過観察期間中に糞便サンプルの細菌叢の多様性は徐々に回復することが示されたが、抗菌薬の投与前の段階までは回復しないことが示された。一方で糞便給餌群では、6日目（ 26 ± 16 ）9日目（ 82 ± 56 ）14日目（ 184 ± 37 ）17日目（ 173 ± 44 ）21日目（ 188 ± 24 ）28日目（ 178 ± 42 ）と対照群よりも大きく回復した。糞便塗布群では、6日目（ 68 ± 27 ）9日目（ 221 ± 21 ）14日目（ 207 ± 28 ）17日目（ 257 ± 23 ）21日目（ 23820 ）28日目（ 197 ± 30 ）と大きく回復した。さらに細菌叢の類似度（多様性）を比較すると、糞便給餌群のレシピエントは、1日目の糞便サンプルと比較して4日目、6日目、9日目、14日目の糞便サンプルの細菌叢構成は有意に異なっていたが、17日目（ $p=0.053$ ）21日目（ $p=0.06$ ）28日目（ $p=0.07$ ）の糞便サンプルの腸内細菌叢の構成とも異なる傾向が見られたが有意な差はなかった（図2）。糞便塗布群も同様に、1日目の糞便サンプルと比較して4日目、6日目、9日目、14日目、17日目の糞便サンプルとは細菌叢構成が有意に異なっていたが、21日目（ $p=0.34$ ）28日目（ $p=0.20$ ）の糞便サンプルの腸内細菌叢の構成とは有意な差はなかった。

以上の結果から、糞便給餌や糞便塗布は細菌叢構成を回復させることが示された。糞便の毛皮への塗布は、比較的容易な方法で毛繕いをする種であれば食糞をしない種にも適応可能であることから、腸内細菌叢の回復手段として、より応用性が高いことが期待される。

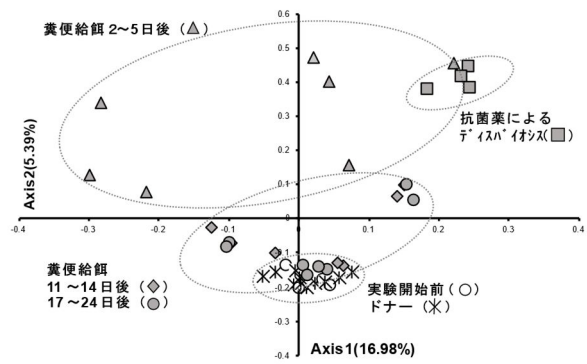


図2：食糞による腸内細菌叢の回復。抗菌薬の投与によりディスバイオシスを起こした個体（■）に健康なドナーの糞便（✱）を与えると腸内細菌叢構成は徐々に変化（△→◇）し、実験開始前（○）と同じ状態（○）に回復した。（注：プロット間の座標が近いほど町内細菌叢が類似していることを示す）

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Ikemoto-Kobayashi, M., Shinohara, A., Jogahara, T., Oda, S. & Mekada, K.	4. 巻 26
2. 論文標題 Volatile fatty acids and microflora composition in the digestive tract of the East European vole (<i>Microtus levis</i>)	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Naturalistae	6. 最初と最後の頁 7-13
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 -

1. 著者名 Kaneko Chiho, Shinohara Akio, Kikuchi Taisei, Tokuda Asami, Irie Takao, Yamada Kentaro, Misawa Naoaki, Yoshida Ayako	4. 巻 103
2. 論文標題 Distinctly different gut microbiota in Japanese badgers and Japanese raccoon dogs despite sharing similar food habits and environments	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Mammalian Biology	6. 最初と最後の頁 363 ~ 373
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s42991-023-00362-7	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 佐藤 雄大、江藤 毅、篠原 明男	4. 巻 61
2. 論文標題 新潟県新潟市江南区および五泉市近郊におけるエチゴモグラ<i>Mogera etigo</i>とアズマモグラ<i>M. imaizumii</i>の分布, 2019年の現状	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 哺乳類科学	6. 最初と最後の頁 29 ~ 37
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.11238/mammalianscience.61.29	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1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 篠原明男
2. 発表標題 ハムスターから学んだ腸内細菌叢の進化（自由集会「野生のネズミに学んだ遺伝学」）
3. 学会等名 日本哺乳類学会2021年度大会
4. 発表年 2021年

〔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
---------	---------