

論文の内容の要旨

氏名：鈴木 亮彦

博士の専門分野の名称：博士（生物資源科学）

論文題名：飼育下鯨類の腸内細菌叢の解明と腸内環境改善に向けた有用性細菌株の取得

1. 緒言

日本は世界有数の水族館大国であり、イルカを飼育している園館が多く、その展示は水族館の大きな利益となっている。しかし近年、野生イルカ個体の水族館への搬入が禁止されたことから、現在の飼育下個体の健康を適切に管理し、長期間飼育することがより重要な課題となっている。飼育下イルカの疾病や死亡には細菌感染症が最も強く関わっている（全体の約 60%）にも関わらず、これまで国内飼育下イルカの細菌学的知見はほとんど集積されてこなかった。

腸内細菌叢は、エネルギー吸収やビタミン産生、免疫システム制御や病原体排除などを通して宿主の健康や恒常性維持に常に貢献している。一方で、腸内細菌叢の組成や多様性は、宿主の性別、年齢、健康状態、ストレス、食事内容や抗生物質投与など様々な要因により変化する。例えば、有用菌の減少や、細菌叢の多様性の減少による病原性細菌の増加などは疾病を引き起こすリスクを増大させる。従って、宿主の健康管理を考える上では、各動物種にとって適切な腸内細菌叢の構成を把握し、維持することが重要である。

本研究では、腸内細菌叢の制御を通じた飼育下イルカの健康維持管理を見据えて、これに役立つ知見を得るため、国内での飼育頭数が最も多いバンドウイルカに着目し、(1) 飼育が細菌叢に与える影響を明らかにすること、(2) 飼育施設間での細菌叢の差異に寄与する飼育環境要因を推定すること、及び (3) 腸内環境の健康維持のためのプロバイオティクス候補菌を見つけること、を目的とした。

2. 飼育がイルカの腸内細菌叢に与える影響の評価

水族館での飼育がイルカ細菌叢に与える影響を明らかにするため、ミナミバンドウイルカを対象として、東京都御蔵島周辺の野生下個体と海洋博公園の飼育下個体の腸内細菌叢を比較し、差異を精査した。野生下個体については水中への排出糞便を用いて解析をおこなったため、御蔵島周辺の海水の細菌叢を野生下個体のものと比較し、糞便への海水中の細菌の混在の程度も併せて明らかにした。

野生下と飼育下個体の比較については、門レベルで両群ともに Firmicutes, Proteobacteria 及び Fusobacteria の 3 門が優占していたが存在割合は有意に異なり、野生下では Proteobacteria, 飼育下では Firmicutes がそれぞれ最優占門であった (図 1)。また、プロバイオティクスとしての有効性が期待される種が多く含まれる *Lactobacillus* 属は野生個体のみから検出された一方、イルカへの病原性が疑われている *Morganella*, *Mycobacterium*, *Mycoplasma* 属は飼育個体のみから検出された。飼育個体において顕著に多かったのは *Clostridium* 属で、細菌叢の約 50% を占めており、これは野生個体と比べ約 50 倍大きい値であった。多様性指数に関しては、細菌叢組成の均等度を示す Evenness 指数が飼育個体で野生個体の約半分であった (図 2)。以上より、他生物種で報告されているように、飼育環境下に置かれることでイルカの腸内細菌叢組成に変化が生じることが明らかとなった。また、飼育下での乳酸菌の欠如、病原性細菌の獲得や増加、細菌叢の均等度の低下は問題であり、今後の飼育個体の健康管理において *Morganella*, *Mycobacterium*, *Mycoplasma*, *Clostridium* 属のモニタリングが必要であることが示唆された。

野生個体と海水の細菌叢を比較した結果、細菌叢組成は属レベルで有意に異なり、海水中に 1% 以上存在していた細菌群が野生個体では検出されない、あるいは 0.003% 以下の検出割合であった。従って、野生イルカ類が水中に放出した直後に糞便試料を採取できれば、海水中の細菌のコンタミネーションの影響を気にせずに腸内細菌叢を解析できることも併せて示された。

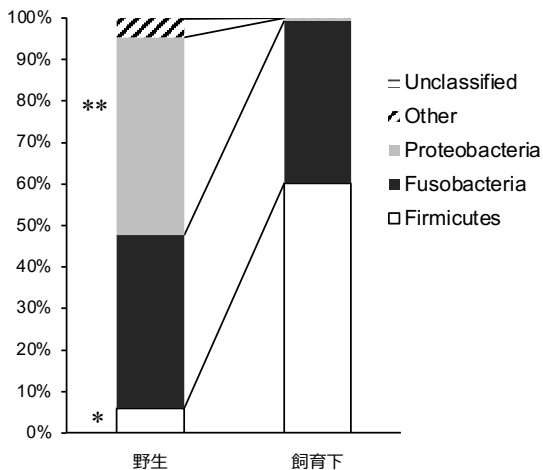


図 1. 野生下及び飼育下ミナミバンドウイルカの細菌門の検出割合. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

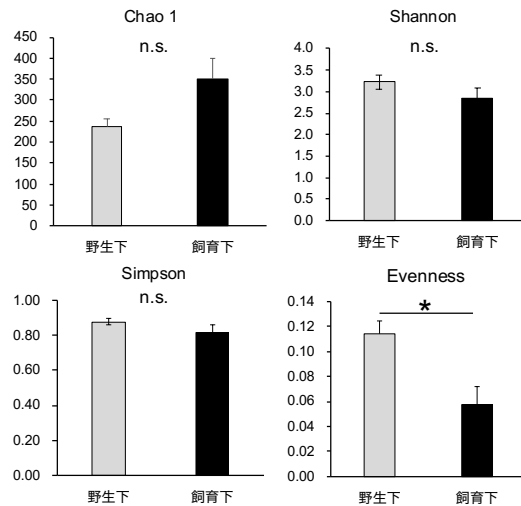


図 2. 野生下及び飼育下ミナミバンドウイルカ細菌叢の多様性指数の比較. * $p < 0.05$, n.s.: 有意差なし

3. 施設間でのイルカ腸内細菌叢の組成及び多様性の差異に寄与する要因の推定

施設間でのイルカ腸内細菌叢の差異を探るため、国内 5 施設のバンドウイルカの細菌叢を比較した。その結果、全施設で Firmicutes、Proteobacteria 及び Fusobacteria が優占門であったが、各施設でそれらの検出割合はわずかに異なっていた。次に、属レベルでの細菌叢組成の類似度を調べたところ、有意差は見られなかったものの施設毎に異なる組成をもつ傾向が認められた。多様性指数を解析したところ、2 施設で Chao 1 及び Simpson 指数が低かった。この 2 施設では、他と比べて餌種数が少なく、これが多様性が低い一因と考えられた。

次に、細菌叢組成または多様性指数と水温、気温、飼育年数、給餌生物種数との関連を探った結果、多様性指数と給餌生物種数間に有意な関連性が見られたことから、給餌生物種数が多いほど細菌叢が多様になることが判明した。また、イルカ細菌叢組成と餌生物種及び飼育プール水の細菌叢とを比較した結果、いずれの施設においても、イルカの細菌叢には餌生物間よりもプール水に見られたものと共通する細菌属が多く含まれていたことから、飼育下個体の細菌叢形成にはプール水を介した細菌伝播が大きく寄与していると考えられた。

さらに、年間を通した細菌叢組成と多様性の変動の有無を探るとともに、通年保持されている細菌群を調べた。その結果、多様性指数の有意な周年変化は見られなかったものの、Evenness 指数は飼育年数と有意な負の相関を示した。また、全個体から年間を通して検出された主要細菌群は 6 属あり、これらは各個体の細菌叢全体の約 80%以上を占めていたため、主要細菌群と思われた。

以上より、(1) バンドウイルカの腸内細菌叢は各施設に特有であること、(2) プール水を介した伝播が細菌叢組成に大きく影響すること、(3) 餌の種類が多いほど細菌叢の多様性が高くなることが示唆された。また、(4) 細菌叢の組成には周年変化は見られなかったが、(5) 細菌叢の均等度は飼育年数に影響されることが判明したため、長期飼育個体には多種多様な餌生物を給餌することで均等度を保ち、病原性細菌の定着を防ぐことが肝要であると考えられる。また、(6) 6 属のみが細菌叢の約 80%以上を占めており、これらの細菌属がイルカの腸管内において何らかの重要な作用をもたらしていると推測された。

4. プロバイオティクス候補菌の探索

飼育下イルカ腸内環境改善のため、乳酸菌と放線菌を対象に、プロバイオティクスに用いる候補菌の取得とその抗菌活性を明らかにすることを目的として以下の実験を行った。野生下と飼育下の5種鯨種の糞便を採取し、乳酸菌の選択培地に塗抹して嫌気条件下で培養した。その結果、各々から58及び86株を得た。16S rRNA 遺伝子領域による菌種同定をしたところ、*Enterococcus faecalis* が最も多く分離されたことから（野生11株、飼育下44株）、同細菌種がイルカ腸内の主要な乳酸菌であると考え、これら55株について、バクテリオシン産生関連遺伝子検出とイルカへの病原性が示された細菌種に対する抗菌活性試験を行なったが、いずれの株からも遺伝子は検出されず、抗菌活性も示さなかった。次に、野生個体のみから検出された *Lactococcus lactis* 9株について、無細胞培養上清（pH4.2–4.3 ないしは pH7.0 に調整）を用いて上述の抗菌活性試験を行なった結果、2株（No.99, No.104）がそれぞれ *Vibrio alginolyticus*, *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* および *Vibrio alginolyticus*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus hirae* に対して抗菌活性を示したが、Proteinase K 処理により抗菌活性は消失したことから、ペプチド様抗菌物質を産生していると考え、全ゲノム解析により *L. lactis* の産生する代表的なバクテリオシンであるナイシンの生合成遺伝子の検出を試みた。その結果、No.99 と No.104 はナイシン生合成遺伝子群（*nisA*, -*B*, -*T*, -*C*, -*I*, -*P*, -*R*, -*K*, -*F*, -*E*, -*G*）を保有しており、ナイシン前駆体（*nisA*）のタンパク質配列はナイシン Z と最も相同性が高かった（図3）。

以上より、イルカ類から *L. lactis* を初めて分離できたが、その中でも No.99, No.104 株はナイシン生合成遺伝子群を有しており、ナイシン産生によってイルカに病原性を示すと思われる細菌に対して抗菌活性を示すと考えられ、イルカ腸内環境改善に向け、有用な候補菌株を取得することができた。今後、プロバイオティクスとしての利用に向けて、胃酸・胆汁酸耐性試験によりイルカ腸内への到達及び定着性を調べる必要がある。

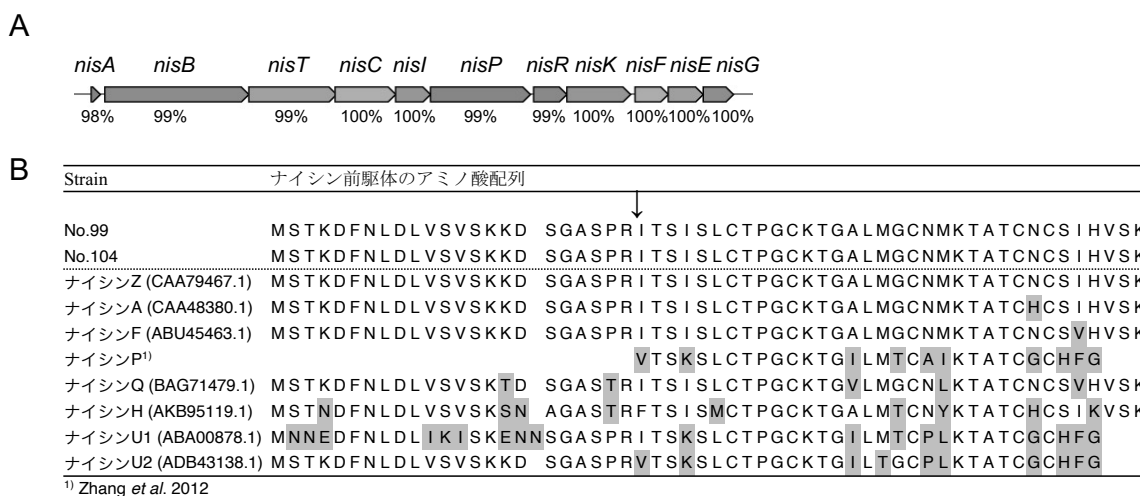


図3. *Lactococcus lactis* No.99 及び No.104 株において同定されたナイシン生合成遺伝子群 (A) 及びナイシン前駆体のアミノ酸配列の各種ナイシンとの比較 (B)。パーセンテージはデータベースとの相同性を示す (A)。灰色部分は No.99 と No.104 と異なるアミノ酸残基を示し、黒色矢印はリーダーペプチド切断部位を示す (B)。

5. 総合考察

本研究により、飼育環境がイルカ類の腸内細菌叢に影響を与えることが初めて示された。また、複数施設間の比較から、施設ごとに特有な細菌叢を形成すること、ならびにその組成はプール水を介した細菌伝播が大きく寄与しており、さらに餌生物種が多いほど多様性が高くなることを見出した。一方で、イルカ腸内細菌の均等度は飼育年数が長くなるにつれ低くなる傾向が見られたことから、長期飼育個体には多様な生物種を与え、細菌叢の多様性を高く維持することが有効であると考えられた。さらに、腸内環境改善のため有用であると考えられるナイシン産生能を有する *Lactococcus lactis* 株を分離し、その抗菌活性を明らかにした。本研究の成果は、腸内細菌を介した飼育下イルカの健康管理法の確立に大きく貢献すると期待される。