

## 論文審査の結果の要旨

氏名：鈴木 亮彦

博士の専攻分野の名称：博士（生物資源科学）

論文題目：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

審査委員：（主査） 教授 鈴木 美和

（副査） 教授 高橋 恭子

（副査） 教授 伊藤 琢也

本学位論文は、飼育下鯨類の健康管理に役立てるため、宿主の健康を左右する腸内細菌に着目し、その科学的知見を取得すべく遂行された。具体的には、飼育環境が細菌叢組成に与える影響を評価するため、まず野生下と飼育下でのイルカ腸内細菌叢組成の差異を明らかにした上で、細菌叢の構成に影響を与える環境要因を推定した。これに加えて、鯨類の健康管理に利用できるプロバイオティクス候補菌の単離を目指した。

論文の第1章では、野生個体の糞便が採取できるミナミバンドウイルカを対象として、野生下および飼育下個体における腸内細菌叢の組成を比較した。解析の結果、門レベルでは最優占門の検出割合に顕著な差が見られ、また amplicon sequence variant (ASV) レベルでも組成が大きく異なることが判明した。多様性の指標である Evenness 指数について、飼育下個体では野生下より有意に低かったことから、飼育下で腸内細菌叢のバランスが偏ると示唆された。飼育下では、感染症の予防や治療のために抗生物質が比較的頻繁に投与され、給餌される生物の種数は数種にとどまる。飼育下特有のこのような状況が腸内細菌叢の偏りに影響していると推測された。さらに、飼育下個体からはイルカに病原性を示すと報告のある複数種/属の細菌が相対的に多く検出されることに加えて、野生個体が保有していた有用乳酸菌が検出されないという特徴が見られた。腸内細菌叢の偏りを考え合わせると、飼育個体においては病原性細菌の増加からくる感染症により、腸管内の健全性ひいては全身の健康が脅かされるリスクが高まっていると懸念される。これらの知見は、飼育個体の健康管理において認識すべき情報であると考えられる。

第2章では、国内での飼育頭数が最も多いバンドウイルカを対象として、飼育施設間でのイルカの腸内細菌叢組成に違いがあるかを調べ、さらに差異に寄与する環境要因を特定することを目指した。また、細菌叢組成の季節変動も併せて調べた。第1節では、国内5施設の当該種を対象として細菌叢組成を比較した結果、その組成が施設ごとにクラスターを形成することが判明した。また、細菌叢の多様性指数も施設ごとに異なることが分かった。さらに、細菌叢組成の違いには餌生物の種数とイルカの収容形態が関与していることが示され、餌生物種が多い個体ほど腸内細菌の多様性が高いことも判

明した。一般的に、食餌の栄養成分が腸内細菌叢に影響し、栄養の偏りは腸内細菌の多様性を減少させることから、イルカ腸管に様々な細菌種を定着・増殖させるためには餌の種類を多くしてバラエティーに富む栄養を与えるのが良いと考える。続いて、環境水とイルカ腸管内との間で共通する ASV 数を解析したところ、プール飼育の個体では多く、生け簀飼育では少ないことが分かった。この結果は、特に閉鎖環境下においては、水中にイルカの腸内細菌が多く存在し、水を介してイルカ間で腸内細菌が伝播することを示唆している。既報でも、プール飼育下では個体の吐き戻しや糞便などを介してイルカ個体間で細菌伝播が生じることが示唆されていることから、水槽内ではイルカ間で腸内細菌が共有されやすく、これが施設ごとに腸内細菌組成がクラスター化した一因でもあると推測された。以上の結果を踏まえると、飼育個体の腸内細菌の多様性を維持するためには、多くの種類の餌を与えることに加えて、飼育頭数を多く保つことも有効であると考えられる。

第2節では、環境温度が腸内細菌に与える影響を探るため、新江ノ島水族館のバンドウイルカを対象として、月1回の頻度で1年間糞便を採取し、細菌叢の多様性について、季節変動および環境温度との関連の有無を調べた。その結果、多様性指数に季節的な変動は見られず、水温と気温のいずれとも関連しないことが判明した。この結果は、水温が飼育適温範囲になるように調節され、また餌内容が限られている飼育下の個体のものであり、野生個体において同様の結論が得られるとは限らない。しかし、イルカの噴気孔周辺の細菌叢が季節を問わず比較的安定して多様であると報告した過去の知見もあることから、イルカの細菌叢が環境温度の変化やそれに伴う体内環境の変化にあまり影響されない可能性がある。以上のように、第2章では、施設ごとに特有な細菌叢組成が形成されること、および、それには給餌される生物種の違いや環境水を介した細菌伝播が寄与している可能性を示した。また、飼育下イルカの腸内細菌叢の多様性を高く維持するためには、多様な内容の餌を与えることが有効であることも示した。さらに、腸内細菌の多様性が年間を通して安定しているという知見は、多様性が減少した場合には環境温度や季節以外の要因が関わっていると考えられる判断材料となる。

第3章では、飼育下個体の腸内環境を健康にするのに役立つプロバイオティクス候補菌を取得することを目指し、野生下および飼育下の鯨類の糞便から細菌を分離培養し、性状解析を行なった。第1節では、野生のスジイルカ、ハナゴンドウ、シロハイルカ、アカボウクジラ、ならびに飼育下バンドウイルカの糞便を試料として、乳酸菌の選択培地を用いて乳酸菌を分離した。その結果、*Enterococcus*, *Streptococcus*, および *Lactococcus* 属に含まれる計9細菌種が分離された。このうち、*E. faecalis* が最も多く検出されたことから、この細菌が鯨類の主要な乳酸菌であると考えられた。また、*Lactococcus* 属に分類された9つの分離株は全て *L. lactis* subsp. *lactis* と同定されたが、これは鯨類で初めての分離となった。*E. faecalis* と *L. lactis* subsp. *lactis* にはバクテリオシンであるエンテロシンおよびナイシンをそれぞれ産生する株が存在することが知られているため、続く第2節では、鯨類から分離した *E. faecalis* (株 No. EF-1~EF-55) と *L. lactis* subsp. *lactis* (株 No. 98~100, No. 102~104, No. 140~142) に着目して、イルカ病原性細菌を含む計20種の指標菌に対する抗菌活性試験をした。その結果、*E. faecalis* の株はいずれの指標菌に対しても抗菌活性を示さなかった一方で、アカボウクジラから得られた *L. lactis* subsp. *lactis* 株である No.99 はこれまでイルカに病原性が示された *Vibrio alginolyticus* に対して、No.104 は *V. alginolyticus*, *E. faecalis* および *E. hirae* に対して、それぞれ抗菌活性を示した。Protease K 処理および熱処理により抗菌活性が減弱したことから、抗菌物質がタンパク質であると考え、No. 99 と No. 104 の全ゲノム配列を解析した。その結果、同細菌の主要なバクテリオシンであるナイシン A/Z 生合成関連遺伝子群が検出された。ナイシン前駆体のアミノ酸配列がナイシン Z と 100% 相同であったことから、No.99 および No.104 の抗菌活性はナイシンを介するものであると推測された。また、No.99 お

よび No.104 の pH 耐性試験を行ったところ、いずれもイルカの胃液 (pH 3.8) および pH 2.5 の培地中で生存・増殖できることが確認されたため、これらの株はイルカの胃を通り腸管に到達できると期待される。上記の通り、第 3 章では、イルカ病原性細菌に対して抗菌活性を示し、イルカ胃内環境でも生存・増殖できる *L. lactis* subsp. *lactis* 株を野生のアカボウクジラから得ることができた。将来的に利用するためには、胆汁酸耐性を調べるとともに、腸内での定着性や簡便な投与方法について検討する必要があるが、飼育下イルカの腸内環境改善に役立つプロバイオティクス候補菌として有望な株を取得することができた。

以上の通り、本研究の遂行によりいくつかの新しい知見を得ることができた。まず、飼育環境がイルカ腸内細菌叢の組成に偏りを生じさせることを初めて明らかにした。次に、イルカの腸内細菌叢が施設ごとにクラスター化されることを初めて報告し、さらに飼育下個体の腸内細菌の多様性を維持するためには多様な餌生物種を与えることが有効であると提案できた。また、腸内細菌叢の多様性が年間を通して安定していることを提示した。これに加えて、イルカ病原性細菌の抑制や排除に有用であると思われる乳細菌株を取得することができた。本研究により得られた成果は、これまで不明な点が多かったイルカ腸内細菌叢について基礎的な知見を提供するとともに、腸内細菌を利用したイルカ個体の健康管理方法の整備に向けて大きく貢献すると期待される。

イルカは水族館の集客に貢献している動物である。また、海外には海洋環境の汚染により生息数を減らしている鯨類を保護する施設もある。そのような施設において、イルカを健康を保つことに資する成果を残した本研究は、生物資源科学の分野の研究として相応しいと判断する。

よって本論文は、博士（生物資源科学）の学位を授与されるに値するものと認められる。

以 上

令和 4 年 2 月 22 日