

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

**Characterization of intestinal microbiota of captive cetaceans and
exploration of beneficial bacteria as probiotics**

日本大学大学院生物資源科学研究科応用生命科学専攻

博士後期課程

鈴木 亮彦

2021

目次

緒言

第1章 飼育がイルカの腸内細菌叢に与える影響の評価

第2章 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

第1節 複数飼育施設個体の細菌叢解析

第2節 季節変動

第3章 プロバイオティクス候補菌の探索

第1節 鯨類糞便試料からの乳酸菌分離

第2節 抗菌活性および pH 耐性試験

総合考察

謝辞

引用文献

第 1 章

飼育がイルカの腸内細菌叢に与える影響の評価

動物園や水族館などの飼育施設は、動物の本来の生息地とは大きく異なる環境である。これまで霊長類 (Clayton *et al.* 2016) や鳥類 (Ushida *et al.* 2015), 爬虫類 (Sandri *et al.* 2020) など様々な生物種において、飼育下での食餌内容の違い、抗生物質やビタミン剤の使用、飼育員との接触が腸内細菌叢に変化を与えることが報告されている。海生哺乳類に関しては、海牛類であるジュゴン *Dugong dugon* (Eigeland *et al.* 2012) や鰭脚類 (Delpont *et al.* 2016) において、抗生物質の投与により糞便内細菌種数が低下し、多様性の乏しい餌内容が細菌叢の多様性の低下を引き起こすと報告されている。したがって、鯨類においても飼育下に置かれることで細菌種数や多様性の減少などにより細菌叢が攪乱され、腸内環境の健康が脅かされることが懸念される。しかし、これまで鯨類において、飼育が細菌叢に与える影響は調べられてこなかった。その理由としては、比較対象とすべき野生下鯨類の糞便採取は困難であり、漂着個体の糞便が使用されることが必然的に多くなるが、このような試料は鮮度が定かでなく、健常時の細菌叢を反映しているかの判断が困難であることが考えられる。

東京都御蔵島ではこれまで 20 年以上に渡りミナミバンドウイルカ (*Tursiops aduncus*) の個体識別調査が行われており (Tsuji *et al.* 2017), 年齢や性別などの生体情報が特定できる野生個体から非侵襲的に糞便試料を

採取することが可能である。ミナミバンドウイルカを飼育している施設もあることから、野生および飼育下イルカ腸内細菌叢を比較することができる。また、同種はバンドウイルカと最も近縁な種であり (Wang *et al.* 1999; Wang *et al.* 2000), バンドウイルカを対象とした本研究の代替モデルとして適している。

そこで本章では、野生および飼育下ミナミバンドウイルカを対象として腸内細菌叢を比較することにより、飼育がイルカの腸内細菌叢に与える影響を明らかにした。また、水中で採取された糞便が野生個体の腸内細菌叢解析に有用であるかを検証するため、糞便試料への海水中細菌の混在の程度を評価した。

材料および方法

検体採取

野生個体の糞便は、2017年6月から10月の間に御蔵島周辺での個体識別調査中に採取した(表 2.1)。具体的には、まず、イルカの群れを発見した後、ボートで群れに近づいて潜水した。個体からの排泄を確認したら、糞便が海中で離散する前に素早く50 ml コニカルチューブもしくはプラスチックチューブで採取し、直ちに糞便の固形部分が残るように海水を取り除いた。船上で冷蔵保存し、上陸した後に冷凍庫で凍結して大学に送付し、実験に供するまで -30°C で保存した。また、採取後に糞便がチューブ内で崩

れ、固形部分が得られないような検体に関しては（図 2.1）、0.22 μm メンブレンフィルター（Merck Millipore, MA, USA）で濾過し、菌体を回収したものを実験に供した。

御蔵島周辺の海水を 2 地点（33°53'42.2''N, 139°35'17.0''E；33°53'52.0''N, 139°35'26.0''E）で採取した。海水 500 ml を滅菌済みプラスチックボトルで採取し、全量を 0.22 μm 孔径フィルターユニット（Sterivex filter unit; Merck Millipore）で濾過して菌体を回収した。フィルターユニットに 2 ml の RNAlater（Sigma-Aldrich, MO, USA）を加え、実験に供するまで 4°C で保存した。

飼育下個体の糞便は、2017 年 6 月 10 日と 11 日に海洋博公園（沖縄県国頭郡）において、健康かつ糞便採取から 2 週間以内に抗生物質が投与されていない 4 個体から糞便を採取した（表 2.1）。飼育員の合図により、イルカを仰向けにさせて尾鰭を保定してプール水面で肛門が見える状態にし、シリンジ付きカテーテルを肛門入り口から約 30cm 挿入して糞便を吸い上げた。直ちにコニカルチューブに糞便を移して凍結し、実験に供するまで -30°C で保存した。この作業は日常的なイルカ健康管理である体温測定の作業に続けて行われた。同施設のプール水はポリエステル繊維と珪砂で濾過されている。また、イルカにはサバ（*Scomber japonicus*）、トビウオ（*Cypselurus agoo*）、シシャモ（*Spirinchus lanceolatus*）が給餌されていた。

DNA 抽出

糞便試料に含まれる細菌の DNA はビーズ破碎・フェノールクロロホルム法により抽出した。まず、PCR 反応阻害物質を取り除くため、100 μ l の糞便試料に 900 μ l のリン酸緩衝食塩水を加えてボルテックスで良く混和した後、10,000 \times g で 1 分間遠心操作し、上清を取り除いてペレットを得た。この操作を 2 回繰り返した。得られたペレットに 700 μ l の抽出液 [buffer RLT (Qiagen, Hilden, Germany) : 99% 2-mercaptoethanol (FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation, Osaka, Japan) = 100 : 1] と薬さじ一杯程の 0.5 mm Φ ガラスビーズ (TOMY SEIKO, Tokyo, Japan) を加え、Micro Smash MS-100R (TOMY SEIKO) を用いて 4,600 rpm, 1 分間の条件で菌体を破碎した。破碎した菌体に 700 μ l のフェノール:クロロホルム:イソアミルアルコール (PCI, 25:24:1) (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan) を加え、数回転倒混和し、16,000 \times g で 3 分間遠心操作した。新しい 1.5 ml チューブに 500 μ l の上清を移し、同量の PCI を加え、数回転倒混和し、再び 16,000 \times g で 3 分間遠心操作した。新しい 1.5 ml チューブに 300 μ l の上清を移し、30 μ l の酢酸ナトリウム、3 μ l のエタチンメイト (Nippon Gene, Tokyo, Japan), 750 μ l の 99% エタノールを加え、ボルテックスで良く混和した。凝集した DNA を確認した後、20,000 \times g で 3 分間遠心操作し、上清を取り除いた後、1 ml の 70% エタノールを加え、ボルテックスで良く混和し、再び 20,000 \times g で 3 分間遠心操作した。上清を丁寧に取り除き、DNA のペレットを風乾させた後、50 μ l の Buffer AE (Qiagen) で溶出した。

海水試料からの DNA 抽出は Miya *et al.* (2015) を参考に行なった。その後フィルターユニット内に 200 μ l の 0.1 \times TE [10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM EDTA] と 100 μ l の 10% TritonX-100 (MP Biomedicals, CA, USA) を加え、攪拌しながら 37 $^{\circ}$ C で 30 分間インキュベートした。その後、25 μ l の 20 mg/ml ProteinaseK (FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation) と 100 μ l の DNeasy Blood and Tissue kit (Qiagen) に付属の Buffer AL を加え、攪拌しながら 56 $^{\circ}$ C で 45 分間インキュベートした。次にフィルターユニットを 50 ml コニカルチューブに入れ、2,000 \times g で 30 秒間遠心操作をすることによりフィルターユニットからチューブ内に溶液を溶出させた。新しい 1.5 ml チューブに 400 μ l の溶出液を移し、200 μ l の 99%エタノールを加え、ボルテックスで良く混和した。混合液は DNeasy Blood and Tissue kit 付属の DNeasy Mini Spin Column で添付の説明書に従い精製し、DNA は 50 μ l の Buffer AE (Qiagen) で溶出した。

DNA の濃度は NanoDrop ND-2000 spectrophotometer (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) を用いて測定した。全ての試料の DNA 濃度を 10 ng/ μ l に調整し、次項の PCR 増幅に用いた。

PCR 増幅

既報のプライマー (Bakt_341F: 5'-CCTACGGGNGGCWGCAG-3', Bakt_805R: 5'-GACTACHVGGGTATCTAATCC-3'; (Herlemann *et al.* 2011)) と濃度調整をしたイルカ糞便／海水由来の菌体の DNA 溶液を用いて、細菌

の 16S rRNA 領域内の 2 つの可変領域 (V3-V4) を含む 460 bp を増幅した。

PCR 反応液組成は、0.5 μ l の各プライマー (10 pmol/ μ l)、2.5 μ l の 10 \times PCR buffer for Blend Taq (Toyobo, Osaka, Japan)、2.5 μ l の dNTPs、0.25 μ l の Blend Taq Plus (Toyobo)、1 μ l の DNA、17.75 μ l の超純水で全量 25 μ l とした。反応条件は、94 $^{\circ}$ C で 2 分間の熱変性の後、94 $^{\circ}$ C で 30 秒の熱変性、55 $^{\circ}$ C で 30 秒のアニーリング、72 $^{\circ}$ C で 30 秒の伸長反応を 30 回繰り返した。

PCR 増幅産物は 1.5%アガロースゲルを用いて 50V で 1 時間電気泳動し、LED 照射により増幅の有無を確認した。増幅産物は Wizard SV Gel and PCR clean up system (Promega, WI, USA) を用いて指定の説明書に従い精製した。

ライブラリ調整と次世代シーケンサーMiseq による配列取得

Illumina Miseq desktop sequencer (Illumina, CA, USA) を用いた配列取得のため、NEBNext Ultra II DNA Library Prep Kit for Illumina (New England Biolabs, MA, USA) と NEBNext Multiplex Oligos (New England Biolabs) を用いて、精製された PCR 増幅産物にアダプター配列および各試料の認識配列であるインデックス配列を付加した。ライブラリの品質は Agilent 2200 Tape Station と Agilent D1000 ScreenTape (Agilent Technologies, CA, USA) を用いて確認した。また、各ライブラリの濃度を Quantus Fluorometer (Promega) を用いて測定し、それぞれから 1.5 ng の DNA を取って混合し、ライブラリ混合液を作成した。Quantus Fluorometer (Promega) を用いて混合液の濃度を測定し、1ng/ μ l あたりの分子量を 2.5 nM として混合液の分子量を算出

した. Hybridization buffer (Illumina) を用いて混合液を 6 pmol/μl に希釈し, これに PhiX Control v3 (12.5 pmol/μl) を 10%の濃度になるように添加したものをシーケンサーにアプライした. 塩基配列は Miseq Reagent Nano kit v2 kit (Illumina) を用いて 250 bp のペアエンドリードシーケンスで取得した.

配列処理

Miseq から得られた .fastq 配列データは, RStudio ver. 1.4.1717 に導入した Divisive Amplicon Denoising Algorithm 2 (DADA2) を用いて処理し, amplicon sequence variant (ASV) を作成した (Callahan *et al.* 2016). まず, *plotQualityProfile* コマンドで配列のクオリティを確認した. 次に *filterAndTrim* コマンドで配列のフィルタリングとトリミングを行なった. すなわち, *truncLen=c* (240,240) でフォワードおよびリバースリードの, クオリティスコアが 30 未満の末端 10 bp を, *trimLeft=c* (17,21) で各プライマー配列をそれぞれ削除した. 配列中の許容可能な N 数は *maxN=0* により 0 個とした. その他の設定は標準値を採用した. 次に, *mergePairs* コマンドでフォワードおよびリバースリードをマージした. マージ後の配列の塩基数を *makeSequenceTable* コマンドで確認し, *seqtab* コマンドで 400 bp 未満の配列を除去した. 残された配列から *removeBimeraDenovo* コマンドでキメラ配列を除去し, 最終的な ASV を取得した. 得られた各 ASV は, *assignTaxonomy* コマンドにより SILVA ver.132 データベースに対して細菌門から細菌属までの同定に供した. その後, *vegan* ver. 2.5.7 (Oksanen *et al.*

2020) の *rrarefy* コマンドを用いて、最もリード数の少ない検体に合わせた abundance-base でのリードリサンプリングを行なった。リサンプリング後のカバレッジは iNEXT ver. 2.0.20 (Hsieh *et al.* 2016) により算出した。

データ解析

本項の解析は、特に明記しない限り全て RStudio ver. 1.4.1717 を用いて行なった。野生下および飼育下個体から検出された各細菌門の検出割合は、Mann–Whitney *U* 検定により平均値の差の有無を比較した。Web ツール (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>) を用いて、各群でそれぞれ特異的に検出された細菌属および共通して検出された細菌属を特定した。着目した ASV の配列を GenBank データベース (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) に対して Basic local alignment search tool (BLAST) にかけて、相同性検索を行なった。

β 多様性として、野生下と飼育下個体、および野生下個体と海水の ASV レベルでの細菌叢組成の類似度は、Bray–Curtis 非類似度指数 (Bray and Curtis 1957) による非計量多次元尺度法 (Nonmetric multidimensional scaling (nMDS), (Guttman 1968)) により算出し、ggplot2 ver. 3.3.5 (Wilkinson 2011) により視覚化した。また、各群間の比較は Bray–Curtis 非類似度指数 (Bray and Curtis 1957) を用いた順列多変量分散分析 (Permutational multivariate analysis of variance; (PERMANOVA), (Anderson 2014)) により行なった。PAST ver. 4.03 ソフトウェア (Hammer *et al.* 2001) の Similarity percentage

(SIMPER) 解析を用いて、群間での細菌叢組成の差異に最も寄与している細菌属を特定した。

細菌叢の多様性は、種の豊富さ (species richness) と均衡度 (evenness) の2つの要素から説明される。そこで α 多様性として細菌種数の豊富さを示す Chao1, 均衡度の指数である Evenness, 種の豊富さと均衡度の両方を考慮した Shannon と Simpson を vegan ver. 2.5.7 (Oksanen *et al.* 2020) および microbiome ver. 3.14 (Lahti and Shetty 2018) を用いてそれぞれ算出した。群間での比較は Mann–Whitney U 検定により行なった。

野生個体の糞便への海水中の細菌の混在の程度は、まず上述と同様に nMDS 解析と PERMANOVA 解析により両群の ASV レベルでの細菌叢組成の差異を検討することに加えて、野生個体で 0.1%以上検出された主要細菌属の海水中での検出割合をそれぞれ比較することで評価した。それぞれの検出割合を pheatmap ver. 1.0.12 (Kolde 2019) を用いてヒートマップで表した。

全ての検定処理において、 $p < 0.05$ を有意差ありとした。

結果

配列および ASV 取得結果

DADA2 を用いたフィルタリングとトリミングの結果、合計 467,454 の高クオリティリードが得られた。野生個体では $19,698 \pm 3,771$ (平均 \pm 標準偏

差) リード, 飼育下個体からは平均 $33,846 \pm 15,078$ リード, 海水 2 試料からは平均 $77,396$ リードをそれぞれ取得した. リード数の最も少ない $16,227$ リードに合わせリードリサンプリングを行なった後のカバレッジは $98.2-99.4\%$ であり, 以降の解析に用いるには十分なリード数であった. 得られた合計 ASV 数は合計 $1,078$ 個であり, 野生個体では平均 175 ± 10 (平均 \pm 標準偏差) 個, 飼育個体からは平均 114 ± 16 個, 海水試料からは平均 809 ± 14 個の ASV がそれぞれ得られた.

野生下および飼育下個体の細菌叢の比較

細菌叢組成の比較

野生個体からは合計 12 門が検出され, Proteobacteria (平均 \pm 標準偏差; $47.8 \pm 10.6\%$), Fusobacteria ($41.8 \pm 12.8\%$), Firmicutes ($5.9 \pm 5.8\%$), および Tenericutes ($4.2 \pm 2.3\%$) が優占門であった. 一方, 飼育下個体からは合計 11 門が検出され, Firmicutes ($60.2 \pm 23.6\%$) と Fusobacteria ($39.2 \pm 23.6\%$) の 2 門が優占しており, それぞれの最優占門の検出割合は群間で有意に異なっていた (表 2.2).

β 多様性からみた類似度の比較

nMDS 解析の結果, 両群の ASV レベルでの細菌叢組成は有意に異なっていた (PERMANOVA: $p = 0.005$, 図 2.3). また, SIMPER 解析の結果, 両群間の組成の差異に最も寄与していた細菌属は *Clostridium sensu stricto* 1 で

あり，飼育下個体からの検出割合は野生個体よりも約 50 倍高かった（表 2.3）．また，最も多く含まれていた ASV の配列は *Clostridium perfringens*（GenBank accession No. AB045290）と 99.2%の相同性であった．

野生個体と飼育下個体から合計 157 属の細菌が検出され，野生個体では 79 属が，飼育下個体では 42 属がそれぞれ特異的に検出された（図 2.2）．野生個体からは，乳酸菌の中でも *Lactobacillus* 属が特異的に検出され，その ASV は *L. salivarius* strain XA1R（GenBank accession No. JX125455）と最も高い相同性（96.2%）を示した．一方，イルカ病原性細菌の中でも，*Morganella*，*Mycobacterium* および *Mycoplasma* 属は飼育下個体からのみ検出され，それらの ASV は *Morganella morganii* strain 17YB9（MN807694），Uncultured *Mycobacterium* sp. clone PLYFP133（JN792398）および Uncultured bacterium clone GB22（GU070691）とそれぞれ 99.6，96.3 および 96.3%の相同性を有していた．

α 多様性指数の比較

各種多様性指数を算出し，群間で比較した結果，Chao 1, Simpson, Evenness 指数において有意差は見られなかったが（それぞれ $p = 0.089, 0.180$ および 0.165 ），Evenness 指数は野生個体と比べ飼育下個体で有意に低く，およそ半分の値であった（ $p = 0.021$ ）（図 2.4）．

野生下個体の糞便と海水の細菌叢の比較

nMDS 解析の結果，野生下ミナミバンドウイルカ糞便と御蔵島周辺の海水の ASV レベルでの細菌叢組成は明瞭に異なっていた (PERMANOVA: $p = 0.019$, 図 2.5). また，糞便に平均 0.1%以上存在していた主要細菌属は，海水において 0-0.015%しか検出されなかったことから，イルカ糞便への海水中の細菌の混在はほとんどないことが示された.

考察

野生下および飼育下ミナミバンドウイルカの腸内細菌叢を比較したところ，細菌門および ASV レベルの組成は大きく異なっており，門レベルでは各群での最優占門の検出割合に顕著な差が見られた. このような細菌叢組成の差異は様々な生物種で報告されている (Ferreira Junior *et al.* 2009; Eigeland *et al.* 2012; Clayton *et al.* 2016; Delport *et al.* 2016; Borbón-García *et al.* 2017; Suzuki *et al.* 2019). 飼育環境の中でも，抗生物質の使用は短期間から長期間にわたる細菌叢の攪乱を引き起こし (Clemente *et al.* 2012)，また野生下と比べ多様性の乏しい食餌内容は腸内細菌叢の多様性を減少させる (McKenzie *et al.* 2017) 飼育下個体には，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るが，このような処置が野生個体に施されることは座礁個体への対応以外にはない. また，御蔵島周辺のミナミバンドウイルカは少なくとも 11 種の魚類，7 種の頭足類，1 種の甲殻類を採餌している (Takahashi *et al.* 2020). 一方で，本研究で対象とした海洋博公園の

個体は 3 魚種のみ給餌されていた。従って、特にこれらの要因が飼育下イルカの腸内細菌叢の変化に影響していると考えられる。

イルカ病原性細菌である *Morganella*, *Mycobacterium* および *Mycoplasma* 属は飼育下個体からのみ検出され、*Clostridium perfringens* の ASV を最も多く含む *Clostridium sensu stricto* 1 は、飼育下個体で野生個体よりも約 50 倍多く検出された。*Morganella*, *Mycobacterium* および *Mycoplasma* 属のイルカへの病原性 (Di Francesco *et al.*; Clayton *et al.* 2012; Elfadl *et al.* 2017) や、*C. perfringens* はイルカに対する病原性を持つこと (Buck *et al.* 1987; Danil *et al.* 2014; Jaing *et al.* 2015) を考慮すると、病原性細菌による感染症のリスクが懸念される。また、飼育下個体の Evenness 指数は野生個体より有意に低い値であったことから、細菌叢のバランスが野生下に比べて偏っていることが判明した。腸内細菌叢のバランスの低下は炎症性腸疾患や潰瘍性大腸炎の発症 (Frank *et al.* 2007; Nemoto *et al.* 2012)、病原性細菌の侵入、定着、そして増殖を誘発する (Biedermann and Rogler 2015)。これらのことから、飼育下個体においては細菌叢のバランスを維持し、上記の病原性細菌に起因する疾病予防に努める必要があると考えた。

野生個体において、乳酸菌の中でも *Lactobacillus salivarius* と思われる ASV が特異的に検出された。同細菌種はバンドウイルカから分離され、病原性細菌への抗菌活性能を示し (Diaz *et al.* 2013)、イルカ腸内での病原体排除に貢献していると考えられる。飼育下に置かれることでこのような細菌種が欠如するとすれば、前述のように細菌叢のバランスが偏っている飼育

下個体の腸管内の健康をさらに脅かす危険性がある。そのため、広く鯨類から有用な乳酸菌を探索して株を単離し、飼育下個体の健康を維持ことが必要である。

野生個体の腸内細菌叢のデータを取得するために、海中に放出された糞便を用いるのが適切か否かを確かめるため、糞便と海水の細菌叢を比較した結果、ASVレベルでの細菌叢組成は明瞭に異なっており、さらに海水中見られた主要細菌属は糞便中ではほとんど検出されなかったことから、水中で採取された糞便には海水中細菌の混在は極めて少ないことが示された。本研究では、野生個体の糞便排出を確認した後、糞便が離散する前に直ちに採取して糞便固形部分を回収した。また、チューブ内で糞便が崩れた検体に関しては、フィルターメンブレンで濾過し、菌体を得た。この一連の作業を素早く行なったことで、海水中の細菌の混在を最小限に抑えることができたと考えた。試料の鮮度や個体の健康状態の不明な漂着個体の腸内細菌叢の知見（Erwin *et al.* 2017; Godoy-Vitorino *et al.* 2017; Mladineo *et al.* 2019; Tian *et al.* 2020; Wan *et al.* 2021）と比べ、正常な健康状態の野生個体の腸内細菌をより忠実に把握できたと思われる。また、御蔵島の調査では、イルカ個体に触れることなく極めて近くまで接近することができるため、上記の方法で検体を採取できる。このような非侵襲的な糞便試料の採取法が採用できる場面においては、本研究で用いた方法が野生下イルカ類の細菌叢研究において有効な手法であると考えられる。

本章より、飼育下での抗生物質の使用や、多様性の乏しい餌が与えられ

ることイルカの腸内細菌叢組成が大きく変化することが明らかとなった。すなわち、野生個体と比べ細菌叢のバランスが大きく低下し、病原性細菌が増加することに加えて、野生個体で見られる有用乳酸菌が検出されなかったことから、細菌叢のバランスを保つとともに病原体排除のための有用細菌を得ることが必要であることが示された。また、水中で採取された糞便には海水中細菌の混在は極めて少なかったことから、糞便試料の入手が困難な野生下イルカの細菌叢解析において、本研究で採用した糞便採取法が有効な手法であることも併せて示された。

表 1.1. 野生下および飼育下ミナミバンドウイルカの個体情報.

由来	個体ID	性別	推定年齢	飼育年数
野生下	Wdo11	雌	—	—
	Wdo12	不明	—	—
	Wdo13	雄	—	—
	Wdo14	雄	—	—
	Wdo15	不明	—	—
	Wdo16	不明	—	—
	Wdo17	不明	—	—
	Wdo18	不明	—	—
	Wdo19	不明	—	—
飼育下	Cdo11 ¹⁾	雄	50才	42年
	Cdo12 ¹⁾	雄	47才	42年
	Cdo13 ¹⁾	雌	42才	42年
	Cdo14 ²⁾	雌	18才	18年

¹⁾ 野外からの搬入個体.

²⁾ 飼育下繁殖個体.

表 1.2 野生下および飼育下ミナミバンドウイルカの糞便から検出された細菌門の検出割合 (%)。

細菌門	野生		飼育下		検定
	Mean	SE	Mean	SE	
Actinobacteria	0.02	0.01	0.02	0.02	-
Bacteroidetes	0.01	0.002	0.001	0.001	-
Cyanobacteria	0.002	0.001	0	0	-
Deinococcus-Thermus	0.003	0.004	0	0	-
Epsilonbacteraeota	0.3	0.26	0.002	0.001	-
Firmicutes	5.9	5.8	60.2	23.6	*
Fusobacteria	41.8	12.8	39.2	23.4	-
Kiritimatiellaeota	0.0	0	0.001	0.001	-
Patescibacteria	0.0	0	0.001	0.001	-
Planctomycetes	0.001	0.001	0.003	0.001	-
Proteobacteria	47.8	1.7	0.5	0.1	**
Spirochaetes	0.001	0.001	0.0	0	-
Tenericutes	4.2	2.34	0.002	0.001	-
Verrucomicrobia	0.0	0	0.001	0.001	-
Opisthokonta	0.001	0.001	0	0	-
Unclassified	0.07	0.02	0.05	0.03	-

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

表 1.3 Bray-Curtis 非類似度指数による SIMPER 解析の結果.

細菌属	平均非類似度 ¹⁾	寄与率	累積寄与率	検出割合 (%)	
				野生下	飼育下
<i>Clostridium sensu stricto 1</i>	25.8 ²⁾	28.9	28.9	3.14.E-05	51.70
<i>Cetobacterium</i>	21.4	24.0	52.8	38.70	24.10
<i>Actinobacillus</i>	14.5	16.2	69.0	29.30	0.26
<i>Paeniclostridium</i>	10.7	12.0	81.0	0.62	21.20
<i>Photobacterium</i>	7.07	7.90	88.9	14.20	2.18.E-04
<i>Candidatus Arthromitus</i>	2.91	3.26	92.1	5.83	0
<i>Ureaplasma</i>	2.41	2.70	94.8	4.83	4.02.E-06

1) 平均非類似度は 2.0%以上のもののみを示した.

2) 数値はパーセント (%) で示されている.



図 1.1. 固形分を含まない野生下ミナミバンドウイルカの糞便.

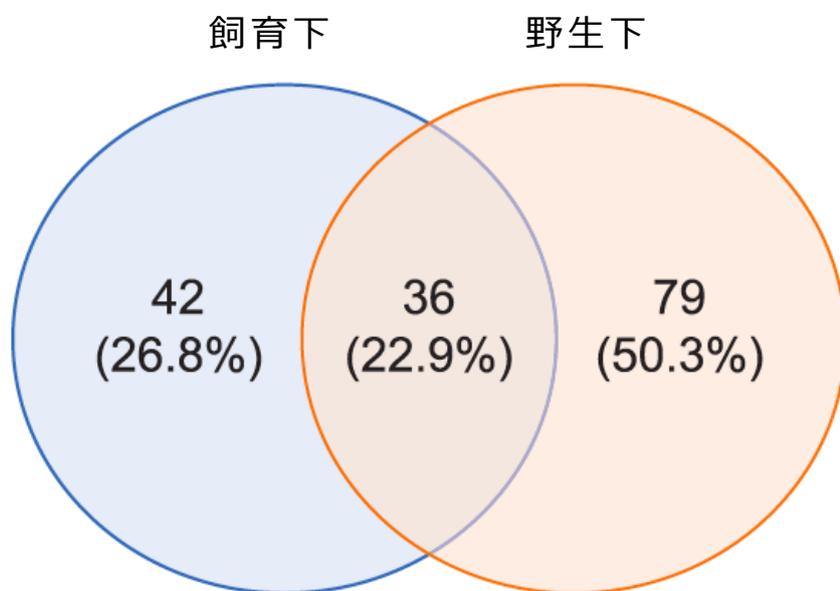


図 1.2 野生下および飼育下ミナミバンドウイルカの糞便から検出された細菌叢の関係。各群に共通して見られた，もしくは各群で特異的に検出された細菌属数および全体の細菌属数に占める割合（%）を示す。

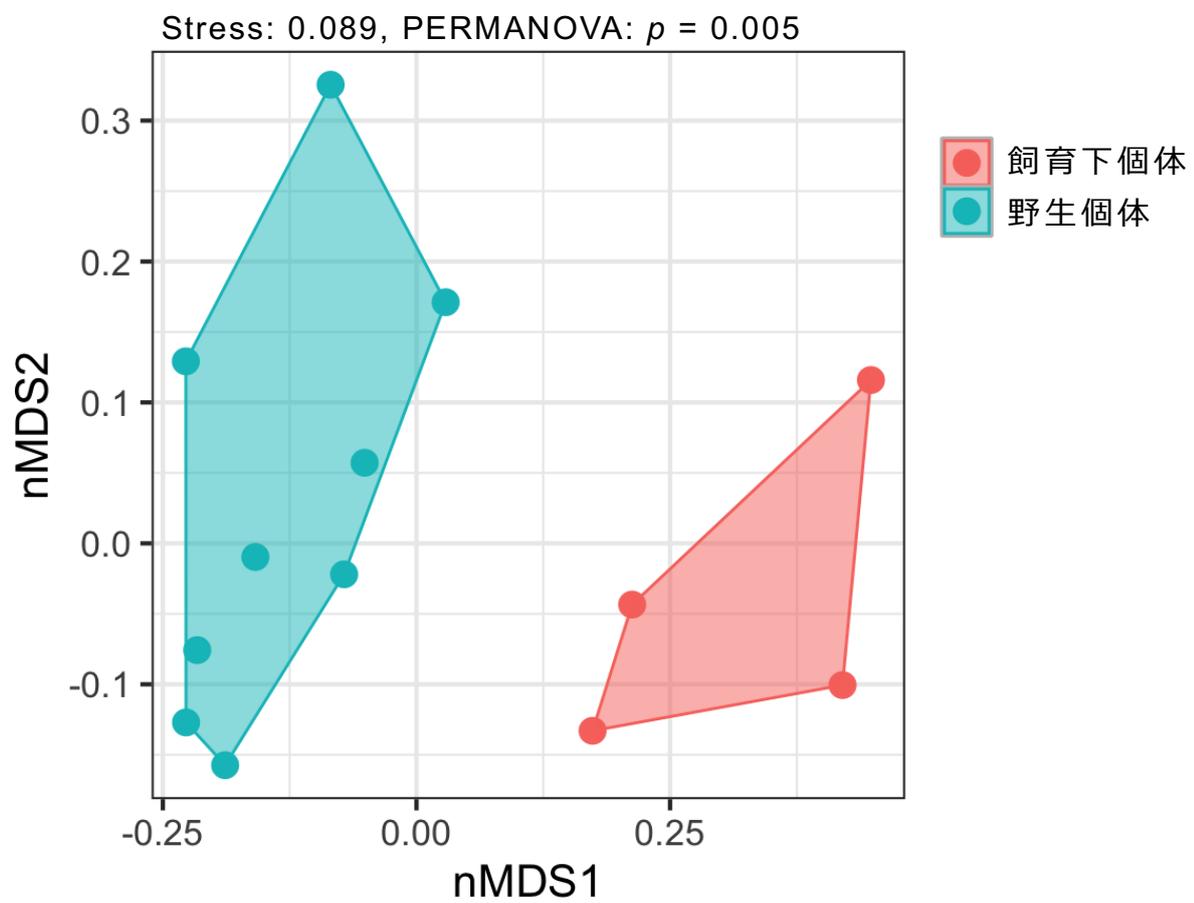


図 1.3 ASV レベルでの野生下および飼育下ミナミバンドウイルカの腸内細菌叢の nMDS 解析の結果.

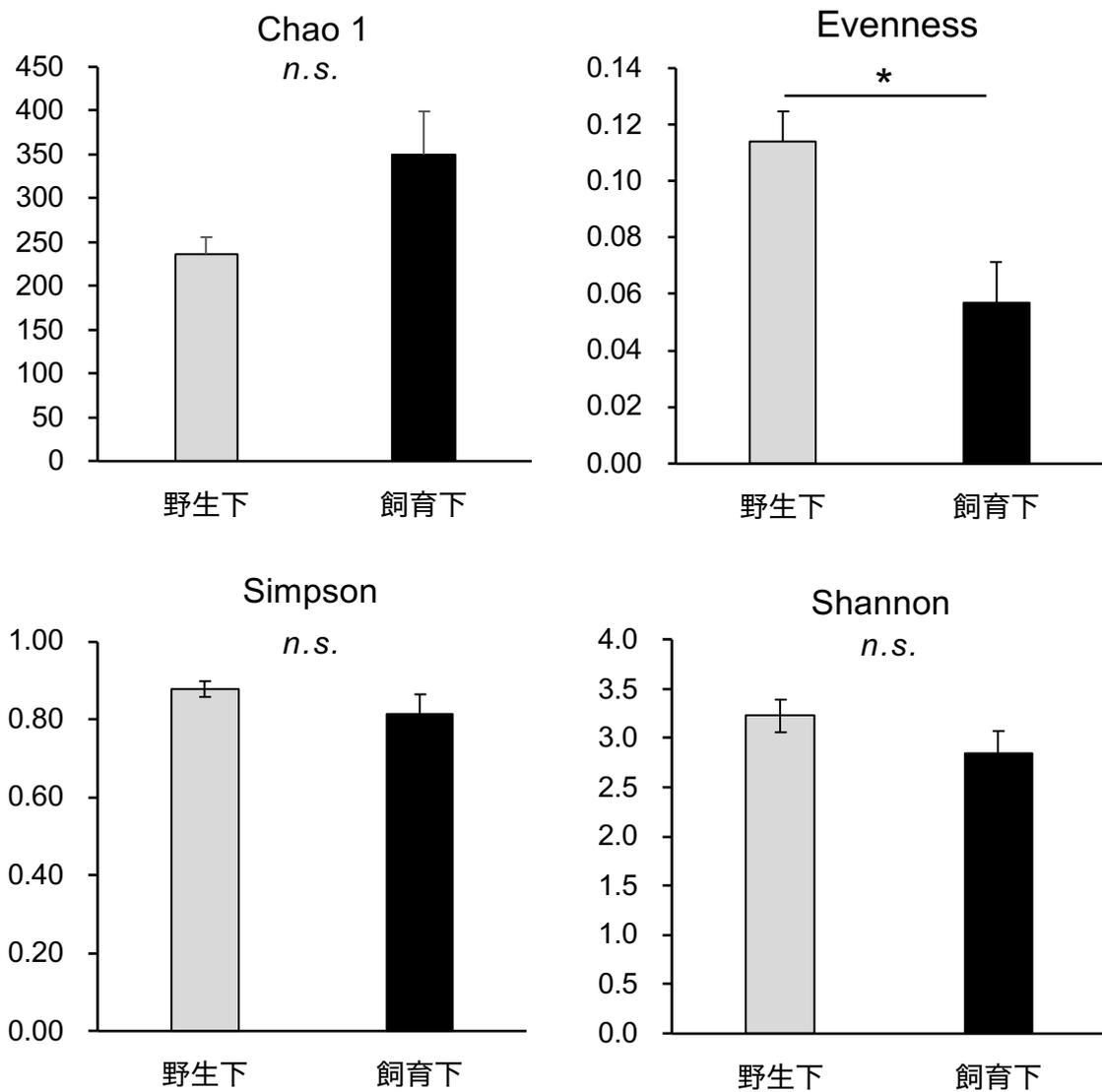


図 1.4 野生下および飼育下ミナミバンドウイルカの腸内細菌叢の多様性指数（平均±標準偏差）の比較。 *は有意差あり（ $p < 0.05$ ）を示す。

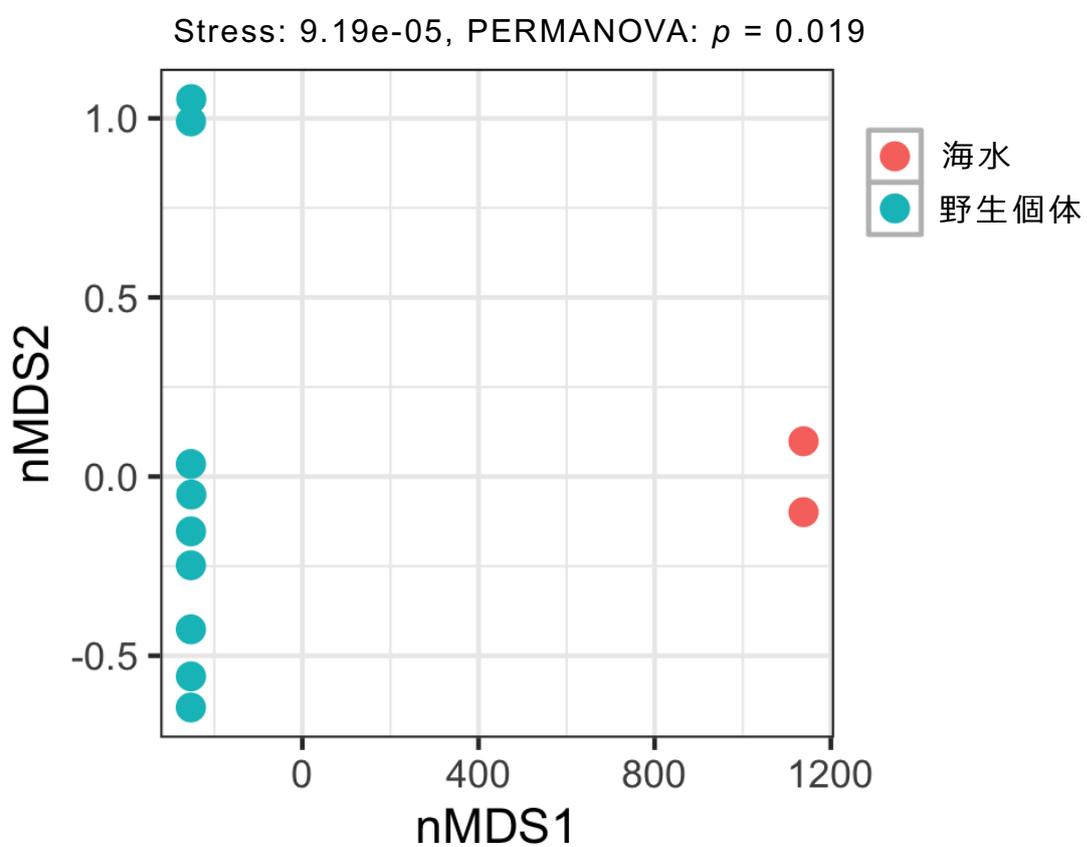


図 1.5 ASV レベルでの野生下ミナミバンドウイルカ糞便と御蔵島周辺で採取された海水の細菌叢の nMDS 解析の結果.

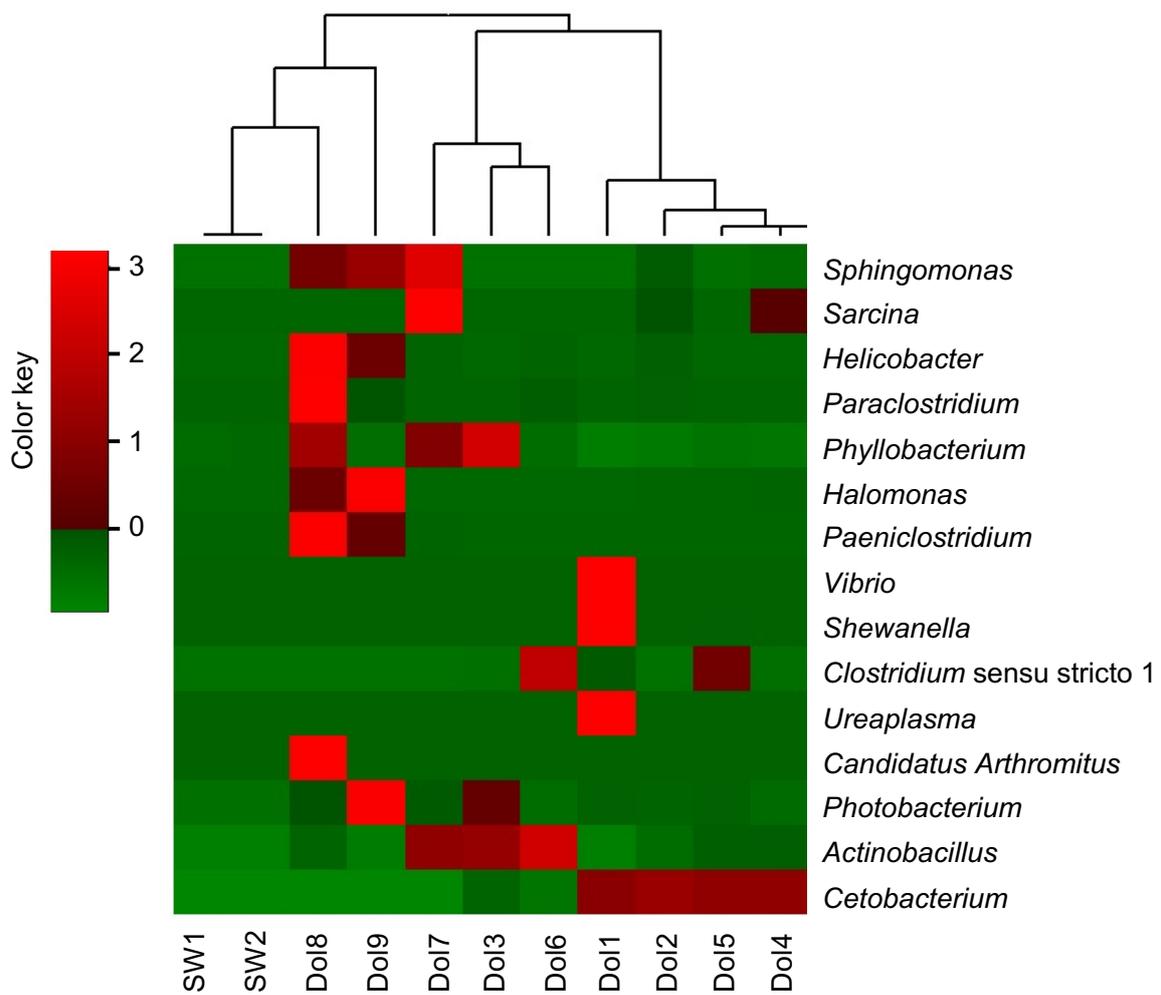


図 1.6 御蔵島周辺海水と野生下ミナミバンドウイルカ糞便に含まれる細菌属ヒートマップ。イルカ糞便細菌叢中に平均 0.1%以上存在していた細菌属について試料ごとに示した。SW：海水試料，Do1：イルカ糞便試料。

第 2 章

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

飼育動物の腸内細菌叢に影響を与える要因としては、宿主の年齢や性別、遺伝的要因などの宿主側の要因や、飼育形態や飼育年数、採餌内容、抗生物質投与歴などの外部環境要因が挙げられる。これまで飼育下動物において、細菌叢組成の明瞭な年齢差や性差が見られ (Nelson *et al.* 2013; Smith *et al.* 2013; Odamaki *et al.* 2016; Han *et al.* 2018; Tian *et al.* 2021), これは加齢や性比による生理学的な代謝の変化によるものであると示唆されている。また、採餌内容の変化や抗生物質投与は細菌種数や多様性の低下を誘発する要因である (Eigeland *et al.* 2012; Nelson *et al.* 2013; Bloodgood *et al.* 2020)。従って、腸内細菌叢に影響を与える飼育環境要因を明らかにすることは動物の腸内細菌叢管理において重要である。

第 1 章の結果より、飼育環境下に置かれることでイルカの細菌叢組成は変化し、均衡度は低下することが示された。しかし、これは単一の施設の結果に基づいており、施設毎の給餌生物種とその数や、飼育形態が多様なイルカ類においては複数施設間での差異を精査する必要がある。

そこで本章第 1 節では、国内複数飼育施設間でのバンドウイルカ腸内細菌叢の差異の有無を探るとともに、その差異に寄与する要因を調べた。その結果、餌生物種数と飼育形態が細菌叢の差異に寄与する要因であったた

め、次に餌生物および環境水とイルカ細菌叢の関連性を探った。

哺乳類において、腸内細菌叢は気温などの環境要因や内因的な変化（代謝の変化や冬眠）により季節変動するという報告がある（Maurice *et al.* 2015; Sommer *et al.* 2016; Khakisahneh *et al.* 2020）。イルカ類においては、唯一 Cardona *et al.*（2018）が 6 週間に渡り腸内細菌叢の変動を調査した報告があるが、これは季節変動の有無を説明できる程の期間であるとは言い難い。そこで第 2 節では、同一施設のバンドウイルカを対象に 1 年間、月 1 回間隔で同個体から糞便を採取し、多様性指数の季節変動の有無を探った。

第 1 節

複数飼育施設個体の細菌叢解析

バンドウイルカは国内で最も多く飼育されている鯨種であり（日本動物園水族館調べ）、個体の年齢や由来、給餌生物種とその数、飼育形態は飼育施設毎に多様であるため、イルカ腸内細菌叢に与える飼育環境の推定において最適なモデルである。本節では、国内 5 施設で飼育されているバンドウイルカの腸内細菌叢を比較し差異を探ると共に、その差異に寄与する環境要因を推定した。また、餌生物および環境水とイルカ細菌叢を比較し、細菌叢への影響度を比較した。

材料および方法

検体採取

表 3.1 に示すように、国内 5 飼育施設、すなわち神奈川県新江ノ島水族館（江ノ島、7 個体 7 検体）、大分県つくみイルカ島（つくみ、5 個体 5 検体）、千葉県鴨川シーワールド（鴨川、12 個体 12 検体）、沖縄県海洋博公園（海洋博、4 個体 4 検体）、および新潟県越前松島水族館（松島、4 個体 4 検体）で飼育されているバンドウイルカを対象とし、それぞれから糞便を採取した。糞便採取は、第 1 章の飼育下ミナミバンドウイルカ個体からの糞便採取と同様の方法で行なった。全ての糞便試料は実験に供するまで -30°C

で保存した。また、各個体の飼育形態、由来、性別、年齢、成熟度、飼育年数の詳細は表 3.1 に示す。

餌生物は、それぞれの施設で給餌されていた合計 12 種、すなわちマサバ *Scomber japonicus*, ニシン *Clupea pallasii*, シシヤモ *Spirinchus lanceolatus*, コマイ *Eleginus gracilis*, サンマ *Cololabis saira*, オオナゴ *Ammodytes personatus*, キュウリウオ *Osmerus mordax dentex*, マアジ *Trachurus japonicus*, マイワシ *Sardinops melanostictus*, ハタハタ *Arctoscopus japonicus*, トビウオ *Cypselurus agoo* 各 2 検体ずつ計 24 検体を対象とした。これらの生物種は各施設で糞便採取時に給餌されていたもので、その後約 1 年間を通して同様の生物種が与えられていた。全ての検体は各施設で -20°C で保存されており、冷凍で研究室に輸送された後、実験に供するまで -20°C で保存されていた。表 3.1 に示されているように、餌生物種とその数は各施設で大きく異なっていた。

対象個体が飼育されているプール（江ノ島，海洋博：各 3 箇所計 3 検体，松島：2 箇所計 2 検体）もしくは生け簀内（つくみ：3 箇所計 3 検体）の環境水を 500 ml 滅菌済みプラスチックボトルで採取し、全量を $0.22\mu\text{m}$ 孔径フィルターユニット（Sterivex filter unit; Merck Millipore）で濾過して菌体を回収した。フィルターユニットに 2 ml の RNAlater（Sigma-Aldrich, MO, USA）を加え、実験に供するまで 4°C で保存した。

DNA 抽出

第 1 章と同様の方法で糞便試料に含まれる PCR 反応阻害物質を取り除いた後、ISOSPIN Fecal DNA (Nippon Gene) を用いて添付の説明書に従い細菌の DNA を抽出し、50 μ l の TE buffer (10 mmol/l Tris-HCl, 1 mmol/l EDTA, pH 8.0) で溶出した。

餌生物種からの DNA 抽出は鰓と表皮、そして消化管内容物の 2 種類の試料から行なった。まず、氷上もしくは冷蔵庫内 (4°C) で検体を融解した後、無菌条件下で解剖し、後述する方法で各組織の試料を得た。まず、滅菌綿棒で魚体の体表を拭い、1 ml のリン酸緩衝食塩水内で攪拌し、これを表皮の試料とした。その後、10,000 \times g で 2 分間遠心操作後、上清を捨てペレットを得た。鰓は、15 ml 遠心管に分注した 4 ml のリン酸緩衝食塩水に入れた後、ボルテックスで良く混和し、組織中の細菌をリン酸緩衝食塩水中へ遊離させ、菌液とした。その後、組織が混入しないように体表試料から得られたペレットが入っているチューブに菌液を移し、10,000 \times g で 2 分間遠心操作後、上清を捨てペレットとし、これを鰓と表皮の試料とした。消化管内容物は、ピンセットを用いて無菌 2.0 ml チューブに移し、1 ml のリン酸緩衝食塩水を加えた後ボルテックスし、10,000 \times g で 2 分間遠心操作後、上清を捨てた。内容物が少ない検体に関しては、消化管組織をリン酸緩衝食塩水内で良くボルテックスした後組織を取り出し、同条件の遠心操作を行い、これを消化管内容物の試料とした。これらの試料から、ISOSPIN Fecal DNA (Nippon Gene) を用いて添付の説明書に従い細菌の DNA を抽出し、

50 μ l の TE buffer (10 mmol/l Tris-HCl, 1 mmol/l EDTA, pH 8.0) で溶出した。

環境水からの DNA 抽出は、第 1 章の海水試料からの DNA 抽出で記したと方法と同様に行なった。

全ての試料の DNA 濃度を 10 ng/ μ l に調整し、次項の PCR 増幅に用いた。

PCR 増幅

第 1 章と同様の方法で PCR 増幅および増幅産物の精製を行なった。

ライブラリ調整と次世代シーケンサー Miseq による配列取得

第 1 章と同様の方法により、Miseq Reagent Nano kit v2 kit (Illumina) を用いた 250 bp のペアエンドリードシーケンスにより塩基配列を取得した。

配列処理

第 1 章と同様の方法で ASV 作成およびリードリサンプリングを行なった。

データ解析

本項の解析は、特に明記しない限り全て RStudio ver. 1.4.1717 を用いて行なった。5 施設のイルカから検出された各細菌門の検出割合は、Kruskal-Wallis 多重検定により中央値の差を比較し、有意差が見られた場合は

Bonferroni 補正の Mann-Whitney U 検定で各群間での平均値の差を比較した。

細菌叢の多様性は, Chao1, Evenness, Shannon および Simpson 指数を `vegan ver. 2.5.7` および `microbiome ver. 3.14` を用いてそれぞれ算出した。群間での比較は上述と同様に Kruskal-Wallis 多重検定を実施後, 有意差が見られた場合は Bonferroni 補正の Mann-Whitney U 検定で各群間での平均値の差を比較した。算出された各種多様性指数は, 飼育年数によって影響を受けるか否かを調べるため, `glm` 関数による単回帰分析を行なった。

β 多様性として, 各飼育施設での ASV レベルでの細菌叢組成と多様性指数の類似度は, 第 1 章と同様に, Bray-Curtis 非類似度指数による nMDS により算出し, `ggplot2 ver. 3.3.5` により視覚化した。また, 個体の由来, 性別, 成熟度, 施設, および各施設での餌生物種数と飼育形態での比較は Bray-Curtis 非類似度指数を用いた PERMANOVA により行なった。

各施設における餌生物および環境水とイルカ細菌叢間の関連性は, Web ツール (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>) を用いて餌生物および環境水とイルカ細菌叢間で共通して検出された ASV 数を算出することにより評価した。

全ての統計処理において, $p < 0.05$ を有意差ありとした。

結果

配列および ASV 取得結果

DADA2 を用いたフィルタリングとトリミングの結果、合計 1,767,085 の高クオリティリードが得られた。イルカでは $22,361 \pm 1,848$ (平均 \pm 標準偏差) リード、餌生物の鰓と表皮、消化管内容物ではそれぞれ平均 $16,347 \pm 6,281$ リード、平均 $17,588 \pm 5,440$ リード、環境水試料では平均 $17,247 \pm 12,109$ リードをそれぞれ取得した。リード数の最も少ない 7,060 リードに合わせリードリサンプリングを行なった後のカバレッジは 97.1–99.8%であり、以降の解析に用いるには十分なリード数であると考えられた。得られた合計 ASV 数は合計 15,464 個であり、イルカでは平均 305 ± 53 (平均 \pm 標準偏差) 個、餌生物の鰓と表皮、消化管内容物ではそれぞれ平均 346 ± 131 個、平均 225 ± 68 個、環境水試料からは平均 904 ± 604 個の ASV がそれぞれ得られた。

国内 5 施設のイルカの細菌叢の比較

細菌叢組成の比較

国内 5 施設のイルカ個体から合計 20 門が検出され、全ての施設において Firmicutes (江ノ島：平均 \pm 標準偏差； $55.4\% \pm 16.1\%$ 、つくみ： $6.9\% \pm 2.6\%$ 、鴨川： $84.4\% \pm 10.7\%$ 、海洋博： $27.9\% \pm 20.0\%$ 、松島： $54.1\% \pm 19.3\%$)、Fusobacteriota (江ノ島： $8.5\% \pm 2.9\%$ 、つくみ： $13.0\% \pm 7.6\%$ 、鴨川： $0.9\% \pm 0.7\%$ 、海洋博： $46.9\% \pm 13.3\%$ 、松島： $1.8\% \pm 0.9\%$)、Proteobacteria (江ノ

島：31.0% ± 11.6%，つくみ：71.5% ± 7.1%，鴨川：12.3% ± 11.0%，海洋博：25.0% ± 9.7%，松島：35.2% ± 22.4%）が優占門であったが，その検出割合は施設毎に大きく異なる傾向が見られた（表 3.3）

β 多様性からみた類似度の比較

nMDS 解析の結果，5 施設の ASV レベルでの細菌叢組成は，施設，餌生物種および飼育形態により有意に異なっていた（PERMANOVA: $p < 0.05$ ，図 3.1）。一方，個体の由来，性別および成熟度によってはイルカ細菌叢組成に差異は生じないことが明らかとなった（PERMANOVA: $p > 0.05$ ，図 3.2）。次に，多様性指数の nMDS 解析の結果，細菌叢組成と同様に，施設，餌生物種および飼育形態により有意に異なっていたが，（PERMANOVA: $p < 0.05$ ，図 3.3），個体の由来，性別および成熟度によっては差が見られなかった（PERMANOVA: $p > 0.05$ ，図 3.4）。

α 多様性指数の比較

各種多様性指数を算出し，施設間で比較した結果，江ノ島，つくみおよび鴨川個体の Chao 1 は海洋博，松島よりも有意に高い値であった（ $p < 0.05$ ，図 3.5）。また，Evenness 指数は江ノ島，鴨川個体で他施設よりも有意に高い値であった（ $p < 0.05$ ，図 3.5）。一方で，Shannon および Simpson 指数には施設間で有意差は見られなかった（ $p > 0.05$ ，図 3.5）。

次に，Chao 1 および Evenness 指数に関して，nMDS 解析で有意差が見ら

れた餌生物種および飼育形態に関して比較した。その結果、餌生物種が多くなるにつれ Chao 1 指数は高くなり、さらに 8 種の餌生物種が与えられていた個体の Evenness 指数は、餌生物種が 1 種および 3 種の個体と比べ有意に高い値を示した ($p < 0.05$, 図 3.6)。飼育形態で比較したところ、生け簀飼育個体の Chao 1 指数はプール飼育個体に比べ有意に高かったが ($p < 0.05$, 図 3.6)、Evenness 指数に関しては有意差は見られなかったものの、生け簀飼育個体で低い値であった。各種多様性指数と飼育年数の単回帰分析の結果、いずれの指数も飼育年数とは関係がないことがわかった ($p > 0.05$, 図 3.7)。

餌生物および環境水とイルカ細菌叢の関連性

各施設における餌生物および環境水とイルカ細菌叢の関連性を共通して検出された ASV 数から評価した。その結果、プール飼育施設では環境水とイルカ間での共通 ASV 数が最も多く（江ノ島：67ASV、海洋博：57ASV、松島：81ASV）、これは生け簀飼育施設における環境水とイルカ間での共通 ASV 数よりも高い値であった（つくみ：30ASV）（表 3.4）。

考察

国内 5 施設のバンドウイルカの腸内細菌叢を比較した結果、組成と多様性は施設毎に特有であることが判明し、さらにこれらは給餌されている餌

生物種数と飼育形態により差が生じていることが明らかとなった。また、餌生物種数が多いほど、細菌叢の細菌種数は多くなり、均衡度は高くなることが明らかとなった。これまで、食餌由来の栄養成分組成の変化は腸内細菌叢に影響し (Scott *et al.* 2013; Flint *et al.* 2017)、多様性の乏しい食餌内容は腸内細菌叢の多様性を減少させるという報告がある (Delpont *et al.* 2016; McKenzie *et al.* 2017)。また、イルカの餌である魚類の栄養素のうち、アミノ酸、無機質およびドコサヘキサエン酸やエイコサペンタエン酸などの脂肪酸の含有量は魚種毎に異なる (Huynh and Kitts 2009; Tacon and Metian 2013)。従って、餌生物種の多い施設の個体では多様な栄養素が腸内に供給され、その結果、多様な細菌種が定着および増殖できると考えられる。このような結果は、細菌叢の多様性が低いイルカに対して、多種多様の餌生物を与えることが細菌叢を高く保つことに有効であることを示している。一方、本研究においては、これまで海生哺乳類の細菌叢に影響する要因であると報告されている性別、成熟度 (Nelson *et al.* 2013; Smith *et al.* 2013; Delpont *et al.* 2016) によっては組成および多様性には影響しなかった。上述の結果を踏まえると、同一施設内で飼育されることと、餌生物種数の違いによる腸内の栄養素の多様性が変化することは、性別や成熟度の影響よりも強くイルカ細菌叢に寄与する要因であると考えられた。

各施設における餌生物および環境水とイルカ細菌叢に共通して検出された ASV 数かはプール飼育施設では環境水とイルカ間での共通 ASV 数が最も多く、一方で生け簀飼育施設ではプール飼育施設で見られたほど環境水

とイルカ間の共通 ASV 数は多くなかった。Goldman *et al.* (2009) は吐き戻しや糞便により汚染された環境水を介してイルカ個体間で細菌伝播が生じることを示唆している。本研究で対象としたプール飼育施設においても、飼育環境水はそれぞれの個体のプールを循環しており、このような閉鎖的な環境下では個体の吐き戻しや糞便由来の細菌を獲得する機会は十分に考えられる。一方、生け簀飼育施設はプール飼育施設よりも開放的な環境であるため、個体由来の細菌の伝播は乏しくなると考えられた。本研究では、具体的にどのような経路で細菌伝播が生じているかは明らかにできなかったが、今後、イルカ腸内細菌の環境水での生存性の検証や、イルカと環境水で共通して見られた細菌を分離し、遺伝子型を比較することが必要である。

第 2 節

季節変動

陸上哺乳類において、季節変化に伴い、高温から低音環境へ断続的に晒されることで腸内細菌叢の多様性が減少し、これは周囲の気温の変化に伴う代謝の変化に起因すると報告されている (Khakisahneh *et al.* 2020).

イルカ類においては、唯一 Cardona *et al.* (2018) が 6 週間に渡りカマイルカの腸内細菌叢の変動を調査した報告があるが、これは季節変動の有無を説明できる程の期間の調査であるとは言い難く、さらにこれまでバンドウイルカ腸内細菌叢の季節変動は一切調査されていない。そこで本節では、同一施設のバンドウイルカを対象に 1 年間、月 1 回間隔で同個体から糞便を採取し、多様性指数の季節変動の有無を探ると共に、環境水温および外気温との関連性も併せて精査した。

材料および方法

検体採取

2020 年 10 月から 2021 年 9 月までの 1 年間、月 1 回間隔で、新江ノ島水族館で飼育されているバンドウイルカ 5 個体から、午前 9 時から 10 時までの間に、第 1 節と同様にして糞便を採取した。また、各糞便採取月の環境水および外気温は表 3.5 に示す通りである。糞便試料は採取後直ちにドラ

アイス内で凍結保存し，実験に供するまで -80°C で保存されていた．

DNA 抽出

第 1 節と同様の方法で糞便試料に含まれる PCR 反応阻害物質を取り除いた後，ISOSPIN Fecal DNA (Nippon Gene) を用いて添付の説明書に従い細菌の DNA を抽出し， $50\ \mu\text{l}$ の TE buffer ($10\ \text{mmol/l}$ Tris-HCl, $1\ \text{mmol/l}$ EDTA, pH 8.0) で溶出した．

全ての試料の DNA 濃度を $10\ \text{ng}/\mu\text{l}$ に調整し，次項の PCR 増幅に用いた．

PCR 増幅

第 1 章と同様の方法で PCR 増幅および増幅産物の精製を行なった．

ライブラリ調整と次世代シーケンサーMiseqによる配列取得

第 1 章と同様の方法により，Miseq Reagent Nano kit v2 kit (Illumina) を用いた $250\ \text{bp}$ のペアエンドリードシーケンスにより塩基配列を取得した．

配列処理

第 1 章と同様の方法で ASV 作成およびリードリサンプリングを行なった．

データ解析

本項の解析は、特に明記しない限り全て RStudio ver. 1.4.1717 を用いて行なった。

細菌叢の多様性は、Chao1, Evenness, Shannon および Simpson 指数を `vegan` ver. 2.5.7 および `microbiome` ver. 3.14 を用いてそれぞれ算出した。季節間での比較は Kruskal-Wallis 多重検定を実施後、有意差が見られた場合は Bonferroni 補正の Mann-Whitney U 検定で各群間での平均値の差を比較した。

算出された各種多様性指数が環境水温および外気温によって影響を受けるか否かを、`glm` 関数による単回帰分析により調べた。

結果

配列および ASV 取得結果

DADA2 を用いたフィルタリングとトリミングの結果、合計 566,726 (5903±2103 [平均±標準偏差]) の高クオリティリードが得られた。リード数の最も少ない 3,389 リードに合わせリードリサンプリングを行なった後のカバレッジは 98.6–99.6%であり、合計 421 個 (平均 82 ± 19 個) の ASV が得られた。

α 多様性指数の季節間比較

各種多様性指数を算出し、季節間で比較した結果、いずれの指数の値も季節間では有意な差はなかった ($p > 0.05$, 図 3.8). 単回帰分析を行い、各種多様性指数が環境水温および外気温によって影響を受けるか否かを調べたが、いずれの多様性指数においても環境水温および外気温との有意な関連性は見られなかった.

考察

同一施設のバンドウイルカを対象に腸内細菌叢の多様性の季節変化の有無を探ったが、季節間では有意差はなく、年間を通して安定していた. 一般に、非冬眠性の小型哺乳類では、低温環境下に置かれると食物摂取、代謝率を増加させ、代謝および熱恒常性を維持するために甲状腺ホルモンやノルアドレナリンによる熱発生を誘導するが (Zhang and Wang 2006), このような体内環境の変化は腸内細菌の多様性を増加させる (Bo *et al.* 2019). 一方、イルカを含む大型哺乳類では、低温環境下に暴露されると甲状腺ホルモンを介した代謝が抑制され、体脂肪を溜める (Suzuki *et al.* 2018) が、ヒグマ *Ursus arctos* においてはこのような代謝の変化と細菌叢の多様性の低下との関連性を示唆している (Sommer *et al.* 2016). そのため、多様性指数と環境水温および外気温との関連性を探ったが、どちらの要因においても多様性指数との有意な関係性は見られなかった. このような長期間の多

様性の安定性は、腸内よりも周辺環境の影響を受けやすいバンドウイルカ噴気孔の調査でも報告されている (Vendl *et al.* 2021). 従って、イルカ腸内細菌叢の多様性は周辺環境の温度変化や、それに伴う体内環境の変化に対して堅牢であると予想される. 他生物種と比べイルカ腸内細菌叢の多様性が安定していた理由は不明であるが、本研究の結果より、イルカ腸内細菌叢の多様性の指標となる情報を明らかにできた. 今後、他施設の個体でも同様の実験を行い、より詳細なデータを蓄積し、個体の体調不良時や、抗生物質投与時の多様性と比較することで、それらの多様性への影響を評価できるものと期待される.

表 2.1 本研究で対象とした国内 5 施設のバンドウイルカの飼育形態，由来，性別，年齢，成熟度，飼育年数の詳細．

飼育施設	個体ID	飼育形態	由来	性別	年齢 ¹⁾	成熟度	飼育年数 (年)
江ノ島	EA1	プール	飼育下	雌	15	成熟	15
	EA2	プール	野生	雌	33	成熟	29
	EA3	プール	飼育下	雄	29	成熟	29
	EA4	プール	飼育下	雌	8	未成熟	9
	EA5	プール	野生	雌	22	成熟	22
	EA6	プール	飼育下	雌	5	未成熟	5
	EA7	プール	野生	雌	20	成熟	20
つくみ	TDI1	生け簀	飼育下	雌	10	亜成熟	8
	TDI2	生け簀	飼育下	雌	10	亜成熟	8
	TDI3	生け簀	飼育下	雄	12	亜成熟	4
	TDI4	生け簀	野生	雄	12	亜成熟	4
	TDI5	生け簀	野生	雌	13	成熟	7
鴨川	KS01	プール	野生	雌	28	成熟	7
	KS02	プール	野生	雌	28	成熟	8
	KS03	プール	野生	雌	27	成熟	8
	KS04	プール	野生	雌	28	成熟	3
	KS05	プール	飼育下	雌	12	成熟	18
	KS06	プール	飼育下	雌	25	成熟	8
	KS08	プール	野生	雄	8	未成熟	32
	KS09	プール	野生	雌	8	未成熟	13
	KS10	プール	飼育下	雄	4	未成熟	25
	KS11	プール	飼育下	雄	29	成熟	28
	KS12	プール	飼育下	雄	37	成熟	28
	海洋博	OEP1	プール	野生	雄	11	亜成熟
OEP2		プール	野生	雌	23	成熟	8
OEP3		プール	野生	雌	17	成熟	3
OEP4		プール	野生	雄	18	成熟	18
松島	EM01	プール	野生	雌	8	未成熟	7
	EM02	プール	野生	雄	37	成熟	7
	EM03	プール	野生	雌	16	成熟	2
	EM04	プール	野生	雄	24	成熟	8

¹⁾ 野生由来個体においては推定年齢．

表 2.2 国内 5 施設においてバンドウイルカに給餌されている餌生物種とその数.

餌生物種	江ノ島	つくみ	鴨川	海洋博	松島
マサバ (<i>Scomber japonicus</i>)	○	○	○	○	○
ニシン (<i>Clupea pallasii</i>)	○	○	○	-	-
シシヤモ (<i>Spirinchus lanceolatus</i>)	○	-	○	○	-
コマイ (<i>Eleginus gracilis</i>)	○	○	-	-	-
サンマ (<i>Cololabis saira</i>)	○	○	-	-	-
オオナゴ (<i>Ammodytes personatus</i>)	○	-	○	-	-
キュウリウオ (<i>Osmerus mordax dentex</i>)	○	-	○	-	-
ホッケ (<i>Pleurogrammus azonus</i>)	-	○	○	-	-
マアジ (<i>Trachurus japonicus</i>)	-	○	○	-	-
マイワシ (<i>Sardinops melanostictus</i>)	○	-	-	-	-
ハタハタ (<i>Arctoscopus japonicus</i>)	-	○	-	-	-
トビウオ (<i>Cypselurus agoo</i>)	-	-	-	○	-
計	8	7	7	3	1

○：給餌，-：非給餌

表 2.3 国内 5 施設で飼育されているバンドウイルカの糞便から検出された細菌門の検出割合 (%) .

細菌門	江ノ島	つくみ	鴨川	海洋博	松島
Firmicutes	55.4±16.1 ^{ac}	6.9±2.6 ^b	84.4±10.7 ^a	27.9±20.0 ^{bc}	54.1±19.3 ^{ac}
Fusobacteriota	8.5±2.9 ^{ac}	13.0±7.6 ^a	0.9±0.7 ^b	46.9±13.3 ^a	1.8±0.9 ^{bc}
Proteobacteria	31.0±11.6 ^{abc}	71.5±7.1 ^b	12.3±11.0 ^{ac}	25.0±9.7 ^{ac}	35.2±22.4 ^{abc}
Other	5.2±2.1 ^{ab}	8.6±6.3 ^b	2.4±0.8 ^{ac}	0.32±0.3 ^{ac}	8.9±5.8 ^b

表中の異なるアルファベットは施設間での有意差 ($p < 0.05$) を示す. 検出割合が 1%以下の細菌門は“Other”に含めた.

表 2.4 国内 4 施設において餌生物および環境水とイルカ細菌叢間で共通に検出された ASV 数.

	プール飼育			生け簀飼育
	江ノ島	海洋博	松島	つくみ
餌生物（表皮/鰓）	17	10	20	14
餌生物（消化管内容物）	52	37	36	43
環境水	67	57	81	30

表 2.5 各糞便採取月の季節，環境水温および外気温の詳細.

採取月	季節	環境水温(°C)	外気温(°C)
10	秋	23.2	15.6
11		19.1	10.5
12	冬	19.3	5.5
1		19.3	6.4
2		19.4	7
3	春	19.4	13.8
4		21.2	14.1
5		24.2	21.4
6	夏	26.1	22.8
7		27.1	26.9
8		27	31.7
9	秋	26.8	20.4

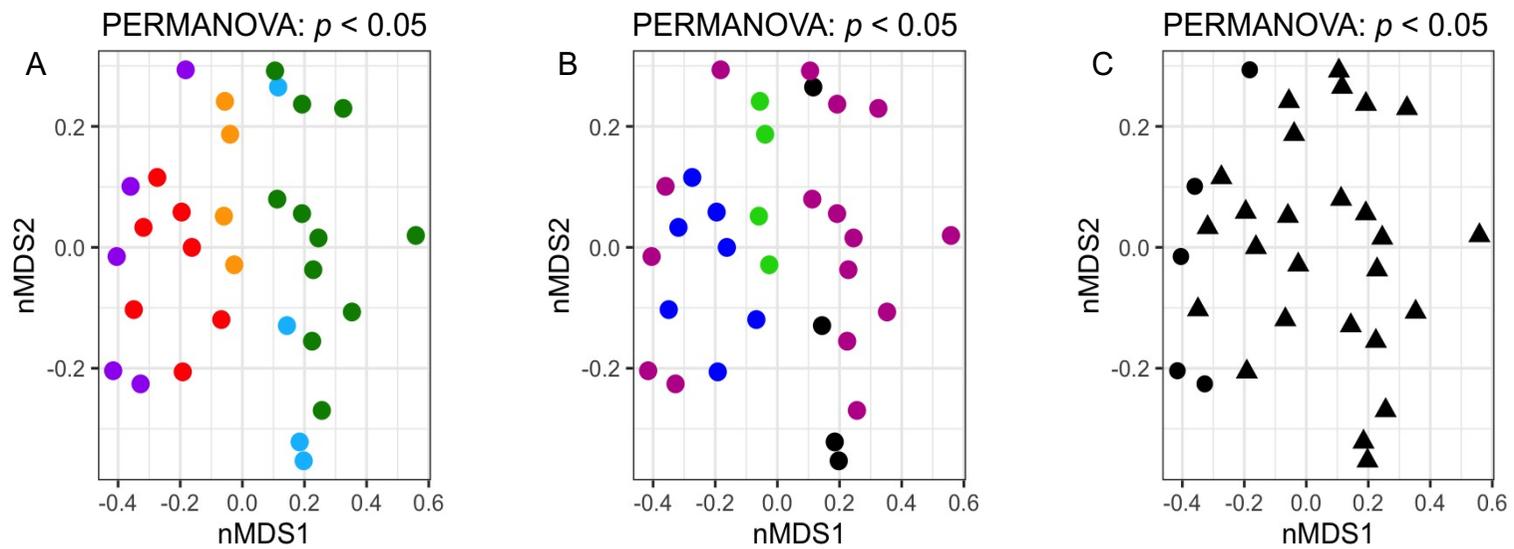


図 2.1 ASV レベルの国内 5 施設のバンドウイルカの腸内細菌叢組成の nMDS 解析の結果. A は施設 (赤 : 江ノ島, 紫 : つくみ, 緑 : 鴨川, 橙 : 海洋博, 青 : 松島), B は餌種数 (黒 : 1 種, 緑 : 3 種, 紫 : 7 種, 青 : 8 種), C は飼育形態 (黒丸 : 生け簀, 黒三角形 : プール) による比較をそれぞれ示す.

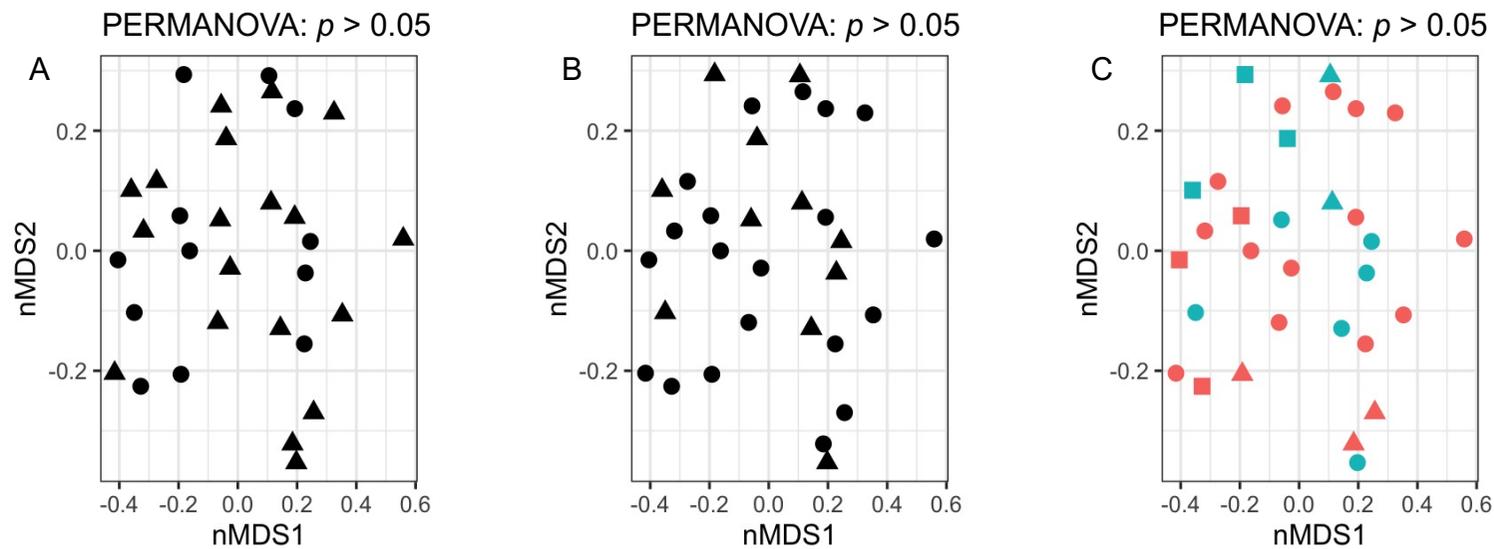


図 2.2 ASV レベルの国内 5 施設のバンドウイルカの腸内細菌叢組成の nMDS 解析の結果. A は個体由来 (黒丸 : 飼育下繁殖, 黒三角形 : 野生搬入), B は性別 (黒丸 : 雌, 黒三角形 : 雄), C は成熟度 (赤 : 雌 [四角 : 未成熟 ; < 9 歳, 三角 : 亜成熟 ; 9-10 歳, 丸 : 成熟 ; > 11 歳], 青 : 雄 [四角 : 未成熟 ; < 10 歳, 三角 : 亜成熟 ; 10-13 歳, 丸 : 成熟 ; > 13 歳], (Cockcroft and Ross 1990)) による比較をそれぞれ示す.

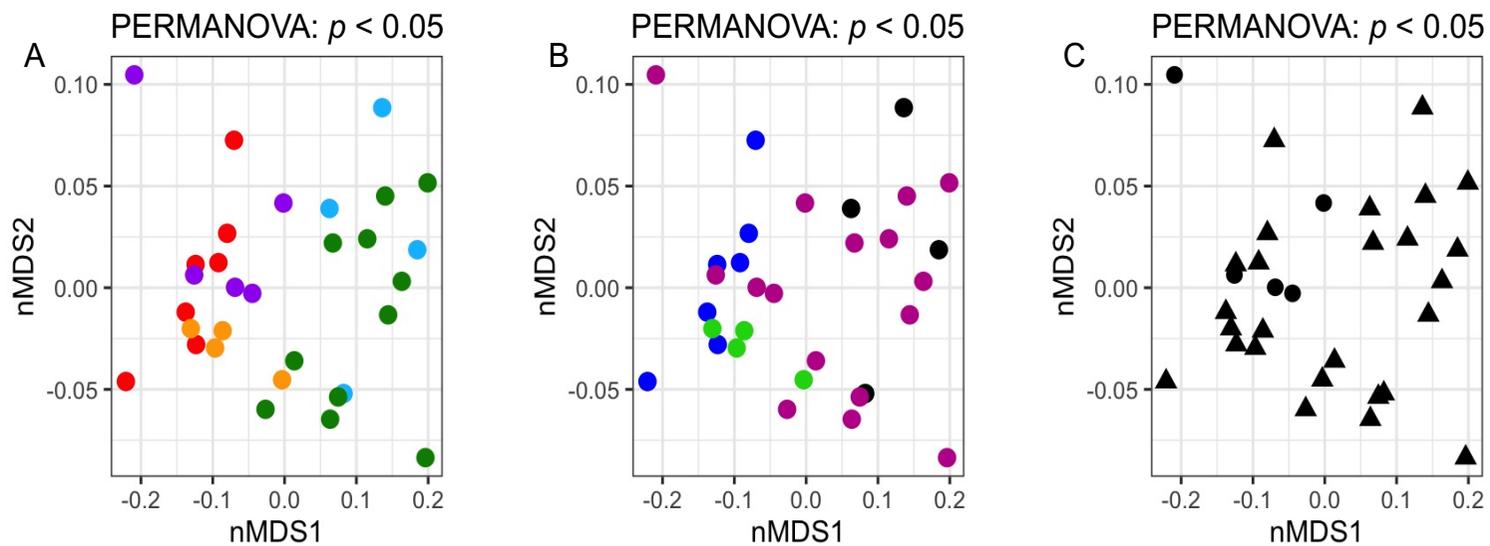


図 2.3 ASV レベルの国内 5 施設のバンドウイルカの多様性の nMDS 解析の結果. A は施設 (赤 : 江ノ島, 紫 : つくみ, 緑 : 鴨川, 橙 : 海洋博, 青 : 松島), B は餌種数 (黒 : 1 種, 緑 : 3 種, 紫 : 7 種, 青 : 8 種), C は飼育形態 (黒丸 : 生け簀, 黒三角形 : プール) による比較をそれぞれ示す.

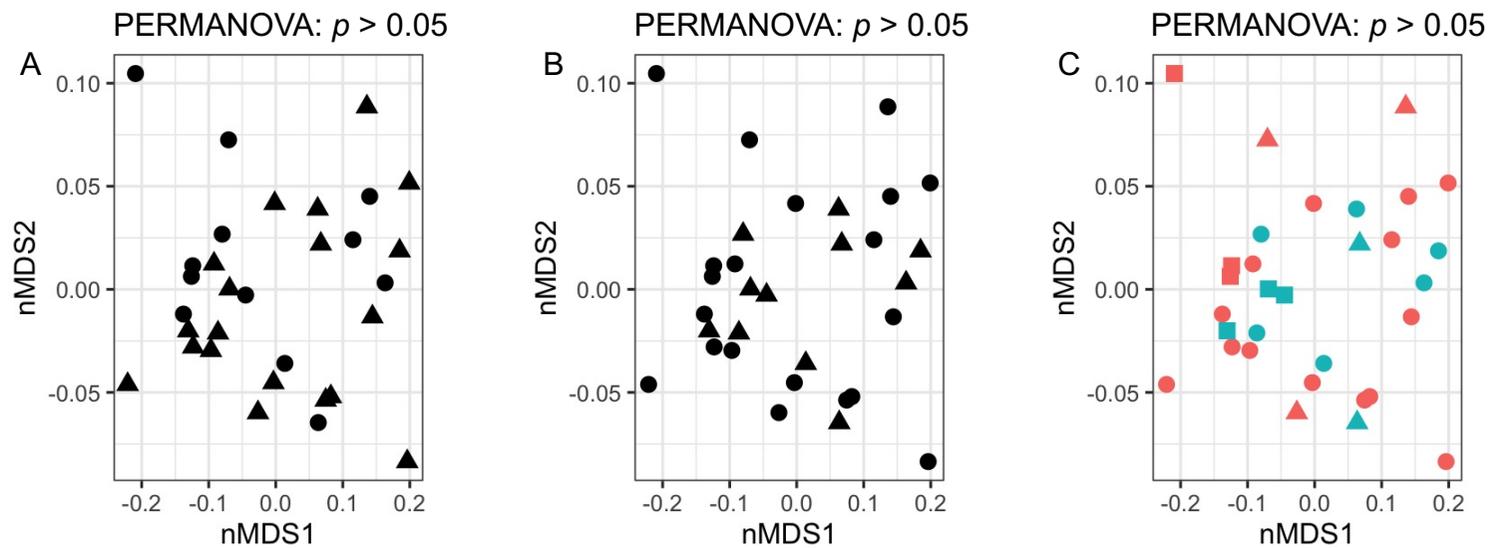


図 2.4 ASV レベルの国内 5 施設のバンドウイルカの多様性の nMDS 解析の結果. A は個体由来 (黒丸 : 飼育下繁殖, 黒三角形 : 野生搬入), B は性別 (黒丸 : 雌, 黒三角形 : 雄), C は成熟度 (赤 : 雌 [四角 : 未成熟 ; < 9 歳, 三角 : 亜成熟 ; 9-10 歳, 丸 : 成熟 ; > 11 歳], 青 : 雄 [四角 : 未成熟 ; < 10 歳, 三角 : 亜成熟 ; 10-13 歳, 丸 : 成熟 ; > 13 歳], (Cockcroft and Ross 1990)) による比較をそれぞれ示す.

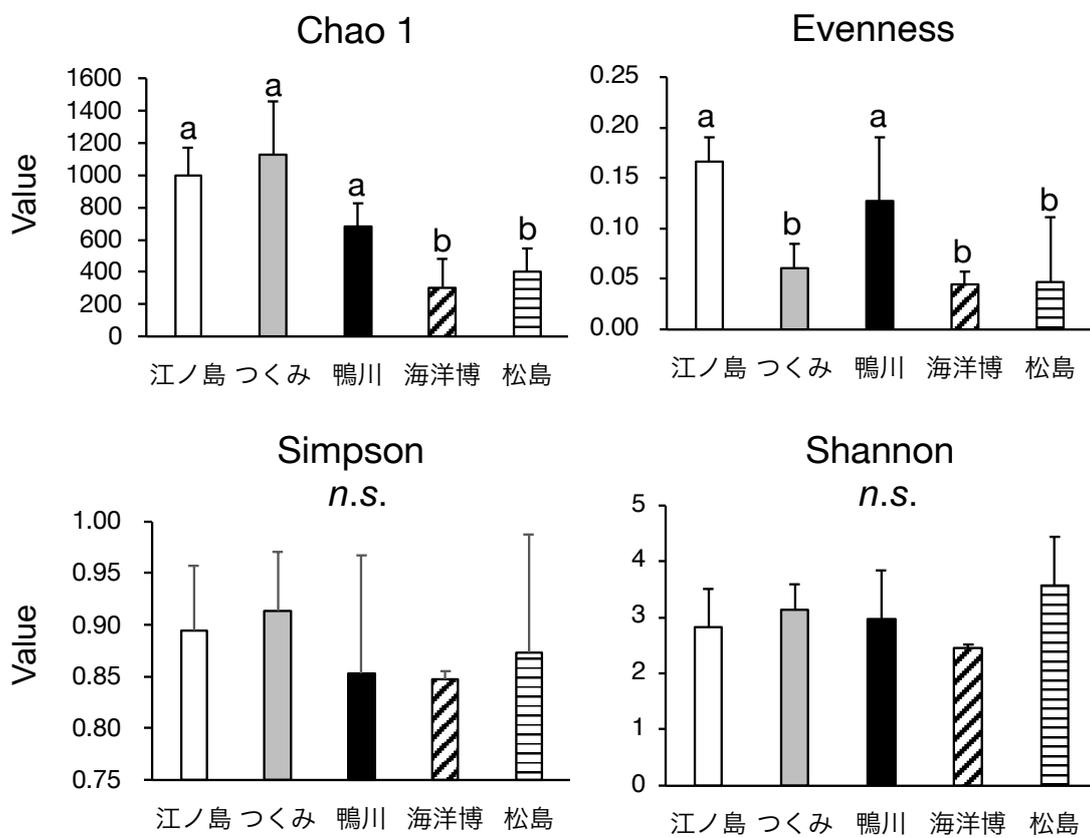


図 2.5 国内 5 施設のバンドウイルカの腸内細菌叢の多様性指数 (平均±標準偏差) の比較. 図中の異なるアルファベットと *n.s.* はそれぞれ有意差あり ($p < 0.05$) もしくは有意差なし ($p > 0.05$) を示す.

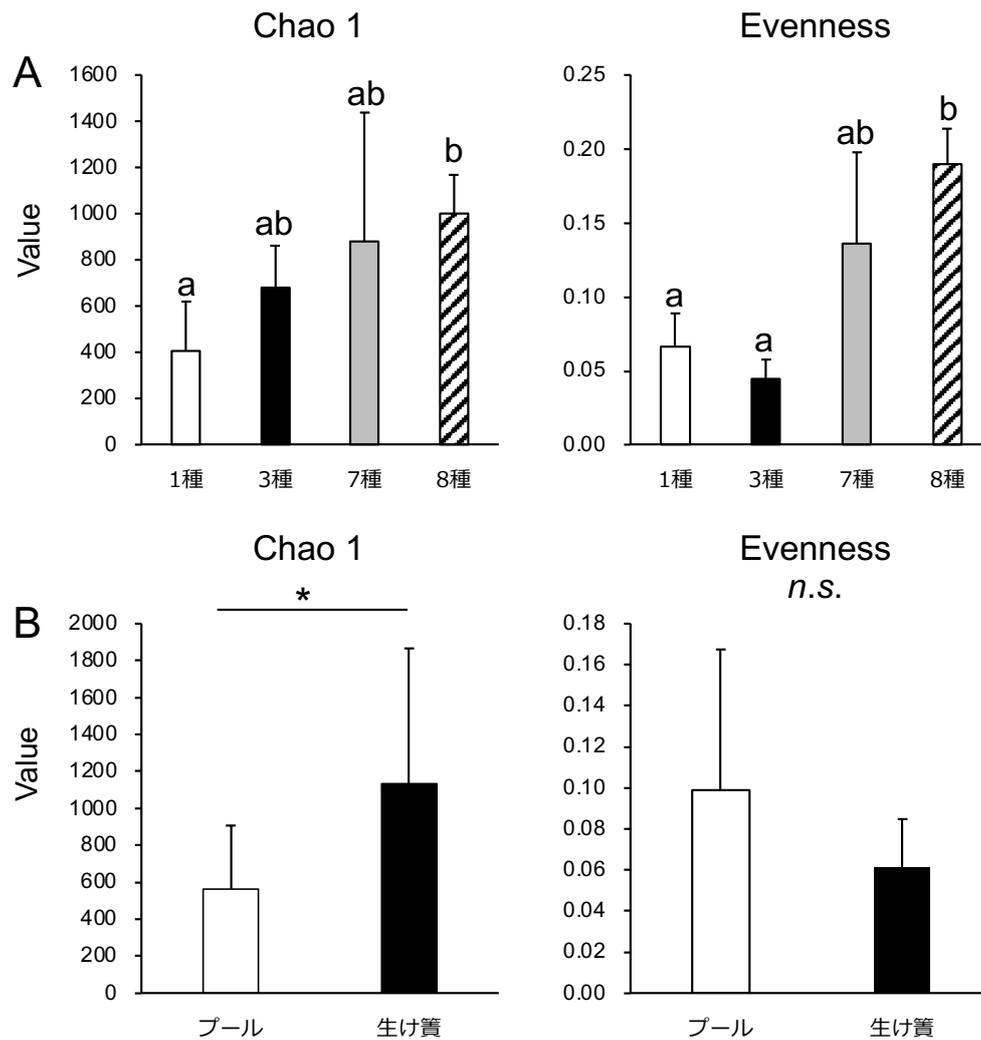


図 2.6 餌生物種数および飼育形態による国内 5 施設のバンドウイルカの腸内細菌叢の多様性指数（平均±標準偏差）の比較．*と異なるアルファベットはそれぞれ有意差あり（ $p < 0.05$ ）を示し，*n.s.*は有意差なし（ $p > 0.05$ ）を示す．

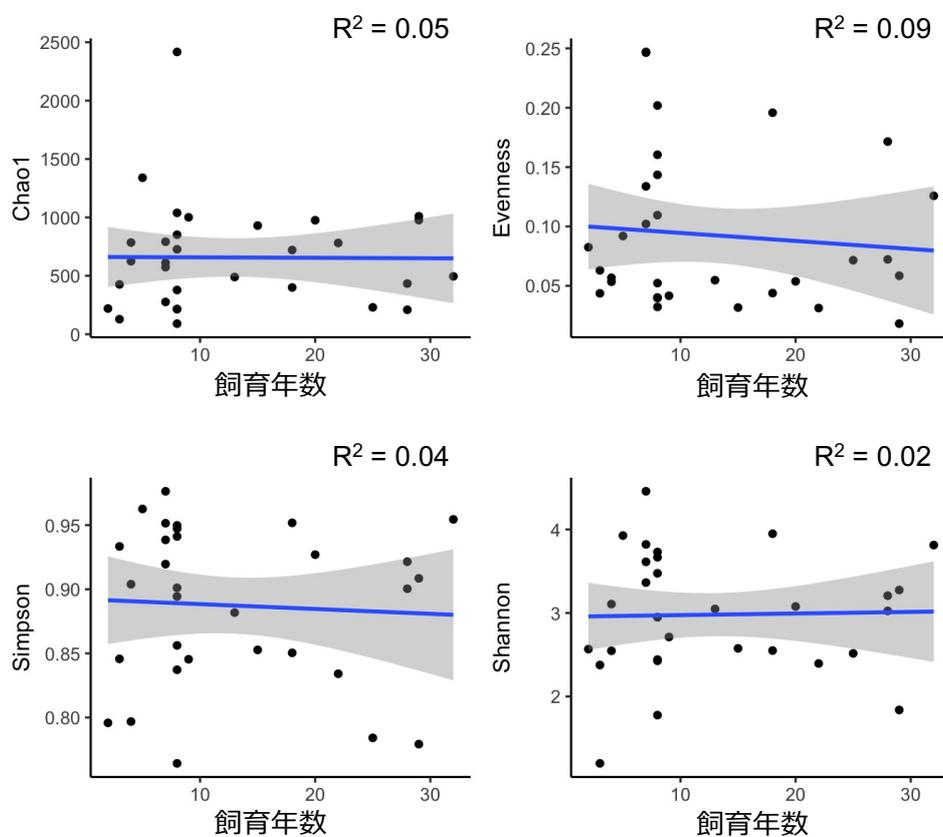


図 2.7 国内 5 施設のバンドウイルカの腸内細菌叢の各種多様性指数と個体の飼育年数との単回帰分析の結果. 図中の青線は回帰式を, 灰色部分は 95% 信頼区間を, R^2 は決定係数の値をそれぞれ示す.

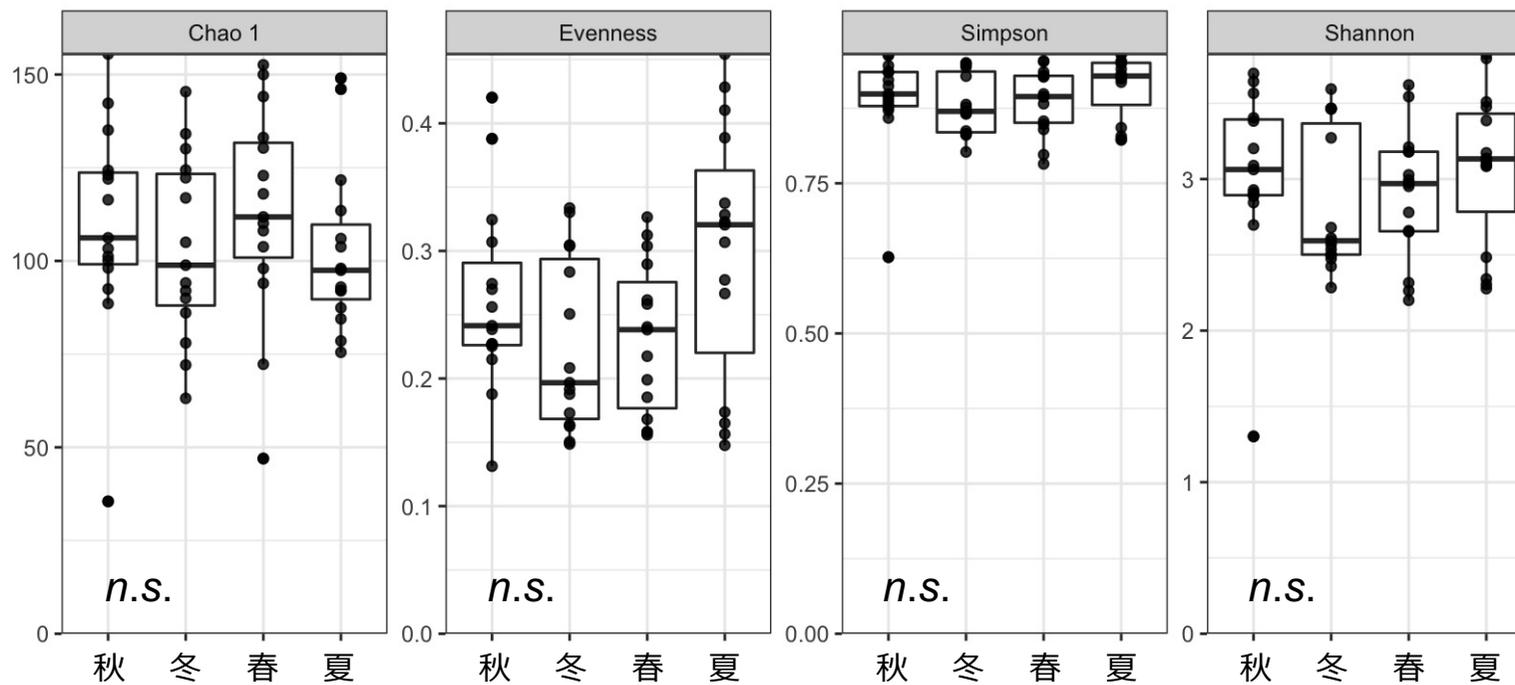


図 2.8 1 年間にわたり採取されたバンドウイルカ 5 個体の腸内細菌叢の各種多様性指数の季節による比較. *n.s.*

は有意差なし ($p > 0.05$) を示す.

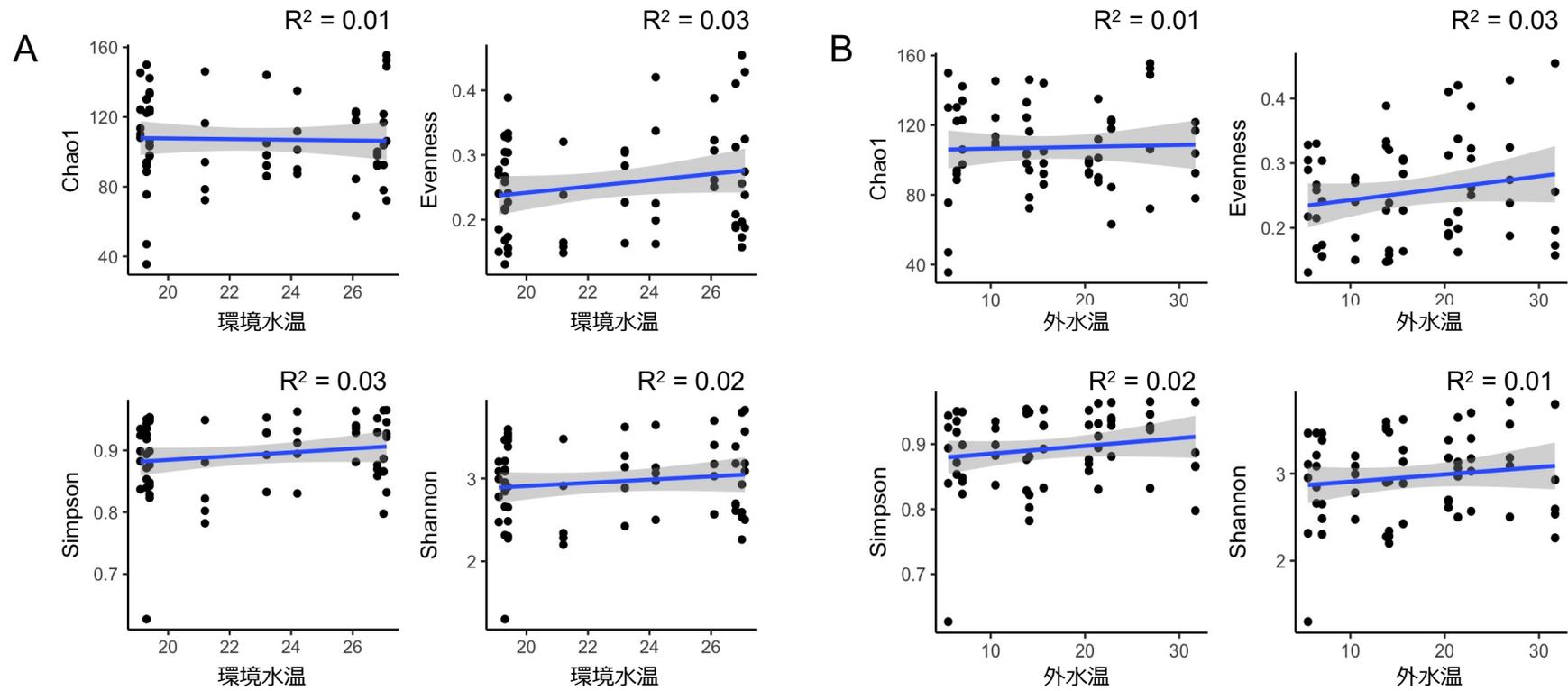


図 2.9 1 年間にわたり採取されたバンドウイルカ 5 個体の腸内細菌叢の各種多様性指数と環境水温と外気温との回帰分析の結果. 図中の青線は回帰式を, 灰色部分は 95%信頼区間を, R^2 は決定係数の値をそれぞれ示す.

第 3 章

プロバイオティクス候補菌の探索

プロバイオティクスは、腸内細菌叢を改善することによって宿主の健康に好影響を与える生きた微生物であり (Fuller and Cole 1989), 免疫機能改善による感染防御・アレルギー抑制効果, 動脈硬化の予防において有益である。これまで報告のある代表的なプロバイオティクスには, 乳酸桿菌である *Lactobacillus* 属や, *Enterococcus* 属, *Lactococcus* 属, *Pediococcus* 属などの乳酸球菌が多く含まれる (Kerry *et al.* 2018)。これら乳酸菌の投与により, 宿主の免疫システムの強化, 病原菌の抑制, 炎症性腸疾患の軽減, コレステロール値の低下およびビタミン類の合成など様々な機能が期待される (Vijayaram and Kannan 2018)。そのため, 健康増進を目的として, ヒトのみならず多くの動物種の乳酸菌に注目が集まっている (Kanamori *et al.* 2001; Liu and Dong 2002; Tsuchida *et al.* 2018; Liu *et al.* 2019)。

これまで鯨類においては, アカボウクジラからの *Lactobacillus ceti* の分離や (Vela *et al.* 2008), ヨーロッパオウギハクジラ *Mesoplodon bidens* からの *Weissella ceti* の分離例がある (Vela *et al.* 2011)。しかし, これらはいずれも新規細菌種提唱に留まっており, その有用性は調査されていない。一方, Diaz *et al.* (2013) はバンドウイルカから海生哺乳類およびヒト病原性細菌に抗菌活性を示す *Lactobacillus salivarius* を分離したが, この研究では乳酸桿菌にのみ注目しており, 乳酸球菌は全く考慮されていない。

第 1 章の結果より，飼育下イルカにおける乳酸菌の欠如から，野生個体と比べ細菌叢のバランスが偏っている飼育下個体の腸管内の健康が脅かされる危険性が示唆された．そこで本章では，飼育下イルカ腸内環境の健康維持に役立つプロバイオティクス候補菌を得るため，まず第 1 節で野生および飼育下鯨類から乳酸菌の分離を試みた．次に第 2 節では第 1 節で得られた乳酸菌のイルカ病原性細菌に対する抗菌活性能と pH 耐性を試験した．

第 1 節

鯨類糞便試料からの乳酸菌分離

健康増進を目的とした有用乳酸菌の探索は、ヒト (Kerry *et al.* 2018) をはじめとして、ジャガー *Panthera onca* (Liu and Dong 2002), ジャイアントパンダ *Ailuropoda melanoleuca* (Liu *et al.* 2019), 霊長類 (Tsuchida *et al.* 2018) など様々な生物種で行われている。鯨類においては、大型ハクジラ類から *Lactobacillus* 属 (Vela *et al.* 2008) や *Weissella* 属 (Vela *et al.* 2011) などの乳酸菌分離報告例があるが、いずれも新規細菌種提唱に留まっており、その有用性は未だ明らかにされていない。また、バンドウイルカから海生哺乳類およびヒト病原性細菌に抗菌活性を示す *Lactobacillus salivarius* の分離報告があるが (Diaz *et al.* 2013), この研究では乳酸桿菌のみを対象としており、乳酸球菌の存在は全く考慮されていない。また、上述の研究は日本国外の飼育施設や漂着個体の試料の結果であり、日本近海や国内飼育施設での鯨類を対象にした乳酸菌の分離報告は無い。そこで本節では、まず日本沿岸に漂着した野生個体および国内飼育下鯨類からの乳酸菌分離を試みた。

材料と方法

供試検体

野生スジイルカ *Stenella coeruleoalba*, ハナゴンドウ *Grampus griseus*, シ

ワイルカ *Steno bredanensis*, およびアカボウクジラ, 飼育下バンドウイルカの糞便を採取し実験に供した.

スジイルカとハナゴンドウの糞便は, 2020年1月6日および7日に和歌山県太地町の追い込み漁により捕獲された個体から採取した. シワイルカの糞便は, 2021年5月2日に藤沢市の海岸に生存漂着した個体から採取した(図4.1). アカボウクジラの糞便は, 2020年9月17日に静岡県清水区三保海岸に漂着した個体から採取した(図4.1). バンドウイルカの糞便は, 新江ノ島水族館で飼育されている健康個体から2020年2月25日, 4月26日, および7月26日の合計3回に渡り採取した.

バンドウイルカとシワイルカの糞便は第1章同様に, シリンジ付きカテーテルを用いて肛門部から採取した. 太地町の追い込み漁捕獲個体とアカボウクジラの糞便は, 解剖後, 腸管組織の表面を70%エタノールで滅菌した後, 解剖はさみで切り開き内容物を採取した. 全ての試料は採取後直ちに滅菌1.5 ml チューブもしくはケンキポーターII (Terumo Corporation, Tokyo, Japan) に移し, 実験に供するまで4°Cで保存し, 寒天培地への塗抹は1時間以内に行なった.

乳酸菌分離

全ての糞便試料は, 1×PBSで10倍段階希釈し, 10倍から100倍希釈液の1白金耳量を, 50%人工海水(インスタントオーシャン; Napqo)で調整し, 1%炭酸カルシウムを含むLactobacilli MRS寒天培地(BD Difco, NJ, USA)

に塗抹した．その後，アネロパック（Sugiyama-gen, Tokyo, Japan）により嫌気環境を構築した角形ジャー（Sugiyama-gen）内でコロニーが出現するまで 37°C でインキュベートした．得られた単離コロニーは白色，形状が丸であり，コロニーの周辺にクリアゾーンが形成されているものを選定し，Lactobacilli MRS 寒天培地に塗抹し，再び嫌気環境下で培養した．純化した菌体は，20%グリセリンを含む Lactobacilli MRS broth (BD Difco) に懸濁し，更なる実験に供するまで -80°C で保存した．

16SrRNA 遺伝子領域による菌種同定

各菌株は，Lactobacilli MRS 寒天培地で復元した後，10% TritonX-100 (MP Biomedicals) と 0.5 mm Φ ガラスビーズ (TOMY SEIKO) の入った 2.0 ml チューブに懸濁し，5,000 rpm, 1 分間の条件で菌体を破砕した．その後，20,000 $\times g$ で 15 分間遠心操作し，その上清 100 μ l を新たな滅菌 1.5 ml チューブに移し，PCR 反応のテンプレート DNA とした．菌種同定は，ユニバーサルプライマー（27F; 5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3'，1492R; 5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3'，(Lane 1991)）を用いた 16S rRNA の約 1,500 bp 領域増幅により行なった．PCR 反応液組成は，0.5 μ l の各プライマー（10 pmol/ μ l），2.5 μ l の 10 \times PCR buffer for Blens Taq (Toyobo)，2.5 μ l の dNTPs，0.25 μ l の Blens Taq Plus (Toyobo)，1 μ l の DNA，そして 17.75 μ l の超純水で全量 25 μ l とした．反応条件は，初めに 94°C で 2 分間の熱変性の後，94°C で 30 秒の熱変性，53°C で 30 秒のアニーリング，72°C で 1 分 30 秒

の伸長反応を 25 回繰り返した。

PCR 増幅産物は 1.0%アガロースゲルを用いて、100V、20 分間の電気泳動後、LED 照射により増幅の有無を確認した。増幅産物は Wizard SV Gel and PCR clean up system (Promega) を用いて添付の説明書に従い精製され、BigDye™ Terminator v3.1/1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, CA, USA) を用いて添付の説明書に従いシーケンス反応を行い、ABI 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems) により配列を決定した。最終的な配列は GeneStudio ソフトウェアを用いて決定し、EZBioCloud 16S データベースに対して標準株との相同性検索を行なった (Yoon *et al.* 2017)。

生化学性状解析による菌種同定

16SrRNA 遺伝子領域による菌種同定の結果、乳酸菌と同定されたもののなかで、バクテリオシン、すなわち抗菌タンパク・ペプチドの産生報告がある細菌種に関しては、生化学性状解析を行い、より詳細な菌種同定を行なった。本項で扱う菌株は、全て Lactobacilli MRS 寒天培地で復元した。まず、グラム鑑別は各菌株をスライドグラス上の 3% KOH に 1 分間懸濁し、その後の粘稠化の有無で判別した (Ryu 1940)。カタラーゼ産生の有無は、菌株を 1 ml の過酸化水素 (Fujifilm Wako Pure Chemical Corporation) に懸濁し、30 秒後の水泡の発生の有無で判別した。運動性の評価は、菌株を白金線で Lysine Indole Motility 半流動培地 (Nissui, Tokyo, Japan) に穿刺し、37°C で 24 時間培養した後、穿刺部分からの発育の広がり度合いにより判別した。

炭水化物代謝プロファイルは，API 50CH システム（bioMérieux, Marcy-l'Étoile, France）と API 50 CHL medium（bioMérieux）を用いて，指定の手順に従い調べられた．

結果

野生下および飼育下鯨類の糞便を *Lactobacilli* MRS 寒天培地に塗抹し，嫌気環境下で培養した結果，合計 128 株が得られた（表 4.1）．これらの 16S rRNA 遺伝子領域による菌種同定の結果，乳酸菌（ラクトバシラス目，（Ludwig *et al.* 2015; Hirayama and Endo 2016））の分離率に着目すると，*Enterococcus* 属が 54.7%（野生下：40.5%，飼育下：61.6%）と最も高く，次に *Streptococcus* 属が 17.2%（野生下：14.3%，飼育下：5.8%），そして *Lactococcus* 属が 7.0%（野生下：21.4%，飼育下：非検出）であった．また，各細菌属の中で最も高頻度に分離されたのは，それぞれ *Enterococcus faecalis*（野生下：64.7%，飼育下：83.0%），*Streptococcus gallolyticus* subsp. *pasteurianus*（野生下：100%），*Streptococcus lutetiensis*（飼育下：57.9%），*Lactococcus lactis* subsp. *lactis*（野生下：100%，飼育下：非検出）であった．

次に，これら乳酸菌の中で，バクテリオシン産生報告例がある *Enterococcus faecalis* と *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* に着目し，生化学性状解析により詳細な菌種同定を行なった．*E. faecalis* 55 株（EF-1-EF-55）と *L. lactis* subsp. *lactis* 9 株（No.98-100, No.102-104, No.140-142）は全て

グラム陽性，カタラーゼ陰性，運動性なし，好気および嫌気環境下で増殖可能であった．また，API 50CH システムを用いた炭水化物代謝試験の結果，*E. faecalis*55 株は amygdalin, arbutin, cellobiose, d-fructose, d-glucose, d-mannose, d-tagatose, esculin, galactose, gluconate, glycerol, maltose, mannitol, melezitose, *N*-acetylglucosamine, ribose, saccharose, salicin, sorbitol, trehalose, b-gentiobiose 陽性であり，lactose および rhamnose 弱陽性であり（表 4.2），これは *E. faecalis* 標準株と同様の結果であった（Schleifer and Kilpper-Bälz 1984）．また，*L. lactis* subsp. *lactis* 9 株は amygdalin, arbutin, cellobiose, d-fructose, d-glucose, d-mannose, d-xylose, esculin, galactose, gluconate, l-arabinose, l-xylose, maltose, mannitol, *N*-acetylglucosamine, ribose, saccharose, salicin, sorbitol, trehalose, b-gentiobiose 陽性であり，starch に関しては菌株により弱陽性であり，標準株（data not shown（Schleifer *et al.* 1985））や淡水魚由来株（Itoi *et al.* 2009）とは異なり，海水魚（Itoi *et al.* 2008）およびハマグリ *Meretrix lamarckiito* と同様の結果であった（表 4.2）．

考察

野生および飼育下鯨類からの乳酸菌分離を試みた結果，*Enterococcus* 属細菌が最も高頻度に分離され，その分離率は 50%以上であった．同細菌属は，陸上肉食哺乳類やイルカ類の主要な腸内細菌であると報告されている（Diaz *et al.* 2013; Nelson *et al.* 2013）ため，本研究の分離結果はこれらを

支持しているものであった。また、野生アカボウクジラから *L. lactis* subsp. *lactis* が分離され、その炭水化物代謝プロファイルは海水魚および海水二枚貝のものと一致していた。同細菌種は、土壌 (Klijn *et al.* 1995) 植物 (Kimoto *et al.* 2004) や乳製品 (Alegria *et al.* 2010)、発酵食品 (Harris *et al.* 1992) など様々な試料から分離されている。さらに、Itoi *et al.* (2008) は、6% NaCl に耐性を持つ *L. lactis* を分離し、陸上試料からの食物連鎖を介して海洋生物に同細菌種が伝播し、海洋環境に適応したことを示唆している。そのため、本研究で分離された 9 株に関しても、食物連鎖を介してアカボウクジラの腸内に定着したと考えられる。しかし、他鯨種では分離されなかったことから、同鯨種特有であるのか、もしくは様々な鯨類に普遍的に存在しているのか否かを明らかにするには、様々な鯨類からの分離実験が必要である。

これまで、*E. faecalis* と *L. lactis* subsp. *lactis* においてはバクテリオシン産生株の報告がある。*E. faecalis* OSY-RM6 由来のエンテロシン RM6 は、*Staphylococcus aureus* や *Listeria monocytogenes* などの病原性細菌に対して抗菌活性を示し (Huang *et al.* 2013)、*L. lactis* subsp. *lactis* の産生するナイシンは幅広いグラム陽性菌に対して抗菌活性を示す (Cheigh and Pyun 2005)。そのため、本研究で分離された *E. faecalis* と *L. lactis* subsp. *lactis* においてもバクテリオシン産生の有無を確かめ、病原性細菌の排除や増殖抑制に有効であるかを明らかにする必要がある。

第 2 節

抗菌活性および pH 耐性試験

バクテリオシンは，グラム陽性菌やグラム陰性菌が生産する抗菌性のタンパク質もしくはペプチドで，生産菌の類縁菌に対して殺菌的に作用するものである．なかでも乳酸菌が生産するバクテリオシンは，類縁菌以外にも広く様々な病原性細菌に広く抗菌活性を示すことから，食品微生物制御や腸内環境の改善において有用である（Klaenhammer 1993）．

第 1 節より，鯨類から *E. faecalis* と *L. lactis* subsp. *lactis* を分離した．これらの細菌種はそれぞれ異常アミノ酸を含まない分子量 10kDa 以下の耐熱・耐酸性ペプチドであるエンテロシン（Izquierdo *et al.* 2009; Huang *et al.* 2013），異常アミノ酸を含む分子量 5kDa 以下の耐熱・耐酸性ペプチドであるナイシン（Klaenhammer 1993）産生株が存在する．一般に，ナイシンはグラム陽性菌全般に殺菌的に高い抗菌活性を示すため，食品保存料やプロバイオティクスとしての利用が期待されている（Punyauppa-path *et al.* 2015）．

そこで本節では，*E. faecalis* と *L. lactis* subsp. *lactis* のイルカ病原性細菌への抗菌活性能を明らかにし，活性が見られた場合にはバクテリオシン合成遺伝子の同定を試みた．また，将来的なプロバイオティクスとしての利用を見据え，菌株の pH 耐性試験を行い，イルカ胃内で生存可能か否かを明らかにした．

材料と方法

供試菌株

第 1 節で各種鯨類から分離され、凍結保存されていた *E. faecalis* EF-1-EF-55（以降、EF-1-EF-55 と表記）および *L. lactis* subsp. *lactis* No.98-100, No.102-104, No.140-142（以降、それぞれ No.98-100, No.102-104, No.140-142 と表記）は、Lactobacilli MRS broth で 37°C, 20 時間嫌気環境下で培養することで復元し、次項以降の実験に用いた。

抗菌活性試験

EF-1-EF-55, No.98-100, No.102-104 および No.140-142 を Lactobacilli MRS broth で 37°C, 20 時間嫌気環境下で培養後、3,000×g, 5 分間遠心操作し、上清を新しい 50 ml ファルコンチューブに移し、再び同条件の遠心操作を行い、上清を得た。この上清は pH 4.2-4.3 であったため、酸性環境による指標菌の増殖抑制の可能性を排除するために 5N NaOH で pH 7.0 に調整した。その後、0.22 μm 孔径フィルター（Millex-GP; Merck Millipore）で濾過し、無細胞培養上清を取得し、これを試験溶液とした。

抗菌活性試験は表 3.3 に示す 20 種の指標菌に対して行われた。凍結保存されていた指標菌は Mueller Hinton 寒天培地（BD Difco）上で表 3.3 に示す環境、温度で復元し、それを 5 ml のリン酸緩衝食塩水にマクファーランド No.0.5 の濁度になるように調整し、これを指標菌液とした。なお、*Vibrio* 属

細菌 5 種と *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* の復元には 50%人工海水で調整した Mueller Hinton 寒天培地を用いた。各指標菌液を滅菌綿棒を用いて Mueller Hinton 寒天培地塗抹した後、5 mm 孔径の滅菌ステンレスパイプを用いて寒天培地をくり抜いた。次に、100 μ l の試験溶液をくり抜いたウェルに入れ、冷蔵庫内で 30 分間静置し試験溶液を寒天培地に十分に浸透させた。その後表 3.3 の培養環境および温度で 24 時間培養した後、ウェル周辺の阻止円の形成の有無を確認した。

また、抗菌活性が見られた試験溶液に関しては、抗菌活性物質が抗菌タンパク、ペプチドによるものと仮定し、タンパク質分解酵素処理により活性が消失されるか確認した。すなわち、90 μ l の試験溶液に対して 10 μ l の 5mg/ml Proteinase K (Fujifilm Wako Pure Chemical Corporation) を加え 56°C で 3 時間反応させたものを、活性を示した指標菌に対して上述の方法と同様にしてウェル周辺の阻止円の形成の有無を確認し、Proteinase K 処理を施していない試験溶液の結果と比較した。

バクテリオシン生合成遺伝子の同定

前述の結果、抗菌活性を有していた細菌株に関して、全ゲノム解析によるバクテリオシン産生関連遺伝子の同定を行なった。

菌株は Lactobacilli MRS broth で 37°C、20 時間嫌気環境下で培養することで復元し、3,000 \times g、10 分間の遠心操作により培養液から菌体のペレットを得た。得られたペレットから NucleoSpin Microbial DNA kit (Macherey-Nagel,

Düren, Germany) を用いて指定の説明書に従いゲノム DNA (gDNA) を抽出した。gDNA の品質は 1%アガロースゲルを用いて 50V で 1 時間電気泳動することで確認した。gDNA は生物技研株式会社(神奈川, 日本)に送られ、後述の方法により塩基配列を取得した。gDNA の濃度は Synergy LX (Bio Tek, VT, USA) と QuantiFluor dsDNA System (Promega) を用いて測定した。ライブラリは MGIEasy FS DNA Library Prep Set (MGI Tech, Shenzhen, China) と MGIEasy DNA Adapters-96 Kit (MGI Tech) を用いて指定の説明書に従い構築され、各ライブラリの品質と濃度は Fragment Analyzer (Agilent) と dsDNA 915 Reagent Kit (Agilent) を用いて確認した。各ライブラリから DNBSEQ-G400RS High throughput Sequencing Set (MGI Tech) を用いて指定の説明書に従い DNA nano ball (DNB) を作成し、得られた DNB ライブラリから DNBSEQ-G400 (MGI Tech) を用いて、2×200 bp ペアエンドリードシーケンスにより配列を取得した。

FastQC ver. 0.11.9 を用いて DNBSEQ-G400 から得られた .fastq 配列データのクオリティを確認した。その後、fastp ver. 0.1.2 を用いてアダプター配列 (--adapter_sequence, --adapter_sequence_r2), クオリティスコア 30 未満 (-q 30) および 30 bp 以下の配列 (-l 30) を排除した。また、配列中の許容可能な N 数は 0 個とした (-n 0)。その後、SPAdes genome assembler ver. 3.15.2 を用いて--isolate オプションとデフォルトの k-mer サイズに基づきゲノム配列をアセンブルした。アセンブル後のドラフトゲノム配列の長さ、コンティグ数、GC 含量、N50、タンパク質コード領域 (coding sequence; CDS),

rRNA, tRNA 数は DDBJ Fast Annotation and Submission Tool (DFAST) ver. 1.4.0 を用いて算出した。ゲノムの完全性 (Completeness) および汚染度 (Contamination) は checkM ver. 1.1.3 を用いて評価した。また、ゲノムアノテーションは Prokka ver.1.14.5 を用いて行なった。

ゲノムレベルでの種同定は標準株との average nucleotide identity (ANI) (Yoon *et al.* 2017) 解析と Genome-to-Genome Distance Calculator ver. 3.0 (Meier-Kolthoff *et al.* 2021) を用いた digital DNA-DNA hybridization (dDDH) を算出することで行なった。

バクテリオシン生合成遺伝子は、二次代謝産物生合成遺伝子の検索ツールである antiSMASH ver. 6.0 (Blin *et al.* 2021) を用いてゲノム配列を MIBiG データベース (Kautsar *et al.* 2019) と照合することで同定した。

pH 耐性試験

菌株は Lactobacilli MRS 寒天培地で 37°C, 20 時間嫌気環境下で培養することで復元し, 単離したコロニーを得た。得られた単離株は 5 ml の 1N NaOH で pH 7.0 に調整した Lactobacilli MRS broth で 37°C, 20 時間嫌気環境下で培養することで十分に増菌した。増菌後, 培養液 1 ml を滅菌 2.0 ml チューブに移し, 3,000×g, 10 分間の遠心操作により菌体のペレットを得た。得られたペレットは, 1 ml のリン酸緩衝食塩水に懸濁し, これを標準菌液とした。この標準菌液 100 µl を, pH 6.0, pH 4.0, pH 2.5 に調整した Lactobacilli MRS broth および朝の給餌前に採取された飼育下バンドウイルカの胃液 (pH

3.8) に添加し，37°C，20 時間嫌気環境下で培養した．また，pH 7.0 の Lactobacilli MRS broth で同様に培養した菌液をコントロール群とした．これらの作業は各 pH 条件において 3 回繰り返された．なお，標準菌液の濁度を均一に保つために，各 pH もしくはイルカ胃液への添加前にボルテックスにより良く混和した．培養後，細菌の増殖度は 595 nm の波長による透過度を測定し，光学濃度 (Optical density: OD) の値で評価した．各 pH 条件間での OD 値の平均値は一元配置分散分析で比較し，Tukey の多重比較検定で各条件間での平均値を比較した． $p < 0.05$ を統計的有意差ありとした．

結果

抗菌活性試験

EF-1-EF-55, No.98-100, No.102-104 および No.140-142 の無細胞培養上清 (pH 7.0) の各種指標菌に対する抗菌活性試験の結果を表 3.3 に示す．EF-1-EF-55 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，No.98 は *Vibrio alginolyticus* および *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* に対して活性を示した．また，No.104 は *Vibrio alginolyticus*, *Enterococcus faecalis* および *Enterococcus hirae* に対して活性を示した．このことから No.98 および No.104 の抗菌活性が抗菌タンパク，ペプチドによるものであると示唆されたため，無細胞培養上清を Proteinase K で処理したもので同様の試験を行った結果，抗菌活性能は消失もしくは大きく減少した (図 3.2)．

バクテリオシン生合成遺伝子の同定

No.98 および No.104 のドラフトゲノム配列の詳細を表 3.4 に示す。ドラフトゲノム配列の長さはそれぞれ 2,624,307 bp, 2,688,733 bp であり、これらは *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ATCC 19435 (GenBank assembly accession: GCA_001456385.1) のゲノム配列の長さ (2,547,291 bp) と類似していた。また、Completeness および Contamination は、No.98 および No.104 でそれぞれ 100%と 100%, 3.91%と 8.97%であり、これはアセンブルの結果が良好であったことを示している。また、両株の ANI 値は *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ATCC 19435 に対して最も高く、それぞれ 97.1%および 97.5%であった。*Lactococcus lactis* の亜種 4 種の標準株 (*Lactococcus lacti* subsp. *lactis* ATCC 19435, subsp. *cremoris* ATCC19257, subsp. *hordniae* DSM 20450 および subsp. *tructae* DSM 21502) に対する dDDH を行なった結果、両株とも *Lactococcus lacti* subsp. *lactis* ATCC 19435 に対して 77.4%および 77.5%と最も高い相同性を示したことから、No.98 および No.104 はゲノムレベルで *Lactococcus lacti* subsp. *lactis* であると同定された。

両株のドラフトゲノム配列情報からバクテリオシン生合成遺伝子の同定を試みた。その結果、*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 由来のナイシン A/Z 生合成に関わる全 11 遺伝子 (*nisABTCIPRKFEG*, MIBiG データベース Accession: BGC0000535) が同定され、それらの塩基配列は 98-100%相同であった (図 3.3)。また、*nisA* 遺伝子、すなわちナイシン前駆体生合成遺伝子から両株のナイシン前駆体のアミノ酸配列を予測し、各種ナイシン前駆

体と比較した結果， ナイシン Z と一致した配列であった（表 3.5）.

pH 耐性試験

No.98 および No.104 を pH 6.0 の Lactobacilli MRS broth で培養した後の OD 値はコントロール（pH 7.0）とほぼ同等の値を示した（図 3.4）. しかし， pH 4.0 で培養した後の OD 値はコントロールと比べ有意に減少し（ $p < 0.05$ ）， その後イルカ胃液（pH 3.8） および pH 2.5 で培養した場合はさらに減少した. また， コントロールでの OD 値を基準とした時の No.98 および No.104 のイルカ胃液（pH 3.8） と pH 2.5 での OD 値から算出される生存率はそれぞれ 33.1%， 40.6% および 21.5%， 26.7% であった.

考察

アカボウクジラ漂着個体から分離された *L. lactis* subsp. *lactis* 9 株のうち， No.98 と No.104 は *V. alginolyticus*， *E. faecalis* および *E. hirae* に対して抗菌活性を示した. *V. alginolyticus* は野生および飼育下イルカから分離されているが（Buck *et al.* 1991; Buck *et al.* 2006）， 同細菌種による日和見感染症が懸念されている（Schroeder *et al.* 1985）. *Enterococcus* 属細菌はヒトや様々な哺乳類の胃腸内常在細菌であるが， *E. faecalis* はイルカの腹膜炎や組織異常の原因菌であり， イルカ類の主要な病原性細菌であると報告されている（Venn-Watson *et al.* 2008）. また， イルカ類の *E. hirae* 感染症に関する報告

はないが、同種はヒトや様々な哺乳類において腸炎の原因菌である (Etheridge *et al.* 1988; Nicklas *et al.* 2010)。また、これらの細菌種はイルカ類だけでなくヒトへの病原性も示唆されているため、イルカとヒト間での細菌伝播により水族館内の健康が脅かされる可能性が考えられるため、公衆衛生上重要な細菌種である。そのため、No.98 と No.104 の抗菌活性能は、イルカの病原性細菌の排除だけでなく、水族館の公衆衛生を守る上で有用であると考えられる。

No.98 と No.104 の pH 7.0 に調整した培養上清において抗菌活性が見られ、その活性はタンパク質分解酵素処理により消失あるいは大幅に減少したことから、両株の抗菌活性は乳酸などの酸産生に基づくものではなく、タンパク質およびペプチドによるものであると示唆された。そこで *L. lactis* subsp. *lactis* の産生する抗菌ペプチドであるナイシンを産生していると考え、全ゲノム解析からナイシン生合成遺伝子の同定を試みた。

その結果、両株においてナイシン A/Z 生合成に関わる遺伝子全て (*nisABTCIPRKFEG*) が検出され、*nisA* のタンパク質配列は、ナイシン Z と一致していた。ナイシン A/Z の生合成は計 11 個の遺伝子により制御されている (Cheigh and Pyun 2005)。まず、*nisA* によりナイシン前駆体が産生される。ナイシン前駆体は *nisBC* による特定のアミノ酸の修飾を経た後、*nisC* により細胞外へ排出される。その際、*nisP* によりリーダーペプチドが切断され、34 アミノ酸残基からなる成熟型ナイシンとなる。細胞外に排出された成熟型ナイシンは菌体表面に存在するセンサータンパク質 (*nisK*) に結合

し、そのシグナルが細胞内部の応答制御タンパク質 (*nisP*) に伝達され、ナイシン前駆体の産生が促進される。また、*nisIFEG* はナイシン排出に必要なタンパク質産生に関与し、これにより自身の産生したナイシンに対する耐性機構を獲得している。以上のことから、No.98 と No.104 がナイシン Z を産生していることが強く示された。

一般に、ナイシン単体ではグラム陽性菌にのみ抗菌作用を示す。これは、ナイシンはグラム陽性菌の細菌細胞の表面に普遍的に存在する細胞壁前駆体であるリポド II に結合し、細胞膜に孔を形成し、ATP やイオンなどの細胞内容物を溶出させることで殺菌的な抗菌作用を示す一方で、グラム陰性菌の有する外膜がナイシンの侵入を防ぎ、リポド II への結合を阻止しているためである (益田 *et al.* 2010)。No.98 と No.104 は *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* や *Enterococcus* 属などのグラム陽性菌だけでなく、グラム陰性菌である *Vibrio alginolyticus* にも抗菌作用を示した。現時点ではこの結果を説明する研究報告や実験データはないが、これまで、僅かであるがナイシンがグラム陰性菌に抗菌活性を示したという報告例がある (Stevens *et al.* 1991; Kuwano *et al.* 2005)。これらの報告では、その理由については考察されていないが、ナイシンの抗菌作用機序には未だ未知な部分が多いため (Punyauppa-path *et al.* 2015)、今後、No.98 と No.104 由来のナイシンを精製し、その詳細な性状解析が必要である。

プロバイオティクスとしての利用のためには、菌体が宿主の胃内環境で生存し、腸管内に生きてたまたま到達し定着する必要がある。そこで、No.98 と

No.104 の pH 耐性試験を行った。その結果、両株はバンドウイルカの胃液 (pH 3.8) および pH 2.5 環境下においても生存、増殖することができた。バンドウイルカの胃液は給餌後 4 時間で約 pH2.6 に低下する (Buddington *et al.* 2006)。また、バンドウイルカの消化管通過時間は約 3.9 時間であると報告されている (Kastelein and Wiepkema 1997)。この 2 つを考慮すると、イルカが摂取した食べ物の胃内滞留時間は 4 時間よりも優に短いと考えられるため、イルカ胃液および pH2.5 での 20 時間培養でも生存、増殖できた No.98 と No.104 はイルカ胃内環境を生きたまま通過できると考えられる。

以上より、鯨類からナイシン Z 産生によりイルカ病原性細菌に抗菌活性を示すと思われる乳酸菌を分離することができ、これらはイルカ胃内環境でも生存、増殖できる可能性が示唆された。今後、胆汁酸耐性試験や、腸内での定着性および簡便な投与方法を検討することで、将来的なプロバイオティクスとしてイルカ腸内環境維持に貢献できると考えた。

表 3.1 野生下および飼育下鯨類から分離された細菌株の 16S rRNA 遺伝子領域による菌種同定の結果.

細菌種	分離株数				
	野生下			飼育下	
	スジイルカ	ハナゴンドウ	シワハイルカ	アカボウクジラ	バンドウイルカ
<i>Clostridium baratii</i>	—	—	1	—	—
<i>Clostridium moniliforme</i>	1	—	1	—	1
<i>Clostridium perfringens</i>	—	1	2	1	3
<i>Enterococcus faecalis</i>	3	3	3	2	44
<i>Enterococcus faecium</i>	2	—	—	—	7
<i>Enterococcus hirae</i>	—	1	1	2	—
<i>Enterococcus lactis</i>	—	—	—	—	2
<i>Escherichia fergusonii</i>	—	—	—	1	2
<i>Escherichia marmotae</i>	—	—	—	—	1
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	—	—	—	9	—
<i>Paeniclostridium sordellii</i>	1	—	—	—	—
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	—	—	—	—	3
<i>Staphylococcus pasteurii</i>	—	—	—	—	3
<i>Staphylococcus</i> sp.	—	—	1	—	—
<i>Staphylococcus warneri</i>	—	—	—	—	4
<i>Streptococcus gallolyticus</i> subsp. <i>pasteurianus</i>	3	2	1	—	—
<i>Streptococcus infantarius</i>	—	—	—	—	1
<i>Streptococcus lutetiensis</i>	—	—	—	—	11
<i>Streptococcus salivarius</i>	—	—	—	—	4
合計	10	7	10	15	86

表 3.2 API 50CH を用いた *Enterococcus faecalis* および *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* の炭水化物代謝試験の結果.

API 50CH	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>												
	<i>Enterococcus faecalis</i> ¹⁾	No.98	No.99	No.100	No.102	No.103	No.104	No.140	No.141	No.142	Marine fish-isolates ²⁾	Bivalvia-isolates ^{3,4)}	Freshwater fish-isolates ⁵⁾
2-Ceto-gluconate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5-Ceto-gluconate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Adonitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Amygdalin	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Arbutin	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Cellobiose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
d-Arabinose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
d-Arabitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
d-Fructose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
d-Fucose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
d-Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
d-Lyxose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
d-Mannose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
d-Raffinose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
d-Tagatose	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8%	-
d-Turanose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
d-Xylose	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	75%	-
Dulcitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Erythritol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Esculin	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Galactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Gluconate	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	92%	+
Glycerol	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Glycogen	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Inositol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Insulin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
l-Arabinose	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	33%	+
l-Arabitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
l-Fucose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
l-Sorbose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
l-Xylose	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lactose	W	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Maltose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Mannitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	42%	+
Melezitose	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Melibiose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
N-Acetyl-d-glucosamine	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Rhamnose	W	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8%	-
Ribose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Saccharose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	92%	+
Salicin	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sorbitol	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Starch	-	+	+	+	W	W	+	+	+	W	+	58%	+
Trehalose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Xylitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
α-Methyl-d-glucoside	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
α-Methyl-d-mannoside	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
β-Gentiobiose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
β-Methyl-xyloside	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

+; 陽性, W; 弱陽性, -; 陰性

- 1) 分離された全 55 株の結果.
- 2) Itoi *et al.* (2008) のデータを引用.
- 3) Itoi *et al.* (2014) のデータを引用.
- 4) 陽性率はパーセンテージで示す.
- 5) Itoi *et al.* (2009) のデータを引用.

表 3.3 抗菌活性試験に用いた指標菌の株名，培養環境および温度と *Enterococcus faecalis* EF1-EF55 株および

Lactococcus lactis subsp. *lactis* 計 9 株の指標菌に対する抗菌活性試験の結果.

指標菌	Strain	培養環境	培養温度	<i>Enterococcus faecalis</i> EF1-EF55	No.98	No.99	No.100	No.102	No.103	No.104	No.140	No.141	No.142
<i>Vibrio alginolyticus</i>	ATCC 17749	好気	25°C	—	—	++	—	—	—	++	—	—	—
<i>Vibrio campbellii</i>	ATCC 25920	好気	25°C	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>Vibrio fluvialis</i>	ATCC 33809	好気	25°C	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	ATCC 17802	好気	25°C	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>Vibrio vulnificus</i>	ATCC 27562	好気	25°C	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>Escherichia coli</i>	DSM 30083	好気	30°C	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>damsela</i>	DSM 7482	好気	25°C	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	ATCC 19435	嫌気	30°C	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	ATCC 19257	嫌気	30°C	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>Lactococcus garvieae</i>	ATCC 43921	嫌気	30°C	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>Lactococcus plantarum</i>	ATCC 43199	嫌気	30°C	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>Lactococcus raffinolactis</i>	ATCC 43920	嫌気	30°C	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>Enterococcus faecalis</i>	DSM 20478	嫌気	37°C	—	—	—	—	—	—	++	—	—	—
<i>Enterococcus hirae</i>	ATCC8043	嫌気	37°C	—	—	—	—	—	—	++	—	—	—
<i>Enterococcus faecium</i>	ATCC 19434	嫌気	37°C	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>Enterococcus canis</i>	DSM 17029	嫌気	37°C	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>Staphylococcus xylosus</i>	ATCC 29971	嫌気	37°C	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	ATCC 14990	嫌気	37°C	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i>	ATCC 6051	好気	30°C	—	—	+	—	—	—	—	—	—	—
<i>Streptococcus salivarius</i>	DSM 20560	嫌気	37°C	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

—; < 6mm, +; 6–10 mm, ++; > 10 mm

表 3.4 No.99 および No.104 のドラフトゲノム配列の詳細.

	No.99	No.104
Total Length (bp)	2,624,307	2,688,733
No. of contigs	382	886
GC Content (%)	35.40%	35.10%
N50 (bp)	284,824	486,474
Gap Ratio (%)	0.00%	0.00%
No. of CDSs	2,499	2,344
No. of rRNA	4	4
No. of tRNA	56	57
Completeness	100%	100%
Contamination	3.91%	8.97%

表 3.5 No.99 および No.104 で同定されたナイシン前駆体と各種ナイシン前駆体のアミノ酸配列の比較.

Strain	ナイシン前駆体のアミノ酸配列	
No.99	MSTKDFNLDLVS	SGASPRITSLCTPGCKTGALMGCNMKTATCNC
No.104	MSTKDFNLDLVS	SGASPRITSLCTPGCKTGALMGCNMKTATCNC
ナイシンZ (CAA79467.1)	MSTKDFNLDLVS	SGASPRITSLCTPGCKTGALMGCNMKTATCNC
ナイシンA (CAA48380.1)	MSTKDFNLDLVS	SGASPRITSLCTPGCKTGALMGCNMKTATCNC
ナイシンF (ABU45463.1)	MSTKDFNLDLVS	SGASPRITSLCTPGCKTGALMGCNMKTATCNC
ナイシンP ¹⁾		VTSKSLCTPGCKTGILMTCAIKTATCGCHFG
ナイシンQ (BAG71479.1)	MSTKDFNLDLVS	SGASTRITSLCTPGCKTGVLMGCNLKTATCNC
ナイシンH (AKB95119.1)	MSTNDFNLDLVS	AGASTRFTSISMCTPGCKTGALMTCNYKTATCNC
ナイシンU1 (ABA00878.1)	MNNE	DFNLDLIKISKENNSGASPRITSKSLCTPGCKTGILMTCPLKTATCGCHFG
ナイシンU2 (ADB43138.1)	MSTKDFNLDLVS	SGASPRVTSKSLCTPGCKTGILTGCP

No.99 および No.104 と異なる残基は灰色で塗りつぶされている. 黒色矢印はリーダーペプチド切断部位を示す.

両括弧内には GenBank アクセション番号を示す. ¹⁾ Zhang *et al.* (2012) のデータを引用.

A



B



図 3.1 本研究で対象とした生存漂着したシロハイルカ (A) と漂着後死亡したアカボウクジラ (B) 個体.

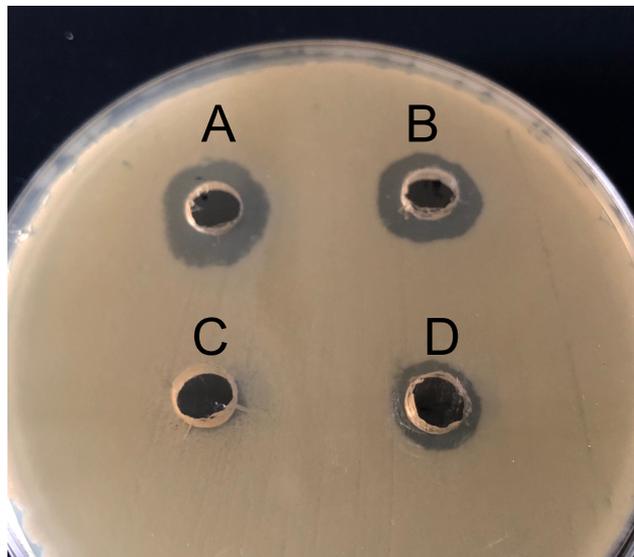


図 3.2 No.99 と No.104 の無細胞培養上清（それぞれ A, B）と Proteinase K で処理した無細胞培養上清（それぞれ C, D）の抗菌活性試験結果の例．寒天培地上の阻止円は指標菌の増殖を抑制していることを示す．

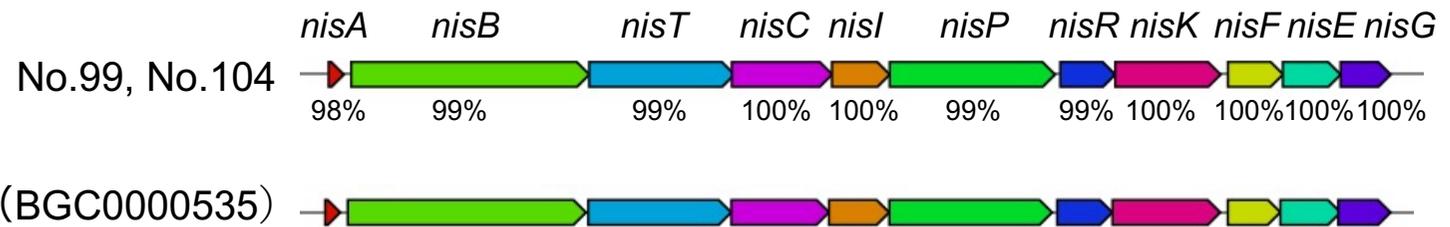


図 3.3 antiSMASH を用いて No.99 と No.104 のドラフトゲノム配列で同定されたナイシン生合成遺伝子と MIBiG データベースのナイシン A 生合成遺伝子の塩基配列の比較. 図中の同じ色は同一の遺伝子を示し, パーセンテージは相同性を示す. 両括弧内にはナイシン A の MIBiG データベースのアクセッション番号を示す.

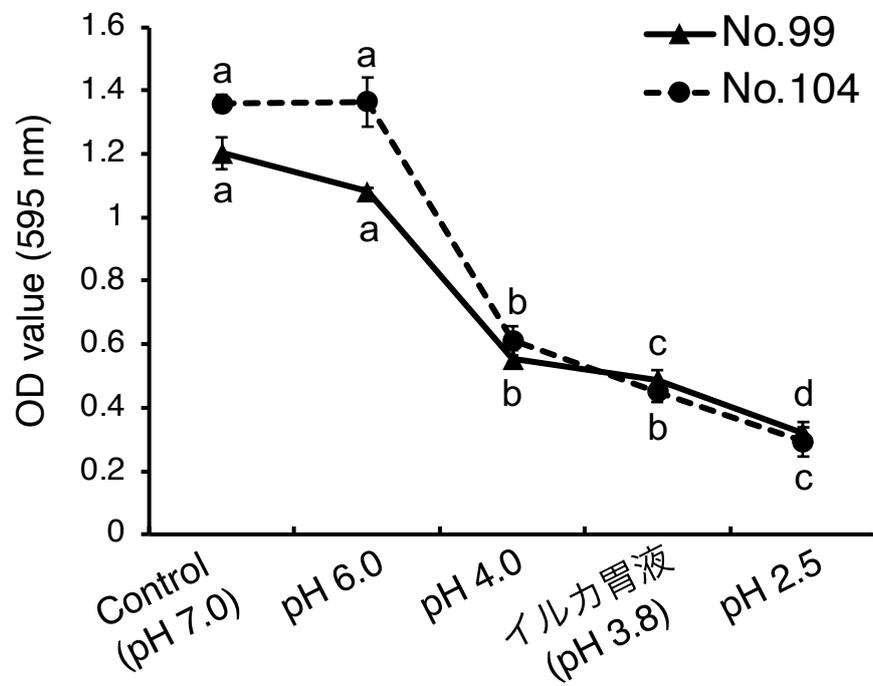


図 3.3 No.99 と No.104 の pH 耐性試験の結果. 図中の異なるアルファベットは有意差あり ($p < 0.05$) を示す.

総合考察

本研究の遂行により、イルカ類の腸内細菌叢に関する様々な知見が得られた。まず第 1 章では、野生下および飼育下ミナミバンドウイルカの腸内細菌叢を比較することにより、飼育がイルカの腸内細菌叢に与える影響を明らかにした。その結果、両群の細菌門および ASV レベルの組成は大きく異なっており、特に門レベルでは各群での最優占門の検出割合に顕著な差が見られた。さらに、飼育下個体の Evenness 指数は野生個体より有意に低い値であったことから、細菌叢のバランスが野生下個体に比べて偏っていることが判明した。この様な細菌叢の差異は様々な生物種で報告されており、抗生物質の使用や、野生下と比べ多様性の乏しい食餌内容がこの差異に大きく関与していると報告されている (Clemente *et al.* 2012; McKenzie *et al.* 2017)。飼育下個体には、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るが、この様な処置が野生個体に施されることは座礁個体への対応以外にはない。また、御蔵島周辺のミナミバンドウイルカは魚類や頭足類、甲殻類など約 20 種の生物を採餌している (Takahashi *et al.* 2020)。一方で、本研究で対象とした飼育下個体は 3 魚種のみ給餌されていた。従って、特にこれらの要因が飼育下イルカの腸内細菌叢の変化に影響していると考えられた。

また、飼育下個体からは野生個体と比べ、*Morganella*, *Mycobacterium* および *Clostridium* 属などのイルカ病原性細菌が多く検出された。さらに、野

生個体が保有していた有用乳酸菌は飼育下個体から検出されなかった。これを上述の飼育下個体の腸内細菌叢の均衡度が野生個体より低いことと併せて考慮すると、病原性細菌による感染症により、飼育下個体の腸管ひいては全身の健康が脅かされるリスクが懸念される。今後、病原性細菌の分離培養を行い、イルカに対する病原性を明確にする必要がある。

以上より、本研究では野生下および飼育下イルカの腸内細菌叢の差異が初めて明らかになり、これらの結果は飼育下イルカの細菌感染症のリスク管理に警鐘を鳴らすものである。今後、野外からの個体の搬入時からの細菌叢の経時的な変動を捉えることや、抗生物質投与前後での差異を明らかにできれば、飼育下個体の腸内細菌叢管理に大きく貢献できると考える。

第 2 章では、腸内細菌叢の施設間での差異を探り、その差異に寄与する要因を推定するとともに、多様性の季節変動の有無を明らかにした。まず第 1 節では、国内 5 施設で飼育されているバンドウイルカの細菌叢組成および多様性指数の値は施設毎に特有であることが判明し、この差異には給餌されている餌生物種数と飼育形態が有意に関係していることがわかった。また、多様性指数と餌生物種数の関連性を調べると、給餌されている生物種が多い個体ほど、細菌叢の細菌種数および均衡度が高くなると判明した。次に、イルカ腸内細菌叢と餌生物/環境水との関連性を探った。その結果、プール飼育施設においてはイルカと環境水間で共通に見られる ASV が最も多かったが、生け簀飼育施設のイルカは餌生物の消化管内容物と共通の ASV を最も多く有していた。以上より、各施設で特有な細菌叢組成に

は、給餌される餌生物種とその数や、環境水を介した個体間伝播が主に寄与していることが示唆された。食餌由来の栄養成分組成の変化は腸内細菌叢に影響し (Flint *et al.* 2017), 多様性の乏しい食餌内容は海生哺乳類の腸内細菌叢の多様性を減少させるという報告がある (Eigeland *et al.* 2012; Delport *et al.* 2016)。また、イルカの餌である魚類のアミノ酸, 無機質および脂肪酸の含有量は魚種毎に異なる (Tacon and Metian 2013)。従って、餌生物種の多い施設の個体では多様な栄養素が腸内に供給され, その結果, 多様な細菌種が定着および増殖できると考えられた。また, Goldman *et al.* (2009) は, 生け簀飼育よりも環境水が循環している閉鎖的なプール飼育環境下では, 個体の吐き戻しや糞便により汚染された環境水を介してイルカ個体間で細菌伝播が生じることを示唆している。本研究におけるプール飼育施設のイルカと環境水の細菌叢に共通に見られる ASV が最も多いという結果は, これを支持するものとなった。

第 2 節では, 同一施設のバンドウイルカを対象に 1 年間, 月 1 回間隔で同個体から糞便を採取し, 多様性指数の季節変動の有無を探ると共に, 環境水温および外気温との関連性を調べた。その結果, 多様性指数は季節間で有意に差はなく, 年間を通して安定していた。また, 多様性指数と環境水温および外気温との関連性を探ったが, どちらの要因も多様性指数との有意な関係性は見られなかった。これまで, イルカの細菌叢の季節変動に関しては, 唯一噴気孔で比較的安定した多様性が報告されている (Vendl *et al.* 2021) ことから, イルカ細菌叢の多様性は周辺環境の温度変化や, それ

に伴う体内環境の変化に対して堅牢であると予想された。このような多様性の安定性が何によって維持されているかは不明であるが、本研究の結果よりイルカ腸内細菌叢の多様性のベースラインとなる有益な情報をできた。

以上、第 2 章では複数施設間での細菌叢の差異と、それに寄与する要因を推定するとともに、多様性の季節変動についても調査した。その結果、施設毎に特有な細菌叢組成には、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ことが示唆された。また、餌生物種数と細菌叢の多様性の関係性から、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、多種多様な餌生物種を与えることが有効であると示唆された。さらに、多様性は年間を通して安定していたことから、本研究の結果は、今後、個体の体調不良や、抗生物質投与の多様性への影響を評価するための指標として役立つと期待される。

第 3 章では、飼育下個体の腸内環境維持に役立つプロバイオティクス候補菌の取得を目指した。まず第 1 節では、野生スジイルカ、ハナゴンドウ、シワハイルカ、およびアカボウクジラ、そして飼育下バンドウイルカの糞便から乳酸菌の選択培地を用いて乳酸菌の分離を試みた。16S rRNA 遺伝子領域による分離株のスクリーニングの結果、乳酸菌の中でも *Enterococcus* 属、*Streptococcus* 属および *Lactococcus* 属に含まれる計 9 細菌種が分離された。これらについて詳細な菌種同定を行った結果、*Enterococcus faecalis* が最も多かったことから、同細菌種は鯨類の主要な乳酸菌であると示唆された。また、*Lactococcus* 属に分類された 9 株は全て *Lactococcus lactis* subsp.

lactis であると同定された。鯨類からの同細菌種の分離は本研究が初めてである。以上、野生および飼育下鯨類からの乳酸菌分離に成功した。

Enterococcus faecalis と *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* には、バクテリオシンであるエンテロシン (Huang *et al.* 2013) およびナイシン (Cheigh and Pyun 2005) を産生する株が存在する。第 2 節では、第 1 節で分離された *Enterococcus faecalis* (EF-1-EF-55 株) と *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (No.98-100, No.102-104, No.140-142 株) の抗菌活性能を明らかにし、活性が見られた場合にはバクテリオシン生合成遺伝子の同定を試みた。さらに、将来的なプロバイオティクスとしての利用を見据え、菌株の pH 耐性試験を行い、イルカ胃内で生存可能か否かを明らかにした。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の結果、EF-1-EF-55 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、No.99 株はこれまでイルカに病原性を示唆されている *Vibrio alginolyticus* に対して、No.104 は *V. alginolyticus*, *Enterococcus faecalis* および *Enterococcus hirae* に対して活性を示した。次に全ゲノム解析によりバクテリオシン生合成遺伝子の同定を試みた結果、ナイシン A/Z 生合成関連遺伝子群が同定され、ナイシン前駆体のアミノ酸配列はナイシン Z と 100% 相同であった。以上より、No.99 および No.104 株の抗菌活性はナイシン産生によるものであると示唆された。次に No.99 および No.104 株の pH 耐性試験を行ったところ、両株はイルカの胃液 (pH 3.8) および pH 2.5 環境下で生存、増殖できたことから、イルカ胃内環境を通過し腸管に到達できると期待される。

以上、第 3 章では鯨類の乳酸菌について調べ、プロバイオティクス候補菌の取得を目指した。*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* No.98 および No.104 株は、イルカ病原性細菌に対して抗菌活性を示すことや、イルカ胃内環境で生存、増殖できることから、両株は飼育下イルカの腸内環境改善に大きく役立つものと期待される。そして、将来的なプロバイオティクスとしての利用には、胆汁酸耐性試験や、腸内での定着性および簡便な投与方法を検討する必要がある。

本研究では、飼育がイルカ腸内細菌叢に与えるということを初めて明らかにした。複数飼育施設での腸内細菌叢を比較した結果、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、多種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。さらに多様性の年間を通した解析から、今後個体の多様性の変化を評価する指標となる結果を明らかにした。また、イルカ病原性細菌の抑制、排除に有用であると思われる細菌株を取得した。本研究はこれまで不明な点が多かったイルカ腸内細菌の基礎的な知見を提供しており、今後の腸内細菌を介したイルカ個体の健康管理の確立に向け大きな貢献になるものと期待される。

謝辞

本研究を進めるに当たり，適切な助言を頂き，終始熱心なご指導を頂いた日本大学生物資源科学部海洋生物資源科学科の鈴木美和教授，澤山英太郎専任講師，朝比奈潔特任教授に謹んで感謝致します。

実験を行うに当たり，懇親なるご指導およびご助言を頂きました日本大学生物資源科学部獣医学科の伊藤琢也教授，瀬川太雄助教，同大学生物資源科学部くらしの生物学科の安齋寛特任教授，炭山大輔専任講師に心から感謝致します。

うみたま体験パーク「つくみイルカ島」の澤修作氏，沖縄美ら海水族館の植田啓一獣医，新江ノ島水族館の白形知佳獣医，越前松島水族館の菊地香織獣医，鴨川シーワールドの信時優子氏，獣医および飼育員の皆様には貴重なバンドウイルカの試料を何度もご提供頂いた。皆様のご協力なくしては本研究を実施することはできなかった。皆様に心からお礼申し上げる。

海洋生物生理学研究室卒業生の阿久澤こゆき氏，御蔵島観光協会の小木万布氏，御蔵島イルカチーム Mido の皆様，島民の皆様の協力なくしては新鮮な野生南バンドウイルカの糞便採取は叶わなかった。ここに厚く感謝致します。

日本大学生物資源科学部海洋生物資源科学科海洋生物生理学研究室および他大学の先輩，同輩，後輩には多くの励ましと研究に打ち込む熱意を頂いた。ここに感謝の意を表する。両親，友人たちに，長い研究期間にわたる

ご理解と励ましを頂いたことに感謝申し上げます。

最後に、自身の貴重な試料を提供してくれた全てのイルカ、クジラ達に感謝致します。

引用文献

- Alegría, Á., Delgado, S., Roces, C., López, B. and Mayo, B. (2010) Bacteriocins produced by wild *Lactococcus lactis* strains isolated from traditional, starter-free cheeses made of raw milk. *International Journal of Food Microbiology* **143**, 61-66.
- Anderson, M.J. (2014) Permutational multivariate analysis of variance (PERMANOVA). *Wiley statsref: statistics reference online*, 1-15.
- Biedermann, L. and Rogler, G. (2015) The intestinal microbiota: its role in health and disease. *European Journal of Pediatrics* **174**, 151-167.
- Blin, K., Shaw, S., Kloosterman, A.M., Charlop-Powers, Z., van Wezel, G.P., Medema, Marnix H. and Weber, T. (2021) antiSMASH 6.0: improving cluster detection and comparison capabilities. *Nucleic Acids Research* **49**, 29-35.
- Bloodgood, J.C., Hernandez, S.M., Isaiah, A., Suchodolski, J.S., Hoopes, L.A., Thompson, P.M., Waltzek, T.B. and Norton, T.M. (2020) The effect of diet on the gastrointestinal microbiome of juvenile rehabilitating green turtles (*Chelonia mydas*). *PloS one* **15**, e0227060.
- Bo, T.-B., Zhang, X.-Y., Wen, J., Deng, K., Qin, X.-W. and Wang, D.-H. (2019) The microbiota–gut–brain interaction in regulating host metabolic adaptation to cold in male Brandt’s voles (*Lasiopodomys brandtii*). *The ISME journal* **13**, 3037-3053.

- Borbón-García, A., Reyes, A., Vives-Flórez, M. and Caballero, S. (2017) Captivity shapes the gut microbiota of Andean bears: insights into health surveillance. *Frontiers in microbiology* **8**, 1316.
- Bray, J.R. and Curtis, J.T. (1957) An ordination of the upland forest communities of southern Wisconsin. *Ecological Monographs* **27**, 326-349.
- Buck, J., Overstrom, N., Patton, G., Anderson, H. and Gorzelany, J. (1991) Bacteria associated with stranded cetaceans from the northeast USA and southwest Florida Gulf coasts. *Diseases of Aquatic Organisms* **10**, 147-152.
- Buck, J.D., Shepard, L.L. and Spotte, S. (1987) *Clostridium perfringens* as the cause of death of a captive Atlantic bottlenosed dolphin (*Tursiops truncatus*). *Journal of Wildlife Diseases* **23**, 488-491.
- Buck, J.D., Wells, R.S., Rhinehart, H.L. and Hansen, L.J. (2006) Aerobic microorganisms associated with free-ranging bottlenose dolphins in coastal Gulf of Mexico and Atlantic Ocean waters. *Journal of Wildlife Diseases* **42**, 536-544.
- Buddington, K.K., Holmes, W.E., Clemons-Chevis, C.L., Solangi, M.A., Vanderpool, D. and Buddington, R.K. (2006) Oral administration of sucrose solutions and measurement of serum sucrose concentrations to evaluate gastric permeability in adult bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*). *American Journal of Veterinary Research* **67**, 931-935.
- Callahan, B.J., McMurdie, P.J., Rosen, M.J., Han, A.W., Johnson, A.J.A. and

- Holmes, S.P. (2016) DADA2: high-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature Methods* **13**, 581-583.
- Cardona, C., Lax, S., Larsen, P., Stephens, B., Hampton-Marcell, J., Edwardson, C.F., Henry, C., Van Bonn, B. and Gilbert, J.A. (2018) Environmental sources of bacteria differentially influence host-associated microbial dynamics. *Msystems* **3**, e00052-00018.
- Cheigh, C.-I. and Pyun, Y.-R. (2005) Nisin biosynthesis and its properties. *Biotechnology Letters* **27**, 1641-1648.
- Clayton, J.B., Vangay, P., Huang, H., Ward, T., Hillmann, B.M., Al-Ghalith, G.A., Travis, D.A., Long, H.T., Van Tuan, B. and Van Minh, V. (2016) Captivity humanizes the primate microbiome. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **113**, 10376-10381.
- Clayton, L.A., Stamper, M.A., Whitaker, B.R., Hadfield, C.A., Simons, B. and Mankowski, J.L. (2012) Mycobacterium abscessus pneumonia in an Atlantic bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*). *Journal of zoo and wildlife medicine: official publication of the American Association of Zoo Veterinarians* **43**, 961.
- Clemente, J.C., Ursell, L.K., Parfrey, L.W. and Knight, R. (2012) The impact of the gut microbiota on human health: an integrative view. *Cell* **148**, 1258-1270.
- Cockcroft, V. and Ross, G. (1990) Age, growth and reproduction in bottlenose

- dolphins from the east coast of southern Africa. *Fish Bull* **88**, 289-302.
- Danil, K., Leger, J.A.S., Dennison, S., De Quirós, Y.B., Scadeng, M., Nilson, E. and Beaulieu, N. (2014) Clostridium perfringens septicemia in a long-beaked common dolphin Delphinus capensis: an etiology of gas bubble accumulation in cetaceans. *Diseases of Aquatic Organisms* **111**, 183-190.
- Delport, T.C., Power, M.L., Harcourt, R.G., Webster, K.N. and Tetu, S.G. (2016) Colony location and captivity influence the gut microbial community composition of the Australian sea lion (*Neophoca cinerea*). *Applied and Environmental Microbiology* **82**, 3440-3449.
- Di Francesco, G., Cammà, C., Curini, V., Mazzariol, S., Proietto, U., Ferri, N., Di Provvio, A. and Di Guardo, G. Pleuropneumonia associated with a Mycoplasma-like agent in a bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*) stranded along the coast of Abruzzo, Italy.
- Diaz, M.-A., Bik, E.M., Carlin, K.P., Venn-Watson, S.K., Jensen, E.D., Jones, S.E., Gaston, E.P., Relman, D.A. and Versalovic, J. (2013) Identification of Lactobacillus strains with probiotic features from the bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*). *Journal of Applied Microbiology* **115**, 1037-1051.
- Eigeland, K.A., Lanyon, J.M., Trott, D.J., Ouwkerk, D., Blanshard, W., Milinovich, G.J., Gulino, L.-M., Martinez, E., Merson, S. and Klieve, A.V. (2012) Bacterial community structure in the hindgut of wild and captive dugongs (*Dugong dugon*). *Aquatic Mammals* **38**, 402.

- Elfadl, A.K., Lee, S.-W., Kim, J.-H., Lee, K.-L., Ullah, H.A., Chung, M.-J., Ghim, S.-G., Lee, E.-J., Kim, Y.D. and Kim, S.-M. (2017) Fatal fibrino-hemorrhagic bronchopneumonia associated with *Morganella morganii* in a bottlenose dolphin: a case report. *Diseases of Aquatic Organisms* **127**, 41-47.
- Erwin, P.M., Rhodes, R.G., Kiser, K.B., Keenan-Bateman, T.F., McLellan, W.A. and Pabst, D.A. (2017) High diversity and unique composition of gut microbiomes in pygmy (*Kogia breviceps*) and dwarf (*K. sima*) sperm whales. *Scientific reports* **7**, 1-11.
- Etheridge, M.E., Yolken, R.H. and Vonderfecht, S.L. (1988) *Enterococcus hirae* implicated as a cause of diarrhea in suckling rats. *Journal of Clinical Microbiology* **26**, 1741-1744.
- Ferreira Junior, R.S., Siqueira, A.K., Campagner, M.V., Salerno, T., Soares, T., Lucheis, S.B., Paes, A.C. and Barraviera, B. (2009) Comparison of wildlife and captivity rattlesnakes (*Crotalus durissus terrificus*) microbiota. *Pesquisa Veterinária Brasileira* **29**, 999-1003.
- Flint, H.J., Duncan, S.H. and Louis, P. (2017) The impact of nutrition on intestinal bacterial communities. *Current Opinion in Microbiology* **38**, 59-65.
- Frank, D.N., Amand, A.L.S., Feldman, R.A., Boedeker, E.C., Harpaz, N. and Pace, N.R. (2007) Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. *Proceedings*

of the National Academy of Sciences **104**, 13780-13785.

Fuller, R. and Cole, C. (1989) The scientific basis of the probiotic concept.

Probiotics Theory and Applications Chalcome Publications, 1-14.

Godoy-Vitorino, F., Rodriguez-Hilario, A., Alves, A.L., Gonçalves, F., Cabrera-

Colon, B., Mesquita, C.S., Soares-Castro, P., Ferreira, M., Marçalo, A. and

Vingada, J. (2017) The microbiome of a striped dolphin (*Stenella coeruleoalba*) stranded in Portugal. *Research in Microbiology* **168**, 85-93.

Goldman, C., Matteo, M., Loureiro, J., Degrossi, J., Teves, S., Heredia, S.R.,

Alvarez, K., González, A.B., Catalano, M. and Boccio, J. (2009) Detection of *Helicobacter* and *Campylobacter* spp. from the aquatic environment of marine mammals. *Veterinary Microbiology* **133**, 287-291.

Guttman, L. (1968) A general nonmetric technique for finding the smallest

coordinate space for a configuration of points. *Psychometrika* **33**, 469-506.

Hammer, Ø., Harper, D.A. and Ryan, P.D. (2001) PAST: Paleontological statistics

software package for education and data analysis. *Palaeontologia electronica* **4**, 9.

Han, G.G., Lee, J.-Y., Jin, G.-D., Park, J., Choi, Y.H., Kang, S.-K., Chae, B.J.,

Kim, E.B. and Choi, Y.-J. (2018) Tracing of the fecal microbiota of commercial pigs at five growth stages from birth to shipment. *Scientific reports* **8**, 1-9.

Harris, L.J., Fleming, H. and Klaenhammer, T. (1992) Characterization of two

- nisin-producing *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* strains isolated from a commercial sauerkraut fermentation. *Applied and Environmental Microbiology* **58**, 1477-1483.
- Herlemann, D.P., Labrenz, M., Jürgens, K., Bertilsson, S., Waniek, J.J. and Andersson, A.F. (2011) Transitions in bacterial communities along the 2000 km salinity gradient of the Baltic Sea. *The ISME journal* **5**, 1571-1579.
- Hirayama, Y. and Endo, A. (2016) Taxonomy of lactic acid bacteria up-to-date and minimal standards for description of new taxa of lactic acid bacteria recommended by subcommittee on the taxonomy of *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* and related organisms. *J Intest Microbiol* **30**, 17-28.
- Hsieh, T., Ma, K. and Chao, A. (2016) iNEXT: an R package for rarefaction and extrapolation of species diversity (Hill numbers). *Methods in Ecology and Evolution* **7**, 1451-1456.
- Huang, E., Zhang, L., Chung, Y.-K., Zheng, Z. and Yousef, A.E. (2013) Characterization and application of enterocin RM6, a bacteriocin from *Enterococcus faecalis*. *BioMed research international* **2013**.
- Huynh, M.D. and Kitts, D.D. (2009) Evaluating nutritional quality of pacific fish species from fatty acid signatures. *Food Chemistry* **114**, 912-918.
- Itoi, S., Abe, T., Washio, S., Ikuno, E., Kanomata, Y. and Sugita, H. (2008) Isolation of halotolerant *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* from intestinal tract of coastal fish. *International Journal of Food Microbiology* **121**, 116-121.

- Itoi, S., Uchida, J., Takanashi, S., Narita, T., Abe, K., Naya, S. and Sugita, H. (2014) The clam *Meretrix lamarckii* (Bivalvia: Veneridae) is a rich repository of marine lactic acid bacterial strains. *Annals of microbiology* **64**, 1267-1274.
- Itoi, S., Yuasa, K., Washio, S., Abe, T., Ikuno, E. and Sugita, H. (2009) Phenotypic variation in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* isolates derived from intestinal tracts of marine and freshwater fish. *Journal of Applied Microbiology* **107**, 867-874.
- Izquierdo, E., Wagner, C., Marchioni, E., Aoude-Werner, D. and Ennahar, S. (2009) Enterocin 96, a novel class II bacteriocin produced by *Enterococcus faecalis* WHE 96, isolated from Munster cheese. *Applied and Environmental Microbiology* **75**, 4273-4276.
- Jaing, C., Thissen, J.B., Gardner, S., McLoughlin, K., Slezak, T., Bossart, G.D. and Fair, P.A. (2015) Pathogen surveillance in wild bottlenose dolphins *Tursiops truncatus*. *Diseases of Aquatic Organisms* **116**, 83-91.
- Kanamori, Y., Hashizume, K., Sugiyama, M., Morotomi, M. and Yuki, N. (2001) Combination therapy with *Bifidobacterium breve*, *Lactobacillus casei*, and galactooligosaccharides dramatically improved the intestinal function in a girl with short bowel syndrome: a novel synbiotics therapy for intestinal failure. *Digestive Diseases and Sciences* **46**, 2010-2016.
- Kastelein, R. and Wiepkema, C.S.a.P. (1997) Food consumption and growth of

Atlantic bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*). *Food consumption and growth of marine mammals*, 73-92.

Kautsar, S.A., Blin, K., Shaw, S., Navarro-Muñoz, J.C., Terlouw, B.R., van der Hooft, J.J.J., van Santen, J.A., Tracanna, V., Suarez Duran, H.G., Pascal Andreu, V., Selem-Mojica, N., Alanjary, M., Robinson, S.L., Lund, G., Epstein, S.C., Sisto, A.C., Charkoudian, L.K., Collemare, J., Linington, R.G., Weber, T. and Medema, M.H. (2019) MIBiG 2.0: a repository for biosynthetic gene clusters of known function. *Nucleic Acids Research* **48**, 454-458.

Kerry, R.G., Patra, J.K., Gouda, S., Park, Y., Shin, H.-S. and Das, G. (2018) Benefaction of probiotics for human health: A review. *Journal of Food and Drug Analysis* **26**, 927-939.

Khakisahneh, S., Zhang, X.-Y., Nouri, Z. and Wang, D.-H. (2020) Gut microbiota and host thermoregulation in response to ambient temperature fluctuations. *Msystems* **5**, e00514-00520.

Kimoto, H., Nomura, M., Kobayashi, M., Okamoto, T. and Ohmomo, S. (2004) Identification and probiotic characteristics of *Lactococcus* strains from plant materials. *Japan Agricultural Research Quarterly: JARQ* **38**, 111-117.

Klaenhammer, T.R. (1993) Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews* **12**, 39-85.

Klijn, N., Weerkamp, A.H. and De Vos, W. (1995) Detection and characterization

- of lactose-utilizing *Lactococcus* spp. in natural ecosystems. *Applied and Environmental Microbiology* **61**, 788-792.
- Kolde, R. (2019) pheatmap: pretty heatmaps. R package version 1.0. 12. . In <https://CRAN.R-project.org/package=pheatmap>.
- Kuwano, K., Tanaka, N., Shimizu, T., Nagatoshi, K., Nou, S. and Sonomoto, K. (2005) Dual antibacterial mechanisms of nisin Z against Gram-positive and Gram-negative bacteria. *International Journal of Antimicrobial Agents* **26**, 396-402.
- Lahti, L. and Shetty, S. (2018) Introduction to the microbiome R package. In <http://microbiome.github.io>.
- Lane, D. (1991) 16S/23S rRNA sequencing. In *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. New York, NY, USA: John Wiley & Sons.
- Liu, B. and Dong, X. (2002) *Lactobacillus pantheris* sp. nov., isolated from faeces of a jaguar. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **52**, 1745-1748.
- Liu, Q., Ni, X., Wang, Q., Peng, Z., Niu, L., Xie, M., Lin, Y., Zhou, Y., Sun, H. and Pan, K. (2019) Investigation of lactic acid bacteria isolated from giant panda feces for potential probiotics in vitro. *Probiotics and antimicrobial proteins* **11**, 85-91.
- Ludwig, W., Schleifer, K.H. and Whitman, W.B. (2015) Lactobacillales ord. nov. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*, 1-1.

- Maurice, C.F., Knowles, S.C., Ladau, J., Pollard, K.S., Fenton, A., Pedersen, A.B. and Turnbaugh, P.J. (2015) Marked seasonal variation in the wild mouse gut microbiota. *The ISME journal* **9**, 2423-2434.
- McKenzie, V.J., Song, S.J., Delsuc, F., Prest, T.L., Oliverio, A.M., Korpita, T.M., Alexiev, A., Amato, K.R., Metcalf, J.L. and Kowalewski, M. (2017) The effects of captivity on the mammalian gut microbiome. *Integrative and Comparative Biology* **57**, 690-704.
- Meier-Kolthoff, J.P., Carbasse, J.S., Peinado-Olarte, R.L. and Göker, M. (2021) TYGS and LPSN: A database tandem for fast and reliable genome-based classification and nomenclature of prokaryotes. *Nucleic Acids Research*.
- Miya, M., Sato, Y., Fukunaga, T., Sado, T., Poulsen, J., Sato, K., Minamoto, T., Yamamoto, S., Yamanaka, H. and Araki, H. (2015) MiFish, a set of universal PCR primers for metabarcoding environmental DNA from fishes: detection of more than 230 subtropical marine species. *Royal Society open science* **2**, 150088.
- Mladineo, I., Hrabar, J., Vrbatović, A., Duvnjak, S., Gomerčić, T. and Đuras, M. (2019) Microbiota and gut ultrastructure of *Anisakis pegreffii* isolated from stranded cetaceans in the Adriatic Sea. *Parasites & vectors* **12**, 1-15.
- Nelson, T.M., Rogers, T.L., Carlini, A.R. and Brown, M.V. (2013) Diet and phylogeny shape the gut microbiota of Antarctic seals: a comparison of wild and captive animals. *Environmental Microbiology* **15**, 1132-1145.

- Nemoto, H., Kataoka, K., Ishikawa, H., Ikata, K., Arimochi, H., Iwasaki, T., Ohnishi, Y., Kuwahara, T. and Yasutomo, K. (2012) Reduced diversity and imbalance of fecal microbiota in patients with ulcerative colitis. *Digestive Diseases and Sciences* **57**, 2955-2964.
- Nicklas, J.L., Moisan, P., Stone, M.R. and Gookin, J.L. (2010) In situ molecular diagnosis and histopathological characterization of enteroadherent *Enterococcus hirae* infection in pre-weaning-age kittens. *Journal of Clinical Microbiology* **48**, 2814-2820.
- Odamaki, T., Kato, K., Sugahara, H., Hashikura, N., Takahashi, S., Xiao, J.-z., Abe, F. and Osawa, R. (2016) Age-related changes in gut microbiota composition from newborn to centenarian: a cross-sectional study. *BMC Microbiology* **16**, 1-12.
- Oksanen, J., Blanchet, F., Friendly, M., Kindt, R., Legendre, P. and McGlinn, D. (2020) vegan: community ecology package. R package version 2.5-7. 2020. In <https://CRAN.R-project.org/package=vegan>.
- Punyaappa-path, S., Phumkhachorn, P. and Rattanachaikunsopon, P. (2015) Nisin: production and mechanism of antimicrobial action. *International Journal of Current Research and Review* **7**, 47.
- Ryu, E. (1940) A Simple Method of Differentiation Between Gram-positive and Gram-negative Organisms Without Staining. *Kitasato Archives of Experimental Medicine* **17**, 58-63.

- Sandri, C., Correa, F., Spiezio, C., Trevisi, P., Luise, D., Modesto, M., Remy, S., Muzungaile, M.-M., Checcucci, A. and Zaborra, C.A. (2020) Fecal Microbiota Characterization of Seychelles Giant Tortoises (*Aldabrachelys gigantea*) Living in Both Wild and Controlled Environments. *Frontiers in microbiology* **11**, 2474.
- Schleifer, K., Kraus, J., Dvorak, C., Kilpper-Bälz, R., Collins, M. and Fischer, W. (1985) Transfer of *Streptococcus lactis* and related streptococci to the genus *Lactococcus* gen. nov. *Systematic and Applied Microbiology* **6**, 183-195.
- Schleifer, K.H. and Kilpper-Bälz, R. (1984) Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to the genus *Enterococcus* nom. rev. as *Enterococcus faecalis* comb. nov. and *Enterococcus faecium* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **34**, 31-34.
- Schroeder, J., Wallace, J., Cates, M., Greco, S. and Moore, P. (1985) An infection by *Vibrio alginolyticus* in an Atlantic bottlenose dolphin housed in an open ocean pen. *Journal of Wildlife Diseases* **21**, 437-438.
- Scott, K.P., Gratz, S.W., Sheridan, P.O., Flint, H.J. and Duncan, S.H. (2013) The influence of diet on the gut microbiota. *Pharmacological Research* **69**, 52-60.
- Smith, S.C., Chalker, A., Dewar, M.L. and Arnould, J.P. (2013) Age-related differences revealed in Australian fur seal *Arctocephalus pusillus doriferus*

- gut microbiota. *FEMS Microbiology Ecology* **86**, 246-255.
- Sommer, F., Ståhlman, M., Ilkayeva, O., Arnemo, J.M., Kindberg, J., Josefsson, J., Newgard, C.B., Fröbert, O. and Bäckhed, F. (2016) The gut microbiota modulates energy metabolism in the hibernating brown bear *Ursus arctos*. *Cell reports* **14**, 1655-1661.
- Stevens, K., Sheldon, B., Klapes, N.A. and Klaenhammer, T. (1991) Nisin treatment for inactivation of *Salmonella* species and other gram-negative bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* **57**, 3613-3615.
- Suzuki, A., Ueda, K., Segawa, T. and Suzuki, M. (2019) Fecal microbiota of captive Antillean manatee *Trichechus manatus manatus*. *FEMS Microbiology Letters* **366**, fnz134.
- Suzuki, M., Banno, K., Usui, T., Funasaka, N., Segawa, T., Kirihata, T., Kamisako, H., Ueda, K. and Munakata, A. (2018) Seasonal changes in plasma levels of thyroid hormones and the effects of the hormones on cellular ATP content in common bottlenose dolphin. *General and Comparative Endocrinology* **262**, 20-26.
- Tacon, A.G. and Metian, M. (2013) Fish matters: importance of aquatic foods in human nutrition and global food supply. *Reviews in Fisheries Science* **21**, 22-38.
- Takahashi, R., Sakai, M., Kogi, K., Morisaka, T., Segawa, T. and Ohizumi, H. (2020) Prey Species and Foraging Behaviour of Indo-Pacific Bottlenose

- Dolphins (*Tursiops aduncus*) Around Mikura Island in Japan. *Aquatic Mammals* **46**.
- Tian, J., Du, J., Lu, Z., Han, J., Wang, Z., Li, D., Guan, X. and Wang, Z. (2020) Distribution of microbiota across different intestinal tract segments of a stranded dwarf minke whale, *Balaenoptera acutorostrata*. *MicrobiologyOpen* **9**, e1108.
- Tian, J., Du, J., Lu, Z., Li, Y., Li, D., Han, J., Wang, Z. and Guan, X. (2021) Differences in the fecal microbiota due to the sexual niche segregation of captive Gentoo penguins *Pygoscelis papua*. *Polar Biology* **44**, 473-482.
- Tsuchida, S., Kakooza, S., Mbehang Nguema, P.P., Wampande, E.M. and Ushida, K. (2018) Characteristics of gorilla-specific *Lactobacillus* isolated from captive and wild gorillas. *Microorganisms* **6**, 86.
- Tsuji, K., Kogi, K., Sakai, M. and Morisaka, T. (2017) Emigration of Indo-Pacific Bottlenose Dolphins (*Tursiops aduncus*) from Mikura Island, Japan. *Aquatic Mammals* **43**.
- Ushida, K., Segawa, T., Tsuchida, S. and Murata, K. (2015) Cecal bacterial communities in wild Japanese rock ptarmigans and captive Svalbard rock ptarmigans. *Journal of Veterinary Medical Science* **78**, 251-257.
- Vela, A., Fernandez, A., los Monteros, A.E., Goyache, J., Herraiz, P., Tames, B., Cruz, F., Domínguez, L. and Fernandez-Garayzabal, J. (2008) *Lactobacillus ceti* sp. nov., isolated from beaked whales (*Ziphius cavirostris*).

- International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **58**, 891-894.
- Vela, A.I., Fernández, A., De Quirós, Y.B., Herráez, P., Domínguez, L. and Fernández-Garayzábal, J.F. (2011) *Weissella ceti* sp. nov., isolated from beaked whales (*Mesoplodon bidens*). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **61**, 2758-2762.
- Vendl, C., Nelson, T., Ferrari, B., Thomas, T. and Rogers, T. (2021) Highly abundant core taxa in the blow within and across captive bottlenose dolphins provide evidence for a temporally stable airway microbiota. *BMC Microbiology* **21**, 1-15.
- Venn-Watson, S., Smith, C.R. and Jensen, E.D. (2008) Primary bacterial pathogens in bottlenose dolphins *Tursiops truncatus*: needles in haystacks of commensal and environmental microbes. *Diseases of Aquatic Organisms* **79**, 87-93.
- Vijayaram, S. and Kannan, S. (2018) Probiotics: The marvelous factor and health benefits. *Biomedical and Biotechnology Research Journal (BBRJ)* **2**, 1.
- Wan, X., Li, J., Cheng, Z., Ao, M., Tian, R., Mclaughlin, R.W., Zheng, J. and Wang, D. (2021) The intestinal microbiome of an Indo-Pacific humpback dolphin (*Sousa chinensis*) stranded near the Pearl River Estuary, China. *Integrative Zoology* **16**, 287-299.
- Wang, J., Chou, L. and White, B. (2000) Differences in the external morphology

- of two sympatric species of bottlenose dolphins (genus *Tursiops*) in the waters of China. *Journal of Mammalogy* **81**, 1157-1165.
- Wang, J., Chou, L.S. and White, B. (1999) Mitochondrial DNA analysis of sympatric morphotypes of bottlenose dolphins (genus: *Tursiops*) in Chinese waters. *Molecular Ecology* **8**, 1603-1612.
- Wilkinson, L. (2011) ggplot2: elegant graphics for data analysis by WICKHAM, H. In *Biometrics*. pp.671-679: Wiley Online Library.
- Yoon, S.-H., Ha, S.-M., Kwon, S., Lim, J., Kim, Y., Seo, H. and Chun, J. (2017) Introducing EzBioCloud: a taxonomically united database of 16S rRNA gene sequences and whole-genome assemblies. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **67**, 1613.
- Zhang, Q., Yu, Y., Vélasquez, J.E. and Van Der Donk, W.A. (2012) Evolution of lanthipeptide synthetases. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **109**, 18361-18366.
- Zhang, X.-Y. and Wang, D.-H. (2006) Energy metabolism, thermogenesis and body mass regulation in Brandt's voles (*Lasiopodomys brandtii*) during cold acclimation and rewarming. *Hormones and Behavior* **50**, 61-69.
- 益田 時, 善藤威, 園元, 謙. (2010) ナイシン—類稀な抗菌物質—. *ミルクサイエンス* **59**, 59-65.