

学 位 論 文 要 旨

畜産科学 専攻 博士後期 課程

学籍番号 21180003

氏 名 矢野 琳太郎



論文題目： ウマ消化管内発酵の安定化に向けた細菌叢動態に基づく多面的解析
(Multifaceted study based on microbial dynamics for stable fermentation in equine hindgut)

要旨

ウマの下部消化管内には多種多様な細菌が共生しており、それらはウマが摂取した飼料の分解や、病原性細菌の増殖抑制に密接に関連している。したがって、ウマにおいては下部消化管内細菌叢が正常かつ安定して作用することが宿主の栄養獲得、ひいては健康を維持する上で重要である。本研究では、糞便内細菌叢および代謝物解析を実施し、ウマの下部消化管内発酵を安定的に保つための基盤情報を集積することを目的として以下の研究を実施した。

本論文の序論に続く第2章では、濃厚飼料の多給が日本輓系種の下部消化管内発酵に与える影響を調査した。本研究では、帯広市ばんえい競馬場内の飼養管理が異なる2つの厩舎（濃厚飼料の重量割合：65%，HC区；50%，MC区）で管理されている日本輓系種を各厩舎10頭ずつ選抜し、それらの糞便内発酵性状および細菌叢を解析した。その結果、HC区ではMC区と比較して、糞便中の乳酸濃度が有意に高く、pHが有意に低かった。糞便内細菌叢解析では、HC区で細菌叢多様性の有意な低下がみられ、またデンプン分解菌として知られる *Streptococcus lutetiensis/equinus/infantarius* の相対的存在割合が有意に高かった。一方MC区では、繊維分解に関わる *Clostridium sacchaloalyticum* および *Ruminococcus albus* の近縁種の相対的存在割合が有意に高かった。このことから、濃厚飼料の過度な給与は、日本輓系種の下部消化管内でデンプン分解菌の急増をはじめとする異常発酵を誘発することが明らかとなった。また本結果は、飼料中の一般成分だけでなく下部消化管内細菌叢の動態にも焦点を当てた飼料設計の構築が重要であることを示唆するものである。

第3章では、疝痛の発症に関与し得る糞便内細菌叢構成およびその酵素機能を評価した。帯広市ばんえい競馬場内の同一厩舎で管理されている日本輓系種を過去2年間の疝痛罹患歴の有無に応じて分類し（疝痛区，n = 5；非疝痛区，n = 5）、これらの糞便内細菌叢および各試験区の代表1サンプルの機能遺伝子解析をおこなった。16S rRNA遺伝子解析の結果、疝痛区では非疝痛区と比較して繊維分解に関与し得る細菌群の相対的存在割合が低い傾向にあり、一方で乳酸産生菌の相対的存在割合が有意に高かった。細菌叢多様性を示す指数は疝痛区で低い傾向にあった。メタゲノム解析の結果、非疝痛区の代表1サンプルではセルロース分解およびヘミセルロース分解に関わる酵素（それぞれ5種）の検出割合が高かった。さらに、植物細胞壁に結合するモジュール3種の検出割合も高かった。このことから、繊維分解能力が低く、かつアシドーシスを誘発しやすい細菌叢を保有する個体は、疝痛を発症し易い可能性が示唆された。

第4章では、疝痛罹患歴の無い個体に多い傾向のある未同定細菌群RFP12の生態学的および系統学的解析を実施した。生態学的解析では、ヒト糞便、ラット盲腸、イヌ糞便、ブタ糞便、ウシルーメン液、およびウマ糞便におけるRFP12の分布パターンを比較した。系統学的解析では、ウマ糞便から得られたRFP12に割り当てられる10配列の16S rRNA遺伝子配列を、Verrucomicrobia subdivision Vに属する59の16S rRNA遺伝子配列、Kiritimatiellota門に属する4菌株の16S rRNA遺伝子配列、およびVerrucomicrobia subdivision Iに属する*Akkermansia muciniphila* Muc^Tの16S rRNA遺伝子配列と比較し、系統学的特徴を評価した。生態学的解析の結果、RFP12の相対的存在割合は、ヒト糞便、イヌ糞便、ラット盲腸およびブタ糞便と比較して、ウシルーメン液およびウマ糞便で有意に高かった。系統解析の結果、ウマ糞便から得られたRFP12に割り当てられる10配列は、草食動物の消化管や糞便から検出された配列と系統的に近いことが示された。本研究結果および第3章で得られた知見から、未同定細菌群RFP12は、ウマの下部消化管内において、植物繊維の分解または発酵を介した安定発酵および宿主の健康に寄与する有用菌である可能性が示された。

第5章では、開腹手術後に下痢を発症するサラブレッド種と発症しないサラブレッド種で糞便内細菌叢および代謝物の違いを明らかにし、術後下痢症の発症に関与する因子を探索することを目的として研究をおこなった。社台ホースクリニックで開腹手術を受けたサラブレッド種7頭（大腸病変6頭、小腸病変1頭）を本研究に用いた。術後7日以内の下痢の有無に応じて分類した（非下痢群，n=5；下痢群，n=3）。使用した抗菌薬、抗炎症薬は全馬共通であり、術後管理も概ね同様であった。糞便は可能な限り退院まで毎日採取し、合計53の糞便サンプルを16S rRNA遺伝子解析に用いた。メタボローム解析は、術後3日目までに採取した計15個サンプルを用いた。下痢の期間中、馬の下痢発症に関与する既知の病原性細菌は検出されなかった。細菌叢多様性指数には群間で差がなかったが、主座標分析では試験区間で有意差が認められた。糞便内代謝物解析の結果、非下痢群では抗炎症性作用が知られる化合物2種が特徴的であったが、下痢群では粘膜への炎症作用が知られる化合物1種が特徴的に検出された。本研究より、術後早期の下痢発症は、宿主が保有する細菌叢構成に関連した代謝産物の違いによって引き起こされた可能性が見出された。

上述した研究成果は、未培養細菌が大部分を占めるウマにおいて、これまで詳細に明らかにされてこなかった発酵異常や疾病発症の機序解明、ひいては安定発酵や個体の健康を維持する上で有用な基盤情報となり得るものである。