

〈原著〉

スイカエキス飲料水がイヌの腸内細菌叢に及ぼす影響

宮井 紗弥香¹⁾、藤原 恵利子²⁾、橋詰 利治³⁾、岡崎 登志夫¹⁾

Effects of a watermelon-extract-beverage on canine fecal microbiome

Sayaka Miyai¹⁾, Eriko Fujihara²⁾, Toshiharu Hashizume³⁾, Toshio Okazaki¹⁾

Summary We previously reported that a watermelon-extract (WM) beverage exerted anti-obesity and anti-urolithiatic effects, such as decreasing plasma leptin concentration and urine lithogenesis by increasing urine output in rats and dogs. To understand effects of a WM beverage on canine fecal condition and microbiome, a WM beverage was administrated to seven healthy dogs instead of water over 3-month period in this study. Consequently, the moisture content and pH in the feces narrowed to a certain range. Moreover, the variability of Bacteroidetes, Firmicutes, Fusobacteria and Proteobacteria has decreased, and converged to a certain ratio after the 3-month period.

Key words: Watermelon extract, Dog, Feces, Microbiome

I. 緒言

スイカにはリコピン、シトルリン、ビタミンC、 β -カロテンやさまざまなポリフェノールなどが含まれ、抗酸化作用や血管拡張作用などを示すことが報告されている¹⁻⁴⁾。私達はこれまでに、スイカ果実抽出物（スイカエキス）飲料水がイヌの血清レプチン濃度を有意に低下させる

ことや、尿比重の値を低下させ尿中のストルバイト結晶（リン酸アンモニウムマグネシウム結晶）やシュウ酸カルシウム結晶の形成を抑制することを報告してきた⁴⁾。

慢性腸症やシュウ酸カルシウム結石、肥満などの場合に、健康なイヌと比較して腸内細菌叢の多様性が異なることが報告されている⁵⁻⁷⁾。腸内細菌叢は栄養素の吸収やエネルギー利用、代

¹⁾ ヤマザキ動物看護大学動物看護学部動物看護学科
〒192-0364 東京都八王子市南大沢4-7-2

²⁾ ヤマザキ動物看護専門職短期大学動物トータルケア学科
〒150-0046 東京都渋谷区松濤2-16-5

³⁾ 株式会社萩原農場生産研究所
〒636-0222 奈良県磯城郡田原本町法貴寺984

¹⁾ Department of Animal Health Technology, Yamazaki University of Animal Health Technology, 4-7-2 Minami-osawa, Hachioji, Tokyo 192-0364, Japan

²⁾ Department of Animal Health Technology, Yamazaki Professional College of Animal Health Technology, Shoto 2-16-5, Shibuya-ku, Tokyo 150-0046, Japan

³⁾ Hagihara Farm Production Institute, 984 Hokiji, Tawaramoto, Nara 636-0222, Japan

連絡先：宮井 紗弥香
ヤマザキ動物看護大学動物看護学部動物看護学科
Tel: +81-042-689-6538
E-mail: s_miyai@yamazaki.ac.jp

受付日：2021年4月7日
採択日：2021年5月28日

謝恒常性などに深く関与しており、腸内細菌叢の破綻 (dysbiosis) は、大腸炎やがん、アレルギー、肥満、代謝性疾患など、イヌの健康に大きな影響を与える可能性がある^{5,7)}。近年、腸内細菌叢のバランスを整え様々な疾患の発症を予防するために、乳酸菌などのプロバイオティクスや食物繊維やオリゴ糖などのプレバイオティクスに関する報告が増えており^{7,8)}、食物繊維や植物由来のポリフェノールが配合されたイヌ用の特別療法食などの開発もなされている^{7,9)}。

このような背景から、本研究ではスイカエキス飲料水がイヌの腸内細菌叢にどのような影響を及ぼすのかを明らかにするために、イヌの糞便検体の水分含量やpHを測定すると同時に、腸内細菌叢のゲノムDNAを抽出し、メタ16S解析を実施したところ、興味深い結果が得られたので報告する。

II. 材料と方法

1. 対象動物

本研究は、ヤマザキ動物看護大学動物実験委員会に承認を受け (承認番号: 20190424-001)、指針に基づき一般家庭で飼育されている健康なイヌ7頭を用いて実施した。1世帯で飼育されているLabrador Retriever 5頭 (L1: 避妊雌2歳、L2: 避妊雌2歳、L3: 去勢雄2歳、L4: 避妊雌3歳、L5: 去勢雄3歳) および別の1世帯で飼育されているToy Poodle (T1: 去勢雄5歳、T2: 去勢雄5歳) に、2019年5月～8月の3ヶ月間、1日あたり150 mL/kgのスイカエキス飲料水を準備し、自由に飲用させた。食餌内容は、各個体が普段摂取している内容と同様にした。

2. 実験計画

1) スイカエキス飲料水の調整

スイカエキス飲料水は、種子採取用スイカ果実に終濃度75%になるようにエタノールを加え、ミキサーで破碎し5時間攪拌後、25,000 Gで5分間遠心し、上清分画を採取し、30℃のロータリーエバポレーターで濃縮乾固後、蒸留水を加えもとの重量に合わせ、アスコルビン酸を約50 mg/100 mLになるよう上記のエタノール抽出物0.6%と混合し作製した。

2) 糞便検体の採取

糞便検体は飲用前と飲用開始から3.0カ月後の2回、早朝に採取し、アネロパック・ケンキ (スギヤマゲン, 東京) パウチ内で-80℃にて保存した。

3) 糞便検体中の水分含量およびpHの測定

糞便検体の水分含量は湿重量と乾燥重量の差から算出し、pH測定は検体湿重量の5倍量の蒸留水で検体を懸濁し、直ちにpHメーター (ツインpHメーターII, HORIBA, 京都) にて測定した。

4) 糞便検体からのゲノムDNA抽出とメタ16S解析

糞便検体は、Fast DNA Stool Mini Kit (QIAGEN, Netherlands) を用いてプロトコールに従いゲノムDNAを抽出した。メタ16S解析はコスモバイオ株式会社 (東京) に委託し、抽出したゲノムDNAより16S rRNA遺伝子のV3-V4領域をHerculase II Fusion DNA Polymerase Nextera XT Index Kit V2 Library kit (Agilent, 東京) を用い、16S Metagenomic Sequencing Library Preparation Part #15044223 Rev. B プロトコールに従いPCRにより増幅された。さらに増幅産物はIllumina platformによってシーケンスされた (Illumina, U.S.A)。ペアードエンドリードは、FLASH version 1.2.11.を用いて回収され、キメラ配列を取り除きQuantitative Insight Into Microbial Ecology (QIME) version 2.0 を用いて分析された。クラスタリングは、CD-HIT-operational taxonomic unit (OTU) software^{10,11)} を用いて解析された。

III. 結果

1. スイカエキス飲料水飲用前後における糞便中水分含量とpHの変化

糞便中の水分含量とpHが腸内細菌叢に影響を与える可能性があるため、イヌ7頭からスイカエキス飲料水飲用前後に採取した糞便の水分含量を測定したところ、飲用後の水分含量は60%付近に収束し、最大水分含量を示したイヌの例では約20%減少したが、60%付近のイヌでは変化が少なかった。飲用後のpHは6.4付近に収束し、最大pHが6.77のイヌでは0.44低下したが、pH6.4付近のイヌではほとんど変化しなかった (Fig.1)。

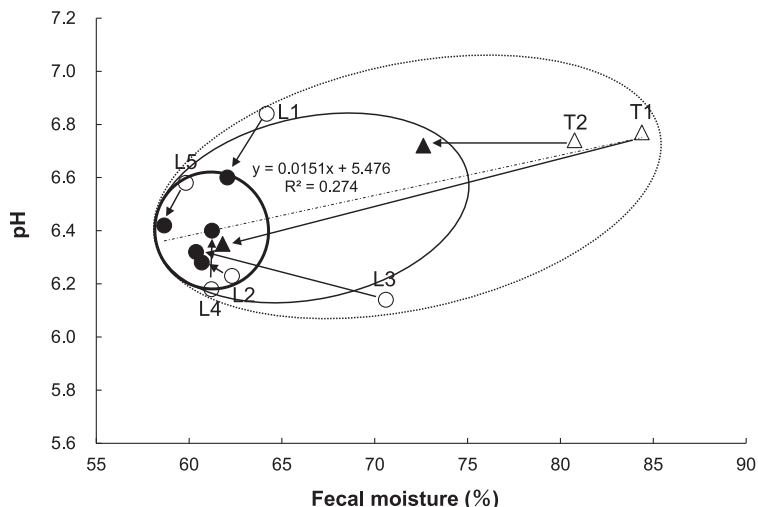


Fig. 1 Scatter plots of moisture content and pH in feces before and after drinking the watermelon-extract (WM) beverage.
 ○: Labrador Retriever before drinking the WM beverage, ●: Labrador Retriever after drinking the WM beverage, △: Toy Poodle before drinking the WM beverage, ▲: Toy Poodle after drinking the WM beverage, dotted line circle: ranges of fecal moisture content and pH before drinking the WM beverage, solid line circle: ranges of fecal moisture content and pH after drinking the WM beverage, bold solid line circle: narrowly certain ranges of fecal moisture content and pH after drinking the WM beverage, dashed line: regression line and coefficient.

2. スイカエキス飲料水飲用前後における糞便中細菌叢相対比率の変化

スイカエキス飲料水飲用前後の14検体の総read数は501977 reads、総OTU数は1827 OTUsでありmeans ± SDは101.5 ± 28.1であった。飲用前後の腸内細菌叢を比較したところ、スイカエキス飲料水飲用前にはBacteroidetes門、Firmicutes門、Fusobacteria門、Proteobacteria門の相対割合が個体によって大きく異なっていたが、飲用後にはT2を除いてすべてのイヌにおいてこれらの相対割合がほぼ同じになった (Fig. 2)。最も高い相対割合を示したBacteroidetes門は、飲用前には46.4 ~ 74.5 %であったが、飲用後には57 %付近に収束していた (Fig. 2)。Toy Poodleでは、飲用前のFirmicutes門の相対割合が小さかった (Fig. 2)。Labrador Retriever では、飲用前のFirmicutes門の相対割合が17.6 ~ 30.1 %であったが、飲用後には23 %付近に収束し、Fusobacteria門の相対割合は飲用前に比べて飲用後に増加していた (Fig. 2)。また、Proteobacteria門の相対

割合は大きな変化がなかった (Fig. 2)。L3のイヌではFirmicutes門のClostridia綱の相対割合が他のイヌに比べて高かったが、飲用後には他のイヌと同程度のレベルまで減少した (Fig. 3)。

Ⅳ . 考察

ブタにポリフェノールを含む飼料を給与すると、糞便中の水分含量に有意な差は認められなかったが、pHが6.5→6.3付近に変化することが報告されている¹²⁾。また、空腹時血糖値が高い過体重および肥満のヒトに、ポリフェノールなどが多く含まれるアーモンドを与えると、糞便中の水分含量とpHが低下し、腸内細菌叢が変化することも報告されている¹³⁾。今回の実験で、スイカエキス飲料水をイヌに与えると、糞便中の水分含量とpHが一定の閾値内に収束したが (Fig. 1)、スイカエキスには、リコペン、シトルリン、ビタミンC、β-カロテンなどのほか、さまざまなポリフェノールが含まれていること

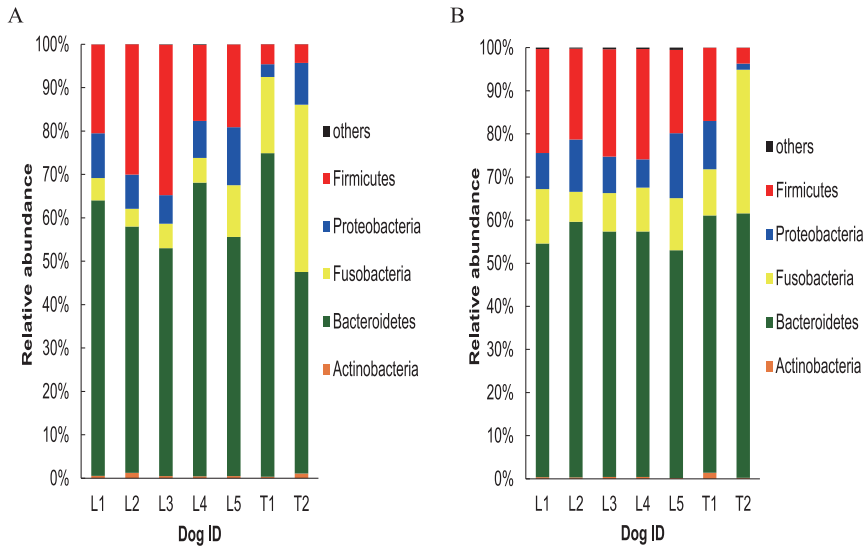


Fig. 2 Relative abundance of the fecal microbiota at the phylum level in each sample. A: Before drinking the watermelon- extract (WM) beverage, B: After drinking the WM beverage.

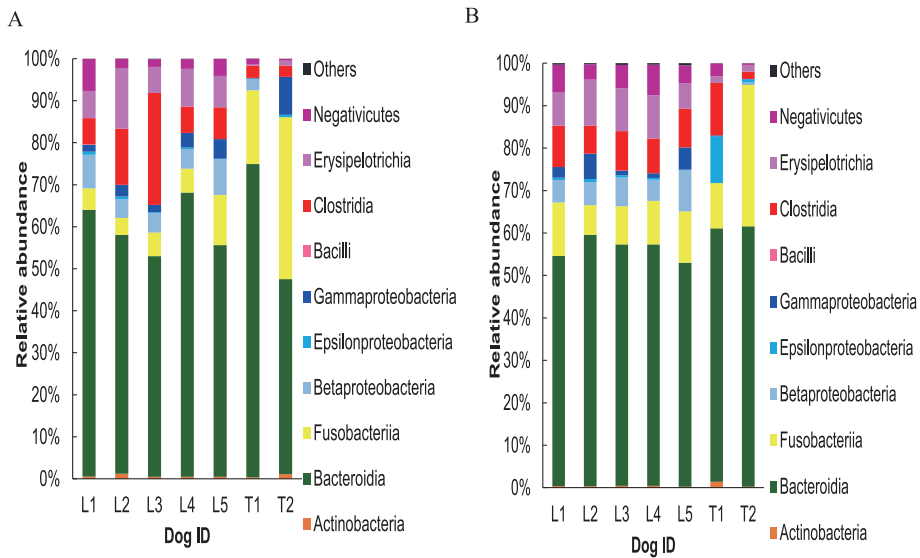


Fig. 3 Relative abundance of the fecal microbiota at the class level in each sample. A: Before drinking the watermelon-extract (WM) beverage, B: After drinking the WM beverage.

が知られており¹⁴⁾、イヌでもブタやヒトと同様に^{12,13)}、ポリフェノールなどの成分が腸内細菌叢に影響を与える可能性が示唆された。それぞ

れのイヌ糞便中で比較的相対割合が大きい Bacteroidetes 門や Firmicutes 門などは、スイカエキス飲料水の飲用後に、ほぼ同じ割合になった

が (Fig. 2)、これらの結果も、糞便中の水分含量やpHが、一定の閾値内に収束したことに起因するのではないかと考えられた。ただし、糞便中の水分含量については季節変動や生理的変動などの影響を受ける可能性もあるので、今後さらに解析する必要がある。

ブタにポリフェノールを多く含む飼料を給与すると、ClostridiaやGammaproteobacteria内の有害な細菌が生成するアンモニア、アミン、フェノール、p-クレゾール、スカトールなどの腐敗産物の生成量が減少することが知られている¹²⁾。L3のイヌでは、スイカエキス飲料水飲用後Clostridia綱が減少したが (Fig. 1-3)、これによって、細菌生成物の産生量が変化し、糞便中の水分含量やpHが変化している原因になっているのではないかと考えられた。また、Fusobacteria門とヒトの潰瘍性大腸炎や大腸がんなどの関連が報告されているが^{10,14)}、肉食動物のイヌでは肉のタンパク質を分解する主要な細菌であり¹⁴⁾、ヒトとは異なる役割を担う可能性がある。Toy Poodleでは、スイカエキス飲料水飲用前のFirmicutes門の相対比率が、Labrador Retrieverと比べて極めて小さかったが (Fig. 2)、犬種によって細菌叢が異なることなどが知られており¹⁵⁾、さらにサンプル数を増やして検討する必要がある。また、食性の違いなど様々な要因が腸内細菌叢に影響を与えることも報告されているため^{5,6,10,15)}、今後は食餌や生活習慣などの違いを考慮しつつ、スイカエキス飲料水飲用によるイヌの腸内細菌叢への影響を明らかにしていきたい。

V . 結語

イヌによるスイカエキス飲料水の飲用は、糞便中の水分含量とpHを一定の閾値内に収束させ、Bacteroidetes門、Firmicutes門、Fusobacteria門、Proteobacteria門の相対割合を一定の割合に整えることが明らかになった。

利益相反は以下のとおり：共同著者である橋詰利治は営利企業である株式会社萩原農場生産研究所に勤務し報酬を得ている。

文献

- 1) Maoto MM, Beswa D, Jideani AIO. Watermelon as a potential fruit snack. *Int J Food Prop*, 22: 355-370, 2019.
- 2) 橋詰 利治: スイカの品種改良と利用Breeding and Utilization of Watermelon. *Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi*, 66: 314-318, 2019.
- 3) Ninomiya M, Itoh T, Fujita S, Hashizume T, Koketsu M: Phenolic glycosides from young fruits of *Citrullus lanatus*. *Phytochemistry Letters*, 40: 135-138, 2020.
- 4) 宮井 紗弥香、橋詰 利治、岡崎 登志夫: スイカエキス飲料がイヌの血清および尿成分に及ぼす効果. *生物試料分析*, 39: 282-287, 2016.
- 5) Omatsu T, Omura M, Katayama Y, Kimura T, Okumura M, Okumura A, Murata Y, Mizutani T: Molecular diversity of the faecal microbiota of Toy Poodles in Japan. *J Vet Med Sci*, 80: 749-754, 2018.
- 6) Li Q, Lauber CL, Czarnecki-Maulden G, Pan Y, Hannah SS: Effects of the Dietary Protein and Carbohydrate Ratio on Gut Microbiomes in Dogs of Different Body Conditions. *mBio*, 8: e01703-16, 2017.
- 7) Becvarova I: 犬猫の腸管内で生存する生物とは? . *mvm*, 28: 82-96, 2019.
- 8) Garcia-Mazcorro JF, Barcenas-Walls JR, Suchodolski JS, Steiner JM: Molecular assessment of the fecal microbiota in healthy cats and dogs before and during supplementation with fructo-oligosaccharides (FOS) and inulin using high-throughput 454-pyrosequencing. *PeerJ*, 5: e3184, 2017.
- 9) 日本ヒルズコルゲートHP: 腸内バイオーム <https://vet.hills.co.jp/pet-solutions/gi>
- 10) Mori A, Goto A, Kibe R, Oda H, Kataoka Y, Sako T: Comparison of the effects of four commercially available prescription diet regimens on the fecal microbiome in healthy dogs. *J Vet Med Sci*, 81: 1783-1790, 2019.
- 11) Unno T, Di DY, Jang J, Suh YS, Sadowsky MJ, Hur HG: Integrated Online System for a Pyrosequencing-Based Microbial Source Tracking Method that Targets Bacteroidetes 16S rDNA. *Environ Sci Technol*, 46: 93-98. 2012.
- 12) Hara H, Orita N, Hatano S, Ichikawa H, Hara Y, Matsumoto N, Kimura Y, Terada A, Mitsuoka T: Effect of tea polyphenols on fecal flora and fecal metabolic products of pigs. *J Vet Med Sci*, 57: 45-9. 1995.
- 13) Choo JM, Tran CD, Luscombe-Marsh ND, Stonehouse W, Bowen J, Johnson N, Thompson CH, Watson EJ, Brinkworth GD, Rogers GB: Almond

- consumption affects fecal microbiota composition, stool pH, and stool moisture in overweight and obese adults with elevated fasting blood glucose: A randomized controlled trial. *Nutr Res*, 85: 47-59, 2021.
- 14) 大草 敏史 : *Fusobacterium*と潰瘍性大腸炎, 大腸癌. 腸内細菌学雑誌, 27: 169-179, 2013.
- 15) Reddy KE, Kim H-R, Jeong JY, So K-M, Lee S, Ji SY, Kim M, Lee H-J, Lee S, Kim K-H, Kim M: Impact of Breed on the Fecal Microbiome of Dogs under the Same Dietary Condition. *J Microbiol Biotechnol*, 29: 1947-1956, 2019.