

〈短報〉

スイカエキス飲料水がネコの腸内細菌叢に及ぼす影響

宮井 紗弥香¹⁾、高柳 信子²⁾、橋詰 利治³⁾、岡崎 登志夫¹⁾

Effects of a watermelon extract beverage on feline fecal microbiome

Sayaka Miyai¹⁾, Nobuko Takayanagi²⁾, Toshiharu Hashizume³⁾, Toshio Okazaki¹⁾

Summary A watermelon (WM) beverage was administered to eight cats instead of water over a 3-month period to understand effects of a WM beverage on feline fecal condition and microbiome in this study. The WM beverage changed the the stool pH from alkaline to acidic, converging between 6.5 and 6.0, but did not change the fecal moisture content. The WM beverage did not alter the microbiome variability at the phylum level, but decreased the relative abundance of Clostridia belonging to Firmicutes at the class level. A decline in the relative abundance of Clostridia was thought to be associated with change in the fecal pH.

Key words: Watermelon extract, Cat, Feces, Microbiome

I . 緒言

スイカにはビタミンC、リコピン、シトルリン、β-カロテン、ポリフェノールなどの様々な成分が含まれており、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Leptin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、腸内細菌叢を一定の割合に整えることなどについて報告してきた^{4,5)}。

近年、炎症性腸疾患、慢性腎臓病や肥満など様々な疾患で腸内細菌叢異常（dysbiosis）が生じることが知られており^{6,7)}、イヌやネコの健康を維持するために腸内細菌叢を整える療法食やプロバイオティクスなどのサプリメントが数多く市販されている。また、最近の報告では、スイカの摂取が高脂肪食を与えたマウスの糖代謝

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：2022年11月18日

採択日：2023年2月28日

や肝臓の炎症産物を抑制するとともに、腸内細菌叢を変化させることが明らかにされている⁸⁾。私達のこれまでの解析においても、スイカエキス飲料水の摂取はイヌの腸内細菌叢を一定の割合に整える効果を示したが⁹⁾、ネコの腸内細菌叢に与える影響については明らかではなかった。

このような背景から、本研究ではスイカエキス飲料水がネコ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、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:20210419-001)、ネコの糞便中の水分含量や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

ヤマザキ動物看護大学動物実験倫理指針に基づき、2022年6月～9月の3.0カ月間、一般家庭で飼育されている雑種ネコ8頭(C1: 避妊雌7歳, C2: 避妊雌4歳, C3: 去勢雄2歳, C4: 去勢雄2歳, C5: 避妊雌2歳, C6: 去勢雄5歳, C7: 去勢雄5歳, C8: 去勢雄10歳)に、1日あたり150 mL/kgのスイカエキス飲料水を準備し、一般家庭で飼育されている上述のネコに自由摂取させた。

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、次のように調整された。種子採取用スイカを搾汁し、加熱減圧処理により10倍濃縮後、クエン酸を約45 mg/10 mLになるよう混合し作製した。使用時には、10 mLのスイカエキスを水で約50倍に希釈し用いた。このクエン酸濃度は、食品安全委員会報告と比較して⁹⁾、十分に体内に影響を与えないレベルであった。

2) 糞便検体の採取と保存

糞便検体は摂取前と摂取開始から3.0カ月の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)のパウチ内で-80℃にて保存

した。

3) 糞便検体のpHと水分含量の測定

糞便検体の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。また、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た。

4) 糞便検体からのゲノムDNA抽出とメタ16S解析

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 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。さらに増幅産物の配列は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。16検体の総read数は1106647 reads、総OTU数は1507 OTUsでありmeans ± SDは94.2 ± 8.61であった。

III. 結果

1. スイカエキス飲料水摂取前後における糞便中のpHと水分含量の変化

ネコ8頭の糞便のpHを測定したところ、スイカエキス飲料水摂取前に6.5 ± 0.7であったが、摂取後に6.1 ± 0.3に減少した。C1とC2では摂取前のpHは7.5付近で高く、摂取後のC1のpHは7.3 → 6.2に、C2は7.8 → 6.3に大きく低下した。C3 ~ C8のpHは6.0付近であったが、摂取後大きな変化は認められなかった。一方、スイカエキス飲料水摂取前後の水分含量を測定したところ、摂取前の平均値は57.5 ± 7.30%であったが、摂取後に59.7 ± 6.40%になりやや増加したが、

その傾向は各個体でばらばらであった。ただし、水分含量が最も低かったC1も他個体の水分含量に近づく傾向が認められた (Fig. 1)。

2. スイカエキス飲料水摂取前後におけるネコの糞便細菌叢相対割合について

スイカエキス飲料水摂取とネコの腸内細菌叢との関連について明らかにするために、摂取前と摂取後の門レベルでの細菌叢を比較したところ、各門の相対割合は、C1、C2およびC8のように摂取後にBacteroidetes門が増加した個体もあれば、変化がない個体もあり、変化は様々であった (Fig. 2)。摂取前後の綱レベルでの細菌叢の相対割合においては、Firmicutes門に属するNegativicutes綱やClostridia綱の相対割合に変化が認められた (Fig. 3)。

Ⅳ．考察

先に私達が報告したように、スイカエキス飲料水摂取後に、イヌの糞便検体のpHおよび水分含量が一定範囲内に収束し、それに伴い腸内細菌叢の門レベルでBacteroidetes門、Firmicutes門、Fusobacteria門、Proteobacteria門の相対割合

が一定の割合に収束していた。しかしながら、ネコのスイカエキス飲料水摂取前後の糞便のpHと水分含量においては、pHは6.0付近に収束する傾向が認められたものの、水分含量の変化はばらばらであった (Fig. 1)。ネコの糞便検体のpHや水分含量の日内変動に関する報告はほとんどないが、マウスの報告から¹²⁾、ネコでも日内変動を示すことが推測される。また、マウスの腸内細菌叢も日内変動を示すことが知られているが¹³⁾、本研究の検体採取は、早朝絶食時に統一しているため、影響は少ないものと考えられた。スイカエキス飲料水摂取前後の門レベルでの腸内細菌叢変化は各個体でばらばらで、一定の変化傾向は認められなかった。しかし、綱レベルでの各個体の解析結果をみると、スイカエキス飲料水摂取前後でFirmicutes門の中の個々の細菌の相対割合が変化する傾向が認められた (Fig. 2)。そこで、ネコについて綱レベルにおけるFirmicutes門のClostridia綱とpHとの関係を解析したところ、スイカエキス飲料水摂取前にpHが7.5付近の2例では、Clostridia綱の相対割合はほとんど変化していなかったが、摂取前のpHが6.0付近のC3～C8では、Clostridia綱の相対割合は摂取後に減少傾向を示し、特に

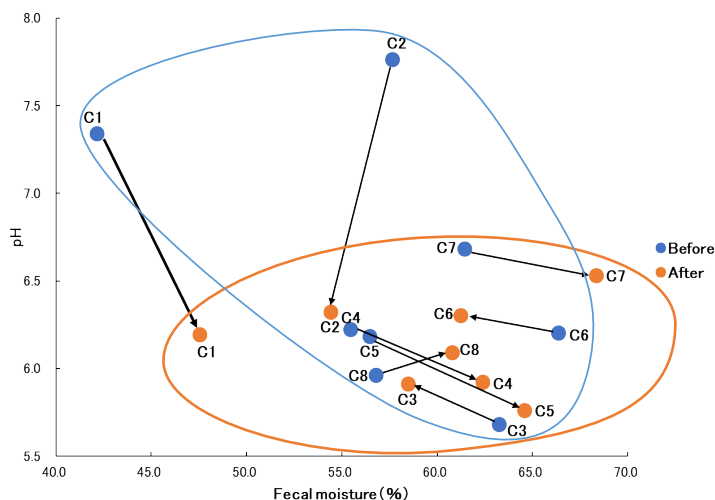


Fig.1 Scatter plots of pH and moisture content in feces before and after drinking the watermelon extract (WM) beverage.

●: Before, ●: After, →: shift from before to after drinking the WM beverage, blue-colored circle: range before drinking the WM beverage, orange-colored circle: range after drinking the WM beverage.

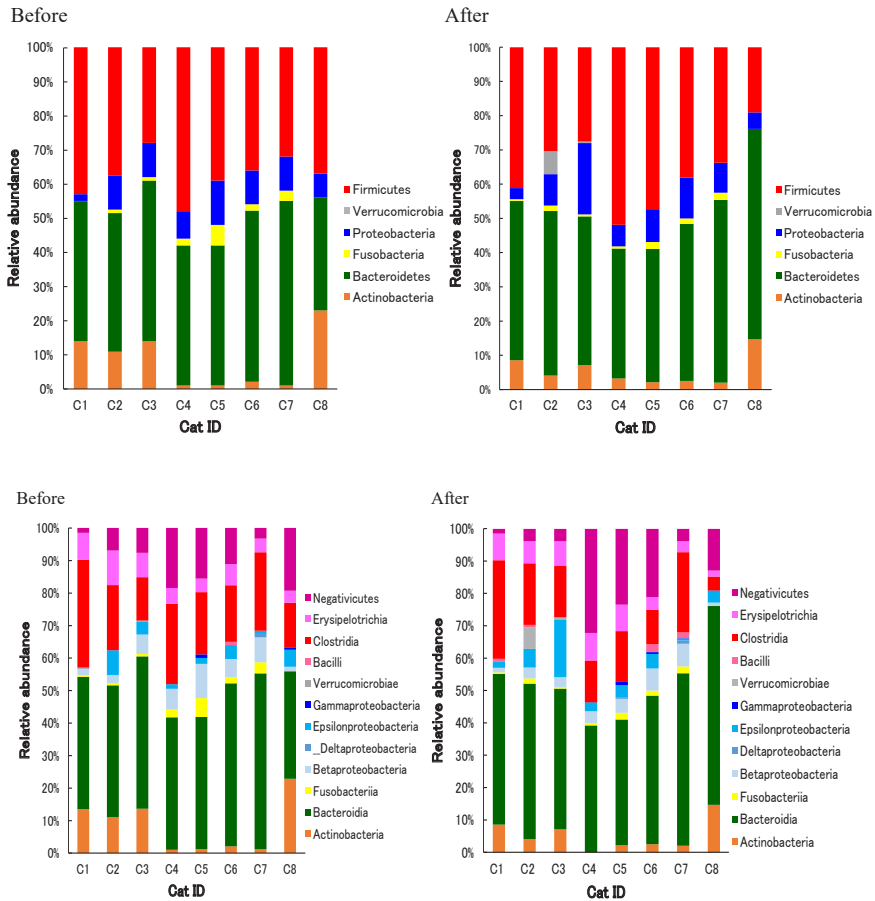


Fig.2 Relative abundance of the fecal microbiota in each sample.
 Upper: phylum level, Lower: Class level.
 Left: before drinking the watermelon extract (WM) beverage, Right: after drinking the WM beverage.

C4では24.8 %→12.5 %に、C8では13.9 %→4.30 %と大きく減少していた (Fig. 3A)。一方で、スイカエキス飲料水摂取前後における、糞便水分含量とClostridia綱との関係を比較したところ、明瞭な変化傾向は認められなかった (Fig. 3B)。Clostridia綱の*Clostridioides difficile*は下痢などの消化器系疾患を引き起こす嫌気性細菌であり、pHがアルカリの場合に感染性を示すが、酸性環境下では増殖と孢子形成、および運動性を低下させることが報告されている¹⁴⁾。また、果物や野菜に含まれるポリフェノールは、Clostridiaなどが生成する酪酸などの短鎖脂肪酸 (SCFA) の産生を増加させ、Clostridiaの相対割合を減少させることが知られている^{15,16)}。これ

らのことから、スイカエキス飲料水の摂取により、pHが低下し、Clostridia綱の相対割合が減少しているのではないかと考えられた。肥満は、*Clostridium difficile*感染症のリスクファクターであることが知られている^{17,18)}。一方で、私達は以前ラットにおいてスイカエキスの摂取が肥満抑制効果を示し、血清TG濃度とLeptin濃度を低下させることを示した¹⁹⁾。ネコにおいてもスイカエキス飲料水の摂取によって腸内細菌叢の*Clostridium difficile*の相対割合が減少し、エネルギー代謝がコントロールされ、肥満が抑制される可能性があるが、この点についてはさらに検討する必要があるものと考えられた。

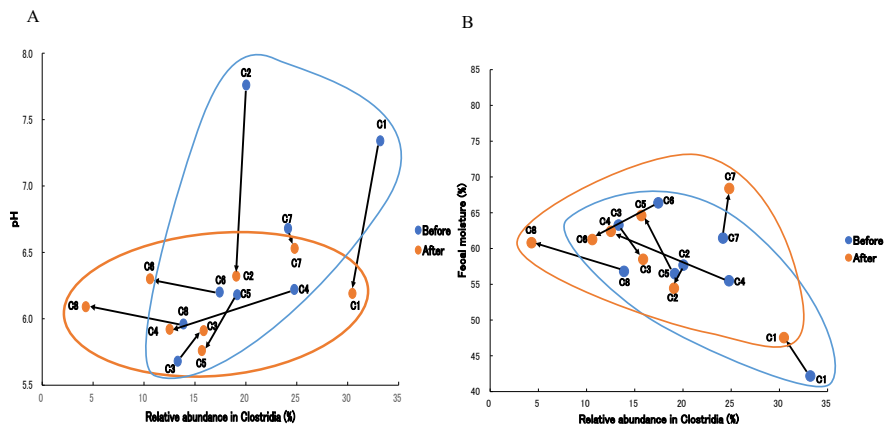


Fig. 3 A: Scatter plots of relative abundance in Clostridia class and pH in feces before and after drinking the watermelon extract (WM) beverage.
 B: Scatter plots of relative abundance in Clostridia class and moisture content in feces before and after drinking the watermelon extract (WM) beverage.
 ●: Before, ●: After. Data before and after WM beverage intake were connected with the arrow. Data before WM beverage intake were enclosed in blue-colored circle, and data after WM beverage intake were enclosed in orange-colored circle.

V . 結語

ネコにおけるスイカエキス飲料水の摂取は、摂取前の糞便中のpHがアルカリ性の場合にはpHを6.0～6.5付近に収束させ、さらに摂取前のpHがすでに6.0～6.5の間にある場合にはClostridia綱の相対割合を減少させることが示唆された。

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) Naz A, Butt MS, Sultan MT, Qayyum MM and Niaz RS: Watermelon lycopene and allied health claims. EXCLI J, 13:650-60, 2014.
- 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) Itoh T, Fujita S, Koketsu M and Hashizume T: Citrulluside H and citrulluside T from young watermelon fruit attenuate ultraviolet B radiation-induced matrix metalloproteinase expression through the scavenging of generated reactive oxygen species in human dermal fibroblasts. Photodermatol Photoimmunol Photomed, 37: 386-394, 2021.
- 4) 宮井 紗弥香、橋詰 利治 他: 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) 宮井 紗弥香、藤原 恵利子 他: スイカエキス飲料水がイヌの腸内細菌叢に及ぼす影響. 生物試料分析, 44: 114-119, 2021.
- 6) Mondo E, Marliani G, Accorsi PA, Cocchi M and Di Leone A: Role of gut microbiota in dog and cat's health and diseases. Open Vet J, 9: 253-258, 2019.
- 7) Suchodolski JS: Analysis of the gut microbiome in dogs and cats. Vet Clin Pathol, 50:6-17, 2022.
- 8) Becraft AR, Sturm ML, Mendez RL, Park SH, Lee SI and Shay NF: Intake of Watermelon or Its Byproducts Alters Glucose Metabolism, the Microbiome, and Hepatic Proinflammatory Metabolites in High-Fat-Fed Male C57BL/6 J Mice. J Nutr, 150: 434-442, 2020.
- 9) クエン酸 (対象外物質) (2022年5月18日評価結果通知) . 内閣府食品安全委員会食品安全総合情報システム <https://www.fsc.go.jp/fscis/evaluationDocument/show/kya20100216036>
- 10) Mori A , Goto A, Kibe R, Oda H, Kataoka Y and 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 and 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) 田原 優: 腸内フローラ代謝産物による概日時計制御. 公益財団法人三島海雲記念財団ガクジュツ研究奨励金研究報告(自然科学部門), 2014. <https://www.mishima-kaiun.or.jp/assist/docs/SNo1-tahara.pdf>
- 13) Liang X, Bushman FD and FitzGerald GA: Rhythmicity of the intestinal microbiota is regulated by gender and the host circadian clock. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 112: 10479-84, 2015.
- 14) Wetzel D and McBride SM: The Impact of pH on *Clostridioides difficile* Sporulation and Physiology. *Appl Environ Microbiol*, 86: e02706-19, 2020.
- 15) Tomova A, Bukovsky I, Rembert E, Yonas W, Alwarith J, Barnard ND and Kahleova H: The Effects of Vegetarian and Vegan Diets on Gut Microbiota. *Front Nutr*, 6:47, 2019.
- 16) Rothenberg DO, Zhou C and Zhang L: A Review on the Weight-Loss Effects of Oxidized Tea Polyphenols. *Molecules*, 23: 1176, 2018.
- 17) Madan R and Petri WA Jr: Role of obesity and adipose tissue-derived cytokine leptin during *Clostridium difficile* infection. *Anaerobe*, 34: 182-6, 2015.
- 18) Leung J, Burke B, Ford D, Garvin G, Korn C, Sulis C and Bhadelia N: Possible association between obesity and *Clostridium difficile* infection. *Emerg Infect Dism*, 19: 1791-8, 2013.
- 19) 岡崎 登志夫、橋詰 利治 他: 高脂肪飼料給餌ラットに対するスिकाエキスの肥満抑制効果. ペット栄養学会誌, 17: 13-18, 2014.