

Akkermansia
muciniphilaを標的とした新規プレバイオティクスの
探索とその応用研究

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 静岡大学 公開日: 2024-06-18 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 宮田, 高明 メールアドレス: 所属:
URL	https://doi.org/10.14945/0002000670

静岡大学 博士論文

Akkermansia muciniphila を標的とした
新規プレバイオティクスの探索とその応用研究

2023年12月

大学院 自然科学系教育部
バイオサイエンス専攻

宮田高明

博士学位論文目次

宮田高明

審査申請論文名 *Akkermansia muciniphila* を標的とした
新規プレバイオティクスの探索とその応用研究

目次

緒論	4
第1章 <i>Akkermansia muciniphila</i> 誘導能を持つムチン素材の探索	12
1.1 諸論	12
1.2 エイ体表粘質物、ブタ胃粘膜および無菌ラット消化管内容物からのムチン調製	13
1.3 各種ムチン素材の一般成分、糖鎖構成糖およびペプチド骨格のアミノ酸組成の比較	15
1.4 ラット新鮮便を酵素源とした各ムチンのムシナーゼ活性に対する各種ムチンの応答性	25
1.5 ラットにおけるエイ体表粘質物ムチンの <i>Akkermansia muciniphila</i> 誘導能とその機序解析-ムチン糖鎖末端の硫酸化糖キャッピング比率およびスレオニン含量の関与-	
1.6 ヒト大腸におけるエイ体表粘質物ムチンの <i>Akkermansia muciniphila</i> 誘導能の推定-ヒト新鮮便の嫌氣的培養試験から-	38
1.7 考察	45
第2章 健常ラットにおける <i>Akkermansia muciniphila</i> 増殖が大腸生理に及ぼす影響	
2.1 緒論	51
2.2 エイ体表粘質物ムチンの摂取による <i>Akkermansia muciniphila</i> 増殖が大腸粘膜ムチン層および腸管透過性に及ぼす影響とその解析-大腸短鎖脂肪酸濃度、ムチン関連遺伝子、タイトジャンクション関連タンパク質重量および血中エンドトキシン濃度に焦点を当てて-	51
2.3 考察	72
第3章 エイ体表粘質物ムチンの摂取による <i>Akkermansia muciniphila</i> 増殖が各種ラット病態モデルに及ぼす影響	
3.1 緒論	76
3.2 ラット耐糖能に及ぼす <i>Akkermansia muciniphila</i> 増殖の影響	76
3.3 デキストラン硫酸ナトリウム誘発ラット大腸炎に及ぼす <i>Akkermansia muciniphila</i> 増殖の影響	85
3.4 考察	97

総括	101
参考文献	104
謝辞	121

緒論

Akkermansia muciniphila (AM) はヒトの腸内に棲息するムチン分解菌である¹⁾。近年、嫌気培養技術や 16S rRNA 遺伝子解析を始めとする分析技術の発達に伴って、多くの腸内細菌が単離・同定され、それらの生化学的性状についても明らかにされてきた²⁾。そのなかで、AM は 2004年にDerrienらによって健康なヒトの糞便から単離された¹⁾。その属名はオランダの著名な微生物学者Antoon Akkermansを記念して命名され、種名は、AM が腸管の杯細胞から分泌される糖タンパク質であるムチンを唯一の炭素、窒素源として増殖可能なことから、*muciniphila* (mucin-loving) と名付けられた。AM は霊長類だけでなく、魚類、鳥類および爬虫類に至るまで広く生物の腸管に存在することが確認されており³⁾、健康な成人ではその占有率は~3%程度とされている⁴⁾。AM は生物の腸管に広く保存されていることや比較的高い占有率を示すことから、宿主との共進化の関係や、腸管における潜在的機能が推定されている³⁾。特に臨床研究において、肥満、糖尿病患者の腸内細菌叢ではAM 占有率が健常者に比べ低値を示すことから⁵⁾、その因果関係が注目されている。

AM が発酵基質として利用するムチンは、プロリン、セリン、スレオニン (threonine, Thr) の繰り返しドメインを主体として構成されるコアタンパク質にN-アセチルガラクトサミン (N-acetylgalactosamine, GalNAc) を起点として、N-アセチルグルコサミン (N-acetylglucosamine, GlcNAc)、ガラクトース (galactose, Gal)、フコース (fucose, Fuc)、シアル酸 (sialic acid, Sia) から構成されるオリゴ糖鎖が結合した糖タンパク質で、糖鎖末端にはFuc, Siaあるいは硫酸化糖を配している⁶⁾。グラム陰性菌であるAM は細胞壁の主成分であるペプチドグリカンの生合成にグルコサミン-6-リン酸 (Glucosamine-6-phosphate, GlcN6P) を必要とするが、通常のグラム陰性菌ではエムデン-マイヤーホフ-パルナス経路 (Embden-Meyerhof-Parnas

pathway, EMP経路) のフルクトース-6-リン酸からGlcN6Pへの変換が可能であるのに対し⁷⁾, *AM* はこの変換を触媒するグルタミン : フルクトース-6-リン酸アミドトランスフェラーゼをコードする遺伝子である *glms* を欠損しているため, その増殖にはGlcNAcの供給が必須である⁸⁾⁹⁾。また, 細菌は通常ホモセリンからThrの合成を触媒するホモセリンキナーゼおよびスレオニンシンターゼを有しているが¹⁰⁾, *AM* はこれらの酵素をコードする遺伝子 (ホモセリンキナーゼ, *thrB*; スレオニンシンターゼ, *thrC*) を欠損するため, その増殖にはThrの供給も必須である⁹⁾。このような代謝的特徴から, *AM* は栄養源としてGlcNAcとThrに富むムチンに強く依存していると考えられる。しかしながら, これらの成分を経口的に摂取した場合, Thrはほぼ小腸で吸収される。またGlcNAcは細菌に特有のリン酸化反応兼輸送系であるphosphoenolpyruvate: sugar phosphotransferase system (PTS) を介して取り込まれるが¹¹⁾, PTSは多くの細菌に存在することが確認されている¹²⁾。大腸に到達するGlcNAcは他の腸内細菌との競合により, *AM* に効果的に供給することができない。このような理由から*AM* を特異的に増殖させるプレバイオティクスの開発は困難とされてきた。

腸内細菌によるムチン分解は糖鎖末端から生じ, その後, 結合特異的なグリコシダーゼの作用によりstep by stepで進行すると考えられている¹³⁾。また, 人工基質を用いた試験から, ムチン分解の律速は糖鎖末端の硫酸エステル除去にあることが指摘されている¹⁴⁾。当研究室の河合らは¹⁵⁾, 対照群に加え, 抗生物質を投与したラット (抗生剤群), およびフラクトオリゴ糖 (fructooligosaccharide, FOS) を摂取させたラット (FOS群) の盲腸内容物から調製したムチンについて解析を行い, これらのムチンの糖鎖末端の硫酸化糖キャッピング比率 (糖鎖末端が硫酸化糖によりキャップされている割合) が対照 > FOS > 抗生剤群の順であったことを明らかにした (別表1)。また, これらのムチン素材を基質として, ラット新鮮便を酵

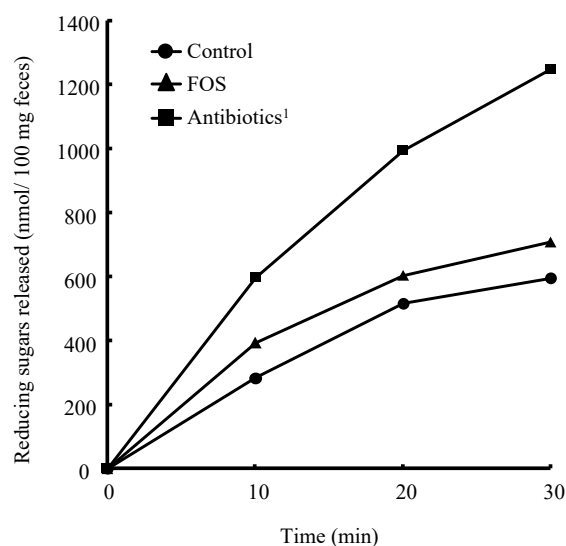
素源に用い、遊離する還元糖量を指標に*in vitro*でのムチン分解活性を比較したところ、ムチン分解速度は抗生物質 > FOS > 対照群の順となることを見出した (別図1)。対照群では比較的分解が進行しやすい中性糖鎖 (糖鎖末端がFucでキャップされている糖鎖) およびシアロ糖鎖 (糖鎖末端がSiaでキャップされている糖鎖) の分解が進み、結果として残存するムチン糖鎖の硫酸化糖キャッピング比率は高くなる。逆に抗生物質の投与またはFOSの摂取は、腸内細菌の活動を抑制または修飾することによって中性糖鎖を主としたムチン分解を遅らせる¹⁶⁾。結果として抗生物質およびFOS群では

別表 1 Composition of cecal mucin fractions of rats with different dietary conditions

	Normal	6% FOS	Antibiotics ¹
O-linked oligosaccharide chains (mmol/ g)	0.050	0.095	0.445
Sulfate (mmol/ g)	0.040	0.050	0.103
Sialic acid (mmol/ g)	0.012	0.023	0.117
Sulfate to O-glycans (%)	80	53	23
Sialic acid to O-glycans (%)	24	24	26

¹Benzylpenicillin (50 U/mL), neomycin (2 mg/mL), and cefoperazone sodium (0.5 mg/mL) were added to drinking water.

FOS, fructooligosaccharides.



別図1 Time course of released reducing sugars from the respective mucin fractions from rats fed a control diet with or without antibiotics treatment¹ or diet containing 6% FOS.

¹Benzylpenicillin (50 U/mL), neomycin (2 mg/mL), and cefoperazone sodium (0.5 mg/mL) were added to drinking water. Fecal homogenates of a rats fed a control diet was used as the enzyme source. FOS, fructooligosaccharide.

対照群に比べ硫酸化糖キャッピング比率が低くなり、*in vitro*でのムチン分解速度（還元糖の遊離量）は高くなったと考えられる。河合らの知見は、*in vivo*においても糖鎖末端の硫酸エステルの除去がムチン分解の律速となることを示している。

先述のように、ムチン分解には糖鎖末端のFuc, Sia, 硫酸化糖を除去する酵素（フコシダーゼ、シアリダーゼおよびグリコサルファターゼ）に加え、各結合特異的なグリコシダーゼやプロテアーゼ等の幅広い種類のムチン分解関連酵素が必要となる¹³⁾。これまでAMに加え、*Bacterioides thetaiotaomicron (BT)*, *Bacteroides fragilis*, *Ruminococcus gnavas*および*Ruminococcus torques*がムチンを含有する培地において増殖することが確認されている¹⁷⁾。特にAMはセクレトーム解析の結果から、分泌するタンパク質のうち11%に相当する61個のタンパク質がムチン分解関連酵素であることが報告されており³⁾、AMの栄養源としてのムチンに対する強い依存性が推察される。また、他のムチン分解菌と異なるAMの特徴として、ムチン分解の律速となる糖鎖末端の硫酸化糖の脱エステル化を触媒するグリコサルファターゼを高発現することが挙げられる¹⁸⁻²¹⁾。これらのことからAMは硫酸化糖キャッピング比率の高いムチンを他のムチン分解菌に比べより効果的に利用可能であると考えられる。

ところで、水中に生息している魚類は環境水中の様々な細菌やカビなどの抗原に絶えず晒されているため、その体表は鱗やムチン層で覆われ、病原性物質の接触から上皮組織を保護している²²⁾。なかでも鱗の退化したウナギのような魚種では代償的に体表面へのムチン分泌量が高く、その厚いムチン層が物理的障壁として生体防御に重要な役割を果たしていると考えられる。また、軟骨魚類で鱗の変化した楯鱗をもつエイやサメの仲間の体表にも比較的多量のムチンが分泌されている²³⁾。さらに、ツバクロエイ (*Gymnura japonica*) 由来のムチンは比較的高濃度のスルホキシドや硫化カ

ルボニルを含有することが報告されている²³⁾。そこで本研究ではAM を選択的に増殖させるプレバイオティクス素材として、エイ体表粘質物由来のムチンに着目した。

本研究ではガンギエイ目のメガネカスベ (mottled skate, *Raja pulchra*) の体表から調製したムチン (skate-skin mucin, SSM) を用いた。第 1 章ではSSMのAM 増殖誘導能の検討を主目的とし、SSMのムチン糖鎖組成およびアミノ酸組成を分析した。SSMはツバクロエイ由来のムチン同様、比較的高濃度の硫酸基を有し、比較対象として用いたブタ胃粘膜ムチン (porcine stomach mucin, PSM) および無菌ラット消化管内容物ムチン (rat gastrointestinal mucin, RGM) に比べ、硫酸化糖キャッピング比率は 2倍以上、Thr含量は 1.5倍以上であった。さらに、SSMの生体における分解速度を推定するために、ラット新鮮便を酵素源として用い *in vitro* でのムチン分解活性を推定した。その結果、SSMの分解速度はPSMおよびRGMに比べ、顕著に低値を示すことを見出した。これは先述の河合らの知見と一致し¹⁵⁾、硫酸化糖キャッピング比率の高いSSMでは、通常の腸内細菌による分解が著しく制限されることを示している。これらの結果から、SSMはサルファターゼを高発現するAM に対し¹⁸⁻²¹⁾、Thrおよびアミノ糖を独占的に供給することでAM を選択的に増殖させるプレバイオティクス機能を発現する可能性を予測した。そこで本章ではラットにSSMを摂取させ、盲腸内容物中のAM 数を測定することで、ラットにおけるAM 誘導能を検討した。さらに、培養装置 (ジャーファーメンター) を用い、SSM を添加した培地中でヒト糞便を用いた嫌気培養試験を行い、ヒト大腸におけるSSMのAM 誘導能を推定した。

第 2 章はAM の増殖が健常ラットの大腸生理に及ぼす影響を解析することを目的とした。従来、AM の大腸生理に対する影響は、高脂肪食により肥満および糖尿病病態を誘発したマウスにおいてのみ検討されてきた²⁴⁾

30)。この病態マウスでは元来、大腸AM 数の極度な減少と近位結腸ムチン層の薄層化、リポ多糖 (lipopolysaccharide, LPS) の腸管透過性の上昇、さらには代謝性エンドトキセミアが観察されるが²⁵⁾、AM の腸内占有率の回復は、杯細胞への短鎖脂肪酸 (short-chain fatty acid, SCFA) の供給を効果的に高めムチン分泌を促進することにより、薄層化したムチン層をむしろ回復させ^{31) 32)}、結果的には腸管透過性、そして耐糖能を改善するという一見、paradoxicalな機序が報告されている³⁾。果して、SSM摂取によるAM 増殖が健常ラットにおける結腸上皮ムチン層や腸管透過性、また腸管透過性の制御に中心的役割を果たすタイトジャンクション (tight junction, TJ) タンパク質の発現量など、腸管バリア機能にどのような影響を及ぼすのかについて検討した。

第3章では、ラットにおけるSSM 摂取がAM 増殖を介して耐糖能および炎症性腸疾患 (inflammatory bowel disease, IBD) に及ぼす影響を解析することを目的とした。産業革命以来、食生活を中心とした生活習慣の変化に伴って、肥満、糖尿病およびIBD の罹患者数は世界的に増加の一途を辿っており^{33) 34)}、これらの疾患に対する予防、改善法の開発は急務である。AM は肥満、糖尿病だけでなくIBD に対しても改善効果が報告されており²⁸⁻³⁰⁾、次世代の有用微生物としての可能性が期待されている³⁵⁾。FOS やポリフェノールなど、病態時に低下したAM 数を回復させるいくつかのプレバイオティクスの摂取がこれらの病態に対し、改善効果を示すことも報告されてきた³⁶⁻⁴¹⁾。しかしながら、これらの前臨床データはすべてC57BL/6 (J) マウスで得られたものであり、本マウスは糖質コルチコイドの分泌量および感受性に他の系統とは異なる特徴を有することが報告されている⁴²⁾。本章では、C57BL/6 (J) マウスで報告されたAM の有用性がラットにおいても再現されるか、否かに注目した。栄養や代謝生理が他動物種よりもヒトとの類似性が高く、生理学試験において普遍的に使用されるWistar系ラットを用い⁴³⁾、

SSM 摂取による *AM* 増殖が，低脂肪食または高脂肪食を長期間摂取したときの耐糖能，さらにはデキストラン硫酸（dextran sulfate sodium, DSS）誘発大腸炎に対しどのような応答を示すのかについて解析した。

第 1章

Akkermansia muciniphila 誘導能を持つムチン素材の探索

第1節 緒論

肥満、糖尿病の罹患者数は世界的に増加傾向が続いており、本邦においても糖尿病の罹患者数（ヘモグロビン A1c値が 6.5%以上の者）が 20歳以上の国民のうち、男性で 19.7%、女性で 10.8%に達した⁴⁴⁾。また、本邦における疫学調査によって、肥満度指数 (body mass index, BMI) の高い集団 (BMI 27以上) では死亡率が高いことが報告されており⁴⁵⁾、糖尿病を始めとする生活習慣病の予防、改善法の需要が高まっている。

Akkermansia muciniphila (AM) は 2004年にヒト糞便から単離されたムチン分解菌である¹⁾。AM は肥満、糖尿病患者ではその占有率が低下することが報告されている⁵⁾。また、臨床においてもDepommeirら⁴⁶⁾が肥満度指数 25以上の男女に対するAM 製剤の投与が一定の病態改善効果を示すことを報告した。このようにAM は次世代の有用微生物の候補として期待されている。これまでにフラクトオリゴ糖 (fructooligosaccharide, FOS) やポリフェノールなどのプレバイオティクスの摂取が高脂肪食の摂取によって減少したAM 数を回復させることが報告されてきた³⁶⁻⁴¹⁾。

本章では、AM を選択的に増殖させる新規プレバイオティクスの探索を目的としエイ由来ムチン (skate-skin mucin, SSM) がAM に対してN-アセチルグルコサミン (N-acetylglucosamine, GlcNAc) およびThrを独占的に供給することで選択的に増殖させるという仮説を検証した。本章ではまず、SSMに加え、比較対照として精製したブタ胃粘膜ムチン (porcine stomach mucin, PSM) およびラット糞便由来ムチン (rat gastrointestinal mucin, RGM) の硫酸化糖キャッピング比率やThr含量をはじめとする化学分析を行った (第 2節, 第 3節)。続いて腸内細菌による各ムチンの分解速度を比較することを目的とし、ラット新鮮便を酵素源とした場合のムチンからの遊離還元糖量を調べた (第 4節)。また、これらのムチンをラットに摂取させ、各ムチンのAM 誘導能を検討した (第 5節)。さらに、培養装置

(ジャーファーメンター) を用い、ヒト大腸におけるSSMによるAM誘導能を検討した(第6節)。

第2節 エイ体表粘質物、ブタ胃粘膜および無菌ラット消化管内容物からのムチン調製

1) SSMの調製

SSMは丸共バイオフーズ(株)(北海道, 日本)から提供を受けた。十分に細切したメガネカスベ (*Raja pulchra*) の表皮(湿重量: 36 kg) を水 5L とニーダー (GN-100/60S, (株)サムソン, 香川, 日本) で混合した。次にエンドペプチダーゼ (Sumizyme, 新日本化学工業(株), 愛知, 日本) 30 gを添加し、タンパク質を分解するため 55°Cで 4時間反応させた。酵素を失活させるため、90°Cで 10分間加熱した後、フィルタープレス (TF-66, 藪田機械(株), 大阪, 日本) を用いて濾過した。濾液を限外濾過し (MICROZA ACP-3013, 旭化成(株), 東京, 日本), 遊離したアミノ酸と低分子ペプチドを除去した後、スプレードライによりSSM粉末を得た。原料エイ表皮からのSSMの収率は約 0.4%であった。なお、6種の異なるロット (A, B, C, D, EおよびF) のSSM粉末を調製した。

2) PSMの調製

ブタ胃粘膜の粗ムチン (TypeII, Sigma-Aldorich, MO, USA) 20 gを量り取り、150 mM 塩化ナトリウム溶液 1 Lを加えた後、ポリトロンホモジナイザー (PT-3100, KINEMATICA, LU, Switzerland) を用いてホモジナイズした後 (14,500 rpm, 4°C, 1 min), 1 M 水酸化ナトリウムを用いてpH 7.5に調整した。その後、ムチンの可溶化を促進するために再びホモジナイズした (14,500 rpm, 4°C, 1 min)。この懸濁液を吸引濾過した後 (No. 526, アドバンテック東洋(株), 東京, 日本), 得られた濾液をさらに自然濾

過した (No. 1, アドバンテック東洋(株))。最終的に得られた濾液を 50 mL 容コニカルチューブ (ファルコンチューブ, Corning, NY, USA) に 15 mL ずつ分注し, 2倍量の 90% エタノールを加えて転倒混和し, -30°C で一晩静置した。続いて遠心分離 ($2,300 \times g$, 4°C , 10 min) により得られた沈澱に 150 mM 塩化ナトリウム溶液 15 mLを加え懸濁させた後, 再度 90% エタノールを 2倍量加え再懸濁させた後, 遠心分離 ($2,330 \times g$, 4°C , 10 min) により得られた沈澱に蒸留水を 5 mL加え, 溶解させた。この溶液の凍結乾燥により得られた乾燥粉末をPSMとした。粗ムチンからのPSMの回収率は約 43%であった。

3) RGMの調製

慶應義塾大学から無菌ラット糞便の提供を受けた。日本エスエルシー(株) (静岡, 日本) から購入した 6週齢のF344/NS1c系の雄性無菌ラット [体重 130 ± 2 g (平均値 \pm 標準誤差)] を室温 $23 \pm 1^{\circ}\text{C}$, 照明管理 (7:00から 19:00に点灯) のもと, ガンマ線照射 (25 kGy) により滅菌した, 水およびAIN-76に準拠した飼料を自由摂取により 8週間与えた。この間, 無菌状態を維持するため, 正圧アイソレータ (ICM-6, (株)アイ・シー・エム, 茨城, 日本) 中の滅菌したプラスチックケージ内で 8週間飼育した。飼育期間中, 糞便を回収し, 飼育終了時にペントバルビタール麻酔下 (50 mg/kg) で断頭により致死させた。当動物実験は慶應大学実験動物委員会によって承認を受け (承認番号; 14015-4), ラットを実験動物の飼育に関する慶應大学のガイドラインに準じて飼育した。糞便 40 gを量り取り, リン酸緩衝生理食塩水 (phosphate buffered saline, PBS; pH 6.0) を 500 mL加えた後, 90°C で 5分間加熱した。その後, ムチンの可溶化を促進するためにポリトロホモジナイザー (PT-2100, Kinematica) を用いてホモジナイズした (11,000 rpm, 4°C , 1 min)。次に糞便に残存するデンプン, 限界デキストリ

ンおよびグリコーゲンを分解するためにアミログルコシダーゼ溶液 (A9913, Sigma) 200 μ Lを加え, 恒温振盪水槽 (NTS-1300, 東京理化学器械株, 東京, 日本) を用い, 60°Cで 3時間反応させた。この懸濁液を遠心分離し (20,000 \times g, 4°C, 15 min), 上清を回収した。上清に 2倍量の氷冷エタノールを加えて転倒混和し, -30°Cで一晩静置した。続いて遠心分離 (2,400 \times g, 4°C, 10 min) により得られた上清に 2倍量の氷冷エタノールを加えて転倒混和し, -30°Cで一晩静置した。静置後のサンプルを再度, 遠心分離し (2,400 \times g, 4°C, 10 min), 得られた上清に 2倍量の氷冷エタノールを加えて転倒混和し, 再度 -30°Cで一晩静置した。静置後のサンプルを遠心分離し (2,400 \times g, 4°C, 10 min), 得られた沈殿に 150 mM 塩化ナトリウム溶液 20 mLを加えて溶解させた。この溶液に 2倍量のエタノールを加え, -30°Cで一晩静置した。静置後のサンプルを遠心分離し (2,400 \times g, 4°C, 10 min), 得られた最終沈殿物に蒸留水 20 mLを加え懸濁させ, 10 Lの蒸留水に対して透析した。透析後溶液の凍結乾燥により得られた乾燥粉末をRGMとした。RGMの糞便乾燥物からの回収率は約3%であった。

第3節 各種ムチン素材の一般成分, 糖鎖構成糖およびペプチド骨格のアミノ酸組成の比較

実験方法

第 2節で調製したSSM, PSMおよびRGMについて一般成分としてタンパク質, 脂質, 灰分および水分含量を測定した。また, 各ムチンのアミノ酸含量を測定した。さらに, 各ムチンの硫酸化糖キャッピング比率やアミノ糖含量を比較するために, O-結合性糖鎖, 硫酸化物, シアル酸および他の糖鎖構成糖の含有量の測定を行った。

1) タンパク質量の測定

タンパク質量をLowryらの方法⁴⁷⁾に従って測定した。各ムチン 10 mg に蒸留水 4 mLを加え溶解させた。その後、この溶液を蒸留水で 20倍に希釈し、希釈後の懸濁液 500 μ Lにビウレット試薬 [10% (w/v) 炭酸ナトリウムを含む 500 mM 水酸化ナトリウム : 0.5% (w/v) 硫酸銅五水和物を含む 1% (w/v) クエン酸ナトリウム = 10 : 1 (v/v) の混合液] 500 μ Lを加え、ボルトックスミキサーで攪拌した後、室温で 10分間静置した。1.8 Nフェノール試薬 (ナカライテクス(株), 京都, 日本) を蒸留水で12倍に希釈した溶液 1.5 mLを加えて攪拌し、恒温振盪水槽 (NTS-1300, 東京理化工機(株)) を用い、37°Cで 30分間静置した。静置後の溶液を室温で 15分間静置して常温に戻した後、750 nmの吸光度を測定した。ウシ血清アルブミン (A4612, Sigma) 溶液を同様に測定して作成した標準曲線をもとにタンパク質濃度を算出した。

2) 脂質量の測定

脂質量をFolchらの総脂質抽出法に基づく重量法⁴⁸⁾に従って測定した。50 mL容のねじ口付き遠沈管に各ムチン 500 mgを量り取り、150 mM 塩化ナトリウム溶液 1 mLを加えた。これにクロロホルムとメタノール混合液 (2 : 1, v/v) を 20 mL加え、シェイカー (Shaker SA300, ヤマト科学(株), 東京, 日本) を用いて 30分間攪拌した (250 rpm)。これを濾過し (No. 2, アドバンテック東洋(株)), クロロホルムとメタノールの混合液 (2 : 1) で 20 mLに定容した後、0.37% 塩化カリウム溶液 4 mLを加えて激しく混和し、4°Cで一晩静置した。次に、水層 (上層) を除去し、クロロホルム、メタノールおよび蒸留水の混合液 (3 : 48 : 37) で試験管の内壁を洗浄した後、メタノール 1 mLを加えて脂質抽出液が完全に一層になるまで攪拌した。これをクロロホルムとメタノールの混合液 (2 : 1) で 25 mLに定容し、恒量済

みのビーカー (通風乾燥機を用い, 105°Cで一晩加熱した後に風袋重量を測定したビーカー) に 20 mL移し, ホットプレート上で (100°C), 溶液を除去した後, 通風乾燥機 (90°C) で 10分間乾燥させた。全重量を測定し, 風袋重量との差し引きから脂質量を算出した。

3) 灰分量の測定

マッフル炉を用いてルツボを 525°Cで 2時間加熱・恒量し, 風袋重量を測定した。恒量後のルツボに各ムチン 500 mgを量り取り, ガスバーナーを用いて煙が出なくなるまで焼いた。次にマッフル炉を用いてこれを 525°Cで 5時間加熱し, ムチンを灰化した。全重量を測定し, 風袋重量との差し引きから灰分量を算出した。

4) 水分量の測定

恒量済みのビーカーに各ムチン 1 gを正確に量り取り, 通風乾燥機内で 105°C, 16時間加熱した。デシケーターの中で常温に戻した後, 全重量を測定し, 風袋重量との差し引きから水分量を算出した。

5) O-結合性糖鎖当量の測定

O-結合性糖鎖当量をCroner&Wemoreらの方法⁴⁹⁾に従って測定した。各ムチン 10 mgに蒸留水 4 mLを加え溶解させた。その後, この溶液を蒸留水で 100倍に希釈した。この懸濁液 100 μ Lを 1.5 mLマイクロチューブに分注し, アルカリ化 2-シアノアセタミド (2-cyanoacetamide, 2-CNA) 溶液 (150 mM 水酸化ナトリウム溶液 : 600 mM 2-CNA = 5 : 1) 120 μ Lを加え, 沸騰水中で 30分間加熱した。この溶液に 600 mM ホウ酸緩衝液 (pH 8.0) 1 mLを加えた。溶液を常温に戻した後, 蛍光光度計 (F-2700, 株式会社日立製作所, 東京, 日本) を用い, 励起光を 336 nmとし, 383 nmにおける蛍光強度

を測定した。標品にはGalNAc (A2795, Sigma) を被験試料と同様に測定して作成した標準曲線をもとにGalNAc量を算出した。

6) 硫酸化物量の測定

各ムチン 10 mgに超純水 4 mLを加え溶解させ、この溶液を超純水で6倍に希釈した (タンパク質含量; 50–100 µg/mL)。1.5 mL容のマイクロチューブにこの溶液 100 µLを量り取り、超純水で調製した 8 M 塩酸 100 µLを加えた。この溶液をヒートブロック (HF61, ヤマト科学株) を用いて 100°Cで 4時間加熱して加水分解した。この溶液を濃縮後、超純水 300 µLを加えて溶解させ、再度濃縮した。この手順 (超純水の添加から濃縮まで) を計 3回繰り返す、最終残渣に超純水 500 µLを加え溶解させた。続いてこの溶液をメンブレンフィルター (DISMIC-13HP, アドバンテック東洋株) で濾過し、この濾液を分析カラムとしてDionex IonPacAS17 (4 × 250 mm, Life Technologies, CA, USA) を備えたイオンクロマトグラフを用いて測定した。標品として硫酸化ナトリウムを被験試料と同様に測定して作成した標準曲線をもとに定量した。

7) シアル酸量の測定

各ムチン 10 mgに超純水 4 mLを加え溶解させ、この溶液を蒸留水で20倍に希釈した。希釈後の溶液 50 µLをガラスバイアル瓶に量り取り、62.5 mM 塩酸 200 µLを加えヒートブロック (HF61, ヤマト科学株) を用い 80°Cで 4時間加熱して加水分解した。放冷後、加水分解後のサンプル 50 µLを別のガラスバイアル瓶に量り取り、1,2-diamino-4,5-methylenedioxybenzene·2HCl (DMB) labeling溶液 [Coupling solution : 蒸留水 : DMB solution = 5 : 4 : 1), シアル酸蛍光標識試薬キット付属, タカラバイオ株, 滋賀, 日本] 200 µLを加え、ヒートブロック (DTU-1C, タイテッ

ク(株), 埼玉, 日本) を用い 50°Cで 2.5時間加熱してシアル酸を標識した。分析カラム (TSKgel ODS-80TS, 東ソー(株), 東京, 日本) および蛍光検出器 (RF-10AXL, 株島津製作所) を備えたHPLCシステムを用い標識後の溶液の蛍光強度 (励起波長, 373 nm; 蛍光波長, 448 nm) を測定した。標品として*N*-アセチルノイラミン酸 (*N*-acetylneuraminic acid, NeuAc, シアル酸蛍光標識キット付属, タカラバイオ(株)) を被験試料と同様に測定して作成した標準曲線をもとに定量した。

8) 糖鎖構成糖の測定

各ムチン 10 mgに蒸留水 10 mLを加え溶解させ, この溶液を蒸留水で10倍に希釈した。続いて希釈後の懸濁液を加水分解した。加水分解の方法を中性糖 (ガラクトース, マンノース, グルコース, アラビノース, リボース, キシロース, フコース, ラムノース) とアミノ糖 [*N*-アセチルマンノサミン, GlcNAc, *N*-アセチルガラクトース (*N*-acetylgalactosamine, GalNAc)] に分けた。中性糖について, 各ムチン溶液 50 μ Lを 1.5 mL容マイクロチューブに量り取り, 8 M トリフルオロ酢酸 50 μ Lを加え, ヒートブロック (HF61, ヤマト科学(株)) を用い 100°Cで 3時間加水分解した。アミノ糖の測定について, ムチン溶液 50 μ Lを 1.5 mL容マイクロチューブに量り取り, 8 M 塩酸 50 μ Lを加え, ヒートブロック (HF61, ヤマト科学(株)) を用いて 100°Cで 4時間加水分解した。放冷後, 加水分解後の溶液を 1.5 mL容のマイクロチューブに 20 μ Lを量り取り, 遠心濃縮した。再度残渣に 2-プロパノール 40 μ Lを加えた後, 濃縮した。さらにこの残渣にピリジン : メタノール = 1 : 9の混合液 40 μ Lを加え, 混合した後, さらに無水酢酸 10 μ Lを加え, 再度混合した。マイクロチューブの蓋を開けた状態でこの溶液を遮光し常温で 30分間静置した。その後, この溶液を濃縮した。濃縮残渣に蒸留水 10 μ Lおよび 4-アミノ安息香酸エチルエステル (4-

aminobenzoic acid ethyl ester, ABEE) labeling溶液 [GlyScope ABEE Labeling Kit, (株)J-オイルミルズ, 東京, 日本; ABEE溶液 : 酢酸 : 還元剤 (ピリジンボランコンプレックス) = 100 : 34 : 29] 40 μ Lを加え, ヒートブロック (HF61, ヤマト科学(株)) を用い 80°Cで 1 時間加熱して標識した。標識後の溶液に蒸留水 200 μ Lおよびクロロホルム 200 μ Lを加えて攪拌した後, 遠心分離した (15,000 \times g, 25°C, 5 min)。その後, 水層 (上層) をメンブレンフィルター (DISMIC-13HP, アドバンテック東洋(株)) で濾過した。糖分析用カラム [Honenpak C18 (for ABEE Labeling Kit), (株)J-オイルミルズ] および蛍光検出器 (RF-10AXL, (株)島津製作所, 京都) を備えたHPLCシステムを用いこの濾液の蛍光強度 (励起光, 305 nm; 蛍光波長, 360 nm) を測定した。標品には未標識の糖水溶液カクテル [GlyScope Monosaccharide Mix-11 (unlabeled), (株)J-オイルミルズ] を用い, 被験試料と同様に標識後, 測定して作成した標準曲線をもとに定量した。

9) アミノ酸の測定

システインとメチオニン, トリプトファンおよびその他のアミノ酸はそれぞれ異なる方法でアミノ酸を測定した。システイン, メチオニン, トリプトファンを除く, アミノ酸について, 各ムチン 50 mgに蒸留水 2.0 mLを加え溶解させた。続いて 1 mL容バキュームリアクションチューブ (ジューエルサイエンス(株), 東京, 日本) にこの溶液 0.5 mLを量り取り, 0.2% 2-メルカプトエタノールを含む 12 M 塩酸を 0.5 mL加えた (終濃度: 6 M)。この溶液を真空ポンプによりバキュームリアクションチューブ内を脱気し, 流動パラフィンで熱伝導効率を良くしたヒートブロック (HF61, ヤマト科学(株)) で110°Cで24時間加水分解した。この溶液を 25 mL容のメスフラスコに移し, 3 M 水酸化ナトリウムを 1.75 mL加えて中和し, 67 mM クエン酸ナトリウム緩衝液 (pH 2.2, 富士フイルム和光純薬(株), 大阪, 日本) で

25 mLに定容した。この溶液をメンブレンフィルター (DISMIC-13HP, アドバンテック東洋株) で濾過し濾液を得た。分析用カラムとして日立ハイテクパックカラム #2622PH (Φ4.6 × 60 mm, 株日立ハイテク, 東京, 日本), プレカラムとして日立パックドカラム #2650L (Φ4.6 × 40 mm, 株日立ハイテク) を備えたアミノ酸アナライザー (L-8900, 株日立製作所, 東京, 日本) を用いて濾液のアミノ酸濃度を測定した。

システインおよびメチオニンの測定について, ムチン 50 mgをネジ付き試験管に量り取り, 過ギ酸溶液 [ギ酸 (富士フィルム和光純薬株): 30% 過酸化水素 (富士フィルム和光純薬株) = 9 : 1の混合液を調製後, 室温で 1 時間放置してから使用] 1 mLを加え, 4°Cで 16時間静置した後, 濃縮した。濃縮残渣に蒸留水 1 mLを加え溶解させた。1 mL容バキュームリアクションチューブ (ジーエルサイエンス株) にこの溶液 500 μLを量り取り, 12 M 塩酸 500 μLを加えた (終濃度: 6 M)。真空ポンプによりバキュームリアクションチューブ内を脱気し, 流動パラフィンで熱伝導効率を良くしたヒートブロック (HF61, ヤマト科学株) で140°Cで20時間加水分解した。加水分解後の溶液を 25 mL容メスフラスコに移し, 3 M 水酸化ナトリウム 1.75 mLを加えて中和し, 67 mM クエン酸ナトリウム緩衝液 (pH 2.2, 富士フィルム和光純薬株) で 25 mLに定容した。この溶液をメンブレンフィルター (DISMIC-13HP, アドバンテック東洋株) で濾過した。続いて先と同様にアミノ酸アナライザーを用い濾液のアミノ酸濃度を測定した。

トリプトファンの測定については, ムチン 30 mgに蒸留水 1.08 mLを加え懸濁させた。6 mL容バキュームリアクションチューブ (ジーエルサイエンス株) にこの懸濁液 900 μLを量り取り, さらに水酸化バリウム八水和物 1.56 gおよび 60% 2'2'-チオジエタノール 100 μLを加えて攪拌した。この懸濁液を沸騰水中で加熱して水酸化バリウムを完全に溶解させ, 水酸化バリウムが再結晶化する前に, 真空ポンプによりバキュームリアクション

チューブ内を脱気した。脱気後のサンプルを、流動パラフィンで熱伝導効率を良くしたヒートブロック (HF61, ヤマト科学(株)) で110°Cで24時間加水分解した。その後蒸留水を加えて適宜希釈しながら、この分解液を 25 mL 容メスフラスコに移した。この手順を数回繰り返した後、6 mL容バキュームリアクションチューブ内にある乳白色の結晶を少量の 6 M 塩酸を加えて溶解させ、メスフラスコに移した。ここに 1% フェノールフタレイン溶液 (富士フィルム和光純薬(株)) を 3滴加えた。液色を指標に 3 M 水酸化ナトリウムおよび 6 M 塩酸で溶液を弱塩基性に調整し、これを蒸留水で 25 mLに定容した。定容後の溶液をメンブレンフィルター (DISMIC-13HP, アドバンテック東洋(株)) で濾過して濾液を得た。分析用カラムとして (CAPCELL PAK C18 AQ, 大阪ソーダ(株), 大阪, 日本) および蛍光検出器 (RF-10AXL, 株島津製作所) を備えたHPLCシステム (株島津製作所) を用い蛍光強度 (励起波長, 285 nm; 蛍光波長, 348 nm) からトリプトファン濃度を測定した。

標品にはそれぞれ0.1 nmol/mLのシステインおよびメチオニン溶液, 24.5 nmol/mLのトリプトファン溶液あるいは100 nmol/mLのアミノ酸溶液を用い、被験試料と同様に測定して作成した標準曲線をもとに定量した。

10) 統計解析

実験結果を平均値 \pm 標準誤差で表した。各データの等分散性を Bartlett検定により確認した後、等分散であれば一元配置分散分析 (one-way analysis of variance, one-way ANOVA) 後、Tukey-Kramerテストによって検定した。不等分散を示すデータについては対数変換した後、等分散であることを確認できた場合、先と同様の統計処理を行った。対数変換後も不等分散を示す場合、Kruskal-Wallis ANOVA後、Steel-Dwassテストを行った。いずれの統計結果も危険率が 5%未満のとき有意とみなした。

結果

SSM (ロット A), PSM および RGM の化学分析の結果を Table 1 に示した。RGM の炭水化物含量は SSM に比べ 17% および PSM に比べ 10% 低かった。O-結合性糖鎖当量は PSM で SSM に比べ 112.5% および RGM に比

Table 1 Chemical characteristics of SSM, PSM, and RGM¹

	SSM	PSM	RGM
Chemical composition (wt %)			
Protein	20.1	19.9	24.3
Carbohydrate	69.8	65.3	57.0
Ash	4.4	6.8	16.4
Lipids	0.0	1.0	0.9
Moisture	5.7	7.0	1.4
O-glycans (mmol/g)	0.46	0.68	0.32
Sulfate content (mmol/g)	0.08	0.04	0.03
Sulfate to O-glycans (%)	18.1	6.0	8.5
Sugar composition (mol %)			
<i>N</i> -acetylglucosamine	13.5	32.7	19.3
<i>N</i> -acetylgalactosamine	30.8	22.4	22.9
Galactose	22.2	22.5	22.5
Fucose	18.7	12.0	14.3
<i>N</i> -acetylneuraminic acid	2.8	1.6	2.8
<i>N</i> -glycolylneuraminic acid	ND	0.1	3.7
Neuraminic acids ²	2.8	1.7	6.5
Other ³	12.0	8.6	14.6
Amino acids (mol %)			
Ser	11.1	10.8	16.4
Pro	10.3	10.7	8.0
Thr	23.2	12.3	15.0
Asp ⁴	4.2	5.0	7.1
Glu ⁵	6.5	6.6	16.2
Gly	7.9	10.3	4.3
Ala	4.3	5.9	4.5
Val	6.5	12.2	9.7
Ile	12.9	7.0	7.2
Leu	2.8	3.5	3.4
Tyr	1.4	1.2	0.6
Phe	1.7	2.2	1.0
Lys	2.5	4.6	2.1
His	1.1	1.8	1.1
Arg	1.2	3.4	0.9
Trp	0.4	0.5	0.6
Cys	1.5	1.4	1.3
Met	0.5	0.4	0.6

¹Values are the mean of duplicate determinations for chemical compositions or triplicate for O-glycans, sulfate content, and compositions of sugars and amino acids.

SSM, skate-skin mucin; PSM, porcine stomach mucin; RGM, rat gastrointestinal mucin. ND, not detected.

²Sum of *N*-acetylneuraminic acid + *N*-glycolylneuraminic acid.

³SSM, Glc (9.4 ± 0.10%) and Ara (2.6 ± 0.48%); PSM, Glc (3.5 ± 0.092%) and Rib (5.1 ± 0.068%); RGM, Glc (6.2 ± 0.82%) and Xyl (8.4 ± 0.49%).

⁴Sum of Asp + Asn.

⁵Sum of Glu + Gln.

べ 48%高く、次いで SSM, RGM の順であった。一方、硫酸化物含量は SSM で他のムチンに比べ有意に高かった。ムチン糖鎖の *O*-結合性糖鎖当量に対する硫酸含有比率として算出した硫酸化糖キャッピング比率も SSM は PSM の約 3 倍, RGM の約 2 倍であった。SSM の GalNAc およびフコース含量, PSM の GlcNAc 含量, RGM のシアル酸含量 [NeuAc + *N*-glycolylneuraminic acid (NeuGc)] は他のムチンに比べそれぞれ高値を示した。18 種 (アスパラギンおよびグルタミンはそれぞれ酸化され, アスパラギン酸およびグルタミン酸として検出される。) のアミノ酸のうち, 15 種類のアミノ酸含量においてムチン間で差が認められた。特にスレオニン (threonine, Thr) 含量は SSM で PSM および RGM に比べ顕著に高値を示した (vs. PSM, 1.9 倍; vs. RGM, 1.5 倍)。これらのことから SSM は PSM および RGM に比べ硫酸化糖キャッピング比率が高く, アミノ酸については高 Thr, 構成糖については高 GalNAc 含有ムチンとして特徴付けられた。SSM のロット A-F の化学分析の結果を Table 2 に示した。*O*-結合性糖鎖当量は 0.23–0.46 mmol/g でいずれのロットも PSM および RGM に比して低値を示した。SSM の硫酸化糖キャッピング比率は少なくとも 14.3%以上と、PSM および RGM に比べるといずれのロットも 1.6 倍以上だった。一方, SSM のロット間の比較について, ロット A-F の Thr 含量の平均値は 58.3 mg/g であったが, ロット E のみ他のロットに比べ Thr 含量が顕著に低かった (28.5 mg/g)。アミノ糖含量はいずれのロットも概ね同等であった (GalNAc, 0.28–0.40 mmol/g; GlcNAc, 0.71–0.97 mmol/g)。

Table 2 Chemical characteristics of SSM from different lots (A, B, C, D, E and F)¹

	A	B	C	D	E	F
<i>O</i> -glycans (mmol/g)	0.46	0.27	0.33	0.46	0.23	0.46
Sulfate content (mmol/g)	0.08	0.10	0.11	0.08	0.09	0.07
Sulfate to <i>O</i> -glycans (%)	18.0	38.0	34.2	17.0	39.3	14.3
Threonine (mg/g)	66.5	51.7	62.9	65.6	28.5	74.3
<i>N</i> -acetylglucosamine (mmol/g)	0.40	0.28	0.30	0.39	0.39	0.31
<i>N</i> -acetylgalactosamine (mmol/g)	0.83	0.72	0.80	0.85	0.97	0.71

¹Values are the mean of duplicate determinations. SSM, skate-skin mucin.

第4節 ラット新鮮便を酵素源とした各ムチンのムシナーゼ活性に対する各種ムチンの応答性 (実験 1)

実験方法

7週齢のWistar系の雄ラット (体重 166 ± 2 g [平均値 \pm 標準誤差]) を日本エスエルシー(株)から購入し, 室温 $23 \pm 1^\circ\text{C}$, 照明管理 (7:00から19:00に点灯) のもと, ラットに水とAIN-76に準拠した飼料を自由摂取により 14日間与えた。試験最終日に新鮮便を採取し, *in vitro* ムチン分解 (ムシナーゼ) 活性をShiauらの方法⁵⁰⁾に従い以下のように測定した。約 100 mgの糞便に氷冷した10 mM リン酸緩衝液 (pH6.5) 10 mLを加えた。糞便をハサミで細切した後, 糞便を軟化させるために氷冷して 10分間静置した。続いてポリトロン (PT-2100, Kinematica) を用いホモジナイズして (11,000 rpm, 4°C , 30 sec) 得た懸濁液を酵素液として以下の酵素反応に用いた。また, 各ムチンを10 mM リン酸緩衝液 (pH6.5) に溶解させた 2%ムチン溶液を基質液として用いた。酵素反応を以下のように実施した。試験管に酵素液 900 μL を量り取り, 恒温振盪水槽 (NTS-1300, 東京理化工機(株)) を用い, 30°C で 5分間予備加熱した。次に基質液 100 μL を添加し直ちに攪拌した後, 30°C で反応させた。酵素液 900 μL に上述のリン酸緩衝液を 100 μL 加えた酵素ブランクおよびリン酸緩衝液 900 μL に基質液 100 μL を加えた基質ブランクを設け, 同様に加熱した。反応時間を 10, 20あるいは 30分間とした。反応終了後, 酵素を失活させるために沸騰水中で 3分間加熱した。これら反応後の混合液について遊離する還元糖量をNelsonらの方法⁵¹⁾に従って測定した。反応後の混合液 1 mLにソモギー試薬 [15% (w/v) 硫酸銅 (II) 五水和物溶液 : 2.5% (w/v) 炭酸ナトリウム, 2.5% (w/v) ロッセル塩および 2% 炭酸水素ナトリウムを含む 20% 硫酸ナトリウム溶液 = 1 : 25 (v/v) の混合液, 使用直前に混合] 1 mLを加え, 沸騰水中で 20分間加熱した。その後直ちに氷水中で冷却し, ネルソン試薬 (七モリブデン酸六ア

ンモニウム四水和物 25 g/DW 450 mL, 硫酸 21 mLおよびヒ酸水素ナトリウム七水和物 3 g/DW 25 mLの混合液, 調製後 24–48 時間 37°Cで加温) 1 mLを加え, 20分間静置した。静置後の懸濁液 450 μ Lを 15 mL容コニカルチューブに量り取り, 蒸留水 3.3 mLを加えて希釈した。続いて希釈後の懸濁液を遠心分離し (2,330 \times g, 25°C, 10 min), 得られた上清の 660 nmにおける吸光度を測定した。標品にはD (+)-グルコースを用い, 被験試料と同様に測定して作成した標準曲線をもとに定量した。基質としてSSM, PSM, RGMを用い, 同一の酵素液を用いて並列して反応させた。ネルソン試薬については使用前に 37°Cで 24–48時間加温した。酵素液のタンパク質含量をLowry法⁴⁷⁾に従って測定し, 酵素活性をタンパク質 1 mg当たりの1分間における還元糖の遊離量 [nmol glucose liberated/(min \cdot mg protein)] とし, 平均値 \pm 標準誤差で表した。ムシナーゼ活性の統計解析を反復測定一元配置分散分析 (repeated measures ANOVA) によって行い, 交互作用が認められた場合, 反応時間ごとの群間比較を本章・第3節と同様に行った。

結果

ムシナーゼ活性をラット新鮮便を酵素源とした還元糖遊離量を測定することにより測定した。各ムチンを基質とした場合の還元糖遊離量の推移をFig. 1に示した。いずれの反応時間においてもPSMを基質とした場合の反応性が最も高く, RGMの反応性は中位であり, SSMの反応性は最も低かった。

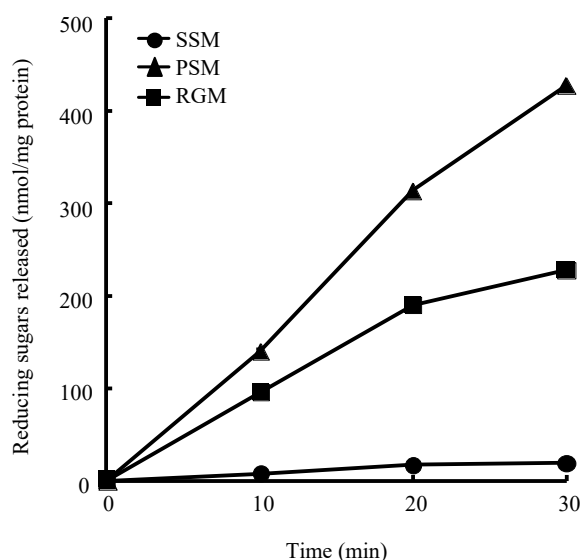


Figure 1 Reactivity of SSM, PSM, and RGM as substrate for fecal mucinase.

Values are the mean of triplicate determinations. SSM, skate-skin mucin; PSM, porcine stomach mucin; RGM, rat gastrointestinal mucin (Experiment 1).

第5節 ラットにおけるSSMのAM誘導能とその機序解析-ムチン糖鎖末端の硫酸化糖キャッピング比率およびThr含量の関与-

実験方法

1) 実験動物および飼料組成

7週齢のWistar系雄ラットを日本エスエルシー(株)から購入し、室温 $23 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 、照明管理 (7:00から19:00に点灯)のもと、底面が格子状のステンレスケージ内で個別に飼育した。ラットを搬入後、7日間予備飼育した。予備飼育中にはラットにAIN-76組成を基本とし、50.25%コーンスターチ、25%カゼイン、10%スクロース、5%コーンオイル、5%セルロース、3.5%ミネラル混合物 (オリエンタル酵母工業(株)、東京、日本)、1%ビタミン混合物 (オリエンタル酵母工業(株)) および 0.25%重酒石酸コリン (富士フィルム和光純薬(株)) で構成された飼料を与えた。予備飼育後、体重を基準にラットを各群に割り当てた。なお、全ての動物実験を静岡大学実験動物委員会に

よって承認された方法に従って実施し (承認番号; 2020A-13および2021A-4), ラットを「実験動物に関する指針」に沿って維持した。

I) ラットにおけるSSM, PSMおよびRGMの摂取によるAM 誘導能の比較 (実験 2)

予備飼育後, 24匹のラット (体重 168 ± 1 g [平均値 \pm 標準誤差]) を各群 6匹の 4群に割り当てた。ラットに水および対照飼料 (予備飼育中に与えた飼料と同一) あるいはSSM (ロットA), PSM, RGMを 15 g/kg添加した飼料を自由摂取により 14日間与えた。ムチンの添加を対照飼料中の同量のコーンスターチと置換することで行った。飼育開始 11, 12日目に新鮮便を採取し, ムシナーゼ活性の測定に用いた。飼育終了時, ペントバルビタール麻酔下 (50 mg/kg) で断頭により致死させた。盲腸を採取した後, その重量を測定した。盲腸内容物をpH, 有機酸濃度, O-結合性糖鎖当量, AM 数, *Bacteroides thetaiotaomicron* (BT) 数および総菌数ならびに 16S rRNA遺伝子解析に供した。

II) ラットにおけるO-結合性糖鎖当量およびThr含量の異なるSSMの摂取によるAM 増殖能の比較 (実験 3)

予備飼育後, 36匹のラット (体重 170 ± 1 g [平均値 \pm 標準誤差]) を各群 6匹の 6群に割り当てた。ラットに水および対照飼料 (予備飼育中に与えた飼料と同一) あるいはロットA, B, D, EあるいはFのSSMを 12 g/kg添加した飼料を自由摂取により 14日間与えた。ムチンの添加を対照飼料中の同量のコーンスターチと置換することで行った。飼育終了時, ペントバルビタール麻酔下 (50 mg/kg) で断頭により致死させた。盲腸を採取した後, その重量を測定した。盲腸内容物のO-結合性糖鎖当量およびAM 数を測定した。

2) 盲腸内容物細菌数の測定

盲腸内容物の菌体成分からDNA抽出キット (ISOFEACAL, (株)ニッポンジーン, 東京, 日本) を用いてDNAを抽出した。盲腸内容物 100 mgを1.5 mL容マイクロチューブに量り取り, lysis solution F 1 mLを加え, 懸濁させた。この懸濁液全量を 2 mL容beads tubeに移し, ボルテックスミキサーを用いて混合した後, ビーズビーティングした (マルチビーズショッカー, 安井機器(株), MB455GU, 大阪, 日本)。続いてこの懸濁液を遠心分離し (12,000 × g, 25°C, 5 min), 上清を回収した。この上清 600 μLを 2 mL容マイクロチューブに移し, purification solution 400 μLを加えて攪拌し, クロロホルム 600 μLを加え, 全体が均一になるまで混合した。この混合液を遠心分離し (12,000 × g, 25°C, 5 min), 上清を回収した。この上清 800 μLを 1.5 mL容マイクロチューブに移し, precipitation solution 800 μLを加えて混合した。続いてこの混合液を遠心分離し (20,000 × g, 4°C, 15 min), 上清を捨て, 得られた沈澱にwash solution 1 mLを加えて分散させた。分散後の液を遠心分離し (20,000 × g, 4°C, 10 min), 上清を捨て, 得られた沈澱に 70% エタノール/DEPC水 [エタノール : 0.1% ジエチルピロカーボネイト (diethylpyrocarbonate, DEPC) = 7 : 3で混合, 予め 0.1% DEPCを 121°Cで 40分間オートクレーブ滅菌してから調製] 1 mLとEthachinmate (キット付属) 2 μLを加えてボルテックスミキサーで混合した。混合後の懸濁液を遠心分離し (20,000 × g, 4°C, 5 min), 上清を捨て, 得られた沈澱を風乾させた。風乾後の沈澱にTris-EDTA緩衝液 (pH 8.0) 100 μLを加えて溶解させ, この溶液をDNA溶液とした。光路長 1 cmのセルを用いて吸光度を測定した場合, DNA濃度が 50 μg/mLのときA260が 1になることを基準に吸光度を測定しDNA濃度を算出した。また, DNAの純度をA260/A280から算出し, この値が推奨値である 1.7–2.1の範囲内にあることを確認した。

細菌数をリアルタイムPCRによって測定した。それぞれの特異的プライマーおよびPCR条件をTable 3に示した。リアルタイムPCRにはLightCycler® Nano (Roche, BS, Switzerland) を使用した。PCRマスターミックス [SYBR Premix EX Taq II (タカラバイオ株) : 10 μ M プライマー溶液 (sense) : 10 μ M プライマー溶液 (antisense) : 滅菌超純水 = 25 : 2 : 2 : 16の混合液] を調製し、PCRマスターミックス 18 μ Lを 8連チューブ (LightCycler® 8-Tube Strips, Roche) の各ウェルに加えた。その後 50 μ g/ μ L以下に希釈したDNA溶液 2 μ Lをそれぞれ加え、8連チューブの蓋を閉め、8連チューブ専用小型遠心分離機 (PRISMTM mini, Labnet, NY, USA) でフラッシュした後、PCRに供した。反応終了後に融解曲線分析により反応の特異性を確認した。AM (JCM30893) , BT (JCM5827) および*E. coli* (DH5 α) の 16S rRNAを組み込んだプラスミドを用いて作成した標準曲線をもとに各細菌数を定量した。本実験においてマイクロピペット用チップおよびマイクロチューブは全て予めオートクレーブ滅菌 (121°C, 20 min) してから使用した。

Table 3 PCR primers and conditions for determination of bacterial counts in the cecal contents

Bacterial species	Sequence (5'-3')	Thermal denaturation	Annealing	Extension
<i>AM</i> ¹⁸⁾	CAG CAC GTG AAG GTG GGG AC (sense)	90°C, 30sec	59°C, 30sec	72°C, 30sec
	CCT TGC GGT TGG CTT CAG AT (antisense)			
<i>BT</i> ⁵²⁾	GCA AAC TGG AGA TGG CGA (sense)	90°C, 30sec	59°C, 30sec	72°C, 30sec
	AAG GTT TGG TGA GCC GTT A (antisense)			
Total bacteria ⁵³⁾	CGG CAA CGA GCG CAA CCC (sense)	95°C, 10sec	58°C, 10sec	72°C, 15sec
	CCA TTG TAG CAC GTG TGT AGC G (antisense)			

3) 盲腸有機酸濃度の測定

盲腸内容物から有機酸を抽出するために、1.5 mL容マイクロチューブに盲腸内容物 150 mgを量り取り、これに蒸留水 350 μ Lおよび内部標準として 300 μ g/mLのクロトン酸を含む 10 mM 水酸化ナトリウム溶液 500 μ Lを加え、ポリトロン (PT-2100, Kinematica) を用いてホモジナイズした

(23,000 rpm, 4°C, 30 sec)。次にこの懸濁液を遠心分離後 (20,630 × g, 4°C, 15 min), 得られた上清 500 μLを別の 1.5 mL容マイクロチューブに量り取り, 等量のクロロホルムを加えた。この混合液を全体が均一になるまで混合した。この混合液を遠心分離して (20,630 × g, 4°C, 15 min) 得られた水層 (上層) をメンブレンフィルター (DISMIC-13HP, アドバンテック東洋(株)) で濾過した後, 有機酸濃度の分析に供した。有機酸濃度の分析はShim-pack SCR 102Hカラム (8 mm I.D. × 300 mm L, 株島津製作所) を備えたHPLCシステム (LC-10A, 株島津製作所) を用いて, 内部標準法によって測定した。

4) 盲腸内容物のムチン量 (O-結合性糖鎖当量) の測定

盲腸内容物からのムチン画分の抽出をLienらの方法⁵⁴⁾に従って行った。盲腸内容物を凍結乾燥させ, 200 mgを 50 mL容ねじ口付き遠沈管に量り取り, 6 mLのPBS (pH 7.4) を加え, 沸騰水中で 10分間加熱した。次に恒温振盪水槽 (NTS-1300, 東京理化工機(株)) を用い, 37°C, 125 rpmで 1.5時間加熱した。この懸濁液をポリトロン (PT-2100, Kinematica) でホモジナイズした (11,000 rpm, 4°C, 1 min)。続いてこの懸濁液を遠心分離して (13,200 × g, 4°C, 30 min), 得られた上清を回収し, 再度遠心分離した (13,200 × g, 4°C, 30 min)。上清を 50 mL容のコニカルチューブ (ファルコンチューブ, Corning) に 3 mL量り取り, エタノールを 9 mL加えて混合した後, -30°Cで一晩静置した。その後, この混合液を遠心分離して (2,300 × g, 4°C, 10 min) 上清を捨てた。沈澱に 150 mM 塩化ナトリウム溶液 3 mLを加え, 沈澱を懸濁させた。この懸濁液にエタノールを 9 mL加えて混合した後, -30°Cで一晩静置した。その後, この混合液を遠心分離して (2,300 × g, 4°C, 10 min) 得られた上清を捨て, 沈澱を 5 mLの蒸留水で溶解させ, 凍結乾燥した。この乾燥物を超純水で 3 mLに定容した。盲腸内

容物のムチン量の指標として、この溶液のO-結合性糖鎖当量を測定した。

これ以降の方法は本章・第3節と同様に行った。

5) 糞便ムシナーゼ活性の測定

糞便ムシナーゼ活性の測定を本章・第4節と同様に行った。基質液として2% PSM溶液および2% SSM溶液を用い、20分の酵素反応後の遊離還元糖量から活性を算出した。

6) 盲腸内容物の16S rRNA遺伝子解析

本節2)に示したように盲腸内容物100 mgからDNAを抽出した。Illuminaの手順に従い⁵⁵⁾、次世代シーケンス解析用アダプター配列を付加した16S rRNA領域特異的プライマー(V3-V4領域)を用いてPCRにより増幅を行うことで、次世代シーケンサーに供するライブラリを調製した。得られたPCR産物の配列情報をMi-seq (Illumina, CA, USA)によって分析した[慶應義塾大学(長谷教授に依頼)]。配列データの解析をQIIME 1.9.1によって行った⁵⁶⁾。OTU (operational taxonomy unit) のクラスタリングをCD-HITで行った。BLAST (NCBI, MD, USA) をもとに配列のアサイメントを行った。なおクラスタリングおよび系統分類での類似性の閾値を97%とした。

7) 統計解析

統計解析は本章・第3節と同様に行った。16S rRNA遺伝子解析によって分析した細菌叢の群間比較には α -多様性の解析として、それぞれ種の豊富さを示すChao1インデックス⁵⁷⁾および種の均等度を示すShannonインデックス⁵⁸⁾を用いた。また、各検体のOUTをUniFrac距離 (weighted) でクラスタリングし、主座標分析 (principal coordinate analysis, PCoA) によって可視化した細菌叢の多様性 (β -多様性) を類似性分析 (analysis of similarity,

ANOSIM) で解析した。また、Huttenhower LabのGalaxyのツール (<https://huttenhower.sph.harvard.edu/galaxy/>) を用い、LEfSe (Linear discriminant analysis Effect Size) 解析を行った。菌種の解析をfactorial Kruskal-Wallisテストで (有意水準 < 0.05), subclassの解析をpairwise Wilcoxonテストで行い (有意水準 < 0.05), 線形判別分析の対数値の閾値を4.0とした。この結果を、同ツールを用いて作成したクラドグラムとして示した。

結果

1) ラットにおけるSSM, PSMおよびRGMの摂取によるAM 誘導能の比較 (実験 2)

飼料摂取量および体重増加量について群間に差は認められなかった (Table 4)。盲腸内容物および盲腸組織の重量も群間に差は認められなかったが、盲腸内pHはSSM群で対照群およびRGM群に比べ有意に低い値を示した。酢酸および酪酸濃度はPSM群で他の群に比べ有意な高値を示した。また、プロピオン酸および総SCFA濃度はSSMおよびPSM群で対照群に比べ高値を示し、SSMおよびPSMが結腸において腸内細菌により発酵を受けることが確かめられた。盲腸内O-結合性糖鎖等量を基準としたムチン残存量はSSM群で他の群に比べ高い値を示した。盲腸内総菌数はPSM群で他の群に比べ有意に高く、RGM群が中位で、対照群およびSM群で有意に低かった。リアルタイムPCRによって測定したAM 数はSSM群で他の群に比べ顕著な高値を示した。一方、BT 数について群間に差は認められなかった。PSMを基質とした場合、ムシナーゼ活性はSSM, PSMおよびRGM群のいずれも対照群に比べて有意な高値を示したが、SSMを基質とした場合のムシナーゼ活性はSSM群のみで他の群に比べ有意な高値を示した。このようにSSM群の消化管内ではSSMの分解に特化した腸内細菌叢が形成された可能

性が示唆された。また、16S rRNA遺伝子解析による盲腸内細菌叢の解析の結果、門レベルではいずれの群においてもFirmicutes, Bacteroides, Proteobacteria, VerrucomicrobiaおよびActinobacteriaが大多数 (97–99%) を占めた (Fig. 2-A)。ムチンの摂取による共通した変化は認められなかった。SSM群で対照群に比べBacteroidesおよびProteobacteria門の低下ならびにVerrucomicrobia門の有意な上昇が認められた。特にVerrucomicrobia門の増加が顕著であり、SSM群のVerrucomicrobia占有率は他の群に比して約 10倍に達していた。SSM群でChao1インデックスに他の群との間に差は認められなかったが (Fig. 2-B), Shannonインデックスは他の群に比べ有意に低下した (Fig. 2-C)。また、 β -多様性も群間に有意な差が認められた (Fig. 2-D)。菌種の占有率についても対照群に比べSSMの摂取によってAM および *Lactobacillus animalis* の、PSMの摂取によって *Hungatella hathewayi*, *Allobaculum stercoricanis*, *Blautia glucerasea* および *Porphyromonas pagonae* の、RGMの摂取によって *Hungatella hathewayi*, *Blautia glucerasea* および *Lactobacillus animalis* の有意な上昇が認められた (Table 5)。また、ムチンの摂取によってヒトの主要な硫酸還元菌である *Desulfovibrio desulfuricans*⁵⁹⁾ の占有率が有意に上昇していた (対照群, $0.19 \pm 0.01\%$; SM群, $0.33 \pm 0.02\%$; PSM群, $0.35 \pm 0.03\%$; RGM群, $0.45 \pm 0.03\%$)。LEfSe解析の結果をFig. 3に示した。当解析においてもSSM群についてAM および *Lactobacillus animalis* 占有率の増加が有意であった。

Table 4 Food intake, weight gain, and cecal and fecal variables in male Wistar rats fed a control diet or diet containing 15 g/kg of SSM, PSM, or RGM for 14 d (Experiment 2)¹

	Control	SSM	PSM	RGM
Food intake (g)	236 ± 7	237 ± 5	226 ± 8	227 ± 4
Body weight gain (g)	65 ± 3	67 ± 2	61 ± 3	62 ± 3
Cecum				
Contents (g)	3.0 ± 0.2	3.3 ± 0.3	3.0 ± 0.1	3.3 ± 0.3
Tissue weight (g)	0.56 ± 0.02	0.57 ± 0.03	0.56 ± 0.02	0.58 ± 0.02
pH	8.0 ± 0.0 ^a	7.4 ± 0.0 ^b	7.7 ± 0.0 ^{ab}	7.9 ± 0.1 ^a
Organic acids (μmol/g)				
Acetate	39.8 ± 2.5 ^b	48.0 ± 2.9 ^{ab}	51.9 ± 1.7 ^a	48.0 ± 2.2 ^{ab}
Propionate	12.8 ± 0.8 ^c	19.4 ± 0.8 ^a	15.8 ± 0.6 ^b	14.7 ± 0.6 ^{bc}
<i>n</i> -Butyrate	3.9 ± 0.5 ^b	4.4 ± 0.4 ^{ab}	5.7 ± 0.5 ^a	4.2 ± 0.2 ^{ab}
SCFAs ²	56.4 ± 3.5 ^b	71.8 ± 3.8 ^a	73.5 ± 2.6 ^a	69.9 ± 2.9 ^b
Succinate	1.0 ± 0.2	0.8 ± 0.6	0.8 ± 0.2	0.8 ± 0.2
<i>O</i> -Glycans (μmol/g)	0.23 ± 0.02 ^c	1.49 ± 0.32 ^a	0.24 ± 0.01 ^c	0.44 ± 0.02 ^b
Total bacteria (log copies/g)	13.0 ± 0.0 ^c	13.1 ± 0.0 ^c	13.4 ± 0.0 ^a	13.3 ± 0.0 ^b
<i>A. muciniphila</i> (log copies/g)	11.5 ± 0.2 ^b	12.9 ± 0.1 ^a	11.6 ± 0.1 ^b	11.6 ± 0.1 ^b
<i>B. thetaiotaomicron</i> (log copies/g)	9.0 ± 0.3	9.8 ± 0.2	9.3 ± 0.3	9.4 ± 0.2
Fecal mucinase activity (nmol/min · mg protein)				
PSM substrate	7.6 ± 1.8 ^b	21.9 ± 2.6 ^a	23.9 ± 5.3 ^a	20.6 ± 4.1 ^a
SSM substrate	3.3 ± 0.4 ^b	9.6 ± 0.7 ^a	5.3 ± 0.6 ^b	4.9 ± 0.6 ^b

¹Values are the mean ± SEMs; *n* = 6. Means in a row not labeled with a common letter differ significantly (*p* < 0.05).

SSM, skate-skin mucin; PSM; porcine stomach mucin; RGM; rat gastrointestinal mucin.

²SCFAs, total short-chain fatty acids (the sum of acetate, propionate, and *n*-butyrate).

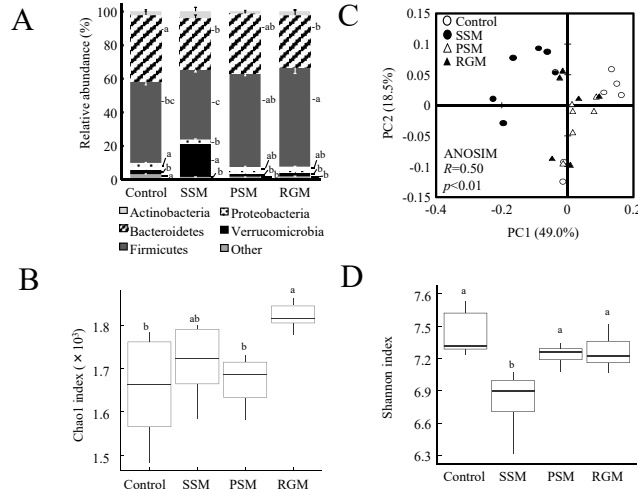


Figure 2 Phylum-level microbial composition (A), Chao 1 index (B), Shannon index (C), and principal coordinate analysis plot based on weighted UniFrac (β -diversity) (D) in male Wistar rats fed a control diet or diet containing 15 g/kg of SSM, PSM, or RGM for 14 d (Experiment 2).

Values are the mean ± SEM; *n* = 6 (A). Boxes represent the interquartile range (IQR) between the first and third quartiles (25th and 75th percentiles, respectively), and the horizontal line inside each box denotes the median. Whiskers represent the lowest and highest values within 1.5 times the IQR from the first and third quartiles, respectively (B, C). Values without a common superscript letter differ significantly (*p* < 0.05). ANOSIM, analysis of similarity; PC, principal component; SSM, skate-skin mucin; PSM, porcine stomach mucin; RGM, rat gastrointestinal mucin.

Table 5 Relative abundance of cecal microbiota at the species level in male Wistar rats fed a control diet or diet containing 15 g/kg of SM, RM, or PM for 14 d (Experiment 2)^{1,2}

	Control	SSM	PSM	RGM
	Relative abundance (%)			
Acidaminococcaceae				
<i>Phascolarctobacterium faecium</i>	0.8 ± 0.8 ^{ab}	1.6 ± 1.0 ^a	0.0 ± 0.0 ^b	0.0 ± 0.0 ^b
Akkermansiaceae				
<i>Akkermansia muciniphila</i>	2.7 ± 0.4 ^b	19.7 ± 2.0 ^a	2.3 ± 0.9 ^b	2.8 ± 0.6 ^b
Bacteroidaceae				
<i>Bacteroides acidifaciens</i>	3.5 ± 1.0	4.6 ± 0.5	4.5 ± 0.5	3.7 ± 0.5
<i>Bacteroides nordii</i>	0.8 ± 0.2	1.2 ± 0.1	1.1 ± 0.1	0.9 ± 0.1
<i>Bacteroides sartorii</i>	7.1 ± 2.0	2.5 ± 0.5	3.6 ± 0.6	3.1 ± 0.7
Bifidobacteriaceae				
<i>Bifidobacterium animalis</i>	1.5 ± 0.8	3.5 ± 2.2	0.6 ± 0.5	1.5 ± 0.8
Clostridiaceae				
<i>Clostridium disporicum</i>	4.6 ± 2.9	0.4 ± 0.2	0.2 ± 0.1	0.5 ± 0.3
<i>Hungatella hathewayi</i>	1.4 ± 0.2 ^b	1.0 ± 0.1 ^b	2.3 ± 0.2 ^a	2.1 ± 0.2 ^a
Desulfovibrionaceae				
<i>Desulfovibrio vulgaris</i>	1.4 ± 0.1 ^a	1.0 ± 0.1 ^b	1.1 ± 0.1 ^{ab}	0.8 ± 0.1 ^b
Erysipelotrichaceae				
<i>Allobaculum stercoricanis</i>	1.9 ± 0.4 ^b	2.1 ± 0.4 ^b	5.2 ± 1.1 ^a	4.4 ± 0.9 ^{ab}
<i>Turicibacter sanguinis</i>	2.4 ± 1.4	0.8 ± 0.5	0.0 ± 0.0	1.0 ± 0.8
Eubacteriaceae				
<i>Eubacterium tortuosum</i>	0.9 ± 0.2	0.6 ± 0.1	0.9 ± 0.2	0.9 ± 0.3
Lachnospiraceae				
<i>Acetatifactor muris</i>	0.8 ± 0.3	0.8 ± 0.3	0.8 ± 0.4	1.6 ± 0.8
<i>Blautia glucerasea</i>	8.6 ± 0.8 ^b	6.6 ± 0.4 ^b	12.7 ± 0.5 ^a	13.6 ± 0.8 ^a
<i>Clostridium clostridioforme</i>	0.5 ± 0.1	0.4 ± 0.0	0.8 ± 0.2	0.6 ± 0.2
<i>Clostridium saccharolyticum</i>	1.6 ± 0.1 ^a	0.6 ± 0.1 ^b	1.4 ± 0.1 ^a	0.9 ± 0.1 ^b
<i>Clostridium scindens</i>	3.9 ± 0.5 ^a	2.0 ± 0.2 ^b	5.1 ± 0.6 ^b	4.9 ± 0.5 ^a
<i>Roseburia faecis</i>	1.3 ± 0.2 ^{ab}	1.0 ± 0.2 ^b	2.8 ± 0.5 ^a	1.9 ± 0.4 ^{ab}
<i>Roseburia intestinalis</i>	2.8 ± 0.5	1.8 ± 0.2	3.1 ± 0.4	2.6 ± 0.4
Lactobacillaceae				
<i>Lactobacillus animalis</i>	2.3 ± 0.2 ^c	7.1 ± 0.6 ^a	3.1 ± 0.9 ^{bc}	3.9 ± 0.5 ^b
<i>Lactobacillus intestinalis</i>	0.1 ± 0.1	0.6 ± 0.3	1.4 ± 0.8	0.6 ± 0.2
<i>Lactobacillus johnsonii</i>	1.3 ± 0.6	2.2 ± 0.6	3.9 ± 1.2	3.7 ± 0.9
<i>Lactobacillus reuteri</i>	0.2 ± 0.1	0.5 ± 0.2	1.2 ± 0.4	0.6 ± 0.1
Odoribacteraceae				
<i>Odoribacter splanchnicus</i>	1.9 ± 0.5 ^a	0.5 ± 0.1 ^b	0.4 ± 0.1 ^b	1.4 ± 0.3 ^{ab}
Oscillospiraceae				
<i>Oscillibacter ruminantium</i>	0.8 ± 0.1	0.8 ± 0.1	0.6 ± 0.1	1.0 ± 0.2
Porphyromonadaceae				
<i>Barnesiella viscericola</i>	1.0 ± 0.0 ^{ab}	0.7 ± 0.0 ^c	1.1 ± 0.1 ^a	0.9 ± 0.0 ^b
<i>Coprobacter fastidiosus</i>	1.4 ± 0.2	1.0 ± 0.1	0.8 ± 0.1	1.1 ± 0.3
<i>Parabacteroides distasonis</i>	2.7 ± 0.3 ^a	1.4 ± 0.2 ^b	2.1 ± 0.1 ^{ab}	1.4 ± 0.2 ^b
<i>Parabacteroides goldsteinii</i>	3.1 ± 0.6	5.1 ± 0.3	3.3 ± 0.2	4.8 ± 0.7
<i>Parabacteroides johnsonii</i>	2.0 ± 0.5	2.0 ± 0.3	2.1 ± 0.2	3.1 ± 0.8
<i>Parabacteroides merdae</i>	0.8 ± 0.3 ^a	0.2 ± 0.1 ^{ab}	1.0 ± 0.5 ^a	0.1 ± 0.1 ^b
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	3.2 ± 0.6 ^a	0.5 ± 0.1 ^b	0.7 ± 0.1 ^b	0.6 ± 0.1 ^b
<i>Porphyromonas pasteri</i>	0.8 ± 0.1 ^a	0.7 ± 0.1 ^{ab}	0.6 ± 0.1 ^a	0.4 ± 0.0 ^b
<i>Porphyromonas pogonae</i>	5.0 ± 0.7 ^b	5.5 ± 0.8 ^b	9.9 ± 1.0 ^a	5.2 ± 0.7 ^b
Rikenellaceae				
<i>Alistipes putredinis</i>	0.5 ± 0.1 ^{ab}	0.8 ± 0.0 ^a	0.4 ± 0.0 ^b	0.7 ± 0.1 ^{ab}
<i>Alistipes senegalensis</i>	2.8 ± 0.1 ^a	1.0 ± 0.1 ^b	1.2 ± 0.2 ^b	0.8 ± 0.2 ^b
Ruminococcaceae				
<i>Flavonifractor plautii</i>	0.7 ± 0.2 ^{ab}	1.1 ± 0.1 ^a	0.6 ± 0.0 ^b	0.9 ± 0.2 ^{ab}
<i>Ruminococcus bromii</i>	2.9 ± 0.7 ^a	1.5 ± 0.3 ^{ab}	0.7 ± 0.1 ^b	3.5 ± 0.9 ^{ab}
Sutterellaceae				
<i>Parasutterella excrementihominis</i>	0.8 ± 0.0 ^a	0.3 ± 0.1 ^b	0.8 ± 0.1 ^{ab}	0.6 ± 0.1 ^{ab}
Not assigned				
<i>Intestinimonas butyriciproducens</i>	1.7 ± 0.4 ^{ab}	2.2 ± 0.2 ^a	1.4 ± 0.1 ^b	2.0 ± 0.4 ^{ab}

¹ Values are the mean ± SEM; *n* = 6. Means in a row not marked with a common letter differ significantly (*p* < 0.05). SSM, skate-skin mucin; PSM, porcine stomach mucin; RGM, rat gastrointestinal mucin.

² The top 30 bacterial species with the highest occupancy were extracted from each dietary group, and comparisons were made among the dietary groups.

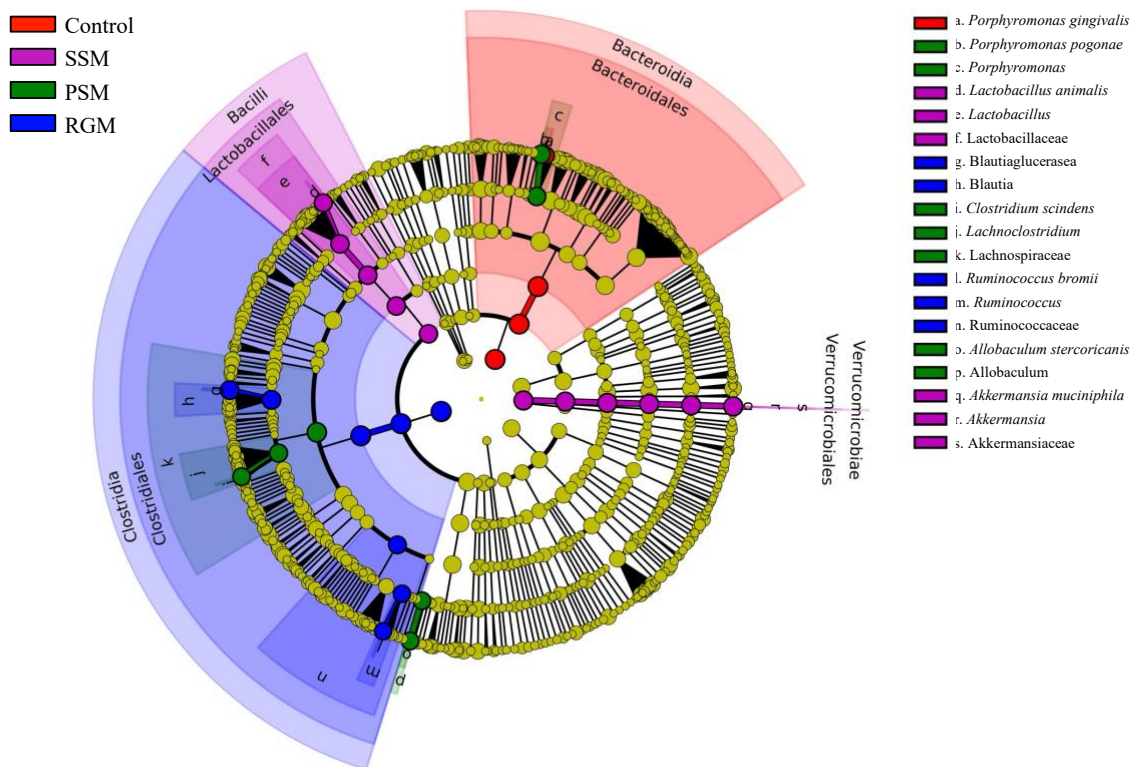


Figure 3 Cladogram of cecal microbiota in rats fed the control diet or a diet containing 15 g/kg diet of SSM, PSM or RGM for 14 d (Experiment 2).

LEfSe was used for linear discriminant analysis and generation of cladograms, considering features with log LDA score > 4 and alpha value < 0.05 as differentially abundant between sample groups using the Huttenhower Galaxy web application (<https://huttenhower.sph.harvard.edu/galaxy/>).

II) ラットにおけるO-結合性糖鎖当量およびThr含量の異なるSSMの摂取によるAM 増殖能の比較 (実験 3)

飼料摂取量，体重増加量および盲腸組織，盲腸内容物重量について群間差は認められなかった (Table 6)。SSM群の盲腸内O-結合性糖鎖等量を基準としたムチン残存量はロットに関わらず，対照群に比べて有意に高値を示した。一方，ロットA, B, D, FのSSMはAM 増殖誘導作用を示したが，Thr含有量が比較的低いロットEのみAM 増殖誘導作用は認められなかった。

Table 6 Food intake, body weight gain, and cecal variables in male Wistar rats fed a control diet or a diet containing 12 g/kg of lot A, B, D, E, or F SSM for 14 d (Experiment 3)¹.

	Control	A	B	D	E	F
Food intake (g)	232 ± 5	225 ± 6	231 ± 5	227 ± 5	235 ± 3	238 ± 3
Body weight gain (g)	70 ± 2	67 ± 3	69 ± 1	68 ± 3	70 ± 1	71 ± 3
Cecum						
Contents (g)	2.8 ± 0.1	3.4 ± 0.2	3.3 ± 0.3	3.3 ± 0.1	3.2 ± 0.1	3.2 ± 0.2
Tissue weight (g)	0.53 ± 0.01	0.57 ± 0.02	0.56 ± 0.03	0.56 ± 0.01	0.55 ± 0.02	0.56 ± 0.02
O-Glycans (μmol/g)	0.33 ± 0.03 ^c	1.11 ± 0.03 ^b	1.04 ± 0.26 ^b	2.37 ± 0.33 ^a	1.43 ± 0.23 ^{ab}	2.90 ± 0.71 ^a
<i>A. muciniphila</i> (log copies/g)	11.3 ± 0.2 ^c	12.8 ± 0.1 ^a	12.6 ± 0.2 ^a	12.6 ± 0.1 ^a	11.8 ± 0.2 ^{bc}	12.3 ± 0.2 ^{ab}

¹Values are the mean ± SEM; *n* = 6. Means in a row not labeled with a common letter differ significantly (*p* < 0.05). SSM, skate-skin mucin.

第6節 ヒト大腸におけるエイ体表粘質物ムチンのAM 誘導能の推定-ヒト新鮮便の嫌氣的培養試験から-

実験方法

1) 糞便の採取

静岡大学研究倫理委員会による承認を受け (承認番号; 20-16) 本試験を実施した。静岡大学の健康な成人男性 20名 (24-63歳) を対象として糞便を採取した。いずれの被験者も過去 6ヶ月の間薬物の服用をしていないことを確認した。発酵試験を行う前に予備試験として糞便のAM 数および総菌数をリアルタイムPCRによって本章・第 5節と同様に測定した。この結果をもとに、AM の初期占有率を算出した (Table 7)。20名のうちAM 初期占有率の異なる 5名を糞便ドナーとして選抜した。AM 初期占有率 1.0%以上 (ドナー 1), 占有率 0.1-1.0% (ドナー 20), 占有率 0.001-0.1% (ドナー 12, 13) および占有率 0.0001%以下 (ドナー 10) の 5名とした。

Table 7 Number of *Akkermansia muciniphila* and total bacteria in human fecal samples.

Donor no.	<i>Akkermansia muciniphila</i> (log copies/g wet feces)	Total bacteria	<i>Akkermansia</i> to total bacteria (%)
1	11.6	13.4	1.6
2	4.4	13.3	0.0000013
3	8.7	14.1	0.00040
4	7.6	14.2	0.000029
5	7.1	13.2	0.000075
6	8.6	13.6	0.0010
7	7.6	14.1	0.000029
8	7.5	13.6	0.000077
9	7.2	13.5	0.000049
10	6.6	13.3	0.000018
11	4.2	13.8	0.00000028
12	8.9	13.8	0.0013
13	9.2	13.2	0.010
14	6.6	13.5	0.000011
15	5.0	13.5	0.00000037
16	4.5	13.9	0.00000040
17	4.9	13.2	0.00000061
18	4.9	13.9	0.000000095
19	4.8	12.9	0.00000088
20	10.5	13.5	0.11

Fresh fecal samples were used. Measurement of *Akkermansia* and total bacteria counts were carried out using real-time PCR.

2) ヒト新鮮便のSSM, PSM添加培地における嫌氣的培養試験 (実験 4)

採取した糞便をプラスチック製のカップに入れ、直ちに酸素吸収・炭酸ガス発生剤 (アネロパック・ケンキ, 三菱ガス化学株, 東京, 日本) を入れたパウチに移し, 発酵試験まで 4°C で 2 時間保存した。Han らの方法⁶⁰⁾に従い, 5 g の糞便を滅菌した生理食塩水 45 mL に懸濁させ, 細菌検査用ホモジナイザー (エクスナイザー 400, オルガノ株, 東京, 日本) を用いて糞便を破碎し (60 sec), 破碎後の懸濁液を糞便懸濁液とした。ジャーファーメンターに糞便懸濁液 22 mL [終濃度 2.0% (w/v)], 3.3 g の SM または PM [終濃度 3.0% (w/v)] を添加した生理食塩水 63 mL および 25 mL の 0.352% (w/v) ニュートリエントブロス (Nutrient broth, NB, ベクトン・デ

イッキンソン株, NJ, USA) [終濃度 0.8% (w/v)] を添加し, 48 時間培養を行った。その間窒素ガス気流下 (流速 40 mL/min) で培養装置の嫌気状態を維持した。また, 2 M 水酸化ナトリウム溶液の滴下によって, 培養液の pH 下限域を 5.5 あるいは 6.5 に維持した。培養開始直後および培養開始 3, 6, 12, 24, 36, 48 時間後に 1 mL の培養液を採取し, 有機酸濃度, *AM* 数, *BT* 数を測定し, 16S rRNA 遺伝子解析を行った。また, 培養中の pH の変動を培養装置のモニターにて確認し, 培養液の採取時に記録した。

3) 培養液中菌数の測定

採取した 1 mL の培養液を 1.5 mL 容マイクロチューブに移し, 遠心分離した (10,000 × g, 4°C, 10 min)。得られた沈澱物から本章・第 5 節と同様に DNA を抽出し, 同様に *AM* および *BT* 数を測定した。

4) 培養液中有機酸濃度の測定

採取した 1 mL の培養液を 1.5 mL 容マイクロチューブに移し, 遠心分離した (10,000 × g, 4°C, 10 min)。得られた上清 250 μL を 1.5 mL 容マイクロチューブに移し, 内部標準として 300 μg/mL のクロトン酸を含む 10 mM 水酸化ナトリウム溶液を 250 μL 加えた。この溶液に等量のクロロホルムを加え全体が均一化するまで混合した。これ以降の手順は本章・第 5 節と同様に行った。

5) 統計解析

実験結果を, 平均値 ± 標準誤差で表した。培養試験中の *AM* および *BT* 数ならびに有機酸濃度の統計処理には反復測定一元配置分散分析 (one-way repeated measures ANOVA) を用いた。交互作用が認められた場合, 各

時間の群間比較を本章・第 4 節と同様に行った。いずれの統計結果も、危険率が 5%未満のとき有意とみなした。

結果

ヒト新鮮便のSSM, PSM添加培地における嫌氣的培養試験 (実験 4)

pH下限域 5.5では最もAMの初期占有率が高いドナー 1においてもSSMおよびPSMのいずれもAM数の増加は認められなかった (Fig. 4)。したがって、pH下限域 6.5で以降の試験を行った。SCFA産生量はいずれでも

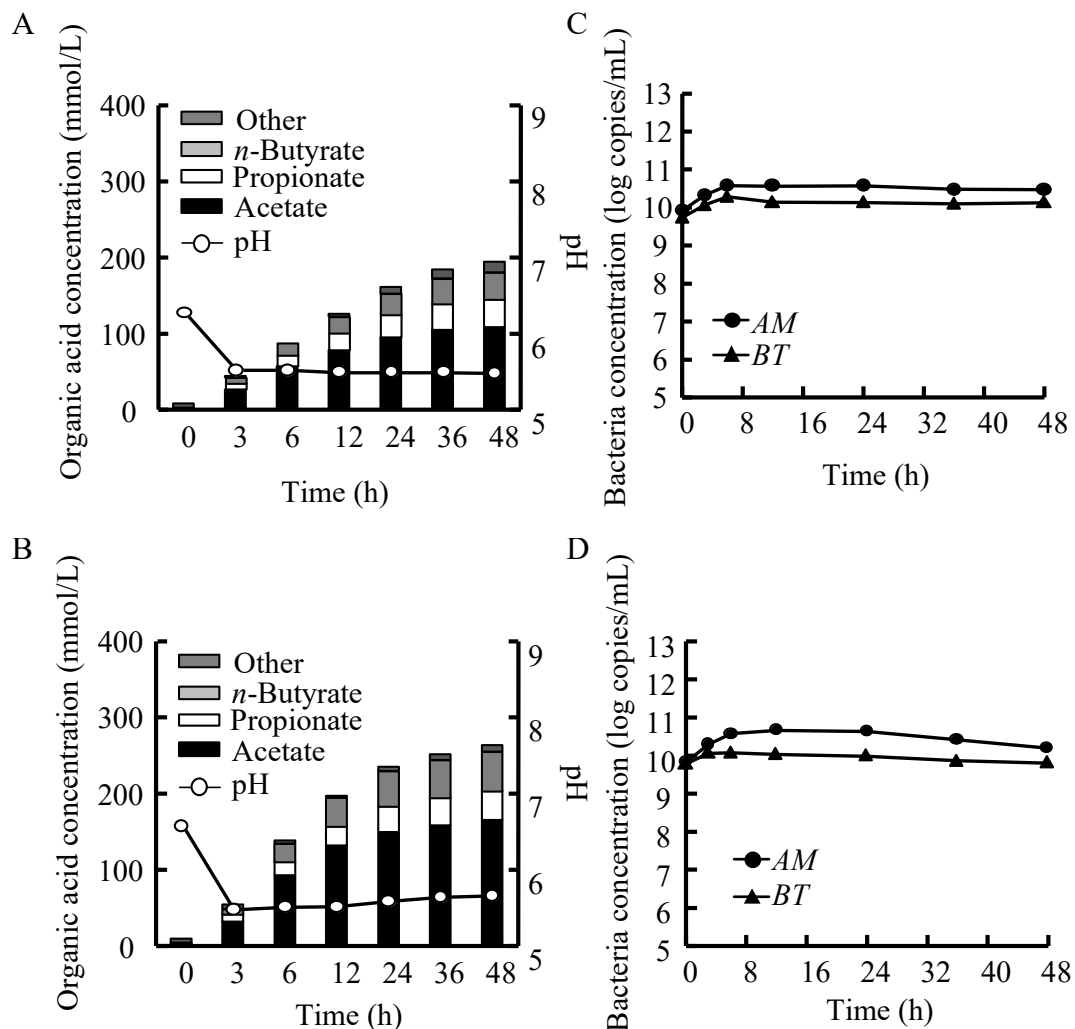


Figure 4 Changes in SCFA concentration and pH during *in vitro* fermentation of SSM (A, C) and PSM (B, D) at pH 5.5 using human fecal inoculum (donor 1) (Experiment 4).

SSM基質でPSM基質に比して有意な低値を示した。発酵試験中、SSMを基質とした場合のpHは培養終了時まで一定 (pH 6.5) であったが、PSMを基質とした場合は 6–12時間にかけて上昇が認められた。また、酢酸、*n*-酪酸および総SCFA濃度はSSMおよびPSMの両方で経時的に上昇を続けた。しかし、その上昇速度はいずれもPSMに比べSSMで有意に低かった (Fig. 5)。

Fig. 6に各検体ごとのAM およびBT 数の推移を、Fig. 7にSCFA濃度の推移を示した。AM 初期占有率は 1%以上の検体 (ドナー1) では培養終了時 (培養開始 48時間後) のAM 数はSSMを基質とした場合が約 480倍、PSMを基質とした場合が 10倍以下であった。AM 初期占有率が 0.1–1.0%の検体 (ドナー 20) ではSSMを基質とした場合のAM 数は約 1450倍、PSMを基質とした場合のそれに増加は認められなかった。AM 初期占有率が

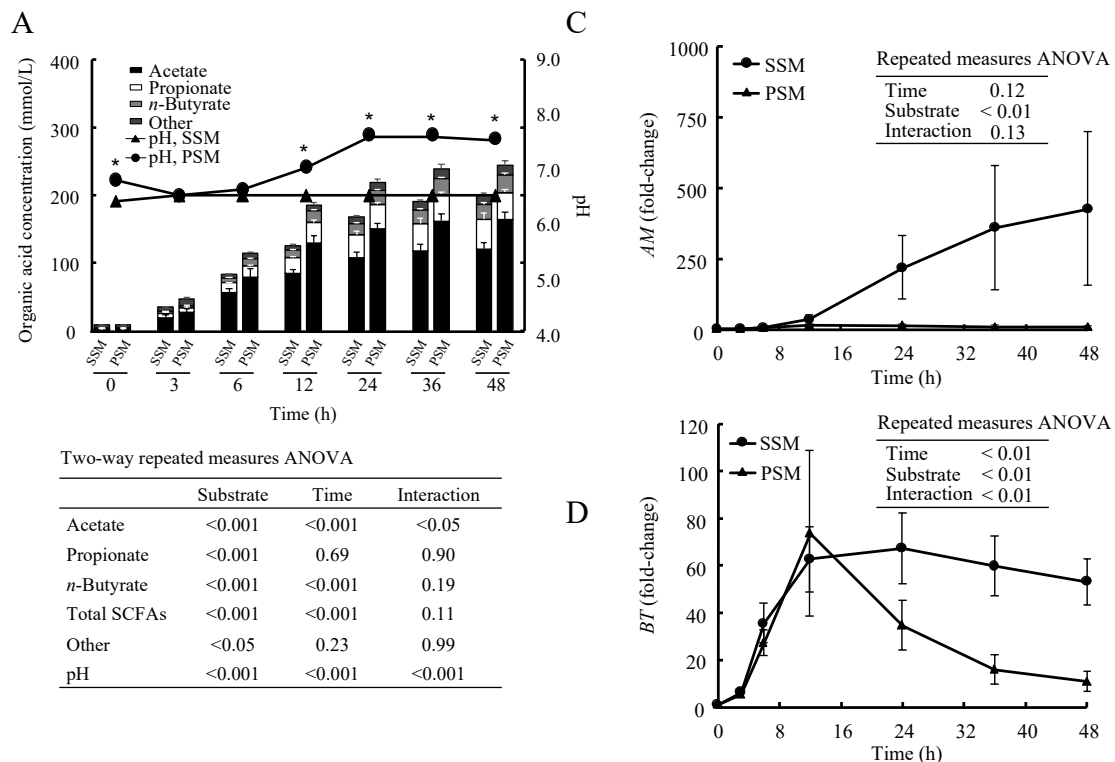


Figure 5 Changes in SCFAs concentration and pH (A) and fold-change in the number of AM (B) and BT (C) during *in vitro* fermentation of SSM and PSM using human fecal inoculum (Experiment 4).

Values are the mean \pm SEM; $n = 5$. AM, *Akkermansia muciniphila*; BT, *Bacteroides thetaiotaomicron*; SSM, skate-skin mucin; PSM, porcine stomach mucin; SCFAs, short-chain fatty acids. * $p < 0.05$ at that time point.

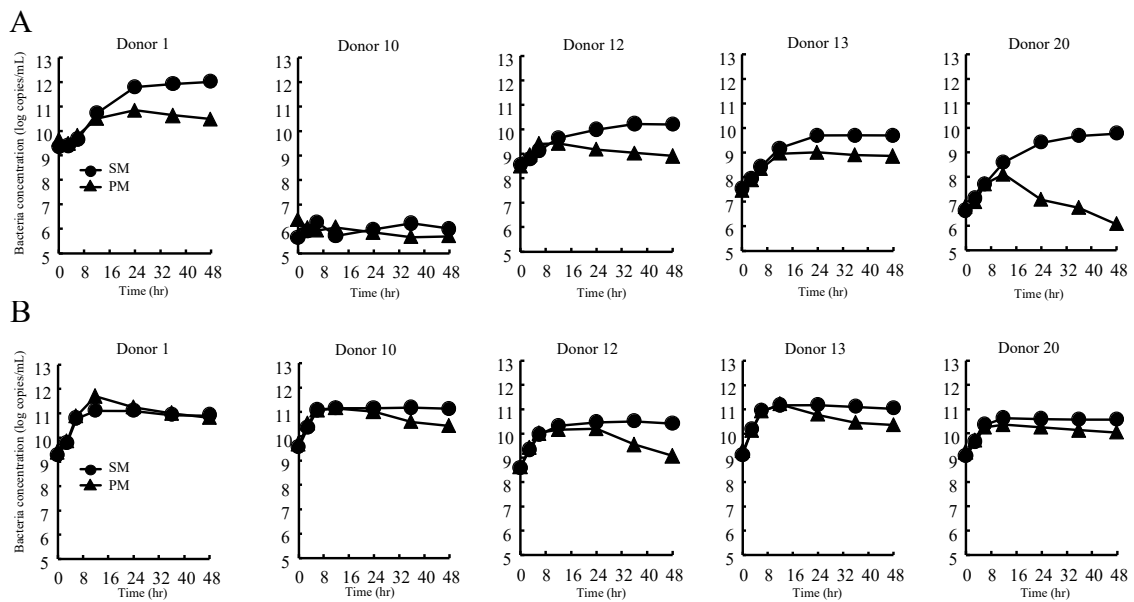


Figure 6 Changes in the number of *AM* (A) and *BT* (B) during *in vitro* fermentation of SSM and PSM at pH 6.5 using human fecal inoculum (Experiment 4).

AM, *Akkermansia muciniphila*; *BT*, *Bacteroides thetaiotaomicron*; SSM, skate-skin mucin; PSM, porcine stomach mucin.

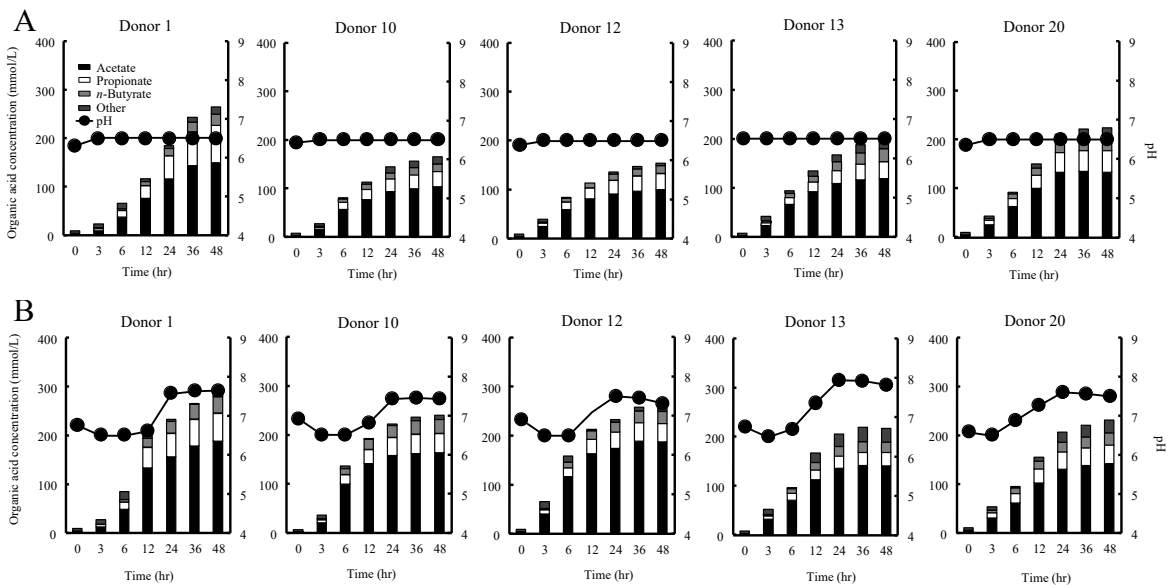


Figure 7 Changes in SCFAs concentration and pH during *in vitro* fermentation of SSM (A) and PSM (B) at pH 6.5 using human fecal inoculum (Experiment 4).

SSM, skate-skin mucin; PSM, porcine stomach mucin; SCFAs, short-chain fatty acids.

0.001–0.1%であるドナー 12およびドナー 13でSSMを基質とした場合、それぞれ約 44倍、約 150倍で、PSMを基質とした場合、それぞれ約 3倍、26倍であった。*AM* 初期占有率は 0.0001%以下の検体 (ドナー 10) で、*AM*

増殖は認められなかった。SSMおよびPSMのどちらを基質とした場合においてもBT数の増加は認められたが、AM数の増加はより顕著であった。AM初期占有率の各クラス1名ずつ(計4名)の培養開始直後の培養液および終了時(培養開始48時間後)の培養液を16S rRNA遺伝子解析に供した。いずれのドナーにおいても遺伝子配列の大多数(95-97%)を門レベルにおいてFirmicutes, Bacteroidetes, ProteobacteriaおよびActinobacteriaが占めていた。発酵試験後の細菌叢の変化は初期の細菌叢組成に強く依存するが、AM初期占有率の高い(1%以上)ドナー1が最も顕著な変化を示した(Fig. 8-A)。SSMを基質とした場合において*Bacteroides thetaiotaomicron*に加え、*Parabacteroides merdae*および*Dorea longicatena*の増殖が認められた。一方で、*Bifidobacterium*属全体は減少する傾向が認められた(Fig. 8-B)。これらの結果から、SSMがヒト大腸においてもAMを増殖させることを確認した。

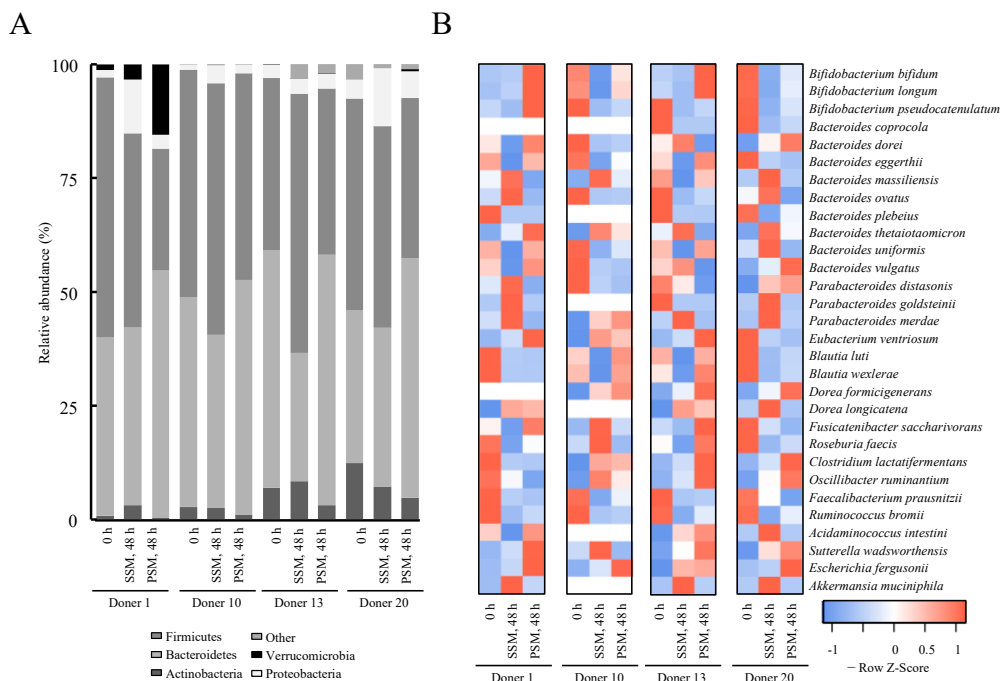


Figure 8 Microbial composition at the phylum level (A) and heatmap of the top 30 bacterial species (B) at 0 and 48 h after *in vitro* fermentation of SSM and PSM using human feces (donors 1, 10, 13, and 20) (Experiment 4).

In panel B, red indicates high standardized relative abundance value (row Z-score), and blue indicates low standardized relative abundance value for each donor. SSM, skate-skin mucin; PSM, porcine stomach mucin.

第7節 考察

ムチン糖鎖はアミノ糖 (GalNAc, GlcNAc) およびガラクトースで構成され、その末端はフコース (フコースを末端に配する糖鎖: 中性糖鎖), シアル酸 (シアル酸を末端に配する糖鎖: シアロ糖鎖) あるいは硫酸化糖によってキャップされている⁶⁾。これまでに、人工基質を用いた*in vitro*試験によってムチン糖鎖末端の硫酸化糖の除去がムチン分解の律速になることが報告された¹⁴⁾。緒論でも述べたが、当研究室の河合ら¹⁵⁾が、ラットにおいてFOSの摂取 (FOS群) および抗生物質の投与 (抗生剤群) が盲腸内ムチンの硫酸化糖キャッピング比率を低下させたことを報告した。また、遊離還元糖量を指標にした*in vitro*ムチン分解活性 (ムシナーゼ活性) についてこれらのムチンを基質にした場合の活性が対照群由来のムチンのそれに比べ高値を示したことを報告した。抗生物質の投与による総菌数の低下は当然であるが、FOSの短期摂取 (9日間) は盲腸内pHの低下により盲腸内総菌数を有意に低下させる⁶¹⁾。対照群では比較的分解が進行しやすい中性糖鎖およびシアロ糖鎖の分解が進み、結果として残存するムチンの硫酸化糖キャッピング比率が高くなる。逆に抗生物質の投与またはFOSの摂取によって、通常分解が進行する中性糖鎖およびシアロ糖鎖が残存し、これらの比率が高いまま維持された結果、FOS群および抗生剤群ラット由来のムチンを基質とした場合の*in vitro*ムチン分解速度が高くなったと考えられる。また、Nakagawaら²³⁾がエイ、ドジョウ、アナゴ、コチ由来のムチンを赤外分光法により分析し、エイ (ツバクロエイ) 由来のムチンの硫酸基の含有率が他のムチンに比べ高いことを報告した。本研究において使用したSSM (メガネスカベ由来) もPSMおよびRGMに比して硫酸化糖キャッピング比率が顕著に高かった (PSMの 3倍; RGMの 2倍)。人工基質を用いたこれまでの報告や¹⁴⁾、当研究室におけるこれまでの知見同様¹⁵⁾、対照試料を摂取させたラットの新鮮便を酵素源としたムシナーゼ活性についてPSMおよび

RGMに比べ、硫酸化糖キャッピング比率の高いSSMが顕著に低い反応性を示した。

さらに本試験の結果から、ラットにおける 1.5%のSSM添加飼料の摂取がSSMを基質とした場合の糞便ムチン分解活性を対照群に対し約 3倍有意に上昇させ、盲腸においてAM 増殖を強力に促進することを示した。菌叢解析の結果、菌種の豊富さを示すChao1 インデックスはSSM摂取による影響が認められなかったが、菌種の均等度を示すShannon インデックスについてはSSM群が対照群およびPSM群に対して有意に低値を示した。また、各群の平均占有率の少なくとも上位 30菌種に該当する菌種のうち、SSM群で対照群に対し有意に高い占有率を示したのはAM および *Lactobacillus animalis* (粘膜に付着することが報告されている⁶²⁾) の 2 菌種のみであった。このように、AM 増殖それ自体に他の菌種に対する影響は認められなかった。Everardら²⁵⁾が高脂肪食を摂取させ、プロバイオティクスとしてAM の生菌を投与した肥満マウスの腸内細菌叢解析を行い、AM の増殖は細菌叢にほとんど影響を与えないことを報告した。これらの知見はAM と他の腸内細菌との相互関係が最小限であることを示している。

当研究室のHinoらがPSMはラット盲腸において効率的に発酵を受けることを示したが⁶³⁾、本試験においても同様に、盲腸内O-結合性糖鎖当量からPSMおよびRGMが盲腸で効率的に発酵されることが示された。一方で、SSM群では他の群に比べ盲腸内O-結合性糖鎖当量が顕著に高かった。これはSSMが腸内細菌による発酵基質として非効率であることを示している。実際、盲腸内総菌数についてSSM群と対照群との間に差が認められず、SSM群の総菌数がPSMおよびRGM群のいずれよりも有意に低かった。これらの結果によって、AM のような限定的な一部の細菌のみがSSMを利用可能であることが示唆されている。ムチンを含有する培地において増殖することが確認されている細菌種のなかでも、サルファターゼをコードする遺

伝子を有する菌は限定的であるが²¹⁾, *AM* はムチンを含有する [ブタ胃粘膜由来, 0.5% (w/v)] 培地中で培養した際にサルファターゼを高発現することが報告されている²⁰⁾。さらに近年, ノックアウト株を用いた研究から, ムチンの分解には, サルファターゼのうちガラクトース-3-硫酸の硫酸基を脱エステル化する活性を有するサルファターゼサブファミリーが必須であり, *AM* がこのサルファターゼサブファミリー (BT1622もしくはBT1636) をコードする遺伝子を比較的多く有することが示された⁶⁴⁾。このような*AM* の代謝的特徴によって, 硫酸化糖キャッピング比率の高いムチンであるSSMは*AM* によって独占的に利用されると考えられる。また, 高度な硫酸化糖キャッピング比率の他に, SSMが*AM* 増殖を誘導可能である理由として, SSMが高濃度のThrを含有している (PSMおよびRGMのおよそ 2倍) ことが挙げられる。本稿冒頭の緒論にも述べたように*AM* はThrの合成に必要な酵素をコードする遺伝子 (*thrB*, *thrC*) を欠損するため, その増殖にThrの供給を必須とする⁹⁾。また, Berryら⁶⁵⁾が安定同位体標識Thr (¹³Cおよび¹⁵Nにより標識) を投与したマウスの 8時間後の盲腸の準超薄切片の作製および分析を行い (固定, カルノア固定; 同位体の分析, 二次イオン質量分析; *AM* の標識, FISH法; 画像解析, ImageJ), *AM* のうちの 30%が統計的に高度に ¹³Cを蓄積していたことから, *AM* が宿主のムチンを分解, 資化することで効果的にThrを取り込むことを報告した。また, 本試験においてロットの異なるSSM摂取による*AM* 増殖誘導能を比較したところ, ロットEとロットBの硫酸化糖キャッピング比率は同等であるにも関わらず, Thr含量が比較的低い (他のムチンに比べ約 1/2) ロットEでは*AM* 増殖能が認められなかった。本試験の結果, 特に比較的高濃度のThrを含有するSSMは*AM* の増殖に必須であるアミノ糖⁸⁾⁹⁾およびThr⁹⁾を独占的に供給することで, *AM* 増殖を特異的に誘導すると考えられた。

ヒト大腸におけるAM 占有率は、食生活や生活スタイルの違いだけでなく国や居住地域によって大きく異なっている^{66) 67)}。Escobarら⁶⁷⁾によって、アジア人のAM 占有率 (<0.01%) がヨーロッパ人 (1.2%)、アメリカ人 (0.1%) およびコロンビア人 (1.2%) に比して顕著に低い値を示すことが報告された。本研究においても糞便中のAM 占有率が 0.01%を上回ったのは20名のうちわずか 5名のみであった。AM 初期占有率の異なる 5検体を用いてSSMの発酵試験を行った結果、ヒト糞便を播種した嫌気発酵においては一定以上のAM 初期占有率 (本試験においては >0.01%以上) の検体のみでSSMによるAM 増殖誘導が認められた。また、ラット摂取試験と同様、ヒト糞便培養試験においてもSSMがPSMに比べ強力なAM 増殖誘導作用を示した。一方、ヒト糞便培養試験においてpH 5.5ではAM 初期占有率が 1%を超えるドナー 1においてもAM 増殖が認められなかった。Van Herreweghenら⁶⁸⁾が、ムチンを含有する培地 [ブタ胃粘膜由来, 0.4% (w/v)] においてそれぞれpHを 3段階 (pH 5.6–5.9, 近位結腸を想定; pH 6.15–6.4, 遠位結腸上部を想定; pH 6.6–6.9, 遠位結腸下部を想定) に分けて培養を行い、AM の増殖が認められたのがpH 6.15以上の中性付近pH領域であったことを報告した。また、Van den Abbeeleら⁶⁹⁾の報告においても 10% (w/w) のイヌリンあるいはアラビノキシランを添加した飼料を与えたラットにおいてAM が盲腸に比べ結腸で活発に増殖したことを報告した。これらの結果は本試験での結果と一致する。AM は中性付近pHで活発に増殖するようである。以上、本試験の結果から、SSMが動物およびヒトの両方においてAM 増殖を誘導することが明確に示された。

有機酸濃度およびpHの変動を基準とした発酵速度についてラットでの結果とヒト糞便での結果を比較すると、どちらの場合についてもSSMがPSMより低値を示した。一方で、SSMによって引き起こされる細菌叢の変化はラットの盲腸とヒト糞便で異なっていた。これはAM とBT の動物種

による初期占有率 (*AM*; 対照群のラット, 2.7%; ヒト糞便, 0.001–1.6%/BT; 対照群のラット, 0.19%; ヒト糞便, 0.65–5.3%) の違いを反映しているのかもしれない。この結果は、プレバイオティクスの機能発現には標的の細菌を一定の閾値以上有していることを前提条件とすることを示している⁷⁰⁾。加齢や抗生物質の使用による菌数の減少だけでなく、個人差による初期占有率の相違がプレバイオティクスの機能発現の有無に関係することが確かめられた。

第 2 章

健常ラットにおける *AM* 増殖が大腸生理に及ぼす影響

第1節 緒論

AM 生菌製剤を胃内投与したマウスの結腸 *fluorescence in situ* hybridization (FISH)-*Muc2* 染色像から *AM* が上皮近傍に存在することが報告された⁷¹⁾。また、*AM* がヒト由来のムチンを分解することが報告されている⁷²⁾。*AM* はムチンを分解、資化し、酢酸、プロピオン酸や 1,2-プロパンジオールを産生する⁹⁾。これらの SCFA が *Anaerostipes caccae*, *Eubacterium hallii* および *Feacalibacterium prausnitzii* によってクロスフィードされることで酪酸およびプロピオン酸に変換される¹⁸⁾。これらの SCFA が杯細胞数の上昇³¹⁾や杯細胞からの *Muc2* 分泌促進^{32) 73)}を介してバリア機能を回復させ、耐糖能を改善すると考えられてきた^{2-4) 74)}。

従来、*AM* の宿主に対する影響は、高脂肪食により肥満、糖尿病病態を誘発したマウスにおいて検討されてきた^{25-27) 37) 38)}。第 1 章により SSM がラットにおいて *AM* を増殖させることが示された。本章では SSM 摂取による *AM* 増殖が健常ラットにおける結腸上皮ムチン層や腸管透過性、また腸管透過性の制御に中心的役割を果たすタイトジャンクション (tight junction, TJ) タンパク質の発現量など⁷⁵⁾、腸管バリア機能にどのような影響を及ぼすかについて検討した。

第2節 SSMの摂取による*AM* 増殖が大腸粘膜ムチン層および腸管透過性に及ぼす影響とその解析-大腸SCFA濃度，ムチン関連遺伝子，TJ 関連タンパク質重量および血中LPS濃度に焦点を当てて-

実験方法

1) 実験動物および飼料組成

7週齢のWistar系雄ラットを日本エスエルシー(株)から購入し、室温 23 ± 1°C、照明管理 (7:00から19:00に点灯) のもと、底面が格子状のステンレスケージ内で個別に飼育した。搬入後ラットを 7日間予備飼育した。予

備飼育中は対照試料（第 1 章・第 5 節と同一）を自由摂取により与えた。
予備飼育終了後、体重を基準に各群に割り当てた。

I) SSMおよびPSMの短期摂取が健常ラットの大腸粘膜ムチン層に及ぼす影響とその解析-大腸SCFA濃度，ムチン関連遺伝子に焦点を当てて-(実験 5)

予備飼育後，36匹のラット（体重 163 ± 1 g [平均値 \pm 標準誤差]) をそれぞれ12匹の 3群に分けた。ラットに水および対照試料（予備飼育中に与えた飼料と同一）あるいは 12 g/kgのSSM（以降全てロットA）あるいはPSMを含有する飼料を自由摂取により 16日間与えた。ムチンの添加を対照飼料中の同量のコーンスターチと置換することで行った。実験最後の 3 日間（d14-16）に各群 6匹のラットから糞便を回収した。飼育終了時，ペントバルビタール麻酔下（ 50 mg/kg）で断頭により致死させた。内容物を含んだ丸ごとの盲腸および遠位結腸組織を採取し，ドライアイスアセトン中で直ちに凍結させた。各群残りの 6匹を上述のように安楽死させ，盲腸および結腸を採取し重量を測定した。盲腸内容物 50 mgを 182 mM 酢酸亜鉛溶液 600 μ Lを入れた 1.5 mL容マイクロチューブに量り取り，硫化水素濃度の測定に用いた。また，残りの盲腸内容物を有機酸および細菌数の測定に用いた。結腸内容物を採取し， 50 mgを先と同様に硫化水素濃度の測定に， 50 mgを細菌数の測定に用いた。盲腸組織を大彎に沿って 2分割し，片方は 10% 中性緩衝ホルマリン液（pH 7.4，富士フィルム和光純薬株）で固定した後，過ヨウ素酸シッフ（periodic acid schiff, PAS）染色に用いた。もう一方の盲腸組織切片および結腸組織全体から粘膜を掻き取り，総RNAの単離とムチン関連遺伝子の分析に用いた。

II) SSMの短期摂取によるAM 増殖が腸管透過性に及ぼす影響とその解析- TJ関連タンパク質量および血中LPS濃度に焦点を当てて-(実験 6)

予備飼育後，24匹のラット（体重 162 ± 2 g [平均値 \pm 標準誤差]) をそれぞれ各群 12匹の 2群に分けた。ラットに水および対照飼料または 12 g/kgのSSM (ロットA) 添加飼料を自由摂取により 21日間与えた。SSMの添加を上述のように行なった。14日目に各群 6匹のラットを代謝ケージに移し，13:00にクロム-EDTA錯体 (50 mg/ラット) を経口投与してから 48時間尿を回収した。飼育終了時，イソフルラン麻酔下でヘパリン処理（日本薬局方ヘパリンナトリウム注射液，1,000 IU/mL，22000AMX00710，(株)陽進堂，富山，日本；ヘパリンをシリンジ内に約1 mL吸引し，排出する操作により内壁に塗布) したシリンジを用い，腹部大動脈血から採血することで致死させた。血液から血漿を分離した後，LPSおよびLPS結合タンパク質 (LPS-binding protein, LBP) の測定に用いた。盲腸と結腸を採取し重量を測定した。盲腸内容物をホモジナイズした後，LPSと細菌数の測定に用いた。結腸内容物を細菌数の測定に用いた。盲腸および結腸粘膜を掻き取り，総RNAの単離とその後のTJタンパク質のウエスタンブロットティング分析に用いた。各群残り 6検体のラットはペントバルビタール麻酔下 (50 mg/kg) で断頭により致死させた後，盲腸および結腸を採取し，粘膜固有層単核球 (lamina propria mononuclear cells, LPMC) を単離し，その後制御性T細胞 (regulatory T cell, Treg) 数の測定に用いた。

2) 盲腸有機酸濃度の測定

盲腸有機酸濃度を第 1章・第 5節と同様に測定した。

3) 盲腸および結腸組織のPAS染色

パラフィン (PARAPLAST PLUS, McCormick SCIENTIFIC, MO, USA) に包埋した盲腸および結腸の固定組織サンプルから切片 (3切片/ラット; 4 μm) を作成した。切片の作成には連続した 3つの切片をスライドガラス上へのせ、伸展板を用いて一晩乾燥させた。これを 100% キシレン, 100% エタノールI, 100% エタノールII, 95% エタノール, 90% エタノール, 80% エタノール, 70% エタノールに各 5分ずつ浸漬することにより脱パラフィンおよび再水和を行った。次に 0.5% (w/v) オルト過ヨウ素酸 (富士フィルム和光純薬株) 溶液に 5分間浸漬させ、組織に直接水が触れないように流水で 5分間洗浄し (流水洗浄), 蒸留水でリンスした。リンス後の切片を遮光下でシッフ試薬 (富士フィルム和光純薬株) に 10分間浸漬させて糖鎖を染色し, 亜硫酸水 (富士フィルム和光純薬株) 中への 3分間の浸漬を 3回繰り返した。その後, 切片を 5分間流水洗浄し, 蒸留水でリンスした。続いて遮光下でマイヤーのヘマトキシリン染色液 (Merck, HE, Germany) に 1分間浸漬することで対比染色した。10分間流水洗浄した後, 蒸留水でリンスした。リンス後, 70% エタノール, 90% エタノール, 95% エタノール, 100% エタノールI, 100% エタノールIIにそれぞれ 5分間浸漬させて脱水を行い, 100% キシレンI, 100% キシレンIIにそれぞれ 5分間浸漬させることで透徹を行った。封入剤としてマルチマウント 480 (松浪硝子工業株, 大阪, 日本) を用いた。杯細胞数および陰窩長をそれぞれの切片について 2人の観察者が独立して測定した。

4) 盲腸, 結腸および糞便の細菌数の測定

第 1章・第 5節と同様に行った。

5) 盲腸および結腸の硫化水素濃度の測定

盲腸と結腸の硫化水素濃度をPichetteらの方法⁷⁶⁾を改変したメチレンブルー法によって測定した。先に述べたように、解剖後直ちに盲腸内容物 50 mgに 182 mMの酢酸亜鉛 600 μ Lを加えて懸濁させた試料 50 μ Lを 1.5 mLのマイクロチューブに移し、等量の蒸留水を加えて 2倍に希釈した。4.5 mMの*N,N*-ジメチル-*p*-フェニレンジアミンおよび 7 mMの塩化鉄 (III) をそれぞれ 100 μ L加え、室温で 30分間静置した。静置後の液を遠心分離 (15,490 \times g, 4°C, 10 min) し、得られた上清を 96ウェルプレート (Nunc MaxiSorp™, Thermo Fisher Scientific, MS, USA) に移し、670 nmにおける吸光度を測定した。硫化ナトリウムを用いて作成した標準曲線をもとに硫化水素濃度を定量した。

6) 糞便の体積の測定

1日分の糞便を回収し、規定量の流動パラフィンで満たしたメスシリンダーに浸漬し、そのときに増加した体積を糞便の体積として測定した。

7) 盲腸および結腸組織切片の作成

ドライアイスアセトンにて凍結した結腸組織をマイクロカッター (BS300-CP, EXAKT Apparatebau, SH, Germany) により 5 mm厚に切り出し、カルノア液 [エタノール : クロロホルム : 氷酢酸 = 6 : 3 : 1] 中に 24時間浸漬して固定した。その後、組織を室温で 70% エタノールに 24時間浸漬してパラフィンへ包埋した。パラフィンに包埋した標本から切片 (5切片/ラット) を作成した。

8) アルシアンブルー染色

本節 7) に従って作成した切片をアルシアンブルー染色によって染色した。100% キシレン, 100% エタノールI, 100% エタノールII, 95% エタノール, 90% エタノール, 80% エタノール, 70% エタノールに各 5分ずつ浸漬することにより脱パラフィンおよび再水和を行った。蒸留水でリンスした後, 3%酢酸に 3分間浸漬させた。続いて切片を 3分間流水洗浄した。これを蒸留水でリンスした後, 遮光下でケルンエヒトロート (Merck) に 3分間浸漬することで対比染色した。5分間流水洗浄し, 蒸留水でリンスした。次に 70% エタノール, 90% エタノール, 95% エタノールでリンスし, 100% エタノールに 5分間浸漬することで脱水を行い, 100% キシレンに 5分間ずつ浸漬することで透徹を行った。上皮ムチン層の厚さをそれぞれの切片ごと異なる 10ヶ所を光学顕微鏡 (BH2, オリンパス(株), 東京) および接眼マイクロメーターを用いて測定した。

9) FISH-Muc2染色

50 mL容コニカルチューブ (ファルコンチューブ, Corning) に hybridization buffer [0.1% (w/v) ドデシル硫酸ナトリウム (sodium dodecyl sulfate, SDS) を含む20 mM Tris, 900 mM 塩化ナトリウム溶液] を染み込ませたキムワイプを入れ, インキュベーター内に静置することで気-液平衡状態にした。本節 7) に従って作成した切片にprobe solution [10 mM Cy3標識EUB338 (5'-GCTGCCTCCCGTAGGAGT-3')/hybridization buffer] 200 μ Lを滴下し, スライドガラスをパラフィルムで覆った。これを先の 50 mL容コニカルチューブに入れ, 50°Cで一晩 (16-20時間) 遮光して静置した。その後スライドガラスを取り出し, 50°Cに加温したwash buffer (20 mM Tris, 900 mM 塩化ナトリウム溶液) で 10分間洗浄した。次いでPBS (pH 7.4) で 5分間洗浄する操作を 3回繰り返した。その後, blocking

buffer [5% (v/v) ヤギ血清/PBS (pH7.4)] 500 μ Lを滴下し，常温で 30分間静置した。これに一次抗体溶液 (blocking bufferで 100倍希釈したウサギ抗 Muc2, clone H-300, Santa Cruz Biotechnology, TX, USA) 200 μ Lをスライドガラスに滴下し，4°Cで一晩 (16–20時間) 遮光して静置した。その後，PBS-T [0.05% (w/v) Tween-20/PBS] で 2分間洗浄する操作を 3回繰り返した。次いで二次抗体溶液 (blocking bufferで 500倍希釈したAlexa488標識抗ウサギIgG, 111-545-003, Jackson Immuno Research, PA, USA) 200 μ Lをスライドガラスに滴下し，遮光して室温で 2時間静置した。その後，PBS-Tで 2分間洗浄する操作を 3回繰り返し，蛍光染色用の封入剤 (VECTASHIELD Mounting Medium with DAPI, Vector Laboratories, CA, USA) を滴下しカバーガラスを被せた。その後，カバーガラスを樹脂で固定した。染色後の組織を共焦点レーザー顕微鏡 (LSM700, Carl Zeiss, BW, Germany) で観察した。

10) 腹部大動脈血および盲腸内容物LPS濃度の測定

腹部大動脈血のLPS濃度を日本薬局方エンドトキシン試験法⁷⁷⁾に基づく比濁時間分析法⁷⁸⁾に準拠したLPS測定キット (リムルスES-IIテストワコー，富士フイルム和光純薬(株)) を用いて測定した。ヘパリン (日本薬局方ヘパリンナトリウム注射液，1000 IU/mL，22000AMX00710，(株)陽進堂) 処理したシリンジを用いて採取した血液を 15 mL容コニカルチューブ (ファルコンチューブ，Corning) に移し，遠心分離して (1,700 \times g, 4°C, 10 min) 血漿を採取した。血漿を，1.5 mL容マイクロチューブ (Eppendorf biopur®, Eppendorf, HH, Germany) に移した。この血漿 100 μ Lに注射用蒸留水 (大塚蒸留水，(株)大塚製薬工場) 900 μ Lを加え，ウォーターバス (SB-35，東京理化器械(株)) を用いて 80°Cで 5分間加熱した。加熱後の血漿 100 μ Lを測定用試験管 (Limulus test tube-s with aluminum capもしくはは

Limulus test tube-s, 富士フイルム和光純薬(株), 使用前に 300°Cで 4時間乾熱滅菌したもの) に量り取った。量り入れた血漿にカプトガニ血球抽出物 (Limulus amoebocyte lysate ES-II, LAL, 富士フイルム和光純薬(株)) を注射用蒸留水 2 mLで溶解したLAL試薬 100 μ Lを加え, 直ちにトキシノメーター (ET-7000, 富士フイルム和光純薬(株)) で分析した。なお, LPSの混入を防ぐため, 測定用試験管の再利用を 1回までとした。LALがLPSによって活性化されることでゲル化する性質を利用し, ゲル化に伴って透過光量が初期値の 96%を下回った時間を比較することで定量した。測定時間の上限は 180分とした。キット付属のコントロールスタンダードエンドトキシン [Control Standard Endotoxin (CSE) from *E. coli* UKT-B] を用い, 被験試料と同様に測定することで作成した標準曲線をもとに定量した。また, 盲腸内容物についても注射用蒸留水を用いて 400,000倍に希釈して同様に測定した。

11) 腹部大動脈血中LBP濃度の測定

LPS結合タンパク質濃度をELISAキット [Enzyme Immunoassay for Determination of mouse LBP (useful also for rat LBP), Biometec, MV, Germany] を用いて測定した。血漿をキット付属の希釈用緩衝液で 100倍に希釈した。抗マウスLBPモノクローナル抗体 (ラットLBPに対しても交差反応を示す) が予め塗布されたキット付属の 96ウェルプレートに希釈後の血漿を 100 μ L量り入れ, マイクロウンプレートミキサー (OPM-103, アズワン(株), 大阪) を用いて, 室温で 1時間攪拌した。次いで, wash buffer [0.05% (v/v) Tween-20を含有するPBS] で3回洗浄し (300 μ L/回), 検出抗体 [ホースラディッシュペルオキシダーゼ (Horseradish peroxidase, HRP) 標識抗マウスLBP抗体] 100 μ Lを加え, マイクロウンプレートミキサー (OPM-103, アズワン(株)) を用いて, 室温で1時間攪拌し

た。次いで、wash bufferで3回洗浄し、3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine, TMB) を含有する基質溶液 100 μ Lを加え、遮光下、室温で14分間静置して反応させた。14分後に停止液 100 μ L加え、450 nm (副波長として 620 nm) における吸光度を測定した。

12) 盲腸および結腸の遺伝子発現量の測定

盲腸および結腸から採取した粘膜を 2 mL容マイクロチューブに入れ、RNAiso Plus (タカラバイオ株) 1 mLを加えて、ポリトロン (PT1200E, Kinematica) を用いてホモジネイトした (25,000 rpm, 60 sec)。これを遠心分離し (10,000 \times g, 4°C, 5 min), 上清 900 μ Lを 1.5 mL容マイクロチューブに量り取り、クロロホルム 200 μ Lを加え、全体が均一化するまで混合した。遠心分離し (12,000 \times g, 4°C, 15 min), 水層 (上層) 400 μ Lを別の 1.5 mL容マイクロチューブに量り取り、イソプロピルアルコール 500 μ Lを加えて攪拌した。これを遠心分離した (12,000 \times g, 4°C, 10 min)。上清を捨て、沈澱に 75% EtOH/DEPC水 [75% (v/v) エタノール/0.1% (v/v) DEPC, 予め 0.1% DEPCを 121°Cで 40分間オートクレーブ滅菌してから調製] 1 mLを加えて転倒混和した。これを遠心分離して (12,000 \times g, 4°C, 10 min), 上清を捨てて風乾させた後、0.1% DEPC 200 μ Lを加えて沈澱を溶解させ、これをRNA溶液とした。光路長 1 cmのセルを用いて吸光度を測定した場合、RNA濃度が 40 μ g/mLのときA260が 1になることを基準にRNA濃度を測定した。また、RNAの純度をA260/A280から算出し、この値が推奨値である 1.7-2.1の範囲内にあることを確認した。RNA溶液を 1 μ g/10 μ Lとなるように 0.1% DEPCで希釈した。

リアルタイムPCRによってサイトカイン (*Il-1 β* , *Il-4*, *Il-6*, *Il-10*, *Il-12*, *Il-13*, *Il-17*, *Ifn- γ* , *Tnf- α* , *Tgf- β*), *occludin*, *zonula occludin-1 (Zo1)*, *claudin-3*および*Muc*遺伝子 (*Muc2*, *Muc3*) のmRNA発現量を測定した。ま

ず、逆転写キット (RR037A, タカラバイオ) を用いて上述の手順で単離したRNAを逆転写した。PCRマスターミックス [5 × Prime Script Buffer : Prime Script Enzyme : Oligo dt Primer : Random 6 mers : RNase free H₂O = 4 : 1 : 1 : 1 : 3の混合液] を 200 μL容マイクロチューブ (PCRチューブ, 深江化成株, 兵庫, 日本) に 20 μL量り取り, この混合液に希釈後のRNA溶液を等量加えた。サーマルサイクラー (PCR Thermal Cycler TP650, タカラ

Table 8 PCR primers and conditions for determination of cytokine, *muc*, and tight junction gene expression

Bacterial species	Sequence (5'-3')	Thermal denaturation	Annealing	Extension
<i>Ifnγ</i> ⁷⁹⁾	GAACTGGCAAAAGGACGGTA (sense) CTGATGGCCTGGTTGTCTTT (antisense)	95°C, 10 sec	58°C, 10 sec	72°C, 15 sec
<i>Il-1β</i> ⁸⁰⁾	TGAAGCAGCTATGGCAACTG (sense) ATCTTTTGGGGTCTGTCAGC (antisense)	95°C, 10sec	56°C, 10 sec	72°C, 20 sec
<i>Il-4</i> ⁷⁹⁾	GAACAAGTCTGGGGTTCTCG (sense) TTGTGAGCGTGGACTCATTC (antisense)	95°C, 10 sec	58°C, 10 sec	72°C, 15 sec
<i>Il-6</i> ⁸⁰⁾	TCCAGAAATACAAAGAAATGATGGAT (sense) GGTAGAAACGGAACTCCAGAAGAC (antisense)	95°C, 10 sec	56°C, 10 sec	72°C, 20 sec
<i>Il-10</i> ⁷⁹⁾	GCCAAGCCTTGTGAGAAATGA (sense) TTTCTGGCCATGGTTCTCT (antisense)	95°C, 10 sec	58°C, 10 sec	72°C, 15 sec
<i>Il-12</i> ⁸⁰⁾	GCACTTCAGAGCCACAATCA (sense) GGAGCTTTCTGGTGCAGAGT (antisense)	95°C, 10 sec	56°C, 10 sec	72°C, 20 sec
<i>Il-13</i> ⁸¹⁾	CTT GCC TTG GTG GTC TTG (sense) TCT TCT GGT CTT GTG TGA TG (antisense)	95°C, 10 sec	56°C, 10 sec	72°C, 20 sec
<i>Il-17</i> ⁸²⁾	TTCCATCCATGTGCCTGATG (sense) CTCGGCGTTTGGACACACT (antisense)	95°C, 10 sec	58°C, 10 sec	72°C, 15 sec
<i>Tnfa</i> ⁸⁰⁾	GCCACCACGCTCTTCTGTCT (sense) GATCTGAGTGTGAGGGTCTGG (antisense)	95°C, 10 sec	56°C, 10 sec	72°C, 20 sec
<i>Tgfb</i> ⁸³⁾	TGGCGTTACCTTGTAACC (sense) GGTGTTGAGCCCTTCCAG (antisense)	95°C, 10 sec	56°C, 20 sec	72°C, 30 sec
<i>Occcludin</i> ⁸⁴⁾	GCCTATGGAACGGGCATCTT (sense) GCCAGCAGGAAACCCTTTG (antisense)	95°C, 10 sec	55°C, 15 sec	72°C, 15 sec
<i>Claudin-3</i> ⁸⁵⁾	ACACCGCACCATCACCCTACTAC (sense) TCTTCCAGCCTAGCAAGCAGAC (antisense)	95°C, 10 sec	60°C, 15 sec	72°C, 15 sec
<i>Zo-1</i> ⁸⁴⁾	GAGGCTTCAGAACGAGGCTAT (sense) CATGTCGGAGAGTAGAGGTTT (antisense)	95°C, 10 sec	55°C, 15 sec	72°C, 15 sec
<i>Muc2</i> ⁸⁶⁾	AAG CCA GAT CCC GAA ACC AT (sense) ATG GCC CCA TTC ACA ACT GCC (antisense)	95°C, 20 sec	60°C, 30 sec	72°C, 30 sec
<i>Muc3</i> ⁸⁶⁾	GGT ACA GCG GTG AAA ACT (sense) CAT GGG GAA ATC TCA ACG (antisense)	98°C, 10 sec	55°C, 15 sec	72°C, 20 sec
<i>18S rRNA</i> ⁸⁷⁾	GGGAGGTAGTGACGAAAAATA (sense) TTGCCCTCCAATGGATCCT (antisense)	95°C, 10 sec	55°C, 15 sec	72°C, 15 sec

バイオ(株) を用いて 37°Cで 15分間加熱することで逆転写し、85°Cで 5秒間加熱して酵素を失活させた。得られた相補的DNA (complementary DNA, cDNA) 溶液を測定まで -80°Cで保存した。

リアルタイムPCRにはLightCycler (Nanoシステム, Roche) を用いた。PCR反応を第 1章・第 5節と同様に行った。各遺伝子の特異的プライマーおよびPCR条件をTable 8に示した。反応終了後に融解曲線分析により反応の特異性を確認した。発現量の解析にはハウスキーピング遺伝子として 18S rRNAを使用し、比較Ct法⁸⁸⁾による相対定量を行った。結果を対照群の発現量を 1とした場合の相対値として示した。なお、本実験においてマイクロピペット用チップおよびマイクロチューブを全て予めオートクレーブ滅菌 (121°C, 20 min) してから使用した。

13) ウェスタンブロット分析

粘膜画分 50 mgを採取し、10倍量の氷冷した放射性免疫沈降法バッファー [radioimmunoprecipitation assay buffer, RIPAバッファー, 25 mM Tris (pH 7.5), 150 mM 塩化ナトリウム, 0.1% SDS, 1% Nonidet P-40, 1% デオキシコール酸ナトリウム, 1 mM エチレンジアミン四酢酸 (ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA), 1 mM グリコールエーテルジアミン四酢酸 (ethylene glycol tetraacetic acid, EGTA) およびプロテアーゼ阻害剤 (complete protease inhibitor, Roche)] を加え、ポリトロン (PT2100, Kinematica) を用いてホモジナイズした (11,000 rpm, 4°C, 60 sec)。この懸濁液のタンパク質含量が 5 mg/mLとなるようにRIPAバッファーで希釈し、希釈したサンプルに同量のLeammiバッファー [187.5 mM Tris-HCl (pH 6.8), 6% SDS, 30% グリセロール, 0.006% ブロモフェノールブルー, 15% 2-メルカプトエタノール] を加え混合した後、5分間煮沸した。サンプルをSDS-PAGE [SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, Zonula

occludens -1 (ZO-1), 6% gel; occludin, 10% gel; claudin-3, 15% gel] によって分離し, フッ化ポリビニリデンメンブレンに転写した。転写終了後, メンブレンを0.1% (w/v) のTween-20含有 20 mM Tris緩衝液 (TBS-T) で洗浄後, ブロッキングバッファー [0.3% (w/v) のスキムミルク粉末を含む TBS-T] 中に 2時間静置することでブロッキングした。次いでTBS-Tで洗浄した後, 抗ZO-1 (1 : 1,000, ウサギ抗ZO-1抗体, Life Technologies), 抗occludin (1 : 1,000, ウサギ抗occludin抗体, Life Technologies), 抗claudin-3 (1 : 2,000, ウサギ抗claudin-3, Life Technologies) または抗 β -アクチン (1 : 5,000, マウス抗 β -アクチン抗体, 富士フイルム和光純薬(株) 抗体を用い 4°Cで一晩反応させた。次にTBS-Tで洗浄後, ZO-1, occludinおよび claudin-3を検出するためにHRP標識抗ウサギIgG抗体 (1 : 10,000, Sigma) で 1時間, TBS-Tで洗浄後, β -アクチンを検出するためにビオチン標識抗マウスIgG抗体 (1 : 5,000, Jackson Immuno Research Laboratories, PA, USA) で 1時間反応させた後, HRP標識ストレプトアビジン (1 : 10,000, RPN1231-2ML, GE Healthcare UK, Buckinghamshire, England) で 1時間反応させた。なお抗体の希釈にはいずれも上述のブロッキングバッファーを用いた。TBS-Tによって洗浄した後, イムノスターゼータ (富士フイルム和光純薬(株)) を用い, 化学発光画像解析装置 (Fluor-S/MAX, Bio rad, CA, USA) で検出した。定量解析にはImage J^{89) 90)}を用い, 結果は β -アクチンを基準としたZO-1, occludinおよびclaudin-3の蛍光強度の比として示した。

14) 尿中クロム排泄率の測定

クロム-EDTA錯体をBinnertsらの方法に従って調製した⁹¹⁾。塩化クロム六水和物 (Sigma) 2.13 gを蒸留水 30 mLに溶解した塩化クロム溶液と, EDTA-2Na (株同仁化学研究所, 熊本, 日本) 3.0 gを蒸留水 45 mLに溶解

したEDTA溶液を調製した。この2つの溶液を混合し、沸騰石2粒を加えて時計皿で蓋をして1時間沸騰させた。その後、1 M 塩化カルシウム溶液を600 μ L加え、pHを6-7に調整し、蒸留水で150 mLに定容した。これを凍結乾燥して得られたものをクロム-EDTA錯体として使用した。前述の通り、尿の回収は代謝ケージを用いて行った。クロム-EDTA錯体を経口投与する直前に代謝ケージの下部に、200 μ g/mL oxytetracycline (Sigma) 溶液を5 mL入れた三角フラスコを設置した。48時間後、糞が混入しないよう留意しながら沸騰させた蒸留水で代謝ケージの洗浄を行い、ケージに付着した尿を回収した。その後、蒸留水で250 mLに定容した。クロムの分析を卓上型誘導結合プラズマ (inductively coupled plasma, ICP) 発光分光装置 (SPS7800, エスアイアイ・ナノテクノロジー株, 千葉, 日本) を用いて行った。250 mLに定容した尿600 μ Lを2 mL容マイクロチューブに量り取り、等倍量の5% (w/v) トリクロロ酢酸溶液と混合した。この溶液を遠心分離し (14,000 \times g, 25°C, 2 min) し、得られた上清500 μ Lを15 mL容コニカルチューブ (ファルコンチューブ, Corning) に量り取り、0.05% (w/v) 塩化クロム溶液4.5 mLを加え、分析に供した。

15) LPMCの単離とTreg数の測定

結腸組織を5 mm角に細切し、10 mM ジチオトレイトールを含むCa/Mgフリーハンクス平衡塩溶液 [HBSS (-), pH 7.2] を加え、37°Cで15分間攪拌する操作を2回繰り返した。1 mM EDTAを含むHBSS (-) を加え、37°Cで30分間攪拌する操作を3回繰り返した。その後、組織をRPMI-1640 (Gibco, MA, USA) で洗浄した後、10% ウシ胎児血清 (fetal bovine serum, FBS) と300 U/mL コラゲナーゼを含有するRPMI-1640中で分解した。分解残渣から細胞濾過器 (池本理工工業株, 東京, 日本) を用いて濾液を分離し、遠心分離後 (400 \times g, 4°C, 5 min) の沈澱を2% FBS

を含むPBS (2% FBS/PBS) に懸濁させた。残った組織片は再度コラゲナーゼ処理を行い、濾液を回収した。遠心分離した (400 × g, 4°C, 5 min) 沈澱を回収後、2% FBSを含むPBSに懸濁させ、再度遠心分離し (400 × g, 4°C, 5 min), 沈澱を再度 2% FBS/PBSに懸濁させた。以上の細胞細胞懸濁液をプールし、遠心分離後 (400 × g, 4°C, 5 min) の沈澱を 40% Percoll溶液に懸濁させる形で 40–70%のPercoll gradientに重層し、遠心分離し (760 × g, 25°C, 20 min), LPMC層を回収した。これに 2% FBS/PBS を 8 mL添加して再度遠心分離した (400 × g, 4°C, 5 min) 沈澱を 2% FBS/PBS 1 mLに懸濁させ、LPMCを単離した。LPMC懸濁液の細胞数をトリパンブルーによる染色後、血球計算板 (Burker-Turk, Hirschmann, BW, Germany) を用いて計測した。細胞数が 1×10^6 個になるように 1.5 mL容マイクロチューブに分注し、遠心分離した (400 × g, 4°C, 5 min)。得られた沈澱に 2.5 µg/mLのフィコエリスリン標識CD4抗体 (0.2 mg/mL, OX-38, BD Biosciences, NJ, USA) および 2.5 µg/mLのフルオレセインイソチオシアナート標識CD3抗体 (0.5 mg/mL, G4.18, BD Biosciences) を含む染色液 100 µLを加え、懸濁させた後、氷中、遮光下で 30分間静置し抗体染色を行った。染色終了後、HBSS (-) 1 mLを加え、遠心分離した (400 × g, 4°C, 5 min)。次いで、得られた沈澱に 0.1% fixable viability stain 780 (BD biosciences, NJ, USA) を含むHBSS (-) 1 mLを加え、室温、遮光下で 10分間静置し死細胞を染色した。その後、2% FBS/PBS 1 mLを加え、転倒混和し、遠心分離して (400 × g, 4°C, 5 min) 沈澱を回収した。この操作をもう一度繰り返した後、攪拌しながら固定液 (Foxp3/transcription factor fixation/permeabilization concentrate and diluent, eBioscience, CA, USA) 400 µLを滴下し、4°C, 遮光下で 45分間反応静置して細胞を固定した。遠心分離後 (400 × g, 4°C, 5 min) の沈澱に、permeabilization buffer (eBioscience) 1 mLを加え、遠心分離 (400 × g, 4°C, 5 min) して沈澱を回

収した。この操作をもう一度繰り返した後、2 µg/mL アロフィコシアニン標識マウス抗ラットFoxp3モノクローナル抗体 (FJK-16s, eBioscience) を含むpermeabilization buffer 100 µLを加え、室温、遮光下で 30分間染色した。反応後、permeabilization buffer 1 mLを加え、遠心分離 (400 × g, 4°C, 5 min) して沈澱を回収した。この操作をもう一度繰り返した後、2% FBS/PBS 300 µLを加え懸濁し、35 µMのナイロンメッシュフィルター (REF 352235, Corning) に通し、フローサイトメーター (Gallios, Beckman coulter, CA, USA) に供した。LPMCのうちFVS780で染色されず、CD3, CD4, Foxp3陽性の細胞集団をTregとした。

16) 統計解析

実験結果を平均値 ± 標準誤差で表した。実験 5の各データの統計処理を第1章と同様に行った。また、実験 6の各データの統計処理については、Bartlett検定により等分散性を確認した後、等分散であればスチューデントのt検定を行った。不等分散であった場合は、実測値を対数に変換してから再度Bartlett検定を行った後、スチューデントのt検定を行った。対数変換後も不等分散であった場合は、ウェルチのt検定を行った。いずれの統計結果も、危険率が 5%未満のとき、有意とみなした。

結果

I) SSMおよびPSMの短期摂取が健常ラットの大腸粘膜ムチン層に及ぼす影響とその解析 -大腸SCFA濃度、ムチン関連遺伝子に焦点を当てて-(実験 5)

飼料摂取量および体重増加量について群間に差は認められなかった (Table 9)。盲腸内容物重量はSSM群およびPSM群が対照群に比べ高値を示したが、組織重量は対照群に比べPSM群のみで高値を示した。盲腸の酢酸、プロピオン酸、*n*-酪酸およびこれらの合計である総SCFA濃度はSSM

およびPSM群で対照群に比べ有意に増加した。盲腸の陰窩長および杯細胞数に群間差は認められなかった。また、盲腸の*Muc2*および*Muc3*発現量に群間差は認められず、結腸の*Muc2*および*Muc3*発現量は他の群に比べSSM群で有意な低値を示し、ムチン発現量には盲腸および結腸のいずれにおいても増加は認められなかった。盲腸および結腸の硫化水素濃度は群間に差が認められなかった。糞便重量、糞塊の数および体積に群間差は認められなかった。盲腸ならびに結腸のAM, BT および総菌数をFig. 9に示した。盲腸のAM 数は対照群とPSM群に比べSSM群で有意な高値を示したが

Table 9 Food intake, body weight gain, and cecal and colonic mucin-related variables in male Wistar rats fed a control diet or a diet containing 12 g of SSM or PSM /kg diet for 16 d (Experiment 5)¹

	Control	SSM	PSM
Food intake (g)	243 ± 5	256 ± 8	255 ± 3
Body weight gain (g)	72 ± 2	77 ± 4	78 ± 1
Cecum			
Contents (g)	2.7 ± 0.1 ^b	3.3 ± 0.2 ^a	3.4 ± 0.1 ^a
Tissue weight (g)	0.53 ± 0.01 ^b	0.58 ± 0.02 ^{ab}	0.62 ± 0.03 ^a
Crypt column height (μm)	174 ± 2	178 ± 2	179 ± 2
Goblet cell (number/column)	22 ± 0	22 ± 0	22 ± 0
Organic acids (μmol/g contents)			
Acetate	31.8 ± 2.3 ^b	42.9 ± 2.4 ^a	46.5 ± 2.4 ^a
Propionate	12.2 ± 0.9 ^b	18.8 ± 1.2 ^a	16.5 ± 0.8 ^a
<i>n</i> -Butyrate	4.0 ± 0.3 ^c	6.0 ± 0.4 ^b	7.7 ± 0.5 ^a
SCFA ²	48.0 ± 3.3 ^b	67.7 ± 3.6 ^a	70.6 ± 3.2 ^a
Succinate	0.8 ± 0.2	4.0 ± 3.0	0.9 ± 0.2
Hydrogen sulfide (μmol /g)	2.7 ± 0.1	2.9 ± 0.1	2.6 ± 0.1
Gene expression (relative value) (fold of control)			
<i>Muc2</i>	1.0 ± 0.1	0.86 ± 0.12	0.98 ± 0.07
<i>Muc3</i>	1.0 ± 0.1	0.88 ± 0.10	0.84 ± 0.10
Colon			
Hydrogen sulfide (μmol /g)	4.0 ± 0.1	4.1 ± 0.1	3.8 ± 0.1
Gene expression (relative value) (fold of control)			
<i>Muc2</i>	1.0 ± 0.1 ^a	0.5 ± 0.1 ^b	0.9 ± 0.1 ^a
<i>Muc3</i>	1.0 ± 0.1 ^a	0.6 ± 0.1 ^b	1.0 ± 0.1 ^a
Feces			
Weight (g/d)	1.4 ± 0.0	1.5 ± 0.0	1.4 ± 0.0
Pellet (number/d)	17 ± 1	18 ± 1	17 ± 0
Volume (mL/d)	1.6 ± 0.0	1.6 ± 0.1	1.5 ± 0.0

¹Values are means ± SEMs; *n* = 6, except for food intake and body weight gain (*n* = 12). Labeled means in a row without a common letter differ, *p* < 0.05. SSM, skate-skin mucin; PSM, porcine stomach mucin.

²Short-chain fatty acids, the sum of acetate, propionate, and *n*-butyrate.

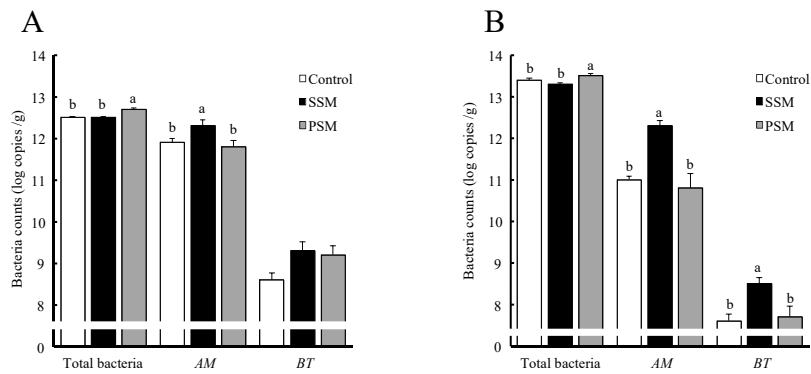


Figure 9 Bacteria counts in the cecum (A) and the colon (B) in rats fed a control diet or diet containing 12 g of SSM or PSM /kg for 16 d (Experiment 5). Values are means \pm SEMs, $n = 6$. Values without a common superscript letter differ significantly ($p < 0.05$).

SSM, skate-skin mucin; PSM, porcine stomach mucin. AM, *Akkermansia muciniphila*; BT, *Bacteroides thetaiotaomicron*.

BT 数に群間差は認められなかった。また、盲腸の総菌数は他の群に比べ PSM群で有意な高値を示した。結腸ではAM 数および総菌数が盲腸と同様の傾向を示したが、BT 数はSSM群で有意な上昇を示した。盲腸および結腸から作成した切片のアルシアンブルー染色は上皮と管腔内容物間のムチン層の可視化を可能にした (Fig. 10-A, 各群の代表; Fig. 11, 検体ごと)。アルシアンブルー染色によって可視化した盲腸上皮ムチン層の厚さに群間差は認められなかったが、結腸上皮ムチン層はSSM群では対照群に比べ有意に薄層化したが、PSM群では差が認められなかった (Fig. 10-B)。同様に結腸のFISH-Muc2免疫染色像もSSM群で薄層化することを確認した (Fig. 10-C, 各群の代表; Fig. 12, 検体ごと)。

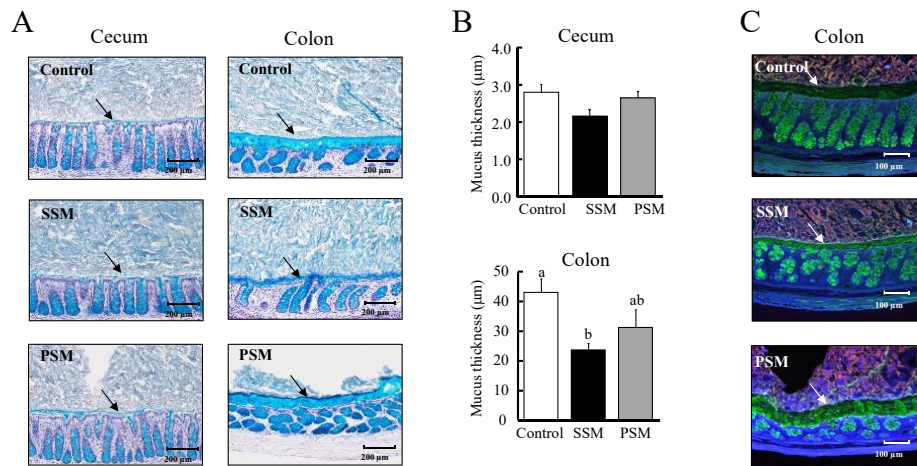


Figure 10 Thin sections of the cecum and the distal colon stained with Alcian blue (A), mucus layer thickness of the cecum and the colon (B) and FISH images of the colon, enabling visualization of bacteria (red-purple) in combination with staining for Muc2 (green) (C) in rats fed a control diet or diet containing 12 g of SSM or PSM /kg for 16 d (Experiment 5).

Values are means \pm SEMs, $n = 6$ (B). Black (A) and white arrows (C) indicate the mucus layer. Magnification, $\times 100$. Values without a common superscript letter differ significantly ($p < 0.05$). SSM, skate-skin mucin; PSM, porcine stomach mucin.

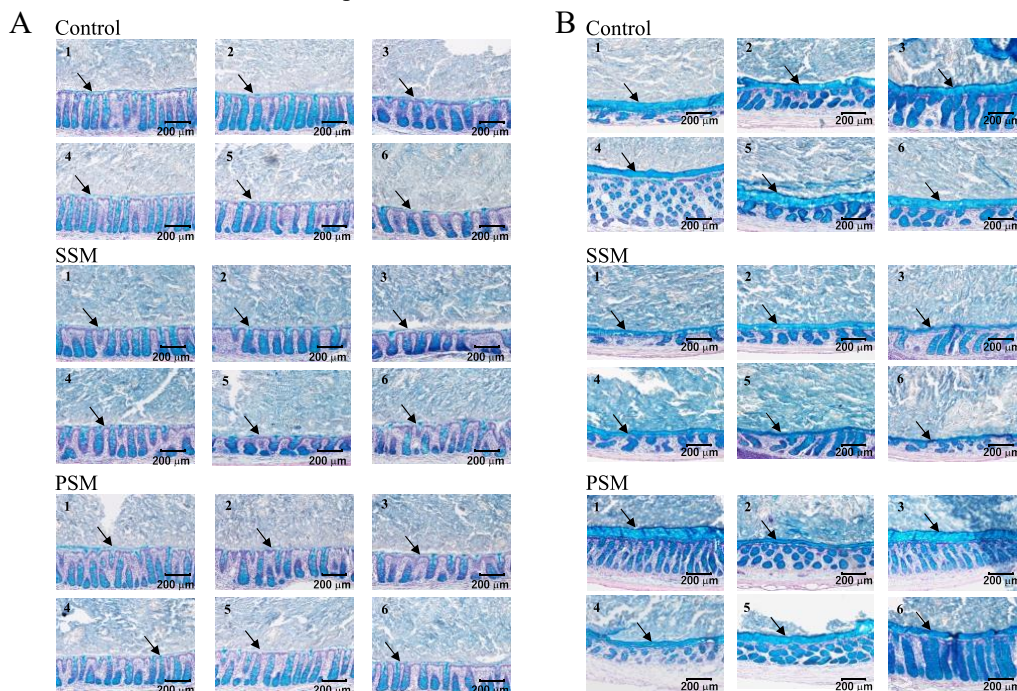


Figure 11 Cecum (A) or colon (B) thin sections stained with Alcian blue and counterstained with Kernechtrot prepared from rats fed control diet or a diet containing 12 g of SSM or PSM/kg for 16 d (Experiment 5).

Black arrows on the photos indicate mucus layers between the epithelium and cecum digesta. Numbers on the photos represent the animal number assigned in each group. Magnification, $\times 100$.

SSM, skate-skin mucin; PSM, porcine stomach mucin.

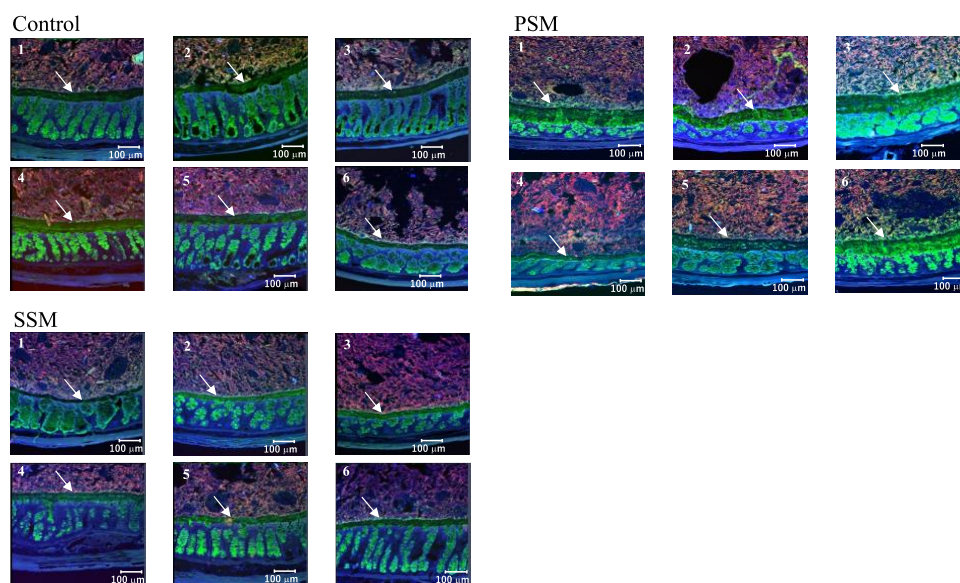


Figure 12 Distal colon thin sections stained with FISH using a general bacterial probe that enable visualization of bacteria (red-purple) in combination with staining for Muc2 (green) and nuclei (blue) prepared from rats fed control diet or a diet containing 12 g of SSM or PSM/kg for 16 d (Experiment 5).

White arrows on the photos indicate Muc2 layers between the epithelium and colonic digesta. Numbers on the photos represent the animal number assigned in each group. Magnification, $\times 100$.

FISH, fluorescence *in situ* hybridization; SSM, skate-skin mucin; PSM, porcine gastric mucin.

II) SSMの短期摂取によるAM 増殖が腸管透過性に及ぼす影響とその解析 -TJタンパク質量および血中LPS濃度に焦点を当てて- (実験 6)

飼料摂取量および体重増加量について群間に差は認められなかった (Table 10)。盲腸内容物重量および組織重量はいずれも群間に差が認められなかった。盲腸内容物のLPS濃度はSSM群で有意な高値を示したが、血漿のLPS濃度およびLBP濃度には群間差が認められなかった。盲腸と結腸のAM 数はいずれもSSM群が対照群に比べ有意な高値を示した。また、TJタンパク質関連遺伝子の発現量について盲腸では群間に差が認められなかったが、結腸では*claudin-3*, *occludin*がSSM群で対照群に比べて有意な低値を示した。粘膜固有層リンパ球のうちTregの比率は盲腸および結腸の両方で群間に差が認められなかった。また、クロム-EDTA錯体の経口投与時における尿中クロム排泄率についても群間差は認められなかった。サイトカインの発現量は盲腸では群間に差が認められなかったが、結腸では一部のサイトカイン (*Il-1 β* , *Il-4*, *Il-13*, *Il-17*, *Ifng*) の発現量がむしろ有意

Table 10 Food intake, body weight gain, gut permeability-related variables, and mucosal immune parameters in the cecum and colon of rats fed a control diet or a diet containing 12 g of SSM /kg diet for 21 d (Experiment 6)¹

	Control	SSM
Food intake (g/21 d)	350 ± 4	369 ± 8
Body weight gain (g/21 d)	94.8 ± 1.8	99.8 ± 2.7
Plasma		
Lipopolysaccharides (ng/L)	0.25 ± 0.04	0.41 ± 0.12
LPS-binding protein ² (µg/mL)	2.0 ± 0.1	2.1 ± 0.2
Cecum		
Contents (g)	3.0 ± 0.2	3.3 ± 0.2
Tissue (g)	0.6 ± 0.04	0.6 ± 0.0
Lipopolysaccharides (µg/g)	3.4 ± 1.0	7.5 ± 1.1*
Total bacteria (log copies/g)	13.4 ± 0.0	13.3 ± 0.0
<i>A. muciniphila</i> (log copies/g)	11.7 ± 0.1	12.8 ± 0.2*
Gene expression (relative value, fold of control)		
<i>Claudin-3</i>	1.0 ± 0.3	1.0 ± 0.7
<i>Zonula occludens1</i>	1.0 ± 0.1	1.0 ± 0.0
<i>Occludin</i>	1.0 ± 0.1	1.0 ± 0.0
Regulatory T cells (CD4 ⁺ -Foxp3 ⁺) (%)	23.8 ± 0.3	23.1 ± 0.5
Colon		
Total bacteria (log copies /g)	13.2 ± 0.1	12.9 ± 0.0
<i>A. muciniphila</i> (log copies /g)	11.1 ± 0.1	12.2 ± 0.1*
Gene expression (relative value, fold of control)		
<i>Claudin-3</i>	1.0 ± 0.6	0.84 ± 0.04*
<i>Zonula occludens1</i>	1.0 ± 0.1	0.80 ± 0.01
<i>Occludin</i>	1.0 ± 0.1	0.68 ± 0.02*
Regulatory T cells (CD4 ⁺ -Foxp3 ⁺) (%)	9.9 ± 0.4	9.9 ± 1.1
Urinary chromium-EDTA excretion (%)	3.7 ± 0.4	3.5 ± 0.4

¹Values are means ± SEMs; *n* = 6, except for food intake and body weight gain (*n* = 12).

*, *p* < 0.05 vs. control. SSM, skate-skin mucin.

²Lipopolysaccharide-binding protein.

な低値を示した (Fig. 13)。一方、盲腸のTJタンパク質 (ZO1, claudin-3およびoccludin) 量に群間で差はなかったが、結腸ではSSM群のclaudin-3が対照群に比べ有意な高値を示した (Fig. 14)。

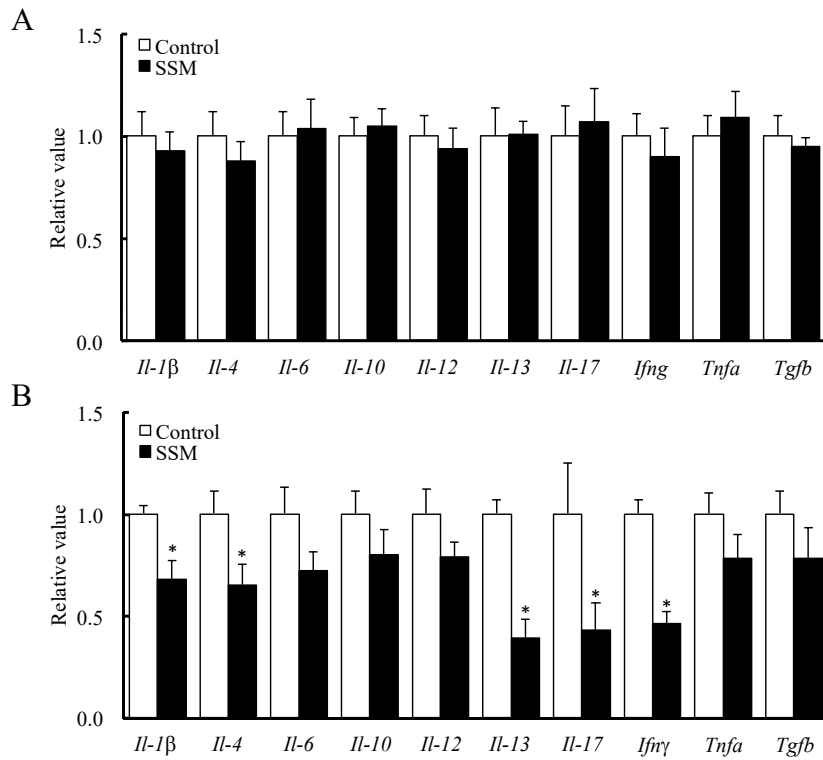


Figure 13 Mucosal mRNA expression of various cytokines in the cecum (A) and the colon (B) in rats fed a control diet or diet containing 12 g of SSM /kg for 21 d (Experiment 6).

Values are means \pm SEMs, $n = 6$. *Different from control ($p < 0.05$). SSM, skate-skin mucin.

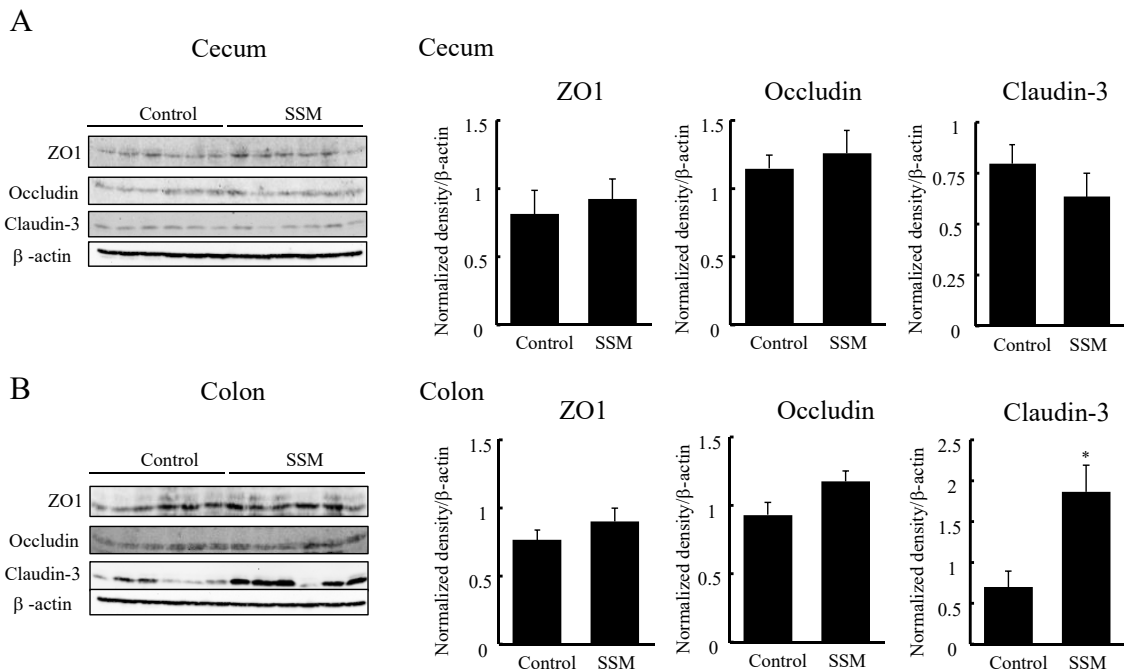


Figure 14 Amount of tight junction proteins in the cecum and the colon in rats fed a control diet or diet containing 12 g of SSM /kg for 21 d (Experiment 6). Values are means \pm SEMs, $n = 6$. *Different from control ($p < 0.05$). SSM, skate-skin mucin.

第3節 考察

本試験では SSM の摂取が健常ラットの大腸バリア機能に及ぼす影響を解析することを目的とした。第 1 章の結果と同様に、本試験においても SSM 群で対照群および PSM 群に比べ AM 数の顕著な増殖が認められた。加えて遠位結腸のムチン層について SSM を摂取させたラットのみで対照群に比べ約 40%以上の有意な薄層化が認められた。Johansson らによれば結腸においてムチン層は結腸上皮に接着する強固な内層と疎な外層の 2 層に分かれる^{92) 93)}。また、本試験において固定に使用したカルノア固定では内層のみが染色される⁹⁴⁾。結腸内容物の体積上昇はムチン層を押し広げることで、測定値を低下させると考えられるが、糞便の体積は群間に差が認められなかった。したがって、SSM の摂取は遠位結腸におけるムチン層の厚さを本質的に低下させるようである。

また、盲腸のムチン層では有意差は認められないものの、SSM 群では対照群に対して約 20%の薄層化が認められた。本試験において SSM と PSM の摂取は盲腸における SCFA の濃度を有意に上昇させ、特に酪酸濃度を 2 倍以上に上昇させた。酪酸は *in vivo* において杯細胞数³¹⁾および杯細胞からの Muc2 分泌を上昇させることが報告されているが^{32) 73)}、盲腸における杯細胞数とムチン関連遺伝子の mRNA 発現量は群間に差が認められず、結腸におけるムチン関連遺伝子の発現量はむしろ有意に低下した。これらの低発現の理由は現在不明だが、少なくとも正常ラットにおいて酪酸濃度の上昇そのものはムチン層の薄層化に対する補償的応答としてのムチン分泌促進には寄与しないと考えられる。

電子顕微鏡を用いた観察によって結腸上皮ムチン層はムチンがジスルフィド結合によって相互に結合した三次元網目構造によって形成されていることが明らかになっている⁹⁵⁾。一方、硫化水素はその還元力によってジスルフィド結合を切断し、ムチン層を崩壊させることが報告された

96)。これらのことから、本試験において観察されたムチン層の厚さの低下が硫化水素濃度の上昇によるものであることを懸念して盲腸および結腸の硫化水素濃度を測定したが、いずれの部位においても群間に差は認められなかった。これは結腸ムチンの薄層化において硫化水素の影響が二次的であることを示唆している。

従来、その分子量から LPS は傍細胞経路によって通過すると考えられていたが、近年 LPS は小腸においてエンドサイトーシスやカイロミクロンを介した経細胞経路によって透過することが報告された⁹⁷⁾。このように血中 LPS 濃度と腸管透過性との関係については未だ完全には解明されていない⁷⁵⁾⁹⁸⁾。AM はグラム陰性菌であることから予想されるように¹⁾、SSM 摂取による AM 増殖は盲腸 LPS 濃度を対照群に比べ 2 倍以上に上昇させた。一方、LBP は LPS に対する急性期応答として肝細胞で合成されるタンパク質であるが⁹⁹⁾、血中 LPS および LBP の濃度はいずれも群間に差が認められなかった。また、クロム-EDTA 錯体の経口投与時における尿中クロム排泄率は傍細胞経路による腸管透過性の指標として確立された基準であるが⁷⁵⁾、これは群間に差が認められなかった。さらに、SSM 群における TJ タンパク質量も対照群と SSM 群の間に差が認められなかった。

Alrafas らは AM を増殖させるプレバイオティクスである Resveratrol の経口投与が 2,4,6-トリニトロベンゼンスルホン酸ナトリウム二水和物によって大腸炎を誘発させたマウスの腸間膜リンパ節 (mesenteric lymph node, MLN) において Treg 数を上昇させることを報告した¹⁰⁰⁾。また、Zhai らは DSS によって誘発させた慢性大腸炎のマウスに対する AM 生菌製剤の投与が MLN において CD4⁺細胞のうちの Foxp3⁺Treg の割合を有意に上昇させることを報告した¹⁰¹⁾。SCFA は結腸粘膜固有層の Treg 数を有意に上昇させることが知られており¹⁰²⁾¹⁰³⁾、AM が SCFA の産生を促進す

ることで Treg を誘導すると考えられている¹⁰⁰⁾¹⁰¹⁾。しかし、本試験においては結腸の Treg 比率に差が認められなかった。

先述のように結腸のムチン層は粘膜表面に接着する強固な内層と腸内細菌に対して生息地と発酵基質を提供する疎な外層の 2 層に分かれると考えられてきた⁹²⁾。しかし、2020 年に Bergstorm らは盲腸から直腸に渡る結腸全体の組織像の観察から近位結腸には明確なムチン層は存在せず、近位結腸由来のムチンが内容物と混ざり合い、内容物をカプセル化することを報告した¹⁰⁴⁾。一方、遠位結腸においてはさらにこの外周をムチンが囲い込むことで 2 層のバリアを形成することを伴わせて報告した。また、糖鎖修飾を担う酵素の一種 C1galt1 の欠損マウスでは、遠位結腸由来のムチン層の厚さのみが低下し、ムチン層全体の厚さには差がないのにも関わらず、炎症像が観察された。このように、腸管透過性を決定付けるのは必ずしもムチン層の厚さだけではないようである。本試験の結果、SSM の短期摂取による AM 増殖は結腸ムチン層をむしろ約 40%有意に薄層化させた。しかし、結腸ムチン層の 40%の薄層化は健常ラットにおいては腸管透過性および結腸および盲腸のムチン、TJ タンパク関連遺伝子発現量、TJ タンパク質量には影響を与えなかった。

第 3 章

SSM の摂取による *AM* 増殖が各種ラット病態モデルに及ぼす影響

第1節 緒論

2013年にEverardらがAMの生菌製剤の投与がマウスにおいて肥満、糖尿病を改善することを報告した²⁵⁾。さらに最近の研究では、低温殺菌したAM製剤が、肥満、糖尿病マウスや肥満度指数25以上の男女を対象とした臨床試験において耐糖能を改善すると報告されている^{26) 46)}。当初はAMによる肥満、糖尿病改善機序について代謝産物(SCFA)による機序が推定されていたが^{2) 3) 17) 18) 74)}、近年、AMの菌体成分による機序がマウスを用いた実験によって報告された^{26) 27)}。また、炎症性腸疾患のモデルとして汎用されているDSS誘発性大腸炎についてもAM生菌製剤の投与による効果がマウスを用いて検討されたが¹⁰⁵⁾、AM生菌製剤の投与がDSS大腸炎を改善するという報告がある一方^{28) 29)}、生菌製剤による効果は認められないという報告もあり³⁰⁾、一定の見解が得られていない。

近年、数多くの*in vitro*および*in silico*実験手法が開発されたが、病態の複雑なエチオロジーや全身の複合的な相互関係を理解する上では動物実験が未だ有用である¹⁰⁶⁾。一方、動物の病態モデルを用いた実験においては動物種や系統による表現系の違いが、実験の結果に影響することが指摘されている¹⁰⁶⁾。そこで第3章では、これまでマウスを用いて報告されてきたAMによる耐糖能およびDSS誘発性大腸炎改善効果について、SSMを摂取させることでAMを増殖させ、ラットにおいて検討した。

第2節 ラット耐糖能に及ぼすAM増殖の影響

1) 実験動物および飼料組成

7週齢のWistar系雄ラットを日本エスエルシー(株)から購入し、室温 23 ± 1°C、照明管理 (7:00から19:00に点灯) のもと、底面が格子状のステンレスケージ内で個別に飼育した。搬入後ラットを7日間予備飼育した。予

備飼育中は対照試料 (第 1 章・第 5 節と同一) を自由摂取により与えた。予備飼育終了後、体重を基準に各群に割り当てた。

I) 健常ラット耐糖能に及ぼすAM 増殖の影響 (実験 7)

予備飼育後、24匹のラット (体重 164 ± 1 g [平均値 \pm 標準誤差]) をそれぞれ各群 12匹の 2群に分けた。ラットに水および対照飼料、12 g/kg のSSM添加飼料を自由摂取により 56日間与えた。飼育開始 49日目に各群 6匹のラットを 20時間絶食させた後、経口投与によってグルコース (1000 mg/kg 体重) を与えた。血漿 (35 μ L) をグルコース投与後 0, 30, 60, 120, 180分に尾静脈から採取し、血漿のグルコースおよびインスリン濃度を測定した。54日目にラットにクロム-EDTA錯体を投与し、第 2章と同様に 48時間尿を採取した。飼育終了後、グルコース投与に供したラットをイソフルラン麻酔下で、腹部大動脈から採血することで致死させ、第 2章と同様に血漿を分離してLPSおよびLBPの測定に用いた。盲腸と結腸を採取し重量を測定した。盲腸内容物について有機酸濃度、硫化水素濃度および細菌数を測定した。結腸内容物について硫化水素濃度を測定した。また、結腸粘膜を採取し、総RNAを単離しムチンおよびTJタンパク質関連遺伝子の発現量ならびにTJタンパク質のウエスタンブロット分析に用いた。クロム-EDTA錯体の投与に割り当てた各群残りの 6匹のラットをペントバルビタール麻酔下 (50 mg/kg) で断頭により致死させ、糞塊を含む遠位結腸組織を第2章と同様に採取し上皮ムチン層の分析に用いた。

II) 高脂肪食摂取ラットにおけるAM 増殖の影響 (実験 8)

予備飼育後、24匹のラット (体重 164 ± 2 g [平均値 \pm 標準誤差]) をそれぞれ各群 12匹の 2群に分けた。ラットに水および上述の対照飼料に20%のラード (純正ラード, 雪印メグミルク株, 東京, 日本) を添加した

高脂肪食または高脂肪食に 12 g/kgのSSMを添加した飼料を自由摂取により 56日間与えた。ラードの添加をコーンスターチと置換することにより行った。飼育開始 49日目に各群実験 7と同様に絶食およびグルコース投与を行い、血漿グルコースおよびインスリン濃度を測定した。54日目にラットにクロム-EDTA錯体経口投与後の尿中排泄率を測定した。飼育終了後、グルコース投与に供したラットをイソフルラン麻酔下で、腹部大動脈から採血することで致死させ、実験 7と同様に血漿を分離し、LPSおよびLBPを測定した。盲腸と結腸を採取し重量を測定した。盲腸内容物について有機酸濃度、硫化水素濃度および細菌数を測定した。結腸内容物について硫化水素濃度を測定した。また、結腸粘膜を採取し、総RNAを単離しムチンおよびTJ関連遺伝子の発現量の測定に用いた。クロム-EDTA錯体の投与に割り当てた各群残りの 6匹のラットをペントバルビタール麻酔下 (50 mg/kg) で断頭により致死させ、糞塊を含む遠位結腸組織を実験 7と同様に採取し上皮ムチン層の分析に用いた。

2) 血中グルコース濃度の測定

前日 12:00にケージから餌つぼを取り除くことで絶食させ、翌日の 12:00に絶食時の採血を行った。その後 14:00からグルコース (1000 mg/kg 体重; 投与容量, 0.5 mL/100 g 体重) を経口投与針 (KN-348 17G-120, 夏目製作所株, 東京, 日本) あるいはフレキシブル経口投与チューブ (KN-349-RC, 夏目製作所株) を用いて経口投与した。グルコース投与から 30, 60, 120, 180分後に採血を行った。採血時にはラットを保定器で保定し、尾にアルコールを塗布することで血管を拡張させた。メスを用いて尾静脈を傷つけて出血させ、ヘパリン処理済みヘマトクリット毛細管 (Hämatokrit-Kapillaren, Na-hep 75 µL vol., 9100275, Hirschmann, BW, Germany) を用いて血液を採取した。採血した血液を測定まで氷上で保存

した。これを遠心分離し (Kubota3200, 久保田商事株, 東京, 日本, 10,000 rpm, 常温, 5 min), 上清を血漿として採取した。血漿中のグルコース濃度を市販のグルコース測定キット (グルコースCIIテストワコー, 富士フイルム和光純薬株) を用いて測定した。採取した血漿 5 μ Lにキット付属の発色液 [キット付属の発色剤 : キット付属の緩衝液 = 1 : 1 (v : w) の混合液] 750 μ Lを混和し, 恒温振盪水槽 (NTS-1300, 東京理化工機株) を用い, 37°Cで 5分間静置した。この混合液 250 μ Lを 96ウェルプレート (Nunc MaxiSorp™, Thermo Fisher Scientific) に移し, 550 nmにおける吸光度を測定した。キット付属のブドウ糖標準液を用い, 被験試料と同様に測定することで作成した標準曲線をもとに定量した。

3) 血中インスリン濃度の測定

上述の手順で得た血漿のインスリン濃度を市販のインスリン測定キット (マウス/ラットインスリン測定キット, 株森永生化学研究所, 神奈川県, 日本) を用いて測定した。キット付属の抗体固相化プレートにキット付属のモルモット抗インスリン血清 93 μ Lおよび血漿 7 μ Lを加え, マイクロウンプレートミキサー (OPM-103, アズワン株) を用いて, 室温で 30から 60秒間攪拌した後, インキュベータ (MIR-254, SANYO株, 大阪, 日本) 内で 4°Cで 20時間静置した。プレート内の溶液を除去しキット付属の洗浄液を用いて 5回洗浄し (300 μ L/回), 完全に洗浄液を除去した後, キット付属の酵素標識抗モルモットIgG抗体溶液を加え, インキュベータ内で 22°Cで 1時間静置した。先と同様に洗浄液を用いて 8回洗浄し (300 μ L/回), 完全に洗浄液を除去した後, キット付属の酵素基質溶液 100 μ Lを加え, インキュベータ内で 22°Cで 30分間静置した。その後直ちにキット付属の反応停止液 100 μ Lを添加し, 450 nm (副波長として 620 nm) における吸光度を測定した。キット付属のインスリン標準品を用

い、被験試料と同様に測定することで作成した標準曲線をもとに定量した。

4) 腹部大動脈血および盲腸内容物LPS濃度の測定

第 2 章・第 2 節と同様に行った。

5) 腹部大動脈血LBP濃度の測定

第 2 章・第 2 節と同様に行った。

6) 盲腸有機酸濃度の測定

第 2 章・第 2 節と同様に行った。

7) 盲腸および結腸硫化水素濃度の測定

第 2 章・第 2 節と同様に行った。

8) 盲腸，結腸内容物および糞便の細菌数の測定

第 1 章・第 5 節と同様に行った。

9) 盲腸および結腸の遺伝子発現量の測定

第 1 章・第 5 節と同様に行った。

10) ウェスタンブロッティング分析

第 2 章・第 2 節と同様に行った。

11) 上皮ムチン層の分析

第 2 章・第 2 節と同様に凍結切片を作成し、アルシアンブルー染色を行った。この組織を同様に観察し、ムチン層の厚さを測定した。

12) 糞便中ムチン量 (O-結合性糖鎖当量) の測定

第 1 章・第 5 節と同様に行った。

13) 統計解析

実験結果を、平均値 ± 標準誤差で表した。実験 7, 8 の各データの統計解析を第 2 章・第 2 節の実験 6 と同様に行った。いずれの統計結果も、危険率が 5%未満のとき、有意とみなした。

結果

I) 健常ラットの耐糖能に及ぼすAM 増殖の影響 (実験 7)

飼育 49日目における血中グルコースおよびインスリン応答について群間に差が認められなかった (Fig. 15)。飼育終了時の飼料摂取量、体重

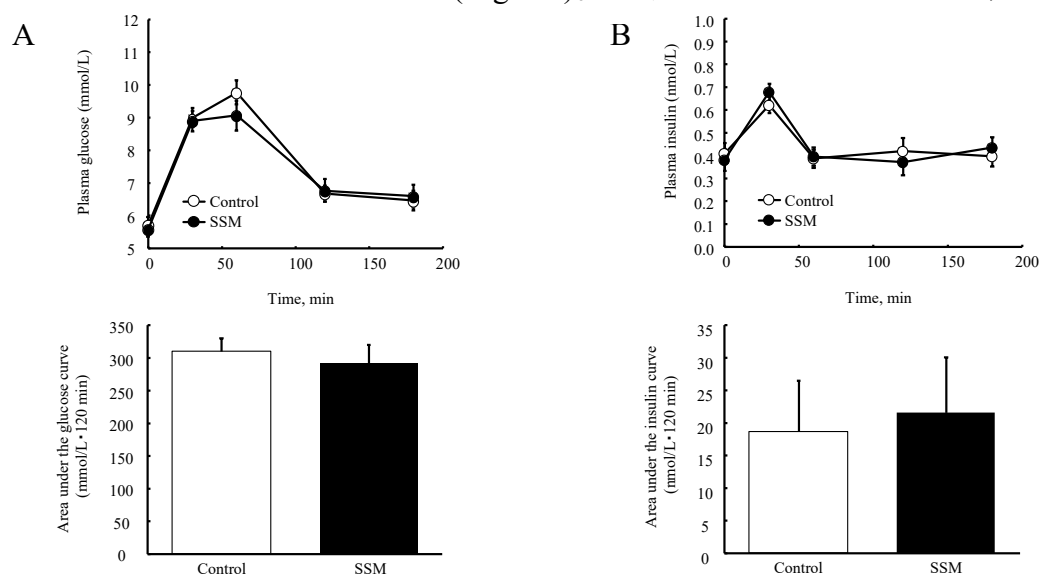


Figure 15 Glycemic (A) and insulinemic responses (B) in rats fed a control diet or diet containing 12 g of SSM /kg for 56 d (Experiment 7).

Values are means ± SEMs, $n = 6$. SSM, skate-skin mucin.

増加量に群間差は認められなかった (Table 11)。盲腸および結腸のAM およびBT 数についてSSM群が有意な高値を示したが、総菌数に群間差は認められなかった。盲腸内容物SCFA濃度は酪酸濃度についてSSM群が有意な高値を示した。硫化水素濃度は盲腸および結腸のいずれも群間差が認められなかった。また、血中LPS濃度およびLBP濃度および結腸ムチン層の厚さについて群間に差が認められなかった。結腸のムチンおよびTJタンパク質関連遺伝子の発現量に群間差は認められず、結腸におけるTJタンパク質 (claudin-3, ZO1およびoccludin) 量にも群間差はなかった。また、

Table 11 Food intake, body weight gain, gut permeability-related variables in male Wistar rats fed a control diet or a diet containing 12 g of SSM/kg diet for 56 d (Experiment 7)¹

	Control	SSM
Food intake (g)	908 ± 14	899 ± 11
Body weight gain (g)	168 ± 6	167 ± 2
Plasma lipopolysaccharides ² (ng/L)	0.17 (3)	0.17 (2)
Cecum		
Contents (g)	2.7 ± 0.1	2.5 ± 0.1
Organic acids (μmol/g)		
Acetate	31.6 ± 1.1	35.5 ± 1.3
Propionate	15.6 ± 1.7	16.7 ± 0.3
<i>n</i> -Butyrate	4.6 ± 0.3	5.5 ± 0.2*
SCFA ³	47.8 ± 5.4	57.7 ± 1.6
Total bacteria (log copies /g)	13.1 ± 0.0	13.3 ± 0.0
<i>A. muciniphila</i> (log copies /g)	12.2 ± 0.1	13.1 ± 0.1*
<i>B. thetaiotaomicron</i> (log copies /g)	8.8 ± 0.1	9.6 ± 0.1*
Hydrogen sulfide (μmol /g)	3.6 ± 0.2	4.4 ± 0.3
Colon		
Mucus layer thickness (μm)	34 ± 2	33 ± 3
Total bacteria (log copies /g)	13.4 ± 0.1	13.1 ± 0.0
<i>A. muciniphila</i> (log copies /g)	11.5 ± 0.1	12.5 ± 0.1*
<i>B. thetaiotaomicron</i> (log copies /g)	8.4 ± 0.1	9.0 ± 0.2*
Gene expression (relative value, fold of control)		
<i>Muc2</i>	1.0 ± 0.1	0.9 ± 0.1
<i>Muc3</i>	1.0 ± 0.1	0.9 ± 0.1
<i>Claudin3</i>	1.0 ± 0.0	0.9 ± 0.1
<i>Zonula occludens1</i>	1.0 ± 0.0	1.0 ± 0.1
<i>Occludin</i>	1.0 ± 0.0	0.9 ± 0.1
Amount of tight junction proteins (density/β-actin)		
<i>Claudin3</i>	1.0 ± 0.3	1.0 ± 0.3
<i>Zonula occludens1</i>	2.0 ± 0.3	1.2 ± 0.2
<i>Occludin</i>	0.50 ± 0.13	0.53 ± 0.11
Hydrogen sulfide (μmol /g)	3.1 ± 0.1	3.2 ± 0.2
Urinary chromium-EDTA excretion (%)	4.9 ± 1.0	4.5 ± 0.7

¹Values are means ± SEMs; *n* = 6, except for food intake and body weight gain (*n* = 12).

*, *p* < 0.05 vs. control. SSM, skate-skin mucin.

²Data represent means and the number of detected in the parenthesis.

³SCFAs, short-chain fatty acids (the sum of acetate, propionate and *n*-butyrate).

クロム-EDTA錯体の経口投与時における尿中クロム排泄率は群間に差が認められなかった。これらの結果からSSMの摂取は少なくとも健常ラットにおいては耐糖能に影響を及ぼさないと結論付けた。

II) 高脂肪食を摂取させたラットにおけるAM 増殖の影響 (実験 8)

飼育 49日目における血中グルコース濃度に群間差は認められなかったが、インスリン濃度の曲線下面積 (area under the curve, AUC) はSSM群が有意に高値を示した (Fig. 16)。飼育終了時の飼料摂取量に群間差は認められなかったが、体重増加量はSSM群が有意に高値を示した (Table 12)。盲腸および結腸のAM およびBT 数はSSM群で有意に高値を示した。総菌数は盲腸で有意差が認められず、結腸ではSSM群で有意に高値を示した。盲腸内容物SCFA濃度についてはプロピオン酸のみがSSM群で有意な高値を示した。盲腸および結腸の硫化水素濃度に群間差は認められなかった。また、血中LPS濃度およびLBP濃度および結腸ムチン層の厚さは群間に差が認められなかった。結腸のムチンおよびTJタンパク質関連遺伝子の

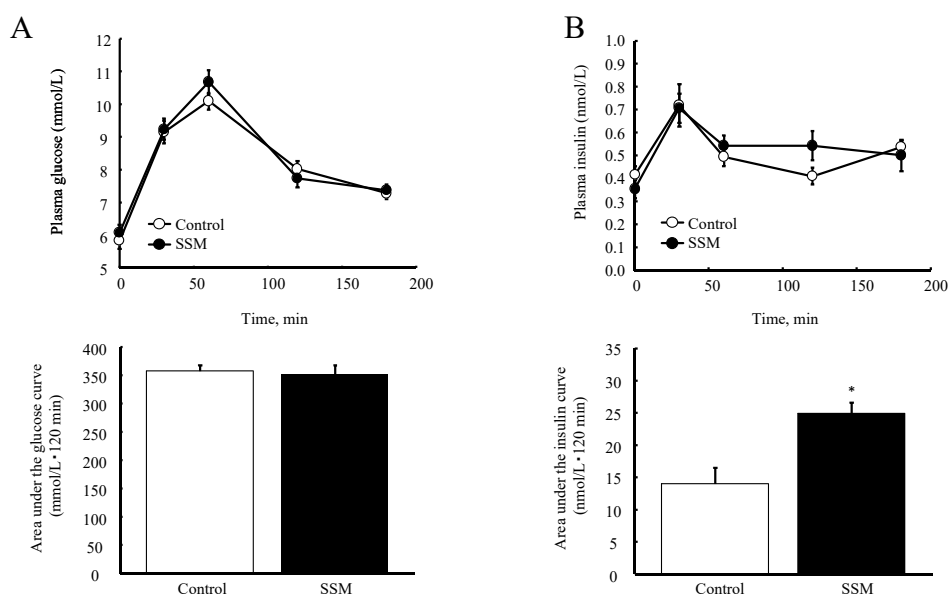


Figure 16 Glycemic (A) and insulinemic responses (B) in rats fed a high fat diet containing 20% lard or high fat diet containing 12 g of SSM /kg for 21 d (Experiment 8).

Values are means \pm SEMs, $n = 6$. *Different from control ($p < 0.05$). SSM, skate-skin mucin.

発現量に群間差は認められず、結腸におけるTJタンパク質 (claudin-3, ZO1およびoccludin) 量にも群間差はなかった。また、クロム-EDTA錯体の経口投与時における尿中クロム排泄率にも群間に差が認められなかった。また、結腸粘膜のサイトカインの遺伝子発現量については*Il-10*および*Tnf- α* 発現量が有意な高値を示した (Fig. 17)。また、有意差は認められないものの*Il-1 β* , *Il-6*, *Ifn- γ* , *Tgf- β* 発現量がSSM群で一様に高値を示した (1.6–3.3倍, いずれも $p < 0.10$)。これらの結果からSSMの摂取は高脂肪食を摂取させたラットの耐糖能に対し少なくとも改善効果を示すことはない結論付けた。

Table 12 Food intake, body weight gain, gut permeability-related variables in male Wistar rats fed a high fat diet containing 20% lard or high fat diet or a diet containing 12 g of SSM/kg diet for 56 d (Experiment 8)¹

	Control	SSM
Food intake (g)	794 \pm 7	807 \pm 7
Body weight gain (g)	190 \pm 2	203 \pm 2*
Epididymal fat pad, g	13.7 \pm 0.4	14.8 \pm 0.6
Plasma lipopolysaccharides ² (ng/L)	0.12 \pm 0.02	0.10 \pm 0.02
Cecum		
Contents (g)	1.9 \pm 0.1	1.8 \pm 0.1
Organic acids (μ mol/g)		
Acetate	26.6 \pm 1.2	27.1 \pm 1.8
Propionate	11.1 \pm 0.5	14.0 \pm 1.1*
<i>n</i> -Butyrate	2.5 \pm 0.1	2.3 \pm 0.1
SCFA ³	40.1 \pm 1.7	43.4 \pm 3.0
Total bacteria (log copies /g)	13.1 \pm 0.0	13.1 \pm 0.0
<i>A. muciniphila</i> (log copies /g)	12.4 \pm 0.1	13.2 \pm 0.0*
<i>B. thetaiotaomicron</i> (log copies /g)	8.8 \pm 0.1	9.4 \pm 0.1*
Hydrogen sulfide (μ mol /g)	3.1 \pm 0.1	3.2 \pm 0.2
Colon		
Mucus layer thickness (μ m)	49.1 \pm 2.8	35.8 \pm 9.7
Total bacteria (log copies /g)	13.3 \pm 0.1	13.0 \pm 0.1*
<i>A. muciniphila</i> (log copies /g)	11.1 \pm 0.1	12.3 \pm 0.1*
<i>B. thetaiotaomicron</i> (log copies /g)	7.6 \pm 0.1	8.4 \pm 0.2*
Gene expression (relative value, fold of control)		
<i>Muc2</i>	1.0 \pm 0.1	1.0 \pm 0.2
<i>Muc3</i>	1.0 \pm 0.1	1.0 \pm 0.1
<i>Claudin3</i>	1.0 \pm 0.1	1.1 \pm 0.1
<i>Zonula occludens1</i>	1.0 \pm 0.1	1.1 \pm 0.1
<i>Occludin</i>	1.0 \pm 0.0	1.0 \pm 0.1
Hydrogen sulfide (μ mol /g)	5.5 \pm 0.4	5.4 \pm 0.5
Urinary chromium-EDTA excretion (%)	7.0 \pm 1.3	6.8 \pm 0.6

¹Values are means \pm SEMs; $n = 6$, except for food intake and body weight gain ($n = 12$).

*, $p < 0.05$ vs. control. SSM, skate-skin mucin.

²Data represent means and the number of detected in the parenthesis.

³SCFAs, short-chain fatty acids (the sum of acetate, propionate and *n*-butyrate).

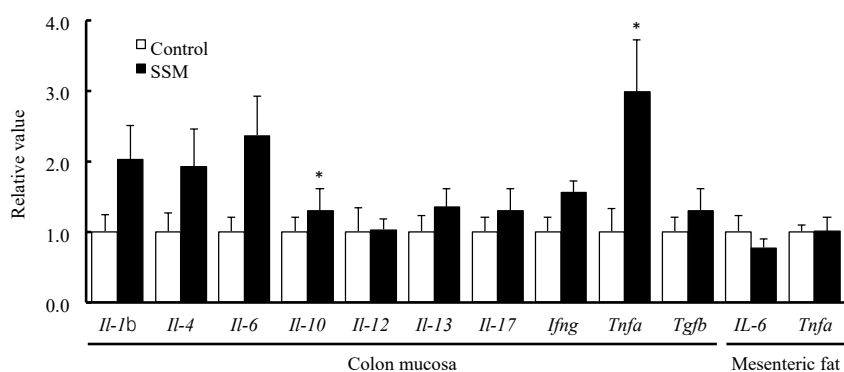


Figure 17 mRNA expression of various cytokines in the colon mucosa and mesenteric fat in rats fed a high fat diet containing 20% lard or high fat diet containing 12 g of SSM /kg for 21 d (Experiment 8).

Values are means \pm SEMs, $n = 6$. *Different from control ($p < 0.05$). SSM, skate-skin mucin.

第3節 DSS 誘発ラット大腸炎に及ぼす AM 増殖の影響

1) 実験動物および飼料組成

7週齢のWistar系雄ラットを日本エスエルシー(株)から購入し、室温 $23 \pm 1^\circ\text{C}$ 、照明管理 (7:00から19:00に点灯) のもと、底面が格子状のステンレスケージ内で個別に飼育した。搬入後ラットを7日間予備飼育した。予備飼育中は対照試料 (第1章・第5節と同一) を自由摂取により与えた。予備飼育終了後、体重を基準に各群に割り当てた。

I) Wistar系ラットにおけるDSS誘発大腸炎モデルの作成 (実験 9)

予備飼育後、32匹のラット (体重 $198 \pm 2 \text{ g}$ [平均値 \pm 標準誤差]) をそれぞれ各群 8匹の4群に分けた。対照飼料を自由摂取により7日間与えた。この間飲料水として 2.0%、3.5%あるいは 5.0% DSS (分子量, 36,000–50,000; MP biomedical, CA, USA) 溶液を与えることで、大腸炎を誘発させた。正常群に対照飼料と蒸留水を与えた。DSS投与期間中には体重減少率、糞便性状および血便を基準とした病態指標 (disease activity index, DAI) の評価を行った。飼育終了時、ラットをペントバルビタール麻酔下 (50 mg/kg) で断頭により致死させた。結腸を採取し組織重量およ

び全長を測定した。結腸組織を縦割きにし、片方をミエロペルオキシダーゼ (myeloperoxidase, MPO) 活性の分析に用いた。もう一方の組織を 10% 中性緩衝ホルマリン液 (pH 7.4, 富士フイルム和光純薬(株)) で固定した後、PAS染色に用いた。

II) DSS誘発ラット大腸炎に及ぼすAM 増殖の影響 (実験 10)

予備飼育終了後、32匹のラット (体重 165 ± 1 g [平均値 \pm 標準誤差]) をそれぞれ各群 8匹の 4群に分けた。ラットに水および対照飼料または 12 g/kgのSSMあるいはPSM添加飼料を自由摂取により 14日間与えた。SSMおよびPSMの添加を上記のように行った。途中 7日目から飲料水を 3% DSS溶液に切り替え、5日間与えた。次いで 2% DSS溶液に切り替えて 2日間与えることで、大腸炎を誘発させた。正常群に対照飼料と蒸留水を与えた。途中 0, 3, 7, 10日目に糞便AM 数を測定した。10日目に 1日分の糞便を採取し、ムチン残存量の測定に供した。DSS投与期間中、DAIの評価を行った。飼育終了時、ラットをイソフルラン麻酔下で、腹部大動脈から採血することで致死させ、第 2章と同様に血漿を分離してLPS およびLBPの測定に用いた。結腸を採取し組織重量および全長を測定した。結腸組織を縦割きにし、片方をMPO活性の分析に用いた。もう一方の組織の近位側から総RNAを単離し炎症性サイトカイン (*Tnf- α* , *Ifn- γ* および*Il-17*) ムチンおよびTJタンパク質関連遺伝子の発現量を測定した。遠位側の組織を 10% 中性緩衝ホルマリン液 (pH 7.4, 富士フイルム和光純薬(株)) で固定した後、PAS染色に用いた。盲腸を採取し重量を測定した。盲腸内容物についてAM 数, LPS濃度, 硫化水素濃度を測定した。近位結腸と遠位結腸の中間部の内容物を採取し、硫化水素濃度の測定に用いた。

2) 腹部大動脈血および盲腸内容物 LPS 濃度の測定

第 2 章・第 2 節と同様に行った。

3) 腹部第動脈血 LBP 濃度の測定

第 2 章・第 2 節と同様に行った。

4) 盲腸および結腸内容物硫化水素濃度の測定

第 2 章・第 2 節と同様に行った。

5) 盲腸および糞便の AM 数の測定

第 1 章・第 5 節と同様に行った。

6) 盲腸および結腸の遺伝子発現量の測定

第 1 章・第 5 節と同様に行った。

7) 糞便中ムチン量 (O-結合性糖鎖当量) の測定

第 1 章・第 5 節と同様に行った。

8) DAI の評価

DAI の評価は基本的に Murthy らの方法¹⁰⁷⁾に従い、一部改変して以下のように行なった。それぞれ独立した基準に従って体重減少率 (0 = None, 1 = 1–5%, 2 = 5–10%, 3 = 10–15%, 4 = > 15%), 糞便性状 (0 = ペレット状の糞便, 2 = 部分的に泥状の糞便, 4 = 全体的に水様便) および血便 (0 = 正常, 2 = 便の表面に血液が点状あるいは筋状にある, 4 = 便全体が血液で覆われている) をスコア化し、その合計を DAI として示した。

9) 結腸粘膜 MPO 活性の測定

結腸組織からの MPO の抽出および測定は Bradley らの方法¹⁰⁸⁾に準じて行った。盲腸組織をビーカーに入れ、氷上で細切した。これを 50 mL 容コニカルチューブ (ファルコン, Corning) に移し, これに 0.5% (w/v) ヘキサデシルトリメチルアンモニウム臭化物 (hexadecyltrimethylammonium bromide, HTAB) を含む 50 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH6.0) を組織重量 50 mg に対して 1 mL の割合で加えた。次いでポリトロン (PT3100, KINEMATICA) を用いてホモジナイズした後 (11,000 rpm, 4°C, 15 sec), ポリプロピレン製のメスシリンダーを用い, 0.5% (w/v) HTAB-リン酸カリウム緩衝液で 30 mL に定容した。この溶液 10 mL を別の 50 mL 容コニカルチューブ (ファルコン, Corning) に量り取り, -30°C で凍結させた。これを融解させ超音波洗浄機を用いて 2 分間超音波処理した後, ボルテックスミキサーを用いて攪拌した。凍結から攪拌までの一連の手順を合計で 3 回繰り返した後, 遠心分離した (20,000 × g, 4°C, 30 min)。この上清を酵素溶液とした。0.0005% (w/v) の過酸化水素を含む 0.167 mg/mL の *o*-ジアニシジン二塩酸塩 (Sigma) を含む 50 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH6.0) を基質溶液とした。酵素反応の測定を基質溶液 2.9 mL を石英セルに入れ, 酵素溶液 100 mL を量り入れ, 直ちに攪拌して行った (ポリプロピレン製の葉さじの上に 100 μL の酵素溶液を乗せ, 基質溶液の中に葉さじごと沈め, そのまま上下させることで攪拌した)。分光光度計のレートアッセイプログラムを用い, 460 nm における 30 秒間の吸光度変化を測定することで活性を測定した。MPO 活性の 1 unit を 1 分間で 1 μmol の過酸化水素を水に変換するのに必要な活性量として定義した。

10) 結腸上皮組織の形態観察

第 2 章・第 2 節と同様に切片の作成および PAS 染色を行った後、陰窩構造が残存する部位の細胞数および陰窩長を測定した。

11) 統計解析

DAI を除くデータを第 2 章・第 2 節の実験 5 と同様に解析した。DAI については反復測定分散分析 (repeated measures ANOVA) によって解析した。なお、実験 10 における統計処理については正常群を除いた 3 群間で行った。いずれの統計結果も、危険率が 5%未満のとき、有意とみなした。

結果

I) Wistar系ラットにおけるDSS誘発大腸炎モデルの作成 (実験 9)

DSS投与期間中の体重は 3.5%群でDSS投与 6日目、5.0%群で 5日目以降、対照群に対し有意な低値を示した (Fig. 18-A)。また、下痢スコアは 3.5%群ではDSS投与開始後 5日目、5.0%群では 3日目以降、飼育終了時まで対照群に比して有意な上昇が認められ、2.0%群で 7日目に対照群に比して高値を示した (Fig. 18-B)。血便スコアは 3.5%および 5.0%群でDSS投与開始後 4日目以降対照群に比べ有意な高値を示した (Fig. 18-C)。体重減少率、下痢、血便スコアの合計として示したDAIについて、3.5%群ではDSS投与開始後 4日目、5.0%群では 3日目以降飼育終了時まで対照群に比して有意な上昇が認められたが、2.0%群には対照群との間の差が認められなかった (Fig. 18-D)。結腸MPO活性および結腸相対重量はいずれも 3.5%および 5.0%群で有意な高値を示した (Fig. 19-A, B)。結腸MPO活性および結腸相対重量はいずれもDAIとの間に有意な相関が認められた (Fig. 19-C, D)。また、PAS染色像において陰窩構造が残存した部位につい

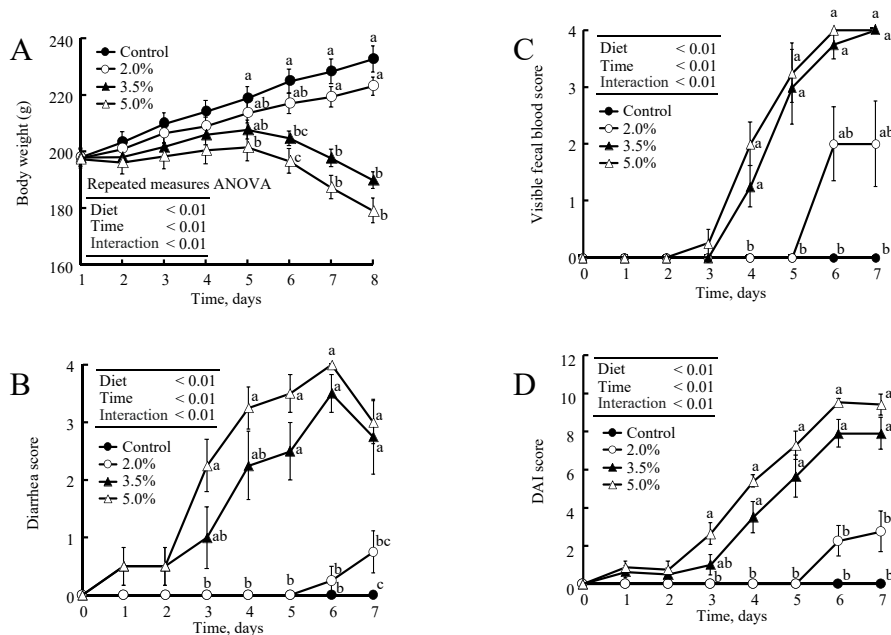


Figure 18 Body weight (A), scores for diarrhea (B), visible fecal blood (C) and disease activity index (D) in rats fed a control diet and administered water or dextran sulfate sodium for 7 d (2.0, 3.5 or 5.0% for 5 d and 2.0% for 2 d) (Experiment 9).

Values are means \pm SEMs, $n=8$.

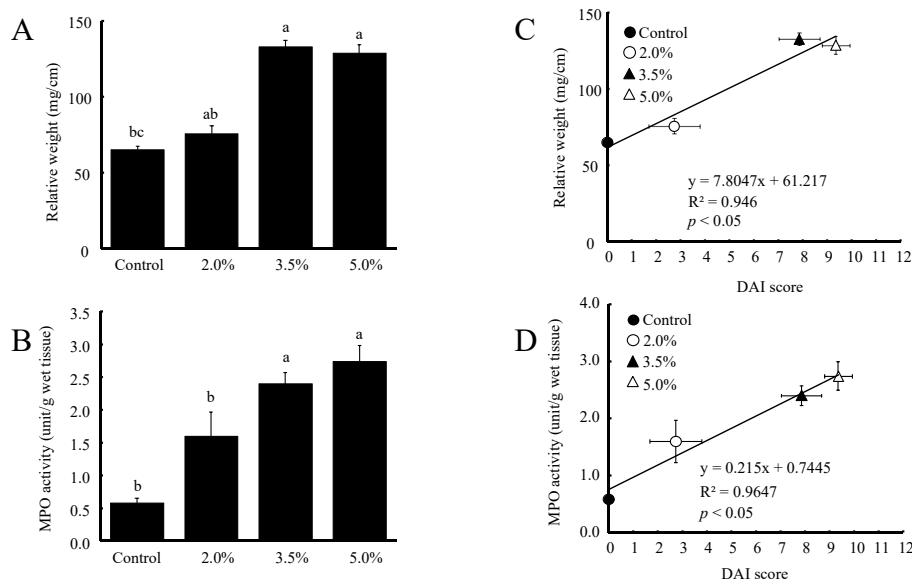


Figure 19 MPO activity (A) and relative weight (B) of colon and respective correlation between disease activity index (C, D) in rats fed a control diet and administered water or dextran sulfate sodium for 7 d (2.0, 3.5 or 5.0% for 5 d and 2.0% for 2 d) (Experiment 9).

Values are means \pm SEMs, $n = 8$. Values without a common superscript letter differ significantly ($p < 0.05$).

て陰窩長および陰窩の細胞数を計測したところ、いずれも対照群に比べ 3.5%および 5.0%群で有意な高値を示した (Fig. 20)。一方、陰窩構造が消失した部位は 2.0%群においても近位結腸では 4検体、遠位結腸では

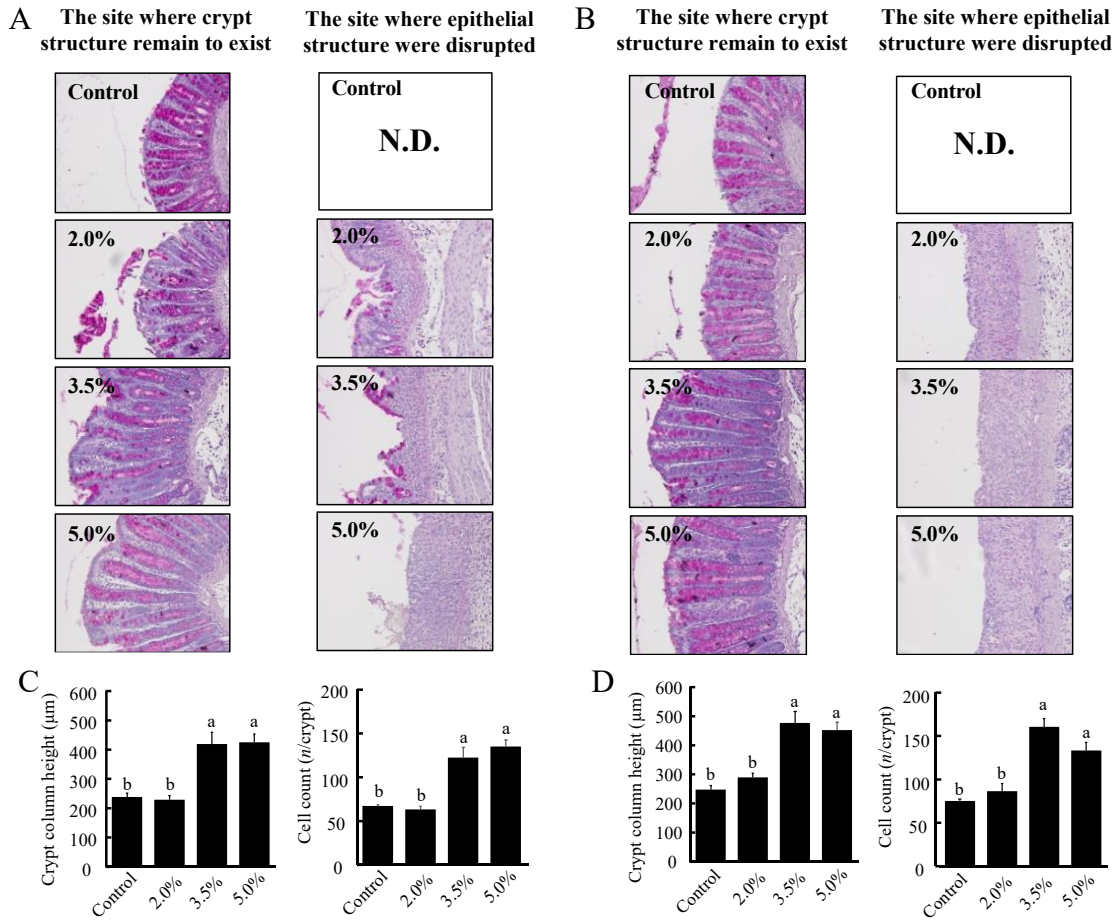
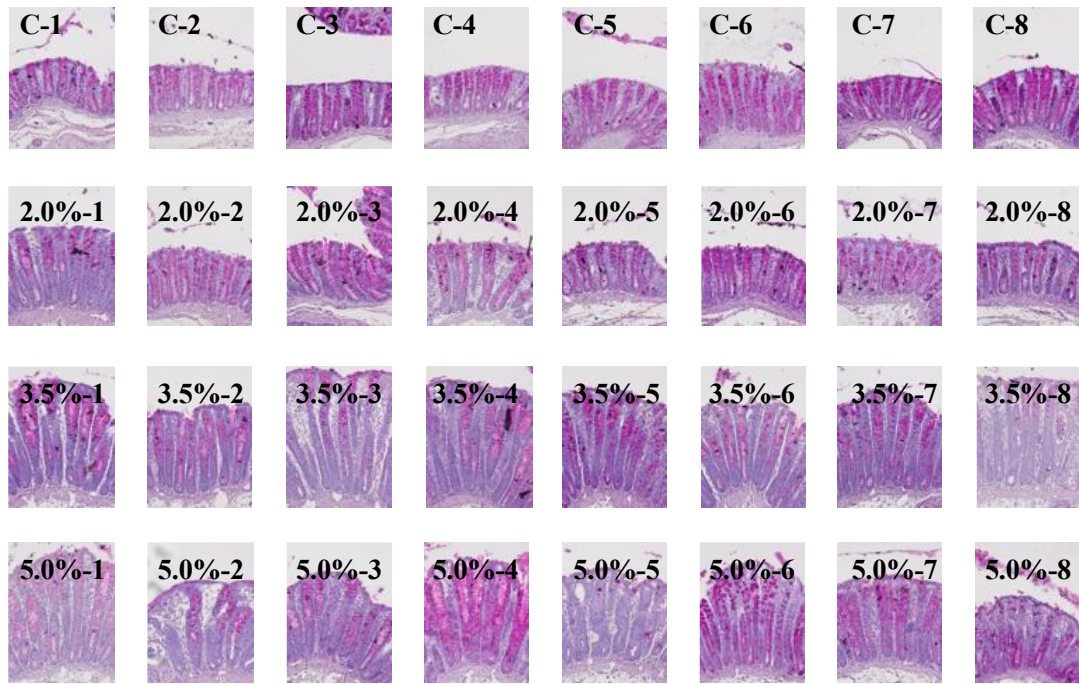


Figure 20 Thin sections stained with PAS of the proximal (A) and distal colon (B), crypt column height and cell count of the proximal (C) and distal colon (D) in rats fed control diet and administered water or dextran sulfate sodium for 7 d (2.0, 3.5 or 5.0% for 5 d and 2.0% for 2 d) (Experiment 9).

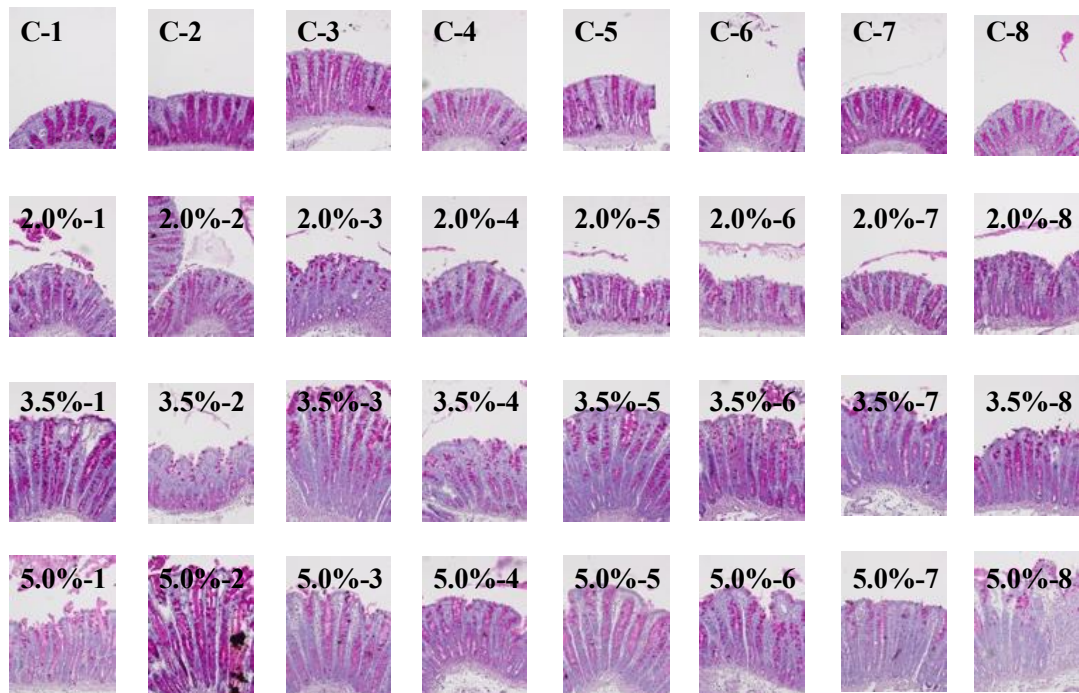
Values are means \pm SEMs, $n = 8$ (C, D). Magnification, $\times 100$. N.D., no data.

7検体で観察され、3.5%および5.0%群においては近位、遠位結腸のいずれもすべての検体で観察された (Fig. 21)。

A



B



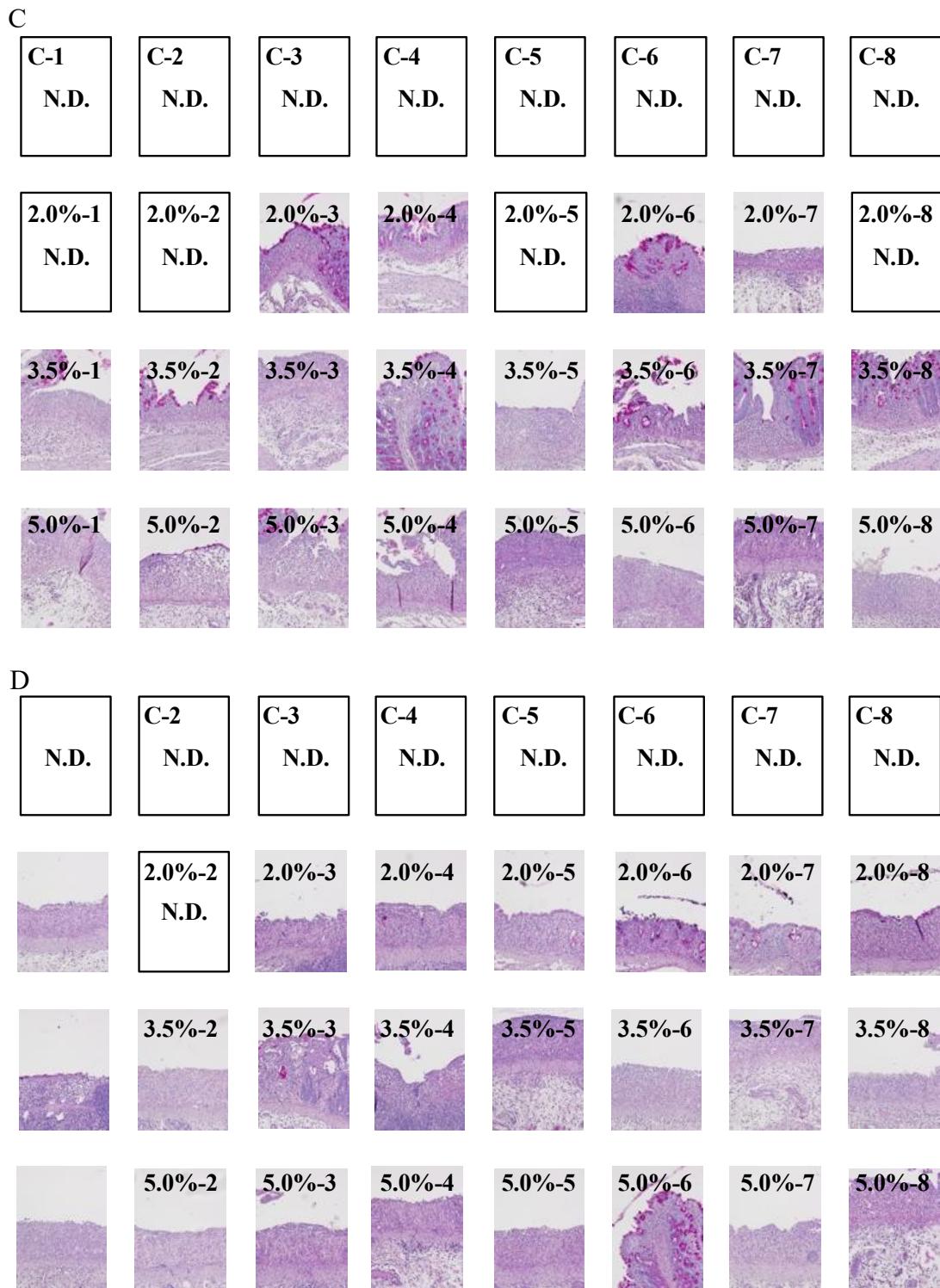


Figure 21 The sites where crypt structure remain to exist in colon thin sections of the proximal (A) and distal colon (B) and epithelial structure were disrupted in colon thin sections of the proximal (C) and distal colon (D) stained with PAS in rats fed control diet and administered water or dextran sulfate sodium for 7 d (2.0, 3.5 or 5.0% for 5 d and 2.0% for 2 d) (Experiment 9).

Numbers on the photos represent the animal number assigned in each group. Magnification, $\times 100$. N.D., no data.

II) DSS誘発ラット大腸炎に及ぼすAM 増殖の影響 (実験 10)

飼育開始 3日目においてSSM群で糞便AM 数の有意な上昇が認められた (Fig. 22-A)。その上昇はDSS投与開始から 3日目に相当する試験開始 10日目においても持続し、試験最終日の盲腸内容物においてもSSM群のAM 数が有意な高値を示した。また、DSS投与期間中のDAIは飼料の要因で有意差が認められたが、試験終了時のDAIはPSM群 (10.3 ± 0.8 [平均値 \pm 標準誤差]), 対照群 (9.4 ± 0.7) > SSM群 (8.3 ± 0.7) の順で、対照群とSSM群の間には有意差が認められなかった (Fig. 22-B)。飼育終了時の飼料摂取量、体重増加量および飲水量はいずれもDSSの投与によって低下したが、DSSを投与した 3群間に差が認められなかった (Table 13)。盲腸内容物LPS濃度がSSM群のみで対照群に対し有意な高値を示したが、血中LPS濃度に群間差は認められなかった。結腸相対重量およびMPO活性もDSSを投与した 3群間に差が認められなかった。また、盲腸および結腸内容物の硫化水素濃度において群間に差が認められなかった。結腸粘膜のミチン関連遺伝子発現量、TJタンパク質関連遺伝子および炎症性サイトカイ

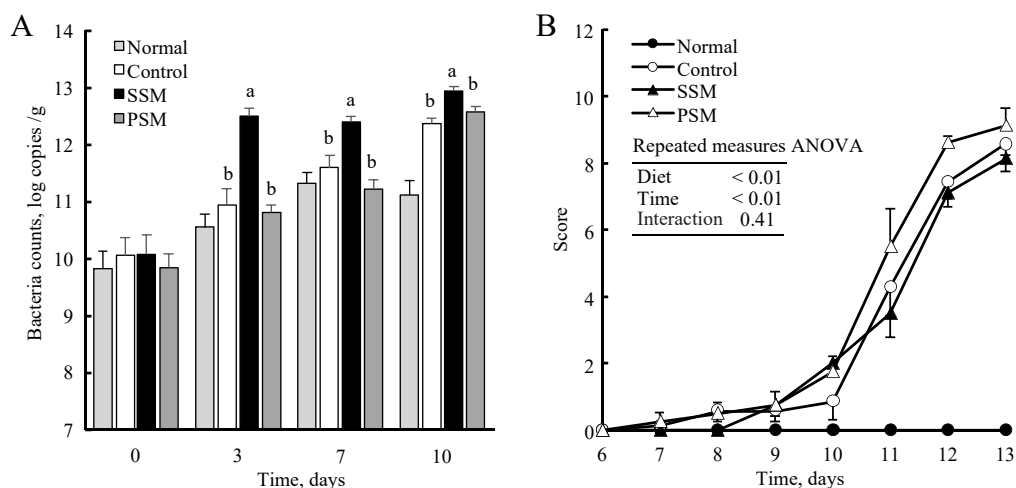


Figure 22 Fecal AM counts in feces (A), and DAI score (B) in male Wistar rats fed a control diet or a diet containing 12 g of SSM or PSM /kg diet for 14 d, and administered water (Normal) or DSS for last 7 d (3% for 5 d and 2% for 2 d) (Experiment 10).

Values are means \pm SEMs, $n = 8$. Values without a common superscript letter differ significantly ($p < 0.05$). Statistical analyses were carried out among 3 groups administered DSS. AM, *Akkermansia muciniphila*; DAI, disease activity index; DSS, dextran sulfate sodium; SSM, skate-skin mucin; PSM, porcine stomach mucin.

ンの発現量はいずれも有意な群間差が認められなかった。糞便 *O*-結合性糖鎖当量を基準としたムチン残存量はSSM群で有意な高値を示した。また、遠位結腸組織の残存する陰窩長および細胞数に有意差はなかった (Fig. 23, 各群の代表; Fig. 24, 検体ごと)。このようにいずれのDSS大腸炎症状にも有意差は認められなかった。

Table 13 Food intake, body weight gain, water consumption, colonic relative weight, and MPO activity in male Wistar rats fed a control diet or diet containing 12 g of SSM or PSM/kg diet for 14 d, and administered water (Normal) or DSS for last 7 d (3% for 5 d and 2% for 2 d) (Experiment 10)¹

	Normal	Control	SSM	PSM
Food intake ² (g)	29 ± 1	2 ± 4	4 ± 4	-8 ± 4
Body weight gain ² (g)	116 ± 2	82 ± 4	80 ± 4	72 ± 2
Water consumption ² (mL)	219 ± 14	119 ± 3	120 ± 4	118 ± 4
Plasma				
Lipopolysaccharides ³ (μg/g)	ND ⁵	1.00 (2)	0.68 ± 0.48 (3)	ND ⁵
LPS-binding protein ⁴ (μg/mL)	2.6 ± 0.1	13.5 ± 1.6	9.4 ± 1.6	10.9 ± 1.0
Cecum				
Lipopolysaccharides (μg/g)	3.4 ± 1.0	22.6 ± 4.4 ^b	58.5 ± 8.8 ^a	37.6 ± 5.9 ^{ab}
Hydrogen sulfide (μmol /g)	4.65 ± 0.06	0.75 ± 0.17 (n=5)	1.16 ± 0.2 (n=7)	0.86 ± 0.29 (n=5)
<i>A. muciniphila</i> (log copies /g)	11.6 ± 0.2	11.4 ± 0.2 ^b	12.3 ± 0.1 ^a	11.6 ± 0.2 ^b
Colon				
Relative weight (mg/cm)	60 ± 3	117 ± 6	125 ± 5	123 ± 5
MPO ⁵ activity (unit/mg protein)	0.55 ± 0.12	2.41 ± 0.27	2.11 ± 0.16	2.17 ± 0.21
Hydrogen sulfide (μmol /g)	2.59 ± 0.07	0.47 ± 0.11 (n=7)	0.74 ± 0.14 (n=8)	0.50 ± 0.13 (n=8)
Gene expression (relative value, fold of control)				
<i>Muc2</i>	-	1.00 ± 0.09	1.06 ± 0.14	0.85 ± 0.05
<i>Muc3</i>	-	1.00 ± 0.09	1.07 ± 0.17	1.39 ± 0.22
<i>Claudin3</i>	-	1.00 ± 0.19	1.96 ± 0.47	1.96 ± 0.35
<i>Zonula occludens1</i>	-	1.00 ± 0.15	1.34 ± 0.21	1.22 ± 0.15
<i>Occludin</i>	-	1.00 ± 0.10	1.04 ± 0.12	1.18 ± 0.11
<i>TNF-α</i>	-	1.00 ± 0.11	1.29 ± 0.22	1.21 ± 0.19
<i>IFN-γ</i>	-	1.00 ± 0.40	2.63 ± 1.30	2.01 ± 0.75
<i>IL-17</i>	-	1.00 ± 0.55	5.45 ± 4.12	7.35 ± 3.79
Feces				
<i>O</i> -Glycans (μmol/g)	1.31 ± 0.13	3.31 ± 0.24 ^b	10.04 ± 0.68 ^b	3.98 ± 0.26 ^a

¹Values are means ± SEMs; n = 8. Statistical analyses were carried out among 3 groups administered DSS. Means in a row not labeled with a common letter differ significantly (*p* < 0.05). DSS, dextran sulfate sodium; SSM, skate-skin mucin; PSM, porcine stomach mucin.

²For the last 7 days, after DSS administration.

³Data represent means and the number of detected in the parenthesis.

⁴Lipopolysaccharide-binding protein.

⁵ND, not detected.

⁶Myeloperoxidase.

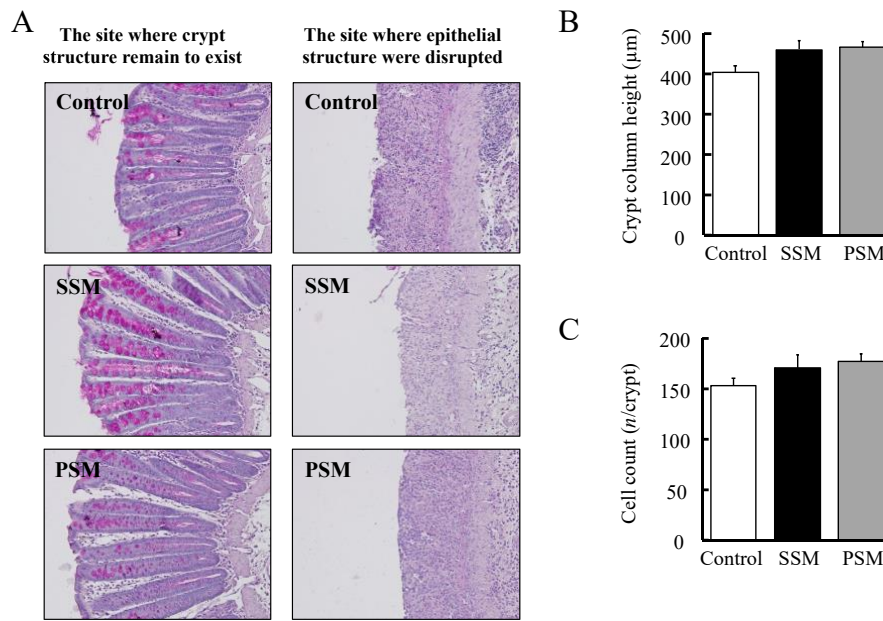


Figure 23 Thin sections of the distal colon stained with PAS (A), crypt column height (B) and cell count of the colon (C) in rats fed a control diet or diet containing 12 g of SSM or PSM /kg for 14 d (Experiment 10).

Values are means \pm SEMs, $n = 8$ (B, C). Magnification, $\times 100$. SSM, skate-skin mucin; PSM, porcine stomach mucin.

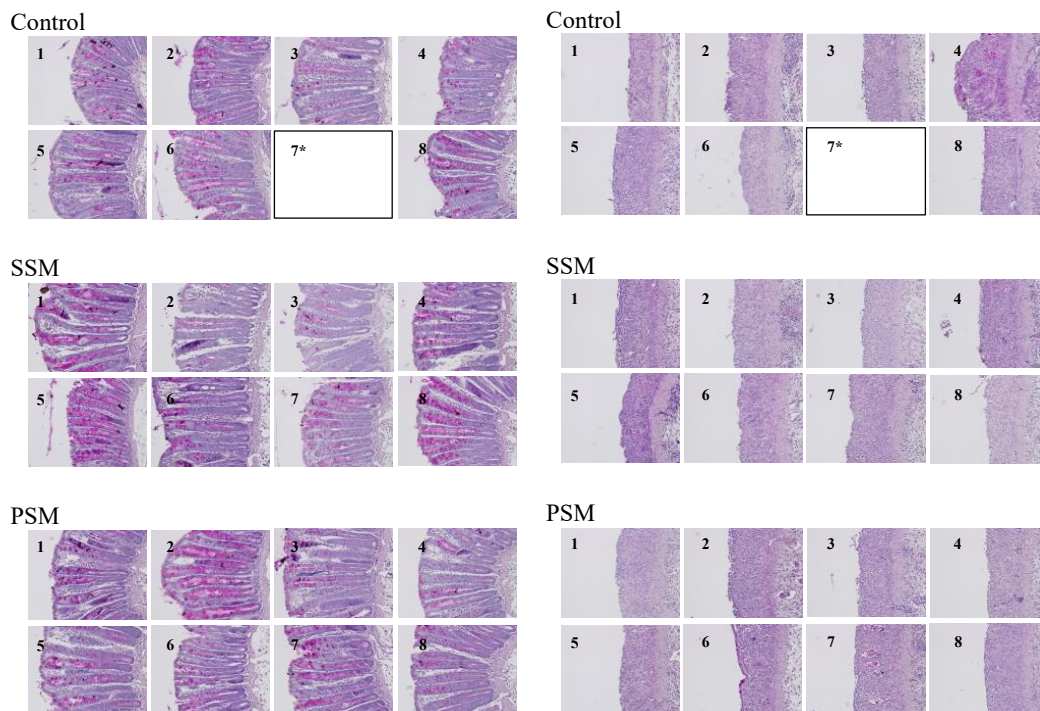


Figure 24 The sites where crypt structure remain to exist (A) and epithelial structure were disrupted (B) in colon thin sections of the distal colon stained with PAS in rats fed a control diet or diet containing 12 g of SSM or PSM /kg for 14 d, and administered water (Normal) or DSS for last 7 d (3% for 5 d and 2% for 2 d) (Experiment 10).

Numbers on the photos represent the animal number assigned in each group. Magnification, $\times 100$. SSM, skate-skin mucin; PSM, porcine stomach mucin.

*The rat was dead during DSS administration.

第4節 考察

本章ではラットにおける SSM 摂取による AM 増殖が耐糖能および DSS 大腸炎におよぼす影響を解析した。

実験 7 では健常ラットに SSM を添加した飼料を 8 週間摂取させ、SSM 摂取が健常ラットの耐糖能に及ぼす影響を評価した。その結果、8 週間の SSM 摂取によって盲腸内容物の AM 数が有意に増加したが、血中グルコースおよびインスリン応答への影響は認められなかった。一方、実験 8 ではラードを 20% 添加し脂質を計 25% 含む高脂肪食に SSM を添加した飼料をラットに摂取させることで、高脂肪食摂取時の AM 増殖による影響を解析した。その結果、血中グルコース応答に違いはないものの、血中インスリン濃度の AUC は SSM 添加飼料の摂取によりむしろ有意に増加した。従来、AM 製剤の投与による C57BL/6 (J) マウスでの肥満、糖尿病改善効果は 10^8 – 10^9 cfu/day の投与用量で報告されたのに対し^{25) 26)}、本試験での SSM 摂取による盲腸および糞便 AM 数は 10^{12} – 10^{13} copies/g に達した。したがって、本試験においても、AM の大腸プールサイズは先の報告と同様に十分に上昇していたと推察される。実験 8 における血中インスリン濃度の AUC が増加した原因は現時点ではわからない。しかしながら、結腸組織ではインスリン抵抗性を惹起する *Tnfa* の上昇が認められたことから、TNF- α が血中および末梢組織に到達した結果、代償的にインスリン分泌が高まった可能性がある。いずれにしても、これまでマウスを用いた実験で報告されてきた AM 増殖による耐糖能改善効果は少なくともラットにおいては認められなかった。

実験 7 では *n*-酪酸、実験 8 ではプロピオン酸が SSM の摂取により有意な高値を示した。従来、AM による肥満、糖尿病改善効果の作用機序は、AM の代謝産物によると考えられてきた。すなわち、粘膜近傍に存在する AM によって産生された酪酸やプロピオン酸といった SCFA による杯

細胞のムチン産生促進^{32) 73) 109)}が、高脂肪食によって低下した腸管バリア機能とメタボリックエンドトキセミアを改善することで、肥満、糖尿病病態が改善すると考えられていた³⁾。しかしながら、実験 7 および 8 のいずれにおいてもムチン関連遺伝子発現量および結腸ムチン層の厚さに差が認められず、少なくともラットにおいては *AM* の増殖に伴う SCFA 濃度上昇が腸管バリア機能の促進をもたらすには至らないことが明らかになった。

実験 7 および 8 のいずれにおいても TJ タンパク質発現量に群間差は認められず、クロム-EDTA 錯体の尿中排泄率を基準とした腸管透過性にも差が認められなかった。Plovier ら²⁶⁾は、*AM* による肥満、糖尿病改善効果が *AM* 低温殺菌製剤の投与によっても認められることから、肥満、糖尿病改善効果には SCFA に加え、*AM* の菌体成分が関与すると提唱している。彼らは、*AM* の菌体外膜に蓄積されるタンパク質である Amuc_1100 が、ヒト TLR2 のリガンド活性を持つこと、高脂肪食への *AM* または Amuc_1100 の添加は C57/BL6 (J)マウスのインスリン感受性を改善し、このとき TJ タンパク質発現が促進していることを示した。本試験では TLR2 シグナルは測定していないが、結腸粘膜での *Tnfa* の有意な発現上昇を実験 8 で確認している。*Tnfa* は TLR2 の活性化によって発現が上昇する遺伝子として¹¹⁰⁾、TJ タンパク質とともに最もよく知られている遺伝子のひとつである¹¹¹⁾。したがって、本試験においても TLR2 が活性化していた可能性はあるが、少なくともラットにおいては *AM* の増加によって TJ タンパク質発現が促進されないことが明らかになった。

なお、第 1 章に示したように SSM は他のムチンに比して高濃度の硫酸基を有し、SSM の摂取はヒトの主要な硫酸還元菌である *Desulfovibrio desulfuricans* の占有率を有意に上昇させることから、SSM の摂取が消化管内において硫化水素濃度を上昇させると予測し測定を行った。消化管管腔

内での硫化水素濃度の上昇は消化管ムチン層を分解することで炎症を惹起する可能性があり¹¹²⁾、AMの増加とは無関係に腸管バリア機能に影響を与える可能性があるためである。しかしながら、本試験では盲腸および結腸のいずれにも硫化水素濃度に群間差が認められなかった。したがって、本試験における*Tnfa*発現上昇の原因は少なくともSSMの摂取による硫化水素濃度の上昇ではないと考えられる。

以上、SSM摂取によるAM増殖がラット耐糖能に及ぼす影響をまとめると、SSM摂取は健常ラットでは中性であり、高脂肪食を摂取させたラットにおいてはむしろ肥満病態の軽度な悪化を招くのかかもしれない。ただし、血中グルコース応答や副睾丸周囲脂肪重量について群間差が認められなかったことから、実質的な肥満病態に差はないと考えられる。SSM摂取による炎症惹起の原因特定は今後の検討課題である。

さらに本章ではDSS誘発ラット大腸炎に対するSSM摂取の影響についても検討した。実験9では2.0, 3.5, 5.0%のDSS溶液を飲料水として与え、Wistar系ラットにおけるDSSの至適濃度を探った。DSSの投与によって下痢、血便、体重減少、結腸相対重量およびMPO活性の上昇が認められたが、これらの指標について対照群に対し有意差が認められたのは3.5%以上のDSSを投与した2群であった。下痢、血便、体重減少を基準としたDAIと結腸MPO活性およびDAIと結腸相対重量の間には有意な相関が認められ、本試験におけるDAIが大腸の炎症を正當に反映することを確認した。また、組織学的には結腸上皮の部分的な陰窩構造の消失が認められた。従来、DSSの投与によって上皮組織の過形成が生ずることが報告されたが¹¹³⁾、本試験においても3.5%以上のDSSを投与した2群では、残存する陰窩長およびその細胞数が対照群に対し有意な高値を示した。DSS大腸炎の病態形成はDSSの濃度および分子量や使用する動物の系統などによって影響を受ける¹⁰⁵⁾。実験9の結果からWistar系ラッ

トにおける SSM の摂取による DSS 誘発大腸炎への影響の評価 (実験 10) には 3.0% の DSS 溶液を用いることとした。実験 10 の結果、SSM 摂取は DSS 投与期間中においても AM 数を有意に上昇させたにも関わらず、SSM 摂取は、DSS 大腸炎の症状には SSM 摂取による影響が認められなかった。これらの結果から、SSM 摂取による AM 増殖は DSS 誘発ラット大腸炎に対して影響を及ぼさないと結論付けた。

これまでに報告されてきた AM による肥満、糖尿病および炎症性腸疾患改善作用はいずれも特定の系統のマウス [C57BL/6 (J)] を用いた実験において報告されてきた。C57BL/6 (J) マウスは代謝に関わる研究に広く利用されてきたが、近年、このマウスは他の系統と異なる代謝的および免疫学的特徴を有することが指摘されるようになった^{42) 114-116)}。本試験と関連する点においても、糖質代謝系ではホルモンおよび転写調節因子レベルで、DSS 大腸炎においてもサイトカイン発現量レベルおよび組織学的レベルでの応答が他の系統のマウスに比べて C57BL/6 (J) マウスでは明らかに異なり、病態を発症しやすく、また、劇症化しやすいという報告がある¹¹⁴⁾。本研究の結果、少なくとも健常ラットにおいて SSM 摂取による AM 増殖が生理的に中性であることが明らかになった。これまで報告されてきた AM の有用性はマウスの系統や高脂肪食に依存的で、且つ激しい病態時においてのみ観察されるのかもしれない。これまでに健常な動物、特に代謝に関する研究において多用される C57BL/6 (J) マウスの健常時において AM の影響を検討した報告はほとんどない。同マウスに SSM を摂取させ、健常 C57BL/6 (J) マウスにおける AM 増殖による耐糖能および DSS 大腸炎に対する影響を検討することが、AM による肥満、糖尿病および炎症性腸疾患改善効果、ならびに動物実験における動物種の選択についての重要な知見を提供しうると考える。

総括

Akkermansia muciniphila (AM) は、ヒトの腸内に生息するムチン分解菌である。AM は前臨床だけでなく臨床試験からも肥満、糖尿病および炎症性腸疾患を改善する次世代の有用微生物として期待されてきた。しかしながら、AM は元来、ムチンを唯一の炭素および窒素源とする培地で増殖可能な菌として 2004 年に発見された嫌気性菌であり、その後の解析から AM がその増殖に *N*-アセチルグルコサミン (*N*-acetylglucosamine, GlcNAc) およびスレオニン (threonine, Thr) の供給を必要とすることから、AM を標的としたプレバイオティクスの開発は困難であると考えられてきた。AM が発酵基質として利用するムチンは、Thr を含むアミノ酸の繰り返しドメインを主体として構成されるコアタンパク質に *N*-アセチルガラクトサミンを起点として、オリゴ糖鎖が結合した糖タンパク質で、糖鎖末端にはフコース、シアル酸あるいは硫酸化糖を配している。細菌によるムチン分解は通常、糖鎖末端から進行するが、特にムチン糖鎖末端の硫酸化糖の割合 (硫酸化糖キャッピング比率) の高さが、ムチンの基質としての利用速度を制限する要因であることが、これまでに推定されていた。一方で、AM は硫酸化糖の除去に必要なサルファターゼを高発現することが報告された。したがって、硫酸化糖キャッピング比率の高いムチンが AM に対して Thr および GlcNAc を独占的に供給することで AM の選択的な増殖を可能にするのではないかとの仮説を立て、これを検討した。

第 1 章ではガンギエイ目のメガネカスベ (mottled skate, *Raja pulchra*) の体表から調製したムチン (skate-skin mucin, SSM) , ブタ胃粘膜ムチン (porcine stomach mucin, PSM) およびラット糞便由来ムチン (rat gastrointestinal mucin, RGM) をプレバイオティクスの候補として検討した。硫酸化糖キャッピング比率が SSM では PSM および RGM に比べ 2 倍以上、Thr 含量が 1.5 倍以上であった。また従来 of 報告同様、ラット新鮮

便を酵素源とした *in vitro* ムチン分解 (ムシナーゼ) 活性が SSM では PSM および RGM に比べ、顕著に低値を示した。これらのムチン素材をラットに摂取させたところ上述の仮説の通り、ラットにおける SSM 摂取が盲腸内 AM 数を顕著に上昇させることを見出した。さらに培養装置 (ジャーファーメンター) を用い、SSM および PSM を添加した培地中でヒト糞便を用いた嫌気培養試験を行ったところ、SSM の添加によって AM 数が有意に上昇した。これらの結果から、SSM はラットおよびヒト大腸において Thr および GlcNAc を独占的に供給することで AM を選択的に増殖させることが示された。

第 2 章では、SSM による AM 増殖が健常ラットの大腸生理に及ぼす影響の解析を目的とした。健常ラットにおける、SSM 摂取による AM 増殖は結腸ムチン層の厚さをむしろ有意に薄層化 (40%以上) させた。糞便の体積および重量には差が認められなかったことから、SSM の摂取はムチン層の厚さを本質的に低下させることが明らかになった。一方、腸管透過性に関わる、血中 LPS、LBP 濃度やクロム-EDTA 錯体の経口投与時における尿中排泄率には群間差が認められなかった。また、AM が Treg を増加させることが報告されたが盲腸および結腸のいずれも Treg 比率に有意差が認められなかった。このように、SSM 摂取による AM 増殖は少なくとも健常ラットにおいて結腸ムチン層を薄層化させるが、腸管透過性には影響を与えないことが明らかになった。

第 3 章では、SSM 摂取による AM 増殖が肥満、糖尿病ならびに炎症性腸疾患に及ぼす影響を検討した。本試験の結果、8 週間の SSM 長期摂取時においても AM 数を有意に上昇させた。しかしながら、少なくとも健常ラットでは血中グルコース応答およびインスリン応答に群間差が認められず、腸管透過性の各指標にも差が認められなかった。一方、高脂肪食を摂取させたラットでは SSM の摂取はむしろインスリン分泌を増加さ

せ、結腸のいくつかのサイトカイン発現量を上昇させた。また、炎症性腸疾患モデルとして、DSS 投与によって大腸炎を惹起させたラットに対する SSM 摂取は DSS 誘発大腸炎の代表的な症状である、体重減少、糞便性状および血便をはじめ腸管透過性にも影響を与えなかった。このように SSM 摂取による AM 増殖は少なくともラットでは耐糖能および炎症性腸疾患改善作用を示さないとの結論に至った。

これまでに報告されてきた AM による肥満、糖尿病および炎症性腸疾患改善作用はいずれも特定の系統のマウス [C57BL/6 (J)] において報告されてきた。C57BL/6 マウスは糖尿病や食事性肥満を発症しやすいことから代謝に関わる研究に多用されてきたが、この系統のマウスは代謝および免疫反応において他の系統と異なる性質を有することが明らかにされている。本研究では SSM による AM 増殖が宿主に及ぼす影響を、ラットを用いて検討したが、SSM の摂取は少なくともラットにおいて生理学的に中性であることが示された。動物モデルを用いた病理学的研究では動物の系統による違いを考慮する必要性があり、今後の検討課題として、C57BL/6 (J) マウスにおける SSM 摂取が宿主に及ぼす影響を検討することが、宿主と AM との共進化の関係や、AM の腸管における潜在的機能を明らかにする上で重要な知見を提供すると考える。

引用文献

- 1) Derrien M., Vaughan E. E., Plugge C. M., de Vos W. M. (2004) *Akkermansia muciniphila* gen. nov., sp. nov., a human intestinal mucin-degrading bacterium. *Int J Syst Evol Microbiol* 54: 1469-76.
- 2) Derrien M., Belzer C., de Vos W. M. (2017) *Akkermansia muciniphila* and its role in regulating host functions. *Microb Pathog* 106: 171-81.
- 3) Belzer C., de Vos W. M. (2012) Microbes inside--from diversity to function: the case of *Akkermansia*. *ISME J* 6: 1449-58.
- 4) De Vos W. M. (2017) Microbe Profile: *Akkermansia muciniphila*: a conserved intestinal symbiont that acts as the gatekeeper of our mucosa. *Microbiology (Reading)* 163: 646-48.
- 5) Dao M. C., Everard A., Aron-Wisnewsky J., Sokolovska N., Prifti E., Verger E. O., Kayser B. D., Levenez F., Chilloux J., Hoyles L., Dumas M. E., Rizkalla S. W., Doré J., Cani P. D., Clément K. (2016) *Akkermansia muciniphila* and improved metabolic health during a dietary intervention in obesity: relationship with gut microbiome richness and ecology. *Gut* 65: 426-36.
- 6) Marcobal A., Southwick A. M., Earle K. A., Sonnenburg J. L. (2013) A refined palate: bacterial consumption of host glycans in the gut. *Glycobiology* 23: 1038-46.
- 7) Milewski S. (2002) Glucosamine-6-phosphate synthase--the multi-facets enzyme. *Biochim Biophys Acta* 1597: 173-92.
- 8) Van der Ark K. C. H., Aalvink S., Suarez-Diez M., Schaap P. J., de Vos W. M., Belzer C. (2018) Model-driven design of a minimal medium for *Akkermansia muciniphila* confirms mucus adaptation. *Microb Biotechnol* 11: 476-85.

- 9) Ottman N., Davids M., Suarez-Diez M., Boeren S., Schaap P. J., Martins Dos Santos V. A. P., Smidt H., Belzer C., de Vos W. M. (2017) Genome-scale model and omics analysis of metabolic capacities of *Akkermansia muciniphila* reveal a preferential mucin-degrading lifestyle. *Appl Environ Microbiol* 83.
- 10) Debabov V. G. (2003) The threonine story. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 79: 113-36.
- 11) Moye Z. D., Burne R. A., Zeng L. (2014) Uptake and metabolism of N-acetylglucosamine and glucosamine by *Streptococcus mutans*. *Appl Environ Microbiol* 80: 5053-67.
- 12) Postma P. W., Lengeler J. W., Jacobson G. R. (1993) Phosphoenolpyruvate:carbohydrate phosphotransferase systems of bacteria. *Microbiol Rev* 57: 543-94.
- 13) Ndeh D., Gilbert H. J. (2018) Biochemistry of complex glycan depolymerisation by the human gut microbiota. *FEMS Microbiol Rev* 42: 146-64.
- 14) Clinch K., Evans G. B., Furneaux R. H., Rendle P. M., Rhodes P. L., Robertson A. M., Rosendale D. I., Tyler P. C., Wright D. P. (2002) Synthesis and utility of sulfated chromogenic carbohydrate model substrates for measuring activities of mucin-desulfating enzymes. *Carbohydr Res* 337: 1095-111.
- 15) 河合 恵里佳 (2016) 宿主と腸内細菌との相利共生関係に及ぼす消化管ムチンの役割に関する研究.
- 16) 源田 知美 (2017) フラクトオリゴ糖摂取時の盲腸 IgA 分泌応答と腸管透過性および粘膜炎症との関連性に関する研究.

- 17) Ouwerkerk J. P., de Vos W. M., Belzer C. (2013) Glycobiome: bacteria and mucus at the epithelial interface. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 27: 25-38.
- 18) Ottman N., Geerlings S. Y., Aalvink S., de Vos W. M., Belzer C. (2017) Action and function of *Akkermansia muciniphila* in microbiome ecology, health and disease. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 31: 637-42.
- 19) Van Passel M. W., Kant R., Zoetendal E. G., Plugge C. M., Derrien M., Malfatti S. A., Chain P. S., Woyke T., Palva A., de Vos W. M., Smidt H. (2011) The genome of *Akkermansia muciniphila*, a dedicated intestinal mucin degrader, and its use in exploring intestinal metagenomes. *PLoS One* 6: e16876.
- 20) Ottman N., Reunanen J., Meijerink M., Pietila T. E., Kainulainen V., Klievink J., Huuskonen L., Aalvink S., Skurnik M., Boeren S., Satokari R., Mercenier A., Palva A., Smidt H., de Vos W. M., Belzer C. (2017) Pili-like proteins of *Akkermansia muciniphila* modulate host immune responses and gut barrier function. *PLoS One* 12: e0173004.
- 21) Derrien M., van Passel M. W., van de Bovenkamp J. H., Schipper R. G., de Vos W. M., Dekker J. (2010) Mucin-bacterial interactions in the human oral cavity and digestive tract. *Gut Microbes* 1: 254-68.
- 22) 浅川 牧夫 (1996) 魚類体表面粘質物の生体防御における役割:ウナギシアル酸含有糖タンパク質の構造と機能. *日本水産学会誌* 62: 291-92.
- 23) Nakagawa Hiroki, Asakawa Makio, Enomoto Noriyuki (1988) Diversity in the carbohydrate moieties of mucus glycoproteins of various fishes. *NIPPON SUISAN GAKKAISHI* 54: 1653-58.

- 24) Everard A., Lazarevic V., Derrien M., Girard M., Muccioli G. G., Neyrinck A. M., Possemiers S., Van Holle A., François P., de Vos W. M., Delzenne N. M., Schrenzel J., Cani P. D. (2011) Responses of gut microbiota and glucose and lipid metabolism to prebiotics in genetic obese and diet-induced leptin-resistant mice. *Diabetes* 60: 2775-86.
- 25) Everard A., Belzer C., Geurts L., Ouwerkerk J. P., Druart C., Bindels L. B., Guiot Y., Derrien M., Muccioli G. G., Delzenne N. M., de Vos W. M., Cani P. D. (2013) Cross-talk between *Akkermansia muciniphila* and intestinal epithelium controls diet-induced obesity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110: 9066-71.
- 26) Plovier H., Everard A., Druart C., Depommier C., Van Hul M., Geurts L., Chilloux J., Ottman N., Duparc T., Lichtenstein L., Myridakis A., Delzenne N. M., Klievink J., Bhattacharjee A., van der Ark K. C., Aalvink S., Martinez L. O., Dumas M. E., Maiter D., Loumaye A., Hermans M. P., Thissen J. P., Belzer C., de Vos W. M., Cani P. D. (2017) A purified membrane protein from *Akkermansia muciniphila* or the pasteurized bacterium improves metabolism in obese and diabetic mice. *Nat Med* 23: 107-13.
- 27) Yoon H. S., Cho C. H., Yun M. S., Jang S. J., You H. J., Kim J. H., Han D., Cha K. H., Moon S. H., Lee K., Kim Y. J., Lee S. J., Nam T. W., Ko G. (2021) *Akkermansia muciniphila* secretes a glucagon-like peptide-1-inducing protein that improves glucose homeostasis and ameliorates metabolic disease in mice. *Nat Microbiol* 6: 563-73.
- 28) Bian Xiaoyuan, Wu Wenrui, Yang Liya, Lv Longxian, Wang Qing, Li Yating, Ye Jianzhong, Fang Daiqiong, Wu Jingjing, Jiang Xianwan, Shi Ding, Li Lanjuan (2019) Administration of *Akkermansia muciniphila*

- ameliorates dextran sulfate sodium-induced ulcerative colitis in mice. *Frontiers in Microbiology* 10.
- 29) Liu Q., Lu W., Tian F., Zhao J., Zhang H., Hong K., Yu L. (2021) *Akkermansia muciniphila* exerts strain-specific effects on DSS-induced ulcerative colitis in mice. *Front Cell Infect Microbiol* 11: 698914.
 - 30) Kang C. S., Ban M., Choi E. J., Moon H. G., Jeon J. S., Kim D. K., Park S. K., Jeon S. G., Roh T. Y., Myung S. J., Gho Y. S., Kim J. G., Kim Y. K. (2013) Extracellular vesicles derived from gut microbiota, especially *Akkermansia muciniphila*, protect the progression of dextran sulfate sodium-induced colitis. *PLoS One* 8: e76520.
 - 31) Tsukahara T., Iwasaki Y., Nakayama K., Ushida K. (2003) Stimulation of butyrate production in the large intestine of weaning piglets by dietary fructooligosaccharides and its influence on the histological variables of the large intestinal mucosa. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 49: 414-21.
 - 32) Gaudier E., Rival M., Buisine M. P., Robineau I., Hoebler C. (2009) Butyrate enemas upregulate Muc genes expression but decrease adherent mucus thickness in mice colon. *Physiol Res* 58: 111-19.
 - 33) Chooi Y. C., Ding C., Magkos F. (2019) The epidemiology of obesity. *Metabolism* 92: 6-10.
 - 34) Kaplan G. G., Ng S. C. (2017) Understanding and preventing the global increase of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 152: 313-21.e2.
 - 35) Cani P. D., de Vos W. M. (2017) Next-generation beneficial microbes: the case of *Akkermansia muciniphila*. *Front Microbiol* 8: 1765.
 - 36) Anhê F. F., Roy D., Pilon G., Dudonné S., Matamoros S., Varin T. V., Garofalo C., Moine Q., Desjardins Y., Levy E., Marette A. (2015) A

- polyphenol-rich cranberry extract protects from diet-induced obesity, insulin resistance and intestinal inflammation in association with increased *Akkermansia spp.* population in the gut microbiota of mice. *Gut* 64: 872-83.
- 37) Roopchand D. E., Carmody R. N., Kuhn P., Moskal K., Rojas-Silva P., Turnbaugh P. J., Raskin I. (2015) Dietary polyphenols promote growth of the gut bacterium *Akkermansia muciniphila* and attenuate high-fat diet-induced metabolic syndrome. *Diabetes* 64: 2847-58.
- 38) Masumoto S., Terao A., Yamamoto Y., Mukai T., Miura T., Shoji T. (2016) Non-absorbable apple procyanidins prevent obesity associated with gut microbial and metabolomic changes. *Sci Rep* 6: 31208.
- 39) Liu T. W., Cephas K. D., Holscher H. D., Kerr K. R., Mangian H. F., Tappenden K. A., Swanson K. S. (2016) Nondigestible fructans alter gastrointestinal barrier function, gene expression, histomorphology, and the microbiota profiles of diet-induced obese C57BL/6J mice. *J Nutr* 146: 949-56.
- 40) Everard A., Lazarevic V., Gaïa N., Johansson M., Ståhlman M., Backhed F., Delzenne N. M., Schrenzel J., François P., Cani P. D. (2014) Microbiome of prebiotic-treated mice reveals novel targets involved in host response during obesity. *Isme j* 8: 2116-30.
- 41) Liu C., Hu B., Cheng Y., Guo Y., Yao W., Qian H. (2021) In-depth analysis of the mechanisms of aloe polysaccharides on mitigating subacute colitis in mice via microbiota informatics. *Carbohydr Polym* 265: 118041.
- 42) Appiakannan H. S., Rasimowicz M. L., Harrison C. B., Weber E. T. (2020) Differential effects of high-fat diet on glucose tolerance, food

- intake, and glucocorticoid regulation in male C57BL/6J and BALB/cJ mice. *Physiol Behav* 215: 112773.
- 43) 猪 貴義 (1992) 動物実験法概論. 朝倉書店.
 - 44) 厚生労働省 (2019) 令和元年国民健康・栄養調査報告.
 - 45) Tsugane S., Sasaki S., Tsubono Y. (2002) Under- and overweight impact on mortality among middle-aged Japanese men and women: a 10-y follow-up of JPHC study cohort I. *Int J Obes Relat Metab Disord* 26: 529-37.
 - 46) Depommier C., Everard A., Druart C., Plovier H., Van Hul M., Vieira-Silva S., Falony G., Raes J., Maiter D., Delzenne N. M., de Barse M., Loumaye A., Hermans M. P., Thissen J. P., de Vos W. M., Cani P. D. (2019) Supplementation with *Akkermansia muciniphila* in overweight and obese human volunteers: a proof-of-concept exploratory study. *Nat Med* 25: 1096-103.
 - 47) Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-75.
 - 48) Folch J., Lees M., Sloane Stanley G. H. (1957) A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem* 226: 497-509.
 - 49) Crowther R. S., Wetmore R. F. (1987) Fluorometric assay of O-linked glycoproteins by reaction with 2-cyanoacetamide. *Anal Biochem* 163: 170-4.
 - 50) Shiau S. Y., Chang G. W. (1983) Effects of dietary fiber on fecal mucinase and beta-glucuronidase activity in rats. *J Nutr* 113: 138-44.

- 51) Nelson Norton (1944) A photometric adaptation of the somogyi method for the determination of glucose. *Journal of Biological Chemistry* 153: 375-80.
- 52) Tong J., Liu C., Summanen P., Xu H., Finegold S. M. (2011) Application of quantitative real-time PCR for rapid identification of *Bacteroides fragilis* group and related organisms in human wound samples. *Anaerobe* 17: 64-8.
- 53) Denman S. E., McSweeney C. S. (2006) Development of a real-time PCR assay for monitoring anaerobic fungal and cellulolytic bacterial populations within the rumen. *FEMS Microbiol Ecol* 58: 572-82.
- 54) Lien K. A., McBurney M. I., Beyde B. I., Thomson A. B., Sauer W. C. (1996) Ileal recovery of nutrients and mucin in humans fed total enteral formulas supplemented with soy fiber. *Am J Clin Nutr* 63: 584-95.
- 55) Illumina. 16S metagenomic sequencing library preparation. 2013 (2023 April 19 th 閱覽).
- 56) Caporaso J. G., Kuczynski J., Stombaugh J., Bittinger K., Bushman F. D., Costello E. K., Fierer N., Peña A. G., Goodrich J. K., Gordon J. I., Huttley G. A., Kelley S. T., Knights D., Koenig J. E., Ley R. E., Lozupone C. A., McDonald D., Muegge B. D., Pirrung M., Reeder J., Sevinsky J. R., Turnbaugh P. J., Walters W. A., Widmann J., Yatsunenkov T., Zaneveld J., Knight R. (2010) QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat Methods* 7: 335-6.
- 57) Chao Anne (1984) Nonparametric Estimation of the Number of Classes in a Population. *Scandinavian Journal of Statistics* 11: 265-70.
- 58) Shannon C. E. (1997) The mathematical theory of communication. 1963. *MD Comput* 14: 306-17.

- 59) Newton D. F., Cummings J. H., Macfarlane S., Macfarlane G. T. (1998) Growth of a human intestinal *Desulfovibrio desulfuricans* in continuous cultures containing defined populations of saccharolytic and amino acid fermenting bacteria. *J Appl Microbiol* 85: 372-80.
- 60) Han K. H., Azuma S., Fukushima M. (2014) In vitro fermentation of spent turmeric powder with a mixed culture of pig faecal bacteria. *Food Funct* 5: 2446-52.
- 61) Genda T., Sasaki Y., Kondo T., Hino S., Nishimura N., Tsukahara T., Sonoyama K., Morita T. (2017) Fructo-oligosaccharide-induced transient increases in cecal immunoglobulin A concentrations in rats are associated with mucosal inflammation in response to increased gut permeability. *J Nutr* 147: 1900-08.
- 62) Gusils C., González S. N., Oliver G. (1999) Some probiotic properties of chicken *lactobacilli*. *Can J Microbiol* 45: 981-7.
- 63) Hino S., Mizushima T., Kaneko K., Kawai E., Kondo T., Genda T., Yamada T., Hase K., Nishimura N., Morita T. (2020) Mucin-derived O-glycans act as endogenous fiber and sustain mucosal immune homeostasis via short-chain fatty acid production in rat cecum. *J Nutr* 150: 2656-65.
- 64) Luis A. S., Jin C., Pereira G. V., Glowacki R. W. P., Gugel S. R., Singh S., Byrne D. P., Pudlo N. A., London J. A., Baslé A., Reihill M., Oscarson S., Eysers P. A., Czjzek M., Michel G., Barbeyron T., Yates E. A., Hansson G. C., Karlsson N. G., Cartmell A., Martens E. C. (2021) A single sulfatase is required to access colonic mucin by a gut bacterium. *Nature* 598: 332-37.
- 65) Berry D., Stecher B., Schintlmeister A., Reichert J., Brugiroux S., Wild B., Wanek W., Richter A., Rauch I., Decker T., Loy A., Wagner M.

- (2013) Host-compound foraging by intestinal microbiota revealed by single-cell stable isotope probing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110: 4720-5.
- 66) Takagi T., Naito Y., Inoue R., Kashiwagi S., Uchiyama K., Mizushima K., Tsuchiya S., Dohi O., Yoshida N., Kamada K., Ishikawa T., Handa O., Konishi H., Okuda K., Tsujimoto Y., Ohnogi H., Itoh Y. (2019) Differences in gut microbiota associated with age, sex, and stool consistency in healthy Japanese subjects. *J Gastroenterol* 54: 53-63.
- 67) Escobar J. S., Klotz B., Valdes B. E., Agudelo G. M. (2014) The gut microbiota of Colombians differs from that of Americans, Europeans and Asians. *BMC Microbiol* 14: 311.
- 68) Van Herreweghen F., Van den Abbeele P., De Mulder T., De Weirdt R., Geirnaert A., Hernandez-Sanabria E., Vilchez-Vargas R., Jauregui R., Pieper D. H., Belzer C., De Vos W. M., Van de Wiele T. (2017) In vitro colonisation of the distal colon by *Akkermansia muciniphila* is largely mucin and pH dependent. *Benef Microbes* 8: 81-96.
- 69) Van den Abbeele P., Gérard P., Rabot S., Bruneau A., El Aidy S., Derrien M., Kleerebezem M., Zoetendal E. G., Smidt H., Verstraete W., Van de Wiele T., Possemiers S. (2011) Arabinoxylans and inulin differentially modulate the mucosal and luminal gut microbiota and mucin-degradation in humanized rats. *Environ Microbiol* 13: 2667-80.
- 70) Lordan C., Thapa D., Ross R. P., Cotter P. D. (2020) Potential for enriching next-generation health-promoting gut bacteria through prebiotics and other dietary components. *Gut Microbes* 11: 1-20.
- 71) Derrien M., Van Baarlen P., Hooiveld G., Norin E., Müller M., de Vos W. M. (2011) Modulation of mucosal immune response, tolerance, and

- proliferation in mice colonized by the mucin-degrader *Akkermansia muciniphila*. *Front Microbiol* 2: 166.
- 72) Png C. W., Lindén S. K., Gilshenan K. S., Zoetendal E. G., McSweeney C. S., Sly L. I., McGuckin M. A., Florin T. H. (2010) Mucolytic bacteria with increased prevalence in IBD mucosa augment in vitro utilization of mucin by other bacteria. *Am J Gastroenterol* 105: 2420-8.
- 73) Barcelo A., Claustre J., Moro F., Chayvialle J. A., Cuber J. C., Plaisancié P. (2000) Mucin secretion is modulated by luminal factors in the isolated vascularly perfused rat colon. *Gut* 46: 218-24.
- 74) Geerlings S. Y., Kostopoulos I., de Vos W. M., Belzer C. (2018) *Akkermansia muciniphila* in the Human Gastrointestinal Tract: When, Where, and How? *Microorganisms* 6.
- 75) Vanuytsel T., Tack J., Farre R. (2021) The Role of Intestinal Permeability in Gastrointestinal Disorders and Current Methods of Evaluation. *Front Nutr* 8: 717925.
- 76) Pichette J., Fynn-Sackey N., Gagnon J. (2017) Hydrogen sulfide and sulfate prebiotic stimulates the secretion of GLP-1 and improves glycemia in male mice. *Endocrinology* 158: 3416-25.
- 77) 厚生労働省 (2021) 第十八改正日本薬局方.
- 78) Levin J., Bang F. B. (1968) Clottable protein in *Limulus*; its localization and kinetics of its coagulation by endotoxin. *Thromb Diath Haemorrh* 19: 186-97.
- 79) Tooley K. L., El-Merhibi A., Cummins A. G., Grose R. H., Lymn K. A., DeNichilo M., Penttila I. A. (2009) Maternal milk, but not formula, regulates the immune response to beta-lactoglobulin in allergy-prone rat pups. *J Nutr* 139: 2145-51.

- 80) Bradesi S., Schwetz I., Ennes H. S., Lamy C. M., Ohning G., Fanselow M., Pothoulakis C., McRoberts J. A., Mayer E. A. (2005) Repeated exposure to water avoidance stress in rats: a new model for sustained visceral hyperalgesia. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 289: G42-53.
- 81) Kuo H. S., Tsai M. J., Huang M. C., Chiu C. W., Tsai C. Y., Lee M. J., Huang W. C., Lin Y. L., Kuo W. C., Cheng H. (2011) Acid fibroblast growth factor and peripheral nerve grafts regulate Th2 cytokine expression, macrophage activation, polyamine synthesis, and neurotrophin expression in transected rat spinal cords. *J Neurosci* 31: 4137-47.
- 82) Kim E. Y., Chi H. H., Bouziane M., Gaur A., Moudgil K. D. (2008) Regulation of autoimmune arthritis by the pro-inflammatory cytokine interferon-gamma. *Clin Immunol* 127: 98-106.
- 83) Wickert L., Steinkrüger S., Abiaka M., Bolkenius U., Purps O., Schnabel C., Gressner A. M. (2002) Quantitative monitoring of the mRNA expression pattern of the TGF-beta-isoforms (beta 1, beta 2, beta 3) during transdifferentiation of hepatic stellate cells using a newly developed real-time SYBR Green PCR. *Biochem Biophys Res Commun* 295: 330-5.
- 84) Ying C., Chunmin Y., Qingsen L., Mingzhou G., Yunsheng Y., Gaoping M., Ping W. (2011) Effects of simulated weightlessness on tight junction protein occludin and Zonula Occluden-1 expression levels in the intestinal mucosa of rats. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci* 31: 26-32.

- 85) Barrat E., Michel C., Poupeau G., David-Sochard A., Rival M., Pagniez A., Champ M., Darmaun D. (2008) Supplementation with galactooligosaccharides and inulin increases bacterial translocation in artificially reared newborn rats. *Pediatr Res* 64: 34-9.
- 86) Tsuboi Y., Kim Y., Paparella M. M., Chen N., Schachern P. A., Lin J. (2001) Pattern changes of mucin gene expression with pneumococcal otitis media. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 61: 23-30.
- 87) Zhu L. J., Altmann S. W. (2005) mRNA and 18S-RNA coapplication-reverse transcription for quantitative gene expression analysis. *Anal Biochem* 345: 102-9.
- 88) Heid C. A., Stevens J., Livak K. J., Williams P. M. (1996) Real time quantitative PCR. *Genome Res* 6: 986-94.
- 89) Rasband Wayne S (1997-2020) ImageJ.
- 90) Schneider C. A., Rasband W. S., Eliceiri K. W. (2012) NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods* 9: 671-5.
- 91) Binnerts W. T., Klooster A.Th. van 't, Frens Ante M. (1968) Soluble chromium indicator measured by atomic absorption in digestion experiments. *Veterinary Record* 82.
- 92) Johansson M. E., Larsson J. M., Hansson G. C. (2011) The two mucus layers of colon are organized by the MUC2 mucin, whereas the outer layer is a legislator of host-microbial interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108 Suppl 1: 4659-65.
- 93) Johansson M. E., Phillipson M., Petersson J., Velcich A., Holm L., Hansson G. C. (2008) The inner of the two Muc2 mucin-dependent mucus layers in colon is devoid of bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 15064-9.

- 94) Strugala V., Allen A., Dettmar P. W., Pearson J. P. (2003) Colonic mucin: methods of measuring mucus thickness. *Proc Nutr Soc* 62: 237-43.
- 95) Johansson M. E., Hansson G. C. (2016) Immunological aspects of intestinal mucus and mucins. *Nat Rev Immunol* 16: 639-49.
- 96) Ijssennagger N., van der Meer R., van Mil S. W. C. (2016) Sulfide as a mucus barrier-breaker in inflammatory bowel disease? *Trends Mol Med* 22: 190-99.
- 97) Akiba Y., Maruta K., Takajo T., Narimatsu K., Said H., Kato I., Kuwahara A., Kaunitz J. D. (2020) Lipopolysaccharides transport during fat absorption in rodent small intestine. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 318: G1070-g87.
- 98) Schoultz I., Keita Å V. (2020) The intestinal barrier and current techniques for the assessment of gut permeability. *Cells* 9.
- 99) Schumann R. R., Leong S. R., Flaggs G. W., Gray P. W., Wright S. D., Mathison J. C., Tobias P. S., Ulevitch R. J. (1990) Structure and function of lipopolysaccharide binding protein. *Science* 249: 1429-31.
- 100) Alrafas Haider Rasheed, Busbee Philip B, Nagarkatti Mitzi, Nagarkatti Prakash S (2019) Resveratrol modulates the gut microbiota to prevent murine colitis development through induction of Tregs and suppression of Th17 cells. *Journal of Leukocyte Biology* 106: 467-80.
- 101) Zhai Rui, Xue Xinhe, Zhang Liying, Yang Xin, Zhao Liping, Zhang Chenhong (2019) Strain-specific anti-inflammatory properties of two *Akkermansia muciniphila* strains on chronic colitis in mice. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 9.
- 102) Furusawa Yukihiro, Obata Yuuki, Fukuda Shinji, Endo Takaho A., Nakato Gaku, Takahashi Daisuke, Nakanishi Yumiko, Uetake Chikako,

- Kato Keiko, Kato Tamotsu, Takahashi Masumi, Fukuda Noriko N., Murakami Shinnosuke, Miyauchi Eiji, Hino Shingo, Atarashi Koji, Onawa Satoshi, Fujimura Yumiko, Lockett Trevor, Clarke Julie M., Topping David L., Tomita Masaru, Hori Shohei, Ohara Osamu, Morita Tatsuya, Koseki Haruhiko, Kikuchi Jun, Honda Kenya, Hase Koji, Ohno Hiroshi (2013) Commensal microbe-derived butyrate induces the differentiation of colonic regulatory T cells. *Nature* 504: 446-50.
- 103) 山田 恭央 (2020) 腸内共生系におけるムチンの内因性プレバイオティクスとしての役割の解明. 慶應義塾大学.
- 104) Bergstrom K., Shan X., Casero D., Batushansky A., Lagishetty V., Jacobs J. P., Hoover C., Kondo Y., Shao B., Gao L., Zandberg W., Noyovitz B., McDaniel J. M., Gibson D. L., Pakpour S., Kazemian N., McGee S., Houchen C. W., Rao C. V., Griffin T. M., Sonnenburg J. L., McEver R. P., Braun J., Xia L. (2020) Proximal colon-derived O-glycosylated mucus encapsulates and modulates the microbiota. *Science* 370: 467-72.
- 105) Zhang T., Ji X., Lu G., Zhang F. (2021) The potential of *Akkermansia muciniphila* in inflammatory bowel disease. *Appl Microbiol Biotechnol* 105: 5785-94.
- 106) Kottaisamy C. P. D., Raj D. S., Prasanth Kumar V., Sankaran U. (2021) Experimental animal models for diabetes and its related complications-a review. *Lab Anim Res* 37: 23.
- 107) Murthy S. N., Cooper H. S., Shim H., Shah R. S., Ibrahim S. A., Sedergran D. J. (1993) Treatment of dextran sulfate sodium-induced murine colitis by intracolonic cyclosporin. *Dig Dis Sci* 38: 1722-34.

- 108) Bradley P. P., Priebat D. A., Christensen R. D., Rothstein G. (1982) Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. *J Invest Dermatol* 78: 206-9.
- 109) Willemsen L. E., Koetsier M. A., van Deventer S. J., van Tol E. A. (2003) Short chain fatty acids stimulate epithelial mucin 2 expression through differential effects on prostaglandin E(1) and E(2) production by intestinal myofibroblasts. *Gut* 52: 1442-7.
- 110) Kawai T., Akira S. (2007) Signaling to NF-kappaB by Toll-like receptors. *Trends Mol Med* 13: 460-9.
- 111) Cario E., Gerken G., Podolsky D. K. (2007) Toll-Like Receptor 2 Controls Mucosal Inflammation by Regulating Epithelial Barrier Function. *Gastroenterology* 132: 1359-74.
- 112) Ijssennagger N., Belzer C., Hooiveld G. J., Dekker J., van Mil S. W., Müller M., Kleerebezem M., van der Meer R. (2015) Gut microbiota facilitates dietary heme-induced epithelial hyperproliferation by opening the mucus barrier in colon. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112: 10038-43.
- 113) Mizoguchi E., Xavier R. J., Reinecker H. C., Uchino H., Bhan A. K., Podolsky D. K., Mizoguchi A. (2003) Colonic epithelial functional phenotype varies with type and phase of experimental colitis. *Gastroenterology* 125: 148-61.
- 114) Melgar S., Karlsson A., Michaëlsson E. (2005) Acute colitis induced by dextran sulfate sodium progresses to chronicity in C57BL/6 but not in BALB/c mice: correlation between symptoms and inflammation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 288: G1328-38.

- 115) Mukhopadhyay S., Saha S., Chakraborty S., Prasad P., Ghosh A., Aich P. (2022) Differential colitis susceptibility of Th1- and Th2-biased mice: A multi-omics approach. PLoS One 17: e0264400.
- 116) Nishikawa S., Doi K., Nakayama H., Uetsuka K. (2008) The effect of fasting on hepatic lipid accumulation and transcriptional regulation of lipid metabolism differs between C57BL/6J and BALB/cA mice fed a high-fat diet. Toxicol Pathol 36: 850-7.

謝辞

本研究を遂行するにあたり適切なご助言を賜り，数多くの御尽力を頂きました，森田達也名誉教授ならびに日野真吾准教授に心より感謝いたします。また，サンプルを提供いただきました，丸共バイオフーズ株式会社，宮本宣之様，実験の一部にご助力いただきました，源田知美さん，水嶋貴康さんに感謝いたします。

本論文をまとめるに際して御高覧を頂いた徳元俊伸教授，小谷真也教授ならびに藤原健智教授に感謝致します。

本論文の一部を御高覧頂いた西村直道教授，菌叢解析にご協力いただいた慶應大学薬学部の長谷耕二教授，またICP発光分析装置によるCrの分析について御助言，御援助をいただきました山下寛人特任助教に感謝いたします。

最後に，本実験遂行中に多大なるご協力を頂きました，静岡大学栄養化学研究室（旧森田・日野研）の皆様，心身ともに下支えしていただいた家族，友人に心より御礼申し上げます。