

総説

## 腸内の粘膜 - 微生物共生システムの基礎的理解と 環境保全型畜産への応用展開

宮本浩邦<sup>1,2,3</sup> 大野博司<sup>1</sup>

1. 理化学研究所生命医科学研究センター 〒230-0045 神奈川県横浜市鶴見区末広町 1-7-22
2. 千葉大学大学院園芸学研究院 〒271-8510 千葉県松戸市松戸 648
3. 千葉大発 VB (株) サーマス研究部門  
〒263-8522 千葉県千葉市稲毛区弥生町 1-33 千葉大学知識集約型共同研究拠点 2-4F  
連絡責任者 宮本浩邦 E-mail: hirokuni.miyamoto@riken.jp Tel : 043-290-3947

### 【要約】

持続可能な生態系を保持するためのフレームワークとしてプラネタリー・バウンダリーが定義されて以降、国連は「持続可能な社会を構築するための目標」、いわゆる SDGs (Sustainable Development Goals) を提唱している。このような国際社会の趨勢に伴い、様々な産業分野において、SDGs を意識した取り組みが進められている。畜産業界も例外ではなく、特に、人工抗生物質の使用を禁止することによって、人の健康を脅かす薬剤耐性菌の蔓延を防止することを目的した AMR (Antimicrobial resistance) 対策は喫緊の課題である。そこで本稿では、近年、研究の進展が目覚ましい腸内の共生システムの基礎的知見とともに、その視点から捉えられる人工抗生物質の代替剤の探索の取り組みの一部を御紹介する。腸内の共生システムに関しては、病原微生物のセンサーとしてのパターン認識受容体と腸内代謝物のセンサーとしての G 共役タンパク受容体 (GPR)、腸管免疫の開始点としての M 細胞について触れるとともに、それらの腸内での相互作用について簡略化して論述する。さらに、微生物間のシグナル・ネットワークを踏まえた家畜細菌叢の制御の必要性に触れた上で、筆者らが取り組んでいる環境保全型の熱安定性プロバイオティクスの研究の進展についても言及する。本稿の情報が、持続可能な環境保全型の畜産技術の発展に少しでも貢献することができれば幸いである。

**キーワード:** 腸内粘膜システム、腸内微生物のクロストーク、熱安定性プロバイオティクス、環境保全型畜産

2009 年に、持続可能な生態系を保持するためのフレームワークとしてプラネタリー・バウンダリーが定義され [1]、生物多様性と窒素とリンの過剰な環境流出が、すでに危険な水準に達していることが示された。これらの研究成果などを踏まえて、さらに人間の生活様式全体を考慮に入れた幅広い観点から、「持続可能な社会を構築するための目標」、いわゆる SDGs

(Sustainable Development Goals) が国連によって 2015 年に提唱された [2]。その後、様々な産業界において、SDGs を意識した取り組みが進められている。畜産業界も例外ではなく、特に、人工抗生物質の使用を禁止することによって、動物の健康を脅かす薬剤耐性菌の蔓延を防止することを目的した AMR (Antimicrobial resistance) 対策 [3] は喫緊の課題である。そのため、世界中で人工抗生物質を代替する製剤の候補となるプロバイオティクスやプレバイオティクスなどが探索されているが、いまだに確

受付: 2022年1月14日

受理: 2022年2月2日

立した技術があるとは言えない。人類は、抗生物質を発見して以来、医療のみならず、動物の成長促進や病気対策などに用いてきており[4]、現在の畜水産分野での抗生物質の使用量は、ヒト用の販売量を超えて50%を超える自体にまでなっている[5]。抗生物質の使用は、生物多様性においても負の影響を与え、結果として耐性菌の出現につながることになる。このような広範な弊害を避ける上で、関連する生化学・生理学・免疫学などの基礎研究の成果の積み上げによる対策は極めて重要である。一方で、これらの基礎研究は、高度に細分化されており、現場に還元するためには統合的な理解が必要とされる。そこで本稿では、腸内環境の制御に関わる基礎研究の成果を、共生微生物-代謝物-細胞のそれぞれの視点で簡略化して概説する。特に、微生物を認識するパターン認識受容体、代謝物を認識するGタンパク質共役受容体、腸管免疫の開始点としてのM細胞、腸管バリア、微生物間の情報ネットワーク手法としてのクオラムセンシングに焦点を絞り、それらの包括的理解を踏まえた上で、家畜の疾病予防と温暖化ガス発生の抑制を想定した環境保全型のプロバイオティクスの研究事例の一部について御紹介する。

### 病原性微生物のセンサーとしての パターン認識受容体 (PRRs)

感染や組織損傷の際に生ずるPAMPs (Pattern-associated Molecular Patterns) や DAMPs (Damage-associated Molecular Patterns) を認識する受容体として、パターン認識受容体 (PRRs) が知られている。Toll様受容体 (TLR: Toll-like receptor) はその一つであり、微生物由来分子のパターンを認識する生物種を超えて存在する受容体である最も歴史がある受容体のファミリーである。1997年、ショウジョウバエの研究から発見されて以来、様々な分子が見出されている。大きく分けて、細菌感染に関与する受容体群とウイルス感染に関与する受容体群が知られており、前者は細胞膜、後者はエンドソームに局在している。図1に記載したように、それぞれのリガンドは、リポタンパク、フラジェリン、リポ多糖 (LPS)、ウイルスエンベロープ、DNA、並びにRNAとなっており、受容体に応じたりガンド特異性がある。また、TLRとは異なる分類となるもので、C型レクチン (CLRs)、NOD様受容体 (NLRs)、RIG-I様受容体 (RLRs)、AIM2様受容体 (ALRs)、並びにDAI (DNA-dependent activator of IFN-regulatory factors) が知られている [6]。

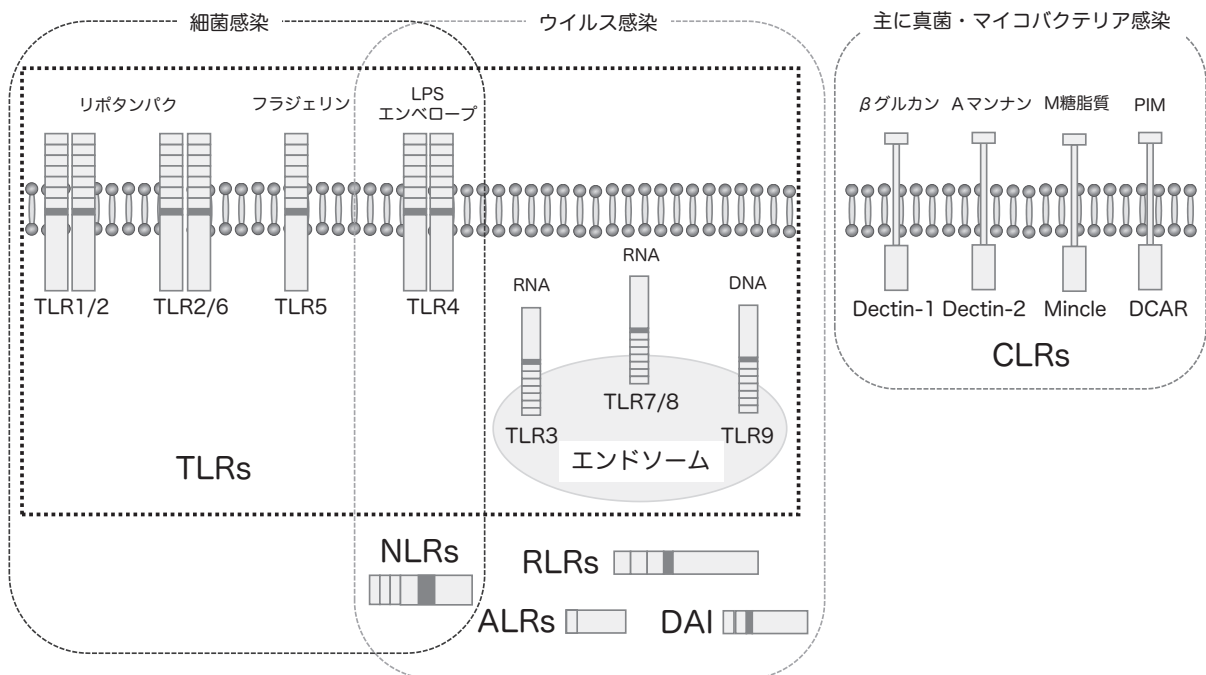


図1 パターン認識受容体とその局在

CLRsは、細胞膜に局在しており、Dectin、Mincle、DCARなどが確認されている。主に真菌やマイコバクテリアの感染制御に関わる受容体であるが、細菌の表面に存在するフコース構造の認識にも関与していることが報告されている。他の受容体は細胞質内に局在しており、受容体NLRsは、感染などによって生じうる活性酸素種、細菌由来のペプチドグリカンやフラジェリン、ウイルス由来の核酸を認識して制御する。RLRsは、核酸の認識に特化しており、主にウイルス由来核酸を認識する。ALRsとDAIは、ウイルス由来の核酸や細胞質に侵入可能な細菌感染によって活性化され、インターフェロンや炎症性サイトカインの産生を誘導する。このように、微生物、並びにその由来分子のセンサーとして複数種の受容体が、細胞膜、エンドソーム、細胞質内に局在し、複雑なクロストークが高度に形成されている。

### 腸内代謝物のセンサーとしての GPRs

Gタンパク質共役受容体 (G protein-coupled Receptors, GPCRs; GPRs) は、細胞膜を7回貫通するヘリックスドメインを持つ受容体である。細胞外のリガンド結合部位と細胞内のGタンパクが結合する部位を有して、ホルモン、神経伝達物質、物理化学的な刺激を感知して、細胞内に情報を伝える働きをする。本稿では、GPRsの中でも腸内の代謝物のセンサーの役割をするGPRs [7, 8] について論述する。図2に示したように、短鎖脂肪酸 (SCFAs) がリガンドとなるGPRsとして、GPR41、GPR43、並びにGPR109Aが知られている。GPR41とGPR43は、生体内で様々な部位で発現し、炎

症制御、血圧調節、インシュリン分泌、脂肪蓄積低減、エネルギー代謝の調節などの多様な機能を発揮することが知られているが、腸内での特徴の一つとして、GPR41がペプチドYY (PYY) の産生に、GPR43が小腸のL細胞におけるグルカゴン様ペプチド (GLP) の産生に寄与する。前者は、視床下部に働きかけて食欲を抑制し、後者は血中のグルコース濃度に依存して、インスリンの分泌を促進するため、畜産動物で捉えると飼料要求率に影響することになる。GPR109Aは、大腸における酪酸による制御性T細胞 (Regulatory T cell, Treg) の分化誘導 [9] などを仲介する受容体であり、免疫制御に欠かせない。GPR40やGPR120は、中鎖脂肪酸 (MCFA) や長鎖脂肪酸 (LCFA) をリガンドとして、腸管バリアの制御や抗菌ペプチドの分泌促進に役割を果たしている。GPR35とGPR121は、それぞれアミノ酸、胆汁酸がリガンドであり、デキストラン硫酸ナトリウム (DSS) 誘導型の腸炎の保護に関与することが示唆されている。また乳酸は、腸管上皮細胞の再生を促進する役割があるが、そこにはGPR81の関与が示唆されている。さらに、畜産分野では病原性大腸菌による下痢予防のために酸化亜鉛が汎用されているが、その作用機序は案外知られていない。GPR39のリガンドが亜鉛であり、GPR39が腸管バリアの保護機能に関与し、自己免疫疾患の抑制を含めて複雑な作用機序で免疫系の制御に貢献している [10]。もちろん、亜鉛が活性酸素を除去するスーパーオキシドジスムターゼ (Zn-SOD) の必須元素であることも腸管細胞を保護の作用機序の一つとして見逃してはならない。ただし、亜鉛は環

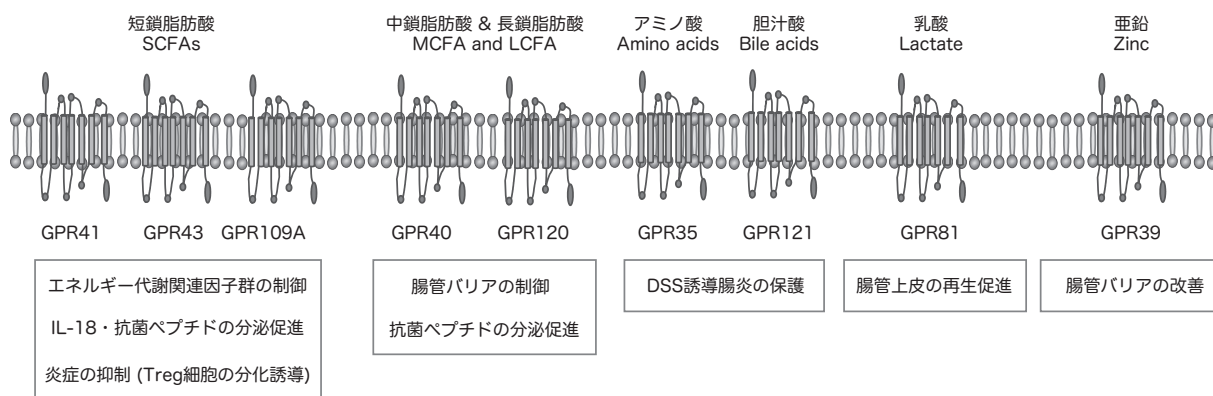


図2 Gタンパク質共役受容体とそのリガンド、並びにそれらの機能



境負荷が高いことが危惧されていることから、畜産分野での使用は削減される方向で国際社会が動いている。腸内の GPR は様々な代謝物を利用して恒常性の維持のために極めて重要な働きをしていることから、亜鉛に頼らない飼育管理の処方箋のヒントがここにあるが、詳しくは後述する。

### 腸管免疫の開始点としての M 細胞とその応用研究

周知の通り、腸管は動物種を超えて広大な比表面積を有し、病原菌の侵入に対して個体を守る末梢免疫系が発達している。独自の免疫系として、免疫誘導組織としてのパイエル板 (Peyer's patch) や孤立リンパ節 (isolated lymphoid follicle, ILF) などの腸管関連リンパ組織 (gut-associated lymphoid tissue, GALT)、免疫実効組織としての上皮細胞間リンパ球 (intraepithelial lymphocyte, IEL)、粘膜固有層の IgA+ 形質細胞からなる。GALT にはリンパ濾胞が存在し、そこから IgA の分泌が誘導される。このリンパ濾胞を覆う上皮 follicle-associated epithelium (FAE) において、生体粘膜の免疫システムの中で外来抗原を取り込む、極めて重要な上皮細胞として M 細胞が点在している (図 3a) [11]。M 細胞の存在を推察しうる知見は 100 年前に遡る。竹尾結核研究所の熊谷健三郎博士は、ウサギに経口投与した結核菌などを選択的に取り込んでいることを見出している。その後、50 年を経てウサギ、

ニワトリ、ヒトにおいてフェリチンやインクの粒子を取り込む細胞の存在を FAE において確認している。そして、この細胞が FAE 上皮細胞と異なり、不規則なひだ状の突起 (microfold) が存在し、膜状 (membranous) の形態をなすことから、これらの単語の頭文字をとって M 細胞と名づけられた。M 細胞の特徴は、抗原を [12] 直接取り込む点にあり、一方向性のトランスサイトシスという物質輸送が発達している。取り込まれた抗原は、樹状細胞 (Dendritic cell, DC) などの抗原提示細胞に取り込まれたのち、タンパク質分解酵素によるプロセッシングを経て、最終的には抗原特異的な IgA の産生に至る (図 3b)。M 細胞には、いくつかの微生物受容体があり、管腔側細胞膜に発現する膜タンパクである  $\beta$  インテグリン、並びに理研粘膜システム研究チームの大野 (筆者の一人) らが見出した glycoprotein2 (GP-2) [13] やプリオンタンパク質 (PrP) [14] が確認されている。GP-2 は、菌体表面が FimH<sup>+</sup> の細菌をリガンドとする受容体であり、PrP については、細菌に表出している熱ショックタンパク (Heat shock protein, hsp) の中で、細菌表面に表出した HSP60 がリガンドである可能性が指摘されている。これらの微生物受容体は経口ワクチンへの応用も期待されており、GP2 に対する抗体とサルモネラ菌 (溶解液) をアビチン・ビオチン反応で結合させた複合体を利用したモデル実験において、サルモネラ菌に対する感染抑制と糞中の分泌型 IgA の増加を確認している [15]。

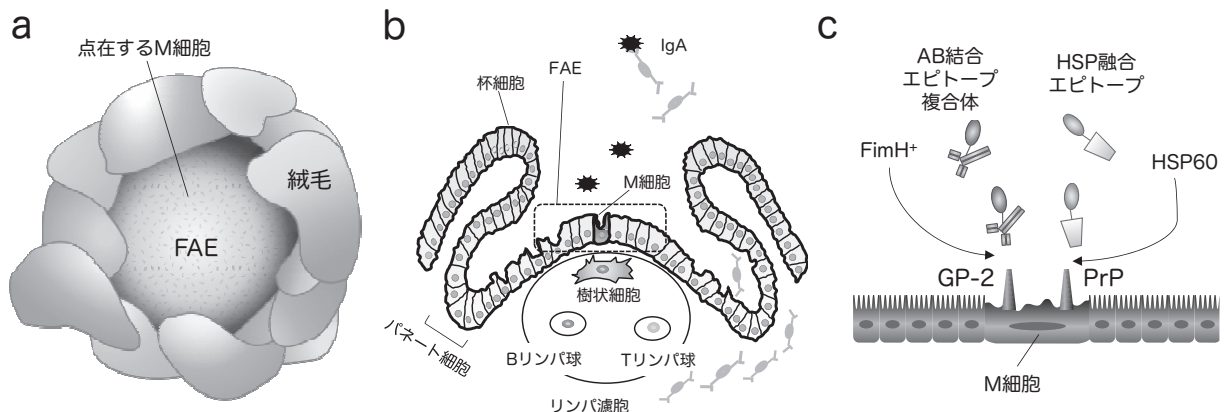


図3 (a) (b) M細胞とその周辺組織 (c) M細胞の受容体のリガンド、並びに受容体をターゲットとしたワクチン様製剤の機能評価

AB結合エпитープ複合体: 抗GP-2抗体-アビチン・ビオチン-サルモネラ菌の複合体

HSP融合エпитープ: heat shock proteinとエпитープの融合タンパク

さらに、PrPに結合するheat shock proteinをアジュバンドとして捉えた研究も進めている。遺伝的な変異のスピードが早い病原性微生物に対しても交差的な生体防御が可能となるように、種を超えて比較的類似する塩基配列断片をエピトープとして設計した条件における解析になる。鼻咽腔関連リンパ組織(Nasopharynx-associated lymphoid tissue, NALT)にもM細胞が存在することから[16]、噴霧を含めた非侵襲的な予防法の適用を目指している。実際、ニワトリのファブリキウス嚢のFAEには、ほぼ100%のM細胞が存在している。ウマ、ウシやブタにおいても少なくともGALTにM細胞は存在し[17]、ウシにはNALTにも存在する可能性が示唆されている[18]。したがって、これらの研究は、生命科学における生体防御系の普遍性の理解のみならず、実学的にも薬剤に頼らない非侵襲的な予防方法を取り入れた畜産経営のために、さらに発展していくことが急務な研究対象であろう。

### 腸管の物理・化学的バリアの存在と センサータンパクを介した相互作用

これまで論述したように、腸管内では微生物、あるいは代謝物のセンサータンパクが存在しているが、物理・化学的バリアとして腸管の杯細胞からムチン(Muc2)[19]が分泌され、腸管を保護する粘液層を形成している(図4)[11]。杯細胞は、小腸と大腸でそれぞれ10分の1、5

分の1を占めており、形成された粘液層は外敵から守る物理的バリアとして働く。さらに、腸管上皮細胞には、微絨毛が林立し、糖衣と呼ばれる層を形成し、負の電荷を持つ糖タンパクと膵臓から分泌された消化酵素が局在する物理・化学的バリアとなっている。また、パターン認識受容体は、細胞膜表面、細胞質内以外に、腸管の粘膜固有層側に局在し、パネート細胞からαデフェンシンと呼ばれる抗菌ペプチド[20]、パイエル板のリンパ濾胞からはSCFAsの刺激などによって分泌型IgA[19]が産生される。SCFAsのうち、酢酸は病原性大腸菌に対する細胞保護の作用があることを大野らが明らかにしている[21]が、その後の研究ではGPR43[22]や腸管透過性に機能するタイトジャンクション(TJ)を構成するclaudin-1やoccudinなどが関与[23]する可能性が指摘されている。TJの機能性に影響を与える代表例が、ビタミンD<sub>3</sub>である[19]。ビタミンD<sub>3</sub>は、紫外線によって皮膚で合成されるが、それだけでは不十分で、栄養学的に摂取することが好ましい。このビタミンD<sub>3</sub>の受容体は腸管細胞内に存在しているが、DSS(デキストラン硫酸ナトリウム)による腸管損傷モデルにおいて効果を発揮し、大腸では抗炎症作用を発揮するCX<sub>3</sub>CR1<sup>high</sup>単核貪食細胞を増加させる[19]。このような知見は、畜産現場において、キノコの廃菌床を用いた敷料を用いると家畜の調子が良くなるという事例と関与しているのかもしれ

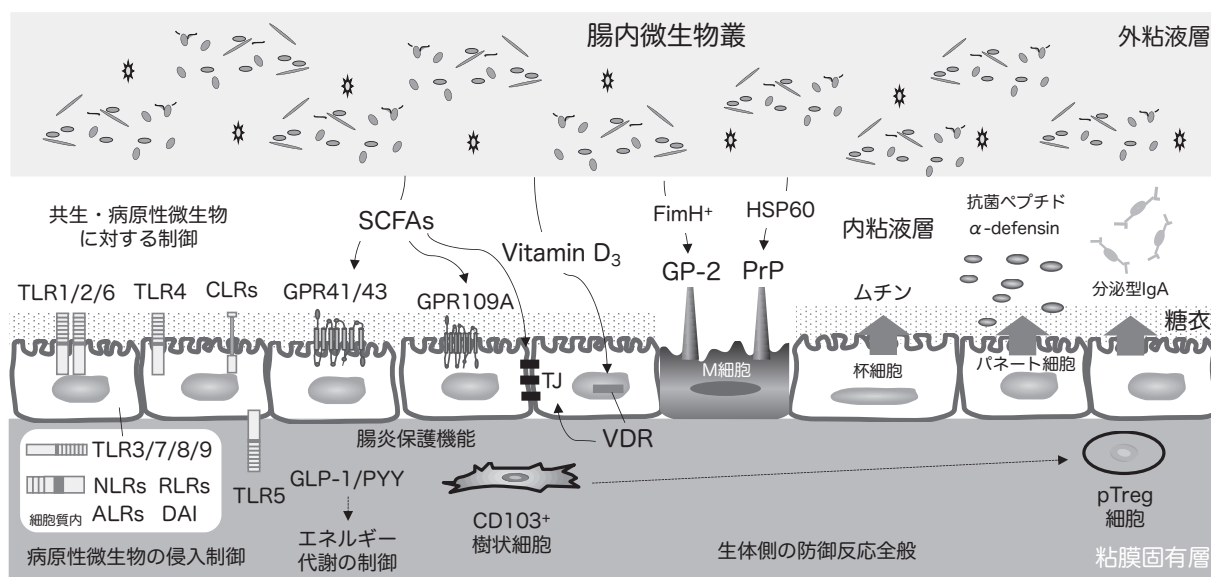


図4 腸管のセンサータンパクと物理・化学的バリアの概念図

ない。推測の域を出ないが、一般的に、キノコを天日干しするとビタミンDが増える傾向が知られているためである。

以上のように、さまざまな物理・化学的バリアとともに、前述のセンサータンパク群などによって、腸管の恒常性が保たれる。世界中で、病原性大腸菌による下痢予防などの処方箋として、酸化亜鉛によって腸管を保護する飼育管理が進められているが、これまで述べた様々な腸管保護のシステムを視野に入れた包括的な対策が今後、求められるのではないだろうか。

### 微生物間のシグナルネットワーク

これまで、主に生体防御に関与する宿主側の腸内の粘膜システムについて紹介した。ここからはさらに、複合微生物間のコミュニケーションの一つであるクオラムセンシング (Quorum sensing) [24] について概略を述べる。クオラムセンシングは、自己誘導因子 (Autoinducer, AI) と呼ばれるシグナル物質を介して周囲の菌密度を感知して、特定の遺伝子の発現を制御し、集団行動を引き起こす現象である (図4a)。クオラムセンシングの研究は、1960年代

の終わり頃から始まり、現在、様々な微生物で確認されており、バイオフィルムの形成、病原性微生物の制御、孢子形成、抗菌物質 (乳酸菌由来のバクテリオシンなど) の生産、生物発光制御、細胞死などに関わっている。類似した細菌間のコミュニケーションとしてメンブレンベシクルと呼ばれる細菌から放出される膜小胞を用いたシステムも知られているが [25, 26]、本稿ではシグナル物質としてのAIに絞って説明する。

AIとしては、グラム陰性菌で特徴的な AI-1 (acyl-homoserine lactone, AHL)、グラム陰性菌とグラム陽性菌で共通する AI-2、腸管出血性大腸菌において知られている AI-3 が知られている。これらは種、あるいは属を超えて共通して用いられている部分があれば、菌種、あるいは菌株毎に特異な因子が使用されるケースもある。グラム陽性菌では、ペプチド性化合物のAIが多く知られているが、ここでは後述するバシラス属が産生することが知られている環状リポペプチド (cyclic lipopeptide) (図5b) [27] とランチビオティック (lantibiotic) (図5c) [28] について述べる。環状リポペプチドは、三つのファ

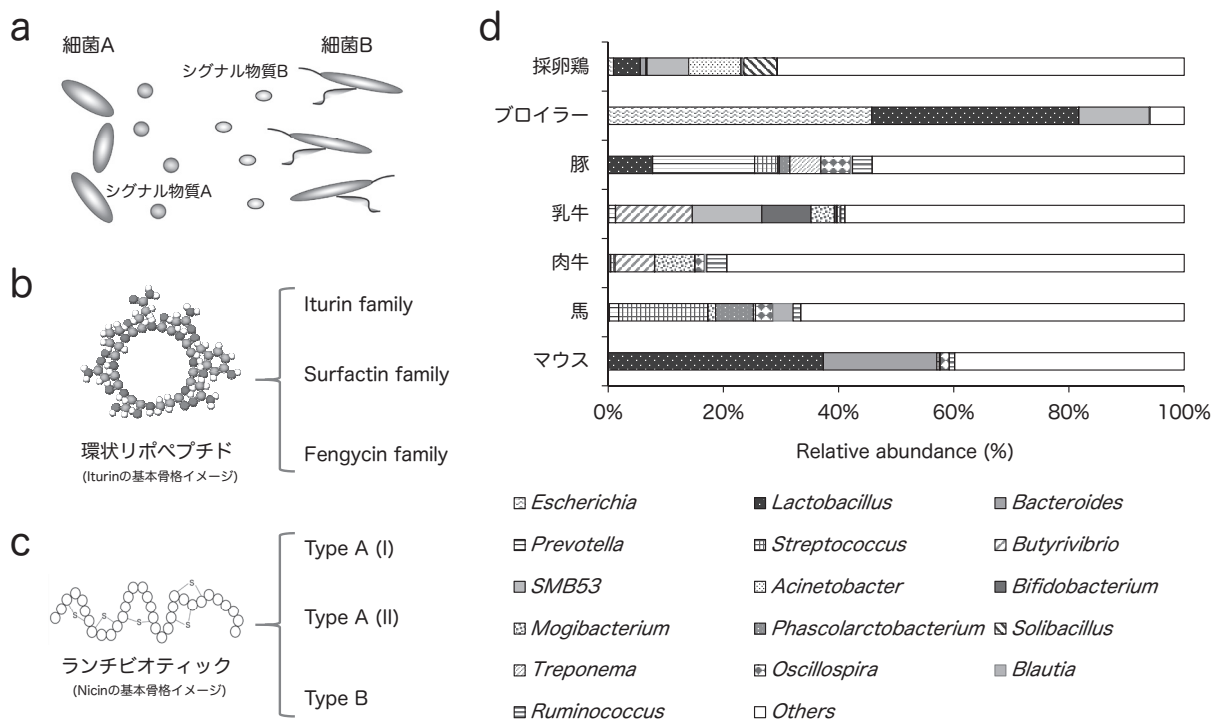


図5 (a) クオラムセンシングの概念図 (b) 環状リポペプチドの分類と基本骨格イメージ (c) ランチビオティックの分類と基本骨格イメージ (d) 動物種別の腸内細菌叢 (属レベルの評価) 解析対象: 16SrRNA 配列 V4 領域



ミリーが知られており、抗真菌活性が比較的知られているが、最近の研究では、黄色ブドウ球菌の増殖抑制効果 [29] やウイルスの感染性を抑える効果も確認されている [30]。ランチビオテックは、lanthionine-containing antibiotics に由来した総称で、デヒドロアラニン、デヒドロプロチリン、ランチオニン、3-メチルランチオンなどの部分的な環構造を持ち (図 5c)、酸や熱に対して安定な特性を有する。しかし、消化酵素によって容易に分解することから、安全な食品保存料や医薬品などの用途が期待されている。最も研究が進んでいるものとして、WHO に承認されている *Lactococcus lactis* 由来のナイシンがある。ナイシンは、構造的な分類上は、TypeA (I) とされる。機能としては、細菌の細胞壁前駆体である lipid II を標的として複合体を形成することによって、細胞内物質の漏出を引き起こしたり、あるいは細胞分裂を阻害することで殺菌するが、ppb レベルの極めて低濃度で効果を発揮する。後述するバシラスのうち、筆者らが千葉大学との共同研究で見出した有孢子性好熱菌 *Bacillus hisashi* (当初、*Bacillus thermoamylovorans* の近縁種として発見 [31]、2015 年新菌種登録 [32]、2020 年、分類学上 *Caldibacillus hisashii* に改名 [33]) のゲノム解析の結果、関連する因子を産生することも示唆されているので、今後の研究の進展が期待される。そして、クオラムセンシングの視点に基づいて、家畜の腸内細菌叢を改めて捉えることは今後の家畜の飼育管理を向上させる上で極めて重要である。図 5d に示したように、家畜の腸内細菌叢は、動物種、並び飼育環境依存的に全く異なる菌叢である。例えば、乳酸菌の代表格であり、グラム陽性菌である *Lactobacillus* 属は、ニワトリとブタの優占菌の一つであるが、他の動物では必ずしもそうではない。これらの違いは、腸内フローラ管理をする上で、共通性と相異性を加味したプロバイオティクスの選抜と運用の必要性を想起させる。実際、SCFAs の中でも酢酸によって分泌された IgA が、病原性片利共生細菌 (大腸菌定着マウスモデル) に対してのみ働く (大野ら最新研究) [34]。モデル動物を用いた限定された実験条件ではあるが、腸内細菌叢のタイプ別に効率的に IgA を分泌させるシステムが存在する可能性がある。一方

で、抗原フリー飼料を用いた試験研究から、飼料成分に含まれる natural IgA がサルモネラ菌ワクチン株に結合する現象も確認されており [19]、菌叢特異的な IgA と非特異的 IgA の双方が重要であることが推察される。家畜の腸内細菌叢の多様性を考慮すると、生体防御機能の向上のために研究の進展が期待される。

#### 家畜細菌叢の特性を考慮した 環境保全型・熱安定性プロバイオティクス

前述の家畜の腸内細菌叢のポピュレーションの相違点に基づいて、筆者らは、家畜の糞便中の細菌叢を無菌マウスに移植したモデルマウス (以下、家畜フローラマウス) の研究にも取り組んでいる [35]。一般的に、動物種特異的な生着性を有する細菌も存在するため、すべての細菌が必ずしも生着しないが、当該モデルを、家畜の特異的な細菌群の *in vivo* 評価系として用いることができる。実際の家畜を用いた試験は、多大な費用を要し、また抗生物質代替候補製剤を選抜する上では、現場で汎用している抗生物質の投与を実験的に中止すること自体が難しいため、かなり有望な資材でなければ、現場試験は難しい。したがって、現場試験をする前にモデル試験の実施が必要であるが、候補製剤を選抜する上では、通常の実験室内で用いる SPF (specific pathogen free) マウスでは、腸内フローラも全く異なるため、家畜フローラマウスによるモデル試験が好ましいと捉えている。抗生物質の耐性遺伝子の伝播には同じ属間のプラスミドの接合とクオラムセンシングが関与しうるため、実際の AMR 対策を考慮した動物実験を進める上でも利便性が高いモデルと言える。これらの研究成果も踏まえて、家畜の腸内細菌叢の中で、宿主の優占菌として存在しないバシラス属は、有望なプロバイオティクス候補と言える。バシラスの中でも *Bacillus subtilis* (枯草菌) はすでに飼料中に含まれている場合が多いので、ここでは、*Bacillus subtilis* とは異なる機能を有するバシラス属菌株として、筆者らが取り組んでいる *Bacillus coagulans* SANK70258 株 (2020 年、分類学上 *Weizmaina coagulans* へ改名 [33])、並びに *Bacillus* / *Caldibacillus hisashii* N11 株での研究成果の一部について報告する (図 6a)。これらの菌群の

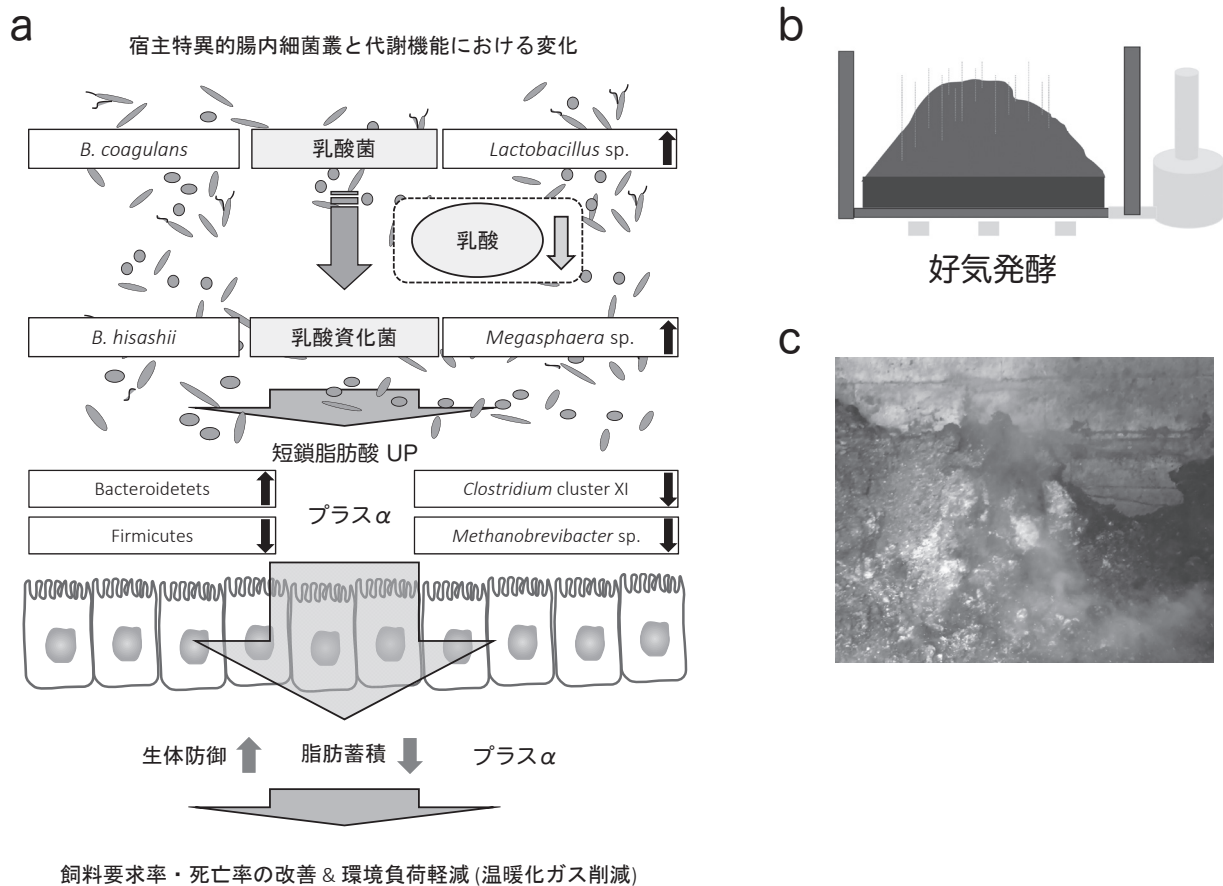


図6 (a) 宿主特異的な腸内細菌叢と代謝機能、並びにそれらの波及効果 (b) 畜糞堆肥の好気発酵概念図 (c) 発酵温度が上昇した畜糞堆肥 (白黒写真)

投与試験は、いずれも腸内の菌数に対して極少量のレベルでの投与でそれぞれ特徴的な効果を発揮することが判明している。

*B.coagulans* は有孢子性の耐熱性乳酸菌であり、日本では、中山大樹博士（山梨大学名誉教授）と世界的な発酵醸造研究の権威、「酒の博士」として知られる坂口謹一郎博士（東京大学・名誉教授 / 理化学研究所・元副理事長）が緑麦から単離に成功した [35, 36]。熱安定性の高い植物由来の乳酸菌の特性から腸まで届くことが明らかとなっており、ヒトの食品用として長年市販されている (*Bacillus / Weizmannia coagulans* SANK70258, 三菱ケミカル株式会社)。乳酸菌としての特性のみならず、*C.difficile* に起因する大腸炎の再発の抑制効果や慢性関節リウマチに対する効能などの報告がある。また、畜産用飼料添加物としての効能も調べられており、病原性 *Escherichia coli*、*Clostridium difficile*、*Salmonella enteritidis* に対する感染予防効果など [35-37] が報告されている。このような作用機序に関わる

因子の一つは、*B.coagulans* 固有のバクテリオシン (Bacteriocin-like inhibitory substance, BLIS)、Coagulin などの可能性が想定される [38-40]。さらに筆者らの研究では、人工的に設定した暑熱条件下でチャンキーを飼育した場合でも、通常の飼育条件下と同等の成長促進効果が認められ、その際に肝臓や筋肉中の過酸化脂質濃度が低下する傾向が確認された [35, 41]。これらの作用機序の一端は明らかになりつつあり、一つの理由として、SANK70258 による SCFAs の増加が関与している可能性がある [42]。鶏腸内では SCFAs のうち、酪酸やプロピオン酸が増加する傾向があるため、GPRs を介した Treg の分化誘導や飼料要求率に影響しうる作用機序が想起された。もう一つの理由として、SCFAs 以外の腸内代謝全体の変容が想定される。幼雛に対する抗生物質の投与直後で、腸内細菌叢が攪乱 (Disbiosis) した腸内の代謝物群をメタボローム解析した結果、糖質とアミノ酸などの代謝パターンに安定した



特徴を見出すことができた。このような代謝パターンの一部は、感染防御に貢献する代謝挙動と類似していた。一般的に鶏の腸管は短く、腸内細菌叢は個体差が大きいことを考えても、このような抗生物質投与直後の Disbiosis における安定した代謝挙動は興味深く、腸内微生物叢に依存しない効果を示すプロバイオティクス候補として *Bacillus / Weizmannia coagulans* SANK70258 が有望であることが示唆された。

もう一つの取り組みとして有胞子性好熱菌 *Bacillus / Caldicoccus* *hisashii* N11 株の研究について紹介する。千葉大学の児玉らとの共同研究によって、*B.hisashii* は、カニ・エビ・小魚などの海産物資源を 70-80℃ の高温下で発酵したりサイクル発酵飼料から見出された [31, 43]。*B.hisashii* は、当該発酵飼料の一部の機能に関わる主要なプロバイオティクスである。一つの機能として、余分な脂肪蓄積を軽減する機能があり、動物種固有の腸内細菌叢をそれぞれ制御することが明らかになっている。宿主に依存した腸内菌叢の変化は、農場毎・飼育環境毎に異なる腸内菌叢の変化も確認されている。Bacteroidetes に対する Firmicutes の比率の減少傾向（マウス、豚、牛）、*Clostridium* cluster XI の減少傾向（マウス、鶏、豚）、乳酸菌のうち *Lactobacillus* 属の増加傾向と *Streptococcus* 属の減少傾向（鶏、豚）、乳酸資化菌である *Megasphaera* 属の増加傾向（豚）、あるいはメタン産生菌である *Methanobrevibacter* 属の減少傾向（牛）[44] などが確認されている（好熱菌発酵飼料提供：京葉ガスエナジーソリューション株式会社）。乳酸資化菌 *Megasphaera* 属の増加傾向は、乳酸菌が作った乳酸を SCFAs へと代謝する上で、重要であることが示唆される現象である。また、メタン産生菌である *Methanobrevibacter* 属は、温暖化ガスであるメタンの産生 [45] のみならず脂肪蓄積にも関与 [46] することが知られているため、牛由来のメタンが温暖化に影響することを考慮すると、極めて重要な知見と捉えている（共同研究機関：九州大学高原農場）。代謝レベルの機能として、動物種を超えて排泄糞中の糖質とアミノ酸濃度、並びに乳酸とコハク酸濃度が減少する傾向があるが、脂肪代謝などに関わる一部の代謝物濃度が変化する。モデルマウスの試験では、腸内細菌叢の条件に依存

して、血清中のアディポネクチンの増加傾向も認められるが、増加しない条件においても、脂肪蓄積の軽減を伴う増体傾向が認められるため、複数の作用機序が推察された。また、畜産現場では下痢症状が軽減する傾向があり、病原性大腸菌の指標遺伝子の存在比率が減少する傾向にある。その機能は、高温発酵飼料の給与条件でより顕著であり、豚流行性下痢（Porcine Epidemic Diarrhea, PED）症状を呈している豚や原因不明の下痢症状を呈している牛への投与で明らかに軽減する事例を確認している [47]。当該飼料中には、イシュリン系の環状リポペプチドが [48] 含まれており、ランチビオティックの生産の可能性があるため、これらの関与を含めて検証を進めている。堆肥発酵に与える影響は、20 年以上前より検証されてきており、適切な好気発酵条件（図 6b）を経た場合には、臭気が軽減された形で完熟化する傾向がある。特に鶏糞においては、甘い香りとなり、発酵初期の段階で発酵温度が上がりやすい傾向があり（80℃ 以上）（図 6c）、このように完熟化した堆肥は比較的強い抗真菌活性を持つ。これらの原因として、臭気に関しては排泄糞のアミノ酸、並びにアンモニアの減少傾向などの関与の可能性がある。抗真菌活性については、実際に環状リポペプチドを産生する芽胞菌が堆肥から単離されている点は興味深い。未熟な堆肥からは、二酸化炭素の約 300 倍の温暖化係数をもつ一酸化二窒素が発生するため、ガスの発生を抑制する必要があるが、抗真菌活性は極めて重要な切り札である。なぜなら、一酸化二窒素の発生には真菌由来のシトクローム P450nor [49] の存在が影響しているからである。

このように、腸内菌叢の優占菌ではない環境微生物群が家畜の腸内で相互作用を果たす現象は興味深いと言える。本稿で論述したパターン認識受容体、G タンパク質共役受容体、M 細胞、並びにクオラムセンシングの視点で捉えることによって、AMR 対策に向けたプロバイオティクス開発のための基礎研究の重要性が理解できるはずである。例えば、今回、ご紹介した *B.coagulans* と *B.hisashii* の単独菌株の投与では明らかな効果が見えにくい動物種の腸内細菌叢の場合でも、併用によって飼料要求率の改善や生理活性を示すことが判明しており [50]、今後、

単独のプロバイオティクスに頼るのではなく、複合的なプロバイオティクス効果の試験研究がさらに必要になるであろう。そしてこのような研究には、今回御紹介したように、宿主となる動物種を超えた普遍性と動物種毎の生理機能と腸内細菌叢の多様性を考慮したアプローチが必要になるであろう。

### おわりに

本稿では、腸内の微生物共生システムの基礎的な理解に基づいて、持続可能な環境保全型の畜産につながる技術の一端について論述した。当該視点は、近年、資本家による ESG (Environment / Social / Government) 投資によって経済が動き始めている現代社会の中でも重要な情報である。腸内の適切な制御によって、人工抗生物質の使用量の削減、排泄窒素量の削減、温暖化ガスの発生抑制が実現される可能性がある。ESG の投資対象としてアニマルウェルフェアの普及を促進する動きもあるが、養鶏場のケージフリーなどの目に見える形式的な部分に目が行きがちである。しかし、アニマルウェルフェアとは、動物の生活とその死に関わる環境と関連する動物の身体的・心的状態であり、家畜の健康管理のためには、本質的には何が必要なのか、現場サイドの視点で捉えれば衛生管理上の側面も含めて検討の余地があることは否めない。その点、家畜の腸内細菌叢の管理は、見えにくい形の家畜の健康管理であるが、本質的にはアニマルウェルフェアの概念に合致する。本稿で記載した情報が、畜産分野に止まらず、幅広い見地で社会貢献につながる情報の一つとなれば幸いである。

故・早石修博士 (元・東京大学医学部教授／元・京都大学医学部教授／元・大阪バイオサイエンス研究所理事長) は、医師でありながら土壌微生物由来の酸素添加酵素 (oxygenase) の研究から、動物種を超えた普遍的な作用機序を解明し [51]、「生化学の父」と呼ばれ、後のノーベル医学・生理学賞受賞の本庶佑博士などの研究者を輩出した。一方、土壌微生物由来の抗寄生虫薬候補分子 avermectin (後の駆虫薬イベルメクチンのベースとなる化合物) を発見 [52] し、ノーベル医学生理学賞を受賞されたのが、大村智博士 (北里研究所特別名誉教授) である。

この成果は、今でも畜産分野からヒトに至るまで広く普及する医薬品として社会に貢献している。世界的な問題となっている生物多様性の保全のために、AMR 対策、環境対策は極めて重要な十字架であり、目先の利益ではなく、将来の子供達のために、過去の著名な研究者の姿勢に学び、いまこそ基礎から応用までを見据えた抜本的な研究の推進が求められるはずである。

### 謝辞

腸内細菌叢の影響評価については、理化学研究所 IMS・服部正平博士、須田互博士の御協力をいただいております。*Bacillus hisashii* の機能性評価については、千葉大学大学院園芸学研究院・見玉浩明教授、牛の機能性評価については、九州大学大学院農学研究院 (高原農場)・高橋秀之博士と稲生雄大博士、長年の畜糞堆肥発酵に関する研究については、都路グループの皆様にご協力を賜りました。その他多くの皆様にご協力いただきました。ここに深謝致します。

### 引用文献

- [1] Rockström J, Steffen W, Noone K, Persson A, Chapin FS, Lambin EF, et al. A safe operating space for humanity. *Nature*. 2009;461:472-5.
- [2] <http://www.un.org/sustainabledevelopment/sustainable-development-goals/>.
- [3] <https://www.mhlw.go.jp/file/06-Seisakujouhou-10900000-Kenkoukyoku/0000138942.pdf>.
- [4] Van Boeckel TP, Brower C, Gilbert M, Grenfell BT, Levin SA, Robinson TP, et al. Global trends in antimicrobial use in food animals. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015;112(18):5649-54.
- [5] <https://www.maff.go.jp/nval/iyakutou/hanbaidaka/>.
- [6] Rahabi M, Jacquemin G, Prat M, Meunier E, AlaEddine M, Bertrand B, et al. Divergent Roles for Macrophage C-type Lectin Receptors, Dectin-1 and Mannose Receptors, in the Intestinal Inflammatory Response. *Cell Rep*. 2020;30(13):4386-98 e5.
- [7] Shimizu H, Ohue-Kitano R, Kimura I. Regulation of host energy metabolism by gut microbiota-derived short-chain fatty acids. *Glycative Stress Research*. 2019;6:181-91.
- [8] Melhem H, Kaya B, Ayata CK, Hruz P, Niess JH. Metabolite-Sensing G Protein-Coupled Receptors Connect the Diet-Microbiota-Metabolites Axis to Inflammatory Bowel Disease. *Cells*. 2019;8(5).
- [9] Furusawa Y, Obata Y, Fukuda S, Endo TA, Nakato G,

- Takahashi D, et al. Commensal microbe-derived butyrate induces the differentiation of colonic regulatory T cells. *Nature*. 2013;504(7480):446-50.
- [10] 西田圭吾. ここまで分かった亜鉛の免疫システムにおける役割. *日本衛生学会誌*. 2013;68:145-52.
- [11] 大野博司. 特殊な腸管上皮細胞, M 細胞の生物学. *生化学*. 2011;83:13-22.
- [12] Fitzgeorge RB. The effect of antibiotics on the growth of *Legionella pneumophila* in guinea-pig alveolar phagocytes infected in vivo by an aerosol. *J Infect*. 1985;10(3):189-93.
- [13] Hase K, Kawano K, Nochi T, Pontes GS, Fukuda S, Ebisawa M, et al. Uptake through glycoprotein 2 of FimH(+) bacteria by M cells initiates mucosal immune response. *Nature*. 2009;462(7270):226-30.
- [14] Nakato G, Hase K, Suzuki M, Kimura M, Ato M, Hanazato M, et al. Cutting Edge: *Brucella abortus* exploits a cellular prion protein on intestinal M cells as an invasive receptor. *J Immunol*. 2012;189(4):1540-4.
- [15] Shima H, Watanabe T, Fukuda S, Fukuoka S, Ohara O, Ohno H. A novel mucosal vaccine targeting Peyer's patch M cells induces protective antigen-specific IgA responses. *Int Immunol*. 2014;26(11):619-25.
- [16] Date Y, Ebisawa M, Fukuda S, Shima H, Obata Y, Takahashi D, et al. NALT M cells are important for immune induction for the common mucosal immune system. *Int Immunol*. 2017;29(10):471-8.
- [17] Wang M, Gao Z, Zhang Z, Pan L, Zhang Y. Roles of M cells in infection and mucosal vaccines. *Hum Vaccin Immunother*. 2014;10(12):3544-51.
- [18] 長澤裕哉, 林智人. ウシの粘膜ワクチン開発を考える上での M 細胞の重要性. *家畜感染症学会誌*. 2017;6:1-11.
- [19] 室井きさら, 高橋大輔, 長谷耕二. 食事因子による腸管の生体防御システムの構築. *実験医学増刊 食と健康を結ぶメディカルサイエンス*. 2020;38:113-9.
- [20] 中村公則, 菊地摩仁, 綾部時芳. 抗菌ペプチド  $\alpha$  デイフェンシンによる腸内細菌叢の制御. *腸内細菌学雑誌*. 2019;33:129-35.
- [21] Fukuda S, Toh H, Hase K, Oshima K, Nakanishi Y, Yoshimura K, et al. Bifidobacteria can protect from enteropathogenic infection through production of acetate. *Nature*. 2011;469(7331):543-7.
- [22] Maslowski KM, Vieira AT, Ng A, Kranich J, Sierro F, Yu D, et al. Regulation of inflammatory responses by gut microbiota and chemoattractant receptor GPR43. *Nature*. 2009;461(7268):1282-6.
- [23] Asahara T, Takahashi A, Yuki N, Kaji R, Takahashi T, Nomoto K. Protective Effect of a Synbiotic against Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii* in a Murine Infection Model. *Antimicrob Agents Chemother*. 2016;60(5):3041-50.
- [24] 中山二郎. 細菌の世界における細胞間ケミカルコミュニケーションとその分子メカニズム. *腸内細菌学雑誌*. 2011;25:221-34.
- [25] 豊福雅典, 森永花菜, 安田まり奈, 野村暢彦. ベシクルから視えてくる細菌間相互作用の姿. *日本微生物生態学会雑誌*. 2018;33:43-9.
- [26] Toyofuku M, Nomura N, Eberl L. Types and origins of bacterial membrane vesicles. *Nat Rev Microbiol*. 2019;17(1):13-24.
- [27] 横田健治. 拮抗性 *Bacillus* 属細菌を利用した植物病害の生物防除機能性物質とその防除メカニズムを中心に. *土と微生物*. 66:27-31.
- [28] 奥田賢一, 永尾潤一, 園元謙二. ランチビオテック. *化学と生物*. 2009;47:91-7.
- [29] Piewngam P, Zheng Y, Nguyen TH, Dickey SW, Joo HS, Villaruz AE, et al. Pathogen elimination by probiotic *Bacillus* via signalling interference. *Nature*. 2018;562(7728):532-7.
- [30] Johnson BA, Hage A, Kalveram B, Mears M, Plante JA, Rodriguez SE, et al. Peptidoglycan-Associated Cyclic Lipopeptide Disrupts Viral Infectivity. *Journal of Virology*. 2019;93:e01282-19.
- [31] Miyamoto H, Seta M, Horiuchi S, Iwasawa Y, Naito T, Nishida A, et al. Potential probiotic thermophiles isolated from mice after compost ingestion. *J Appl Microbiol*. 2013;114(4):1147-57.
- [32] Nishida A, Miyamoto H, Horiuchi S, Watanabe R, Morita H, Fukuda S, et al. *Bacillus hisashii* sp. nov., isolated from the caeca of gnotobiotic mice fed with thermophile-fermented compost. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2015;65(11):3944-9.
- [33] Gupta RS, Patel S, Saini N, Chen S. Robust demarcation of 17 distinct *Bacillus* species clades, proposed as novel *Bacillaceae* genera, by phylogenomics and comparative genomic analyses: description of *Robertmurraya kyonggiensis* sp. nov. and proposal for an emended genus *Bacillus* limiting it only to the members of the *Subtilis* and *Cereus* clades of species. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2020;70(11):5753-98.
- [34] Takeuchi T, Miyauchi E, Kanaya T, Kato T, Nakanishi Y, Watanabe T, et al. Acetate differentially regulates IgA reactivity to commensal bacteria. *Nature*. 2021;595(7868):560-4.
- [35] 宮本浩邦, 大野博司, 児玉浩明. 第2章 家畜動物に対するプロバイオティクスとその展望 服部正平監修 ヒトマイクロバイオーム vol.2. 2020.
- [36] Miyamoto H. *Symbiotic Microorganisms* (Eds. by



- Hiroshi Ohno), Dojin Bioscience series 27, Kagaku-Dojin (Kyoto, Japan). 2016:247-58.
- [37] Nishisaka K, Takahashi Y, Adachi Y. Effect of *Bacillus coagulans* and complex organic acid on elimination to *Salmonella* in chicken. *The Japanese Journal of Animal Hygiene*. 2003;29(2):79-84.
- [38] Hyronimus B, Marrec CL, Urdaci MC. Coagulin a bacteriocin-like inhibitory substance produced by *Bacillus coagulans* I4. *Journal of Applied Microbiology*. 2002;85:42-50.
- [39] Le Marrec C, Hyronimus B, Bressollier P, Verneuil B, Urdaci MC. Biochemical and genetic characterization of coagulin, a new antilisterial bacteriocin in the pediocin family of bacteriocins, produced by *Bacillus coagulans* I(4). *Appl Environ Microbiol*. 2000;66(12):5213-20.
- [40] Abada EAEm. Isolation and characterization of an antimicrobial compound from *Bacillus coagulans*. *Animal Cells and Systems*. 2008;12(1):41-6.
- [41] Ito Kayo YT, Honda Fuyuko, Okada Hiroko, Takahashi Keiji and Waki Masayuki. Heat Adaptation Technology by Precise Nutrition Management for Each Fattening Stage in Broilers. *Bulletin of the Chiba Prefectural Livestock Research Center*. 2019;No.19:7-15.
- [42] Sasaki K, Sasaki D, Inoue J, Hoshi N, Maeda T, Yamada R, et al. *Bacillus coagulans* SANK 70258 suppresses Enterobacteriaceae in the microbiota of ulcerative colitis in vitro and enhances butyrogenesis in healthy microbiota. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2020;104(9):3859-67.
- [43] Miyamoto H, Miyamoto H, Tashiro Y, Sakai K, Kodama H. Studies on highly functional fermented-products made from unutilized biomass resources by thermophilic bacteria. *Seibutsu-kogaku Kaishi*. 2018;96:56-63.
- [44] Inabu Y, Taguchi Y, Miyamoto H, Etoh T, Shiotsuka Y, Fujino R, et al. Development of a novel feeding method for Japanese black calves with thermophile probiotics at postweaning. *Journal of Applied Microbiology*. in press.
- [45] Hristov AN, Oh J, Giallongo F, Frederick TW, Harper MT, Weeks HL, et al. An inhibitor persistently decreased enteric methane emission from dairy cows with no negative effect on milk production. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015;112(34):10663-8.
- [46] Mbakwa CA, Penders J, Savelkoul PH, Thijs C, Dagnelie PC, Mommers M, et al. Gut colonization with *Methanobrevibacter smithii* is associated with childhood weight development. *Obesity (Silver Spring)*. 2015;23(12):2508-16.
- [47] Miyamoto H, Suda W, Kodama H, Takahashi H, Nakanishi Y, Moriya S, et al. A novel sustainable role of compost as a universal protective substitute for fish, chicken, pig, and cattle, and its estimation by structural equation modeling. Preprint at [Available from: <https://arxiv.org/abs/2201.10895> (2022)].
- [48] Niisawa C, Oka S, Kodama H, Hirai M, Kumagai Y, Mori K, et al. Microbial analysis of a composted product of marine animal resources and isolation of bacteria antagonistic to a plant pathogen from the compost. *J Gen Appl Microbiol*. 2008;54(3):149-58.
- [49] 祥雲弘文, 伏信進矢. シトクローム P450nor の生理機能・反応機構・構造. *生化学*. 2008;80:560-8.
- [50] 宮本浩邦, 児玉浩明, 大野博司. 家畜・家禽類の生産性を制御する環境微生物－好熱菌・耐熱菌を中心として－. *畜産技術*. 2018;11月号:18-22.
- [51] 早石修. 握り飯より柿の種. *ファルマシア*. 2006;42:539-41.
- [52] S O, A C. The life and times of ivermectin-a success story. *Nat Rev Microbiol*. 2004;2:984-9.

## Fundamental grasp of the symbiotic system of intestinal mucosa and microorganisms, and its application to the development of environmental protective livestock technology

Hirokuni Miyamoto<sup>1,2,3</sup> and Hiroshi Ohno<sup>1</sup>

*1. RIKEN Center for Integrative Medical Sciences, Yokohama, Kanagawa 230-0045, Japan*

*2. Graduate School of Horticulture, Chiba University, Matsudo, Chiba 271-8501, Japan*

*3. Sermas Co., Ltd., Ichikawa, Chiba 272-0033, Japan*

### **[Abstract]**

Since the planetary boundaries framework defined safety for humanity and the stability of the Earth system, the United Nations has advocated "goals for building sustainable societies," so-called SDGs (Sustainable Development Goals). Along with such trends in the international community, people in various industrial fields perform the efforts for SDGs. The livestock industry is no exception. In particular, AMR (Antimicrobial resistance) measures to prevent the spread of drug-resistant bacteria that threaten human health by banning the use of artificial antibiotics are urgent issues. Here we introduce the basic information of the symbiotic intestinal system, which has made remarkable progress in recent years, and some of our efforts as an alternative to artificial antibiotics in the point of that perspective. The following intestinal symbiotic system was described: Toll-like receptors (TLRs) as sensors for intestinal microorganisms, G-coupled protein receptors (GPRs) as sensors for intestinal metabolites, and M cells as the starting point of intestinal immunity, and their intestinal interactions. In addition, grasping the need to control the livestock bacterial flora based on the symbiotic interactive networks between microorganisms, our research on environmental protection-type thermostable probiotics is highlighted. The information in this paper would contribute to sustainable livestock technology in the future.

**Keywords:** SDGs/intestinal mucosa/microorganisms/environment/livestock/thermostable probiotics