

論文博士

2023年3月

関西大学審査学位論文

牡蠣 (*Crassostrea gigas*) 熱水抽出物による
実験的大腸炎の緩和に関する研究

石田達也

牡蠣 (*Crassostrea gigas*) 熱水抽出物による実験的大腸炎の緩和に関する研究

<概要>

牡蠣の熱水抽出物（牡蠣肉エキス）の投与が大腸炎に代表される炎症性腸疾患に及ぼす影響を検討する目的で、デキストラン硫酸ナトリウム（DSS）によって急性および慢性大腸炎を惹起したマウスに牡蠣肉エキスを投与し、諸症状に及ぼす影響を検討した。低脂肪餌料を与えた健常マウスに牡蠣肉エキスを投与すると糞の細菌叢と短鎖脂肪酸組成に変化が認められたことから、牡蠣肉エキスには腸内細菌叢と細菌による短鎖脂肪酸の生成に影響を及ぼすことが確認された。低脂肪餌料およびこれに牡蠣肉エキスを添加した餌料で飼育したマウスに、DSSを単回または反復投与して、急性および慢性大腸炎を惹起させ、大腸の状態を検討したところ、牡蠣肉エキスは急性・慢性にかかわらず大腸炎の諸症状を緩和していた。また、DSS投与によって生じる糞中細菌叢の多様性低下と糞中短鎖脂肪酸総量の増加も牡蠣肉エキスによって緩和されていた。牡蠣肉エキスは、腸内細菌叢と腸内細菌による短鎖脂肪酸生成に影響を及ぼすことによって、急性および慢性大腸炎の諸症状を緩和したことから、ヒトの炎症性腸疾患における諸症状を緩和できる天然由来物質になり得る可能性があると考えられた。

<要旨>

潰瘍性大腸炎およびクローン病に代表される炎症性腸疾患（inflammatory bowel disease: IBD）は、自己免疫疾患の一種と考えられており、全国で約30万人の患者が存在している。正常な大腸粘膜上皮では、粘液や抗菌性物質が腸管バリアを形成して、病原性微生物の感染や腸内細菌に対する過剰な免疫応答に起因する腸管炎症を防止している。一方、IBDでは、腸内細菌叢や腸内細菌が生産する短鎖脂肪酸などの物質の組成変化などが引き金となってバリア機能に欠損が生じ、免疫異常が生じていることが指摘されている。したがって、IBDの予防や症状の改善には、腸内細菌叢や腸内細菌が生産する物質を健全な状態に維持・改善する必要があると考えられる。

IBDに対する抜本的な治療法は確立されておらず、対症療法として、抗炎症ステロイドや免疫抑制剤による症状管理が行われているが、再発と寛解を繰り返すことが多い。したがって、IBDに罹患した場合、これらの薬剤を長期間服用するケースが多く、副作用の問題が生じている。このため近年では、補完代替法として、症状の緩和に応用できる安全性の高い天然由来物質の探索および開発が進められている。

牡蠣 (*Crassostrea gigas*) は海のミルクと呼ばれ、亜鉛、タウリン、グリコーゲン、各種のビタミン、アミノ酸など、豊富な栄養素を含んでいる。牡蠣の摂取は、経験的に、二日酔

い症状の緩和、疲労回復、精力増強などにつながるとされる。しかし、牡蠣には重金属や貝毒などの有害物質が含まれていることがあり、日常的にその摂取を継続することには問題がある。このような背景から、牡蠣に含まれている栄養素および機能性成分を抽出・濃縮した牡蠣の熱水抽出物（牡蠣肉エキス）が開発されている。これまでに、牡蠣肉エキスに関して、抗不安作用、肝臓保護作用などの機能が報告されている。また安全性試験（単回投与試験・反復投与試験）においては、通常の摂取量であれば毒性を示さないことが報告されている。

他方、牡蠣肉エキスを日常的に摂取する潰瘍性大腸炎の患者からは、「便秘や下痢が改善した」などの大腸の機能改善を示唆する感想が寄せられている。また、牡蠣肉エキスの投与によって、化学物質による大腸前がん状態の惹起が抑制されることも示されている。しかしながら、これまでに、牡蠣肉エキスの摂取が大腸の炎症に及ぼす影響を科学的に調べた研究は行われていない。そこで本研究では、マウスにおける実験的大腸炎に及ぼす牡蠣肉エキスの緩和作用について検討した。

第1章では、牡蠣肉エキスが大腸内の細菌叢および短鎖脂肪酸組成に及ぼす影響を検討した。低脂肪および高脂肪の餌料、およびそれぞれに5%牡蠣肉エキス粉末を添加した合計4種の餌料を調製し、健常マウスに56日間投与した。投与期間の後半に糞を採取して、その細菌叢を調べたところ、低脂肪餌料を与えた場合に、牡蠣肉エキスを摂取した群では、乳酸菌 *Lactobacillus* 属の構成比率が増加していた。また糞中短鎖脂肪酸を分析したところ、牡蠣肉エキス添加餌料を与えた場合にプロピオン酸量を増加させていた。これらのことから、牡蠣肉エキスは、腸内細菌叢および腸内細菌が生産する物質、とくに短鎖脂肪酸の組成を変化させることが明らかになった。

第2章では、急性大腸炎モデルマウスに対する牡蠣肉エキス摂取の影響を検討した。低脂肪餌料、および低脂肪餌料に5% (w/w) 牡蠣肉エキスを添加した餌料を調製して、マウスに投与した。投与開始22日目から、飲水として大腸炎を誘発するデキストラン硫酸ナトリウム (DSS) の2.5%水溶液、または蒸留水を7日間与えた。DSSを投与したマウスでは、体重の減少、下痢・血便症状、disease activity index スコアの上昇、大腸長の短縮、脾臓重量の増加、結腸の陰窩損傷が生じており、急性大腸炎が誘発されたことが明らかだった。しかし、牡蠣肉エキスを与えていたマウスでは、DSS投与によるこれらの症状は緩和されていた。また、DSSの投与は糞中の総短鎖脂肪酸量を増加させたが、牡蠣肉エキスの摂取は、この増加を緩和していた。さらに糞の細菌叢を調べたところ、IBD患者に多く見られる腸内細菌である *Ruminococcus gnavus* が牡蠣肉エキス摂取群において減少していた。これらのことから、牡蠣肉エキスの摂取は、腸内細菌叢や腸内の短鎖脂肪酸生成に影響を与えることによって、急性の実験的大腸炎の諸症状を緩和したと考えられた。

第3章では、慢性大腸炎モデルマウスに対する牡蠣肉エキス摂取の影響を検討した。IBDが再発と寛解を繰り返す慢性疾患であることを念頭に、DSSの反復投与によってマウスに慢性の実験的大腸炎を惹起し、牡蠣肉エキスの緩和効果を検討した。低脂肪餌料、および低

脂肪餌料に 5% (w/w) 牡蠣肉エキスを添加した餌料を調製し、マウスに投与した。投与開始 22 日目から、飲水として 2.0%DSS 水溶液を 5 日間、その後蒸留水を 5 日間与えた。この DSS と蒸留水の連続投与を 3 回繰り返し、慢性の実験的大腸炎を惹起させた。牡蠣肉エキスは DSS の反復投与による体重の減少、血便症状、大腸長の短縮、脾臓重量の増加、結腸の陰窩損傷および糞中総短鎖脂肪酸量の増加を緩和した。糞を採取して細菌叢を調べたところ、DSS の反復投与は細菌叢の多様性を低下させていたが、牡蠣肉エキス投与はこの多様性低下を緩和していた。細菌叢の構成を調べたところ、慢性の実験的大腸炎を惹起させたマウスでは、IBD 発症との関連が指摘されている Proteobacteria 門と *Enterococcus* 属の構成比率が増加していたが、牡蠣肉エキスの投与はこれらの増加を緩和していた。これらのことから、牡蠣肉エキスの摂取は、ヒトの IBD により近い慢性大腸炎モデルマウスにおいても、その諸症状を緩和できると考えられた。

まとめでは、これまでに潰瘍性大腸炎抑制効果をもたらす天然物と牡蠣肉エキスとの比較を試みた。これまでに潰瘍性大腸炎抑制効果を示す天然物として、マグロ、柿タンニン、夏白菊（フィーバーフュー）、藻類油などが報告されている。しかし、これらの天然物は、すべて過剰に摂取した場合の健康障害について懸念があったり、不明であったりするものである。たとえば、柿のタンニンは過剰に摂取すると収斂作用が強く働き、便秘を引き起こす可能性がある。また、牡蠣と同じ水産物であるマグロは、メチル水銀を蓄積している場合があり、これを連日大量に摂取することはできない。牡蠣においても重金属や貝毒などが安全性の問題とされているが、熱水抽出にてエキス化することによって、これらの有害物質を分離しており、その安全性については十分に検証できている。

以上より、牡蠣肉エキスは、腸内細菌叢と腸内細菌による短鎖脂肪酸生成に影響を及ぼすことによって急性および慢性大腸炎の諸症状を緩和したことから、IBD 患者の症状緩和につながる安全な天然由来物質になり得る可能性がある結論した。

以上

目次

序論	1
第1章 正常マウスに対する牡蠣肉エキス摂取の影響	5
1-1. 序章	6
1-2. 実験方法と材料	7
1-3. 結果	11
1-3-1. 成長パラメーター	11
1-3-2. 糞中細菌叢	13
1-3-3. 糞中短鎖脂肪酸	18
1-4. 考察	19
第2章 急性大腸炎モデルマウスに対する牡蠣肉エキス摂取の影響	21
2-1. 序章	22
2-2. 実験方法と材料	22
2-3. 結果	25
2-3-1. 成長パラメーター, 血清検査, DAI スコア	25
2-3-2. 大腸の病理組織	28

2-3-3. 糞中短鎖脂肪酸	28
2-3-4. 糞中細菌叢	29
2-4. 考察	34
第3章 慢性大腸炎モデルマウスに対する牡蠣肉エキス摂取の影響	37
3-1. 序章	38
3-2. 実験方法と材料	38
3-3. 結果	40
3-3-1. 成長パラメーター, 大腸の長さ	40
3-3-2. DAI スコア	42
3-3-3. 血清検査	43
3-3-4. 大腸の病理組織	45
3-3-5. 大腸粘膜の遺伝子発現	46
3-3-6. 糞中短鎖脂肪酸	47
3-3-7. 糞中細菌叢	48
3-4. 考察	51
第4章 まとめ	55

参考文献 57

序論

1. 消化管と腸内細菌叢に関して

ヒトの消化管には1,000種類、100兆個以上、重さにして1~2 kgもの細菌が存在すると言われており、複雑な微生物生態系を形成している [1, 2]。腸内細菌叢の99%以上は、Firmicutes (64%~), Bacteroides (23%~), Proteobacteria (8%~), Actinobacteria (5%~) の4つの門で構成されている [3]。消化管内の細菌のほとんどは大腸に存在しており、結腸においては1 gあたり 10^{11} ~ 10^{12} の細菌が存在している [4]。近年になって、ヒトの健康と腸内細菌叢の密接な関係が次々に明らかにされてきている。腸内環境は腸内細菌叢やその代謝産物を含み、宿主への代謝、免疫、内分泌、アレルギーや自己免疫異常により発症する免疫疾患、自閉症などの脳神経疾患に影響を与えていることが分かってきている [5, 6, 7]。したがってヒトの健康を保つには腸内環境を良好に維持することが重要である。しかしながら、食の欧米化による高脂肪食の摂取、運動不足やストレス情勢により、腸内細菌叢の異常（ディスバイオーシス）が発生している。特に近年になって腸内環境の悪化による炎症性腸病患者数（inflammatory bowel disease: IBD）が急増していることが問題となっている。

2. IBD の患者数

IBDには潰瘍性大腸炎（ulcerative colitis: UC）およびクローン病（Crohn's disease: CD）に代表される慢性あるいは寛解・再燃性の腸管の炎症性疾患を総称する。UCは大腸の粘膜を直腸側から連続性に侵し、しばしば糜爛や潰瘍を形成する原因不明の炎症性疾患である。CDは消化管に非連続性に分布する全層性肉芽腫性炎症や瘻孔を特徴とする原因不明の炎症性疾患である [8]。最新の統計（2014年度）では全国で、潰瘍性大腸炎患者は約22万人、クローン病患者数は約7万人と推定されている [9]。これらの疾患は、原因不明の慢性的な下痢や強い腹痛を伴い、再発と寛解を繰り返す疾患であり、近年になって両疾患ともに急増している。

3. 腸管バリアに関して

正常な大腸粘膜上皮では、腸管バリアと呼ばれる物理的バリア（ムチン、上皮細胞のタイトジャンクション）、化学的バリア（粘液、消化液）、抗菌性物質が、病原性微生物の感染や腸内細菌に対する過剰な免疫応答に起因する腸管炎症を防止している。腸管バリアには抗菌性物質である哺乳類の代表的な抗菌ペプチドである、ディフェンシンファミリーとカセリジンファミリーがある。口腔から大腸までの消化管、気道、泌尿器、皮膚などの上皮細胞は抗菌ペプチドバリアとなる。大腸の抗菌ペプチドには β -ディフェンシン、カセリジンがある [10]。腸管上皮細胞は、栄養素の吸収に関与すると同時に、食品や腸内細菌などの抗原の無秩序な侵入を物理的・化学的に制御するバリア機能を担うことが知られている。こ

のような腸管上皮細胞の細胞間に局在するタイトジャンクション (tight junction: TJ) は、オクルディンやクローディンなどの膜貫通型タンパク質と、ゾウニユラ オクルディンなどの細胞内裏打ちタンパク質によって構成され、その機能は各 TJ 分子の発現量や局在の変化によっても調節されている。また、細胞間の抗原の無秩序な侵入を制御する細胞間接着因子でもあり、このバリア機能の破綻は種々の疾患の発症に寄与すると考えられている [11]。

4. 短鎖脂肪酸に関して

この腸管バリアには短鎖脂肪酸 (酢酸, プロピオン酸, 酪酸) が関与している。短鎖脂肪酸は難消化性多糖, 食物繊維を基質として, 腸内細菌 (主に Firmicutes 門と Bacteroidetes 門) による発酵によって生成される [12, 13, 14]。大腸にて産生された短鎖脂肪酸は, 大腸上皮細胞のエネルギー源として [15], 上皮細胞の増殖や粘液の分泌, 水やミネラルの吸収に関与している。更には, 宿主のエネルギー代謝機能に関与するだけでなく, 代謝系・免疫機能にまで影響を及ぼすことで, 生体の恒常性維持に密接に寄与することが明らかになってきている [16]。

酪酸とプロピオン酸は腸の生理機能と免疫機能の調節, 酢酸は脂質生成と糖新生の基質として機能する [17]。更に酢酸は, 病原性大腸菌 O157 の感染を予防することや腸管バリア機能を向上させることが明らかになっている [18]。短鎖脂肪酸は結腸の粘液分泌を促進する [19, 20]。腸の中の便と腸管壁の間には粘液の層があって [21], ここに水分が分泌されると滑りやすくなる。この粘液層によって, 便がスムーズに腸内を移行できるだけでなく, 便が腸管壁に触れることを防止する。つまり, 便に含まれる細菌が腸管壁から侵入することを防ぐバリアにもなる。短鎖脂肪酸は病原菌であるサルモネラ属を含むグラム陰性腸内細菌科の増殖を阻害する。最近になって, ムチンはバリア機能に加えて, その糖鎖が腸内細菌に資化され, 酪酸などの短鎖脂肪酸が産生されることから, 内因性の食物繊維であるとも考えられている [22]。

5. IBD の病因に関して

IBD は遺伝的要因に食習慣, 衛生環境, ストレスなどの環境因子が関与して腸管免疫や腸管内細菌叢の異常をきたして発症すると考えられているが, いまだに原因は解明されていない [23]。しかしながら, 腸粘膜の免疫系の調節機構が障害される自己免疫疾患が現在の総意である。IBD は免疫異常により, 炎症性細胞から放出される活性酸素種, 活性窒素種 [24, 25, 26], 炎症性サイトカイン, 炎症反応に関わるロイコトリエンの物質などが腸の粘膜を攻撃して, 潰瘍をつくる慢性の疾患である。IBD の発症因子や増悪因子として, 種々の食事成分が報告されている。特に高タンパク, 高脂肪食の過剰摂取が IBD の増悪因子として注目されている [27, 28, 29, 30]。

微生物等の外敵 (病原体) が腸管上皮細胞の腸管バリアを突破すると, 粘膜免疫が働く。腸管バリアの障害は, 炎症性腸疾患をもたらす。これらの病態では腸内細菌叢のディスバイ

オーシスが観察され、腸内環境の変化が腸管バリア機能の障害を誘導し、疾患の発症・増悪に寄与することも示唆されている。自然免疫系と獲得免疫系の炎症と炎症抑制のバランスにより腸管の恒常性を維持している。このバランスが崩れることが IBD の原因であると考
えられている [31]。

6. IBD と腸内細菌叢との関係

腸炎発症モデルマウスは無菌状態で生育させると腸炎を発症せず、腸内細菌の存在する通常状態で生育させて始めて腸炎を発症する [32]。CD の病態形成においては腸内細菌叢が重要な役割をはたすことが知られている。免疫関連遺伝子のノックアウトマウス (IL-2 欠損マウス, IL-10 欠損マウスなど) は CD 類似の大腸炎を自然発症するが、無菌環境で飼育すると発生しない。また、無菌環境下で飼育されたこれらのマウスを通常の飼育に戻すと腸炎を発症する [33]。このことは、腸炎の発症に腸内細菌が何らかの重要な役割を果たすと考えられている根拠となる。現在までの研究成果により、IBD ではディスバイオーシスが起こることが示唆されている。特定の微生物が IBD の腸管炎症を引き起こすかは厳密に明らかになっていないが、いくつかの報告がされている。まず、腸内細菌叢の多様性の減少、Firmicutes 門と Bacteroides 門の減少と、Proteobacteria 門の増加によって特徴付けられる [34]。CD では *Ruminococcus gnavus* は腸管粘液を攻撃する作用があり、粘液層の減少と関係し、さらには産生する多糖類が炎症応答を誘導することも報告されている [35]。

したがって、IBD の予防や症状の改善には、腸内細菌叢や腸内細菌が生産する物質を健全な状態に維持・改善する必要があると考えられる。IBD に対する抜本的な治療法は確立されておらず、対症療法として、抗炎症薬、特にステロイドと抗サイトカインは、IBD 患者に効果的であることが知られているが、時間の経過とともに、薬物による効果は弱まり、副作用を伴う問題を生じている [36]。両疾患共に発症ピークが若年者層に多いことから、長期に治療などで医療費の圧迫などが危惧される。また、薬剤を長期間服用するケースが多く、副作用の問題が懸念される。このため近年では、補完代替法として、症状の緩和に応用できる安全性の高い天然由来物質の探索および開発が進められている [37]。

7. 牡蠣肉エキスについて

牡蠣 (*Crassostrea gigas*) は世界中で最も広く分布している海洋生物の1つであり、日本では真牡蠣や岩牡蠣が棲息している。牡蠣はその高い栄養価と健康上の利点から、海のミルク、海の玄米と呼ばれ、亜鉛、タウリン、グリコーゲン、各種のビタミン、アミノ酸など、豊富な栄養素を含んでいる。牡蠣はその高い栄養価と健康上の利点から、古来より世界中で人類の貴重な食べ物とされてきた。特に真牡蠣は環境の変化にも強く、栄養のバランスも優れており、収穫年による栄養成分のばらつきも少ない品種である。牡蠣の摂取は、経験的に、二日酔い症状の緩和、疲労回復、精力増強などにつながるとされる。しかしながら、牡蠣には重金属や貝毒などの有害物質が含まれていることがあり、日常的にその摂取を継続することには問題がある [38]。

このような背景から、牡蠣に含まれている栄養素および機能性成分を抽出・濃縮した牡蠣の熱水抽出物(牡蠣肉エキス)が開発されている。牡蠣肉エキスの主成分には亜鉛、タウリン、グリコーゲン、アミノ酸、タンパク質などが含まれている。これまでの研究では、牡蠣肉エキスには、細胞内のグルタチオンの発現増加 [39]、フリーラジカル消去活性 [40]、抗腫瘍活性 [41]、血小板凝集抑制活性 [42]などの様々な健康促進機能があることが報告されている。また、安全性試験ではこれまでに、30日間連続投与試験、90日間反復投与毒性試験、変異原性試験、骨髄細胞小核試験、催奇形性試験、マウス精子奇形試験、医薬品との相互作用 [43]と様々な試験を実施してきたが、通常の牡蠣肉エキスの摂取量であれば毒性を示さないことが報告されている。

他方、牡蠣肉エキスを日常的に摂取する潰瘍性大腸炎の患者からは、「便秘や下痢が改善した」などの大腸の機能改善を示唆する感想が寄せられている。また、牡蠣肉エキスの投与によって、化学物質による大腸前がん状態の惹起が抑制されることも示されている [44]。しかしながら、これまでに牡蠣肉エキスの摂取が大腸の炎症に及ぼす影響を科学的に調べた研究は行われていない。加えて、亜鉛やタウリンは大腸における炎症を抑えることが知られている [45]。以上のことから、大腸の炎症に関して牡蠣肉エキスが寄与していると考え、試験を開始した。

以上の背景をもとに本研究では、ヒトの炎症性腸疾患における諸症状を緩和できる天然代替候補物として牡蠣熱水抽出物にて検証した。

第1章では、牡蠣肉エキスが大腸に与える要因を検証する為に健常マウスの細菌叢と代謝物の変化を検証した。

第2章では、DSSを単回投与した急性大腸炎モデルマウスに対する影響の検討をおこなった。

第3章では、臨床モデルに近付ける為にDSSを反復投与した慢性大腸炎モデルマウスに対する影響の検討をおこなった。

第1章 正常マウスに対する牡蠣肉エキス摂取の影響

要約

牡蠣肉エキスには、グリコーゲン、タウリン、亜鉛など多くの栄養成分が含まれている。我々の以前の研究では、牡蠣肉エキスがラットの盲腸内容物中の *Lactobacillus* 属の構成比率を増加させていた。しかし、牡蠣肉エキスの *Lactobacillus* 属のこの増加がマウスにおいても同様の結果を示すかは明らかではなかった。本研究では、マウスの糞便中の微生物叢と短鎖脂肪酸の組成に対する牡蠣肉エキスの影響を示した。雄性 C57BL/6J マウスを4つの群に分け、AIN-93G 食餌 (LF 食餌), AIN-93G 改変高脂肪食餌 (HF 食餌), 5% (w/w) 牡蠣肉エキスを含む LF 食餌 (LFOE), 牡蠣肉エキスを含む 5% (w/w) HF 食餌を56日間与えた。糞便中の細菌叢の構成比率は、イオン PGM システムを使用したハイスループット 16S rRNA 遺伝子アンプリコンシーケンス後の群間で比較した。牡蠣肉エキスを給餌したマウスの糞便中の *Lactobacillus* 属の構成比率の増加は、牡蠣肉エキスを与えていないマウスよりも有意に高かった。これらの結果は牡蠣肉エキスの給餌はラットだけでなく、マウスにおいても同様の働きがあることを示した。

1-1. 序章

牡蠣 (*Crassostrea gigas*) には、亜鉛、グリコーゲン、タウリンなどの様々な栄養・機能性成分が含まれている。この栄養・機能性成分を抽出・濃縮した牡蠣肉エキスが健康食品の原料として用いられている。これまでに牡蠣肉エキス中の亜鉛の生体利用性に関する研究報告が数多くなされている [46] [47] [48]。また、牡蠣肉エキスの摂取による生体調節機能については、血小板凝集抑制効果 [49]や肝臓保護効果 [50]が報告されている。また腎障害 [51]モデル動物に対する牡蠣肉エキス摂取の有益な効果を報告している。

近年、宿主の健康と腸内細菌叢の密接な関係が次々に明らかにされてきている。ヒトの消化管には 10^{13} 個以上もの多種多様な細菌が存在しており、複雑な微生物生態系を形成している。これまで、腸内に存在する多くの嫌気性細菌は培養することができなかったために、大半が機能未知であった。しかし、ゲノム分析技術の発展によって、16S リボソーム RNA (rRNA) 系統解析やメタゲノム解析が可能になったことで、著しい腸内細菌研究の進展が見られるようになった。腸内細菌の多様性の減少や偏った菌種の異常な増加による腸内細菌叢の乱れ (dysbiosis) は、腸管免疫を起点とする恒常性維持システムに異常を起し、疾患の原因となる [52]。例えば、偏った食事や栄養は、腸内細菌叢の変化を介して宿主の健康状態によって、マウスの Firmicutes 門の増加および Bacteroidetes 門の減少とともに、腸内細菌叢の多様性が失われることが報告されている [53]。これまでに我々は、牡蠣肉エキスの摂取には盲腸内 *Lactobacillus* 属の構成比率を増加させることを、高脂肪餌料を与えたラット試験によって観察している [54]。そこで本研究では、牡蠣肉エキスの給餌による *Lactobacillus* 属の構成比率の増加が、ラット以外の種、または低脂肪餌料の給餌においても同様に起きる現象であるのか明らかにすることを目的とし、牡蠣肉エキスを添加した2種の餌料 (低脂肪および高脂肪) 餌料をマウスに給餌し、糞中細菌叢およびその代謝物である短鎖脂肪酸組成に及ぼす影響を評価した。

1-2. 実験方法と材料

1-2-1. 餌料調製

新鮮な生牡蠣を熱水で抽出し（約 90°C，約 2 時間），固形物をろ過で取り除き，ろ液をドラム乾燥機で乾燥させた（110°C で 2.25 時間）。得られた粉末を牡蠣肉エキス（OE）と名付けた。牡蠣肉エキスの栄養成分（炭水化物，グリコーゲン，タンパク質，アミノ酸，タウリン，脂肪，灰分，塩化ナトリウム，亜鉛，水分）を食品分析センター（東京，日本）にて測定した。牡蠣肉エキスの製法を（Fig.1-1）と牡蠣肉エキスの一般成分組成を Table 1-1 に示した。

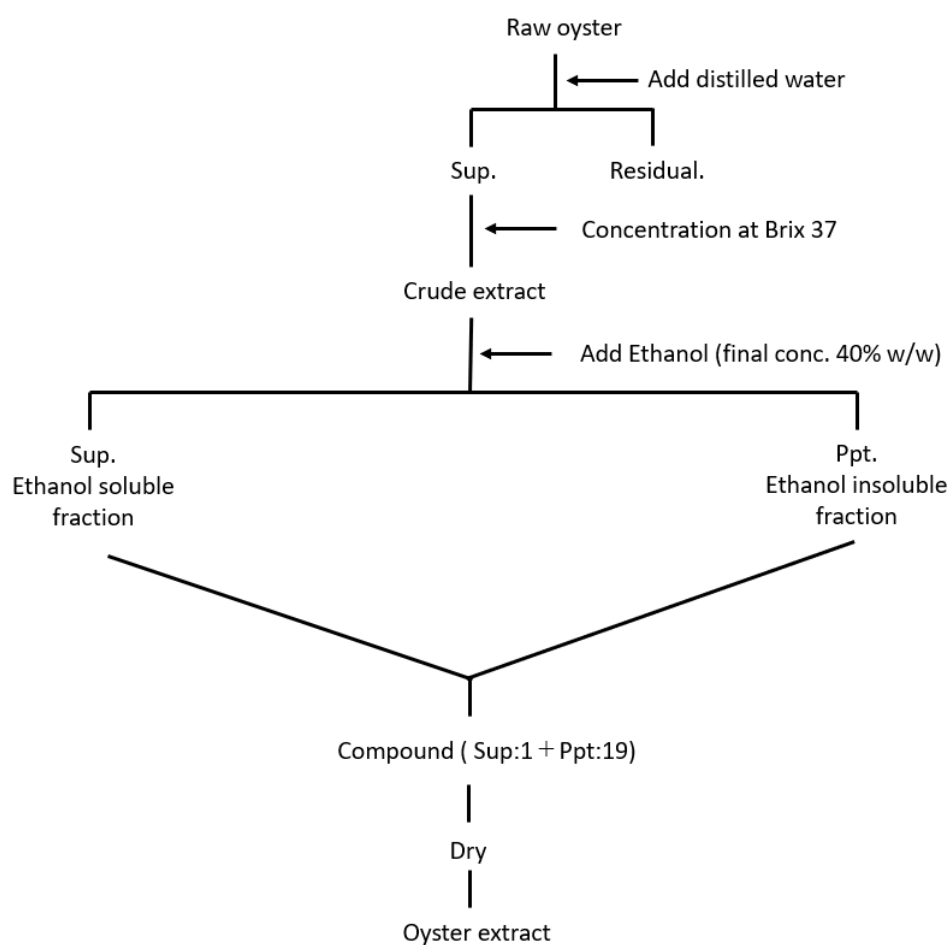


Fig 1-1. Production method of oyster extracts.

Table 1-1. Composition of the oyster extract.

Carbohydrate	50.6 g
Glycogen	34.5 g
Protein	28.1 g
Taurine	5.5 g
Lipid	2.0 g
Ash	15.4 g
NaCl	8.2 g
Zn	37.7 mg
Moisture	3.9 g

Oyster-extract was provided by Japan Clinic Co., Ltd. (Kyoto, Japan).

Composition per 100 g of oyster extract.

餌料は、AIN-93G 組成 [55]の NaCl 量を改変した低脂肪餌料(LF, 大豆油 7%, w/w)と、この LF 餌料を 20%高脂肪 (大豆油 7%+ラード 13%, w/w) に改変した高脂肪餌料 (HF) を調製した。さらに、LF および HF 餌料に 5% (w/w) 牡蠣肉エキス (OE) を添加し、炭水化物, タンパク質, 脂肪および NaCl 量が LF または HF 群と同等になるように LFOE および HFOE 餌料を調製した。各餌料の組成を Table.1-2 に示した。

Table 1-2. Composition of experimental diets.

	LF	LFOE	HF	HFOE
Dextrinized corn starch	132	132	92.1	92.1
Corn starch	397.486	366.486	277.386	246.386
Sucrose	98.47	100	98.47	100
Cellulose	50	50	50	50
Casein	200	182.3	230	212.3
L-Cystine	3	3	3	3
Choline bitartrate	2.5	2.5	2.5	2.5
AIN-93G mineral mixture	35	-	35	-
NaCl-free AIN-93G mineral mixture	-	35	-	35
AIN-93 vitamin mixture	10	10	10	10
Soybean oil	70	68.7	70	68.7
Lard	-	-	130	130
Oyster-extract	-	50	-	50
NaCl	1.53	-	1.53	-
tert-Butylhydroquinone	0.014	0.014	0.014	0.014

AIN, American Institute of Nutrition; HF, high-fat; HFOE, high-fat diet containing oyster-extract; LF, low-fat; LFOE, low-fat diet containing oyster-extract.

1-2-2. 動物実験

本実験は関西大学動物実験委員会の承認を受けて実施した（承認番号：1819）。実験動物には4週齢雄性 C57BL/6J マウス（日本エスエルシー株式会社，静岡）を用い，24匹を6匹ずつ平均体重が同等になるように4群に分けた。マウスは室温 22°C ± 1°C，明暗 12 時間サイクル（8：00～20：00）の条件下で飼育した。実験餌料および水は自由摂取とし，56 日間飼育した。飼育期間終了後，イソフルラン（共立製薬株式会社，東京）による深麻酔下で下大静脈より採血し，肝臓，盲腸および白色脂肪組織（WAT）を採取した。血清は，血液を 2,000×g，15 分間遠心分離して得た。肝臓および盲腸は液体窒素にて急速凍結し，-80°C で保管した。また，解剖前日の 1 日分の糞を採取し，臓器と同様の方法で凍結・保管した。

1-2-3. 糞中細菌叢

各個体の 1 日分の糞から，QIAamp DNA Stool Mini Kit (Qiagen, Venlo, Netherlands) を用いて Total DNA を抽出した。抽出した Total DNA から細菌の同定を行うために，16S rRNA 遺伝子の V2-4-8, V3-6 および V7-9 領域を，Ion 16S Metagenomics Kit

(Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA)を用いて PCR 法により増幅させた。PCR 産物は AMPure XP ビーズ (Beckman Coulter, California, USA)を用いて精製した。精製した PCR 産物は、 Ion Plus Fragment Library kit および Ion Xpress Barcode Adaptors 1-16 kit (ともに Thermo Fisher Scientific)を用いて、 Ion PGM system での解析に必要なアダプター配列および個体識別の為にバーコード配列を付加させ、 DNA ライブラリを作製した。再び AMPure XP ビーズを用いて DNA ライブラリを精製し、次いで各 DNA ライブラリ濃度をバイオアナライザー (Agilent 2100 : Agilent Technologies, California, USA) により定量した。各 DNA ライブラリを 10 pM に希釈し、エマルジョン PCR およびエンリッチメント処理をそれぞれ Ion OneTouch 2 と Ion OneTouch ES systems (ともに Thermo Fisher Scientific)で行った。調製した 16S rRNA 遺伝子フラグメントライブラリのシーケンス解析には、 Ion PGM System, Ion PGM 400 sequencing reagents, Ion 318 v2 chips および Torrent Suit Software ver.5.6 (Thermo Fisher Scientific)を用いた。

得られた配列データは、 MicroSEQ 16S Reference Library v2013.1 (Thermo Fisher Scientific)と Greengenes v13.5 (The Greengenes Database Consortium, <http://greengenes.secondgenome.com/>)を参照配列とする Ion Reporter Software 16S Metagenomics Workflow ver.5.10 (Thermo Fisher Scientific)を用いて解析した。Ion Reporter Software によって、各サンプルの門および属の分類階級で同定された細菌とそのリード数のデータを得た。得られたリード数を用いて、各分類階級での細菌の構成比率を求めた。

レアファクション解析 (chao1 推定量および simpson 指数)は、 QIIME を用いた Ion Reporter Software 16S Metagenomics Workflow ver.5.10 により求めた。また、各群の門および属レベルの構成比率をもとに、 R [56]を用いて階層的クラスタリングを行った。さらに、 Linear discriminant analysis effect size (LEfSe)分析 (<http://huttenhower.sph.harvard.edu/galaxy/>) [57]を行って、各群の腸内細菌叢のバイオマーカーを調べた。

1-2-4. 糞中短鎖脂肪酸

盲腸内容物を蒸留水に懸濁し、 pH メーター (F-21, 株式会社堀場製作所, 京都)を用いて pH を測定した。糞中短鎖脂肪酸 (SCFA) 組成は、 2-エチル酪酸を内部標準として、ガスクロマトグラフ (GC) を用いて分析した [58]。凍結乾燥した糞をミルで粉末化し、蒸留水を加え、十分にボルテックスした。次に、 2-エチル酪酸、塩酸およびジエチルエーテルをそれぞれ添加し、攪拌した。その後、遠心分離 (10 分, 16,000 rpm, 4°C) し、上清を回収し、ナイロンフィルター (0.45 μm) でろ過した。Nukol™ キャピラリーカラム (30 m × 0.25 mm i.d. × 0.25 μm d.f., Merck KGaA, Darmstadt, Germany) を備えた水素炎イオン化検出器 GC (GC-2014, 株式会社島津製作所, 京都) を用いて SCFA を分析

した。カラムオープン温度プログラムは、初期温度は 40°C に設定し、その後、180°C に達するまで温度を 20°C/分上昇させ、180°C で 15 分間放置した。キャリアガスはヘリウムで 1 mL/分の流量とした。各短鎖脂肪酸の成分は Volatile Free Acid Mix certified reference material (Merck KGaA) を用いて同定した。

1-2-5. 統計処理

得られた測定値は平均値±標準誤差で示した。餌料中脂肪濃度および餌料中の牡蠣肉エキスの有無を因子として二元配置分散分析を行った。有意水準は $p < 0.05$ とし、 $0.05 \leq p < 0.15$ の場合は傾向があるとした。二元配置分散分析において、相互作用に有意差が認められた場合は、Tukey's multiple comparisons test による多群間比較を行った。統計解析は GraphPad Prism ver. 7.0d (GraphPad Software, California, USA) を用いて行った。

1-3. 結果

1-3-1. 成長パラメーター

Table 1-3 に成長パラメーターおよび解剖時臓器重量を示した。終体重および体重増加量において、餌料中脂肪濃度が影響する傾向がみられた (それぞれ $p = 0.135$ および $p = 0.104$)。餌料摂取量は、餌料中脂肪濃度の影響がみられた。体重増加量を餌料摂取量で除して算出した餌料効率も、餌料中脂肪濃度の影響が認められた。初体重は、各群間で有意差は見られなかった。一方、解剖時臓器重量において、肝臓重量は餌料中脂肪濃度および牡蠣肉エキスの影響が認められた。精巣上体周囲 WAT 重量では、餌料中脂肪濃度の影響が認められた。また、腎臓周囲 WAT 重量では、餌料中脂肪濃度が影響する傾向がみられた ($p = 0.057$)。腸間膜 WAT および鼠径部 WAT 重量には、各群間で有意な変化は見られなかった。

Table 1-3. Growth parameters and organ weight.

	Groups								Two-way ANOVA (P value)		
	LF	LFOE	HF	HFOE	Diet	OE	Diet x OE				
Growth parameters											
Initial body weight (g)	15.3 ± 0.4	15.3 ± 0.3	15.3 ± 0.5	15.3 ± 0.3	0.961	0.961	0.987				
Final body weight (g)	28.9 ± 0.8	28.6 ± 0.8	30.1 ± 0.4	30.0 ± 1.1	0.135	0.788	0.929				
Body weight gain (g/day)	0.24 ± 0.01	0.23 ± 0.01	0.26 ± 0.01	0.26 ± 0.02	0.104	0.791	0.917				
Food intake (g/day)	3.00 ± 0.06	2.94 ± 0.06	2.86 ± 0.10	2.72 ± 0.08	0.030	0.211	0.630				
Food efficiency (g/kcal) [†]	0.080 ± 0.004 ^a	0.079 ± 0.003 ^b	0.091 ± 0.003 ^{ab}	0.094 ± 0.005 ^b	0.002	0.718	0.617				
Organ weights (g/100g BW)											
Liver	4.25 ± 0.10 ^{ab}	4.56 ± 0.14 ^a	3.73 ± 0.17 ^b	4.16 ± 0.04 ^{ab}	0.001	0.006	0.611				
Epididymal WAT	2.55 ± 0.23 ^b	2.76 ± 0.23 ^{ab}	3.59 ± 0.20 ^a	3.52 ± 0.37 ^{ab}	0.002	0.796	0.607				
Perirenal and retroperitoneal WAT	1.08 ± 0.13	1.14 ± 0.14	1.47 ± 0.10	1.28 ± 0.15	0.057	0.648	0.366				
Mesentery WAT	1.82 ± 0.09	1.80 ± 0.09	1.88 ± 0.12	1.95 ± 0.15	0.348	0.828	0.696				
Inguinal WAT	0.82 ± 0.08	0.85 ± 0.17	1.07 ± 0.10	0.74 ± 0.12	0.535	0.233	0.152				

Data represent means ± SEM. Values in the same row not sharing a common superscript are significantly different at $p < 0.05$ using Tukey's multiple comparison test.

[†] Food efficiency (g/g) = BW gain (g/day) / food intake (g/day).

ANOVA, analysis of variance; BW, body weight; HF, high-fat; HFOE, high-fat diet containing oyster-extract; LF, low-fat; LFOE, low-fat diet containing oyster-extract; OE, oyster-extract, WAT, white adipose tissue.

1-3-2. 糞中細菌叢

糞より Total DNA を抽出し、これを鋳型に 16S rRNA 遺伝子の超可変領域を PCR で増幅させ、Ion PGM System でシーケンスした。その結果、各個体の試料から $457,437 \pm 33,647$ リードの配列データが得られ、低品質のデータを除いた $349,163 \pm 25,547$ リードの配列データを解析に用いた。また、各群の平均リード数には有意差はなかった。Fig.1-2 に属レベルの Chao1 推定量および Simpson 指数のレアファクション解析結果を示した。両指数において、各群間で有意な変化は見られなかった。さらに、両指数ともに 3 万リードまでで飽和に達し、実質的に十分なリード数が解析に供されたと考えられる。

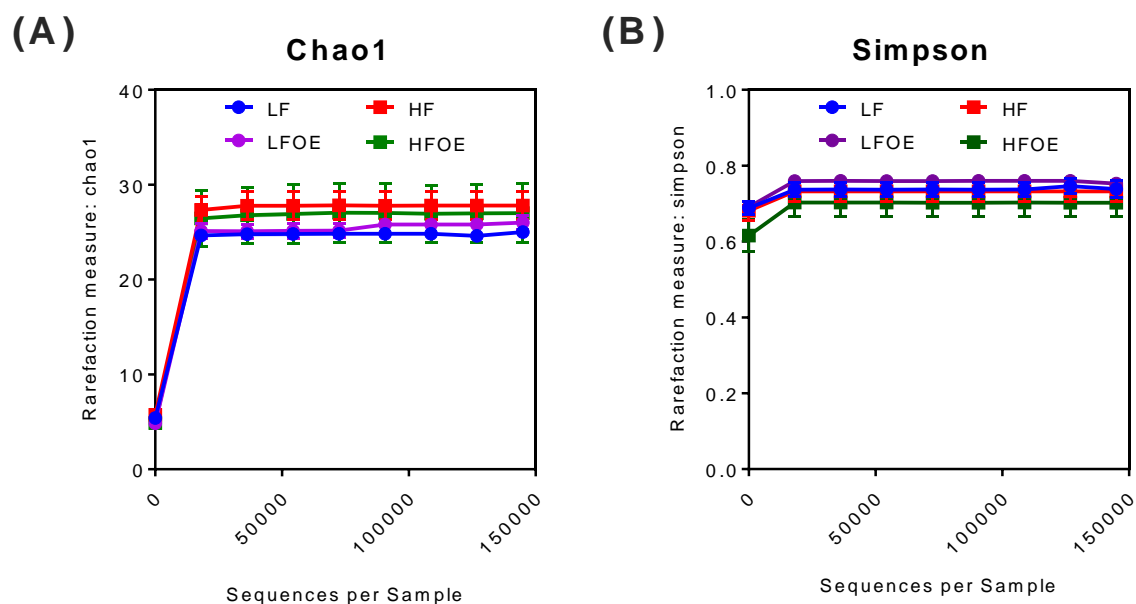


Fig 1-2. Bacterial rarefaction curves based on Chao 1 (A) and Simpson (B) in genus level
The data are shown as mean value \pm SEM.

HF, high-fat; HFOE, high-fat diet containing oyster-extract; LF, low-fat; LFOE, low-fat diet containing oyster-extract.

Fig 1-3 に門 (A) および属 (B) レベルの分類階級別の細菌叢の構成比率と階層的クラスタリングを示した。門および属ともに、LF 群において構成比率の高いものから示し、構成比率 0.5%未満の細菌は Others にまとめた。門レベルの構成比率を見ると、Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria および Proteobacteria 門で 98%が構成されていた。クラスター解析の結果、LF 群および LFOE 群、また HF 群および HFOE 群が同一のクラスターとなり、餌料中脂肪濃度の違いによって分類された。

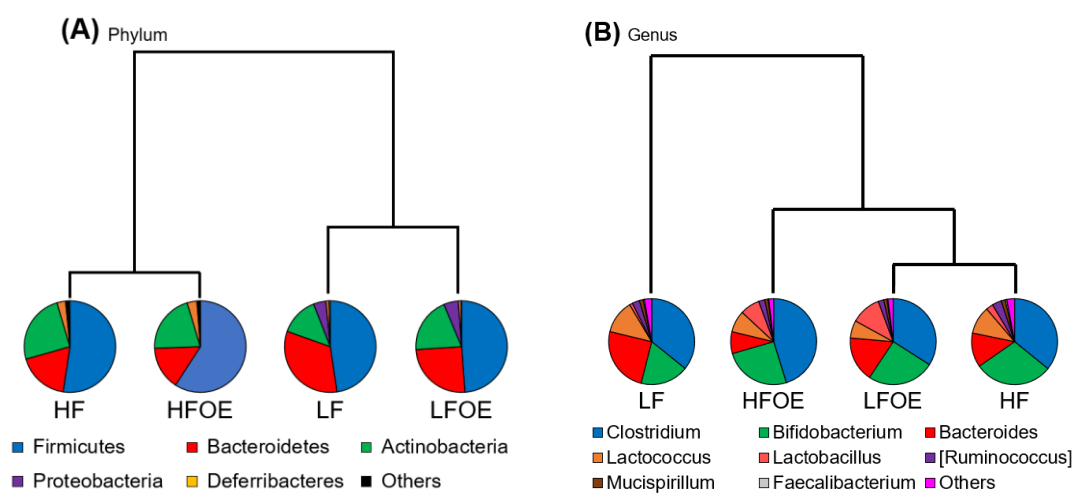


Fig 1-3. Relative abundance of fecal microbiota on the phylum (A) and genus (B) levels. Graphs are stacked from higher relative abundance in LF groups, and those with less than 0.5 % of the relative abundance are summarized as Others.

HF, high-fat; HFOE, high-fat diet containing oyster-extract; LF, low-fat; LFOE, low-fat diet containing oyster-extract.

Fig 1-4A に Firmicutes 門および Bacteroidetes 門の構成比率を示した。Firmicutes 門の構成比率は、餌料中脂肪濃度の影響が認められた。一方、Bacteroidetes 門の構成比率は、餌料中脂肪濃度および牡蠣肉エキスの影響が認められた。

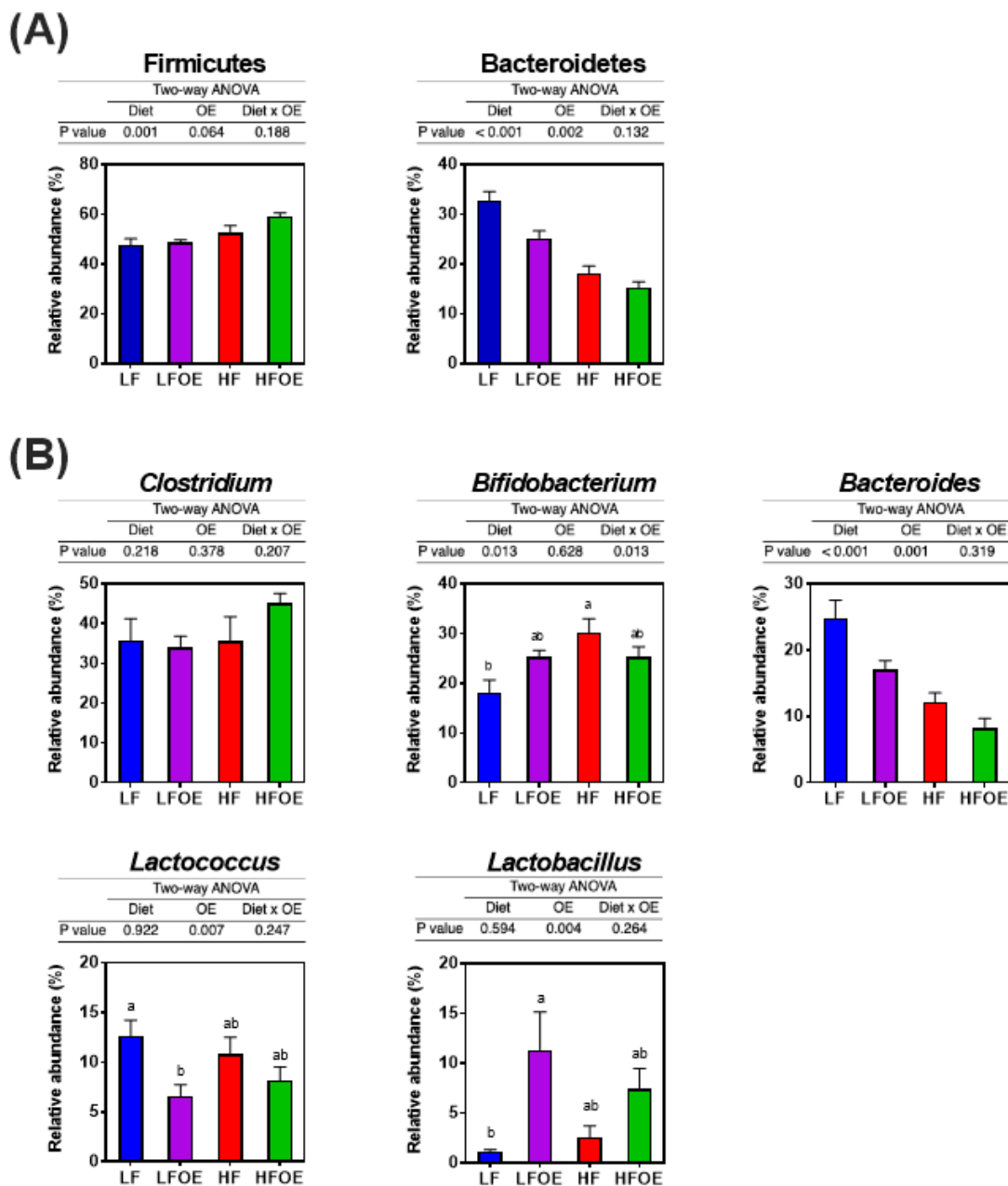


Fig 1-4. Relative abundance of predominant microbes on the genus level Data represent mean \pm SEM. Different letters indicate significant differences at $P < 0.05$ using Tukey's multiple comparison test. ANOVA, analysis of variance; BW, body weight; HF, high-fat; HFOE, high-fat diet containing oyster-extract; LF, low-fat; LFOE, low-fat diet containing oyster-extract; OE, oyster-extract.

階層的クラスタリング解析の結果、LFOE 群が HF 群と同一のクラスターに分類され、LF 群とは異なるクラスターに分類された。そのため属レベルの構成比率では、低脂肪餌料に牡蠣肉エキスを添加することによって、高脂肪餌料給餌群でみられる細菌叢の構成に近づく可能性が示された。Fig.1-4B に *Clostridium*, *Bifidobacterium*, *Bacteroides*, *Lactococcus* および *Lactobacillus* 属の構成比率を示した。*Clostridium* 属は各群間で有意な変化はみられなかった。*Bifidobacterium* 属は、餌料中脂肪濃度の影響が認められ、LF 群と比較して、HF 群で有意な増加が確認された。*Bacteroides* 属は、餌料中脂肪濃度および牡蠣肉エキスの影響が認められた。*Lactococcus* 属は、牡蠣肉エキスの影響が認められた。

各群に特徴的な細菌を同定するため、LEfSe 解析を行った (Fig.1-5)。その結果、計 33 の系統が同定された。LF 群では、*Bacteroides*, *Lactococcus*, *Subdoligranulum*, *Alistipes*, *Ruminococcus* および *Akkermansia*, LFOE 群では、*Lactobacillus* および *Stomatobaculum*, HF 群では、*Bifidobacterium*, *Parvibacter* および *Dorea*, HFOE 群では、*Lachnoclostridium* が属レベルとして同定された。

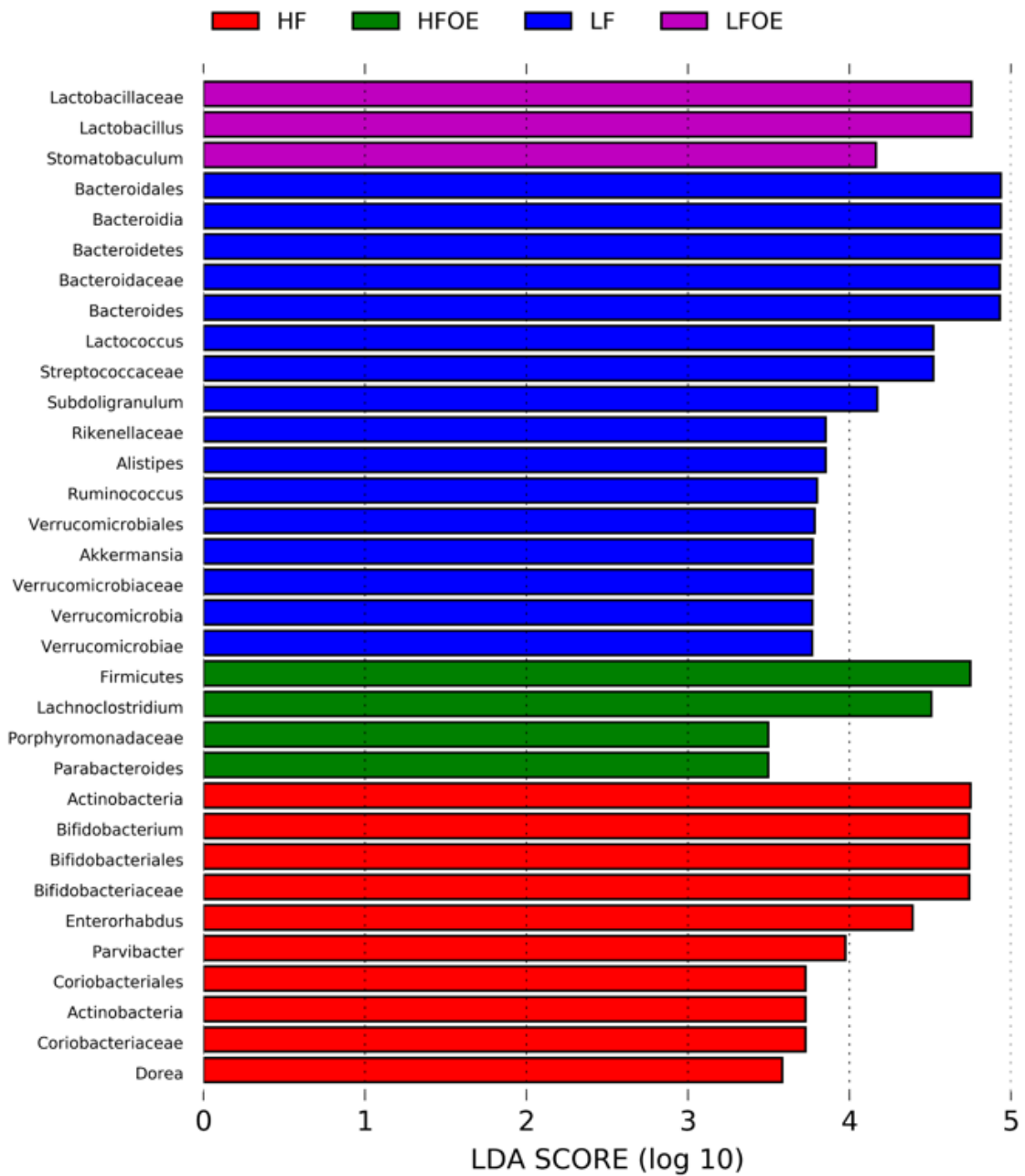


Fig 1-5. Comparisons of gut bacteria using linear discriminant analysis effect size (LEfSe) HF, high-fat; HFOE, high-fat diet containing oyster-extract; LF, low-fat; LFOE, low-fat diet containing oyster-extract; OE, oyster-extract.

1-3-3. 糞中短鎖脂肪酸

Fig 1-6 に糞へ排泄された短鎖脂肪酸量を示した。糞プロピオン酸量において、餌料中牡蠣肉エキスの影響が認められた。

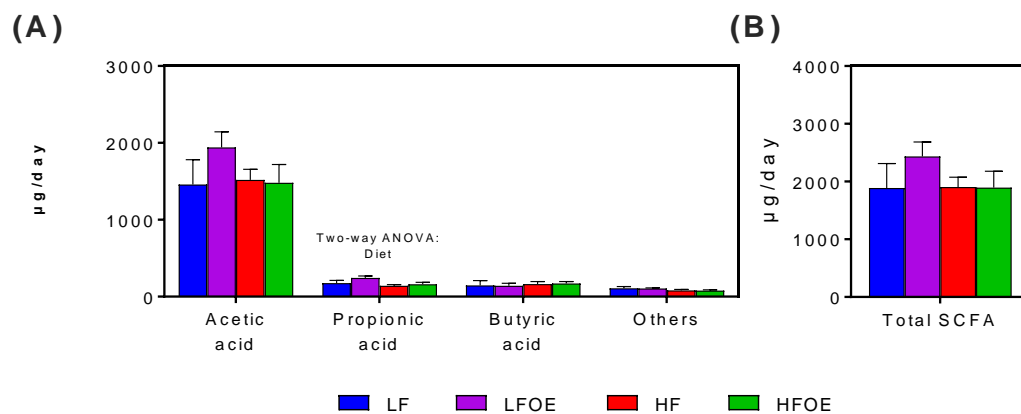


Fig 1-6. Fecal short-chain fatty acid (SCFA) composition.

(A) SCFA composition in feces, (B) Total SCFA content in feces.

Data represent mean \pm SEM. Different letters indicate significant differences at $P < 0.05$ using Tukey's multiple comparison test.

ANOVA, analysis of variance; HF, high-fat; HFOE, high-fat diet containing oyster-extract; LF, low-fat; LFOE, low-fat diet containing oyster-extract; SCFA, Short-chain fatty acid.

1-4. 考察

Table 1-2 より、本実験で用いた C57BL/6J マウスに長期的に高脂肪餌料を給餌すると、低脂肪餌料と比較して、体重が増加し、肥満が誘導されることが知られている [59]。本実験において、高脂肪餌料給餌群は、精巣上体周囲 WAT 重量の有意な増加、および終体重と腎臓周囲 WAT 重量の増加傾向がみられたことから、若干肥満が誘導された状態であると判断した。また、牡蠣肉エキスの給餌によって、体重 100 g あたりの肝臓重量の有意な増大がみられた ($p=0.006$)。ラットに牡蠣肉エキスを給餌した前報 [54] においても同様に、肝臓重量が増大する傾向がみられたが、重量増加に関与すると考えられる肝臓総脂質濃度には影響はみられなかった。今後、牡蠣肉エキスの給餌による齧歯類の肝臓重量増大の原因を明らかにする必要がある。

Fig 1-2 より、Chao1 推定量および Simpson 指数の両指数において、各群間で有意な変化は見られなかったことから、餌料中脂肪濃度および牡蠣肉エキスは、腸内細菌叢の多様性には影響を与えなかったと考えられる。Fig.1-3A より、これまでに高脂肪餌料をマウスに給餌すると、Firmicutes 門に分類される細菌が増加し、Bacteroidetes 門に分類される細菌が減少することが報告されている [60]。Fig.1-4A より、これまでの報告 [60]と同様に、本実験においても高脂肪餌料の給餌によって Firmicutes 門の構成比率が増加し、Bacteroidetes 門の構成比率が減少する結果が得られた。一方、Fig.1-3B の属における構成比率では、*Clostridium*, *Bifidobacterium*, *Bacteroides*, *Lactococcus* および *Lactobacillus* 属で 90%以上が構成されていた。Fig 1-4B より、*Lactobacillus* 属は、牡蠣肉エキスの影響が認められた。これまでの試験において、ラットに牡蠣肉エキスを給餌すると、盲腸内の *Lactobacillus* 属の構成比率が上昇することが報告されている [54]。そのため牡蠣肉エキスの給餌は、ラットだけでなくマウスにおいても *Lactobacillus* 属の構成比率を増加させると考えられる。Fig 6 より、プロピオン酸は、主に *Clostridia*, *Desulfovibrio*, *Propionibacterium* や *Bacteroides* によって生成されることが知られている [61]。低脂肪群 (LF および LFOE 群) で *Bacteroides* の構成比率が増加していた (Fig.1-4B)。一方、*Desulfovibrio* および *Propionibacterium* は本実験では検出されず、*Clostridia* は各群間で変化は見られなかった (data not shown)。そのため、低脂肪群で観察された糞プロピオン酸の増加は、*Bacteroides* の構成比率の増加が関係していると考えられる。腸内細菌により生成された短鎖脂肪酸は、大腸の粘膜細胞により腸内容物中の水分吸収の際のエネルギー源として利用されることが明らかにされており、この吸収作用のため、盲腸内容物と糞の短鎖脂肪酸量に差が出ることを報告されている。一方で、盲腸内容物と糞の細菌叢の構成はほとんど同じことが報告されている [62]。そのため、腸内細菌叢の違いによる短鎖脂肪酸組成の変化を検証する為には、糞短鎖脂肪酸のみではなく、盲腸内容物の短鎖脂肪酸組成も合わせて測定する必要があると考えられる。一方、糞総短鎖脂肪酸、酢酸、酪酸、Others (イソ酪酸、吉草酸およびイソ吉草酸の総量) に各群間に有意な差は見られなかった。また、盲腸内容物の pH にも各群間で有意な変化はみられなかった

(data not shown)。 *Lactobacillus* の構成比率の上昇といった腸内細菌叢の変化を引き起こした牡蠣肉エキス中の成分として、牡蠣肉エキスの約半分を占めるグリコーゲンが考えられる。これまでに、グリコーゲンをラットに給餌すると、糞の *Bifidobacterium* や *Lactobacillus* といった有用菌が顕著に増加する事が報告されている [63]。一方、牡蠣肉エキスに含まれているタウリンは、腸内細菌叢の多様性やその構成比率に影響を与えないことが、培養系ヒト腸内細菌叢モデルを利用した *in vitro* 試験において報告されている [64]。そのため、かき肉エキス中のグリコーゲンによって、糞中 *Lactobacillus* の構成比率が増加したと考えられる。

第2章 急性大腸炎モデルマウスに対する牡蠣肉エキス摂取の影響

要約

炎症性腸疾患に関する医薬品は深刻な副作用を伴う可能性があり、天然物に由来する代替候補資源物の開発に注目が集められている。牡蠣肉エキス (OE) はマウスにおいて、腸内細菌叢に影響を与える事が示唆された。本研究では、デキストラン硫酸ナトリウム (DSS) によって誘発される急性実験的大腸炎モデルマウスの糞便中の腸内細菌叢およびその代謝物に対する牡蠣肉エキス給餌の抗大腸炎効果を検証した。雄性的 C57BL/6J マウスを3群に分け、(1) AIN93G 食餌+DSS 未処理, (2) AIN93G 食餌+DSS 処理, (3) 5%OE 食餌+DSS 処理。各群に各食餌を与えた。投与開始 22 日目に飲水として 2.5%DSS 溶液を7日間与えて急性大腸炎を誘発した。DSS を投与したマウスでは、体重の減少、下痢・血便症状、disease activity index スコアの上昇、大腸長の短縮、脾臓重量の増加、結腸の陰窩損傷が生じており、急性大腸炎が誘発されたことが明らかだった。しかし、牡蠣肉エキスを与えていたマウスでは、DSS 投与によるこれらの症状は緩和されていた。さらに、牡蠣肉エキスは糞中の細菌叢の構成を変化させ、糞便の短鎖脂肪酸量を改善した。これらのことから、牡蠣肉エキスの摂取は、腸内細菌叢や腸内の短鎖脂肪酸生成に影響を与えることによって、急性の実験的大腸炎の諸症状を緩和したと考えられた。

2-1. 序章

第1章において牡蠣肉エキスが正常マウスの腸内細菌叢および短鎖脂肪酸の組成を変化させることが明らかになった [65]。IBD の病因は、腸内の細菌叢とその代謝物の変化、腸管上皮バリア障害、免疫調節不全、環境要因、および遺伝的感受性を含む多因子性疾患であると示唆される [66]。腸内細菌叢の構成割合は、宿主の健康と密接に関連しており [67]、IBD とも密接に関連している [37]。宿主と細菌叢のクロストークは、全身の恒常性を維持する上で重要な役割を果たし、細菌の構成や細菌の代謝物の変化などの腸内環境の悪化が腸の炎症を引き起こす [67]。特に、細菌叢の構成変化は、宿主酵素への基質利用、宿主免疫の成熟、および病原性細菌の増殖に影響を与える可能性がある [68]。したがって、腸内の微生物叢の構造と組成の変化は、IBD の開始と進行に関連していると考えられる [69]。このことから、腸内細菌叢と短鎖脂肪酸組成を変化させる牡蠣肉エキスは、IBD の発症進行を改善する機能性があると予想される。ゆえに急性大腸炎モデルマウスに対する牡蠣肉エキス摂取の影響を検証した。

2-2. 実験方法と材料

2-2-1. 実験材料

牡蠣肉エキスの調製は1章と同様に行った。DSS は、MP Biomedicals (Irvine, CA, USA) から購入した。

2-2-2. 動物実験

本実験は関西大学動物実験委員会の承認を受けて実施した (承認番号 1819)。人道的エンドポイントは DSS 投与を開始した体重 (BW) と比較して、20%以上の体重減少として設定した。

4週齢雄性 C57BL/6J マウスは、(日本エスエルシー株式会社, 静岡) から購入した。マウスは室温 22°C ± 1°C, 明暗 12 時間サイクル (8:00–20:00) の条件下で飼育した。実験餌料および水は自由摂取とした。7 日間の順化後、マウスを 3 群に分けた。各群 8 匹のマウスを Control, Control+DSS, OE+DSS とした。Control 群と Control+DSS 群には Control 食を与え、OE+DSS 群には OE 食を与えた。Table.2-1 は、American Institute of Nutrition (AIN)-93G 組成に基づいた実験食 (Control および OE) の成分を示す [55]。Control 食と OE 食の塩化ナトリウム量が等しくなるように調整した。食餌摂取量と体重 (BW) は、2 日ごとに 21 日間測定した。22 日目から、Control+DSS および OE+DSS 群の飲料水を 2.5% (w/w) 溶液に 7 日間交換した。7 日間の DSS 投与期間に毎日、午前 10 時に、disease activity index (DAI) スコア [70] (糞便の固さ、体重減少、および糞便中の潜血) を毎日評価した。動物実験のタイムスケジュールを Fig.2-1 に示す。人道的エンドポイントに該当するマウスはいなかった。Control+DSS 群のマウスは DSS 投与 7 日後に 1 匹の死亡が確認された。DSS 投与の 7 日後、各マウスから糞便を採集し、非絶食マウスに

イソフルラン麻酔下で安楽死させた（午前9：00～11：00）。下大静脈から採血し，遠心分離（2000xg, 15分間）により血清を得た。肝臓，腎臓，脾臓，および大腸を素早く取り出し，秤量し，大腸の長さを測定した。大腸内容物を冷食塩水で洗い流し，遠位結腸切片を10%ホルマリン溶液で固定した。

Table 2-1. Composition of the experimental diets.

	Experimental Diets ¹	
	Control	OE
	g/1000g	
Dextrinized corn starch	132	132
Corn starch	397.486	366.486
Sucrose	95.9	100
Cellulose	50	50
Casein	200	182.3
L-Cystine	3	3
Choline bitartrate	2.5	2.5
AIN-93G mineral mixture	35	35
AIN-93 vitamin mixture	10	10
Soybean oil	70	68.7
Oyster extract		50
Sodium chloride	4.1	
<i>tert</i> -Butylhydroquinone	0.014	0.014
	1000	1000

Based on the AIN-93G composition, diets were prepared. The amount of sodium chloride in the control and OE diets was equal. AIN, American Institute of Nutrition; OE, oyster extract.

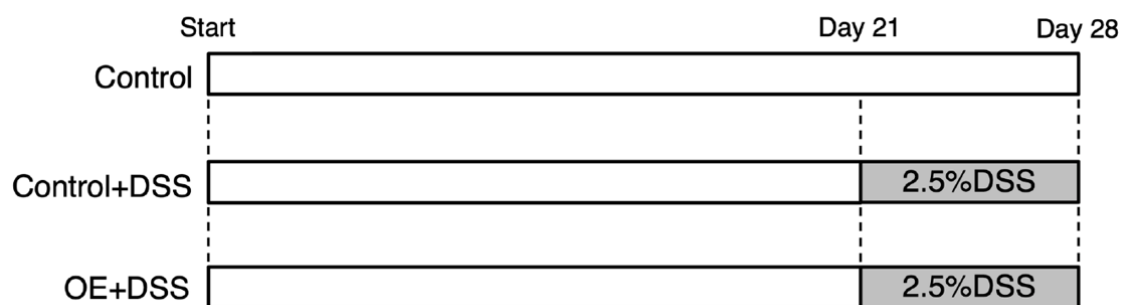


Figure 2-1. Schematic diagram of DSS-treated mice. DSS, dextran sulfate sodium; OE, oyster extract.

2-2-3. 血清生化学的パラメーター

アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST), アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT)、クレアチンホスホキナーゼ (CPK), 乳酸デヒドロゲナーゼ (LDH), 総タンパク質 (TP), およびアルブミン (Alb) は, 日本医療研究所 (貝塚, 日本) にて測定した。

2-2-4. 組織病理学的分析

10%ホルマリンで固定した遠位結腸切片をパラフィンに包埋し, 5 μ m 切片を作成した。ヘマトキシリン-エオジンで染色した後, 組織学的分析 (炎症重症度, 炎症深達度, 粘膜上皮の再生度, 陰窩損傷度) を, Dieleman らの方法に準じて評価した [71]。

2-2-5. 糞中の短鎖脂肪酸

2.5%DSS 投与後 7 日目の糞便 SCFA 組成は, ガスクロマトグラフィー (GC-2014; 島津製作所, 京都, 日本) を使用して分析した [72]。

2-2-6. 16S rRNA アンプリコンシーケンス

16S rRNA アンプリコンシーケンスでは, 各群からランダムに 5 つの糞便サンプルを選択し, ISOSPIN 糞便 (ニッポンジーン株式会社, 東京, 日本) を使用して全 DNA を抽出した。詳細は Maeda らの方法に準じて実施した [73]。16S rRNA アンプリコンシーケンスおよび生シーケンスデータ分析は, 次世代シーケンス (NGS) システム (Ion PGMTM; Thermo Fisher Scientific Inc, 米国マサチューセッツ州ウォルサム) および細菌の構成と多様性を調べるために, Ion Reporter ソフトウェア (Metagenomics 16S w1.1ver. 5.14, Thermo Fisher Scientific Inc) を用いた。 β 多様性は, ClustVis (<https://biit.cs.ut.ee/clustvis/>) (2021 年 10 月 12 日にアクセス) を用いて, 主成分分析 (PCA) から推定および視覚化した。線形判別分析の効果量 (LEfSe) [56] 分析 (LDA スコア $\log_{10}>4$ および $p<0.05$ のレベルでは, Galaxy(<http://huttenhower.sph.harvard.edu/galaxy/>) (2021 年 10 月 16 日にアクセス) を使

用して評価した。

2-2-7. 統計処理

得られた測定値は、平均値±標準誤差（SEM）で示した。DAI および組織病理学的スコア（順序尺度）には、Kruskal-Wallis 検定後に未補正の Dunn's 検定を用いた。他のパラメーター（比率尺度または間隔尺度）については、一元配置分散分析とそれに続く Holm-Sidak の多重比較検定が使用された。群間比較は、Control 群と Control+DSS 群、および Control+DSS 群と OE+DSS 群間で分析された。属レベルでの糞便の細菌、各短鎖脂肪酸組成、および重症度の指標間の関係。DSS 誘発性大腸炎は、スピアマンの相関係数検定を用いて評価した。0.05 未満の p 値は統計的に有意であると見なし、 $0.05 \leq p < 0.10$ の p 値は統計的に有意な傾向があると見なした。統計分析は、GraphPad Prism バージョン 7.0（GraphPad Software, 米国カリフォルニア州サンディエゴ）を使用した。

2-3. 結果

2-3-1. 成長パラメーター，血清検査，DAI スコア

急性実験的大腸炎症状への影響を評価するために、牡蠣肉エキスを 21 日間与えたマウスに、飲料として大腸炎を誘発するデキストラン硫酸ナトリウム（DSS）の 2.5%水溶液または蒸留水を 7 日間与えた。実験期間中、摂餌量と摂水量または DSS 溶液の摂水量に有意差はみられなかった（Table 2-2）。Control+DSS 群では、盲腸重量の有意な減少、血清生化学的パラメーター（Total protein, Albumin, AST, CPK）が有意に減少していた。一方で、Control+DSS 群と比較して、OE+DSS 群ではこれらのパラメーターに影響は見られなかった。

Table 2-2. Growth parameters, organs weights, and serum biochemical parameters in DSS-treated mice.

	Groups		
	Control	Control+DSS	OE+DSS
Growth parameters			
Food intake (g/day)	2.56 ± 0.08	2.40 ± 0.17	2.37 ± 0.13
Water intake (g/day)	8.24 ± 0.74	7.85 ± 0.67	7.47 ± 0.65
DSS solution intake (g/day)	-	9.58 ± 0.50	9.06 ± 0.52
Organ weights (g/100g BW)			
Liver	4.19 ± 0.17	4.52 ± 0.16	4.40 ± 0.18
Kidney	1.16 ± 0.03	1.19 ± 0.02	1.16 ± 0.01
Cecum	0.97 ± 0.11	0.57 ± 0.05 **	0.80 ± 0.11
Serum biochemical parameters			
Total protein	4.63 ± 0.05	3.79 ± 0.10 ***	3.85 ± 0.13
Albumin	2.81 ± 0.04	2.06 ± 0.07 ***	1.96 ± 0.07
AST	42.6 ± 1.6	34.9 ± 1.2 **	40.8 ± 2.8
ALT	15.0 ± 1.5	11.1 ± 1.0	11.4 ± 1.8
CPK	33.9 ± 1.5	53.1 ± 4.7 **	45.5 ± 7.2
LDH	176 ± 17	147 ± 21	150 ± 17

The values shown are the mean ± SEM (n = 7-8 per group). Data were analyzed using one-way analysis of variance followed by Holm-Sidak's multiple comparisons test between the control vs. control+DSS and control+DSS vs. OE+DSS groups. **p<0.01 and ***p<0.001 vs control group. ALT, alanine aminotransferase; AST, aspartate aminotransferase; BW, body weight; CPK, creatine phosphokinase; DSS, dextran sulfate sodium; LDH, lactate dehydrogenase.

Fig.2-2 の A-C では、DSS 投与の開始から Control+DSS 群で体重減少と DAI スコアの増加を示した。OE+DSS 群の体重減少は、Control+DSS 群と比較して 6 日目と 7 日目に有意に低かった (Fig.2-1A)。OE + DSS 群の DAI スコアは、Control+DSS 群よりも 1 日目と 6 日目で有意に低かった (Fig.2-1B)。Control+DSS 群と比較して、OE + DSS 群の DAI スコアの曲線下面積 (AUC) の増加を抑えた (Fig.2-1C)。結腸の長さの短縮と脾臓の重量

の増加の両方が、DSS 誘発性大腸炎の重症度の指標として使用された [74][33]。Control 群と比較して、Control+DSS 群は、結腸の長さが大幅に短縮し、脾臓の重量が増加したことを示した (Fig.2-2 E,F)。Control+DSS 群と比較して、OE + DSS 群は、結腸の短縮と脾臓重量の増加を緩和させる傾向が見られた。

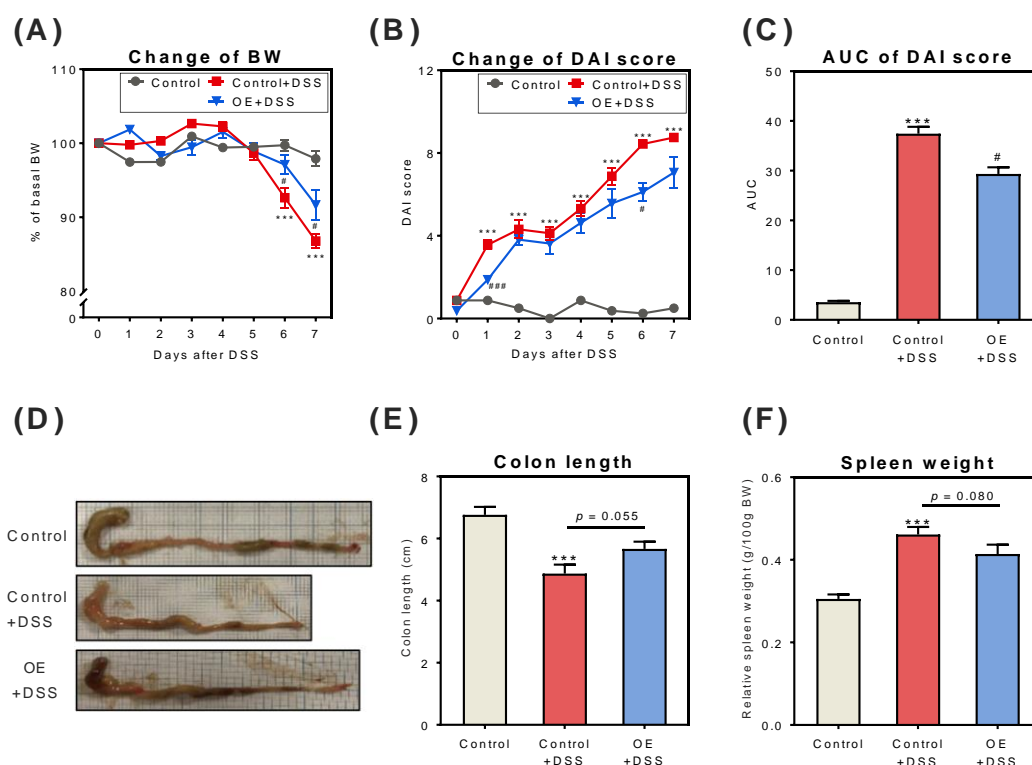


Figure 2-2. Effect of OE on BW, DAI score, colon length, and relative spleen weight in mice of DSS induced acute experimental colitis symptoms. (A) Changes in BW. Changes in the BW percentage (%) = BW on the specified day/the BW at day 0 \times 100. (B) Change of DAI score. (C) AUC of DAI score of mice during administration of 2.5% DSS in drinking water. (D) Representative pictures of colons. (E) Colon length of mice at day 7 after 2.5% DSS administration. (F) Relative spleen weight of mice at day 7 after 2.5% DSS administration. The values shown are the mean \pm SEM (8 mice in control and OE + DSS groups and 7 mice in control + DSS group). *** $p < 0.001$ vs. control group, # $p < 0.05$, and ### $p < 0.001$ vs. control + DSS group. AUC, area under the curve; BW, body weight; DAI, disease activity index; DSS, dextran sulfate sodium; OE, oyster extract; SEM, standard error of the mean.

2-3-2. 大腸の病理組織

Fig 2-3 は、大腸の組織障害（炎症重症度、炎症深達度、粘膜上皮の再生度、陰窩損傷度）を示す。DSS は大腸の組織障害を有意に増加させた(Fig 2-3. B-E)。OE+DSS 群では大腸の陰窩損傷が有意に緩和した(Fig2-3E)。

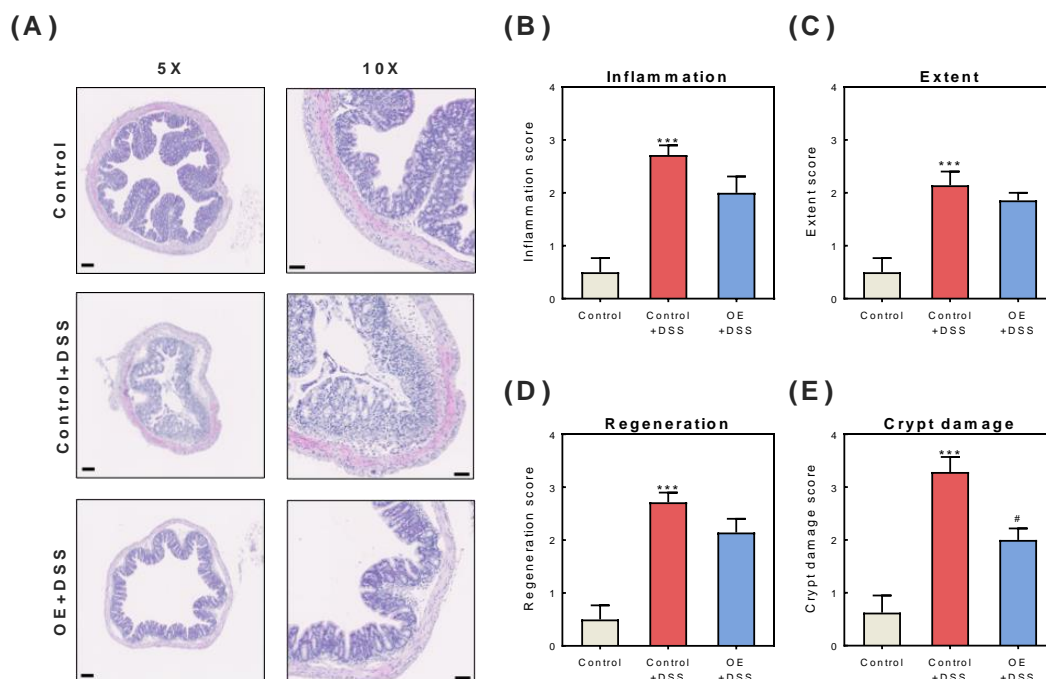


Figure 2-3. Effect of OE on the histological damages in the colon tissues of DSS-treated mice. (A) Representative histologic sections were stained with hematoxylin-eosin. Scale bar, 100 μm (5×) and 50 μm (10×). (B–E) Histological analysis in the colon of mice at day 7 after 2.5% DSS administration. The values shown are the mean SEM (8 mice in control and OE + DSS groups and 7 mice in control + DSS group). *** $p < 0.001$ vs. control group, # $p < 0.05$ vs. control + DSS group. DSS, dextran sulfate sodium; OE, oyster extract; SEM, standard error of the mean.

2-3-3. 糞中短鎖脂肪酸

IBD 症状と大腸の代謝物は関連している [75]。したがって、DSS に対する牡蠣肉エキスの糞便中の短鎖脂肪酸量、組成の影響を評価した(Fig.3A-C)。DSS 投与により糞便中の短鎖脂肪酸量と総短鎖脂肪酸量の増加が見られた。さらに、OE+DSS 群は、Control+DSS 群よりも低い糞便中の短鎖脂肪酸および総短鎖脂肪酸量を示した。盲腸重量は Control 群よりも Control+DSS 群の方が低かった (Table.2-2)。これは糞便中の短鎖脂肪酸の濃度を示している可能性があるため、相対的な糞便中の短鎖脂肪酸組成を Fig.2-4C に示した。Control 群と比較して、Control+DSS 群は、より低い相対酢酸およびより高い相対プロピオン酸、

イソ酪酸, イソ吉草酸, および吉草酸の組成を示した。これらの結果は, 牡蠣肉エキスが DSS 投与によって誘発される糞中の短鎖脂肪酸量および組成の変化を改善できることを示唆している。

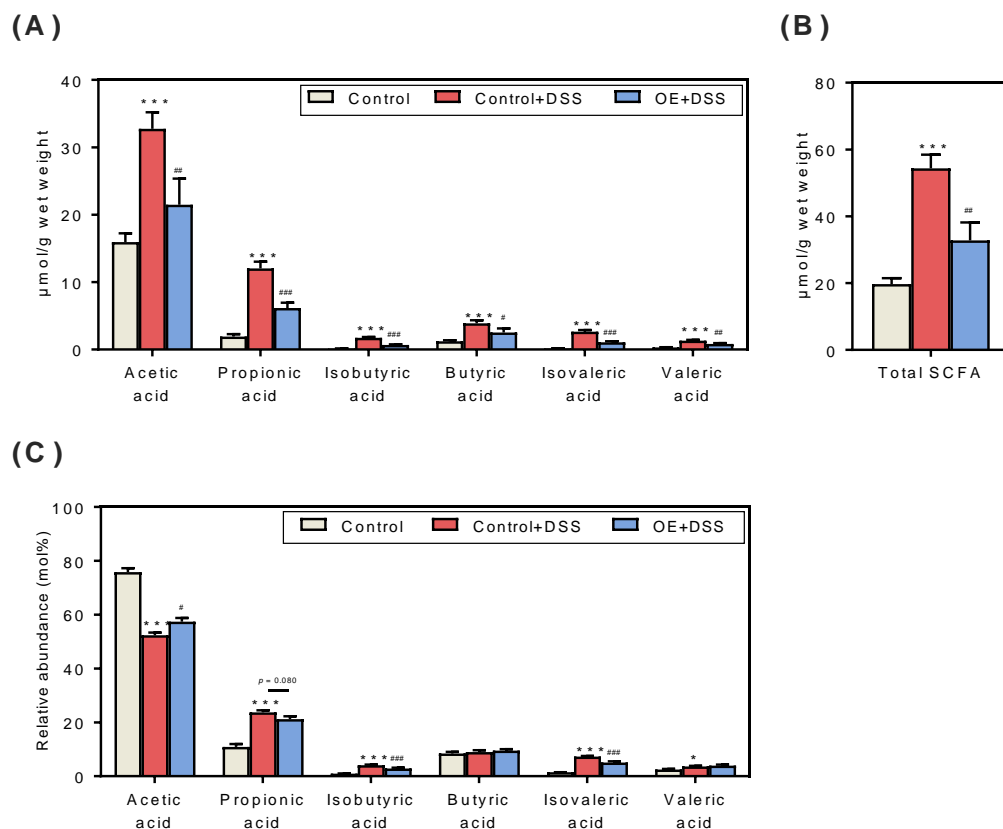


Figure 2-4. Effect of OE on the SCFA contents and compositions in the feces of DSS-induced acute experimental colitis mice. (A) SCFA content, (B) total SCFA content, and (C) relative SCFA abundance in the feces of mice at day 7 after 2.5% DSS administration. The values shown are the mean \pm SEM (n = 8 per group). * p < 0.05 and *** p < 0.001 vs. control group, # p < 0.05, ## p < 0.01, and ### p < 0.001 vs. control + DSS group. DSS, dextran sulfate sodium; OE, oyster extract; SCFA, short-chain fatty acids, SEM, standard error of the mean.

2-3-4. 糞中細菌叢

DSS 誘導性大腸炎モデルでは, 腸内細菌叢の種の数と構成の変化が報告されている [37]。牡蠣肉エキスが腸内細菌叢を改善するかどうかを判断するために, 次世代シーケンサーに基づく 16S rRNA アンプリコンシーケンスを用いて, 糞便中の腸内細菌叢の数と構成を検証した。Ion Reporter 処理後の有効な読み取り配列の数は, 実験群間で有意差はなかった (Control 群: $168,632 \pm 19,922$, Control+DSS 群: $158,437 \pm 24,418$, OE+DSS 群: $127,632$)

±22,393)。レアファクション解析 (Chao-1 推定量および Simpson 指数) は、飽和しているため、シーケンス深度は多様性を反映するのに十分であり、シーケンス結果は信頼できると判断される (Fig.2-5 A, B)。Control 群と比較して、Chao-1 (種の豊富さ) と Simpson (種の多様性と均等度) [76] の指標は、Control+DSS 群で有意に高かった。OE 給餌は、DSS による Chao-1 指標の増加を改善した。 β 多様性の結果 (Fig.2-5 C, D) は、DSS 投与が糞便中の細菌叢の構造を変化させたことを示した。OE+DSS 群は、属レベルで PC1-PC3 のコントロール+DSS 群から明確に分離された (Fig.2-5D)。

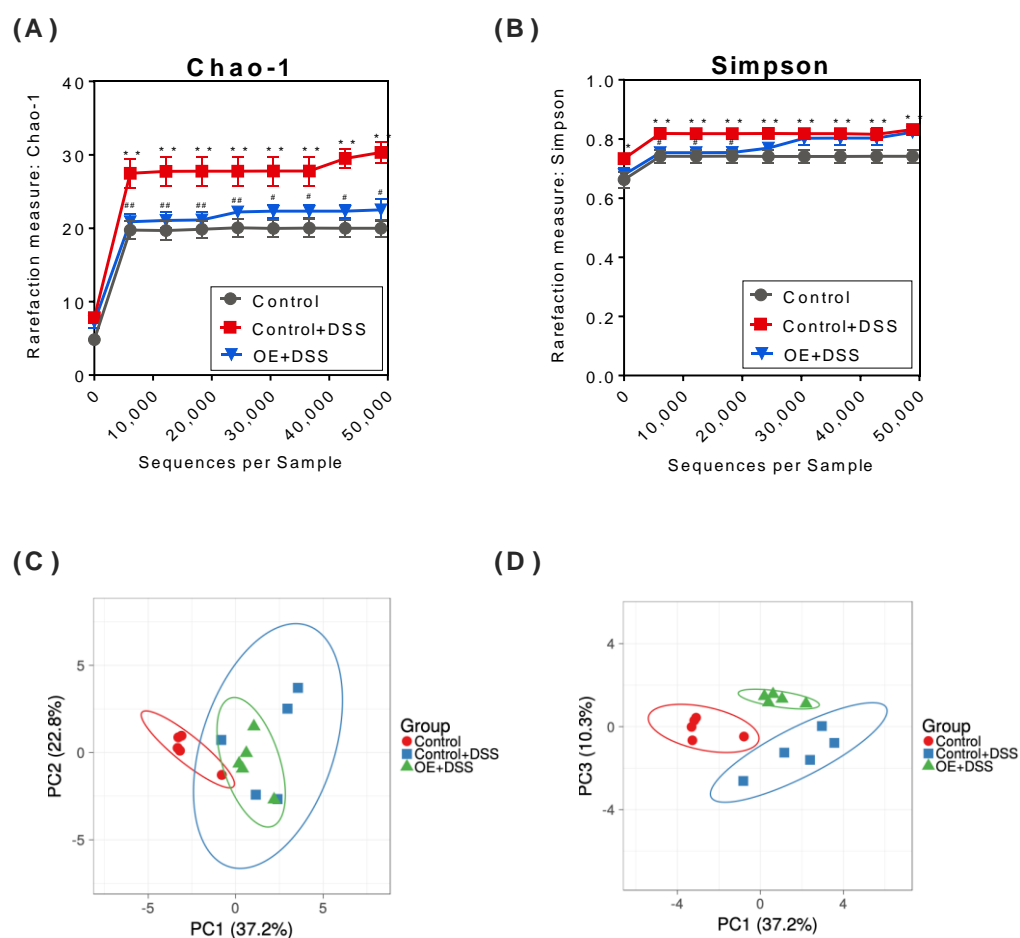


Figure 2-5. Effect of OE on the α - and β -diversities in the feces of DSS-treated mice. (A,B) Bacterial rarefaction curves based of the Chao-1 and Simpson indices, respectively. The values shown are the mean \pm SEM ($n = 5$ per group). * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ vs. control group, # $p < 0.05$ and ## $p < 0.01$ vs. control + DSS group. (C,D) PCA of the bacterial compositions at the genus level. The prediction ellipse shows the extent to which a new sample falls inside the ellipse with probability 0.95. DSS, dextran sulfate sodium; OE, oyster extract, PCA, principal component analysis.

ヒストグラムを使用して、群ごとの糞便中の門および属レベルの細菌の構成比率を示した (Fig.2-6A,B)。Control 群と比較して、DSS 投与は、Firmicutes の構成比率が低く、Bacteroidetes, Proteobacteria, および Deferribacteres の構成比率が高かった (Fig.2-6 C-F)。OE 給餌は Control+DSS 群と比較して門レベルで相対的な細菌量を変化させなかった。Control 群と比較して、DSS 投与は、属レベルの *Lactococcus* および *Bifidobacterium* の構成比率が低く、*Bacteroides*, *Mucispirillum* および *Lactobacillus* の構成比率が高かった (Fig.2-6G-K)。Control+DSS 群と比較して、OE+DSS 群は、*Ruminococcus gnavus* の構成比率が有意な減少がみられた (Fig.2-6L)。

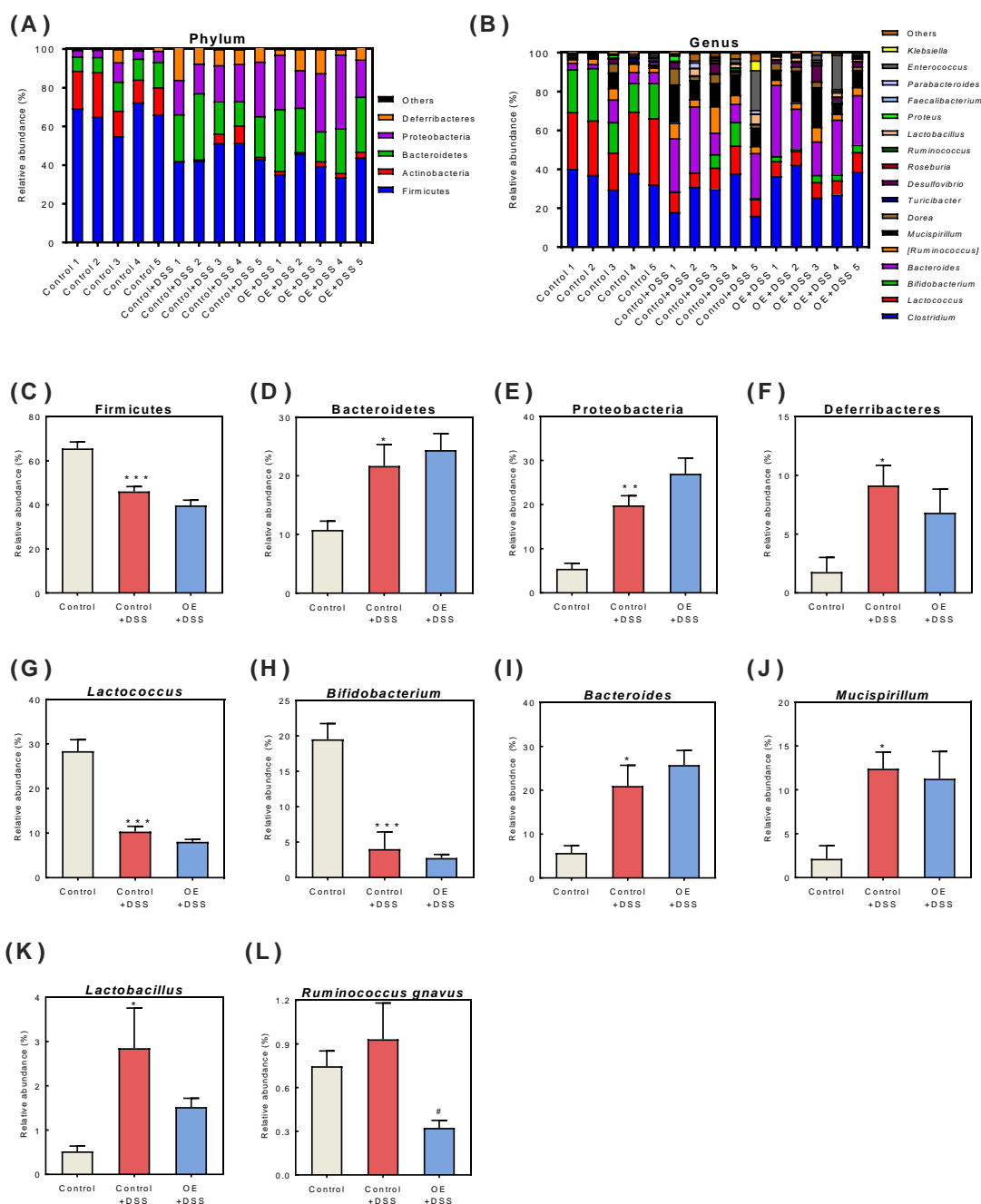
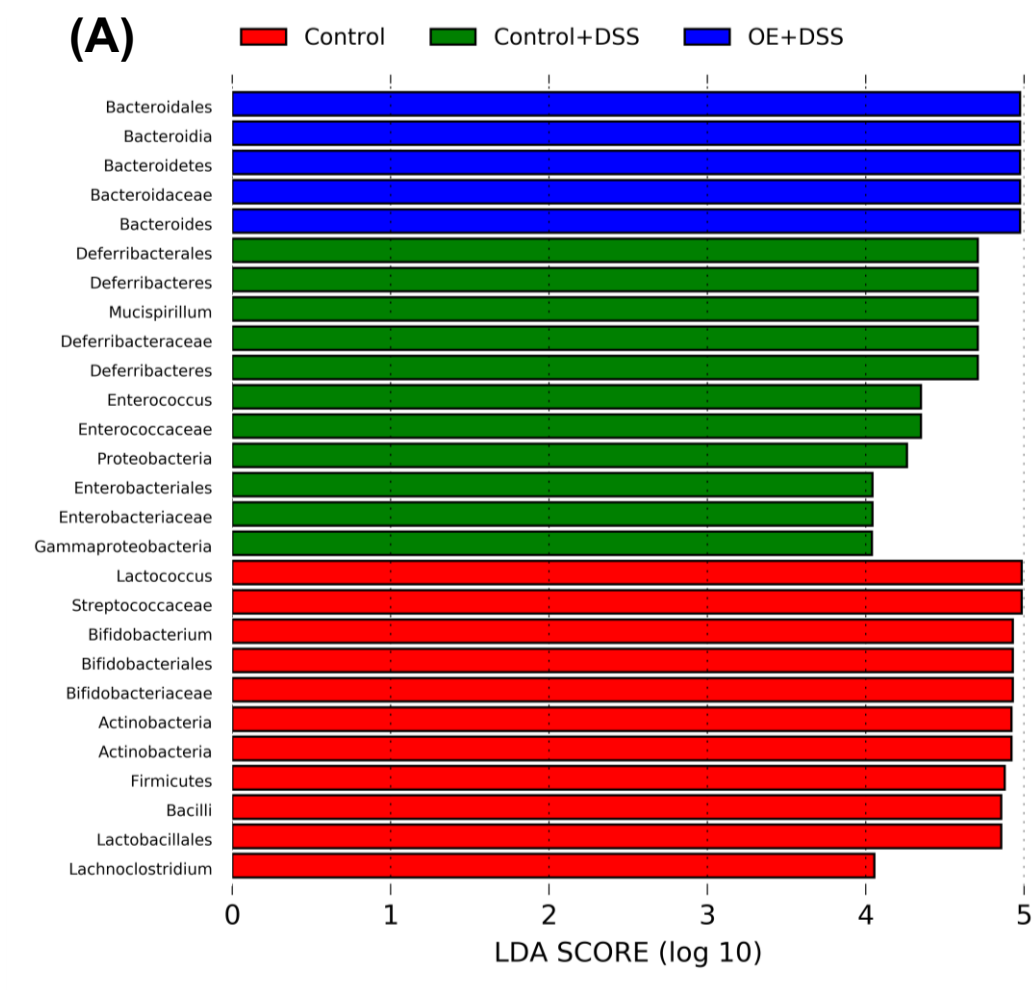


Figure 2-6. Effect of OE on the microbiota composition in the feces of DSS-induced acute experimental colitis mice. (A,B) Relative fecal bacteria abundance at the phylum and genus level, respectively. The relative fecal bacteria abundance was sorted from the highest relative abundance in the control group, and those with a relative abundance of less than 0.5% were grouped together as “others”.(C-L) Relative abundance of each bacteria. The values shown are the mean \pm SEM (n = 5 per group). * p < 0.05, ** p < 0.01, and *** p < 0.001 vs. control group, # p < 0.05 vs. control + DSS group. DSS, dextran sulfate sodium; OE, oyster extract; SEM, standard error of the mean.

OE 給餌と DSS 投与が糞便中の細菌叢に及ぼす影響を検証する為に、LEfSe 解析を行った。各群間で最も特徴的な細菌を同定した(Fig.2-7)。その結果、計 27 の系統が同定された。Actinobacteria と Firmicutes 門は、Control 群で豊富だった。対照的に、Defferibacteres および Proteobacteria 門は、Control+DSS 群でより豊富だった。さらに、Bacteroidetes 門は、OE+DSS 群でより豊富だった。



(B)

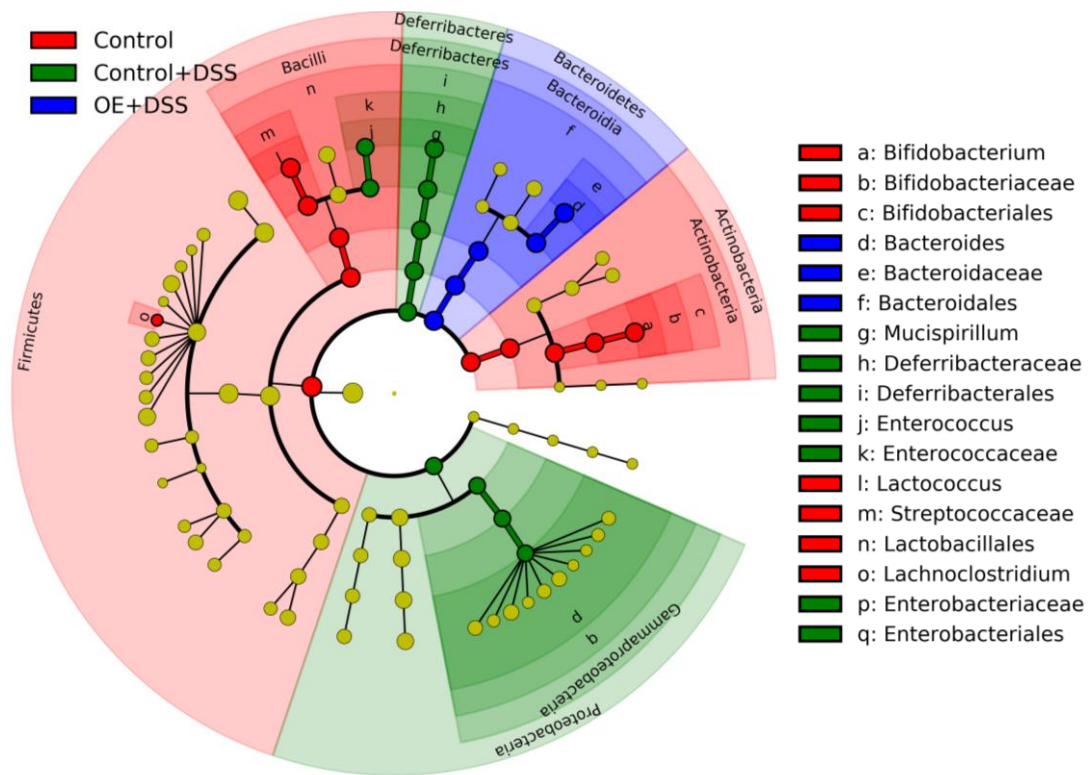


Figure 2-7. Comparison of microbiota in the feces using LefSe. The results (A) and cladogram (B) of the phylogenetic distribution in fecal bacteria among the experimental groups obtained by LefSe analysis are showed. Bacteria are listed at the LDA scores $\log_{10} > 4$ and $p < 0.05$. DSS, dextran sulfate sodium ;LDA, linear discriminant analysis; LefSe, linear discriminant analysis effect size; OE, oyster extract.

2-4. 考察

この研究では、DSS 誘導性の急性実験的大腸炎のマウスモデルを臨床的大腸炎として想定し、実施した。2.5%DSS 投与による 7 日間の誘導後、DSS 投与群のマウスにおいて、下痢、体重の減少、結腸の長さの短縮、および脾臓重量の増加は、急性実験的大腸炎モデルが確立されたことを示した。炎症性腸疾患の患者では、栄養状態の指標である血清アルブミン値が低下することが報告されており [77]、栄養状態の悪化により血清総タンパク質、AST、LDH 値が低下したと考えられる。さらに、Control+DSS 群で観察された高い血清 CPK 値は、DSS によって誘導された筋肉の損傷が原因である可能性がある [78]。他の研究者も、本研究で報告されたものと同様の方法を使用して、急性実験的大腸炎モデルのマウスモデルを誘発することが可能であると報告した [79, 80]。一連の研究は、食品成分が急性大腸炎に対して改善効果をもたらすことを示している [81, 82, 83, 84, 85]。牡蠣肉エキスによる急性実験的大腸炎の緩和に対して、初めて研究を行った。Control+DSS 群と比較して、体重減少、DAI スコアの増加、大腸短縮 ($p=0.05$) 脾臓重量の増加 ($p=0.080$)、および組織学的スコアの増加（陰窩の損傷）が OE+DSS 群で低下することが分かった。このことから、牡蠣肉エキスの給餌は DSS による急性実験的大腸炎を抑制したと示唆される (Fig.2-2, 2-3)。

短鎖脂肪酸は、大腸上皮細胞のエネルギー源として機能し、腸内細菌が非消化性炭水化物、非消化性タンパク質を利用によって産生される代謝産物である [86]。短鎖脂肪酸は腸の炎症と密接に関連している [87]。例えば、酪酸は腸のバリア機能の保護と改善に役割を果たす [88]。IBD 患者の便中には、短鎖脂肪酸の産生細菌数の減少と短鎖脂肪酸量が減少しており [89]、短鎖脂肪酸の産生は IBD リスクの低下に関連している [90]。大腸炎マウスでは大腸と糞中の短鎖脂肪酸含有量が減少することが報告されており [90]、本研究では DSS 投与により糞便の総短鎖脂肪酸含有量が増加することが分かった (Fig.2-4B)。短鎖脂肪酸の吸収と代謝は、炎症性大腸粘膜 [91] および再燃時の潰瘍性大腸炎患者で損なわれることが報告されている [92]。更に、酢酸はマウスモデルで大腸炎を誘発する為に使用されている [93]。本研究では、糞中の短鎖脂肪酸量と DSS 誘発性大腸炎の重症度の指標との間に強い相関関係が見られた。したがって、DSS 実験大腸炎マウスで見られた糞中の総短鎖脂肪酸および酢酸含有量の増加は、大腸の機能障害に関連していることが示唆される。一方で、OE+DSS 群は、Control+DSS 群と比較して糞中の総短鎖脂肪酸含有量が減少していた (Fig.2-4B)。牡蠣肉エキス給餌による糞便中の短鎖脂肪酸量の減少は、大腸炎の重症度の減少を示している。これは、陰窩障害を緩和することによる大腸での短鎖脂肪酸の吸収が要因である可能性が示唆される (Fig.2-4E)。

主な分岐鎖脂肪酸であるイソ酪酸とイソ吉草酸は、腸内の総短鎖脂肪酸量の約 5~10% を占めている [94]。プレバイオティクス摂取によるイソ吉草酸、およびイソ酪酸の減少はアポトーシスを誘発し、イソ酪酸はイオン交換に影響を与える事によってナトリウム吸収に関与している可能性が報告されているが、その役割に関しては完全には分かっていない

[94]。大腸中の分岐鎖脂肪酸はリポ多糖誘発性大腸炎マウスで増加し [95]、イソ吉草酸は切除不能大腸癌患者において増加していた [96]。さらに、主に分岐鎖アミノ酸の発酵から生成されるイソ酪酸とイソ吉草酸は、タンパク質発酵マーカーであると考えられている [97]。DSS 投与により増加した糞便中の分岐鎖脂肪酸は、Control 群および OE 群のカゼイン由来 (各 200 および 182.3 g/kg) の分岐鎖アミノ酸であると考えられた。この研究では、Control+DSS 群と比較して、OE 給餌により糞便中のイソ酪酸とイソ吉草酸の含有量と組成を減少させた (Fig.2-4A,C)。この現象は、DSS による大腸炎とタンパク質の不消化を牡蠣肉エキスが緩和している事を示唆している。

腸内細菌叢の α 多様性の著しい減少は DSS 誘導マウスで報告されている [98]。しかし、Control+DSS 群は、Control 群と比較して、高い α 多様性 (Chao-1 推定量および Simpson 指標) を示した (Fig.2-5A, B)。この現象は、DSS 投与による優占種である Firmicutes 門の減少、Bacteroidetes 門、Proteobacteria 門、および Deferribacteres 門の細菌数の増加が原因である可能性が考えられる。PC1-PC3 での β 多様性の結果 (Fig.2-5D) は、OE+DSS 群が Control+DSS 群から分離していることを明確に示している。牡蠣肉エキスの給餌は DSS による糞便中の細菌叢への影響を逆転させることはできなかったが、糞便中の細菌叢を制御している兆候が見られる。これらのことは、Control+DSS 群と比較して、OE+DSS 群が属レベルの糞便中の細菌叢に影響を及ぼしたことを示唆している。

糞中の酢酸およびプロピオン酸の組成は、DSS 誘導性大腸炎の重症度の指標および相対的な *Bifidobacterium*, *Mucispirillum*, および *Lactobacillus* の存在量 ($p < 0.01$) と強く相関していた。糞中の短鎖脂肪酸の量だけでなく、組成比も大腸炎の重症度と関連している。これらの短鎖脂肪酸 (酢酸とプロピオン酸) は腸内細菌によって生成される [99]。*Bifidobacterium* 種は糖発酵中に大量の酢酸を生成する [100] 一方で、*Lactobacillus* 属は大量のプロピオン酸と少量の酢酸を生成する [101]。酢酸とプロピオン酸の相対的な組成変化は、ビフィズス菌と乳酸桿菌の構成比率に関連している可能性がある。

牡蠣肉エキスの給餌は、*R.gnavus* のような有害細菌の構成比率の減少がみられた。*R.gnavus* は腸粘膜の表面にコロニーを形成し、そこでムチン糖鎖のシアル酸を炭素源として利用している [102]。大規模な細菌叢シーケンシング研究では、IBD 患者は健常人と比較して *R.gnavus* の構成比率が高いことが報告されている [103]。通常、健常人の *R.gnavus* の腸内細菌叢の構成比率は 0.1% 未満だが、IBD 患者の一部では再燃時に一時的に上昇することが報告されている [104]。DSS は糞便中の *R.gnavus* を増加させるが、牡蠣肉エキスによって増加を抑えていた (Fig.2-6L)。このことから、牡蠣肉エキスは、*R.gnavus* などの有害細菌に対する調節効果により、急性大腸炎を予防できる可能性があることを示唆している。ただし、この仮説に関しては詳細な研究が必要である。現在、ショートリード 16S rRNA アンプリコンシーケンスを使用して、種レベルで細菌の正確な割合を評価することは困難である。

牡蠣肉エキスは様々な成分で構成されているので、DSS による急性大腸炎の緩和をもた

らした成分を特定する事は難しい。予想しえる成分としては、第 1 章と同様にグリコーゲンがあげられる。牡蠣肉エキス中には 32.5 g/100 g のグリコーゲンが含まれる。酵素合成グリコーゲン摂取が盲腸の短鎖脂肪酸の産生を著しく増加したことが報告されている。これは、特に *Bifidobacterium* と *Lactobacillus* による資化が要因である可能性がある [63]。また第二の要因としてタウリンがあげられる。牡蠣肉エキス中には 5.5 g/100 g のタウリンが含まれている。タウリンは、DSS による大腸炎の予防効果がある [105]。また、タウリンは免疫応答を制御し、腸内のタイトジャンクション結合バリアを回復することが報告されている [84]。今後は大腸炎の予防効果をもたらす牡蠣肉エキス中の成分を特定する事が必要である。その為には、DSS 誘導大腸炎モデルマウスを用いた牡蠣肉エキス中のグリコーゲンとタウリンの更なる検証が必要である。

牡蠣肉エキスは糞便中の短鎖脂肪酸量および組成の変化。腸内細菌叢の制御を通じて、DSS による急性実験的大腸炎に対する保護効果をもたらした。これらの結果から、急性実験大腸炎の緩和における牡蠣肉エキスの保護効果の理解、機能性食品成分の利用および開発に関する見通しをもたらした。

第3章 慢性大腸炎モデルマウスに対する牡蠣肉エキス摂取の影響

要約

第2章において牡蠣肉エキス摂取による急性大腸炎モデルマウスの症状緩和がみられた。しかしながら、IBD患者における大腸炎症状は、再発と寛解を繰り返す慢性疾患であるゆえに、急性大腸炎モデルマウスは、臨床モデルとしてあまり適していないことが示唆される。したがって、より臨床例に類似した症状を呈するモデルを作成する為に、DSS反復投与によるマウスに慢性大腸炎を惹起させることとした。4週齢雄性C57BL/6JマウスにAIN93G（Control食）およびAIN93Gに5.0%（w/w）牡蠣肉エキスを添加した餌料を調製し、マウスに投与した。投与開始22日目から、飲水として2.5%DSS水溶液を5日間、その後蒸留水を5日間与えた。このDSSと蒸留水の連続投与を3回繰り返し、慢性の実験的大腸炎を惹起させた。牡蠣肉エキスはDSSの反復投与による体重の減少、血便症状、大腸長の短縮、脾臓重量の増加、結腸の陰窩損傷および糞中総短鎖脂肪酸量の増加を緩和した。糞を採取して細菌叢を調べたところ、DSSの反復投与は細菌叢の多様性を低下させていたが、牡蠣肉エキス投与はこの多様性低下を緩和していた。細菌叢の構成を調べたところ、慢性の実験的大腸炎を惹起させたマウスでは、IBD発症との関連が指摘されているProteobacteria門とEnterococcus属の構成比率が増加していたが、牡蠣肉エキスの投与はこれらの増加を緩和していた。これらのことから、牡蠣肉エキスの摂取は、ヒトのIBDにより近い慢性大腸炎モデルマウスにおいても、その諸症状を緩和できると考えられた。

3-1. 序章

第2章でIBDモデルマウスにおいて牡蠣肉エキスによる大腸炎緩和効果が見られた。しかしながら、IBD患者の病状は再発寛解型の慢性症状であるゆえに、急性実験的大腸炎マウスモデルはヒトIBDモデルとして適切なモデルとは述べにくい。したがって、DSS反復投与による慢性実験的大腸炎マウスモデルが開発された [106, 107]。慢性および急性大腸炎の両モデルを用いることは、大腸炎に対する牡蠣肉エキスの効果を包括的に明らかにするうえで意義あることである。よってDSS反復投与による慢性実験的大腸炎マウスモデルを用いて、大腸炎症状（糞便中の細菌叢や短鎖脂肪酸組成）に対する牡蠣肉エキスの効果を検証した。

3-2. 実験方法と材料

3-2-1. 牡蠣肉エキスの調製と栄養素組成

*C.gigas*からの牡蠣肉エキスの調製とその栄養組成は、第1章に記載 [108]。

3-2-2. 動物実験

本実験は関西大学動物実験委員会の承認を受けて実施した（承認番号1918）。人道的エンドポイントはDSS投与を開始した体重（BW）と比較して、20%以上の体重（BW）の減少として設定した。

AIN-93G [55]に基づく実験食の組成を示しており、等量の炭水化物（645 g/kg）、タンパク質（200 g/kg）、脂肪（70 g/kg）、および塩化ナトリウム（4.12 g/kg）。これまでの研究 [109, 65, 108]で報告されているように、牡蠣肉エキス濃度は5.0%（w/w）に設定した。マウスは、単独の飼育ケージ（cat.KN-60105-T;夏目製作所，東京，日本）で飼育し、水と実験食を自由に摂取できるエアコン付きの部屋で飼育した。

ここでは、日本エスエルシー株式会社から購入した4週齢雄C57BL/6Jマウスを使用した（静岡，日本）。マウスは関西大学の飼育室に持ち込み、Control食を7日間与え、順化した。マウスは、平均体重が同等になるように3群に分けた（Control [n=6]，Control+DSS [n=8]，OE+DSS [n=8]）。ControlおよびControl+DSS群にはControl食を与え、OE+DSS群にはOE食を与えた。食物と水の摂取量と体重は2日ごとに測定した。

慢性実験的大腸炎は、先行研究 [107] を参考に Fig.3-1 に示すスケジュールにて実施した。

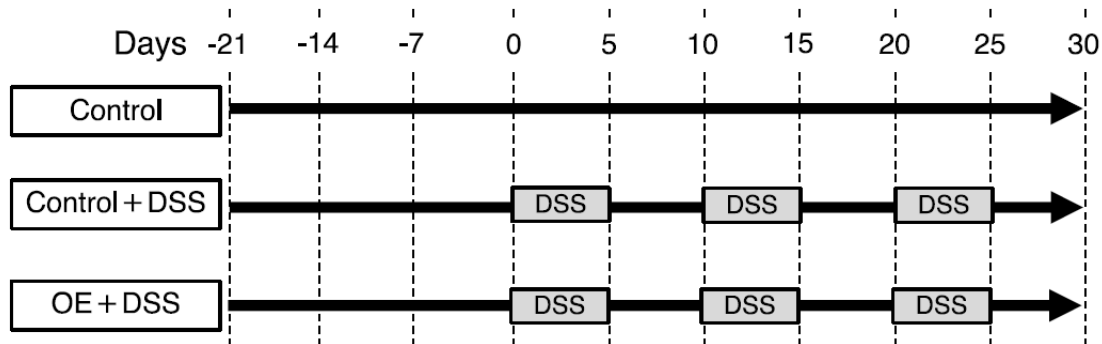


Figure 3-1. Schematic diagram illustrating the induction of chronic experimental colitis symptoms. DSS, dextran sulfate sodium; OE, oyster extract.

3 週間の Control 食給餌後，DSS を投与して慢性実験的大腸炎を誘発した。マウスに 2.0 % (w/w) DSS (MP Biomedicals, Irvine, CA, USA) 溶液を 5 日間投与した後，蒸留水を 5 日間投与した。このサイクルを 3 回繰り返した。Disease activity index (DAI) スコア [70] は，0 日目から 30 日間，2 日ごとに午前 10:00 に評価した。人道的エンドポイントに該当するマウスはいなかった。

30 日目に各マウスケージに残った糞を採取した。非絶食条件下で，イソフルランによる麻酔下で採血 (9:00~12:00) し，過剰なイソフルラン吸入により安楽死を誘発した。血清は，血液を $2,000 \times g$, 15 分間遠心分離して得た。脾臓，肝臓，腎臓，腎周囲白色脂肪組織，小腸，盲腸，結腸を摘出し，重量を測定した。結腸の長さも測定した。遠位結腸を冷生理食塩水で洗浄して結腸内容物を除去し，Gene Keeper RNA & DNA 安定化溶液 (cat. 319-08901; ニッポンジーン株式会社，東京，日本) および組織固定用の 10%ホルマリン溶液に保存した (富士フィルム和光純薬，大阪，日本)。先行研究同様に，結腸をヘマトキシリンエオジン (HE) 染色して，炎症重症度，炎症深達度，粘膜上皮の再生度，陰窩損傷度をスコア化した [108, 71]。

3-2-3. 血清生化学的パラメーターの分析

総タンパク質 (TP), アルブミン (Alb), アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST), アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT), クレアチンホスホキナーゼ (CPK), 乳酸デヒドロゲナーゼ (LDH), 尿素窒素 (BUN), クレアチニン (Cr), トリグリセリド (TG), 総コレステロール (T-chol), 高密度リポタンパク質コレステロール (HDL), リン脂質 (PL) は，日本医学研究所 (貝塚，日本) に分析依頼した。

3-2-4. 遺伝子発現解析

大腸粘膜の腫瘍壊死因子- α (*Tnf*) α , インターロイキン (*Il*) 1β , *Il6* の発現レベルは，先行研究の方法に準じた定量的 PCR によって測定した [110]。

3-2-5. 糞中の短鎖脂肪酸の分析

糞中の短鎖脂肪酸の組成は、先行研究の方法に準じたガスクロマトグラフィーフレームイオン化検出器 (GC-2014, 島津製作所, 京都, 日本) を用いて測定した [72]。

3-2-6. 16S rRNA アンプリコン配列の解析

Control 群, Control+DSS 群, OE+DSS 群の各群からランダムに 6 つの糞サンプルを選択し, Total DNA を ISOSPIN Fecal DNA (cat.315-08621;ニッポンジーン株式会社)を用いて抽出した。腸内細菌叢 (組成と多様性) は, 先行研究 [108]に準じて, 次世代シーケンサー IonPGM™ Workflow (Thermo Fisher Scientific Inc.) を使用した 16S rRNA アンプリコンシーケンスによって分析した。 β -多様性と線形判別分析 (LDA) の効果サイズ (LEfSe) [56]は, ClustVis <https://biit.cs.ut.ee/clustvis/> (2022 年 4 月 12 日にアクセス) と Galaxy (<http://huttenhower.sph.harvard.edu/galaxy/>(2022 年 4 月 13 日にアクセス))。

3-2-7. 統計処理

得られた測定値は平均値±標準誤差で示した。Control と Control+DSS 群間, および Control+DSS 群と OE+DSS 群間で有意差を調べた。パラメトリックおよびノンパラメトリックデータは, 一元配置分散分析後に, Holm-Sidak 多重比較検定および Kruskal-Wallis 検定に続いて, 未補正の Dunn 検定を用いて各群間の有意差を求めた。本研究では, Control 群と OE+DSS 群間の比較は実施していない。これは群間に 2 つの要因 (DSS 投与と OE 給餌) があり, これら 2 つの群間を比較しても違いの要因が明らかにならないためである。p 値<0.01, p 値<0.05 は統計的に有意差があると見なし, 0.05≤p 値<0.10 は統計的に傾向があると見なした。データ分析は, iMac (Mid 2014, Apple Inc., 米国カリフォルニア州クパチーノ) で GraphPad Prism ソフトウェア (バージョン 7.0d; GraphPad ソフトウェア, 米国カリフォルニア州サンディエゴ) を使用して実施した。

3-3. 結果

3-3-1. 成長パラメーター, 大腸の長さ

試験した群において, 試験期間中の摂餌量と摂水量, および DSS 投与期間中の DSS 溶液摂水量に有意差は示されなかった (Table.3-1)。

Table.3-1 Growth parameters.

	Experimental groups					
	Control		Control + DSS		OE + DSS	
Growth parameters						
Food intake (g/day)	2.95	± 0.02	2.93	± 0.07	2.87	± 0.03
Water intake (g/day)	5.82	± 0.13	6.58	± 0.13	6.62	± 0.10
DSS solution intake (g/day)	-		7.33	± 0.14	7.24	± 0.10

Results are presented as mean ± standard error of the mean (n = 6 for the control group and n=8 for the control + DSS and OE + DSS groups). DSS, dextran sulfate sodium; OE, oyster extract.

Fig 3-2 は、慢性実験的大腸炎の重症度（体重変化、大腸の長さ、脾臓の重量変化）を示した。DSS 投与後（Control+DSS および OE+DSS 群）、体重変化は 6 日目に減少し、その後増加していった。DSS 投与間に体重の変化はなかった。大腸長の短縮と脾臓重量の増加は、DSS 誘発性大腸炎の重症度の指標として使用した [74]。DSS 投与はこれら 2 つの指標にて大腸炎悪化を及ぼし、牡蠣肉エキスはこれらの悪化を大幅に緩和した (Fig.3-2C,D)。

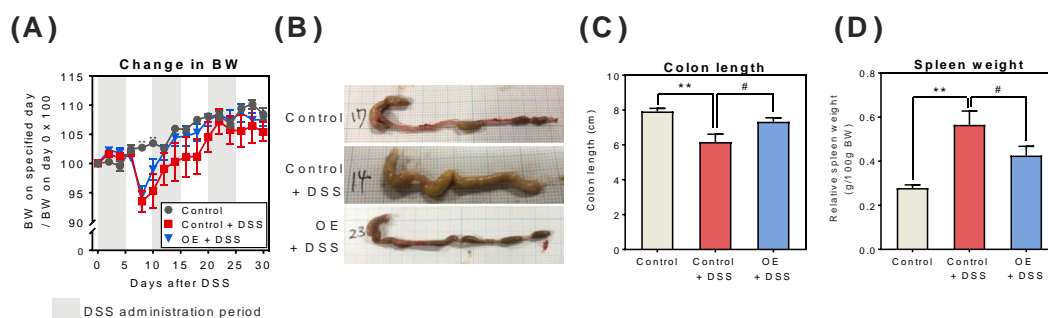


Figure 3-2. Indicators of chronic experimental colitis severity induced by dextran sulfate sodium(DSS). (A) Changes in body weight (BW). (B) Representative colon images. (C,D) Colon length and relative spleen weight in mice at day 30 after DSS administration. Results are presented as the mean ± standard error of the mean (n = 6 for the control group and n = 8 for groups the control + DSS and oyster extract (OE) + DSS groups). ** p < 0.01 and # p < 0.05.

対照的に、DSS 投与は肝臓、小腸、盲腸、および大腸の相対重量に影響を与えたが、腎臓および腎周囲の白色脂肪組織の重量に影響しなかった (Fig.3-3)。臓器重量は、Control+DSS と OE+DSS 群間で有意差は見られなかった。

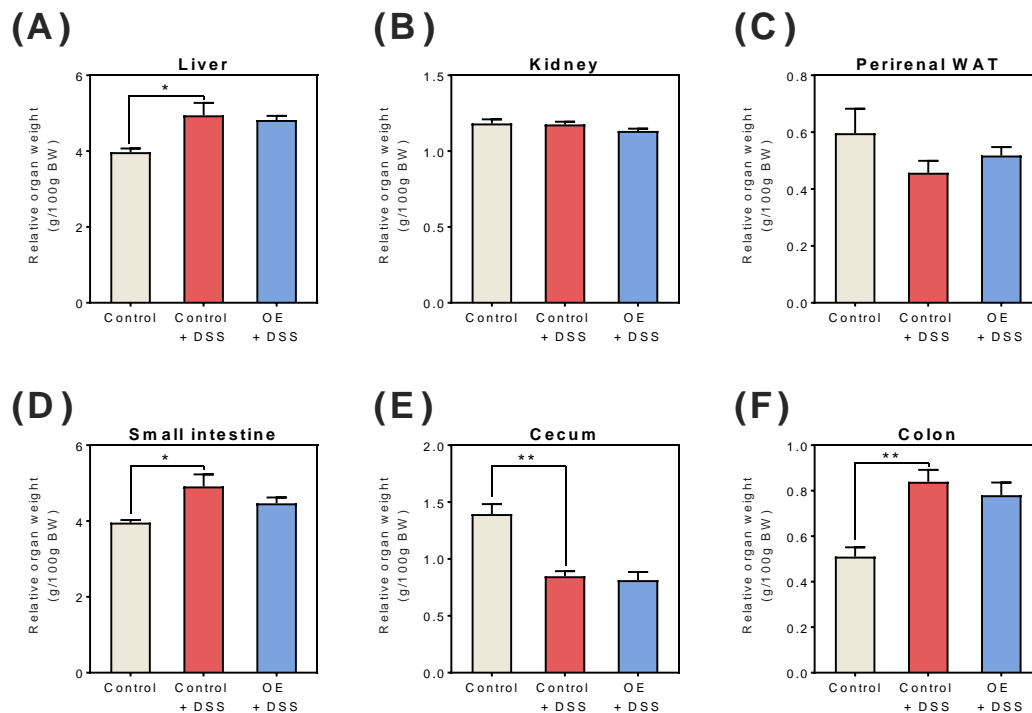


Figure 3-3. Relative weights of organs. Relative weights of (A) liver, (B) kidney, (C) perirenal white adipose tissue (WAT), (D) small intestine, (E) cecum, and (F) colon on day 30 of dextran sulfate sodium (DSS) administration. The weights of the small intestine, cecum, and colon includes their contents. Results are presented as mean \pm standard error of the mean (n = 6 for the control group and n = 8 for groups the control + DSS and oyster extract (OE) + DSS groups). * p < 0.05 and ** p < 0.01. OE, oyster extract.

3-3-2. DAI スコア

Fig.3-4 は、体重減少、便中の血液、便の硬さ、および DAI スコアの変化を示した。DSS 投与群では、2 日目から便中の血液、便の硬さ、DAI スコアの増加が見られた (Fig.3-4B-D)さらに、体重減少、便の硬さ、便中の血液、および DAI スコアの曲線下面積 (AUC) は、Control+DSS 群で Control 群よりも有意に高かった (Fig.3-4E-H)。OE+DSS 群は Control +DSS 群と比較して、16 日目の便中血液スコアが有意に低かった (Fig.3-4B)。ただし、OE +DSS 群は Control+DSS 群と比較して、AUC に有意な差は見られなかった (Fig.3-4E-H)。

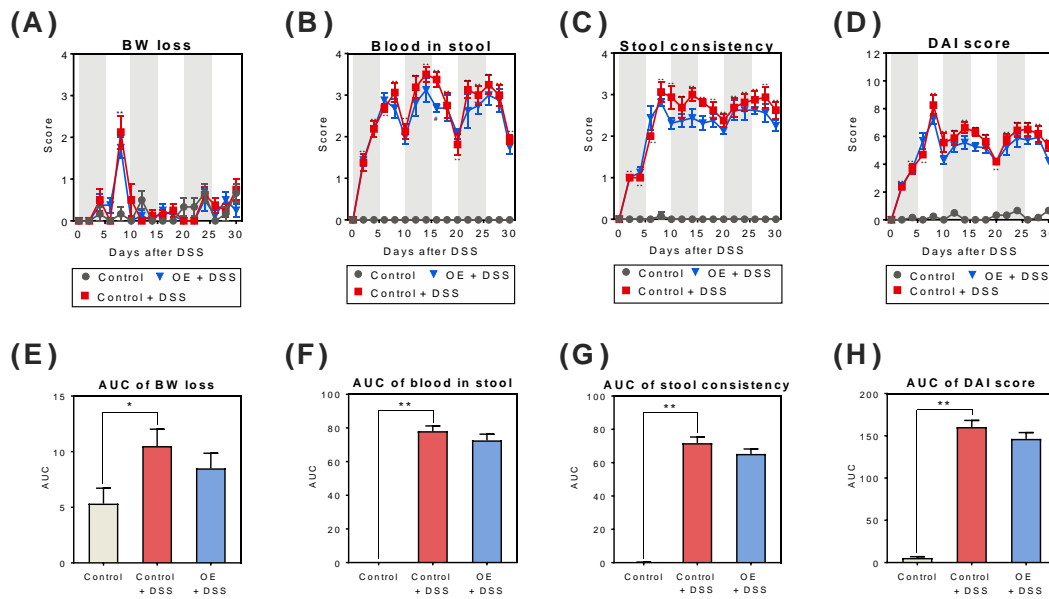


Figure 3-4. Disease activity index (DAI) scores. (A–D) Changes in body weight (BW) loss, blood in the stool, stool consistency, and DAI score during dextran sulfate sodium (DSS) administration. DAI score is the sum of BW loss, blood in the stool, and stool consistency scores. (E–H) Area under the curve (AUC) of BW loss, blood in the stool, stool consistency, and DAI score loss during DSS administration. Results are presented as the mean \pm standard error of the mean ($n = 6$ for the control group and $n = 8$ for groups the control + DSS and oyster extract (OE) + DSS groups). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and # $p < 0.05$.

3-3-3. 血清検査

血清生化学パラメーター（総タンパク質，アルブミン，アラニンアミノトランスフェラーゼ，クレアチンホスホキナーゼ，乳酸脱水素酵素，尿素窒素，クレアチニン，トリグリセリド，総コレステロール，高密度リポタンパク質コレステロール，およびリン脂質）において，各群間に有意差は見られなかった（Table3-2.）。

Table 3-2. Serum biochemical parameters.

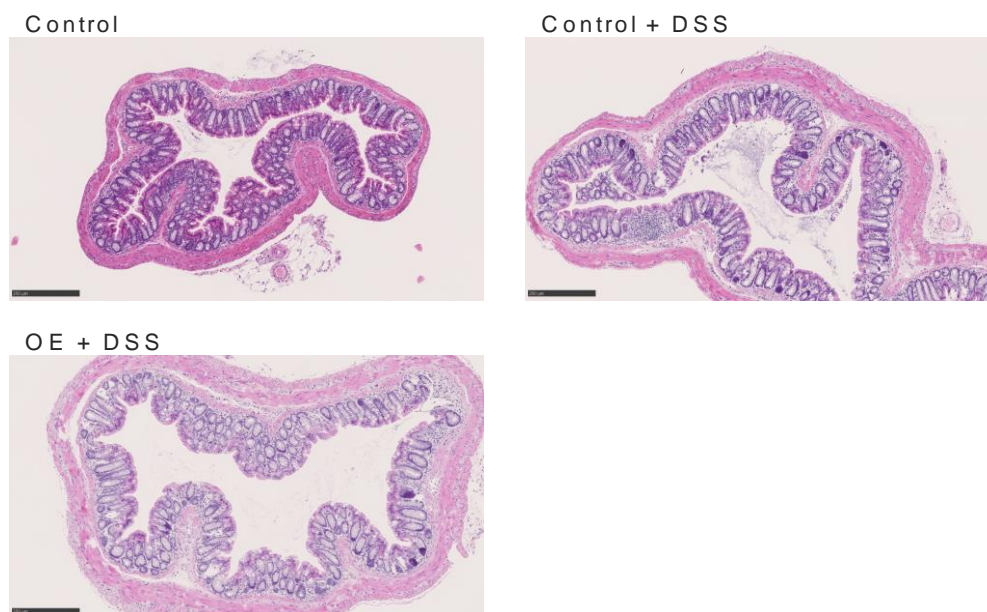
	Experimental groups								
	Control			Control + DSS			OE + DSS		
Total protein (g/dL)	4.42	±	0.08	4.4	±	0.1	4.31	±	0.12
Albumin (g/dL)	2.43	±	0.14	2.4	±	0.08	2.3	±	0.11
AST (IU/L)	36.8	±	1.3	38.4	±	2	37.1	±	1.3
ALT (IU/L)	10	±	0.9	11.9	±	0.7	11	±	0.7
LDH (IU/L)	187	±	5	187	±	4	171	±	11
CPK (IU/L)	32.2	±	4.5	38.5	±	4.7	31.8	±	1.9
Urea nitrogen (mg/dL)	28.2	±	1	29	±	1.2	27.5	±	1.8
Creatinin (g/dL)	0.14	±	0.01	0.13	±	0.01	0.14	±	0.01
Triglyceride (mg/dL)	41.7	±	7.6	58.3	±	7.3	61.4	±	11.6
Phospholipids (mg/dL)	266	±	6	267	±	6	249	±	6
Total cholesterol (mg/dL)	117	±	4	114	±	4	110	±	4
HDL-cholesterol (mg/dL)	93.3	±	1.8	87.9	±	3.7	84.3	±	2.8

Results are presented as mean ± standard error of the mean (n = 6 for the control group and n = 8 for the control + DSS and OE + DSS groups). DSS, dextran sulfate sodium; OE, oyster extract.

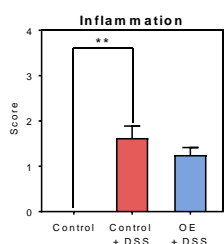
3-3-4. 大腸の病理組織

Figure.3-5 には、大腸組織標本の組織病理学のスコー付けを示した。DSS 投与は、大腸組織の組織病理学的損傷（炎症重症度、炎症深達度、粘膜上皮の再生度、陰窩損傷度）が増加していた（Figure.3-5B-E）。一方で、OE+DSS 群は Control+DSS 群と比較して、粘膜上皮の再生度スコアが有意に緩和していた（ $p=0.03$, Fig.3-5D）。

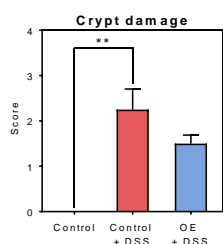
(A)



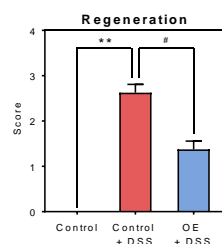
(B)



(C)



(D)



(E)

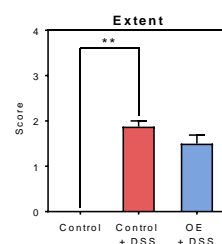


Figure 3-5. Histopathological grading of colonic tissue. (A) Representative histopathological sections (scale bar = 250 μm [10 \times]). (B-E) Histopathological grading scores of inflammation, crypt damage, regeneration, and extent in colonic tissues at day 30 after dextran sulfate sodium (DSS) administration. Results are presented as the mean \pm standard error of the mean ($n = 6$ for the control group and $n = 8$ for groups the control + DSS and oyster extract (OE) + DSS groups). ** $p < 0.01$ and # $p < 0.05$.

3-3-5. 大腸粘膜の遺伝子発現

Fig.3-6 は、*Tnf α* 、*Il1 β* 、*Il6* の mRNA 発現量を示した。DSS の投与により *Tnf α* の発現が大幅に増加した (Fig.3-6A)。対照的に、OE+DSS 群の *Il1 β* 、*Il6* および *Tnf α* の発現量は、Control+DSS 群の発現レベルと有意な変化は見られなかった。

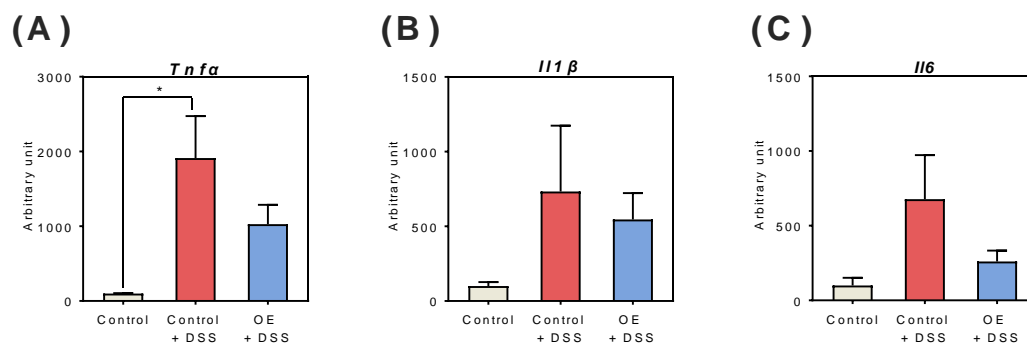


Figure 3-6. Expression levels of inflammation-related genes in colonic mucosa. (A-C) Expression levels of tumor necrosis factor (*Tnf*) α , interleukin (*Il*) 1β , and *Il6* in the colonic mucosa at day 30 after dextran sulfate sodium (DSS) administration. Results are presented as the mean \pm standard error of the mean (n= 6 for the control group and n = 8 for groups the control + DSS and oyster extract (OE) + DSS groups) . * p < 0.05.

3-3-6. 糞中短鎖脂肪酸

Fig.3-7 は、糞中の短鎖脂肪酸量と組成を示している。DSS 投与により、糞中の総短鎖脂肪酸および個々の短鎖脂肪酸量（酢酸、プロピオン酸、イソ酪酸、酪酸、イソ吉草酸）が有意に増加し (Fig.3-7A, B)、糞中の吉草酸組成が有意に減少していた (Fig.3-7C)。糞中の酢酸量は、Control+DSS 群と比較して、OE+DSS 群で低い傾向が見られた ($p=0.07$, Fig.3-7A)。

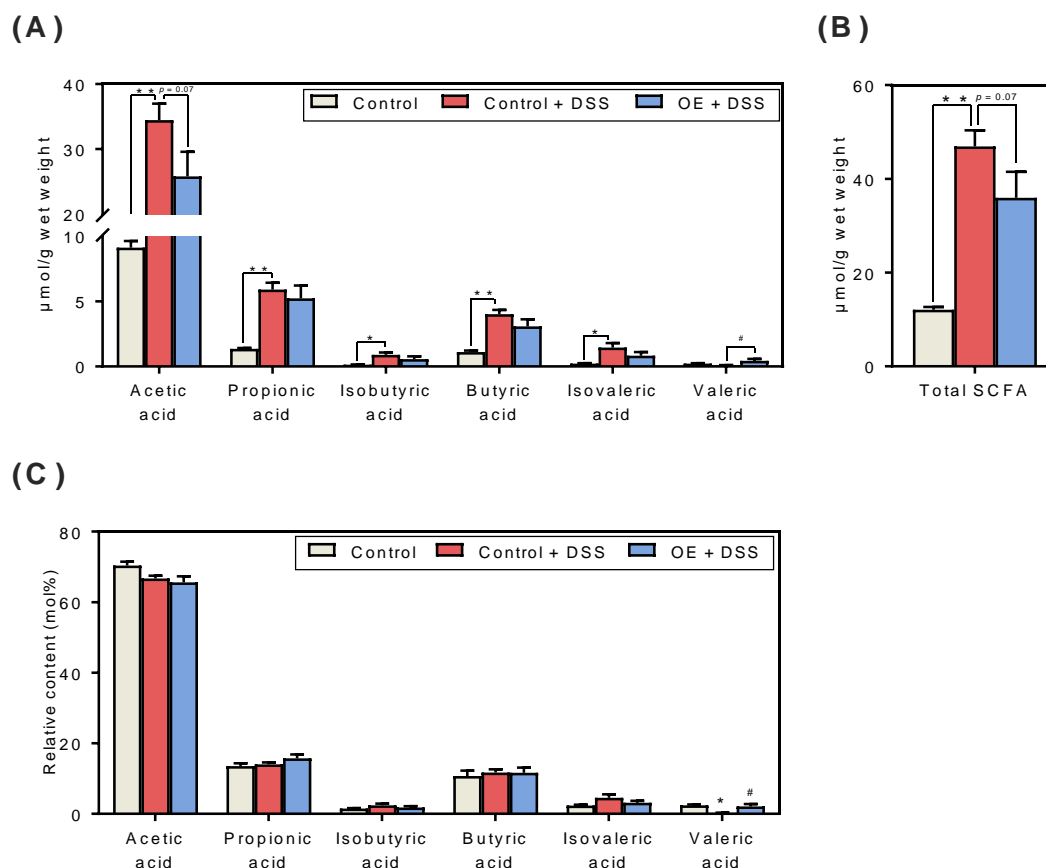


Figure 3-7. Fecal short-chain fatty acids (SCFA) compositions. (A,B) Fecal individual and total SCFA contents. (C) Fecal relative content of SCFA. Results are presented as the mean \pm standard error of the mean ($n = 6$ for the control group and $n = 8$ for groups the control + dextran sulfate sodium (DSS) and oyster extract (OE) + DSS groups). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and # $p < 0.05$.

3-3-7. 糞中細菌叢

Fig. 3-8 は糞中細菌叢の構造と組成を示す。塩基配列の合計読み取り数 Control : 179,787 ± 18,479。Control+DSS : 187,456 ± 20,677。OE+DSS : 161,965 ± 26,451。サーモフィッシュャーサイエンティフィック社のイオンレポーターによる処理を実施，群間で有意差は見られなかった。有効な配列数 Control : 110,369 ± 17,423。Control+DSS : 118,994 ± 17,998。OE+DSS : 105,498 ± 20,893 Chao-1 指数は，群間で有意な変化は見られなかった (Fig.3-8A)。OE 群は，DSS 投与によって減少した Simpson 指数を回復する傾向が見られた (Fig.3-8B)。DSS 投与は糞中の細菌叢の PCA を変化させた。門レベルにおいて，Control+DSS 群は Control 群と比較して，Proteobacteria 門の構成比率が増加していた (Fig.3-8D)。OE+DSS 群は Control+DSS 群と比較して，Bacteroidetes 門の構成比率が有意に増加していた (Fig.3-8E)。属レベルにおいては，DSS 投与は有意に *Bifidobacterium*，*[Ruminococcus]*，*Ruminococcus* が有意に減少していた (Fig.3-8H-J)。Enterococcus が増加した (Fig.3-8K)。OE+DSS 群は Control+DSS 群と比較して *Ruminococcus* 属が有意に増加 (Fig.3-8J)，*Bacteroides* 属が増加傾向だった (Fig.3-8G)。

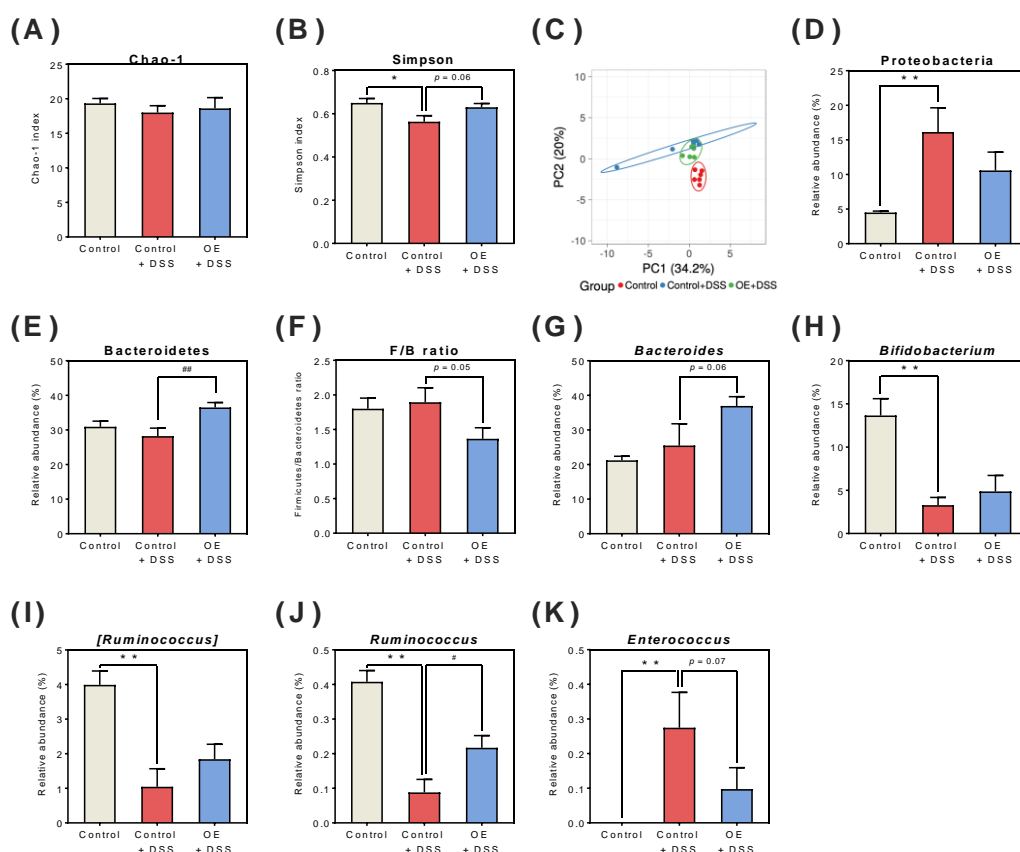
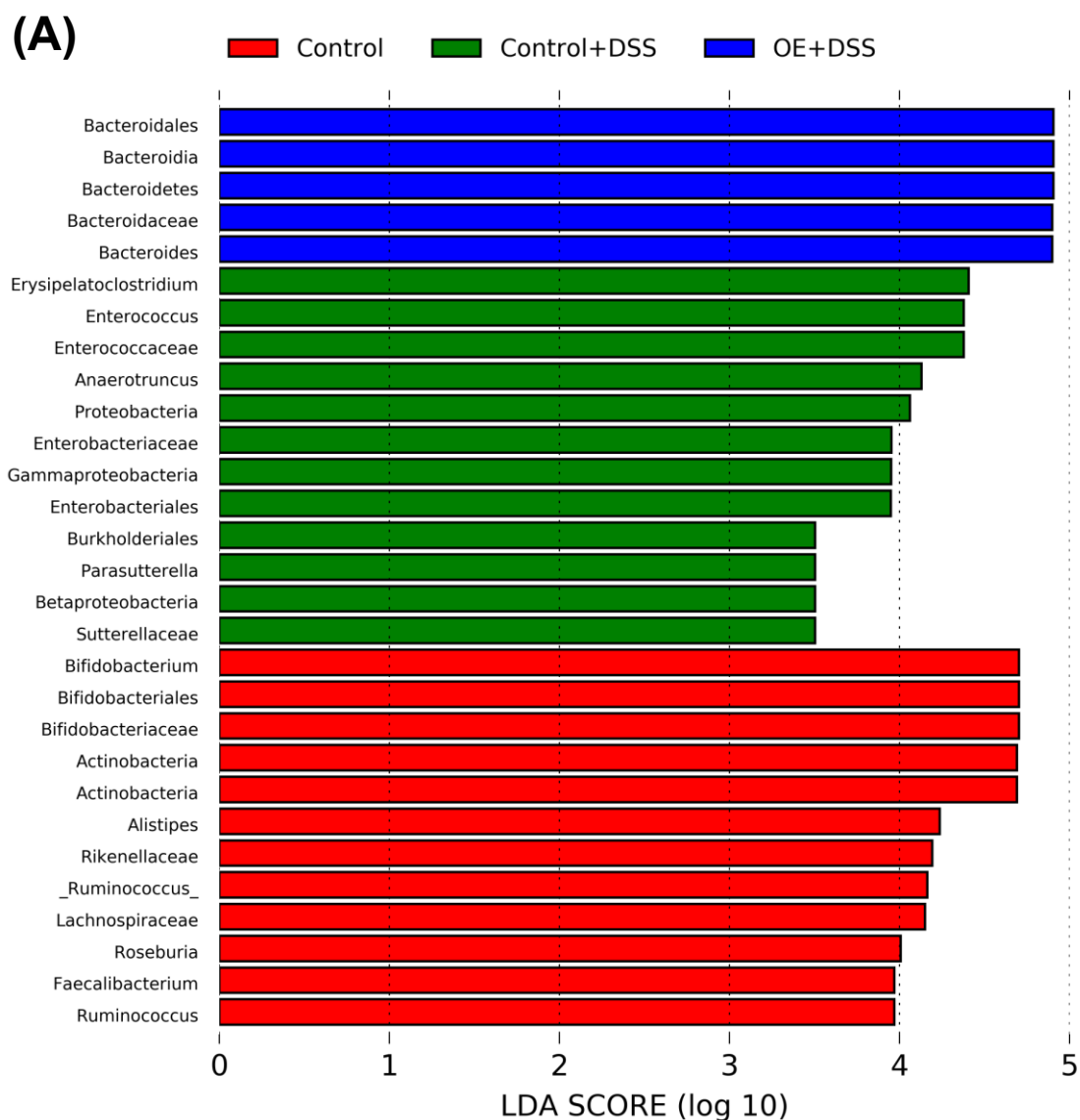


Figure 3-8. Microbiota community (structure and composition). (A)Chao-1 index. (B) Simpson index. (C) Principal component analysis of the bacterial genus community. (D,E,G–K) Relative abundance of each bacteria. (F) Firmicutes/Bacteroidetes (F/B) ratio. Results are presented as the mean \pm standard error of the mean (n = 6 for all groups). * p < 0.05, ** p < 0.01, # p < 0.05, and ## p < 0.01. DSS, dextran sulfate sodium; OE, oyster extract.

Fig.3-9 には、LDA ヒストグラムスコアと LEfSe クラドグラムを示す。29 の異なる分類群（門から属レベルまで）が群間で特徴付けられた。門レベルでは、Actinobacteria 門、Bacteroidetes 門、Firmicutes 門の系統型が Control 群、Control+DSS 群、OE+DSS 群で多く見られた。



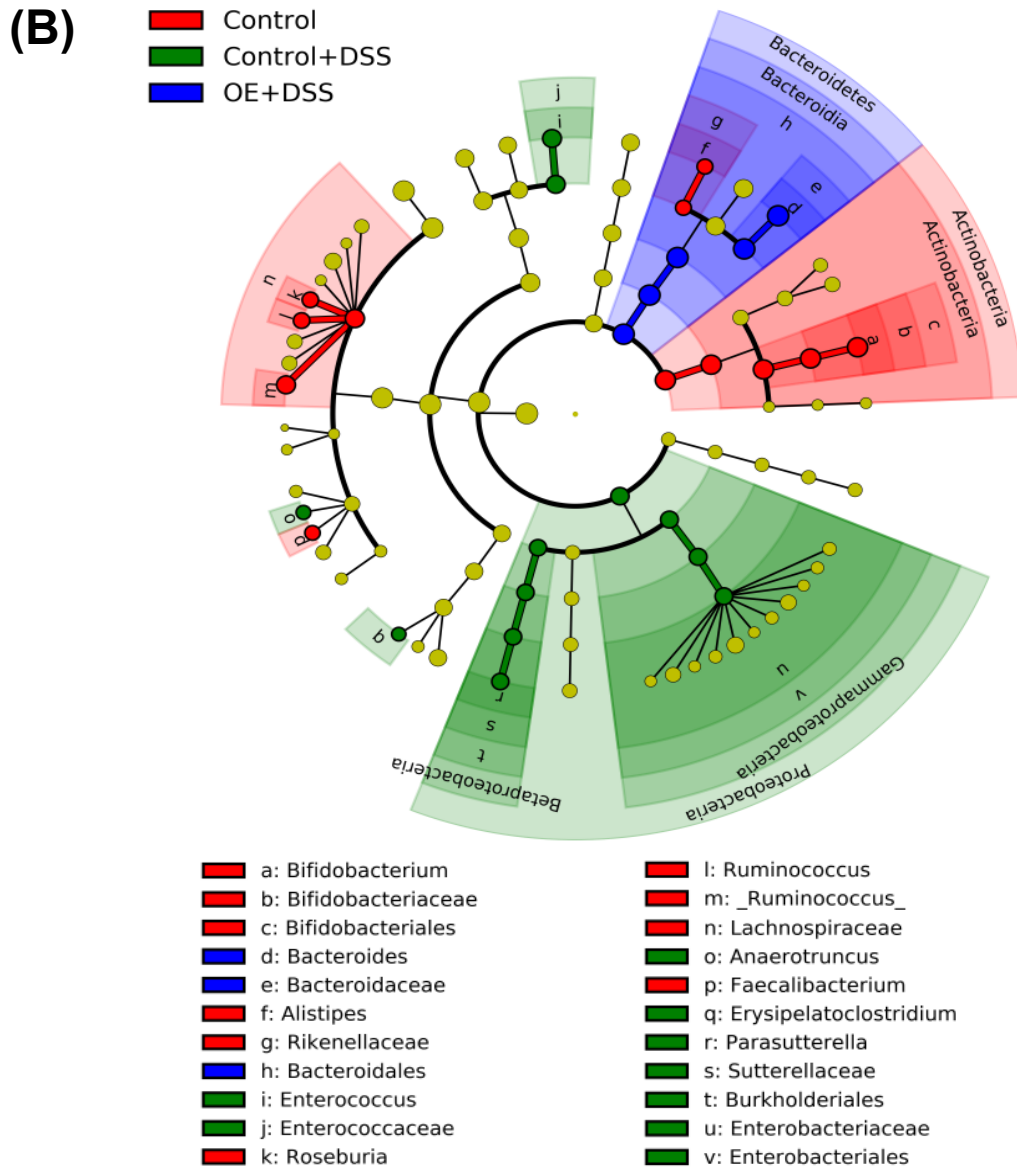


Figure 3-9. Comparisons of fecal microbiota using the linear discriminant analysis effect size analysis. (A) Results. (B) Cladogram. Parameters: linear discriminant analysis scores $\log_{10} > 3$ and $p < 0.05$. DSS, dextran sulfate sodium; OE, oyster extract.

3-4. 考察

慢性的大腸炎群における牡蠣肉エキスの影響を検証するために、DSS 反復投与によって誘導されたモデルマウスを用いて、大腸炎症状、腸内細菌叢、短鎖脂肪酸を調べた。大腸の組織病理学的評価 (Fig.3-5A) では、慢性大腸炎モデルマウスの特徴である単核細胞の湿潤 [107] および局所的に肥厚した粘膜 [106] が観察された。DSS の反復投与による慢性実験的大腸炎モデルマウスは、本研究の表現型から推察されるように首尾よく確立されたことを示した。Control+DSS 群と比較して、OE+DSS 群は、大腸腸の短縮、脾臓重量の増加、結腸の組織病理学的スコア (粘膜上皮の再生)、DAI の評価項目の一つである便中血液スコアが Day16 において緩和していた。第 2 章では、牡蠣肉エキス給餌が DSS 投与によって誘導された急性大腸炎モデルマウスに改善効果があることを報告した [108]。これらは、牡蠣肉エキス給餌が DSS 投与によって誘導された急性および慢性の実験的大腸炎を改善することを示している。

一方、牡蠣肉エキス給餌は大腸炎症状の重症度の指標の 1 つである大腸粘膜の炎症関連遺伝子群の発現に影響を与えなかった (Fig.3-6)。DSS 誘導大腸炎のメカニズムはあまり知られていないが、腸管上皮細胞の障害と炎症性物質 (細菌やその代謝物など) が粘膜下層に拡散した可能性が考えられている [111]。牡蠣肉エキスは、腸内の炎症性物質が下層組織に拡散防止に有効的ではない可能性が示唆される。一方で、大腸炎症状の重症度の間接的な指標である脾臓重量の増加は、牡蠣肉エキスによって有意に減少された (Fig.3-2D)。DSS 誘導性慢性大腸炎モデルマウスでは、腸に浸透した多量の DSS が脾臓に見られるため [112]、DSS によって誘導される免疫応答は脾臓の重量を増加させると考えられる。牡蠣肉エキスの給餌は腸管バリア機能を維持し、DSS 浸透を阻害し、脾臓重量の増加を抑制していると考えられる。腸管バリア機能の維持に関する牡蠣肉エキスの影響を明らかにするには、claudin, occludin, zonula occluden などの腸のタイトジャンクションタンパク質の発現と、および FITC をラベルしたデキストランの血中移行を調べる必要がある。さらに、牡蠣肉エキスの給餌は大腸粘膜上皮の再生スコアの低下と関連していた (Fig.3-5D)。腸管上皮細胞特異的インスリン様成長因子 1 [113] および上皮成長因子 [114] を含む成長因子は、上皮細胞の再生を促進することが知られている。最近の研究では、胆汁酸による膜貫通型 G タンパク質共役受容体 5 (TGR5) の活性化が腸管上皮の再生を促進し、粘膜バリアの回復に寄与していることが報告されている [115]。牡蠣肉エキスに含まれるタウリンは、回腸の胆汁酸組成を変化させることが報告されており [116]、この変化は TGR5 を活性化し、上皮細胞の再生を促進する可能性がある。

IBD の病因は複雑であるが、腸内細菌叢と代謝産物の変化は、IBD の病因に関連する最も重要な発見の一つである [117, 89]。このことから、我々は慢性大腸炎モデルマウスにおける糞中細菌叢と短鎖脂肪酸に対する牡蠣肉エキスの影響を調べることを目的とした。酢酸、プロピオン酸、酪酸などの主要な腸内の短鎖脂肪酸は、腸内細菌叢による難消化性多糖類およびタンパク質の発酵によって生成され、腸内環境の維持に重要な役割を果たしてい

る [118]。これまでの研究では、DSS 誘導大腸炎マウスの大腸および糞中の短鎖脂肪酸量が減少することが報告されている [90]。一方で、Control+DSS 群の糞中の要な短鎖脂肪酸量は Control 群と比較して増加していた (Fig.3-7A,B)。これまでの研究において、IBD 患者は大腸の短鎖脂肪酸の吸収と代謝の低下を示すことが報告されている [76, 109]。更に酢酸は大腸炎モデルマウスの誘導に使用されている [93]。

慢性大腸炎モデルマウスの重症度の指標と糞便中の SCFA 含有量の間には強い相関関係がみられている。これは第 2 章の急性大腸炎モデルマウスと同様の結果を示している [108]。したがって、慢性大腸炎モデルマウスにおける糞中酢酸および総 SCFA 含有量の上昇は、大腸機能障害に関連している可能性がある。Control+DSS 群と比較して、糞中の酢酸および総 SCFA 含有量は低下する傾向がみられた (Fig.3-7A,B)。牡蠣肉エキスによる糞中の短鎖脂肪酸量の低下は、慢性大腸炎モデルの重症度の緩和を示しており、粘膜上皮の再生度 (Fig.3-5D) と大腸長の短縮 (Fig.3-2C) の緩和によって、大腸機能を正常化させたことによる短鎖脂肪酸の吸収に寄与していると示唆される。これらの結果は、牡蠣肉エキス摂取が DSS 投与の 3 回の反復投与によって誘導された実験的慢性大腸炎を改善することを示している。

Control 群と比較して、Control+DSS 群において、糞中の吉草酸が減少していた。一方で、牡蠣肉エキスは吉草酸量の増加が見られた (Fig.3-7A,C)。先行研究において、ビタミン B の一種であるニコチンアミドが、DSS 誘導慢性大腸炎モデルマウスの大腸内容物中の吉草酸の減少を回復したことが報告されている [119]。他の主要な短鎖脂肪酸とは異なり、大腸における吉草酸の生理的な機能はよく分かっていない。一部の研究報告であるが、吉草酸は腸上皮細胞の増殖を促進し [120]、ヒストン脱アセチル化酵素を阻害することにより、大腸炎の発症を抑えることが報告されている [121]。さらに、糞中の吉草酸と *Turicibacter* の存在量の間には強い相関関係があった。最近の研究によると、*Turicibacter* 種のうち、*Turicibacter bilis* は吉草酸を生成できるが、*Turicibacter sanguinis* は生成できないことが報告されている [122]。現在の研究では、16S rRNA アンプリコンシーケンスは、いくつかの種までを同定できるが、*Turicibacter* の場合、属レベルまでしか同定できなかった。第 2 章における急性大腸炎マウスモデルに牡蠣肉エキスを給餌した場合、糞中の吉草酸量に有意差は見られなかった。牡蠣肉エキス給餌による糞中の吉草酸の増加は、抗大腸炎効果の一部分の要因であり、*Turicibacter* は吉草酸の産生に関与している可能性がある。

IBD 患者 [123] および大腸炎モデルマウス [106] は、腸内細菌叢の α 多様性の低下がみられる。Chao-1 と Simpson 指標は腸内細菌叢の推定値、種の豊富さと均一度の組み合わせを示している [76]。DSS 投与は Simpson 指標を減少した。一方、Control+DSS 群と比較して、OE+DSS 群の Simpson 指数は増加傾向がみられた ($p=0.06$, Fig.7B)。さらに、牡蠣肉エキスの給餌は、正常マウス (Control 群) に近い糞中細菌叢の構成の傾向が見られた (Fig.7C)。カイワレ大根 [124] やエビのペプチド [125] などの他の食品成分においても、DSS 投与によって低下した腸内細菌の多様性を改善することが報告されている。牡蠣肉エ

キスも同様に DSS 投与によって悪化した α , β 多様性を改善する可能性が示唆される。

さらに、大腸炎モデルマウス [126] および IBD 患者 [127] では、Verrucomicrobia と Proteobacteria の構成比率の増加が報告されている。DSS の投与は、Proteobacteria 門が豊富になり (Fig.3-9)、構成比率も増加していた (Fig.3-8D)。しかしながら、OE+DSS 群では Control+DSS 群と比較して有意な変化は見られなかった。Verrucomicrobia は、本研究で使用された 16S rRNA アンプリコンシーケンスでは検出できなかった。OE+DSS 群では、F/B 比の低下が見られた。F/B 比は腸の炎症の指標として使用される。Control+DSS 群よりも Bacteroidetes の構成比率が高いため、F/B 比の低下がみられた (Fig.3-8 E,F)。この結果は、第 2 章の急性大腸炎マウスモデルの研究と一致していた [108]。F/B 比は DSS 誘導大腸炎モデルマウスでは増加がみられる [128] が、本研究における F/B 比は DSS の投与の有無にかかわらず変化が見られなかった。牡蠣肉エキスを介した F/B 比の減少が DSS 誘導慢性実験的大腸炎の発症を抑制するかどうかは不明である。

本研究では、DSS 投与による慢性大腸炎モデルマウスにおいて *Bifidobacterium*, [*Ruminococcus*], および *Ruminococcus* の構成比率の減少が見られた (Fig.3-8H-J)。この現象は、これまでの報告と同様に DSS 投与大腸炎モデルマウスの細菌叢異常の結果を示している [129, 130]。DSS 投与によって減少した *Bifidobacterium* の構成比率は共役リノール酸を与えられたマウスで増加した事が報告されている [131] が、牡蠣肉エキスの給餌ではビフィズス菌の構成比率を増加できなかった。OE+DSS 群の *Ruminococcus* の構成比率は Control+DSS 群よりも高かった (Fig.3-8J)。さらに、*Ruminococcus* の構成比率と慢性大腸炎モデルマウスの指標との間には強い相関関係がみられた。*Ruminococcus* はグラム陽性菌であり、食物繊維と難消化性糖質を資化することにより、大腸での酪酸生産に大きく寄与している [132]。しかし、牡蠣肉エキスの給餌は、糞便中の酪酸量と組成の変化が見られなかった (Fig.3-7A,C)。一方で、*Enterococcus* は IBD の病状発症を誘導する可能性があり [133]、*Enterococcus* によって生成されたゼラチナーゼは、プロテアーゼ活性化受容体 2 を活性化することにより、腸管上皮を破壊する可能性が示唆されている [134]。さらに、*Enterococcus* の増殖は、若い IBD 患者の重症度と正の相関が報告されている [135]。DSS 投与は *Enterococcus* の構成比率を増加させた (Fig.3-8K) のに対し、牡蠣肉エキスの給餌は Control+DSS 群と比較して *Enterococcus* の構成比率を減少させる傾向がみられた ($p=0.07$, Fig.3-8K)。この研究の結果は、*Ruminococcus* と *Enterococcus* が DSS 誘導慢性大腸炎モデルマウスとどのように関連しているかを示すエビデンスは得られていない。この結果は第 2 章の急性大腸炎マウスモデルの *Enterococcus* の構成比率の減少と一致していた [108]。牡蠣肉エキスは *Ruminococcus* および *Enterococcus* の変化は慢性大腸炎の改善に重要な役割があると示唆される。

大腸炎抑制効果をもたらす牡蠣肉エキスの有効成分は特定できていないが、1 章、2 章と同様にグリコーゲンが候補に挙げられる。牡蠣肉エキス中のグリコーゲンが消化管モデルで消化酵素に耐性があることを観察している (石田, 細見 未発表データ)。グリコーゲン

の摂取が短鎖脂肪酸産生を著しく増加させ、盲腸内の細菌叢を改善したことが報告されている [63]。一方で、DSS 誘導性大腸炎を改善するタウリンにおいても、牡蠣肉エキス中に含まれている (5.5 g/100 g) [105]。さらに、IBD との関連が報告されている亜鉛においても [45]、牡蠣肉エキス中に (37.7 mg/100 g) 豊富に含まれている。このことから、牡蠣肉エキス給餌による大腸炎抑制効果は、単一成分に起因しているのではなく、複数種類の成分が複合的に働いていると考えられる。

牡蠣肉エキスの給餌は腸内細菌叢と糞中の短鎖脂肪酸量・組成の改善によって、DSS 反復投与慢性大腸炎の症状を緩和することを実証した。したがって、牡蠣肉エキスは、大腸炎の予防および改善に対する栄養補助食品や機能性食品素材に使用できると示唆される。

第4章 まとめ

DSSによる潰瘍性大腸炎抑制効果をもたらす天然物には以下の物が挙げられる。マグロ、柿タンニン、トリプトファン、夏白菊（フィーバーフュー）、藻類油など。例えば、マグロ（Tuna）は高タンパクかつ豊富な栄養素を含んでおり、ヒトの食材として消費されている。また、未利用資源として期待されるマグロの身以外の廃棄物（骨、黒味、皮、鱗）から酵素加水分解により抽出されたペプチドには、抗酸化、抗肥満、静菌、癌細胞増殖の抑制、抗炎症作用が報告されている。更に、潰瘍性大腸炎モデルマウスの病態を改善することが報告されている [83]。

しかしながら、食物連鎖の上位にいるマグロには神経毒性を有するメチル水銀（MeHg）を体内に蓄積することが知られている。特に妊婦がメチル水銀を摂取すると胎児への影響が懸念される。メチル水銀は妊婦の胎盤を通じて胎児に移行し、血液-脳関門を通過して脳に到達してしまう。メチル水銀は神経系に作用し、高濃度に暴露するとヒトに神経障害や発達障害を引き起こしてしまう。胎児の発達中の脳はメチル水銀に対する感受性が高いため、比較的低濃度の暴露であってもその影響が懸念されてしまう。その為、妊娠中の母親は過剰なメチル水銀を摂取しないようにマグロなどの海産物の摂食制限が必要な場合がある。

柿より高純度に抽出した柿タンニン（Persimmon-derived tannin）を摂取することで潰瘍性大腸炎モデルマウスの病態を改善する事が報告されている [136]。柿由来のタンニンには、抗酸化作用、抗菌作用、抗炎症作用などの多様な作用が報告されている。潰瘍性大腸炎モデルマウスの病態では、柿タンニンは腸内の悪玉菌の増殖と炎症反応を抑える。しかしながら、天然に存在する植物性ポリフェノールのタンニンは飲料、食品、果物の一成分として含有されているときには、下痢止め、消化器系疾患、各種皮膚疾患などに有効であるが、タンニンを単体で過剰に摂取した場合、収斂作用が強く働き、便秘を引き起こす報告がある [137]。

必須アミノ酸であるトリプトファンは抗炎症、抗酸化作用により潰瘍性大腸炎モデルマウスの病態の症状緩和が報告されている [138]。一方で、トリプトファンの代謝産物である5-ヒドロキシトリプタミン（セロトニン）が大腸炎の悪化、キヌレニン経路により生成される3-ヒドロキシサントニン酸や3-ヒドロキシキヌレニンは、酸化ストレスの補助因子となることが報告されている。トリプトファンの投与による大腸炎に対する効果の作用機序は不明であることから、摂取には注意を要する必要がある。

以上のことから、潰瘍性大腸炎モデルマウスの病態に対する改善にはいくつかの天然物が見受けられるが、過剰摂取など安全性の問題を考慮する必要がある。同様に牡蠣においても重金属や貝毒などが安全性の問題とされている。しかしながら、牡蠣肉エキスは牡蠣の身を直接使用せずに熱水抽出にてエキス化しているため、重金属や貝毒は牡蠣の身の中に残留している。その為、エキス中の重金属である鉛を検査しても検出限界以下である。麻痺性

貝毒，下痢性貝毒に関しても検出限界以下である。牡蠣肉エキスは上市してから 50 年近く経過しているが，摂取制限のある妊婦，老若男女に至る飲用者からは安全性に関する重大な知見について現在まで報告されていない。

上記の天然物と同様に牡蠣肉エキスには抗酸化，抗炎症作用が報告されており，大腸炎症状の緩和以外にも健康維持作用がある。例えば，肝臓保護や抗ストレス作用が報告されている。高用量の解熱鎮痛剤（APAP）による肝臓障害を引き起こしたラットでは肝臓中のグルタチオン量の低下が見られるが，牡蠣肉エキスではグルタチオン量の増加が見受けられた [139]。また，マウスにおける非アルコール性脂肪肝炎（NASH）に対しても牡蠣肉エキスの効果が見受けられた [140]。抗不安・抗ストレス試験ではいくつかの試験が報告されている [141]。抗不安作用について，マウスを用いたホールボード試験により評価を行っており，牡蠣肉エキスの 5 日間および 28 日間反復投与試験で抗不安作用を示すことを確認している。加えて，精神的ストレスにより不安状態を惹起したマウスに対して抗不安作用を確認している。また，カニクイザルの軽ストレスモデル（モンキーチェアによるストレス負荷）試験では，ストレス誘発後に，ストレスマーカー因子である血中コルチゾールとアドレナリンの増加を抑制し，DHEA に対して減少は認められなかった [142]。このことから，牡蠣肉エキスには大腸炎の緩和以外にも肝臓保護作用，抗不安・抗ストレス作用がある。したがって，大腸炎の緩和をもたらす天然物の中でも特に牡蠣肉エキスはヒトの健康促進に幅広く効果があることが示唆される。

以上より，牡蠣肉エキスは，腸内細菌叢と腸内細菌による短鎖脂肪酸生成に影響を及ぼすことによって急性および慢性大腸炎の諸症状を緩和したことから，IBD 患者の症状緩和につながる安全な天然由来物質になり得る可能性がある結論した。

参考文献

- [1] 安藤朗, “腸内細菌の種類と定着：その隠された臓器としての機能,” 日内会誌, 104 : 29~34, 2015.
- [2] Akira Andoh Atsushi Nishida, “Alteration of the Gut Microbiome in Inflammatory Bowel Disease,” *Digestion DOI*, 10.1159/000525925, 2022.
- [3] RB, Sartor, “ Microbial influences in inflammatory bowel diseases, ” *Gastroenterology*, 134:577–94, 2008.
- [4] Sekirov I, et al, “Gut microbiota in health and disease,” *Physiol Rev*, 90 : 859—904, 2010.
- [5] Amato, K.R.; Arrieta, M.-C.; Azad, M.B.; Bailey, M.T.; Broussard, J.L.; Bruggeling, C.E.; Claud, E.C.; Costello, E.K.; Davenport, E.R.; Dutilh, B.E.; al., et, “The human gut microbiome and health inequities, ” *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 118, e2017947118., 2021.
- [6] Hsiao EY, McBride SW, Hsien S, Sharon G, Hyde ER, McCue T, Codelli JA, Chow J, Reisman SE, Petrosino JF, Patterson PH, Mazmanian SK, “Microbiota modulate behavioral and physiological abnormalities associated with neurodevelopmental disorders,” *Cell*, 155:1451–1463, 2013.
- [7] Browne HP, Neville BA., Forster SC., Lawley TD, “Transmission of the gut microbiota: spreading of health,” *Nat Rev Microbiol*, 15: 531–543, 2017.
- [8] 日本消化器病学会_炎症性腸疾患(IBD)診療ガイドライン 2020”.
- [9] Murakami Y, Nishiwaki Y, Oba MS, et al, “Estimated prevalence of ulcerative colitis and Crohn’s disease in Japan in 2014: an analysis of a nationwide survey,” *J Gastroenterol*, 54: 1070-1077, 2019.
- [10] Kiminori NAKAMURA*, Mani KIKUCHI, Tokiyoshi AYABE, “Regulation of the Intestinal Microbiota by Antimicrobial Peptide a-Defensin,” *腸内細菌学雑誌*, 33 : 129-135, 2019.
- [11] S. C. Nalle & J. R. Turner, “Intestinal barrier loss as a critical pathogenic link between inflammatory bowel disease and graft-versus-host disease,” *Mucosal Immunology*, 8, 720, 2015.
- [12] Schwartz A, Taras D, Schafer K, Beijer S, Bos NA, Donus C, et al, “Microbiota and SCFA in lean and overweight healthy subjects,” *Obesity*, 18(1): 190–5., 2010.
- [13] Flint HJ, Scott KP, Louis P, Duncan SH, “The role of the gut microbiota in nutrition

- and health,” *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, Oct; 9(10): 577–89, 2012.
- [14] Marchesi JR, Adams DH, Fava F, Hermes GDA, Hirschfield GM, Hold G, et al, “The gut microbiota and host health: a new clinical frontier,” *Gut*, Feb; 65(2): 330–9, 2016.
- [15] NI, McNeil, “The contribution of the large intestine to energy supplies in man,” *Am J Clin Nutr*, Feb 39(2): 338–42, 1984.
- [16] Hidenori Shimizu, Ryuji Ohue-Kitano, Ikuo Kimura, “Regulation of host energy metabolism by gut microbiota-derived short-chain fatty acids,” *Glycative Stress Research*, 6 (3): 181-191, 2019.
- [17] Macfarlane GT, Macfarlane S, “Fermentation in the human large intestine: its physiologic consequences and the potential contribution of prebiotics. *J Clin Gastroenterol*,” *J Clin Gastroenterol*, Nov;45 Suppl: S120–7, 2011.
- [18] 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*, 469,543–547, 2011.
- [19] Sakata, T. & H. Setoyama, “Local stimulatory effect of short-chain fatty acids on the mucus release from the hindgut mucosa of rats (*Rattus norvegicus*),” *Comp. Biochem. Physiol. Part A*, 111(3), 429-432, 1995.
- [20] Shimotoyodome, A., et al, “Short chain fatty acids but not lactate or succinate stimulate mucus release in the rat colon *Comp, Biochem. Physiol, Part A*: 125(4), 525-531, 2000.
- [21] Sakata, T. & W. T. von Engelhardt, “Luminal mucin in the large intestine of mice, rats and guinea pigs,” *Cell Tissue Res*, 219(3), 629-635, 1981.
- [22] Yanhong Luo, Yue Xiao, Jianxin Zhao, Hao Zhang, Wei Chen, Qixiao Zhai, “The role of mucin and oligosaccharides via cross-feeding activities by *Bifidobacterium*: A review,” *International Journal of Biological Macromolecules*, 167, 15, 1329-1337, 2021.
- [23] Zhou, M.; He, J.; Shen, Y.; Zhang, C.; Wang, J.; Chen, Y, “New Frontiers in Genetics, Gut Microbiota, and Immunity: A Rosetta Stone for the Pathogenesis of Inflammatory Bowel Disease,” *Biomed. Res*, 8201672, 2017.
- [24] Hussain SP, Amstad P, Raja K, et al, “Increased p53 mutation load in noncancerous colon tissue from ulcerative colitis : a cancer-prone chronic inflammatory disease,” *Cancer Res*, 60 ; 3333—3337, 2000.
- [25] Hofseth LJ, Saito S, Hussain SP, et al, “Nitric oxide-induced cellular stress and p53 activation in chronic inflammation,” *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100 ; 143—148, 2003.

- [26] Kimura H, Hokari R, Miura S, et al, "Increased expression of an inducible isoform of nitric oxide synthase and the formation of peroxynitrite in colonic mucosa of patients with active ulcerative colitis," *Gut* 42, 180—187, 1998.
- [27] Shoda R, Matsueda K, Yamato S et al, "Epidemiologic analysis of Crohn disease in Japan ; increased dietary intake of n—6 polyunsaturated fatty acids and animal protein relates to the increased incidence of Crohn disease in Japan," *Am J Clin Nutr*, 63 : 741—745, 1996.
- [28] Hart AR, Luben R, Olsen A et al, "Diet in the aetiology of ulcerative colitis ; a European prospective cohort study," *Digestion* , 77 : 57—64, 2008.
- [29] John S, Luben R, Shrestha SS et al, "Dietary n—3 polyunsaturated fatty acids and the aetiology of ulcerative colitis ; a UK prospective cohort study," *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 22 : 602—606, 2010.
- [30] Ananthakrishnan AN, Khalili H, Konijeti GG et al, "Long-term intake of dietary fat and risk of ulcerative colitis and Crohn's disease," *Gut*, 63 : 776 —778, 2014.
- [31] Tomohisa Sujino and Takanori Kanai, "Development, Competition and Plasticity of the T-lymph cells in inflammatory bowel disease," *Jpn. J. Immunol*, 35 (5) 399~411, 2012.
- [32] SARTOR., R. BALFOUR, "Therapeutic Manipulation of the Enteric Microflora in Inflammatory Bowel Diseases:Antibiotics, Probiotics, and Prebiotics, " *GASTROENTEROLOGY*, 126:1620–1633, 2004.
- [33] RB., Sartor, " Microbial Influences in Inflammatory Bowel Diseases, " *Gastroenterology*, 134: 577–594, 2008.
- [34] Zakerska-Banaszak, O.; Tomczak, H.; Gabryel, M.; Batur, A.; Wolko, L.; Michalak, M.; Malinska, N.; Mankowska-Wierzbicka, D.;Eder, P.; Dobrowolska, A.; et al., "Dysbiosis of gut microbiota in Polish patients with ulcerative colitis," *A pilot study. Sci. Rep*, 11, 2166, 2021.
- [35] Henke MT, et al, "Ruminococcus gnavus, a member of the human gut microbiome associated with Crohn's disease, produces an inflammatory polysaccharide," *Proc Natl Acad Sci U S A* , 116 : 12672-12677, 2019.
- [36] Sandborn, W.J., "Current directions in IBD therapy: What goals are feasible with biological modifiers?," *Gastroenterology*, 135,1442–1447, 2008.
- [37] Harris, K.G.; Chang, E.B., " The intestinal microbiota in the pathogenesis of inflammatory bowel diseases: New insights into complex disease.," *Clin. Sci*, 132, 2013–2028., 2018.

- [38] 荒川好満, 山崎妙子, “牡蠣 その知識と調理の実際,” 柴田書店, 1977 年.
- [39] Tapiero, H.; Tew, K.D., “ Increased glutathione expression in cells induced by *Crassostera gigas* extract (JCOE),” *Biomed. Pharm*, 50, 149–153., 1996.
- [40] Yoshikawa, T.; Naito, Y.; Masui, Y.; Fujii, T.; Boku, Y.; Yoshida, N.; Kondo, M., “30—Antioxidant Properties of *Crassostera gigas* Oyster Extract.,” In *Antioxidant Food Supplements in Human Health*; Packer, L., Hiramatsu, M., Yoshikawa, T., Eds, pp. 461–469., 1999.
- [41] Matsuda, Y.; Yoshida, M., “Examination of the Anti-tumor Action of Oyster Extract for P388 Leukemia,” *J. Jpn. Health Med. Assoc*, 13, 3–10., 2004.
- [42] Matsuda, Y.; Izuta, S.; Fujita, T.; Murata, M.; Doi, E.; Ishizu, H.; Ohta, T.; Nakatsuka, M.; Tsubouti, R.; Shibata, Y., “Influence of oyster extract on the platelet aggregation, the nucleotides and minerals of blood in diabetes mellitus patients,” *Trace Nutr. Res*, 9, 67–73., 1992.
- [43] Nishihori, Y.; Suzuki, Y.; Kishinami, M.; Fujisawa, H.; Nagaoka, S.; Yamazaki, N.; Matsui, H.; Matsuda, Y., “Study of Safety and Functionality in Oyster Extract Powder,” *Trace Nutr.Res*, 28,40-44, 2011.
- [44] Ryota Hosomi, Yoshikazu Matsuda, Ayako Ishimaru, Kenji Fukunaga and Munehiro Yoshida, “Preventive Effects of Dietary Oyster Extract on the Development of 1,2-Dimethylhydrazine-Induced Colonic Aberrant Crypt Foci in Mice,” *Trace Nutrients Research*, 23, 13-16, 2006.
- [45] Higashimura, Y.; Takagi, T.; Naito, Y.; Uchiyama, K.; Mizushima, K.; Tanaka, M.; Hamaguchi, M.; Itoh, Y., “Zinc deficiency activates the IL-23/Th17 axis to aggravate experimental colitis in mice.,” *J. Crohns Colitis*, 14, 856–866, 2020.
- [46] 松田芳和, “牡蠣亜鉛の性質とその栄養有効性. ミネラルの科学と最新応用技術 (糸川嘉則),” シーエムシー出版, 東京: pp.124-135, 2008.
- [47] 吉田宗弘, 平田登, 木谷祥子, 松田芳和, “牡蠣から調製した亜鉛濃縮物の性質,” *微量栄養素研究*, 19: 43-46, 2002.
- [48] 辻貴之, 菊池祐子, 中塚千晶, 木谷祥子, 福永健治, 西山利正, 松田芳和, 吉田宗弘, “牡蠣の酸可溶性画分に含有される亜鉛の栄養有効性,” *微量栄養素研究*, 18: 63-66, 2001.
- [49] 久保道徳, 松田秀秋, 田村崇子, 高津政雄, “バランスター [カキ *Crassostrea gigas* (THUNBERG) の肉エキス] の実験的肝障害に対する予防および肝機能改善作用,” *基礎と臨床*, 14: 1437-1442, 1980.
- [50] 松田芳和, 出田祐久, 藤田忠義, 太田隆男, 中塚正博, 吉野昌孝, 柴田幸雄, “糖尿

- 病・肝臓病患者に対するかき肉エキスの影響,” 微量栄養素研究, 12 : 91-97, 1994.
- [51] Hosomi R, Matsuda Y, Watanabe Y, Fukunaga K, Yoshida M, “Effect of dietary oyster extract on the p-aminophenol-induced nephrotoxicity in rats.,” *Trace Nutrients Research*, 25: 91-95, 2008.
- [52] 雑賀あずさ, 國澤純, “食用油を介した「食事－腸内細菌－宿主」ネットワークによる免疫制御,” *腸内細菌誌*, 32 : 167-174, 2018.
- [53] Cani PD, Bibiloni R, Knauf C, Waget A, Neyrinck AM, Delzenne NM, Burcelin R, “Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet-induced obesity and diabetes in mice,” *Diabetes*, 57: 1470-1481, 2008.
- [54] 池田祐生, 細見亮太, 松田芳和, 新井博文, 下埜敬紀, 神田靖士, 西山利正, 吉田宗弘, 福永健治, “カキ肉エキスの給餌によるラットの盲腸内細菌叢の変化,” 微量栄養素研究, 35 : 41 – 46, 2018.
- [55] Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC Jr, “AIN-93 purified diets for laboratory rodents: Final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet,” *J Nutr* 123, 1939-1951, 1993.
- [56] Segata N, Izard J, Waldron L, Gevers D, Miropolsky L, Garrett WS, Huttenhower C, “Metagenomic biomarker discovery and explanation,” *Genome Biol*, 12: R60, 2011.
- [57] Ihaka R, Gentleman R, “R: a language for data analysis and graphics,” *J Comp Graph Stat*, 5:299-314. Available via <http://www.R-project.org>, 1996.
- [58] Duan J, Ishida M, Aida K, Tsuduki T, Zhang J, Manabe Y, Hirata T, Sugawara T, “Dietary Cerebroside from Sea Cucumber (*Stichopus japonicus*): Absorption and Effects on Skin Barrier and Cecal Short-Chain Fatty Acids,” *J Agric Food Chem*, 64: 7014-7021., 2016.
- [59] An HJ, Chung HS, An NH, Park RK, Kim SH, Kim CH, Kim YK, Kim HM, Hong SH, “Regulatory effect of doxycycline on high-fat diet-induced obesity in C57BL/6J mice,” *Biol Pharm Bull*, 27: 1297-1300, 2004.
- [60] Hildebrandt MA, Hoffmann C, Sherrill-Mix SA, Keilbaugh SA, Hamady M, Chen YY, Knight R, Ahima RS, Bushman F, Wu GD, “High-fat diet determines the composition of the murine gut microbiome independently of obesity.,” *Gastroenterology*, 137:1716-1724, 2009.
- [61] MacFabe DF, Cain NE, Boon F, Ossenkopp K-P, Cain DP, “Effects of the enteric bacterial metabolic product propionic acid on object-directed behavior, social behavior, cognition, and neuroinflammation in adolescent rats: Relevance to autism spectrum disorder,” *Behav Brain Res*, 217: 47-54, 2011.

- [62] 河津大輔, 大島直子, 奥積昌世, 藤井建夫, “ラットの盲腸内容物と糞便の細菌叢および代謝産物の比較,” 日食微誌, 11 : 125-128., 1994-1995.
- [63] Furuyashiki T, Takata H, Kojima I, Kuriki T, Fukuda I, Ashida H, “Metabolic fate of orally administered enzymatically synthesized glycogen in rats,” *Food Funct* , 2: 183-189, 2011.
- [64] Sasaki K, Sasaki D, Okai N, Tanaka K, Nomoto R, Fukuda I, Yoshida KI, Kondo A, Osawa R, “Taurine does not affect the composition, diversity, or metabolism of human colonic microbiota simulated in a single-batch fermentation system,” *PLoS One*, 12: e0180991, 2017.
- [65] Nakamura, J.; Ikeda, Y.; Hosomi, R.; Ishida, T.; Matsui, H.; Matsuda, Y.; Shimono, .; Kanda, S.; Nishiyama, T.; Yoshida, M.; et al., “Effects of Dietary Oyster-Extract on the Composition of the Microbiota and Short-Chain Fatty Acids in the Feces of Mice.,” *Trace Nutr. Res*, 36, 21–28., 2019.
- [66] Zhou, M.; He, J.; Shen, Y.; Zhang, C.; Wang, J.; Chen, Y., “ New Frontiers in Genetics, Gut Microbiota, and Immunity: A Rosetta Stone for the Pathogenesis of Inflammatory Bowel Disease.,” *Biomed. Res. Int.*, 2017, 8201672., 2017.
- [67] Kau, A.L.; Ahern, P.P.; Griffin, N.W.; Goodman, A.L.; Gordon, J.I., “ Human nutrition, the gut microbiome and the immune system.,” *Nature*, 474, 327–336. , 2011.
- [68] O’Hara, A.M.; Shanahan, F., “The gut flora as a forgotten organ,” *EMBO Rep*, 7, 688–693. , 2006 .
- [69] Ni, J.; Wu, G.D.; Albenberg, L.; Tomov, V.T., “ Gut microbiota and IBD: Causation or correlation?,” *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol*, 14, 573–584 , 2017.
- [70] Ito, R.; Shin-Ya, M.; Kishida, T.; Urano, A.; Takada, R.; Sakagami, J.; Imanishi, J.; Kita, M.; Ueda, Y.; Iwakura, Y.; et al., “Interferon gamma is causatively involved in experimental inflammatory bowel disease in mice.,” *Clin. Exp. Immunol*, 146, 330–338, 2006.
- [71] Dieleman, L.A.; Palmen, M.J.; Akol, H.; Bloemena, E.; Peña, A.S.; Meuwissen, S.G.; Van Rees, E.P., “ Chronic experimental colitis induced by dextran sulphate sodium (DSS) is characterized by Th1 and Th2 cytokines,” *Clin. Exp. Immunol.*, 114, 385–391, 1998.
- [72] Hosomi, R.; Matsudo, A.; Sugimoto, K.; Shimono, T.; Kanda, S.; Nishiyama, T.; Yoshida, M.; Fukunaga, K., “Dietary Fat Influences the Expression of Genes Related to Sterol Metabolism and the Composition of Cecal Microbiota and Its

- Metabolites in Rats.,” *J.Oleo. Sci*, 68, 1133–1147, 2019.
- [73] Maeda, H.; Hosomi, R.; Yokoyama, T.; Ikeda, Y.; Nishimoto, A.; Tanaka, G.; Shimono, T.; Kanda, S.; Nishiyama, T.; Yoshida, M.; et al., “Dietary Alaska pollock protein attenuates liver steatosis and alters gut microbiota in leptin-deficient ob/ob mice.,” *J. Funct.Foods*, 75, 104266, 2020.
- [74] Axelsson, L.G.; Landström, E.; Bylund-Fellenius, A.C., “ Experimental colitis induced by dextran sulphate sodium in mice: Beneficial effects of sulphasalazine and olsalazine,” *Aliment. Pharmacol. Ther*, 12, 925–934, 1998.
- [75] Lavelle, A.; Sokol, H., “ Gut microbiota-derived metabolites as key actors in inflammatory bowel disease,” *Nat. Rev. Gastroenterol.Hepatol*, 17, 223–237., 2020.
- [76] Kim, B.R.; Shin, J.; Guevarra, R.; Lee, J.H.; Kim, D.W.; Seol, K.H.; Lee, J.H.; Kim, H.B.; Isaacson, R., “ Deciphering Diversity Indices for a Better Understanding of Microbial Communities.,” *J. Microbiol. Biotechnol*, 27, 2089–2093., 2017.
- [77] Jarnum, S.; Jensen, K.B., “Fecal radioiodide excretion following intravenous injection of 131-I-albumin and 125-I-immunoglobulin G in chronic inflammatory bowel disease. An aid to topographic diagnosis.,” *Gastroenterology*, 68, 1433–1444, 1975.
- [78] Saul, D.; Kosinsky, R.L., “Dextran Sodium Sulfate-induced Colitis as a Model for Sarcopenia in Mice.,” *Inflamm. Bowel. Dis*, 26,56–65, 2020.
- [79] Okayasu, I.; Hatakeyama, S.; Yamada, M.; Ohkusa, T.; Inagaki, Y.; Nakaya, R., “A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice.,” *Gastroenterology*, 98, 694–702, 1990.
- [80] Randhawa, P.K.; Singh, K.; Singh, N.; Jaggi, A.S., “A review on chemical-induced inflammatory bowel disease models in rodents.,” *Korean J. Physiol. Pharmacol*, 18,279–288, 2014.
- [81] Xu, Z.; Tang, H.; Huang, F.; Qiao, Z.; Wang, X.; Yang, C.; Deng, Q., “ Algal Oil Rich in n-3 PUFA Alleviates DSS-Induced Colitis via Regulation of Gut Microbiota and Restoration of Intestinal Barrier.,” *Front. Microbiol*, 11, 615404., 2020.
- [82] Hwang, S.; Hwang, S.; Jo, M.; Lee, C.G.; Rhee, K.J., “Oral administration of Korean ropolis extract ameliorates DSS-induced colitis in BALB/c mice,” *Int. J. Med. Sci*, 17, 1984–1991., 2020.
- [83] Xiang, X.W.; Zhou, X.L.; Wang, R.; Shu, C.H.; Zhou, Y.F.; Ying, X.G.; Zheng, B., “Protective Effect of Tuna Bioactive Peptide on Dextran Sulfate Sodium-Induced Colitis in Mice.,” *Mar. Drugs*, 19, 127, 2021.
- [84] Wen, C.; Guo, Q.; Wang, W.; Duan, Y.; Zhang, L.; Li, J.; He, S.; Chen, W.; Li, F.,

- “Taurine Alleviates Intestinal Injury by Mediating Tight Junction Barriers in Diquat-Challenged Piglet Models.,” *Front. Physiol*, 11, 449, 2020 .
- [85] Peng, L.; Gao, X.; Nie, L.; Xie, J.; Dai, T.; Shi, C.; Tao, L.; Wang, Y.; Tian, Y.; Sheng, J., “ Astragalin Attenuates Dextran Sulfate Sodium (DSS)-Induced Acute Experimental Colitis by Alleviating Gut Microbiota Dysbiosis and Inhibiting NF-B Activation in Mice,” *Front. Immunol*, 11, 2058, 2020.
- [86] Arpaia, N.; Campbell, C.; Fan, X.; Dikiy, S.; van der Veeken, J.; deRoos, P.; Liu, H.; Cross, J.R.; Pfeffer, K.; Coffey, P.J.; et al., “Metabolites produced by commensal bacteria promote peripheral regulatory T-cell generation,” *Nature*, 504, 451–455, 2013.
- [87] Vital, M.; Karch, A.; Pieper, D.H., “ Colonic Butyrate-Producing Communities in Humans: An Overview Using Omics Data,” *mSystems*, 2,e00130-17 , 2017.
- [88] Kelly, C.J.; Zheng, L.; Campbell, E.L.; Saeedi, B.; Scholz, C.C.; Bayless, A.J.; Wilson, K.E.; Glover, L.E.; Kominsky, D.J.; Magnuson, A.; et al., “ Crosstalk between Microbiota-Derived Short-Chain Fatty Acids and Intestinal Epithelial HIF Augments Tissue Barrier Function,” *Cell Host Microbe*, 17, 662–671, 2015.
- [89] Huda-Faujan, N.; Abdulmir, A.S.; Fatimah, A.B.; Anas, O.M.; Shuhaimi, M.; Yazid, A.M.; Loong, Y.Y., “The impact of the level of the intestinal short chain Fatty acids in inflammatory bowel disease patients versus healthy subjects,” *Open Biochem. J*, 4, 53-58, 2010.
- [90] Machiels, K.; Joossens, M.; Sabino, J.; De Preter, V.; Arijs, I.; Eeckhaut, V.; Ballet, V.; Claes, K.; Van Immerseel, F.; Verbeke, K.; et al., “A decrease of the butyrate-producing species *Roseburia hominis* and *Faecalibacterium prausnitzii* defines dysbiosis in patients with ulcerative colitis,” *Gut*, 63, 1275–1283, 2014.
- [91] Roediger, W.E., “The colonic epithelium in ulcerative colitis: An energy-deficiency disease?,” *Lancet*, 2, 712–715, 1980.
- [92] Vernia, P.; Caprilli, R.; Latella, G.; Barbetti, F.; Magliocca, F.M.; Cittadini, M., “Fecal lactate and ulcerative colitis,” *Gastroenterology*, 95, 1564–1568, 1988.
- [93] Karakoyun, B.; Ertaş, B.; Yüksel, M.; Akakin, D.; Çevik, Ö.; Sener, G., “ Ameliorative effects of riboflavin on acetic acid-induced colonic injury in rats.,” *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol*, 45, 563–572, 2018.
- [94] Verbeke, K.A.; Boobis, A.R.; Chiodini, A.; Edwards, C.A.; Franck, A.; Kleerebezem, M.; Nauta, A.; Raes, J.; van Tol, E.A.F.; Tuohy, K.M., “ Towards microbial fermentation metabolites as markers for health benefits of prebiotics.,” *Nutr. Res.*

- Rev, 28, 42-66, 2015.
- [95] Fan, S.; Zhang, Z.; Zhong, Y.; Li, C.; Huang, X.; Geng, F.; Nie, S., “ Microbiota-related effects of prebiotic fibres in lipopolysaccharideinduced endotoxemic mice: Short chain fatty acid production and gut commensal translocation.,” *Food Funct*, 12, 7343-7357, 2021.
- [96] Thomas, A.M.; Manghi, P.; Asnicar, F.; Pasolli, E.; Armanini, F.; Zolfo, M.; Beghini, F.;Manara, S.; Karcher, N.; Pozzi, C.; et al., “Metagenomic analysis of colorectal cancer datasets identifies cross-cohort microbial diagnostic signatures and a link with choline degradation.,” *Nat. Med*, 25, 667–678, 2019.
- [97] Macfarlane, G.T.; Gibson, G.R.; Beatty, E.; Cummings, J.H., “ Estimation of short-chain fatty acid production from protein by human intestinal bacteria based on branched-chain fatty acid measurements.,” *FEMS Microbiol. Lett*, 101, 81–88., 1992.
- [98] Shen, Z.-H.; Zhu, C.-X.; Quan, Y.-S.; Yang, Z.-Y.; Wu, S.; Luo, W.-W.; Tan, B.; Wang, X.-Y., “Relationship between intestinal microbiota and ulcerative colitis: Mechanisms and clinical application of probiotics and fecal microbiota transplantation,” *World J.Gastroenterol*, 24, 5–14, 2018.
- [99] Silva, Y.P.; Bernardi, A.; Frozza, R.L., “ The Role of Short-Chain Fatty Acids from Gut Microbiota in Gut-Brain Communication,” *Front. Endocrinol*, 11, 25., 2020.
- [100] Margolles, A.; Sánchez, B., “ Selection of a *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* strain with a decreased ability to produce acetic acid,” *Appl. Environ. Microbiol*, 78, 3338–3342, 2012.
- [101] Özcelik, S.; Kuley, E.; Özogul, F., “ Formation of lactic, acetic, succinic, propionic, formic and butyric acid by lactic acid bacteria.,” *LWT*, 73, 536–542, 2016.
- [102] Crost, E.H.; Tailford, L.E.; Le Gall, G.; Fons, M.; Henrissat, B.; Juge, N., “ Utilisation of mucin glycans by the human gut symbiont *Ruminococcus gnavus* is strain-dependent,” *PLoS ONE*, 8, e76341, 2013.
- [103] Willing, B.P.; Dicksved, J.; Halfvarson, J.; Andersson, A.F.; Lucio, M.; Zheng, Z.;Järnerot, G.; Tysk, C.; Jansson, J.K.; Engstrand, L., “A pyrosequencing study in twins shows that gastrointestinal microbial profiles vary with inflammatory bowel disease phenotypes,” *Gastroenterology*, 139, 1844–1854.e1, 2010.
- [104] Henke, M.T.; Kenny, D.J.; Cassilly, C.D.; Vlamakis, H.; Xavier, R.J.; Clardy, J., “*Ruminococcus gnavus*, a member of the human gut microbiome associated with Crohn’s disease, produces an inflammatory polysaccharide.,” *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 116,12672-12677, 2019.

- [105] Shimizu, M.; Zhao, Z.; Ishimoto, Y.; Satsu, H., “Dietary taurine attenuates dextran sulfate sodium (DSS)-induced experimental colitis in mice.,” *Adv. Exp. Med. Biol.*, 643, 265–271, 2009.
- [106] Xu, H.M.; Huang, H.L.; Liu, Y.D.; Zhu, J.Q.; Zhou, Y.L.; Chen, H.T.; Xu, J.; Zhao, H.L.; Guo, X.; Shi, W.; et al., “Selection strategy of dextran sulfate sodium-induced acute or chronic colitis mouse models based on gut microbial profile.,” *BMC Microbiol.*, 21, 279, 2021.
- [107] “Optimization of a Chronic Colitis Model in Mice Induced by Dextran Sulfate Sodium (DSS) and Effects of Drugs Thereon.,” Available online, <https://www.criver.com/sites/default/files/resource-files/SP-DDW-18-optimization-of-a-chronic-colitismodel-in-mice-induced-by-dextran-sulphate-sodium.pdf> (accessed on 30 May 2022).
- [108] Ishida, T.; Matsui, H.; Matsuda, Y.; Hosomi, R.; Shimono, T.; Kanda, S.; Nishiyama, T.; Fukunaga, K.; Yoshida, M., “Oyster (*Crassostrea gigas*) extract attenuates dextran sulfate sodium-induced acute experimental colitis by improving gut microbiota and short-chain fatty acids compositions in mice,” *Foods*, 11, 373, 2022.
- [109] Matsudo, A.; Nishimura, N.; Hosomi, R.; Harumatsu, S.; Fukuda, S.; Matsuda, Y.; Yoshida, M.; Fukunaga, K., “Dietary Oyster-Extract Decreases Cholesterol Content by Suppressing hepatic HMG-CoA Reductase mRNA Expression Level and Enhancing Fecal Steroids Excretions in Rats Fed High-Fat Diet.,” *Trace Nutr. Res.*, 33, 43–48, 2016.
- [110] Tanaka, G.; Hagihara, N.; Hosomi, R.; Shimono, T.; Kanda, S.; Nishiyama, T.; Yoshida, M.; Fukunaga, K., “Dietary Alaska pollock protein attenuates the experimental colitis induced by dextran sulfate sodium via regulation of gut microbiota and its metabolites in mice.,” *Metabolites*, 12, 44, 2022.
- [111] Chassaing, B.; Aitken, J.D.; Malleshappa, M.; Vijay-Kumar, M., “Dextran sulfate sodium (DSS)-induced colitis in mice.,” *Curr. Protoc. Immunol.*, 104, 15.25.1–15.25.14., 2014.
- [112] Cooper, H.S.; Murthy, S.N.; Shah, R.S.; Sedergran, D.J., “Clinicopathologic study of dextran sulfate sodium experimental murine colitis.,” *Lab. Investig.*, 69, 238–249., 1993.
- [113] Zheng, Y.; Song, Y.; Han, Q.; Liu, W.; Xu, J.; Yu, Z.; Zhang, R.; Li, N., “Intestinal epithelial cell-specific IGF1 promotes the expansion of intestinal stem cells during epithelial regeneration and functions on the intestinal immune homeostasis.,” *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, 315, E638–E649., 2018.

- [114] Tang, X.; Liu, H.; Yang, S.; Li, Z.; Zhong, J.; Fang, R., “Epidermal Growth Factor and Intestinal Barrier Function,” *Mediat. Inflamm*, 2016, 1927348, 2016.
- [115] Dong, S.; Zhu, M.; Wang, K.; Zhao, X.; Hu, L.; Jing, W.; Lu, H.; Wang, S., “ Dihydromyricetin improves DSS-induced colitis in mice via modulation of fecal-bacteria-related bile acid metabolism.,” *Pharmacol. Res*, 171, 105767, 2021.
- [116] Miyata, M.; Tanaka, T.; Takahashi, K.; Funaki, A.; Sugiura, Y., “Cholesterol-lowering effects of taurine through the reduction of ileal FXR signaling due to the alteration of ileal bile acid composition.,” *Amino Acids*, 53, 1523–1532., 2021.
- [117] Walker, A.W.; Sanderson, J.D.; Churcher, C.; Parkes, G.C.; Hudspith, B.N.; Rayment, N.; Brostoff, J.; Parkhill, J.; Dougan, G.; Petrovska, L., “High-throughput clone library analysis of the mucosa-associated microbiota reveals dysbiosis and differences between inflamed and non-inflamed regions of the intestine in inflammatory bowel disease.,” *BMC Microbiol*, 11, 7, 2011.
- [118] Gonçalves, P.; Araújo, J.R.; Di Santo, J.P., “A cross-talk between microbiota-derived short-chain fatty acids and the host mucosal immune system regulates intestinal homeostasis and inflammatory bowel disease.,” *Inflamm. Bowel Dis*, 24, 558–572, 2018.
- [119] Kang, K.; Sun, Y.; Pan, D.; Chang, B.; Sang, L.X., “Nicotinamide Ameliorates Dextran Sulfate Sodium-Induced Chronic Colitis in Mice through Its Anti-Inflammatory Properties and Modulates the Gut Microbiota,” *J. Immunol. Res*, 2021, 5084713, 2021.
- [120] Liang, Y.; Liang, S.; Zhang, Y.; Deng, Y.; He, Y.; Chen, Y.; Liu, C.; Lin, C.; Yang, Q., “Oral administration of compound probiotics ameliorates HFD-induced gut microbe dysbiosis and chronic metabolic inflammation via the G protein-coupled receptor 43 in non-alcoholic fatty liver disease rats.,” *Probiotics Antimicrob. Proteins*, 11, 175–185., 2019.
- [121] Yang, K.M.; Jiang, Z.Y.; Zheng, C.T.; Wang, L.; Yang, X.F., “ Effect of *Lactobacillus plantarum* on diarrhea and intestinal barrier function of young piglets challenged with enterotoxigenic *Escherichia coli* K881.,” *J. Anim. Sci*, 92, 1496–1503, 2014.
- [122] Maki, J.J.; Looft, T., “*Turicibacter bilis* sp. nov., a novel bacterium isolated from the chicken eggshell and swine ileum,” *Int. J. Syst.Evol. Microbiol*, 72, 005153, 2022.
- [123] Ohkusa, T.; Koido, S., “Intestinal microbiota and ulcerative colitis.,” *J. Infect. Chemother*, 21, 761–768., 2015.
- [124] Kim, G.; Jang, M.; Hwang, I.; Cho, J.; Kim, S. , “Radish sprout alleviates DSS-induced

- colitis via regulation of NF- κ B signaling pathway and modifying gut microbiota. *Biomed.*, Pharmacother, 144, 112365, 2021.
- [125] Xiang, X.; Jiang, Q.; Shao, W.; Li, J.; Zhou, Y.; Chen, L.; Deng, S.; Zheng, B.; Chen, Y., “Protective Effects of Shrimp Peptide on Dextran Sulfate Sodium-Induced Colitis in Mice.” *Front. Nutr*, 8, 773064., 2021.
- [126] Oh, S.Y.; Cho, K.A.; Kang, J.L.; Kim, K.H.;Woo, S.Y., “Comparison of experimental mouse models of inflammatory bowel disease.” *Int. J. Mol. Med*, 33, 333–340., 2014.
- [127] Zakerska-Banaszak, O.; Tomczak, H.; Gabryel, M.; Batur, A.; Wolko, L.; Michalak, M.;Malinska, N.; Mankowska-Wierzbicka, D.;Eder, P.; Dobrowolska, A.; et al., “Dysbiosis of gut microbiota in Polish patients with ulcerative colitis: A pilot study.” *Sci. Rep*, 11, 2166, 2021.
- [128] Rodríguez-Nogales, A.; Algieri, F.; Garrido-Mesa, J.; Vezza, T.; Utrilla, M.P.; Chueca,N.;Fernández-Caballero, J.A.; García, F.;Rodríguez-Cabezas, M.E.; Gálvez, J., “The administration of *Escherichia coli* Nissle 1917 ameliorates development of DSS-induced colitis in mice.” *Front. Pharmacol*, 9, 468., 2018.
- [129] Long, T.; Yu, Z.-J.; Wang, J.; Liu, J.; He, B.-S. , “ Orally administered chitooligosaccharides modulate colon microbiota in normal and colitis mice.” *Int. J. Pharmacol*, 14, 291–300, 2018.
- [130] Wang, J.; Chen, W.-D.; Wang, Y.-D., “The relationship between gut microbiota and inflammatory diseases: The role of macrophages.” *Front. Microbiol*, 11, 1065, 2020.
- [131] Chen, Y.; Yang, B.; Ross, R.P.; Jin, Y.; Stanton, C.; Zhao, J.; Zhang, H.; Chen,W., “Orally Administered CLA Ameliorates DSS-Induced Colitis in Mice via Intestinal Barrier Improvement, Oxidative Stress Reduction, and Inflammatory Cytokine and Gut Microbiota Modulation.” *J. Agric. Food Chem*, 67, 13282–13298, 2019.
- [132] Venkataraman, A.; Sieber, J.; Schmidt, A.; Waldron, C.; Theis, K.; Schmidt, T., “Variable responses of human microbiomes to dietary supplementation with resistant starch.” *Microbiome*, 4, 33, 2016.
- [133] Salem, F.; Kindt, N.; Marchesi, J.R.; Netter, P.; Lopez, A.; Kokten, T.; Danese, S.; Jouzeau,J.Y.; Peyrin-Biroulet, L.; Moulin, D., “Gut microbiome in chronic rheumatic and inflammatory bowel diseases: Similarities and differences.” *United Eur. Gastroenterol. J*, 7, 1008–1032, 2019.
- [134] Maharshak, N.; Huh, E.Y.; Paiboonrungruang, C.; Shanahan, M.; Thurlow, L.; Herzog, J.; Djukic, Z.; Orlando, R.; Pawlinski, R.;Ellermann, M.; et al., “*Enterococcus faecalis* gelatinase mediates intestinal permeability via protease-activated receptor 2.”

- Infect.Immun, 83, 2762–2770, 2015.
- [135] Wang, X.; Xiao, Y.; Xu, X.; Guo, L.; Yu, Y.; Li, N.; Xu, C., “Characteristics of fecal microbiota and machine learning strategy for fecal invasive biomarkers in pediatric inflammatory bowel disease.,” *Front. Cell Infect. Microbiol*, 11, 711884, 2021.
- [136] Masahiro Kitabatake¹, Yoko Matsumura, Noriko Ouji-Sageshima, Tatsuki Nishioka, Atsushi Hara, Shin-ichi Kayano & Toshihiro Ito, “Persimmon-derived tannin ameliorates the pathogenesis of ulcerative colitis in a murine model through inhibition of the inflammatory response and alteration of microbiota,” *Scientific Reports* volume, 11, Article number: 7286, 2021.
- [137] Gilman AG, Goodman LS & Gilman A, “The Pharmacological Basis of Therapeutics,” 6th ed, The MacMillan Publishing Co, New York, NY, , 1980.
- [138] 静間 徹 石渡 一夫 福山 直人, “動物モデルを用いた、トリプトファンによる デキストラン硫酸ナトリウム誘発性大腸炎の抑制効果,” *静脈経腸栄養*, Vol.27 No.2 , 2012.
- [139] Shin Harumatsu, Suguru Fukuda, Hiroyuki Matsui, Yoshikazu Matsuda, “Study of oyster extract on acetaminophen-induced hepatic damage,” *Trace Nutrients Research*, 30 : 41–43, 2013.
- [140] Suguru Fukuda, Shin Harumatsu, Hiroyuki Matsui, Yoshikazu Matsuda, “Oyster Extract Ameliorates Steatosis in Mice Model with Non-Alcoholic Fatty Liver Disease,” *Trace Nutrients Research*, 32 : 4–10, 2015.
- [141] Tohru Masuzawa, Hiroyuki Matsui, Yoshikazu Matsuda, Megumi Asato, Hiroko Ikeda, Junzo Kamei, “Evaluation of anxiolytic-like effect of Oyster Extract in mice,” *Trace Nutrients Research*, 29:7-12, 2012.
- [142] Hitoshi Yasuda, Chihomi Mitsuoka, Noriyuki Yamazaki, Sachi Okabayashi, Takashi Sakuraba, Tomohiko Yamanouchi, Kosuke Tahara, Tatsuya Ishida, Hiroyuki Matsui, Yoshikazu Matsuda, “Pilot study for the effect of oyster extract on light-stress response in cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*),” *Trace Nutrients Research*, 35:1-5, 2018.

謝辞

本論文を完成させるにあたりまして、数多くの方より多大なるご支援を賜りました。ここに記してお礼申し上げます。

本研究の遂行ならびに本博士論文の執筆にあたり御指導、御鞭撻を賜りました関西大学 化学生命工学部 生命・生物工学科の吉田宗弘教授に深甚なる感謝の意を表します。

本研究の実施に当たり終始、御指導と御鞭撻を賜りました関西大学 化学生命工学部 生命・生物工学科の細見亮太准教授には、甚大なる謝意を申し上げます。

お忙しい中、学位審査の副査として熱心なご指導を賜りました福永健治教授、長岡康夫教授に深く御礼申し上げます。

実験の様々な面で数多くの御協力を戴きました関西大学食品化学・栄養化学研究室の院生および学部生の方々に多くのご支援をいただきました。御礼申し上げます。

最後に本研究を遂行する機会を与えて頂きました日本クリニック株式会社に深く感謝いたします。

2023年3月