

目次

第1章	序論	3~6
第2章	臨床症状を有する LPE 犬における糞便中細菌叢の特定	7~24
1.	緒言	8
2.	材料および方法	9~13
3.	結果	14~15
4.	考察	16~17
5.	小括	18
6.	図表	19~24
第3章	無症候性 LPE 犬における細菌叢の細菌数と短鎖脂肪酸の濃度の 関係に関する検討	25~40
1.	緒言	26
2.	材料および方法	27~31
3.	結果	32
4.	考察	33~34
5.	小括	35
6.	図表	36~40
第4章	臨床症状を有する LPE 犬における FMT の臨床応用	41~66
1.	緒言	42
2.	材料および方法	43~45

3. 結果 46~47

4. 考察 48~49

5. 小括 50

6. 図表 51~59

第5章 総括 60~63

 謝辞 64~65

 参考文献 66~73

第 1 章 序論

1. 腸内細菌叢

人を含む全ての動物は、主として Actinobacteria 門、Bacteroidetes 門、Firmicutes 門そして Proteobacteria 門に属する菌で構成された腸内細菌を保有する [1] [2] [3]。腸内細菌叢の分子生物学的研究において、1970 年代から細菌に特異的な遺伝子である 16S rRNA とそれをコードする遺伝子 16S rDNA をターゲットとするダイレクトシーケンスにより未知の菌種の検出が可能となってきた [4] [5]。それに加え、次世代シーケンサーの登場により遺伝子解析の迅速化が図られ、メタゲノム解析により莫大な量の腸内細菌叢の解明が可能になった [1] [2] [6]。犬においてもこれらの分子生物学的な技術の進歩は、腸内細菌叢における菌種の構成や数量の異常と種々疾患との関係を明らかにした [1] [2] [6]。

2. 腸内細菌と短鎖脂肪酸

短鎖脂肪酸 (SCFA) は、アルキル基が 1 つ結合した脂肪酸のうち、炭素数が 6 以下のもので、酢酸、プロピオン酸、酪酸そして吉草酸などが含まれる [7]。酢酸、プロピオン酸そして酪酸を合わせた重量は、総 SCFA の 95 % 以上を占めている [8] [9] [10]。SCFA は、食物から直接に摂取されるものを除き、腸内細菌の嫌気性発酵によって生じる [11] [10]。人の消化管内で産生される SCFA の 1 日量は 500~600 mmol 程度であるが、その濃度は、摂食物の種類そして腸内細菌の構成や数量などに依存する [11] [10]。Bacteroidetes 門に属する細菌は主に酢酸とプロピオン酸を産生し、Firmicutes 門に属する細菌は酪酸を主な最終産物として産生する [10] など、腸内細菌の菌種の違いによって産生する SCFA の種類は異なる。さらに、人由来の *Bifidobacterium* 属である *B. breve* UCC2003 と *B. longum* NCIMB 8809 は、オリゴ糖を利用し酢酸を産生するが [12]、*B. animalis* subsp. *Lactis* GCL2505 は、腸管内で独自に増殖し酢酸を単独で増加させる [13] といったように同属細菌であっても菌種株が異なると SCFA の産生過程は異なる。また、Bacteroidetes 門に属する細菌は、一般に乳酸を利用して主に酢酸とプロピオン酸を産生するが、炭素源や乳酸が少ない腸内環境下ではコハク酸を脱炭酸してプロピオン酸を産生するといった腸内環境の

変化により代謝経路が異なる [10]。しかしながら、犬において腸内細菌と脂肪酸の関係について検討した報告は限られている。

3. 犬の炎症性腸疾患

近年、増加傾向にある犬の炎症性腸疾患 (Inflammatory Bowel Disease; IBD) は、消化管粘膜における慢性炎症を特徴とし、持続性または再発性の消化器症状を呈する疾患である。IBD の種類は炎症部位に認めるリンパ球、プラズマ細胞そして好中球などの炎症細胞の種類や炎症の発生部位の違いによって分類される [14]。犬における IBD の典型は、リンパ球と形質細胞が小腸粘膜内に浸潤するリンパ球形質細胞性腸炎 (Lymphocytic-plasmacytic enteritis; LPE) である [15] [16]。

犬の LPE における臨床症状は、2~3 週間以上続く慢性間歇的な消化器症状である。特に食欲不振、嘔吐、下痢そして体重減少などが一般的であるが、特異的な臨床症状はない [14]。犬において、消化器症状を呈する疾患は、消化管感染症、異物、腫瘍、肝臓胆道系疾患、膵臓疾患、腎臓疾患、神経筋疾患、内分泌疾患ならびに中毒性疾患など極めて多岐にわたる。そのため、LPE の診断方法は、除外診断により行う [17]。LPE の治療は、低脂肪や抗原性の低いフード、タイロシンやメトロニダゾールなどの抗菌薬そしてコルチコステロイド薬や免疫抑制薬などが使用されている [18] [19]。そのため、近年では治療への反応性によって食事反応性腸症、抗菌薬反応性腸症、あるいは免疫抑制薬反応性腸症などに分類されるようになった [18] [19]。免疫抑制薬反応性腸症に対してはコルチコステロイド薬や免疫抑制薬を選択するが、これらの薬剤に抵抗を示す LPE も多く存在する。そのため、これらの薬剤に対する反応が悪い場合には予後不良と判定されるため、コルチコステロイド薬や免疫抑制薬に反応しない LPE に対する治療法の確立が急務となっている。

4. 糞便微生物移植 (Fecal microbiota transplantation; FMT)

FMT 治療とは、医療において腸内細菌叢の正常化を目的として不均衡な腸内細菌叢に起因する患者の腸管内に健常者の糞便を直接移植する治療方法として開発された [20]

[21]。現在までに、潰瘍性大腸炎、過敏性腸症候群、不応性および再発性 *Clostridium difficile* 感染症、IBD、メタボリック症候群ならびに特発性血小板減少性紫斑病などに応用されている [22] [23]。

犬における FMT は、*C. difficile* 感染症や急性下痢症に対して実施され、それにより症状の改善や *C. difficile* の毒素遺伝子が検出されなくなったことが報告されている [24] [25]。しかし、LPE の犬に対する FMT の報告はない。

我々は、2017 年 4 月から 2020 年 9 月までに臨床的な健常犬 70 頭に対して消化管内視鏡検査を行っている。しかしながら、そのいずれもが組織検査では LPE と診断を下された経験を有しており、組織学的に健常な犬の存在は非常に少ないと推察している。そのため、本論文の目的は、臨床症状を有する LPE 犬に対する FMT の有用性の確立とし、以下の内容で研究を進めた。

第 2 章では臨床症状を有する LPE 犬の細菌叢の特定を行うことを目的とし、LPE と診断された犬を臨床症状の有無により分類し、それらの腸内細菌叢の多様性や菌種構成の違いを調査した。次いで第 3 章では犬の消化管における腸内細菌の働きを検討するために、犬の腸内細菌叢において優勢である細菌とその代謝産物である SCFA の関係を調査した。最後に第 4 章では、第 3 章で明らかとなった腸管免疫機構の修復に關与する SCFA の産生に影響を与えるような細菌種を FMT によって補充できることを期待し、臨床症状を有する LPE 犬に対して FMT の臨床応用を行った。そのために、先ず犬に対する FMT の安全性を調査するために無症候性 LPE 犬に対して FMT を実施し、臨床的な副作用の発現を調べた。次に、臨床症状を有する LPE 犬に対する FMT の有用性を検討するために、FMT 前後の臨床症状、糞便中細菌叢の多様性、菌種構成および細菌数の変化を調査した。

第2章 臨床症状を有する LPE 犬における 糞便中細菌叢の特定

1. 緒言

近年、次世代シーケンスの普及により腸内細菌を網羅的に捉えることが可能となり、膨大な数量の腸内細菌叢の解析方法は飛躍的に進歩している [26] [27] [28]。すべての細菌には 16S rRNA 遺伝子が存在し、系統分類を行うために必要な 1,000 塩基以上の情報を有している。さらに、近年では塩基配列が比較的容易に決定できることなどから、微生物生態学では 16S rRNA 配列を指標とした分類法が広く利用されている。それにより、腸内細菌叢の菌種の構成や菌種数の異常は、急性もしくは慢性の腸炎、便秘、病原性微生物感染性腸疾患そしてメタボリックシンドロームなど様々な疾患と関係していることが明らかになってきた [26] [27] [28]。

消化管粘膜に慢性炎症を引き起こす犬の IBD ではその病態の発生や進行に腸内細菌叢の異常である *dysbiosis* が関連している [29] [30] [31] [32]。特に IBD 罹患犬の十二指腸粘膜では腸内細菌叢の多様性が低下し、*Proteobacteria* 門の菌種は増加している [33]。そして、IBD 罹患犬の糞便中の *Proteobacteria* 門に属する *Gammaproteobacteria* 属菌の菌数は、健常犬よりも多いことが報告されている [34]。

犬における IBD の典型は、リンパ球と形質細胞が小腸粘膜内に浸潤するリンパ球プラズマ細胞性腸炎 (*Lymphocytic-plasmacytic enteritis*; LPE) である [15] [16]。しかし、我々はこれまでに臨床的な健常犬においても消化管内視鏡を実施しているが、組織学的に LPE である臨床的な健常犬の存在を多く認めている。IBD の犬のうち LPE と診断された犬の糞便中細菌叢の菌種構成についての報告は限られており、さらに臨床的な健常犬に対して組織学的診断を行っている報告はない。

そのため、本研究では、臨床症状を有する LPE 犬の糞便細菌叢の多様性や菌種構成を特定することを目的とし、IBD 罹患犬である臨床症状を有する LPE 犬と無症候性の LPE 犬の細菌叢の多様性や菌種の構成と比較するために 16S rRNA シーケンスを行った。

2. 材料および方法

本研究は、日本獣医生命科学大学動物実験委員会 (承認番号: 29-5) および生命倫理委員会 (承認番号: 29-5) の承認を得て行った。

2-1. 供試動物

慢性消化器症状を主訴に 2017 年 5 月から 2018 年 5 月までに本学付属動物医療センターに来院し、10 年以上の組織診断歴を有する病理学者 2 名により組織学的に LPE と診断されたトイ・プードル 2 頭、ミニチュア・ダックスフンド 1 頭およびフレンチブルドック 1 頭は、臨床症状を有する LPE (symptomatic LPE ; sLPE) 群として供試した (表 1)。sLPE 群の年齢は 10.0 ± 1.1 歳齢であり、体重は 5.2 ± 1.5 kg であり、去勢オス 3 頭と避妊メス 1 頭であった。sLPE 群の body condition score は、5 段階中の 2 または 3 であった。sLPE 群は、前医による血液検査、腹部超音波検査、胸腹部のレントゲン検査ならびに糞便検査により IBD と診断され、生菌製剤や低脂肪食、メトロニダゾール、エンロフロキサシンおよびタイロシンなどの抗菌薬およびコルチコステロイド薬を処方されていた。

本学付属動物医療センターで飼育管理しているジャーマン・シェパード・ドッグ 1 頭、ラブラドル・レトリバー 2 頭、雑種 1 頭およびゴールデン・レトリバー 1 頭は、無症候性 LPE (asymptomatic LPE ; aLPE) 群として供試した (表 1)。aLPE 群の年齢は 2.0 ± 0.4 歳齢であり、体重は 26.9 ± 4.0 kg であり、去勢オス 4 頭とメス 1 頭であった。aLPE 群の組織診断は、sLPE 群と同様に行った。これらの犬は、血液検査、胸腹部超音波検査ならびに糞便検査において異常な所見を認めず、本研究に供試する 12 か月以上前から臨床症状はなく、いずれの治療歴も認めなかった。フードは、総合栄養食 (セレクトプロテイン、ロイヤルカナン社、エマルグ、フランス) を朝夕の 2 回に分けて与えた。飲用水は水道水を専用容器に常備して与えた。

2-2. 供試糞便の検査と採便方法

両群における糞便検査は、直接法と浮遊法に加え定量 PCR 法によって糞便中の

Cryptosporidium spp., *Giardia* spp., *Clostridium perfringens* α toxin, *C. difficile* toxins A & B, *Campylobacter jejuni*, *C. coli*, *Salmonella* spp., 犬パルボウイルス 2 型、犬ジステンパーウイルス、犬腸コロナウイルスの検査を行った (IDEXX 社、東京、日本)。

sLPE 群の採便は、来院時に自然排泄した糞便で行った。aLPE 群の採便は朝食後に自然排泄した糞便で行った。すべての糞便は採便直後に約 1 g を 1.5 mL 容のエッペンチューブに入れ、測定まで -80 °C で保管した。

2-3. 臨床症状の評価

臨床症状の評価には、犬炎症性腸疾患活動指標 (CIBDAI) を用いた。CIBDAI の評価は、表 2 に示した各項目 0 から 3 点でスコアリングし、その合計が 3 点以下を無症候性、4 と 5 点が軽度、6 から 8 点が中程度そして 9 点以上を重度と判定した [35] [36] 。

2-4. 糞便性状の評価

糞便性状の評価は、Waltham Faeces Scoring System (Waltham[®], Mars Incorporated, マクレーン、バージニア) を用いた。糞便の硬さは 9 段階にグレード分類し、3.5 以内は良便、4.0 は軟便そして 4.5 以上は下痢と判断した (図 1) 。

2-5. 供試動物の糞便中細菌 DNA 抽出

糞便中の細菌 DNA は、ビーズ破砕法によって抽出した [37] 。

糞便サンプル 20 mg に PBS 1 mL を加え 14,000 × g で 5 分間の遠心分離により洗浄した。この操作を 3 回繰り返した後、直径 0.1 mm のガラスビーズ (Sigma-Aldrich、セントルイス、ミズーリー) 100 mg、DNA extraction buffer (100 M Tris-HCl、40 mM EDTA、pH 9.0) 450 μ L、10 % SDS 50 μ L、そして飽和フェノール 500 μ L を混合し、70 °C に設定したウォーターバスで 10 分間加温した。その後、ボルテックスミキサーで 1 分間粉碎混和し、再び 70 °C で 10 分間の加温とボルテックスミキサーで 1 分間の粉碎混和を行った。混和後に 14,000 × g で 5 分間の遠心分離で得た上清は、新たなエッペンチューブに約 400 μ L を分注し、その中にフェノールクロロホルム 400 μ L を加え、激しく混和した。混和後に 14,000 × g で 5 分間の遠心分離後、再

び上清約 300 μL を新しいエッペンチューブに移し、2-プロパノール 300 μL と 3 M 酢酸ナトリウム 60 μL を順次加えた。混和後に 20,800 $\times g$ で 5 分間の遠心分離により DNA を沈殿させた。上清を除去後、500 μL の 70 %エタノールで 2 回洗浄し、100 μL の TE バッファー (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH8.0) を加えて DNA を溶解した。

2-6. 糞便中細菌の DNA 濃度の測定

抽出した DNA は分光光度計 (DU[®]、Beckman Coulter、Inc.、サンディエゴ、カリフォルニア) を用いて 260 nm と 280 nm の波長時の吸光度を計測した。一般的に二本鎖 DNA では、260 nm 波長での吸光度 1.0 が DNA 濃度 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ に相当するため、DNA 濃度は、吸光度に 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ と希釈率を乗じて算出した。DNA 濃度の純度は A260/A280 を求め、その値が 1.8~2.0 となる DNA サンプルを用いた。

2-7. 次世代シーケンス

糞便中の DNA を用いた 16S rRNA シーケンスは、16S rRNA 遺伝子の V3-4 領域を増幅して行った (タカラバイオ株式会社、東京、日本)。精製した PCR 増幅産物は MiSeq Reagent Kit v2 (Illumina 社、サンディエゴ、カリフォルニア) を用いて Illumina MiSeq プラットフォームによって配列を決定した。PCR 増幅産物は、ペアエンド法により 250 bp を読み取り、Quantitative Insights Into Microbial Ecology (QIIME) パイプラインソフトウェア v1.8.0 を用いて解析した。また、配列のキメラチェックと除去には UCHIME を用いた。リードした遺伝子はエラー率 0.01、そしてリード数 97 % の条件のもとで CD-HIT-OTU (operational taxonomic units) を用いてクラスタリングした。各 OTU の代表配列は GreenGenes ver 13.8 (DeSaints TZ 2006) データベースと比較した。

2-8. 腸内細菌叢の解析

細菌叢の菌種多様性の評価方法には、1 サンプル中における細菌叢の多様性を示す α 多様性と各サンプル間の細菌叢の多様性を示す β 多様性がある。細菌の α 多様性を示す指標には細菌叢に含まれる菌種の豊富さを示す chao1 指数 [38] や細菌叢の構成比の均等度を

示す Shannon 指数 [39] などが用いられている [40] [41]。chao1 指数は、検出された細菌種の数量に基づいて計算されるため、細菌種の数量に注目する際に用いられる手法である。他方、shannon 指数はサンプル全体に対する菌種の割合に基づき算出するため、サンプル数が多く、各細菌種が均等に分布しているかに重点を置く評価の場合に用いられる。今回、 α 多様性は菌種数の数量に注目するために chao1 指数を採用した。 β 多様性は、菌種数で決定する定量的な weighted UniFrac 法と菌種の有無で決定する定性的な unweighted UniFrac 法がある。本研究では、細菌叢の相違を数値化して比較するために weighted UniFrac 法を採用した。

2-9. 統計解析

両群の年齢と体重は、平均値±標準偏差で示した。CIBDAI および Waltham Faeces Scoring System は、平均値±標準誤差で示し、両群の値の比較には、Wilcoxon rank sum test を用いた。細菌叢を構成している細菌種の多様性を示す chao1 指数は平均値±標準誤差で示し、両群間の値は Wilcoxon rank sum test を用いて比較した。 α 多様は、chao1 指数とシーケンスリード数を用いて各サンプル間のリード数を調整して多様性を推定する希薄化解析により求めた。群内または群間における weighted UniFrac 距離は、平均値±標準誤差で示した。これらの値は、菌種数および細菌叢の系統発生的な類似度を OTU 代表配列に基づいて決定した。UniFrac 距離の値は、one-way ANOVA による解析を行った後に Bonferroni 補正を施した多重比較を行った。Principal Coordinate Analysis (PCoA) は、細菌叢の非類似度の関係を低次元に縮約し視覚化する方法であり、各サンプルの細菌叢の菌種の構成比と UniFrac 距離を用いて解析した。さらに、PCoA における評価には、どの程度サンプルの細菌叢を再現できているかを示す Mardia fit measure を指標として用いた [42]。その値は 0.8 以上をもって距離誤差の許容範囲とした。糞便中細菌叢における各菌門の構成比は占有率 (%) の範囲を示し、それらの比較にはそれぞれのサンプルの総シーケンスリード数と細菌種の構成比から算出した各細菌門のリード数を用いて Wilcoxon rank sum

test を行った。

すべての統計解析は Stata/MP 14.0 (64-bit x86-64、stata 社、テキサス) 用いて行い、危険率 0.05 未満をもって有意とした。

3. 結果

sLPE 群の CIBDAI は、 13.5 ± 1.4 であり、aLPE 群が 0.0 ± 0.0 であった。sLPE 群の値は、aLPE 群と比較して有意に高値であった ($p < 0.01$)。さらに、sLPE 群と aLPE 群の Waltham Faeces Scoring System は、それぞれ 5.0 ± 0.0 、 2.0 ± 0.0 であり、両群間には有意な差を認めた ($p < 0.01$)。

次世代シーケンスにおいて、シーケンスクオリティー情報をもとにフィルタリングを行った後の総リード数は 6,521,570 であった。 α 多様性である chao1 指数は、sLPE 群 (29.3 ± 4.0) が aLPE 群 (89.1 ± 1.8) と比較して有意に低値を示した ($p < 0.03$) (図 2)。

β 多様性を求めるための UniFrac 距離は、sLPE 群内では 0.29 ± 0.02 であり、aLPE 群内では 0.22 ± 0.02 であった。さらに、両群間における UniFrac 距離は、 0.40 ± 0.02 であり、この両群間の距離は aLPE 群内の距離と比較して有意に離れていた ($p < 0.01$)。PCoA による各主成分が持つ情報量である寄与率は、第 1 主成分と第 2 成分ではそれぞれ 56.84 % と 17.87 % であった。さらに、すべての情報のうち説明可能な情報量を示す第 1 主成分と第 2 主成分の寄与率の合計である累積寄与率は 74.71 % であり、両群の細菌叢における β 多様性は各群内では類似したが、両群間では明らかに異なっていた (図 3)。また、PCoA における再現性の評価の指標である Mardia fit measure は、0.95 であった。

糞便の細菌叢からは Actinobacteria、Bacteroidetes、Firmicutes、Fusobacteria、Proteobacteria、Tenericutes そして Verrucomicrobia といった 7 つの細菌門に属する細菌が検出され、それらの構成比は図 4 に示した。sLPE 群の各細菌門の占有率は、高い順に Proteobacteria (23.7~80.3 %)、Firmicutes (4.4~51.8 %)、Bacteroidetes (0.1 %未満~24.5 %)、Actinobacteria (19.1 %以下)、Fusobacteria および Tenericutes が検出限界値未満であった。また、sLPE 群の 1 例のみから Verrucomicrobia 門の細菌が検出され、その占有率は 35.9 % であった。一方の aLPE 群の占有率は、高い順に Firmicutes (25.9~71.0 %)、Bacteridetes (7.9~45.0 %)、Fusobacteria (6.5~24.6 %)、Actinobacteria (2.7~14.4 %)、

Proteobacteria (0.2~3.8%)、Tenericutes (0.2%未満)そして Verrucomicrobia (検出限界値未満)であった。Proteobacteria 門の占有率は、sLPE 群の方が aLPE 群よりも有意に高値であり ($p < 0.01$)、特に Proteobacteria 門のうち、59~100%が *Enterobacteriaceae* 科であった。Fusobacteria 門の占有率は sLPE 群の方が aLPE 群よりも有意に低値であり ($p < 0.01$)、このうち 100%が *Fusobacterium* 属であった。

4. 考察

sLPE 群と aLPE 群は、CIBDAI と Waltham Faeces Scoring System の 2 つの評価方法から両群の臨床症状の明らかな違いにより分類することができた。sLPE 群の糞便中細菌叢の α 多様性は、aLPE 群と比較して有意に低いことが明らかとなった。IBD に罹患した犬の十二指腸粘膜や糞便の細菌叢における α 多様性は、健常犬と比較して有意に低いことが報告されている [34] [29] [31]。これら報告の健常犬と IBD 罹患犬は、組織学的診断が明らかではないが、それら健常犬と IBD 罹患犬は、それぞれ aLPE 群と sLPE 群の α 多様性と類似していた。さらに、sLPE 群と aLPE 群それぞれの群内の β 多様性は類似するが、両群間では異なることが明らかとなった。これらのことから、LPE の犬の細菌叢の多様性の相違は、臨床症状に関与する可能性が示唆された。特に、sLPE 群の Proteobacteria 門の占有率は、aLPE 群と比較して有意に高く、Proteobacteria 門のうち 59~100 %が *Enterobacteriaceae* 科であった。*Enterobacteriaceae* 科の一部の細菌は、腸管粘膜上皮に接着し、粘膜に侵入する毒性因子をもつ [43]。これらのことから *Enterobacteriaceae* 科の細菌が炎症を惹起する一因となっている可能性が示唆された。

一方、aLPE 群において Fusobacteria 門の占有率は 17.0 %であったが、sLPE 群ではこの細菌門が検出されなかった。健常犬における優勢菌門は Firmicutes、Bacteroidetes および Fusobacteria 門である [44]。これらのことから、sLPE 群の細菌叢は dysbiosis が発現しており、この状態は臨床症状に関連することが示唆された。また、IBD 犬の十二指腸粘膜では Fusobacteria 門の占有率が健常犬よりも有意に低下している [36]。このことから、十二指腸における細菌叢と糞便中の細菌叢どちらにおいても臨床症状を有する LPE 犬では Fusobacteria 門の占有率が低いことが明らかとなった。これは、IBD 罹患犬である臨床症状を有する LPE 犬に特徴的な細菌学的変化であると考えられる。さらに、LPE 犬の細菌叢において糞便中の細菌叢と十二指腸の細菌叢が類似していたことから、糞便中の細菌叢の調査は十二指腸の細菌叢の調査より安全かつ容易に行える方法であり、細菌叢の調査方法と

して優れた方法であると考えられた。

また、*Verrucomicrobia* 門の細菌は、sLPE 群の 1 例から占有率 35.9 %で検出された。この門に属する細菌は、培地の種類、培養時間あるいは単独培養が困難などの理由から難培養性であるため、検出の報告は極めて限られていた。しかし、細菌培養を必要としない 16S rRNA シークエンスにより、*Verrucomicrobia* 門の細菌は土壌中に存在することが明らかとなった [45]。*Verrucomicrobia* 門の細菌の病原性については未知な点が多いが、近年では再発性 *Clostridium difficile* 感染症 (CDI) 患者の *Verrucomicrobia* 門の占有率が高いことが報告されている [46] [47]。人や犬における CDI の再発原因として、抗菌薬の長期連用あるいはバンコマイシン、メトロニダゾールそしてチゲサイクリンの併用が挙げられている [46] [48] [47]。*Verrucomicrobia* 門が検出された sLPE 群の 1 例では、メトロニダゾール、タイロシンおよびエンロフロキサシンなどの抗菌薬を長期にわたり服用していた。したがって、この症例では細菌叢の多様性が低下し、*Verrucomicrobia* 門と *Proteobacteria* 門の占有率が増加した可能性が示唆される。抗菌薬は、有益菌のコロニー形成能を低下させ、抗菌薬に耐性を持つ細菌の増殖を促す [49]。IBD に対する抗菌薬としてはタイロシンとメトロニダゾールが第一選択薬であるが、それらの薬剤に抵抗性を示す場合には、ニューキノロン系の抗菌薬も試みられている。今回の sLPE 群の細菌叢は、aLPE 群と比較して α 多様性は低く、 β 多様性は異なっていた。特に *Proteobacteria* 門の占有率の有意な増加と *Fusobacteria* 門の占有率の有意な減少が認められた。これらの原因の 1 つとして抗菌薬の長期連用や多剤併用が影響していた可能性が否定できない。今後、加療経験がなく臨床症状を有する LPE 犬の多様性についての調査も必要であると考えられる。

5. 小括

臨床症状を有する LPE 犬の糞便中細菌叢の多様性や細菌構成を調査する目的で、臨床症状の有無により分類した LPE 犬の糞便中細菌叢の比較を 16S rRNA シークエンス解析により行った。臨床症状を有する LPE 犬 (sLPE) 群と無症候性 LPE 犬 (aLPE) の両群の間には CIBDAI と Waltham Faeces Scoring system に有意な差を認め、両群における臨床症状の有無を確認した。sLPE 群の α 多様性は、aLPE 群と比較して有意に低下していた。また、両群の β 多様性は、相違性が高いことが明らかとなった。sLPE 群の Proteobacteria 門の占有率は、aLPE 群よりも有意に高値であった。一方、Fusobacteria 門の占有率は aLPE 群よりも有意に低値であり、Firmicutes 門と Bacteroidetes 門は有意ではないものの低値であった。これらの臨床症状を有する LPE 犬でみられた細菌叢は、この疾患犬の特徴的な細菌叢であり、そのため sLPE 群は dysbiosis の状態にあると判断できた。さらに、その状態が臨床状態に関連していることが示唆された。

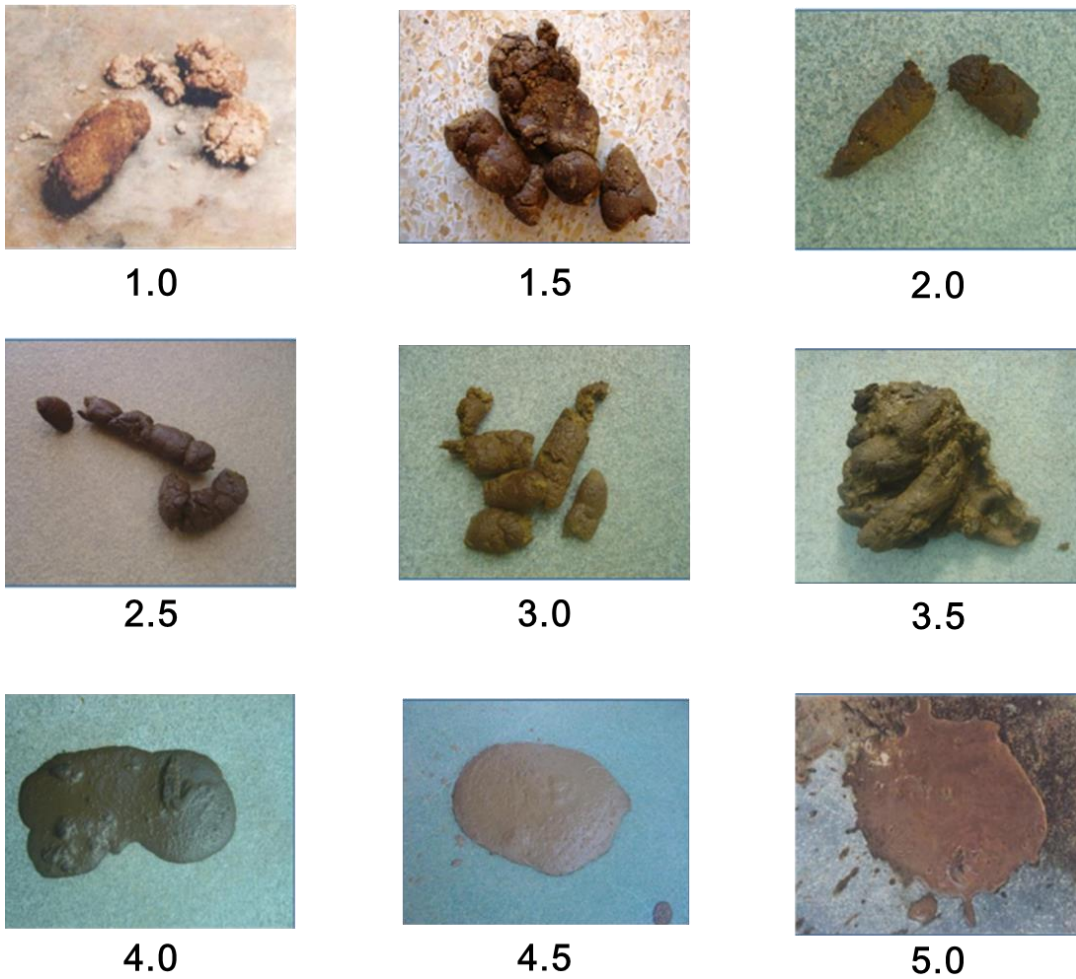


図 1 Waltham Faeces Scoring System における基準

グレード 1.0 : 硬く乾燥し碎けやすい

グレード 1.5 : 硬く乾燥している

グレード 2.0 : よく成形されており取り上げたときに跡が残らない

グレード 2.5 : よく成形されているが取り上げたときに少し跡が残る

グレード 3.0 : 水気を含み、取り上げると明らかな跡が残る

グレード 3.5 : 非常に水分を多く含むが明らかな形を保っている

グレード 4.0 : 均質性がなく粘調度が高い

グレード 4.5 : 部分的に形はあるが下痢

グレード 5.0 : 水様性下痢

グレード 3.5 以内 : 良便、グレード 4.0 : 軟便、4.5 以上 : 下痢

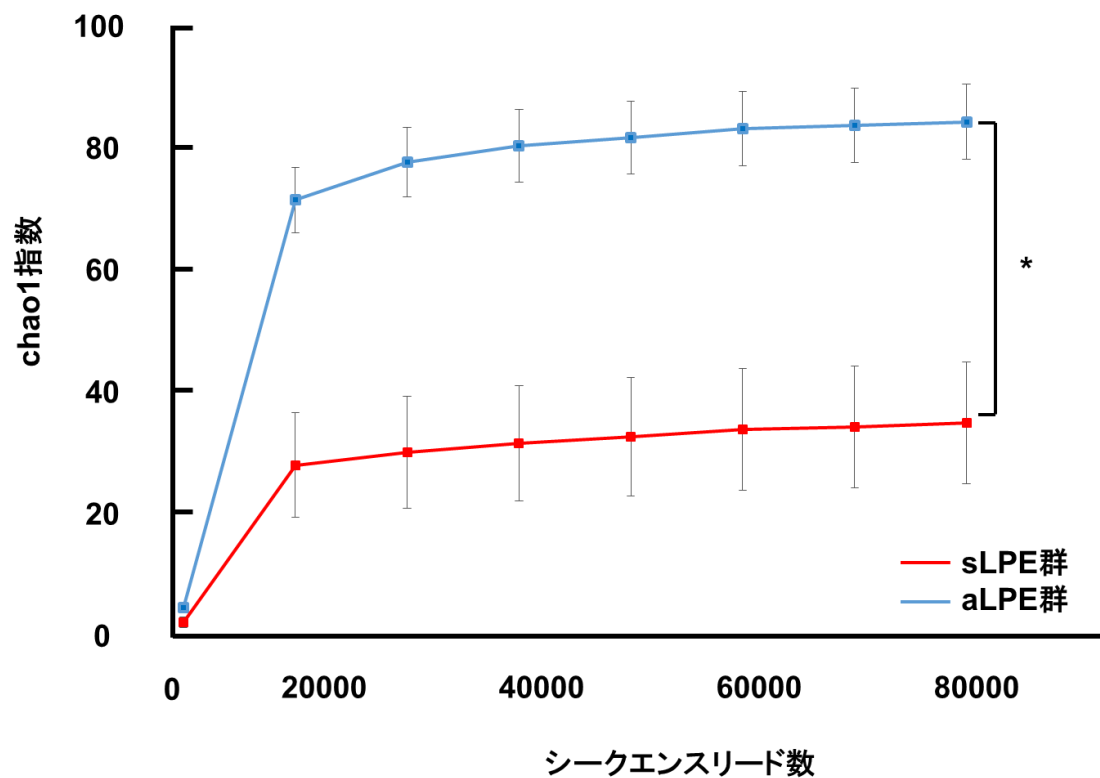


図2 sLPE群とaLPE群における α 多様の比較

sLPE群：臨床症状を有するLPE群、aLPE群：無症候性LPE群、*： $P < 0.03$

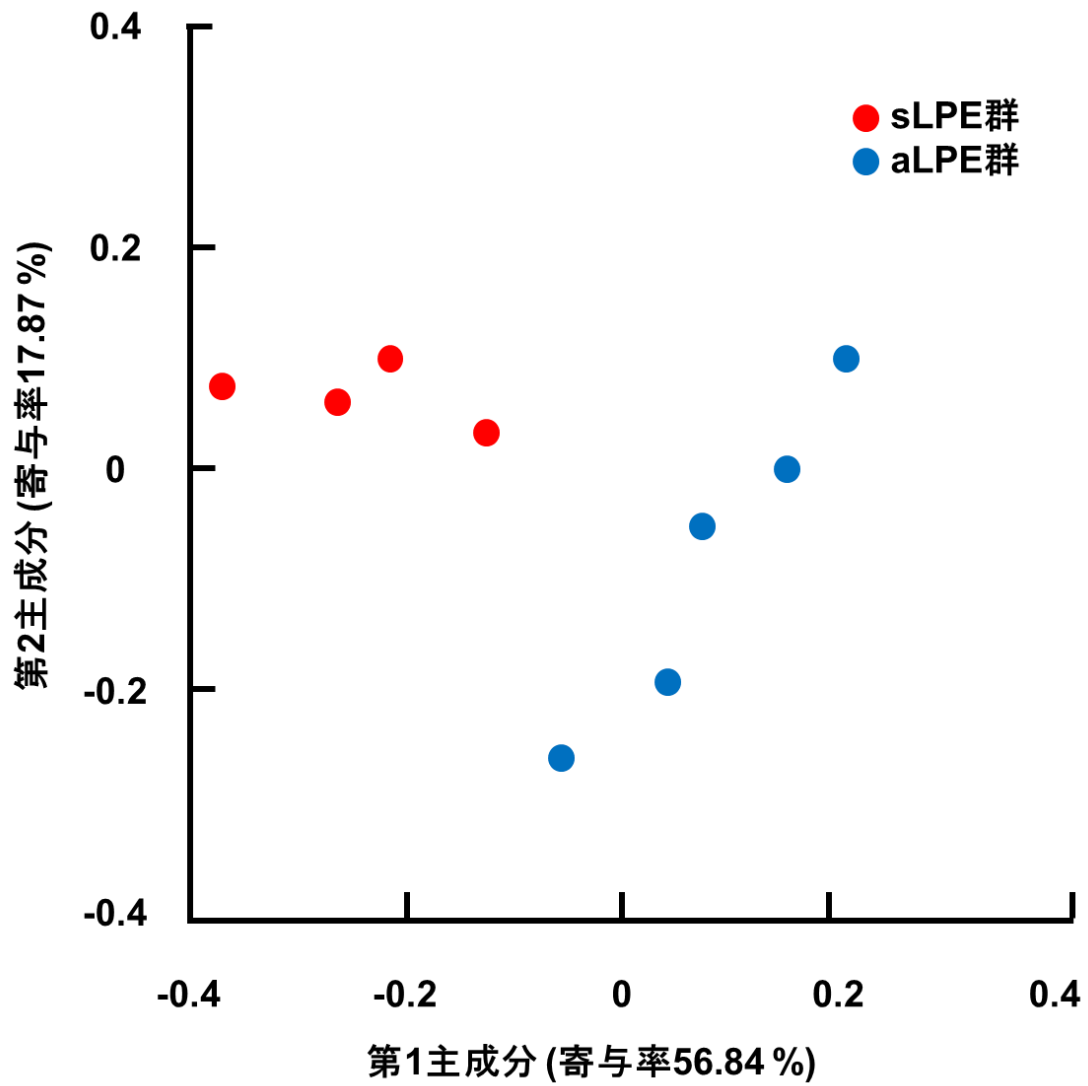


図3 sLPE群とaLPE群における β 多様性の比較

sLPE群：臨床症状を有するLPE群、aLPE群：無症候性LPE群

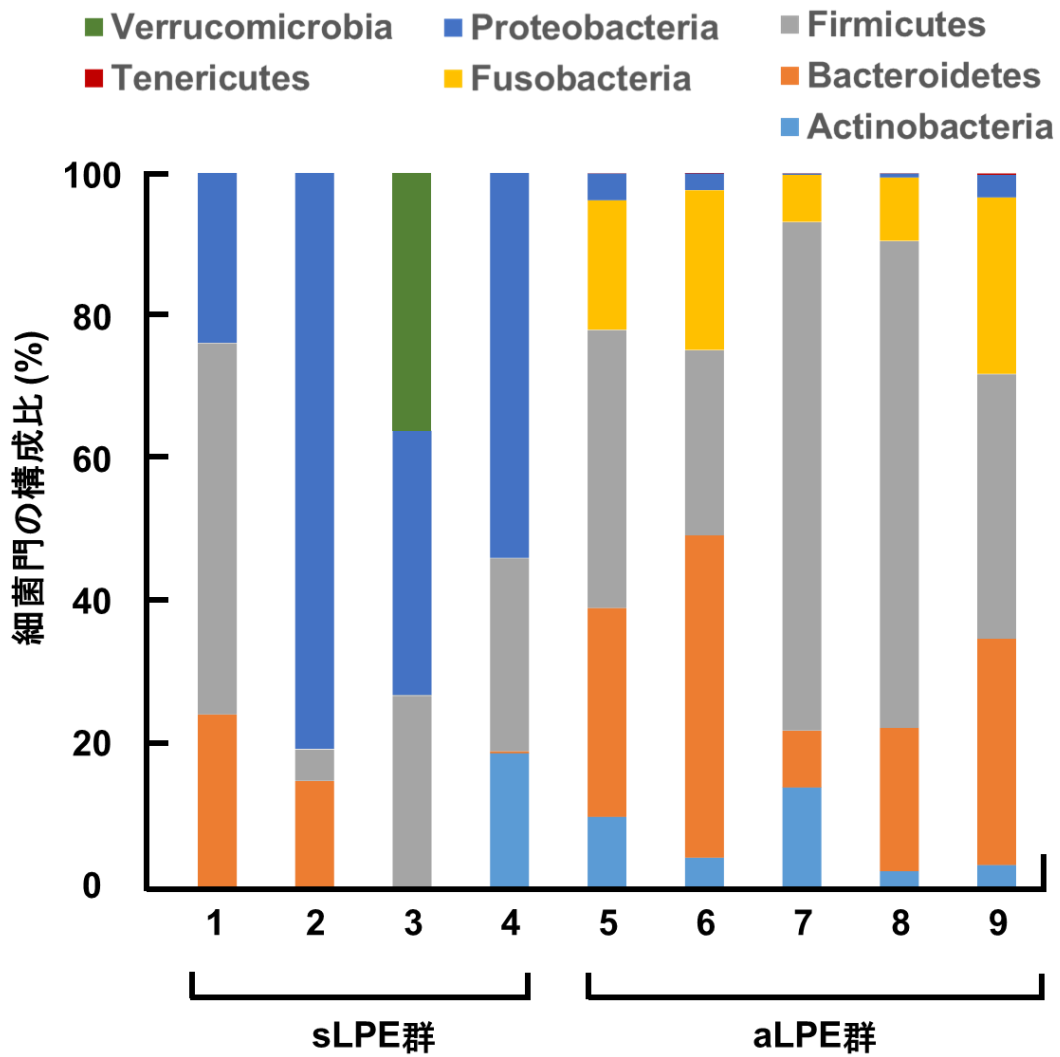


図4 sLPE群と aLPE群の細菌叢における細菌門の構成比

sLPE群：臨床症状を有する LPE 群、aLPE群：無症候性 LPE 群

1～4：sLPE 群、5～9：aLPE 群

表1 sLPE群とaLPE群のプロフィール

	年齢 (歳)	体重 (kg)	性別	品種
sLPE群	12	5.5	去勢オス	トイ・プードル
	10	3.4	避妊メス	ミニチュア・ダックスフンド
	10	4.5	去勢オス	トイ・プードル
	9	7.4	去勢オス	フレンチブルドック
aLPE群	2	26.6	メス	ジャーマン・シェパード・ドッグ
	2	29.8	去勢オス	ラブラドル・レトリバー
	2	22.2	去勢オス	ラブラドル・レトリバー
	1	23.3	去勢オス	雑種
	2	32.8	去勢オス	ゴールデン・レトリバー

表2 イヌ炎症性腸疾患活動指標 (CIBDAI)

評価項目	0	1	2	3
活動性	正常	軽度低下	中等度低下	重度低下
食欲	正常	軽度低下	中等度低下	重度低下
嘔吐	なし	1週間に1回	1週間に2~3回	1週間に3回以上
糞便性状	正常	軽度軟便	重度軟便	水様性下痢
排便の頻度	正常	1日に2~3回	1日に4~5回	1日に5回以上
体重減少	なし	5%以下	5~10%以下	10%以上

第3章 無症候性 LPE 犬における

細菌叢の細菌数と短鎖脂肪酸の濃度に関する検討

1. 緒言

短鎖脂肪酸 (SCFA) は、食物から直接に摂取されるものを除き、腸内細菌の嫌気性発酵によって生じる [10] [11]。酢酸は、病原性細菌による上皮細胞のアポトーシスを抑制し、上皮バリア機構を維持することにより感染防御に関与する。また、プロピオン酸は、IL-6、IL-8 および TNF α などの炎症性サイトカインの産生を減少させる [50]。これらのことから SCFA は、腸管免疫機構の修復に関与してしていると考えられている。

さらに dysbiosis が関連する疾患では、SCFA 濃度が低下し、腸管免疫機構の破綻を引き起こすことも報告されている [3] [51]。

第 2 章で臨床症状を有する LPE 犬は dysbiosis の状態であり、特に Fusobacteria 門の占有率が有意に低く、Bacteroidetes 門と Firmicutes 門の占有率が有意ではないものの低下していた。そのため、臨床症状を有する LPE 犬においてこれらの細菌が減少し、SCFA 濃度を減少させることにより腸管免疫機構が破綻している可能性が考えられた。

そのため、本章では健常犬の優勢菌門である Firmicutes 門、Bacteroidetes 門および Fusobacteria 門の細菌が SCFA 産生に関与していると仮定し、無症候性 LPE 犬における糞便中細菌叢の細菌の数量変化と SCFA 濃度の関係を調査した。

2. 材料および方法

本研究は日本獣医生命科学大学動物実験委員会（承認番号：29S-54）および生命倫理委員会の承認（承認番号：29S-54）を得て行った。

2-1. 供試動物と供試サンプル

本学で飼育管理されているビーグル4頭を無症候性LPE (asymptomatic LPE ; aLPE) として供試した。これらは全頭ともに雄であり、年齢は 5.8 ± 1.3 歳齢、そして体重は 9.5 ± 0.9 kgであった。これらのビーグルは、身体検査、血液検査、腹部超音波検査、胸部超音波検査そして糞便検査において明らかな特異所見を認めず、本研究に供するまでの12か月以上の間臨床症状を示さず、何らの治療歴を認めなかった。また、前章と同様の方法でLPEと診断された。フードは、AFFCOの基準を満たした総合栄養食（プロステージル・シアンポーク アダルト、イースター株式会社、兵庫）の1日量を朝夕の2回に分けて与えた。飲用水は水道水を専用容器に常備して与えた。

採便は、細菌株の給与の開始1日目と15日目の細菌株給与前の朝食後に自然排便した直後に行った。糞便は、採便の直後に1.5 ml容のエッペンチューブに約1g入れ、測定に用いるまで -80°C で保存した。

2-2. プロバイオティクスとしての細菌株

細菌株は、動物用サプリメントとして上市されているものから2種類を採用した。すなわち、一方は *Enterococcus faecium* E1707 株が単一株のものであり、他方は *Streptococcus faecalis* T-110 株、*Clostridium butyricum* TO-A 株および *Bacillus mesentericus* TO-A 株が混在したものである。*E. faecium* E1707 株（単独株）は、 $4.0\text{E} + 05$ 個を1頭あたり1日に1回として14日間連続で夕食に混ぜて給与した。その後2週間の無給与期間を設け、*S. faecalis* T-110 株 $2.1\text{E} + 07$ 個、*C. butyricum* TO-A 株 $6.0\text{E} + 05$ 個および *B. mesentericus* TO-A 株 $9.0\text{E} + 05$ 個の混在した3菌株（混合株）を単独株と同様の方法で与えた。

健康犬において、抗菌薬を2週間内服すると、腸内細菌叢の菌種構成は内服終了から2週

間を要する [52]。また、*Lactobacillus rhamnosus* GG 株を 4 日間給与した研究では、腸内細菌叢の細菌種構成は給与終了後から 4 日以内に元の状態へ戻ることが報告されている [53]。これらのことから、本研究では細菌株給与終了後のウォッシュアウト期間を給与期間と同じ 2 週間に設定した。

2-3. 定量 PCR (qPCR) による細菌数の測定

糞便中細菌叢の細菌数の測定は、Thermal Cycler Dice[®] Real Time System (タカラバイオ株式会社、滋賀、日本) を使用して行った。未知サンプル測定用の検量線は、スタンダードサンプルの検量線に当てはめて濃度測定を行うために、総菌数の標準細菌として *E. coli* (ATCC 25922T 株、アズワン株式会社、大阪、日本) を用いて作成した。

健康犬の細菌叢において優勢菌門は、Firmicutes 門、Bacteroidetes 門および Fusobacteria 門であり [54]、Firmicutes 門には 16S rRNA の塩基配列に基づいて *Clostrisium* 属および嫌気性芽胞非形成菌を対象に分子系統的に分類したグループが存在し、特にその中では *Clostridium coccooides* group と *Clostridium leptum* subgroup が人や犬の腸内細菌叢から最優勢に検出されている [31] [55]。そのため、本研究では Firmicutes 門に分類される *C. coccooides* group、*C. leptum* subgroup、*Enterococcus* spp. 属、*Faecalibacterium* 属、*Lactobacillus* 属および *Ruminococcaceae* 科の細菌、Bacteroidetes 門に分類される *Bacteroides* 属、Fusobacteria 門に分類される *Fusobacterium* 属および Proteobacteria 門に分類される *Enterobacteriaceae* 科における細菌数の定量を行った。これらの細菌についても菌属特異的なプライマーセット (表 1) を用いて、*E. coli* を用いた際と同様に検量線を作成した。

サンプルの qPCR は、Promega GoTaq[®] qPCR Master mix (Promega corporation、マディソン、ウィスコンシン) 10 μ L、プライマー (タカラバイオ株式会社、滋賀、日本) 各 4 pmole、鋳型 DNA 200 ng を用いて、0.2 mL PCR チューブに全量 20 μ L で調整し行った。各細菌種に対する PCR の条件は、熱変性を 95 $^{\circ}$ C で 50 秒とし、アリーリングを表 3 に示した温度と時間で行った後に伸長反応を 72 $^{\circ}$ C、45 秒で 40 サイクルずつ行った。

2-4. SCFA 濃度測定前処理の方法

糞便の測定前処理は、Hang らの方法の変法で行った [56]。糞便の凍結乾燥は、1.5 ml 容のエッペンチューブに糞便約 1g を収め行った。乾燥時には内容物がエッペンチューブからの噴出を防止するために、12 等分に切り分けたプロワイプ (ソフトマイクロワイパー S220、大王製紙、東京、日本) で覆い、その上からタイ型の針金で巻き付けた。その後にエッペンチューブは凍結乾燥瓶 (EYELA 600 ml 口径 102 mm、東京理科学器械株式会社、東京、日本) に入れ、-80 °C で 2 時間凍結した。次に凍結乾燥後の糞便は凍結乾燥機 (EYELA FDU-1200 型、東京理科学器械株式会社、東京、日本) に装着し、6 時間以上を要して乾燥させた。凍結乾燥した糞便 0.01 g は新たなエッペンチューブに入れ替えた後に、MilliQ 水 1000 µL を加え、ボルテックスで 4 分間混和した。混和後の糞便は 4 °C、11,000 rpm (5,412 g) で 15 分間遠心した。分離した上清 500 µL は、新たなエッペンチューブに分注して 4 °C、15,000 rpm (10,064 g) で 10 分間遠心した。得られた上清は、1 mL のシリンジ (電子線滅菌済、Terumo、東京、日本) で 0.45 mL 吸引し、シリンジフィルター (口径 0.2 µm、直径 13 mm、Whatman GE Healthcare Life Science、アマーシャム、イギリス) を介して測定用バイアル (12×32 mm、広口スクリーバイアル 褐色ガラス 目盛メモ域付、Systech、東京、日本) に注入した。さらに、このバイアル中に内部標準液 100 µL を加え、キャップ用セプタム (10/425 キャップ用セプタム赤 PTFE/白シリコン-5/55 ml、Systech、東京、日本) を予め付けておいたキャップ (プロピレン製白スクリーキャップ、Systech、東京、日本) を装着し、ボルテックスで数秒混和した直後にガスクロマトグラフィー法による測定に用いた。

2-5. SCFA 濃度の測定

SCFA の種類を同定するための標準物質として揮発性遊離脂肪酸 Mix (SIGMA-ALDRICH 社、ミズーリー) を用いた。内部標準物質は、2-Ethylbutyric acid 99 % (SIGMA-ALDRICH 社、ミズーリー) を用いた。これらの標準物質は、使用するまで -20 °C で保存した。

SCFA 濃度の測定には、ガスクロマトグラフ (GC-2010;SHIMADZU、京都、日本) にキャピラリーカラム (DB-FFAP、Agilent Technology、カリフォルニア) を装着し、水素炎イオン化型検出器を用いた。気化室と検出器の温度はそれぞれ 280 °C と 240 °C に調整した。キャリアーガスにはヘリウムガスを用い、線速度は 94.6 cm/sec、そしてスプリット比は 1:10 とした。カラム温度は 100 °C で 0.5 分間保持した後に 10 °C/min で 200 °C まで昇温し、その後 10 分間保持した。試料の注入量は 0.8 μ L とした。

SCFA 濃度は、ガスクロマトグラフ上に認められた各脂肪酸のピークをそれぞれの標準物質の保持時間と照合し、その面積比から内部標準法により定量した。ガスクロマトグラフィー法には、外部標準法、内部標準法そして標準添加法がある。内部標準法は、目的成分と内部標準物質のピーク面積比と濃度比の関係から目的成分の濃度を求める方法である。この方法は、目的成分と内部標準物質が検出できれば定量計算が可能であり、試料密度の違いの影響を受けにくい。さらに、濃度比は試料の注入量に依存しないため、注入量の誤差を補正することが可能である。これらの利点から、今回はガスクロマトグラフィー法による脂肪酸の定量方法として内部標準法を選択した。

2-6. 統計分析

年齢と体重は平均±標準偏差で示した。細菌株の給与前後の細菌数と SCFA 濃度はそれぞれ平均値±標準誤差で示し、これらの比較は Wilcoxon rank sum test により行った。糞便中の細菌数と SCFA 濃度の関係は、単回帰分析によって解析した。回帰式は ANOVA に基づく F 検定を行い、回帰式である仮定条件の検証を行った。回帰分析における独立変数の係数は、独立変数の値の変動に対する従属変数の平均値の分散を示すため、係数は推定値である [57]。この係数推定値が信頼区間にあることで解析結果の正確性を保証した。さらに、決定係数 R^2 は、従属変数の分散を独立変数がどの程度説明できるかを示している係数であるため [57]、 R^2 値 50% 以上で対象モデルが適切にデータを表現できていると判断した。本研究では、従属変数を SCFA 濃度とし、独立変数を細菌数とした。全ての解析

は、Stata/MP 14.0 (64-bit x86-64、stata 社、テキサス) を用いて行った。危険率 5 %未満をもって有意とした。

3. 結果

単独株給与前後の細菌数の変化は、図 1 (A~I) に示した。*Enterobacteriaceae* 科は、 $6.8E+08$ 個から $4.5E+09$ 個へと、*Enterococcus* spp.属は $2.4E+08$ 個から $3.0E+09$ 個へと有意に増加した (それぞれ $p < 0.05$)。また、混合株給与前後の細菌数の変化は、図 2 (A~I) に示した。*Bacteroides* 属は $1.9E+10$ 個から $9.0E+11$ 個、*C. leptum* subgroup は $8.6E+08$ 個から $5.0E+10$ 個、および *Faecalibacterium* 属は $1.6E+09$ 個から $6.1E+10$ 個へと有意に増加した (それぞれ $p < 0.01$)。

SCFA の種類は、酢酸、プロピオン酸、i-酪酸、n-酪酸、i-吉草酸ならびに n-吉草酸の 6 種類が検出できた。しかし、n-カプロンサン、n-ヘプタンサンおよび乳酸は検出限界値未満であった。単独株群における SCFA の濃度には有意な変化を認めなかったが、混合株群では酢酸が 8.8 mM から 14.5 mM へ、そしてプロピオン酸が 3.2 mM から 5.5 mM へとそれぞれの濃度が有意に上昇した (それぞれ $p < 0.05$) (図 3)。また、酢酸濃度に対する各細菌属と細菌科の係数推定値は、*Bacteroides* 属が 2.46、*Fusobacterium* 属が 2.28、*Ruminococcaceae* 科が 2.07 そして *C. coccoides* group が 1.42 であった (それぞれ $p < 0.05$) (表 2)。プロピオン酸の濃度に対する各細菌属と細菌科の係数推定値は、*Bacteroides* 属が 0.97、*Fusobacterium* 属が 0.79 であった (それぞれ $p < 0.01$)。

4. 考察

単独株を給与した前後では、*Enterococcus* spp.属と *Enterobacteriaceae* 科が有意に増加したが、いずれの SCFA においても有意な変化を認めなかった。今回使用した単独株は、*Enterococcus faecium* E1707 株であったため、*Enterococcus* spp.属の菌数の有意な増加が認められたと考えられる。また、*Enterobacteriaceae* 科の細菌数の増加による SCFA 濃度の変化が認められなかったことから、この細菌は SCFA 産生に影響を与える細菌種ではない可能性が示唆された。混合株を給与した前後では *Bacteroides* 属、*C. coccoides* group の細菌群および *Faecalibacterium* 属が有意に増加し、酢酸とプロピオン酸の濃度が有意に上昇した。今回使用した混合株は単独株よりも 1 回給与当たりの菌数と菌種数が多かったため、酢酸とプロピオン酸を産生する細菌が、単独株の給与時よりも増加したと考えられる。

健康犬において、*Bifidobacterium longum* KACC91563 株を給与すると *Bifidobacterium* 属、*Enterobacteriaceae* 科そして *Clostridium* 属の細菌数の増加そして酢酸とプロピオン酸の濃度が有意に上昇したことが報告されている [58]。しかし、プロバイオティクスの給与により引き起こされる細菌の数的な変化が SCFA 濃度をどのように変化させるか、すなわち細菌の増加数に対する SCFA の増加予想値を求めた報告はないため、本章では従属変数を SCFA 濃度とし、独立変数を細菌数とした単回帰分析を行った。その結果、酢酸濃度の上昇には *Bacteroides* 属、*Fusobacterium* 属、*Ruminococcaceae* 科および *C. coccoides* group と順に影響を示すことが明らかとなった。さらに、プロピオン酸濃度の上昇には、*Bacteroides* 属と *Fusobacterium* 属が順に影響が強いことも明らかとなった。

Dysbiosis の状態では腸管内 SCFA の低下により腸内の免疫機構が破綻する [3] [51]。SCFA のうち酢酸は、制御性 T 細胞の Foxp3 遺伝子プロモーター領域のアセチル化を促すことで、Treg 細胞の分化誘導を促進する [59]。また、デキストラン硫酸ナトリウムを用いた大腸炎モデルマウスにおいては、食物繊維の豊富なフードや酢酸を経口給与することで NLRP3 インフラマソームが活性化され、大腸炎が抑制される [60]。さらに、プロピオン酸

は IL-6、IL-8 そして TNF α などの炎症性サイトカインの産生を減少させる [50][61]。今回の結果から *Bacteroides* 属と *Fusobacterium* 属の細菌数の増加は、酢酸とプロピオン酸の濃度の上昇に関与することで腸内の免疫機構を修復させることが示唆された。第 2 章で臨床症状を有する LPE 犬は、*dysbiosis* の状態であり腸管の免疫機構が破綻していることが推測された。さらにこれらの犬の細菌叢において *Fusobacteria* 門が有意に減少し、*Bacteroidetes* 門が減少傾向にあったことから、腸管内の SCFA 濃度を上昇させるためには、SCFA 産生に特異性の高い *Fusobacterium* や *Bacteroides* などの細菌数を補充する必要があることが明らかとなった。

5. 小括

本章では健常犬の優勢菌門である Firmicutes 門、Bacteroidetes 門および Fusobacteria 門の細菌が SCFA 産生に関与していると仮定し、無症候性 LPE 犬における糞便中細菌叢の細菌の数量変化と SCFA 濃度の関係を調査した。細菌数と SCFA 濃度は、それぞれ qPCR 法とガスクロマトグラフィー法によって測定した。

単回帰分析により無症候性 LPE 犬の酢酸濃度の上昇に対する細菌の影響力は、*Bacteroides* 属、*Fusobacterium* 属、*Ruminococcaceae* 科そして *C. coccoides* group の順であることが明らかとなった。さらに、プロピオン酸濃度の上昇には、*Bacteroides* 属と *Fusobacterium* 属がその順に影響することも明らかとなった。これらの SCFA 産生に関与する細菌数を増加させることにより腸内の免疫機構の修復が期待できることが示唆された。そして、臨床症状を有する LPE 犬における腸管内の SCFA 濃度を上昇させるためには、SCFA 産生に特異性の高い *Bacteroides* 属、*Fusobacterium* 属、*Ruminococcaceae* 科そして *C. coccoides* group などの菌種を与える必要があることが明らかとなった。

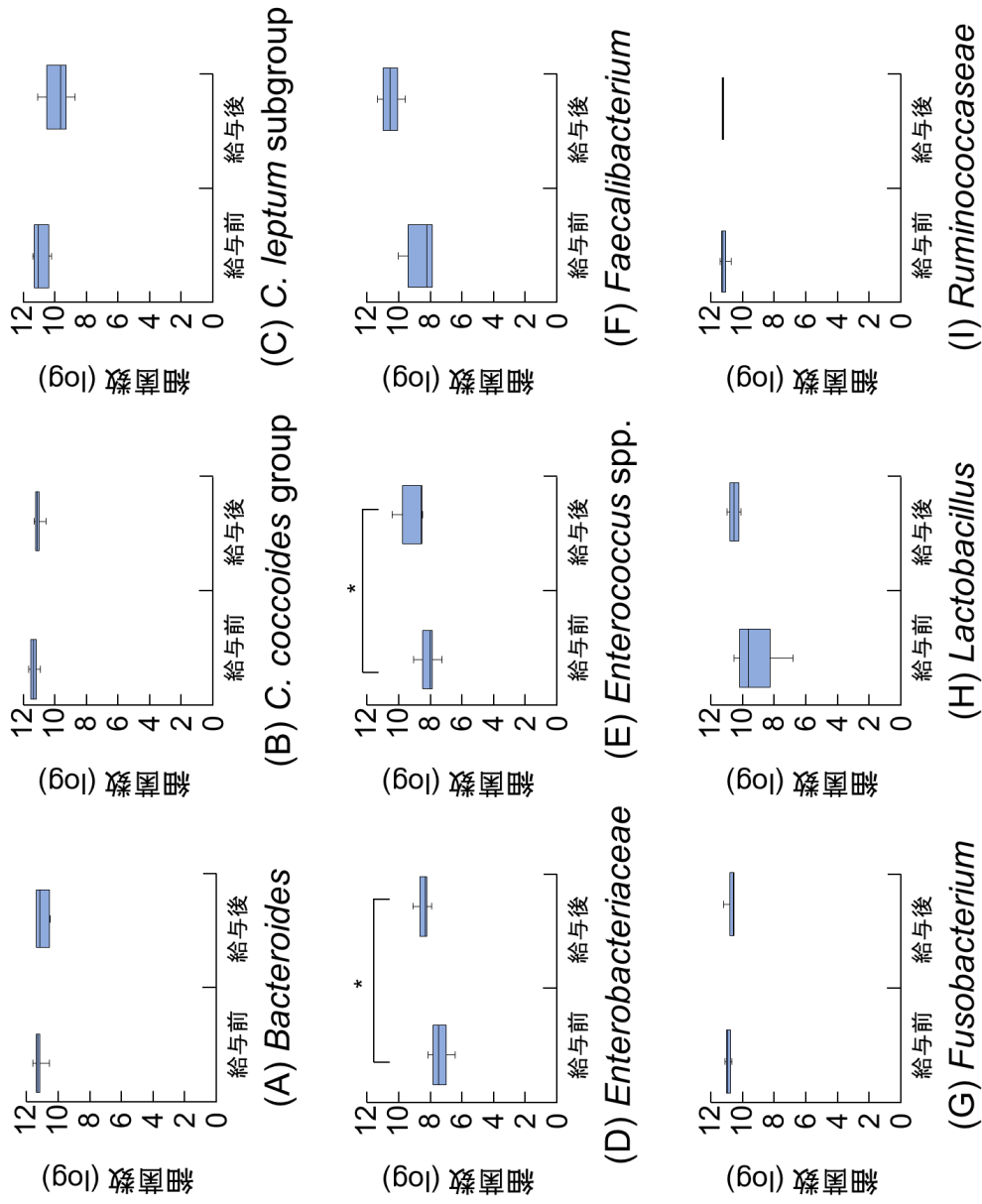


図1 (A~I) 単独株給与前後の細菌数の変化
* : p < 0.05

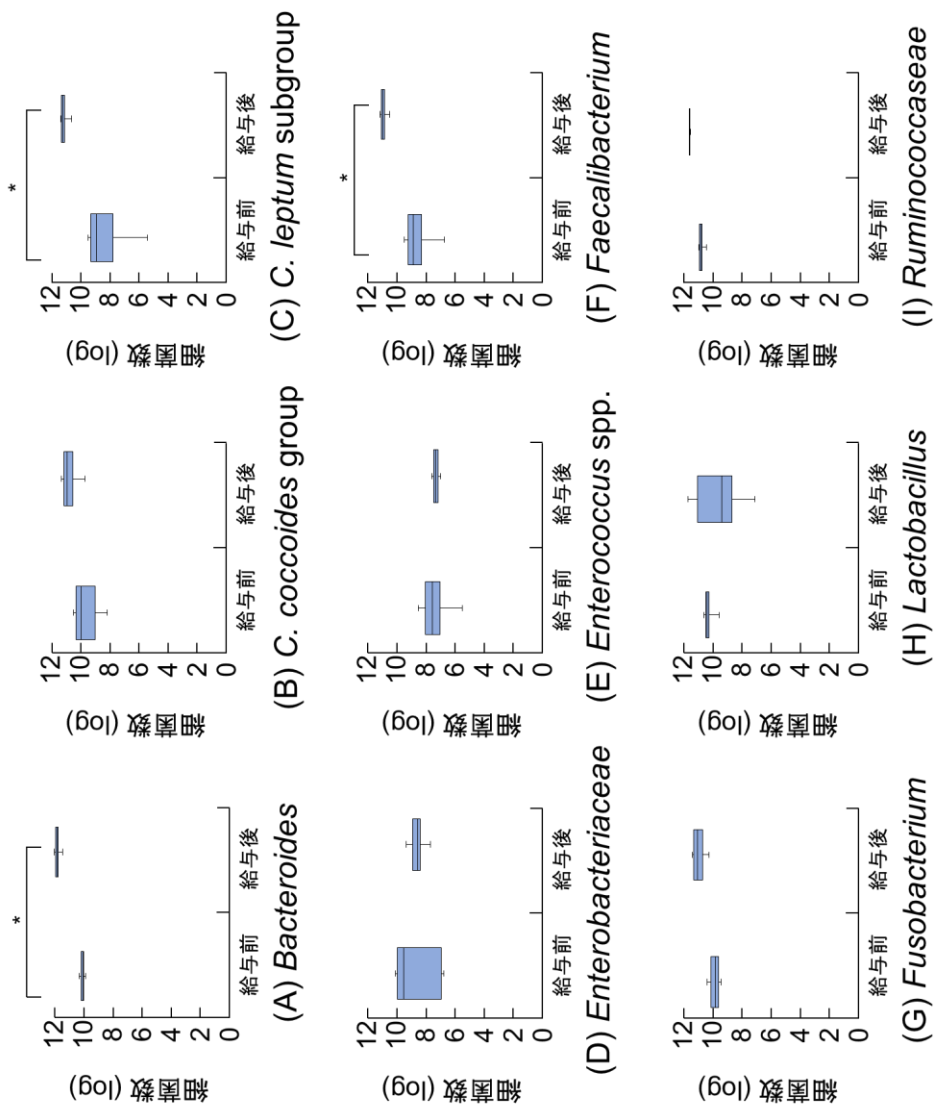


図2 (A~I) 混合株給与前後の細菌数の変化
*: p < 0.01

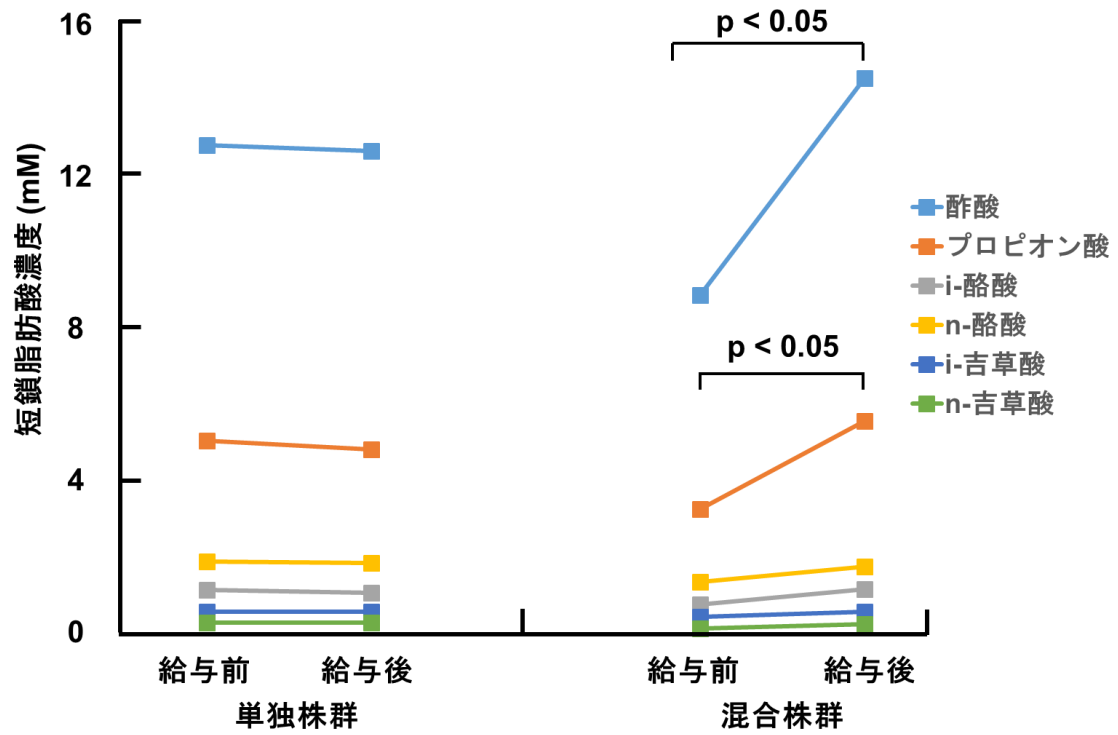


図3 単独株と混合株の给与前後における短鎖脂肪酸の濃度の変化

表1 菌種に対するプライマーの種類とアニーリング温度

qPCR primers/ probe	Sequence(5'-3')	Target	Annealing (°C)
CFB55f	CCGGAWTYATTGGGTTTAAAGGG	<i>Bacteroides</i>	52
CFB968r	GGTAAGGTTCCCTCGCGTA		
g-CcocF	AAATGACGGTACCTGACTAA	<i>Clostridium coccooides</i> group	51
g-CcocR	CTTTGAGTTTCATTCCTGCGAA		
sg-Clept-F	GCACAAGCAGTGGAGT	<i>Clostridium leptum</i> subgroup	58
sg-Clept-R3	CTTCCTCCGTTTGTCAA		
En-lsu3F	TGCCGTAACCTTCGGGAGAGGCA	<i>Enterobacteriaceae</i>	60
En-lsu3'R	TCAAGGCTCAATGTTCAAGTGTC		
Forward	CCCTTATTGTTAGTTGCCATCATT	<i>Enterococcus</i> spp.	58
Reverse	ACTCGTTGTACTTCCCATTGT		
FaecaF	GAAAGCGGCCCTACTGGGCAC	<i>Faecalibacterium</i>	61
FaecaR	GTGCAGGCGGAGTTGCAGCCT		
Fuso-F	KGGGCTCAACMCMGTATTGCCGT	<i>Fusobacterium</i>	58
Fuso-R	TGCCGTTAGCTTGGGCGCTG		
g-Lact(Rin)-F	AGCAGTAGGGAATCTTCCA	<i>Lactobacillus</i>	50
g-Lact(Rin)-R	CACCGCTACACATGGAG		
RumiF	ACTGAGAGGTTGAACGGCCA	<i>Ruminococcaceae</i>	50
RumiR	CCTTTACACCCAGTAAWTCCGGA		
341-F	CCTACGGGAGGCAGCAG	<i>Universal Bacteria</i>	60
518-R	ACCGCGGCTGCTGGC		

表2 糞便中の細菌数と短鎖脂肪酸濃度の関係

	酢酸	プロピオン酸	i-酪酸	n-酪酸	i-吉草酸	n-吉草酸
<i>Fusobacterium</i>	2.28 (84)**	0.79 (67)**	-	-	-	-
<i>Bacteroides</i>	2.46 (73)**	0.97 (66)**	-	0.46 (45)*	-	-
<i>C. coccoides</i> group	1.42 (69)**	-	0.17 (46)**	-	-	-
<i>C. leptum</i> subgroup	0.70 (46)*	-	-	0.18 (45)*	-	-
<i>Enterobacteriaceae</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Enterococcus</i> spp.	-	-	-	-	-	-
<i>Faecalibacterium</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Lactobacillus</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Ruminococcaceae</i>	2.07 (57)*	-	-	0.50 (41)*	-	-

係数推定値 (決定係数) **: p < 0.01 *: p < 0.05

第4章 臨床症状を有する LPE 犬に対する

FMT の臨床応用

1. 緒言

FMT は、腸内細菌叢の正常化を目的としてドナーの糞便を *dysbiosis* が原因となる疾患患者の腸管内に直接投与する方法であり、薬物療法のように化学物質による副作用を伴わないため、安全性が高い治療法として急速に世界中に普及しつつある [20] [21]。医療において、FMT は偽膜性腸炎や潰瘍性大腸炎、過敏性腸症候群などの慢性腸疾患さらには消化管感染症である不応性および再発性の CDI に対する治療方法として研究が進んでいる [62] [63] [20] [64] [21]。近年、これらの疾患に加え、慢性便秘、IBD、メタボリック症候群ならびに特発性血小板減少性紫斑病などの *dysbiosis* に関連する疾患に対する FMT が実施され始めている [22] [23]。

犬における FMT は、CDI や急性下痢症に関して報告されているが [24] [25]、これらの疾患のように *dysbiosis* に関連する疾患である IBD を対象とした報告はない。そのため、IBD に対する FMT の臨床的な安全性や有効性に関しては未だ不明な点が多く、FMT の実施方法は確立されていない。

第 2 章において臨床症状を有する LPE 犬は *dysbiosis* の状態であり、特に *Fusobacteria* 門の占有率が有意に低下することが明らかとなった。また、第 3 章において健常犬の細菌叢で優勢菌門に分類される *Fusobacterium* 属と *Bacteroides* 属などの細菌数の増加が酢酸とプロピオン酸の濃度の上昇に影響することが明らかとなった。これらのことから、臨床症状を有する犬では、腸管免疫機構の修復に関与する SCFA 産生に影響を与える細菌を補充し、*dysbiosis* の状態を改善させる必要があることが明らかとなった。そのため、本章では、FMT を実施することによって、これらの有益菌の補充ができることが期待されたため、臨床症状を有する犬に対して FMT の臨床応用を行った。初めに無症候性 LPE 犬に対して FMT を実施することでその安全性を臨床症状や血液化学検査により評価した。次いで、症状を伴う LPE 犬に対して FMT を実施することで臨床的な有効性を評価した。

2. 材料および方法

本研究は日本獣医生命科学大学動物実験委員会（承認番号：29-5）、生命倫理委員会（承認番号：29-5）および動物医療センター倫理委員会（承認番号：29-5）の承認を得て行った。また、すべてのレシピエント犬の管理者には FMT の実施前に十分なインフォームドコンセントを行った。

2-1. 供試動物

FMT のレシピエントは、第 3 章で用いた無症候性 LPE 犬 4 頭を asymptomatic LPE (aLPE) 群とし、臨床例 9 頭を symptomatic LPE (sLPE) 群とした (表 1)。sLPE 群は、2017 年 5 月から 2019 年 5 月までに本学附属動物医療センターに来院した、年齢が 9.4 ± 2.1 歳、体重が 7.5 ± 3.7 kg、性別が去勢オス 6 頭と避妊メス 3 頭の犬であった。これらの sLPE 群は、慢性的な下痢や嘔吐、体重減少そして食欲不振などを呈しており、前医のもとで低脂肪食による食事療法、アモキシシリン、エンロフロキサシン、メトロニダゾールそしてタイロシンなどによる抗菌薬治療さらにコルチコステロイド薬による治療を施されていたが、すべての治療に難反応性であった。sLPE 群は、FMT 実施の当日からはすべての内服薬を休薬した。これらの犬は、FMT 実施前に第 2 章および 3 章と同様の方法で LPE と組織診断が下された。

2-2. FMT 用の糞便移植液の作製と移植方法

FMT 実施用のドナー糞便は、第 2 章で供試した無症候性 LPE の犬 5 頭のものを用いた。ドナー糞便を用いた糞便移植液は、レシピエントの体重 1.0 kg 当たり 3 g のドナー糞便をレシピエントの体重 1.0 kg 当たり 10 mL の生理食塩水で溶解し懸濁液を作成した。糞便移植液中に含まれる被毛やゴミなどの不要物は、金属製メッシュと滅菌ガーゼでそれぞれ 1 回ずつ順次濾過した。今回の FMT の実施方法は浣腸法を選択し、糞便移植液は、レシピエントの体重 1.0 kg 当たり 5 mL を加温した生理食塩水で浣腸した結腸内に浣腸用チューブを介して注入した。この方法は、内視鏡を用いる上部消化管へ移植する方法や経口的な方法に比

べ、麻酔のリスク、胃内腔で塩酸の影響そして移植液の用量の点から容易かつ大量に移植できる方法である。

aLPE 群に対する FMT は、21 日に 1 回の間隔で合計 4 回実施した。sLPE 群 9 頭の FMT は、7 頭が 1 回のみであり、他の 2 頭は 7 から 70 日の間隔で複数回行った。

2-3. レシピエントの採便と糞便の保存方法

sLPE 群 9 頭に対する採便は、FMT の実施直前 (pre) と実施 7 日後 (post) に行った。複数回の FMT を実施した犬 2 頭は、2 回目の FMT 以後は毎回の FMT 実施直前に行った。すべての糞便は自然排泄した直後に 1.5 mL のエッペンチューブに約 1 g 入れ、測定まで 80 °C で保存した。

2-3. FMT の安全性と有効性の評価

FMT の安全性は、aLPE 群を対象として行った。マウスに対して抗菌薬を 14 日間投与した翌日に FMT を実施した研究では、抗菌薬投与中の細菌種数は減少したが、レシピエントの細菌叢は抗菌薬の投薬が終了してから 21 日以内にドナーの細菌叢と類似した [65]。本研究では、この報告を参考に、aLPE 群に対する FMT を 21 日の間隔で合計 4 回に設定した。医療において、CDI や IBD に対して FMT を行った際の副作用は、下痢、腹部疼痛そして腹部の違和感などであるが [66]、犬では FMT に関連した副作用の報告はない。そのため、FMT の安全性は、CIBDAI と血液化学検査を用いて評価した。

FMT の有効性の評価は、sLPE 群 9 頭を対象として第 2 章と同様に CIBDAI と Waltham Faeces Scoring System (Waltham[®]、Mars Incorporated、マクリーン、バージニア) を用いて行った。

2-4. 次世代シーケンスによる細菌叢の検出

ドナー群と sLPE 群のうち 2 頭ずつの糞便を無作為に選択し、第 2 章の方法と同様の次世代シーケンス解析を行った。

2-5. 定量 PCR (qPCR) による細菌数測定

FMT 実施前後の sLPE 群 9 頭の糞便中における *Enterobacteriaceae* 科と *Fusobacterium* 属の細菌数の測定は、第 3 章の方法と同様に qPCR 法によって行った。

2-6. 統計解析

sLPE 群の犬の年齢と体重は、平均±標準偏差で示した。血液化学検査の測定値は、平均±標準偏差で示し、Friedman 検定を行った後、Bonferroni 補正を施した多重比較検定を行った。sLPE 群における CIBDAI および Waltham Faeces Scoring System は平均±標準誤差で示し、FMT 実施前後の比較は Wilcoxon rank sum test により行った。 α 多様性は、ドナー群と FMT 実施前後の sLPE 群の chao1 指数を平均±標準誤差で示し、第 2 章の方法と同様の希釈解析を行った。そして、それらの値は oneway ANOVA 解析を行った後、Bonferroni の補正による多重比較を行った。 β 多様性は、群間の weighted UniFrac 距離を平均±標準誤差で示し、第 2 章の方法と同様に PCoA を行った。糞便中細菌叢における各菌門の構成比は占有率 (%) の範囲を示した。糞便中細菌叢の細菌数は平均±標準誤差で示し、FMT 実施前後の比較は Wilcoxon rank sum test により行った。すべての解析は、Stata/MP 14.0 (64-bit x86-64、stata 社、テキサス) を用いて行い、危険率 5%未満をもって有意とした。

3. 結果

aLPE 群において、FMT 前後の CIBDAI は 0.0 ± 0.0 から 0.0 ± 0.0 へと有意な変化を認めなかった。FMT 実施 42 日後の AST 値は 48.0 ± 11.7 U/L と基準値の範囲をわずかに超えたが、経時的な変化は有意ではなかった。それ以外の測定値においては基準値の範囲内の変化であった (表 2)。

sLPE 群 9 頭の CIBDAI は、 11.2 ± 1.5 から 3.8 ± 1.5 へと有意に低下した ($p < 0.05$) (図 1-A)。そして、Waltham Faeces Scoring System も 5.0 ± 0.0 から 2.6 ± 0.2 へと有意に低下した ($p < 0.05$) (図 1-B)。

ドナー群と sLPE 群のうち 2 頭ずつにおける chao1 指数は、ドナー群が 121.4 ± 2.6 であり、sLPE 群における pre と post はそれぞれ 40.6 ± 4.3 と 100.7 ± 2.4 であった。sLPE 群 pre の α 多様性は、ドナー群と sLPE 群 post よりも有意に低下していた (それぞれ $p < 0.01$) (図 2)。

PCoA による β 多様性については、群内の UniFrac 距離が短い順に、ドナー群 (0.12)、sLPE 群の post (0.13) および pre (0.26) であった。また、群間の UniFrac 距離は短い順に、ドナー群と sLPE 群 post (0.16 ± 0.02)、ドナー群と sLPE 群の pre (0.38 ± 0.03) および sLPE 群の pre と post (0.38 ± 0.03) であった。ドナー群と sLPE 群の pre の間および sLPE 群の pre と post の間の UniFrac 距離は、ドナー群と sLPE 群 post の間と比較して離れていた。第 1 主成分と第 2 主成分の寄与率は、それぞれ 43.81 % と 27.17 % であり、累積寄与率は 70.97 % であった。 β 多様性は、ドナー群と sLPE 群の post は第 1 および 2 主成分で両群の細菌叢が類似していたが、この両群と sLPE 群の pre の間には相違性がみられた。この PCoA における Mardia fit measure の値は、0.93 であった (図 3)。

今回用いたドナー群、sLPE 群の pre および post の糞便からは Actinobacteria、Bacteroidetes、Firmicutes、Fusobacteria、Proteobacteria そして Tenericutes といった 6 つの細菌門に属する細菌が検出された (図 4)。ドナー 1 とドナー 2 の細菌門の占有率は、

Bacteroidetes 門 (47.3 %と 40.3 %)、Firmicutes 門 (24.6 %と 24.5 %) そして Fusobacteria 門 (20.2 %と 22.6 %) の順に優勢であった。sLPE1 と sLPE2 の細菌門の占有率は、Bacteroidetes 門 (15.2 %と 24.5 %)、Firmicutes 門 (4.4 %と 51.8 %) そして Proteobacteria 門 (80.3 %と 23.7 %) であった。sLPE1 と sLPE2 の post の細菌門の占有率は、Bacteroidetes 門 (35.9 %と 40.7 %)、Firmicutes 門 (15.2 %と 27.2 %) そして Fusobacteria 門が (38.1 %と 23.5 %) であった。sLPE 群で優勢であった Proteobacteria 門のうち 91 %は、*Enterobacteriaceae* 科であり、検出限界値未満であった Fusobacteria 門のうち 100 %は *Fusobacterium* 属であった。そのため、sLPE 群における *Enterobacteriaceae* 科と *Fusobacterium* 属の菌数の測定を行った。sLPE 群 9 頭における *Enterobacteriaceae* 科の細菌数は、 $8.9E+13$ 個から $7.6E+06$ 個へと有意に減少した ($p < 0.01$) (図 5-A)。*Fusobacterium* 属の細菌数は、 $1.4E+05$ 個から $5.4E+05$ 個へと有意に増加した ($p < 0.01$) (図 5-B)。

sLPE 群のうち複数回の FMT を実施した 2 頭は sLPE3 と sLPE4 に識別した。sLPE3 は、7 日から 70 日の間隔で合計 212 日間に 7 回の FMT を実施した。FMT を実施中には Actinobacteria、Bacteroidetes、Cyanobacteria、Firmicutes、Fusobacteria そして Proteobacteria といった 6 つの細菌門に属する細菌が検出された (図 6)。Proteobacteria 門の占有率は、0 日目の 52.2 %から 7 日目以降は 0.4~8.0 %以下に減少した。Fusobacteria 門の占有率は、0 日目の検出限界値未満から 7 日目以降は 3.6~35.6 %に増加した。sLPE4 は、7 日から 56 日の間隔で合計 119 日間に 7 回の FMT を実施した (図 7)。*Enterobacteriaceae* 科の細菌数は、0 日目の $1.5E+06$ から 7 日目の $7.0E+02$ に減少し、7 日目以降の細菌数は 0 日目と比較して常に低値であった。*Fusobacterium* 属は、0 日目から 7 日目の間に $1.0E+02$ から $5.0E+04$ に増加し、7 日目以降は、 $1.0E+05$ 以上で維持した。これら 2 頭の FMT 実施後における臨床状態と血液化学検査による安全性の評価項目は、いずれの時点においても異常値は認めなかった。

4. 考察

aLPE 群において、FMT 前後の臨床状態には変化を認めなかった。また、FMT を行った 42 日後の AST 値は、基準値の範囲をわずかに上回ったが、その変化は一過性のものであった。これらのことから、今回の用法による FMT は、21 日間隔での 4 回であれば安全に実施可能であることが確認できた。

sLPE 群 9 頭では CIBDAI と Waltham Faeces Scoring System の指標の数値が FMT 後には有意に減少し、下痢、排便と嘔吐の頻度、体重減少などの臨床症状における明らかな改善を認めた。さらに、これらの犬は抗菌薬やコルチコステロイド薬などの薬物治療に難反応性であったため、臨床症状を有する LPE 犬に対する FMT は、抗菌薬やコルチコステロイド薬などによる治療以上に効果的である可能性が示唆された。

急性と慢性のいずれの消化器疾患においても dysbiosis は認められる [19] [67] [68]。急性下痢の α 多様性と β 多様性は、FMT により明らかに改善する [25]。sLPE 群の FMT 前の α 多様性は、ドナー群と比較して有意に低下し、 β 多様性はドナー群と異なる細菌叢を示したことから、sLPE 群は dysbiosis の状態であったと判断した。しかし、FMT 後の多様性はドナー群と類似する状態となった。健常犬における Proteobacteria 門と Fusobacteria 門の占有率はそれぞれ 5.0~7.0% と 23.0~40.0% である [54]。今回のドナー群の菌種占有率はその報告と同等であり、sLPE 群 post の占有率はドナー群と類似していたことから、臨床症状を有する LPE 犬に対する FMT は dysbiosis を修復する作用により治療効果を発揮する可能性が示唆された。そのためには、特に Bacteroidetes 門、Firmicutes 門および Fusobacteria 門を多く占有するドナーの選択が重要と考えられる。

sLPE 群で占有率の高かった Proteobacteria 門のうち 91% は Enterobacteriaceae 科であり、検出限界値未満であった Fusobacteria 門のうち 100% は *Fusobacterium* 属であった。そのため、qPCR 法を用いて Enterobacteriaceae 科と *Fusobacterium* 属の細菌数を測定した。その結果、sLPE 群における Enterobacteriaceae 科の細菌数は、FMT 後に有意に低値となり、

Fusobacterium 属の細菌数は FMT 後に有意に高値となった。これらのことと第 2 章の結果を総合すると、臨床症状を有する LPE 犬では *Enterobacteriaceae* 科の細菌数の増加と *Fusobacterium* 属の細菌数の低下は特徴的な細菌学的変化であることが示唆された。

複数回の FMT を実施した 2 頭は、FMT 実施期間中に副作用や異常を示さず安全に行うことができた。そして、基礎データとなる 4 回あるいは 84 日を大きく超えて現在も FMT による治療が進行中である。これら 2 症例の飼育責任者には CIBDAI と Waltham Faeces Scoring System のスコアを毎日記録していただきながら、加えて定期的な血液化学検査を行っている。それにより実施間隔を調整しながら FMT を行うことが可能となっている。これらことを含め、クライアントエデュケーションを充実させ慎重に観察することでさらに FMT の有効性が高くなると実感している。

5. 小括

浣腸法による FMT の臨床的な安全性と有効性について評価するために、aLPE 群に対して FMT を 21 日間隔で 4 回実施した。臨床的な安全性は、活動性、食欲、嘔吐の頻度、糞便性状、排便の頻度、体重および血液化学検査で評価した。その結果、FMT 後の安全性に異常は認めなかった。これらのことから、今回用いた無麻酔下での浣腸法による FMT は、4 回あるいは 84 日以内であれば安全に実施可能な方法であることが確認できた。

FMT の有効性は sLPE 群に対する FMT 前後の臨床症状、細菌門の構成比ならびに細菌数で評価した。臨床症状は、FMT 実施前後の CIBDAI と Waltham Faeces Scoring System の指標の数値が FMT 後には有意に減少し、下痢、排便と嘔吐の頻度、体重減少などの臨床症状における明らかな改善を認めた。さらに、FMT 後には抗菌薬やコルチコステロイド薬の治療が不要となった。

今回用いたドナー群の細菌叢の菌種占有率は、Bacteroidetes 門、Firmicutes 門そして Fusobacteria 門が優勢であり、この占有率と FMT 実施後の sLPE 群の細菌門の占有率が類似していたことから、臨床症状を有する LPE 犬に対する FMT は dysbiosis を修復する作用により治療効果を発揮する可能性が示唆された。sLPE 犬の細菌叢は Proteobacteria 門の占有率が増加し、特にその多くを占有する *Enterobacteriaceae* 科の細菌数が増加する一方、*Fusobacterium* 属の細菌数は低下した。これらは臨床症状を有する LPE 犬において特徴的な細菌学的変化であることが示唆された。

以上のことから臨床症状を有する LPE 犬は dysbiosis の状態であり、この状態が消化器症状を中心とした臨床状態に関与する可能性が示唆される。この dysbiosis を改善させるためには、Bacteroidetes 門、Firmicutes 門および Fusobacteria 門を多く含む糞便移植液を用いることが重要であると考えられる。さらに、FMT は臨床症状を有する LPE 犬に対する治療法として、薬剤治療よりも副作用が少なく安全かつ有効的な治療方法である可能性が示唆された。

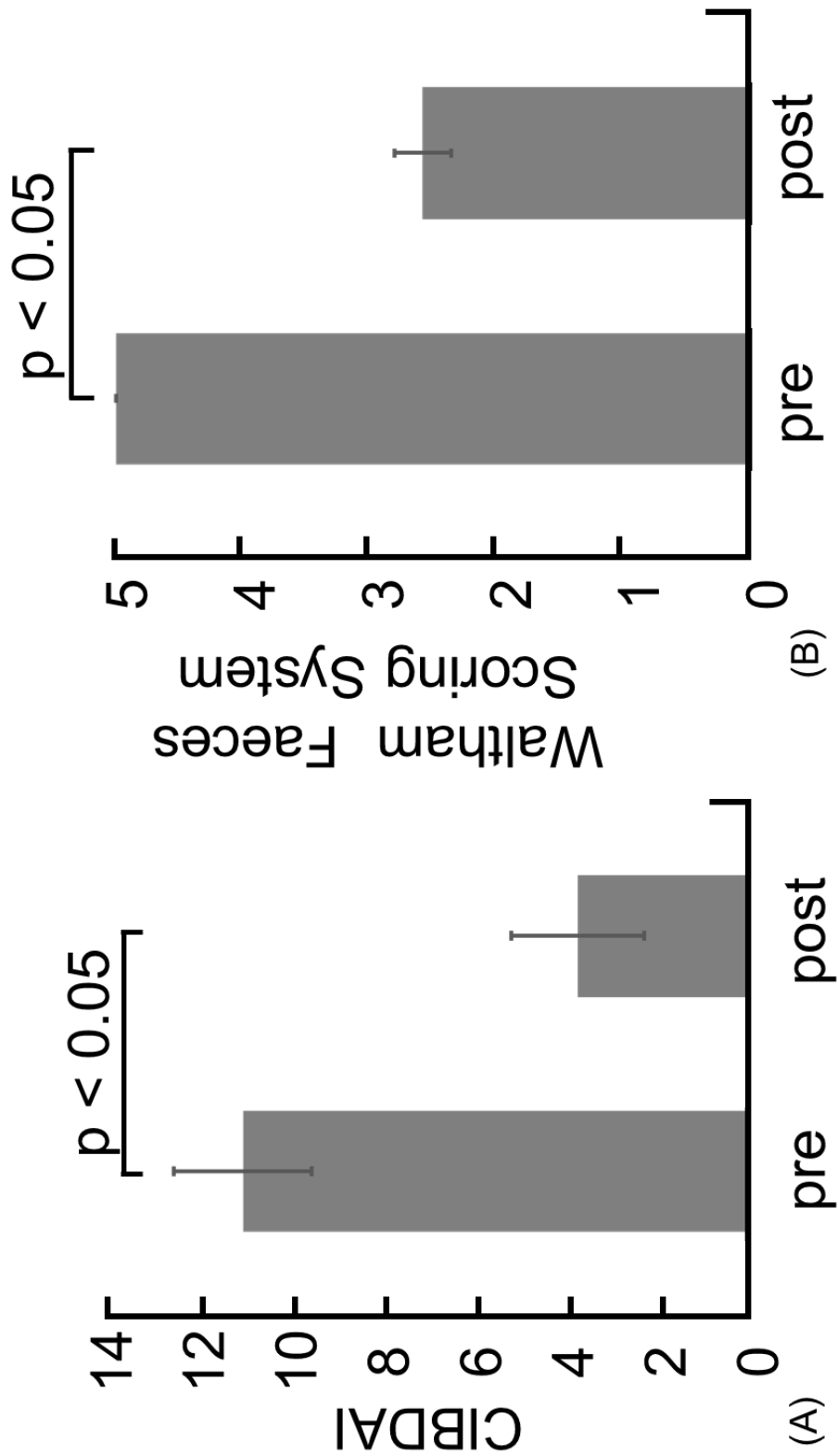


図1 sLPE群におけるFMT前後の臨床症状の変化 (A) CIBDAI (B) Waltham Faeces Scoring System
 sLPE群 : 臨床症状を有するLPE群、pre : FMT前、post : FMT後

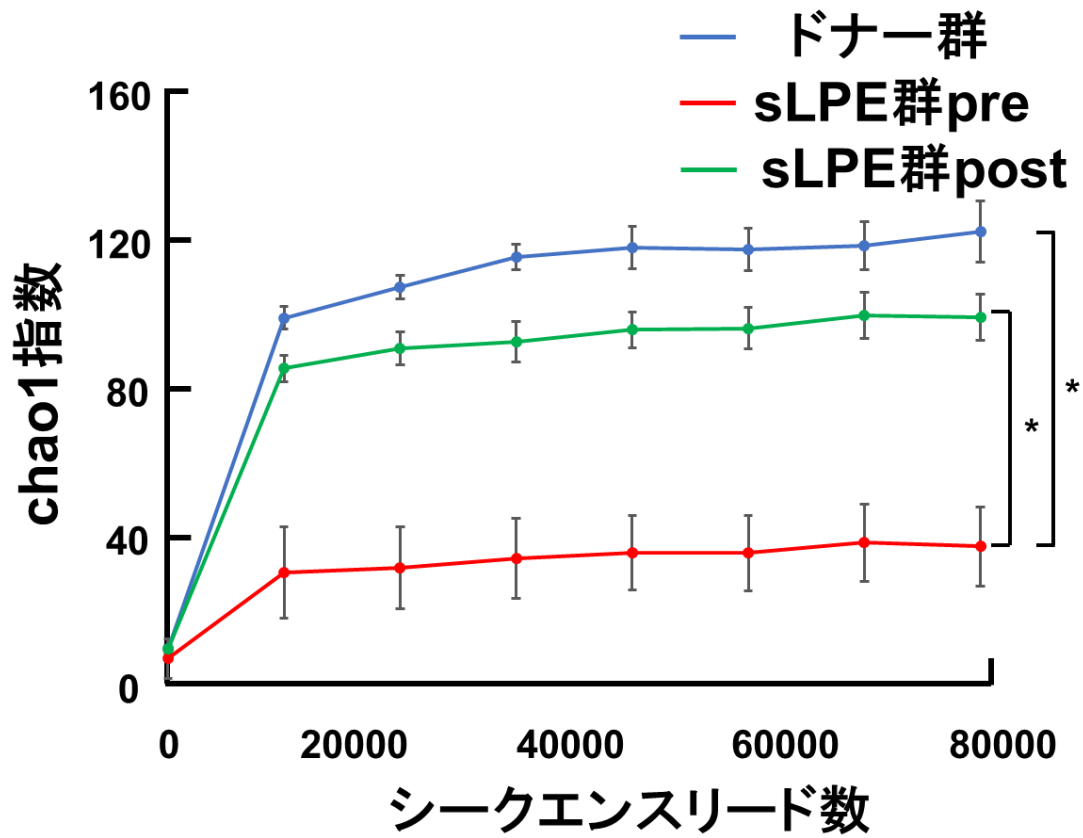


図2 ドナー群と FMT 前後の sLPE 群における α 多様性の比較

sLPE 群：臨床症状を有する LPE 群、pre：FMT 前、post：FMT 後、*： $p < 0.01$

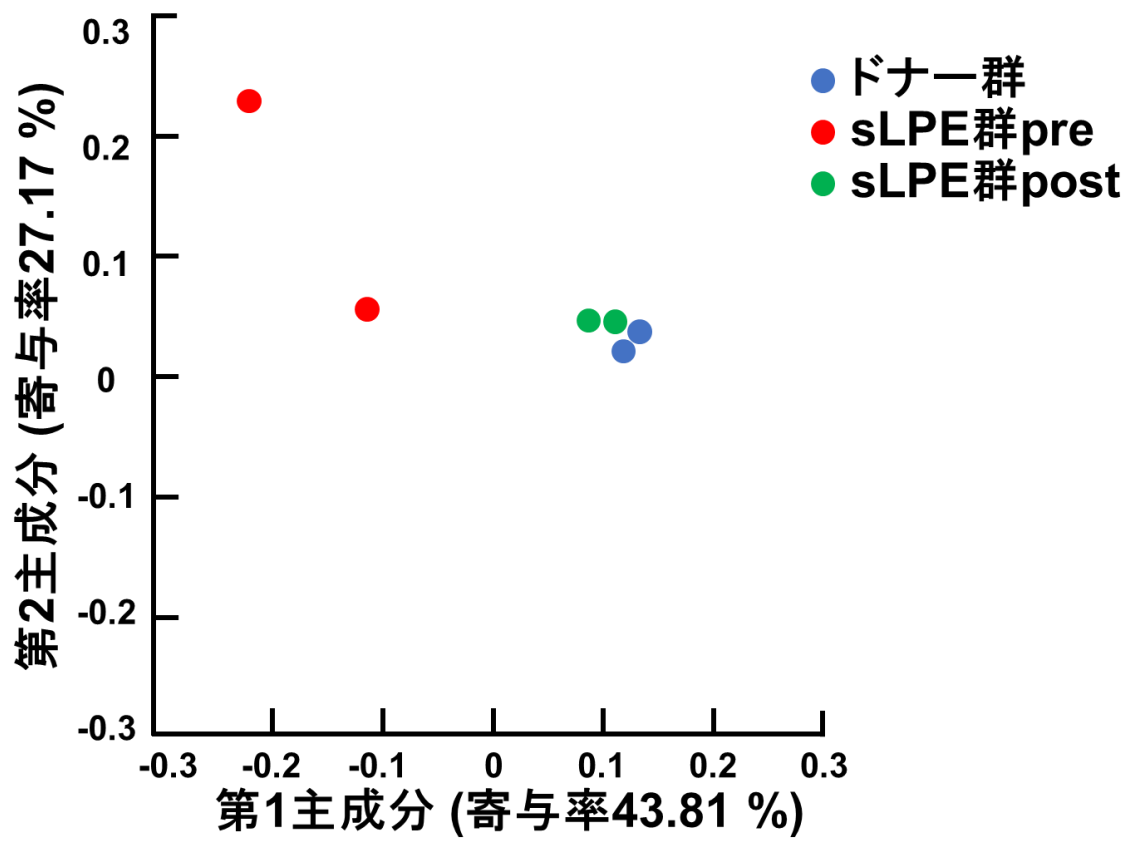


図3 ドナー群と FMT 前後の sLPE 群における β 多様性の比較

sLPE 群：臨床症状を有する LPE 犬、pre：FMT 前、post：FMT 後

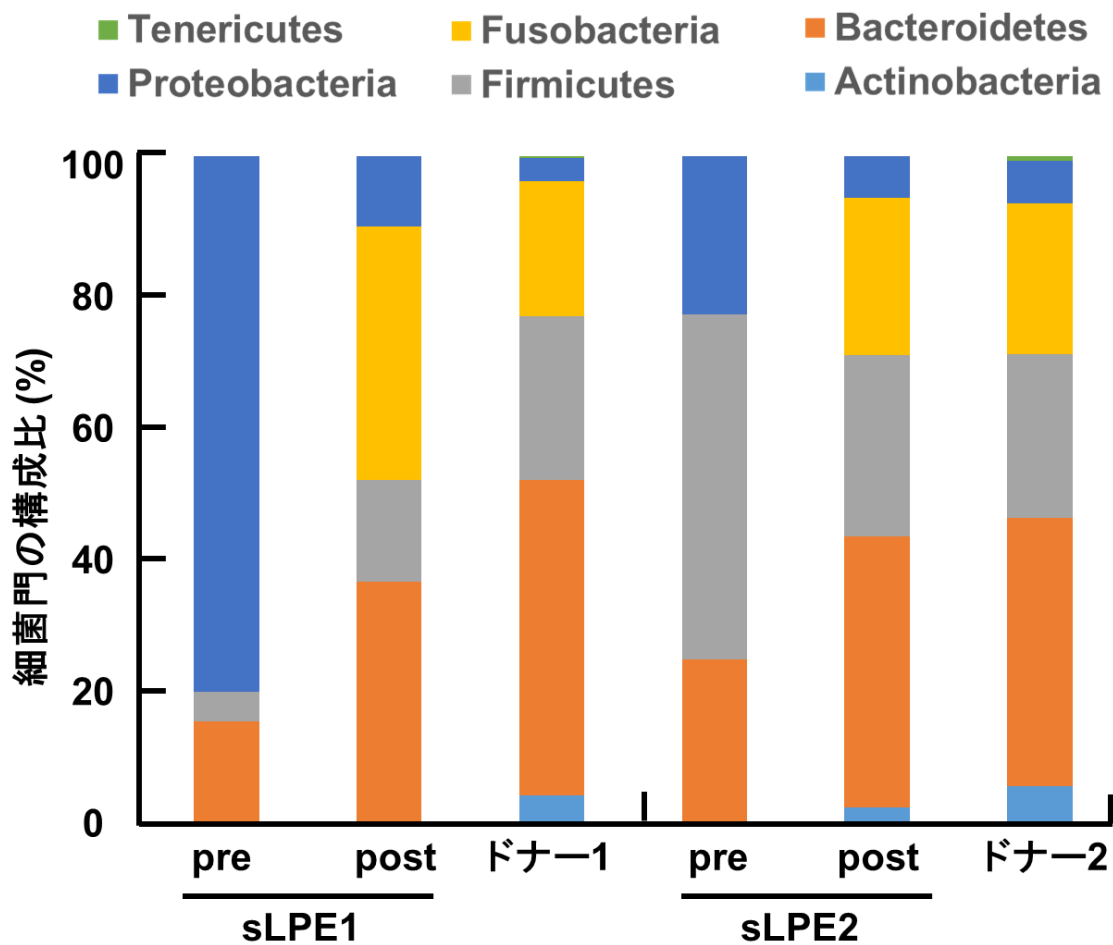


図4 ドナー群と FMT 前後の sLPE 群における細菌門の構成比

sLPE1：臨床症状を有する LPE 犬の症例 1、sLPE2：臨床症状を有する LPE 犬の症例 2、
 pre：FMT 前、post：FMT 後、ドナー1：症例 1 に使用したドナー犬、ドナー2：症例 2 に
 使用したドナー犬

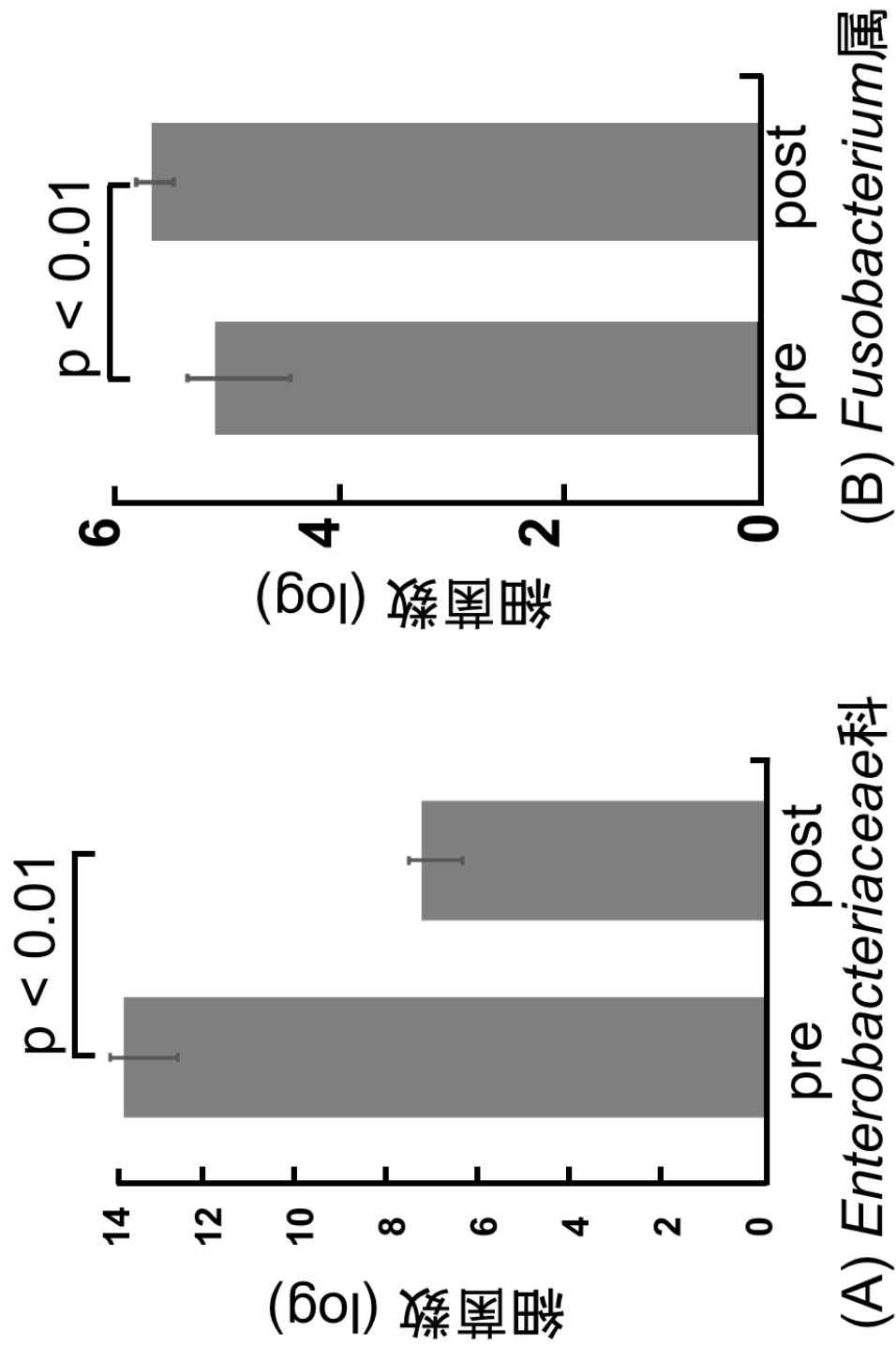


図5 FMT前後のsLPE群における(A) Enterobacteriaceae科と(B) Fusobacterium属の細菌数の変化
sLPE群: 臨床症状を有するLPE群、pre: FMT前、post: FMT後

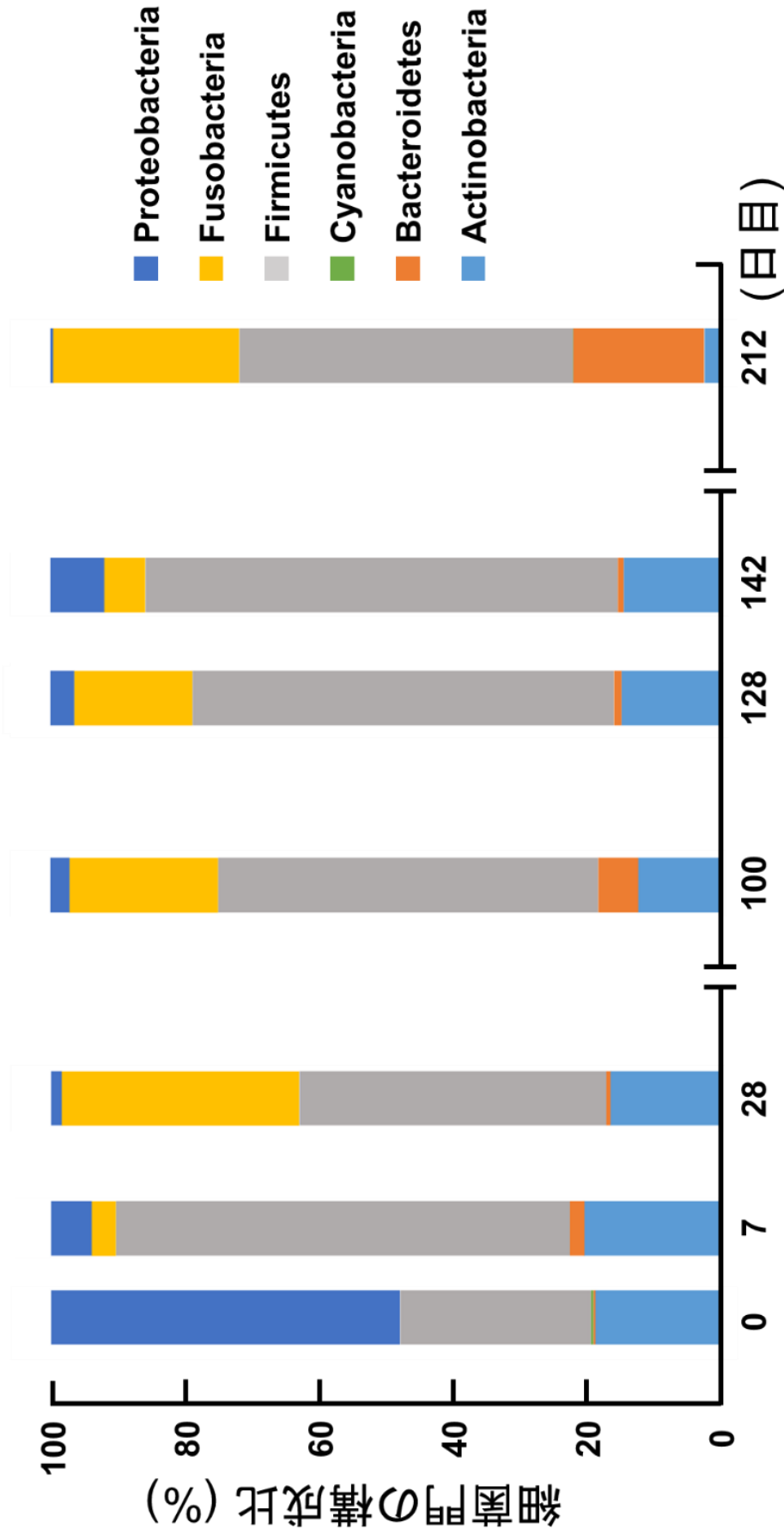


図6 複数回のFMTを実施したsLPE3の細菌門の構成比
sLPE3: 臨床症状を有するLPE犬の症例3

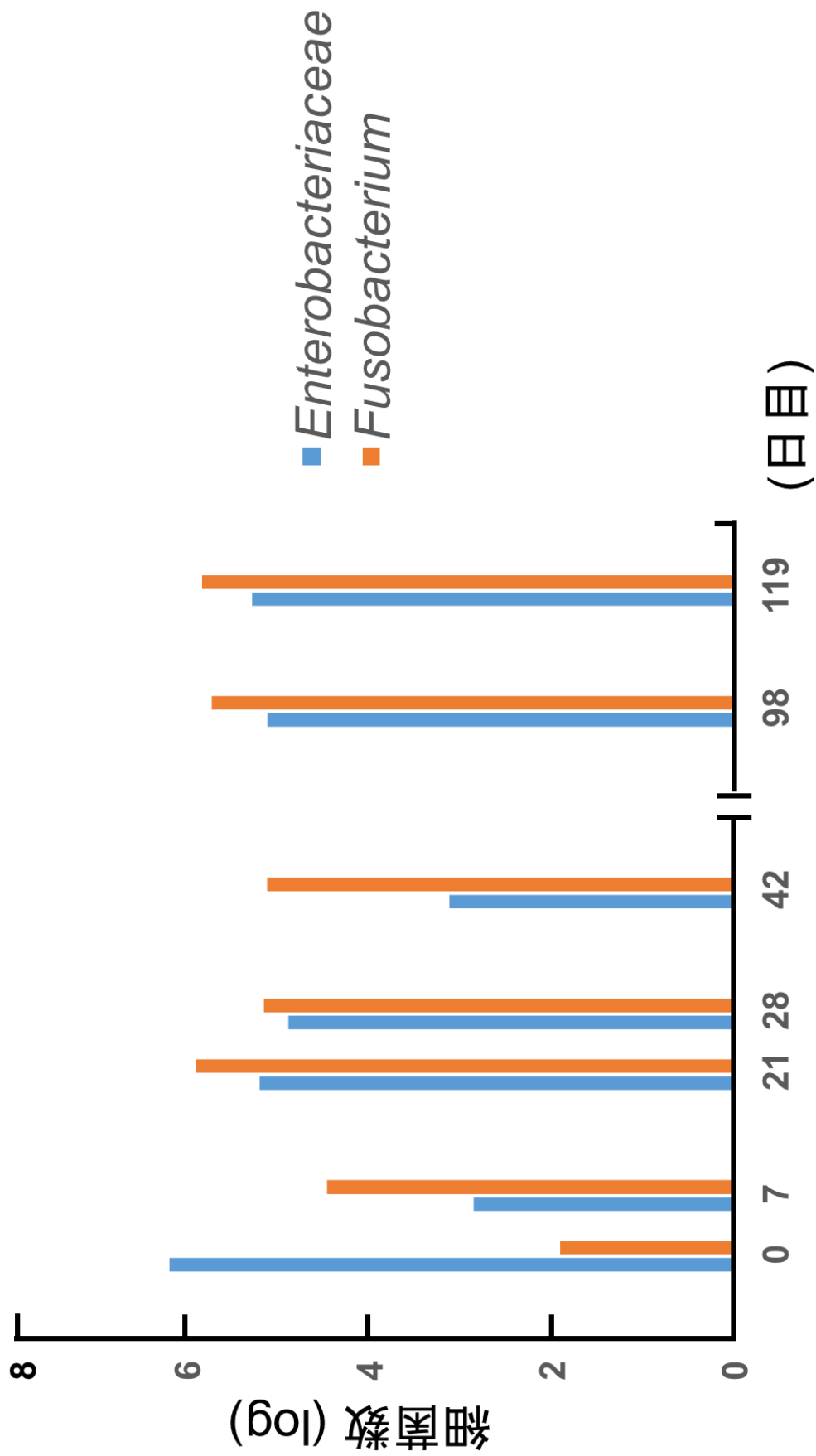


図7 複数回のFMTを実施したsLPE4のEnterobacteriaceae科とFusobacterium属の細菌数
sLPE4: 臨床症状を有するLPE犬の症例4

表1 sLPE群のプロフィール

年齢 (歳)	体重 (kg)	性別	品種
10	3.4	避妊メス	ミニチュア・ダックスフンド
12	5.1	去勢オス	トイ・プードル
12	5.7	去勢オス	キャバリア・キング・チャールズ・スパニエル
12	4.2	去勢オス	トイ・プードル
10	16.0	去勢オス	雑種
7	9.7	避妊メス	ボーダー・コリー
7	10.0	去勢オス	ビーグル
7	5.2	去勢オス	ポメラニアン
8	8.0	避妊メス	ビーグル

表2 aLPE群に対するFMT実施における安全性の評価

	CIBDAI	AST (IU/L)	ALT (IU/L)	ALP (IU/L)	γ-GTP (IU/L)	総ビリルビン (mg/dL)
FMT実施前	0.0±0.0	34.5±3.3	38.8±12.2	168.0±66.7	3.5±2.1	0.4±0.1
21日後	0.0±0.0	34.0±7.8	44.8±23.7	179.5±85.6	5.5±1.3	<0.1
42日後	0.0±0.0	48.0±11.7	51.5±25.1	152.0±54.9	2.3±1.3	0.3±0.1
63日後	0.0±0.0	40.0±7.3	37.5±19.9	152.8±60.0	5.5±1.2	<0.1

第 5 章 総括

本研究の目的は、臨床症状を有する LPE 犬に対する FMT の有用性の確立とし、以下の内容で研究を進めた。

第 2 章では臨床症状を有する LPE 犬の細菌叢の特定を行うことを目的とし、LPE と診断された犬を臨床症状の有無により分類し、それらの腸内細菌叢の多様性や菌種構成の違いを調査した。LPE 犬は、CIBDAI と Waltham Faeces Scoring system を用いて臨床症状を有する LPE 犬 (sLPE) 群と無症候性 LPE 犬 (aLPE) 群に分類した。両群の糞便中細菌叢の比較は、16S rRNA シークエンス解析により行った。sLPE 群の α 多様性は、aLPE 群と比較して有意に低下していた。また、それぞれの群内の β 多様性は類似したが、両群間の β 多様性は異なっていた。sLPE 群の Proteobacteria 門の占有率は、aLPE 群よりも有意に高値であった。一方、Fusobacteria 門の占有率は aLPE 群よりも有意に低値であり、Firmicutes 門と Bacteroidetes 門は有意ではないものの低値であった。これらの細菌の占有率の違いによって、sLPE 群は dysbiosis の状態にあると判定された。そして、その状態が臨床症状に関連していることが示唆された。

第 3 章では犬の消化管における腸内細菌の働きを検討するために、犬の腸内細菌叢において優勢である細菌とその代謝産物である SCFA の関係を調査した。第 2 章で臨床症状を有する LPE 犬は、dysbiosis の状態であり、健常犬の細菌叢で優勢菌門である Fusobacteria 門の占有率が有意に低下し、Firmicutes 門や Bacteroidetes 門も有意ではないものの低下したことが明らかとなった。そのため、これらの菌種が SCFA 産生に影響することで臨床症状を有する LPE 犬では、腸管免疫機構に関与する SCFA 濃度が低下していると仮定した。単回帰分析により無症候性 LPE 犬の酢酸濃度の上昇に対する細菌の影響力は、*Bacteroides* 属、*Fusobacterium* 属、*Ruminococcaceae* 科そして *C. coccoides* group の順であることが明らかとなった。さらに、プロピオン酸濃度の上昇には、*Bacteroides* 属と *Fusobacterium* 属がその順に影響することも明らかとなった。これらのことから、特に *Bacteroides* 属と *Fusobacterium* 属の細菌数の増加により酢酸とプロピオン酸の濃度を上昇させることで、腸

内の免疫機構の修復が期待できることが示唆された。そして、臨床症状を有する LPE 犬における腸管内の SCFA 濃度を上昇させるためには、SCFA 産生に特異性の高い *Bacteroides* 属や *Fusobacterium* 属などの細菌種を与える必要があることが明らかとなった。

第 4 章では、第 3 章で明らかとなった腸管免疫機構の修復に関与する SCFA の産生に影響を与えるような細菌種を FMT によって補充できることを期待し、臨床症状を有する LPE 犬に対して FMT の臨床応用を行った。そのために、先ず犬に対する FMT の安全性を調査するために無症候性 LPE 犬に対して FMT を実施し、臨床的な副作用の発現を調べた。次に、臨床症状を有する LPE 犬に対する FMT の有用性を検討するために、FMT 前後の臨床症状、糞便中細菌叢の多様性、菌種構成および細菌数の変化を調査した。

浣腸法による FMT の臨床的な安全性と有効性について評価するために、aLPE 群に対して FMT を 21 日間隔で 4 回実施した。臨床的な安全性は、活動性、食欲、嘔吐の頻度、糞便性状、排便の頻度、体重そして肝臓に関する血液化学検査で評価した。その結果、FMT 後の安全性に異常は認めなかった。これらのことから、今回用いた無麻酔下での浣腸法による FMT は、4 回あるいは 84 日以内であれば安全に実施可能な方法であることが確認できた。

FMT の有効性は薬剤治療に難反応性を示した sLPE 群に対して FMT を実施し、FMT 前後の臨床症状、細菌門の構成比ならびに細菌数で評価した。臨床症状は、FMT 実施前後の CIBDAI と Waltham Faeces Scoring System の指標の数値が FMT 後には有意に減少し、下痢、排便と嘔吐の頻度、体重減少などの臨床症状における明らかな改善を認めた。さらに、FMT 後には抗菌薬やコルチコステロイド薬の治療が不要となった。

今回用いたドナー群の細菌叢の菌種占有率は、Bacteroidetes 門、Firmicutes 門そして Fusobacteria 門が優勢であり、この占有率と FMT 実施後の sLPE 群の細菌門の占有率が類似していたことから、LPE 犬に対する FMT は dysbiosis を修復する作用により治療効果を発揮する可能性が示唆された。sLPE 群 9 頭における *Enterobacteriaceae* 科の細菌数は、

FMT 後に有意に低値となり、*Fusobacterium* 属の細菌数は FMT 後に有意に高値となった。sLPE 犬の細菌叢は、Proteobacteria 門の占有率が増加し、特にそのうちの多くを占有した *Enterobacteriaceae* 科の細菌数が増加した。一方、Fusobacteria の細菌門の占有率は低下し、そのうち 100% を占有する *Fusobacterium* 属の細菌数は低下した。これらは臨床症状を有する LPE 犬において特徴的な細菌学的変化であることが示唆された。

以上のことから LPE の犬は dysbiosis の状態であり、この状態が消化器症状を中心とした臨床状態に関与する可能性が示唆される。この dysbiosis を改善させるためには、Bacteroidetes 門、Firmicutes 門および Fusobacteria 門を多く含む糞便移植液を用いることが重要であると考えられる。また、今回 FMT を実施した臨床症状を有する LPE 犬は、薬剤治療に対して難反応性であったことから、FMT は臨床症状を有する LPE 犬に対する治療法として、薬剤治療よりも副作用が少なく安全かつ有効的な治療方法である可能性が示唆された。

謝辭

本研究の終始にわたり多大なる御指導と御助言を賜りました日本獣医生命科学大学獣医内科学研究室小山秀一教授に心から感謝いたします。

本研究に対し、多大なるご指導とご助言を賜りました、日本獣医生命科学大学獣医内科学研究室、松本浩毅准教授、手嶋隆洋准教授ならびに鈴木亮平助教に心から感謝いたします。

本研究における解析結果を通じ数多くの議論をさせていただき、さらに実験手技や研究の醍醐味について熱意をもって教えて頂いた、日本獣医生命科学大学獣医微生物学研究室、片岡康准教授、木邊量子講師に心から感謝いたします。

本研究における実験および膨大なるデータの解析に対し、統計学の醍醐味について熱意をもって教えて頂いた、日本獣医生命科学大学野生動物学研究室、田中亜紀講師に心から感謝いたします。

本研究における実験に対し、多大なるご協力とご支援を頂きました、日本獣医生命科学大学獣医内科学研究室および日本獣医生命科学大学獣医微生物学研究室の卒業生および室員各位に心から感謝いたします。

本研究を行うに際し、社会人大学院生という立場を理解し、応援していただいた勤務先の日本小動物医療センターならびに彩の森動物病院のスタッフの皆様に心から感謝いたします。

また、大学院進学を理解し、経済的および精神的の両面において長きにわたり応援していただいた私の両親、父道春、母優子に心から感謝いたします。

最後になりましたが、本研究の供試動物および本研究にご協力いただいた多くの動物たちに心から感謝すると共に、将来このような研究成果によって多くの動物たちが救われることを願います。

参考文献

- [1] J. R. Kelsen and G. D. Wu, “The gut microbiota, environment and diseases of modern society,” *Gut Microbes*, vol. 3, no. 4. Landes Bioscience, p. 374, 2012, doi: 10.4161/gmic.21333.
- [2] P. C. Barko, M. A. Mcmichael, K. S. Swanson, and D. A. Williams, “The Gastrointestinal Microbiome: A Review,” 2017, doi: 10.1111/jvim.14875.
- [3] S. Altveş, H. K. Yildiz, and H. C. Vural, “Interaction of the microbiota with the human body in health and diseases,” *Biosci. Microbiota, Food Heal.*, vol. 39, no. 2, pp. 23–32, 2020, doi: 10.12938/BMFH.19-023.
- [4] F. Sanger, S. Nicklen, and A. R. Coulson, “DNA sequencing with chain-terminating inhibitors.,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 74, no. 12, pp. 5463–5467, 1977, doi: 10.1073/pnas.74.12.5463.
- [5] F. Sanger, “Determination of nucleotide sequences in DNA,” *Science (80-.)*, vol. 214, no. 4526, pp. 1205–1210, Dec. 1981, doi: 10.1126/science.7302589.
- [6] S. Mukherjee, N. Joardar, S. Sengupta, and S. P. Sinha Babu, “Gut microbes as future therapeutics in treating inflammatory and infectious diseases: Lessons from recent findings,” *Journal of Nutritional Biochemistry*, vol. 61. Elsevier Inc., pp. 111–128, Nov. 01, 2018, doi: 10.1016/j.jnutbio.2018.07.010.
- [7] G. T. Macfarlane and S. Macfarlane, “Human colonic microbiota: Ecology, physiology and metabolic potential of intestinal bacteria,” *Scandinavian Journal of Gastroenterology, Supplement*, vol. 32, no. 222. Taylor & Francis, pp. 3–9, 1997, doi: 10.1080/00365521.1997.11720708.
- [8] J. H. Cummings, E. W. Pomare, H. W. J. Branch, C. P. E. Naylor, and G. T. MacFarlane, “Short chain fatty acids in human large intestine, portal, hepatic and venous blood,” *Gut*, vol. 28, no. 10, pp. 1221–1227, 1987, doi: 10.1136/gut.28.10.1221.
- [9] P. Louis and H. J. Flint, “Formation of propionate and butyrate by the human colonic microbiota,” *Environmental Microbiology*, vol. 19, no. 1. Blackwell Publishing Ltd, pp. 29–41, Jan. 01, 2017, doi: 10.1111/1462-2920.13589.
- [10] J. He *et al.*, “Short-chain fatty acids and their association with signalling pathways in inflammation, glucose and lipid metabolism,” *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 21, no. 17. MDPI AG, pp. 1–16, Sep. 01, 2020, doi: 10.3390/ijms21176356.
- [11] E. N. Bergman, “Energy contributions of volatile fatty acids from the gastrointestinal tract in

- various species,” *Physiological Reviews*, vol. 70, no. 2. *Physiol Rev*, pp. 567–590, 1990, doi: 10.1152/physrev.1990.70.2.567.
- [12] L. Ruiz-Aceituno, M. Esteban-Torres, K. James, F. J. Moreno, and D. van Sinderen, “Metabolism of biosynthetic oligosaccharides by human-derived *Bifidobacterium breve* UCC2003 and *Bifidobacterium longum* NCIMB 8809,” *Int. J. Food Microbiol.*, vol. 316, p. 108476, Mar. 2020, doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2019.108476.
- [13] H. Horiuchi *et al.*, “*Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* GCL2505 modulates host energy metabolism via the short-chain fatty acid receptor GPR43,” *Sci. Rep.*, vol. 10, no. 1, pp. 1–8, Dec. 2020, doi: 10.1038/s41598-020-60984-6.
- [14] M. K. AlShawaqfeh *et al.*, “A dysbiosis index to assess microbial changes in fecal samples of dogs with chronic inflammatory enteropathy,” *FEMS Microbiol. Ecol.*, vol. 93, no. 11, p. 136, Nov. 2017, doi: 10.1093/femsec/fix136.
- [15] R. C. Windsor, L. R. Johnson, E. J. Herrgesell, and H. E. V. De Cock, “Idiopathic lymphoplasmacytic rhinitis in dogs: 37 Cases (1997-2002),” *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, vol. 224, no. 12, pp. 1952–1957, Jun. 2004, doi: 10.2460/javma.2004.224.1952.
- [16] R. Lobetti, “Idiopathic lymphoplasmacytic rhinitis in 33 dogs,” *J. S. Afr. Vet. Assoc.*, vol. 85, no. 1, 2014, doi: 10.4102/jsava.v85i1.1151.
- [17] K. Ohno, “Differential Diagnosis of Inflammatory Bowel Disease (IBD) and Gastrointestinal Lymphoma : Procedure of Clinical Diagnosis.”
- [18] A. E. Jergens, “Inflammatory bowel disease in veterinary medicine,” *Front. Biosci.*, vol. E4, no. 1, p. 1404, 2012, doi: 10.2741/470.
- [19] G. Rossi *et al.*, “Comparison of microbiological, histological, and immunomodulatory parameters in response to treatment with either combination therapy with prednisone and metronidazole or probiotic VSL#3 strains in dogs with idiopathic inflammatory bowel disease,” *PLoS One*, vol. 9, no. 4, Apr. 2014, doi: 10.1371/journal.pone.0094699.
- [20] C. R. Kelly *et al.*, “Update on Fecal Microbiota Transplantation 2015: Indications, Methodologies, Mechanisms, and Outlook,” *Gastroenterology*, vol. 149, no. 1, pp. 223–237, Jul. 2015, doi: 10.1053/j.gastro.2015.05.008.
- [21] M. C. Niederwerder, “Fecal microbiota transplantation as a tool to treat and reduce susceptibility to disease in animals,” 2018, doi: 10.1016/j.vetimm.2018.11.002.

- [22] L. P. Smits, K. E. C. Bouter, W. M. De Vos, T. J. Borody, and M. Nieuwdorp, “Therapeutic potential of fecal microbiota transplantation,” *Gastroenterology*, vol. 145, no. 5. W.B. Saunders, pp. 946–953, Nov. 01, 2013, doi: 10.1053/j.gastro.2013.08.058.
- [23] N. G. Rossen *et al.*, “Fecal microbiota transplantation as novel therapy in gastroenterology: A systematic review,” *World J. Gastroenterol.*, vol. 21, no. 17, pp. 5359–5371, 2015, doi: 10.3748/wjg.v21.i17.5359.
- [24] K. Sugita *et al.*, “Oral faecal microbiota transplantation for the treatment of Clostridium difficile-associated diarrhoea in a dog: a case report,” doi: 10.1186/s12917-018-1754-z.
- [25] J. Chaitman *et al.*, “Fecal Microbial and Metabolic Profiles in Dogs With Acute Diarrhea Receiving Either Fecal Microbiota Transplantation or Oral Metronidazole,” *Front. Vet. Sci.*, vol. 7, Apr. 2020, doi: 10.3389/fvets.2020.00192.
- [26] E. W. Alm, D. B. Oerther, N. Larsen, D. A. Stahl, and L. Raskin, “The oligonucleotide probe database,” *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 62, no. 10. American Society for Microbiology, pp. 3557–3559, 1996, doi: 10.1128/aem.62.10.3557-3559.1996.
- [27] D. Zheng, E. W. Alm, D. A. Stahl, and L. Raskin, “Characterization of universal small-subunit rRNA hybridization probes for quantitative molecular microbial ecology studies,” *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 62, no. 12, pp. 4504–4513, 1996, doi: 10.1128/aem.62.12.4504-4513.1996.
- [28] J. Doré, A. Schir, G. Hannequart-Gramet, G. Corthier, and P. Pochart, “Design and evaluation of a 16S rRNA-Targeted oligonucleotide probe for specific detection and quantitation of human faecal Bacteroides populations,” *Syst. Appl. Microbiol.*, vol. 21, no. 1, pp. 65–71, 1998, doi: 10.1016/S0723-2020(98)80009-X.
- [29] P. G. Xenoulis, B. Palculict, K. Allenspach, J. M. Steiner, A. M. Van House, and J. S. Suchodolski, “Molecular-phylogenetic characterization of microbial communities imbalances in the small intestine of dogs with inflammatory bowel disease,” *FEMS Microbiol. Ecol.*, vol. 66, no. 3, pp. 579–589, Dec. 2008, doi: 10.1111/j.1574-6941.2008.00556.x.
- [30] K. Allenspach *et al.*, “Evaluation of mucosal bacteria and histopathology, clinical disease activity and expression of Toll-like receptors in German shepherd dogs with chronic enteropathies,” *Vet. Microbiol.*, vol. 146, no. 3–4, pp. 326–335, Dec. 2010, doi: 10.1016/j.vetmic.2010.05.025.
- [31] J. S. Suchodolski, P. G. Xenoulis, C. G. Paddock, J. M. Steiner, and A. E. Jergens, “Molecular analysis of the bacterial microbiota in duodenal biopsies from dogs with idiopathic inflammatory

- bowel disease,” *Vet. Microbiol.*, vol. 142, no. 3–4, pp. 394–400, May 2010, doi: 10.1016/j.vetmic.2009.11.002.
- [32] J. S. Suchodolski, S. E. Dowd, V. Wilke, J. M. Steiner, and A. E. Jergens, “16S rRNA gene pyrosequencing reveals bacterial dysbiosis in the Duodenum of dogs with idiopathic inflammatory bowel disease,” *PLoS One*, vol. 7, no. 6, Jun. 2012, doi: 10.1371/journal.pone.0039333.
- [33] K. W. Simpson and A. E. Jergens, “Pitfalls and Progress in the Diagnosis and Management of Canine Inflammatory Bowel Disease,” *Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice*, vol. 41, no. 2. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*, pp. 381–398, Mar. 2011, doi: 10.1016/j.cvsm.2011.02.003.
- [34] Y. Minamoto *et al.*, “Alteration of the fecal microbiota and serum metabolite profiles in dogs with idiopathic inflammatory bowel disease,” *Gut Microbes*, vol. 6, no. 1, pp. 33–47, Jan. 2015, doi: 10.1080/19490976.2014.997612.
- [35] A. E. Jergens *et al.*, “A Scoring Index for Disease Activity in Canine Inflammatory Bowel Disease,” *J. Vet. Intern. Med.*, vol. 17, no. 3, pp. 291–297, May 2003, doi: 10.1111/j.1939-1676.2003.tb02450.x.
- [36] J. S. Suchodolski *et al.*, “The Fecal Microbiome in Dogs with Acute Diarrhea and Idiopathic Inflammatory Bowel Disease,” *PLoS One*, vol. 7, no. 12, Dec. 2012, doi: 10.1371/journal.pone.0051907.
- [37] E. Navarro, G. Serrano-Heras, M. J. Castaño, and J. Solera, “Real-time PCR detection chemistry,” *Clinica Chimica Acta*, vol. 439. Elsevier, pp. 231–250, Jan. 15, 2015, doi: 10.1016/j.cca.2014.10.017.
- [38] “Nonparametric Estimation of the Number of Classes in a Population on JSTOR.” <https://www.jstor.org/stable/4615964?seq=1> (accessed Dec. 27, 2020).
- [39] C. E. Shannon, “A Mathematical Theory of Communication.”
- [40] N. Segata *et al.*, “Metagenomic biomarker discovery and explanation,” *Genome Biol.*, vol. 12, no. 6, p. R60, Jun. 2011, doi: 10.1186/gb-2011-12-6-r60.
- [41] K. Laitinen and K. Morkkala, “Overall dietary quality relates to gut microbiota diversity and abundance,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 20, no. 8, Apr. 2019, doi: 10.3390/ijms20081835.
- [42] “Multidimensional Scaling - Joseph B. Kruskal, Myron Wish - Google ブックス.”

- https://books.google.co.jp/books/about/Multidimensional_Scaling.html?id=2y2bxAEACAAJ&redir_esc=y (accessed Dec. 27, 2020).
- [43] C. D. Packey and R. B. Sartor, “Commensal bacteria, traditional and opportunistic pathogens, dysbiosis and bacterial killing in inflammatory bowel diseases,” *Current Opinion in Infectious Diseases*, vol. 22, no. 3. NIH Public Access, pp. 292–301, Jun. 2009, doi: 10.1097/QCO.0b013e32832a8a5d.
- [44] I. S. Middelbos, B. M. Vester Boler, A. Qu, B. A. White, K. S. Swanson, and G. C. Fahey, “Phylogenetic Characterization of Fecal Microbial Communities of Dogs Fed Diets with or without Supplemental Dietary Fiber Using 454 Pyrosequencing,” doi: 10.1371/journal.pone.0009768.
- [45] P. Hugenholtz, B. M. Goebel, and N. R. Pace, “Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity,” *Journal of Bacteriology*, vol. 180, no. 18. American Society for Microbiology, pp. 4765–4774, 1998, doi: 10.1128/jb.180.18.4765-4774.1998.
- [46] A. R. Weingarden *et al.*, “Microbiota transplantation restores normal fecal bile acid composition in recurrent *Clostridium difficile* infection,” *Am. J. Physiol. - Gastrointest. Liver Physiol.*, vol. 306, no. 4, p. G310, Feb. 2014, doi: 10.1152/ajpgi.00282.2013.
- [47] T. J. De Wolfe *et al.*, “Oral probiotic combination of lactobacillus and bifidobacterium alters the gastrointestinal microbiota during antibiotic treatment for clostridium difficile infection,” *PLoS One*, vol. 13, no. 9, Sep. 2018, doi: 10.1371/journal.pone.0204253.
- [48] C. M. Bassis, C. M. Theriot, and V. B. Young, “Alteration of the Murine Gastrointestinal Microbiota by Tigecycline Leads to Increased Susceptibility to *Clostridium difficile* Infection,” 2014, doi: 10.1128/AAC.02262-13.
- [49] P. Damborg, A. H. Sørensen, and L. Guardabassi, “Monitoring of antimicrobial resistance in healthy dogs: First report of canine ampicillin-resistant *Enterococcus faecium* clonal complex 17,” *Vet. Microbiol.*, vol. 132, no. 1–2, pp. 190–196, Nov. 2008, doi: 10.1016/j.vetmic.2008.04.026.
- [50] M. Usami *et al.*, “Butyrate and trichostatin A attenuate nuclear factor κ B activation and tumor necrosis factor α secretion and increase prostaglandin E2 secretion in human peripheral blood mononuclear cells,” *Nutr. Res.*, vol. 28, no. 5, pp. 321–328, May 2008, doi:

10.1016/j.nutres.2008.02.012.

- [51] P. M. Smith *et al.*, “The microbial metabolites, short-chain fatty acids, regulate colonic T reg cell homeostasis,” *Science* (80-.), vol. 341, no. 6145, pp. 569–573, 2013, doi: 10.1126/science.1241165.
- [52] J. S. Suchodolski *et al.*, “The effect of the macrolide antibiotic tylosin on microbial diversity in the canine small intestine as demonstrated by massive parallel 16S rRNA gene sequencing,” *BMC Microbiol.*, vol. 9, p. 210, 2009, doi: 10.1186/1471-2180-9-210.
- [53] J. S. Weese and M. E. C. Anderson, “Preliminary evaluation of *Lactobacillus rhamnosus* strain GG, a potential probiotic in dogs,” *Can. Vet. J.*, vol. 43, no. 10, pp. 771–774, Oct. 2002, Accessed: Dec. 03, 2020. [Online]. Available: /pmc/articles/PMC339608/?report=abstract.
- [54] I. S. Middelbos, B. M. Vester Boler, A. Qu, B. A. White, K. S. Swanson, and G. C. Fahey, “Phylogenetic Characterization of Fecal Microbial Communities of Dogs Fed Diets with or without Supplemental Dietary Fiber Using 454 Pyrosequencing,” doi: 10.1371/journal.pone.0009768.
- [55] H. J. M. Harmsen, G. C. Raangs, T. He, J. E. Degener, and G. W. Welling, “Extensive set of 16S rRNA-based probes for detection of bacteria in human feces,” *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 68, no. 6, pp. 2982–2990, Jun. 2002, doi: 10.1128/AEM.68.6.2982-2990.2002.
- [56] I. Hang *et al.*, “Impact of diets with a high content of greaves-meal protein or carbohydrates on faecal characteristics, volatile fatty acids and faecal calprotectin concentrations in healthy dogs,” *BMC Vet. Res.*, vol. 9, p. 201, Oct. 2013, doi: 10.1186/1746-6148-9-201.
- [57] D. G. Altman, S. M. Gore, M. J. Gardner, and S. J. Pocock, “Statistical guidelines for contributors to medical journals,” 1983.
- [58] H.-E. Park, Y. J. Kim, K.-H. Do, J. K. Kim, J.-S. Ham, and W.-K. Lee, “Effects of Queso Blanco Cheese Containing *Bifidobacterium longum* KACC 91563 on the Intestinal Microbiota and Short Chain Fatty Acid in Healthy Companion Dogs,” *Korean J. food Sci. Anim. Resour.*, vol. 38, no. 6, pp. 1261–1272, Dec. 2018, doi: 10.5851/kosfa.2018.e62.
- [59] A. N. Thorburn *et al.*, “Evidence that asthma is a developmental origin disease influenced by maternal diet and bacterial metabolites,” *Nat. Commun.*, vol. 6, no. 1, pp. 1–13, Jun. 2015, doi: 10.1038/ncomms8320.
- [60] L. Macia *et al.*, “Metabolite-sensing receptors GPR43 and GPR109A facilitate dietary fibre-

- induced gut homeostasis through regulation of the inflammasome,” *Nat. Commun.*, vol. 6, no. 1, pp. 1–15, Apr. 2015, doi: 10.1038/ncomms7734.
- [61] M. A. R. Vinolo, H. G. Rodrigues, E. Hatanaka, F. T. Sato, S. C. Sampaio, and R. Curi, “Suppressive effect of short-chain fatty acids on production of proinflammatory mediators by neutrophils,” *J. Nutr. Biochem.*, vol. 22, no. 9, pp. 849–855, Sep. 2011, doi: 10.1016/j.jnutbio.2010.07.009.
- [62] P. Lepage *et al.*, “Twin study indicates loss of interaction between microbiota and mucosa of patients with ulcerative colitis,” *Gastroenterology*, vol. 141, no. 1, pp. 227–236, Jul. 2011, doi: 10.1053/j.gastro.2011.04.011.
- [63] D. Gevers *et al.*, “The treatment-naive microbiome in new-onset Crohn’s disease,” *Cell Host Microbe*, vol. 15, no. 3, pp. 382–392, Mar. 2014, doi: 10.1016/j.chom.2014.02.005.
- [64] J. F. Garcia-Mazcorro *et al.*, “Commentary on key aspects of fecal microbiota transplantation in small animal practice,” *Vet. Med. Res. Reports*, vol. 7, p. 71, May 2016, doi: 10.2147/vmrr.s105238.
- [65] J. Suez *et al.*, “Post-Antibiotic Gut Mucosal Microbiome Reconstitution Is Impaired by Probiotics and Improved by Autologous FMT,” *Cell*, vol. 174, no. 6, pp. 1406–1423.e16, Sep. 2018, doi: 10.1016/j.cell.2018.08.047.
- [66] C. R. Kelly *et al.*, “Fecal microbiota transplant for treatment of clostridium difficile infection in immunocompromised patients,” *Am. J. Gastroenterol.*, vol. 109, no. 7, pp. 1065–1071, 2014, doi: 10.1038/ajg.2014.133.
- [67] H. K. Herstad, B. B. Nesheim, T. L’Abée-Lund, S. Larsen, and E. Skancke, “Effects of a probiotic intervention in acute canine gastroenteritis - A controlled clinical trial,” *J. Small Anim. Pract.*, vol. 51, no. 1, pp. 34–38, Jan. 2010, doi: 10.1111/j.1748-5827.2009.00853.x.
- [68] Y. Minamoto, N. Dhanani, M. E. Markel, J. M. Steiner, and J. S. Suchodolski, “Prevalence of *Clostridium perfringens*, *Clostridium perfringens* enterotoxin and dysbiosis in fecal samples of dogs with diarrhea,” *Vet. Microbiol.*, vol. 174, no. 3–4, pp. 463–473, 2014, doi: 10.1016/j.vetmic.2014.10.005.