

犬のリンパ球形質細胞性腸炎 (LPE) は、炎症性腸疾患を含む慢性腸疾患の十二指腸の病理検査において典型的な組織診断である。消化器症状を中心とした臨床症状を有する LPE 犬の治療は食事療法、抗菌薬、コルチコステロイド剤ならびに免疫抑制剤が頻用される。しかし、それらの治療に抵抗性を示す LPE も多く存在するため、治療法の確立が急務となっている。

医療では、異常な腸内細菌叢の状態 (dysbiosis) にある疾患に対して腸内細菌叢の正常化に主眼を置いた治療方法として健常な糞便から作製される糞便移植液を患者の腸管内に直接注入する糞便微生物移植 (FMT) が利用され始めている。臨床症状を有する LPE 犬においても dysbiosis が発現することから、FMT はこの疾患に対する治療方法として期待できると考えられた。

そこで本研究は、2 章で臨床症状を有する LPE 犬の細菌叢の特定を目的とし、臨床症状の有無により分類した LPE 犬の細菌叢の調査を行った。ついで、3 章では腸内細菌とその代謝産物である短鎖脂肪酸 (SCFA) の関係を調査した。4 章では、FMT により SCFA の産生に特異的な腸内細菌を補充することが可能であると考え、臨床症状を有する LPE 犬に対して臨床応用を行い、FMT の有用性について検討した。

2 章 臨床症状を有する LPE 犬の糞便中細菌叢の特定

臨床症状の分類は、犬炎症性腸疾患活動指標 (CIBDAI) と Waltham Faeces Scoring system を用いて行った。臨床症状を有する LPE 犬 (sLPE) 群の CIBDAI は 13.5 ± 1.4 であり、無症候性 LPE (aLPE) は 0.0 ± 0.0 であった。sLPE 群の Waltham Faeces Scoring system は 5.0 ± 0.0 で、aLPE 群は 2.0 ± 0.0 であった。sLPE 群の CIBDAI と Waltham Faeces Scoring system は、aLPE 群と比較して有意に高値であった (それぞれ $p < 0.01$)。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 群における細菌叢の α 多様性は、aLPE 群と比較して有意に低下していた ($p < 0.03$)。また、細菌叢の β

多様性を求めるための UniFrac 距離は、両群間の距離が aLPE 群内の距離よりも有意に離れていた ($p < 0.01$)。このことから細菌叢の β 多様性は、両群内では類似し、両群間では異なる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 ($p < 0.01$)。一方、sLPE 群の Fusobacteria 門の占有率は aLPE 群よりも有意に低値 ($p < 0.01$) であり、Firmicutes 門と Bacteroidetes 門は有意ではないものの低い傾向にあった。これらの細菌学的変化は、臨床症状を有する LPE 犬に特徴的な細菌叢であり、そのため sLPE 群は dysbiosis の状態であると考えられた。さらに、この dysbiosis の状態は臨床症状に関与することが示唆された。

3 章 無症候性 LPE 犬における糞便中細菌叢と短鎖脂肪酸濃度の関係に関する検討

短鎖脂肪酸 (SCFA) は腸内細菌の嫌気性発酵によって生じ、腸管免疫機構の修復に関与すると考えられている。さらに、dysbiosis が発現する疾患では SCFA 濃度が低下していることから、臨床症状を有する LPE 犬では SCFA 濃度の低下による腸管免疫機構の破綻が生じる可能性が考えられた。特に、第 2 章で臨床症状を有する LPE 犬では Fusobacteria 門の占有率が有意に低下していたことから、健常犬で優勢菌門であるこれらの細菌数が増動することによって SCFA 濃度の増減に影響を与えると仮定した。そこで、無症候性の LPE 犬に対してプロバイオティクスを給与することで人為的に細菌叢を変動させ、細菌数と SCFA 濃度の変動の関係について解析を行った。細菌数と SCFA 濃度は、それぞれ定量 PCR 法とガスクロマトグラフィー法によって測定した。酢酸濃度の上昇に対する細菌の影響力は、*Bacteroides* 属 (係数推定値 2.46、 $p < 0.01$)、*Fusobacterium* 属 (係数推定値 2.28、 $p < 0.01$)、*Ruminococcaceae* 科 (係数推定値 2.07、 $p = 0.04$) そして *C. coccoides* group (係数推定値 1.42、 $p < 0.01$) 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 (係数推定値 0.97、 $p < 0.01$) と *Fusobacterium* 属 (係数推定値 0.79、 $p < 0.01$) 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。さらに、第2章で臨床症状を有する LPE 犬では Fusobacteria 門の占有率が有意に低下することが明らかとなったため、臨床症状を有する LPE の腸管内の 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* 属の細菌を補充させる必要があると考えられた。

4章 臨床症状を有する LPE 犬における FMT の臨床応用

臨床症状を有する LPE 犬では Fusobacteria 門の占有率が有意に低下しており、Bacteroidetes 門も低下傾向にあることが2章で明らかとなった。さらに、3章で酢酸とプロピオン酸の産生には *Fusobacterium* 属と *Bacteroides* 属が特異性の高い菌種であることが明らかとなり、臨床症状を有する LPE 犬において dysbiosis を改善させ、腸内の免疫機構の修復に関係が深い SCFA を効率よく産生させるためには、特に *Fusobacterium* 属と *Bacteroides* 属の細菌の補充が重要と考えられた。FMT によってこれらの細菌を補充することが期待できると考えられたため、薬剤治療に抵抗性を示す臨床症状を有する LPE 犬に対して FMT の臨床応用を実施した。まず、浣腸法による FMT の臨床的な安全性について評価するために、4頭の無症候性 LPE 犬に対して FMT を 21 日間隔で 4 回実施した。臨床的な安全性は、CIBDAI と血液化学検査で評価した。その結果、FMT 実施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 日以内であれば臨床的ならびに肝臓の障害や機能に悪影響を及ぼすことなく実施可能な方法であることが確認できた。

次に、FMT の臨床的な有効性について評価するために、9 頭の臨床症状を有する LPE 犬 (sLPE) 群に対して FMT を行い臨床症状の変化を調査した。FMT 実施前後の CIBDAI は、 11.2 ± 1.5 から 3.8 ± 1.5 へと有意に低下した ($p < 0.05$)。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 ($p < 0.05$)。これらの数値から sLPE 群の臨床症状は、FMT 実施後には有意に減少し、特に慢性下痢や嘔吐ならびに体重減少などの明らかな改善を認めた。さらに、全症例に対して FMT 実施当日より抗菌薬やコルチコステロイド薬などを休薬したが、FMT 実施後はそれらの薬剤治療が不要となった。

細菌叢の多様性と菌種構成は、sLPE 犬 9 頭のうち 2 頭とドナー犬 5 頭のうち 2 頭の糞便を用いて 16S rRNA シークエンス解析によって行った。FMT 実施前の sLPE 群の α 多様性はドナー群と比較して有意に低下していたが、FMT を実施することにより有意に上昇することが明らかとなった。(それぞれ $p < 0.03$)。 β 多様性において、FMT 実施前の sLPE 群とドナーの細菌叢は異なっていたが、FMT を実施することにより sLPE 群の細菌叢はドナーの細菌叢に類似するようになることが明らかとなった。これらの sLPE 群における細菌叢の多様性の異常から sLPE 群は *dysbiosis* の状態であったと判断した。FMT 実施後の sLPE 群における細菌叢の構成は、ドナーの細菌叢と類似していた。特に sLPE 群の細菌叢は FMT 実施後には、Proteobacteria 門の *Enterobacteriaceae* 科の占有率の減少と Fusobacteria 門の *Fusobacterium* 属の占有率の増加が認められた。そのため、これらの 2 頭の sLPE 犬を含む 9 頭の sLPE 犬に対して、*Enterobacteriaceae* 科と *Fusobacterium* 属の細菌数の測定を定量 PCR 法によって行った。FMT 実施後の sLPE 群において炎症を惹起する一因と考えられた *Enterobacteriaceae* 科の細菌数は有意に減少し ($p < 0.01$)、酢酸やプロピオン酸などの SCFA 産生に関与することが明らかとなった *Fusobacterium* 属の細菌数は有意に増加した ($p < 0.01$)。

sLPE 犬の FMT 後の細菌叢はドナーの細菌叢と類似し、慢性の下痢や嘔吐などの状態から脱した。これらのことから、臨床症状を有する LPE 犬に対する FMT は、安全かつ有効な治療となりうると考えられた。

さらに、sLPE 犬 9 頭のうち 2 頭は複数回の FMT を実施した。複数回の FMT を実施し

た2頭の sLPE 犬のうち1頭は、毎回の FMT 実施直前の糞便を用いて 16Sr RNA シークエンスによって糞便中細菌叢を調査した。この sLPE 犬の細菌叢における 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、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。そして、他方の sLPE 犬は毎回の FMT 直前の糞便を用いて定量 PCR 法により、*Enterobacteriaceae* 科と *Fusobacterium* 属の細菌数を測定した。*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。これらの2頭の sLPE 犬は、基礎データとなる4回あるいは84日を超えて FMT による治療を実施したが、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。複数回の FMT は臨床症状と定期的な血液検査を行いながら、実施間隔を決定することでこの治療の安全性と有効性がさらに高くなると考えられる。

以上のことから臨床症状を有する LPE 犬の糞便中細菌叢は、無症候性 LPE 犬と比較して多様性が低下し、Proteobacteria 門の *Enterobacteriaceae* 科は有意に高い一方で Fusobacteria 門の *Fusobacterium* 属は有意に低いことが明らかとなった。さらに、酢酸とプロピオン酸の産生には、*Fusobacterium* 属と *Bacteroides* 属が特異性の高い菌種であることが明らかとなった。臨床症状を有する LPE 犬において dysbiosis を改善させ、腸内の免疫機構の修復に関係が深い SCFA を効率よく産生させるためには、特に *Fusobacterium* 属と *Bacteroides* 属の細菌の補充が重要と考えられた。これらの細菌を補充するため、薬剤治療に抵抗性を示す臨床症状を有する LPE 犬に対して FMT を実施した結果、炎症を惹起する一因であると考えられた *Enterobacteriaceae* 科の菌数の減少と SCFA 産生に関与する *Fusobacterium* 属の細菌数の増加が認められた。さらにこの FMT 実施後の細菌叢はドナー

の細菌叢と類似し、慢性の下痢や嘔吐などの状態から脱した。これらのことから臨床症状を有する LPE 犬に対する FMT は、安全かつ有効な治療法となりうると考えられた。