

学位論文題名

Different impacts of purified and nonpurified diets on the indigenous *Lactobacillus* flora in mouse stomach

(マウスの胃に常在する乳酸桿菌に精製飼料および非精製飼料が及ぼす異なる影響)

学位論文内容の要旨

There are two predominant types of diet for experimental animals: nonpurified diet and purified diet. The ingredients in nonpurified diet are derived from natural sources, while purified diet is made of refined ingredients. Although purified diet is widely used for nutritional studies, the diet is quite different from the human diet, which contains a wide variety of ingredients. Clearly, purified and nonpurified diets have different impacts on the physiology of animals. For instance, lactobacilli are indigenous to the stomach of rodents, with much lower numbers found in mice fed purified diet than in those fed nonpurified diet. The present study aimed to describe precisely the difference in the indigenous *Lactobacillus* flora of mouse stomach and to elucidate the mechanism behind the difference.

**I. Different impacts of purified and nonpurified diets on the microbiota and Toll-like receptors in mouse stomach**

BALB/c mice were fed either nonpurified diet or purified diet for 2 weeks. Conventional cultivation and cultivation-independent molecular biological analysis based on the 16S rRNA gene sequence revealed that the number of lactobacilli associated with the gastric tissue was significantly higher in mice fed the nonpurified diet than in those fed the purified diet. Sequencing analysis showed that *L. gasseri* and *L. johnsonii* are predominant *Lactobacillus* species associated with the gastric tissue of mice fed the nonpurified diet. In addition, we examined whether the expression of Toll-like receptor (TLR)2, which is involved in the recognition of lactobacilli, is influenced by diet. mRNA levels of TLR2, but not 9, in the gastric tissue were significantly higher in mice fed the purified diet than in those fed the nonpurified diet. We propose that nonpurified and purified diets have different impacts on the gastric microbiota, which

may in turn influence the expression of TLR2 in the stomach.

## **II. Gastric emptying is involved in lactobacilli colonization in the stomach of mice fed purified and nonpurified diets**

We postulated that gastric emptying (GE) is responsible for the different population of lactobacilli, and tested this idea. GE, estimated by measuring the remaining diet in the stomach, was higher in mice fed the purified diet than in those fed the nonpurified diet and correlated negatively with the number of lactobacilli in the stomach. Plasma concentrations of acylated ghrelin, a gastric hormone regulating GE, tended to be higher in mice fed the purified diet than in those fed the nonpurified diet. There was a negative correlation between GE and the number of lactobacilli in mice fed nonpurified diet, purified diet, and purified diet supplemented with insoluble and soluble fiber (beet fiber and carboxymethyl cellulose, respectively). We propose that lower GE contributes, at least in part, to lactobacilli colonization in the stomach of mice fed the nonpurified diet.

In conclusion, we propose that nonpurified and purified diets have different impacts on the gastric microbiota, which may in turn influence the expression of TLR2 in the stomach. We also propose that GE is involved in the different colonization by lactobacilli in the stomach of mice fed these two diets. For 19 years, the AIN-93G purified diet has been used extensively in food science and nutritional studies. It has well served the purpose of both giving proper nutritional values and standardizing many studies. However, the present study prompts us to call for caution in using the purified diet under certain condition.

# 学位論文審査の要旨

主査	教授	川端	潤
副査	教授	横田	篤
副査	准教授	石塚	敏
副査	准教授	園山	慶(生命科学院)
副査	助教	吹谷	智

## 学位論文題名

### Different impacts of purified and nonpurified diets on the indigenous *Lactobacillus* flora in mouse stomach

(マウスの胃に常在する乳酸桿菌に精製飼料および非精製飼料が及ぼす異なる影響)

本論文は総頁数 65 の英語論文で、図 12 および表 7 を含み、5 章で構成されている。別に参考論文 1 編が添えられている。

実験動物を飼育する際に用いられる飼料には、精製されていない（非栄養素を含む）天然の食品素材により構成される非精製飼料と、精製された素材より調製される精製飼料とがある。後者は栄養学研究に広く用いられるが、実際にヒトが摂取する食事とはかけ離れている。これら二種類の飼料が動物の生理に異なる影響を及ぼすことは明白であり、例えば、齧歯類の胃に常在する乳酸桿菌の数は、非精製飼料摂取時に比較して精製飼料摂取時に著しく減少する。本論文は、非精製飼料および精製飼料で飼育したマウスの胃内細菌叢の相違を詳細に解析するとともに、その相違が生じる機序について解析した結果をまとめたものである。

#### 1) マウスの胃に常在する乳酸桿菌および Toll 様受容体に精製飼料および非精製飼料が及ぼす異なる影響

BALB/c マウスを非精製飼料あるいは精製飼料のいずれかで 2 週間飼育した。培養法および 16S rRNA 遺伝子の塩基配列に基づく分子生物学的手法を用いて胃組織に接着している細菌叢を解析した結果、乳酸桿菌の数は精製飼料摂取マウスに比較して非精製飼料摂取マウスで有意に多く、そのうち、*Lactobacillus gasseri* および *L. johnsonii* が優勢であった。また、宿主動物において乳酸桿菌の認識に関わる Toll 様受容体（Toll-like receptor, TLR）2 の発現が飼料によって影響を受けるか否かを調べたところ、胃組織における TLR2 mRNA レベルは非精製飼料摂取マウスに比較して精製飼料摂取マウスで有意に高値を示した。以上の結果より、非精製飼料と精製飼料はマウスの胃内常在細菌叢に異なる影響を及ぼし、そのことが胃組織における TLR2 発現の変化を惹起することが示唆された。

## 2) 非精製飼料および精製飼料を摂取したマウスの胃における乳酸桿菌の定着に胃排出速度が及ぼす影響

非精製飼料および精製飼料を摂取したマウスの胃内常在細菌叢の差異が生じる理由について、胃内容物の排出速度（gastric emptying, GE）の違いが関与するという仮説を立て、それを検証した。GE は、胃内に残存した飼料の乾燥重量を測定することにより求めた。非精製飼料摂取マウスに比較して精製飼料摂取マウスで GE は有意に高値を示し、GE と胃内乳酸桿菌数は負の相関を示した。GE を促進することが知られている消化管ホルモンであるアシル化（活性型）グレリンの血漿中濃度は、非精製飼料摂取マウスに比較して精製飼料摂取マウスで高値を示した。また、消化管内容物の粘度を上昇させる水溶性食物繊維は GE を低下させるので、精製飼料に食物繊維を添加することにより GE が低下して胃内乳酸桿菌数が増加するのではないかと考え、それを確かめた。マウスに非精製飼料、精製飼料、および精製飼料にビート繊維（水溶性繊維と不溶性繊維を含む天然の食物繊維）あるいはカルボキシメチルセルロース（高粘度水溶性繊維）を添加した飼料を摂取させ、胃内乳酸桿菌数と GE を測定した。その結果、繊維の添加により GE は低下したが、胃内乳酸桿菌数は変化しなかった。にもかかわらず、GE と胃内乳酸桿菌数は負の相関を示した。以上の結果より、非精製飼料を摂取したマウスの胃における乳酸桿菌の定着の少なくとも一部に GE が寄与することが示唆された。

結論として、精製飼料は食品科学ならびに栄養学における動物実験に多用されるが、本研究で観察されたように胃に常在する乳酸桿菌の著しい減少およびその結果生じる宿主の生理機能の変化など、必ずしも生理的な状態を反映しない場合があると指摘した。

以上、本研究では、非精製飼料と精製飼料を摂取させたマウスの胃内常在菌叢の相違を詳細に記述するとともに、その相違を生じる機序として胃排出速度に着目して検証し、胃排出速度を調節する消化管ホルモンの関与についても言及するなど、動物実験で用いられる基礎飼料が動物の常在細菌叢および生理機能に及ぼす影響に関する新しい知見を加え、精製飼料を用いることに関して注意を喚起した点で学術上高く評価されるものである。

よって審査員一同は、Yuraporn Sahasakul が博士（農学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認めた。