

イヌ糞便の硬さに寄与する因子の検討

酪農学園大学大学院 獣医学研究科
獣医保健看護学専攻 修士課程

21542001 井上貴裕

(指導:比較動物薬理学研究室 北澤多喜雄 教授)

2016年度

目次

I. 緒論	1
II. 材料と方法	5
1. 材料	
2. 調査方法	
3. 統計的解析	
III. 成績	9
1. BSFS、糞便 pH と水分含有量との関係	
2. 糞便中の細菌数、細菌種と硬度との関係	
3. 糞便硬度の時間的推移と検出菌種との関係	
IV. 考察	21
V. 総括	25
VI. 謝辞	27
VII. 引用文献	28

I. 緒論

糞の硬さの尺度としてヒトではブリストル大便スケール(Bristol Stool Form Scale、以下 BSFS)があり、1～7段階でスコアが高いほど便が柔らかいことを示している。この BSFS は 1990年に糞便の腸内通過時間と糞便硬度の相関を表す形で考案され、ヒトの糞便の形状を把握し数値化するものである[19]。便形状の変化を把握することは多くの消化器症状の診断に役立っており[17]、病因の追及、予防、健康を診断する尺度としても用いられている。この方法は簡便なことから子供でも判断可能な方法であり[3]、非観血的なため臨床以外の場でも用いることができる。

筆者は、この BSFS がイヌに使用できないかと考え便の硬度、水分量と BSFS を測定し BSFS と硬度の間、BSFS と水分量の間に関連があることを示した[15]。しかしながら、BSFS と硬度の間には表面で観察できる硬さと内部の硬さは一致しないこともありばらつきが大きくなる傾向にあった。BSFS と水分量の間には関連性が認められるものの飼養されているイヌの排便はヒトによってコントロールされているという背景(散歩時に戸外で排便)もあり、腸内に糞便が溜まっている時間に依存し水分が吸収され硬さが変わるということも考えられる。さらに、糞便の硬さはその動物のコンディションや食餌、環境条件によっても変化するため、完全にコントロールすることは難しいと考えられている。イヌの糞便の硬さに関してはこれまでに以下のような報告がある。すなわち、タンパク質の消化率が低い場合に軟便になる[8]。高蛋白質グリーブス・ミール(脱脂内臓肉)は下痢を誘発し、高炭水化物澱粉ベースや市販ドライフードと比べ糞便 pH が高くなる[10]。ジャガイモ繊維は糞便中の短鎖脂肪酸(Short Chain Fatty Acid、以下 SCFA)濃度を増加させ糞便の硬さに影響を与える[21]。ドライフードと缶詰フードを与えた場合に缶詰のほうが便は柔らかい[31]。フード中の植物性蛋白質を増加させることにより午前より午後のほうが柔らかい便になるなどである[11]。以上の報告からイ

又糞便の硬さは主に食餌によって変化はするものの、摂餌の時間やイヌの体調によっても影響を受けると考えられる。

糞便の硬さを決定する要因の中に近年注目されているのが腸内細菌である。腸内に存在する細菌は腸内細菌叢を形成し、体内の免疫系の賦活、感染防御や腸蠕動の活性化、消化吸収に関与するなど多岐に渡り宿主に影響をおよぼす[1]。しかし、腸内細菌には宿主にとって有益な効果をもたらす種類が存在する反面、病気の原因に関連するような細菌も含まれている。炎症性腸疾患 (inflammatory bowel disease、以下 IBD) は遺伝的な感受性や腸内毒素症、環境、食事要因の組み合わせが原因となり起こると考えられる慢性炎症性腸疾患である。健康なイヌと比較したところ IBD に罹患したイヌでは細菌の多様性が有意に低かったという報告がある[18]。またヒトにおいてポリエチレングリコールで下痢を誘発させた実験では粘膜上の *Proteobacteria* が有意に増加するという[8]。すなわち、IBD を含む腸疾患は腸内細菌叢と深い関係を持っていることが推察されている。それゆえ、腸疾患の防止には腸内細菌叢をコントロールして有益な腸内細菌を増やし、害をもたらす細菌を増やさないようにすることが必要とされている。プレバイオティクスやプロバイオティクスなどがその一例で、前者はヒトにおける実験で、フルクトオリゴ糖を摂取することにより排便回数が増加すること[25]、後者では有益な菌 (*Bifidobacterium bifidum*、*B. lactis*、*B. longum*、*Lactobacillus acidophilus*、*L. rhamnosus*、および *Streptococcus thermophilus*) をそれぞれカプセルに入れて投与することにより下痢を改善できるという報告がある[29]。このような目的でプレバイオティクスやプロバイオティクスは最近ではヒト以外の動物種にも適用され始めている。プレバイオティクスとプロバイオティクスの二つを合わせてシンバイオティクスとも呼ばれ、フルクトオリゴ糖と有用細菌の同時適用により犬ぞり用のイヌで下痢をする期間が短くなり、糞便の硬さも硬くなったという報告がある[7]。経口的に与えるだけという簡便な方法なので動物にも適用しやすく主に伴侶動物で検討が始まっている。有益とされる腸内細菌として *Lactobacillus* 属や *Bifidobacterium* 属が挙げられ様々な菌種、菌株が見つかっている。例えば *Lactobacillus casei* は小腸でも増殖できるという特徴を持っていること、*Bifidobacterium*

longum は胃酸に耐性で大腸まで生きて届くという機能を持っていることが解っている。また *Lactobacillus casei* は184株中の4株がカタラーゼ様の活性を示し好気性条件下で生存可能であった[32]。このことは、*L. casei* が食品産業用途に応用できる可能性を示している。メロニダゾール、プレドニゾロン投与は *Bacteroides* 科、*Clostridium* 科、*Fusobacteria* 科、*Lachnospira* 科、*Ruminococcus* 科、*Turicibacteria* 科、*Veillonella* 科の細菌を減少させ、*Bifidobacterium* 科、*Enterobacteria* 科、*Enterococcus* 科、*Streptococcus* 科を初期(14日目)に増加させることから、メロニダゾール投与により *Fusobacteria* 科などの病原菌を減らし、*Bifidobacterium* 科のような有益な細菌を増やすことで胃腸管の健康を促進できるかもしれないという報告がある[14]。すなわち、プロバイオティクスなどで腸内細菌叢が変化することにより糞便の硬さが変化して下痢や便秘に罹りにくくなる可能性がある。ジャーマンシェパードから分離された *Bifidobacterium* 属には酸性、胆汁酸塩に耐性が認められ、腸管内で生存が可能であることから、イヌや他の動物のプロバイオティクスとして糞便の硬さに与える影響を検討できるという報告があるが[2]、具体的にどの菌を与えればどのように糞便の硬さをコントロールできるかは現在のところ不明である。

細菌種を同定する方法は様々ある。イヌの腸内細菌叢中で最も優勢な細菌種を DNA の塩基配列で解析するサンガー法で同定すると、*Firmicutes* 門が優勢で全細菌の47.7%を占めることが知られている。一方、454パイロシーケンス法では *Fusobacterium* 門が優勢で23~40%、ショットガンシーケンス法では *Bacteroides* 門で37~38%、次世代シーケンサー法では *Firmicutes* 門で86.3%と報告されており[5,28]、細菌の種類およびその割合ともに測定法により誤差が大きい。また総菌数も小腸で 10^4 CFU/ml以下という報告[12]やそれよりも10から1000倍高いという報告も[13]あり一定の値とはなっていない。このように、細菌叢における腸内細菌の種類、割合については様々な報告があり、分析方法の違い等により一定の値が得られていないのが現状である。このような腸内細菌の分析の基本となるのは16s リボソーム RNA を用いる方法で、細菌の遺伝子を感知するため細菌が生きている必要がなく、試料の扱いに対しても時間や保存方法に縛られないという長所がある。しかし、死菌まで測定す

るため生菌を測定する方法としては適当とは言えない。最近、細菌の同定には MALDI TOF-MS(Matrix Assisted Laser Desorption / Ionization Time of Flight Mass Spectrometer)の結果を Biotyper というソフトウェア(ブルカー・ダルトニクス社)で解析する方法が用いられている。この方法では、培養した細菌をプレートに塗布し細菌特異的タンパク質の分子量を測定することにより細菌同定を可能としている[20]。嫌気性菌に対しても使用可能であり[27]、*Fusobacteria* 科、*Clostridium* 科、*Bacteroides* 科、グラム陽性嫌気性球菌の鑑別が可能となっている。TOF-MS による Biotyper は臨床的に関連する嫌気性細菌の迅速かつ信頼性の高い同定手段であることが示されており[3]、試薬のコストも安くなるうえ誰でも扱えるというメリットもある。

イヌと霊長類の糞便を使い腸内細菌の乳酸菌とビフィズス菌を Biotyper において分析している報告[23]がある。その際、*Lactobacillus* 属を選択する培地に MRS 寒天培地、*Bifidobacterium* 属を選択する培地に TOS プロピオン酸寒天培地が用いられている。MRS 寒天培地はスキムミルクを含有することにより *L. acidophilus* の成長が促進されるなど改変がなされている[22]。また TOS プロピオン酸寒天培地も *Bifidobacterium* 属のムピロシン耐性を確かめるために使われている[24]。このように Biotyper を用いた検討では目的とする細菌を培養する培地の選択も重要なポイントとなっている。

以上のような背景を元に本研究では、イヌの糞便の硬さが、糞便中の細菌すなわち腸内細菌叢により影響を受けるのではないかという仮説をたてた。この仮説を検証するために、糞便の硬さとその pH、水分含量そして糞便中の細菌数とその種類に関連性があるのか、あるとすればどのような関連性があるのかを明らかにすることを目的とした。方法としては獣医保健看護学類のD1棟内で一定の条件で飼養されているイヌから採取した同一の糞便試料において、各パラメーター(硬度、pH、水分量、普通寒天培地、MacConkey 寒天培地、MRS 寒天培地、TOS 寒天培地により培養した生菌数と種類)を測定し、糞便の硬さとの間に相関性があるかどうかを検討した。

II. 材料と方法

1. 材料

本実験には酪農学園大学獣医学群獣医保健看護学類で飼育されているイヌ(犬番号1~5)と学生が飼育しているイヌ(犬番号6)の合計6頭が自然排便した便を使用した。各イヌは、ドライフードを朝夕の二回給餌されている。給餌量は体重に応じて栄養要求量を計算し、体重が変化したら食餌の量も変更するという形で行い、水は水道水を自由に摂取させた。表1には、実験に使用したイヌの犬種、年齢、雌雄と体重を示した。

表 1. 対象犬一覧

番号	種類	年齢 (歳)	雌雄	体重 (kg)
1	ダックスフント	12	メス	5.8
2	ビーグル	6	オス	9.9
3	柴	5	オス	10.7
4	ビーグル	12	オス	13.9
5	ウェルシュコーギー	1	オス	10.6
6	スコティッシュテリア	3	オス	6.8

2. 調査方法

2.1.採便方法

糞便は自然排便したものを午前8時から午前9時までの間に採便し使用した。採便スケジュールは表2に示した通りであり、連続した日時で採便したイヌもいた。

採取された便は以下の BSFS(図1)に従って硬さにより1~7段階に分類した。その後、糞塊から、2g 程度を水分量測定用に、1g を細菌培養用に分け、ファルコンチューブ内に保存した。

表 2. 採材日一覧(2016年)

犬\日付	5/11	5/13	5/20	5/27	6/10	6/29	7/6	7/15	7/27	8/19	8/24	8/26	10/12	10/19	10/21	10/28	11/2	11/9
1		○	○	○					○		○	○	○			○	○	
2	○									○						○		
3	○													○	○			○
4	○				○	○				○		○				○		
5		○																
6							○	○										

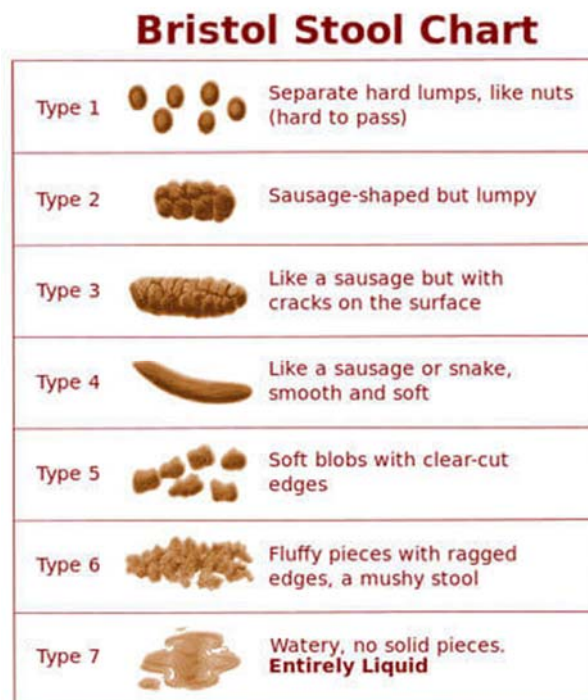


図 1. Bristol Stool Form Scale :BSFS について

BSFS では糞便の硬さをその形状から7つの段階に分けている。Type1はナッツ状の硬い塊。Type2はソーセージ状で硬い便。Type3は表面にヒビのあるソーセージ状。Type4はソーセージか蛇の形状で表面が滑らか。Type5は輪郭が不明瞭な小塊。Type6は輪郭が曖昧な柔らかい糞便。Type7は水様な液体状の便。(http://www.thealternativedaily.com/the-bristol-poop-chart-which-of-the-7-types-of-bowel-movements-are-you/ より引用。)

2.2. 糞便 pH の測定方法

pH の測定には pH 試験紙(Johnson Test Papers)を用いた。試験紙の先端に一滴の蒸留水を染み込ませた後、この先端を糞便の表面に付着させ試験紙の色調の変化からpHを測定した。予備検討で、ひとつの糞塊において糞便表面、糞便内部と数か所の pHを測定したが、著明な差異が認められなかったために今回は統一して表面の pHを測定した。

2.3. 糞便中水分量の測定法

ファルコンチューブ内に入れた糞便(2g程度)を EYELA 社の遠心エバポレーターを用いて真空状態で6時間、常温で乾燥させた。乾燥後は以下の式により水分量を計算した。

W:乾燥前の重量 DW:乾燥後の重量

$$\text{水分量(\%)} = 100 \times (W - DW) / W$$

2.4. 糞便に含まれる細菌の培養法

糞便中の細菌の培養は、以下の様に処理をした材料を用いて行った。

- 1 ファルコンチューブに保存した1gの糞便を9mLの滅菌生理食塩水で希釈した。これを10倍希釈糞便材料とした。
- 2 10倍希釈材料を滅菌生理食塩水で希釈を繰り返し、1,000倍と100,000倍に希釈した材料を作成した。
- 3 10倍、1,000倍、100,000倍に調整した糞便材料を以下に示す平板培地に0.1mlずつ3枚のシャーレに撒いた。
- 4 培地は、普通寒天培地(ニッスイ)、MacConkey寒天培地(ニッスイ)、MRS寒天培地(Merck KGaA)、TOSプロピオン酸寒天培地(ヤクルト薬品)を使用した。
- 5 培養条件はアネロパック・アネロジャー(三菱ガス化学株式会社)を用い嫌気培養にてふ卵器で37°C、48~72時間とした。

6 培養後100,000倍に調整した培地からコロニー数を計測した(3枚のシャーレのコロニー数を測り平均した)。計測不可だった場合1,000倍、10倍で調整した培地を用いた。単位は1gあたりのCFUで以下のように計算した。

C:コロニー数 M:希釈倍率

$$\text{CFU/g} = C \times M \times 100$$

2.5. 細菌種の同定方法

各培地で培養してきたコロニーを純培養して、MALDI TOF—MSとBiotyperソフトウェアを用いて分離細菌を同定した。この方法は、培養細菌の同定にすでに用いられている[27,28]。一連の作業手順を以下に示した。

- 1 各培地からコロニーを選択して純培養した。
- 2 純培養したコロニーはMALDI TOF—MSのターゲットプレートに直接塗抹するスメア法で固定した。
- 3 MALDI TOF—MSのソフトウェアであるBiotyperを用いスコア1.700以上を信頼できる値として細菌種を同定した。
- 4 この際、スメア法で菌種レベルまでの同定ができなかった株についてはギ酸抽出法にて再度解析を行い同定した。

3. 統計処理

得られた成績(pH、水分量、普通寒天培地、MacConkey寒天培地、MRS寒天培地、TOS寒天培地により培養した生菌数と種類)と硬度(BSFS)との関係を散布図にして表し、ピアソンの積率相関解析から相関係数とそのp値を求め相関の有無を明らかにした。また各BSFSの間の有意差検定はF検定後にstudentのT検定を行い、 $P < 0.05$ を有意差ありとした。

Ⅲ. 成績

1. BSFS、糞便 pH と水分含有量との関係

今回の実験に使用した糞便(25検体)の BSFS は2から6の間であり、平均すると3.56標準誤差であった。一方、pHは5.2~6.7の間であり平均すると6.2標準誤差であった。図2は、BSFS と糞便 pH との関係調べた散布図である。BSFS と pH の間には BSFS が増加すると pH が低下するという負の相関関係が認められ、相関係数-0.56であった。この相関係数は、統計上有意 ($p < 0.01$) であった。BSFS3の糞便の pH は 6.44 ± 0.12 ($n=8$)、4の pH は 5.98 ± 0.25 ($n=5$)、5の pH は 5.35 ($n=2$) となったが、BSFS3と4間の比較では pH に有意な差は認められなかった。尚、BSFS5に関しては2例であったために有意差検定の対象外とした。

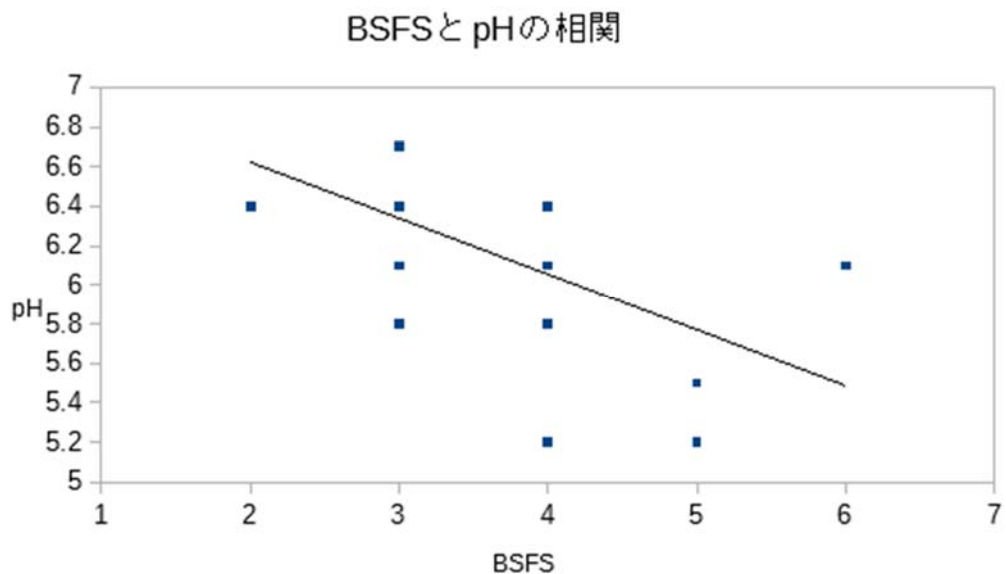


図 2. BSFS と pH の相関性について

横軸に各糞便の BSFS 値を縦軸に pH をプロットして両者の関連性を調べた。斜めの直線は両者の関連性を示している。相関係数は-0.56、有意性は $p < 0.01$ であった。

図3は、BSFSと水分量との相関を表した散布図である。水分量はBSFSが増加すると上昇していく傾向が認められたが、相関係数は0.4、p値は $p=0.06$ であり、統計学的には両者の間に有意な相関があるとはいえなかった。

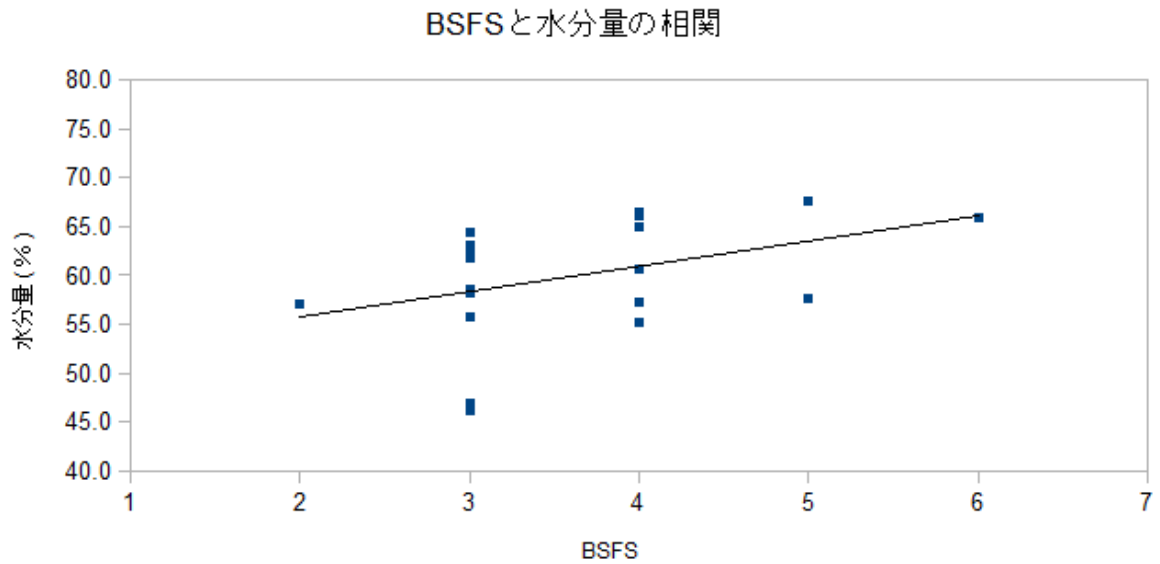


図 3.BSFSと水分量の相関性について

横軸にBSFS値を縦軸に水分量をプロットして両者の関連性を調べた。相関係数は0.4、有意性は $p=0.06$ であったので両者の間に有意な相関がないことが解った。

図4は pHと水分量に関連性があるかどうかを検討したものである。水分量の低下により pHが増加する傾向が認められたが、相関係数は-0.29、P値は0.18であり、両者の間に統計学的に有意な相関がないことが示された。

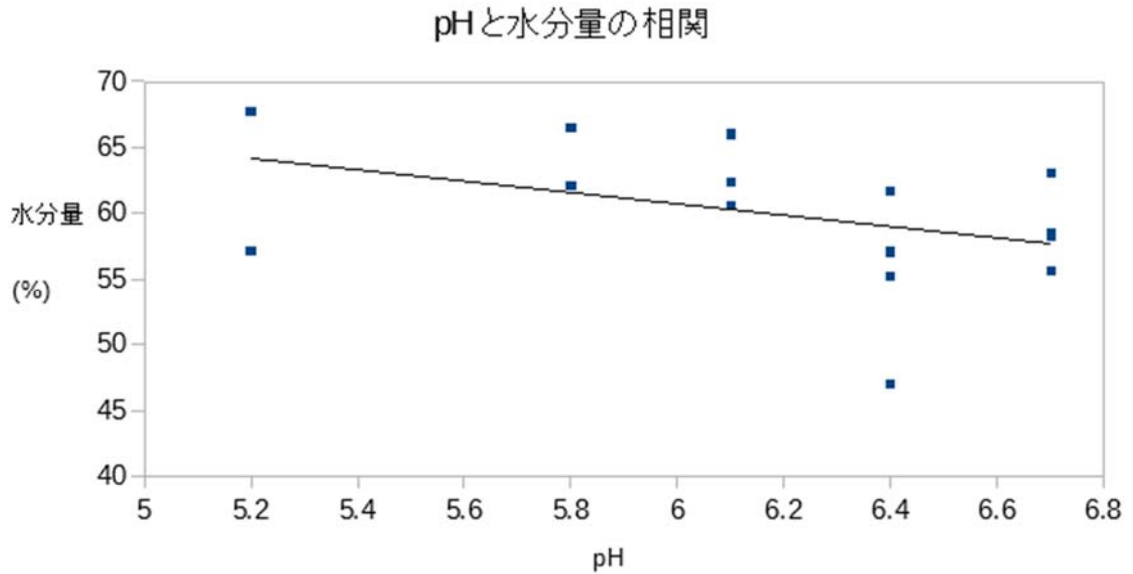


図 4. 糞便 pH と水分量の相関性について

横軸に各糞便の pH 値を縦軸に水分含量をプロットして両者の関連性を調べた。斜めの直線は両者の関連性を示している。相関係数は-0.29、P=0.18であったので両者の間に有意な相関がないことが解った。

2. 糞便中の細菌数、細菌種と硬度との関係

表3に Biotyper で同定された主要な細菌種と BSFS との関係を示した。それぞれの硬度が、3が13例、4が8例、5が2例と差があるので直接的な比較は難しかったが、*Escherichia coli* は硬度に関係なく共通し糞便中に存在している細菌であった。*Bifidobacterium longum*、*Bifidobacterium animalis*、*Streptococcus canis*、*Streptococcus equinus*、*Streptococcus ratti*、*Enterococcus avium*、*Enterococcus canintestini* は、硬度3の糞便のみで検出された細菌であった。一方、*Streptococcus gallolyticus* は硬度5の糞便のみで観察された。

図5～図8に BSFS と各培地に培養された菌数との相関性を示した。普通寒天培地、選択培地いずれの培地で糞便を培養しても、培養された菌数と BSFS の間に有意 ($p < 0.05$) な相関性はなかった。しかしながら、MRS 寒天培地の培養細菌数と硬度との間の相関係数と p 値はそれぞれ、 -0.38 と $p = 0.08$ であり有意水準に近い値を示した(図7)。

前章の検討で糞便硬度と相関が認められた pH に着目し、pH と各培地に生えた菌数の相関を調べた。図9に示したように pH と MRS 寒天培地の培養菌数の間には関連性が認められ($n = 17$)、相関係数が 0.62 、p 値が 0.01 以下であることから有意な相関であることが示された。

また、図10に示したように今回の検討では MRS 寒天培地と TOS プロピオン酸寒天培地で生えた菌数の間には正の相関が見られた($n = 16$ 、相関係数: 0.45 、 $P < 0.05$)。

表 3. 各硬度の糞便の Biotyper で同定された菌種

細菌種\BSFS	3(n=13)	4(n=8)	5(n=2)
<i>Escherichia coli</i>	6	5	1
<i>Bifidobacterium longum</i>	1		
<i>Bifidobacterium animalis</i>	1	1	
<i>Lactobacillus ruminis</i>		1	
<i>Streptococcus lutetiensis</i>	5		1
<i>Streptococcus gallolyticus</i>		1	1
<i>Streptococcus canis</i>	1		
<i>Streptococcus equinus</i>	1		
<i>Streptococcus rattus</i>	1		
<i>Enterococcus faecalis</i>		1	
<i>Enterococcus faecium</i>		1	
<i>Enterococcus gallinarum</i>	1		1
<i>Enterococcus avium</i>	1	1	
<i>Enterococcus canintestini</i>	1		

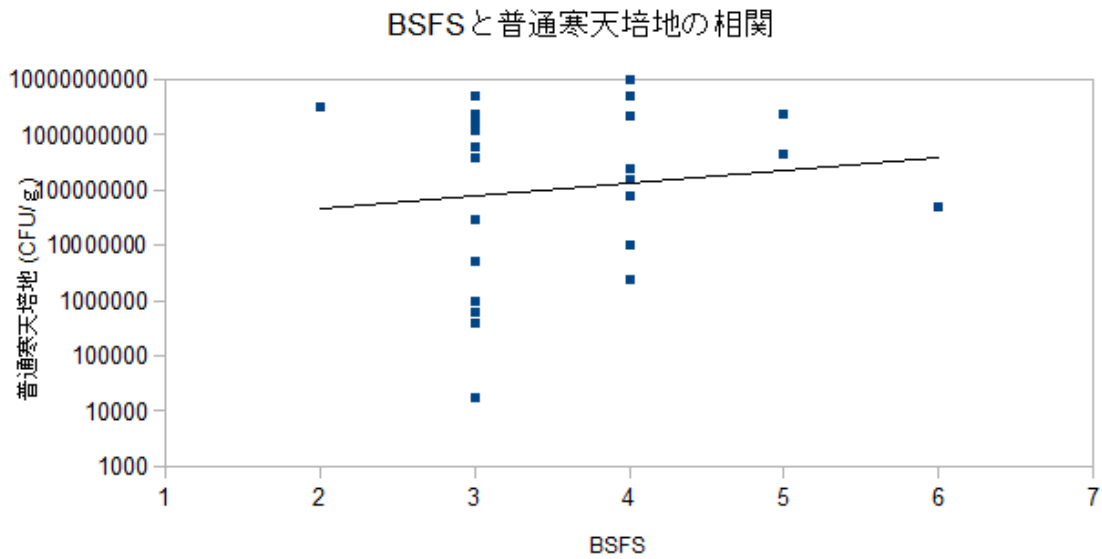


図 5. BSFSと普通寒天培地の相関性について 横軸に BSFS 値を縦軸に普通寒天培地の総菌数をプロットして両者の関連性を調べた。相関係数は-0.006、 $p=0.98$ であったので両者の間に有意な相関がないことが解った。

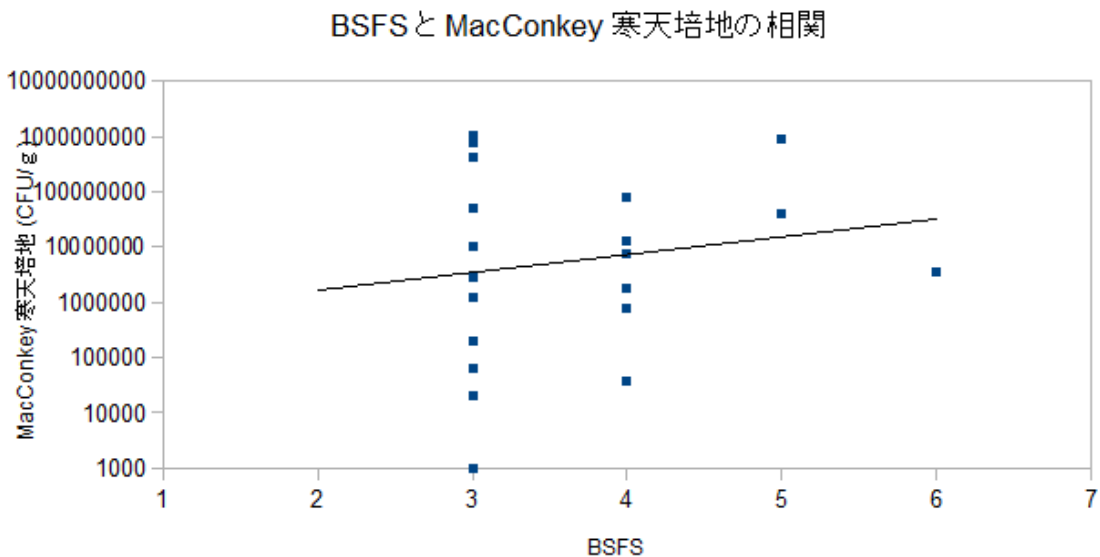


図 6. BSFSと MacConkey 寒天培地の相関性について 横軸に BSFS 値を縦軸に MacConkey 寒天培地の総菌数をプロットして両者の関連性を調べた。相関係数は-0.02、 $p=0.92$ であったので両者の間に有意な相関がないことが解った。

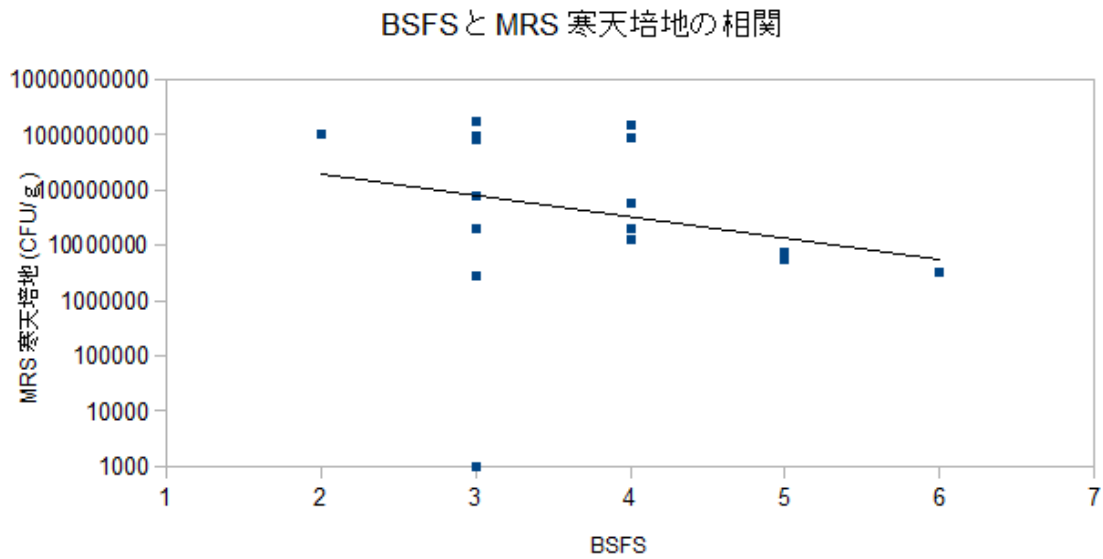


図 7. BSFSとMRS寒天培地の相関性について

横軸にBSFS値を縦軸にMRS寒天培地の総菌数をプロットして両者の関連性を調べた。

相関係数は-0.38、 $p=0.08$ であったので両者の間に有意な相関がないことが解った。

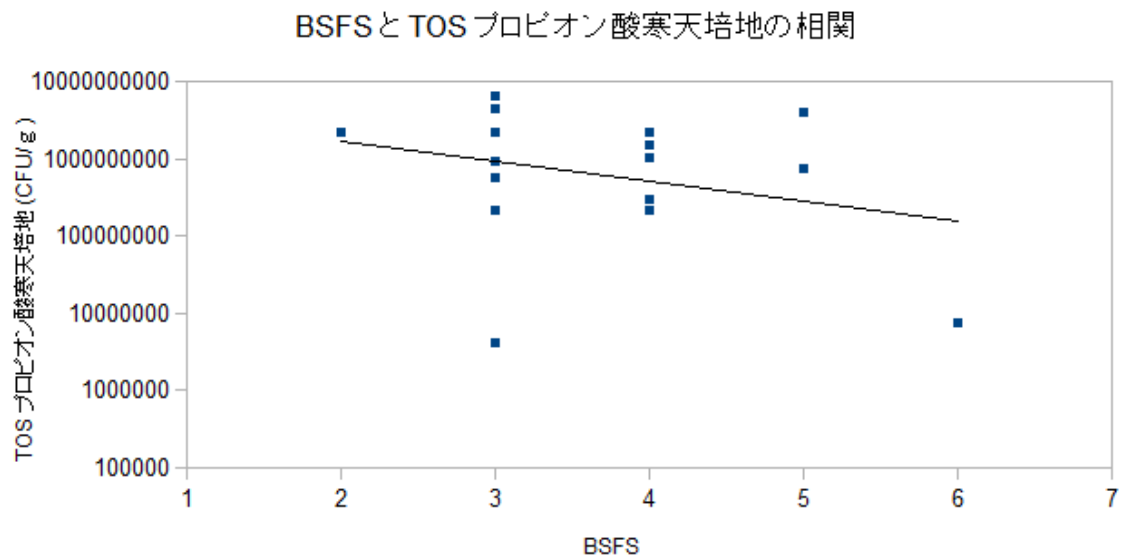


図 8. BSFSとTOSプロピオン酸寒天培地の相関性について

横軸にBSFS値を縦軸にTOSプロピオン酸寒天培地の総菌数をプロットして両者の関連性を調べた。相関係数は-0.20、 $p=0.36$ であったので両者の間に有意な相関がないことが解った。

た。

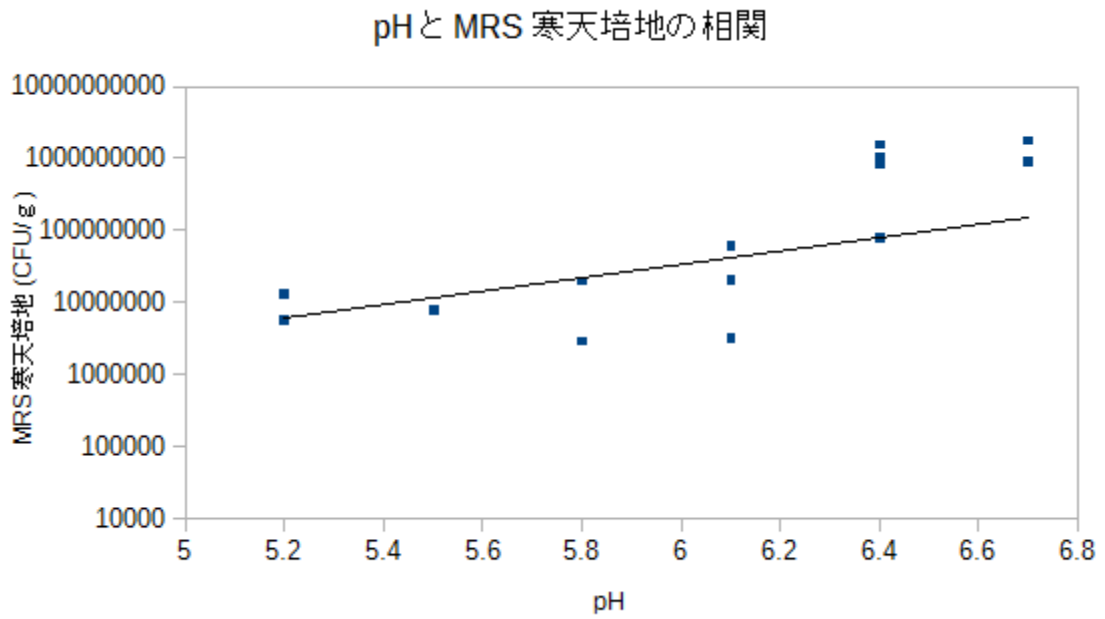


図 9. pHと MRS 寒天培地の相関性について

横軸に pH 値を縦軸に MRS 寒天培地の総菌数をプロットして両者の関連性を調べた。両者の間には正の相関関係が認められ、相関係数は-0.62、 $p < 0.01$ であった。

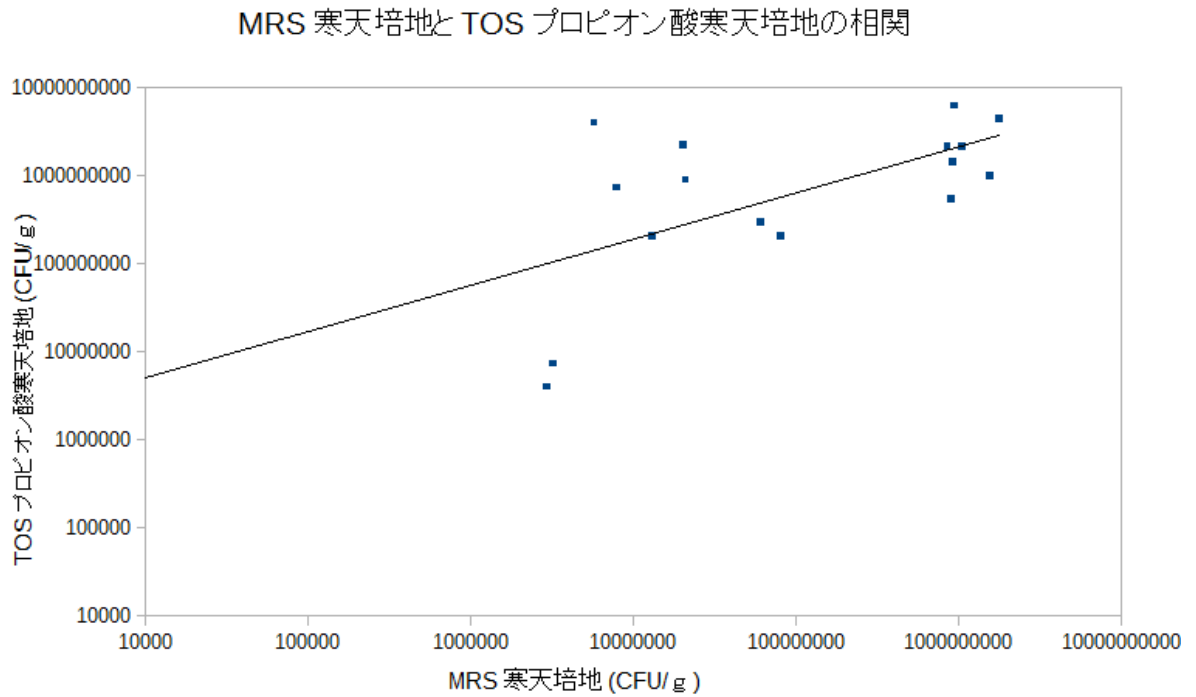


図 10. MRS 寒天培地と TOS プロピオン酸寒天培地の相関性について

横軸に MRS 寒天培地の総菌数を縦軸に TOS プロピオン酸寒天培地の総菌数をプロットして両者の関連性を調べた。両者の間には正の相関関係が認められ、相関係数は0.45、 $p < 0.05$ であった。

3. 糞便硬度の時間的推移と検出菌種との関係

今回、一例のイヌにおいて(犬番号1)4か月間、ほぼ一か月間隔で採便してその便の硬度、pH、水分含有量と糞便中の細菌種を比較した。室温がコントロールされている室内で同じフードで飼っているイヌにおいて、BSFSは3~4、pHは5.8~6.7、糞便水分量は46.1~64.5%の間で推移した。この3つのパラメーターの中で水分含量の変動が最も大きく、他のBSFS、pHの変動はそれほど高くないことが解った。

図12には採便日毎の総菌数を示した。硬度に比べて各培地で検出できた細菌数には変動が大きく、5-7月まではほぼ一定であったものが、8月、10月には上昇し、その後10月の末から一過性の低下を示した後、回復した。Biotyperによって同定された菌種としては、8/26日に *S. gallolyticus*、7/27日、10/12日、11/2日に *S. lutetiensis*、10/28日に *S. canis*、11/2日に *S. equinus*、11/2日に *S. ratti*、8/26日、10/28日に *B. animalis* であり、採便日により同定される菌種に差が認められた。

表 4. 採便日と同定された菌種の一覧(犬番号1)

菌種 \ 日付	7/27	8/24	8/26	10/12	10/28	11/2
<i>S. gallolyticus</i>			○			
<i>S. lutetiensis</i>	○			○		○
<i>S. canis</i>					○	
<i>S. equinus</i>						○
<i>S. ratti</i>						○
<i>B. animalis</i>			○		○	

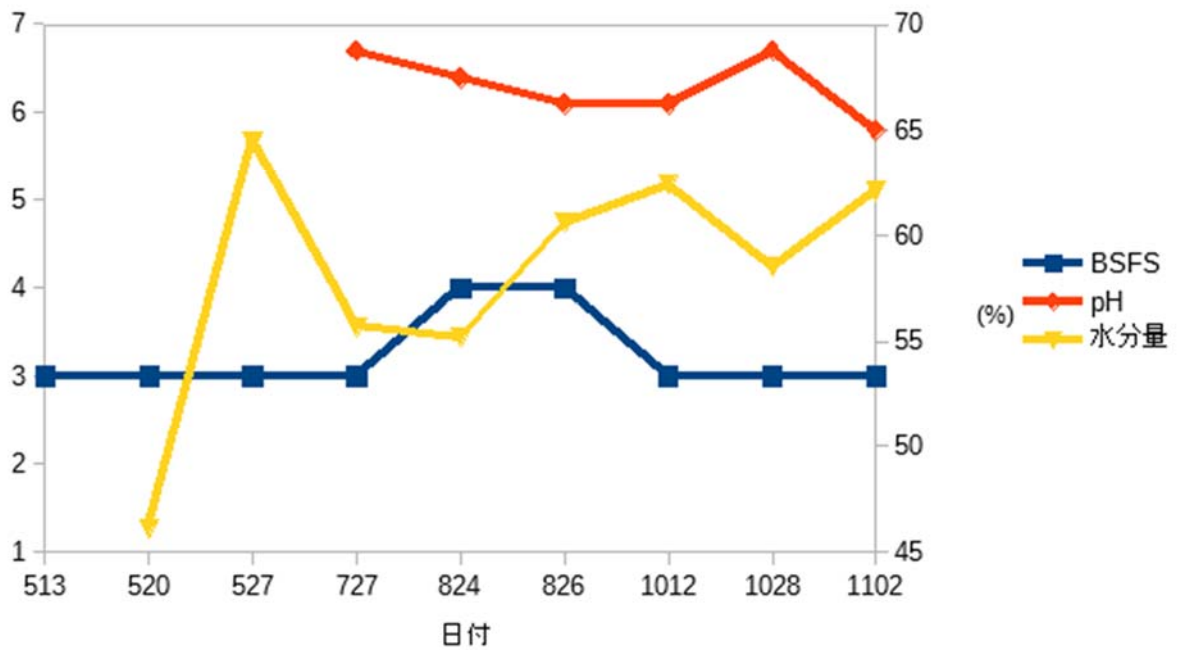


図 11. 糞便の BSFS、pH、水分量の時間推移(犬番号1) 図の横軸は採便した日時(2016年5月から11月)を示している。左縦軸は BSFS(青色)と pH(赤色)を右縦軸は水分量(黄色)の変化をそれぞれ示している。5月においては pH や水分量を測定しない場合があった。

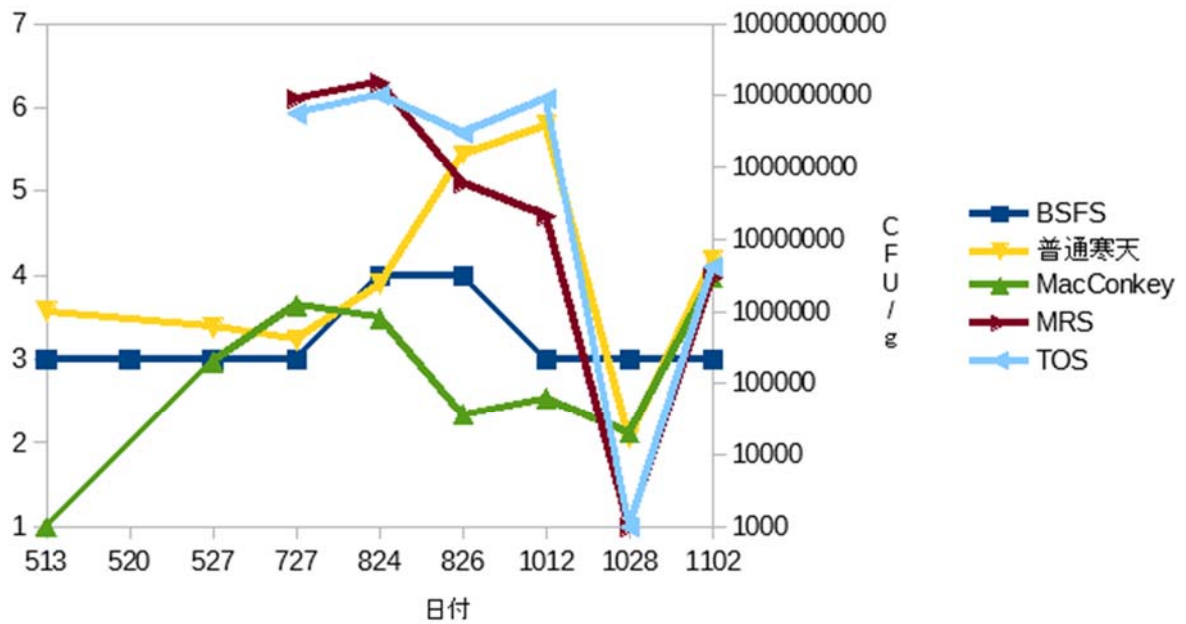


図 12. 糞便の BSFS、各培地の総菌数の時間推移(犬番号1)

左縦軸は BSFS(青色)を右縦軸は普通寒天培地(黄色)、MacConkey 寒天培地(緑色)、MRS 寒天培地(紅色)、TOS プロピオン酸寒天培地(水色)の総菌数の変化をそれぞれ示している。5月においては pH や水分量を測定しない場合があった

IV. 考察

1. BSFS、糞便 pH と水分含量との関係

今回の実験ではイヌ糞便の硬度 (BSFS) に影響を与える因子について明らかにするために硬度と水分量、pH および糞便中細菌数とその種類を測定して、どの因子と BSFS との間に統計学的な相関が認められるか否かを検討した。

水分量との相関では、以前の検討では硬度との間に有意な相関を認めていたが[15]、今回の検討では相関が認められる傾向があるものの、有意なものではなかった。ただ、p 値が 0.06 であり有意水準の 0.05 に近かったことから例数を増加させると有意な相関が認められる可能性は高いと考えられる。一方、今回の検討では糞便の硬度 (BSFS) と pH との間に有意な相関が見られた。一般的に腸内の pH は 6.0~6.5 程度の弱酸性といわれており、糞便の pH もこれに類似すると考えられるが、今回の糞便 pH の結果はほぼその範囲内であった。糞便内には腸内細菌が生息しており、*Lactobacillus* 属や *Bifidobacterium* 属などのいわゆる善玉菌が多いと乳酸などの酸性物質を出すため pH は低下を示す。反対に病原性のある *Clostridium* 属などの悪玉菌はアルカリ物質を代謝産物として発生させるため、悪玉菌が増えるとアルカリ性に傾くと言われている [30]。本実験の結果から、糞便が硬いと pH が高く、柔らかくなると pH が低下することが示された。これまで糞便の硬さと pH との相関を調べた研究はなくこの仕事が初めての報告である。高蛋白質グリーブス・ミール (脱脂内臓肉) をイヌに与えた際は下痢が誘発され、糞便中の pH が高くなるという報告がある [10]。下痢を起している状況下では悪玉菌が優勢になり、これら細菌により産生されるアルカリ性物質が増加し、善玉菌が産生する乳酸などの酸性産物が低下するため pH が上がると考えられている。また、下痢などにおいては腸粘膜から大量の腸液 (細胞外液、pH=7.4 前後) が流出し糞便と混じりで pH が増加した可能性も否定できない。今回 BSFS6 は 1 検体しか見られなかったが、5 の時と比較して明らかに pH は高い値になっていた。今後さらに検体 (BSFS が高い

糞便)を集め、下痢便での pH の変化を観察し、腸内細菌種も含めた糞便 pH に影響を与える因子についての検討が必要である。

糞便内の水分量は、水分摂取量が多かったり、ストレスを感じたりすると上がるとされている [6]。今回の検討において糞便中の pH と水分量の間には有意な相関関係が見られなかった ($P=0.18$)。イヌにおいてシンバイオティクスを投与することで下痢の総日数は対照群より有意に少なくなるが、酢酸、酪酸、プロピオン酸の濃度に有意な変化は見られなかったとの報告がある [7]。このことは下痢、すなわち糞便の水分含有量と SCFA 濃度すなわち pH 濃度には密接な関係がないことを示唆しており本研究の実験結果と一致していた。

2. 腸内細菌種との糞便硬度の関連性について

今回の実験結果で、まず BSFS と普通寒天培地総菌数との相関を検討したが、両者の間に有意な相関は認められなかった。すなわち、同じ便硬度でも細菌の総菌数には大きな幅が見られたことから総細菌数が硬さに関与するとは考えにくいことが示唆された。そこで、次に菌種に注目してみた。今回は腸内細菌を菌種別に培養するために選択性の高い培地として MRS 寒天培地と TOS プロピオン酸寒天培地を用いて *Lactobacillus* と *Bifidobacterium* の同定を試みたが、*Lactobacillus* 属は *L. ruminis* のみ、*Bifidobacterium* 属は *B. longum* と *B. animalis* のみしか同定することが出来なかった (表3)。他の菌種が同定出来なかった原因については今後の検討が必要である。今回の検討でイヌ糞便から高頻度に同定された菌種は、*Streptococcus* 属と *Enterococcus* 属のものであった。*Streptococcus* 属と *Enterococcus* 属は、*Lactobacillus* 科に属しホモ乳酸発酵をする性質を持ち L 型乳酸を生成することが知られている [1]。硬度との関連では、*S. lutetiensis* は BSFS3 の糞便で他の種類よりも高頻度で観察される傾向にあった。*S. lutetiensis* は、*Streptococcus* を 6 つにクラスター化する分類では bovis group に属する種類である [16]。ヒトでは、*S. bovis* は大腸ガンとの関連が注目されている菌種である [16]。イヌから分離された *S. lutetiensis* は難消化性食物繊維投与 (フルクタン、プレバイオティクス効果を有する) により増加するが、イヌの健康状態に

影響を与えるか否かは不明とされている[26]。今回の検討で *S.lutetiensis* は適度な便の硬さと考えられる BSFS3 で多く検出されていることから便の硬度と関連性がある細菌と考えることも可能である。今後この細菌の性状や産生物と便の硬さとの関連性を調べていくことが必要である。

今回の検討で *Enterococcus* のうちの *E. faecium*、*E. faecalis* はどちらも BSFS4 から同定された。これらの細菌は、プロバイオティクスとして国内で市販されている動物用生菌製剤の中にも入っている種である[1]。すなわち、このような生菌製剤の摂取により糞便硬度を中程度(BEFS4)に保たせることが期待できる。今回選択培地として使用した MRS 寒天培地は、*Lactobacillus* 属の選択培地であるが、実際は選択性が低く *Streptococcus* 属や *Enterococcus* 属も生えやすいと言われている。*Lactobacillus* 属、*Bifidobacterium* 属は BSFS3 から4の糞便では認められたが、pH が最も低下している BSFS5 では認められなかった。このことは、軟便には有益な善玉菌が存在しない可能性を示唆するものであるが、BSFS5 は2例しかないため今後この例数を増やし細菌同定を行うことが必要である。

本研究で pH と MRS 寒天培地の細菌数との間に有意な相関が認められた。MRS 寒天培地は原則的に乳酸菌を選択する培地であるが、今回の実験では pH が高い糞便ほど MRS 寒天培地に生える細菌数が多い傾向にあった。このような傾向が認められた理由は不明であるが、今回、糞便中で高頻度に同定された *Streptococcus* 属や *Enterococcus* 属は低 pH では生育できない可能性がある。

TOS プロピオン酸寒天培地は、*Bifidobacterium* 属の選択培地であるが、ムピロシン下にてより有意にこの細菌を検出できるとの報告がある[24]。今回は既報[23]に従い、ムピロシン未添加で培養実験を行ったが、既報とは異なり *Streptococcus* や *Enterococcus* が検出された。この相違が起きる理由は現在不明であるが、TOS プロピオン酸寒天培地にムピロシンを加えた条件下の検討も今後必要であろう。

3. 糞便パラメーターの時間変動

犬番号1(ダックスフント、メス)の経時的な変化を検討したところ、BSFSとpHに大きな変化は見られないものの、水分量が5月の測定では平均値に比べてそれぞれ低値、高値を示した。この時BSFSは一定値で3を示していたことから、糞便には外見で硬く見えても内部に水分量が多い場合もあると考えられる。また、BSESとpHに比べて糞便の水分量には採便時期(季節)による変動が大きいことに注意しなければならない。これまでの研究で筆者はBSFSと水分量が有意に相関することを示している[15]が、糞便の内部と表面では硬さに違いがあることを観察していること、また排便後の時間によっても糞便表面の硬度は影響を受けることから考えると、糞便を外見だけでスコア化できるBSFSは確かに迅速に糞便硬度を判断でき、有用ではあるが必ずしも水分量を判断できるものではないことに注意すべきである。今後は排便された糞便で放置時間と硬さ、水分、pHなどの値を継時的に測定することも必要である。いずれにせよ、室内で一定の温度環境、食事環境で飼育している屋内犬の場合は、気温や湿度などの影響を受けずほぼ一定の糞便を排出することが推定された。このことは、屋外飼育犬で類似の実験を行ってみることにより裏付けられると考えている。次に総菌数を見てみると10/28日に普通寒天培地、MRS寒天培地とTOSプロピオン酸寒天培地において急激に菌数が減少している。すなわちBSFSの変化がなくとも総菌数が変化していることから、総菌数と糞便硬度には関係がないことがさらに支持された。

今回、初めて経時的にイヌ糞便の硬さ、水分含量、pHおよび腸内細菌数とその種類について比較してきたが、一頭のイヌの成績であること、室内で飼養しているが屋外で散歩し、寒冷などのストレスを受けると考えられる冬季での検討をしていないなど今後の課題も大きいと考えられた。

V. 総括

糞便の硬さは種々の因子によって影響を受けると考えられている。今回の研究では、イヌ糞便中の細菌数とその種類により糞便の硬さが影響を受けるのか否かを明らかにするために、家庭犬で通常排便された便を用い、便の硬さ、水分量、pH および各種の培地での総菌数と分離菌種との関連性を検討した。得られた結果は以下に示す通りである。

1. 糞便の硬さは水分量が増加すると柔らかくなる傾向が認められたが有意な相間ではなかった。一方、糞便の硬さと pH には有意な相関があり、糞便が柔らかくなると pH が低下することがわかった。pH と水分含有量との間には有意な相関が認められなかった。
2. 糞便の硬さと便中の総菌数との相関においては、普通寒天培地、MacConkey 寒天培地、TOS プロピオン酸寒天培地で培養された菌数と硬さとの間に相関は認められなかった。一方、MRS 寒天培地に生えた細菌数と硬度との間には関連性が認められる傾向にあった。
3. 糞便中で優勢に同定された菌は大腸菌を除くと *Streptococcus lutetiensis* であった。この細菌は BSFS3 の糞便において他の菌種と比較して高頻度に観察された。また、*Lactobacillus* 属、*Bifidobacterium* 属は BSFS3 と 4 で認められたが、BSFS が 5 の糞便では検出できなかった。
4. 特定のイヌで経時的に糞便のパラメーターを追跡したところ、硬度や pH に比べて水分量は時期により変動しやすい値であることがわかった。また、糞便中の総細菌数は BSFS の変化を伴わずに変動した。

以上の結果から、イヌで糞便の硬さと pH が相関することを初めて明らかにした。糞便硬度は、糞中の総細菌数とは関係がなく、菌種と関連する可能性が示唆された。

イヌ糞便の硬度を適度（BSFS3から4）に保つには *Lactobacillus* 属と *Bifidobacterium* 属の菌種の存在が必要であると考えられた。また、*Streptococcus lutetiensis* も糞便の硬さに関与する重要な細菌であることが示唆された。

VI. 謝辞

本稿を終えるにあたり、本研究の遂行に関し終始温かいご助言とご指導を賜りました酪農学園大学獣医保健看護学類臨床動物栄養研究室の内田英二教授、ご校閲の労を賜りました比較薬理学教室北澤多喜雄教授に深甚なる謝意を捧げます。また、細菌培養、細菌同定に関する実験でご指導をいただいた本大学獣医学群獣医学類獣医細菌学ユニット村田亮講師に心からお礼を申し上げます。

イヌの糞便の採取に関して多大なるご協力頂いた獣医学群獣医保健看護学類1年生、2年生の学生に謝意を示します。

VII. 引用文献

1. 辨野義己.2011.プロバイオティクスとして用いられる乳酸菌の分類と効能. モダンメディア 57巻10号277-287
2. Bunešová,V., Vlková,E., Rada,V., Ročková,S., Svobodová,I., Jebavý,L., Kmet',V.2012.Bifidobacterium animals subsp. lactis strains isolated from dog feces. *Veterinary Microbiology* 160 501–505
3. Chumpitazi,B.P., Lane,M.M., Czyzewski,D.I., Weidler,E.M., Swank,P.R., and Shulman,R.J.2010.Creation and initial evaluation of a stool form scale for children. *J Pediatr.*157(4): 594-597
4. Coltella,L., Mancinelli,L., Onori,M., Lucignano,B., Menichella,D., Sorge,R., Raponi,M., Mancini,R., Russo,C.2013.Advancement in the routine identification of anaerobic bacteria by MALDI-TOF mass spectrometry. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 32:1183–1192
5. Deng,P., Swanson,K.S.2015.Gut microbiota of humans, dogs and cats: current knowledge and future opportunities and challenges. *Br J Nutr*;113 S6-17
6. Enck,P., Aziz,Q., Barbara,G., Farmer,A.D., Fukudo,S., Mayer,E.A., et al.2016.Irritable bowel syndrome. *Nat Rev Dis Primers*;2:16014
7. Gagné,J.W., Wakshlag,J.J., Simpson,K.W., Dowd,S.E., Latchman,S., Brown,D.A., Brown,K., Swanson,K.S., and Fahey Jr,G.C.2013.Effects of a synbiotic on fecal quality, short-chain fatty acid concentrations, and the microbiome of healthy sled dogs. *BMC Veterinary Research*, 9:246
8. Gorkiewicz,G., Thallinger,G.G., Trajanoski,S., Lackner,S., Stocker,G., Hinterleitner,T., Gully,C., Högenauer,C.2013.Alterations in the colonic microbiota in response to osmotic diarrhea. *PLoS ONE* 8(2): e55817

9. Hall,J.A., Melendez,L.D., Jewell,D.E.2013.Using Gross Energy Improves Metabolizable energy predictive equations for pet foods whereas undigested protein and fiber content predict stool quality. *PLoS ONE* 8(1): e54405
10. Hang,I., Heilmann,R.M., Grützner,N., Suchodolski,J.S., Steiner,J.M., Atroshi,F., Sankari,S., Kettunen,A., deVos,W.M., Zentek,J., and Spillmann,T.2013.Impact of diets with a high content of greavesmeal protein or carbohydrates on faecal characteristics, volatile fatty acids and faecal calprotectin concentrations in healthy dogs. *BMC Veterinary Research* , 9:201
11. Hill,R.C., Burrows,C.F., Ellison,G.W., Finke,M.D., Huntington,J.L., and Bauer,J.E.2011.Water content of faeces is higher in the afternoon than in the morning in morning-fed dogs fed diets containing texturised vegetable protein from soya. *British Journal of Nutrition*.106: 202-205
12. 日野常男, 浅沼成人.2004.イヌ・ネコの腸内細菌と健康. ペット栄養学会誌,7(3):139-152
13. Hooda,S., Minamoto,Y., Suchodolski,J.S., Swanson,K.S.2012.Current state of knowledge: the canine gastrointestinal microbiome. *Anim Health Res Rev.*;13(1):78-88
14. Igarashi,H., Maeda,S., Ohno,K., Horigome,A., Odamaki,T., Tsujimoto,H.2014.Effect of oral administration of metronidazole or prednisolone on fecal microbiota in dogs. *PLoS ONE* 9(9): e107909
15. 井上貴裕、及川真由 2015. イヌの糞便における BSFS とリング法の有用性の検討. 酪農学園大学卒業論文.
16. 川村好章.2005.ブドウ球菌とレンサ球菌の分類・この10年の変遷. モダンメディア51巻12号 313-327
17. Lane,M.M., Czyzewski,D.I., Chumpitazi,B.P., and Shulman,R.J.2011.Reliability and validity of a modified bristol stool form scale for children. *J Pediatr*.159(3): 437-441

18. Minamoto, Y., Otoni, C.C., Steelman, S.M., Büyükleblebici, O., Steiner, J.M., Jergens, J.E., and Suchodolski, J.S. 2015. Alteration of the fecal microbiota and serum metabolite profiles in dogs with idiopathic inflammatory bowel disease. *Gut Microbes* 6:1, 33-47
19. O'Donnell, L.J., Virjee, J., and Heaton, K.W. 1990. Detection of pseudodiarrhoea by simple clinical assessment of intestinal transit rate. *BMJ*.300: 439-440
20. 大楠清文. 2012. 質量分析技術を利用した細菌の新しい同定法. モダンメディア58巻4号 113-122
21. Panasevich, M.R., Rossoni, S., Serao, M.C., de Godoy, M.R., Swanson, K.S., Guérin-Deremaux, L., Lynch, G.L., Wils, D., Fahey Jr, G.C., and Dilger, R.N. 2013. Potato fiber as a dietary fiber source in dog foods. *J. Anim. Sci.* 91:5344–5352
22. Pyar, H., Peh, K.K. 2014. Cost effectiveness of cryoprotective agents and modified De-man Rogosa Sharpe medium on growth of *Lactobacillus acidophilus*. *Pak J Biol Sci.*;17(4):462-71
23. Stropfová, V., Lauková, A. 2014. Isolation and characterization of faecal bifidobacteria and lactobacilli isolated from dogs and primates. *Anaerobe* 29 108-112
24. Thitaram, S.N., Siragusa, G.R., Hinton Jr, A. 2005. Bifidobacterium-selective isolation and enumeration from chicken caeca by a modified oligosaccharide antibiotic-selective agar medium. *Lett Appl Microbiol.*;41(4):355-60
25. Tominaga, S., Hirayama, M., Adachi, T., Tokunaga, T., and Iino, H. 1999. Effects of ingested fructooligosaccharides on stool frequency in healthy female volunteers: a placebo-controlled study. *Bioscience Microflora* Vol. 18 (1), 49-53
26. Vanhoutte, T., Huys, G., Brandt, E.D., Fahey Jr, G.C., Swings, J. 2005. Molecular monitoring and characterization of the faecal microbiota of healthy dogs during fructan supplementation. *FEMS Microbiology Letters* 249 65–71

27. Veloo,A.C.M., Welling,G.W., Degener,J.E.2011.The identification of anaerobic bacteria using MALDI-TOF MS. *Anaerobe* 17 211-212
28. Weese,J.S., Jalali,M.2014.Evaluation of the impact of refrigeration on next generation sequencing-based assessment of the canine and feline fecal microbiota. *BMC Veterinary Research* 10:230
29. Yoon,H., Park,Y.S., Lee,D.H., Seo,J.G., Shin,C.M., and Kim,N.2015.Effect of administering a multi-species probiotic mixture on the changes in fecal microbiota and symptoms of irritable bowel syndrome: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *J Clin Biochem Nutr.* 57(2): 129–134
30. 吉井貴宏,浅沼成人,阿部哲男,岩本美和,日野常男.2003.イヌおよびネコの腸内細菌による硝酸・亜硝酸還元反応. ペット栄養学会誌第6巻:1-6
31. Zentek,J., Kaufmann,D., and Pietrzak,T.2002.Digestibility and effects on fecal quality of mixed diets with various hydrocolloid and water contents in three breeds of dogs. *J. Nutr.*132: 1679-1681
32. Zotta,T., Ricciardi,A., Ianniello,R.G., Parente,E., Reale,A., Rossi,F., Iacumin,L., Comi,G., Coppola,R.2014.Assessment of aerobic and respiratory growth in the *Lactobacillus casei* Group. *PloS ONE* 9(6): e99189