

カキ肉エキスの給餌によるラットの盲腸内細菌叢の変化

池田 祐生¹⁾, 細見 亮太^{1)†}, 松田 芳和²⁾, 新井 博文³⁾, 下 埜 敬 紀⁴⁾,
神 田 靖 士⁴⁾, 西 山 利 正⁴⁾, 吉 田 宗 弘¹⁾, 福 永 健 治¹⁾

(¹⁾関西大学 化学生命工学部 生命・生物工学科*, (²⁾日本クリニック株式会社 中央研究所**,

³⁾北見工業大学 工学部 地域未来デザイン工学科***, (⁴⁾関西医科大学 医学部 衛生・公衆衛生学講座****)

(受付 2018年8月31日, 受理 2018年9月25日)

Effects of Dietary Oyster Extract on the Gut Microbiome in Rats

Yuki IKEDA¹⁾, Ryota HOSOMI¹⁾, Yoshikazu MATSUDA²⁾, Hirofumi ARAI³⁾, Takaki SHIMONO⁴⁾,
Seiji KANDA⁴⁾, Toshimasa NISHIYAMA⁴⁾, Munehiro YOSHIDA¹⁾, and Kenji FUKUNAGA¹⁾

¹⁾Department of Life Science and Biotechnology, Kansai University

²⁾Central Research Institute, Japan Clinic Co., Ltd.

³⁾Department of Biotechnology and Environmental Chemistry, Kitami Institute of Technology

⁴⁾Department of Public Health, Kansai Medical University

Summary

The main components of oyster extract (*Crassostrea gigas*) include zinc, glycogen, and taurine, and oyster extract powder is currently being marketed as a supplement. However, few studies have investigated the effects of dietary oyster extract on the gut microbiome. The present study demonstrated the effects of oyster extract on the composition of bacteria in the cecal contents of rats fed a high-fat diet. Male Wistar rats were divided into three groups and fed an AIN-93G diet (LF diet), AIN-93G modified high-fat diet (HF diet), and 5% (w/w) oyster extract-containing HF diet (HFOE diet) for four weeks. The composition of gut microbiome species were compared in samples using high-throughput 16S rRNA gene amplicon sequencing with the Ion PGM system (Thermo Fisher Scientific). The relative abundance of *Lactobacillus* in cecal contents was significantly lower with the HF diet than with the LF diet, whereas no significant differences were observed between the HFOE and LF diets. Therefore, oyster extract may increase the abundance of *Lactobacillus*, which was reduced by the HF diet. These results suggest the potential of oyster extract supplementation to improve the composition of gut bacteria.

カキ (*Crassostrea gigas*) は「海のミルク」と称され、亜鉛、グリコーゲン、タウリンなどの様々な機能性成分が含まれている。そのため、カキの栄養・機能性成分を抽出・濃縮したカキ肉エキスが健康食品の原料として用いられている。これまでにカキ肉エキス中に含まれる亜鉛の生体利用性に関する研究報告が数多くなされている¹⁻³⁾。また、カキ肉エキス摂取による生体への健康機能については、実験動物とヒトにおいて血小板凝集抑制効果⁴⁾や肝臓保護効果⁵⁾が報告されている。さらに我々も、薬物により惹起した大腸前癌病変⁶⁾と腎障害⁷⁾モデル動物に対する有益な効果を報告している。

近年、健康と腸内細菌叢の関連について注目が集まっている。ヒトの消化管には 10^{13} 個以上もの多種多様な細菌が在住しており、複雑な微生物生態系を形成している。腸内細菌は、難消化性多糖の分解、生体内・生体外成分の代謝、ビタミン類の生産、病原菌の増殖抑制といった様々な生理機能を有している。これまで、腸内に存在する多くの嫌気性細菌は培養不可能であったために、大半が機能未知であった。しかし、ゲノム分析技術の発展によって、16S リボソーム RNA (rRNA) 系統解析やメタゲノム解析が可能になったことで、著しい腸内細菌研究の進展が見られるようになった。そのため、宿主の健康と腸内細菌叢の密

*所在地：大阪府吹田市山手町3-3-35 (〒564-8680)

**所在地：京都市北区大將軍西町1番地 (〒603-8331)

***所在地：北海道北見市公園町165番地 (〒090-8507)

****所在地：大阪府枚方市新町2丁目5番1号 (〒573-1010)

†連絡先 (Corresponding Author), Tel: 06-6368-1765, E-mail: hryotan@kansai-u.ac.jp

接な関係が徐々に明らかにされてきている。

腸内細菌叢に影響を及ぼす食事成分のうち、食物繊維や脂肪といったファクターが注目されている。一例として、高脂肪・低繊維食の摂取によって、腸内の Bacteroidetes 門や *Prevotella* 属が増加することが報告されている⁸⁾。また、慢性的な高脂肪食の摂取は、腸内細菌の代謝物である二次胆汁酸量の増加を引き起こすことが報告されている⁹⁾。このように腸内細菌叢と食事の食物繊維や脂肪に着目した研究は多いが、様々な健康機能が報告されているカキ肉エキスと腸内細菌叢との関係に着目した研究は見あたらない。そこで本研究では、カキ肉エキス粉末を添加した高脂肪餌料をラットに給餌し、盲腸内細菌叢に及ぼす影響を評価した。

実験方法

1. 餌料調製

カキ肉エキス粉末は、日本クリニック株式会社（京都）より供与された。カキ肉エキスの一般成分組成は、炭水化物 61.0 g/100 g、タンパク質 22.4 g/100 g、脂肪 1.2 g/100 g、水分 3.5 g/100 g、灰分 11.9 g/100 g であった。餌料は、米国立栄養研究所により発表されたげっ歯類の実験動物用餌料のスタンダードである AIN-93G 組成¹⁰⁾ に従った LF 餌料と、この組成を 20% 高脂肪および 0.5% コレステロールに改変した餌料 (HF) を調製した。さらに、HF 餌料に 5% カキ肉エキスを添加し、糖質、タンパク質および脂肪量が HF 群と同等になるように HFOE 餌料を調製した。各餌料の組成を、Table 1 に示した。

Table 1 Composition of experimental diets

	Groups		
	LF	HF	HFOE
	g/kg		
Dextrinized corn starch	132	92.1	92.1
Corn starch	397.5	271.4	235.3
Oyster-extract			50
Sucrose	100	100	100
Cellulose	50	50	50
Casein	200	230	216.8
L-Cystine	3	3	3
Choline bitartrate	2.5	2.5	2.5
AIN-93G mineral mixture	35	35	35
AIN-93 vitamin mixture	10	10	10
Soybean oil	70	70	70
Lard		130	129.3
Cholesterol		5	5
Cholic acid		1	1

† Oyster-extract was provided by Japan Clinic Co., Ltd. (Kyoto, Japan). The composition of oyster-extract was as follows (% w/w): carbohydrate, 61.0; protein, 22.4; fat, 1.2; moisture, 3.5; and ash, 11.9.

AIN, American Institute of Nutrition.

2. 動物実験

本実験は関西大学化学生命工学部実験動物実験委員会の承認を受けて実施した。実験動物には 4 週齢 Wistar 系雄ラット（日本エスエルシー株式会社、静岡）を用い、18 匹を 6 匹ずつ平均体重が同等になるように 3 群に分けた。ラットは室温 22°C ± 1°C、明暗 12 時間サイクル（8:00 ~ 20:00）の条件下で飼育した。実験餌料および水は自由摂取とし、28 日間飼育した。飼育期間終了後、ソムノペンチル（共立製薬株式会社、東京）による深麻酔下で下大静脈より採血し、肝臓、腎臓、脾臓、盲腸および白色脂肪組織 (WAT) を採取した。血清は、血液を 2,000 × g、15 分間遠心分離して得た。肝臓および盲腸は液体窒素にて急速凍結し、-80°C で保管した。

3. 血清分析

血清のアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST)、アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT)、中性脂肪 (TG)、リン脂質 (PL)、総コレステロール、高密度リポ蛋白 (HDL) コレステロールの分析は日本医学株式会社（大阪）に依頼した。血清の非エステル型脂肪酸 (NEFA) は、NEFA C テストワコー（富士フィルム和光純薬株式会社、大阪）で分析した。血清コレステロールエステルヒドロペルオキシド (CE-OOH) は、逆相カラムを用いた高速液体クロマトグラフにて測定した¹¹⁾。

4. 肝臓脂質分析

肝臓の総脂質は Bligh and Dyer 法¹²⁾ により抽出した。PL は、総脂質を湿式灰化後、遊離したリンをモリブデン酸アンモニウムにより発色し、分光光度計 (UV-1800: 株式会社島津製作所、京都) を用いて測定した。コレステロールは 5 α -コレスタンを内部標準とし、ガスクロマトグラフ (GC-14B: 株式会社島津製作所) を用いて定量した。TG はトリグリセライド E- テストワコー（富士フィルム和光純薬株式会社）を用いて測定した。

5. 16S リボソーム RNA アンプリコンシーケンス

各個体の盲腸内容物を 20 mL の冷生理食塩水に完全に懸濁した。この各盲腸内容物懸濁液より、LF 群は 3 検体、HF および HFOE 群は 5 検体を無作為に抽出し、QIAamp DNA Stool Mini Kit (Qiagen, Venlo, Netherlands) を用いて総 DNA を抽出した。抽出した総 DNA から細菌の同定を行うために、16S リボソーム RNA (rRNA) 遺伝子の V2-4-8 と V3-6, 7-9 領域を、Ion 16S Metagenomics Kit (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA) を用いて PCR により増幅させた。PCR 産物は AMPure XP ビーズ (Beckman Coulter, California, USA) を用いて精製した。精製した PCR 産物は、Ion Plus Fragment Library kit (Thermo Fisher Scientific) および Ion Xpress Barcode Adaptors 1-16 kit (Thermo Fisher Scientific) を用いて、Ion PGM system での解析に必要な

アダプター配列および個体識別のためのバーコード配列を付加させ、DNA ライブラリを作製した。再び AMPure XP ビーズを用いて DNA ライブラリを精製し、次いで各 DNA ライブラリ濃度をバイオアナライザー (Agilent 2100: Agilent Technologies, California, USA) により定量した。各 DNA ライブラリを 10 pM に希釈し、エマルジョン PCR およびエンリッチメント処理をそれぞれ Ion OneTouch 2 (Thermo Fisher Scientific) と Ion OneTouch ES systems (Thermo Fisher Scientific) で行った。調製した 16S rRNA 遺伝子フラグメントライブラリのシーケンス解析には、Ion PGM System, Ion PGM 400 sequencing reagents, Ion 318 v2 chips および Torrent Suit Software ver.5.6 (すべて Thermo Fisher Scientific) を用いた。

得られた配列データは、MicroSEQ 16S Reference Library v2013.1 (Thermo Fisher Scientific) と Greengenes v13.5 (The Greengenes Database Consortium, <http://greengenes.secondgenome.com/>) を参照配列とする Ion Reporter Software 16S Metagenomics Workflow ver.5.6 (Thermo Fisher Scientific) を用いて解析した。Ion Reporter Software によって、各サンプルの門、科および属の分類階級で同定された細菌とそのリード数のデータを得た。得られたリード数を用いて、各分類階級での細菌の構成比率を求めた。

6. 統計処理

得られた測定値は平均値 ± 標準誤差で示した。群間の差については、Tukey's multiple comparison test で検定を行い、有意水準は $p < 0.05$ とした。統計解析は GraphPad

Prism ver. 7.0d (GraphPad Software, California, USA) を用いて行った。

結果と考察

Table 2 に成長パラメーターおよび解剖時臓器重量を示した。初体重、摂餌量および水分摂取量については、各群間で有意差は見られなかった。HF および HFOE 群において、LF 群と比較して終体重の増加傾向が見られた (それぞれ $p = 0.15$ および 0.19)。HF および HFOE 餌料は、LF 餌料よりも脂肪量が多いため単位重量あたりのエネルギー量が高いが、各群の餌料摂取量には違いが見られなかった。そのため HF 群および HFOE 群は飼育期間中の摂取エネルギー量が多かったため、終体重、体重増加量および餌料効率に増加傾向が見られたと考えられる。これまでに、Wistar ラットに高脂肪餌料 (脂質エネルギー比 45%) を 17 週間給餌することで食餌誘導性肥満モデルの作製が報告されている¹³⁾。本研究では、高脂肪食として脂質エネルギー比 30% の餌料を用いていることと、飼育期間が 4 週間と短期間であったことから、終体重に差が現れるまでには至らなかったと考えられる。解剖時臓器重量において、HFOE 群の精巣上体周囲 WAT 重量は、LF 群と比較した場合、有意な増加が見られたが、HF 群と比較すると有意差は認められなかった。そのため、高脂肪餌料 (HF および HFOE 餌料) の摂取によって精巣上体周囲 WAT 重量が上昇したと考えられる。一方、肝臓、腎臓、脾臓、盲腸、腎臓周囲 WAT および腸管膜 WAT 重量について、各群間で有意差は見られなかった。

Table 2 Growth parameters and organ weights in rats fed experimental diets for 4 weeks

	Groups		
	LF	HF	HFOE
Growth parameters			
Initial BW (g)	82.1 ± 1.6	82.4 ± 2.9	82.0 ± 2.0
Final BW (g)	295.2 ± 8.4	320.0 ± 9.5	317.5 ± 8.4
BW gain (g/day)	7.10 ± 0.27	7.92 ± 0.28	7.85 ± 0.25
Food intake (g/day)	15.1 ± 0.9	15.3 ± 0.8	14.9 ± 0.9
Food efficiency (g/g) [†]	0.447 ± 0.017	0.495 ± 0.018	0.500 ± 0.016
Water intake (mL/day)	33.9 ± 1.7	34.9 ± 2.2	34.3 ± 2.1
Organ weights (g/100g BW)			
Liver	5.39 ± 0.43	6.06 ± 0.42	6.75 ± 0.40
Kidney	0.72 ± 0.01	0.67 ± 0.01	0.70 ± 0.01
Spleen	0.18 ± 0.01	0.21 ± 0.01	0.21 ± 0.01
Cecum [‡]	1.14 ± 0.10	0.91 ± 0.05	1.01 ± 0.04
Epididymal WAT	1.32 ± 0.07 ^a	1.58 ± 0.08 ^{ab}	1.79 ± 0.12 ^b
Mesentery WAT	1.45 ± 0.07	1.49 ± 0.05	1.68 ± 0.12
Perirenal and retroperitoneal WAT	1.21 ± 0.13	1.47 ± 0.14	1.35 ± 0.22

Data represent means ± SEM (n = 6). Values in the same row not sharing a common superscript are significantly different at $p < 0.05$ using Tukey's multiple comparison test.

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

[‡] Cecum contains the cecal content.

BW, body weight; WAT, white adipose tissue.

Table 3 に血清生化学検査値と肝臓脂質組成を示した。HFOE 群の血清 TG 濃度は、LF 群と比較した場合、有意な増加が見られたが、一方 HF 群と比較した場合、有意差は認められなかった。また、HFOE 群の血清総コレステロールおよび HDL コレステロール濃度は、HF 群と比較して、有意に増加した。これまでに私たちは、カキ肉エキスを 5% 含む高脂肪餌料（脂肪含量 20%、コレステロール非添加）をラットに給餌すると、高脂肪餌料と比較して、肝臓コレステロール濃度は低下するが、血清総コレステロールおよび HDL コレステロール濃度は増加傾向にあることを報告している¹⁴⁾。本研究と既報¹⁴⁾ から、カキ肉エキスの給餌は、ラットの血清総コレステロール濃度を増加させる作用を有している可能性がある。今後、カキ肉エキスの給餌による血清総コレステロール濃度上昇の作用機序を明らかにする必要がある。血清 PL 濃度について、HF 群と比較して、HFOE 群で有意に増加した。HDL 粒子は、

PL を多く含むリポタンパク質である。HFOE 群で HDL コレステロール濃度の上昇が認められているため、HDL 粒子の増加が HFOE 群の血清 PL 濃度の上昇に関与していると考えられる。血清 NEFA 濃度は、高脂肪餌料を給餌している HF および HFOE 群で LF 群と比較して有意に増加した。高脂肪食は血中 NEFA 濃度の上昇を招くことが知られているため¹⁵⁾、HF および HFOE 群で見られた血清 NEFA 濃度の上昇は、高脂肪餌料の影響と考えられる。血清 AST、ALT および CE-OOH 値については、実験群間で有意差は確認されなかった。肝臓の TG およびコレステロール濃度において、高脂肪餌料である HF 群および HFOE 群で LF 群と比較して、有意な増加が見られた。一方、肝臓 PL 濃度は、各群間で有意な差は認められなかった。

Fig. 1 に門および科の分類階級別の盲腸内細菌叢の構成比率を示した。門および科ともに、LF 群において構成比

Table 3 Serum and liver lipid parameters in rats fed experimental diets for 4 weeks

	Groups		
	LF	HF	HFOE
Serum components			
AST (IU/L)	71.3 ± 3.5	70.3 ± 3.0	72.0 ± 5.1
ALT (IU/L)	40.3 ± 1.8	39.0 ± 3.7	36.2 ± 1.9
TG (mg/dL)	63.0 ± 11.1 ^a	74.2 ± 5.7 ^{ab}	102.0 ± 10.5 ^b
PL (mg/dL)	145 ± 4 ^{ab}	133 ± 5 ^a	163 ± 6 ^b
Total-cholesterol (mg/dL)	74.5 ± 2.1 ^a	75.8 ± 3.1 ^a	97.0 ± 5.8 ^b
HDL-cholesterol (mg/dL)	53.0 ± 1.9 ^{ab}	44.2 ± 2.9 ^a	55.3 ± 3.4 ^b
NEFA (mEq/L)	217 ± 12 ^a	370 ± 18 ^b	368 ± 26 ^b
CE-OOH (μmol/L)	1.04 ± 0.33	0.77 ± 0.25	0.88 ± 0.24
Liver lipid content (mg/g Liver)			
TG	45.8 ± 4.7 ^a	191.3 ± 8.3 ^b	195.7 ± 10.6 ^b
PL	11.7 ± 0.6	11.6 ± 0.6	9.7 ± 0.6
Cholesterol	5.19 ± 0.57 ^a	10.9 ± 0.59 ^b	12.47 ± 0.87 ^b

Data represent means ± SEM (n = 6). Values in the same row not sharing a common superscript are significantly different at $p < 0.05$ using Tukey's multiple comparison test.

ALT, alanine aminotransferase; AST, aspartate aminotransferase; CE-OOH, cholesteryl ester hydroperoxides; HDL, high-density lipoprotein; NEFA, non-esterified fatty acid; PL, phospholipid; TG, triacylglycerol.

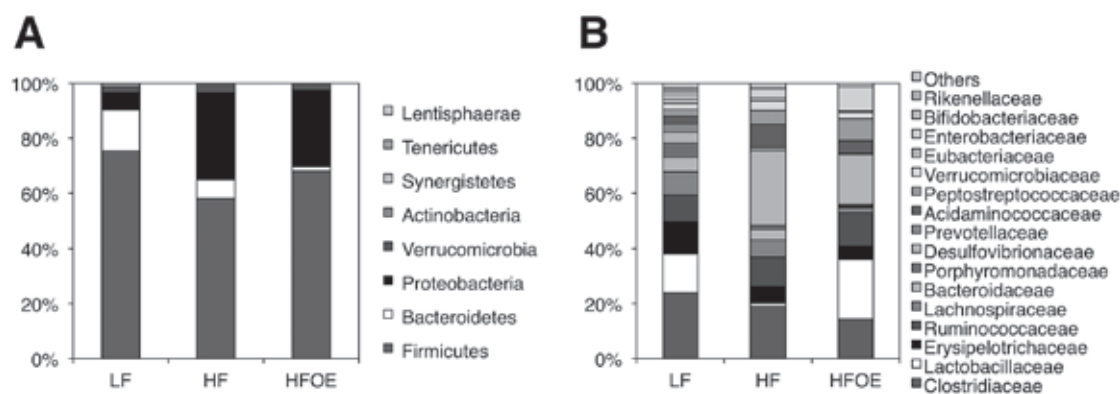


Fig. 1 Relative abundance of gut bacteria in rat cecal contents at phylum and family levels

A) At the phylum level. B) At the family level.

The numbers of rats in the LF, HF, and HFOE groups were 3, 5, and 5, respectively. At the family level, families less than 0.1% were included in "Others".

率の高いものから積み上げて示した。また、科における構成比率では0.1%未満の科はOthersに含めた。門における構成比率を見ると、Firmicutes, BacteroidetesおよびProteobacteria門で95%が構成されていた。これまでに高脂肪餌料をマウスに給餌すると、FirmicutesとProteobacteria門に分類される腸内細菌が増加し、Bacteroidetes門に分類される菌が減少することが報告されている¹⁶⁾。高脂肪餌料を与えたHF群では、LF群と比較して、Proteobacteria門の構成比率において有意な変化が見られたが、FirmicutesとBacteroidetes門の構成比率には有意な変化は見られなかった。門における構成比率では、HFおよびHFOE群間の各細菌の構成比率に統計的有意差は確認できなかった。

科における構成比率において、LF群で最も高い科はClostridiaceae科(LF, HF, HFOE群において、それぞれ24.0, 19.0, 14.3%)であった。しかし、各群間で有意な差は見られなかった。LF群で次に多い科はLactobacillaceae科(LF, HF, HFOE群において、それぞれ14.0, 1.1, 21.6%)であった。Lactobacillaceae科の構成比率は、LF群と比較して、HF群で有意な低下が見られたが、HFOE群では有意な差は見られなかった。Lecomteらは、ラットに高脂肪餌料を与えた場合、通常餌料と比較して、Lactobacillaceae科の構成比率が著しく低下することを報告している¹⁷⁾。本研究においても、HF群でLF群と比較して、Lactobacillaceae科の構成比率が有意に低下していた。一方、HF餌料にカキ肉エキスを混合したHFOE餌料を給餌した場合、HF群で見られたLactobacillaceae科の構成比率の低下が見られなかった。このLactobacillaceae科には、プロバイオティクスとして用いられている*Lactobacillus*属が含まれている。そこでFig.2に、Lactobacillaceae科に分類される*Lactobacillus*と*Lactococcus*属の属における構成比率を示した。*Lactobacillus*属の構成比率において、LF群と比較して、HF群では有意に低下したが、HFOE群では有意な変化は見られなかった。一方、*Lactococcus*属の構成比率は、*Lactobacillus*属よりも2桁小さく、さらに各群間の変化も見られなかった。そのためカキ肉エキスには、

高脂肪餌料の給餌によって生じるLactobacillaceae科、特に*Lactobacillus*属の構成比率の低下を抑制する働きがあると考えられる。これまでに、乳酸菌は抱合型胆汁酸の脱抱合を促進することによって胆汁酸の再吸収を抑制する働きをもつため、腸内の乳酸菌構成比率と血清総コレステロール濃度は逆相関することが報告されている^{18,19)}。しかし、HFOE群はHF群と比較して、血清総コレステロール濃度と*Lactobacillus*属の構成比率ともに増加する結果であり、既報¹⁹⁾の結果と異なっていた。そのためHFOE群で見られた*Lactobacillus*属の構成比率の増加に寄与した細菌が胆汁酸の脱抱合作用を有しているか調べるために種の同定を試みた。しかし、本研究で用いた16S rRNAアンプリコンシーケンスでは、理論上の部分配列から種を特定することは不可能であった。そのため、HFOE群で見られた*Lactobacillus*属の構成比率の増加に寄与した種の同定は叶わなかった。今後、16S rRNA遺伝子の全長の塩基配列を解析し、種の同定を行う必要がある。

以上のとおり、カキ肉エキスの給餌は、高脂肪餌料の給餌によって低下する盲腸内*Lactobacillus*属の構成比率を上昇させる働きを有することが示唆された。

参考文献

- 1) 松田芳和 (2008) 牡蠣亜鉛の性質とその栄養有効性. ミネラルの科学と最新応用技術 (糸川嘉則). シーエムシー出版, 東京: pp. 124-135.
- 2) 吉田宗弘, 平田登, 木谷祥子, 松田芳和 (2002) 牡蠣から調製した亜鉛濃縮物の性質. 微量栄養素研究 19: 43-46.
- 3) 辻貴之, 菊池祐子, 中塚千晶, 木谷祥子, 福永健治, 西山利正, 松田芳和, 吉田宗弘 (2001) 牡蠣の酸可溶性画分に含有される亜鉛の栄養有効性. 微量栄養素研究 18: 63-66.
- 4) 久保道徳, 松田秀秋, 田村崇子, 高津政雄 (1980) バランスター [カキ *Crassostrea gigas* (THUNBERG) の肉エキス] の実験的肝障害に対する予防および肝機能改善作用. 基礎と臨床 14: 1437-1442.
- 5) 松田芳和, 出田祐久, 藤田忠義, 太田隆男, 中塚正博, 吉野昌孝, 柴田幸雄 (1994) 糖尿病・肝臓病患者に対するかき肉エキスの影響. 微量栄養素研究 12: 91-97.
- 6) Hosomi R, Matsuda Y, Ishimaru A, Takemura S, Fukunaga K, Yoshida M (2007) Effect of dietary oyster extract on the colonic aberrant crypt foci in mice. Trace Nutrients Research 24: 71-75.
- 7) Hosomi R, Matsuda Y, Watanabe Y, Fukunaga K, Yoshida M (2008) Effect of dietary oyster extract on the p-aminophenol-induced nephrotoxicity in rats. Trace Nutrients Research 25: 91-95.
- 8) Wu GD, Chen J, Hoffmann C, Bittinger K, Chen

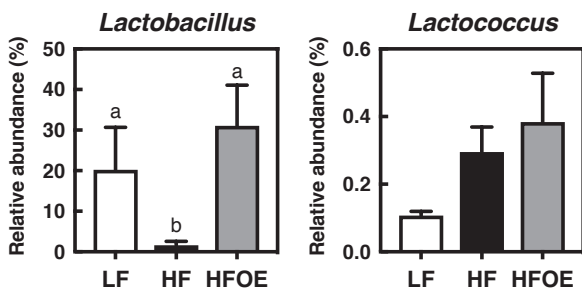


Fig. 2 Relative abundance of *Lactobacillus* and *Lactococcus* in rat cecal contents
Data represent means \pm SEM. Values not sharing a common letter are significantly different at $p < 0.05$ using Tukey's multiple comparison test.
The numbers of rats for LF, HF, and HFOE groups are 3, 5, and 5, respectively.

- YY, Keilbaugh SA, Bewtra M, Knights D, Walters WA, Knight R, Sinha R, Gilroy E, Gupta K, Baldassano R, Nessel L, Li H, Bushman FD, Lewis JD (2011) Linking long-term dietary patterns with gut microbial enterotypes. *Science* 334: 105–108.
- 9) Ridlon JM, Kang DJ, Hylemon PB, Bajaj JS (2014) Bile acids and the gut microbiome. *Curr Opin Gastroenterol* 30: 332–338.
- 10) Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC Jr (1993) AIN-93 purified diets for laboratory rodents: Final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr* 123: 1939–1951.
- 11) Arai H, Terao J, Abdalla DS, Suzuki T, Takama K (1996) Coulometric detection in high-performance liquid chromatographic analysis of cholesteryl ester hydroperoxides. *Free Radic Biol Med* 20: 365–371.
- 12) Bligh EG, Dyer WJ (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* 37: 911–917.
- 13) Marques C, Meireles M, Norberto S, Leite J, Freitas J, Pestana D, Faria A, Calhau C (2015) High-fat diet-induced obesity Rat model: a comparison between Wistar and Sprague-Dawley Rat. *Adipocyte* 5: 11–21.
- 14) Matsudo A, Nishimura N, Hosomi R, Harumatsu S, Fukuda S, Matsuda Y, Yoshida M, Fukunaga K (2016) Dietary Oyster-Extract Decreases Cholesterol Content by Suppressing hepatic HMG-CoA Reductase mRNA Expression Level and Enhancing Fecal Steroids Excretions in Rats Fed High-Fat Diet. *Trace Nutrients Research* 33: 43–48.
- 15) Rebuffé-Scrive M, Anderson B, Olbe L, Björntorp P (1990) Metabolism of adipose tissue in intraabdominal depots in severely obese men and women. *Metabolism* 39: 1021–1025.
- 16) Hildebrandt MA, Hoffmann C, Sherrill-Mix SA, Keilbaugh SA, Hamady M, Chen YY, Knight R, Ahima RS, Bushman F, Wu GD (2009) High-fat diet determines the composition of the murine gut microbiome independently of obesity. *Gastroenterology* 137: 1716–1724.
- 17) Lecomte V, Kaakoush NO, Maloney CA, Raipuria M, Huinao KD, Mitchell HM, Morris MJ. (2015) Changes in gut microbiota in rats fed a high fat diet correlate with obesity-associated metabolic parameters. *PLoS One* 10: e0126931.
- 18) De Smet I, Van Hoorde L, Vande Woestyne M, Christiaens H, Verstraete W (1995) Significance of bile salt hydrolytic activities of lactobacilli. *J Appl Bacteriol* 79: 292–301.
- 19) Panasevich MR, Schuster CM, Phillips KE, Meers GM, Chintapalli SV, Wankhade UD, Shankar K, Butteiger DN, Krul ES, Thyfault JP, Rector RS (2017) Soy compared with milk protein in a Western diet changes fecal microbiota and decreases hepatic steatosis in obese OLETF rats. *J Nutr Biochem* 46: 125–136.