

ISSN 2436-7362

**JOURNAL
OF
GERMFREE LIFE
AND
GNOTOBIOLOGY**
無菌生物

Vol. 53

No. 2

2023

無 菌 生 物

J. germfree life gnotobiol.

日本無菌生物ノートバイオロジー学会

JAPANESE ASSOCIATION OF GERMFREE LIFE AND GNOTOBIOLOGY

無菌生物

Vol. 53, No. 2 Dec. 1 2023

編集委員会

神谷 茂
白川 仁
大崎 敬子

印刷所
事務所

共立印刷株式会社
日本無菌生物ノートバイオロジー学会
〒210-0821 神奈川県川崎市川崎区殿町3-25-12
公益財団法人実験動物中央研究所内
小倉 智幸 (おぐら ともゆき)
TEL (044)201-8520 内線1325
FAX (044)201-8521

発行所

杏林大学医学部感染症学講座
大崎 敬子 (おおさき たかこ)

JOURNAL OF GERMFREE LIFE AND GNOTOBIOLOGY

Vol. 53, No. 2 Dec. 1 2023

Editorial and Publications Committee

SHIGERU KAMIYA MD PhD

HITOSHI SHIRAKAWA PhD

TAKAKO OSAKI PhD

Japanese Association of Germfree Life and Gnotobiology

c/o Tomoyuki Ogura

Central Institute for Experimental Animals

3-25-12 Tonomachi, Kawasaki-ku, Kawasaki, 210-0821 Japan

TEL +81-44-201-8520extension1325

FAX +81-44-201-8521

E-mail jagg@ciea.or.jp

Department of Infectious Diseases
Kyorin University School of Medicine
Dr Takako Osaki

クローン病における腸管線維化と腸内細菌の関連

今井 仁^{* **} 津川 仁^{***} 鈴木 秀和^{**} 西崎 泰弘^{*} 穂積 勝人^{***}
(*東海大学医学部健康管理学, **東海大学医学部消化器内科学, ***東海大学医学部生体防御学)

要 旨：炎症性腸疾患のうちクローン病は線維性の腸管狭窄を起こすことが知られている。近年、抗TNF- α 抗体を中心とした新規分子生物学的製剤の登場により、急性期での炎症のコントロールは比較的可能になってきた。しかし、そうした薬剤に反応しない線維化に至った腸管病変については、外科手術や内視鏡的な拡張術のみ行われているのが現状であり、再発の多さが課題となっている。最近、メタゲノム解析技術の進歩から疾患特異的な腸内細菌叢が注目されている中、クローン病に特徴的な腸内細菌として腸管粘膜上皮に接着し上皮細胞内に侵入する Adherent-invasive *Escherichia coli* (AIEC) という細菌が新たに発見された。この細菌の保菌者では術後の再狭窄が発生しやすいとの報告がなされ、今後の新たな治療ターゲットとしても注目されている。この総説では、クローン病における AIEC と腸管線維化に関する知見と今後の展望について紹介する。

キーワード：炎症性腸疾患、クローン病、腸管狭窄、線維化、Adherent-invasive *Escherichia coli* (AIEC)

1. クローン病における腸管線維性狭窄

炎症性腸疾患 (Inflammatory bowel disease; IBD) は主に潰瘍性大腸炎 (Ulcerative colitis; UC) とクローン病 (Crohn's disease; CD) を指す難病指定疾患である。どちらも明らかな病因は同定されておらず、環境要因、遺伝的要因などが複雑に混在し発症に至るとされている。2010年以降、IBD に対して抗 TNF- α 抗体を中心とする炎症性サイトカインを狙った生物学的製剤が新規に登場し、従来のステロイド療法ではコントロールできなかった急性期の病態も大幅に改善できるようになった。しかし、CD は腸管の全層炎症を特徴とする疾患で、腸管合併症の頻度も高い。中でも、小腸病変を有する症例は、診断から10年の間に約50%程度が瘻孔や狭窄といった合併症を起こすことが知られており¹、狭窄・瘻孔だけでなく、出血や膿瘍なども含め、全 CD 患者のうち約半数が診断から10年以内に手術適応となっている²。しかし、術後の再狭窄のリスクは高く³、また狭窄部に対する内視鏡的拡張術は、本邦のデータにおいても短期成績は良好だが⁴、長期成績では再狭窄の頻度が約2-3年で50%となっている⁵。このように、CD の腸管線維性狭窄は、薬物治療では改善しにくく、治療に難渋する病変としてとらえられており、新たな治療戦略が望まれている。

2. 腸内細菌叢と腸管線維化

近年、メタゲノム解析技術の著しい進歩により、腸管内には多種多様で無数の細菌が定着し、直接、あるいはその代謝産物が免疫系を介して宿主の健康維持に寄与し、腸内細菌叢の変容 (dysbiosis) が様々な疾患と関係していることが明らかになってきた。IBD においても腸内細菌叢の大きな変容が知られている⁶。では、IBD における dysbiosis は、腸管内炎症の原因であるのか、結果であるのか。この疑問に対して、Kamada らは無菌マウスに IBD 患者の腸内細菌を定着させる手法を確立し、同マウスの腸管では炎症を惹起する遺伝子発現の亢進を見出し、さらに IL-10ノックアウト無菌マウスに CD 患者の便を移植すると腸炎が悪化することを報告している⁷。このことから、dysbiosis が宿主である患者の免疫能や病態に影響を与えている可能性が示唆される。

CD の腸管線維性狭窄は、特に回腸末端に好発し、慢性炎症による組織損傷の修復に伴い発生するとされているが、慢性炎症を惹起・持続する要因の存在が示唆された。1998年、CD の腸管から、粘膜上皮に接着侵入する能力を有する接着性侵入性大腸菌 (Adherent-invasive *Escherichia coli*; AIEC) の分離に成功した報告が欧州よりあり⁸、さらには線維性狭窄の好発部位である回腸末端から特に高頻度で検出されることが続け

て報告された⁹。この報告を受け、韓国¹⁰やブラジル¹¹など世界各国でも分離されることが分かり、さらに、小児の症例でも保菌の存在が明らかになった¹²。その保菌率は、国々で程度の差はあるが、おおよそ20-40%前後と推測される。一方で、CDの腸管線維性狭窄の発症率が約40%で、かつAIECが分離同定されやすい回腸末端に好発する点を踏まえ、筆者らは、AIECが腸管の慢性炎症を持続させ腸管線維化に寄与する可能性を検討した。その結果、AIECを感染させたマウスに軽微な慢性炎症を付加すると腸管線維化が明確に増悪することが示された¹³。そして、この現象はAIECの表面抗原のうちflagellinを介し、他の臓器の線維化との相関が示されているIL-33/ST2 signalに依存することも示された¹³。さらに、血清中のflagellin抗体(anti-CBir1 flagellin)が健常人やUCに比してCD患者で上昇しており¹⁴、特に合併症のあるCDにおいて著明に上昇することが報告されている¹⁵。一方で、実臨床でのAIEC保菌者のエビデンスは乏しく、わずかに入院率が高い傾向にあるという程度であったが¹⁰、2023年になり興味深い報告がなされた。CDの腸管狭窄の手術検体でAIEC保菌の有無を調べ、6か月後の術後再狭窄の頻度を内視鏡で調べたコホート研究の結果、AIEC保菌者の方が術後再狭窄のリスクが高いことが示された¹⁶。この報告により、AIECの存在がCDの病態に明確に影響すること、中でも、腸管線維化に関与することが強く示唆された。これらの知見は、「肝硬変における肝炎ウイルス」のように、臓器線維化における原因(の1つ)が同定されたとも考えられ、今後の治療展開において大きな進歩となるかもしれない。IL-33 signal阻害、AIECを狙った単細菌治療やflagellinに対する特異的な治療などの展望が期待される。

実際に世界では、AIECを治療標的としたいくつかのプロジェクトがすでに進行している。EcoActive™と呼ばれるバクテリオファージを用いた*in vivo*の検討では、1回投与では効果が乏しかったが複数回投与によってAIEC感染腸炎マウスの改善が見られた¹⁷。これは健常マウスの投与での安全性とdysbiosisの誘導がな

いことも示されている。さらに、AIECが上皮細胞への接着侵入に使用するFimHと呼ばれるType1線毛の先端にある付着因子を標的としたFimH antagonistも注目されている¹⁸。ヒトCD腸管生検組織を用いた*ex vivo*の検討では、FimH antagonistがAIECの接着侵入の阻害能を有することが示され、現在、小化合物製剤として欧米で臨床試験が進められている¹⁹。近年、本邦でも注目されているIBDに対する糞便移植療法においても、腸内細菌叢へのドラスティックな変化を考慮すれば、線維化を誘導するAIECを減少させる可能性もあり、検討の余地がある。

筆者らも、AIECの長期感染マウスモデルにて、AIECに対する特異的なIgA抗体が誘導されること、この抗体は非病原性大腸菌とAIECを識別し、かつ、AIECの粘膜上皮細胞への接着侵入を阻害することを報告している²⁰。現在この抗体のモノクローナル抗体を作出し、保菌者の診断・抗AIEC治療へと臨床応用につなげていきたいと考えている。

3. 結語

現在、CDに対する治療薬が分子標的薬を中心に次々と開発されており、ますます急性期の治療成績は向上していくと考える。一方で、先述の通り現状では腸管線維性狭窄に対する治療成績はまだ改善の余地が多い。CD患者のQOLを考慮すれば、今後は、CDの治療方針はいかに活動期を抑え込むかに注視するのみならず、線維性狭窄を予測し、早く診断して治療を行い、真のmucosal healingを達成することを加味したものにしていかなければならない。そのためには、例えば、常に腸内細菌に暴露されている腸管という特殊な環境下での線維化のメカニズムを深く理解すること、腸管内ガスと隣り合わせの中での正確な画像診断が問われること、副作用を減らした抗線維化治療を実現するかなど、課題も多い。その中でも、今回述べたAIECの研究は大きなブレイクスルーになる可能性を秘めている。腸管線維性狭窄は今後ますます研究の発展が期待される分野となっていると考える。

Association of intestinal fibrosis and gut microbiota in Crohn's disease

JIN IMAI^{*,**}, HITOSHI TSUGAWA^{***}, HIDEKAZU SUZUKI^{**},
YASUHIRO NISHIZAKI^{*} and KATSUTO HOZUMI^{***}

**Department of Clinical Health Science, Tokai University School of Medicine, Isehara*

***Department of Gastroenterology, Tokai University School of Medicine, Isehara*

****Transkingdom Signaling Research Unit, Division of Host Defense Mechanism, Tokai University School of Medicine, Isehara*

Crohn's disease is known to cause fibrotic intestinal stenosis. By use of novel molecular biological agents, mainly anti-TNF- α antibodies, the control of the acute phase of inflammation has become relatively achievable. However, for lesions with prominent fibrosis that do not respond to such agents, only surgical or endoscopic dilatation has been performed, and recurrence is still a common problem. Recently, advances in metagenomic analysis have focused attention on disease-specific gut microbiota and the Adherent-invasive *Escherichia coli* (AIEC), which adheres to the intestinal mucosal epithelium and invades the mucosa, has been found as a characteristic bacteria of Crohn's disease. It has been reported that postoperative intestinal fibrosis is more likely to occur in carriers of AIEC, and it is also considered to be a new therapeutic target in the treatment of Crohn's disease. This review will tidy up their knowledge and present the prospects for intestinal fibrosis in Crohn's disease.

References

1. COSNES, J., GOWER-ROUSSEAU, C., SEKSIK, P. & CORTOT, A.: Epidemiology and natural history of inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology*, **140**, 1785-1794, 2011.
2. PEYRIN-BIROULET, L., LOFTUS, E., V., Jr., COLOMBEL, & SANDBORN, W., J.: The natural history of adult Crohn's disease in population-based cohorts. *Am J Gastroenterol*, **105**, 289-297, 2010.
3. MORAR, P., S., FAIZ, O., WARUSAVITARNE, J., BROWN, S., COHEN, R., HIND, D., ABERCROMBIE, J., RAGUNATH, K., SANDERS, D., S., ARNOTT, I., WILSON, G., BLOOM, S. & AREBI, N. : Systematic review with meta-analysis: endoscopic balloon dilatation for Crohn's disease strictures. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, **42**, 1137-1148, 2015.
4. HIRAI, F., ANDOH, A., UENO, F., WATANABE, K., OHMIYA, N., NAKASE, H., KATO, S., ESAKI, M., ENDO, Y., YAMAMOTO, H., MATSUI, T., IIDA, M., HIBI, T., WATANABE, M., SUZUKI, Y. & MATSUMOTO, T. : Efficacy of endoscopic balloon dilation for small bowel strictures in patients with Crohn's disease: A nationwide, multi-centre, open-label, prospective cohort study. *Journal of Crohn's & Colitis*, **12**, 394-401, 2018.
5. TAIDA, T., NAKAGAWA, T., OHTA, Y., HAMANAKA, S., OKIMOTO, K., SAITO, K., MARUOKA, D., MATSUMURA, T., ARAI, M., KATSUNO, T. & KATO, N. : Long-term outcome of endoscopic balloon dilatation for strictures in patients with Crohn's disease. *Digestion*, **98**, 26-32, 2018.
6. IMAI, J., KITAMOTO, S. & KAMADA, N. : The pathogenic oral-gut-liver axis: new understandings and clinical implications. *Expert Review of Clinical Immunology*, **17**, 727-736, 2021.
7. NAGAO-KITAMOTO, H., SHREINER, A., B., GILLILLAND, M., G., 3rd, KITAMOTO, S., ISHII, C., HIRAYAMA, A., KUFFA, P., EL-ZAATARI, M., GRASBERGER, H., SEEKATZ, A., M., HIGGINS, P., D., YOUNG, V., B., FUKUDA, S., KAO, J., Y. & KAMADA, N. : Functional characterization of inflammatory bowel disease-associated gut dysbiosis in gnotobiotic mice. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*, **2**, 468-481, 2016.
8. DARFEUILLE-MICHAUD, A., NEUT, C., BARNICH, N., LEDERMAN, E., Di MARTINO, P., DESREUMAUX, P., GAMBIEZ, L., JOLY, B., CORTOT, A. & COLOMBEL, J., F. : Presence of adherent *Escherichia coli* strains in ileal mucosa of patients with Crohn's disease. *Gastroenterology*,

- 115, 1405-1413, 1998.
9. DARFEUILLE-MICHAUD, A., BOUDEAU, J., BULOIS, P., NEUT, C., GLASSER, A., L., BARNICH, N., BRINGER, M., A., SWIDSINSKI, A., BEAUGERIE, L. & COLOMBEL, J., F. : High prevalence of adherent-invasive *Escherichia coli* associated with ileal mucosa in Crohn's disease. *Gastroenterology*, **127**, 412-421, 2004.
 10. LEE, J., G., HAN, D., S., JO, S., V., LEE, A., R., PARK, C., H., EUN, C., S. & LEE, Y.: Characteristics and pathogenic role of adherent-invasive *Escherichia coli* in inflammatory bowel disease: Potential impact on clinical outcomes. *PLoS One*, **14**, e0216165, 2019.
 11. COSTA, R., F., A., FERRARI, M., L., A., BRINGER, M., A., DARFEUILLE-MICHAUD, A., MARTINS, F., S. & BARNICH, N. : Characterization of mucosa-associated *Escherichia coli* strains isolated from Crohn's disease patients in Brazil. *BMC Microbiology*, **20**, 178, 2020.
 12. CONTE, M., P., LONGHI, C., MARAZZATO, M., CONTE, A., L., ALEANDRI, M., LEPANTO, M., S., ZAGAGLIA, C., NICOLETTI, M., ALOI, M., TOTINO, V., PALAMARA, A., T. & SCHIPPA, S. : Adherent-invasive *Escherichia coli* (AIEC) in pediatric Crohn's disease patients: phenotypic and genetic pathogenic features. *BMC Research Notes*, **7**, 748, 2014.
 13. IMAI, J., KITAMOTO, S., SUGIHARA, K., NAGAO-KITAMOTO, H., HAYASHI, A., MORHARDT, T., L., KUFFA, P., HIGGINS, P., D., R., BARNICH, N. & KAMADA, N. : Flagellin-mediated activation of IL-33-ST2 signaling by a pathobiont promotes intestinal fibrosis. *Mucosal Immunology*, **12**, 632-643, 2019.
 14. LODES, M., J., CONG, Y., ELSON, C., O., MOHAMATH, R., LANDERS, C., J., TARGAN, S., R., FORT, M. & HERSHBERG, R., M. : Bacterial flagellin is a dominant antigen in Crohn disease. *The Journal of Clinical Investigation*, **113**, 1296-1306, 2004.
 15. TARGAN, S., R., LANDERS, C., J., YANG, H., LODES, M., J., CONG, Y., PAPADAKIS, K., A., VASILIAUSKAS, E., ELSON, C., O. & HERSHBERG, R., M. : Antibodies to CBir1 flagellin define a unique response that is associated independently with complicated Crohn's disease. *Gastroenterology*, **128**, 2020-2028, 2005.
 16. BUISSON, A., SOKOL, H., HAMMOUDI, N., NANCEY, S., TRETON, X., NACHURY, M., FUMERY, M., HÉBUTERME, X., RODRIGUES, M., HUGOT, J., P., BOSCHETTI, G., STEFANESCU, C., WILS, P., SEKSIK, P., LE, BOURHIS, L., BEZAULT, M., SAUVANET, P., PEREIRA, B., ALLEZ, M. & BARNICH, N.: Role of adherent and invasive *Escherichia coli* in Crohn's disease: lessons from the postoperative recurrence model. *Gut*, **72**, 39-48, 2023.
 17. TITÉCAT, M., ROUSSEAU, C., DUBUQUOY, C., FOLIGNÉ, B., RAHMOUNI, O., MAHIEUX, S., DESREUMAUX, P., WOOLSTON, J., SULAKVELIDZE, A., WANNERBERGER, K. & NEUT, C.: Safety and efficacy of an AIEC-targeted bacteriophage cocktail in a mice colitis model. *Journal of Crohn's & Colitis*, **16**, 1617-1627, 2022.
 18. SPAULDING, C., N., KLEIN, R., D., RUER, S., KAU, A., L., SCHREIBER, H., L., CUSUMANO, Z., T., DODSON, K., W., PINKNER, J., S., FREMONT, D., H., JANETKA, J., W., REMAUT, H., GORDON, J., I. & HULTGREN, S., J. : Selective depletion of uropathogenic *E. coli* from the gut by a FimH antagonist. *Nature*, **546**, 528-532, 2017.
 19. CHEVALIER, G., LAVEISSIÈRE, A., DESACHY, G., BARNICH, N., SIVIGNON, A., MARESCA, M., NICOLETTI, C., PASQUALE, E., Di, MARTINEZ-MEDINA, M., SIMPSON, K., W., YAJNIK, V., SOKOL, H., PLASSAIS, J., STROZZI, F., CERVINO, A., MORRA, R. & BONNY, C. : Blockage of bacterial FimH prevents mucosal inflammation associated with Crohn's disease. *Microbiome*, **9**, 176, 2021.
 20. TANAKA, R., IMAI, J., TSUGAWA, H., EAP, K., B., YAZAWA, M., KANEKO, M., OHNO, M., SUGIHARA, K., KITAMOTO, S., NAGAO-KITAMOTO, H., BARNICH, N., MATSUSHIMA, M., SUZUKI, T., KAGAWA, T., NISHIZAKI, Y., SUZUKI, H., KAMADA, N., & HOZUMI, K. : Adherent-invasive *E. coli* - induced specific IgA limits pathobiont localization to the epithelial niche in the gut. *Frontier in Microbiology*, **14**, <https://doi.org/10.3389/fmicb.1031997>, 2023.

第56回 日本無菌生物ノートバイオロジー学会総会

(承 前)

The Fifty-sixth Annual Meeting of
The Japanese Association of Germfree Life and Gnotobiology

January 21-22, 2023

Isehara

President *Makoto Onizuka*

会 長 鬼 塚 真 仁
会 期 2023年（令和5年）1月21日（土）・22日（日）
会 場 東海大学・松前記念講堂・オンライン開催併用

一般演題 セッション I

座長 高橋 志達
(ミヤリサン製薬株式会社)

1. 陽圧完全密閉式個別換気ラックを使用した無菌マウスの飼育…………… 30
石倉知征, 松田正史
(国立研究開発法人理化学研究所生命医科学研究センター (IMS))
2. 新生仔の鼻腔炎症が腸内細菌叢に及ぼす影響…………… 32
浅野妃南*, 三島由祐子**, 大崎敬子***, 石井さなえ**
(*杏林大学大学院保健学研究科, **杏林大学保健学部臨床検査技術学科, ***杏林大学医学部感染症学)
3. 発酵小麦ふすまの摂取は糞便中の短鎖脂肪酸を増加させ DSS 誘発性大腸炎の改善する …… 35
Afifah Zahra Agista, 大崎雄介, 駒井三千夫, 白川 仁
(東北大学大学院農学研究科栄養学分野)
4. 造影 X 線検査による無菌コモンマーモセットの盲腸の形態評価 …… 37
井上貴史
(実験動物中央研究所マーモセット医学生物学研究部)
5. 新しいブタ用アイソレーターの特長と Germ-Free マイクロミニピッグの解剖学的評価 …… 39
大竹正剛
(静岡県畜産技術研究所中小家畜研究センター)

一般演題 セッションII

座長 鬼塚真仁
(東海大学)

6. 炎症性腸疾患における病原性共生菌へのIgA応答と臨床応用…………… 41
今井 仁^{***}, 穂積勝人^{***}
(*東海大学医学部健康管理学, **東海大学医学部消化器内科学, ***東海大学医学部生体防御学)
7. 腸内細菌叢の攪乱による攻撃行動特性の比較…………… 43
花輪球太^{*}, 渡邊己弦^{**}, 三上克央^{**}
(*東海大学医学部医学研究科先端医科学, **東海大学医学部総合診療系精神科学)
8. 異なる脂肪酸の摂取条件が食品抗原を介した免疫応答に与える影響…………… 45
吉村美和, 津田真人, 細野 朗
(日本大学生物資源科学部食品生命機能学研究室)
9. 薬剤耐性プラスミドの接合伝達に対するフラボフォスフォリポールの活性評価…………… 47
工藤逸美^{***}, 岡 健太郎^{**}, 高橋志達^{**}
(*酪農学園大学獣医学群食品衛生学ユニット, **ミヤリサン製薬株式会社研究開発本部研究部)
10. 酪酸によるT細胞を介した抗腫瘍免疫応答の誘導…………… 49
山田裕貴, 丹羽みずほ, 北原秀悟, 岡 健太郎, 林 篤史, 高橋志達
(ミヤリサン製薬株式会社研究開発本部)

陽圧完全密閉式個別換気ラックを使用した無菌マウスの飼育

石倉 知征 松田 正史

(国立研究開発法人理化学研究所生命医科学研究センター (IMS))

I. 目的

当研究センターでは2005年から重度の免疫不全マウス飼育に伴い、ビニールアイソレーターを導入した。その後、腸内細菌が健康や寿命に深く関わっていることが明らかになってきたことから、無菌マウスやノトバイオームマウスを用いた研究への需要が高まり、2010年から無菌マウスの維持管理を、2014年から無菌マウス作製をセンターの支援業務に導入している。無菌マウスは誰でも簡単に維持管理できるものではなく、無菌環境を維持するためにはビニールアイソレーター等の飼育器材が必要となる。それらを扱うためには十分な技術習得期間が必要である。そこで無菌マウス飼育維持の技術的な問題を軽減できないかと考え、ビニールアイソレーターに代わる無菌マウスの飼育方法の検討を行った。

II. 材料と方法

無菌マウス (C57BL/6NJcl, MCH (ICR) /Jcl (日本クレア株式会社)) を陽圧完全密閉式個別換気ラック (テクニプラスト・ジャパン株式会社) と過酸化水素ガス殺菌装置付きバイオクリーンベンチを用いて飼育 (1回/週のケージ交換) 及び繁殖試験を行った。無菌状態の確認はケージ交換時におけるグラム染色した新鮮糞便の顕微鏡検査 (鏡検) 及び1回/月の無菌検査 (鏡検および培地による培養検査) に

よって判定した。

III. 結果, 考察, 結論

①無菌マウスの飼育維持

無菌 C57BL/6NJcl の飼育の結果, 3ヶ月間, 鏡検および培地検査の何れも無菌状態を維持できた。

②無菌マウスの繁殖, 維持

無菌 C57BL/6NJcl メス1匹; オス1匹の交配の結果, 初産は7匹出産後, 全て喰殺したが, 2産目では7匹出産, 6匹 (メス3匹, オス3匹) が離乳まで成長した。

無菌 MCH (ICR) /Jcl (2腹) を妊娠期でケージに収容し, 1腹: 11匹出産, 11匹離乳 (メス8匹, オス3匹), 1腹: 12匹出産, 12匹離乳 (メス8匹, オス4匹) と産仔すべて離乳まで成長した。

試験開始から6ヶ月間, 計10ケージ全てにおいて無菌状態を維持できた。

本試験の結果, 飼育, 繁殖に問題なく, ビニールアイソレーターを使用しない無菌マウスの飼育維持方法の1つとなりうることがわかった。従来のビニールアイソレーターを用いる方法と比べて作業効率の面での煩雑さなど改善点はあるが, 従来法の技術未習得者にとっての代替法として有用であると考えられる。

Breeding of germ-free mice using an Individually Ventilated Caging System

TOMOYUKI ISHIKURA and MASASHI MATSUDA

RIKEN Center for Integrative Medical Sciences, Yokohama

We introduced vinyl isolators for breeding of severely immunodeficient mice in 2005.

Since then, the demand for research using germ-free (GF) mice and gnotobiotic (GB) mice increased, we started management of breeding GF mice and GB mice in 2010. Furthermore, we introduced generated GF mice into our support services in 2014.

Vinyl isolators have been generally used for breeding GF mice and GB mice. However, handling vinyl isolators requires long-term training and experience. Therefore, we examined a combination of an Individually Ventilated Caging System (IVC) and a clean bench with hydrogen peroxide gas sterilizer as an alternative to breeding GF mice using vinyl isolators.

We maintained and bred 10 cages of GF mice (C57BL/6N Jcl and MCH (ICR) / Jcl (CLEA Japan)) in IVC and changing cages in a clean bench weekly.

In all 10 cages, no microbiological contamination occurred for 6 months.

The results of this study suggest that this method is effective as one method of breeding GF mice, although there are still improvements to be made.

新生仔の慢性鼻腔炎症が腸内細菌叢に及ぼす影響

浅野 妃南* 大崎 敬子*** 石井 さなえ**

(*杏林大学大学院保健学研究科, **杏林大学保健学部臨床検査技術学科, ***杏林大学医学部感染症学)

要 旨: 腸内細菌叢が免疫, 代謝, 神経系を介し宿主と相互作用する脳-腸-免疫連関が注目されている。成体マウスを用いた先行研究では, 慢性鼻腔炎症が嗅球の萎縮と神経炎症に加え, 特に雄マウスにおいて腸内細菌叢のディスバイオーシスを起こすことを見出した。このことから, 慢性鼻腔炎症が脳-腸-免疫連関に影響すると考えた。そこで本研究では, 腸内細菌叢が形成される授乳期に慢性鼻腔炎症を起こすと腸内細菌叢は変化するのか, その変化は成体まで持続するのかを明らかにすることを目的とした。生後7日齢から週2回ずつ3週間, 雌雄マウスの両側鼻腔にリポ多糖を投与し, 慢性鼻腔炎症モデルとした。全投与終了後に離乳し, 離乳直後の4週齢と, 成体まで成長した10週齢の時点で, 糞と盲腸便の16S rRNAメタゲノム解析を行った。その結果, 授乳期の慢性鼻腔炎症により雌雄とも腸内細菌叢は変化した, その変化は成体までは持続しなかった。

キーワード: 慢性鼻腔炎症, 脳-腸-免疫連関, 新生仔, 腸内細菌叢

I. 背景と目的

近年, 腸内細菌叢が免疫, 代謝, 神経系を介して宿主と相互作用し, 脳機能にも影響を及ぼすという, 脳-腸-免疫連関が注目されている¹。例えば, 腸内細菌叢の乱れがうつ病などの精神疾患に関与する。また, 慢性鼻腔炎症の患者では, うつ病や不安障害などの精神疾患のリスクが高まり, 慢性鼻腔炎症マウスは不安を示すことから, 慢性鼻腔炎症が脳-腸-免疫連関に影響して, 脳機能を低下させる可能性が考えられる。先行研究では, 鼻腔炎症を起こした成体マウスでは, 末梢炎症細胞が脳に浸潤し神経炎症を起こすこと², 慢性鼻腔炎症を起こすと嗅球が萎縮すること³, そして特に雄マウスにおいて腸内細菌叢のディスバイオーシスが起ること⁴を示した。腸内細菌叢は, 出生時から形成され始め, 母親や環境の影響を受けて確立される。そこで, 本研究では, 腸内細菌叢の形成に重要な時期である授乳期に慢性的に鼻腔炎症を起こすと, 新生仔の腸内細菌叢は変化するのか, また, 変化した場合, それは成体に成長するまで持続するのかを明らかにすることを目的とした。

II. 対象と方法

C57BL/6マウスを使用した。マウスの場合, 生後3-4週間までが授乳期であるため, 生後7日齢から週

に2回ずつ3週間 (P7, P10, P14, P17, P21, P24), 雌雄マウスの両側鼻腔にリポ多糖 (LPS) もしくは生理食塩水を投与し, 慢性鼻腔炎症モデル及び対照群とした。投与開始から1週間毎に体重を測定し, 体重の変動を調べた。最終投与終了直後の4週齢と成体まで成長した10週齢の時点で組織学的解析と, 糞と盲腸便を用いた腸内細菌叢の16S rRNAメタゲノム解析を行った。同様の実験を3回繰り返した。新生仔は個体識別が困難なため, 投与期間中は雄のsaline投与群と雌のLPS投与群, 雄のLPS投与群と雌のsaline投与群の2グループに分け, それぞれ母マウスを2匹ずつ入れて飼育した。

III. 結果

組織学的解析の結果, LPS投与終了後, 4週齢の時点で, 雌雄とも嗅上皮中に好中球や単球が浸潤し, 炎症性サイトカインの発現が見られたため, 同程度に鼻腔炎症が起きていたことを確認した。10週齢になるまでに, 鼻腔炎症はほぼ回復した。

体重測定の結果, 授乳期間中は雌雄とも処置による体重の違いは見られなかった。しかし, 離乳後, 雌雄ともにsaline投与群に比べてLPS投与群では体重が低くなった。雄のLPS投与群では10週齢になるまで体重が有意に低いままだったが, 雌では6週齢でsaline投

与群に追いつき、差が見られなくなった。

bray-curtis および jaccard 指数を用いて細菌叢の β 多様性解析を行った結果、4週齢の糞と盲腸便において雌雄差、処置差が有意に見られた。しかし、1回目の実験では、同じ母マウスの元で飼育していた雄の saline 投与群と雌の LPS 投与群、雌の saline 投与群と雌の LPS 投与群の β 多様性がそれぞれ類似しており、母マウスによる差である可能性が考えられた (Figure 1)。そこで、2回目、3回目の実験では、毎週マウスを入れ替えて、母マウスによる差が生じないように飼育した。その結果、母マウスの影響を均等化しても、 β 多様性で雌雄差、処置差がともに見られた (Figure 2)。具体的に、どの細菌が変化していたのかは現在解析中である。さらに、10週齢まで成長したマウスの糞と盲腸便の β 多様性においては、雌雄差は見られたものの処置差は見られなかった。

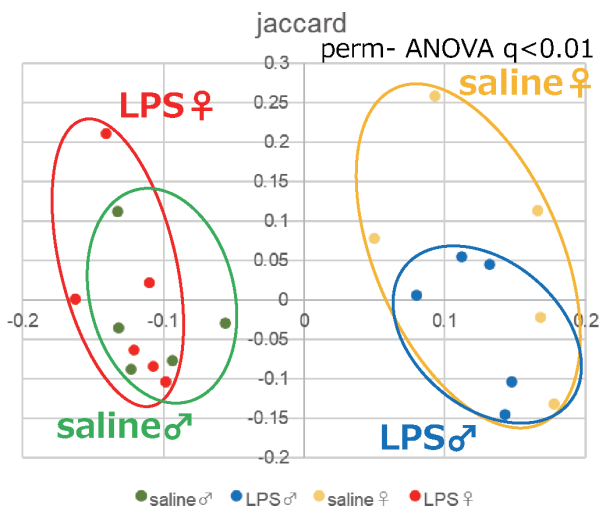


Figure 1 Analysis of microbiota from cecal contents of 4 groups of mice at 4 wks by principle component analysis (PCA) based on Jaccard dissimilarities before equalizing the influence of the mother.

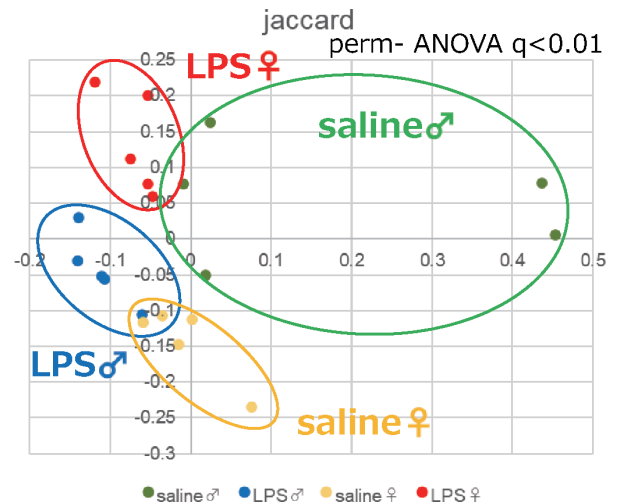


Figure 2 Analysis of microbiota from cecal contents of mice at 4 wks by principle component analysis (PCA) based on Jaccard dissimilarities after equalizing the influence of the mother.

IV. 考察

授乳期間中は仔マウスの体重に差が見られなかったことから、母マウスからの栄養は saline 投与群と LPS 投与群に同様に与えられたと考えられる。それにも関わらず、離乳後には、saline 投与群に比べて LPS 投与群では体重が低かったため、自力での摂食量が減少したと推測される。また、母マウスの影響を均等化した実験群においても、離乳直後の saline 投与群と LPS 投与群において腸内細菌叢の β 多様性に有意差が見られたため、新生仔の慢性鼻腔炎症は腸内細菌叢を変化させることが示唆された。

V. 結論

授乳期に慢性的に鼻腔炎症を起こすと、母マウスから同様に栄養が与えられていたにも関わらず、雌雄とも腸内細菌叢が変化したが、大人になるまではその変化は持続しなかった。

Chronic nasal inflammation during lactation period induces transient dysbiosis of gut microbiota in mice

HINAMI ASANO*, TAKAKO OSAKI*** and SANAE HASEGAWA-ISHII**

*Faculty of Health Sciences, Kyorin University School of Medicine, Tokyo

**Graduate School of Health Sciences, Kyorin University, Tokyo

***Department of Infectious Diseases, Kyorin University School of Medicine, Tokyo

Patients with chronic nasal inflammation have a higher risk for psychiatric disorders, and it becomes clearer that depression is associated with dysbiosis of gut microbiota. Thus, we speculated that chronic nasal inflammation might perturb the gut microbiota, leading to psychiatric disorders. Our previous study indicated that adult male, but not female, mice with chronic nasal inflammation changed the composition and abundance of gut microbiota. To address the question of whether chronic nasal inflammation induces dysbiosis of gut microbiota even in the lactation period, baby mice received intranasal administration of saline or LPS twice a week for 3 weeks (P7, P10, P14, P17, P21, P24), and were weaned at P24. Their gut microbiota were analyzed just after weaning (4-week-old) and at 10-week-old to examine whether potential dysbiosis would last during life if it happens in the lactation period. Body weight was measured once a week during the experiments. In the lactation period, the body weight was similar in saline- and LPS-treated mice in male and female groups, suggesting that breast milk was given similarly to all mice. However, the beta diversity of the gut microbiota changed in LPS-treated male and female mice just after weaning. After weaning, the increase in body weight in saline-treated mice was larger than in LPS-treated mice. At 10-week-old, the beta diversity of gut microbiota was not different between saline- and LPS-treated mice. Thus, chronic nasal inflammation induced transient dysbiosis of gut microbiota even in the lactation period, but it can return to normal during development.

Keywords: Gut-brain axis, chronic nasal inflammation, lactation period, gut microbiota

References

1. CLEMENTE, J.C., URSELL, L.K., PARFREY, L.W. & KNIGHT, R.: The impact of the gut microbiota on human health: an integrative view, *Cell*, **148**, 1258-1270, 2021.
2. ASANO, H., HASEGAWA-ISHII, S., ARAE, K., OBARA, A., LAUMET, G., DANTZER, R. & SHIMADA, A.: Infiltration of peripheral immune cells into olfactory bulb in a mouse model of acute nasal inflammation, *J. Neuroimmunol.*, **368**, 577897, 2022.
3. HASEGAWA-ISHII, S., SHIMADA, A. & IMAMURA F.: Neuroplastic change in the olfactory bulb associated with nasal inflammation in mice, *J. Allergy Clin Immunol.*, **143**, 978-989, 2019.
4. MISHIMA, Y., OSAKI T., SHIMADA, A., KAMIYA, S. & HASEGAWA-ISHII, S.: Sex-dependent differences in the gut microbiota following chronic nasal inflammation on adult mice, *Sci Rep.*, **11**(1), 4640, 2021.

発酵小麦ふすまの摂取は糞便中の短鎖脂肪酸を増加させ DSS 誘発性大腸炎の改善する

Afifah Zahra Agista 大崎 雄介 駒井 三千夫 白川 仁
(東北大学大学院農学研究科栄養学)

I. 背景

小麦ふすま (WB) は、世界で 2 番目に生産量の多い穀物である小麦の製粉産業における副産物である。食物繊維を多く含むことが知られており、生物学的利用能が低い一因となっている。WB の健康機能性を向上させるためにテンペスターター (*Rhizopus oligosporus* 等) を用いた発酵を行った。我々の以前の研究で、米ぬかの発酵物では、デキストラン硫酸ナトリウム (DSS) 誘発性大腸炎の改善能が向上した。本研究は小麦ふすまと米ぬかの生理活性物質の類似性を参考にして、発酵小麦ふすま (FWB) が DSS 誘発性大腸炎モデルマウスの病状に与える影響を調査することを目的とした。

II. 方法

C57BL/6N 雄マウス (11週齢, 25匹) を 3 群に分け、コントロール食 (n = 8), 10% WB 食 (n = 8), 10% FWB 食 (n = 9) を給餌した。試験食を 4 日間給餌し、続いて試験食給餌および DSS (飲水中 3%)

給水を 9 日間行った。飼育終了後、マウスを解剖し、炎症のパラメータを測定した。

III. 結果

FWB は WB と比較して総フェノール含量, ACE 阻害活性, DPPH ラジカル消去活性が上昇していた。FWB 摂取により、体重減少が抑制され、DAI (disease activity index, 下痢と血便で評価) 値が減少した。また、糞便中の短鎖脂肪酸 (SCFA) 含有量の増加が観察された。さらに、FWB 摂取は、大腸の抗菌ペプチド, Il-17 および Il-22 mRNA レベルを増加させた。これらの結果より、FWB は大腸炎を改善し、その作用は腸内細菌が産生する SCFA による腸内の Th17 細胞の調節を介している可能性が示唆された。

(会員外共同研究者: Chien Yushan (簡妤珊)*, 小関拓也**;* 東北大学大学院農学研究科栄養学専攻, ** 山形大学農学部)

Dietary supplementation of fermented wheat bran alleviates DSS-induced colitis in mice by increasing fecal SCFA content

AFIFAH ZAHRA AGISTA, YUSUKE OHSAKI,
MICHIO KOMAI and HITOSHI SHIRAKAWA

Laboratory of Nutrition, Graduate School of Agricultural Science, Tohoku University, Sendai

[Introduction]

Wheat bran (WB) is a by-product of the milling industry of wheat. It is known for its high content of dietary fiber, which contributes to its low nutritional bioavailability. Fermentation with Tempe starter (*Rhizopus oligosporus* etc.) was conducted to improve WB's nutritional quality. Fermentation increased rice bran capacity in ameliorating dextran sulfate sodium (DSS)-induced colitis. Considering the similarities between wheat bran and rice bran bioactive compounds, this study also aimed to investigate whether FWB can prevent the onset of DSS-induced colitis in a mouse model.

[Method]

Twenty-five mice (11-week-old C57BL/6N male mice) were divided into three groups. The first group was fed with the control diet (n=8), the second group received a 10% WB-supplemented diet (n=8), and the last group a 10% FWB-supplemented diet (n=9). The diet treatment was given for 4 days before DSS (3% in drinking water) was given. Simultaneous DSS and diet treatments were continued for another 9 days before mice were euthanized.

[Results]

Fermentation increased WB total phenolic content, elevates WB's ACE inhibitory and DPPH radical scavenging activities. FWB prevented mice body weight loss and reduced their disease activity index. FWB supplementation also increased the fecal short-chain fatty acid (SCFA) content. Furthermore, dietary FWB increased the colonic mRNA levels of Il-17 and Il-22 along with regulating anti-bacterial peptides, suggesting that the colitis-ameliorating effect of FWB was achieved via the regulation of Th17 cells in the intestine by the gut microbiota-produced SCFA.

(Non-member collaborators : Chien Yushan*, Takuya Koseki**. *Laboratory of Nutrition, Graduate School of Agricultural Science, Tohoku University, Sendai, **Faculty of Agriculture, Yamagata University, Tsuruoka)

造影 X 線検査による無菌コモンマーモセットの 盲腸の形態評価

井上 貴史

(実験動物中央研究所マーモセット医学生物学研究部)

I. 目的

無菌霊長類を用いた腸内微生物叢研究の展開をめざして、我々はアイソレーター内での飼育・取り扱いに適する小型の霊長類種のコモンマーモセットにおいて無菌動物の作出とその研究応用のための技術開発を進めている。これまでに、妊娠個体の準備からビニールアイソレータ (VI) 内での無菌環境下での帝王切開による産仔獲得から人工哺育、育成までの技術を確認し、培養検査で生菌が検出されない無菌マーモセット個体の作出に成功している (第55回総会にて報告)。そこで、作出された無菌マーモセットの特性解析として、無菌げっ歯類で特徴的は盲腸の拡大が無菌マーモセットで認められるかどうかの検討を行った。

II. 方法

無菌マーモセットを非侵襲的に無菌状態を維持したまま盲腸の形態を評価する方法として X 線造影検査を試みた。無菌維持のため VI 内のマーモセットを X 線撮影することとし、VI 外の上部にポターブル X 線照射装置を設置し、底面に受像器 (カセット) を設置することでアイソレータ越しに撮影を行った。造影剤にはヨード系のガストログラフィン[®]を用い、注腸 (経肛門投与) と経口投与の両方法による消化管造影を行った。造影剤投与前に12時間以上の絶食処置を施し、経口投与方法ではカテーテルにより胃内投与、注腸法では

麻酔下でバルーンカテーテルを用いて経肛門投与し、投与後に経時的に腹部の X 線撮影を行った。

III. 結果, 考察

無菌マーモセットと通常飼育 (コンベンショナル) 個体において X 線造影検査を実施した。その結果、注腸法と経口投与方法のいずれにおいても、無菌検査陰性の個体ではコンベンショナル個体と比較して右下腹部の大腸上部の盲端部が拡大して小腸が頭側に変位している像が観察された。このことから、無菌維持個体において盲腸～結腸上部が拡大しており、無菌げっ歯類と同様の特性が認められることが示唆された。無菌げっ歯類では、腸内細菌叢による発酵が起こらないため食物繊維が盲腸内で滞留し水分を含んで膨潤するため盲腸が拡大すると考えられ、腸内細菌の定着により盲腸が縮小することが知られている。野生のマーモセットは樹液・樹脂を採食するが、これらは盲腸で発酵されることが知られている。飼育下のマーモセットにおいても盲腸が発酵の場として機能していることが考えられることから、無菌マーモセットの盲腸拡大は無菌げっ歯類と同様の機序で生じることが推察された。

(会員外共同研究者：岡原則夫、菊池理加、佐々木えりか；実験動物中央研究所マーモセット医学生物学研究部)

Contrast enhanced X-ray imaging of the cecum in germ-free common marmosets

TAKASHI INOUE

Central Institute for Experimental Animals, Kawasaki

Germ-free nonhuman primates (NHPs) are expected to play a critical role in translational microbiome research. We have been developing technologies for the generation and research application of germ-free common marmosets, small NHPs suitable for rearing and handling in an isolator. To date, we have generated germ-free marmosets with no viable organisms detected in culture tests (reported at the 55th Annual Meeting). Here, we developed methods for evaluating the size of the cecum to investigate whether germ-free marmosets have enlarged cecum, one of the major characteristics of germ-free rodents. Contrast-enhanced radiography acceptable for live animals was performed on the animals in sterile isolators. After fasting for 12-20 hours, animals were administered Gastrografin[®] intragastrically or transanally under anesthesia. Abdominal radiography was performed through a flexible film isolator using a computed radiography system. X-ray images of germ-free marmosets by both intragastric and transanal administration methods showed an expansion of the blind end of the upper part of the large intestine in the right lower abdomen, indicating the cecal enlargement. The cecal diameter predictively measured from the images of germ-free marmosets was significantly larger than that measured in conventional marmosets. In germ-free rodents, it is considered that the lack of fermentation by the intestinal microbiota causes swelling of the cecum by dietary fiber with water. Wild marmosets are known to forage gum from trees and obtain nutrition by fermentation in the cecum. That suggests the cecal enlargement observed in germ-free marmosets occurred by similar mechanisms.

(Non-member collaborators: Norio Okahara, Rika Kikuchi, Erika Sasaki. *Central Institute for Experimental Animals, Kawasaki*)

新しいブタ用アイソレーターの特長と Germ-Free マイクロミニピッグの解剖学的評価

大竹 正剛

(静岡県畜産技術研究所中小家畜研究センター)

I. 目的

近年、先端医療等を含めた医学研究でのブタの利用にニーズが高まっている。今後異種移植等において、ブタの利用に高度に微生物制御された環境が求められることが予想される。しかし産業利用を目的としたブタの長期無菌飼養管理技術は、未だ確立されていない。そこで本研究では長期無菌飼育可能なブタ用アイソレーターを開発するとともに、格段に小さいミニブタであるマイクロミニピッグ (MMP) を用いて実証試験を行った。

II. 材料と方法

ブタ用アイソレーターは発育ステージごとに3種類作製した。蘇生アイソレーターは、硬質塩化ビニル製で薬液槽を具備し、摘出した子宮から無菌的に子ブタを娩出できる構造とした。若齢飼育アイソレーターは、硬質塩化ビニル製で加温機能を有し若齢ブタを飼育できる構造とした。長期飼育アイソレーターは、ケージ (体重15kgを2頭飼育できる面積 (0.72m²/H × 2)) を載せた基台を軟質ビニルで被覆した構造とした。アイソレーターは、過酢酸製剤 (ダイヤパワー FP; 三菱ガス化学 (株)) および亜塩素酸製剤 (アクロファイン Pro8000; (株) ジック) を用いて滅菌し、クリーンブース (Class10,000) 内にて運用した。実証試験では、まず交配後110日目のメス MMP から子宮を摘出して蘇生アイソレーター内に導入し、無菌的に子ブタを娩出し蘇生させた。次に蘇生子ブタを若齢飼育アイソレー

ターに移動させ、 γ 線滅菌飼料 (50kGy)、オートクレーブ滅菌水 (127°C 2時間) および EOG 滅菌資材にて無菌的に飼育した。さらに2.5か月齢時に長期飼育アイソレーターに移動させ、13か月齢まで飼育した。飼育ブタは目標到達時に安楽殺し、体重、体格、臓器重量および組織学的検索を行った。なお対照区は通常環境下で飼育した MMP とし、無菌評価は2週から1か月毎に直腸や糞等から滅菌綿棒にて採材し、TGC、HIF、CM および PDA 培地で20°C および37°C 下で14日間培養し確認することとした。

III. 結果と考察

無菌評価では試験期間を通して菌は認められなかった。13か月齢の無菌 MMP の体重 (n = 2) は14.7kg および15.5kgであり、対照区18.2 ± 2.0kg (n = 3) に比べ低値を示したが体格に大きな差は認められず、概ね正常に成長したと考えられた。剖検では盲腸の肥大化以外は特に異常は認められず、臓器重量は消化管が対照区に比べ高値を示し盲腸で著しい傾向にあった。組織学的評価では、対照区に比べ盲腸粘膜の細胞浸潤が少なく腸壁に菲薄化傾向が観察されたが、その他に異常は認められなかった。

(会員外共同研究者: 佐藤剛司**, 塩谷聡子*, 伊神悠祐*, 金森健太***, 網野信**, 柴田昌利*; *静岡県畜産技術研究所中小家畜研究センター, **日商産業(株), ***静岡県中部家畜保健衛生所)

Anatomical evaluation of the germ-free microminipig using a novel long-term pig rearing isolator

MASAYOSHI OTAKE

Shizuoka Prefectural Research Institute of Animal Industry, Swine and Poultry Research Center, Kikukawa

The aim of this study is to evaluate the anatomical characteristics of the germ-free microminipigs (MMP) with the novel isolators for long-term rearing of pigs. Three types of isolators were generated for each developmental stage and sterilized by spraying with a peracetic acid or a chlorite solution. Female MMP were mated with natural insemination, and delivered at 110 days gestation via hysterectomy. For hysterectomy, the uterus was cut from the sow under an anesthesia and introduced into a resuscitation isolator, a hard plastic, through the germicidal trap and the piglets were delivered surgically from uterus. The piglets were transferred from the resuscitation isolator to a nursing isolator, hard plastic, and reared for 2.5 months. After rearing a nursing isolator, the piglets were transferred to a long-term rearing isolator, consisted with a stainless-steel cage enclosed in a soft vinyl chamber, and continued rearing until 13 months of age. For sterility evaluation, samples were taken periodically and incubated in four different media for 14 days. Two MMPs were successfully reared in the isolators under a sterile environment until 13 months of age. The germ-free MMPs weighed 14.7 kg and 15.4 kg, respectively. Furthermore, the germ-free MMPs tended to have larger the caecum than pigs raised in a normal environment. In summary, we have succeeded to generate a novel pig rearing isolator and rear the germ-free MMPs for a long period of time.

炎症性腸疾患における病原性共生菌への IgA 応答と臨床応用

今井 仁^{*,**} 穂積 勝人^{***}

(*東海大学医学部健康管理学, **東海大学医学部消化器内科学, ***東海大学医学部生体防御学)

I. 目的, 背景

メタゲノム解析の進歩により, 近年数々の消化器疾患とその病態に関連が示唆される病原性共生菌 pathobiont が報告されている. pathobiont は健常人にも分離され, その病原性は宿主や周囲に環境に依存する. このような pathobiont に対する宿主の免疫応答は十分に解明されておらず, どのような機序で共生に至ってしまうかは大きな課題である. 我々はこれまで, クローン病 (CD) の回腸末端から約40%の割合で分離される侵襲性接着性大腸菌 (AIEC: adherent-invasive *E. coli*) に注目し, マウスモデルにて AIEC 定着が持続炎症を惹起し腸管線維化につながることを報告している¹. そこで, この AIEC の持続感染マウスモデルを用いて pathobiont に対する宿主免疫応答の一端として IgA 反応性を検討した.

II. 材料と方法

抗菌薬で前処置した SPF マウスに AIEC の代表株である LF82株, 対照として病原性を有さない一般大腸菌 HS 株を経口投与する. 10週まで毎週, 糞便を採取し, IgA 分画を分離し LF82株に対する IgA 結合細菌率を flowcytometry で評価する. そして, AIEC の病原性抗原の変異 LF82株 ($\Delta fimH$, $\Delta fliC$, $\Delta ompA$, $\Delta ompC$) を用いて, 認識する AIEC の病原性抗原を同定する. また, ヒト大腸粘膜細胞 Caco-2を用いて, 抗 AIEC-IgA 抗体による AIEC の侵入性の阻害効果を評価する.

III. 結果, 結語

抗菌薬前処置 SPF マウスに LF82株を長期感染させると, 同マウスの糞便中に LF82株に結合する IgA が2週目以降に急激に産生され持続した. さらに, この AIEC 感染で産生される IgA は一般大腸菌株には反応せず, AIEC に特徴的な抗原のみを認識することが分かった. 一方, 病原性を有しない一般大腸菌 HS 株は, LF82株と同様にマウスに持続定着はするものの, IgA 応答を誘導しなかった. そして, 誘導された抗 AIEC-IgA 抗体は LF82株の Caco-2への侵入を阻害することが *in vitro* にて示された. 本研究により, 同じ大腸菌でも pathobiont と非病原性細菌株では宿主の IgA 応答が異なることが示された. さらに, pathobiont により誘導される IgA 抗体は病原性の有無を識別できることが分かった. 今後は, この IgA 応答の違いを用いた臨床応用の可能性を検討していく.

IgA response to pathobiont in inflammatory bowel disease and its clinical application

JIN IMAI*** and KATSUTO HOZUMI***

*Department of Clinical Health Science, Tokai University School of Medicine, Isehara,

**Department of Gastroenterology, Tokai University School of Medicine, Isehara,

***Department of Immunology, Tokai University School of Medicine, Isehara

[Introduction]

A new category of bacteria, called pathobionts, that promotes disease only when host genes or environmental conditions are altered, has been identified. A pathotype of *Escherichia coli*, namely adherent-invasive *E. coli* (AIEC), is known as a potential pathobiont associated with Crohn's disease (CD). The colonization by AIEC exacerbates intestinal inflammation and fibrosis in murine colitis models¹. However, Details of the immune response of the host and pathobiont are not yet known.

[Methods]

Specific pathogen-free (SPF) mice were pre-treated with a cocktail of antibiotics and then colonized either by an AIEC strain LF82 or a commensal *E. coli* strain HS. The specificity of IgA was evaluated by flowcytometry. LF82 $\Delta fimH$, $\Delta fliC$, $\Delta ompA$, and, $\Delta ompC$ mutant strains were used to determine the antigen specificity of induced IgA. The function of IgA was assessed by in vitro bacterial invasion assay using a human colonic epithelial cell line Caco-2.

[Results]

We found that AIEC, but not commensal *E. coli*, colonization induced IgA production in mice. The induced IgA selectively bound to AIEC strains but not to commensal *E. coli* strains. Induced IgA recognized surface antigens of AIEC LF82, including fimbriae and outer membrane proteins. Also, we found that AIEC-specific IgA limits the invasion of the AIEC LF82 to the colonic epithelial cells.

[Conclusion]

These results suggested that IgA, induced by the persistent colonization by AIEC, offers the protection to the host by inhibiting invasion of the pathobionts to the colonic epithelial cells.

Reference

1. IMAI, J., KITAMOTO, S., SUGIHARA, K., NAGAO-KITAMOTO, H., HAYASHI, A., MORHARDT, T., L., KUFFA, P., HIGGINS, P., D., R., BARNICH, N. & KAMADA, N. : Flagellin-mediated activation of IL-33-ST2 signaling by a pathobiont promotes intestinal fibrosis. *Mucosal Immunology*, **12**, 632-643, 2019.

腸内細菌叢の攪乱による攻撃行動特性の比較

花輪 球太* 渡邊 己弦** 三上 克央**

(*東海大学医学部医学研究科先端医科学, **東海大学医学部総合診療系精神科学)

I. 目的

脳と腸は液性因子や自律神経系, 免疫系の伝達経路を介して双方向的な情報伝達を行っており, 脳腸相関と呼ばれている。これまでの研究では, 腸内細菌叢は迷走神経などの神経系経路や免疫担当細胞による免疫学的経路に関与していることが解明されてきており, 腸内細菌叢-腸-脳軸として知られている。生体は, 有害なストレス刺激に暴露されたとき, 視床下部-下垂体-副腎軸と交感神経系を活性化して体内の恒常性を維持する。視床下部-下垂体-副腎軸の発達には, 遺伝的要因のみならず生後の環境要因も深く関与している。我々の研究では, Specific-pathogen-free マウスおよび無菌マウスを用いた研究で, 出生直後の腸内細菌叢の構成が成長後のストレス反応に影響を与えていることを明らかにした。このような研究成果を踏まえて, 腸内細菌叢がストレス反応性だけでなく宿主の精神活動や行動自体に影響を及ぼしていると仮説を立て, 活動性や不安症状, 攻撃性を標的にアイソレータ内で無菌マウス群と常在腸内細菌叢群の行動解析を行なった。結果は, 無菌マウスは, 常在腸内細菌叢マウスと比較し, 多動性や不安症状, 攻撃性が増強した。これらの結果は, 腸内細菌叢は多動性や攻撃性, 不安症状に影響を与えることを示唆した。

以上の研究成果から, 後天的な影響による腸内細菌叢の乱れは, 宿主の行動特性に影響を与えるのかという問題提起となった。本実験では, 抗菌薬を用いて腸

内細菌叢を攪乱し, 宿主の攻撃行動特性への影響を観察した。

II. 材料と方法

全てのマウスは母体妊娠時からアイソレータ内で飼育した。6週齢時に常在腸内細菌叢マウスにアミノグリコシド系抗菌薬, ストレプトマイシンを自由飲水で計6日間投与した。抗菌薬投与終了後, ストレプトマイシン投与マウス群とストレプトマイシン非投与マウス群で攻撃行動特性を比較した。アイソレータ内で, ソーシャルインタラクション法を使用し, 攻撃行動特性を評価した。

III. 結果, 考察, 結論

ストレプトマイシン投与群マウスとストレプトマイシン非投与群マウスではそれぞれ攻撃行動特性は観察されなかった。ストレプトマイシン投与群マウスの腸内細菌叢では, 好気性菌数は有意に減少し, ストレプトマイシンの抗菌効果は示されたが, 全菌数では有意差を認めなかった。主な腸内細菌の減少は Enterobacteriaceae であった。本実験では, ストレプトマイシンを使用した腸内細菌叢の攪乱によって, 宿主の攻撃行動特性への影響を認めなかった。抗菌薬の投与週齢やターゲットとなる菌の相違によって, 攻撃行動特性に影響を与える可能性が示唆された。

Comparison of aggressive behavior characteristics by dysbiosis of commensal gut microbiota

KYUTA HANAWA*, NATSURU WATANABE** and KATSUNAKA MIKAMI**

**Department of Medical Science, Graduate School of Medicine, Tokai University, Isehara,*

***Department of Psychiatry, Tokai University School of Medicine, Isehara*

[Introduction]

In our study, we found that the gut microbiota immediately after birth affects the stress response in mice. Based on these results, we hypothesized that the gut microbiota influences the host's mental activity and behavior in addition to stress reactivity, and conducted a behavioral analysis. As a result, it was suggested that the gut microbiota may affect hyperactivity, aggression, and anxiety. In this study, we used antibacterial agents to dysbiosis the gut microbiota and then observed the effects on host aggressive behavior characteristics.

[Methods]

All mice were housed in sterile isolators from the time of maternal pregnancy. At 6 weeks of age, commensal gut microbiota mice were administered an aminoglycoside antibiotic streptomycin, with free drinking water for a total of 6 days. After administration of antibiotics, aggressive behavior characteristics were compared between streptomycin-treated and non-streptomycin-treated mice. Observations of aggression behavior were made in a sterile isolator and used the social interaction method.

[Result and discussion]

Aggressive behavior characteristics were not observed in both streptomycin-treated mice and non-streptomycin-treated mice. In the gut microbiota of streptomycin-treated mice, the number of aerobic bacteria decreased significantly, indicating the antibacterial effect of streptomycin, but there was no significant difference in the total number of bacteria. The most decreased bacteria were Enterobacteriaceae. In this experiment, dysbiosis of the gut microbiota using streptomycin did not affect host aggressive behavior characteristics. It was suggested that the age of antibiotic administration and differences in target bacteria may affect aggressive behavior characteristics.

異なる脂肪酸の摂取条件が食品抗原を介した免疫応答に与える影響

吉村 美和 津田 真人 細野 朗

(日本大学生物資源科学部食品生命機能学研究室)

I. 目的

近年、食物アレルギー患者が増加している。食事摂取する栄養素に注目した場合、必須脂肪酸の経口摂取によって炎症性脂質メディエーターが産生され1型アレルギーが誘導される。脂肪酸組成の違いによってアレルギー発症に影響があると考えられるが、その作用機序については明らかにされていない。そこで、本研究では食餌組成の違いが食物アレルギーに及ぼす影響に関与する抗原特異的応答や炎症反応においてどのような影響があるのかを検討した。

II. 材料と方法

卵アレルギーモデルである卵白オボアルブミン(OVA)特異的T細胞受容体トランスジェニックOVA23-3マウスを用いた。魚油・コーン油不含の対照食(0%)、魚油配合食(24%)、コーン油配合食(24%)の実験群それぞれにおいて、食物アレルギーの誘導を行う卵白食群とカゼイン食群を設定した。異なる脂肪配合比率の高脂肪食(カゼイン食)を、それぞれ4週間自由摂取させ、その後さらに、それぞれの脂肪配合比率にてカゼイン食または卵白食を2週間投与する実験系に分け、自由摂取させた。卵白食によるOVA食餌抗原の感作の影響を解析するために、各実験群のマウスより小腸パイエル板(PP)、脾臓(SPL)、腸間膜リンパ節(MLN)を採取・調製し、OVA(1mg/mL)と72時間共培養し、培養上清中のサイトカイン(IL-4)量の測定(ELISA法)を行っ

た。また、各実験群のマウスのPP、SPL、MLN細胞のT細胞フェノタイプ(CD3⁺CD4⁺CD45RB^{lo}CD69^{hi}, CD3⁺CD4⁺CD62L^{lo}CD44^{hi})をフローサイトメトリーにより解析した。また、各実験群のマウスの血中mouse mast cell protease-1(mMCP-1)を腸管マスト細胞の脱顆粒のマーカーとして測定した。

III. 結果、考察、結論

卵白食を摂取した3つの実験群間では、腸管マスト細胞の脱顆粒について解析したところ、mMCP-1量が対照食に比べ魚油配合食で有意に減少、対照食に比べコーン油配合食で有意に増加した。OVAと共培養した組織の培養上清中のIL-4量は、SPLにおいて対照食に比べ魚油配合食で有意な減少が見られ、PP、MLN細胞でも魚油配合食でIL-4産生量が減少傾向だった。すべての細胞(PP、SPL、MLN)の活性化T細胞(CD4⁺CD45RB^{lo}CD69^{hi}, CD4⁺CD62L^{lo}CD44^{hi})発現はコーン油配合食、魚油配合食、対照群の順に高値を示す傾向が見られた。

以上のことから、魚油の摂取によりマスト細胞の脱顆粒抑制が誘導されること、また、活性化T細胞の発現は対照群に比べ増加したが、IL-4産生量が対照食に比べ抑制されたことから、Th2への分化抑制が示唆された。異なる脂肪酸の摂取は腸管内での脂肪酸代謝にも影響を与えている可能性があり、腸内環境因子にも注目した解析を行っている。

The composition of dietary fatty acids alter intestinal immune responses induced by dietary antigen

MIWA YOSHIMURA, MASATO TSUDA and AKIRA HOSONO

Department of Food Bioscience and Biotechnology, College of Bioresource Sciences, Nihon University, Fujisawa

In this study, we investigated the effects of different composition of dietary fatty acids on antigen-specific immune responses and inflammatory responses involved in food allergy. Ovalbumin (OVA)-specific T cell receptor transgenic OVA23-3 mice were used as a model of food allergy. Mice were fed ad libitum an experimental casein-based diet containing either fish oil (n-3 rich) or corn oil (n-6 rich) or control without fish oil and corn oil for 4 weeks, and then these groups were further divided into two experimental groups which were fed either an egg-white based diet (to induce food allergy) or a casein-based diet for 2 weeks. Peyer's patches (PP), mesenteric lymph nodes (MLN), and spleen (SPL) were collected and co-cultured with OVA (1 mg/mL) for 72 hours. The amount of cytokine (IL-4) in the culture supernatant was measured by ELISA. T cell phenotypes from each tissue were measured using flow cytometry. Blood samples were collected and measured mouse mast cell protease-1 (mMCP-1), a marker of intestinal mast cell degranulation using ELISA.

There was a significantly lower level of mMCP-1 in serum of fish oil diet group compared to control group suggesting suppression of degranulation of intestinal mast cells. In addition, fish oil group had an increased activated T cells but reduced IL-4 production from PP, MLN, and SPL cells compared to control group. These findings suggest oral intake of fish oil suppress the differentiation of Th2 cells in food allergy.

薬剤耐性プラスミドの接合伝達に対する フラボフォスフォリポールの活性評価

工藤 逸美^{*、**} 木村 淳一郎^{*} 福田 昭^{*} 岡 健太郎^{**}
高橋 志達^{**} 白井 優^{*}

(*酪農学園大学 獣医学群 食品衛生学ユニット, **ミヤリサン製薬株式会社 研究開発本部 研究部)

I. 背景

薬剤耐性 (AMR) は One Health で制御すべき公衆衛生上の重要な課題である。薬剤耐性遺伝子 (ARGs) の水平伝達は、薬剤耐性菌 (ARB) の伝播・拡散の主要なメカニズムであり、中でも ARGs がコードされたプラスミドの接合伝達は菌種を超えて高頻度に起きることが報告されている。フラボフォスフォリポール (FV) は日本を含む諸外国において豚、鶏、牛などの生産性を向上させる目的で抗菌性飼料添加物として指定されているが、細菌の接合伝達阻害作用を併せ持つことが報告されている。本研究では、実際の畜種の腸管内において、FV が ARB/ARGs の制御に有用であるか否かを調査するとともに、糞便中の菌叢と代謝物の動態を明らかにするために、豚を用いた *in vivo* 試験を実施した。

II. 材料と方法

供試豚は、酪農学園大学附属農場で肥育された三元交雑種 (LWD) 20頭を用いた。試験区分として、対照区、ドキシサイクリン (DOXY) 単体投与区、FV 単体投与区、DOXY 及び FV 併用区を設け、平均体重及び性別が等しくなるように5頭ずつ配分した。抗菌性物質は指定された最大濃度を使用した。飼養36日目より出荷直前150日目まで経時的に糞便を採取し、糞便中のテトラサイクリン (TC) 耐性大腸菌の菌数および ARGs を、それぞれ培養法と qPCR により定量した。また分離した TC 耐性大腸菌が実際に FV の存在下で接合伝

達が抑制されるのかを *in vitro* で評価した。さらに糞便の16S メタゲノム解析及び GC-MS メタボロミクス解析を組み合わせ、FV が菌叢に与える影響を評価した。最後に FV の接合伝達阻害作用の機序解明のため、網羅的に転写物を評価する RNA シーケンス (RNA-seq) 解析を FV 存在下、非存在下で実施した。

III. 結果, 考察, 結論

獣医療で使用頻度の高い DOXY 単体投与区で TC 耐性大腸菌の分離率は顕著に上昇したが、FV を併用した区においてその分離率は対照区と同程度であり、TC 耐性に寄与する遺伝子である *tetA* のコピー数も培養法と同様の動態を示した。一方、分離された TC 耐性大腸菌自体に対する FV の接合伝達阻害作用は、プラスミドのレプリコン型によってその作用の程度が異なった。16S メタゲノム解析及び GC-MS 解析の結果、FV 投与区に特徴的な細菌 (*Megasphaera* や *Streptococcus* 属細菌) が検出され、これらの細菌と複数の代謝物が相関して変動していることを明らかにした。また RNA-seq 解析の結果、プラスミドの複製に関与している酵素であるリラクサーゼをコードする *traI* 遺伝子の発現量が FV 曝露により有意に減少していた。以上より、FV は実際の畜種の腸管内においてプラスミドに依存する ARGs の拡散を阻害している可能性が示された。

(会員外共同研究者: 白井 優, 福田 昭, 木村淳一郎;
酪農学園大学 獣医学群 食品衛生学ユニット)

The dynamic changes of antimicrobial-resistance bacteria and fecal microbiome using flavophospholipol as the feed Additives.

HAYAMI KUDO***, JUNICHIRO KIMURA*, AKIRA FUKUDA*, KENTARO OKA**, MOTOMICHI TAKAHASHI** and MASARU USUI*

**Department of Health and Environmental Sciences, School of Veterinary Medicine, Rakuno Gakuen University, Ebetsu,*

***Research Department, R&D Division, Miyarisan Pharmaceutical Co., Ltd., Saitama*

[Background]

Flavophospholipol (FV) is an antimicrobial that is used as a feed additive for poultry, piglets, and cattle in some countries. FV was known to have an inhibitory effect on bacterial cell wall synthesis as well as on plasmid transfer harboring antimicrobial resistance genes (ARGs). To clarify whether the use of FV can reduce the ARGs transfer in the animal intestine, in vivo experiment was performed in the presence of doxycycline (DOXY), belonging to the tetracycline (TC) class.

[Methods]

Pigs were equally and randomly divided into 4 experimental groups (Control group, DOXY group, FV group, and FV-DOXY group) with 5 pigs per pen. The fecal samples from each group of pigs were collected before and after antimicrobial treatment. The number of TC-resistant *E. coli* and *tetA* genes in fecal samples was quantified using culture methods and qPCR, respectively. In addition, intestinal microbiota and their accompanying metabolite were analyzed by 16S rRNA sequencing and GC-MS analysis.

[Results]

DOXY alone sufficiently induced TC resistance, while FV combined with DOXY did not alter detection levels in both ARB (TC-resistant *E. coli*) and ARG (*tetA* gene) as well as the non-treated control group. Moreover, FV in-feed partially increased the generally recognized beneficial bacteria.

[Conclusion]

These results suggested that using FV in-feed could be one possible solution to address the dissemination of plasmid-mediated ARGs.

酪酸による T 細胞を介した抗腫瘍免疫応答の誘導

山田 裕貴 丹羽 みずほ 北原 秀悟 岡 健太郎 林 篤史 高橋 志達
(ミヤリサン製薬株式会社 研究開発本部)

要 旨 : *Clostridium butyricum* MIYAIRI588 (CBM588) は酪酸産生菌の一種で、免疫調節作用や抗炎症作用を有している。近年、腸内細菌が免疫チェックポイント阻害剤 (ICI) の効果に影響を与えることが明らかにされつつあり、CBM588 もがん患者における ICI の治療効果を高める可能性が示唆されている。しかし、CBM588 が抗腫瘍免疫応答に及ぼす正確なメカニズムは不明である。本研究では、CBM588 の産生する主要代謝物である酪酸に着目し、酪酸が抗腫瘍免疫応答に及ぼす影響を検証した。その結果、*in vitro* と *in vivo* どちらにおいても、酪酸はマウス T 細胞からの IFN- γ や TNF- α などのサイトカイン産生を誘導することが分かった。また酪酸は、他の免疫細胞を介してではなく、T 細胞に直接作用することでこれらのサイトカインの産生を誘導することが示された。以上のことから、CBM588 が産生する酪酸が宿主の免疫応答を活性化し、抗腫瘍効果をもたらす可能性が示唆された。

キーワード : 腫瘍, 腫瘍免疫, 腸内細菌, 酪酸, T 細胞

I. 背景と目的

免疫チェックポイント阻害剤 (ICI : Immune Checkpoint Inhibitors) は、抗腫瘍免疫応答を改善することにより抗腫瘍効果を示すが、奏効率が10-40%程度に留まることが治療上の課題となっている。近年、特定の腸内細菌や腸内細菌由来代謝産物が ICI の治療効果に影響を及ぼすことが次々と明らかとなりつつある¹⁻⁴⁾。例えば、腫瘍モデルマウスに *Bifidobacterium pseudolongum* あるいは *Akkermansia muciniphila* を ICI と併用投与すると、その治療効果が高まることが報告されている¹⁻²⁾。 *Bifidobacterium pseudolongum* は自身が産生した代謝物であるイノシンが CD4 陽性 T 細胞を活性化することで、また、 *Akkermansia muciniphila* は樹状細胞からの IL-12 産生を誘導し CD4 陽性 T 細胞を活性化することで、その効果を示すと考えられている。 *Clostridium butyricum* MIYAIRI588 (CBM588) は主要代謝産物である酪酸や菌体成分を介して宿主の免疫応答に影響を与えることが知られているが、2022年に米国にて実施された、転移性腎細胞がん患者を対象とした ICI との併用療法による医師主導第 I 相臨床試験の結果が報告された⁵⁾。この試験では CBM588 と ICI を併用投与することにより、ICI 単独投与と比べ、無増悪生存期間が有意に延長される可能性が示唆された。しかしながら、その詳細な作用メカニズムは不明である。そこで本研究では、

CBM588 が抗腫瘍免疫に及ぼす影響を検証することを目的とし、CBM588 の主要代謝産物である酪酸と抗腫瘍免疫についてマウスを用いて検討した。

II. 材料と方法

SPF 環境下で飼育した 7-8 週齢の C57BL/6/N マウスから脾細胞を単離し、抗マウス CD3/28 抗体刺激下にて、様々な濃度の酢酸ナトリウム、酪酸ナトリウム、乳酸ナトリウムを添加し 3 日間培養した。その後、免疫細胞の変化をフローサイトメーターで解析した。培養上清中のサイトカインは ELISA で測定した。また、酪酸の T 細胞への直接的な影響を確認するため、CD4 あるいは CD8 陽性 T 細胞を脾細胞から単離し、同様の試験を実施した。次に、マウス生体内での酪酸の効果を確認するため、マウスに滅菌水もしくは、酪酸のプロドラッグであるトリブチリン (3 g/kg) を 3 日間経口投与した後、脾臓中の IFN- γ 産生細胞をフローサイトメーターで解析した。

III. 結果と考察

CBM588 の産生する主要な有機酸である酪酸、酢酸、乳酸がマウス脾細胞へ与える影響を確認したところ、酪酸で刺激した場合のみ IFN- γ 及び TNF- α の産生が有意に増加し、その産生量は刺激した酪酸の濃度の上

昇に伴い増加した。加えて、これらのサイトカインの主要な産生細胞をフローサイトメーターで解析したところ、IFN- γ 産生性のCD4陽性T細胞及びCD8陽性T細胞の割合が有意に増加した。次に、酪酸のT細胞への直接的な作用を検証するため、マウス脾細胞からCD4陽性T細胞とCD8陽性T細胞を単離し、酪酸で刺激後にフローサイトメーターで解析した。その結果、IFN- γ 産生性のCD4陽性T細胞及びCD8陽性T細胞の割合が有意に増加したことから、酪酸はT細胞に直接作用し、IFN- γ の産生を誘導することが示された。さらに、マウス生体内における酪酸の作用を検証するため、マウスに滅菌水あるいはトリブチリンを3日間経口投与し、脾臓における免疫応答をフローサイトメーターで解析した。酪酸は経口投与をするとその大部分が消化管で吸収されてしまうことから、酪酸のプロドラックであるトリブチリンを実験に用いた。その結果、コントロール群と比較し、トリブチリン投与群では

IFN- γ 及びTNF- α 産生性のCD8陽性T細胞の割合が有意に増加した。

本研究では、*in vitro* および *in vivo* において、酪酸がT細胞からのIFN- γ 及びTNF- α の産生を誘導することが示された。これらの結果から、CBM588は自身の産生する酪酸を介してT細胞からのIFN- γ やTNF- α の産生を促進することで、ICIの治療効果を高める可能性が示唆された。今後はCBM588の培養上清や菌体成分を用いた抗腫瘍免疫応答を検討し、さらなる作用機序を解明していくことが必要である。

IV. 結論

酪酸はCD4陽性T細胞及びCD8陽性T細胞に直接作用し、これらの細胞からのIFN- γ とTNF- α の産生を誘導することが明らかとなった。この結果から、CBM588は酪酸を介してICIの治療効果を増強する可能性が示唆された。

Butyrate promotes the anti-tumor immune response in mice

YUKI YAMADA, MIZUHO NIWA, SYUGO KITAHARA, KENTARO OKA,
ATSUSHI HAYASHI and MOTOMICHI TAKAHASHI

Research and Development Division, Miyarisan Pharmaceutical Co., Ltd., Saitama

[Background]

Clostridium butyricum MIYAIRI588 (CBM588), a strain of butyrate-producing bacteria, possesses immunoregulatory and anti-inflammatory properties. Studies have shown that the gut microbiome and its metabolites affect the efficacy of immune checkpoint inhibitors (ICIs), and it is suggested that CBM588 may also enhance the therapeutic efficacy of ICIs in cancer patients. However, little is known about the precise mechanism of CBM588 on the antitumor immune response.

[Methods]

1) Splenocytes isolated from C57BL6/N mice were cultured with various concentrations of acetate, butyrate, lactate for three days under anti-CD3/28 stimulation. The production of IFN- γ and TNF- α were analyzed by flow cytometry and ELISA. 2) To confirm the direct effect of butyrate on CD4 and CD8 positive T cells, sorted CD4 or CD8 positive T cells were stimulated with butyrate and immune cells were analyzed. 3) Tributyrin, which elevates the concentration of butyrate in the gut, was administered to mice daily for three days, and cytokines production was analyzed.

[Results]

1) The frequency of IFN- γ in the splenic T cells was significantly increased when stimulated with butyrate. 2) Both CD4 and CD8 positive T cells, not other immune cells, in the splenocyte significantly increased the frequency of IFN- γ in response to butyrate. 3) Tributyrin treatment significantly increased the frequency of IFN- γ and TNF- α in CD8 positive T cells.

[Conclusion]

Here, we demonstrated that butyrate promotes the antitumor immune response in mice. Given that CBM588 can produce a robust amount of butyrate, we speculate that butyrate produced by CBM588 may activate the host immune response, resulting in antitumor effects.

Keywords: Tumor, Tumor immunity, Microbiota, Butyrate, T cell

References

1. MAGER, L.F., BURKHARD, R., PETT, N., COOKE, N.C.A., BROWN, K., RAMAY, H., PAIK, S., STAGG, J., GROVES, R.A., GALLO, M., LEWIS, I.A., GEUKING, M.B. & MCCOY, K.D.: Microbiome-derived inosine modulates response to checkpoint inhibitor immunotherapy, *Science.*, **369**, 1481–1489, 2020.
2. ROUTY, B., LE CHATELIER, E., DEROSA, L., DUONG, C.P.M., ALOU, M.T., DAILLÈRE, R., FLUCKIGER, A., MESSAOUDENE, M., RAUBER, C., ROBERTI, M.P., FIDELLE, M., FLAMENT, C., POIRIER-COLAME, V., OPOLON, P., KLEIN, C., IRIBARREN, K., MONDRAGÓN, L., JACQUELOT, N., QU, B., FERRERE, G., CLÉMENSON, C., MEZQUITA, L., MASIP, J.R., NALTET, C., BROSSEAU, S., KADERBHAI, C., RICHARD, C., RIZVI, H., LEVENEZ, F., GALLERON, N., QUINQUIS, B., PONS, N., RYFFEL, B., MINARD-COLIN, V.,

- GONIN, P., SORIA, J.-C., DEUTSCH, E., LORIOT, Y., GHIRINGHELLI, F., ZALCMAN, G., GOLDWASSER, F., ESCUDIER, B., HELLMANN, M.D., EGGERMONT, A., RAOULT, D., ALBIGES, L., KROEMER, G. & ZITVOGEL, L.: Gut microbiome influences efficacy of PD-1-based immunotherapy against epithelial tumors, *Science.*, **359**, 91–97, 2018.
3. SIVAN, A., CORRALES, L., HUBERT, N., WILLIAMS, J.B., AQUINO-MICHAELS, K., EARLEY, Z.M., BENYAMIN, F.W., MAN LEI, Y., JABRI, B., ALEGRE, M.-L., CHANG, E.B. & GAJEWSKI, T.F.: Commensal *Bifidobacterium* promotes antitumor immunity and facilitates anti-PD-L1 efficacy, *Science.*, **350**, 1084–1089, 2015.
4. TANOUE, T., MORITA, S., PLICHTA, D.R., SKELLY, A.N., SUDA, W., SUGIURA, Y., NARUSHIMA, S., VLAMAKIS, H., MOTOO, I., SUGITA, K., SHIOTA, A., TAKESHITA, K., YASUMA-MITOBÉ, K., RIETHMACHER, D., KAISHO, T., NORMAN, J.M., MUCIDA, D., SUEMATSU, M., YAGUCHI, T., BUCCI, V., INOUE, T., KAWAKAMI, Y., OLLE, B., ROBERTS, B., HATTORI, M., XAVIER, R.J., ATARASHI, K., HONDA, K.: A defined commensal consortium elicits CD8 T cells and anti-cancer immunity, *Nature.*, **565**, 600–605, 2019.
5. DIZMAN, N., MEZA, L., BERGEROT, P., ALCANTARA, M., DORFF, T., LYOU, Y., FRANKEL, P., CUI, Y., MIRA, V., LLAMAS, M., HSU, J., ZENGIN, Z., SALGIA, N., SALGIA, S., MALHOTRA, J., CHAWLA, N., CHEHRAZI-RAFFLE, A., MUDDASANI, R., GILLECE, J., REINING, L., TRENT, J., TAKAHASHI, M., OKA, K., HIGASHI, S., KORTYLEWSKI, M., HIGHLANDER, S.K. & PAL, S.K.: Nivolumab plus ipilimumab with or without live bacterial supplementation in metastatic renal cell carcinoma: a randomized phase I trial, *Nature Medicine.*, **28**, 704–12, 2022.

原稿執筆要綱

1. 一般演題の演者と共同発表者は本学会員とします。未入会の方は本学会事務所へ入会申込をしてください。無菌生物学・ノートバイオロジーに関する新しい知見を有する研究で、未発表のものに限ります。本誌への掲載の可否は編集委員会の審査を経て決定します。編集委員会は加除修正を行うことがあります。掲載論文等の著作権は、本学会に帰属し、当該論文の全部または一部を本学会が認めたネットワーク媒体、その他の媒体において、任意の言語で、掲載、出版（電子出版を含む）できるものとします。
2. 原著・総説については英文 Guideline for Authors B をご参照ください。
 - 注1 電子データを下記アドレス宛にお送りください。
日本無菌生物ノートバイオロジー学会事務所
jagg@ciea.or.jp
 - 注2 略語 (abbreviation) は初出のところに「略さない語」 full term をお示しください。

例)

1. 演題 気管支喘息への肺炎マイコプラズマ感染の影響
2. 発表者 蔵田 訓 田口晴彦* 大崎敬子 花輪智子 米澤英雄 神谷 茂
3. 所属 (杏林大学医学部感染症学講座, *同保健学部免疫学)
4. 和文要旨 (400字)
肺炎マイコプラズマ感染は気管支喘息の増悪因子の……
5. キーワード (5項目)
気管支喘息, 肺炎マイコプラズマ, 無菌マウス, 動物モデル, ……
6. 和文抄録 (2000字)
 - I. 目的 (はじめに, 背景, ……)
Mycoplasma pneumoniae (*M. pneumoniae*) は学童から青年……
 - II. 材料 (対象)
実験動物として BALB/c マウス (雄, 5週齢) と IQI 系……
 - III. 方法
感作初日に *M. pneumoniae* M129株を超音波により……
 - IV. 結果
BALB/c マウスの血清中 OVA 特異的 IgE 濃度は……
 - V. 考察
M. pneumoniae 菌体抗原による感作は……
 - VI. 結論
M. pneumoniae ノートバイオート肺炎モデルの肺内サイトカインの検討より……
 - VII. 謝辞
7. 表, 図・写真 (5点以内) Table 1. Figure 1. ……とし, 本文中に入る場所を示してください。タイトル, 説明および表・図中の文字は英語にしてください。図・写真は, 中の文字をふくめ, そのままオフセット印刷できる原図にしてください。カラー印刷も可。
8. 英文演題 The effect of *Mycoplasma pneumoniae* infection on asthma model in mice
9. 英文発表者 (フルネーム, 大文字) SATOSHI KURATA, HARUHIKO TAGUCHI*, TAKAKO OSAKI, TOMOKO HANAWA, HIDEO YONEZAWA and SHIGERU KAMIYA
10. 英文所属 Department of Infectious Diseases, Kyorin University School of Medicine, Mitaka
*Department of Immunology, Faculty of Health Sciences, Kyorin University, Hachioji
11. 英文抄録 (250 words)
Mycoplasma pneumoniae infection is known as one of the factors deteriorating asthma.……
12. 英文キーワード (5項目)
Keywords: asthma, *Mycoplasma pneumoniae*, germfree mouse, animal model...

13. 引用文献 *References* は引用順に番号をつけ、本文の引用場所に右肩付けとする。著者（全著者名、大文字）、表題、雑誌・図書の名称（イタリック）、巻数（太字）、頁数（最初と最後）、年の順に記載する。
 1. TAGUCHI, H., TAKAHASHI, M., YAMAGUCHI, H., OSAKI, T., KOMATSU, A., FUJIOKA, Y. & KAMIYA, S.: Experimental infection of germfree mice with hyper-toxigenic enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7, strain 6. *J. Med. Microbiol.*, **51**, 336-343, 2002.
 2. LINDAHL, G., HEDEN, L-O. & STENBERG, L. : Streptococcal IgA receptors. In: *Molecular recognition in host-parasite interactions*, Edited by KORHONEN, T. K., MAKELA, P. H. & HOVI, T. New York, Plenum Press, pp.77-83, 1992.
 3. SAKAGAMI, T., FUKUDA, Y., TAMURA, K., TANIDA, N. & SHIMOYAMA, T.: Does *Helicobacter pylori* promote gastric carcinogenesis? *J. germfree life gnotobiol.*, **31**, 25-26, 2001. (in Japanese)
14. 連絡先 〒181-8611 東京都三鷹市…… 蔵田 訓
15. TEL (0422) 47-…… 内線……
16. FAX (0422) 44-……
17. E-mail kurata@……

3. 倫理指針：ヒトを対象とした研究は「ヘルシンキ宣言」(World Medical Assembly, 1964年, 2013年追加), 人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針に従って行われ, 動物を用いた研究は「実験動物の飼養および保管ならびに苦痛の軽減に関する基準」(平成18年環境省告示第88号)に従って行われ, 倫理委員会等で承認されたものでなければならない。

Guideline for Authors

A. Annual meeting proceedings

I. Proceeding manuscripts (oral presentations)

1. Authors and all co-authors must be members of the Japanese Association of Germfree Life and Gnotobiology (JAGG). Papers submitted for review must convey new unpublished findings from studies in germfree research or gnotobiology. Manuscripts are accepted for publication following review by the Editorial and Publications Committee. Please prepare manuscripts according to the instructions below, with reference to the printing sample available through our website.
2. Manuscripts are accepted in both English and Japanese. However, in the case of Japanese papers, the information carried in the title page, abstract, and key words must also be duplicated in English. All titles and legends to tables, figures, and photos, as well as the reference list must be prepared in English regardless of whether the papers are prepared in English or Japanese.
The title page of the manuscript should carry manuscript title, name of authors and affiliations, postal address, zip code, phone, fax, and e-mail address of the corresponding author.
Begin the manuscript on page two, starting with abstract (within 250 words), five key words, and text (2000 words), in the order of: I) Objective (or Introduction), II) Materials (or Subjects), III) Methods, IV) Results, V) Discussion, VI) Conclusion, VII) Acknowledgments (if any), References, and a maximum of 5 figures, tables, or photos in total.
3. An electronic copy in MS-Word format, tables and figures may be incorporated into the Word file, submitted as separate Excel or PowerPoint files, or as jpg, pct, eps, or tif images adjusted to actual printing size. Tables and figures should each be numbered consecutively in Arabic numerals (Table 1, Figure 1), with a title for tables and descriptive legends for figures. The location of tables and figures in the text should be indicated in the margin of the typescript. Each table and figure should be printed on a separate sheet of paper. The manuscripts in the journal are generally printed in black and white. However, if the authors prefer color printing of figure (s) in the manuscript, additional page charge will be added.
4. Abbreviations must be preceded by the full term at first mention. Use standard units of measure such as: m, cm, mm, μm , nm, l, ml, μl , kg, g, mg, μg , ng, pg.
5. References should be cited in the text using superscript Arabic numbers, in order of appearance. In the reference list, the references should be numbered, followed by authors (all authors in full, all capitals), title, journal name (italicized, abbreviated according to Index Medicus), volume (boldface), page numbers (first and last), and year of publication.

Example:

1. TAGUCHI, H., TAKAHASHI, M., YAMAGUCHI, H., OSAKI, T., KOMATSU, A., FUJIOKA, Y. & KAMIYA, S.: Experimental infection of germfree mice with hyper-toxigenic enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7, strain 6. *J. Med. Microbiol.*, , 336-343, 2002.
 2. LINDAHL, G., HEDEN, L-O. & STENBERG, L. : Streptococcal IgA receptors. In: *Molecular recognition in host-parasite interactions*, Edited by KORHONEN, T. K., MAKELA, P. H. & HOVI, T. New York, Plenum Press, pp.77-83, 1992.
 3. SAKAGAMI, T., FUKUDA, Y., TAMURA, K., TANIDA, N. & SHIMOYAMA, T.: Does *Helicobacter pylori* promote gastric carcinogenesis? *J. germfree life gnotobiol.*, , 25-26, 2001. (in Japanese)
6. Manuscripts should be sent by E-mail to jagg@ciea.or.jp.
 7. Copyright of manuscripts accepted for publication will become the property of the Japanese Association of Germfree Life and Gnotobiology (JAGG).
 8. The JAGG retains the right to publish accepted manuscripts in part or full in any network or other media recognized by the Association, in any language (including electronic publishing).

B. Original articles and reviews

I. Original articles

1. Submission of manuscripts to this journal is limited to members of the Japanese Association of Germfree Life and Gnotobiology (JAGG) or the International Association for Gnotobiology (IAG), based on material presented at the annual meeting of the JAGG or International Symposium for Gnotobiology.
2. Papers submitted as original articles must convey unpublished findings and conclusions of note from innovative studies capable of contributing to the development of germfree research or gnotobiology.
3. Acceptance of manuscripts for publication will be judged by the Editorial and Publications Committee and referees.
4. Original articles must be prepared in English throughout, in accordance with the instructions for proceeding manuscripts above, with the exception that there is no limitation in word count or number of tables, figures and photos.

II. Reviews

1. Reviews are accepted in either English or Japanese as invited papers as a rule, to be prepared in accordance with instructions for oral presentation manuscripts.

C. Ethical guidelines

Study protocol must have obtained approval by an appropriate institutional Ethics Committee. Studies on human subject must also conform to the provisions of the Declaration of Helsinki (as revised in Brazil 2013, Ethical Guidelines for Clinical Research 2015 Ministry of Health, Labour and Welfare Public Notice 415), and the Ethical Guidelines for Epidemiological Research. Animal studies must conform to the Standards for the Rearing, Housing, and Alleviation of Pain of Experimental Animals (2006 Ministry of the Environment Public Notice 88). Compliance with these guidelines must be stated within the text of original articles.

CONTENTS

REVIEW

Association of intestinal fibrosis and gut microbiota in Crohn's disease <i>Jin Imai et al.</i>	23
--	----

SCIENTIFIC PROCEEDINGS OF THE JAPANESE ASSOCIATION

Breeding of germ-free mice using an Individually Ventilated Caging System <i>Tomoyuki Ishikura et al.</i>	30
Chronic nasal inflammation during lactation period induces transient dysbiosis of gut microbiota in mice <i>Hinami Asano et al.</i>	32
Dietary supplementation of fermented wheat bran alleviates DSS-induced colitis in mice by increasing fecal SCFA content <i>Afifah Zahra Agista</i>	35
Contrast enhanced X-ray imaging of the cecum in germ-free common marmosets <i>Takashi Inoue</i>	37
Anatomical evaluation of the germ-free microminipig using a novel long-term pig rearing isolator <i>Masayoshi Otake</i>	39
IgA response to pathobiont in inflammatory bowel disease and its clinical application <i>Jin Imai et al.</i>	41
Comparison of aggressive behavior characteristics by dysbiosis of commensal gut microbiota <i>Kyuta Hanawa et al.</i>	43
The composition of dietary fatty acids alter intestinal immune responses induced by dietary antigen <i>Miwa Yoshimura et al.</i>	45
The dynamic changes of antimicrobial-resistance bacteria and fecal microbiome using flavophospholipol as the feed Additives. <i>Hayami Kudo et al.</i>	47
Butyrate promotes the anti-tumor immune response in mice <i>Yuki Yamada et al.</i>	49

GUIDELINE FOR AUTHORS

Guideline for authors	53
-----------------------------	----