

ISSN 2436-7362

JOURNAL  
OF  
GERMFREE LIFE  
AND  
GNOTOBIOLOGY

無菌生物

Vol. 54

No. 2

2024

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. 54, No. 2 Dec. 1 2024

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  
公益財団法人実中研 動物資源技術センター内  
小倉 智幸 (おぐら ともゆき)

TEL (044)201-8520

FAX (044)201-8521

jagg@ciea.or.jp

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. 54, No. 2 Dec. 1 2024

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 Medicine and Life Science  
3-25-12 Tonomachi, Kawasaki-ku, Kawasaki, 210-0821 Japan

TEL +81-44-201-8520

FAX +81-44-201-8521

E-mail jagg@ciea.or.jp

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

# ビオチンが免疫応答に与える影響

大西 拓人 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

**要旨：**ビオチンは水溶性ビタミンで、食事からの摂取に加え、腸内細菌が産生する代謝産物として体内に供給される。ビオチンはカルボキシラーゼの補酵素として働き、代謝を調節する。ビオチンの欠乏は乾癬や炎症性腸疾患などの炎症反応を誘発することが知られている。しかし、腸内細菌由来のビオチンが腸管免疫系に及ぼす影響についてはまだ不明である。ビオチン欠乏症は、ヒトにおいてアトピー性皮膚炎様の皮膚炎を引き起こすことが報告されている。また、マウスでは脱毛や体重の減少、疲労に対する効果も報告されている。そこでここではビオチン欠乏が起きた際の生体応答、特に腸管免疫応答について報告する。

## I. ビオチンの生理作用

ビオチン (Figure 1) は水溶性ビタミンであるビタミン B 群に含まれる水溶性ビタミンである。ビオチンは生体内で糖新生や脂質の代謝、アミノ酸の代謝に関わるピルビン酸カルボキシラーゼ、アセチル CoA カルボキシラーゼ、プロピオニル CoA カルボキシラーゼ、メチルクロトコニル CoA カルボキシラーゼの補酵素として生体内で働いている (Figure 2)。ビオチンは食品から摂取するほか腸内細菌が産生するものがあり、Bacteroidetes 門、Fusobacteria 門、Proteobacteria 門などがビオチンを産生する細菌として知られている。生体内でビオチンを吸収する経路は、腸管で発現する SLC5A6 遺伝子にコードされているナトリウム依存性マルチビタミン輸送体 (SMVT: sodium-dependent multivitamin transporter) によって生体内に吸収され生体内で利用される<sup>1,2</sup>。ビオチンはタンパク質に結合している結合型と結合していない遊離型の物が存在する。結合型ビオチンは食物に多く含まれており、生体内酵素によってビオチンとリジンが結合したビオシチンに分解される。その後ビオチニダーゼによって遊離型のビオチンまで分解され、SMVT を介して小腸から生体内に吸収され、生体内でさまざまな機能を発揮する。また、腸内細菌が産生するビオチンは遊離型のビオチンと考えられており消化管から直接 SMVT を介して吸収される。このビオチンは一日の摂取量の目安は厚生労働省が発表している数値は成人・小児ともに50

$\mu\text{g/mL}$  であるといわれているが平均必要量を設定する実験は行われていない<sup>3</sup>。わが国では栄養機能食品として飲料などに含まれることが多い。上記のようにビオチンの摂取量の目安は50  $\mu\text{g/mL}$  と微量の必須栄養素ではあるが欠乏症に陥る可能性がある。特に腸内細菌叢が安定していない小児や、複合カルボキシラーゼ欠損症といわれる先天性の難病などがある。ビオチンが関与するさまざまな疾患や炎症などの生体応答については多くの報告がある (Table 1) が、ビオチン欠乏の症状として、ヒトではアトピー性皮膚炎のような皮膚炎症状になることが報告されている<sup>4</sup>。また、マウスでは脱毛や体重増加の鈍化・減少などが報告されている<sup>5</sup> ほか、ビオチン欠乏による疲労に対する効果についても報告がある<sup>6</sup>。

## II. ビオチンの薬理作用

生体内でエネルギー代謝に関与するビタミンとして知られているビオチンはエネルギー代謝への関与のほかにも生体応答に関与している。その中でもビオチンを目安量より多く摂取することによって期待される薬理作用についてはいくつか報告されている。例えば、乾癬などの皮膚炎症状を発症した人に高容量のビオチンを2か月間摂取すると症状が改善された<sup>7</sup>というものが、これはビオチンの薬理作用として有名なものである。そのほかにもホルモンの上昇や糖尿病に関する報告もある<sup>8,9</sup>。

Table 1. Biotin-mediated biological responses

Biotin	Target	Result	Reference
Sufficient	Human	Improvement of dermatitis	7
	Mice	Increased hormone levels	8
		Suppression of diabetes	9
		Improvement of inflammation	10
Deficient	Human	Atopic dermatitis	4
	Mice	Alopecia	5
		Fatigue	6
Inflammation		11	

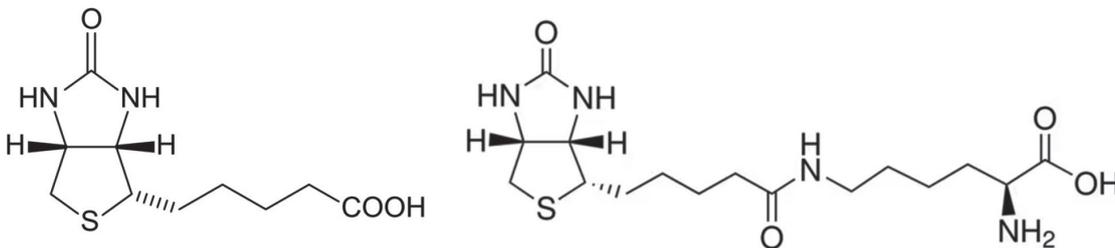


Figure 1. Biotin (left) and Biocytin (right)

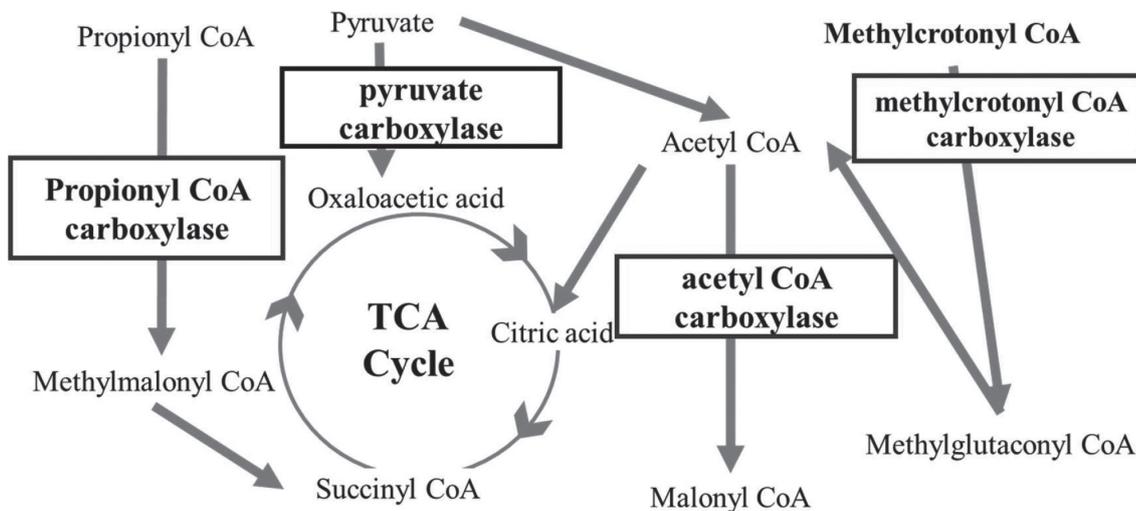


Figure 2. Metabolic pathways involving biotin as a coenzyme

### Ⅲ. ビオチンと免疫応答

ビオチンは欠乏するとアトピー性皮膚炎や乾癬のような皮膚炎症状になることが知られている。しかし、ビオチンが免疫系に与える影響の多くはわかっていない。そこで本項ではビオチンが免疫応答に与える影響とビオチン欠乏が免疫応答に与える影響を紹介する。マウスに1.5% デキストラン硫酸ナトリウム塩 (DSS) を投与することによって誘導される大腸炎モデルにビオチンを投与した報告がある。DSS 群では炎症の指標

として見られる結腸の長さは対照群より短くなっていたが、DSS + 1.5 mM ビオチン投与群では DSS を投与しない対照群と差はなかった。また、結腸部位では IL-6 や TNF- $\alpha$  などの炎症性サイトカインの遺伝子発現量が DSS + 1.5 mM ビオチン投与群において DSS 群より減少していた。これは生体内にビオチンを補充することでの生体内の免疫応答を改善するといった報告である<sup>10</sup>。その逆に、ビオチンが生体内で欠乏した際の免疫応答としてもいくつか報告がある。免疫系の報告に

関わらず、ビオチン欠乏による生体内の影響を解析した報告ではビオチンとの結合性の高いアビジンが多く含まれている卵白含有ビオチン欠乏飼料を用い効率的にビオチン欠乏を引きおこした後に解析を行う実験系がある。マウスにママ週間のビオチン含有飼料と卵白含有ビオチン欠乏飼料を投与したとき、マウス鼠径部のリンパ節の細胞を採取しマ細胞を解析したところ、IFN- $\gamma$ 、IL-17の産生量がビオチン欠乏群で対照群と比較して上昇していた。それに伴い、同サイトカインの遺伝子発現量も上昇していた同。これらのことからビオチンは生体の免疫応答に影響を与える可能性が考えられる。

#### IV. 腸内細菌とビオチン

これまでビオチンの投与による疾患の回復やビオチン欠乏による炎症応答のいくつかを紹介した。だが腸内細菌の変化によるビオチン欠乏の報告やビオチン欠乏による腸内細菌の影響の報告は少ない。ビオチンは腸内細菌が産生するビタミンとして有名である。そのようなビオチンと腸内環境の関係についてもとても興味深いところである。HayashiらはSPF環境で飼育しているC57BL/6マウスでは食餌性ビオチンの欠乏では脱毛など症状は現れなかったが、同時に抗生物質であるバンコマイシンの投与をすると脱毛が見られたと報告をしている。その際ビオチン要求菌である*Lactobacillus murinus*の存在比が増加していることが分かり、*L. murinus*を無菌マウスに投与してノトバイオト化させると無菌マウスと比べ顕著に脱毛することが分かった<sup>4</sup>。

また、ビオチン欠乏による腸内細菌の変化を解析した文献はほかにもあるが、実際に、ビオチンを産生する細菌による生体応答への影響について明解に示した報告がない。

#### V. ビオチンと腸管免疫系

生体の主要な免疫応答には腸管免疫系がある。腸管は食物の消化・吸収をする組織として知られている一方で、生体内最大の免疫組織としても機能しており、腸管免疫系は常に多くの食品抗原や病原体にさらされている。また、腸管には多くの微生物が共生し、腸内細菌叢を形成している。それらの腸内細菌は食物の消化を手助けするだけでなく、宿主の免疫応答に与える影響も大きい。

腸管の免疫系を形成する腸管関連リンパ組織は小腸部位にパイエル板 (PP)、大腸部位の盲腸に盲腸リンパ節 (CeP)、結腸に結腸リンパ節 (CoP) が存在する。それらのリンパ節では食品抗原からの刺激や、腸内細菌からの刺激によって生体の免疫反応を制御している。また、小腸部位と大腸部位では腸内細菌の数や種類が違い小腸部位に比べて大腸部位のほうが多くの腸内細菌が存在し、多様性にも富んでいる。また、免疫応答にも違いがあることが報告されている。Tsudaらは小腸と大腸の免疫応答の違いについて、BALB/cマウスの小腸部位ではIgA<sup>+</sup>B細胞の発現が高くIgG2b<sup>+</sup>B細胞が少ないのに対し、大腸部位にある盲腸のCePではIgG2b<sup>+</sup>B細胞がIgA<sup>+</sup>B細胞に比べて多いことを報告した<sup>12</sup>。

そこで我々は食餌由来、腸内細菌由来ビオチン欠乏が腸管免疫系に与える影響を検討した。通常環境マウスと無菌環境マウスにそれぞれ対照飼料、または腸内細菌の影響を解析するためアビジン非含有ビオチン欠乏飼料を給餌した。特に、無菌環境ではビオチン欠乏食を与えた群を真性のビオチン欠乏モデルとして実験を行った。その結果、通常環境下で飼育しているものと違いが見えてきた。まず、マウスのビオチン欠乏の症状として見られる脱毛についてだが、通常環境でビオチン欠乏食を投与しても脱毛は起こる個体は少なく、無菌マウスにビオチン欠乏食投与をした真性のビオチン欠乏モデルでは多くの個体で脱毛が起こり、少なくとも体表面の2割以上の脱毛が起きることが観察された。また、多い個体では5~6割程度の脱毛が確認できることから、腸内細菌が産生するビオチンが生体で利用するビオチンの多くを担っていると考えられる。

真性のビオチン欠乏モデルマウスを用いた実験のみられる生体応答については、特に腸管免疫系における代表的な抗体産生に関与するB細胞やT細胞の応答について解析を行った。腸管粘膜における特徴的な免疫応答にはB細胞の抗体産生応答があり、主要な抗体には免疫グロブリン (Ig) Aがあげられる。そこで、我々はB細胞の応答として腸管の粘膜中の主要な抗体であるIgAの応答について検討したところ、腸内細菌の存在はIgA産生応答を強く誘導するのに対し、ビオチン欠乏によるIgA産生応答の影響はビオチン欠乏食群と対照食群との差は認められなかった。しかし、抗体産生の誘導に強く関与する腸管関連リンパ組織中のT細胞の応答については、フローサイトメトリーによるT

細胞フェノタイプの解析において、真性のビオチン欠乏群が他の群と比較して大腸部位の免疫応答がビオチンの影響を受けている特徴が明らかになった。特に、CoP細胞ではナイーブT細胞 ( $CD3^+CD4^+CD44^{low}CD62L^{high}$ ) の発現が減少し、エフェクターT細胞 ( $CD3^+CD4^+CD44^{low}CD62L^-$ ) の発現が上昇している

ことが分かってきた (Table 2)。また、T細胞分化にはT細胞内のエネルギー代謝が関与していることが報告されている<sup>13,14</sup>。我々は、ビオチン欠乏による大腸免疫系のT細胞分化のメカニズムの解明を目指し、ビオチンが関与するエネルギー代謝とT細胞応答に注目したさらなる解析を進めている。

Table 2. Relative comparison in the ratio of specific phenotypes in the  $CD4^+$ T cells of each group when the Control diet group of Conventional mice is used as a reference

	Naïve T cell ( $CD3^+CD4^+CD44^{low}CD62L^{high}$ )				Effector T cell ( $CD3^+CD4^+CD44^{low}CD62L^-$ )			
	Conventional		Germ-Free		Conventional		Germ-Free	
	Control	Biotin-Deficient	Control	Biotin-Deficient	Control	Biotin-Deficient	Control	Biotin-Deficient
PP	++	++	++	++	++	++	++	++
CoP	++	++	++	+	++	++	++	+++

## VI. まとめ

ビタミンB群に含まれるビオチンは、生体内でエネルギー代謝以外にも多くの応答に関与しており、ホルモン量の変化、疲労に対する効果、免疫系に対する効果などの生体応答にも影響を及ぼしている。また、腸内細菌由来のビオチンが生体内の応答にも関わっていることが分かってきた。この先、さらに多くのビオチンの機能が解明されることによって、食物に限ったビオチンだけではなく、ビオチンを産生する腸内細菌

の有用性ととも、ビオチンが多くの疾患の予防や改善に用いられることが期待される。

謝辞：生体内ビオチン濃度の定量にあたっては、白川仁博士・駒井三千夫博士・大崎雄介博士（東北大学栄養学）に多大なるご指導と有益なご助言を賜り、厚く御礼申し上げます。

## Effects of biotin on the host immune responses

TAKUTO ONISHI, MASATO TSUDA and AKIRA HOSONO

*Food and Physiological Functions Laboratory, College of Bioresource Sciences, Nihon University, Fujisawa*

Biotin is a water-soluble vitamin, and is supplied to the body by not only dietary intake but also a metabolite produced from intestinal bacteria. Biotin acts as a cofactor for carboxylase and regulates energy metabolism. It is known that the biotin deficiency induces the inflammatory responses such as psoriasis and inflammatory bowel diseases. However, the effects of biotin derived from intestinal bacteria on the intestinal immune system are still largely unknown. Biotin deficiency has been reported to cause atopic dermatitis-like symptoms in humans. There are also reports indicating biotin deficiency lead to reduced alopecia and weight loss and accumulated fatigue in mice.

Although biotin deficiency promotes inflammations, the regulatory effects of biotin on cellular immune responses are not fully understood. Therefore we are focusing on biological responses, especially the large intestinal immune responses using germ-free mice with biotin deficient conditions. We analyzed the activated status of CD4<sup>+</sup> helper T cells in colonic patches (CoP) from germ-free mice received biotin deficient diet (GD) and control diet (GC). The lower proportion of naive CD4<sup>+</sup> T cells (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD44<sup>low</sup>CD62L<sup>high</sup>) and higher percentage of effector CD4<sup>+</sup> T cells (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD44<sup>low</sup>CD62L<sup>-</sup>) were observed in CoP of GD mice, which are the condition with primary biotin deficiency compared to those of GC mice. To understand the cellular and molecular mechanisms underlying these altered T cell status, we are focusing on energy metabolism in CD4<sup>+</sup> T cells caused by biotin deficiency.

It is expected that biotin from biotin-producing intestinal bacteria as well as foods will be used for the prevention and improvement of many diseases. Further biological functions of biotin need to be elucidated.

### References

1. Sabui S, Bohl JA, Kapadia R, Cogburn K, Ghosal A, Lambrecht NW, et al. Role of the sodium-dependent multivitamin transporter (SMVT) in the maintenance of intestinal mucosal integrity. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology*. 2016;311 (3):G561-70.
2. Neophytou C, Pitsouli C. Biotin controls intestinal stem cell mitosis and host-microbiome interactions. *Cell reports*. 2022;38 (10):110505.
3. 厚生労働省：日本人の食事摂取基準，2020.
4. Hsieh CH, Lee J, Sung HH, Huang YF, Ding YS, Li CY, et al. Novel SLC5A6 mutations lead to B lymphocyte maturation defects with metabolic abnormality rescuable by biotin replenishment. *Clinical immunology (Orlando, Fla)*. 2023;257:109855.
5. Hayashi A, Mikami Y, Miyamoto K, Kamada N, Sato T, Mizuno S, et al. Intestinal dysbiosis and biotin deprivation induce alopecia through overgrowth of *Lactobacillus murinus* in mice. *Cell reports*. 2017;20 (7):1513-24.
6. Osada K, Komai M, Sugiyama K, Urayama N, Furukawa Y. Experimental study of fatigue provoked by biotin deficiency in mice. *International journal for vitamin and nutrition research Internationale Zeitschrift für Vitamin- und Ernährungsforschung Journal international de vitaminologie et de nutrition*. 2004;74 (5):334-40.
7. Maebashi M, Makino Y, Furukawa Y, Ohinata K, Kimura S, Sato T. Effect of biotin treatment on metabolic abnormalities occurring in patients with sternocostoclavicular hyperostosis. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*. 1993;15 (1):65-76.
8. Shiozawa K, Maeda M, Ho HJ, Katsurai T, Howlader MZH, Horiuchi K, et al. Biotin enhances testosterone production in mice and their testis-derived cells. *Nutrients*. 2022;14 (22).

9. Zhang H, Osada K, Maebashi M, Ito M, Komai M, Furukawa Y. A high biotin diet improves the impaired glucose tolerance of long-term spontaneously hyperglycemic rats with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Journal of nutritional science and vitaminology*. 1996;42 (6):517-26.
10. Skupsky J, Sabui S, Hwang M, Nakasaki M, Cahalan MD, Said HM. Biotin supplementation ameliorates murine colitis by preventing NF- $\kappa$ B activation. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*. 2020;9 (4):557-67.
11. Elahi A, Sabui S, Narasappa NN, Agrawal S, Lambrecht NW, Agrawal A, et al. Biotin Deficiency Induces Th1- and Th17-mediated proinflammatory responses in Human CD4<sup>(+)</sup> T Lymphocytes via Activation of the mTOR Signaling Pathway. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2018;200 (8):2563-70.
12. Tsuda M, Okada H, Kojima N, Ishihama F, Muraki Y, Oguma T, et al. Cecal patches generate abundant IgG2b-bearing B Cells that are reactive to commensal microbiota. *Journal of immunology research*. 2022;2022:3974141.
13. Aso K, Kono M, Kanda M, Kudo Y, Sakiyama K, Hisada R, et al. Itaconate ameliorates autoimmunity by modulating T cell imbalance via metabolic and epigenetic reprogramming. *Nat Commun*. 2023;14 (1):984.
14. Chen C, Zhang W, Zhou T, Liu Q, Han C, Huang Z, et al. Vitamin B5 rewires Th17 cell metabolism via impeding PKM2 nuclear translocation. *Cell reports*. 2022;41 (9):111741.

# 第57回 日本無菌生物ノートバイオロジー学会総会

(承 前)

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

January 19-20, 2024

Tokyo

President *Motomichi Takahashi*

会 長 高 橋 志 達

会 期 2024年（令和6年）1月19日（金）・20日（土）

会 場 東京都北区王子 北とびあ

## 一般演題 セッション I

座長 林 篤 史  
(ミヤリサン製薬株式会社)

1. 無菌ヒト肝キメラマウスの作製…………… 36  
野津量子, 富山香代, 高橋利一  
(公益財団法人実中研)
2. 授乳期の慢性鼻腔炎症に誘導される腸内細菌叢の一過性及び長期的変動…………… 39  
小牧すずほ\*, 大崎敬子\*\*, 石井さなえ\*\*\*  
(\*杏林大学大学院保健学研究科, \*\*杏林大学医学部感染症学, \*\*\*杏林大学保健学部臨床検査技術学科)
3. *C. albicans* の増殖, 菌糸形成, バイオフィームおよび上皮細胞接着に …… 42  
対するヒト腔由来乳酸菌の阻害効果  
高野知憲\*, 工藤逸美\*\*, 松本麻未\*\*, 岡 健太郎\*\*, 高橋志達\*\*, 國島広之\*  
(\*聖マリアンナ医科大学感染症学講座, \*\*ミヤリサン製薬株式会社研究開発本部研究部)
4. ビオチン摂取が認知機能関連物質の産生に与える影響の解析…………… 45  
吉川智貴, Afifah Z. 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)
5. 無菌マウスを用いた真性ビオチン欠乏モデルにおける炎症反応とT細胞応答の解析 …… 47  
大西拓人\*, 津田真人\*, 岡田 開\*, 大崎雄介\*\*, 白川 仁\*\*, 駒井三千夫\*\*, 細野 朗\*  
(\*日本大学生物資源科学部食品生命機能学研究室, \*\*東北大学大学院農学研究科栄養学分野)

## 一般演題 セッションII

座長 米澤英雄  
(東京歯科大学)

6. CBM588による抗腫瘍免疫応答の誘導と機序の解明…………… 49  
北原秀悟, 丹羽みずほ, 山田裕貴, 工藤逸美, 林 篤史, 高橋志達  
(ミヤリサン製薬株式会社研究開発本部)
7. ペプチド資化性を有するブタ小腸内細菌の単離と同定…………… 52  
早川陽平, 大坪和香子  
(東北大学大学院農学研究科動物食品機能学分野)
8. MPS マウスを用いたヘリコバクターピロリ感染に関連する消化管内常在細菌叢の解析 …………… 54  
北条 史\*, 米澤英雄\*\*, 岡 健太郎\*\*\*, 高橋志達\*\*\*, 藏田 訓\*\*\*\*, 神谷 茂\*\*,  
三戸部治郎\*\*\*\*\*, 大崎敬子\*\*\*\*\*,  
(\*杏林大学大学院医学研究科共同研究施設部門実験動物施設部門,  
\*\*東京歯科大学歯学部微生物学講座, \*\*\*ミヤリサン製薬株式会社中央研究所,  
\*\*\*\*杏林大学保健学部臨床検査技術学科微生物学部門, \*\*\*\*\*杏林大学医学部感染症学教室)
9. 無菌コモンマーマーモセットの繁殖の検討 …………… 56  
岡原則夫, 植野昌未, 井上貴史  
(公益財団法人実中研)
10. 繁殖母豚への酪酸菌飼料添加物が, 子豚の離乳後の腸内環境に与える影響評価…………… 58  
工藤逸美\*, 森合修也\*\*, 扇 隆介\*, 小野田 尚\*\*, 篠原良太\*\*, 高橋志達\*  
(\*ミヤリサン製薬株式会社研究開発本部研究部, \*\*フィード・ワン株式会社 研究所)

# 無菌ヒト肝キメラマウスの作製

野津 量子 富山 香代 高橋 利一

(公益財団法人実中研)

**要 旨：** 肝臓で代謝された物質は胆汁とともに腸管内へ排出され、腸管内において腸内細菌叢による代謝を受けることが明らかとなっている。ヒト肝細胞が生着しているヒト肝キメラマウスはヒトの肝臓代謝活性を有していることから、ヒト腸内細菌叢の定着やヒト固有の代謝活性の観察が期待される。このような背景から、ヒト腸内細菌叢を定着させるモデルマウスの作製法として、無菌環境でのヒト肝細胞移植技術の確立、および SPF ヒト肝キメラマウスへの抗生剤投与による消化管内除菌の 2 法を検討している。今回は、無菌ヒト肝キメラマウスの作製について報告する。

ヒト肝細胞を移植した無菌 NOG-Tg (Ttr-UL23mut30) 4-9/Jic (TKm30) マウスでは、雌雄ともに継続的な体重低下と肝障害が確認された一方、ヒト肝細胞の生着はほとんど認められなかった。SPF ヒト肝キメラマウスでは70% 以上のヒト肝細胞が生着しているため、本モデルにおいては腸内細菌叢がヒト肝細胞の生着に重要な影響を及ぼすことが推察された。

**キーワード：** 無菌ヒト肝キメラマウス、陽圧クリーンルーム、個別換気ケージシステム、ヒト肝細胞移植、ヒト肝細胞置換率

## I. 背景

肝臓で代謝された物質は胆汁とともに腸管内へ排出され、腸管内において腸内細菌叢による代謝を受けることが明らかとなっている。ヒト肝細胞が生着しているヒト肝キメラマウスはヒトの肝臓代謝活性を有していることから、ヒト腸内細菌叢の定着やヒト固有の代謝活性の観察が期待される。このような背景から、ヒト腸内細菌叢を定着させるモデルマウスの作製法として、われわれは無菌環境でのヒト肝細胞移植技術の確立、および通常環境で作製されたヒト肝キメラマウスへの抗生物質投与による消化管内除菌の 2 法を検討している。今回は、無菌マウスを用いたヒト肝キメラマウスの作製について報告する。

## II. 材料と方法

5-6 週 齢 の 無 菌 NOG-Tg (Ttr-UL23mut30) 4-9/Jic (TKm30) マウスへ、マウス肝臓への障害を誘導するためのガンシクロビル飲水投与条件の検討として、至適濃度および投与日数の検討を無菌ビニールアイソレータにて行った。ガンシクロビル投与開始10日後に血液生化学性状から肝障害の度合いを確認し、至適肝障害のマウスに対してヒト肝細胞を $10^6$ 個/匹、脾臓経由で移植した。移植は陽圧クリーンルーム (bioBUBBLE 社) に併設された陽圧ワークステーションにて、無菌環境に配慮して実施した<sup>1</sup> (Figure 1)。

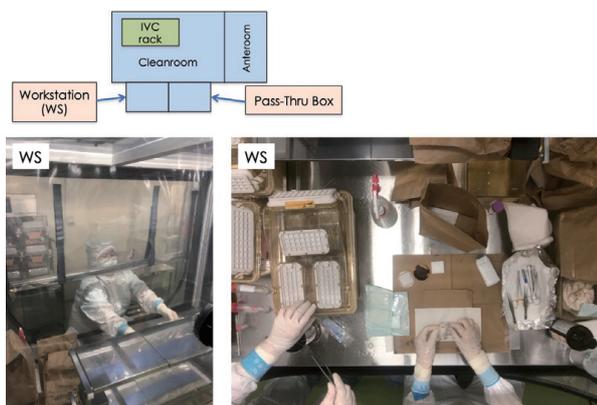


Figure 1. Environment of generating germ-free chimeric mice. This chart shows a bioBUBBLE cleanroom combined with an individually ventilated cage system (above). The workers wore dust-free garments in a positive-pressure cleanroom (left). We prepared to transplant of human liver cells into germ-free TKm30 mice in a workstation (right).

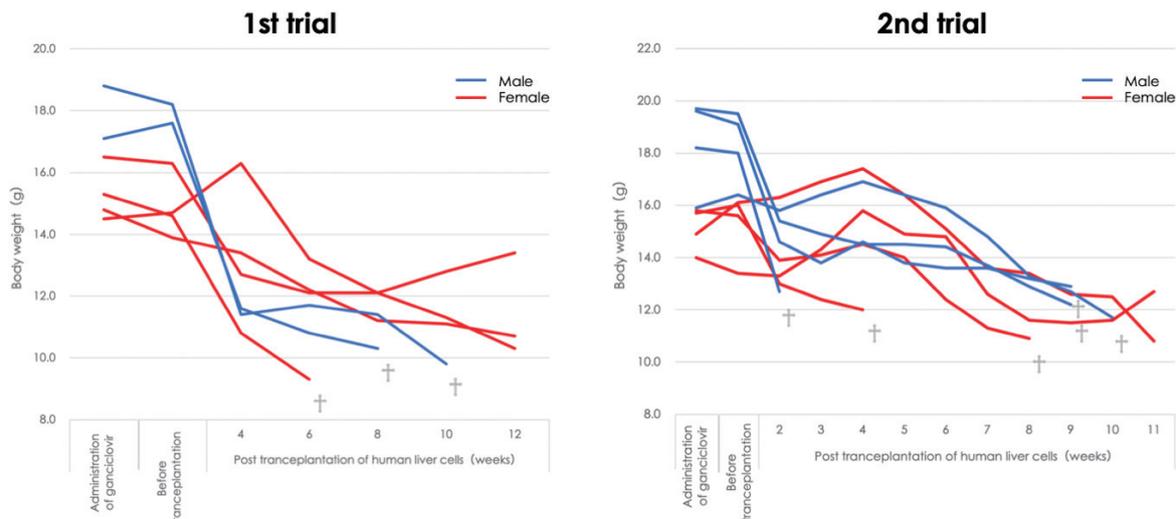


Figure 2. Body weight curve of germ-free human liver chimeric mice. Germ-free human liver chimeric mice were generated twice. However, germ-free TKm30 mice showed a continuous decrease in body weight after transplantation of human liver cells in both trials. Unfortunately, some mice died.

ヒト肝細胞移植マウスは個別換気ケージ（日本クレア社）で飼育し、体重測定を週1回実施した。無菌検査は月1回実施し、無菌の維持を確認した。マウスは移植4、7週後に採血して血液生化学性状から肝障害およびヒト肝細胞の生着度合いを確認した。

### Ⅲ. 結果, 考察

ガンシクロビルはメスで0.05mg/mL、オスで0.08mg/mLを72時間飲水投与することを至適条件とした。ヒト肝細胞移植後の体重推移は既報<sup>2</sup>と類似して、雌雄ともに継続的な体重低下が認められた (Figure 2)。

また、ヒト肝細胞を移植した無菌 TKm30マウスは、継続した肝障害が確認された一方、ヒト肝細胞の生着はほとんど認められなかった (Figure 3)。

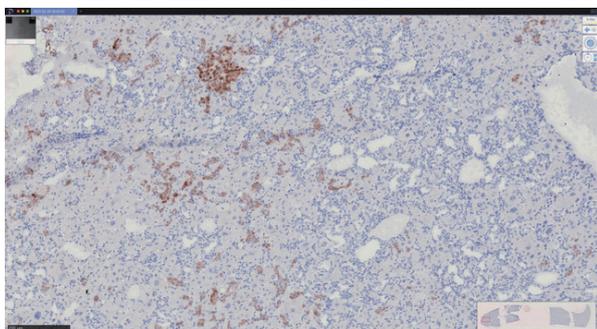


Figure 3. Histopathological examination in an immunostaining for human mitochondria of the livers of germ-free human liver chimeric mouse. Human hepatocytes were stained brown..

2回実施した本検討の飼育期間中においては、いずれの検討も無菌維持が確認された。SPFヒト肝キメラマウスでは70%以上のヒト肝細胞が生着しているため<sup>3</sup>、本モデルにおいては腸内細菌叢がヒト肝細胞の生着に重要な影響を及ぼすことが推察された。

### Ⅳ. まとめ

本検討では、Kaらが報告した個別換気ケージシステムとbioBUBBLEを組み合わせた実験環境<sup>4</sup>における外科的手術において、環境菌に汚染することなく無菌ヒト肝キメラマウスを維持することができた。ヒト肝細胞を移植した無菌 TKm30マウスは継続的な体重減少を呈し、死亡する個体が散見された。これらのマウスは継続した肝障害が確認された一方、ヒト肝細胞の推定置換率は低値であった。

今後は、もう一方のアプローチである通常環境で作製されたヒト肝キメラマウスへの抗生物質投与による消化管内除菌を実施する。その後、無菌あるいは消化管内除菌を施したヒト肝キメラマウスにヒト便投与し、ヒト肝細胞の生着動態およびヒト便由来の菌叢変化を観察する予定である。

### Ⅴ. 謝辞

本研究は会員外共同研究者である米田直央氏、末水洋志氏、川井健司氏および末松誠氏の協力のもと実施した。また、特定奨励費を使用して実施した。

## Generation of germ-free human liver chimeric mice.

RYOKO NOZU, KAYO TOMIYAMA, and RIICHI TAKAHASHI

*Central Institute for Experimental Medicine and Life Science, Kawasaki*

Substances metabolized in the liver are excreted into the intestinal tract with bile and further metabolized by the gut microbiota. Since human liver chimeric mice have human liver metabolic activity, they are expected to be colonized with human gut microbiota and present human-specific metabolic activity. Given this background, we generated germ-free human liver chimeric mice for colonizing human gut microbiota.

We investigated the optimal concentration of ganciclovir to induce liver injury. Mice were administered ganciclovir in drinking water for 72 hours to 5 to 6-week-old germ-free NOG-Tg (Ttr-UL23mut30)4-9/Jic (TKm30) mice. Human liver cells were transplanted via the spleen after confirming the degree of liver injury based on the plasma ALT activity. The TKm30 mice transplanted with human hepatocytes were reared in individually ventilated cages; the body weight of these mice was measured once a week. Sterility testing was performed once a month to confirm that the germ-free status was maintained. After 4 and 7 weeks of human liver cell transplantation, the replacement rate of human hepatocytes in the murine liver was estimated using the concentration of choline esterase in plasma as an index.

Germ-free TKm30 mice showed a continuous decrease in body weight after transplantation of human liver cells, similar to previous reports. The mice showed continued liver injury, whereas almost no engraftment of human hepatocytes was observed. As SPF human liver chimeric mice have high replacement rates of human hepatocytes, it was inferred that the presence of gut microbiota is essential for the engraftment of human liver cells in this model.

**Keywords:** Germ-free human liver chimeric mice, positive pressure cleanroom, individually ventilated cage system, transplantation of human liver cells, replacement rate of human hepatocyte

### *References*

1. Ka Y, Ogura T, Tomiyama K, Ueno M, Nozu R, Tsuruzono N, *et al.* : Creation of an experimental rearing environment for microbiome animal research using an individually ventilated cage system and bioBUBBLE enclosure. *Exp. Anim* 2021,70 : 177-184.
2. Morioka S, Ishida Y, Sanoh S, Chayama K. & Tateno C.: Development of humanized-liver mouse model with transplanted human gut microbiota 2022 : IWHM6.
3. Uehara S, Higuchi Y, Yoneda N, Kawai K, Yamamoto M, Kamimura H, *et al.* : An improved TK-NOG mouse as a novel platform for humanized liver that overcomes limitations in both male and female animals. *Drug. Metab. Pharmacokinet* 2022, 42: 100410.
4. 公益財団法人実中研. 動物実験設備および動物実験方法. 特開2022-17768. 2022-1-26.

# 授乳期の慢性鼻腔炎症に誘導される腸内細菌叢の一過性及び長期的影響

小牧 すずほ\* 大崎 敬子\*\* 石井 さなえ\*\*\*

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

**要旨：** 授乳期の腸内細菌叢は、生涯を通じて宿主の生理機能に影響を及ぼすが、その機構は明らかではない。成体マウスを用いた先行研究では、慢性鼻腔炎症により特に雄マウスの腸内細菌叢が変動することを見出した。本研究では、授乳期のマウスに慢性鼻腔炎症を誘発し、鼻腔炎症誘発後にディスバイオーシスが起るか、その後成体になった時期に持続しているか、この過程に性差が見られる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。4週齢（離乳直後）と10週齢（成体）の時点で、盲腸内容物の16S rRNA ゲノム解析を行った。その結果、4週齢では、リポ多糖投与群に雌雄で異なるディスバイオーシスが起った。10週齢では雌雄ともほぼ正常に戻ったが、一部の細菌の割合は低いままだった。したがって、授乳期の慢性鼻腔炎症は腸内細菌叢の正常な成熟を妨げる可能性が示唆された。

**キーワード：**慢性鼻腔炎症、授乳期、腸内細菌叢、ディスバイオーシス

## I. 目的

腸内細菌叢は、出生と同時に宿主に棲息し始め、分娩様式、授乳方法、環境などの影響を受けて発達する。乳児が離乳し固形食を食べ始めると、腸内細菌叢は成人のものに近づく。最初に棲息した腸内細菌叢は、生涯を通じて宿主の生理機能に大きな影響を及ぼすことが知られているが、その機構は明らかではない。そこで、授乳期の腸内細菌叢の異常が生涯にわたって維持され、宿主の健康に影響し続けるのではないかと考えた。我々は以前の研究で、成体雄マウスにおいて、慢性的な鼻腔炎症が腸内細菌叢のディスバイオーシスを誘導することを見出した<sup>1</sup>。本研究では、授乳期のマウスに慢性鼻腔炎症を誘発し、離乳直後にディスバイオーシスが起るか、そのマウスが成体まで成長した時点においてディスバイオーシスが起っているか、この過程に性差が見られるかについて明らかにすることを目的とした。

## II. 材料

実験動物として C57BL/6 JmsSLC 雌雄マウス（7日齢）を用いた。

## III. 方法

雌雄マウスにリポ多糖（LPS）を週2回（P7, P10, P14, P17, P21, P24）、両側鼻腔に投与することで慢性鼻腔炎症を誘発した（LPS群）。対照として生理食塩水を投与した（対照群）。いずれも P24で離乳した。離乳直後の4週齢と成体まで成長した10週齢の時点において、盲腸内容物の総DNAを抽出し、16S アンプリコンシーケンス解析を行った。週1回体重を測定した。

## IV. 結果

組織学的解析の結果、4週齢の時点では、雌雄 LPS 群において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、同程度に鼻腔炎症が起っていることを確認した。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。離乳後、雄の LPS 投与群では対照群に比べて体重が低くなったが、生後42日以降は対照群に追いつき差が見られなくなった。雌はどの時点においても群による体重の違いは見られなかった。

4週齢の盲腸内容物由来の細菌叢において、bray-curtis および jaccard 指数を用いて $\beta$ 多様性解析を行った。その結果、雌雄差、処置差が有意に見られた。門レベルの解析の結果、雄の LPS 群では、*Firmicutes* の比率が増加し、*Bacteroidota* の比率が減少した。雌の LPS 群では、*Deferribacterota* の比率が減少した。Lefse 解析の結果、雄の LPS 群では、腸炎や肥満で増加することが知られている細菌の比率が増加していた。雌の LPS 群では、これらの細菌に加え、短鎖脂肪酸産生菌も増加していた。10週齢の盲腸内容物由来の細菌叢において、同様に $\beta$ 多様性解析を行った結果、雌雄差はみられたものの、処置差は見られなかった。門レベルの解析の結果、雄の LPS 群では変化がみられなかったが、雌の LPS 群では *Desulfobacterota* の比率が増加した。Lefse 解析の結果、雄の LPS 群では、短鎖脂肪酸産生菌として知られる細菌の比率が減少した。雌の LPS 群では、LPS 産生菌の比率が増加し、短鎖脂肪酸産生菌として知られる細菌の比率が減少した。

4週齢と10週齢の対照群を比較した時、10週齢では短鎖脂肪酸産生菌の比率が増加していた。

## V. 考察

授乳期間中は、LPS 群と対照群で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母乳を介してどのマウスにも同様に与えられたと考えられる。

4週齢の LPS 群で、雌雄ともに腸炎や肥満で増加す

ることが知られている細菌が増加したことから、軽度

に全身性の炎症が起こっている可能性が示唆された。また、雌ではそういった疾患に関連する細菌に加えて、短鎖脂肪酸産生菌も増加していたことから、短鎖脂肪酸が生体防御因子として働き、腸内細菌叢の過度な変動が起こらず、鼻腔炎症による影響も少なかったのではないかと考える。通常は腸内細菌叢の成熟とともに増加する細菌の比率が、LPS 群の10週齢では増加しなかったことから、授乳期の慢性鼻腔炎症によって腸内細菌叢の成熟が妨げられている可能性が示唆された。

## VI. 結論

授乳期の慢性鼻腔炎症は一過性のディスバイオーシスを引き起こし、正常な腸内細菌叢の成熟が妨げられる可能性が示唆された。また、ディスバイオーシスの程度には性差が見られた。

## VII. 謝辞

本研究を進めるにあたり多くの方にご指導ご鞭撻いただいた。本研究の16S rRNA メタゲノム解析では、ミヤリサン製薬株式会社中央研究所の支援をうけた。本研究は、杏林大学の共同研究奨励費 (2020)、三島海雲記念財団の共同研究奨励金 (2021)、ヤクルトバイオサイエンス研究財団 (2023) の助成を受けたものである。ご協力いただいた方々に深く感謝申し上げます。

## Chronic nasal inflammation during the lactation period induces transient and long-term dysbiosis of gut microbiota in mice

SUZUHO KOMAKI\*, TAKAKO OSAKI\*\* and SANAE HASEGAWA-ISHII\*\*\*

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

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

\*\*\**Faculty of Health Sciences, Kyorin University, Tokyo*

The gut microbiota begins to colonize the host body following birth, develops during the lactation period and changes to the adult type after weaning. The gut microbiota during the lactation period has profound effects on the host physiology throughout the life, but the mechanism is still unclear. Our previous study indicated that chronic nasal inflammation induces dysbiosis of the gut microbiota in adult male mice. Here we addressed the questions whether chronic nasal inflammation during the lactation period induces dysbiosis, whether the dysbiosis is retained until they grow up to adult, and whether there are sex differences in the changing pattern of the gut microbiota. Male and female baby mice received intranasal administration of lipopolysaccharide (LPS) twice a week during the lactation period for 3 weeks and then the cecal contents were obtained for 16S rRNA analysis at 2 time points; at 4 weeks (wks), just after weaning and at 10 wks, when they grow up to adult. At 4 wks, the beta diversity of gut microbiota was significantly different between saline- and LPS-treated mice. The changing pattern was different between LPS-treated male and female mice. At 10 wks, the beta diversity was not different between saline- and LPS-treated mice, but detailed analysis showed that the ratio of one short-chain fatty acid-producing bacteria, which usually increase as mice grow up, was significantly lower in LPS-treated male and female mice. Together, chronic nasal inflammation during the lactation period caused transient and long-term dysbiosis and may inhibit normal maturation of gut microbiota.

**Keywords:** chronic nasal inflammation, lactation period, gut microbiota, dysbiosis

### *Reference*

1. 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.* 2021,11(1), 4640.

## *C. albicans* の増殖，菌糸形成，バイオフィームおよび上皮細胞 接着に対するヒト腔由来乳酸菌の阻害効果

高野 知憲\* 工藤 逸美\*\* 松本 麻未\*\* 岡 健太郎\*\*  
高橋 志達\*\* 國島 広之\*

(\*聖マリアンナ医科大学感染症学講座, \*\*ミヤリサン製薬株式会社研究開発本部研究部)

**要 旨：** *Lactobacillus* 属細菌の代謝産物は、*Candida albicans* のバイオフィーム形成を阻害する。バイオフィーム形成阻害の機序としては、*Lactobacillus* 属細菌自体による *C. albicans* の細胞表面への接着抑制作用と *Lactobacillus* 属細菌の代謝産物による菌糸形成を阻害作用が重要である。

代謝産物として菌糸形成阻害において、乳酸菌が濃度依存的な抑制効果を認めバイオフィーム形成阻害に重要な役割を果たしている可能性がある。

### I. 背景

抗菌薬の使用や免疫抑制により、腸管や腔では細菌叢を構成する細菌種の多様性が消失し dysbiosis が生じる。*Candida* 属真菌は粘膜の正常細菌叢に dysbiosis が生じることで、日和見感染症（カンジダ症）を引き起こす。カンジダ症のうち、最も頻度の高い原因真菌 *Candida albicans* は宿主の粘膜や血管内留置カテーテル等の人工物にバイオフィーム（BF）という主に多糖類からなるマトリックスに埋め込まれた微生物の細胞からなる構造化されたコミュニティを形成する。BF が関連した疾患では、本来効果を有する薬剤に対して抵抗性を示すことが知られている。特に、外陰腔部にて *C. albicans* が優位に増殖することで、炎症が起こり外陰腔カンジダ症（Vulvovaginal Candidiasis: VVC）を発症する。VVC の生涯有病率は75%にも及び、QOL の低下、抗真菌薬の乱用、不妊と関連する可能性がある。近年、*Lactobacillus* 属による VVC の制御に関する報告があるものの、その制御機構に関わる *Lactobacillus* 属の代謝産物に関しては乳酸と過酸化水素についての研究が多く、それ以外の代謝産物と BF 形成に関する相加・相乗・拮抗作用は不明である。本研究で *Lactobacillus* 属細菌の *C. albicans* の BF 形成に対する阻害作用を解析することを目的とした。

### II. 材料と方法

*C. albicans* と同定された45株の臨床分離株を使用し Crystal violet (CV) 及び water-soluble tetrazolium

salts (WST-1) にて BF 形成能の評価を行い最も BF 形成能が高い株 (Ca) を選別した。また腔内菌叢の構成細菌として報告のある *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus jensenii*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactocaseibacillus rhamnos*, 及び *Limosilactobacillus vaginalis* の5菌種27株の臨床分離株を使用した。乳酸桿菌の培養上清に含まれる乳酸および過酸化水素を定量後、一定量の培養上清を *C. albicans* に曝露し、菌糸形成阻害および BF 形成阻害作用を評価した。また、乳酸桿菌生菌による Ca の上皮細胞への接着阻害効果を HeLa 細胞で評価した。

### III. 結果

本研究で用いた乳酸桿菌の産生する乳酸および過酸化水素の生産量は、それぞれ42.1-201.7 mM および38.7-170.8 nM の範囲であった。乳酸生産量と WST-1 法の測定値の間には中程度の負の相関が認められたが ( $r = -0.625$ ;  $p < 0.001$ )、過酸化水素生産量と WST-1 測定値の間には相関は観察されなかった ( $r = -0.10$ ;  $p = 0.61$ )。 *L. crispatus* 35-1 の BF 形成阻害作用が最も強く、その培養上清の乳酸濃度は14.1 mM であった。

菌糸形成に対する乳酸と過酸化水素の影響は、乳酸は16-64 mM で濃度依存的 ( $r = -0.50$ ;  $p = 0.12$ ) に菌糸形成が減少したが ( $p < 0.05$ )、過酸化水素は濃度依存的な変化を示さず ( $r = -0.17$ ;  $p = 0.61$ ) なかった。HeLa 細胞に対する乳酸桿菌の影響は、*L. crispatus* 35-1 株と *L. gasseri* 株45-3-1 は、HB-10に対して有意な接着阻害作用 ( $p < 0.05$ ) を示した。

#### IV. 考察

*C. albicans* は酵母型から菌糸型へ形態変換し上皮細胞へ接着することで細胞障害やBF形成を起こし人への病原性を示す。今回の研究で使用した乳酸と過酸化水素の濃度は *C. albicans* に対して静菌的に作用する。そのため、乳酸桿菌の産生する乳酸や過酸化水素は、*C. albicans* の菌糸形成、上皮細胞への接着、BF形成の多

段階に作用することで *C. albicans* の病原性を抑制していると考えられる。

#### V. 結論

*Lactobacillus* 属細菌の *C. albicans* のバイオフィルム形成阻害作用としては、細胞表面への接着抑制作用と代謝産物による菌糸形成を阻害作用が重要である。

## Inhibitory effect of human vaginally derived lactobacilli on *Candida albicans* growth, hyphal formation, biofilm and epithelial cell adhesion

TOMONORI TAKANO\*, HAYAMI KUDO\*\*, ASAMI MATSUMOTO\*\*, KENTARO OKA\*\*, MOTOMICHI TAKAHASHI\*\* and HIROYUKI KUNISHIMA\*

\*Department of Infectious Diseases, St. Marianna University School of Medicine, Kanagawa,

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

*Candida* spp. cause inflammation and vulvovaginal candidiasis (VVC) due to the development of dysbiosis in the vulva. The presence of certain lactobacilli has been found to be associated with vaginal health. This study aimed to evaluate the metabolites of lactobacilli to determine the effects of lactobacilli on *C. albicans* growth, hyphal formation, biofilm development, and epithelial cell adhesion.

Forty-five *C. albicans* strains, which were clinically isolated from the vagina were used in this study. Twenty-seven clinical isolates of *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus jensenii*, *Lactobacillus gasseri*, *Lacticaseibacillus rhamnosus*, and *Limosilactobacillus vaginalis*, which have been reported as components of the vaginal flora, were used. Lactate and hydrogen peroxide in the culture supernatant of lactobacilli were used to evaluate the inhibition of hyphal and biofilm formation of *C. albicans*. The inhibitory effect of live lactobacilli on *C. albicans* adhesion to epithelial cells was also evaluated in HeLa cells.

A moderate negative correlation was observed between lactate production and biofilm inhibition ( $r = -0.625$ ;  $p < 0.001$ ), but no correlation was observed between hydrogen peroxide production and biofilm inhibition ( $r = -0.10$ ;  $p = 0.61$ ). At the concentrations of lactate and hydrogen peroxide produced by the lactobacilli used in this study, it was found that lactate and hydrogen peroxide have a bacteriostatic effect on *C. albicans*.

Lactate and hydrogen peroxide produced by lactobacilli are thought to suppress *C. albicans* virulence by affecting multiple steps of *C. albicans* hyphal formation, epithelial cell adhesion, and biofilm formation.

# ビオチン摂取が認知機能関連物質の産生に与える影響の解析

吉川 智貴 Afifah Z. 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)

## 【背景・目的】

水溶性ビタミンの一種であるビオチンは食事や腸内細菌によって供給される。我々はビオチンが、精巢の Leydig 細胞において cAMP-cAMP 依存性リン酸化酵素 -cAMP 応答配列結合タンパク質経路の活性化を介して、ステロイドホルモンであるテストステロン産生を増強することを明らかにした。ステロイドホルモンのうち、脳内で合成されるものはニューロステロイドとよばれ、海馬のシナプス強化の働きを持つことが知られている。本研究では、ビオチン摂取が脳海馬においてテストステロンをはじめとしたニューロステロイドや、その他の認知機能関連物質の産生に与える影響について解析した。

## 【方法】

8 週齢の Wistar 系雄性ラットに蒸留水 (Control 群)、またはビオチン水 (3.3 mg/L, Biotin 群) を自由摂水させ、2 週間、および 8 週間飼育した。飼料として固型飼料 (F-2, フナバシファーム) を与えた。解剖時に採取した海馬を PBS 中でホモジナイズし、ジエチルエーテルでステロイドホルモンを抽出した。血漿についても同様の抽出操作を行い、抽出物を LC-MS/MS で解析した。また、海馬ホモジネートを遠心分離し、得られた上清をウエスタンブロットに供し、ビオチン結合

タンパク質と認知機能関連タンパク質の測定を行った。

## 【結果】

総摂水量、体重、臓器重量に群間で差はみられなかった。Biotin 群が飲水によって摂取した 1 日当たりのビオチン量は約 70  $\mu$ g であった。Biotin 群の海馬では 2 週間飼育によってプロゲステロンとコルチコステロンが有意に減少し、テストステロンが増加傾向を示した。8 週間飼育ではプロゲステロンが有意に減少し、コルチコステロンが減少傾向を示した。海馬中のタンパク質は 2 週間飼育の Biotin 群で脳由来神経栄養因子 (BDNF) の成熟型 (mature-BDNF) が有意に増加し、8 週間飼育では前駆体 (pro-BDNF) が有意に減少した。ビオチン結合タンパク質は 2 週間飼育では群間差はみられなかったが 8 週間飼育では Biotin 群で有意に増加していた。これらの結果から、ビオチン摂取が海馬でのテストステロンや BDNF といった認知機能関連物質の産生を増加させることが示唆された。また海馬でのコルチコステロンやプロゲステロン、pro-BDNF の減少を引き起こす可能性が示唆された。

会員外共同研究者：久古 鈴香<sup>\*</sup>、前川 正充<sup>\*\*</sup>

(<sup>\*</sup>東北大学大学院農学研究科栄養学分野、<sup>\*\*</sup>東北大学病院・薬剤部)

## Effects of biotin ingestion on the production of cognitive function-related molecules in rat brain

TOMOKI KIKKAWA, AFIFAH Z. AGISTA, YUSUKE OHSAKI, MICHIO KOMAI and HITOSHI SHIRAKAWA

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

Biotin, a water-soluble vitamin, is supplied by food and the product of gut microbiota. It has been shown to enhance the production of testosterone, a steroid hormone, by activating the cAMP – protein kinase A – cAMP response element binding protein pathway in Leydig cells of the testis. Neurosteroids, steroid hormones produced in the brain, are known to increase spine development in the hippocampus, which is crucial for synaptic connections. In this study, we analyzed the effects of biotin ingestion on the production of cognitive function-related molecules in rats hippocampus.

8-week-old male Wistar rats were divided in two groups and supplied either distilled water (Control group) or water containing biotin (Biotin group) as drinking waters for 2 or 8 weeks. Steroid hormones in the hippocampus and the blood were analyzed by LC-MS/MS. Additionally, the protein related to cognitive function and biotinylated proteins were measured by Western blotting.

Progesterone and corticosterone levels in the hippocampus were decreased in 2- and 8-week Biotin groups. The expression levels of mature brain-derived neurotrophic factor (mature BDNF) were significantly increased in the 2-weeks Biotin group, while the precursor BDNF (pro-BDNF) was significantly decreased in the 8-week Biotin group. Biotinylated proteins in the hippocampus were significantly increased in 8-weeks Biotin group. These results suggest that biotin intake can increase the production of cognitive function-related molecules such as testosterone and mature-BDNF in the hippocampus.

(Non-member collaborators : Suzuka Kyuko\*, Masamitsu Maekawa\*\*, \*Laboratory of Nutrition, Graduate School of Agricultural Science, Tohoku University, \*\*Department of Pharmaceutical Sciences, Tohoku University Hospital )

# 無菌マウスを用いた真性ビオチン欠乏モデルにおける炎症反応と T 細胞応答の解析

大西 拓人\* 津田 真人\* 岡田 開\* 大崎 雄介\*\*  
白川 仁\*\* 駒井 三千夫\*\* 細野 朗\*  
(\*日本大学生物資源科学部食品生命機能学研究室,  
\*\*東北大学大学院農学研究科栄養学分野)

## 1. 目的

ビオチンは水溶性ビタミンであるビタミン B 群に属しており生体内で糖代謝や脂肪酸代謝, アミノ酸代謝などに関与している. ビオチンは食品として経口摂取されるほか Bacteroidetes 門などの腸内細菌によっても産生されることが分かっている. ビオチン欠乏によって乾癬などの皮膚炎症状や炎症性腸疾患に関与していることが報告されている. しかし, 腸内細菌由来ビオチンが腸管免疫系へ与える作用についてはまだ不明な点が多い. そこで本研究では腸内細菌由来のビオチンが腸管免疫系 T 細胞に与える影響を解析するために腸内細菌を排除した無菌マウスにビオチン欠乏食を与えることで真性のビオチン欠乏マウスを作製し解析を行った.

## 2. 材料と方法

雌性 BALB/c マウス (8 週齢) を用いて, 通常環境 (conventional) と無菌環境 (germ-free) にて, ビオチン含有飼料を与えた対照食 (control) 群とビオチン欠乏飼料を与えた欠乏食 (biotin-deficient) 群に分け, それぞれを通常対照食 (CC) 群, 通常欠乏食 (CD) 群, 無菌対照食 (GC) 群, 無菌欠乏食 (GD) 群とし 12 週間飼育を行った. その後, 各群のマウスより脾臓 (SPL), 腸間膜リンパ節 (MLN), パイエル板 (PP), 盲腸リンパ節 (CeP), 結腸リンパ節 (CoP) を採取し調製した各細胞をフローサイトメトリー法により T

細胞フェノタイプの解析を行った. さらにそれぞれの細胞を CD3/CD28 抗体刺激下で 60 時間培養を行い, 培養上清中のサイトカインを酵素免疫測定 (ELISA) 法で定量し, さらにリアルタイム定量 PCR (qPCR) にて T 細胞応答に関与する遺伝子発現量の解析を行った. また, 血清中の IgE 濃度の測定を ELISA 法により測定した.

## 3. 結果, 考察, 結論

真性ビオチン欠乏の GD 群において, 結腸部位にある CoP 細胞では無菌対照食の GC 群と比べてナイーブ T 細胞 ( $CD3^+CD4^+CD44^{low}CD62^{Lhigh}$ ) が減少しエフェクター T 細胞 ( $CD3^+CD4^+CD44^{low}CD62L$ ) の割合が上昇し, IL-10 産生応答が高い傾向がみられた. これらのことから, 腸内細菌由来のビオチンが結腸部位の T 細胞応答に影響が大きいのではないかと考える. また, GD 群の CoP では T 細胞内のビオチン依存性カルボキシラーゼの遺伝子発現量もほかの群と比較し減少することから, 結腸部位では食餌由来のビオチンではなく, 腸内細菌由来のビオチンが T 細胞内の代謝を調節し, T 細胞分化に影響をしていることが推察された.

会員外共同研究者: 池田大貴, 肥田野澄怜

(日本大学生物資源科学部食品生命学科食品生命機能学研究室)

## **Analysis of inflammatory responses and T cell responses in a primary biotin deficiency model utilizing germ-free mice.**

TAKUTO ONISHI\*, MASATO TSUDA\*, HIRAKU OKADA\*, YUSUKE OHSAKI\*\*, MICHIO KOMAI\*\*, HITOSHI SHIRAKAWA\*\* and AKIRA HOSONO\*

*\*Food and Physiological Functions Laboratory, College of Bioresource Sciences, Nihon University, Fujisawa*

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

Biotin is a water-soluble vitamin, and is supplied to the body as a metabolite produced by intestinal bacteria in addition to dietary intake. It is known that the biotin deficiency induces the inflammatory responses such as psoriasis and inflammatory bowel diseases. However, the effects of biotin derived from intestinal bacteria on the intestinal immune system are still unknown. In this study, we analyzed the effect of biotin derived from intestinal bacteria on the responses of CD4<sup>+</sup> T cells in the intestine by using the mice with primary biotin deficiency.

BALB/c mice were fed biotin-containing (control) or biotin-deficient experimental diet for 12 weeks in conventional (CV) or germ-free (GF) condition. Spleen (SPL), Peyer's patches (PP), cecal patches (CeP), colonic patches (CoP) were collected and analyzed CD4<sup>+</sup> T cells by flow cytometry, quantitative PCR (qPCR) and enzyme immunoassay (ELISA).

The lower proportion of naive CD4<sup>+</sup> T cells (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD44<sup>low</sup>CD62L<sup>high</sup>) and higher percentage of effector CD4<sup>+</sup> T cells (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD44<sup>low</sup>CD62L<sup>-</sup>) were observed in CoP of GD (germ-free biotin-deficient diet group) mice, which are the condition with primary biotin deficiency compared to those of GC mice. IL-10 production from CoP cells from GD group tended to be higher than that of GC group. These findings suggest that primary biotin deficiency induces biological responses related to host inflammation and may induce T cell responses that regulate inflammation in the colon immune system.

# CBM588による抗腫瘍免疫応答の誘導と機序の解明

北原 秀悟 丹羽 みずほ 山田 裕貴 工藤 逸美 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：** 免疫チェックポイント阻害剤 (Immune checkpoint inhibitor ; ICI) のがん治療効果に、特定の腸内細菌や細菌由来代謝産物が影響を及ぼす可能性が分かりつつあり、欧米を中心にがんを標的としたマイクロバイオーム創薬が加速している。本研究では、*Clostridium butyricum* MIYAIRI 588 (CBM588) の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することを目的とした。結果として、酪酸がマウス T 細胞からの抗腫瘍性のサイトカイン産生を直接的に誘導するとともに、がん細胞に対するアポトーシスも誘導することが明らかとなった (*in vitro*)。また、腫瘍マウスモデルにおいて酪酸のプロドラッグ投与が腫瘍増大を抑えたことから (*in vivo*)、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：** 腫瘍免疫, 腸内細菌, 酪酸, T 細胞, ICI

## I. 背景と目的

免疫チェックポイント阻害剤 (ICI: Immune Checkpoint Inhibitors) は、がん治療分野において革命的な進展をもたらした治療薬である。しかし、がん種によって奏効率が15-60%と多岐にわたることから<sup>1</sup>、奏効率の改善が重要な課題となっている。近年、ICI のがん治療効果に、特定の腸内細菌や細菌由来代謝産物が影響を及ぼす可能性が分かりつつあり、欧米を中心にがんを標的としたマイクロバイオーム創薬が加速している。例えば、米国で実施された第 I 相医師主導治験 (NCT03829111) において、転移性腎細胞がんに対する ICI の一次治療に、*Clostridium butyricum* MIYAIRI 588 (CBM588) を併用することで、治療効果が改善することが示唆された<sup>2,3)</sup>。抗腫瘍免疫の活性化には複数の機構が関与しているが、本研究では、CBM588の主要代謝産物である酪酸に着目し、その抗腫瘍免疫応答に及ぼす影響を評価した。

## II. 材料と方法

CBM588を嫌気下にて液体培養した後、培養液を遠心分離して無細胞培養上清を得た。HPLCにより培養上清中の短鎖脂肪酸濃度を測定した。SPF環境下で飼育した7-8週齢の C57BL6/N マウスから脾細胞を単離し得られた脾細胞を抗 CD3/28抗体存在下にて、異なる濃度の酪酸塩または CBM588培養上清で3日間共培養

した。ELISA法により培養液中の IFN- $\gamma$  および TNF- $\alpha$  の産生量を定量し、フローサイトメーター (FCM) により誘導された免疫細胞の割合を解析した。脾細胞から CD4、CD8陽性 T 細胞を磁気ビーズ法により単離し、同様の試験を実施した。大腸がん細胞株 (HCT-116, Colon-26) と異なる濃度の酪酸塩または CBM588培養上清で1日間共培養した後に、Annexin V染色によってアポトーシス細胞割合を解析した。SPF環境下で飼育した7-8週齢の BALB/c マウスに対して Colon-26細胞を皮下注射することにより、マウス大腸がんモデルマウスを作製した。3週間にわたりトリプチリンを経口投与、PD-1抗体を腹腔内投与した。

## III. 結果と考察

CBM588を液体培地で培養すると、培養上清中の酪酸濃度は接種菌数と培養時間に依存して増加した。酪酸による抗腫瘍免疫応答を確認するため、脾細胞に酪酸塩による刺激を行ったところ、酪酸濃度依存な IFN- $\gamma$  および TNF- $\alpha$  の産生誘導が確認された。また FCM解析により、これらのサイトカインを産生する CD4陽性、CD8陽性 T 細胞の割合が酪酸濃度依存的な増加が認められた。高濃度の酪酸を含有する CBM588培養上清を使用して脾細胞刺激を行った所、酪酸刺激時と同様にサイトカイン産生が誘導され、サイトカイン産生 T 細胞の割合も増加した。次に CBM588の T 細胞への

直接的な影響を確認するために脾細胞から CD4陽性、CD8陽性 T 細胞をそれぞれ単離して酪酸あるいは CBM588培養上清と共培養したところ、単離前と同様に IFN- $\gamma$  および TNF- $\alpha$  の誘導が認められた。以上から、酪酸は他の免疫細胞を介さずに T 細胞に直接作用し、腫瘍免疫応答を誘導する可能性が示唆された。

酪酸のがん細胞に対する効果を検討するために、二種類の大腸がん細胞株に対するアポトーシス誘導能を評価した。酪酸塩または高濃度の酪酸を含有する CBM588培養上清との共培養を行った所、いずれの細

胞に対しても濃度依存的なアポトーシス細胞割合の上昇を引き起こしたことから、酪酸及び CBM588培養上清は大腸がん細胞に対してアポトーシス誘導する可能性が示唆された。

最後に、大腸がんモデルマウスに対する効果を検証

した。酪酸のプロドラッグであるトリブチリンと、ICI の一種である PD-1抗体をモデルマウスに投与すると、ICI 投与群と比較して、ICI・トリブチリン併用投与群で平均腫瘍体積の増大が抑えられた。このことから酪酸は腫瘍マウスモデルマウスにおいて ICI の治療効果を高めることが示唆された。

#### IV. 結論

CBM588の代謝産物である酪酸は、CD4陽性 T 細胞及び CD 8 陽性 T 細胞に直接的に作用し、これらの細胞からの IFN- $\gamma$  と TNF- $\alpha$  の産生を誘導することが明らかとなった。さらに、大腸がんモデルマウスにおいて、酪酸のプロドラッグと ICI の併用効果も確認されたことから、CBM588は酪酸によって免疫反応を高め ICI の治療効果を増強する可能性が示唆された。

## Induction of anti-tumor immune response by CBM588 and its mechanism.

SHUGO KITAHARA, MIZUHO NIWA, YUKI YAMADA, HAYAMI KUDO,  
ATSUSHI HAYASHI and MOTOMICHI TAKAHASHI

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

It has been reported that certain intestinal bacteria may influence the efficacy of immune checkpoint inhibitors (ICIs) in cancer therapy. A phase I clinical trial (NCT03829111) suggested that *Clostridium butyricum* MIYAIRI588 (CBM588) improved therapeutic efficacy in the first-line treatment of ICI. In this study, we focused on butyrate, the major metabolite of CBM588, and evaluated its effect on anti-tumor immune response.

CBM588 was cultured in liquid culture medium under anaerobic conditions, and the culture medium was centrifuged to obtain cell-free culture supernatant. Splenocytes isolated from C57BL6/N mice were cultured with various concentrations of butyrate for three days. The production of cytokines (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ ) was analyzed by flow-cytometry and ELISA. CD4 and CD8 positive T cells were isolated from splenocytes by magnetic bead method and the stimulation assay was performed. Colorectal cancer cell lines (HCT116, Colon26) were similarly stimulated, and percentage of apoptosis cells were measured. Tumor model mice were established by inoculating Colon26 cell line and treated with ICIs and tributyrin.

Stimulation with high concentrations of butyrate significantly increased the production of anti-tumor cytokines (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ ) in splenic T cells. Stimulation with CBM588 culture supernatant containing high concentrations of butyrate also increased the production of anti-tumor cytokines in splenic T cells. CD4- and CD8-positive T cells isolated from splenocytes were also induced immune responses with butyrate stimulation. Percentage of apoptotic cells in colon cancer cell lines were increased by butyrate stimulation. Tumor growth in tumor model mice was best suppressed by ICI and tributyrin combination administration.

**Keywords:** Oncoimmunology, Gut microbiota, Butyrate, T-cells, ICI

### *References*

1. Das S, Johnson D.B. : Immune-related adverse events and anti-tumor efficacy of immune checkpoint inhibitors. *J. Immunotherapy Cancer* 2019, 7 : 306.
2. 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 SK, Pal SK. : Nivolumab plus ipilimumab with or without live bacterial supplementation in metastatic renal cell carcinoma: a randomized phase 1 trial. *Nat Med.* 2022, 28 : 704–712.
3. Ebrahimi H, Meza LA, Lee K, Malhotra J, Alcantara M, ZENGIN, ZB, Dizman N, Govindarajan A, Hsu J, Llamas M, Neal Shiv Chawla, Castro DV, Mercier BD, Liu S, Chehrazi-Raffle A, Dorff TB, Frankel PH, Li X, Pal SK, and Tripathi A. : Effect of CBM588 in combination with cabozantinib plus nivolumab for patients (pts) with metastatic renal cell carcinoma (mRCC): A randomized clinical trial. *JCO* 41, 2023: LBA104-LBA104.

# ペプチド資化性を有するブタ小腸内細菌の単離と同定

早川 陽平 大坪 和香子

(東北大学大学院農学研究科 動物食品機能学分野)

## I. 目的

小腸内に生息する小腸内細菌は、宿主によるタンパク質の消化吸収の過程で遊離したアミノ酸やペプチドから、D-アミノ酸やL-DOPA、インドール誘導体など様々な機能性を有するアミノ酸代謝産物を産生すると考えられている。しかし、健常な小腸の検体を入手することは非常に困難であることから、ヒト小腸内細菌の種構成や性状に関する知見は非常に乏しい。

そこで本研究では、ペプチド資化性を有する小腸内細菌に関する知見を獲得するため、解剖学的、生理学的特徴がヒトと似ている健常な若齢ブタ個体 (*Sus scrofa domestica*) の小腸を採取し、糖を含まない高ペプチド含有培地を用いて腸内細菌の単離を行い、菌種同定と性状解析を行った。

## II. 材料と方法

1～2%のペプトン類を含む無糖 YCFA と無糖

HGBM 寒天培地を調製し、段階希釈したブタ回腸内容を塗布後、37℃で3日間嫌気培養し、生育したコロニーを単離した。また、グラム染色で菌の形態を観察した。単離した菌株の16S rRNA 遺伝子の塩基配列をサンガーシーケンスにより決定し、BLAST 相同性検索と系統解析により属種名を同定した。

## III. 結果および考察

ブタ回腸サンプルから単離した50菌株の90%以上が乳酸桿菌であり、7菌種で構成されていた。そのうち、*Limosilactobacillus reuteri* と同定された菌株が54%、*Lactobacillus johnsonii* が20%、*Lactobacillus gasseri* が16%であった。これらの菌種は、同試料の16S rRNA 遺伝子の次世代シーケンスによるアンプリコン解析においても、優勢種であったことから、ブタ小腸内で優勢化する乳酸桿菌には高いペプチド資化性があることが示唆された。

## Isolation and identification of peptide-utilizing porcine small intestinal bacteria.

YOHEI HAYAKAWA and WAKAKO IKEDA-OHTSUBO

*Laboratory of Animal Food Function, Graduate School of Agricultural Science, Tohoku University, Sendai*

Small intestinal bacteria are thought to produce various metabolites from amino acids and peptides derived from host protein digestion with various functions, such as D-amino acids, L-DOPA and indole derivatives. However, species composition and properties of human small intestinal bacteria is poorly known due to the difficulty to obtain small intestinal samples from healthy subject.

In order to obtain knowledge on small intestinal bacteria, we conducted isolation of small intestinal bacteria in ileal contents collected from healthy young pig individuals (*Sus scrofa domesticus*) using sugar-free, high peptide-containing media to identify the species composition and their properties.

Sugar-free YCFA and HGBM agar medium containing 1-2% peptones were prepared and serially-diluted porcine ileum contents were inoculated and anaerobically incubated at 37 °C for 3 days. Grown colonies were randomly isolated and morphology of the bacteria was observed by Gram staining. 16S rRNA gene sequences of the isolated strains were determined by Sanger sequencing and the species were identified by homology search using BLASTN.

More than 90% of the 50 strains isolated from the pig ileal contents were identified as lactobacilli, comprising seven species. Of these, 54% were identified as *Limosilactobacillus reuteri*, 20% as *Lactobacillus johnsonii* and 16% as *Lactobacillus gasseri*. These strains were also the predominant species in 16S rRNA gene amplicon sequencing analysis of the same samples, which suggests that the isolated bacterial strains represent peptide-utilizing bacteria in the pig small intestine.

# MPS マウスを用いたヘリコバクターピロリ感染に関連する 消化管内常在細菌叢の解析

北条 史\* 米澤 英雄\*\* 岡 健太郎\*\*\* 高橋 志達\*\*\* 歳田 訓\*\*\*\*  
神谷 茂\*\*\* 三戸部 治郎\*\*\*\*\* 大崎 敬子\*\*\*\*\*

(\*杏林大学大学院医学研究科共同研究施設部門実験動物施設部門,

\*\*東京歯科大学歯学部微生物学講座, \*\*\*ミヤリサン製薬株式会社中央研究所,

\*\*\*\*杏林大学保健学部臨床検査技術学科微生物学部門, \*\*\*\*\*杏林大学医学部感染症学教室)

## I. 目的

*Helicobacter pylori* はヒトの胃に感染し、除菌治療が施されない限り生涯にわたって持続感染している。本菌に感染することにより、胃内および消化管内細菌叢が攪乱されることが想定される。本研究では、*H. pylori* 長期持続感染マウスモデルを用いて、感染がマウスの消化管内細菌叢にどのように影響するか、また消化管内のどの部位まで影響があるかを明らかにする目的で実施した。

## II. 材料と方法

動物モデルは細菌感染高感受性のミュータントマウスであるMPSマウスに*H. pylori*を経口感染させることで作成した。感染期間終了後、胃粘膜および回腸、盲腸内容物中のDNAを抽出し、細菌16SリボソームDNAのV3-V4領域を標的とする16Sメタゲノム解析を行った。

## III. 結果、考察、結論

投与したMPSマウスの全頭に*H. pylori*の胃内感染を認め、感染5週後に平均 $10^{4.6}$  CFU/g mucusが感染し、57週後に平均 $10^{4.7}$  CFU/g mucusで維持されてい

た。 $\alpha$ 多様性解析の結果、感染後8週目では感染マウスの胃内細菌叢 $\alpha$ 多様性は非感染マウスと比較して有意に低いことが明らかになった。以降のマウスでは非感染マウスでも胃内細菌叢の多様性は低下しており、感染の他にも加齢による細菌叢構成の変化が考えられた。 $\beta$ 多様性解析の結果、感染、非感染群で有意に違いが認められた。LEfSe解析の結果、投与した*Helicobacter*属の他、*Blautia*属が感染群を特徴づける細菌として挙げられた。非感染群に特徴的な細菌として、*Enterohabdus*属、*Parasutterella*属、*Saccharimonas*属、*Monoglobas*属、*Alistioes*属、*Mucispirillum*属、*Muribaculum*属、*Rikenella*属、*Desulfovibrio*属が挙げられた。盲腸および回腸においては細菌叢構成に関して感染群と対象群の間に有意な差は認められなかった。以上の結果から、*H. pylori*感染MPSマウスモデルにおいて本菌感染は胃内細菌叢に影響を与えることがわかった。盲腸および回腸では $\alpha$ および $\beta$ 多様性に有意な差は確認できなかったが、胃内同様同モデル内の感染群に特徴的な細菌を明らかにすることができた。本感染マウスモデルはスナネズミモデルと異なり、激しい炎症を認めず慢性持続感染を維持できるモデルとして有用であると考えられた。

## Changes in gastrointestinal microbiota in the *Helicobacter pylori* infection model using MPS mice

FUHITO HOJO\*, HIDEO YONEZAWA\*\*, KENTARO OKA\*\*\*, MOTOMICHI TAKAHASHI\*\*\*,  
KURATA SATOSHI\*\*\*\*, SHIGERU KAMIYA\*\*\*, JIRO MITOBE\*\*\*\*\* and TAKAKO OSAKI\*\*\*\*\*

\**Institute of Laboratory, Animals graduate school of Medicine, Kyorin University, Tokyo*

\*\**Department of Microbiology, Tokyo Dental College, Tokyo*

\*\*\**Central Research Institute, Miyarisan Pharma. Co., Ltd., Saitama*

\*\*\*\**Division of Microbiology, Department of Medical Technology, Faculty of Health Sciences, Kyorin University, Tokyo*

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

*Helicobacter pylori* infects the human stomach and persists throughout life unless eradication therapy is provided. *H. pylori*-infection is assumed to disrupt the bacterial flora in the stomach and gastrointestinal tract. This study was conducted using a mouse model of long-term persistent *H. pylori*-infection in order to determine how the infection affects the gastric and gastrointestinal microflora in mice. The animal model was created by orally infecting MPS mice, which are mutant mice highly susceptible to bacterial infection. After the infection period, DNA in the gastric mucosa and ileal and cecal contents was extracted for 16S metagenomic analysis. All treated MPS mice were infected with *H. pylori* in the stomach, with an average of  $10^{4.6}$  CFU/g mucus after 5 weeks of infection and maintained at an average of  $10^{4.7}$  CFU/g mucus after 57 weeks.  $\alpha$ -diversity analysis revealed that at 8 weeks post infection, gastric flora  $\alpha$ -diversity in infected mice was significantly lower than that in uninfected mice. The results of  $\beta$ -diversity analysis showed significant differences between infected and uninfected groups. In the cecum and ileum, there were no significant differences in  $\alpha$  and  $\beta$ -diversity. These results indicate that *H. pylori*-infection affects the gastric microbiota in the *H. pylori*-infected MPS mouse model. Unlike the gerbil model, the mouse model of infection is not characterized by severe inflammation and can be used to maintain chronic persistent infection.

## 無菌コモンマーモセットの繁殖の検討

岡原 則夫 植野 昌未 井上 貴史

(公益財団法人実中研)

腸内細菌による宿主の生体反応の解析において無菌マウスを用いたノトバイオト実験系が欠かすことのできないものとして貢献している。その一方で、マウスでの研究成果をヒトへ外挿する際、ヒトとげっ歯類との消化管構造や代謝、免疫、中枢神経系などの生体機能の違いや、宿主との共進化により形成されてきたとされる腸内細菌叢の定着性の違いが障壁となる。そこで、マウスとヒトとのギャップを埋める霊長類による腸内細菌研究の展開をめざして、我々は無菌コモンマーモセット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、帝王切開によるビニールアイソレータ (VI) 内の無菌環境下での産子獲得から人工哺育、育成までの一連の技術を確立し、生菌が検出されない無菌個体を得ており、最長で4年間以上の維持に至っている。現在、これらの維持中の無菌マーモセットを用いて繁殖の検討を行っており、本発表において報告する。

繁殖に際して、無菌マーモセット個体の性成熟を確認した。1.5歳以上の無菌マーモセットのオス4頭においてVI内にて振動刺激法による精液採取を試み、いずれの個体も精液射出と運動精子が観察された。また、1.5歳以上のメス4頭について、尿中プロゲステロン濃度

を経時的に測定し、通常個体と同様の約28日間の性周期を観察した。これらのオスとメスを用いて4ペアで交配を試みたところ、1ペアで交尾行動が観察され、超音波診断による子宮内腔の開口から自然交配による妊娠を確認した。また、人工授精による繁殖を検討し、これまでに3頭のメスにおいて尿中プロゲステロン濃度による推定排卵日周辺 (-3 ~ +1日) に同居のオスの精液を用いて人工授精を実施した。その結果、2頭のメスで排卵後6週目以降まで尿中プロゲステロン濃度が高値で維持され、妊娠を確認した。自然交配による妊娠は、妊娠満期まで妊娠を継続したが、死産であった。人工授精による妊娠2頭のうち1頭は9週目で流産したが、もう1頭は現在も妊娠継続 (17週目) 中である。以上の検討より、妊娠末期まで胎子が無事に生育することが確認できたことにより、無菌環境下におけるマーモセットの繁殖の可能性が示唆された。これまでに無菌霊長類の無菌環境下での繁殖の報告はなく、今後、無菌マーモセットの安定した繁殖が可能となるように引き続き検討を行う。

(会員外共同研究者：公益財団法人実中研；山崎栄子，佐々木絵美，菊池理加，黒滝陽子，佐々木えりか)

## **Trial of breeding germ-free common marmosets**

NORIO OKAHARA, MASAMI UENO and TAKASHI INOUE

*Central Institute for Experimental Medicine and Life Science, Kawasaki*

Studies using germ-free mice have demonstrated that intestinal bacteria play important functional roles in host homeostasis. However, extrapolating the findings of these mouse studies to human medical research is hampered by the evolutionary distance between rodents and humans. Therefore, to advance microbiota research using non-human primates closely related to humans, we have produced germ-free common marmosets and developed technologies for their application in research. To date, we have established a technique for obtaining and rearing neonates in a sterile environment and have succeeded in producing and maintaining germ-free individuals, with culture tests revealing an absence of viable bacteria and fungi for up to 4 years. In addition, we have developed a series of reproductive techniques, including estrous cycle monitoring, semen collection, artificial insemination, and ultrasonography, for marmosets in a sterile isolator. Using these, we have attempted to breed germ-free marmosets. Among individuals aged 1.5 years or more, monitoring of urinary progesterone levels indicated the occurrence of estrous cycles in females, and the release of motile sperm was observed in males. Natural breeding was attempted in four pairs using these mature males and females, and mating behavior was observed in one pair. Then, we also performed artificial insemination in the breeding pairs. Resultingly, two females became pregnant though one case was aborted at 9th week of pregnancy, and another was stillborn. This is the first report of pregnancy in germfree primates, suggesting the possibility of their reproduction under sterile condition.

# 繁殖母豚への酪酸菌飼料添加物が、子豚の離乳後の腸内環境に与える影響評価

工藤 逸美 扇 隆介 高橋 志達  
(ミヤリサン製薬株式会社 研究開発本部研究部)

## I. 背景

母豚からの受動免疫が低下する離乳期の子豚は、下痢や軟便が頻発する。離乳期の下痢や軟便の発生は、その後の肥育期の発育成績に多大な影響を与える。子豚の消化管に移入する細菌は環境に由来するため、授乳期の母豚の健康が子豚の健康に直接的に作用する可能性が示唆されている。日本や欧州を含む諸外国では、豚の生産性を向上させる目的で、抗菌性飼料添加物の代替としてプロバイオティクスが利用される。そこで本研究では、母豚への酪酸菌飼料添加物が子豚の腸内環境に与える影響を評価するため、母豚妊娠期・分娩・離乳期を通して、母豚と子豚の双方の菌叢を経時的に解析した。

## II. 材料と方法

フィード・ワン株式会社研究所で飼育された交雑種(LW種およびWL種)の母豚とその哺乳子豚を用いた。試験区分として、対照区と試験区を設け、平均産次が等しくなるように6頭ずつ母豚を配分した。哺乳子豚も同様に、対照区と試験区を設け、平均体重および性別が等しくなるように26-27頭ずつ分配した(母豚対照・子豚対照区、母豚対照・子豚試験区、母豚試験・子豚対照区、母豚試験・子豚試験区の計4区)。酪酸菌飼料添加物は対照区通常飼料に0.1%添加した。母豚は、妊娠期(妊娠90日目)、分娩房移動期(妊娠101-108日目)、分娩後(妊娠115日目)、授乳期1週目、2週目および3週目の6時点を、子豚は離乳前(生後21日目・離乳0日目)、離乳前期終了時(離乳後11-13日目)、離乳中

期終了時(離乳18-20日目)の3時点において糞便を採取し、16SrRNA遺伝子(V3-V4)解析を行った。子豚の糞便は採取日を含め期間を通して毎日その性状を観察し、下痢又は軟便の発生率を計測した。

## III. 結果・考察・結論

離乳通期の子豚の軟便発生率は、母豚対照区(7.4%)と母豚試験区(4.6%)で有意な差が認められた( $p=0.026$ , Student t-test)。母豚対照・子豚対照区の下痢便発生率は通期11.6%であったのに対し、母豚試験・子豚試験区では6.7%であり、母豚から子豚まで一貫して酪酸菌飼料添加物を添加することで、離乳期の消化器症状を低減させる可能性が示唆された。母豚腸内菌叢のShannon指数は、授乳期1週目で最も低下傾向にあったが、対照区と試験区間には統計的な有意差は認められなかった。子豚腸内菌叢のShannon指数は日齢と相関した。離乳前の子豚の菌叢構造は母豚対照区と母豚試験区で顕著に異なった(weighted UniFrac距離,  $p=0.003$ , PERMANOVA)。母豚試験区に由来する子豚の離乳期の菌叢は、*Blautia*属細菌や*Pyramidobacter*属細菌を含む6つの細菌属が特徴付けられ(DESeq2解析,  $\log_2 FC > 2$ および $p < 0.05$ )、これらの常在菌が豊富な菌叢構造は、その後の下痢・軟便発生率を低減させる可能性が示唆された。

会員外共同研究者：フィード・ワン株式会社 研究所；  
森合修也，小野田 尚，篠原良太

## Effects of *Clostridium*-based probiotics feeding in gestating and lactating sows on gut microbiota and health outcomes in weanling piglets

HAYAMI KUDO, RYUSUKE OGI, MOTOMICHI TAKAHASHI\*

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

Weanling piglets often face health challenges like diarrhea and loose stools due to reduced passive immunity, impacting their growth performance. This study hypothesizes that the use of probiotics, specifically *Clostridium butyricum*, as a substitute for antimicrobial feed additives, may influence the gut microbiota and health of piglets and explore gut microbiota in both sows and piglets across various stages.

Crossbred sows and their piglets were divided into control and treatment groups. *C. butyricum* additives were incorporated at 0.1% into the control diet. Fecal samples from sows and piglets were collected at various stages, including pregnancy, farrowing, and weaning, and 16Sr RNA sequencing was performed. Piglets were monitored daily for the prevalence of loose or diarrheic feces.

A significant reduction in loose stool incidence among pig of treated sow (4.6%) compared to controls (7.4 %) during the weaning period. Piglets receiving continuous *C. butyricum* supplementation exhibited a lower incidence of diarrhea (6.7%) compared to the control group (11.6%). While no significant differences were observed in the Shannon index of sow's gut microbiota, an age-related correlation was clarified in piglets. The structure of gut microbiota of pre-weaning piglets significantly varied depending on probiotics treatment for sow, with specific bacterial genera such as *Blautia* and *Pyramidobacter*.

Continuous *C. butyricum* supplementation from sows to piglets potentially mitigates gastrointestinal symptoms during weaning by modulating specific gut microbiota.

(Non-member collaborators : Moriai Shuya, Takashi Onoda, Shinohara Ryota. *FEED ONE CO.,LTD.* )

## 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。書式はバンクーバー方式とする。著者（苗字と名前のイニシャルの文頭を大文字、6名以上の場合は *et al.*）、表題、雑誌・図書の名称と発行年、巻数：頁数（最初と最後）の順に記載する。
  1. Taguchi H, Takahashi M, Osaki T, Komatsu A, Fujioka Y, Kamiya S. Experimental infection of germfree mice with hyper-toxigenic *Escherichia coli* O157: H7 strain 6. *J Med Microbiol* 2002, 51:336-43.
  2. Lindahl G, Heden L-O, Stenberg L. Streptococcal IgA receptors. In, *Molecular recognition in host-parasite interactions*, Edited by Korhonen TK, Makela PH, Hovi T. New York, Plenum Press 1922: pp.77-83.
  3. Sakagami T, Fukuda Y, Tamura K, Tanida N, Shimoyama T. Does *Helicobacter pylori* promote gastric carcinogenesis? *J. germfree life gnotobiol* 2001, 31:25-26. (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,  $\mu\text{m}$ , nm, l, ml,  $\mu\text{l}$ , kg, g, mg,  $\mu\text{g}$ , 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 (capitalize the first letter of your last name and first name, up to 6 people, for more than that, write as *et al.*), title, the journal name (abbreviated according to Index Medicus, and year of publication), volume: page numbers (first and last).

#### Example:

1. Taguchi H, Takahashi M, Osaki T, Komatsu A, Fujioka Y, Kamiya S. Experimental infection of germ-free mice with hyper-toxigenic *Escherichia coli* O157: H7 strain 6. *J Med Microbiol* 2002, 51:336-43.
  2. Lindahl G, Heden L-O, Stenberg L. Streptococcal IgA receptors. In, *Molecular recognition in host-parasite interactions*, Edited by Korhonen TK, Makela PH, Hovi T. New York, Plenum Press 1922: pp.77-83.
  3. Sakagami T, Fukuda Y, Tamura K, Tanida N, Shimoyama T. Does *Helicobacter pylori* promote gastric carcinogenesis? *J. germfree life gnotobiol* 2001, 31:25-26. (in Japanese)
6. Manuscripts should be sent by E-mail to [jagg@cica.or.jp](mailto:jagg@cica.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

Effects of biotin on the host immune responses <i>Takuto Onishi et al.</i> .....	27
---	----

## SCIENTIFIC PROCEEDINGS OF THE JAPANESE ASSOCIATION

Generation of germ-free human liver chimeric mice. <i>Ryoko Nozu et al.</i> .....	34
Chronic nasal inflammation during the lactation period induces transient and long-term dysbiosis of gut microbiota in mice <i>Suzuho Komaki et al.</i> .....	36
Inhibitory effect of human vaginally derived lactobacilli on <i>Candida albicans</i> growth, hyphal formation, biofilm and epithelial cell adhesion <i>Tomonori Takano et al.</i> .....	39
Effects of biotin ingestion on the production of cognitive function-related molecules in rat brain <i>Tomoki Kikkawa et al.</i> .....	42
Analysis of inflammatory responses and T cell responses in a primary biotin deficiency model utilizing germ-free mice. <i>Takuto Onishi</i> .....	45
Induction of anti-tumor immune response by CBM588 and its mechanism. <i>Shugo Kitahara et al.</i> .....	47
Isolation and identification of peptide-utilizing porcine small intestinal bacteria. <i>Yohei Hayakawa et al.</i> .....	49
Changes in gastrointestinal microbiota in the <i>Helicobacter pylori</i> infection model using MPS mice <i>Fuhito Hojo et al.</i> .....	52
Trial of breeding germ-free common marmosets <i>Norio Okahara et al.</i> .....	56
Effects of <i>Clostridium</i> -based probiotics feeding in gestating and lactating sows on gut microbiota and health outcomes in weanling piglets <i>Hayami Kudo et al.</i> .....	58

## GUIDELINE FOR AUTHORS

Guideline for authors .....	60
-----------------------------	----