

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

**Vol. 52**

**No. 2**

**2022**

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. 52   No.2      Dec. 1      2022

---

編集委員会      神   谷      茂  
                         白   川      仁  
                         大   崎   敬   子

印 刷 所   共   立   印   刷   株   式   会   社  
事 務 所   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）

E-mail   gnotobiolosaki@ks.kyorin-u.ac.jp

---

JOURNAL OF GERMFREE LIFE AND GNOTOBIOLOGY

Vol. 52   No.2   Dec.1   2022

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@cica.or.jp

Department of Infectious Diseases

Kyorin University School of Medicine

Dr Takako Osaki

E-mail gnotobiolosaki@ks.kyorin-u.ac.jp

## 無菌コモンマーマーモセットの作出

井上 貴史 植野 昌未 野津 量子  
(公益財団法人実験動物中央研究所)

**要旨:** 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、我々は小型の霊長類種のコモンマー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。妊娠個体の準備からビニールアイソレータ内の無菌環境下での帝王切開による産仔獲得、人工哺育、育成までの一連の技術確立を進めて無菌マーマーモセットの作出を試みた。その結果、糞便の培養検査により生菌が検出されない無菌マーマーモセット個体の作出に成功し、最長で 24 ヶ月齢まで培養検査陰性の維持に至った。獲得したマーマーモセット個体では、糞便中の二次胆汁酸の欠如や、分泌型 IgA の低濃度、糞便・血漿のプロテオーム解析での免疫関連のタンパク質の低発現、造影レントゲン検査による盲腸拡大が観察され、無菌動物としての特性が示唆された。今後は、作出した無菌マーマーモセットの繁殖を試みるとともに、作出技術を洗練させて研究利用のための安定供給体制を確立していきたい。

**キーワード:** 無菌動物, マーマーモセット, 非ヒト霊長類, 実験動物

### I. 目的

近年の腸内微生物叢研究の発展において、無菌マウスを用いた実験系は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には、ヒトとげっ歯類との代謝、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微生物叢の定着性の差異が障壁となることがある。これらの差異を埋めるべく、ヒトに近縁な霊長類を用いた実験系が期待されるが、現在、利用可能な無菌霊長類は存在しない。そこで、我々は、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、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。

### II. 方法・結果

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て無菌マーマーモセットの作出を試み、その結果、糞便の培養検査により生菌が検出されないマーマーモセット個体を獲得した。現在までに 10 頭の産子が離乳し、そのうち 8 頭では 2 ヶ月齢以上まで培養検査で生菌 (細菌・真菌) が検出されず、最長で 24 ヶ月齢まで培養検査陰性を維持している。獲得した生菌が検出されない個体 (無菌個体)

の 1 歳までの育成期間中の体重増加は、通常環境で育成された個体と差異は認められなかった。また、性成熟に達した無菌個体においてメスでは性周期、オスでは運動精子の射出が観察された。

獲得した無菌個体の糞便の代謝物解析では、腸内細菌が生成する短鎖脂肪酸の濃度は通常飼育個体と比較して低く、二次胆汁酸は検出されなかった。また、腸管免疫の活性化の指標である糞便中の分泌型 IgA の濃度が低く、糞便および血漿のプロテオーム解析においては免疫関連のタンパク質の発現が低いことが観察された。さらに、下部消化管の造影 X 線撮影により、無菌維持個体において無菌マウスと同様に盲腸が著しく拡張していることが観察された。

### III. 考察

本検討において、生菌が検出されない無菌マーマーモセット個体を作成し、性成熟に達する 2 歳以上までの維持に成功した。また、獲得したマーマーモセット個体においては、無菌マウス等で知られている腸内細菌叢の欠如による特性を有していることが示唆された。今後は、作出した無菌マーマーモセットの繁殖を試みるとともに、作出技術を洗練させて研究利用のための安定供給体制を確立していきたい。また、ノトバイオート実験を行い、霊長類モデル動物としての無菌マーマーモセットの有用性について検証を進める予定である。

(会員外共同研究者: 岡原則夫\*, 岡橋伸幸\*\*, 佐藤賢哉\*, 上田政広\*\*\*, 新 幸二\*\*\*\*, 諫山 純\*\*\*, 青戸良賢\*\*\*, 川島祐介\*\*\*\*\*, 菊池理加\*, 黒滝陽子\*, 峰重隆幸\*, 坂本晃海\*, 板谷佳織\*, 田之上 大\*, 中畑龍俊\*, 塩田 淳\*\*\*, 有田 誠\*\*, 本田賢也\*\*\*\*, 佐々木えりか\*, \*実験動物中央研究所, \*\*理化学研究所生命医科学研究センター, \*\*\*JSR・慶應義塾大学医学化学イノベーションセンター, \*\*\*\*慶應義塾大学医学部, \*\*\*\*\*かずさ DNA 研究所)

## A trial of developing germ-free common marmosets

TAKASHI INOUE<sup>\*</sup>, MASAMI UENO<sup>\*</sup> and RYOKO NOZU<sup>\*</sup>

<sup>\*</sup>*Central Institute for Experimental Animals, Kawasaki*

Germ-free mice have contributed indispensably to the advance of gut microbiota research. On the other hand, extrapolation of mouse studies to human medicine can be hampered by differences in biological functions such as metabolism, immunity, and central nervous system between humans and rodents, as well as differences in the colonization of gut microbiota, which is believed to have been formed by coevolution with the host. To bridge these gaps, experimental systems using nonhuman primates (NHPs) are expected, but there are currently no germ-free NHPs available. Therefore, we have been developing technologies for the production of germ-free animals in common marmosets, a small NHP suitable for rearing and handling in an isolator. A series of techniques for germ-free marmoset production including preparation of full-term pregnant animals, aseptic caesarean section, hand-rearing of neonates and long-term maintenance of animals under sterile conditions were developed. To date, we succeeded obtaining 8 germ-free marmosets in which no viable bacteria and fungi were detected in culture and maintained them for a long period of up to 24 months. The weight gain in the obtained germ-free individuals was not different from that in conventional ones. In the sexually mature individuals, a sexual cycle in a female and the ejection of motile sperm in a male were observed. Germ-free marmosets exhibited low levels of faecal short-chain fatty acids, bile acid metabolites, plasma and faecal immunoglobulins, and enlarged caecum in contrast-enhanced X-ray. These germ-free marmosets can serve as novel models that reveal the interaction between microbiota and primate hosts.

**Keywords :** germ-free animal, marmoset, nonhuman primate, laboratory animal

(Non-member collaborators: NORIO OKAHARA<sup>\*</sup>, NOBUYUKI OKAHASHI<sup>\*\*</sup>, KENYA SATO<sup>\*</sup>, MASAHIRO UEDA<sup>\*\*</sup>, KOJI ATARASHI<sup>\*\*\*\*</sup>, JUN ISAYAMA<sup>\*\*\*</sup>, YOSHIMASA AOTO<sup>\*\*\*</sup>, YUSUKE KAWASHIMA<sup>\*\*\*\*</sup>, RIKI KIKUCHI<sup>\*</sup>, YOKO KUROTA<sup>\*</sup>, TAKAYUKI MINESHIGE<sup>\*</sup>, TERUMI YURIMOTO<sup>\*</sup>, KAORI ITAYA<sup>\*\*</sup>, TAKESHI TANOUE<sup>\*\*\*\*</sup>, TATSUTOSHI NAKAHATA<sup>\*</sup>, ATSUSHI SHIOTA<sup>\*\*</sup>, MAKOTO ARITA<sup>\*\*</sup>, KENYA HONDA<sup>\*\*\*\*</sup>, ERIKA SASAKI<sup>\*</sup>. <sup>\*\*</sup>RIKEN Center for Integrative Medical Sciences, Yokohama, <sup>\*\*\*</sup>JSR-Keio University Medical and Chemical Innovation Center, Tokyo, <sup>\*\*\*\*</sup>Keio University School of Medicine, Tokyo, <sup>\*\*\*\*\*</sup>Kazusa DNA Research Institute, Kisarazu)

## 第55回 日本無菌生物ノートバイオロジー学会総会

(承 前)

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

January 22-23, 2022

Sendai

President *Hitoshi Shirakawa*

会 長 白 川 仁

会 期 2022年（令和4年）1月22日（土）・22日（日）

会 場 東北大学・青葉山コモンズ・オンライン開催併用

## 一般演題 セッションI

座長 大崎敬子

(杏林大学)

津田真人

(日本大学)

1. 新生仔の鼻腔炎症に起因する腸内細菌叢の変動と脳組織損傷・・・・・・・・・・・・・・・・ 30  
石井さなえ\*, 三島由祐子\*, 浅野妃南\*\*, 大崎敬子\*\*\*  
(\*杏林大学保健学部臨床検査技術学科, \*\*杏林大学大学院保健学研究科, \*\*\*杏林大学医学部感染症学)
2. 個別換気ケージによる無菌マウスの自発運動量測定法の検討・・・・・・・・・・・・・・・・ 32  
小島圭介, 何裕遥, 野津量子, 富山香代, 植野昌未, 小倉智幸, 高橋利一  
(公益財団法人実験動物中央研究所)
3. 無菌コモンマーマセットの作出・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 34  
井上貴史  
(公益財団法人実験動物中央研究所)
4. トリプトファンの微生物代謝産物トリプタミンは発酵米糠の炎症抑制機能性に重要な役割を果たす・・・・・・・・ 36  
Affifah 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)
5. 難治性下痢症発症牛に対する糞便移植の有効性評価・・・・・・・・・・・・・・・・ 38  
Jahidul Islam, 野地智法  
(東北大学大学院農学研究科食と農免疫国際教育研究センター)

## 一 般 演 題 セッションII

座長 大 坪 和香子

(東北大学)

大 崎 雄 介

(東北大学)

## 6. ヒト腸内細菌によるL-フコースの資化性・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 40

田村彩佳, 大坪和香子

(東北大学大学院農学研究科 動物資源化学分野)

7. *Lactobacillus* 属乳酸菌の性状に影響を与えるストレス因子の研究・・・・・・・・・・ 42

周 冰卉, 大坪和香子

(東北大学大学院農学研究科動物資源化学分野)

## 8. ビオチン欠乏が腸管免疫系を介した免疫修飾に関与する・・・・・・・・・・ 44

細野 朗\*, 津田真人\*, 岡田 開\*, 大崎雄介\*\*, 白川 仁\*\*, 駒井三千夫\*\*

(\*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, \*\*東北大学大学院農学研究科栄養学分野)

## 9. ビオチン水摂取による脳の認知機能関連遺伝子の発現への影響・・・・・・・・・・ 46

塩沢浩太, 大崎雄介, 白川 仁

(東北大学大学院農学研究科栄養学分野)

## 10. ビタミンK無添加食給餌によるマウスの胆汁酸代謝への影響・・・・・・・・・・ 48

錦戸迪哉, 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)

## 新生仔の鼻腔炎症に起因する腸内細菌叢の変動と脳組織損傷

石井 さなえ\* 三島 由祐子\* 浅野 妃南\*\* 大崎 敬子\*\*\*

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

### I. 背景と目的

妊娠後期の母体感染に伴う胎児の炎症応答は、生後自閉症などの精神疾患を患う危険因子となる。しかし、胎児期に起こる炎症応答により、生後の脳機能が持続的に障害される機構については不明である。私たちは、胎児/新生児期という生体形成の重要な時期に炎症が起こると、腸内細菌叢の正常な形成が妨げられ、腸内細菌叢の構成が乱れることで通常の脳腸連関が構築されず、脳機能が阻害されるのではないかと考えた。胎児への感染経路としては、子宮内細菌感染に起因して胎盤経由で全身性炎症反応を起こす経路と、感染した羊水を口腔及び鼻腔から吸引する経路がある。本研究では後者の経路を模倣し、マウス新生仔の鼻腔炎症がその後の腸内細菌叢の構成と脳組織にどのような影響を及ぼすかを明らかにすることを目的とした。

### II. 対象と方法

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、鼻腔炎症モデル及び対照群とした。最終投与終了後(P24), またその6週間後(10週齢)に便を採取し、腸内細菌叢の16SrRNAメタゲノム解析を行った。同時期にマウスを灌流固定し、脳の凍結切片を作製、免疫染色を行った。投与開始から1週間毎に体重を測定した。

### III. 結果と考察

投与終了時のP24における腸内細菌叢は、門レベルではいずれの群もFirmicutesとBacteroidetesが優勢であったが、オスのLPS投与群では占有比が変動していた細菌(門)を認めた。科、属のいずれのレベルにおいても、オスではLPS投与群と対照群との間に有意な違いが見られた。しかしながら、メスではLPS投与群と対照群の間に違いは見られなかった。P24の時点でオスのLPS投与群において変動していた細菌は、10週齢では対照群と同程度であったが、別の種類の細菌(科、属)の占有比が有意に変動した。脳の免疫染色を行った結果、オスのLPS投与群では鼻腔の嗅上皮中にまだ炎症が続いている部分があり、嗅球のミクログリア及びアストロサイトは顕著に活性化していた。嗅球以外の領域におけるグリア細胞の活性化、神経炎症の有無、及びメスの脳組織については現在解析中である。また、オスのLPS投与群は、P35以降に対照群と比べて体重の有意な低下が認められたが、メスではこのような違いは見られなかった。これらの結果から、新生仔期の鼻腔炎症は、長期にわたって腸内細菌叢と脳組織に変化をもたらし、特にオスマウスにおいて顕著な差となると考えられた。



## Neonatal nasal inflammation-induced perturbation of gut microbiota and the brain tissue changes

SANAE HASEGAWA-ISHII\*, YUKO MISHIMA\*, HINAMI ASANO\*\* and TAKAKO OSAKI\*\*\*

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

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

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

Maternal infections and resulting inflammatory responses are risk factors for neuropsychiatric disorders in offspring. But the mechanisms underlying sustained impairment of the brain function after birth remain elucidated. We hypothesized that inflammation during fetal and neonatal periods may disturb the gut microbiota development and alter the gut-brain axis, leading to brain diseases. We aimed to reveal how the neonatal nasal inflammation affects the gut microbiota and the brain. From postnatal day 7 (P7), neonatal mice received bilateral nasal administration of lipopolysaccharide (LPS) as a nasal inflammation model or saline as a control twice a week for 3 weeks (at P7, P10, P14, P17, P21 and P24). At P24 and at 10 weeks (10w) of age, feces were used for 16SrRNA metagenome analysis. At the same time points, mice were fixed and frozen sections of the brain were analyzed immunohistochemically. The body weight was measured every 1 week from P7. In LPS-treated male mice, gut microbiota was perturbed in the phylum, family and genus levels at P24, while it did not change in LPS-treated female mice. The abundances of bacteria were similar at 10w, but some were changed in LPS-treated male mice. In the olfactory bulb, glial cells were still activated in LPS-treated male mice at 10w. The body weight was significantly lower in LPS-treated male, but not female mice than in control later than P35. These results suggest that neonatal nasal inflammation causes long-term perturbation of gut microbiota and the brain and that male mice seemed to be more affected.

## 個別換気ケージによる無菌マウスの自発運動量測定法の検討

小島 圭介 何 裕遙 野津 量子 富山 香代 植野 昌未 小倉 智幸 高橋 利一  
(公益財団法人実験動物中央研究所)

### 【背景】

無菌マウス(GF)を用いた動物実験は、従来ビニールアイソレータ(VI)が用いられてきたが、我々はバイオバブルクリーンルーム(bioBUBBLE社、以下、バブル)と個別換気ケージ(IVC)システムを組み合わせることで、コンベンショナル環境下においてGFマウスの維持が可能なシステムを構築した(Ka Y, et al. 2020)。本報告では、これまでVIでは事例を見ない動物実験として自発運動量のデータ取得を試みた。IVCトップに回転かごを装着できるように改造を行い、測定値を無線接続することで、無菌状態を維持しながらマウスの自発運動量を連続的にモニターできることを目標とした。さらに、GFマウスにSPFマウスの糞便を投与(以下、FMT)して腸内細菌叢を再構成したマウス(以下、EX-GF)とSPFマウスの自発運動量も比較した。

### 【材料と方法】

コンベンショナル飼育環境下にバブル(bioBUBBLE, Inc)を設置した。IVCシステムは日本クレア(株)を用い、IVCケージに適合するよう回転かご付ケージトップ((有)メルクエスト)を改良した。測定データは無線にてバブル外のパソコンに転送した。飼育機材はIVCにセット

した状態で127°C40分、水は127°C90分で滅菌した。また測定用センサー類はホルマリン殺菌装置(メディエート社)で処理した。作業者は無塵衣を着用してバブルに入室し、ケージ交換等はバブル内に設置したクリーンベンチ内で実施した。測定期間は5日間の順化後17日間とし、ケージ交換時には無菌検査を実施した。また、EX-GFマウスの実験においては、SPFマウスの糞便を給水瓶に混濁させる方法でFMTを行い、FMTの前後1週間の自発運動量を測定した。それぞれ得られた回転かごデータの解析は明期と暗期に分け、群間で比較した。

### 【結果と考察】

本実験で構築した実験プロトコルにおいて、無菌を維持した状態で自発運動量を測定することができた。しかし、自発運動量はマウスの個体差があり、現在までGFマウスとSPFマウスの比較において有意差は見いだせていない。本検討において無菌環境下でのマウスを用いた自発運動量評価が可能となったことで、腸内細菌が自発運動量に与える影響を経時的かつ総量的に評価できる手法となることが期待できる。

## Establishment of running-wheel activity test using germ-free mice

KEISUKE KOJIMA, YUYO KA, RYOKO NOZU, KAYO TOMIYAMA, MASAMI UENO, TOMOYUKI OGURA and RIICHI TAKAHASHI

*Central Institute for Experimental Animals, Kawasaki*

We have developed a system that can maintain Germ-free mice in a conventional environment. by combining a bioBUBBLE clean room with an individual ventilation cage (IVC) system in a conventional environment. (Ka Y, et al. 2020)

In this study, we tried to acquire data on running-wheel (RW) activity by modifying the RW mounted on the IVC cage and monitoring its tally counter by wireless.

In addition, we also observed changes in the running-wheel activity of EX-GF mice whose intestinal bacterial flora was reconstituted by fecal transplantation (FMT) from SPF mice.

The mice were acclimatized for 5 days and their locomotor activity was monitored for 2 weeks. Confirmation of maintenance of GF condition by culture inspection was carried out by collecting feces and bedding at the time of weekly cage changing.

In the EX-GF mice experiment, FMT was performed by suspending the feces of SPF mice in a water bottle, and we measured the locomotor activity for one week before and after FMT.

We divided each rotating wheel data into a diurnal period and a nocturnal period and compared the groups.

In this experiment, it was possible to measure locomotor activity while maintaining sterility. However, to date, we find no significant difference in comparing GF and SPF ,EX-GF mice.

Therefore we expect that it will be a method for assessing the effect of intestinal bacteria on locomotor activity over time and in a total amount.

(Non-member collaborators : Norio Okahara\*, Nobuyuki Okahashi\*\*, Kenya Sato\*, Masahiro Ueda\*\*\*, Koji Atarashi\*\*\*\*, Jun Isayama\*\*\*, Yoshimasa Aoto\*\*\*, Yusuke Kawashima\*\*\*\*\*, Rika Kikuchi\*, Masami Ueno\*, Ryoko Nozu\*, Yoko Kurotaki\*, Takayuki Mineshige\*, Terumi Yurimoto\*, Kaori Itaya\*\*\*, Takeshi Tanoue\*\*\*\*, Tatsutoshi Nakahata\*, Atsushi Shiota\*\*\*, Makoto Arita\*\*, Kenya Honda\*\*\*\*, Erika Sasaki\* \* ; *Central Institute for Experimental Animals, Kawasaki* \*\**RIKEN Center for Integrative Medical Sciences, Yokohama*, \*\*\**JSR-Keio University Medical and Chemical Innovation Center, Tokyo*, \*\*\*\**Keio University School of Medicine, Tokyo*, \*\*\*\*\* *Kazusa DNA Research Institute, Kisarazu*)

## 無菌コモンマーモセットの作出

井上貴史

(公益財団法人実験動物中央研究所)

近年の腸内微生物叢研究の発展において、無菌マウスを用いた実験系は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には、ヒトとげっ歯類との代謝、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微生物叢の定着性の差異が障壁となることがある。これらの差異を埋めるべく、ヒトに近縁な霊長類を用いた実験系が期待されるが、現在、利用可能な無菌霊長類は存在しない。そこで、我々は、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、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、育成までの技術確立して無菌マーモセットの作出を試み、その結果、糞便の培養検査により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。現在までに 10 頭の産子が離乳し、そのうち 8 頭では 2 ヶ月齢以上まで培養検査で生菌 (細菌・真菌) が検出されず、最長で 24 ヶ月齢まで培養検査陰性を維持している。獲得した生菌が検出されない個体 (無菌個体) の 1 歳までの育成期間中の体重増加は、

通常環境で育成された個体と差異は認められなかった。また、性成熟に達した無菌個体においてメスでは性周期、オスでは運動精子の射出を観察しており、生殖機能を有することが示唆された。

獲得した無菌個体の糞便の代謝物解析では、腸内細菌が生成する短鎖脂肪酸の濃度は通常飼育個体と比較して低く、二次胆汁酸は検出されなかった。また、腸管免疫の活性化の指標である糞便中の分泌型 IgA の濃度が低く、糞便および血漿のプロテオーム解析においては免疫関連のタンパク質の発現が低いことが観察された。さらに、下部消化管の造影 X 線撮影により、無菌維持個体において無菌マウスと同様に盲腸が著しく拡張していることが観察された。これらの所見から、獲得したマーモセット個体の無菌動物としての特性が示唆された。

今後は、作出した無菌マーモセットの繁殖を試みるとともに、作出技術を洗練させて研究利用のための安定供給体制を確立していきたい。また、ノトバイオート実験を行い、霊長類モデル動物としての無菌マーモセットの有用性について検証を進める予定である。

(会員外共同研究者：岡原則夫\*, 岡橋伸幸\*\*, 佐藤賢哉\*, 上田政広\*\*\*, 新 幸二\*\*\*\*, 諫山 純\*\*\*, 青戸良賢\*\*\*, 川島祐介\*\*\*\*\*, 菊池理加\*, 植野昌未\*, 野津量子\*, 黒滝陽子\*, 峰重 隆幸\*, 坂本晃海\*, 板谷佳織\*, 田之上 大\*, 中畑龍俊\*, 塩田 淳\*\*\*, 有田 誠\*\*, 本田賢也\*\*\*\*, 佐々木えりか\*; \*公益財団法人実験動物中央研究所, \*\*理化学研究所生命医科学研究センター, \*\*\*JSR・慶應義塾大学医学化学イノベーションセンター, \*\*\*\*慶應義塾大学医学部, \*\*\*\*\*かずさ DNA 研究所)

## A trial of developing germ-free common marmosets

TAKASHI INOUE

*Central Institute for Experimental Animals, Kawasaki*

Germ-free mice have contributed indispensably to the development of gut microbiota research. On the other hand, extrapolation of mouse studies to human medicine can be hampered by differences in biological functions such as metabolism, immunity, and central nervous system between humans and rodents, as well as differences in the colonization of gut microbiota, which is believed to have been formed by coevolution with the host. To bridge these gaps, experimental systems using nonhuman primates (NHPs) are expected, but there are currently no germ-free NHPs available. Therefore, we have been developing technologies for the production and application of germ-free animals in common marmosets, a small NHP suitable for rearing and handling in an isolator. A series of techniques for germ-free marmoset production including preparation of full-term pregnant animals, aseptic caesarean section, hand-rearing of neonates and long-term maintenance of animals under sterile conditions were developed. To date, we succeeded obtaining 8 germ-free marmosets in which no viable bacteria and fungi were detected in culture and maintained them for a long period of up to 24 months. The weight gain in the acquired germ-free individuals was similar to that in conventional ones. In the sexually mature individuals, a sexual cycle in a female and the ejection of motile sperm in a male were observed. Germ-free marmosets exhibited low levels of faecal short-chain fatty acids, bile acid metabolites, plasma and faecal immunoglobulins, and enlarged caecum in contrast-enhanced X-ray. These stable germ-free marmosets can serve as novel models that reveal the interaction between microbiota and primate hosts.

(Non-member collaborators : Norio Okahara<sup>\*</sup>, Nobuyuki Okahashi<sup>\*\*</sup>, Kenya Sato<sup>\*</sup>, Masahiro Ueda<sup>\*\*\*</sup>, Koji Atarashi<sup>\*\*\*\*</sup>, Jun Isayama<sup>\*\*\*</sup>, Yoshimasa Aoto<sup>\*\*\*</sup>, Yusuke Kawashima<sup>\*\*\*\*\*</sup>, Rika Kikuchi<sup>\*</sup>, Masami Ueno<sup>\*</sup>, Ryoko Nozu<sup>\*</sup>, Yoko Kurotaki<sup>\*</sup>, Takayuki Mineshige<sup>\*</sup>, Terumi Yurimoto<sup>\*</sup>, Kaori Itaya<sup>\*\*\*</sup>, Takeshi Tanoue<sup>\*\*\*\*</sup>, Tatsutoshi Nakahata<sup>\*</sup>, Atsushi Shiota<sup>\*\*\*</sup>, Makoto Arita<sup>\*\*</sup>, Kenya Honda<sup>\*\*\*\*</sup>, Erika Sasaki<sup>\*\*</sup>; Central Institute for Experimental Animals, Kawasaki \*\*RIKEN Center for Integrative Medical Sciences, Yokohama, \*\*\*JSR-Keio University Medical and Chemical Innovation Center, Tokyo, \*\*\*\*Keio University School of Medicine, Tokyo, \*\*\*\*\*Kazusa DNA Research Institute, Kisarazu)

## トリプトファンの微生物代謝産物トリプタミンは発酵米糠の 炎症抑制機能性に重要な役割を果たす

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)

### 【背景】

麹カビと乳酸菌によって二段階発酵された米糠(FRB)の摂取はデキストラン硫酸ナトリウム(DSS)誘発性大腸炎に対して炎症抑制効果を有することが示されている。しかし、FRBに含まれる炎症を抑制する成分は不明である。本研究ではマウス由来マクロファージ様細胞を用い、FRBの分画物に含まれる炎症抑制成分の分離・同定を行った。

### 【方法】

マウス由来マクロファージ様細胞 RAW264.7 細胞をリボ多糖 (LPS) で処理したときの炎症性サイトカインの mRNA 量の変化を指標として、FRB の分画物を評価した。FRB を二段階の分画によっていくつかの画分に分けた。第一段階では溶媒抽出法を用い、最も炎症性サイトカイン mRNA の発現を抑制する画分を選択した。第二段階では、固相抽出法で分画し、各画分を評価した。これらの画分に含

まれる成分を HPLC により分析した。

### 【結果】

FRB を熱水で抽出した後、逆相カラムで固相抽出した画分には抗炎症成分が含まれることが明らかになった。この画分を HPLC 分析したところ、トリプトファンやトリプトファンの微生物代謝産物であるトリプタミンが多量に含まれていた。トリプタミンを RAW264.7 細胞で評価したところ、LPS 誘導による IL-6 mRNA 量を有意に低下させた。更に、野生型、および芳香族炭化水素受容体 (AHR) 欠損マウスからマクロファージを採取して、トリプタミン、および FRB 画分の抗炎症性を調べたところ、AHR 欠損マウス由来細胞では抗炎症性が消失した。以上のことから、FRB のもつ抗炎症活性は、トリプトファンやトリプトファンの微生物代謝産物、トリプタミン等によるものであり、AHR を介して機能が発揮されると推定された。

(会員外共同研究者：小関卓也；山形大学農学部)

## **Tryptamine, a microbial metabolites in fermented rice bran reduced LPS-induced inflammation in murine macrophage**

AFIFAH ZAHRAAGISTA, YUSUKE OHSAKI, MICHIO KOMAI and  
HITOSHI SHIRAKAWA

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

**【Introduction】** : Dual fermented rice bran with *Aspergillus kawachii* and a mixture of lactic acid bacteria (FRB) was able to ameliorate dextran sodium sulfate-induced inflammation in mice intestine. Yet, it is still unknown which of FRB' s bioactive compounds plays a key role in its anti-inflammatory effect. This research aimed to reveal this bioactive compound and its mechanism of action by using macrophages.

**【Methods】** : FRB was separated into different fractions with a series of extraction processes. The first stage of extraction was conducted with solvent-based extraction, followed by the second stage, solid-phase extraction. The produced fractions were screened for their anti-inflammatory activity by using RAW 264.7 cells which were activated with lipopolysaccharide (LPS). Reverse-phase HPLC analysis was used to determine the content of FRB fractions.

**【Results】** : The screening process showed that FRB fractions E (FRBE) has prominent anti-inflammatory properties. HPLC analysis showed that FRBE was rich in tryptophan and tryptamine, a microbial metabolite of tryptophan. Tryptamine was also revealed to have an Il-6 mRNA suppressing effect in LPS-induced RAW 264.7 cells. Furthermore, FRBE and tryptamine were able to lower the expression of LPS-induced Il-6 in intraperitoneal macrophage from wild type, but not Ahr deficient mice. Tryptamine in FRB was potentially able to suppress the LPS-induced inflammatory response in cells by modulating Ahr activity.

(Non-member collaborators : Takuya Koseki. *Faculty of Agriculture, Yamagata University*)

## 難治性下痢症発症牛に対する糞便移植の有効性評価

Jahidul Islam 野地 智法

(東北大学大学院農学研究科食と農免疫国際教育研究センター)

子牛の下痢症は、感染性および非感染性の両方の要因に起因し、感染性の場合、複数の腸内病原体(ウイルス、細菌、原生動物など)が発症に関与している。感染性の下痢症に対する抗菌剤の乱用は薬剤耐性菌の発生を助長することから、抗菌剤に依存しない新たな治療戦略の構築が求められている。そこで、本研究では、難治性下痢症に対する新たな治療法として、糞便移植(Fecal microbiota transplantation: FMT)の有効性について評価した。具体的には、令和元年度に難治性下痢症発症牛(20頭)に対し糞便移植を実施し、その有効性を臨床評価および、16S rRNA 遺伝子を標的とした糞便メタゲノム解析、さらには、CE-TOFMSを用いた糞便メタボローム解析により検証した。その結果、20回の試験のうちの14回(70%)で下痢症状が大幅に改善され、難治性下痢症に対する糞便移植の優れた有効性が臨床的に実証された。糞便移植の有効区(70%)と無効区(30%)を比較した詳細解析から、FMT治療の有効群においてドナーからレシピエントへの移植による適合性を示す微生物属として、

*Selenomonas* が同定された。また、メタゲノム及びメタボローム解析間の相関の有無を検討するためのプロクラステス解析により、FMTの有効群では、2つの解析結果間に強い正の相関が認められた。さらには、千葉県内で飼育されている計158頭の健康牛および下痢症発症牛より糞便をさらに採材し、機械学習による糞便移植の最適ドナーを選択するための基準の確立を試みたところ、*Sporobacter*が糞便移植を成功に導く可能性を有した微生物属として特定された。加えて、メタボローム解析から、ドナーおよびFMT実施前のレシピエントの糞便中の特定の代謝物(例: glycerol 3-phosphate, dihydroxyacetone phosphate and isoamylamine)の濃度が低値であることが、FMTの有効性を期待する上で重要であることが示された。以上の通り、FMTの成否に関わる微生物および代謝物の探索に成功した本研究を通して、子牛の難治性下痢症を治療することを目的としたFMTを獣医療として技術開発する上で必要とされる要素が見出された。

(会員外共同研究者: 谷水優江\*\*, 清水優\*\*, 五島可祥\*\*, 大谷夏輝\*\*, 大谷夏輝\*\*, 舘崎恵理子\*\*, 佐藤茉純\*\*, 牧野英司\*\*, 島田亘\*\*, 上田千世\*\*, 田中秀和\*\* ; \*東北大学大学院農学研究科食と農免疫国際教育研究センター, \*\*千葉県農業共済組合)



## Therapeutic efficacy of fecal microbiota transplantation for intractable calf diarrhea treatment

JAHIDUL ISLAM and TOMONORI NOCHI

*International Education and Research Center for Food and Agricultural Immunology, Graduate School of Agricultural Science, Tohoku University, Sendai*

Calf diarrhea is attributed to both infectious and non-infectious factors and multiple enteric pathogens (e.g., viruses, bacteria, and protozoa) are involved in the development of this disease. Proper treatment of diarrhea represents a therapeutic challenge in livestock production as because inappropriate diagnosis provokes the overuse of antibiotics and antibiotic resistance germs. Here, we describe the ability of fecal microbiota transplantation (FMT), to ameliorate intractable diarrhea. Although establishing FMT to cure diarrhea in calves is difficult because of differences in farm management practices and the lack of optimal donors selection. In this study, the underlying factors of successful and unsuccessful FMT treatment cases are elucidated, and the potential markers for predicting successful FMT are identified using fecal metagenomics via 16S rRNA gene sequencing, fecal metabolomics via capillary electrophoresis time-of-flight mass spectrometry (CE-TOFMS), and machine-learning approaches. Specifically, 20 FMT treatment cases, in which feces from healthy donors were intrarectally transferred into recipient diarrheal calves, were conducted with a success rate of 70%. *Selenomonas* was identified as a microorganism genus that showed significant donor–recipient compatibility in successful FMT treatments. A strong positive correlation between the microbiome and metabolome data, which is a prerequisite factor for FMT success, was confirmed by Procrustes analysis in successful FMT ( $r = 0.7439$ ,  $P = 0.0001$ ). Additionally, using another 158 healthy and diarrheal calves, machine learning approach is used to establish the criteria for donor selection. In where genus *Sporobacter* is identified as a potential microorganism in successful donor selection. Low levels of metabolites, such as glycerol 3-phosphate, dihydroxyacetone phosphate, and isoamylamine, in the donor or recipients prior to FMT are predicted to facilitate FMT. Overall, we provide the first substantial evidence of the factors related to FMT success or failure; these findings could improve the design of future microbial therapeutics for curing diarrhea in calves.

## ヒト腸内細菌による L-フコースの資化性

田村 彩佳 大坪 和香子

(東北大学大学院農学研究科 動物資源化学分野)

### I. 目的

フコースはヒトや動物の粘液や細胞表面糖タンパク、乳中オリゴ糖の修飾・構成糖として多様な生態機能に関与していることが知られているが、ヒト腸内細菌による L-フコース資化性についての知見は少ない。本研究では、乳児および成人健常者の腸内細菌叢の構成細菌の L-フコース資化性を明らかにすることを目的とし、ヒト糞便試料を用いた集積培養と単離資化試験を行った。

### II. 材料と方法

ヒト由来糞便試料のサンプリングおよび使用は、東北大学大学院農学研究科「ヒトを対象とする研究に関する倫理委員会」の規定を遵守して実施した。

L-フコースを唯一の糖源として添加した半合成培地および無糖 MRS 培地を調製し、ヒト(乳児・健常成人)由来糞便試料を滅菌注射針で培地に添加し段階希釈後 37℃で嫌氣的に集積培養した。濁度が上昇した培養液を段階希釈・継代培養し、培養液を栄養寒天培地に塗布して生育したコロニーを単離した。単離した菌株の 16S rRNA 遺伝子の塩基配列を決定し、BLAST 相同性検索と系統解析により属種名を同定した。

また、各培養液から上清を回収し、薄層版にフコースと並べてスポットし、展開溶液(ブタノール:イソプロパノール:水=3:12:4, v/v/v)により複数回展開を行った。乾燥後、発色試薬(硫酸・メタノール)を噴霧し、加熱により検出された各スポットの濃淡および移動度を測定した。

### III. 結果および考察

16S rRNA 遺伝子解析の結果、乳児糞便から単離された菌株は *Bifidobacterium breve*、健常成人糞便から単離された菌株は *Bacteroides* 属が多く特に *B. thetaiotaomicron* に最も近縁(>99%)であった。各菌株を L-フコースを炭素源として添加した栄養培地で培養し、培養液上清の薄層クロマトグラフィーを行った結果、L-フコースに相当するスポットが培養時間の経過に伴って薄くなる様子が確認されたことから、各単離菌株が L-フコースを資化して生育したことが示されたことから、乳児腸管および成人健常者の腸内細菌叢の主要な構成細菌が L-フコース資化能を有することが明らかとなった。

(会員外共同研究者: 江田真代, 佐子川さやか, 北澤春樹; 東北大学大学院農学研究科 動物資源化学分野)

## L-fucose utilization by human gut bacteria

AYAKA TAMURA and WAKAKO IKEDA-OHTSUBO

*Laboratory of Animal Product Chemistry, Graduate School of Agricultural Science,  
Tohoku University*

Fucose occurs as a common constituent of human and animal mucus, cell-surface polysaccharides, as well as of human milk oligosaccharides, but it has not been well known whether this monosaccharide can be a good nutritional source for intestinal bacteria. In this study, we conducted serial culture enrichments and bacterial colony isolation using media containing L-fucose as a sole carbon source, which were inoculated by human stool samples. Bacterial strains isolated from enrichments with infant stool samples were affiliated with *Bifidobacterium breve*, while strains from adult human stools were most closely-related to *Bacteroides* species such as *Bacteroides thetaiotaomicron*. Fucose utilization abilities were confirmed by thin-layer chromatography of the culture supernatants of each strain, where spots corresponding to L-fucose disappeared as the incubation periods proceeded. Our current findings indicate that fucose serves as a common nutritional source for human intestinal bacteria.

## *Lactobacillus* 属乳酸菌の性状に影響を与えるストレス因子の研究

周 冰卉 大坪 和香子

(東北大学大学院農学研究科 動物資源化学分野)

### I. 目的

グラム陽性菌である乳酸菌は、ヒト腸管内や発酵食品、環境中に広く生息しており、プロバイオティクスとして宿主に有益な効果をもたらすことが知られている。生育条件や保存条件は、乳酸菌の特性に様々な面で影響を与えるが、特に高温・低温ストレス、炭素源の違いなどは乳酸菌の分裂増殖に影響を与えるだけでなく、乳酸菌の表層特性を変化させ、宿主細胞への付着性や免疫調節性に影響を与える。その他、低pHや胆汁酸などのストレスも乳酸菌の細胞分裂、膜形成の生合成、EPSの生合成などプロバイオティクス効果に関連する機能に影響を与える可能性がある。本研究では各種ストレス因子が乳酸菌の性状にどのような影響を与えるかを明らかにすることを目的とし、乳酸菌 *Ligilactobacillus salivarius* を異なる条件で培養・処理し、生存率や形態変化を比較した。

### II. 材料と方法

*Ligilactobacillus salivarius* をグルコース、ガラクトース、マンノース、フルクトースを含むMRS培地または酵素処理したワカメ消化物で24時間培養し、30分ごとOD値を測定した。*L. salivarius* の生存率は、25 mg/mL のペプシンを

添加した模擬胃液中で評価した。pHは0.1N塩酸で2に調整した。酵素処理したワカメ溶液を胃液に1%(v/v)添加して実験を行い、対照として滅菌したMilliQ水を添加した。細菌の生存率は、0.5, 1, 2, 3, 4, 5時間後にMRS寒天培地プレート上のコロニーカウティングにより行った。*L. salivarius* の胆汁酸中での生存率は、0.3%の胆汁酸塩を用いて上記と同様の方法で評価した。また、グルタルアルデヒドにより固定した菌体の表層構造を走査型電子顕微鏡により観察した。

### III. 結果および考察

*L. salivarius* のコロニーは嫌気的な培養で大きくなり、またプレインキュベーションの繰り返しにより、菌体表面の膨張が観察された。模擬胃液などの低pHや消化酵素添加条件は主に細胞表面のタンパク質に物理的なダメージを与え、胆汁酸塩の存在は主に細胞表面を加水分解する化学的なダメージを与えることが知られた。一方、*L. salivarius* は70℃で90分間加熱させても菌体表面の損傷は最小限に抑えられ、元の形状を維持していた。これらの条件は、乳酸菌を不活化した状態における免疫調節性の評価アッセイなど「イムノポストバイオティクス」の選抜・評価に応用可能と期待された。

## Research on stress factors affecting characteristics of *Lactobacillus*

BINGHUI ZHOU and WAKAKO IKEDA-OHTSUBO

*Laboratory of Animal Product Chemistry, Tohoku University, Graduate School of Agricultural Science, Tohoku University, Sendai*

Lactobacilli is gram-positive bacteria, commonly inhabited in the human body, fermented food and environment, which proved to have a beneficial effect on the host when colonized on the gastrointestinal tract.

Growth and preservation conditions would affect the properties of lactobacilli in many aspects. Higher or lower temperature could cause low enzymic activity, which leads to difficulty in fission. One of the most important ingredients in broth, carbon sources not only affect the growth of lactobacilli by fission but also result in the change of properties of biosynthetic, reflecting the different performance of adhesion ability and immunomodulatory to cells, related to the surface layer of lactobacilli. On the other hand, stress such as low pH and bile acid environment could have effects on performances of lactobacilli relating to the bacterial cell division, biosynthesis of the membrane-forming, or the biosynthesis of EPS and in this study, we will find out if it may be observed by the morphology of lactobacilli.

Different culture media resulted in growth change of *Lactobacillus*, leading to the various performance of lactobacilli when apply to further research. This research aims to investigate tolerance and morphological changes under different growth conditions and treatment, to determine the optimal growth condition of *Lactobacillus* applying to various further research.

*Ligilactobacillus salivarius* were incubated in MRS with glucose, galactose, mannose, fructose and enzyme-treated wakame broth for 24 h. OD values were measured every 30 min. Survival of *L. salivarius* was evaluated in the simulated gastric juice, which contained 25 mg/mL of pepsin. The pH was adjusted to 2, with 0.1N HCl. Wakame solution with enzyme treatment was added to gastric juice (1%(v/v)) for the experiment and sterilized MilliQ water was added as the control. Bacterial viability was performed by plate counting on MRS agar plates after 0.5, 1, 2, 3, 4, and 5 hours. Survival of *L. salivarius* in bile salt was evaluated by the method as above with 0.3% of bile salt.

Bigger colonies of *L. salivarius* were observed when incubated anaerobically. Surface of bacteria were plump by three-times pre-incubation. Low pH cause mainly physical damage to the protein of cell surface and presence of bile salt cause mainly chemical damage by hydrolyzing cell surface. When the *L. salivarius* were heat killed at 70°C for 90 min, bacteria surface was minimally damaged with the original shape, indicating this inactivate condition for the lactobacilli could apply to further immunoassay to evaluate properties of immunobiotics.

(Non-member collaborators : Haruki Kitazawa. *Laboratory of Animal Product Chemistry, Tohoku University, Graduate School of Agricultural Science, Tohoku University*)

## ビオチン欠乏が腸管免疫系を介した免疫修飾に関与する

細野 朗\* 津田 真人\* 岡田 開\* 大崎 雄介\*\* 白川 仁\*\* 駒井 三千夫\*\*

(\*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,

\*\*東北大学大学院農学研究科栄養学分野)

### I. 目的

水溶性ビタミンとして生体内の代謝（糖代謝・脂肪酸代謝・アミノ酸代謝・脂肪酸合成など）に関与しているビオチンは、経口摂取する食品から栄養素として生体内で利用されるほか、腸内細菌によっても産生されている。ビオチン欠乏は様々な生体内炎症に関与していることが報告されているが、腸管免疫系においてどのように機能するのかは不明な点が多い。本研究は、腸内細菌の影響を顕著に受けている大腸部位の腸管関連リンパ組織の細胞応答に与えるビオチンの影響を解析することをめざした。

### II. 材料と方法

通常および無菌の飼育環境下にある BALB/c マウス（雌性 9-12 週齢）に対して、それぞれに標準食（AIN-93G）またはビオチン欠乏食を 8 週間自由摂取させた。その後、各マウスから脾臓（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、単一細胞を調製した。調製した各細胞画分は細胞フェノタイプに注目した細胞機能解析をフローサイトメトリーにより行い、さらに、それぞれの細胞画分を CD3/CD28 刺激下で 60 時間培養を行い、上清中のサイトカイン（IFN- $\gamma$ , IL17A, IL-10）量を酵素免

疫測定法（ELISA 法）法にて定量した。加えて、血清、腸粘膜組織中の抗体（IgA, IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgM）量を ELISA 法で定量した。

### III. 結果・考察・結論

通常、無菌マウスともビオチン欠乏食の摂取によってパイエル板および結腸リンパ節中の胚中心 B 細胞（B220<sup>+</sup>CD95<sup>+</sup>GL-7<sup>+</sup>）の割合がそれぞれの標準食群に比べて低値を示し、さらに、無菌マウスの CoP 細胞においてはナイーブ（CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>）が標準食群よりも減少しエフェクター T 細胞（CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD44<sup>low</sup>CD62L<sup>+</sup>）が増加した。しかし、通常マウスではビオチン欠乏食によってこれらの T 細胞フェノタイプの影響はみられなかった。このとき、無菌マウスにビオチン欠乏食を与えると、CoP 細胞の T 細胞応答は IL-4 産生応答が高くなる特徴がみられた。したがって、無菌マウスにビオチン欠乏食を給餌することで誘導される真性ビオチン欠乏が、大腸部位の CoP 中の T 細胞分化の誘導を介して炎症反応に関与する可能性が考えられた。

(会員外共同研究者：池田大貴\*, 古川凱斗\*, 久古鈴香\*\* ; \*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, \*\*東北大学大学院農学研究科栄養学分野)

## Biotin deficiency is involved in immune modulation by the intestinal immune system

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

*\*Department of Food Bioscience and Biotechnology, College of Bioresource Sciences, Nihon University, Isehara*

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

Biotin, a water-soluble vitamin, is an essential nutrient for body as well as one of the metabolites by intestinal commensal bacteria. It is known that the biotin deficiency induces the inflammatory responses in the body, but the immunomodulatory effects of biotin on the intestinal immune system have not been fully elucidated. In this study, we aimed to analyze the effect of biotin on the cellular responses of lymphoid tissues in the large intestine, which is significantly affected by intestinal bacteria.

We utilized BALB/c mice bred on a biotin-containing (control) or a biotin-deficient diet under conventional (CV) or germ-free (GF) condition to investigate the immunomodulatory effect of biotin derived from both dietary components and intestinal commensal bacteria. The phenotype of B or T cells in spleen (SPL), Peyer's patches (PP), cecal patches (CeP), colonic patches (CoP) were analyzed. Each cells fraction from gut-associated lymphoid tissues was cultured under CD3/CD28 stimulation, and the amount of cytokines in the supernatant was measured by enzyme immunoassay (ELISA).

In CoP cells of GF mice, dietary biotin deficiency decreased naive CD4<sup>+</sup> T cells and increased effector CD4<sup>+</sup> T cells compared with the standard diet group. CoP T cells in biotin-deficient GF mice were characterized by a higher IL-4 production than that of GF mice on the standard diet. Therefore, we hypothesized that a genuine biotin deficiency induced by feeding a biotin-deficient diet to GF mice may be involved in the inflammatory responses through the induction of T-cell differentiation on CoP in the gut.

## ビオチン水摂取による脳の認知機能関連遺伝子の発現への影響

塩沢 浩太 大崎 雄介 白川 仁  
(東北大学大学院農学研究科栄養学分野)

**要 旨：** ビオチンは補酵素としての機能のほかに非補酵素作用が知られており、認知機能への影響も示唆されている。Wistar 系雄性ラットに飲水により高用量のビオチンを2週間または8週間摂取させたところ、コントロール群と比較して2週間で血中のエストラジオールが増加した。飼育8週間で海馬の脳神経由来栄養因子 (BDNF) のプロセッシングが誘導され、pro-BDNF の減少および mature-BDNF の増加がみられた。PKA-CREB 経路のタンパク質発現量を測定したところ、飼育2週間では cAMP 応答配列結合タンパク質 (CREB) のリン酸化比が増加したが、飼育8週間ではリン酸化 CREB は減少した。以上の結果より、慢性的なビオチン摂取は海馬での性ホルモン産生量を増加させ、PKA-CREB 非依存的経路を介した海馬での BDNF のプロセッシングを誘導し、mature-BDNF への変換を促進する可能性が示唆された。

**キーワード：** ビオチン、認知機能、脳、性ホルモン、脳神経由来栄養因子 (BDNF)

### I. 目的

ビオチンは食事および腸内細菌により供給される水溶性ビタミンである。糖代謝、脂質代謝、アミノ酸代謝に関わるカルボキシラーゼの補酵素として機能する。我々の研究室は、無菌マウスを用いたビオチン欠乏モデルにより胎仔奇形や発育不全が起こることを報告した。一方で、高用量のビオチン摂取には非補酵素作用が示されており、糖尿病、高血圧症の改善や抗炎症作用が明らかにされている。近年、中枢神経系における性ホルモンや脳神経由来栄養因子 (BDNF) の認知機能改善への貢献が注目されている。特に脳内で生産される性ホルモンは「ニューロステロイド」としても知られている。本研究では、ラットに高用量のビオチンを慢性的に摂取させ、血中、大脳、海馬中の性ホルモン濃度、および大脳、海馬中の認知機能関連タンパク質の発現量を解析した。

### II. 方法

Wistar 系ラット (雄, 8 週齢) を1週間馴化後、コントロール群 (蒸留水) と、ビオチン群 (3.3 mg/L ビオチン水) に分け、それぞれ自由摂水として2週間、または8週間飼育した。飼料は市販固型飼料 (F-2, フナバシファーム) を自由摂食とした。体重と摂食量、飲水量は2日毎に測定し、飼育終了時に血清、海馬を採取した。ビオチン濃度は LC-MS/MS 法により測定した。また、性ホルモン濃度は ELISA 法により測定した。認知機能関連タンパク質の発現量はウエスタンブロット法により解析した。

### III. 結果と考察

飲水量 (蒸留水、ビオチン水) および摂食量 (飼料中のビオチン含量) から各群のビオチンの摂取量を算出すると、コントロール群に対して、ビオチン群では約 15-30 倍のビオチンを摂取していた。2週間飼育、8週間飼育ともにビオチン群で血清中の遊離ビオチン濃度が増加した。2週間飼育のビオチン群で血清中のエストラジオール (E2) 濃度は上昇したが、8週間飼育では変化がみられなかった。ビオチン群の海馬の E2 濃度は2週間飼育では減少し、8週間飼育では増加傾向が見られた。海馬の認知機能関連タンパク質の発現量を解析したところ、海馬の BDNF は8週間飼育ではビオチン群で、mature-BDNF は増加し、pro-BDNF は減少した。次に PKA (cAMP 依存性リン酸化酵素) およびその下流因子 CREB を解析したところ、2週間飼育のビオチン群でリン酸化 CREB (p-CREB)、および p-CREB/CREB 比の上昇がみられた。一方で、8週間飼育のビオチン群で p-CREB は減少した。

以上の結果から、慢性的なビオチン摂取は海馬での性ホルモン産生量を増加させる可能性が示唆された。また、PKA-CREB 非依存的経路を介して海馬での BDNF のプロセッシングを誘導し、mature-BDNF への変換を促進する可能性が示唆された。

(会員外共同研究者：久古鈴香\*, 前川正充\*\* ; \*東北大学大学院農学研究科栄養学分野,

\*\*東北大学病院・薬剤部)



## Effect of biotin ingestion on the expression of genes associated with cognitive ability

KOTA SHIOZAWA, YUSUKE OHSAKI and HITOSHI SHIRAKAWA

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

Biotin is a member of B group vitamin that is supplied from daily diet and the product by gut microbiota. Its well-known function is a coenzyme of carboxylase involved in glucose, lipid, and amino acid metabolisms. Beside these physiological functions, pharmacological dose of biotin shows novel functions; improvement of diabetes and hypertension, and anti-inflammatory effects. However, there are few reports regarding effect of biotin on brain, specially cognitive function. In this paper, we analyzed the effect of biotin supplementation on the gene expression in the hippocampus in rats. Wistar rats (male, 8 weeks old) were divided into a control (distilled water) and a biotin (3.3 mg /biotin solution ) groups and were bred for 2 or 8 weeks. Estradiol levels in hippocampus were decreased in biotin treatment for 2 weeks but increased in 8 weeks treatment. On the other hand, blood estradiol levels were increased in 2 weeks of biotin treatment, but not changed in 8 weeks treatment. These results indicated that hippocampus steroidogenesis altered by biotin treatment is not correlated with its synthesis in gonad tissue and peripheral metabolism. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF), a nerve growth factor, has an important role in neurogenesis and improvement of cognitive function. Hippocampus BDNF was increased in biotin administered group for 8 weeks. Protein kinase A (PKA) and CREB, which regulate the expression of BDNF, were decreased in biotin treatment for 8 weeks. These results suggested that BDNF expression is enhanced by biotin via PKA-CREB independent manner.

**Keywords:** biotin, cognitive ability, brain, sex hormone, brain-derived neurotrophic factor (BDNF)

### References

1. Zemleni, J., Wijeratne, S. S. K. & Hassan, Y. I. : Biotin. *Biofactors*, **35**, 36–46, 2009.
2. Mock, D. M. Biotin: From Nutrition to Therapeutics. *J. Nutr.*, **147**, 1487–1492, 2017.
3. Sasaki, Y., Sone, H., Kamiyama, S., Shimizu, M., Shirakawa, H., Kagawa, Y., Komai, M. & Furukawa, Y. : Administration of biotin prevents the development of insulin resistance in the skeletal muscles of Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty rats. *Food Funct.*, **3**, 414–419, 2012.
4. Watanabe-Kamiyama, M., Kamiyama, S., Horiuchi, K., Ohinata, K., Shirakawa, H., Furukawa, Y. & Komai, M. : Antihypertensive effect of biotin in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Br. J. Nutr.*, **99**, 756–763, 2008.
5. Kuroishi, T., Endo, Y., Muramoto, K. & Sugawara, S. : Biotin deficiency up-regulates TNF-alpha production in murine macrophages. *J. Leukoc. Biol.*, **83**, 912–920, 2008.
6. Compagnone, N. A. & Mellon, S. H. Neurosteroids : biosynthesis and function of these novel neuromodulators. *Front. Neuroendocrinol.*, **21**, 1–56, 2000.
7. Moraga-Amaro, R., van Waarde, A., Doorduyn, J. & de Vries, E. F. J. Sex steroid hormones and brain function : PET imaging as a tool for research. *J. Neuroendocrinol.*, **30**, 2018.

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

## ビタミン K 無添加食給餌によるマウスの胆汁酸代謝への影響

錦戸 迪哉 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)

**要旨：**メナキノン-4 (MK-4) は、薬物・胆汁酸代謝の制御に関わる核内受容体 PXR のリガンド活性を有する。日常的に摂取しているビタミン K (VK) は生体内で MK-4 に変換されることから、食餌由来 VK が胆汁酸代謝に影響を与える可能性がある。そこで、VK 無添加食をマウスに 4 週間給餌したところ、肝臓および回腸における胆汁酸代謝関連遺伝子発現量が変化し、肝臓中の胆汁酸濃度も変化した。このことから、食餌由来 VK は胆汁酸代謝に影響を与える可能性が示唆された。

**キーワード：**ビタミン K, メナキノン-4, 胆汁酸, PXR, 性差

### I. 目的

ビタミン K (VK) は天然には植物由来の VK1 (フィロキノン) と、主に微生物由来の VK2 (メナキノン: MK-n) が存在する。我々の生体内では腸内細菌により VK2 が合成され、その一部は吸収・利用されていると考えられている。VK は  $\gamma$ -グルタミルカルボキシラーゼの補因子として働き、血液凝固や骨形成において重要な役割を果たしている。近年、メナキノン-4 (MK-4) が核内受容体 PXR のリガンド活性を示すことが明らかになった。PXR は薬物・糖質・胆汁酸代謝に関与する多くの代謝酵素や輸送体の遺伝子発現を転写レベルでリガンド依存的に制御している。しかし、MK-4 の PXR を介した研究は主に骨代謝や PXR の発現が見られる培養細胞実験に集中しており、未だその生理的機能については不明な点が多い。我々はヒト型 PXR マウスに MK-4 を単回経口投与すると、肝臓における胆汁酸合成遺伝子発現量が減少することを見いだした<sup>1</sup>。日常的に摂取している VK は生体内で MK-4 に変換されるため (Fig. 1)、食事由来の VK が胆汁酸代謝に影響を与える可能性がある。そこで本研究では、VK 無添加食を給餌しマウスの胆汁酸代謝に及ぼす影響を解析した。

### II. 方法

C57BL/6 マウス (14 週齢, 雌雄) に、AIN-93M 組成の Control 食 (VK1: 0.75 mg/kg 飼料) または VK free 食 (VK 無添加) を 28 日間給餌した。飼育期間中、体重・摂食量の測定を 2 日毎に行った。飼育終了後、6 時間絶食させ、麻酔下で心臓より採血を行い、肝臓・回腸を摘出した。肝臓中の VK 量を蛍光 HPLC 法、胆汁酸量を LC-MS/MS を用いて測定した。また、肝臓および回腸における胆汁酸代謝関連遺伝子の mRNA 発現量を定量 RT-PCR 法で解析した。

### III. 結果と考察

試験期間を通して体重は雌に対して雄で有意に高かったが、餌による変化は見られなかった。VK free 食群の肝臓中 VK1, MK-4 濃度は Control 食群に対して有意に減少した。また雄よりも雌の肝臓中 VK 濃度が高かった。肝臓における胆汁酸合成遺伝子発現量の減少が VK free 食群で見られた。また、給餌食を問わず雄よりも雌で同発現量が高かった。肝臓から胆汁酸を排出する輸送体遺伝子の発現量は、VK free 食により雄では増加、雌では減少した。雌において、VK free 食により肝臓中の二次胆汁酸が変化し、総胆汁酸量も同様の傾向を示した。また、給餌食に関係無く雄に比べて雌の総胆汁酸量が高かった。回腸における胆汁酸輸送遺伝子発現量は性別問わず VK free 食により減少した。これらの結果より、食餌由来 VK は胆汁酸の合成や排出に関わる遺伝子発現を変化させ、肝臓中の胆汁酸量に影響を与える可能性が示唆された。また、その作用には性差があると推察された。

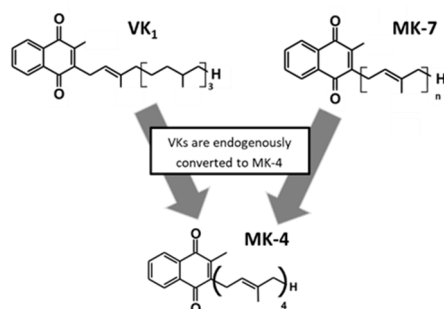


Figure 1. Endogenous synthesis of menaquinone-4 from other vitamin K

## The effect of vitamin K-free diet on bile acid metabolism in mice

MICHIYA NISHIKIDO, YUSUKE OHSAKI, MICHIO KOMAI and HITOSHI SHIRAKAWA

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

There are two types of naturally occurring vitamin K (VK), plant-derived VK1 (phylloquinone) and mainly microbial-derived VK2 (menaquinone: MK-n). Our intestinal microbiota also synthesized menaquinones, and a part of them are absorbed and utilized. Menaquinone-4 (MK-4) works as a ligand of nuclear receptor PXR and can modulate certain gene expression. Previously we reported that orally administered MK-4 modulated mRNA expression of bile acid synthesis in the liver of humanized PXR mice. MK-4 is known to be endogenously converted from dietary VK, thus in order to clarify the relationship between dietary VK and bile acid synthesis we analyzed the effect of the VK-free diet on bile acid metabolism in mice.

C57BL/6 mice were fed either control or VK-free diets for 28 days, then organs were collected after 6 h fasting. Hepatic VK and bile acids concentrations were measured by fluorescence HPLC, and LC-MS/MS, respectively. In addition, the mRNA expression levels of bile acid metabolism-related genes in the liver and ileum were analyzed by quantitative RT-PCR.

Hepatic VK levels were reduced by the VK free diet. In addition, VK concentration in the liver of females was higher than that of males. The mRNA level of bile acid synthesis genes in the liver was decreased by the VK free diet. In females, the VK free diet increased secondary bile acids in the liver, and the total bile acid content also tended to increase. These results suggest that dietary VK could affect bile acid metabolism in mice.

**Keywords :** Vitamin K, Menaquinone-4, Bile acids, PXR, Sex difference

### Reference

1. SULTANA, H., WATANABE, K., RANA, M. M., TAKASHIMA, R., OHASHI, A., KOMAI, M., and SHIRAKAWA, H. : Effects of Vitamin K2 on the Expression of Genes Involved in Bile Acid Synthesis and Glucose Homeostasis in Mice with Humanized PXR, *Nutrients*, **10**, 982, 2018.

## 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、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。カラー印刷は全額自己負担とします。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

gnotobiolosaki@ks.kyorin-u.ac.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 (別途, 実費請求となります)。
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, 2004年追加）, 「臨床研究に関する倫理指針」（平成20年厚生労働省告示第415号）, 「疫学研究に関する倫理指針」（平成19年文部科学省・厚生労働省告示第1号）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. Reproduction in color is available, at the full expense of the author.
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,  $\mu$ m, nm, l, ml,  $\mu$ l, kg, g, mg,  $\mu$ 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 (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 gnotobiosaki@ks.kyorin-u.ac.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.
5. Authors will be charged 5,000 yen/printed page for manuscripts submitted as original articles. Color reproductions are possible at the full expense of the author.

## 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. Color reproductions are possible at the full expense of the author.

## 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 Seoul 2008), the Ethical Guidelines for Clinical Research (2008 Ministry of Health, Labour and Welfare Public Notice 415), and the Ethical Guidelines for Epidemiological Research (2007 Ministry of Education, Culture, Sports, Science, and Technology, and Ministry of Health, Labour and Welfare Public Notice 1). 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

A trial of developing germ-free common marmosets <i>Takashi Inoue et al.</i> .....	25
---	----

### SCIENTIFIC PROCEEDINGS OF THE JAPANESE ASSOCIATION

Neonatal nasal inflammation-induced perturbation of gut microbiota and the brain tissue changes <i>Sanae Hasegawa-ishii et al.</i> .....	30
---	----

Establishment of running-wheel activity test using Germ-free mice <i>Keisuke Kojima et al.</i> .....	32
---	----

A trial of developing germ-free common marmosets <i>Takashi Inoue</i> .....	34
--	----

Tryptamine, a microbial metabolites in fermented rice bran reduced LPS-induced inflammation in murine macrophage <i>Afifah Zahra Agista et al.</i> .....	36
--	----

Therapeutic efficacy of fecal microbiota transplantation for intractable calf diarrhea treatment <i>Jahidul Islam et al.</i> .....	38
--	----

L-fucose utilization by human gut bacteria <i>Ayaka Tamura et al.</i> .....	40
--	----

Research on stress factors affecting characteristics of <i>Lactobacillus</i> <i>Binghui Zhou et al.</i> .....	42
--	----

Biotin deficiency is involved in immune modulation by the intestinal immune system <i>Akira Hosono et al.</i> .....	44
--	----

Effect of biotin ingestion on the expression of genes associated with cognitive ability <i>Kota Shiozawa et al.</i> .....	46
--	----

The effect of vitamin K-free diet on bile acid metabolism in mice <i>Nishikido Michiya et al.</i> .....	48
--	----

### GUIDELINE FOR AUTHORS

Guideline for authors .....	50
-----------------------------	----