

ISSN 2436-7362

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

Vol. 55

No. 1

2025

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. 55, No. 1 Sept. 1 2025

---

### 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@ciem.or.jp

発 行 所 杏林大学医学部予防医学教室

大崎 敬子 (おおさき たかこ)

---

## JOURNAL OF GERMFREE LIFE AND GNOTOBIOLOGY

Vol. 55, No. 1 Sept. 1 2025

### 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@ciem.or.jp

Department of Preventive Medicine  
Kyorin University School of Medicine  
Dr Takako Osaki

# 第58回 日本無菌生物ノートバイオロジー学会総会

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

January 24-25, 2025

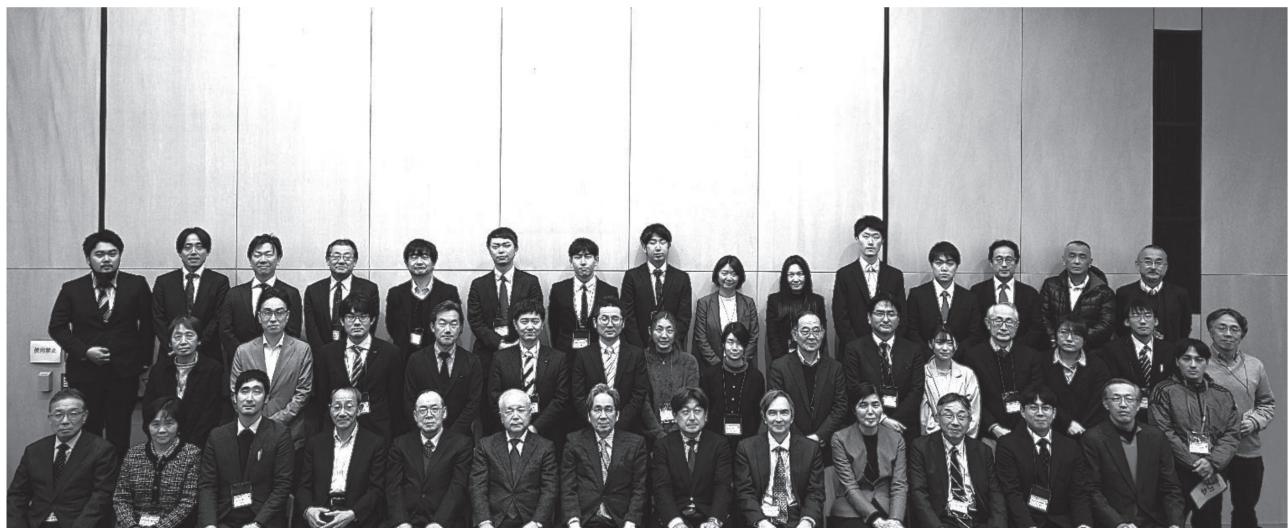
Fujisawa

President *Akira Hosono*

会長 細野朗

会期 2025年（令和7年）1月24日（金）・25日（土）

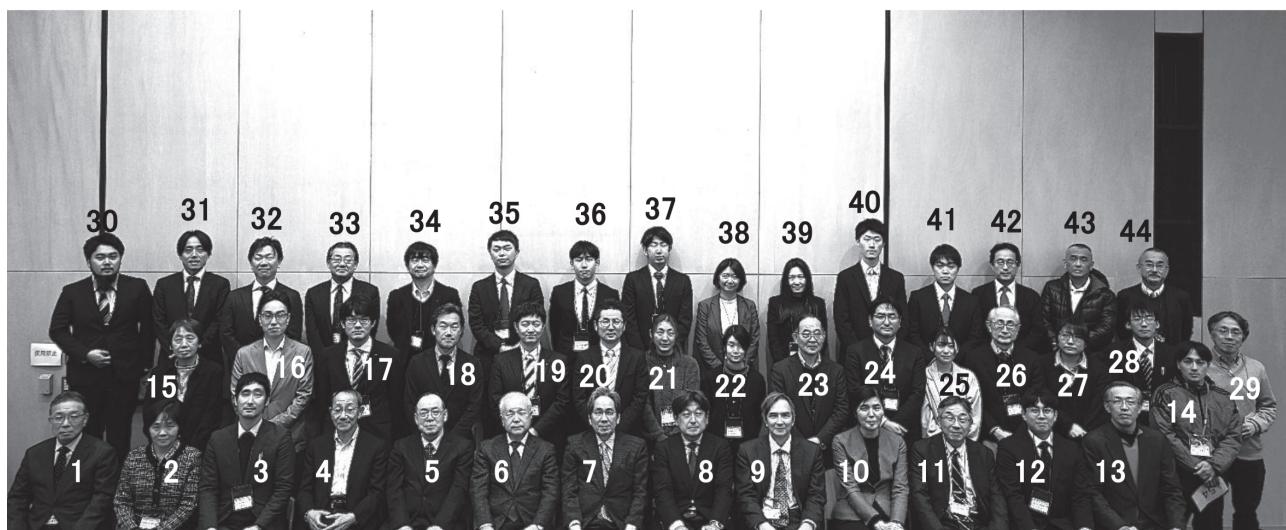
会場 神奈川県藤沢市龜井野 日本大学生物資源科学部



第58回無菌生物ノートバイオロジー学会総会 会長 細野 朗

2025年1月17日 藤沢 日本大学生物資源科学部 211講義室

## 第58回無菌生物ノートバイオロジー学会総会 集合写真名簿 (敬称略)



- |           |            |            |
|-----------|------------|------------|
| 1. 田口 晴彦  | 15. 川村 智子  | 30. 大西 拓人  |
| 2. 足立 はるよ | 16. 今井 健一  | 31. 岡 健太郎  |
| 3. 津田 真人  | 17. 鈴木 祐輝  | 32. 林 篤史   |
| 4. 伊藤 守   | 18. 小倉 智幸  | 33. 高橋 志達  |
| 5. 駒井 三千夫 | 19. 小田巻 俊孝 | 34. 八村 敏志  |
| 6. 加藤 俊一  | 20. 野地 智法  | 35. 有吉 理   |
| 7. 神谷 茂   | 21. 石井 さなえ | 36. 村上 瑠   |
| 8. 細野 朗   | 22. 小牧 すずほ | 37. 丹野 雄大  |
| 9. 戸村 道夫  | 23. 稲葉 守彦  | 38. 田中 まさ子 |
| 10. 大崎 敬子 | 24. 蓬田 雅人  | 39. 富沢 冬喜子 |
| 11. 白川 仁  | 25. 遠藤 佑香  | 40. 今井 龍一  |
| 12. 河本 新平 | 26. 大島 利夫  | 41. 花輪 球太  |
| 13. 平山 和宏 | 27. 富山 香代  | 42. 徳永 健吾  |
| 14. 岡田 開  | 28. 高 升    | 43. 田村 基   |
|           | 29. 長田 和美  | 44. 高橋 利一  |

## 第58回日本無菌生物ノートバイオロジー学会プログラム

## 特別講演

座長 細野 朗

(日本大学)

「腸管内 microbiota・胆汁酸・食物繊維などの腸内容物と腸上皮細胞の動態に関する研究」 ..... 8

駒井 三千夫

(東北大学大学院農学研究科栄養学分野, (株)東北アグリサイエンスイノベーション)

## シンポジウム

「生物の誕生から成長・老化まで微生物が関わる生体応答を紐解く」

座長 野地 智法

(東北大学)

津田 真人

(日本大学)

1. 乳幼児の腸内におけるビフィズス菌の定着メカニズムと免疫学的役割 ..... 10

小田巻 俊孝

(森永乳業株式会社 研究本部 基礎研究)

2. 母乳免疫の機能形成に関する分子・細胞メカニズム ..... 12

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)

3. 加齢に伴う IgA を介した宿主と腸内細菌叢のクロストークの破綻 ..... 14

河本 新平

(大阪大学微生物病研究所)

4. Gut-bone axis —消化管アレルギーモデルを利用した骨代謝の調節に対する腸内細菌の役割の解析 ..... 16

足立 (中嶋) はるよ

(東京大学大学院農学生命科学研究科免疫生体機能研究社会連携講座)

5. 腸内細菌の共生と腸管上皮細胞に対する作用 ..... 18

高橋 恒子

(日本大学生物資源科学部)

## 特 別 セ ミ ナ ー

座長 白 川 仁  
(東北大学)

「生体内イメージングによる免疫応答の可視化」..... 20

戸村 道夫  
(大阪大谷大学・薬学部・免疫学講座)

## テ ク ニ カ ル セ ミ ナ ー

座長 大 崎 雄 介  
(東北大学)

1. 無菌動物とそのヒト腸内菌叢研究への応用..... 22

平山 和弘  
(東京大学大学院農学生命科学研究科獣医公衆衛生学教室／附属食の安全研究センター)

2. 無菌動物飼育技術の整備と新たな実験手法への応用..... 24

小倉 智幸  
(公益財団法人 実中研)

## 一般演題 セッションI

座長 大崎敬子

(杏林大学)

細野朗

(日本大学)

1. 慢性鼻腔炎症に誘発される鼻腔細菌叢・腸内細菌叢のディスバイオーシス ..... 00  
 今井 龍一\*, 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, \*\*杏林大学保健学部臨床検査技術学科, \*\*\*杏林大学医学部感染症学教室)
2. 加齢性腺機能低下症モデルラット精巣のテストステロン産生に対するビタミンK投与の影響の解析 ..... 00  
 上 瑠\*, 伊藤 晉\*, 大崎 雄介\*, 前川 正充\*\*, Afifah Zahra Agista \*, 白川 仁\*  
 (\*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)
3. 血中の腸内細菌反応性 IgG2b 抗体誘導に対する腸内細菌叢の影響 ..... 00  
 岡田 開\*, 津田 真人\*, 平山 和宏\*\*, 細野 朗\*  
 (\*日本大學生物資源科学部, \*\*東京大学大学院農学生命科学研究科獣医公衆衛生学)
4. ビフィズス菌による幼少期のマウスの攻撃行動への影響 ..... 00  
 花輪 球太\*, 渡邊 己弦\*\*, 津川 仁\*\*\*, 三上 克央\*\*  
 (\*東海大学医学部医学研究科先端医科学, \*\*東海大学医学部総合診療系精神科学,  
 \*\*\*東海大学医学部医学科基礎医学系生体防御学)
5. ラットにおけるビタミンK欠乏症の発症に対する性差の解析 ..... 00  
 丹野 雄大\*, 大崎 雄介\*\*, 駒井 三千夫\*\*, 白川 仁\*\*  
 (\*東北大学農学部栄養学研究室, \*\*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 岡 健太郎  
(ミヤリサン製薬)  
津田真人  
(日本大学)

6. ケルセチン代謝分解性ノトバイオートマウスの血漿ケルセチンに及ぼすフラクトオリゴ糖摂取の影響..... 00

田村 基\*, 平山 和宏\*\*

(\*農業・食品産業技術総合研究機構 食品研究部門, \*\*東京大学大学院農学生命科学研究科)

7. 無菌マウス体内における *Helicobacter pylori* の生態と形態について ..... 00

北条 史\*, 大崎 敏子 \*\*

(\*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, \*\*杏林大学医学部感染症学教室)

8. 酪酸菌およびフィターゼ配合飼料添加物の長期給与による肥育豚の飼養成績への影響..... 00

鈴木 祐輝\*, 平田 真樹 \*\*, \*\*\*, \*\*\*\*, 吉田 知加\*, \*\*\*, 有吉 理\*, 岡 健太郎 \*\*, \*\*\*, 高橋 志達\*, \*\*\*, 森松文毅\*\*\*\*, \*\*\*\*\*

(\*ミヤリサン製薬株式会社 研究開発本部, \*\*徳島大学バイオイノベーション研究所, \*\*\*徳島大学動物生産技術共同研究講座, \*\*\*\*徳島大学生物資源産業学部)

# 腸管内 microbiota・胆汁酸・食物纖維などの腸内容物と 腸上皮細胞の動態に関する研究

駒井 三千夫

(東北大学大学院農学研究科栄養学分野, (株)東北アグリサイエンスイノベーション)

1970年代に無菌動物を使って胆汁酸を研究する機会を与えられた。教科書や論文では遊離型（脱抱合型）胆汁酸は、腸管内の microbiota の酵素によってのみ肝臓で合成された抱合型一次胆汁酸が脱抱合して生成する、という記載があった。二次胆汁酸も、やはり一次胆汁酸が腸管内で microbiota の酵素によって生成するという記載であった。後者は間違いない事実だが、我々の無菌マウスを使った研究によって、前者の遊離型胆汁酸のほうは必ずしもそうではないことが分かった。それは、無菌マウスに食物纖維のセルロース食を多めに与えると、腸管内に遊離型胆汁酸が大幅に増えることを確認したためである。当時、教科書とは反するこの結果を公表することが憚られたが、参考になつたのは東海大学の田爪正氣先生の「無菌動物の胆汁中と腸内容物中に遊離型胆汁酸が存在する」という論文であった<sup>1</sup>。当時の最新の GC-MS を使った新しい成果であり、東海大学で開催された無菌生物 GB 学会の折に田爪先生に直接そのデータと分析装置を教えていただく事ができた。その後無事に研究が進められたのも、この学会のお陰と言っても過言ではない。当時は、海外の論文でも無菌動物の盲腸内容物の胆汁酸のうち 4 % が遊離型として検出されたが、実験上の "artifact" である、と記載されていたのである<sup>2</sup>。田爪先生の論文の他にも Koopman, J.P. ら<sup>3</sup>も遊離型胆汁酸が無菌動物の糞便中に検出されることが発表され、当方らも無菌動物に高セルロース食 (15%, 30%) を与えると遊離型胆汁酸が増えて、セルロース30%食では総胆汁酸の 49% にまでになることを報告することができた<sup>4</sup>。肝臓での抱合化が食餌条件によって大きく影響を受けるという新しい知見であった。

これ自体はそれほど大きなインパクトを与えるものではなかったが、同じ条件のマウスに<sup>3</sup>H-チミジン標識物質を腹腔内投与して増殖する細胞核に取り込ませて小腸上皮細胞と結腸上皮細胞の再生を調べてみると、予想外に大きく変わっていたのである。すなわち、腸管内に遊離型胆汁酸が増える条件では、腸上皮細胞の増殖（再生速度）が速まる関係性があるのではないかと推察することができた。要するに、食事の内容によって遊離型胆汁酸が大幅に増えることがわかり、腸内 microbiota のほかに食事の中身が腸上皮細胞の再生系に大きく影響を及ぼしている実態が分かった。

後半では、以下の新しい論文を紹介して、腸内 microbiota・胆汁酸・食事内容が腸上皮組織、ひいては身体全体の健康機能に影響を及ぼしている状況について展望する。

- 「腸内 microbiota- 胆汁酸シグナル軸」が腸上皮組織の恒常性を修飾する。
- 胆汁酸と腸上皮細胞のバリアー機能不全、ならびに腸疾患発症との関連性に着目する必要がある。  
⇒ Irritable bowel disease などの疾患が、胆汁酸・microbiota・腸上皮細胞の再生や健全性と関連。
- 胆汁酸が苦味レセプター TAS2Rs (T2Rs) のリガンドとなる研究 (ヒト・マウス. 2018~).  
⇒ TAS2Rs シグナルを介して incretin を分泌するなど、インスリン分泌を介した糖代謝改善の効果を発揮する。
- ダイオキシンレセプター (AHR) は、内因的には腸管内等のバリアーにおいてトリプトファン代謝物等のリガンドとなっていることが判明した (2003~2016年). AHR は、抗炎症メカニズムに関与している。

## Importance of intestinal microbiota, bile acid, and dietary fibers on the intestinal cell renewal

MICHIO KOMAI

*Graduate School of Agricultural Science, Tohoku University & Tohoku Agriscience Innovation, Co. Ltd., Sendai*

It had been generally accepted that small amount of unconjugated bile acid were found in intestinal contents and bile of germfree mice<sup>1, 2, 3</sup> which were reared with laboratory chow diet. Our results also showed that unconjugated bile acid was detected in the feces of germfree mice with lower levels under fiber-free diet, and this was increased in proportion to cellulose content<sup>4</sup> (Komai, M., et al.: 1987). Fecal total bile acid excretion and the percentage of its unconjugated form increased dramatically according to dietary cellulose contents in germfree mice. Moreover, we observed the paralleled relationship between the percentage of unconjugated bile acid and the intestinal epithelial cell renewal rate, which led us to consider that the increased unconjugated bile acid may relate to accelerated intestinal cell renewal.

The following papers<sup>5-12</sup> and research field must be recommended to achieve further advances in this research.

### References

1. 田爪生氣. 腸内常在菌叢の胆汁酸代謝における役割—無菌および通常マウスにおける胆汁酸の比較研究. 慶應医学. 1979; **56**(2): 103-16.
2. Madsen D, Beaver M, Chang L, Bruckner-Kardoss E, Wostmann B. Analysis of bile acids in conventional and germ-free rats. *J Lipid Res.* 1976; **17**(2): 107-11.
3. Koopman JP, Welling GW, Huybregts AW, Mullink JW, Prins RA. Association of germ-free mice with intestinal microflora. *Z Versuchstierkd.* 1981; **23**(3): 145-54.
4. Komai, M & Kimura, S: Effect of dietary fiber on fecal steroid profiles in germfree and conventional mice. *Nutr. Rep. Int.*, 1987; **36**: 365-75.
5. Li T, Ding N, Guo H, Hua R, Lin Z, Tian H, Yu Y, Fan D, Yuan Z, Gonzalez FJ, Wu Y. A gut microbiota-bile acid axis promotes intestinal homeostasis upon aspirin-mediated damage. *Cell Host Microbe.* 2024; **32**(2): 191-208. e9.
6. Sorrentino G, Perino A, Yildiz E, El Alam G, Bou Sleiman M, Gioiello A, Pellicciari R, Schoonjans K. Bile acids signal via TGR5 to activate intestinal stem cells and epithelial regeneration. *Gastroenterology.* 2020; **159**(3): 956-68. e8.
7. Shi L, Jin L, Huang W. Bile acids, intestinal barrier dysfunction, and related diseases. *Cells.* 2023; **12**(14): 1888.
8. Wang D, Li P, Odle J, Lin X, Zhao J, Xiao K, Liu Y. Modulation of intestinal stem cell homeostasis by nutrients: a novel therapeutic option for intestinal diseases. *Nutr Res Rev.* 2022; **35**(1): 150-8.
9. Kok BP, Galmozzi A, Littlejohn NK, Albert V, Godio C, Kim W, Kim SM, Bland JS, Grayson N, Fang M, Meyerhof W, Siuzdak G, Srinivasan S, Behrens M, Saez E. Intestinal bitter taste receptor activation alters hormone secretion and imparts metabolic benefits. *Mol Metab.* 2018; **16**: 76-87.
10. Ziegler F, Steuer A, Di Pizio A, Behrens M. Physiological activation of human and mouse bitter taste receptors by bile acids. *Commun Biol.* 2023; **6**(1): 612.
11. Wisniewski PJ, Nagarkatti M, Nagarkatti PS. Regulation of intestinal stem cell stemness by the aryl hydrocarbon receptor and its ligands. *Front Immunol.* 2021; **12**: 638725.
12. Zhou X, Chakraborty D, Murray IA, Coslo D, Kehs Z, Vijay A, Ton C, Desai D, Amin SG, Patterson AD, Perdew GH. Aryl hydrocarbon receptor activation coordinates mouse small intestinal epithelial cell programming. *Lab Invest.* 2023; **103**(2): 100012.

## 乳幼児の腸内におけるビフィズス菌の定着メカニズムと免疫学的役割

小田巻 俊孝

(森永乳業株式会社 研究本部 基礎研究)

ヒトの腸内細菌叢は加齢に伴い大きく変化するが、生後1週間ほどで *Bifidobacterium* 属細菌、いわゆるビフィズス菌が最優勢になることが知られている。現在、ビフィズス菌は100菌種以上が発見・分類されているが、ヒト腸内に生息している菌種は10種ほどに限られる。類人猿の腸内細菌叢を解析した研究によると、ビフィズス菌のグループは宿主を変えずに進化を遂げてきたことが明らかになっており、現在ヒト腸内に生息しているビフィズス菌 (Human Residential Bifidobacteria, HRB) は、少なくとも1500万年にわたりヒトと共に進化してきたと考えられている。

我々の研究により、HRBの特徴を調査する中で、乳幼児にビフィズス菌が多い主な理由がヒトの母乳に含まれるヒトミルクオリゴ糖 (HMO) の資化能の高さとリゾチーム耐性にあることを明らかにした。特にHMO資化性の差異は、ビフィズス菌の菌種間における先住効果に大きな影響を与えることも示された。

乳児腸内に生息するビフィズス菌は、母親の産道を通る際に伝播するとされており、我々も新生児の口腔

内から検出されたビフィズス菌が、1か月後の乳児糞便から検出されることを確認した。さらに、母子間に限らず家族間でも同一のビフィズス菌株を腸内に保有していることが明らかとなり、その原因の一つが幼い子供たちとの入浴習慣にあるのではないかという仮説を裏付けるデータも取得した。

HRBは、インドール-3-乳酸 (ILA) などの芳香族乳酸を産生することで乳児の正常な免疫発達に重要な役割を果たしていることが近年の研究から明らかになっている。さらに、我々の研究では、腸内のビフィズス菌占有率によってビフィズス菌や乳酸菌の刺激を受けた際の末梢血単核細胞由来樹状細胞のサイトカイン産生能が異なることも示されており、何故ヒトが母乳という選択圧を与えることで乳幼児の腸内をビフィズス菌最優勢に保っているのか、その理由がより明確になってきていると考えられる。

講演では乳幼児に留まらず、ビフィズス菌を摂取する意義もこれらのメカニズムを踏まえながら考察してみたい。

## Evolutionary insights and immunological roles of bifidobacteria in infant gut colonization

TOSHITAKA ODAMAKI

*Innovative Research Institute, R&D Division, Morinaga Milk Industry Co. Ltd., Kanagawa*

The human gut microbiota undergoes profound changes with age, with *Bifidobacterium* species becoming predominant within the first month of life. Although over 100 species of *Bifidobacterium* have been identified, only about 10 species colonize the human gut. Research indicates that these species have co-evolved with hominids for 15 million years.

Our investigation reveals that the predominance of *Bifidobacterium* in infants is primarily attributable to their superior capacity to metabolize human milk oligosaccharides (HMO) and their resistance to lysozyme. These attributes significantly influence their colonization efficacy, particularly through the priority effect. *Bifidobacterium* is supposed to be transmitted to infants during birth from mother. However, identical strains are also found among family members, potentially due to shared practices such as communal bathing.

Human Residential Bifidobacteria (HRB) play a pivotal role in the immunological development of infants by producing aromatic lactic acids, notably indole-3-lactic acid (ILA). Our research demonstrates that the proportion of *Bifidobacterium* in the gut modulates cytokine production by dendritic cells derived from peripheral blood mononuclear cells upon stimulation by these bacteria. This finding elucidates the evolutionary advantage conferred by human breast milk in promoting *Bifidobacterium* dominance in the infant gut.

This presentation will further explore the broader implications of *Bifidobacterium* consumption beyond infancy, considering these underlying mechanisms.

## 母乳免疫の機能形成に関する分子・細胞メカニズム

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)

哺育を介した母子免疫移行は、免疫機能が未熟な子が母の免疫を受動する上で非常に重要である。我々は、哺育の質向上による幼若動物の健全育成を目指した研究を行っており、特に母乳中に含まれる免疫グロブリン（抗体）の産生機序解明とその強化を目指している。組織学の教科書には、乳腺は表皮が皮下組織の中に落ち込み発達した皮膚腺として定義されており、その中に免疫学的な記載を見出すことは容易ではない。これは、哺育を介した母子免疫移行が乳腺単独で行われていないことを意味するものであり、事実、母乳抗体を分泌する形質細胞（B細胞から分化した細胞）は、乳腺に由来するものではない。また、授乳期以外の乳腺には、そのような形質細胞は存在していない。つまり、母乳抗体を産生する形質細胞は、乳腺以外の臓器より移動してくると考えられているが、そのメカニズムは長らく解明されていなかった。

哺育を介した母子移行抗体の質的量的向上を目的とした免疫強化技術を開発することは、哺乳動物を健全に繁殖・維持する上で、非常に重要である。我々は、

この乳腺免疫（特に母乳中の抗体産生）が、乳腺から遠く離れたパイエル板（腸管の免疫臓器）で促されていることを明らかにしてきた。また、その際に母体の腸管内に常在する特定の微生物（例：*Bacteroides acidifaciens*, *Prevotella buccalis*）の存在が重要であることを突き止めてきた。加えて、一部の形質細胞は離乳後においても乳腺にお留まり続けることも明らかにしてきた。これは、近年、腸管をはじめとする粘膜組織で存在が確認され、組織の恒常性維持に寄与するとされている長命型形質細胞であると推測された。乳腺で確認された長命型形質細胞も、長期的な乳腺組織の恒常性の維持や、次の乳期における IgA 産生に関わっていることが予想されたことから、授乳期と離乳期の乳腺をシングルセル解析に供した。それにより、授乳期に大半を占めると予想される短命型形質細胞と、離乳期に存在する長命型形質細胞の遺伝子発現を比較することで、短命型と長命型の形質細胞のそれぞれが持つ機能とその生存戦略に関する情報を得たので紹介する。

## Molecular and cellular mechanisms involved in the development of immune function in breast milk

TOMONORI NOCHI

*Tohoku University Graduate School of Agricultural Science, Sendai*

The development of immune-enhancing strategies aimed at improving the quality and quantity of antibodies transferred from mother to offspring via nursing is critical for the healthy reproduction and maintenance of mammals. We have shown that the mammary gland immunity (especially antibody production in breast milk) is promoted in the Peyer's patches (immune organs of the intestinal tract). We have also found that the presence of certain microorganisms indigenous to the maternal intestinal tract is important in this process. In addition, we have demonstrated that a few plasma cells remain in the mammary glands even after weaning. These plasma cells are thought to be long-lived plasma cells that have recently been identified in mucosal tissues and are thought to contribute to tissue homeostasis. Since the long-lived plasma cells identified in the mammary glands were also expected to be involved in long-term homeostasis of mammary tissues and in IgA production in the following lactation, in this study the mammary glands of lactation and weaning were subjected to single-cell analysis. By comparing gene expressions of short-lived plasma cells, which are expected to comprise the majority of lactation, and long-lived plasma cells, which are present during weaning, we could construct respective gene profiles to understand the function and survival strategies of short-lived and long-lived plasma cells in the mammary glands.

## 加齢に伴う IgA を介した宿主と 腸内細菌叢のクロストークの破綻

河本 新平<sup>\*, \*\*</sup>

(\*大阪大学微生物病研究所, \*\*東北大学加齢医学研究所)

老化は普遍的かつ進行性の現象であり、様々な組織や器官の機能を低下させ、疾患発症のリスクを高める。そこで、健康寿命の延伸を達成するため、老化のメカニズムの解明と、その制御方法の解明を目的とした老化研究が現在盛んに行われている。近年、老化に関連する2つの現象、すなわち細胞老化をおこした細胞（老化細胞）の蓄積と腸内細菌叢の組成の変化が、老化の進行に重要な役割を果たすことが示されている。しかし、これらの現象の関連性や生体機能に与える影響に関しては未だに不明な点が多い。

我々は、以前、特定の腸内細菌が細胞老化を誘導することで、肝がんや大腸がんの進展を促進する機能を有することを報告してきた。そこで、腸内細菌が加齢に伴う老化細胞の蓄積に与える影響を検討した。specific pathogen free (SPF) または無菌環境下で維持された  $p16^{INK4a}$  レポーター マウスを用いた *in vivo* イメージングを行い、加齢に伴い腸内細菌依存的に回腸に老化細胞が蓄積することを見出した。さらに、単細胞 RNA 発現解析と我々が新たに確立した  $p16^{INK4a}$  の免疫染色法により、回腸の胚中心 (GC) B 細胞に細胞老化

が誘導されることを明らかにした。GC B 細胞は、腸内細菌を標的とする免疫グロブリン A (IgA) の産生に重要である。そこで、同じ個体のマウスの加齢過程における IgA 産生と腸内細菌叢の変化を検討したところ、加齢に伴って IgA 産生量が減少し、腸内細菌叢の組成も有意に変化することが明らかとなった。さらに、野生型マウスと、細胞老化誘導因子である  $p16^{INK4a}$  と  $p21^{Waf1/Cip1}$  の両遺伝子を欠損することで細胞老化をおこしにくくしたマウス ( $p16/p21$ -DKO) の比較解析から、B 細胞老化が IgA の産生と多様性を低下させ、老齢マウスの腸内細菌叢の組成変化の一因となっていることを明らかにした。興味深いことに、加齢に伴って増加するグラム陰性菌 (*Bacteroides acidifaciens*) は B 細胞の増殖を促進し細胞老化を誘導する活性を持つ一方、加齢に伴って減少するグラム陽性菌 (*Lactobacillus reuteri*) にはそのような活性はもたなかった。以上の結果から、腸内細菌が細胞老化の誘導を引き起こすストレスとして働くことで、宿主免疫系の機能低下を引き起こし、加齢に伴う腸管の恒常性破綻の一因となることが明らかとなった。

## Age-related disruption of the crosstalk between host and gut microbiota through IgA

SHIMPEI KAWAMOTO \* . \*\*

\* Research Institute for Microbial Diseases, The University of Osaka, Osaka

\*\* Institute of Development, Aging and Cancer, Tohoku University, Sendai

The elucidation of the mechanisms of ageing and the identification of methods to control it have been long anticipated. Recently, two factors associated with ageing, the accumulation of senescent cells and the change in the composition of gut microbiota, have been shown to play key roles in ageing. However, little is known about how these phenomena occur and are related during ageing. Here, we found that senescent cells are accumulated in the ileum during ageing in a bacteria-dependent manner by *in vivo* imaging with *p16<sup>INK4a</sup>*-reporter (*p16-luc*) mice maintained under specific pathogen-free (SPF) or germ-free environments through ageing. Furthermore, the single-cell RNA sequencing analysis and our newly established *p16<sup>INK4a</sup>* immunostaining method revealed that cellular senescence is induced in germinal centre (GC) B cells in the ileum during ageing. As GC B cells are critical for the production of Immunoglobulin A (IgA) targeting gut bacteria, we next analyzed age-related changes in IgA production and gut microbiota with follow-up analysis of the same individual mice. We found that IgA production decreased, and the composition of gut microbiota also significantly changed with ageing. Importantly, comparative analysis of wild-type mice and mice lacking both *p16<sup>INK4a</sup>* and *p21<sup>Waf1/Cip1</sup>* genes, which are less prone to cellular senescence, revealed that B-cell senescence reduces the production and diversity of IgA, thereby changing the composition of gut microbiota in aged mice. Interestingly, it has been shown that Gram-negative bacteria increasing with ageing have the potential to promote B-cell proliferation and induce cellular senescence, whereas Gram-positive bacteria decreasing with aging do not have such a function. These results reveal the existence of IgA-mediated crosstalk between the gut microbiota and cellular senescence and thus extend our understanding of the mechanism of gut microbiota changes with age, opening up possibilities for their control.

# Gut-bone axis—消化管アレルギーモデルを利用した骨代謝の調節に対する腸内細菌の役割の解析

足立（中嶋） はるよ

（東京大学大学院農学生命科学研究科免疫生体機能研究社会連携講座）

近年、腸管は脳腸相関といった他臓器と関係し合って我々の健康維持に積極的に関わることが明らかにされており、その情報伝達に果たす腸内細菌叢の役割が注目されている。我々は、食品中のタンパク質が免疫応答に影響を及ぼす食物アレルギーに注目し、その発症機構の解明を目指して消化管アレルギーモデルマウス（OVA23-3マウス）を開発し、その研究過程でこのモデルマウスが骨量減少を併発することを発見した。腸炎は、通常の餌のタンパク質画分が全て卵白からなる餌（卵白食）を自由摂取させることにより発症し、炎症期を経て、制御性T細胞の誘導とともに寛解に至るが、骨量減少は継続する。これは近交系マウスであるBALB/cマウスでも再現しており、OVA23-3マウスに特殊な状態ではなく、Th2型の過剰な炎症により起こることも明らかにした。興味深いことにこの骨量減少は、腸炎の発症に必須の働きをする腸間膜リンパ節を切除すると軽減することから、腸管における炎症を起こす免疫応答が骨量減少の発症機構（骨代謝）と関係することが示唆された。これまでの研究により、IL-4依存的に腸炎が起きる炎症期では、腸管免疫系で活性化T細胞が産生するIL-4が起点となって、骨量減少と連携をすることを証明した。一方寛解期においてもIL-10産生細胞が両者の応答をつなぐ可能性がある。し

かし、寛解期に継続する骨量減少の要因はIL-4依存的な過剰な炎症によるものではなかったこと、Conventional環境とSPF環境で炎症は起きても応答の程度がかなり異なり、さらにSPF環境を維持していても炎症にかなりの個体差があった。そこで我々は環境要因として腸内細菌に注目し、腸管の免疫応答+骨量減少の連携に腸内細菌がどのように関わるか検討を始めている。腸内細菌の関与に関しては、抗生素をOVA23-3マウスに投与する方法に加え、日本大学で維持されている無菌のOVA23-3マウスを用い、両者を比較しながら進めている。これまでの解析で抗原特異的に発症する腸炎と骨代謝に対して、腸内細菌が特異的応答の制御と、非特異的な制御の両面から影響を及ぼす結果を得ている。消化管アレルギーは食品に対する腸管の免疫応答が深刻化し発症する疾患である。そこでその過剰応答に免疫細胞を生み出す必須の器官である骨髄が関わり、その骨髄においての反応が骨量に影響する可能性は十分想定され、それは炎症でなくとも起きていると思われる。骨と腸管の連携は我々の健康維持に必須の役割を果たすと考えられ、近年、研究報告も増え始めている。しかしこの連携の解明にはまだ乗り越えるべき課題が山積している。

## **Gut-bone axis - investigation of the role of microbiota in the regulation of bone metabolism using a gastrointestinal allergy model**

HARUYO NAKAJIMA-ADACHI

*Department of Immunobiology and Biofunctional Research, Agricultural and Life Sciences/  
The University of Tokyo, Tokyo*

Recent attention for a role of intestinal microbiota has been received in the link between the intestine and other organs, for example the brain-gut axis. Food allergy is a disease in which a food protein affects the intestinal immune system and causes severe inflammatory responses. To investigate a detailed mechanism, we established a mouse model of gastrointestinal allergy, OVA23-3. When fed a diet containing egg white (EW), OVA23-3 mice develop severe enteropathy associated with bone loss. Mesenteric lymph nodes (MLN) play a pivotal role in the development of the enteropathy and subsequent tolerance acquisition (desensitization), and it is worthy to describe that the bone loss reduces by resection of MLN from OVA23-3 mice, suggesting a potential link via immune responses between enteropathy and bone loss. Both immune responses are associated with IL-4, mainly produced by activated T cells during the inflammatory phase, and IL-10-producing cells from MLN, which reduce osteoclast differentiation during the tolerant phase. However, the mice recover from intestinal inflammation, but bone loss persists during the desensitization period. Given the complex situation in the BM, especially during the desensitization phase, we are investigating roles of microbiota as an environmental factor in the linkage by using antibiotic-treated or germ-free OVA23-3 mice. The intestinal microbiota may influence the immune responses of both tissues in an antigen-specific or a non-specific manner. Our study could contribute to maintaining our health, but there are still obstacles to overcome before we can achieve our goal of clarifying the link between enteropathy and bone loss.

## 腸内細菌の共生と腸管上皮細胞に対する作用

高橋 恭子

(日本大学生物資源科学部)

腸管には、莫大な数の腸内細菌が共生している。近年、これらの腸内細菌が宿主の生理機能に多大な影響を及ぼすことが急速に明らかにされてきた。本演題では、腸内細菌とその代謝産物の腸管上皮細胞に対する作用に焦点を当てる。

### I. 腸内細菌の共生と宿主遺伝子のエピジェネティックな制御

腸管の管腔と体内は一層の上皮細胞で隔てられ、これらの腸管上皮細胞は、管腔に存在する腸内細菌からの刺激を常に最前線で受け取っている。腸内細菌は免疫学的に非自己であるにもかかわらず、免疫系により排除されてしまうことなく共生している。腸管上皮細胞は、腸内細菌に対する過剰な炎症反応を抑制し共生を成立させるための幾重にも張りめぐらされた機構を備えており、特定の菌体認識受容体の低発現がその1つの機構として寄与すると考えられている。まず、大腸の上皮細胞では TLR4遺伝子の発現が腸内細菌依存的にDNAメチル化を介して制御されることが示された。さらに、TLR4遺伝子へDNAメチル化酵素DNMT3をリクルートする因子としてRBM14を同定した。腸内細菌が大腸上皮細胞における本因子の発現を誘導することが明らかになり、腸内細菌が上皮細胞に作用し自身が共生できる環境を整えている側面が示された。

### II. 腸内細菌由来GABAの脳腸相関における役割

腸内細菌の代謝産物が宿主に対して多彩な作用を示

すことが知られている。ここでは、脳腸相関の観点から、哺乳類における主要な抑制性神経伝達物質として機能する $\gamma$ -アミノ酪酸(GABA)を取り上げる。まず、マウスへの抗生物質の投与により腸内細菌叢の構成を変化させたとき、特定の抗生物質の投与により腸管内GABA濃度が上昇した。腸内細菌叢の構成と腸管内GABA濃度に相関が認められたことから、プロバイオティクスによる腸内細菌叢への介入試験を行った。その結果、*Bifidobacterium bifidum* TMC3115 (TMC3115)の投与により腸管内GABA濃度の有意な上昇が認められた。TMC3115投与群では、対照群と比べ不安様行動が低減した。TMC3115投与群において血中GABA濃度の上昇は観察されず、腸管上皮にGABA受容体の発現が認められた。さらに、ヒト腸管上皮細胞株およびマウス腸管オルガノイドをGABAで刺激することにより、細胞内シグナル伝達が惹起された。TMC3115投与マウスの大腸上皮細胞においても、同様のシグナル伝達が検出された。これらの結果より、腸内細菌が產生するGABAが大腸上皮を介して作用する機構が示唆された。

IおよびIIはいずれも、腸内細菌の大部分が生息する大腸において、腸内細菌およびその代謝産物の腸管上皮細胞を介する作用が宿主生理機能の調節において重要な役割を果たすことを示すものである。

会員外共同研究者:池上美音\*, 山下未夢\*, 榎林ひかり\*, 高麗千晴\*, 中西祐輔\*, 原田岳\*\*, 依田一豊\*\*, 宮澤賢司\*\*

\* 日本大学生物資源科学部

\*\*タカナシ乳業株式会社

## Symbiosis of gut microbiota and its effects on intestinal epithelial cells

KYOKO TAKAHASHI

*College of Bioresource Sciences, Nihon University, Kanagawa*

This presentation focuses on the action of gut microbiota and their metabolites on intestinal epithelial cells (IECs).

### Epigenetic regulation of host genes for establishment of symbiosis

IECs are continuously exposed to commensal bacteria and equipped with multiple mechanisms, including low expression of specific bacterial recognition receptors, to suppress excessive inflammatory reactions to gut microbiota. TLR4 gene expression was regulated via DNA methylation by gut microbiota in colonic epithelial cells. RBM14 was identified as a factor that recruited the DNA methyltransferase DNMT3 to the TLR4 gene. Gut microbiota induced the expression of this factor in colonic epithelial cells, indicating that gut microbiota acts on IECs to establish the symbiosis by themselves.

### Role of gut microbiota-derived GABA in the gut-brain axis

Metabolites of gut microbiota exert diverse effects on the host. We focus on  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) from the perspective of the gut-brain axis. Intestinal GABA was increased by a specific antibiotic treatment in mice, indicating a correlation between the gut microbiota composition and intestinal GABA concentrations. Administration of *Bifidobacterium bifidum* TMC3115 (TMC3115) significantly increased intestinal GABA and reduced anxiety-like behavior without increasing serum GABA levels. IECs were found to express GABA receptors and elicit intracellular signaling upon GABA stimulation. The intracellular signals were detected in colonic epithelial cells of TMC3115-treated mice, suggesting a mechanism by which GABA derived from gut microbiota acts via the colonic epithelium.

Both results demonstrate that the actions of gut microbiota and their metabolites through IECs in the colon, where the majority of gut microbiota resides, play an important role in the regulation of host physiology.

Non-member collaborators: MION IKEGAMI\*, MIYU YAMASHITA\*, HIKARI NARABAYASHI\*, CHIHARU KOMA\*, YUSUKE NAKANISHI\*, GAKU HARATA\*\*, KAZUTOYO YODA\*\*, KENJI MIYAZAWA\*\*

\* College of Bioresource Sciences, Nihon University

\*\*Takanashi Milk Products Co., Ltd

## 生体内イメージングによる免疫応答の可視化

戸村 道夫  
(大阪大谷大学・薬学部・免疫学講座)

私達は、テキストのイラストに描かれた細胞同士の相互作用を見て、生体内で起こっている生理現象をイメージしてきた。しかし、現実の生体内では、沢山の種類の免疫細胞が、組織内、臓器間を移動して働いている。組織内では免疫応答の場を形成する間質系の細胞、あるいは神経系とも相互作用している。そして、これらを健常時から病態時において変化させることで生体恒常性を維持している。

Seeing is Believing、「百聞は一見にしかず」。蛍光タンパク質そして生体内2光子レーザー顕微鏡観察技術の発達により、生体内での細胞の動態、相互作用に加え機能発現の可視化が実現している。生体内2光子レーザー顕微鏡観察は一般的に数 $100\mu\text{m}$ 立方の中で起こる生命現象を直接観察し、生きている体の中で起こっ

ている生物現象を目で見て理解できる。それに対し、近年開発が進んだ組織透明化法は、固定化された組織ではあるが mm オーダーを超え、ヒト検体やマウスなどの個体レベルでの蛍光イメージングによる単細胞レベルの3D 可視化観察を可能にした。また、我々は、紫色の光照射で緑から赤色に変換する光蛍光タンパク質 Kaede/KikGR を発現するマウスを用い、生きたマウスでの *in situ* 光ラベリング系を確立し、全身レベルで定常時および病態時における臓器間の免疫細胞動態の解明を可能にした。

本講演では、免疫応答の開始から病態まで、上記の可視化技術によって得られた映像をお見せしながら、生体防御機構を担っている個々の細胞のダイナミックな働きを紹介します。

## Visualization of immune responses by *in vivo* imaging

MICHIO TOMURA

*Laboratory of Immunology, Faculty of Pharmacy, Osaka Ohtani University, Osaka*

We have always imagined physiological phenomena by looking at the cell-cell interactions depicted in the illustrations in the text. However, in the real living organism, many types of immune cells move within tissues and between organs. They also interact with cells of the stromal cells and with the nervous system. The homeostasis is maintained by changing these systems from the normal state to the pathological state.

Seeing is believing. The development of fluorescent proteins and *in vivo* two-photon laser microscopy has made it possible to visualize cellular dynamics, interactions, and expression of functions *in vivo*. *In vivo* two-photon laser microscopy generally allows direct observation of biological phenomena occurring within a few hundred micrometer cubic space and visualization of biological phenomena occurring in a living body. In contrast, the tissue transparency method, which has been developed in recent years, enables 3D visualization observation at the single-cell level by fluorescence imaging at the individual level of human specimens and mice, exceeding several mm scale, although the tissue is fixed. We have established an *in situ* photolabeling system in living mice expressing the photoconvertible fluorescent protein Kaede/KikGR, which changes its color from green to red upon exposure to violet light, allowing us to elucidate the immune cell dynamics among organs at the whole body level.

I will show videos obtained by the above visualization technique from the initiation of immune response to the pathological state, and introduce the dynamic functions of individual cells that are responsible for the biological defense mechanisms.

## 無菌動物とそのヒト腸内菌叢研究への応用

平山 和宏

(東京大学大学院農学生命科学研究科獣医公衆衛生学教室／附属食の安全研究センター)

腸内細菌は宿主の健康や疾病に多大な影響を与えている。しかし、腸内細菌は数が膨大であり、菌種も極めて多彩であることから、その働きや健康や疾病における役割を研究することは困難であることが多い。腸内細菌が宿主に与える影響を研究する方法の一つとして、腸内細菌を持つ動物と持たない動物との比較がある。腸内細菌を持たない動物は非吸収性の抗菌性物質を経口投与して腸内を除菌することによって得ることができる。しかし、腸内細菌がいない状態を保つためには抗菌性物質を投与し続けることが必須であり、投与を続けていても耐性菌や真菌などの再定着がしばしば見られるため、長期の研究には向かない。また、抗菌性物質そのものが実験成績に影響を与える可能性も否定できない。

より確実に腸内細菌がない動物を手に入れることができるのが、無菌動物の利用である。無菌動物とは微生物や寄生虫が一切検出されない動物であり、無菌アイソレータ内で外界と完全に隔離して飼育する限り、長期間にわたって無菌状態を保つことができる。繁殖も正常に行うことができる。これまでに、生理学、栄養学、感染症研究など様々な分野の研究に利用されており、例えば、ビタミン類の生成などの宿主に有益な効果や発がん物質の活性化や二次胆汁酸の生成など生体に有害な作用の解明に利用してきた。最近では免疫学の分野での応用が目立つが、肥満やメタボリックシンドロームの研究にも利用されるようになっている。

抗菌性物質を投与していないので、1あるいは複数株の既知の細菌のみを定着させたノットバイオート動物を作ることもできる。定着させた菌株の代謝活性や宿主の疾患や異常における役割などを研究するモデルとして有用である。複数の菌株を定着させたモデルでは、菌株間の相互作用を観察することも可能となる。また、正常な腸内菌叢は一般に「Colonization Resistance」とも呼ばれる感染防御効果を持っているが、無菌動物はこれを欠くため、通常の動物では感染や発症が起こらない病原菌でも、容易に感染が成立する。通常は腸内で低い菌数に抑制されている菌が過剰に増殖して感染を引き起こす例も知られている。抗菌性物質を投与しないので、薬剤耐性を持たない細菌についても感染実験を行うことができる。

さらに、ヒトの糞便懸濁液を無菌マウスに経口投与することにより、ヒト由来の腸内菌叢を持ったマウスを作ることもできる。腸内菌叢の構成や代謝活性をマウス腸内に全て再現できるとは限らないが、発癌物質や毒性物質などが生体におよぼす影響におけるヒトの腸内菌叢の役割や病原体に対するヒト腸内菌叢が持つ拮抗作用など、ヒトを用いては行うことができない研究を *in vivo* で行うことができるという点においてヒト腸内菌叢移植マウスは有用である。ヒトでは困難な腸管各部位の採材も可能である。

本セミナーではこのような無菌動物の応用例を紹介する。

## Germfree animals as a model for studying the role of intestinal microbiota

KAZUHIRO HIRAYAMA

*Department of Veterinary Public Health/Research Center for Food Safety, Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo, Tokyo*

It has been well established that intestinal microbiota plays an important role in health and disease of the host. However, it is often difficult to study the role of microbiota because of its huge population and the wide variety of component bacterial species.

Comparison between animals with and without intestinal microbiota would be a measure to study the role of microbiota. By dosing antibiotics, the animals without intestinal microbiota can be prepared, but it is necessary to keep dosing the antibiotics to keep the microbiota suppressed. Resistant microorganisms can colonize even under the administration of the antibiotics, so the experiments are often limited to be short term. The influence of antibiotics should also be considered.

Germfree animals can be one of the powerful alternatives to study the roles of intestinal microbiota. It is possible to run long term experiments as far as keeping the animals isolated in the isolator from outside world. It is not necessary to give antibiotics. Germfree animals can also be applied to produce gnotobiotic animals, ex-germfree animals colonized with one or several bacterial strains, to study the role of specific bacteria *in vivo*. Germfree animals are even a good receptor of microbiota of different animal origin.

In this seminar, I will introduce some examples of how the germfree animals can be applied to the biomedical studies.

## 無菌動物飼育技術の整備と新たな実験手法への応用

小倉 智幸, 何 裕遙, 野津 量子, 富山 香代, 高橋 利一  
(公益財団法人 実中研)

日本における無菌マウスの歴史は、1965年に慶應大学医学部の佐々木正五先生がアメリカから輸入した繁殖ペアを実中研が引き継いで行ったのが始まりで、その後2年間で生産体制が整えられ、1967年より供給が開始された。同時に実中研は、国産のビニールアイソレータ飼育装置（以下、VI）、滅菌缶および周辺器材の開発も進め、供給を継続している。これら開発過程で確立した無菌・ノートバイオートマウスの飼育技術は、我が国における技術の根幹となっている。

そこから60年余りが経過した近年、注目を浴びているマイクロバイオーム関連研究には隔離飼育が可能であるVIの使用が必要不可欠であり、動物資源技術センター無菌動物開発室では、その飼育環境と実験環境の開発改良に取り組んで来た。本セミナーでは実中研における、1) 無菌マウス飼育に必要な器材の紹介、2) VIおよび円盤フィルターの組立てと滅菌、3) VIの基本操作と飼育器材の搬出入、4) VI内への動物の搬出入と日常の飼育ならびに無菌検査、5) VI内における

実験処置（体重測定、投与、材料採取、麻酔法など）について紹介する。

また、新たな実験手法として、ヒトの免疫系と腸内細菌叢の相互作用を評価するために、ヒト免疫細胞と腸内細菌叢を同時に再構築したデュアルヒト化モデルマウスについて紹介する<sup>1</sup>。本モデルマウスは、重度免疫不全 NOG マウスを無菌化し、クリーンベンチ下でヒトの造血幹細胞を移植することでヒト免疫系を構築し、その後、造血幹細胞移入から16週目にヒト糞便の経口投与によりヒト腸内細菌叢を定着させることで作製した。継続的に採糞や採血を行い、ヒト造血幹細胞移植後23週時に採材を実施した。得られた材料を用いてマウスの腸内細菌叢解析や各臓器におけるヒト免疫細胞の割合を解析した。

本テクニカルセミナーでは、従来の基盤技術はもとより各種実験手技や新たな実験手法について話題提供することで、今後の無菌動物を用いた実験応用の参考になり本研究領域の基盤となることが予想される。

## Development of germ-free animal rearing techniques and their application to novel experimental methods

TOMOYUKI OGURA, YUYO KA, RYOKO NOZU, KAYO TOMIYAMA,  
RIICHI TAKAHASHI

*Central Institute for Experimental Medicine and Life Science (CIEM), Kawasaki*

The history of germ-free (GF) mice in Japan dates back to 1965, when CIEM acquired a breeding pair imported from the US by Dr. Shogo Sasaki. Over the subsequent two years, a production system was implemented, and the supply of GF mice began in 1967. At the same time, CIEM developed and started domestic production of vinyl isolators (VIs) for breeding, as well as sterilization cans and related peripheral equipment. The breeding techniques for GF and gnotobiotic mice developed during this period have since become the cornerstone of GF technology in Japan.

VIs remain indispensable for microbiome-related research, requiring specialized equipment and facilities for breeding and management. Mastering the associated experimental procedures can be time-consuming. Here, we introduce the essential equipment and sterilization methods for GF mouse breeding, the daily care and management of GF animals, and experimental procedures conducted within VIs.

As a novel experimental approach to evaluate the interaction between the human immune system and the gut microbiota, a human immune system was constructed by transplanting human hematopoietic stem cells into GF NOG mice, followed by oral administration of human feces to establish the human gut microbiota. We will present a dual-humanized model mouse system, in which human immune cells and gut microbiota were simultaneously reconstructed<sup>1</sup>.

This seminar will cover various experimental techniques and innovative methods alongside conventional basic technologies. It aims to serve as a reference for future experimental applications involving GF animals and to contribute to the advancement of this research field.

### *Reference*

Ka Y, Ito R, Nozu R, Tomiyama K, Ueno M, Ogura T, Takahashi R. Establishment of a human microbiome- and immune system-reconstituted dual-humanized mouse model. *Exp Anim.* 2023; **72**(3): 402-12. doi: 10.1538/expanim.23-0025.

## 原稿執筆要綱

- 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。
- 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@ciem.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, ……) <i>Mycoplasma pneumoniae</i> ( <i>M. pneumoniae</i> ) 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 <i>M. pneumoniae</i> 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 <i>M. pneumoniae</i> 菌体抗原による感作は…… VI. 結論 <i>M. pneumoniae</i> 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 <i>Mycoplasma pneumoniae</i> 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) <i>Mycoplasma pneumoniae</i> infection is known as one of the factors deteriorating asthma.……
12. 英文キーワード (5項目) <b>Keywords:</b> asthma, <i>Mycoplasma pneumoniae</i> , 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 1992: 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 調  
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,  $\mu$ 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 (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 1992: 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@ciem.or.jp](mailto:jagg@ciem.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

### THE FIFTY-EIGHTH ANNUAL MEETING OF THE JAPANESE ASSOCIATION OF GERMFREE LIFE AND GNTOBIOLOGY

Importance of intestinal microbiota, bile acid, and dietary fibers on the intestinal cell renewal <i>Michio Komai</i> .....	8
Evolutionary insights and immunological roles of bifidobacteria in infant gut colonization <i>Toshitaka Odamaki</i> .....	10
Molecular and cellular mechanisms involved in the development of immune function in breast milk <i>Tomonori Nochi</i> .....	12
Age-related disruption of the crosstalk between host and gut microbiota through IgA <i>Shimpei Kawamoto</i> .....	14
Gut-bone axis - investigation of the role of microbiota in the regulation of bone metabolism using a gastrointestinal allergy model. <i>Haruyo Nakajima-Adachi</i> .....	16
Symbiosis of gut microbiota and its effects on intestinal epithelial cells <i>Kyoko Takahashi</i> .....	18
Visualization of immune responses by in vivo imaging <i>Michio Tomura</i> .....	20
Germfree animals as a model for studying the role of intestinal microbiota <i>Kazuhiro Hirayama</i> .....	22
Development of germ-free animal rearing techniques and their application to novel experimental methods <i>Tomoyuki Ogura et al.</i> .....	24

### GUIDELINE FOR AUTHORS

Guideline for Authors .....	26
-----------------------------	----