

ISSN 2436-7362

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

Vol. 55

No. 2

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 GNTOBIOLOGY

無菌生物

Vol. 55, No. 2 Dec. 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
發 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 GNTOBIOLOGY

Vol. 55, No. 2 Dec. 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

# ヘリコバクター・ピロリと無菌動物 —微生物叢の欠如がもたらす感染応答

北条 史

(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)

**要 旨**: *Helicobacter pylori* はヒトの胃粘膜に長期定着し、慢性胃炎から消化性潰瘍、さらには胃癌や MALT リンパ腫を引き起こす病原細菌である。世界的保菌率は依然高く、地域・社会経済要因により大きく変動するが、成人の約半数が保有すると推定される。こうした疫学的背景は、公衆衛生上の重要性に加え、発がん機序の理解という基礎・臨床横断的な課題を提起している。一方、*H. pylori* の病態は病原体一宿主の二者関係のみでは十分に説明できない。腸内および胃内の共生微生物叢は、免疫寛容の成立、粘膜バリアの維持、代謝ネットワークの調整を通じて感染成立や炎症進展を大きく修飾する。微生物相の影響を分離・検証するためには、無菌およびノトバイオート動物を活用した実験系が不可欠である。本総説では、まず *H. pylori* の細菌学的特徴と主要な病原性因子、疫学の概略を整理し、次いで無菌・ノトバイオート動物モデルの意義・限界を概説する。さらに、当該モデルを用いた *H. pylori* 研究の具体例を紹介し、筆者らが構築中の無菌マウス感染モデルへと展望を述べる。

**キーワード**: ヘリコバクター・ピロリ、無菌マウス、ノトバイオート・マウス、電子顕微鏡観察、細菌の形態変換

## I. ヘリコバクター・ピロリ *Helicobacter pylori* の細菌学的特徴と病原性

*H. pylori* は、ヒトの胃粘膜に定着するグラム陰性のらせん状桿菌であり、複数の極鞭毛を有することから高い運動性を示す。微好気性であり、培養には 5% O<sub>2</sub>・10% CO<sub>2</sub>・高湿度環境が必要とされる。pH 1～2 の強酸環境に曝露される胃内で生存できるのは、強力なウレアーゼ活性によりアンモニアを産生し、局所的な pH 緩衝環境を形成するためである<sup>1, 2, 3</sup>。*H. pylori* は鞭毛運動を介して粘液層を遊泳し、粘膜上皮細

胞表層に接着して定着する。上皮細胞表層では長期間にわたって生存可能であり、その形態は螺旋状の “spiral form” (Fig. 1) を主体とするが、環境ストレス下では球状の “coccoid form” (Fig. 2) へと変化する<sup>4</sup>。この形態変換は非増殖的休眠状態を反映すると考えられており、感染持続や除菌抵抗性との関連が指摘されている。

*H. pylori* は世界人口の約半数に感染していると推定されるが、感染率は地域や社会経済状況によって大きく異なる。日本を含む先進国では衛生環境の改善と除菌治療の普及により感染率が低下している一方、発展

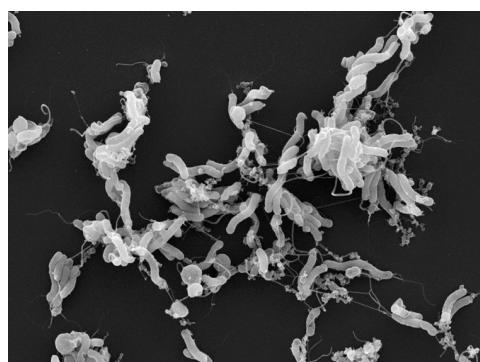


Fig. 1 *H. pylori*-spiral form

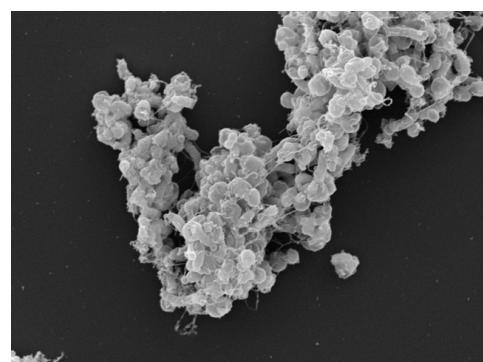


Fig. 2 *H. pylori*-coccoid form

途上地域では依然として高率の感染がみられる<sup>5, 6</sup>。感染は主に幼少期に成立し、家族内感染（特に母子間の口→口感染）が主要経路とされる<sup>7</sup>。糞口感染や水系感染の関与も指摘されており、筆者らも水系環境に分布する自由生活性アメーバと *H. pylori* の共生関係を解析したが<sup>8</sup>、確立した経路としては明確ではない。

感染後、*H. pylori* は慢性活動性胃炎を惹起し、一部の宿主では十二指腸潰瘍や胃潰瘍、さらには胃癌や MALT (mucosa-associated lymphoid tissue) リンパ腫などへの進展が認められる<sup>9</sup>。宿主の遺伝的背景<sup>10</sup>、細菌株の病原性遺伝子構成<sup>11</sup>、共生微生物叢<sup>12</sup>の構成などが発症リスクに影響することが知られている。

除菌療法はプロトンポンプ阻害薬 (PPI) と抗菌薬 (アモキシシリン、クラリスロマイシンなど) の併用が日本国内では保険適用となっているが、近年はマクロライド耐性株の増加が大きな問題となっている。耐性獲得や再感染の背景には、腸内あるいは口腔内における *H. pylori* の潜在的貯留も関与する可能性があり、常在菌叢との関係を無視できない<sup>13, 14</sup>。

## II. 無菌動物・ノトバイオート動物を用いた実験の意義

無菌動物 (germfree animals) とは、胎児期または帝王切開により無菌環境下で取り出され、その後も外界の微生物と一切接触することなく飼育された実験動物である。飼育にはアイソレーターや無菌キャビネットなど、完全に閉鎖された環境制御装置が用いられる。これらの動物は、微生物叢をまったく欠くため、外来微生物の感染に対する宿主の純粋な反応を観察できるという独自の利点を有する。一方で、無菌環境下で発育した動物は、腸管上皮の絨毛構造や免疫系の成熟において著しい変化を示すことが知られている。たとえば、バイエル板や腸管関連リンパ組織 (GALT) の発達不全、血清 IgA 濃度の低下、腸管運動や酵素活性の低下などが報告されている<sup>15, 16</sup>。

ノトバイオート動物 (gnotobiotic animals) は、無菌動物に対して特定の微生物（単一株または定義された菌群）を導入した動物を指す。したがって、導入された微生物の種類・数・性状がすべて既知であり、その微生物が宿主の生理や感染応答に及ぼす影響を明確に評価できる。

ノトバイオート化は、単一菌の導入による単純な共生実験から、ヒト常在微生物叢の再構成 (humanized microbiota) まで幅広く応用されている。とくに感染

実験の分野では、「ある病原体の病原性が常在菌の存在によってどのように修飾されるか」を解析する上で不可欠な手法となっている。

無菌動物・ノトバイオート動物モデルには SPF (specific pathogen free) 動物モデルにはない利点が存在する。第一に、宿主と病原体の相互作用を常在微生物叢の影響から切り離して解析できる点が最大の利点である。常在微生物叢が存在する通常環境 (SPF 環境) では、感染の成立や免疫応答が常在微生物叢によって大きく修飾されるため、病原体固有の作用を純粋に評価することは難しい。無菌動物を用いれば、感染成立率、局所炎症、免疫細胞の分化などを病原体単独の影響として捉えることができる。第二に、段階的な菌叢再構成による比較解析が可能である。ノトバイオート動物に特定の菌種群を順次導入することで、個々の共生菌が感染防御・炎症促進・免疫寛容に果たす役割を個別に解析できる。こうした実験は、常在微生物叢を介した感染感受性のメカニズム解明に極めて有効である。第三に、近年ではメタゲノム解析やトランスクリプトーム解析と組み合わせることで、無菌動物をベースラインとして利用し、微生物共生が宿主遺伝子発現に及ぼす影響を定量的に評価できるようになっている。

無菌動物の最大の限界は、その生理的・免疫的未成熟さに起因する非生理的応答である。腸管粘膜の防御機構や上皮細胞のターンオーバー、免疫細胞の分化が常在微生物依存的に形成されるため、無菌動物では感染防御反応が異常に弱い、あるいは過敏に出現する場合がある。また、無菌動物施設での維持には高度な技術とコストが必要であり、感染実験においても病原体が外部環境に漏出しないよう厳格なバイオセーフティ対策を要する。さらに、無菌状態そのものがストレスや代謝系に影響を及ぼす可能性があり、結果の解釈には慎重さが求められる。ノトバイオート化実験においても、導入菌群が本来の複雑な微生物生態系を完全に再現するものではない点に留意すべきである。特定の菌種間相互作用や代謝ネットワークが欠如している場合、得られる知見は限定的な条件依存のものが多い。

## III. 無菌・ノトバイオート動物を用いたヘリコバクター・ピロリ研究の事例

*H. pylori* はヒト胃粘膜に特異的に定着する病原体であり、その感染成立や持続性は宿主の免疫応答や常在

微生物叢との相互作用に強く依存している。特に齧歯類の胃内環境にはヒトと比べて細菌が多く棲息しており、従来の SPF 環境下マウスでは、胃内常在菌との競合や局所免疫によって感染が一過的となり、再現性の高い持続感染モデルの構築が困難であった。一方、無菌マウスを用いると、*H. pylori* は極めて高率に定着し、長期間にわたって持続感染を示すことが知られている<sup>17</sup>。このことは、常在微生物叢が胃粘膜表層の受容体占有や代謝競合を介して *H. pylori* の感染を阻害している可能性、あるいは常在微生物叢が *H. pylori* に対する感染防御に寄与している可能性を示唆する。

我々の研究グループは、プロバイオティクスに用いられる酪酸菌のピロリ菌に対する影響を解析する際に無菌マウスを用いた。その研究の中で無菌マウスの胃内で 5 週間のピロリ菌持続感染を確認した<sup>17</sup>。*H. pylori* 単独感染ノトバイオートマウスでは、糞便からの培養法による *H. pylori* の検出は困難であるため、免疫磁気ビーズ法と組み合わせて本菌の DNA 検出を行った<sup>18</sup>。さらに、胃および腸管中の *H. pylori* の生菌数を算定するための propidium monoazide (PMA) 定量 PCR 法および電子顕微鏡観察を行い、ノトバイオートマウス内での *H. pylori* 生菌の観察に成功したものの、胃および腸管中には生菌が死菌に比べて相対的に少ないことを報告した<sup>19</sup>。

*H. pylori* 感染に対する免疫応答は、常在微生物叢の存在によって顕著に修飾される。無菌マウスでは感染後の胃粘膜における好中球浸潤や炎症性サイトカイン産生 (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  など) が低下し、慢性炎症の形成が遅延することが報告されている。これは、常在菌由来の分子パターン (microbe-associated molecular patterns : MAMPs) が免疫系を基礎的に刺激し、病原体に対する応答閾値を調節していることを示唆する<sup>20</sup>。このように、無菌環境下では感染そのものの成立は容易であるが、病態形成は緩徐であり、炎症応答の制御において常在微生物叢が重要な役割を担っていることが明らかになっている。

*H. pylori* が誘導する胃がんに対する研究では、発がんモデルとしてトランスジェニックマウスである INS-GAS (insulin-gastrin) マウスが用いられるが、このマウスを無菌化し、常在微生物叢が *H. pylori* が引き起こす胃がんにどのように影響するかを解析した興味深い研究が進展している<sup>21</sup>。

筆者らはこれまで、環境中における細菌と原生動物の相互作用に着目して解析を行ってきた<sup>22</sup>。その中で、

ヘリコバクター・ピロリとアカンソアメーバ・カステラニとの共培養系において、両者の相互作用が本菌の生存に重要であることを報告している<sup>8</sup>。この研究背景からも、共生生物とともに *H. pylori* を無菌動物に投与することが、マウスにおける感染・定着効率に影響を及ぼす可能性が示唆される。

#### IV. 今後の展望

*H. pylori* の感染研究は、これまで主として病原性因子と宿主応答の二者関係を中心に展開してきた。しかし、近年明らかになりつつあるように、感染の成立や病態形成は宿主の微生物生態系との相互作用によって大きく修飾される。常在菌叢は免疫寛容の形成、粘膜バリアの維持、代謝ネットワークの制御など、多方面で宿主防御と病原体の生存戦略の均衡に関与している。そのため、常在微生物叢を欠く無菌動物は、感染成立や炎症進展のベースラインを可視化する上で極めて有用なツールである。

筆者らは、こうした観点から、無菌マウスを用いた *H. pylori* 感染モデルを独自に構築している。本モデルでは、無菌環境下で感染を成立させ、体内での菌の形態変化と局在を詳細に観察することを目的としている。とくに注目しているのは、螺旋状の “spiral form” から球状の “coccoid form” への形態転換である。この変化は従来、培養環境下での非増殖状態や死滅過程と考えられてきたが、筆者らの観察では、無菌個体の胃粘膜内でも一定頻度で認められ、宿主要因や常在微生物叢の欠如に応じた生理的適応の一形態である可能性も示唆されている。現在はさらに下流の腸管あるいは上流の食道において本菌がどのような形態で存在するかを解析中である。

今後は、こうした無菌動物を用いた感染モデルが、培養をベースとした古典細菌学的解析や形態学的解析のみならず、生化学的・分子生物学的・代謝学的解析など、多層的研究アプローチの基盤として発展していくことが期待される。常在微生物叢を制御可能なノトバイオート系や、メタオミクス解析、空間トランスクリプトーム解析などの新技術と組み合わせることで、微生物感染における宿主・微生物・環境の三者関係を統合的に理解できる時代が到来しつつある。

筆者の構築する感染モデルもその一端として、無菌個体における菌の形態変化を出発点に、細菌の生存戦略を解明することを目指したい。

## ***Helicobacter pylori* and Germfree animals: The specificity of infection responses resulting from the absence of Microbiota**

Fuhito Hojo

*Institute of Laboratory Animals, Graduate School of Medicine, Kyorin University, Tokyo*

*Helicobacter pylori* is a pathogenic bacterium that colonizes the human gastric mucosa long-term, causing chronic gastritis, peptic ulcers, and even gastric cancer and MALT lymphoma. The global carrier rate remains high, varying significantly by region and socioeconomic factors, with approximately half of adults estimated to be infected. This epidemiological background highlights its public health importance and raises fundamental, translational research questions regarding the understanding of carcinogenesis mechanisms. However, the pathogenesis of *H. pylori* cannot be fully explained by the pathogen-host relationship alone. The commensal microbial communities within the gut and stomach significantly modify infection establishment and inflammatory progression through the establishment of immune tolerance, maintenance of the mucosal barrier, and regulation of metabolic networks. Experimental systems utilizing germfree and gnotobiotic animals are essential for isolating and verifying the influence of the microbiome. This review first summarizes the bacteriological characteristics, major virulence factors, and epidemiology of *H. pylori*. It then outlines the significance and limitations of germfree and gnotobiotic animal models. Furthermore, it presents specific examples of *H. pylori* research using these models and concludes with an outlook on the germfree mouse infection model currently under development by the authors.

**Keywords:** *Helicobacter pylori*, germfree mice, gnotobiotic mice, electron microscopic study, coccoid form

### *References*

1. Duan Y, Xu Y, Dou Y, Xu D. *Helicobacter pylori* and gastric cancer: mechanisms and new perspectives. *J Hematol Oncol.* 2025;18(1):10. doi:10.1186/s13045-024-01654-2.
2. Scopel-Guerra A, Olivera-Severo D, Staniscuaski F, Uberti AF, Callai-Silva N, Jaeger N, et al. The impact of *Helicobacter pylori* urease upon platelets and consequent contributions to inflammation. *Front Microbiol.* 2017;8:2447. doi:10.3389/fmicb.2017.02447.
3. Ansari S, Yamaoka Y. Survival of *Helicobacter pylori* in gastric acidic territory. *Helicobacter.* 2017;22(4):e12386. doi:10.1111/hel.12386.
4. Salama NR. Cell morphology as a virulence determinant: lessons from *Helicobacter pylori*. *Curr Opin Microbiol.* 2020;54:11-17. doi:10.1016/j.mib.2019.12.002.
5. Li Y, Choi H, Leung K, Jiang F, Graham DY, Leung WK. Global prevalence of *Helicobacter pylori* infection between 1980 and 2022: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Gastroenterol Hepatol.* 2023;8(6):553-564. doi:10.1016/S2468-1253(23)00070-5.
6. Malaty HM. Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2007;21(2):205-214. doi:10.1016/j.bpg.2006.10.005.
7. Brown LM. *Helicobacter pylori*: epidemiology and routes of transmission. *Epidemiol Rev.* 2000;22(2):283-297. doi:10.1093/oxfordjournals.epirev.a018040.
8. Hojo F, Osaki T, Yonezawa H, Hanawa T, Kurata S, Kamiya S. *Acanthamoeba castellanii* supports extracellular survival of *Helicobacter pylori* in co-culture. *J Infect Chemother.* 2020;26(9):946-954. doi:10.1016/j.jiac.2020.04.016.
9. Persson C, Canedo P, Machado JC, El-Omar EM, Forman D. Polymorphisms in inflammatory response genes and their association with gastric cancer: a HuGE systematic review and meta-analyses. *Am J Epidemiol.* 2011;173(3):259-270. doi:10.1093/aje/kwq370.

10. da Costa DM, Pereira E dos S, Rabenhorst SH. What exists beyond *cagA* and *vacA*? *Helicobacter pylori* genes in gastric diseases. World J Gastroenterol. 2015;**21**(37):10563-10572. doi:10.3748/wjg.v21.i37.10563.
11. Serrano C, Harris PR, Smith PD, Bimczok D. Interactions between *H. pylori* and the gastric microbiome: impact on gastric homeostasis and disease. Curr Opin Physiol. 2021;**21**:57-64. doi:10.1016/j.cophys.2021.04.003.
12. Salahi-Niri A, Nabavi-Rad A, Monaghan TM, Rokkas T, Doulberis M, Sadeghi A, et al. Global prevalence of *Helicobacter pylori* antibiotic resistance among children in WHO regions between 2000 and 2023: a systematic review and meta-analysis. BMC Med. 2024;**22**(1):598. doi:10.1186/s12916-024-03816-y.
13. Morad Kasani SM, Mofid M, Navidifar T, Golab N, Parvizi E, Badmasti F, et al. Insights into *Helicobacter pylori* macrolide resistance: a comprehensive systematic review and meta-analysis. Front Microbiol. 2024;**15**:1481763. doi:10.3389/fmicb.2024.1481763.
14. Jans M, Vereecke L. A guide to germ-free and gnotobiotic mouse technology to study health and disease. FEBS J. 2025;**292**(6):1228-1251. doi:10.1111/febs.17124.
15. Thomson CA, Morgan SC, Ohland C, McCoy KD. From germ-free to wild: modulating microbiome complexity to understand mucosal immunology. Mucosal Immunol. 2022;**15**(6):1085-1094. doi:10.1038/s41385-022-00562-3.
16. Karita M, Li Q, Cantero D, Okita K. Establishment of a small animal model for human *Helicobacter pylori* infection using germ-free mouse. Am J Gastroenterol. 1994;**89**(2):208-213.
17. Takahashi M, Taguchi H, Yamaguchi H, Osaki T, Kamiya S. Studies of the effect of *Clostridium butyricum* on *Helicobacter pylori* in several test models including gnotobiotic mice. J Med Microbiol. 2000;**49**(7):635-642. doi:10.1099/0022-1317-49-7-635.
18. Osaki T, Taguchi H, Yamaguchi H, Kamiya S. Detection of *Helicobacter pylori* in fecal samples of gnotobiotic mice infected with *H. pylori* by an immunomagnetic-bead separation technique. J Clin Microbiol. 1998;**36**(1):321-323. doi:10.1128/JCM.36.1.321-323.1998.
19. Hojo F, Osaki T. The ecology and morphology of *Helicobacter pylori* in germ-free mice. J gemfree life gnotobiol. 2025, **55**(2), 56-57. (in Japanese)
20. Lofgren JL, Whary MT, Ge Z, Muthupalani S, Taylor NS, Mobley M, et al. Lack of commensal flora in *Helicobacter pylori*-infected INS-GAS mice reduces gastritis and delays intraepithelial neoplasia. Gastroenterology. 2011;**140**(1):210-220. doi:10.1053/j.gastro.2010.09.048.
21. Lertpiriyapong K, Whary MT, Muthupalani S, Lofgren JL, Gamazon ER, Feng Y, et al. Gastric colonisation with a restricted commensal microbiota replicates the promotion of neoplastic lesions by diverse intestinal microbiota in the *Helicobacter pylori* INS-GAS mouse model of gastric carcinogenesis. Gut. 2014;**63**(1):54-63. doi:10.1136/gutjnl-2013-305178.
22. Hojo F, Sato D, Matsuo J, Miyake M, Nakamura S, Kunichika M, et al. Ciliates expel environmental *Legionella*-laden pellets to stockpile food. Appl Environ Microbiol. 2012;**78**(15):5247-5257. doi:10.1128/AEM.00421-12.

# 第58回 日本無菌生物ノートバイオロジー学会総会

(承 前)

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

## 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	39
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	41
村上 瑠*, 伊藤 晴*, 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	43
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	46
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	50
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 ..... 53

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 ..... 56

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 ..... 58

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)

# 好酸球性副鼻腔炎マウスに誘発される 鼻腔細菌叢・腸内細菌叢のディスバイオーシス

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)

キーワード：好酸球性副鼻腔炎モデル，鼻腔細菌叢，腸内細菌叢，ディスバイオーシス

## I. 背景

鼻腔は、空気中に含まれる細菌やウイルスの侵入門口となるため、急性および慢性的炎症を起こしやすい環境にある。疫学的な研究では、慢性鼻腔炎症はうつ病や不安障害などの精神疾患のリスクを高めることが明らかになっているが、そのメカニズムは不明である。先行研究では、リポ多糖 (Lipopolysaccharide: LPS) 誘導性の慢性鼻腔炎症が成体雄マウスにおいて腸内細菌叢のディスバイオーシスを引き起こすことが示された<sup>1</sup>。鼻腔を含む粘膜表面には常在細菌叢が存在していることから、慢性鼻腔炎症が鼻腔細菌叢の細菌構成を変化させ、それにより脳や腸内細菌叢に影響を及ぼすのではないかと考えた。本研究では、マウスの鼻腔細菌叢を同定し、好酸球性副鼻腔炎が鼻腔および腸内細菌叢のディスバイオーシスを誘発するかどうかを明らかにすることを目的とした。

## II. 材料と方法

8週齢の雄マウスに好酸球性副鼻腔炎 (Eosinophilic chronic rhinosinusitis: ECRS) を誘発した。ECRS群のマウスには、右耳介にビタミンDアナログ (MC903) とオボアルブミン (Ovalbumin: OVA) を2週間局所塗布し、その後右鼻腔にOVAを1週間投与した。対照マウス (CONT) 群には、100%エタノールとPBS

の耳介塗布を2週間、PBSの経鼻投与を1週間行った。マウスを4%パラホルムアルデヒドで灌流固定し、組織学的解析のために凍結切片を作製した。また別に、マウスの鼻部および盲腸便を新鮮な状態で採取し、細菌DNAを抽出、16S rRNAのV3-V4領域をPCRで増幅した後に Illumina MiSeqでシーケンス解析を行った。

## III. 結果、今後の展望

組織学的解析の結果、ECRS群では鼻粘膜に顕著な好酸球浸潤が認められたが、CONT群では認められなかった。このことから、ECRSモデルマウスが正しく作製されたことが示された。16S rRNA解析から、腸内細菌叢では、Firmicutes門とBacteroidota門の2門が優占し、Firmicutes門とBacteroidota門の比率 (F/B比) はCONT群とECRS群ともに2~4であった。一方、鼻腔細菌叢では、Firmicutes門とActinobacteriota門の2門が優勢菌であり、F/B比はCONT群とECRS群ともに平均100以上であった。これらのことから、鼻腔細菌叢と腸内細菌叢の細菌構成が異なることが示された。ECRS群とCONT群における鼻腔細菌叢と腸内細菌叢を比較すると、いずれもβ多様性に有意な違いがあったことから、細菌叢の構成が変化したことを確認した。現在変動パターンについて、解析を行っているところである。

## Eosinophilic chronic rhinosinusitis induces dysbiosis of the nose and gut microbiota in mice

RYUICHI IMAI\*, SUZUHO KOMAKI\*\*, TAKAKO OSAKI\*\*\*, SANAE HASEGAWA-ISHII\*, \*\*

\*Graduate School Health Science, Kyorin University, Tokyo

\*\*Faculty Health Science, Kyorin University, Tokyo

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

**Keywords:** eosinophilic chronic rhinosinusitis model, nose microbiota, gut microbiota, dysbiosis

Chronic nasal inflammation increases the risk of psychiatric disorders including depression and anxiety, but the underlying mechanism remains unknown. Our previous studies exhibited that lipopolysaccharide-induced chronic nasal inflammation caused dysbiosis of gut microbiota in adult male mice. Thus, we hypothesized that chronic nasal inflammation changes the composition of nose microbiota at first, which may then affect the brain and gut microbiota. Here we aimed to identify nose microbiota in mice and then clarify whether eosinophilic chronic rhinosinusitis (ECRS) would induce dysbiosis in nose and gut microbiota.

To establish a mouse model of ECRS group, adult male mice were topically treated with vitamin D analog (MC903) and ovalbumin on the right ear for 2 weeks, followed by administration of ovalbumin to the right nostril for 1 week. Control mice (CONT) received ethanol and PBS topical treatment and PBS nasal administration. Mice were fixed for histological analyses. Nasal tissue and cecal contents were freshly obtained for 16S rRNA amplicon sequencing analysis.

We found remarkable eosinophilic infiltration in the nasal mucosa only in the ECRS group. In the gut microbiota, phyla Firmicutes and Bacteroidota were 2 dominant bacteria and the ratio of Firmicutes to Bacteroidota (F/B ratio) was 2-4. In contrast, 2 dominant bacteria were phyla Firmicutes and Actinobacteriota and the F/B ratio was more than 100 in the nose microbiota, indicating that the bacterial compositions were different between nose and gut microbiota. Differences in the microbiota between ECRS and CONT groups are currently being conducted.

### References

1. Mishima Y, Osaki T, Shimada A, Kamiya S, Hasegawa-Ishii S. Sex-dependent differences in the gut microbiota following chronic nasal inflammation in adult mice. Sci Rep. 2021; **11** (1): 4640.

# 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

村上 瑞\* 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)

キーワード：ビタミンK, テストロン, 加齢男性腺機能低下症候群

## I. 背景

加齢によるテストステロン (Ts) 産生の低下は、性機能の低下や鬱病、筋肉量の低下を伴う加齢男性性腺機能低下症 (LOH) を引き起こし、高齢男性の QOL を著しく低下させる要因となり得る。さらに既存の Ts 補充療法には副作用の懸念があり、より安全な代替治療法の開発が求められている。ビタミン K (VK) は食事からの摂取に加えて腸内細菌からも供給される脂溶性ビタミンの一種であり、ビタミン K 依存性タンパク質の翻訳後修飾 (Gla 化) を介して血液凝固や骨恒常性の維持に重要な役割を果たしている。我々は先行研究において、VK 投与は Gla 化とは異なる機構により Ts 産生を増強させることを見出している。本研究では新たに LOH モデル動物を作出し、精巣における Ts 産生に対する VK 投与の影響を解析した。

## II. 材料と方法

試験開始時に 8 週齢雄性 SD ラット（日本エスエルシー）に対し、徐放性性腺刺激ホルモン放出ホルモンアゴニストである酢酸リュープロレリン (LA) を皮下投与 (1.5mg/kg 体重) し、LOH モデルラットとした。その後 AIN-93G 標準飼料 (LOH 群), VK1 (VK1 群) または VK2 の一種であるメナキノン-4 (MK-4 群) 添加飼料 (75mg/kg 飼料) を与えて 4 週間飼育した。LA の代わりに生理食塩水を投与して AIN-93G 標準飼料を

与えた群をコントロール (Cont) 群とした。飼育期間中は 1 週間に 1 度イソフルラン麻酔下での尾静脈採血を行い、血清を得た。飼育期間終了時に血液と精巣を採取して、LC-MS/MS 法により Ts 濃度を測定した。また精巣での Ts 産生関連因子を定量 RT-PCR 法ならびにウェスタンブロット法により解析した。

## III. 結果・考察・結論

試験期間中の体重、摂餌量に群間で差はなかった。Cont 群と比較して LA を投与した群では精巣重量が有意に低下したことから、精巣が萎縮したと考えられた。また LA の投与は Cont 群と比較して血清中ならびに精巣中 Ts を有意に低下させ、この血清中 Ts 濃度の低下は試験期間終了時まで持続した。これらの結果から LA 投与により LOH 様症状が誘導されたことが示唆された。LA を投与したラットの中で比較すると、MK-4 添加飼料の給餌 4 週後の血清中 Ts 濃度は LOH 群と比較して有意に高値を示したことから、MK-4 投与により精巣での Ts 産生が増強されたことが示唆された。また、定量 RT-PCR 法による解析から LOH 群と比較して MK-4 群では精巣中の Ts 産生の律速酵素である Cyp11al mRNA 発現の上昇傾向が認められた。

以上のことから、LOH モデルラットへの MK-4 投与は PKA-CREB 経路の活性化を介して、精巣での Ts 産生を増強する可能性が示唆された。

## Effect of vitamin K supplementation on testicular testosterone production in a rat model of late-onset hypogonadism

RUI MURAKAMI\*, HIKARU ITO\*, YUSUKE OHSAKI\*, MASAMITSU MAEKAWA\*\*, AFIFAH ZAHRA AGISTA\*, HITOSHI SHIRAKAWA\*

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

\*\**Department of Pharmaceutical Science, Tohoku University Hospital, Sendai*

**Keywords:** Vitamin K, testosterone, late-onset hypogonadism

Age-related decline in testosterone levels can lead to late-onset hypogonadism (LOH), which can cause symptoms such as sexual dysfunction and depression. Existing treatments, such as hormone replacement therapy, for LOH have adverse effects, increasing the need for safer alternatives. Our previous research indicated that vitamin K supplementation could enhance testosterone production in the testis of healthy male rats. Therefore, in this study, we evaluated the effect of vitamin K supplementation on testosterone production in LOH model rats.

Leuprorelin acetate (LA), a gonadotropin-releasing hormone agonist, was administered to male SD rats (1.5 mg/kg BW) to establish LOH model rats. The rats were fed on AIN-93G (LOH group), or AIN-93G supplemented with a 75 mg/kg diet of VK1 (VK1 group) or MK-4 (MK-4 group) for 4 weeks. Blood was collected from the tail vein once a week. At the end of the experimental period, testis and blood from abdominal aorta were collected and testosterone concentration was measured with LC-MS/MS. The activation of signaling pathways related to testicular testosterone production was also assessed by qRT-PCR or Western blotting.

Vitamin K supplementation did not change body weight and food intake during the experimental period. The serum testosterone level in the MK-4 group at the 4th week was significantly higher than that in the LOH group. qRT-PCR analysis revealed that MK-4 supplementation increased the expression level of Cyp11a1 mRNA, a rate-limiting enzyme in testicular testosterone production. In conclusion, dietary MK-4 supplementation could activate the PKA-CREB pathway and promote testicular testosterone production in LOH model rats.

# 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

岡田 開\* 津田 真人\* 平山 和宏\*\* 細野 朗\*

(\*日本大学生物資源科学部食品開発学科、食品生命機能学研究室、

\*\*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)

**要 旨：** 本研究では、血中の腸内細菌反応性 IgG2b 抗体 (commensal bacteria-reactive IgG2b; CBR-IgG2b) の誘導に対する腸内細菌の関与とその菌種の特定を目指した。その結果、複数のブリーダー由来の BALB/cA マウスでは、腸内細菌叢を構成する菌種が異なることにより、血中の総 IgG2b および CBR-IgG2b 抗体量に違いがあることが明らかとなった。また、興味深いことに、血中の CBR-IgG2b は腸管内に定着した固有の腸内細菌に対して強く結合する特徴が明らかとなった。

次に、抗菌スペクトルの異なる抗生物質をそれぞれ単独で BALB/cA マウスに投与した際に、ampicillin または vancomycin の投与によって、血中 CBR-IgG2b 抗体量が低下した。したがって、本研究では、腸内細菌叢の違いが血中の CBR-IgG2b の誘導に強い影響を及ぼすこと、また ampicillin や vancomycin などの抗生物質に感受性の高い腸内細菌の存在が、特に CBR-IgG2b の誘導に寄与することを明らかにした。

**キーワード：**腸内細菌反応性 IgG2b、腸内細菌、抗生物質

## I. 目的

近年、ウイルスや病原微生物などの外来抗原だけでなく、様々な腸内細菌に結合性を示す血中 IgG 抗体 (CBR-IgG) の存在が報告されている<sup>1, 2</sup>。この CBR-IgG は、dysbiosis などに起因した腸内細菌の血流感染が引き起こされた際に、血中に流入した腸内細菌に対する防御に寄与すると考えられている<sup>3</sup>。一方で当研究室では、健常な成体 BALB/cA マウスの血中に CBR-IgG2b が存在すること、さらに、無菌 BALB/cA マウスを用いた解析により、血中 CBR-IgG2b が腸内細菌依存的に誘導されることを見出している<sup>4</sup>。しかし、血中 CBR-IgG2b 誘導に対する宿主の腸内細菌叢の違いや関与する腸内細菌の種類は明らかではない。そこで本研究では、複数のブリーダー由来のマウスを用いて、腸内細菌叢の違いが血中 CBR-IgG2b 誘導にどのような影響を与えるかを解析した。さらに、抗生物質投与により腸内細菌叢を制御した条件において、血中 CBR-IgG2b 誘導に関与する腸内細菌の探索を行った。

## II. 材料と方法

実験①では 3 社 (A, B, C) のブリーダーからそれぞ

れ購入した BALB/cA マウスを用いた。また実験②では、当研究室で継続的に使用している A 社の BALB/cA マウスに対して、スペクトラムの異なる複数の抗生物質 (1 g/L ampicillin, 1 g/L neomycin, 0.25 g/L metronidazole, 0.5 g/L vancomycin) をそれぞれ飲水に混合して、単独で 4 週間投与した。各実験のマウスから血液を採取し、血清中の総 IgG2b 量を ELISA 法で定量した。次に、CBR-IgG2b 量を A 社のマウスの腸内細菌を基準として測定した。すなわち、A 社のマウスの糞便から調製した糞便細菌を ELISA プレートに固相化し、各マウスの血清を反応させることにより、糞便中細菌に対する CBR-IgG2b を検出した。また、実験②では抗生物質投与後の盲腸内細菌叢を解析し、血中 CBR-IgG2b 誘導に関与する腸内細菌の探索を試みた。

## III. 結果

実験①において、各ブリーダー由来マウスの中でも、A, B 社のマウスと比較して、C 社のマウスの血中総 IgG2b 量が最も高い値を示した。一方で、A 社のマウス糞便から調製した腸内細菌に対する反応性は、B, C 社に比べて A 社のマウスの血中 IgG2b が最も強い反応

性を示した。すなわち、腸内細菌叢の違いにより血中 IgG2b 誘導能が異なること、また血液中に誘導される CBR-IgG2b は腸管内に定着している固有の腸内細菌に高い反応性を示す特徴が示唆された。

次に実験②において、A 社のマウスに抗生物質を投与したところ、ampicillin または vancomycin 投与群において血中総 IgG2b と CBR-IgG2b が低下した。この時、ampicillin と vancomycin 投与群の盲腸内細菌叢を解析したところ、*Lachnospiraceae* 科、*Muribaculaceae* 科、*Ruminococcaceae* 科、*Bacteroidaceae* 科の細菌が対照群やその他の抗生物質投与マウスと比較して有意に低下していた。

#### IV. 考察

以前の報告では、グラム陽性細菌よりもグラム陰性細菌が血中の CBR-IgG 抗体誘導に関与することが示唆されている<sup>2</sup>。実験①より、腸内細菌叢の異なる同一系統のマウスにおいて、血中の CBR-IgG2b 誘導能と CBR-IgG2b の腸内細菌結合性が異なる可能性が示唆されたことから、このような腸内細菌叢を構成する菌種の違いが CBR-IgG2b の誘導と機能性に強い影響を及ぼすと推察された。さらに、実験②より、ampicillin または vancomycin の投与によって、*Bacteroidaceae* 科細菌などの特定の腸内細菌の占有率が低下し、同時に血中 CBR-IgG2b 量が低下した。以前に、*Bacteroidaceae* 科細菌である *Bacteroides thetaiotaomicron* の基準株である

*B. thetaiotaomicron* VPI-5482 株を成体の無菌 C57BL/6 マウスに投与することにより、血清中の IgG2b 抗体価が上昇することが示されている<sup>5</sup>。このことから、腸内細菌の中でも、特に、ampicillin または vancomycin 投与によって低下した *Bacteroidaceae* 科細菌などの特徴的な腸内細菌の存在が、血中の総 IgG2b および CBR-IgG2b 抗体の誘導にも寄与する可能性が示唆された。

#### V. 結論

血中 CBR-IgG2b の誘導に対して宿主の腸内細菌叢の変化が強く影響するだけでなく、血中 CBR-IgG2b は腸管内に定着した固有の腸内細菌に対して結合する特徴をもつことが明らかとなった。今後、ノトバイオートマウスを用いた解析などから、血中の CBR-IgG2b 抗体誘導に関わる腸内細菌種を詳細に明らかにすることにより、CBR-IgG2b 抗体の誘導能を促進し、血中において腸内細菌が原因となる全身感染症の保護に寄与するメカニズムの解明が期待される。

#### VI. 謝辞

本研究は会員外共同研究者である高橋恭子博士、京井大輔博士（日本大学生物資源科学部）、原田岳博士、宮澤賢司博士（タカナシ乳業株式会社）、八村敏志博士（東京大学大学院食の安全研究センター）、高橋宜聖博士（国立感染症研究所免疫部）との共同研究によって行われたものであり、ここに深謝いたします。

## The intestinal bacteria modulate commensal bacteria-reactive IgG2b production in the blood.

HIRAKU OKADA\*, MASATO TSUDA\*, KAZUHIRO HIRAYAMA\*\*, AKIRA HOSONO\*

\*Department of Food Science and Technology, College of Bioresource Sciences, Nihon University, Fujisawa

\*\*Laboratory of Veterinary Public Health, Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo, Tokyo

In this study, we investigated the involvement of commensal bacteria and their types in the induction of commensal bacteria-reactive IgG2b (CBR-IgG2b) in the blood. First, we compared the CBR-IgG2b titer in the serum of BALB/cA mice from several commercial breeders (A, B, C) with different gut microbiota. The mice from breeder C had higher levels of total IgG2b than the mice from the other breeders. Furthermore, using a modified ELISA technique, we measured the levels of CBR-IgG2b in the serum against commensal bacteria from the mice from breeder A. Serum IgG2b in the mice from breeder A was most strongly reacted to its own fecal bacteria. These results suggest that the difference in gut microbiota affects the level and binding property of CBR-IgG2b in serum.

Next, we analyzed the serum CBR-IgG2b from several antibiotic-treated mice. As a result, the serum CBR-IgG2b was reduced in ampicillin- and/or vancomycin-treated mice. In addition, the composition and diversity of the gut microbiota in the cecal contents in ampicillin- and/or vancomycin-treated mice were significantly changed. In particular, *Lachnospiraceae*, *Muribaculaceae*, *Ruminococcaceae*, and *Bacteroidaceae*, abundant in the control group, were significantly reduced in mice treated with ampicillin and/or vancomycin. Our results indicate that intestinal bacteria, particularly those susceptible to ampicillin and/or vancomycin, play a role in the systemic supply of CBR-IgG2b.

**Keywords:** commensal bacteria-reactive IgG2b, gut microbiota, antibiotics

### References

1. Koch MA, Reiner GL, Lugo KA, Kreuk LS, Stanberry AG, Ansaldi E, Seher TD, Ludington WB, Barton GM. Maternal IgG and IgA antibodies dampen mucosal T helper cell responses in early life. *Cell*. 2016;165(4):827-41. doi:10.1016/j.cell.2016.04.055.
2. Zeng MY, Cisalpino D, Varadarajan S, Hellman J, Warren HS, Cascalho M, Inohara N, Núñez G. Gut microbiota-induced immunoglobulin G controls systemic infection by symbiotic bacteria and pathogens. *Immunity*. 2016;44(3):647-58. doi:10.1016/j.immuni.2016.02.006.
3. Rusconi B, Bard AK, McDonough R, Kindsvogel AM, Wang JD, Udayan S, McDonald KG, Newberry RD, Tarr PI. Intergenerational protective anti-gut commensal immunoglobulin G originates in early life. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2024;121(13):e2309994121. doi:10.1073/pnas.2309994121.
4. Tsuda M, Okada H, Kojima N, Ishihama F, Muraki Y, Oguma T, Hattori N, Mizoguchi T, Mori K, Hachimura S, Takahashi Y, Takahashi K, Kaminogawa S, Hosono A. Cecal patches generate abundant IgG2b-bearing B cells that are reactive to commensal microbiota. *J Immunol Res*. 2022;2022:3974141. doi:10.1155/2022/3974141.
5. Peterson DA, Planer JD, Guruge JL, Xue L, Downey-Virgin W, Goodman AL, Seedorf H, Gordon JI. Characterizing the interactions between a naturally primed immunoglobulin A and its conserved *Bacteroides thetaiotaomicron* species-specific epitope in gnotobiotic mice. *J Biol Chem*. 2015;290(20):12630-49. doi:10.1074/jbc.M114.633800.

## 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

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)

**要 旨：**近年、攻撃性の一因として、腸内細菌叢との関連が様々な動物モデルで指摘されている。しかし、現在においてマウスの攻撃性減弱の介入方法に単一菌種を用いた報告はほとんどない。本研究では攻撃性に焦点を当て、*Bifidobacterium infantis* (*B. infantis*) 単一菌叢マウスを作成し、無菌マウスとの攻撃行動を比較した。発達早期への介入効果を明らかにするため、4週齢に作成した単一菌マウス、8週齢に作成した単一菌マウス、無菌マウス (GF) の3群で攻撃行動特性を比較した。結果、後天的に作成された *B. infantis* 単一菌マウスは、GFマウスよりも攻撃性が有意に低いことを示した。また、4週齢に作成した単一菌マウスは攻撃性の減弱効果に有意差が認められたが、8週齢に作成した単一菌マウスには有意差が認められなかったことから、その効果は生後早期への介入により認められたものだと考えられた。発達早期における腸内環境への介入は、生涯の攻撃行動特性の緩和に影響を与えることが示唆された。

**キーワード：**攻撃性、脳腸相関、単一菌マウス、無菌マウス、*Bifidobacterium infantis*

### I. 目的

動物界において、攻撃性は種特有の行動パターンで表現され、主に繁殖相手や子孫、食物、縛張りを維持するために必要な要素である<sup>1</sup>。しかし、この攻撃性は、生命維持に必要な行動としての範囲を超えると社会的活動において有害な事象をもたらす<sup>2</sup>。攻撃性は、脳の器質的特徴や神経伝達物質、幼少期の環境などの様々な要因が関与しており、単一の要因を検証するためには、動物モデルが極めて有効である<sup>3</sup>。

脳と腸は液性因子や自律神経系、免疫系の伝達経路を介して双方向的な情報伝達を行っており、脳腸相関として知られている<sup>4</sup>。これまでの研究により、腸内細菌叢に由来する神経伝達物質を介したストレス反応や感情への影響など精神面の発達との関連が明らかになってきた<sup>5</sup>。腸内細菌叢は情動や腸機能の維持に重要な役割を果たしており、脳と腸の相互作用における重要な要素として、「腸内細菌－腸－脳軸」として考えられている<sup>6</sup>。

近年、攻撃性の一因として、腸内細菌叢との関連が様々な動物モデルで指摘されている<sup>7</sup>。しかしながら、現在においてマウスの攻撃性減弱の介入方法に単一菌種を用いた報告はほとんどない。

プロバイオティクスとは、適量を投与すると宿主の健康上の利益をもたらす生きた微生物と定義されている<sup>8</sup>。我々は乳幼児期の主要なプロバイオティクスである *Bifidobacterium infantis* (*B. infantis*) による介入が攻撃性を減弱させるという仮説を立てた。本研究では攻撃性に焦点を当て、無菌マウスに *B. infantis* を投与し単一菌叢マウスを作成し、無菌マウスとの攻撃行動を比較した。

### II. 材料

全てのマウスは母体妊娠時からアイソレータ内で飼育した。発達早期への介入効果を明らかにするため、4週齢時と8週齢時に *B. infantis* を投与し、*B. infantis* 単一菌マウスを作成した。

### III. 方法

4週齢の単一菌マウス、8週齢の単一菌マウス、無菌マウス (GF) の3群で攻撃行動特性を比較した。アイソレータ内で、ソーシャルインテラクション法を使用し、攻撃行動特性を評価した。

#### IV. 結果

後天的に作成された *B. infantis* 単一菌マウスは、GF マウスよりも攻撃性が有意に低いことを示した。また、4 週齢に作成した単一菌マウスは攻撃性の減弱効果に有意差が認められたが、8 週齢に作成した単一菌マウスには有意差が認められなかった。

#### V. 考察

4 週齢に投与した群では攻撃性の減弱効果を認めた

が、8 週齢での投与では減弱効果が得られなかつたことから、その効果は生後早期への介入により出現した認められたものだと考えられた。

#### VI. 結論

発達早期における腸内環境への介入は、生涯の攻撃行動特性の緩和に影響を与えることが示唆された。

## Effect of bifidobacteria on aggressive behavior of mice early in life

KYUTA HANAWA\*, NATSURU WATANABE\*\*, HITOSHI TSUGAWA\*\*\*, KATSUNAKA MIKAMI \*\*

\* Department Medical Science, Graduate School of Medicine, Tokai University, Kanagawa

\*\* Department of Psychiatry, Tokai University School of Medicine, Kanagawa

\*\*\* Department of Medicine, Biological defense science, Tokai University School of Medicine, Kanagawa

Recently, the relationship between the gut microbiota and aggression has been suggested in various animal models. However, there are currently few reports of the use of a single bacterial species as an intervention to reduce aggressiveness in mice. In this study, we focused on aggression and administered *Bifidobacterium infantis* to germ-free mice to create mice with a single flora of *B. infantis*, and compared their aggressive behavior with that of germ-free mice (GF).

To clarify the effects of intervention during early development, *B. infantis* was administered to mice at 4 and 8 weeks of age to create mice monocultured with *B. infantis*. Aggressive behavioral characteristics were compared among three groups of mice: monomicrobial mice bred at 4 weeks of age, monomicrobial mice bred at 8 weeks of age, and germ-free mice. The social interaction method was used to evaluate aggressive behavioral characteristics, and observations were conducted in a sterile isolator.

The *B. infantis* monomicrobial mice bred later in life showed significantly lower aggression than the GF mice. The monomicrobial mice bred at 4 weeks of age showed a significant reduction in aggression, but the monomicrobial mice bred at 8 weeks of age did not show a significant difference, suggesting that the effect was due to intervention at an early developmental stage. These findings suggest that intervention in the intestinal environment during early development may have an impact on mitigating aggressive behavioral traits throughout life.

**Keywords:** Aggression, gut-brain axis, monobacterial mice, germ free mice, *Bifidobacterium infantis*

### References

1. de Boer SF. Animal models of excessive aggression: implications for human aggression and violence. *Curr Opin Psychol.* 2018;19:81-7.
2. Flanigan ME, Russo SJ. Recent advances in the study of aggression. *Neuropsychopharmacology.* 2019;44(2):241-4.
3. Mikami K, Watanabe N, Tochio T, Kimoto K, Akama F, Yamamoto K. Impact of gut microbiota on host aggression: potential applications for therapeutic interventions early in development. *Microorganisms.* 2023;11(4):1008. doi:10.3390/microorganisms11041008.
4. Collins SM, Surette M, Bercik P. The interplay between the intestinal microbiota and the brain. *Nat Rev Microbiol.* 2012;10(11):735-42.
5. Bercik P, Denou E, Collins J, Jackson W, Lu J, Jury J, Deng Y, Blennerhassett P, Macri J, McCoy KD, Verdu EF, Collins SM. The intestinal microbiota affect central levels of brain-derived neurotropic factor and behavior in mice. *Gastroenterology.* 2011;141(2):599-609, 609.e1-3.
6. Collins SM, Bercik P. The relationship between intestinal microbiota and the central nervous system in normal gastrointestinal function and disease. *Gastroenterology.* 2009;136(6):2003-14.
7. Langmajerová M, Roubalová R, Šebela A, Vevera J. The effect of microbiome composition on impulsive and violent behavior: a systematic review. *Behav Brain Res.* 2023;440:114266.
8. Hill C, Guarner F, Reid G, Gibson GR, Merenstein DJ, Pot B, Morelli L, Canani RB, Flint HJ,

Salminen S, Calder PC, Sanders ME. Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2014;11(8):506-14.

# 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

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)

**要 旨：** ビタミン K 欠乏症の発症頻度には性差がみられ、女性よりも男性の発症リスクが高いが、その機序は十分には解明されていない。本研究では、無菌ラットにおけるビタミン K 欠乏症に対する性差の影響、ならびに性腺摘出ラットにおける組織中ビタミン K 濃度の変化を解明することを目的とした。無菌ラットへのビタミン K 欠乏飼料の給餌はプロトロンビン時間ならびに活性化部分トロンボプラスチン時間を有意に延長させたが、その延長は雌性ラットよりも雄性ラットでより顕著であった。肝臓中ビタミン K 濃度は雄性ラットと比較して雌性ラットで有意な高値を示した。一方で肝臓中ビタミン K1 濃度は、雄ラットの精巣摘出により有意に上昇し、雌ラットで卵巣摘出により有意に低下した。以上の結果よりビタミン K 欠乏症の感受性ならびに組織中ビタミン K 濃度は性差の影響を受け、その機序の一部には性ホルモンが関与する可能性が示唆された。

**キーワード：**ビタミン K 欠乏症、性差、無菌ラット、性腺摘出

## I. 目的

ビタミン K は、ビタミン K 依存性タンパク質 (VKDP) の特定のグルタミン酸残基を  $\gamma$ -カルボキシグルタミ酸に変換する  $\gamma$ -グルタミルカルボキシラーゼの補因子として作用する。プロトロンビンなどの血液凝固因子の一部も VKDP であることから、ビタミン K は血液凝固反応において重要な役割を果たしている。ビタミン K のうちビタミン K2 (メナキノン類) は腸内細菌によつても産生され、宿主がこれを利用することから、重篤な欠乏症になることは稀である。しかし、腸内細菌の定着が不十分である新生児や乳児、あるいは抗生素質を服用する患者では発症リスクが高い。加えて、ビタミン K 欠乏症は女性と比較して男性で発症リスクが数倍程度高いことが知られているが、その機序は十分には解明されていない。本研究では実験動物におけるビタミン K 欠乏症の性差を確認するとともに、性腺摘出による性ホルモンの低下が組織中ビタミン K 濃度に与える影響について明らかにすることを目的とした。

## II. 方法

無菌 Wistar 系雄性ならびに雌性ラット (12~19週齢) をビタミン K 欠乏飼料 (Def 群, TD97053, Harlan Teklad), これにビタミン K1 を 0.75 または 75 mg/kg 飼

料で添加したコントロール飼料 (Cont 群), ビタミン K 添加飼料 (Sup 群) を与え、雄性ラットは 9 日間、雌性ラットは 21 日間飼育した。飼育期間終了時に血液凝固試験を行い、肝臓を採取した。また、12 週齢の雄性ならびに雌性 DahlS コンベンショナルラットに麻酔下にて精巣摘出術 (ORX), 卵巣摘出術 (OVX) あるいは偽手術 (Sham 群) を行い、AIN-93M 標準飼料を与えて 5 週間飼育し、飼育期間終了時に肝臓を採取した。肝臓中のビタミン K 濃度を蛍光 HPLC 法により測定した。

## III. 結果・考察

無菌ラットでは雌雄とともに、Def 群では他の 2 群と比較してプロトロンビン時間 (PT) と活性化部分トロンボプラスチン時間 (APTT) が有意に延長していた。また、Def 群の中では、雌性ラットよりも雄性ラットで、PT と APTT が有意に延長していた。無菌ラットの肝臓中ビタミン K 濃度は雌雄とともに、Sup 群は他 2 群と比較して有意な高値であった。Sup 群の中では、雄性ラットよりも雌性ラットで、より高いビタミン K 濃度を示した。また、DahlS ラットの肝臓中ビタミン K 濃度も Sham 群の雄と比較して Sham 群の雌では有意な高値を示した。一方で、雄の Sham 群と比較して ORX

群では有意な高値を示し、雌の Sham 群と比較して OVX 群では有意な低値を示した。これらの結果より、ラットにおいてもビタミン K 欠乏飼料給餌による血液凝固能の低下ならびに肝臓中のビタミン K 濃度には性差がみられ、性腺から放出されるホルモンが関与する可能性が示唆された。

## V. 結論

ビタミン K の欠乏症の感受性ならびに組織濃度は性差の影響を受け、一部は性ホルモンによる寄与を受ける可能性が示唆された。

## Elucidation of sex differences in susceptibility to vitamin K deficiency in rats

YUTA TANNO\*, YUSUKE OHSAKI\*\*, MICHIO KOMAI\*\*, HITOSHI SHIRAKAWA\*\*

\**Laboratory of Nutrition, Faculty of Agriculture Science, Tohoku University, Sendai*

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

Vitamin K is an essential nutrient for the maturation of several blood clotting factors. Male is more susceptible to vitamin K deficiency, but the mechanism is not fully investigated. Therefore, we attempted to clarify the sex differences in vitamin K deficiency and the effects of gonadal hormones using animal models. In this study, male and female germ-free Wistar rats were fed a vitamin K-deficient (Def), control (Cont), or vitamin K-supplemented (Sup) diet for 9 days in males and 21 days in females. At the end of the experiment, blood coagulation times and liver vitamin K concentration were evaluated. Male or female DahlS rats were orchietomized (ORX), ovariectomized (OVX), or sham-operated and fed an AIN-93M standard diet for 5 weeks, after which liver vitamin K concentration was evaluated. Prothrombin time (PT) and activated partial thromboplastin time (APTT) were prolonged in the Def group compared with the Cont and Sup groups in both male and female rats. PT and APTT in the male Def group was longer than that in the female Def group. Liver vitamin K concentrations were higher in the Sup group compared with the Cont and Def groups in both male and female rats. Vitamin K concentrations in the liver were higher in females than in males, were significantly increased by orchectomy, and were significantly decreased by ovariectomy in Dahl S rats. These results indicate that susceptibility to vitamin K deficiency and tissue concentrations could be influenced by sex and suggest that sex hormones may partially involve.

**Keywords:** Vitamin K deficiency, sex difference, germ-free rat, gonadectomy

# 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

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)

**要 旨：** ケルセチンはタマネギ等に含まれているフラボノイドの一つであり、ヒトおよび動物試験等により生活習慣病予防効果が期待されている。ケルセチンやケルセチンの配糖体ルチン等の機能成分の生体利用性は腸内細菌の個人差によって変わると考えられているが、具体的にどの腸内細菌やどの共存食品が機能成分の生体利用性を高めるかは不明であり、腸内細菌や腸内環境の調節を介した機能成分の生体利用性を高める方法が課題となっている。フラクトオリゴ糖を資化可能な腸内細菌と資化できない腸内細菌が共存する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を検討したところ、血漿イソラムネチン（ケルセチン代謝物）濃度は、対照群に比べて、フラクトオリゴ糖群で有意に高い結果となった。血漿イソラムネチン濃度はケルセチン代謝菌 *Bacterium 19-20* の菌数と負の相関 ( $r=-0.903$ ) が認められた。盲腸内容物の酢酸濃度は、フラクトオリゴ糖群で有意に高い傾向が認められた。盲腸内容物の酢酸濃度と血漿ケルセチン代謝物イソラムネチン濃度との間には有意な正の相関が認められ、ケルセチン代謝菌 *Bacterium 19-20* の菌数との間に負の相関が認められた。腸内菌叢の產生する酢酸がケルセチン代謝菌 *Bacterium 19-20* の増殖を抑制することでケルセチン分解が抑制された結果、ケルセチンの吸収が低下した可能性が考えられる。一方、フラクトオリゴ糖は、ミネラル等の吸収を促進することから、フラクトオリゴ糖摂取で生じた酢酸がケルセチンの吸収促進に寄与した可能性も考えられた。

**キーワード：** ケルセチン、イソラムネチン、ケルセチン代謝菌、ノトバイオートマウス、酢酸

## I. 目的

ケルセチンはタマネギ等に含まれているフラボノイドの一つであり、ヒト<sup>1</sup>および動物試験<sup>2</sup>等により生活習慣病予防効果が期待されている。ケルセチンの保健効果が注目されている。ケルセチンやケルセチンの配糖体ルチン等の機能成分の生体利用性は腸内細菌の個人差によって変わると考えられている<sup>3</sup>が、具体的にどの腸内細菌やどの共存食品が機能成分の生体利用性を高めるかは不明であり、腸内細菌や腸内環境の調節を介した機能成分の生体利用性を高める方法が課題となっている。発表者らは、ヒト糞便からケルセチン代謝・分解が可能な腸内細菌 *Bacterium 19-20* を見出している。今回、フラクトオリゴ糖を資化可能な腸内細菌と資化できない腸内細菌が共存する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を検討した。

## II. 対象と方法

東京大学獣医公衆衛生学教室で飼育している無菌メス BALB/cA マウス12匹にケルセチン代謝菌 *Bacterium 19-20*、フラクトオリゴ糖を資化して短鎖脂肪酸產生可能な *Bifidobacterium pseudocatenulatum* JCM1200<sup>T</sup>、フラクトオリゴ糖を資化しないが短鎖脂肪酸は產生する *Limosilactobacillus reuteri* JCM1112<sup>T</sup> と *Escherichia coli* JCM2013を嫌気性希釈液に懸濁して経口投与し、3週間滅菌 CMF ベレットで飼育してから、6匹ずつ二群に分け、一方には、0.05% ケルセチン添加滅菌ベレット食を給与し（対照群）、他方には、0.05% ケルセチン-3% フラクトオリゴ糖添加ペレット食を給与し（フラクトオリゴ糖群）、3週間アイソレータ内で飼育した。飼育試験終了後、解剖を行い、血糖値、肝脂質、内臓脂肪重量等を測定し、盲腸内容物中の短鎖脂肪酸濃度、血漿のケルセチンとその代謝産物を定量した。また、肝臓組織から RNA を抽出し、遺伝子発現解析を行った。

### III. 結果および考察

血漿イソラムネチン（ケルセチン代謝物）濃度は、対照群に比べて、フラクトオリゴ糖群で有意に高い結果となった (Figure 1)。肝脂質は、二群間で有意差は認められなかった。血糖値についても二群間で有意差は認められなかった。盲腸内容物の短鎖脂肪酸濃度は、フラクトオリゴ糖群は対照群に比べて、酢酸濃度が高い傾向が認められた (Figure 2)。*B. pseudocatenulatum* の菌数は、フラクトオリゴ糖群で有意に高く、フラクトオリゴ糖群の盲腸内容物の酢酸濃度の高さは、*B. pseudocatenulatum* が產生する酢酸が寄与している可能性が示唆された。盲腸内容物の酢酸濃度と血漿ケルセン代謝物イソラムネチン濃度との間には有意な正の相関が認められた (Figure 3)。血漿イソラムネチン（ケルセチン代謝物）

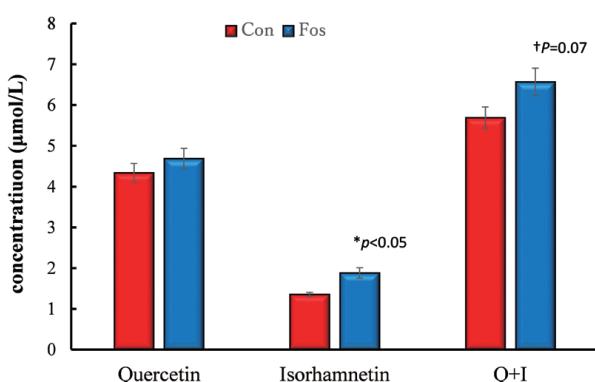


Figure 1. Plasma quercetin and isorhamnetin metabolites in the Fos (Fructooligosaccharides) and Con (Control) groups. Q+I indicate (Quercetin+Isorhamnetin), \* $p<0.05$ , † $p=0.07$

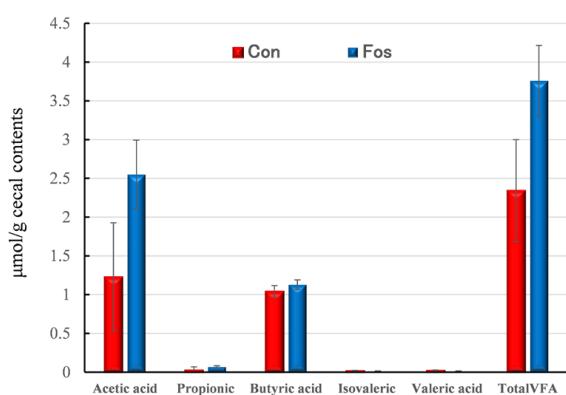


Figure 2. Cecal short-chain fatty acids in the Fos (Fructooligosaccharides) and Con (Control) groups.

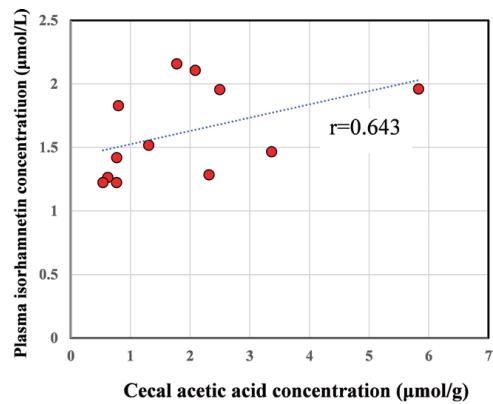


Figure 3. Results of correlation analysis between plasma isorhamnetin and cecal acetic acid concentration: A significant positive correlation was observed between plasma isorhamnetin and cecum content acetic acid concentration.

濃度はケルセチン代謝菌 *Bacterium 19-20* の菌数と負の相関 ( $r=-0.903$ ) が認められ、ケルセチン代謝菌 *Bacterium 19-20* が血漿ケルセチン代謝物濃度の減少に関連している可能性が示唆された。また、盲腸内容物中のケルセチン代謝菌 *Bacterium 19-20* の菌数は対照群に比べてフラクトオリゴ糖群で有意に低値を示した。ケルセチン代謝菌 *Bacterium 19-20* の菌数は、盲腸内容物の酢酸濃度と有意な負の相関を示したことから、盲腸内容物の酢酸はケルセチン代謝菌 *Bacterium 19-20* の増殖を抑制する可能性が考えられた。肝臓の遺伝子発現解析では、肝臓の IL-10 の遺伝子発現がフラクトオリゴ糖群で有意に高く、脂質代謝関連遺伝子の FASN, ACC, ChREBP は低い傾向が認められた。フラクトオリゴ糖摂取で血漿ケルセチン代謝産物濃度が有意に高く、盲腸内容物中の酢酸レベルが高く、盲腸内容物中の酢酸濃度と血漿ケルセン代謝物イソラムネチン濃度との間に有意な正の相関が認められ、盲腸内容物の酢酸濃度とケルセチン代謝菌 *Bacterium 19-20* の菌数とに負の相関が認められたことから、腸内菌叢の產生する酢酸がケルセチン分解が抑制されてケルセチンの吸収が低下した可能性が考えられる。一方、フラクトオリゴ糖は、ミネラル等の吸収を促進する<sup>4</sup>ことから、フラクトオリゴ糖摂取で生じた酢酸がケルセチンの吸収促進に寄与した可能性も考えられた。

## Effect of fructooligosaccharide intake on plasma quercetin in quercetin-metabolizing gnotobiotic mice.

MOTOI TAMURA\* and KAZUHIRO HIRAYAMA\*\*

\*Institute of Food Research, The National Agriculture and Food Research Organization, Tsukuba,

\*\*Laboratory of Veterinary Public Health, Graduate School of Agricultural and Life Sciences,  
The University of Tokyo, Tokyo

Quercetin is one of the flavonoids contained in onions and other plants and is expected to prevent lifestyle-related diseases through human<sup>1</sup> and animal<sup>2</sup> studies. It is believed that the bioavailability of functional components such as quercetin depends on individual differences in intestinal bacteria<sup>3</sup>, but it is unclear which intestinal bacteria and which coexisting foods specifically enhance the bioavailability of functional components, so a method to enhance the bioavailability of functional components through the regulation of intestinal bacteria and the intestinal environment is a challenge. The effect of fructooligosaccharide intake on plasma quercetin in quercetin-metabolizing gnotobiotic mice, in which intestinal bacteria that can and cannot capitalize fructooligosaccharide coexist, was examined. The plasma isorhamnetin (a quercetin metabolite) concentration was significantly higher in the fructooligosaccharide group than in the control group. Plasma isorhamnetin concentrations were negatively correlated ( $r=-0.903$ ) with the number of the quercetin metabolizing Bacterium 19-20. Acetic acid concentrations in cecal contents tended to be higher in the fructooligosaccharide group. A significant positive correlation was found between the concentration of acetic acid in the cecal contents and the plasma quercetin metabolite isorhamnetin, and a negative correlation was found between the concentration of acetic acid in the cecal contents and the number of the quercetin metabolizing Bacterium 19-20. It is possible that the acetic acid produced by the intestinal bacteria inhibited the growth of quercetin-metabolizing Bacterium 19-20, which suppressed quercetin degradation, resulting in decreased absorption of quercetin. On the other hand, since fructooligosaccharide promote the absorption of minerals and other substances<sup>4</sup>, it is possible that the acetic acid produced by fructooligosaccharide intake contributed to the promotion of quercetin absorption.

**Keywords:** Quercetin, Isorhamnetin, Bacterium 19-20, gnotobiotic mice, acetic acid

(Non-member collaborator: Hiroyuki Nakagawa, *Research Center for Advanced Analysis, National Agriculture and Food Research Organization, Tsukuba*)

### References

1. Lee KH, Park E, Lee HJ, Kim MO, Cha YJ, Kim JM, Lee H, Shin MJ. Effects of daily quercetin-rich supplementation on cardiometabolic risks in male smokers. *Nutr Res Pract*. 2011;5:28-33.
2. Kobori M, Masumoto S, Akimoto Y, Oike H. Chronic dietary intake of quercetin alleviates hepatic fat accumulation associated with consumption of a Western-style diet in C57BL/6J mice. *Mol Nutr Food Res*. 2011;55:530-40.
3. Tamura M, Hoshi C, Kobori M, Takahashi S, Tomita J, Nishimura M, Nishihira J. Quercetin metabolism by fecal microbiota from healthy elderly human subjects. *PLoS One*. 2017;12:e0188271. doi:10.1371/journal.pone.0188271.
4. Tahiri M, Tressol JC, Arnaud J, Bornet F, Bouteloup-Demange C, Feillet-Coudray C, Ducros V, Pépin D, Brouns F, Rayssiguier AM, Coudray C. Five-week intake of short-chain fructo-oligosaccharides increases intestinal absorption and status of magnesium in postmenopausal women. *J Bone Miner Res*. 2001;16:2152-60.

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

北条 史\* 大崎 敬子\*\*

(\*杏林大学大学院医学研究科共同研究施設部門実験動物施設部門, \*\*杏林大学医学部感染症学教室)

キーワード : *Helicobacter pylori*, 無菌マウス, 球状化, VBNC

## I. 目的

*Helicobacter pylori* は胃・十二指腸潰瘍の原因菌である他、胃がんとの関連性も指摘されている細菌である。本邦ではその除菌が保険適用となり、その病原性、治療法、耐性菌に関する研究が進んでいる一方、世界人口の半数が保菌しているとされるにも関わらず、その感染経路については全容が明らかになっていない。本菌の感染経路は、先進国での保菌率が低く発展途上国での保菌率が高いことから、衛生状態などに関連する水系一糞口感染が主な感染経路と推定されている。しかしながら河川などの水系環境やヒトを含む感染動物の糞便からは、本菌の核酸は検出されるものの、培養には成功していない。一方で本菌は通常らせん状の構造を取るが、環境条件によって球状化することがあり、この形態は VBNC (Viable But Not Culturable : 生きているが培養できない) 状態であると考えられている。仮に本菌がこの VBNC 状態として糞便中に排出されるならば、「保菌動物の糞便から培養できること」、「衛生環境の悪い地域での高い陽性率」に説明をつけることができる。

そこで本研究では球状化・VBNC 化した本菌が環境への分布に関与している可能性に着目し、無菌マウスへの感染実験を行い、生体内での *H. pylori* の生態と形態の変化について解析を行なった。

## II. 材料と方法

細菌株には *H. pylori* PMSS1 株を用いて、無菌マウス C57BL/6 [GF] に対して経口感染することで感染モデルを作成した。ビニールアイソレーター内で感染と飼育を行い、約10日後に安樂死と解剖を行なった。胃、十二指腸、小腸、盲腸、大腸を採取し、透過型電子顕微鏡と走査型電子顕微鏡で形態の解析を行なった。生態の解析はサンプルを培養法および Propidium monoazide (PMA) を用いた生菌選択的 qPCR によって行なった。本法は動物実験を行う前に in vitro で事前検討を行なった。

## III. 結果・結論

PMA は *H. pylori* PMSS1 死菌の PCR 反応を阻害し、生菌の PCR 反応は阻害しなかった。動物実験では培養法、PMA-qPCR でも胃のサンプルからのみ本菌を検出した。電子顕微鏡観察の結果、胃のサンプルからは螺旋状および球状の菌が観察された。腸管組織においては培養法や PMA-qPCR、電子顕微鏡でも菌体は検出されなかった。

*H. pylori* は胃に定着しながら形態や生態をえるものの、腸管内にはほとんど定着せずに排出されることが示唆された。

## The ecology and morphology of *Helicobacter pylori* in germ-free mice

FUHITO HOJO\*, TAKAKO OSAKI\*\*

\*Institute of Laboratory Animals, Graduate School of Medicine, Kyorin University, Tokyo

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

**Keywords:** *Helicobacter pylori*, germ-free mice, coccoid form, VBNC

*Helicobacter pylori* is a bacterium that causes stomach and duodenal ulcers, and there have recently been reports of a link between it and stomach cancer. The main route of infection is thought to be water-fecal infection related to hygiene conditions as the rate of infection is low in developed countries and high in developing countries. On the other hand, this bacterium usually has a spiral structure, but under certain environmental conditions it can become coccoid, and this form is thought to be a VBNC (Viable But Not Culturable) state.

In this study, we focused on the possibility that coccoid and VBNC *H. pylori* is involved in the distribution of the bacteria in the environment and conducted an infection experiment using germ-free mice to analyze the ecology and morphological changes of *H. pylori* in the body.

The mice were infected and raised in a vinyl isolator and were euthanized and dissected about 10 days later. The stomach, duodenum, jejunum, ileum, cecum, and colon were collected and analyzed for morphology using transmission and scanning electron microscope. The ecology was analyzed using a culture method and a live-cell selective qPCR method using propidium monoazide (PMA).

The culture method and PMA-qPCR detected the bacteria only from the stomach samples. Electron microscopy revealed the presence of spiral and coccoid bacteria in the stomach samples. In intestinal tissue, no bacteria were detected by culture, PMA-qPCR or electron microscopy.

It was suggested that *H. pylori* changes its morphology and biology while colonizing the stomach, but is almost never colonized in the intestinal tract and is expelled.

# 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

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)

**要 旨：** フィターゼは動物飼料添加物として用いることで飼料中のフィチン酸を分解し、豚などのフィチン酸を利用できない動物のリンの有効利用に寄与する。本試験では生菌剤である *Clostridium butyricum* MIYAIRI 588(CBM588)との相乗効果を期待し、フィターゼおよびCBM588を配合した飼料添加物(MPH)の肥育豚への長期給与試験を実施し、MPH 添加が飼養成績、肉質および腸内細菌叢に与える影響を評価した。その結果、MPH 添加群において一日平均増体量および飼料要求率の有意な改善が確認され、また、肉質についても改善傾向が確認された。さらに腸内細菌叢を比較解析した結果、MPH 添加群において乳酸產生菌や酪酸產生菌の占有率が有意に増加することが確認された。以上の結果から、MPH 添加はリンの吸収促進に加えて、腸内細菌叢に影響を与えることで飼養成績の改善に寄与する可能性が示唆された。

**キーワード：** フィターゼ, CBM588, 飼養成績, 腸内細菌, 豚

## I. 背景と目的

近年、リンによる環境汚染やリン資源の枯渇が世界的に問題となっている<sup>1</sup>。人工排水や土壤に蓄積したリンが雨水によって海に流れ出ることで、海洋中のリンが過剰となり赤潮を引き起こして海洋生物へ打撃を与える環境汚染が問題となっている。さらに、このリンの海洋流出に伴い、人類が利用可能なリン資源は早ければ100年程度で枯渇してしまうという悲観的な予測がなされている。このような現状から各業界においてリンの効率的な利用が求められている。

畜産業界においてもリンの効率的な利用が求められており、フィターゼと呼ばれる酵素が飼料添加物として注目されている<sup>2</sup>。フィターゼは飼料中に豊富に含まれるフィチン酸のリン酸エステルを加水分解する酵素であり、本酵素を持たない豚や鶏などの畜種において、飼料からの有効的なリンの利用を可能とする<sup>3</sup>。また、フィターゼによるフィチン酸の加水分解後にはイノシトールやアミノ酸、タンパク質、微量元素などの他の栄養成分も遊離することが知られており、タンパク質などの高分子化合物はさらに細菌によって分解されることで、宿主の栄養として効率的に利用されることが

期待される。そこで、本研究ではフィターゼと生菌剤である *Clostridium butyricum* MIYAIRI 588 (CBM588)の相乗効果を期待し、両成分を配合した飼料添加物(ミヤフォス®E (以下、MPH))が肥育豚の飼養成績に与える影響を評価した。これまでに育成期仔豚に対する21日間のMPHの給与が飼養成績の改善および骨密度の上昇に寄与することを報告しているが、肥育期豚に対する離乳後から出荷までの長期給与の影響は明らかになっていない。そこで、本研究では子豚の導入期から精肉加工のための出荷に至るまでの長期間にわたるMPHの給与が肥育豚の飼養成績と腸内細菌叢および肉質に及ぼす影響を検証した。

## II. 材料と方法

50日齢のDanbred (Landrace×Large White) × Durocの仔豚を19頭導入し24日間の馴致飼育後、無機リンの使用を抑えたリン欠乏飼料を基礎飼料とし、コントロール群(リン欠乏飼料群)、0.1%MPH給与群(0.1%MPH群)、0.5%MPH給与群(0.5%MPH群)およびリン酸カルシウム0.4%給与群(通常飼料群)の4群に分け、100日間給餌を行った(Fig. 1)。群分けは体重を第一要

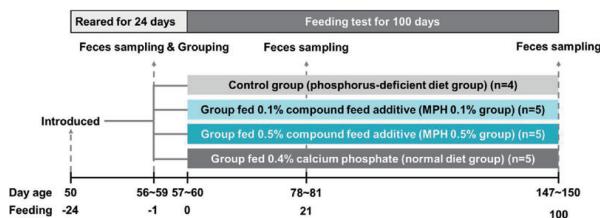


Fig. 1. Trial design

因とし群間で有意差が無いことを確認し、母豚および性別に関しても偏りがないように群分けした。毎週体重測定を行い、試験開始前日、21日目および100日目の3時点で糞便をサンプリングした。サンプリングした糞便からDNAを抽出後、次世代シーケンサーを用いてV3-V4領域を標的とした16S rDNA菌叢解析を実施した<sup>4</sup>。また、試験終了後に豚を屠畜し、剪断力価や破断応力などの肉質解析を実施した<sup>5</sup>。菌叢解析に関するデータは、Mann-Whitney U testにて有意差検定を行い、肉質解析に関するデータは、Tukey-Kramer法にて有意差を確認した。

### III. 結果と考察

最終体重測定日である91日時点の飼養成績を評価した結果、一日平均増体量はリン欠乏飼料群と比較し

0.1%MPH群では1.32倍( $p=0.045$ )、0.5%MPH群では1.40倍( $p=0.012$ )、通常飼料群では1.33倍( $p=0.029$ )と有意な増加が確認された。さらに0.5%MPH群ではリン欠乏飼料群と比較し飼料要求率が0.84倍( $p=0.020$ )に抑えられ、有意な飼料要求率の改善も認められた。また、肉の柔らかさや噛み切りやすさの指標である破断応力および剪断力価は、通常飼料群に対して数値が悪化したリン欠乏飼料群と比較し、0.1%および0.5%MPH群では改善する傾向が確認された。さらに糞便の菌叢解析を行ったところ、0.5%MPH群において*Lactobacillus*などの乳酸産生菌や酪酸産生菌である*Terrisporobacter*の占有率が有意に増加していることが確認された。以上の結果から、MPHの長期給与は腸内細菌叢の改善およびリンの吸収促進の両面から飼養成績を改善する可能性が示唆された(Fig. 2)<sup>2, 6, 7</sup>。

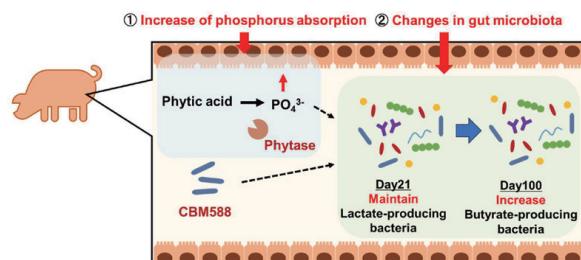


Fig. 2. Estimated mechanisms of MPH on feeding performance

## Effect of long-term feeding of feed additives containing butyric acid bacteria and phytase on feeding performance of fattening pigs

YUKI SUZUKI \* , MAKI HIRATA \*\*,\*\*\*,\*\*\*\*, CHIKA YOSHIDA \*,\*\*\* ,  
TADASHI ARIYOSHI \*, KENTARO OKA \*,\*\*\* , MOTOMICHI TAKAHASHI \*,\*\*\* and  
FUMIKI MORIMATSU \*\*\* ,\*\*\*\*

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

\*\* Bio-Innovation Research Center, Tokushima University, Tokushima

\*\*\* Technology of Animal Production Laboratory, Tokushima University, Tokushima

\*\*\*\* Faculty of Bioscience & Bioindustry, Tokushima University, Tokushima

Undigested feed components in the digestive tract of pigs are known to worsen gain and feed conversion ratio. The gut microbiota is also known to be involved in feed digestion. In this study, feed additives containing *Clostridium butyricum* MIYAIRI 588 (CBM588) and phytase, an enzyme that digests phytic acid ("compound feed additive") were fed to piglets from introduction to shipment, and their feeding performance, gut microbiota, and meat quality were tested.

Twenty 50-day-old Danbred x Duroc piglets were introduced and reared for 24 days, then divided into four groups: a control group fed a phosphorus-deficient diet (phosphorus-deficient diet group), a group fed 0.1% (0.1% group) and 0.5% (0.5% group) of a compound feed additive, and a group fed 0.4% calcium phosphate (normal diet group) and fed for 100 days.

Evaluation of the 91-day results indicated that the 0.1%, 0.5%, and normal diet groups showed significant increases in average daily body weight gain compared to the phosphorus-deficient group. In addition, the 0.5% group showed a significant improvement in feed conversion ratio compared to the phosphorus-deficient group. Results of meat quality analysis showed a trend toward improved tender meat quality in the 0.1% and 0.5% groups compared to the phosphorus-deficient diet. Furthermore, analysis of fecal microbiota showed a trend towards increased occupancy of *Lactobacillus* spp. and butyrate-producing bacteria in the 0.5% group, suggesting a beneficial effect of compound feed additive on feeding performance of fattening pigs.

**Keywords:** Phytase, CBM588, feed conversion ratio, microbiota

### References

1. Cordell D, Drangert J, White S. The story of phosphorus: global food security and food for thought. *Glob Environ Change*. 2009;19:292-305.
2. EFSA Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP), Rychen G, Aquilina G, Azimonti G, Bampidis V, Bastos ML, Bories G, Chesson A, Flachowsky G, Gropp J, Kolar B, Kouba M, López-Alonso M, López Puente S, Mantovani A, Mayo B, Ramos F, Saarela M, Villa RE, Wallace RJ, Wester P, Brantom P, Dierick NA, Glandorf B, Herman L, Kärenlampi S, Aguilera J, Anguita M, Cocconcelli PS. Safety and efficacy of Natuphos® E (6-phytase) as a feed additive for avian and porcine species. *EFSA J*. 2017;15(11):e05024. doi:10.2903/j.efsa.2017.5024.
3. 斎藤守. 豚におけるフィターゼの利用によるリン排泄量の低減とフィターゼの効果的利用法. 栄養生理研究会報. 1998;42:141-54.
4. Klindworth A, Pruesse E, Schweer T, Peplies J, Quast C, Horn M, Glöckner FO. Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Res*. 2013;41(1):e1. doi:10.1093/nar/gks808.
5. American Meat Science Association. Research guidelines for cookery, sensory evaluation, and

- instrumental tenderness measurements of meat. Champaign: American Meat Science Association; 2015.
6. 設樂修, 忽那圭子. 抗菌性物質無添加飼料への乳酸菌製剤添加が子豚の発育, 血液性状および糞便内細菌数に及ぼす影響. 日豚会誌. 2009;46(3):144-51.
  7. Barba-Vidal E, Castillejos L, Roll VF, Cifuentes-Orjuela G, Muñoz JAM, Martín-Orué SM. The probiotic combination of *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* CECT 7210 and *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BPL6 reduces pathogen loads and improves gut health of weaned piglets orally challenged with *Salmonella Typhimurium*. Front Microbiol. 2017;8:1570.

## 原稿執筆要綱

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

注1 電子データを下記アドレス宛にお送りください。

日本無菌生物ノートバイオロジー学会事務所

jagg@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 ICI 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, 本文中に記入す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, µm, nm, l, ml, µl, kg, g, mg, µg, ng, pg.
5. References should be cited in the text using superscript Arabic numbers, in order of appearance. In the reference list, the references should be numbered, followed by authors (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

### REVIEW

<i>Helicobacter pylori</i> and Germ-free Animals: The specificity of infection responses resulting from the absence of microbiota <i>Fuhito Hojo</i> .....	31
---	----

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

Eosinophilic Chronic Rhinosinusitis Induces dysbiosis of the nose and gut microbiota in mice <i>Ryuichi Imai, et al.</i> .....	39
Effect of vitamin K supplementation on testicular testosterone production in a rat model of late-onset hypogonadism <i>Rui Murakami, et al.</i> .....	41
The intestinal bacteria modulate commensal bacteria-reactive IgG2b production in the blood. <i>Hiraku Okada, et al.</i> .....	43
Effect of bifidobacteria on aggressive behavior of mice early in life <i>Kyuta Hanawa, et al.</i> .....	46
Elucidation of sex differences in susceptibility to vitamin K deficiency in rats <i>Yuta Tanno, et al.</i> .....	50
Effect of fructooligosaccharide intake on plasma quercetin in quercetin-metabolizing gnotobiotic mice. <i>Motoi Tamura and Kazuhiro Hirayama</i> .....	53
The ecology and morphology of <i>Helicobacter pylori</i> in germ-free mice <i>Fuhito Hojo and Takako Osaki</i> .....	56
Effect of long-term feeding of feed additives containing butyric acid bacteria and phytase on feeding performance of fattening pigs <i>Yuki Suzuki, et al.</i> .....	58

### GUIDELINE FOR AUTHORS

Guideline for Authors
-----------------------