

第 87 回麻布獣医学会 一般演題 18

本学での無菌マウス用アイソレータの立ち上げと ノトバイオート化マウスによる研究成果

高畑 宗明, 竹尾 淳, 友清 帝, 中野 章代, 森田 英利

麻布大学獣医学部動物応用科学科食品科学研究室

ヒトをはじめとする哺乳動物の消化管内には、100兆個以上にもおよぶ腸内細菌の細胞（腸内細菌叢）が存在する。腸内細菌叢についての研究の進展により、腸内細菌叢の宿主への健康増進作用が明らかになるとともに¹⁾、肥満やメタボリック症候群などの生活習慣病^{2,3)}、アレルギー・炎症性腸疾患などの免疫疾患や各種感染症の誘発⁴⁾、腸内細菌叢と脳の発達との関連^{5,6)}などが報告されている。

一方、ある1つの要因に対する基礎研究において、実験動物のもつ腸内細菌叢の個体差によって、得られた実験結果が考察し難い事実も見受けられる。また、TCR β とp53遺伝子ダブル・ノックアウトによる腺癌自然発症マウスにおいて、そのマウスを無菌化すると腺癌を自然発症しなくなる⁷⁾のは、非常に興味深い知見である。すなわち、細菌叢のなかの細菌同士は勿論、細菌叢と宿主細胞間で相互作用することにより、「超有機体 (superorganism)」と称される腸内共生環境を形成しているので、実験動物を用いた種々の研究において細菌叢を考慮した解析も見受けられようになった。

そこで、近年、無菌マウスやノトバイオート化マウス（単独・複数を問わず細菌叢が明らかなマウス）を用いた研究が盛んに行われるようになってきている。演者らは、すでに、乳酸菌による *in vivo* での抗菌物質ロイテリンの産生と検出⁸⁾、ビフィズス菌の産生する酢酸による O157 感染防御¹⁾、Th17 を特異的に誘導する腸管免疫系に重要な役割を果たすセグメント細菌 (SFB) のゲノム解析⁹⁾ において、ノトバイオート化マウスを用いた研究成果を報告してきた。その実験系

の有用性と実施経験を生かして、本学に無菌マウスを導入し、そのノトバイオート化の立ち上げに成功したので、実務作業と本学飼育環境で得られた知見について報告する。

生物科学総合研究所内に無菌を維持するためのビニール性アイソレータを設置し、過酢酸により内部を入念に噴霧して一晩、滅菌した。空気は施設内のオートクレーブ (121°C, 30 分間) により滅菌したフィルターを通して循環させることで、アイソレータ内の無菌状態を維持した。床敷き、飲用水、糞便回収用 1.5 ml チューブ、胃ゾンデ、その他の実験道具はオートクレーブ (125°C, 70 分間) により滅菌し、アイソレータに連結して内部に移動させた。一連の作業は、過酢酸による滅菌した状態で行った。マウスの餌は 50 kGly で照射した市販の γ 線照射滅菌飼料を使用し、自由摂取させた。

無菌化された BALB/cCr [GF] マウスは、三協ラボサービス株式会社から購入した。まず、無菌マウスが入ったコンテナを過酢酸により滅菌してアイソレータに連結し、アイソレータ内のケージに移動させた。無菌マウスをケージに移して 1 週間の馴らし期間後に、目的のノトバイオート化を図った。ノトバイオート化のためのサンプルにはヒト由来サンプルおよび牛ルーメン内容物を用い、アイソレータ内に無菌的に搬入し、各サンプルを 200 μ l ずつ、胃ゾンデにより無菌マウスの胃内に投与した。ノトバイオート化マウスから、1 週間ごとに糞便を採取した。新鮮な糞便を 1 匹につき約 0.02 g ずつ採取して糞便中の全ゲノム DNA 抽出を行い、接種前の各サンプルと、それぞれのノト

バイオート化後のマウス消化管に定着した細菌叢を、メタ 16S rRNA 解析により比較した。今後、ノトバイオート化マウスの栄養学および免疫学的な解析を行い、マウス消化管内に定着した細菌との相関を考察していきたい。

【文献】

- 1) Fukuda and Morita et al., Bifidobacteria can protect from enteropathogenic infection through production of acetate, *Nature*, 469: 543-547 (2011).
- 2) Turnbaugh et al., A core microbiome in obese and lean twin, *Nature*, 457: 480-484 (2009).
- 3) Herbert et al., Gut microbiome, obesity, and metabolic dysfunction, *J Clin Invest.*, 121: 2126-2132 (2011).
- 4) Kawamoto et al., The inhibitory receptor PD-1 regulates IgA selection and bacterial composition in the gut, *Science*, 336: 485-489 (2012).
- 5) Diaz et al., Normal gut microbiota modulates brain development and behavior, *Proc Natl Acad Sci.*, 108: 3047-3052 (2011).
- 6) Collins et al., The interplay between the intestinal microbiota and the brain, *Nature Reviews Microbiology*, doi:10.1038/nrmicro2876 (2012).
- 7) Kado et al., Intestinal microflora are necessary for development of spontaneous adenocarcinoma of the large intestine in T-cell receptor beta chain and p53 double-knockout mice, *Cancer Res.*, 61: 2395-2398 (2001).
- 8) Morita et al., Comparative genome analysis of *Lactobacillus reuteri* and *Lactobacillus fermentum* reveal a genomic island for reuterin and cobalamin production, *DNA Res.*, 15: 151-161 (2008).
- 9) Prakash and Morita et al., Complete genome sequences of rat and mouse segmented filamentous bacteria, a potent inducer of th17 cell differentiation, *Cell Host & Microbe*, 10: 273-284 (2011).