

幼少期の行動発達における腸内細菌叢の役割解明  
(The elucidation of the role of gut microbiota in  
behavioral development during early life period)

論文内容要約

麻布大学大学院 獣医学研究科  
動物応用科学専攻 博士後期課程  
伴侶動物学

DA1701 上村 いつか

第1章の内容は学術ジャーナルへの掲載予定のため一部省略とする

第1章 実験1：早期離乳による行動および細菌叢構成変化の解析

- ・結果（原版ページ 15-16）
- ・図表の一部(原版ページ 20-28)

第1章 実験2：無菌マウスを用いた細菌叢による行動発現変化の実証

- ・結果（原版ページ 32-34）
- ・図表の一部(原版ページ 41-47)

## 目次

要旨	1
英語要旨	3
総合緒言	6
第1章 早期離乳による行動発達変化における腸内細菌叢の関与	
緒論	8
実験1：早期離乳による行動および細菌叢構成変化の解析	
材料と方法	10
1 供試動物	10
2 離乳操作	10
3 行動実験	11
4 糞便サンプリング	11
5 糞便内の細菌ゲノム抽出	12
6 16S rRNA 遺伝子のシーケンスによる腸内細菌叢分析	12
7 統計	13
結果(省略)	
1 早期離乳による行動表現型の変化	
2 早期離乳による細菌叢構成変化	
図表 (一部省略)	14
実験2：無菌マウスを用いた細菌叢による行動発現変化の実証	
材料と方法	15
1 供試動物	15
2 行動実験	16
3 糞便内の細菌ゲノム抽出	16
4 16S rRNA 遺伝子のシーケンスによる腸内細菌叢分析	16
5 フローサイトメトリー	16
6 統計解析	17
結果(省略)	
1 行動表現変化に対する早期離乳細菌叢の影響	
2 早期離乳細菌叢マウスの細菌叢構成解析	
3 免疫細胞のプロファイリング	
考察	18
図表 (一部省略)	23

第2章 母性行動の世代間伝播における腸内細菌叢の関与	
緒言	25
材料と方法	26
1 供試動物	26
2 母性行動解析	26
3 糞便採取	27
4 網羅的細菌叢解析	27
5 統計解析	27
結果	28
1 腸内細菌叢による母性行動表現型への影響	28
2 早期離乳細菌叢マウスの細菌叢構成解析	28
考察	29
図表	31
第3章 性発達における腸内細菌叢の関与	
緒言	36
材料と方法	38
1 供試動物	38
2 糞中ステロイド測定	38
3 Odor preference test	39
4 統計解析	40
結果	41
1 糞中ステロイド測定	41
2 Odor preference test	42
3 生殖器の重量	42
考察	43
図表	47
総合考察	60
謝辞	63
参考文献	64

本論文の一部は以下に公表した。

Kamimura I, Watarai A, Takamura T, Takeo A, Miura K, Morita H, et al. Gonadal steroid hormone secretion during the juvenile period depends on host-specific microbiota and contributes to the development of odor preference. *Dev Psychobiol.*, Jan 24., 2019,

## 要旨

哺乳類では通常よりも早く離乳(EW)されることによって、成長後に不安行動や攻行動が増加し、ストレス反応が増強することなどが示されている。さらにこの早期離乳によるストレス応答の増強や行動異常は、早期離乳された個体の子孫にまで伝播するとも示唆されている。また、早期離乳を含む幼少期ストレスの曝露は、免疫機構を変化させ、病気に対する脆弱性を高める。近年、発達期における腸内細菌叢の構成が、正常なストレス応答や免疫機能の確立、さらに神経発達に大きく寄与するという報告が増加していることから、子にとって大きなストレスともなる EW が腸内細菌叢の構成変化を誘発して成長後の変化を引き起こしていること、またその腸内細菌叢の垂直伝播によって EW の影響が次世代に伝承されると仮説を立てた。これを実証するために、第 1 章では、EW マウスの不安行動とうつ様行動を調査し、その行動変化に腸内細菌叢が関与するかを無菌マウスを利用して調べた。EW マウスは通常離乳(NW)されたマウスと比較し、Marble burying test と Open field test において多動であった。Tail suspension test における不動時間の結果から、EW によって雌マウスではうつ様行動が高まり、雄マウスではうつ様行動が低くなることか示唆され、EW による行動表現型変化には性的特異性があった。これらの EW マウスの腸内細菌叢を投与された無菌マウス(GF-EW マウス) は、4 週齢時に多動になり高いうつ様行動を示した。腸内細菌叢構成解析の結果、NW マウス糞便由来細菌叢を投与されたマウス(GF-NW マウス)と GF-EW マウスの腸内細菌叢の構成は異なっていた。また、免疫細胞の発現プロファイルを計測した結果、GF-EW マウスでは脾臓における CD4 陽性 T 細胞の細胞数が低下していた。これらのことは、EW による行動発達および免疫系の変化には腸内細菌叢の変化が関与することを示唆している。

これまでの研究から EW マウスでは母性行動の中でも仔マウスへ示すリッキングやグルーミングの割合が低下することが知られている。さらに EW マウスに育てられた次世代マウスが成体になった時も、母と同様の低い母性行動を示すことが分かってきており、母性行

動の次世代伝承が示唆される。第 2 章では、第 1 章と同様に無菌マウスに EW マウス細菌を定着させて母性行動を観察し、EW による母性行動変化への細菌叢の関与を調べた。その結果、GF-NW マウスと比較して、GF-EW マウスではリッキングやグルーミングの割合が低下する傾向があり、巣の出入り回数が多かった。これらのことは、EW マウスで見られる低い母性行動の次世代への伝播にも腸内細菌叢の変化が関与することを示唆している。

第 2 章では細菌叢構成によって母性行動が変化することが示唆されたが、細菌叢の構成変化によってそもそも母性発現の基盤となる性成熟が影響を受けた可能性も考えられる。第 3 章では、性成熟に対する腸内細菌叢の影響を調査することを目的とした。4 週齢の無菌マウスに SPF マウスまたはモルモットの糞便由来細菌叢を投与した各細菌叢マウス(GF-SPF or GF- Guinea pig)を作出した。その雌の糞中ステロイドホルモン(エストラジオール、プロゲステロン、コルチコステロン)の濃度を 8 週齢まで継時的に測定した。また、これらの雌マウスが雌雄どちらの匂いを選択するかのテストも実施した。その結果、無菌マウスのステロイドホルモンレベルは SPF マウスよりも顕著に低く、SPF マウスでみられる週齢によるホルモンレベルの増加もなかった。GF-SPF マウスでは、SPF マウスと類似したホルモン変動がみられたが、GF-GP マウスのホルモンレベルはそれよりも低かった。また興味深いことに、無菌マウスは他のマウスと異なり、雌が雄の匂いを選択しなかった。これらのことから、腸内細菌叢は性成熟に影響をおよぼすことが明らかとなった。

以上の結果は、EW ストレスが腸内細菌叢の構成変化を誘発して行動や内分泌系、また免疫系に対して変化を引き起こしていることを示唆している。また、本研究は腸内細菌叢の垂直伝播によって EW の影響が次世代に伝承される可能性も示した。

## 英語要旨

It has been shown that early weaning induce various developmental effects and the early-weaned mice (EW mice) show increased anxiety, the enhancement of the stress response of hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis, and reduced maternal behavior in their adulthood. It has also known that early life stress including early weaning impacts the immune system and therefore increases vulnerability to infection. Interestingly, offspring of the EW mice shows the enhanced stress response of HPA axis and behavioral changes similarly with the EW mice. In addition, many studies has recently reported that composition of gut microbiota at juvenile period affects the development of both the nervous and immune system. Here, we hypothesized that early weaning modulates the gut microbiota composition and then affects the development of the nerve and/or immune system. In addition, the influence of early weaning could be transmitted to the next generation by vertical transmission of the modulated gut microbiota. To test these hypotheses, in the chapter 1, we observed the change of anxiety and depression-like behaviors in EW mice and then examined the involvement of gut microbiota in their behavioral changes using Germ-free (GF) mice. As results, EW mice showed high hyperactivity in both the marble burying test and the open field test. In tail suspension test, the higher depression-like behavior was found in EW females but lower depression-like behavior in EW males, suggesting the sex difference in the effect of early weaning on depression-like behavior. In the test using GF mice, the depression-like behavior in GF mice colonized with gut microbiota of EW mice (GF-EW mice) was higher as compare with GF mice colonized with NW mice (GF-NW mice). We also analyzed the number of immune cells in the spleen, Peyer's patches and mesenteric lymph nodes when GF-EW and GF-NW mice were 10week of age. GF-EW mice had a decreased number of



CD4<sup>+</sup> T cells in the spleen. These results suggest that the gut microbiota is involved in the developmental effects of early weaning to depression-like behavior and immune system.

Previous studies have suggested that the maternal behavior is affected by early weaning, EW mice show a lower frequency of licking/grooming. Since the offspring of EW mice similarly show lower maternal behavior, the trait of maternal behavior is also considered to be transmitted to the next generation. In the chapter 2, in order to elucidate the involvement of gut microbiota in the change of maternal behavior by early weaning, we compared the maternal behavior between the GF-EW mice and GF-NW mice. As results, GF-EW mice tended to have a lower licking and grooming rate, and the frequency of exiting the nests was significantly higher. Thus, it is suggested that the vertical transmission of microbiota may be involved in the intergenerational transmission of the traits of maternal behavior.

If the traits of maternal behavior and its intergenerational transmission are affected by gut microbiota as suggested in the chapter 2, there is a possibility that the sexual maturation during juvenile is initially affected by gut microbiota. The experiments in the Chapter 3 was aimed to investigate the effects of gut microbiota on sexual maturation. We administered the fecal microbiota of SPF mice or guinea pigs to female GF mice at 4 weeks old (GF-SPF mice or GF-Guinea pig mice). We investigated chronological changes of levels of gonadal hormones and corticosterone in the feces of 4–8-week-old female GF, SPF, GF-SPF and GF-guinea pigs mice. In each group of mice, odor preference test was conducted at 8 weeks of age. As results, fecal steroid hormone levels of GF mice were lower than those of SPF mice, fecal level of estradiol in SPF mice increased at about 6 weeks of age. The colonization of microbiota of SPF mice or guinea

pigs with GF mice increased the steroid hormone levels. However, the degree of recovery of progesterone and corticosterone by microbiota of guinea pigs was lower than that by GF mice. In odor preference test, interestingly, female GF mice preferred female odors to male odors, although this preference was not seen in other mice. These suggest that the gut microbiota affects sexual maturation.

In conclusion, these findings suggest that early weaning modulates the gut microbiota composition, and this plays an important role in the developmental changes of the endocrine, nerve and immune system in the EW mice. In addition, our study also suggest that the some behavioral traits could be transmitted intergenerational by vertical transmission of gut microbiota.

## 総合緒言

動物の腸管には、数にして 100 兆、種類にして 500-1000 からなる細菌群(腸内細菌叢)が生息しており、宿主の腸管免疫と相互作用することによって複雑な生態系を形成している<sup>(1)</sup>。腸内細菌叢は短鎖脂肪酸、ビタミン B、ビタミン K などのさまざまな栄養素を生成し、宿主の代謝に貢献する<sup>(2)</sup>。哺乳類は胎盤形成を介して胎児を育て、出産に至る。胎児は無菌環境下で育つが、出産時に母体の産道を通る際に、母親の膣や肛門の細菌に曝露されることで、新生児の細菌叢が形成されていく。新生児の腸内細菌叢のコロニー形成は出産様式(自然分娩か帝王切開)、摂食様式(母乳か人工乳)に影響されることが知られており、帝王切開による母親の産道の膣細菌叢の曝露の機会を奪うことや妊娠中期・後期の妊婦に抗生物質を飲ませることによって、子の出生後の疾患のリスクの上昇することが知られている<sup>(3-7)</sup>。近年、この脳と腸の相互作用が注目されており、腸内細菌叢が神経伝達物質や迷走神経、細菌由来代謝産物を介することで宿主の行動や内分泌系に影響をすることが明らかにされつつある<sup>(8-11)</sup>。妊娠期母マウスへの抗生物質投与によって腸内細菌叢の構成を攪乱すると、産まれた仔マウスの不安行動が増加することや<sup>(12)</sup>、無菌マウスの過剰なストレス応答性は、SPF マウスの腸内細菌叢を発達期に投与することで減弱化するが、成熟した無菌マウスへの投与ではその効果が認められないことなどが報告されており<sup>(13)</sup>、腸内細菌叢の影響は発達期で特に大きいことが示唆されている。

本研究では、腸内細菌叢が発達期宿主の行動および内分泌系へおよぼす影響を解明することを目的に、第一章では幼少期のストレスによる行動表現型や免疫の発達変化と腸内細菌叢との関連を、第二章では母性行動の次世代伝承における腸内細菌叢の垂直伝播の関与を、第三章では腸内細菌叢の性成熟に対する役割について検討した。

## 第 1 章

早期離乳による行動発達変化における腸内細菌叢の関与

## 緒言

哺乳類の新生児の発育における母子関係は、栄養や身体的接触だけではなく、行動や内分泌、神経発達において重要である。幼少期ストレス曝露や母親の不十分な養育は、成長後の行動障害や認知障害、ストレス反応の増強につながる<sup>(14-17)</sup>。そして、これらの行動および神経内分泌の変化は、成長後も持続し、これらに関与する中枢神経系のエピジェネティックな変化が観察されている<sup>(15,18)</sup>。さらに、幼少期ストレスは自然免疫並びに獲得免疫に対して影響を及ぼす。たとえば、豚における早期離乳ストレスはマイトジェン誘導性 T 細胞の増殖を抑制し、細菌感染のモデルであるリポポリサッカライド(LPS)投与に対して神経内分泌反応を増強し、嘔吐や下痢、傾眠の発症率を高める<sup>(19)</sup>。これらのことから、幼少期のストレスは免疫、行動および神経発達において非常に重要であることがいえる。

幼少期ストレスは、幼少期ストレスをうけた個体の発達に悪影響をもたらすだけではなく、次世代の子孫にまで影響をもたらす可能性が示されている<sup>(20-22)</sup>。幼少期ストレスの伝播には、遺伝的メカニズム<sup>(23)</sup>と非遺伝的なメカニズムがある<sup>(20,24,25)</sup>。新生児の期における母親からの養育行動は、仔の神経発達を司る遺伝子のプロモーターをメチル化し、行動を変化させる<sup>(26,27)</sup>。また、近年腸内細菌叢が宿主の行動、情動を調節するという報告が増えている。たとえば、無菌(GF: Germ-free)マウスの過剰なストレス応答性は、SPF マウスの腸内細菌叢を発達期に投与することで減弱化するが、成熟した無菌マウスへの投与ではその効果が認められないことなどが報告されていること<sup>(13)</sup>から、腸内細菌叢の影響は発達期で特に大きいことが示唆されている。新生児の腸内細菌叢は母親由来のものであり、母親由来細菌叢は正常な免疫機能の獲得や代謝、成長に不可欠である<sup>(28-31)</sup>。ヒトにおいて、帝王切開による母子間の母親由来細菌叢の伝播を阻害することによって、新生児のセリアック病や喘息、肥満、一型糖尿病のリスクを上昇させることや<sup>(5,32-34)</sup>、妊娠中期または妊娠後期に抗生物質に曝露された胎児は、出生後の小児肥満や喘息のリスクが高いことが報告されている<sup>(6,7)</sup>。また、母乳で育てられた子と比較して人工乳で育てられた子は、適切な免疫機能の発

達を損なうことが知られている<sup>(35)</sup>。乳児における腸内細菌叢のコロニー形成は神経系の発達期間と同時に起こり、神経発達において重要な役割を担っていることが考えられている<sup>(36)</sup>。妊娠期母マウスへの抗生物質投与による腸内細菌叢の攪乱は、出生後の仔マウスの不安行動が増加すること<sup>(12)</sup>や妊娠期母のストレスによる腸内細菌叢構成のバランス失調が仔の細菌叢構成と脳のアミノ酸代謝プロファイルを攪乱させる<sup>(37)</sup>。これらのことから、幼少期ストレスの伝播の方法のひとつに、幼少期ストレスによって攪乱された母マウス細菌叢の垂直伝播があると考えた。これを解明することを目的に、第 1 章の実験 1 で早期離乳マウスの行動表現型と細菌叢構成の解析を実施し、実験 2 で無菌マウスを用いた早期離乳マウスの行動表現型変化における発達期の細菌叢の影響を実証した。

## 実験 1: 早期離乳による行動および細菌叢構成変化の解析

### 材料と方法

#### 1. 供試動物

Fig1-1A に従って飼養実験を実施した。供試動物として、日本クレア株式会社より導入され、本研究室において繁殖維持された C57BL/6J 系統の雄マウスを用いた。通常離乳群は生後 28 日で離乳し(n=44)、早期離乳群は生後 16 日で離乳し(n=21)、1 ケージに同性のマウス 2-3 匹で飼育した。

全てのマウスは、12 時間の明暗周期(明期;6:00-18:00, 暗期;18:00-6:00)、一定の温度( $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ) と湿度( $50 \pm 10\%$ )に保たれた飼育室内で飼育ケージ( $17.5 \times 24.5 \times 12.5\text{cm}$ )にて床敷と (Shepherd's Cob; SHPHERD, USA)と巣材 (パルマス  $\alpha$  N; 天然素材探索研究所, Kanagawa, Japan)を敷いて飼育した。飼育中には飼育用固形飼料 (MM-3; Funabashi Farm Co., Chiba, Japan) と水は自由摂取させた。

全てのマウスは 4 週齢と 8 週齢の時に行動実験を実施し、10 週齢時に頸椎脱臼にて安楽死させた。すべての実験手順は麻布大学の倫理委員会 (#150316-3) によって承認されました。

#### 2. 離乳操作

本実験では、早期離乳群と通常離乳群を作成する為、仔マウスが 16 日齢(PD16)に達した日に新しい床敷と巣材を敷いたケージに半数の仔マウスの雌雄をわけて移し、これを早期離乳群(Early Weaning; EW)とした。もう半数の仔マウスは母マウスと共に新しい床敷と巣材を敷いたケージに移し、これを通常離乳群(Normal Weaning; NW)とした(Fig1-1B)。早期離乳群には飼育用固形飼料 (MM-3; Funabashi Farm Co., Chiba, Japan) を粉末状にしたものを与えた。

### 3. 行動実験

行動実験は、マウスが 4 週齢と 8 週齢の時に Marble burying test、Open field test、Tail suspension test の順で実施した。全てのマウスは、各試験の実験開始の 2 時間以上前に行動観察室(温度;  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ )に移され、実験環境へ馴化された。この間、全てのマウスは飼料と水を自由摂取できた。全ての試験は明期に蛍光灯下で行った。

#### 3.1. Marble burying test

深さ 3cm まで床敷(ソフトチップ; Japan SLC, Inc., Sizuoka, Japan)を敷き詰めたプラスチックケージ(17.5×24.5×12.5cm)に 5 分間マウスを馴化させた。その後、12 個のステンレス球(直径 9.58mm)を等間隔で配置した。25 分後、埋めた球の個数を記録した。また、運動活性を測定する為に、Ethovision XT ver.10 (Noldus, Wageningen, Netherlands) を用いて、マウスの移動距離を測定した。

#### 3.2. Open field test

30×30cm のオープンフィールドアリーナを、マウスは 30 分間自由に探索した。

#### 3.3. Tail suspension test

マウスの尾の先端をクリップで固定し、懸垂状態にしたマウスを 6 分間ビデオ録画した。尾をつたってクリップに登った個体を除外個体とした。録画ビデオより、Excel イベントレコーダー(東京大学獣医動物行動学研究室卒業生赤川直人氏および Chuo Ito Technoscience 山本武氏作成)を用いて、不動時間を測定した。

### 4. 糞便サンプリング

マウスが 4 週齢時(PD28)と 8 週齢時(PD56)に、オートクレーブ滅菌したエッペンチュー



ブを用いて、10:00-13:00 に肛門から直接糞便を採取した。採取した糞便サンプルは直ちにグリセロールストックを実施して、 $-80^{\circ}\text{C}$ にて保存した。

## 5.糞便内の細菌ゲノム抽出

$-80^{\circ}\text{C}$ で凍結した糞便サンプルは、氷上で融解してから本実験に用いた。まず、サンプルの懸濁液を  $100\mu\text{m}$  径のセルストレイナーに通し、リン酸緩衝生理的食塩 ( Phosphate buffered saline : PBS )、Tris-EDTA Buffer ( TE )10 でサンプルを洗浄した後、ペレットを TE10 で懸濁した。Lysozyme (Sigma-Aldrich Co., Saint Louis, USA) と Achromopeptidase (FUJIFILM Wako Pure Chemical Co., Osaka, Japan) による溶菌処理後に、Sodium Dodecyl Sulphate ( SDS )と ProteinaseK (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) によりタンパク質の分解、フェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール処理でタンパク質の除去を行った。得られた上清に 3M 酢酸ナトリウムとイソプロパノールを加えて  $4^{\circ}\text{C} \cdot 12000 \text{ rpm} \cdot 15\text{min}$  で遠心した。デカントしてさらに 75%エタノールでリンスをした ( $4^{\circ}\text{C}, 12000 \text{ rpm}, 15\text{min}$  で遠心)。上清を除去した後、乾燥して、 $4^{\circ}\text{C}$ で一晩  $1 \times \text{TE } 600\mu\text{l}$  に溶解した。75%エタノールでリンス ( $4^{\circ}\text{C} \cdot 12000 \text{ rpm} \cdot 15\text{min}$ ) した後、上清を除き、乾燥させ、 $1 \times \text{TE } 50\mu\text{l}$  に溶解した。

## 6.16S rRNA 遺伝子のシーケンスによる腸内細菌叢分析

16S リボソーム RNA(16S rRNA)遺伝子の高頻度可変領域である V4 領域(515F-806R)を Kozich らの方法に従って Miseq でシーケンスした<sup>(38)</sup>。PCR の条件は以下のとおりである。0.2 mM デオキシリボヌクレオシド三リン酸、5  $\mu\text{l}$   $10 \times \text{Ex Taq HS buffer}$ 、1.25 U Ex Taq HS polymerase(Takara Bio, Inc., Shiga, Japan)、抽出した DNA 50 ng を全量が 50 $\mu\text{l}$  に調製した。PCR の条件は、初回の変性を  $95^{\circ}\text{C}$  で 2 分間、 $95^{\circ}\text{C}$  20 秒間の変性、 $55^{\circ}\text{C}$  15 秒間のアニーリング、 $72^{\circ}\text{C}$  5 分間、 $72^{\circ}\text{C}$  10 分間の伸長反応を 25 サイクル行った。PCR

産物を AMPure XP (Beckman Coulter, Inc., Brea, CA, USA) で精製し、Quant-iT PicoGreen ds DNA Assay Kit (Lifetechnologies Japan, Ltd, Tokyo, Japan) を用いて定量した。混合サンプルは、各サンプルからほぼ等量の PCR アンプリコンをプールすることにより調製した。プールされたライブラリーは、Agilent 2100 Bioanalyzer で Agilent High Sensitivity DNA Kit で分析した。また、リアルタイム PCR は、製造元が提供するプロトコルに従って、イルミナの KAPA ライブラリー定量化キットを使用して、プールされたライブラリーで実行した。定量に基づいて、サンプルライブラリーを希釈し、Miseq によって 20%変性 PhiX スパイクインを含むサンプルライブラリーのシーケンスを実施した。

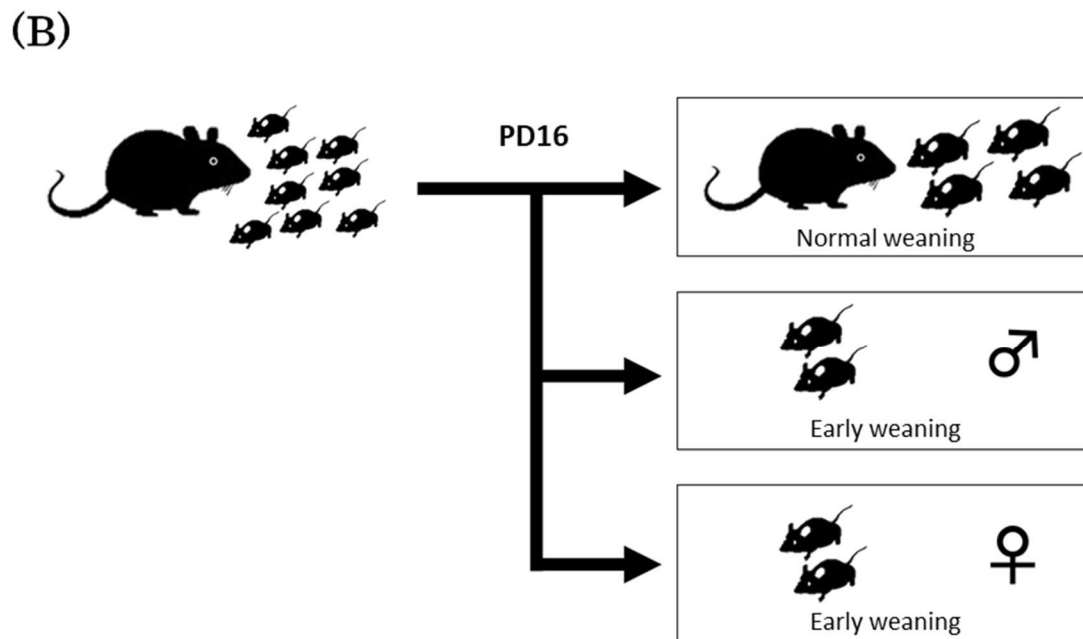
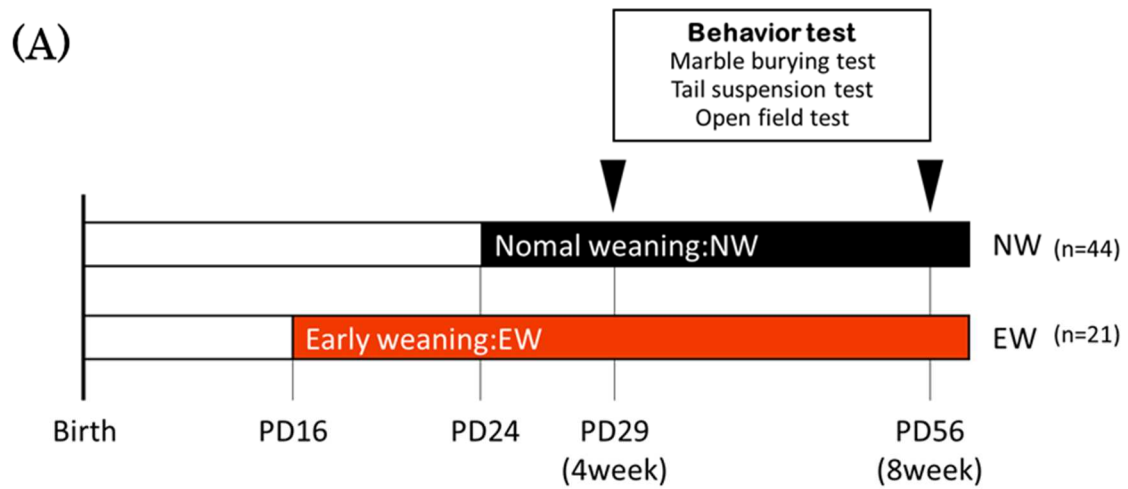
サンプルごとに 30,000 リードをランダムで選択した。Mothur の Miseq SOP ([https://www.mothur.org/wiki/MiSeq\\_SOP](https://www.mothur.org/wiki/MiSeq_SOP)) に従って操作上の分類単位(OTU)を作成した。分類とシーケンスデータの相対的な量を推定し、0.1%未満の相対存在量を示す OTU は、フィルタリングをした。α多様性は、Chao1 および Shannon index を用いて計算した。また、UniFrac Principal Coordinate Analysis (PCoA) を実行して、クラスタリングを分析した。UniFrac 解析は、NW マウスと EW マウスにおける腸内細菌叢の類似性を評価するために用いた。

## 7.統計

パラメトリックテストの前提条件を満たしている行動実験のデータ解析には、週齢ごとの行動実験のスコアを因子にして Two-way repeated measures ANOVA を実施した。主効果に有意差が認められた場合、事後検定として多重比較検定である Bonferroni test を実施した。パラメトリックの前提条件が満たされなかった場合、週齢とグループを従属変数として一般化線形混合モデルを構築し、事後検定として多重比較検定である Bonferroni test を実施した。

腸内細菌叢の門レベルの解析において、パラメトリックテストの前提条件を満たしてい

図表



**Fig1-1.** (A)実験スケジュール。離乳操作によって通常離乳(NW)群と早期離乳(EW)群の2群を設ける。仔マウスが16日齢時(PD16)に離乳操作を実施した群をEW群とした。NW群は、母マウスとPD28日まで同居させた。すべてのマウスはPD29とPD56で行動実験を施行された。(B)早期離乳操作の概要図。

## 実験 2: 無菌マウスを用いた細菌叢による行動発現変化の実証

### 材料と方法

#### 1. 供試動物

Fig1-7 に従って実験を実行した。供試動物として、日本クレア株式会社より購入した、妊娠の C57BL/6J 系統の無菌マウスを用いた。妊娠マウスのストレス軽減を目的に、ホームケージにマウスハウス(Shepherd Shack; SHPHERD, USA)を設置した。無菌状態を確認するために、糞サンプルの綿棒検査と顕微鏡検査を実施しました。ビニルアイソレーターの内側を ICR スワブ(Merck Millipore, Darmstadt, Alemanha)で拭き取り、25° C 48 時間インキュベートし、吸光光度計のフィルター550 nm で濁度を測定した。ビニルアイソレーター内で出産させ、出生した仔マウスが 10 日齢の時に、母マウスに NW マウス糞便由来菌液または EW マウス糞便由来菌液を経口投与した。GF 群の母マウスは、滅菌した PBS を経口投与した。28 日で仔マウスを離乳した後、1 ケージに雄マウス 2-3 匹で飼育した(GF·NW, n=23; GF·EW, n=22; GF, n=6)。また、全ての雄マウスは 4 週齢と 8 週齢の時に行動実験を実施し、10 週齢時に頸椎脱臼にて安楽死させた。その後ただちに脾臓とパイエル板、腸間膜リンパ節、小腸をフローサイトメトリーの為に採取した。

全てのマウスは、12 時間の明暗周期(明期;6:00-18:00, 暗期;18:00-6:00)、一定の温度(22 ±2°C) と湿度(50±10%)に保たれた飼育室内で飼育ケージ(17.5×24.5×12.5cm)にてオートクレーブ滅菌した床敷(ソフトチップ; Japan SLC,Inc., Sizuoka, Japan)を敷いて飼育した。飼育用固形飼料 (ガンマ線照射飼料 CMF 50kGy; Oriental yeast CO., Tokyo, Japan) と滅菌した水をマウスは自由摂取した。

#### 2. 行動実験

全ての行動実験は、試験は明期に蛍光灯下でビニルアイソレーター内で無菌的に実施した。全てのマウスは行動実験の直前まで飼料と水を自由摂取できた。

## 2.1. Marble burying test

行動実験を開始する前に、ビニルアイソレーター内にオートクレーブ滅菌(121°C, 15 分)した床敷(ソフトチップ; Japan SLC, Inc., Sizuoka, Japan)とプラスチックケージ(17.5×24.5×12.5cm)、ステンレス球(直径 9.58mm)を搬入した。行動解析は、第 1 章実験 1 と同様である。

## 2.2. Open field test

30×30cm の塩化ビニル板に次亜塩素酸系洗剤を噴霧することで滅菌した。滅菌水で消毒液を拭き取った後行動実験を実施した。行動解析は第 1 章実験 1 と同様である。

## 2.3. Tail suspension test

行動解析は第 1 章実験 1 と同様である。

## 3. 糞便内の細菌ゲノム抽出

実験 1 と同様の方法を実施した。

## 4. 16S rRNA 遺伝子のシーケンスによる腸内細菌叢分析

実験 1 と同様の方法を実施した。

## 5. フローサイトメトリー

各細菌叢マウスの脾臓、小腸粘膜固有層(SILP)、パイエル板(PP)および腸間膜リンパ節(mLN)から免疫細胞を分離した。免疫細胞は、70 μm ナイロンメッシュに通し、細胞をPBSで洗浄し、染色のためにPBSに再懸濁した。

次のモノクローナル抗体はビオチンと FITC、AlexaFluor 488、phycoerythrin (PE)、

PerCP-Cy5.5、 PE-Cy7、アロフィコシアニン(APC)、 AlexaFluor 647、 Alexa700、 APC-H7、 eFluor450、 Brilliant Violet 421 or V500 (eBioscience or Biolegend)と結合した。抗体は anti-human CD2 (RPA-2.10), anti-mouse CD3 $\epsilon$  (145-2C11), CD4 (GK1.5), CD25 (PC61), CD44 (IM7), CD45R/B220 (RA3-6B2), CD45RB (16A), CD62L (MEL-14), CD103 (2E7), Gr1 (RB6-8C5), folate receptor 4, FR4 (eBio12A5), Foxp3 (FJK-16 s), Helios (22F6), IL-10 (JES5-16E3) and TER119 (TER-119)を用いた。ビオチン化 anti-mouse /rat neuropilin-1 ポリクローナル抗体は、R&D Systems 製のものである。Foxp3 の細胞内染色は、細胞表面を染色する前に単球を Fc $\gamma$  R (CD16 / CD32) ブロッキングモノクローナル抗体をインキュベートした。次に Foxp3 染色 kit (eBioscience; Takara Bio, Inc., Shiga, Japan) を用いてモノクローナル抗体を染色した。

## 6.統計解析

データ解析には、SPSS statistics 17.0 (SPSS Japan Inc.)を用い、週齢ごとの行動実験のスコアを因子にして Two-way repeated measures ANOVA を実施した。事後検定として多重比較検定である Bonferroni test を実施した。

腸内細菌叢の門レベルの解析において、パラメトリックテストの前提条件を満たしている菌門は、群間差を Student t-test を使用して評価した。パラメトリックの前提条件が満たされなかった場合、Mann-Whitney U test を使用してデータを分析した。菌属レベルの群間比較解析において、Mann-Whitney U test を使用してデータを分析した。行動実験の成績と菌属の存在量の相関については、Pearson の相関分析を実施した。

データは平均値±標準誤差で示した。危険率 5%で有意差があると判定した。また、 $0.05 < P < 0.1$  で傾向があると判定した。

## 考察

幼少期ストレスの不安やうつ様行動に対する長期的影響を調査するために、早期離乳モデルマウスを用いて行動表現型を確認した。本実験の結果は、EW マウスは Marble burying test におけるより高い運動活性と Tail suspension test における 4 週齢時の高い不動時間と 8 週齢時の低い不動時間を示した。本実験における EW マウスは Marble burying test の高い運動活性は、早期離乳ストレスに曝露されることによって多動になるという先行研究を支持している<sup>(39)</sup>。また、本研究の Tail suspension test において 4 週齢時の EW マウスの不動時間は高く、8 週齢時に不動時間が短かったことから、EW マウスは 4 週齢時に高いうつ様行動を示し、8 週齢時にうつ様行動が低下することが示唆された。4 週齢時の早期離乳ストレスによるうつ様行動の増加は先行研究と一致するが<sup>(40)</sup>、8 週齢時にうつ様行動が低下するという本研究の結果は、9 週齢時に早期離乳ストレスによる高いうつ様行動を示すという報告<sup>(39)</sup>と矛盾する。先行研究では早期離乳ストレスに加え、母子分離ストレスを仔マウスに与えている<sup>(39)</sup>。この矛盾は、早期離乳ストレスに加えて母子分離ストレスに繰り返し曝露されているという受けたストレスの差異によって説明できるかもしれない。加えて、George らの研究では、早期離乳をうけた C57BL / 6J 系統マウスの強制水泳試験における不動時間は通常離乳操作をうけたマウスと差異がなかった<sup>(39)</sup>。さらに、うつ病モデルである Wistar Kyoto (WKY) ラットは、捕食者に遭遇するというストレスに曝露されるとうつ様行動が低下する<sup>(41)</sup>。一連のストレス曝露によるうつ様行動への調査から、曝露したストレスの度合いによってうつ様行動が変化する可能性がある。これらのことから、軽度のストレス曝露は一過性の高いうつ様行動を示すが、重度のストレス曝露は慢性的に高いうつ様行動を示すかもしれない。

本研究は、早期離乳マウス糞便細菌叢を投与された GF マウスが通常離乳マウス糞便細菌叢を投与された GF マウスと異なる免疫細胞のプロファイルを示すことを明らかにした。通常よりも早く離乳された哺乳類において、感染性病原体に対する粘膜免疫応答障害が報告

されている<sup>(50-52)</sup>。また、捕食者ストレスに曝露されたマウスは抗炎症性サイトカインレベルを増加させ、炎症性・抗炎症性のバランスが低下させる<sup>(53)</sup>。炎症マーカーの増加と免疫遺伝子発現の変化が PTSD 患者の重症度と相関するという報告があることから<sup>(44)</sup>、早期離乳操作が免疫機能の発達を抑制することが考えられる。本実験において、GF-EW マウスは特に脾臓において CD4 陽性 T 細胞の細胞数の減少を見出した。CD4 陽性 CD25 陽性 T 細胞の枯渇は高い不安およびうつ様行動を誘発することや<sup>(54)</sup>、第うつ病の患者の血清 CD4 陽性 CD25 陽性 T 細胞の発現レベルが低いことが報告されている<sup>(55)</sup>。本実験の結果を合わせて考えると、GF-EW マウスの発達期の高いうつ様行動は、早期離乳細菌叢による CD4 陽性細胞の減少に起因する可能性がある。

我々はまた、特に 8 週齢時の早期離乳マウスにおいて腸内細菌叢構成の変化が生じることを示し、早期離乳マウス由来の腸内細菌叢を投与されたマウスは EW マウスと同様に 4 週齢時の高いうつ様行動と Marble burying test における多動性の増加を示すことを発見した。門レベルでの 8 週齢時の EW マウス腸内細菌叢の組成比は Actinobacteria が高く、Verucomicrobia と Proteobacteria、Bacteroides が低下した。これに対して、早期離乳マウス由来腸内細菌叢を投与した GF マウスの組成比は Deferribacteres と Proteobacteria が 4 週齢と 8 週齢通して高く、Verucomicrobia が低下した。EW マウスと GF-EW マウスは Verucomicrobia 門の組成比が共に低かった。本実験で検出された Verucomicrobia 門に属する菌属は *Akkermansia* のみである。ヒトにおいて *Akkermansia* は生後 1 ヶ月の乳児腸管内で検出し、徐々にその存在量を増加させ、1 歳児で成人と同レベルの検出量になる<sup>(56)</sup>。*Akkermansia* はグラム陰性のムチン分解菌であり、短鎖脂肪酸であるプロピオン酸を産生して宿主にエネルギーを提供する<sup>(57)</sup>。また近年、*Akkermansia* は宿主の腸管上皮に付着することによって、腸管上皮細胞層を保護し、粘膜バリア機能を強化するプロバイオティクスであることが示唆されている<sup>(58)</sup>。本実験における GF-EW マウスの低い *Akkermansia* の組成比は、脾臓の免疫細胞のプロファイルを変化させたかもしれない。また、げっ歯類の研究において、幼少期にケージを傾け



る、夜間照明、拘束される等といった慢性の予想できない軽度のストレス(chronic unpredictable mild stress; CUMS)はうつ様行動を誘発し、腸内細菌叢の構成が変化することが報告されている<sup>(59-63)</sup>。Li らは CUMS マウスにおいて低い *Lactobacillus* と高い *Akkermansia* の組成比を示している<sup>(d)</sup>。我々の結果はこの結果と矛盾している。この矛盾は、ストレス曝露の回数と週齢によって説明づけられるかもしれない。

我々はさらに、EW マウスと GF-EW マウスの腸内細菌叢の組成比において *Porphyromonadaceae\_unclassified* と *Lachnospiraceae\_incertainae\_sedis* が高く、*Erysipelotrichaceae\_unclassified* が低いことを示した。うつ病患者において、*Erysipelotrichaceae*、*Lachnospiraceae*、*Prevotellaceae*、*Ruminococcaceae* の組成比が健常者と比較して組成比が減少した<sup>(64)</sup>。うつ様行動を示す EW マウスと GF-EW マウスの低い *Erysipelotrichaceae\_unclassified* の組成比はこの知見を支持する。また、*Porphyromonadaceae* には歯周病原菌である *Porphyromonas gingivalis* が属している。先行研究において、*Porphyromonas gingivalis* の感染は海馬の BDNF およびアストロサイト p75NTR のダウンレギュレーションを介してうつ様行動を誘発すること<sup>(65)</sup>や、社会的ストレスをうけたマウスの脾臓細胞は、*Porphyromonas gingivalis* 由来 lipopolysaccharide(LPS)に対する炎症反応が促進されることが報告されている<sup>(66)</sup>。また、拘束ストレスを受けることによって血液脳関門(Blood-Brain Barrier; BBB)の透過性が上がることから<sup>(67)</sup>、ストレス曝露による *Porphyromonas gingivalis* 由来の LPS に対する脾臓のサイトカイン産生量が亢進し、BBB を通過したサイトカインまたは LPS が神経炎症を誘発してうつ様行動を引き起こす可能性がある。*Porphyromonadaceae* の役割とうつ様行動誘発のメカニズムを明らかにするために、さらなる研究が必要である。

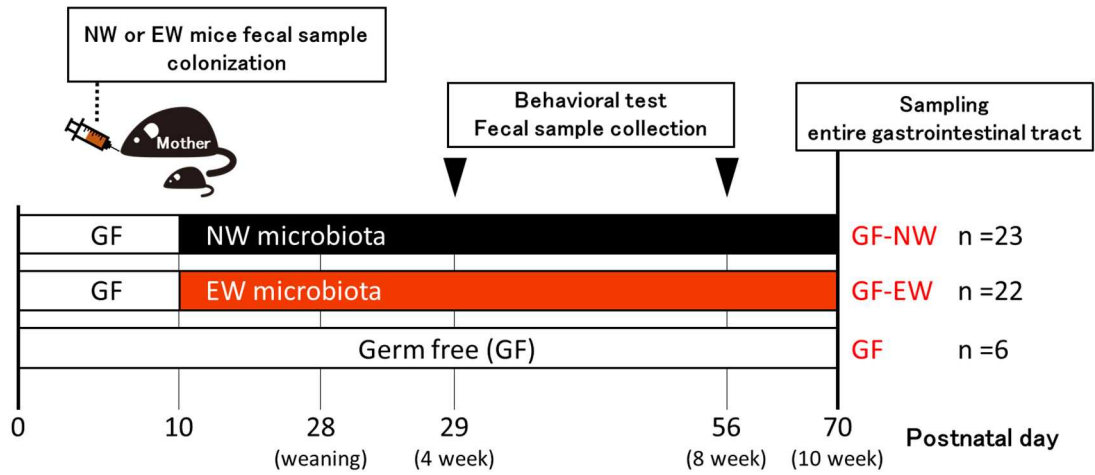
行動実験の成績と属レベルの組成比との相関関係を解析したところ、実験 1 における Tail suspension test における不動時間と *Ruminococcus*、*Erysipelotrichaceae\_unclassified* に負の相関があり、*Streptococcus* と正の相関があった。また、実験 2 マウスにおける不動時

間と *Lachnospiraceae\_incertae\_sedis*、*Desulfovibrionaceae\_unclassified* に負の相関があり、*Alistipes* に正の相関があった。先行研究において、大うつ病患者の腸内細菌叢は *Alistipes* 属の顕著な増加と *Ruminococcus* 属と *Erysipelotrichaceae* 属の組成比の低下を示した<sup>(64)</sup>。*Erysipelotrichaceae* は腸管における炎症疾患との関連が報告されている<sup>(68)</sup>が、乳酸を産生する *Erysipelotrichaceae* 科の新菌種である *Intestinibaculum porci* が報告されている<sup>(69)</sup>。病原菌と考えられている *Erysipelotrichaceae* 科の菌に属する菌属内に *Intestinibaculum porci* のように宿主に対して有益な代謝産物を産生する菌種が、ヒトおよび本研究のうつ様行動と負の相関を示した要因かもしれない。また、過敏性小腸行群の小児患者において腹痛の度合いと *Alistipes* 属の存在比は相関し<sup>(70)</sup>、ストレスをうけた BALB/c 系統マウスにおいて *Ruminococcus* 属はストレスによって誘発される行動変化と相関することが報告されている<sup>(71)</sup>。*Lachnospiraceae* は短鎖脂肪酸産生菌であり、短鎖脂肪酸産生菌の減少は腸管内の短鎖脂肪酸レベルの低下と腸バリア機能障害を誘発する<sup>(72)</sup>。ストレスと腸内環境の関連研究において、O'Malley らは母子分離ストレスを受けたラットは内臓痛覚過敏およびストレス誘発性排便の増加、軽度の粘膜損傷が観察し<sup>(73)</sup>、Moussaoui らは幼少期の環境ストレスによってコルチコステロンレベルの増加や腸透過性の亢進、腸内細菌叢の多様性の低下、グラム陽性菌の存在量の増加と繊維分解菌および酪酸産生菌の減少することを報告している<sup>(42)</sup>。また、拘束ストレスによって Proteobacteria 門の増加と lipopolysaccharide(LPS)の過剰産生を誘発させることが示されており<sup>(43)</sup>、LPS の曝露はげっ歯類の不安行動の増強、うつ様行動を誘発することを報告している<sup>(44-49)</sup>。これらの報告を合わせて考察すると、本研究で認められた早期離乳ストレスによる *Akkermansia* や短鎖脂肪酸産生菌の減少による腸管バリア機能の低下を介して病原菌が増殖し、それに対する炎症性サイトカインによってうつ様行動を誘発しているかもしれない。

本実験においての変化した菌属が幼少期のうつ様行動の増加を引き起こしているかもしれない。これを解明するために、GF マウスに単一菌を投与して作成したノトバイオートマ

ウスによる実証研究や抗生物質投与による早期離乳マウスの行動表現型の変化の観察といった更なる研究が必要である。

図表



**Fig1-7.** 実験スケジュール。ビニルアイソレーター内で妊娠 GF マウスを出産させ、出生した仔マウスが 10 日齢の時に、母マウスに NW マウス糞便由来菌液または EW マウス糞便由来菌液を経口投与した(GF-NW, n=23; GF-EW, n=22; GF, n=6)。28 日で仔マウスを離乳した後、4 週齢と 8 週齢の時に行動実験を実施した。

## 第2章

### 母性行動の世代間伝播における腸内細菌叢の関与

## 緒言

第1章で、早期離乳による行動変化に腸内細菌叢の関与する可能性を示した。哺乳類は、新生仔に対して養育行動を示す。げっ歯類の養育行動の代表的なものとして、巣作り行動、授乳行動、リッキングやグルーミング、保温行動などがあげられる。また、いくつかの要素で構成された複合的行動でもあり、前述の行動に伴って、出産後数時間以内に母親が仔に覆いかぶさったり、あるいは腕で抱擁する形で仔を乳房付近に引き寄せ、授乳しやすい体勢をとったりといった行動が観察される。このような養育行動は、仔の発達において重要な因子となっている。母性の剥奪は、仔の不安の増加やうつ様行動を長期的に示すことや神経ゲノムの構造変異を誘発する<sup>(74-77)</sup>。十分な養育行動を受けなかった仔は成長後に養育行動を示さなくなるという報告<sup>(78-80)</sup>や早期離乳による母性行動発現の低下が次世代へ伝播するという報告<sup>(81)</sup>から、仔の将来の養育行動とその障害が伝播する可能性が示唆されている。

母親の共生細菌叢が仔に伝播する。たとえば、偏性嫌気性菌である *Bifidobacterial strains* は母親の膣や母乳から子に伝播されることが報告されており<sup>(82-83)</sup>、この母親由来の *Bifidobacterium* が仔の体重増加を促進することが報告されている<sup>(83)</sup>。また、妊娠期にストレスを受けた母マウスの膣細菌叢は *Lactobacillus* が減少し、この細菌の仔への伝播が減少し、脳のアミノ酸プロファイルを変化させたこと<sup>(37)</sup>から、母親由来の細菌は仔の発育だけではなく、神経発達を支持することが考えられる。

以上の報告から、早期離乳ストレスによって変化した腸内細菌叢は次世代に伝播が、早期離乳の母性行動の低下の次世代伝承に関与すると考え、第2章ではそれを解明することを目的とした。

## 材料と方法

### 1. 供試動物

Fig2-1A に従って実施した。供試動物として、日本クレア株式会社より購入した、妊娠の C57BL/6J 系統の無菌マウス(F0 世代)を用いた。妊娠マウスのストレス軽減を目的に、ホームケージにマウスハウス(Shepherd Shack; SHPHERD, USA)を設置した。無菌状態を確認するために、糞サンプルの綿棒検査と顕微鏡検査を実施しました。また、ビニルアイソレーターを ICR スワブ(Merck Millipore, Darmstadt, Alemanha)で拭き取り、25° C 48 時間インキュベートし、吸光光度計のフィルター550 nm で濁度を測定した。

ビニルアイソレーター内で出産させ、出生した仔マウス(F1 世代)が 10 日齢の時に、母マウスに通常離乳マウス糞便由来菌液または早期離乳マウス糞便由来菌液を経口投与した。すべての仔マウスは 28 日で離乳した。1 ケージに異なる腹同士の雄マウスと雌マウスを 8 週齢時につがいにしてマウスハウス(Shepherd Shack; SHPHERD, USA)が設置されたケージ内で飼育し、分娩させた。新たに産まれた仔マウス(F2 世代)が 4 週齢になった時、母マウス(F1 世代)をビニルアイソレーターから搬出し、頸椎脱臼にて安楽死させた。

全てのマウスは、12 時間の明暗周期(明期;6:00-18:00, 暗期;18:00-6:00)、一定の温度(22 ±2°C) と湿度(50±10%)に保たれた飼育室内で飼育ケージ(17.5×24.5×12.5cm)にてオートクレーブ滅菌した床敷(ソフトチップ; Japan SLC,Inc., Sizuoka, Japan)を敷いて飼育した。飼育用固形飼料 (ガンマ線照射飼料 CMF 50kGy; Oriental yeast CO., Tokyo, Japan) と滅菌した水をマウスは自由摂取した。

### 2. 母性行動解析

F1 世代が仔を出産した日を 0 日目と定義づけ、8:00-17:00 の間、1 時間おきにビデオカメラでマウスを Fig2-1B の実験スケジュールに則って録画した。合計撮影時間は計 25 時間である。解析項目は、(1) リッキングやグルーミング、(2)仔に接している(parental contact

behavior)、(3)仔から離れている(parent off pups)、(4)巣を出入りする回数 (frequency of exiting the nest)の4つである。(1)(2)(3)の解析項目における解析方法は、各1時間を3分毎に区切り、3項目の発現回数を瞬間サンプリングした。1日の各発現回数合計を1日の最大発現数 100 回で割り、各項目の1日あたりの割合を算出した。(4)巣を出入りする回数 (frequency of exiting the nest)については、1日毎の巣から出入りする回数をカウントした。

### 3. 糞便採取

第1章の実験2に準じた方法で糞便を採取した。各細菌叢マウスの糞便サンプルはParingの2週間後(Pregnant period)と産後10日目(After delivery)、産後20日目(Parenting period)、離乳日(After weanig)の4ポイントで採取した(Fig2-1A)。

### 4. 網羅的細菌叢解析

第1章の実験1に準じた。

### 5. 統計解析

データ解析には、SPSS statistics 17.0 (IBM, New York, NY, USA)を用い、1日当たりの各観察行動の発現割合を因子にして Two-way repeated measures ANOVA を実施した。また、有意差が認められた場合、事後検定として多重比較検定である Bonferroni test を実施した。データは平均値±標準誤差で示した。危険率 5%で有意差があると判定した。また、 $0.05 < P < 0.1$  で傾向があると判定した。



## 結果

### 1. 母性行動解析

リッキングやグルーミングの主効果の影響がなかったが(Table2-1A)、GF-EW マウスのリッキング・グルーミングの割合が GF-NW マウスより低い傾向が認められた(Fig2-2A;  $P = 0.058$ )。parental contact behavior と parent off pups において群間差は認められなかった(Fig2-2B, C)。巣を出入りする回数に主効果の影響も交互作用もなかったが(Table2-1D)、事後検定として Bonferroni test を実施した結果、産後 1 日目において GF-EW マウスは GF-NW マウスより高い頻度で巣へ出入りした(Fig2-2D)。

### 2. 16S rRNA 遺伝子解析

EW マウスまたは NW マウス腸内細菌叢構成解析の結果は、Fig2-4 に示した。GF-EW マウスと GF-NW マウスの腸内細菌叢の間に diversity に差異はなかった(Fig2-4A)。門レベルにおいて、GF-EW マウスは Proteobacteria 門の存在量が高くなった(Fig2-4B)。GF-NW マウスと GF-EW マウスはそれぞれ異なるクラスターを形成する。OTU に含まれるリード数（組成比）を考慮しない unweighted と考慮する weighted UniFrac 解析の双方において、GF-NW マウスと GF-EW マウスはそれぞれ異なるクラスターを形成した(Fig2-4C)。Pregnant period – After weaning の期間で細菌叢の変動は認められなかった。

## 考察

早期離乳マウス腸内細菌叢を経口投与された GF-EW マウスはリッキングとグルーミングの割合が低下する傾向にあり、第 1 章の実験 2 と同様に、GF-EW マウスと GF-NW マウス間に腸内細菌叢構成に明確な差異が認められた。

本研究では、GF-EW マウスのリッキングとグルーミングの割合は GF-NW マウスと比較して低下傾向が認められたが、仔への接触時間に群間差は無かった。早期離乳ストレスをうけたマウスは低いリッキングとグルーミングの頻度を示し、通常離乳マウスと同等の仔への接触時間を示した<sup>(81)</sup>。早期離乳マウスと早期離乳マウス腸内細菌叢投与マウスは同様の母性行動表現型を示すことから、母性行動の表現型に腸内細菌叢が関与する可能性がある。Sudo らは GF マウスの母性行動は SPF マウスと同等であることを報告した<sup>(13)</sup>。本研究の結果と併せて考えると、菌の有無は母性行動の表現型に影響を及ぼさないが、腸内細菌叢の構成変化は母性行動の表現型に影響を及ぼすことが考えられる。

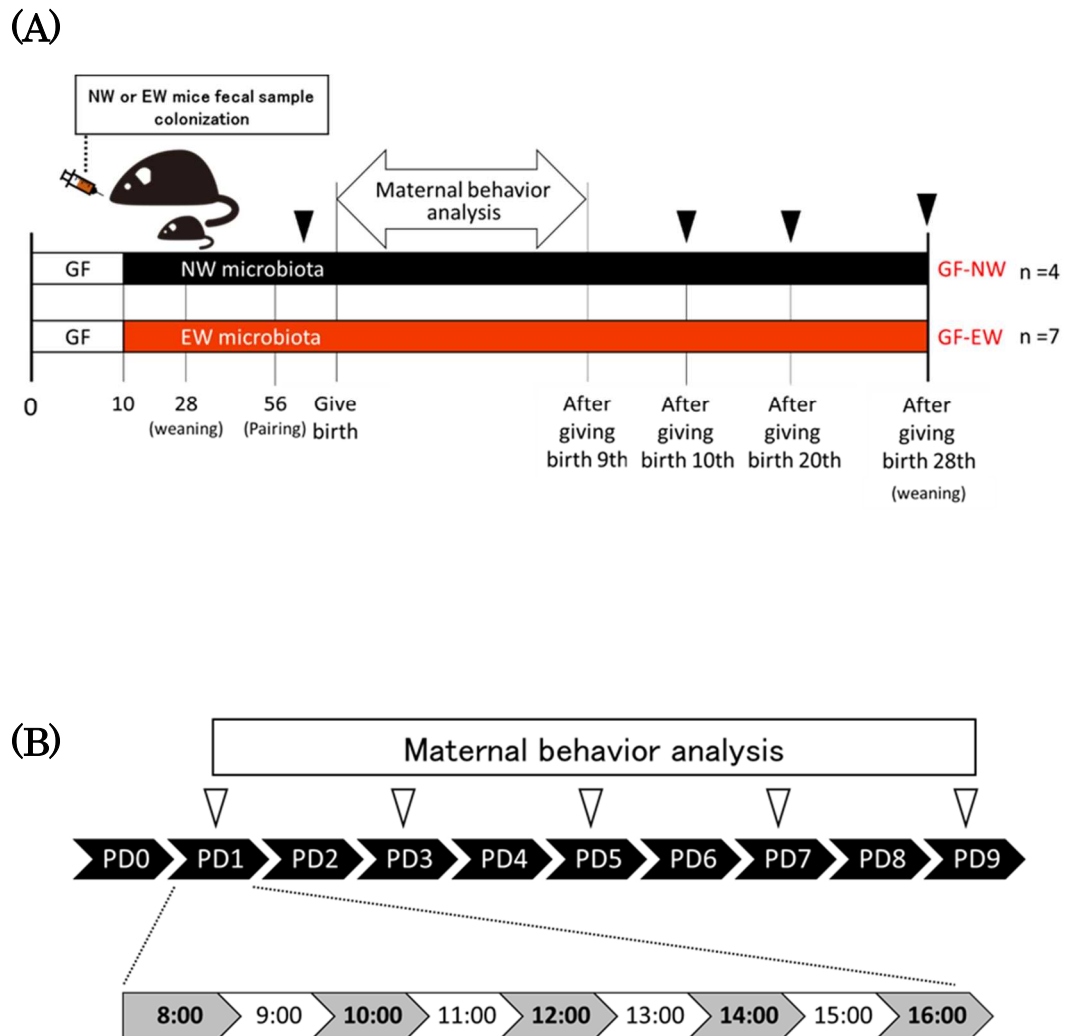
妊娠中期から後期の血中エストロゲンレベルの上昇とプロゲステロンの低下が出産後の養育行動に寄与すること<sup>(84)</sup>や卵巣摘出手術を受けた雌ラットの養育行動の発現が低下することから<sup>(85)</sup>、養育行動の活性に性腺由来ホルモン等の内分泌ホルモンは重要な関わりがあることが知られている。他方、微生物も内分泌系を調節する。たとえば、腸管内の大腸菌が有する  $\beta$ -グルクロニダーゼによりエストロゲンの活性型への分解によって血清エストロゲンレベルを調節すること<sup>(86)</sup>や、ヒト腸内細菌の *Clostridium scindens* はグルココルチコイドをアンドロゲンに変換する<sup>(87)</sup>。また、抗生物質投与によってエストロゲンレベルが低下する<sup>(94)</sup>。これらことから、早期離乳マウス腸内細菌叢はエストロゲンやプロゲステロン等の生殖ホルモンレベルを変化させ、その変化を介して母性行動の形質を変えた可能性がある。

我々は GF-EW マウスは巣の出入り時間が高い傾向があることを示した。先行研究において、生後 2-10 日に巣材と床敷が極端に少ないストレス(Limited nesting stress)を受けた

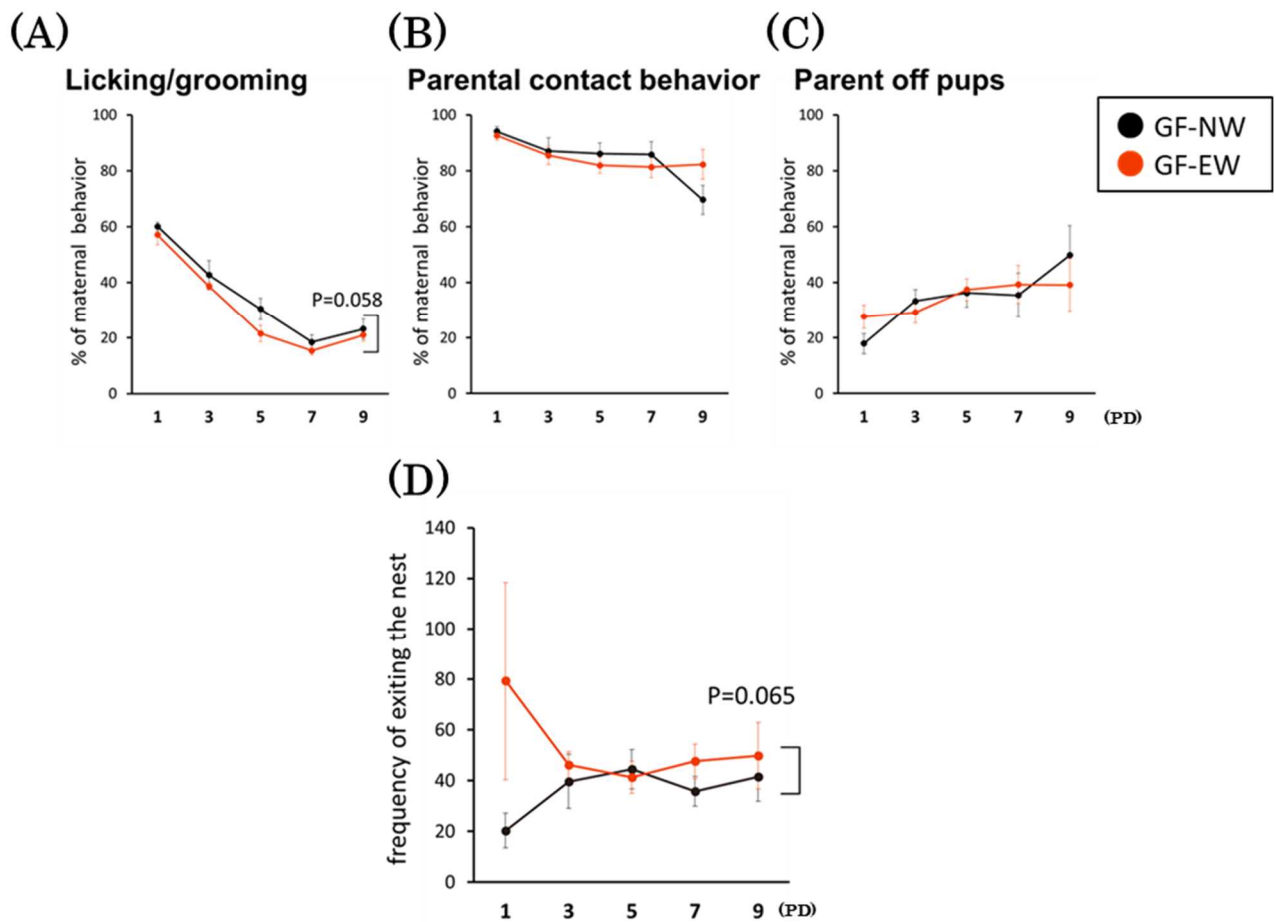
母ラットは暗期におけるリッキングとグルーミング時間の低下と巣の出入りする回数が増加すること<sup>(88)</sup>や早期離乳マウスは多動になるということ<sup>(39)</sup>が報告されている。また、腸内細菌叢が宿主の不安様行動やうつ様行動を調節することが知られていること<sup>(10,43)</sup>を合わせて考えると、早期離乳ストレスによる腸内細菌叢の変化がストレス誘発性の多動を引き起こす可能性を示唆している。さらに、GF-EW マウスの産後 1 日目の巣の出入り回数が増加を示したが、解析期間の後半で巣の出入り回数は GF-NW マウスと同等にまで減少した。げっ歯類の研究において、授乳中の母ラットは繁殖経験のない雌ラットと比較して不安様行動の発現が低下し、新奇物を回避する為のシグナルを仔が発することによる母の不安減少が、養育行動を促進する可能性を示唆されている<sup>(89,90)</sup>。本研究の結果と併せて考えると、早期離乳マウス細菌叢による高い不安を出産直後は示したが、仔マウスとの接触による不安行動の低下を示している可能性がある。

結論として、我々の結果は、腸内細菌叢が母性行動の表現型に影響を及ぼす可能性があることを明らかにした。母性行動の表現型の変化と腸内菌叢の関りを調査した研究は、我々の知る限り、Sudo らの研究のみである<sup>(13)</sup>。本研究の早期離乳マウス腸内細菌叢が母性行動の表現型を変化させるメカニズムは不明瞭であるが、ストレス応答性が亢進している GF マウスと SPF マウスが同様の母性行動の形質を示していることから、ストレス応答性の亢進は早期離乳腸内細菌叢による母性行動の変化の要因ではないことが考えられる。もうひとつの要因として、養育行動の発現に重要な関連を示す妊娠期の性腺由来ホルモンがある。性腺由来ホルモンの分泌や性発達に対する無菌環境下の影響は明らかにされていない。本研究における養育行動と性腺由来ホルモンレベルに関連を明らかにする為に、後の章では GF マウスの性腺由来ホルモンレベルを掲示的に測定した。

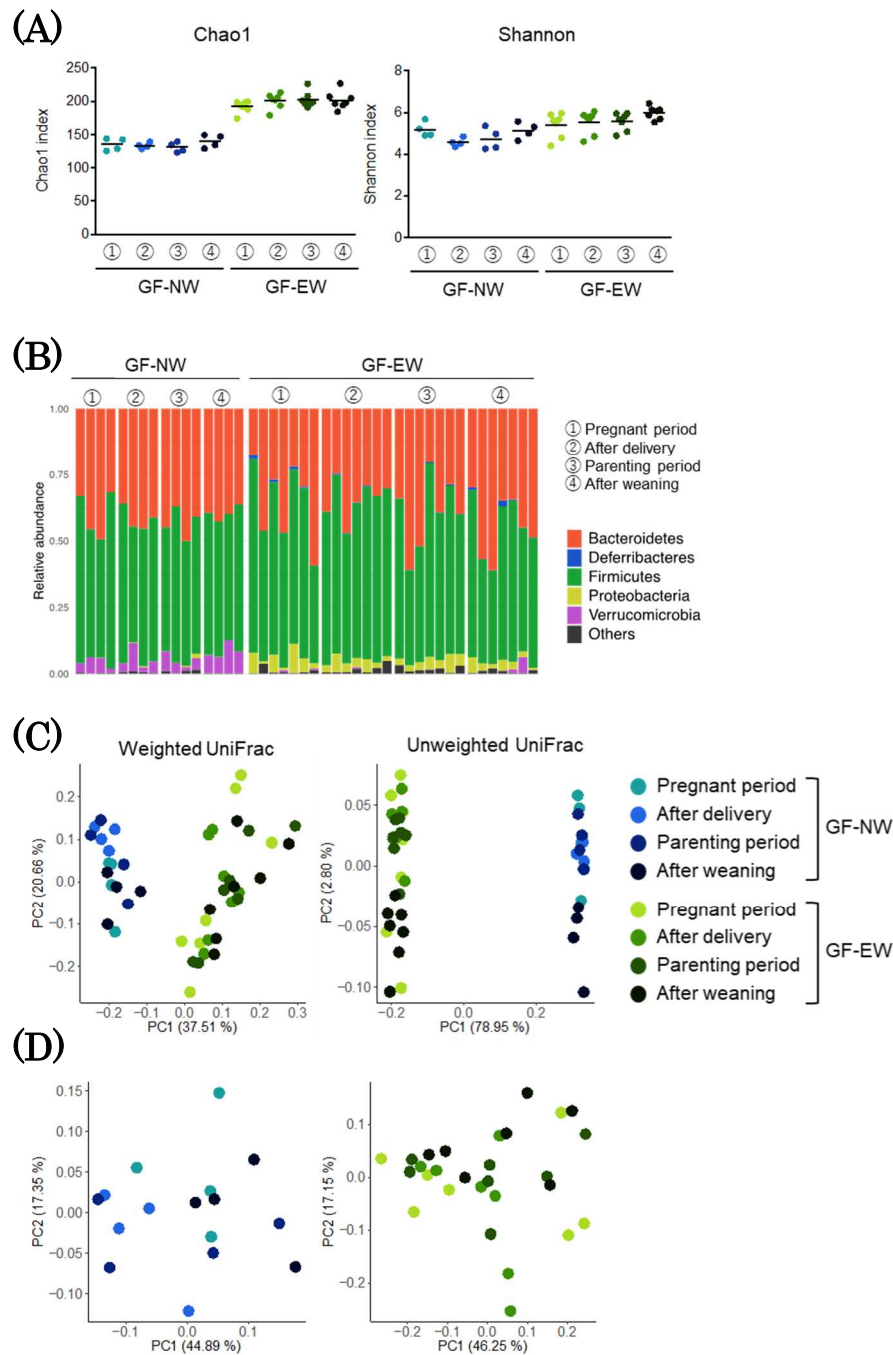
図表



**Fig2-1.** (A) 実験スケジュール。無菌(GF)母マウスに通常離乳 (NW) マウスまたは早期離乳(EW) マウスの糞便細菌叢を投与された仔マウスを GF-NW マウスまたは GF-EW マウスとする。黒い三角形は、細菌叢構成解析用の糞便サンプルを採取した日を示す。GF-NW または GF-EW マウスを繁殖させ、出生日(PD0)から PD9 の期間の母性行動を撮影した。(B) 母性行動録画の流れと解析日。PD1,3,5,7,9 の 8:00-9:00, 10:00-11:00, 12:00-13:00, 14:00-15:00, 16:00-17:00 の計 25 時間を母性行動解析した。



**Fig2-2.** リッキング・グルーミングの割合(A)と仔に接している割合(B)、仔から離れている割合(C)、巣を出入りする回数(D)における各細菌叢マウスの比較。データは平均値±標準誤差で表した。リッキング・グルーミングの割合が GF-EW マウスは低くなる傾向がある( $F[1,8] = 4.883$   $P = 0.058$ )。仔に接している割合と仔から離れている割合において群間差は認められなかった(Fig2-2B, C)。巣を出入りする回数において、PD1の GF-EW マウスは GF-NW マウスより高い頻度で巣の出入りした(PD1:  $P < 0.05$ )。



**Fig2-3.** (A)NW 細菌叢投与マウス (青) と EW 細菌叢投与マウス (緑) の各グループにおける Chao1 と Shanon index を用いた  $\alpha$  多様性の比較。各細菌叢マウスにおいて、Pregnant period – After weaning の期間に多様性に変動はなかった。(B) Pregnant period – After weaning における NW 細菌叢投与マウスと EW 細菌叢投与マウスの門レベルの細菌叢構成の変動。(C) UniFrac distance に基づく、PCoA プロットである。各プロットが近ければ菌叢構成が類似していることを示す。GF-NW マウスと GF-EW マウスはそれぞれ異なるクラスターを形成する。(D)各細菌叢投与マウスにおけるサンプル期間での細菌叢の構成変動を示した。細菌叢の変動はアドニス関数を使用して計算した(GF-NW;  $P=0.114$   $R^2=0.291$ , GF-EW;  $P=0.364$   $R^2=0.118$ )。

(A)

リッキング・グルーミングの割合

	F 値	自由度 1	自由度 2	有意確率
PD	55.577	4	32	0
group	4.883	1	8	0.058
PD*group	0.226	4	32	0.922

	有意確率
GF-NW vs GF-EW	0.058

	有意確率
PD1_GF-NW vs GF-EW	0.475
PD3_GF-NW vs GF-EW	0.366
PD5_GF-NW vs GF-EW	0.158
PD7_GF-NW vs GF-EW	0.394
PD9_GF-NW vs GF-EW	0.611

(B)

仔に接している割合

	F 値	自由度 1	自由度 2	有意確率
PD	7.937	4	32	0
group	0.023	1	8	0.883
PD*group	2.538	4	32	0.059

	有意確率
GF-NW vs GF-EW	0.883

	有意確率
PD1_GF-NW vs GF-EW	0.25
PD3_GF-NW vs GF-EW	0.669
PD5_GF-NW vs GF-EW	0.662
PD7_GF-NW vs GF-EW	0.667
PD9_GF-NW vs GF-EW	0.142

(C)

仔から離れている割合

	F 値	自由度 1	自由度 2	有意確率
PD	5.083	4	32	0.003
group	0.679	1	8	0.811
PD*group	0.061	4	32	0.612

	有意確率
GF-NW vs GF-EW	0.811

	有意確率
PD1_GF-NW vs GF-EW	0.175
PD3_GF-NW vs GF-EW	0.674
PD5_GF-NW vs GF-EW	0.658
PD7_GF-NW vs GF-EW	0.859
PD9_GF-NW vs GF-EW	0.48

(D)

巣の出入り回数

	F 値	自由度 1	自由度 2	有意確率
PD	0.638	4	28	0.64
group	0.065	1	7	0.596
PD*group	0.703	4	28	0.065

	有意確率
GF-NW vs GF-EW	0.065

	有意確率
PD1_GF-NW vs GF-EW	0.013
PD3_GF-NW vs GF-EW	0.151
PD5_GF-NW vs GF-EW	0.517
PD7_GF-NW vs GF-EW	0.313
PD9_GF-NW vs GF-EW	0.478

**Table2-1.** リッキング・グルーミングの割合(A)と仔に接している割合(B)、仔から離れている割合(C)、巣を出入りする回数(D)における分散分析表。黄色で塗りつぶされたセルは、 $P < 0.05$ であることを示し、オレンジ色塗りつぶされたセルは、 $0.05 < P < 0.1$ であることを示している。

## 第3章

### 性発達における腸内細菌叢の関与



## 緒言

腸内細菌叢が宿主の内分泌系と相互作用することが近年示唆されている<sup>(91)</sup>。たとえば、*Bifidobacterium pseudocatenulatum* CECT 7765 をマウスに投与するとグルココルチコイドの分泌レベルが低下したという報告や成熟した雄マウスから未成熟雌マウスに腸内細菌叢を移植すると血中テストステロンレベルが高くなるという報告がある<sup>(92,93)</sup>。さらに、尿中エストロゲン濃度は、腸内細菌叢の多様性と強く相関しており、抗生物質の処置で腸内細菌叢の多様性を低くすると、ヒトの尿中エストロゲン濃度が減少した<sup>(94)</sup>。これらの知見は、腸内細菌が宿主の内分泌系を調節することを示唆している。他方、いくつかの報告は宿主の内分泌系が腸内細菌に影響を及ぼすことを示している<sup>(95,96)</sup>。エストラジオール投与は *Bacteroides melaninogenicus* の増殖を促進し<sup>(95)</sup>、エストラジオール受容体  $\beta$  欠損マウスは豊富な Proteobacteria 門や Bacteroidetes 門、Deltaproteobacteria 門を示し、宿主のエストロゲン系が細菌叢の構成に重要な役割を果たしていることを示している<sup>(96)</sup>。

無菌 (GF: Germ-free) マウスは、宿主の機能に対して腸内細菌が及ぼす影響を調査するためのユニークで強力な研究モデル動物である。たとえば、生殖機能の発達において、GF マウスは SPF マウスと比較して、産仔数と着床率の減少、膈開口の遅延を示した<sup>(97)</sup>。さらに、エストラジオールを投与した GF マウスの子宮重量は、エストラジオールを投与したコンベンショナルなマウスの子宮重量よりも低いことが報告されている<sup>(98)</sup>。これらのことから、GF マウスを用いた実験は、生殖のための宿主内分泌系における細菌の重要な役割を示した。性成熟における生殖ホルモンの重要性を考慮すると<sup>(98,99)</sup>、発達期の無菌マウスにおいて、生殖ホルモンの分泌が増加しない可能性があると考えられる。しかし、我々の知る限り、特に GF マウスの幼若期における生殖に関連するホルモンの経時変化を調査した研究はみられなかった。

本研究では、4-8 週齢の GF マウスの糞中エストロゲンおよびプロゲステロン、コルチコステロンレベルを測定した。GF マウスを用いた視床下部-下垂体-副腎 (HPA) 軸の活動は

比較的多く研究されている。さらに、発達段階での性腺ステロイドホルモン分泌における宿主特異的細菌叢の重要な役割を評価するために、SPF マウスまたはモルモット糞便細菌叢を経口投与した4週齢のGF(GF-SPF または GF-guinea pig)マウスの糞便ホルモンレベルの変化を調査した。加えて、雌雄双方のマウスの臭いがついた床敷きを使用して、8週齢時のGF マウス、GF-SPF マウス、GF-guinea pig マウス、SPF マウスの匂い嗜好性も調査した。先行研究で、ショウジョウバエにおいて細菌叢は繁殖相手の選好に関与することが示唆されており、交配シグナルとしての揮発性の匂いが細菌叢の影響を受ける可能性が示されていた<sup>(100)</sup>。哺乳類の匂いの選好における細菌叢の役割は不明であるが、GF マウスの匂いの選好は投与した腸内細菌叢の影響を受けると仮説立てた。

## 材料と方法

### 1. 供試動物

近交系である C57BL / 6J マウス(CLEA Japan Inc., Tokyo, Japan)および無菌状態の C57BL / 6J マウス(Sankyo Labo Service Co. Ltd., Tokyo, Japan)を用いた。全てのマウスは、標準の 12:12 時間の明暗サイクル下で飼育した。

9 匹の妊娠 GF マウスを Sankyo Labo Service Corporation から購入し、ビニルアイソレーターで無菌的に飼育した。GF マウスは、無菌飼育用固形飼料（ガンマ線照射飼料 CMF 50kGy; Oriental yeast CO., Tokyo, Japan）と滅菌水を自由摂取させた。また、無菌状態を確認するために、糞サンプルの綿棒検査と顕微鏡検査を実施しました。サンプルは、ビニルアイソレーターを ICR スワブ(Merck Millipore, Darmstadt, Alemanha)で拭き取り、25° C 48 時間インキュベートし、吸光光度計のフィルター 550 nm で濁度を測定した。

妊娠 GF マウスを、グループごとにビニルアイソレーターに搬入した。3 週齢時に仔マウスを離乳し、1 ケージあたり雌 GF マウス 3 匹収容した。4 週齢時に雌 GF マウスに SPF マウスまたはモルモット糞便由来菌液を経口投与した。それぞれの糞便由来菌液投与マウスを GF-SPF マウスと GF- Guinea pig マウスと呼ぶことにした。モルモット糞便は Japan SLC Inc. (Shizuoka, Japan)から購入した。

8-9 週齢時に、全てのマウスはアイソレーターから取り出され、コンベンショナル環境下の防音室に移動して行動実験を実施した。行動実験の直前まで、マウスは飼料と水を自由摂取できた。行動実験実施後、頸椎脱臼にて安楽死させ、直ちに卵巣と子宮を採取し、4%パラホルムアルデヒドリン酸緩衝液で固定した。

### 2. 糞中ステロイド測定

糞便サンプルは Fig3-1A に示したスケジュールで採取した。糞便サンプルはホームケージから収集し、解析するまで-20°Cで保存した。次に、採取した糞便サンプルを乾燥させ、

ステンレスビーズを用いてホモジナイズし、糞便サンプル 0.05g を 5mL ジエチルエーテル (FUJIFILM Wako Pure Chemical Co., Osaka, Japan) で抽出した。

コルチコステロンは公開されているプロトコルに準じて実施した<sup>(79)</sup>。酵素免疫吸着検定胞 (ELISA) プレートに二次抗ウサギ IgG 抗体溶液 (Jackson Immuno Research Laboratories, PA, USA, Cat# 111-005-003, RRID: AB\_2337913) でコーティングした。4°C でインキュベート後、プレートウォッシャー (Immunowash Model 1250; Bio-Rad Laboratories, Inc., CA, USA) でプレートを 2 回洗浄した。ウサギ由来抗コルチコステロン抗体のアリコート (Cosmo Bio Co., Tokyo, Japan, Cat# FKA-420-E, RRID: AB\_10708379) と horseradish-peroxidase (HRP) 標識コルチコステロンのアリコート 100 $\mu$ L を添加後、プレートを覆い、4°C で overnight した。次に HRP substrate solution を各 well に加え反応させた後、N-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> の添加によって反応を停止させる。サンプルの吸光度は、自動マイクロプレートリーダー (Bio-Rad model 550; Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA) を使用して 450 nm で測定した。エストラジオールおよびプロゲステロンレベルの測定は、それぞれの EIA キット (Cayman Chemical Co., Ann Arbor, MI, USA) を使用した。プレートにアリコートを加え、トレーサーと抗体でコーティングした。22°C で 1 時間インキュベート後、プレートを洗浄緩衝液で 5 回洗浄し、基質溶液を加えてから 1 時間インキュベートし、自動マイクロプレートリーダーを使用してサンプルの吸光度を 405 nm で測定した。

### 3. Odor preference test

8 週齢の GF、GF-SPF および GF- Guinea pig マウスは、ビニルアイソレーターからコンベンショナル環境下に移動した直後に行動実験を実施された。すべてのマウスは、実験開始前に、テストケージ (Fig3-1B) にて 10 分間馴化した。テストケージは黒いアクリル板で 2 つの区画に分けられている。各区画には nose poke がある壁に隔たれ、その奥に雄または雌マウスの尿で汚れた床敷を設置した (Fig3-1B)。雄または雌マウスの尿で汚れた床敷は、各

4 人の adult の雄または雌を含むいくつかのケージから収集した。雄または雌マウスの尿で汚れた床敷は、別々の区画に設置した。

雌マウスをテストケージに入れ、その行動を 5 分間ビデオカメラで録画した。観察項目は各区画の滞在時間、匂い嗅ぎ時間、進入時間である。雌マウスが nose poke を嗅いだ時間を「匂い嗅ぎ時間」、nose poke に鼻を入れた時間を「進入時間」と定義づけた。

#### 4. 統計解析

試験期間中の糞中ステロイドホルモンの差異を評価するために、two-way repeated-measures analysis (ANOVA) を週とグループを従属変数として実行しました。グループ、時間、または交互作用の効果が有意 ( $P < 0.05$ ) である場合、事後検定として多重比較検定である Bonferroni test を実施した。糞中ステロイドホルモンレベルの経時変化を分析するために、2 つの隣接するサンプリングポイントを組み合わせた後、two-way repeated ANOVA を実施した。

ノンパラメトリックテストが適応可能な場合、Wilcoxon rank sum test を用いて Odor preference test の行動データを分析した。また、雄の臭い探索率における群間差を評価する為に one-way ANOVA (Tukey least significant difference procedure) を実行した。すべてのデータは有意水準 0.05 で両側であり、SPSS statistics 17.0 (IBM, New York, NY, USA) を使用して分析した。

## 結果

### 1. 糞中ステロイド測定

Fig3-2A は各グループの糞中エストラジオールレベルの経時変化を示している。GF マウスのエストラジオールレベルが SPF マウスのエストラジオールレベルよりも有意に低いことを明らかにした。GF-SPF マウスと GF-Guinea pig マウスのエストラジオールレベルは、GF マウスと SPF マウスのレベルの中間を示した。エストラジオール濃度の経時変化を分析するために、2つの隣接するサンプリングポイントを組み合わせ再分析した(Fig3-2B)。被験者内比較により、GF マウスと GF-Guinea pig マウスのエストラジオールレベルは、サンプリング期間を通して変動しなかった。対照的に、SPF マウスにおいて、実験後半のエストラジオールレベルは 4.5-5 および 5.5-6 週齢時よりも有意に高いことが示された。GF-SPF マウスの 5.5-6 週齢時のエストラジオールレベルは 4.5-5 週齢時のエストラジオールレベルよりも有意に高かった。つまり、SPF マウスと GF-SPF マウスはサンプリング期間後半でエストラジオールレベルが増加したが、GF マウスと GF-Guinea pig マウスでは増加しなかった。

Fig3-3A は各グループの糞中プロゲステロンレベルの経時変化を示している。GF マウスの糞中プロゲステロンレベルは最も低かった。さらに、GF-Guinea pig マウスは SPF マウスと GF-SPF マウスより低いプロゲステロンレベルを示した。エストラジオールと同様に、2つの隣接するサンプリングポイントを組み合わせ再分析を実施した結果、GF マウスのプロゲステロンレベルは変動しなかった(Fig3-3B)。サンプリング期間中のプロゲステロンレベルの漸増は、SPF マウスと GF-Guinea pig マウスで観察された。しかし、GF-SPF マウスのプロゲステロンレベルの増加は一時的なものであった。

Fig3-4A は各グループの糞中コルチコステロンレベルの経時変化を示している。GF マウスのコルチコステロンレベルは最も低く、GF-SPF マウスのコルチコステロンレベルは最も高かった。2つの隣接するサンプリングポイントを組み合わせ再分析した結果、SPF マ

ウスと GF-SPF マウスのコルチコステロンレベルは、サンプリング期間中に徐々に減少した(Fig2-4B)。GF マウスと GF-Guinea pig マウスのコルチコステロンレベルは変動しなかった。

## 2. Odor preference test

Fig3-5A は、Odor preference test の匂い嗅ぎ時間を示している。GF マウスは雄の匂いをよりも雌の匂いを嗅ぐ時間が長かった。対照的に、GF-SPF マウスは、雌の匂いよりも雄の匂いを嗅いだ。SPF マウスと GF-Guinea pig マウスにおいて、そのような差異はみられなかった。また、GF マウスの雄匂い区画に費した匂い嗅ぎ時間の割合は、グループ間で最も低かった(Fig3-5B)。

Fig3-5C は、Odor preference test の滞在時間を示している。GF マウスは雄の匂い区画よりも雌の匂い区画にとどまった回数が多かった。他のマウスにそのような差異はみられなかった。また、雄の匂い区画に対する滞在時間の割合は、GF マウスはグループ間で最も低かった(Fig3-5D)。

進入時間において、全てのグループで雄の匂い区画と雌の匂い区画に差異はなかった(Fig3-5E)。また、雄の匂い区画に対する進入時間の割合に群間差はみられなかった(Fig3-5F)。

## 3. 生殖器の重量

Fig3-6A, B は各グループの卵巣および子宮重量を示しており、双方において群間差は見られなかった(Fig3-6A, one-way ANOVA,  $F_{[3, 37]} = 0.80$ . n.s.; Fig3-6B,  $F_{[3, 37]} = 1.20$ . n.s.)。

## 考察

GF マウスの糞中のエストラジオールやプロゲステロン、コルチコステロンレベルは、SPF マウスよりも低いことが明らかにした。また、GF マウスに SPF マウスやモルモット糞便由来細菌叢を投与することによって、全てのステロイドホルモンの含量が増加した。加えて、雌の GF マウスは雄の匂いよりも雌の匂いに嗜好性を示した。これらの知見は、マウスにおける宿主内分泌機能の発達と匂いの好み双方において腸内細菌叢が重要な役割を果たすことを示唆している。

SPF マウスのエストラジオールレベルは 6-7 週齢にかけて増加し、サンプリング期間の後半まで高いレベルを維持した。マウスの卵巣におけるエストロゲン合成と血清エストロゲンレベルが同様の期間にわたって増加することが報告されている<sup>(102-104)</sup>。また、血清エストラジオール含量と糞中エストラジオールに相関があることから<sup>(103)</sup>、SPF マウスで見られる糞中エストラジオール濃度の経時的変動は、卵巣におけるエストロゲン合成能力の発達を反映していると考えられる。我々は GF マウスの糞便エストラジオールレベルが SPF マウスのものよりも低く、サンプリング期間を通して増加しなかったことを明らかにした。エストロゲン分泌の増加は、雌のマウスの思春期の開始において重要であることが示されているため<sup>(99)</sup>、GF マウスの性成熟の遅延は、発達期のこのエストロゲン合成の低下に関連している可能性がある。さらに、SPF マウスまたはモルモット腸内細菌叢が定着した GF マウスのエストラジオールレベルは、GF マウスよりも高かったが、SPF マウスのエストラジオールレベルと同等までの回復には至らなかった。これらの結果は、発達期の細菌叢が卵巣のエストロゲン合成能の発達に重要な役割を担っている可能性があることを示している。また、エストラジオールと同様に GF マウスは SPF マウスより糞中プロゲステロン含量が低かった。加えて、SPF マウスやモルモット腸内細菌叢を経口投与した GF マウスのプロゲステロンは、GF マウスのものよりも有意に高く、腸内細菌叢が定着したマウスのプロゲステロンレベルの回復の程度は、エストラジオールレベルよりも高いことが考えられる。こ



これらのことから、コレステロールから変換されるプロゲステロンは様々なステロイドホルモン生成における主要なステロイドホルモンであり、GF マウスの低いエストラジオールは、卵巣のプロゲステロン合成活性が低いことに起因することが推測できる。また、卵巣および子宮重量に群間差はみられなかったが、たとえば、細菌が存在しないことによるコレステロールからプロゲステロンに変換する酵素活性の低下が卵巣の発育不全を誘発する可能性がある。GF マウスは生殖能力が低いことが報告されているが、これは卵巣のステロイド合成能の低下によるものであると考えられる<sup>(76)</sup>。腸内細菌叢が卵巣のステロイド生成機能の発達にどのように影響するかを解明するために、さらなる研究が必要である。

本研究では、発達期の GF マウスの糞中コルチコステロンレベルが、エストロゲンおよびプロゲステロンレベルと同様に、SPF マウスよりも低かった。さらに、GF-SPF マウスと GF-Guinea pig マウスのレベルは、GF マウスのレベルよりも高かった。一方、Neufeld らによる先行研究において、GF マウスの血漿コルチコステロン濃度は SPF マウスの血漿コルチコステロン濃度よりも高いことが報告されている<sup>(105)</sup>。この矛盾の正確な理由は不明であるが、先行研究の GF マウスは、新奇環境に置かれた直後に血液サンプルを採取後した。本研究のホームケージでの糞便サンプリングは、新奇環境下の血液サンプリングよりマウスへのストレスが少ないことが考えられる。このことによって、本研究におけるコルチコステロンレベルの低下に起因する可能性がある。我々のデータは、GF マウスのコルチコステロンの基礎分泌レベルが通常のマウスよりも低い可能性があると考えた。Sudo らは、GF マウスのストレス刺激に対するコルチコステロンの放出が、SPF マウスよりも増加することを示唆した<sup>(13)</sup>。このことは、GF マウスの副腎皮質における糖質コルチコイド合成は阻害されないことを示している。先行研究と本実験の結果を合わせて考慮すると、腸内細菌叢は HPA 軸の調節に発達的影響を与える可能性がある。

我々はまた、使用した床敷を用いて雌マウスの匂い嗜好性を調査した。雄の匂いがついた床敷は、異性間のコミュニケーションにおいて重要な役割を果たす揮発性化合物と不揮発

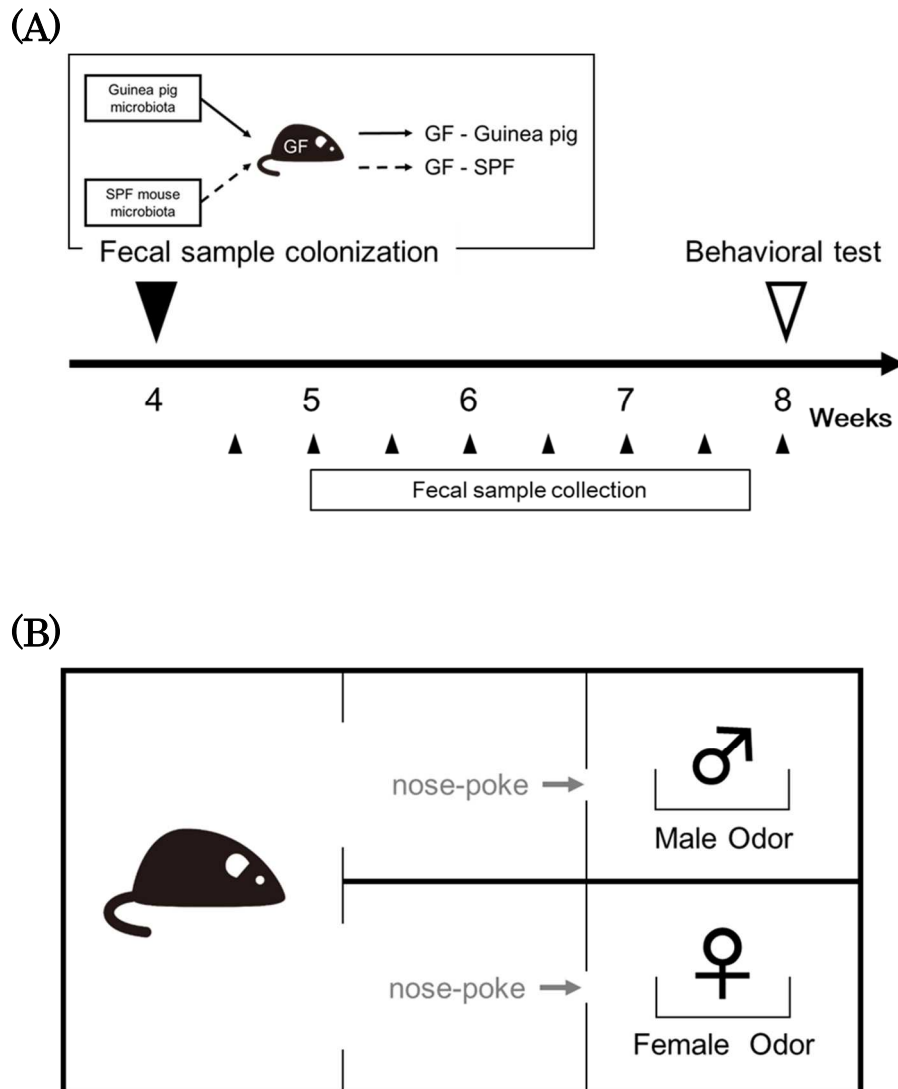
性化合物の両方が含まれている<sup>(106-109)</sup>。雌 GF マウスは、雄の匂いよりも雌の匂いを長く嗅ぎ、雄の匂い区画より雌の匂い区画に滞在時間費やしたため、本実験の結果は興味深いものであった。また、GF マウスは雄の匂いに対する臭い嗅ぎ時間は、すべてのマウスグループの中で最も低かった。これらの結果は、雌の GF マウスは雄の匂いに嗜好性を示さなかったことを示唆する。予想に反して、雄の匂いに対する嗜好性は GF-SPF マウスのみで観察された。雄の匂いに対する雌マウスの嗜好性は、発情周期に関連し、周期的な変動があることが報告されている<sup>(110)</sup>。本実験において、odor preference test では雌の発情周期を追跡していないが、GF-Guinea pig マウスと SPF マウスで雄の匂いに対する嗜好性が減衰する時期であった可能性がある。卵巣摘出された雌マウスは雄の匂いに対する嗜好性は見られなかったが、エストラジオールやプロゲステロンの投与によって雄の匂いに嗜好性を示すことが報告されている<sup>(111)</sup>。GF マウスのステロイドホルモンレベルの低下を考慮すると、GF マウスで示された同性に対する嗜好性は、エストロゲンとプロゲステロンの分泌レベルの低下によって部分的に引き起こされた可能性があり、これによって GF マウスで見られる着床率の低下に寄与する可能性がある。

本研究では、糞中ステロイドレベルにおいて GF-SPF マウスと GF-Guinea pig マウス間に差異があることを発見した。SPF マウスにおいて、GF マウスではみられない、サンプリング期間後期におけるエストラジオールレベルの増加が観察された(Fig3-2B)。そして、SPF マウス腸内細菌叢をコロナイゼーションした GF マウスは、サンプリング期間後期にエストラジオールレベルが増加した。興味深いことに、モルモット腸内細菌叢をコロナイゼーションした GF マウスでは、サンプリング期間後期のエストラジオールの増加が見られなかった。プロゲステロンにおいて、SPF マウスと同様に、GF-Guinea pig マウスのプロゲステロンレベルは段階的な増加を示したが、全体的なプロゲステロンの分泌レベルは、GF-SPF と SPF マウスよりも低かった。更に、GF-Guinea pig マウスのコルチコステロンレベルは、サンプリング期間中に変動はなかったが、GF-SPF マウスのコルチコステロンレベル

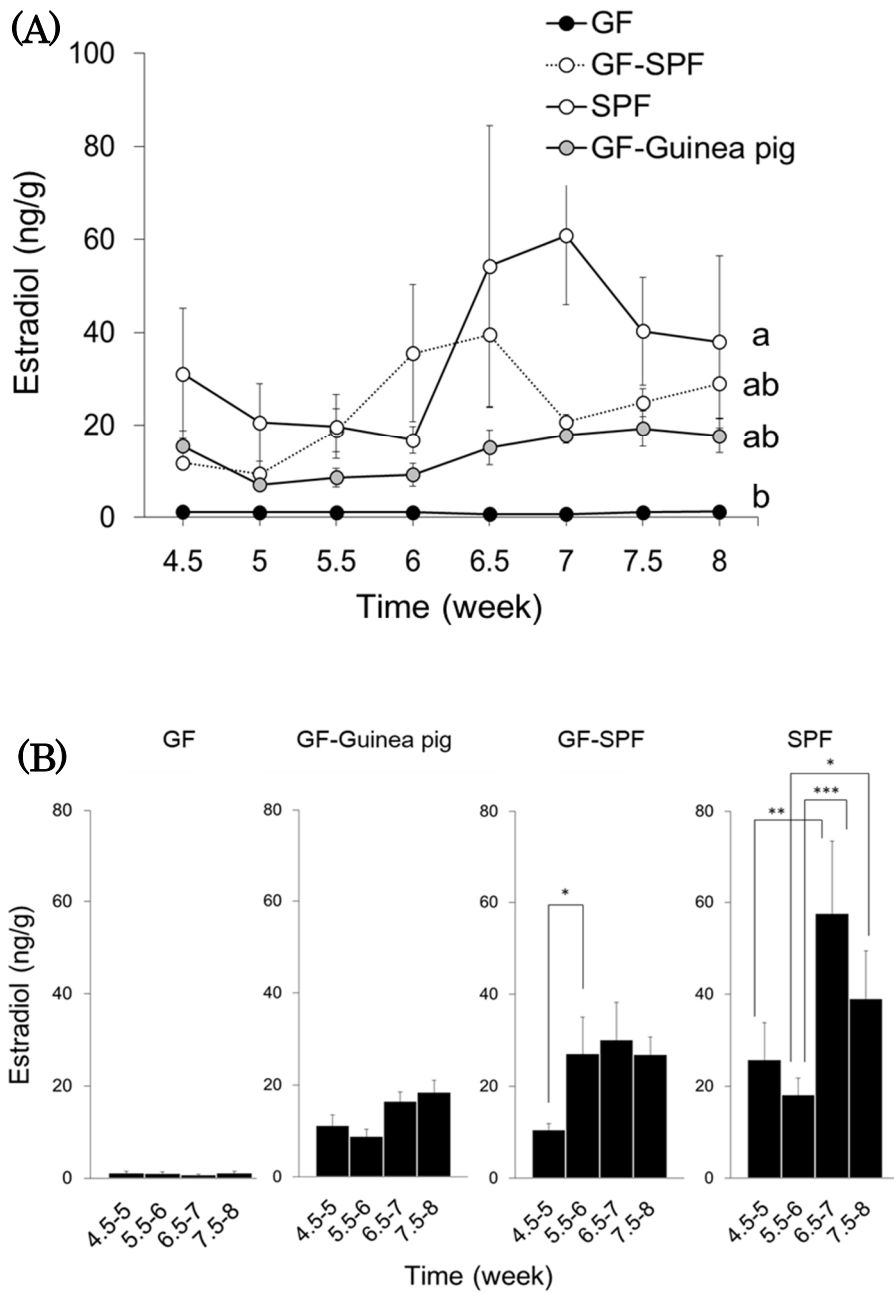
は、SPF マウスと同様に段階的な減少を示した。腸内細菌叢の組成は宿主の種によって異なり、特定種にのみ生息する細菌が存在する<sup>(113,114)</sup>。Chung らは、マウスの腸内細菌叢を投与することで GF マウスの低下した T 細胞数と樹状細胞数が改善するが、ヒトの腸内細菌叢の投与ではこの改善が見られなかったことを報告した<sup>(114)</sup>。これらのことから、宿主固有の細菌叢は正常な免疫機能の発達において、重要であることが示唆される。したがって、GF-Guinea pig マウスの糞中ホルモンレベルが GF-SPF マウスと異なる現象は、宿主固有の細菌叢の不足によるものかもしれない。

結論として、我々の結果は、発達期において GF マウスは SPF マウスと比較して性腺ステロイドホルモンおよびコルチコステロンの含有量の低下を示した。また、発達期の腸内細菌叢が匂いの嗜好性の発達に影響を与えたことを示した。更に、宿主固有の腸内細菌叢が正常な性腺ステロイドホルモンとコルチコステロンの分泌に重要であることを示唆した。

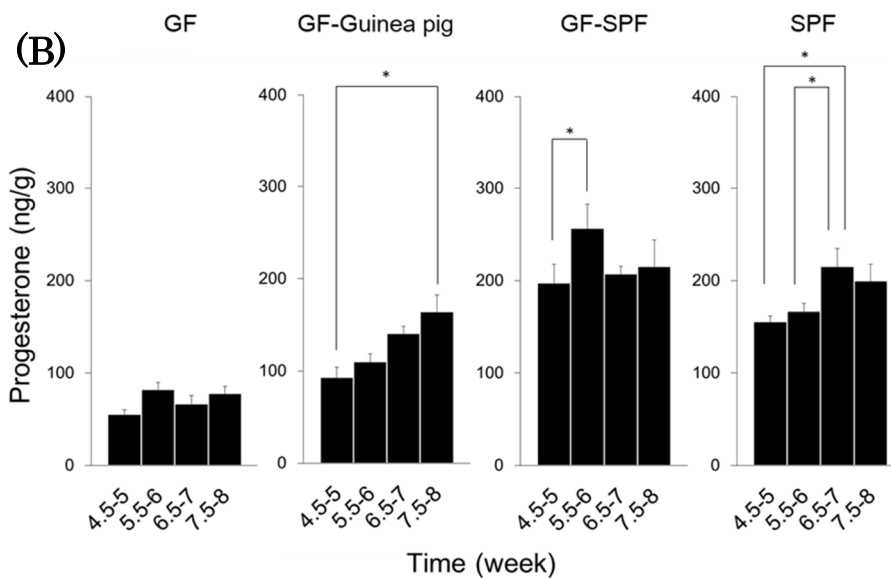
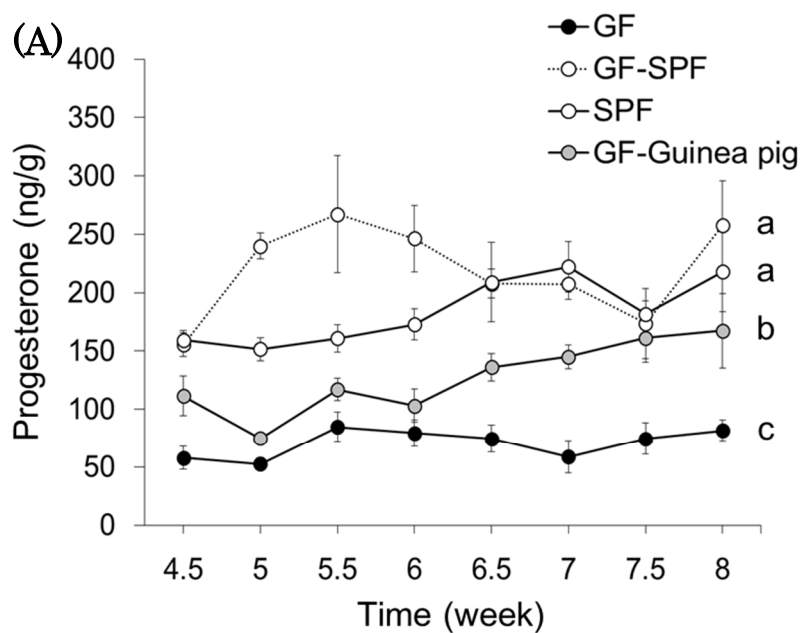
図表



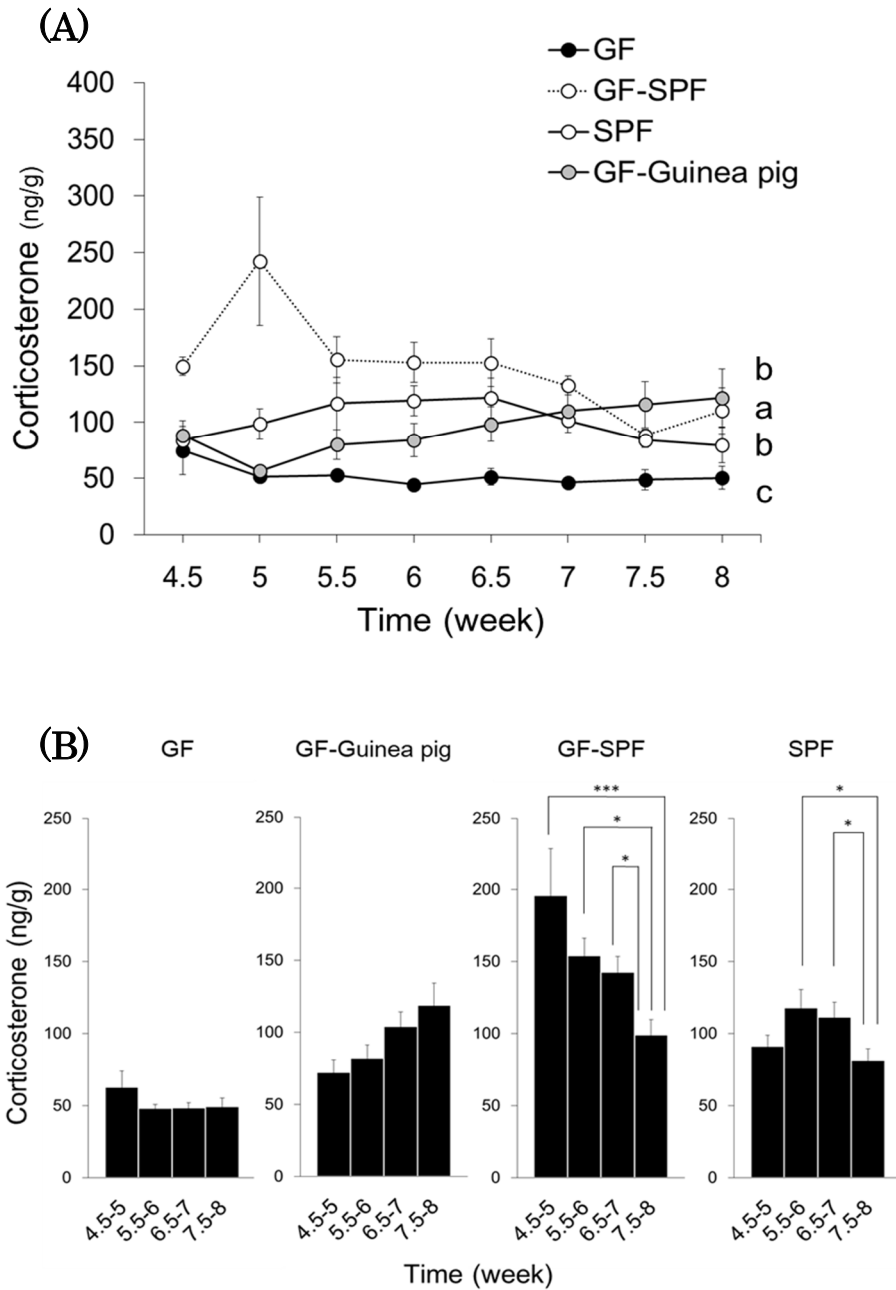
**Fig3-1.** (A) 実験スケジュール。specific pathogen-free (SPF) マウスまたはモルモットの糞便細菌叢を4週齢の無菌 (GF) マウスに経口投与した (GF-SPF または GF-Guinea pig マウス)。黒い三角形は、ステロイドホルモン分析用の糞便サンプルをサンプリングした日数を示す。8-9週齢時にすべてのマウスをアイソレーターから出した直後に、行動実験を実施しました。(B) odor preference test のテストケージの概要図。



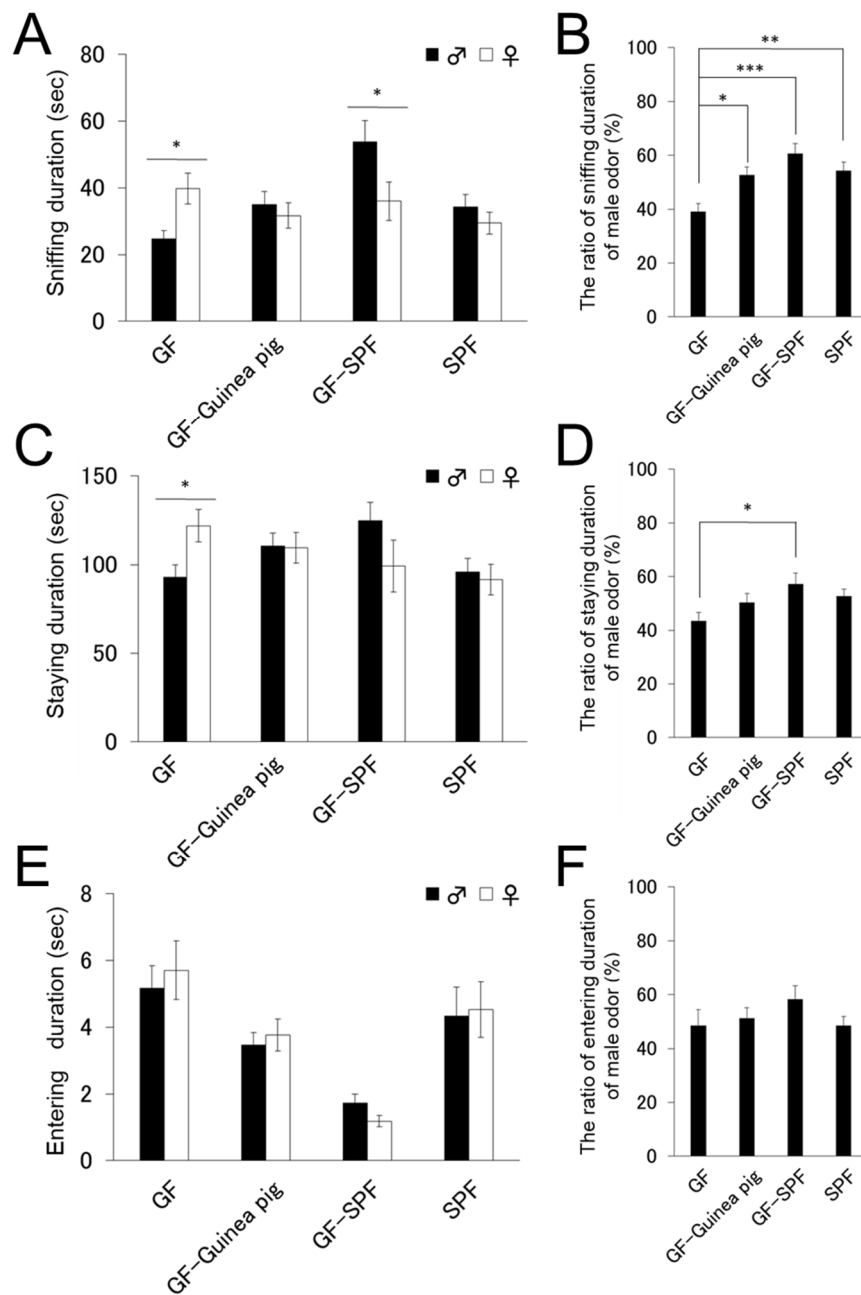
**Fig3-2.** (A) 各グループの発達期におけるエストラジオール含量の経時変化 (GF;n = 3, GF-Guinea pig; n = 4, GF-SPF; n = 3, SPF; n = 5)。折れ線グラフのアルファベットは、同じアルファベットのグループ間で有意差がないことを示す。GF マウスは、糞便中エストラジオールレベルの低下を示した(GF vs. SPF;  $P < 0.05$ )。 (B) 週毎の各糞便エストラジオールの変動を示している。GF-SPF と SPF マウスは、サンプリング期間の後半にエストラジオール含量の上昇を示した。GF と GF-Guinea pig マウスはエストラジオールレベルの増加を示さなかった。データは平均値±標準誤差で表した。\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ 。



**Fig3-3.** (A) 各グループの発達期におけるプロゲステロン含量の経時変化 (GF; n = 3, GF-Guinea pig; n = 4, GF-SPF; n = 3, SPF; n = 5)。折れ線グラフのアルファベットは、同じアルファベットの群間で有意差がないことを示す。GF マウスは低い糞便中プロゲステロン含量を示した (GF vs. SPF;  $P < 0.001$ , GF vs. GF-SPF;  $P < 0.001$ , GF vs. GF-Guinea pig;  $P < 0.01$ )。GF-Guinea pig マウスのプロゲステロンレベルは、SPF マウスと GF-SPF マウスよりも低かった (GF-Guinea pig vs. SPF;  $P < 0.001$ , GF-Guinea pig vs. GF-SPF;  $P < 0.001$ )。 (B) 週毎の各糞便プロゲステロンの変動を示している。SPF と GF-Guinea pig マウスのプロゲステロンレベルは徐々に増加した。GF マウスはプロゲステロンレベルの増加を示さず、GF-SPF マウスの上昇は一時的なものであった。データは平均値 ± 標準誤差で表した。\* $P < 0.05$ 。

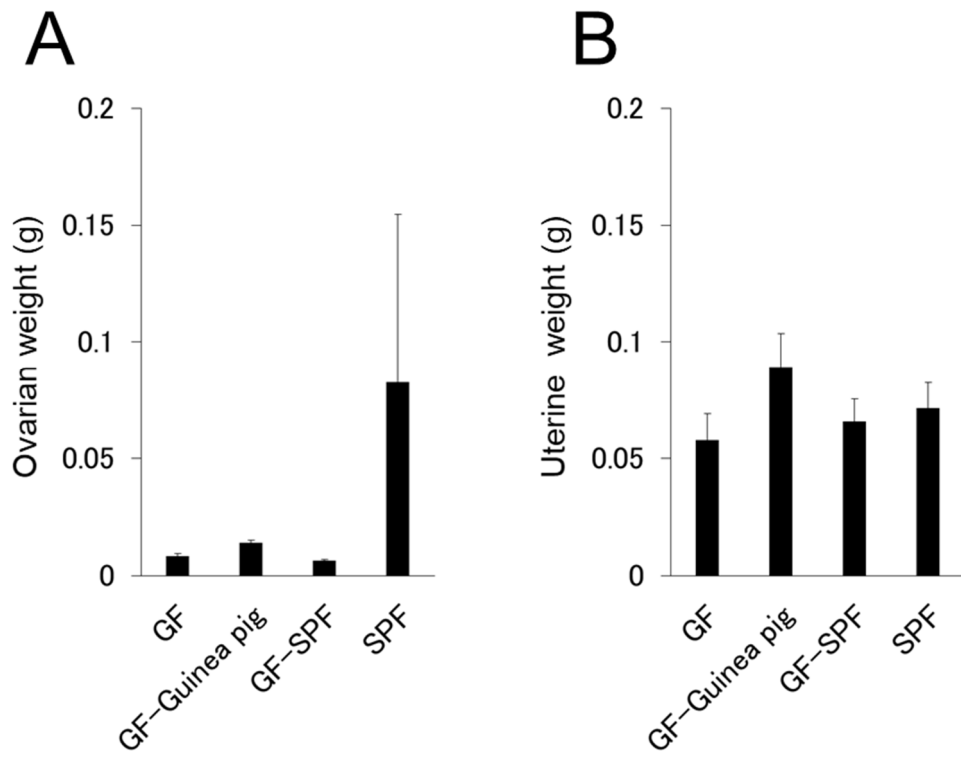


**Fig3-4.** (A) 各グループの発達期におけるコルチコステロン濃度の経時変化 (GF;n = 3, GF-Guinea pig; n = 4, GF-SPF; n = 3, SPF; n = 5)。折れ線グラフのアルファベットは、同じアルファベットのグループ間で有意差がないことを示す。GF マウスは低い糞便中コルチコステロンレベルを示した(GF vs. SPF;  $P < 0.01$ , GF vs. GF-SPF;  $P < 0.001$ , GF vs. GF-Guinea pig;  $P < 0.05$ )。 (B) 週毎の各糞便コルチコステロンの変動を示している。SPF と GF-SPF マウスのコルチコステロンレベルは段階的に低下した。GF と Guinea pig マウスは、コルチコステロンレベルの減少を示さなかった。データは平均値±標準誤差で表した。\* $P < 0.05$ , \*\*\* $P < 0.001$ 。



**Fig3-5.** 各グループにおける odor preference test の匂い嗅ぎ時間(A)と雄匂い区画に費やされた匂い嗅ぎ時間の割合(B)、滞在時間(C)と雄匂い区画に費やされた滞在時間の割合(D)、進入時間(E)と雄匂い区画に費やされた進入時間の割合(F)を示している (GF; n = 9, GF-Guinea pig; n = 11, GF-SPF; n = 9, SPF; n = 14)。データは平均値±標準誤差で表した。\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ 。





**Fig3-6.** 8-9 週齢時の各グループの卵巣重量(A)および子宮重量(B) (GF; n = 9, GF-Guinea pig; n = 11, GF-SPF; n = 9, SPF; n = 12)。

	F 値	自由度 1	自由度 2	有意確率
week	1.43914	7	77	0.202065
group	5.966875	3	11	0.011443
week*group	0.787827	21	77	0.725283

	有意確率
GF vs GF-SPF	0.217463
GF vs SPF	0.012176
GF vs GF-Guinea pig	1
SPF vs GF-SPF	1
SPF vs GF-Guinea pig	0.114855
GF-SPF vsGF-Guinea pig	1

		有意確率
4.5week	GF vs GF-SPF	1
	GF vs SPF	0.342767
	GF vs GF-Guinea pig	1
	SPF vs GF-SPF	1
	SPF vs GF-Guinea pig	1
	GF-SPF vsGF-Guinea pig	1
5week	GF vs GF-SPF	1
	GF vs SPF	0.251129
	GF vs GF-Guinea pig	1
	SPF vs GF-SPF	1
	SPF vs GF-Guinea pig	0.656226
	GF-SPF vsGF-Guinea pig	1
5.5week	GF vs GF-SPF	0.343369
	GF vs SPF	0.179963
	GF vs GF-Guinea pig	1
	SPF vs GF-SPF	1
	SPF vs GF-Guinea pig	0.809112
	GF-SPF vsGF-Guinea pig	1
6week	GF vs GF-SPF	0.027336
	GF vs SPF	0.590618
	GF vs GF-Guinea pig	1
	SPF vs GF-SPF	0.320473
	SPF vs GF-Guinea pig	1
	GF-SPF vsGF-Guinea pig	0.086671
6.5week	GF vs GF-SPF	1
	GF vs SPF	0.674489
	GF vs GF-Guinea pig	1
	SPF vs GF-SPF	1
	SPF vs GF-Guinea pig	1
	GF-SPF vsGF-Guinea pig	1
7week	GF vs GF-SPF	1
	GF vs SPF	0.011134
	GF vs GF-Guinea pig	1
	SPF vs GF-SPF	0.120602
	SPF vs GF-Guinea pig	0.053445
	GF-SPF vsGF-Guinea pig	1
7.5week	GF vs GF-SPF	0.598193
	GF vs SPF	0.04207
	GF vs GF-Guinea pig	1
	SPF vs GF-SPF	1
	SPF vs GF-Guinea pig	0.480587
	GF-SPF vsGF-Guinea pig	1
8week	GF vs GF-SPF	1
	GF vs SPF	0.470988
	GF vs GF-Guinea pig	1
	SPF vs GF-SPF	1
	SPF vs GF-Guinea pig	1
	GF-SPF vsGF-Guinea pig	1

**Table3-1.** 各群の試験期間内の糞中エストラジオール含量における分散分析表。黄色で塗りつぶされたセルは、 $P < 0.05$ であることを示し、オレンジ色塗りつぶされたセルは、 $0.05 < P < 0.1$ であることを示している。

	F 値	自由度 1	自由度 2	有意確率
week	4.222253	3	78	0.008058
group	7.795295	3	26	0.000714
week*group	2.060516	9	78	0.04334

	有意確率
GF vs GF-SPF	0.0681
GF vs SPF	0.000595
GF vs GF-Guinea pig	0.683328
SPF vs GF-SPF	0.808166
SPF vs GF-Guinea pig	0.025398
GF-SPF vs GF-Guinea pig	1

		有意確率
GF	4.5-5 week vs 5.5-6 week	1
	4.5-5 week vs 6.5-7 week	1
	4.5-5 week vs 7.5-8 week	1
	5.5-6 week vs 6.5-7 week	1
	5.5-6 week vs 7.5-8 week	1
GF-SPF	4.5-5 week vs 5.5-6 week	0.037294
	4.5-5 week vs 6.5-7 week	0.433344
	4.5-5 week vs 7.5-8 week	0.740427
	5.5-6 week vs 6.5-7 week	1
	5.5-6 week vs 7.5-8 week	1
SPF	4.5-5 week vs 5.5-6 week	0.526319
	4.5-5 week vs 6.5-7 week	0.00342
	4.5-5 week vs 7.5-8 week	0.651009
	5.5-6 week vs 6.5-7 week	0.001373
	5.5-6 week vs 7.5-8 week	0.014402
GF Guinea pig	4.5-5 week vs 5.5-6 week	1
	4.5-5 week vs 6.5-7 week	1
	4.5-5 week vs 7.5-8 week	1
	5.5-6 week vs 6.5-7 week	1
	5.5-6 week vs 7.5-8 week	1
6.5-7 week vs 7.5-8 week	1	

		有意確率
4.5-5 week	GF vs GF-SPF	1
	GF vs SPF	0.024371
	GF vs GF-Guinea pig	1
	SPF vs GF-SPF	0.372028
	SPF vs GF-Guinea pig	0.314652
5.5-6 week	GF-SPF vs GF-Guinea pig	1
	GF vs GF-SPF	0.002116
	GF vs SPF	0.033874
	GF vs GF-Guinea pig	1
	SPF vs GF-SPF	0.763069
6.5-7 week	SPF vs GF-Guinea pig	0.51596
	GF-SPF vs GF-Guinea pig	0.029472
	GF vs GF-SPF	0.677706
	GF vs SPF	0.009029
	GF vs GF-Guinea pig	1
7.5-8 week	SPF vs GF-SPF	0.591773
	SPF vs GF-Guinea pig	0.058032
	GF-SPF vs GF-Guinea pig	1
	GF vs GF-SPF	0.20229
	GF vs SPF	0.006301
GF vs GF-Guinea pig	GF vs GF-Guinea pig	0.71992
	SPF vs GF-SPF	1
	SPF vs GF-Guinea pig	0.229006
GF-SPF vs GF-Guinea pig	1	

**Table3-2.** 各群の試験期間内の糞中エストラジオール含量における分散分析表。黄色で塗りつぶされたセルは、 $P < 0.05$ であることを示し、オレンジ色塗りつぶされたセルは、 $0.05 < P < 0.1$ であることを示している。

	F 値	自由度 1	自由度 2	有意確率
week	3.206151	7	77	0.004928
group	55.94063	3	11	6.00E-07
week*group	1.642426	21	77	0.060904

	有意確率
GF vs GF-SPF	9.63E-07
GF vs SPF	4.69E-06
GF vs GF-Guinea pig	0.003794
SPF vs GF-SPF	0.065372
SPF vs GF-Guinea pig	0.001197
GF-SPF vsGF-Guinea pig	5.53E-05

		有意確率
4.5week	GF vs GF-SPF	0.002133
	GF vs SPF	0.000611
	GF vs GF-Guinea pig	0.074916
	SPF vs GF-SPF	1
	SPF vs GF-Guinea pig	0.067767
5week	GF-SPF vsGF-Guinea pig	0.19405
	GF vs GF-SPF	1.92E-07
	GF vs SPF	3.8E-05
	GF vs GF-Guinea pig	0.665498
	SPF vs GF-SPF	0.000109
5.5week	SPF vs GF-Guinea pig	0.000186
	GF-SPF vsGF-Guinea pig	3.58E-07
	GF vs GF-SPF	0.001631
	GF vs SPF	0.193547
	GF vs GF-Guinea pig	1
6week	SPF vs GF-SPF	0.034226
	SPF vs GF-Guinea pig	0.912392
	GF-SPF vsGF-Guinea pig	0.004416
	GF vs GF-SPF	0.000362
	GF vs SPF	0.014462
6.5week	GF vs GF-Guinea pig	1
	SPF vs GF-SPF	0.060432
	SPF vs GF-Guinea pig	0.052485
	GF-SPF vsGF-Guinea pig	0.000759
	GF vs GF-SPF	0.0419
7week	GF vs SPF	0.019916
	GF vs GF-Guinea pig	0.783702
	SPF vs GF-SPF	1
	SPF vs GF-Guinea pig	0.299689
	GF-SPF vsGF-Guinea pig	0.50167
7.5week	GF vs GF-SPF	0.001523
	GF vs SPF	0.000259
	GF vs GF-Guinea pig	0.043381
	SPF vs GF-SPF	1
	SPF vs GF-Guinea pig	0.038686
8week	GF-SPF vsGF-Guinea pig	0.221257
	GF vs GF-SPF	0.03778
	GF vs SPF	0.011233
	GF vs GF-Guinea pig	0.055936
	SPF vs GF-SPF	1
8week	SPF vs GF-Guinea pig	1
	GF vs GF-SPF	0.037931
	GF vs SPF	0.084154
	GF vs GF-Guinea pig	0.64327
	SPF vs GF-SPF	1
8week	SPF vs GF-Guinea pig	1
	GF-SPF vsGF-Guinea pig	0.555431

**Table3-3.** 各群の試験期間内の糞中プロゲステロン含量における分散分析表。黄色で塗りつぶされたセルは、 $P < 0.05$ であることを示し、オレンジ色塗りつぶされたセルは、 $0.05 < P < 0.1$ であることを示している。

	F 値	自由度 1	自由度 2	有意確率
week	5.597954	3	78	0.001574
group	55.68973	3	26	1.88E-11
week*group	2.264402	9	78	0.026115

	有意確率
GF vs GF-SPF	5.28E-11
GF vs SPF	1.5E-09
GF vs GF-Guinea pig	0.000438
SPF vs GF-SPF	0.031197
SPF vs GF-Guinea pig	6.3E-05
GF-SPF vs GF-Guinea pig	2.17E-07

		有意確率
GF	4.5-5 week vs 5.5-6 week	1
	4.5-5 week vs 6.5-7 week	1
	4.5-5 week vs 7.5-8 week	1
	5.5-6 week vs 6.5-7 week	1
	5.5-6 week vs 7.5-8 week	1
6.5-7 week vs 7.5-8 week	1	
GF-SPF	4.5-5 week vs 5.5-6 week	0.041943
	4.5-5 week vs 6.5-7 week	1
	4.5-5 week vs 7.5-8 week	1
	5.5-6 week vs 6.5-7 week	0.146157
	5.5-6 week vs 7.5-8 week	0.734217
6.5-7 week vs 7.5-8 week	1	
SPF	4.5-5 week vs 5.5-6 week	1
	4.5-5 week vs 6.5-7 week	0.011901
	4.5-5 week vs 7.5-8 week	0.178992
	5.5-6 week vs 6.5-7 week	0.030176
	5.5-6 week vs 7.5-8 week	0.654048
6.5-7 week vs 7.5-8 week	1	
GF Guinea pig	4.5-5 week vs 5.5-6 week	1
	4.5-5 week vs 6.5-7 week	0.135103
	4.5-5 week vs 7.5-8 week	0.017056
	5.5-6 week vs 6.5-7 week	0.591157
	5.5-6 week vs 7.5-8 week	0.132558
6.5-7 week vs 7.5-8 week	1	

		有意確率
4.5-5 week	GF vs GF-SPF	4.96E-08
	GF vs SPF	3.66E-06
	GF vs GF-Guinea pig	0.153034
	SPF vs GF-SPF	0.062196
	SPF vs GF-Guinea pig	0.00091
	GF-SPF vs GF-Guinea pig	3.8E-06
5.5-6 week	GF vs GF-SPF	3.41E-08
	GF vs SPF	0.000581
	GF vs GF-Guinea pig	0.952633
	SPF vs GF-SPF	0.000266
	SPF vs GF-Guinea pig	0.014684
	GF-SPF vs GF-Guinea pig	2.57E-07
6.5-7 week	GF vs GF-SPF	9.64E-06
	GF vs SPF	5.81E-07
	GF vs GF-Guinea pig	0.011324
	SPF vs GF-SPF	1
	SPF vs GF-Guinea pig	0.002819
	GF-SPF vs GF-Guinea pig	0.025454
7.5-8 week	GF vs GF-SPF	0.000792
	GF vs SPF	0.000893
	GF vs GF-Guinea pig	0.034898
	SPF vs GF-SPF	1
	SPF vs GF-Guinea pig	1
	GF-SPF vs GF-Guinea pig	0.514115

**Table3-4.** 各群の試験期間内の糞中プロゲステロン含量における分散分析表。黄色で塗りつぶされたセルは、 $P < 0.05$ であることを示し、オレンジ色塗りつぶされたセルは、 $0.05 < P < 0.1$ であることを示している。

	F 値	自由度 1	自由度 2	有意確率
week	1.157	7	77	0.337
group	18.548	3	11	0.00E+00
week*group	3.2	21	77	

	有意確率
GF vs GF-SPF	0
GF vs SPF	0.009
GF vs GF-Guinea pig	0.031
SPF vs GF-SPF	0.01
SPF vs GF-Guinea pig	1
GF-SPF vsGF-Guinea pig	0.006

		有意確率
4.5week	GF vs GF-SPF	0.019
	GF vs SPF	1
	GF vs GF-Guinea pig	1
	SPF vs GF-SPF	0.021
	SPF vs GF-Guinea pig	1
	GF-SPF vsGF-Guinea pig	0.043
5week	GF vs GF-SPF	0.002
	GF vs SPF	1
	GF vs GF-Guinea pig	1
	SPF vs GF-SPF	0.008
	SPF vs GF-Guinea pig	1
	GF-SPF vsGF-Guinea pig	0.002
5.5week	GF vs GF-SPF	0.04
	GF vs SPF	0.239
	GF vs GF-Guinea pig	1
	SPF vs GF-SPF	1
	SPF vs GF-Guinea pig	1
	GF-SPF vsGF-Guinea pig	0.144
6week	GF vs GF-SPF	0.003
	GF vs SPF	0.018
	GF vs GF-Guinea pig	0.487
	SPF vs GF-SPF	0.69
	SPF vs GF-Guinea pig	0.474
	GF-SPF vsGF-Guinea pig	0.04
6.5week	GF vs GF-SPF	0.02
	GF vs SPF	0.087
	GF vs GF-Guinea pig	0.544
	SPF vs GF-SPF	1
	SPF vs GF-Guinea pig	1
	GF-SPF vsGF-Guinea pig	0.331
7week	GF vs GF-SPF	0.003
	GF vs SPF	0.03
	GF vs GF-Guinea pig	0.016
	SPF vs GF-SPF	0.445
	SPF vs GF-Guinea pig	1
	GF-SPF vsGF-Guinea pig	1
7.5week	GF vs GF-SPF	0.424
	GF vs SPF	0.431
	GF vs GF-Guinea pig	0.024
	SPF vs GF-SPF	1
	SPF vs GF-Guinea pig	0.447
	GF-SPF vsGF-Guinea pig	0.979
8week	GF vs GF-SPF	0.478
	GF vs SPF	1
	GF vs GF-Guinea pig	0.189
	SPF vs GF-SPF	1
	SPF vs GF-Guinea pig	0.75
	GF-SPF vsGF-Guinea pig	1

**Table3-5.** 各群の試験期間内の糞中コルチコステロン含量における分散分析表。黄色で塗りつぶされたセルは、 $P < 0.05$ であることを示し、オレンジ色塗りつぶされたセルは、 $0.05 < P < 0.1$ であることを示している。

	F 値	自由度 1	自由度 2	有意確率
week	1.902438	3	78	0.136084
group	25.69853	9	26	6.11E-08
week*group	5.143593	3	78	1.82E-05

	有意確率
GF vs GF-SPF	1.91E-08
GF vs SPF	0.000246
GF vs GF-Guinea pig	0.002149
SPF vs GF-SPF	0.000296
SPF vs GF-Guinea pig	1
GF-SPF vs GF-Guinea pig	0.000105

		有意確率
GF	4.5-5 week vs 5.5-6 week	1
	4.5-5 week vs 6.5-7 week	1
	4.5-5 week vs 7.5-8 week	1
	5.5-6 week vs 6.5-7 week	1
	5.5-6 week vs 7.5-8 week	1
	6.5-7 week vs 7.5-8 week	1
GF-SPF	4.5-5 week vs 5.5-6 week	0.278695
	4.5-5 week vs 6.5-7 week	0.113829
	4.5-5 week vs 7.5-8 week	0.000318
	5.5-6 week vs 6.5-7 week	1
	5.5-6 week vs 7.5-8 week	0.011055
	6.5-7 week vs 7.5-8 week	0.020548
SPF	4.5-5 week vs 5.5-6 week	0.573935
	4.5-5 week vs 6.5-7 week	1
	4.5-5 week vs 7.5-8 week	1
	5.5-6 week vs 6.5-7 week	1
	5.5-6 week vs 7.5-8 week	0.039159
	6.5-7 week vs 7.5-8 week	0.049718
GF Guinea pig	4.5-5 week vs 5.5-6 week	1
	4.5-5 week vs 6.5-7 week	0.580078
	4.5-5 week vs 7.5-8 week	0.076417
	5.5-6 week vs 6.5-7 week	0.64717
	5.5-6 week vs 7.5-8 week	0.075151
	6.5-7 week vs 7.5-8 week	1

		有意確率
4.5-5 week	GF vs GF-SPF	5.97E-05
	GF vs SPF	1
	GF vs GF-Guinea pig	1
	SPF vs GF-SPF	0.000326
	SPF vs GF-Guinea pig	1
	GF-SPF vs GF-Guinea pig	6.48E-05
5.5-6 week	GF vs GF-SPF	1.31E-05
	GF vs SPF	0.000873
	GF vs GF-Guinea pig	0.301367
	SPF vs GF-SPF	0.172618
	SPF vs GF-Guinea pig	0.11406
	GF-SPF vs GF-Guinea pig	0.000956
6.5-7 week	GF vs GF-SPF	1.52E-05
	GF vs SPF	0.000806
	GF vs GF-Guinea pig	0.004973
	SPF vs GF-SPF	0.212112
	SPF vs GF-Guinea pig	1
	GF-SPF vs GF-Guinea pig	0.086451
7.5-8 week	GF vs GF-SPF	0.046515
	GF vs SPF	0.2803
	GF vs GF-Guinea pig	0.001271
	SPF vs GF-SPF	1
	SPF vs GF-Guinea pig	0.085915
	GF-SPF vs GF-Guinea pig	1

**Table3-6.** 各群の試験期間内の糞中コルチコステロン含量における分散分析表。黄色で塗りつぶされたセルは、 $P < 0.05$ であることを示し、オレンジ色塗りつぶされたセルは、 $0.05 < P < 0.1$ であることを示している。

(A) Odor preference tests

匂い嗅ぎ時間の割合	$F_{[3,39]}=6.609, P < 0.001$
滞在時間の割合	$F_{[3,39]}=2.714, n.s.$
進入時間の割合	$F_{[3,39]}=0.999, n.s.$

		有意確率
雄匂い区画に 費やされた 匂い嗅ぎ時間の割合	GF vs GF-SPF	0.000652
	GF vs SPF	0.009023
	GF vs GF-Guinea pig	0.03465
	SPF vs GF-SPF	0.531289
	SPF vs GF-Guinea pig	0.977902
	GF-SPF vs GF-Guinea pig	0.362271
雄匂い区画に 費やされた 滞在時間の割合	GF vs GF-SPF	0.040901
	GF vs SPF	0.183789
	GF vs GF-Guinea pig	0.460166
	SPF vs GF-SPF	0.753777
	SPF vs GF-Guinea pig	0.949429
	GF-SPF vs GF-Guinea pig	0.491097
雄匂い区画に 費やされた 進入時間の割合	GF vs GF-SPF	0.481169
	GF vs SPF	1
	GF vs GF-Guinea pig	0.972789
	SPF vs GF-SPF	0.39385
	SPF vs GF-Guinea pig	0.962415
	GF-SPF vs GF-Guinea pig	0.702373

		有意確率
GF	匂い嗅ぎ時間 ♂ vs ♀	0.024341
	滞在時間 ♂ vs ♀	0.03051
	進入時間 ♂ vs ♀	0.401542
GF-SPF	匂い嗅ぎ時間 ♂ vs ♀	0.037977
	滞在時間 ♂ vs ♀	0.23323
	進入時間 ♂ vs ♀	0.070266
SPF	匂い嗅ぎ時間 ♂ vs ♀	0.38266
	滞在時間 ♂ vs ♀	0.890364
	進入時間 ♂ vs ♀	0.926781
GF Guinea pig	匂い嗅ぎ時間 ♂ vs ♀	0.622375
	滞在時間 ♂ vs ♀	0.973808
	進入時間 ♂ vs ♀	0.57674

(B) 生殖器の重量

卵巣	$F_{[3,37]}=0.801, n.s.$
子宮	$F_{[3,37]}=1.202, n.s.$

		有意確率
卵巣	GF vs GF-SPF	0.999989
	GF vs SPF	0.614064
	GF vs GF-Guinea pig	0.999727
	SPF vs GF-SPF	0.593366
	SPF vs GF-Guinea pig	0.631743
	GF-SPF vs GF-Guinea pig	0.999313

		有意確率
子宮	GF vs GF-SPF	0.973687
	GF vs SPF	0.853144
	GF vs GF-Guinea pig	0.290205
	SPF vs GF-SPF	0.985477
	SPF vs GF-Guinea pig	0.697948
	GF-SPF vs GF-Guinea pig	0.536717

Table3-7. 各群の Odor preference test(A)と生殖器の重量(B)における分散分析表。黄色で塗りつぶされたセルは、 $P < 0.05$ であることを示した。



## 総合考察

発達期に非常に強いストレスをうける早期離乳による腸内細菌叢の変動が行動および内分泌系に対しておよぼす影響を解明することを目的に研究を実施した。幼少期ストレスによる成長後の行動や神経発達、ストレス応答性の亢進が恒久的に持続することが知られているが、腸内細菌叢の関与は検討されていない。そこで、第1章では通常よりも早く離乳したマウスの行動表現型に及ぼす腸内細菌叢の影響を、無菌マウスを用いて検討した。

実験1ではEWマウスとNWマウスの4週齢および8週齢における行動、腸内細菌叢の構成に差異があるかを調べた。EWマウスはMarble burying testにおける多動性の増加が認められた。また、EW雄マウスでは低うつ様行動を示すのに対し、EW雌マウスはより高うつ様行動を示す傾向があった。実験2では、ビニルアイソレーター内で無菌マウスを出産させ、10日齢の時に無菌の母マウスにEWマウスまたはNWマウス糞便由来細菌叢を経口投与して各細菌叢マウス(GF-EW or GF-NW)を作成した。それらのマウスの行動と腸内細菌叢構成、腸管免疫細胞を測定した。GF-EWマウスとGF-NWマウス間では、4週齢および8週齢での腸内細菌叢の構成に有意な差異が認められた。4週齢時のTail suspension testでは、GF-EWマウスはGF-NWマウスより顕著なうつ様行動を示したが、この差異は8週齢時にはみられなかった。また、8週齢のGF-EWマウスの脾臓ではT細胞の数およびFoxp3陽性細胞の減少が認められた。これらのことから、EWによる行動発達および免疫系の変化には腸内細菌叢の変化が関与する可能性が考えられる。本実験の結果は、ヒトにおける大うつ病患者の腸内細菌叢構成の変動やストレス誘発性うつ様行動の増進を示す先行研究の結果を支持し、ストレス誘発性のうつ様行動の増進を腸内細菌叢が誘発することを明らかにした。宿主のストレス曝露によってうつ様行動を誘発する腸内細菌叢の構成変化が生じることから、抗生物質処理やシンバイオティクス投与によるストレス誘発性の腸内細菌叢の構成変化の阻害することで、幼少期の行動異常を予防できることが期待できる。

第 2 章では、この母性行動の伝播における腸内細菌叢の関与を明らかにすることを目的に実験した。第 1 章の実験 2 と同様の方法を用いて、GF-EW マウスと GF-NW マウスを作成してビニルアイソレーター内で繁殖させ、母性行動を観察した。その結果、GF-EW マウスは GF-NW マウスと比較して、リッキングやグルーミングの割合が低下する傾向があり、巢の出入り回数が顕著に多く、EW マウスで見られる低い母性行動の次世代への伝播にも腸内細菌叢の変化が関与することが示唆された。本章の結果は早期離乳ストレスによって変化した腸内細菌叢の構成が関連することを示したが、そのメカニズムは依然不明瞭なままである。この母性行動の表現型の変動の原因として考えられる要因には妊娠期の性腺由来ホルモンと受けた母性行動の経験がある。細菌と内分泌ホルモンの相互作用は知られており、早期離乳ストレスによって変化した腸内細菌叢の構成変化が性腺由来ホルモンに作用し、母性行動の発現に影響をおよぼした可能性が考えられる。

第 3 章では、性発達に対する腸内細菌叢の影響を調査することを目的とした。4 週齢の無菌マウスに SPF マウス、SPF マウスまたはモルモットの糞便由来細菌叢を投与した各細菌叢マウス(GF-SPF or GF-Guinea pig)を作出した。その雌の糞中ステロイドホルモン(エストラジオール、プロゲステロン、コルチコステロン)の濃度を 8 週齢まで継時的に測定した。また、これらの雌マウスが雌雄どちらの匂いを選択するかのテストも実施した。その結果、無菌マウスのステロイドホルモンレベルは SPF マウスよりも低く、SPF マウスでみられる週齢による増加もなかった。GF-SPF マウスでは、SPF マウスと類似したホルモン変動がみられたが、GF-Guinea pig マウスのホルモンレベルはそれよりも低かった。興味深いことに、無菌マウスは他のマウスと異なり、雌が雄の匂いを選択しなかった。これらのことから、腸内細菌叢は性発達に影響をおよぼすことが示唆された。

本実験は無菌マウスの低い性腺由来ホルモンを観察しただけではなく、宿主固有の腸内細菌叢が宿主の内分泌ホルモンレベルに影響を及ぼすことを示した。このことから、第 2 章での早期離乳マウス糞便由来菌液投与マウスの低い母性行動の発現は、早期離乳ストレス

によって変化した腸内細菌叢構成が宿主の内分泌ホルモン、特に性腺由来ホルモンに作用して母性行動を変化させた可能性がある。これを解明するためには、さらなる検証が必要である。いずれにせよ、本研究から、幼少期の母子関係やストレスによって仔の情動行動や内分泌発達に変化する現象において、腸内細菌叢の構成変化が重要な役割を果たすことが明らかとなった。今後、腸内細菌叢がどのようにこれらの現象に関与するのかといったメカニズムがさらに解明され、幼少期に母子関係が障害されたりストレスに曝露された動物の行動や中枢機能が、プロバイオティクス投与によって改善されることが示されれば、伴侶動物や家畜動物の育成方法、また人の育児においても応用価値を生み出すことが期待できる。

## 謝辞

本研究の遂行に当たり、本学伴侶動物学研究室の茂木一孝准教授、久世明香先生、野元謙作先生、本学介在動物学研究室の菊水健史教授、永澤美保先生には研究全般にわたり、多くのご助言、ご助力を賜りました。ご多忙にもかかわらず、私の質問、疑問には的確なご指導を頂き、誠にありがとうございました。また理化学研究所生命医科学研究センター（IMS）粘膜システム研究チームの大野博司先生、宮内栄治先生、竹内直志先生には、本研究の免疫学的解析方法について沢山のご指導を賜りました。この場をお借りして厚く御礼申し上げます。

本研究で命を犠牲にしてたくさんの貴重なデータを提供してくれた実験動物の冥福を祈るとともに、深く感謝いたします。

末尾になりますが、博士課程後期課程に進学することを快諾し、学生生活を援助していただいた、家族に心から感謝いたします。

## 参考文献

- (1) Kobozev I, Reinoso Webb C, Furr KL, Grisham MB. Role of the enteric microbiota in intestinal homeostasis and inflammation. *Free Radic Biol Med* 2014 Mar;68:122-133.
- (2) Ramakrishna BS. Role of the gut microbiota in human nutrition and metabolism. *J Gastroenterol Hepatol* 2013 Dec;28 Suppl 4:9-17.
- (3) Moya-Perez A, Luczynski P, Renes IB, Wang S, Borre Y, Anthony Ryan C, et al. Intervention strategies for cesarean section-induced alterations in the microbiota-gut-brain axis. *Nutr Rev* 2017 Apr 1;75(4):225-240.
- (4) Zachariassen LF, Krych L, Rasmussen SH, Nielsen DS, Kot W, Holm TL, et al. Cesarean Section Induces Microbiota-Regulated Immune Disturbances in C57BL/6 Mice. *J Immunol* 2019 Jan 1;202(1):142-150.
- (5) Blustein J, Attina T, Liu M, Ryan AM, Cox LM, Blaser MJ, et al. Association of caesarean delivery with child adiposity from age 6 weeks to 15 years. *Int J Obes (Lond)* 2013 Jul;37(7):900-906.
- (6) Metsala J, Lundqvist A, Virta LJ, Kaila M, Gissler M, Virtanen SM. Prenatal and post-natal exposure to antibiotics and risk of asthma in childhood. *Clin Exp Allergy* 2015 Jan;45(1):137-145.
- (7) Mueller NT, Whyatt R, Hoepner L, Oberfield S, Dominguez-Bello MG, Widen EM, et al. Prenatal exposure to antibiotics, cesarean section and risk of childhood obesity. *Int J Obes (Lond)* 2015 Apr;39(4):665-670.
- (8) Sgritta M, Dooling SW, Buffington SA, Momin EN, Francis MB, Britton RA, et al. Mechanisms Underlying Microbial-Mediated Changes in Social Behavior in Mouse Models of Autism Spectrum Disorder. *Neuron* 2019 Jan 16;101(2):246-259.e6.
- (9) Hsiao EY, McBride SW, Hsien S, Sharon G, Hyde ER, McCue T, et al. Microbiota modulate behavioral and physiological abnormalities associated with neurodevelopmental disorders. *Cell* 2013 Dec 19;155(7):1451-1463.

- (10) Bercik P, Denou E, Collins J, Jackson W, Lu J, Jury J, et al. The intestinal microbiota affect central levels of brain-derived neurotrophic factor and behavior in mice. *Gastroenterology* 2011 Aug;141(2):599-609, 609.e1-3.
- (11) Hata T, Asano Y, Yoshihara K, Kimura-Todani T, Miyata N, Zhang XT, et al. Regulation of gut luminal serotonin by commensal microbiota in mice. *PLoS One* 2017 Jul 6;12(7):e0180745.
- (12) Tochitani S, Ikeno T, Ito T, Sakurai A, Yamauchi T, Matsuzaki H. Administration of Non-Absorbable Antibiotics to Pregnant Mice to Perturb the Maternal Gut Microbiota Is Associated with Alterations in Offspring Behavior. *PLoS One* 2016 Jan 20;11(1):e0138293.
- (13) Sudo N, Chida Y, Aiba Y, Sonoda J, Oyama N, Yu XN, et al. Postnatal microbial colonization programs the hypothalamic-pituitary-adrenal system for stress response in mice. *J Physiol* 2004 Jul 1;558(Pt 1):263-275.
- (14) Krugers HJ, Arp JM, Xiong H, Kanatsou S, Lesuis SL, Korosi A, et al. Early life adversity: Lasting consequences for emotional learning. *Neurobiol Stress* 2016 Nov 27;6:14-21.
- (15) Nakamura K, Kikusui T, Takeuchi Y, Mori Y. Changes in social instigation- and food restriction-induced aggressive behaviors and hippocampal 5HT1B mRNA receptor expression in male mice from early weaning. *Behav Brain Res* 2008 Mar 5;187(2):442-448.
- (16) Kikusui T, Takeuchi Y, Mori Y. Early weaning induces anxiety and aggression in adult mice. *Physiol Behav* 2004 Mar;81(1):37-42.
- (17) Kikusui T, Ichikawa S, Mori Y. Maternal deprivation by early weaning increases corticosterone and decreases hippocampal BDNF and neurogenesis in mice. *Psychoneuroendocrinology* 2009 Jun;34(5):762-772.
- (18) Mogi K, Ishida Y, Nagasawa M, Kikusui T. Early weaning impairs fear extinction and decreases brain-derived neurotrophic factor expression in the prefrontal cortex of adult male C57BL/6 mice. *Dev Psychobiol* 2016 Dec;58(8):1034-1042.

- (19) Kanitz E, Tuchscherer M, Tuchscherer A, Stabenow B, Manteuffel G. Neuroendocrine and immune responses to acute endotoxemia in suckling and weaned piglets. *Biol Neonate* 2002;81(3):203-209.
- (20) Babb JA, Carini LM, Spears SL, Nephew BC. Transgenerational effects of social stress on social behavior, corticosterone, oxytocin, and prolactin in rats. *Horm Behav* 2014 Apr;65(4):386-393.
- (21) Nephew BC, Carini LM, Sallah S, Cotino C, Alyamani RAS, Pittet F, et al. Intergenerational accumulation of impairments in maternal behavior following postnatal social stress. *Psychoneuroendocrinology* 2017 Aug;82:98-106.
- (22) Grundwald NJ, Brunton PJ. Prenatal stress programs neuroendocrine stress responses and affective behaviors in second generation rats in a sex-dependent manner. *Psychoneuroendocrinology* 2015 Dec;62:204-216.
- (23) Crews D, Gillette R, Scarpino SV, Manikkam M, Savenkova MI, Skinner MK. Epigenetic transgenerational inheritance of altered stress responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012 Jun 5;109(23):9143-9148.
- (24) Francis D, Diorio J, Liu D, Meaney MJ. Nongenomic transmission across generations of maternal behavior and stress responses in the rat. *Science* 1999 Nov 5;286(5442):1155-1158.
- (25) Weaver IC. Epigenetic programming by maternal behavior and pharmacological intervention. Nature versus nurture: let's call the whole thing off. *Epigenetics* 2007 Jan-Mar;2(1):22-28.
- (26) Kaffman A, Meaney MJ. Neurodevelopmental sequelae of postnatal maternal care in rodents: clinical and research implications of molecular insights. *J Child Psychol Psychiatry* 2007 Mar-Apr;48(3-4):224-244.
- (27) Kikusui T, Kanbara N, Ozaki M, Hirayama N, Ida K, Tokita M, et al. Early weaning increases anxiety via brain-derived neurotrophic factor signaling in the mouse prefrontal cortex. *Sci Rep* 2019 Mar 8;9(1):3991-019-40530-9.

- (28) Hansen CH, Andersen LS, Krych L, Metzdorff SB, Hasselby JP, Skov S, et al. Mode of delivery shapes gut colonization pattern and modulates regulatory immunity in mice. *J Immunol* 2014 Aug 1;193(3):1213-1222.
- (29) Hansen CH, Nielsen DS, Kverka M, Zakostelska Z, Klimesova K, Hudcovic T, et al. Patterns of early gut colonization shape future immune responses of the host. *PLoS One* 2012;7(3):e34043.
- (30) Koenig JE, Spor A, Scalfone N, Fricker AD, Stombaugh J, Knight R, et al. Succession of microbial consortia in the developing infant gut microbiome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011 Mar 15;108 Suppl 1:4578-4585.
- (31) Gomez de Agüero M, Ganai-Vonarburg SC, Fuhrer T, Rupp S, Uchimura Y, Li H, et al. The maternal microbiota drives early postnatal innate immune development. *Science* 2016 Mar 18;351(6279):1296-1302.
- (32) Decker E, Engelmann G, Findeisen A, Gerner P, Laass M, Ney D, et al. Cesarean delivery is associated with celiac disease but not inflammatory bowel disease in children. *Pediatrics* 2010 Jun;125(6):e1433-40.
- (33) Couzin-Frankel J. Bacteria and asthma: untangling the links. *Science* 2010 Nov 26;330(6008):1168-1169.
- (34) Algert CS, McElduff A, Morris JM, Roberts CL. Perinatal risk factors for early onset of Type 1 diabetes in a 2000-2005 birth cohort. *Diabet Med* 2009 Dec;26(12):1193-1197.
- (35) Innis SM. Human milk: maternal dietary lipids and infant development. *Proc Nutr Soc* 2007 Aug;66(3):397-404.
- (36) Borre YE, O'Keefe GW, Clarke G, Stanton C, Dinan TG, Cryan JF. Microbiota and neurodevelopmental windows: implications for brain disorders. *Trends Mol Med* 2014 Sep;20(9):509-518.



- (37) Jasarevic E, Howerton CL, Howard CD, Bale TL. Alterations in the Vaginal Microbiome by Maternal Stress Are Associated With Metabolic Reprogramming of the Offspring Gut and Brain. *Endocrinology* 2015 Sep;156(9):3265-3276.
- (38) Kozich JJ, Westcott SL, Baxter NT, Highlander SK, Schloss PD. Development of a dual-index sequencing strategy and curation pipeline for analyzing amplicon sequence data on the MiSeq Illumina sequencing platform. *Appl Environ Microbiol* 2013 Sep;79(17):5112-5120.
- (39) George ED, Bordner KA, Elwafi HM, Simen AA. Maternal separation with early weaning: a novel mouse model of early life neglect. *BMC Neurosci* 2010 Sep 29;11:123-2202-11-123.
- (40) Portero-Tresserra M, Gracia-Rubio I, Cantacorps L, Pozo OJ, Gomez-Gomez A, Pastor A, et al. Maternal separation increases alcohol-drinking behaviour and reduces endocannabinoid levels in the mouse striatum and prefrontal cortex. *Eur Neuropsychopharmacol* 2018 Apr;28(4):499-512.
- (41) Chen LJ, Shen BQ, Liu DD, Li ST. The effects of early-life predator stress on anxiety- and depression-like behaviors of adult rats. *Neural Plast* 2014;2014:163908.
- (42) Moussaoui N, Jacobs JP, Larauche M, Biraud M, Million M, Mayer E, et al. Chronic Early-life Stress in Rat Pups Alters Basal Corticosterone, Intestinal Permeability, and Fecal Microbiota at Weaning: Influence of Sex. *J Neurogastroenterol Motil* 2017 Jan 30;23(1):135-143.
- (43) Jang HM, Lee KE, Kim DH. The Preventive and Curative Effects of *Lactobacillus reuteri* NK33 and *Bifidobacterium adolescentis* NK98 on Immobilization Stress-Induced Anxiety/Depression and Colitis in Mice. *Nutrients* 2019 Apr 11;11(4):10.3390/nu11040819.
- (44) Deslauriers J, van Wijngaarde M, Geyer MA, Powell S, Risbrough VB. Effects of LPS-induced immune activation prior to trauma exposure on PTSD-like symptoms in mice. *Behav Brain Res* 2017 Apr 14;323:117-123.

- (45) Benmhammed H, El Hayek S, Nassiri A, Bousalham R, Mesfioui A, Ouichou A, et al. Effects of lipopolysaccharide administration and maternal deprivation on anxiety and depressive symptoms in male and female Wistar rats: Neurobehavioral and biochemical assessments. *Behav Brain Res* 2019 Apr 19;362:46-55.
- (46) Al-Amin MM, Sultana R, Sultana S, Rahman MM, Reza HM. Astaxanthin ameliorates prenatal LPS-exposed behavioral deficits and oxidative stress in adult offspring. *BMC Neurosci* 2016 Feb 8;17:11-016-0245-z.
- (47) Lei Y, Chen CJ, Yan XX, Li Z, Deng XH. Early-life lipopolysaccharide exposure potentiates forebrain expression of NLRP3 inflammasome proteins and anxiety-like behavior in adolescent rats. *Brain Res* 2017 Sep 15;1671:43-54.
- (48) Spencer SJ, Martin S, Mouihate A, Pittman QJ. Early-life immune challenge: defining a critical window for effects on adult responses to immune challenge. *Neuropsychopharmacology* 2006 Sep;31(9):1910-1918.
- (49) Custodio CS, Mello BSF, Filho AJMC, de Carvalho Lima CN, Cordeiro RC, Miyajima F, et al. Neonatal Immune Challenge with Lipopolysaccharide Triggers Long-lasting Sex- and Age-related Behavioral and Immune/Neurotrophic Alterations in Mice: Relevance to Autism Spectrum Disorders. *Mol Neurobiol* 2018 May;55(5):3775-3788.
- (50) Zhong JF, Wu WG, Zhang XQ, Tu W, Liu ZX, Fang RJ. Effects of dietary addition of heat-killed *Mycobacterium phlei* on growth performance, immune status and anti-oxidative capacity in early weaned piglets. *Arch Anim Nutr* 2016 Aug;70(4):249-262.
- (51) McLamb BL, Gibson AJ, Overman EL, Stahl C, Moeser AJ. Early weaning stress in pigs impairs innate mucosal immune responses to enterotoxigenic *E. coli* challenge and exacerbates intestinal injury and clinical disease. *PLoS One* 2013 Apr 24;8(4):e59838.
- (52) Hulbert LE, Cobb CJ, Carroll JA, Ballou MA. The effects of early weaning on innate immune responses of Holstein calves. *J Dairy Sci* 2011 May;94(5):2545-2556.

- (53) Deslauriers J, Powell S, Risbrough VB. Immune signaling mechanisms of PTSD risk and symptom development: insights from animal models. *Curr Opin Behav Sci* 2017 Apr;14:123-132.
- (54) Kim SJ, Lee H, Lee G, Oh SJ, Shin MK, Shim I, et al. CD4+CD25+ regulatory T cell depletion modulates anxiety and depression-like behaviors in mice. *PLoS One* 2012;7(7):e42054.
- (55) Li Y, Xiao B, Qiu W, Yang L, Hu B, Tian X, et al. Altered expression of CD4(+)/CD25(+) regulatory T cells and its 5-HT(1a) receptor in patients with major depression disorder. *J Affect Disord* 2010 Jul;124(1-2):68-75.
- (56) Collado MC, Derrien M, Isolauri E, de Vos WM, Salminen S. Intestinal integrity and *Akkermansia muciniphila*, a mucin-degrading member of the intestinal microbiota present in infants, adults, and the elderly. *Appl Environ Microbiol* 2007 Dec;73(23):7767-7770.
- (57) Louis P, Flint HJ. Formation of propionate and butyrate by the human colonic microbiota. *Environ Microbiol* 2017 Jan;19(1):29-41.
- (58) Reunanen J, Kainulainen V, Huuskonen L, Ottman N, Belzer C, Huhtinen H, et al. *Akkermansia muciniphila* Adheres to Enterocytes and Strengthens the Integrity of the Epithelial Cell Layer. *Appl Environ Microbiol* 2015 Jun;81(11):3655-3662.
- (59) Li N, Wang Q, Wang Y, Sun A, Lin Y, Jin Y, et al. Fecal microbiota transplantation from chronic unpredictable mild stress mice donors affects anxiety-like and depression-like behavior in recipient mice via the gut microbiota-inflammation-brain axis. *Stress* 2019 Sep;22(5):592-602.
- (60) Qu W, Liu S, Zhang W, Zhu H, Tao Q, Wang H, et al. Impact of traditional Chinese medicine treatment on chronic unpredictable mild stress-induced depression-like behaviors: intestinal microbiota and gut microbiome function. *Food Funct* 2019 Sep 1;10(9):5886-5897.

- (61) Sun L, Zhang H, Cao Y, Wang C, Zhao C, Wang H, et al. Fluoxetine ameliorates dysbiosis in a depression model induced by chronic unpredicted mild stress in mice. *Int J Med Sci* 2019 Sep 7;16(9):1260-1270.
- (62) Sun L, Ma L, Zhang H, Cao Y, Wang C, Hou N, et al. Fto Deficiency Reduces Anxiety- and Depression-Like Behaviors in Mice via Alterations in Gut Microbiota. *Theranostics* 2019 Jan 24;9(3):721-733.
- (63) Jianguo L, Xueyang J, Cui W, Changxin W, Xuemei Q. Correction: Altered gut metabolome contributes to depression-like behaviors in rats exposed to chronic unpredictable mild stress. *Transl Psychiatry* 2019 Nov 7;9(1):275-019-0645-9.
- (64) Jiang H, Ling Z, Zhang Y, Mao H, Ma Z, Yin Y, et al. Altered fecal microbiota composition in patients with major depressive disorder. *Brain Behav Immun* 2015 Aug;48:186-194.
- (65) Wang YX, Kang XN, Cao Y, Zheng DX, Lu YM, Pang CF, et al. *Porphyromonas gingivalis* induces depression via downregulating p75<sup>NTR</sup>-mediated BDNF maturation in astrocytes. *Brain Behav Immun* 2019 Oct;81:523-534.
- (66) Bailey MT, Kinsey SG, Padgett DA, Sheridan JF, Leblebicioglu B. Social stress enhances IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  production by *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide-stimulated CD11b<sup>+</sup> cells. *Physiol Behav* 2009 Sep 7;98(3):351-358.
- (67) Xu G, Li Y, Ma C, Wang C, Sun Z, Shen Y, et al. Restraint Stress Induced Hyperpermeability and Damage of the Blood-Brain Barrier in the Amygdala of Adult Rats. *Front Mol Neurosci* 2019 Feb 13;12:32.
- (68) Kaakoush NO. Insights into the Role of Erysipelotrichaceae in the Human Host. *Front Cell Infect Microbiol* 2015 Nov 20;5:84.
- (69) Kim JS, Choe H, Lee YR, Kim KM, Park DS. *Intestinibaculum porci* gen. nov., sp. nov., a new member of the family Erysipelotrichaceae isolated from the small intestine of a swine. *J Microbiol* 2019 May;57(5):381-387.

- (70) Saulnier DM, Riehle K, Mistretta TA, Diaz MA, Mandal D, Raza S, et al. Gastrointestinal microbiome signatures of pediatric patients with irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* 2011 Nov;141(5):1782-1791.
- (71) Bangsgaard Bendtsen KM, Krych L, Sorensen DB, Pang W, Nielsen DS, Josefsen K, et al. Gut microbiota composition is correlated to grid floor induced stress and behavior in the BALB/c mouse. *PLoS One* 2012;7(10):e46231.
- (72) Wong JM, de Souza R, Kendall CW, Emam A, Jenkins DJ. Colonic health: fermentation and short chain fatty acids. *J Clin Gastroenterol* 2006 Mar;40(3):235-243.
- (73) O'Malley D, Julio-Pieper M, Gibney SM, Dinan TG, Cryan JF. Distinct alterations in colonic morphology and physiology in two rat models of enhanced stress-induced anxiety and depression-like behaviour. *Stress* 2010 Mar;13(2):114-122.
- (74) Liu D, Diorio J, Tannenbaum B, Caldji C, Francis D, Freedman A, et al. Maternal care, hippocampal glucocorticoid receptors, and hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress. *Science* 1997 Sep 12;277(5332):1659-1662.
- (75) Pryce CR, Ruedi-Bettschen D, Dettling AC, Weston A, Russig H, Ferger B, et al. Long-term effects of early-life environmental manipulations in rodents and primates: Potential animal models in depression research. *Neurosci Biobehav Rev* 2005;29(4-5):649-674.
- (76) Plotsky PM, Thrivikraman KV, Nemeroff CB, Caldji C, Sharma S, Meaney MJ. Long-term consequences of neonatal rearing on central corticotropin-releasing factor systems in adult male rat offspring. *Neuropsychopharmacology* 2005 Dec;30(12):2192-2204.
- (77) Bedrosian TA, Quayle C, Novaresi N, Gage FH. Early life experience drives structural variation of neural genomes in mice. *Science* 2018 Mar 23;359(6382):1395-1399.
- (78) Champagne FA, Francis DD, Mar A, Meaney MJ. Variations in maternal care in the rat as a mediating influence for the effects of environment on development. *Physiol Behav* 2003 Aug;79(3):359-371.

- (79) Meaney MJ. Maternal care, gene expression, and the transmission of individual differences in stress reactivity across generations. *Annu Rev Neurosci* 2001;24:1161-1192.
- (80) Umemura S, Imai S, Mimura A, Fujiwara M, Ebihara S. Impaired Maternal Behavior in *Usp46* Mutant Mice: A Model for Trans-Generational Transmission of Maternal Care. *PLoS One* 2015 Aug 18;10(8):e0136016.
- (81) Kikusui T, Isaka Y, Mori Y. Early weaning deprives mouse pups of maternal care and decreases their maternal behavior in adulthood. *Behav Brain Res* 2005 Jul 30;162(2):200-206.
- (82) Oshiro T, Nagata S, Wang C, Takahashi T, Tsuji H, Asahara T, et al. Bifidobacterium Supplementation of Colostrum and Breast Milk Enhances Weight Gain and Metabolic Responses Associated with Microbiota Establishment in Very-Preterm Infants. *Biomed Hub* 2019 Sep 24;4(3):1-10.
- (83) Padilha M, Iaucci JM, Cabral VP, Diniz EMA, Taddei CR, Saad SMI. Maternal antibiotic prophylaxis affects Bifidobacterium spp. counts in the human milk, during the first week after delivery. *Benef Microbes* 2019 Mar 13;10(2):155-163.
- (84) Terkel J, Rosenblatt JS. Humoral factors underlying maternal behavior at parturition: cross transfusion between freely moving rats. *J Comp Physiol Psychol* 1972 Sep;80(3):365-371.
- (85) Leon M, Numan M, Moltz H. Maternal behavior in the rat: facilitation through gonadectomy. *Science* 1973 Mar 9;179(4077):1018-1019.
- (86) Baker JM, Al-Nakkash L, Herbst-Kralovetz MM. Estrogen-gut microbiome axis: Physiological and clinical implications. *Maturitas* 2017 Sep;103:45-53.
- (87) Ridlon JM, Ikegawa S, Alves JM, Zhou B, Kobayashi A, Iida T, et al. *Clostridium scindens*: a human gut microbe with a high potential to convert glucocorticoids into androgens. *J Lipid Res* 2013 Sep;54(9):2437-2449.

- (88) Ivy AS, Brunson KL, Sandman C, Baram TZ. Dysfunctional nurturing behavior in rat dams with limited access to nesting material: a clinically relevant model for early-life stress. *Neuroscience* 2008 Jun 26;154(3):1132-1142.
- (89) Fleming AS, Luebke C. Timidity prevents the virgin female rat from being a good mother: emotionality differences between nulliparous and parturient females. *Physiol Behav* 1981 Nov;27(5):863-868.
- (90) Lonstein JS. Reduced anxiety in postpartum rats requires recent physical interactions with pups, but is independent of suckling and peripheral sources of hormones. *Horm Behav* 2005 Mar;47(3):241-255.
- (91) Neuman H, Debelius JW, Knight R, Koren O. Microbial endocrinology: the interplay between the microbiota and the endocrine system. *FEMS Microbiol Rev* 2015 Jul;39(4):509-521.
- (92) Moya-Perez A, Perez-Villalba A, Benitez-Paez A, Campillo I, Sanz Y. *Bifidobacterium* CECT 7765 modulates early stress-induced immune, neuroendocrine and behavioral alterations in mice. *Brain Behav Immun* 2017 Oct;65:43-56.
- (93) Markle JG, Frank DN, Mortin-Toth S, Robertson CE, Feazel LM, Rolle-Kampczyk U, et al. Sex differences in the gut microbiome drive hormone-dependent regulation of autoimmunity. *Science* 2013 Mar 1;339(6123):1084-1088.
- (94) Adlercreutz H, Pulkkinen MO, Hamalainen EK, Korpela JT. Studies on the role of intestinal bacteria in metabolism of synthetic and natural steroid hormones. *J Steroid Biochem* 1984 Jan;20(1):217-229.
- (95) Kornman KS, Loesche WJ. Effects of estradiol and progesterone on *Bacteroides melaninogenicus* and *Bacteroides gingivalis*. *Infect Immun* 1982 Jan;35(1):256-263.
- (96) Menon R, Watson SE, Thomas LN, Allred CD, Dabney A, Azcarate-Peril MA, et al. Diet complexity and estrogen receptor beta status affect the composition of the murine intestinal microbiota. *Appl Environ Microbiol* 2013 Sep;79(18):5763-5773.

- (97) Shinoda M, Tamura H, Maejima K, Watarai S. Reproductive ability of germfree ICR female mice (author's transl). *Jikken Dobutsu* 1980 Jan;29(1):55-59.
- (98) Shinoda M, Tamura H, Tajima Y, Maejima K, Watarai S. The weights of genital organs in germfree and conventional ICR mice administered with hCG, estradiol benzoate, progesterone and testosterone propionate (author's transl). *Jikken Dobutsu* 1980 Jul;29(3):345-349.
- (99) Kumar D, Boehm U. Genetic dissection of puberty in mice. *Exp Physiol* 2013 Nov;98(11):1528-1534.
- (100) Sharon G, Segal D, Ringo JM, Hefetz A, Zilber-Rosenberg I, Rosenberg E. Commensal bacteria play a role in mating preference of *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010 Nov 16;107(46):20051-20056.
- (101) Kikusui T, Ishio Y, Nagasawa M, Mogil JS, Mogi K. Early weaning impairs a social contagion of pain-related stretching behavior in mice. *Dev Psychobiol* 2016 Dec;58(8):1101-1107.
- (102) Mannan MA, O'Shaughnessy PJ. Ovarian steroid metabolism during post-natal development in the normal mouse and in the adult hypogonadal (hpg) mouse. *J Reprod Fertil* 1988 Mar;82(2):727-734.
- (103) Shideler SE, Ortuno AM, Moran FM, Moorman EA, Lasley BL. Simple extraction and enzyme immunoassays for estrogen and progesterone metabolites in the feces of *Macaca fascicularis* during non-conceptive and conceptive ovarian cycles. *Biol Reprod* 1993 Jun;48(6):1290-1298.
- (104) Wasser SK, Risler L, Steiner RA. Excreted steroids in primate feces over the menstrual cycle and pregnancy. *Biol Reprod* 1988 Nov;39(4):862-872.
- (105) Neufeld KM, Kang N, Bienenstock J, Foster JA. Reduced anxiety-like behavior and central neurochemical change in germ-free mice. *Neurogastroenterol Motil* 2011 Mar;23(3):255-64, e119.



- (106) Cavaggioni A, Mucignat C, Tirindelli R. Pheromone signalling in the mouse: role of urinary proteins and vomeronasal organ. *Arch Ital Biol* 1999 May;137(2-3):193-200.
- (107) Jemiolo B, Harvey S, Novotny M. Promotion of the Whitten effect in female mice by synthetic analogs of male urinary constituents. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986 Jun;83(12):4576-4579.
- (108) Jemiolo B, Xie TM, Novotny M. Socio-sexual olfactory preference in female mice: attractiveness of synthetic chemosignals. *Physiol Behav* 1991 Dec;50(6):1119-1122.
- (109) More L. Mouse major urinary proteins trigger ovulation via the vomeronasal organ. *Chem Senses* 2006 Jun;31(5):393-401.
- (110) Yano S, Sakamoto KQ, Habara Y. Estrus cycle-related preference of BALB/c female mice for C57BL/6 males is induced by estrogen. *J Vet Med Sci* 2012 Oct;74(10):1311-1314.
- (111) McCarthy EA, Naik AS, Coyne AF, Cherry JA, Baum MJ. Effect of Ovarian Hormones and Mating Experience on the Preference of Female Mice to Investigate Male Urinary Pheromones. *Chem Senses* 2018 Feb 2;43(2):97-104.
- (112) Ley RE, Backhed F, Turnbaugh P, Lozupone CA, Knight RD, Gordon JI. Obesity alters gut microbial ecology. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005 Aug 2;102(31):11070-11075.
- (113) Tannock GW, Miller JR, Savage DC. Host specificity of filamentous, segmented microorganisms adherent to the small bowel epithelium in mice and rats. *Appl Environ Microbiol* 1984 Feb;47(2):441-442.
- (114) Chung H, Pamp SJ, Hill JA, Surana NK, Edelman SM, Troy EB, et al. Gut immune maturation depends on colonization with a host-specific microbiota. *Cell* 2012 Jun 22;149(7):1578-1593.