

帝王切開出生マウス仔への細菌投与の影響：人工ニップルを用いた方法

Effects of oral bacterial administration on a neonatal mouse born by caesarean operation: Method for hand-feeding pups with nursing bottles

矢島昌子¹、干場純治²、寺原正樹¹、柴田 剛¹、成島聖子¹、山口 真¹、永淵真也¹、中道 昇¹、北条研一¹、
坪井 洋¹、池上秀二¹、竹友直生¹、矢島高二¹、桑田 有¹
明治乳業食機能科学研究所¹、岡山大学自然生命科学研究支援センター・動物資源部門²

免疫系の発達は胎児期に始まるが胎児期は無菌であり、そのまま無菌動物として生育した個体と、出生直後から多様な細菌等抗原にさらされて生育した通常個体とでは、免疫担当細胞の組成が異なることはよく知られている。また、乳児期の一定の期間に母子分離などのストレスを与えられると、生育後の免疫応答や炎症応答が修飾されることや、胎児期からの不十分な栄養摂取が子の成人病の発症を促すとの知見が報告されているなど、未熟児や新生児の細菌環境や栄養管理が、生育後の免疫や生理応答に影響を及ぼす可能性があることがわかってきた。我々はこれらの機作を理解し、食によるサポートの可能性を探るために、哺乳期動物研究は有用ではないかと考えている。

哺乳期動物の栄養や免疫研究を進めるためには母乳や母獣哺育の影響を抜きにしては検討できない。例えば母乳中の有用因子の研究や栄養素合成系遺伝子のノックアウト動物、トランスジェニック動物を用いた研究では、哺育乳中の目的栄養因子をコントロールできる調製乳と人工乳哺育系の利用が不可欠である。このような考え方に基づいて、菅野らはラット母乳の分析を行い、分析値に近似させたラット用の調製乳を考案した。また、この調製乳を用いて胃カニューレ法により生育させた人工乳哺育仔は、母乳哺育仔と同等の生育が得られたことを報告した(1)。本調製乳はカゼインとホエイタンパク質、5種類の油、ビタミンおよびミネラルから成っている。

我々は菅野らの方法を用いて哺乳期ラットのカニューレ法による人工乳哺育を行い、腸内菌叢とバクテリアルトランスロケーション(BT)に及ぼす母乳の影響を調べた(2)。その結果、人工乳哺育ラットでは、母乳哺育ラットに比べて糞便中の大腸菌群とクロストリディウム菌数が高かった。これらの傾向はヒト人工乳児の菌叢と母乳児のその違いに類似していた。また、乳仔は両群ともに哺乳期間を通して高頻度に腸間膜リンパ節までのBTが認められたが、母乳哺育群では肝臓、脾臓等全身性へのBTはほぼ抑制されていた。これに対して胃カニューレ法による人工乳哺育群では、胃内へのカニューレ装着術により人為的なBTがおり、肝臓、脾臓等全身性にBTが起こった。一方、カニューレ装着術を同様に施し母乳で哺育した擬手術群では、全身性BTは起こったものの術後の肝臓へのBTが人工乳哺育群に比べて早期に消失し、母乳摂取により全身性のBTが軽減されていることが示された。更に、ラットの母乳哺育群では離乳を境にして糞便中の大腸菌群の低下が起こったが、人工乳哺育群では、離乳後の大腸菌群菌数が母乳哺育群より約100倍から10000倍も高いままであった(3)。これらの違いの機作は興味深いはまだ良く分かっていない。しかし、哺乳期における菌叢構成の違いやBTの違い等宿主への細菌抗原刺激の違いが、成長後の宿主の腸内環境に影響を与えている可能性が考えられた。また、これらの結果は、通常では起こらないBTが人為的に惹起されてしまう胃内カニューレ装着術を用いた人工乳哺育系は、出生直後からの免疫研究には適さないことを示している。

一方、ノックアウト動物やトランスジェニック動物の多くにはマウスが用いられ、免疫研究ツールである市販抗体の種類はマウス用が圧倒的に多い。そこで我々は免疫研究を進めるためにはマウスの利用が適していると

考え、マウス人工乳哺育系の検討を開始した。そこで、まずマウスの調製乳作成に取り組んだ。ICR、BALB/C、FVB/Nの3系統のマウス母乳を採取して分析を行った結果、マウスの母乳中のタンパク質濃度はラットのそれと同程度であったが、脂肪含量がラットのほぼ2倍高いことが分かった。そこで、菅野らのラット用調製乳処方を参考にマウス用の調製乳処方を考案した。マウス用の調製乳は、出生ゼロ日からの哺育を目指すために消化性を配慮しカゼインの一部をホエイタンパク質の加水分解物に置き換え、脂肪濃度を16%とした。

マウスの人工哺乳方法には干場により開発された人工ニップル式哺乳器を用いた。人工ニップル式哺乳の利点は、身体的な侵襲を与えることなく哺乳ができることである。また、ニップルを口にくわえさせるまでは半強制ではあっても、仔はその後みずからの意志でニップルに吸い付き、哺乳を開始する。すなわち、飲用に唾液分泌を伴うと考えられるなど、本哺育方法は、ヒト乳児の人工乳哺育に最も類似した哺乳方法であるとともに、出生当日から侵襲のない投与が可能な点で、従来方法に比べて最も優れている。

そこで本人工ニップル式哺乳器を用いて、初乳の影響を調べるため、以下の実験を行った。初乳はある種の免疫刺激因子濃度が成乳に比べて高いことが知られている。出生16時間以内に人工乳の哺乳を開始するゼロ日群と、生後2日齢まで母乳哺育させた後に人工乳哺育を開始する2日齢群を設け、無処置の母乳哺育群を対象とした。その結果、2日齢群では、生後10日齢で対照の母乳哺育群とほぼ同等の体重が得られたが、ゼロ日群では、母乳哺育群に比べてやや低下傾向が認められた。生後10日齢で剖検し、臓器重量を比較した。その結果、人工乳哺育群は2群とも母乳哺育群に比べ、胸腺重量(対体重)比(%)が低下していた。また、脾臓の凍結切片を抗体染色し、単位面積あたりのCD4および/またはCD8陽性細胞比を比較した結果、ゼロ日群では、母乳哺育群に比べてCD8シングル陽性細胞比が有意に低かったが、2日齢群では、母乳哺育群と差異がなかった。ゼロ日群では2日齢群に比べて体重増加が悪かったことがこれらの差異起因の一つであるかもしれないが、少なくとも2日間の初乳の摂取が10日齢で母乳仔型に近いT細胞組成を形成するのに影響した可能性が示された。

一方、腸内菌叢の成立過程は帝王切開子と正常産子とは異なることが報告されている。T細胞の分化には腸内細菌やウイルス抗原刺激が関与することが想定されることから、母獣の産道由来の感染の影響を受けない帝王切開出生仔と正常出生子とを比較するため、現在、プラグ確認後18日目で帝王切開させたC57Black/6マウスに生後1時間目を初回として、その後6日目まで一日に1回、ピフィズス菌あるいは大腸菌を人工ニップルにより投与し、里親により母乳哺育させたマウス乳仔の胸腺細胞比等との違いを比較検討中である。

人工ニップル式哺乳器は、生体侵襲を与えずにマウス乳仔に出生直後から人工乳哺育を行う有用なツールである。一方、胃ソンの代わりに試験液を投与するためにも極めて有用なツールとなった。我々はまだ、実験系を構築したばかりであるが、これまでに得られたデータの一部を紹介したい。

- (1) Kanno T et al.1997 Simplified preparation of refined milk formula comparable to rat's milk: Influence of the formula on development of the gut and brain in artificially reared rat pups. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 24:242-252
- (2) Yajima M et al.2001 Bacterial translocation in neonatal rats: the relationship between intestinal flora. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 33:592-601
- (3) Nakayama M et al. 2003 Intestinal adherent bacteria and bacterial translocation in breast-fed and formula-fed rats in relation to susceptibility to infection. *Pediatr Res* 54:364-371
- (4) Hoshiba J. 2004 Method for hand-feeding mouse pups with nursing bottles. *Contemporary Topics* 43 (5) 25-28

Effects of oral bacterial administration on a neonatal mouse born by caesarean operation: Method for hand-feeding pups with nursing bottles

Yajima M,¹ Hoshihara J,² Terahara M,¹ Shibata T,¹ Narushima S,¹ Yamaguchi M,¹ Nagafuchi S,¹ Nakamichi N,¹ Houjyou K,¹ Tsuboi H,¹ Ikegami S,¹ Taketomo N,¹ Yajima T,¹ and Kuwata T¹

¹ Food Science Institute, Division of Research and Development, Meiji Dairies Corporation, Odawara, Kanagawa, JAPAN. ² Department of Animal Resources, Advanced Science Research Center, Okayama University, Okayama, JAPAN

It is well known that the appearance of T-cell subsets in immune-associating tissues in adult germ-free animals is different from that in conventional animals, in which immune responses are inevitably induced by environmental antigens, including vast amounts of intestinal microorganisms, although the development of the immune system begins during the fetal stage. In addition, many findings support the possibility that the differences in the colonized bacteria and those in the intake nutrition differently influence immunological and physiological responses after pre-mature and full-term neonates reach adulthood. It has been demonstrated that maternal deprivation alters stress-induced responses in 12-week-old rats and malnutrition in the uterus triggers some life-style related diseases after maturation. These findings suggested that an experiment using neonates as models might be useful to explore the underlying mechanisms and to find ways to implement improvements.

Breast milk has a direct effect on the nutritional and immunological development of neonates; on the other hand, maternal care may influence a physiological response through a psychological effect. A chemically refined-formula is necessary to examine the effects of milk on neonatal growth, especially in neonatal experiments that require a gene-knockout animal or a transgenic animal without maternal rearing. Kanno et al. reported a simplified procedure for preparing a chemically refined formula for rats that closely resembled the nutritional composition of rat's milk. They succeeded to get similar growth of artificially reared rat pups using a gastric cannula comparing mother-reared pups, and also they showed the physical and histological appearance of the pups (1). The rat formula was composed of casein, whey protein, five edible oils, vitamins, and minerals.

Using Kanno's method, we examined changes in fecal bacterial flora, bacterial translocation (BT), and adherent bacterial flora of the intestinal tissue (AdC) using maternally reared rats and artificially reared rats after a gastric cannulation through the esophagus and abdomen from 5 days of age (AR) (2, 3). As a result, the *Enterobacteriaceae* and *Clostridium* were more common in the feces of artificially reared (AR) pups than in those of maternally reared (MR) pups at 14 days of age. In 10-day-old rats, there were no significant differences in the fecal and cecal flora between the AR and MR pups, whereas the AdC and the BT to the liver were

observed more frequent in the AR than in the MR pups. In the MR pups, systemic BT to the liver was undetected, but BT to the liver was stimulated in the MR pups by a sham operation, indicating that the stimulation was due to the surgery for gastric cannulation. On the other hand, the occurrence of BT was ameliorated in the pups of the sham group, indicating that breast feeding ameliorates the systemic BT (3). In addition, *Enterobacteriaceae*, *Streptococcus* and/or *Enterococcus*, and *Staphylococcus* were dominantly detected as microorganisms in AdC flora and BT. The AdC flora did not directly reflect the bacterial colonization flora. On the other hand, the bacterial counts of *Enterobacteriaceae* began to decrease during the weaning period in MR pups, but, in contrast, those in AR pups continued to be 100 to 10000 higher than in MR pups at 28 and 42 days of age. Although the reasons for these outcomes were not investigated yet, it is possible to speculate that the differential colonization patterns of the intestinal flora and the BT in the neonatal period largely influence intestinal colonization after maturation. These results suggest that artificial rearing using a gastric cannula is inappropriate for experiments to examine immunological development in the neonatal period.

Next, we tried artificial rearing of mice. Because, mice are more popular than rats in experiments using gene-transgenic and knockout animals. Furthermore, antibody reagents of mice are commercially available. Protein, fat, and minerals were analyzed in mice-milk. Three kinds of milk, independently suckled from ICR, BALB/C, and FVB/N mice, were used. The mean analytical values of milk from ICR, BALB/C, and FVB/N mice were $10.23 \pm 0.49\%$ of total protein and $21.34 \pm 1.31\%$ of total fat. The milk substitute for the mice was newly devised. The concentration of total protein and total fat were respectively determined to be 11.1% and 16% in the formula.

The experiment of hand-feeding pups was conducted using nursing bottles newly devised by Hoshihara (4). This rearing system allows mouse pups to suckle and swallow formula using their tongue and lips with saliva secretion. In this way, the rearing system can start being used immediately after birth without injury to the pups.

Using these methods, the impact of maternal nursing on the immune-related organs was examined. The BALB/C mouse pups were divided into three groups within 16 hrs of birth: mother-reared (MR), formula-fed from the first day (AR-0), and formula-fed from the third day (AR-2). The thymus was significantly smaller, and the spleen was larger in AR-0 and AR-2 pups than in MR pups. The total numbers of CD4+CD8+ double-positive, CD4 single+, and CD8 single+ cells of the spleen in a unit parcel of the tissue slide in MR pups were significantly higher than those in AR-0. Interestingly, the numbers of CD4 single+ and CD8 single+ cells in AR-2 pups were higher than those in AR-0 pups. These results indicate that the first two-day intake of colostrums may bring the T-cell population pattern of the spleen in artificially reared pups to a level consistent with that found in MR pups.

The development of the intestinal micro-flora is different in cesarean-delivered animals and naturally delivered animals. Our current experiments are focusing on examining the influence on immune-related organs of administering *Bifidobacterium* or *Escherichia coli* to pups just 60 min after being delivered by cesarean section on day 18 of pregnancy in comparison to normally-delivered pups, in which the surrogate nipples were used as substitutes for gastric administration tools.

The surrogate nipples used in hand-feeding with a nursing bottle are very convenient to conduct immunological and nutritional experiments of artificial rearing as well as of substitutes for gastric administration tools.

- (1) Kanno T et.al.1997 Simplified preparation of refined milk formula comparable to rat's milk: Influence of the formula on development of the gut and brain in artificially reared rat pups. J Pediatr Gastroenterol Nutr 24:242-252
- (2) Yajima M et.al.2001 Bacterial translocation in neonatal rats: the relationship between intestinal flora. J Pediatr Gastroenterol Nutr 33:592-601
- (3) Nakayama M et al. 2003 Intestinal adherent bacteria and bacterial translocation in breast-fed and formula-fed rats in relation to susceptibility to infection. Pediatr Res 54:364-371
- (4) Hoshiba J. 2004 Method for hand-feeding mouse pups with nursing bottles. Contemporary Topics 43 (5) 25-28