

ノトバイオート技術を用いた
異種動物フローラマウスの作出

平山和宏

①

ノトバイオート技術を用いた
異種動物フローラマウスの作出

平山 和宏

目次

	頁
緒言	1
第1章 ヒトフローラマウス (HFA) の作出	4
序論	4
材料と方法	4
ヒト糞便試料	
動物	
HFAマウスの作出	
細菌学的検索	
統計的解析	
結果	5
試料Aの糞便を投与されたHFAマウスの菌叢	
試料Bの糞便を投与されたHFAマウスの菌叢	
考察	6
第2章 HFAマウス腸内菌叢の安定性	9
序論	9
材料と方法	9
動物	
マウス新生仔の腸内菌叢の形成過程	
同居によるGFマウス腸内へのHFAマウス腸内菌叢の形成過程	
細菌学的検索	
結果	10
CVマウス腸内菌叢の形成過程	
HFAマウス腸内菌叢の形成過程	
同居によるHFAマウス腸内菌叢のGFマウスへの移植	
考察	12
第3章 HFAマウスを用いた応用研究：食餌成分の腸内菌叢に与える影響について	14
序論	14
材料と方法	14
HM飼料およびHB飼料の給与試験	
FOSの投与試験	
細菌学的検索	
統計的解析	
結果	15

ex-GFマウス腸内菌叢の構成に対するHM飼料とHB飼料の効果	
ex-GFマウス腸内菌叢の構成に対するFOSの効果	
考察	16
第4章 6検体の異なる糞便を投与されたHFAマウスの菌叢の構成と代謝活性の比較研究	19
序論	19
材料と方法	19
動物	
HFAマウスとその仔の作出	
試料の採取	
細菌学的検索	
酵素活性の測定	
腸内腐敗産物濃度の測定	
SCFAs濃度の測定	
統計的解析	
結果	21
糞便菌叢の構成	
酵素活性	
腸内腐敗産物濃度	
SCFAsの濃度と組成	
考察	23
第5章 ブタフローラ (PFA) マウスの作出	26
序論	26
材料と方法	26
ブタ	
PFAマウスの作出	
試料の採取	
細菌学的検索	
腸内腐敗産物濃度の測定	
SCFAs濃度の測定	
統計的解析	
結果	27
ブタ糞便菌叢の構成	
20日齢ブタ糞便希釈液を投与したPFAマウスの糞便菌叢	
60日齢ブタ糞便希釈液を投与したPFAマウスの糞便菌叢	
腸内腐敗産物の濃度	
SCFAsの濃度	
考察	29

総括	31
謝辞	33
文献	34
表および図	41

緒言

腸内菌叢は宿主にとって有用にも有害にも働くことが知られている (13、19、44、47) が、ヒトと実験動物の腸内菌叢は構成 (30) や酵素活性 (40) が互いに大きく異なるため、動物実験で得られた成績をそのままヒトに外挿することは困難である。そこで、ヒトの糞便を無菌 (GF) 動物に投与することにより、ヒトの腸内菌叢を保有するヒトフローラ (HFA) マウスを作出することが試みられている。このようにして作出されたHFAマウスは、その菌叢構成がヒトの糞便菌叢と類似している (15、37) ため、ヒトの腸内菌叢の生態や代謝活性の研究のための有用なモデル動物となると期待され、臨床分野において白血球減少症患者の腸内菌叢を投与したHFAマウスを用いてその患者への抗生物質投与計画の検討に用いる研究 (48) や食餌成分がヒトの腸内菌叢に与える影響に関する研究 (12、39) などに応用が試みられてきた。しかし、GFマウスに投与されたヒトの腸内菌叢がマウス腸内に形成される過程や、ヒト糞便菌叢の構成がどれほどHFAマウス腸内に反映されているかは十分に検討されているとは言えず、HFAマウス腸内に移植されたヒト菌叢の長期間にわたる安定性や、菌叢の持つ様々な代謝活性のHFAマウス腸内における再現性などの検討はほとんどなされていない。

また、ヒト以外の様々な動物種についても同様の試みはなされており (28)、Ducluzeauら (8) はGFマウスにブタの糞便菌叢を投与することにより、ブタの腸内菌叢研究のための有用な実験動物を作り出せることを報告している。近年家畜

の疾病予防や飼料効率向上に抗生物質や化学療法剤などの薬剤を用いず、プロバイオティクスによる腸内環境の改善や腸内菌叢の正常化を利用する試みがなされている(11)。しかし、プロバイオティクスの効果の研究に対象家畜そのものを用いることは環境や遺伝的背景を均一にすることが困難であり、しばしば実験成績が安定しない。この問題を解決する手段の一つとしてブタフローラ(PFA)マウスなどの異種動物の腸内菌叢を持った動物がモデル動物として考えられている。

本論文では、第1章でヒト糞便をGFマウスに投与してHFAマウスを作出し、ヒト糞便菌叢の構成をマウス腸内に再現することができるかどうかを、高度に嫌氣的な培養法を用いて詳細に検討した。第2章では、このようにして作出されたHFAマウス腸内菌叢のマウス腸内における安定性の検索を行い、実験動物として利用する際に不可欠な再生産性の検討を行った。第3章では、HFAマウスを食餌成分と腸内菌叢の関係を探る実験的な研究に応用し、実際のモデル動物としての有用性を検討した。さらに第4章では、マウスに投与するヒト糞便の例数を増やしてHFAマウスを作出して繁殖し、ヒト糞便菌叢のHFAマウス腸内での再現性と連続性を確認するとともに、菌叢構成以外の代謝活性がどの程度HFAマウスに再現できるかを検討した。また、投与したヒト糞便にみられた各性状の個体差が、HFAマウスに反映されるかどうかとも検討した。最後に第5章では、家畜への応用の例としてブタ糞便を投与したPFAマウスを作出し、その菌叢構成や代謝活性がブタ糞便菌叢を反映できるかを検討した。本論文の目的は、HFAマウスやPFAマウスのような異種動物由来の腸内菌叢を持つマウスを、ヒトや家畜の腸内菌叢の生態や代謝を

研究するためのモデル動物としてどこまで外挿できるかを明確にすることにある。

「動物モデル」の概念は、動物の生理学的・生化学的・行動学的な特性を、人間の病態や治療に適用することを指す。動物モデルは、人間の病態を再現し、そのメカニズムを解明するための重要なツールである。動物モデルの選択は、研究の目的や対象の病態によって異なる。例えば、マウスは遺伝子操作が容易であり、多くの疾患モデルに使用されている。一方、霊長類は人間の解剖学的・生理学的特性と類似しているため、神経学や免疫学の研究に有用である。動物モデルの利点として、実験の再現性が高く、大規模な実験が可能であることが挙げられる。一方で、動物モデルは人間の病態を完全に再現できないという限界がある。動物と人間との種差による生理学的・生化学的差異は、研究結果の解釈に影響を与える可能性がある。したがって、動物モデルを用いた研究の結果を人間に外挿する際には、慎重な評価が必要である。

動物モデルを用いた研究は、人間の病態を再現し、そのメカニズムを解明するための重要なツールである。動物モデルの選択は、研究の目的や対象の病態によって異なる。例えば、マウスは遺伝子操作が容易であり、多くの疾患モデルに使用されている。一方、霊長類は人間の解剖学的・生理学的特性と類似しているため、神経学や免疫学の研究に有用である。動物モデルの利点として、実験の再現性が高く、大規模な実験が可能であることが挙げられる。一方で、動物モデルは人間の病態を完全に再現できないという限界がある。動物と人間との種差による生理学的・生化学的差異は、研究結果の解釈に影響を与える可能性がある。したがって、動物モデルを用いた研究の結果を人間に外挿する際には、慎重な評価が必要である。

第1章 ヒトフローラマウス (HFA) の作出

序論

GFマウスにヒトの糞便あるいは糞便からの分離菌を投与することにより、ヒト由来の腸内菌がマウス腸内に定着しうることはこれまでに報告されている (7, 15, 37)。しかし、GFマウスに投与されたヒトの腸内菌叢がマウス腸内に形成されていく過程や、その安定性については十分に検討されていない。

本章の目的は2人の被検者の糞便菌叢を投与されたHFAマウスの腸内菌叢を高度に嫌気的な菌群を培養するためのプレートインボトル法 (32) をも含めた方法で検索してヒトの糞便菌叢がマウス腸内に再現できるかどうかを検討し、さらにその菌叢の形成過程を明らかにすることである。

材料と方法

ヒト糞便試料：ヒト糞便の試料は2人の健康成人から採取した。試料Aは採取後直ちに嫌気性輸送培地 (33) 中で氷冷して運搬し、試料Bは採取後速やかに細菌学的検索に供した。

動物：HFAマウスの作出には、東京大学獣医公衆衛生学教室で繁殖した8~12週齢のGF雄BALB/cマウスを用いた。HFAマウスはGFマウスと同様にビニールアイソレータ内で50kGyで γ 線滅菌したCMF (オリエンタル酵母) を給与して飼育した。

HFAマウスの作出：菌叢構成の検索のために調整した10倍階段希釈のうち、試料Aについては 10^{-5} 、試料Bについては 10^{-3} および 10^{-5} 希釈液をブチルゴム栓をした試験管に移し、ステンレスアイソレータ（22）内に搬入した。GFマウスは各希釈液を0.5mlずつ金属カテーテルを用いて胃内に接種された。

細菌学的検索：HFAマウスの糞便菌叢はヒト糞便投与1、2、3、7、14日および8週後に検索した。菌叢構成の検索はMitsuokaら（33、34）およびItoh and Mitsuoka（21）の方法に従った。試料は秤量後、 O_2 を含まない CO_2 噴射下で、ヒトの試料については10倍、マウスの試料については50倍の懸濁液を 10^{-1} 希釈液として10倍階段希釈を作成し、10種類の選択培地と4種類の非選択培地に接種した。使用した培地とその培養条件はTable 1.に示した。M10培地の培養にはプレートインボトル法（32）を用いた。培養された菌は、コロニー形態、グラム染色性、菌形態、好気性発育の有無などをもとに同定し、菌数は糞便1g当たりの生菌数の対数で表した。

統計的解析：得られた成績は平均と標準偏差で表し、Studentの*t*-検定で有意差の判定を行った。

結果

試料Aの糞便を投与されたHFAマウスの菌叢：試料Aの糞便希釈液を投与されたHFAマウスの糞便菌叢の変化をTable 2.に示す。投与翌日では、bacteroidaceae、cubacteria、bifidobacteriaといった偏性嫌気性菌群の菌数は投与した糞便に比べて有意（ $p < 0.01$ ）に低く、逆にenterobacteriaceaeはこれらの嫌気性菌群と同様の高い菌

数 (9.5 ± 0.2) で検出された。bacteroidaceaeは投与2日目には急速に増加して投与糞便より高い菌数 ($p < 0.01$) に達し、以降はこの高い菌数を維持した。cubacteriaの菌数は投与後2日以内に投与した糞便と同じレベルまで増加した。bifidobacteriaの菌数も2日目には高いレベル (10.2 ± 0.3) まで増加したが、投与8週間にかけて約 $10^7/g$ まで減少し、以降はこのレベルで安定した。

試料Bの糞便を投与されたHFAマウスの菌叢：試料Bの糞便の 10^{-5} 希釈液を投与されたHFAマウスの糞便菌叢の変化は同じ試料の 10^{-3} 希釈液を投与された場合と同様であったため、 10^{-3} 希釈液を投与されたHFAマウスの糞便菌叢の変化のみをTable 3に示す。enterobacteriaceaeは試料Aの場合と同様にやはり投与直後には投与糞便に比べて有意に高い菌数を示し、徐々に減少した。streptococciも投与後2週間は比較的高い菌数を示したが、投与8週間には投与糞便と同程度の菌数まで減少した。一方、嫌気性菌群は試料Aの 10^{-5} 希釈液を投与されたHFAマウスよりも速やかに菌数が増え、投与1日後にはすでに投与糞便と同様の菌叢が再構築されていた。ただし、bifidobacteriaの菌数は投与3日目から減少を始め、他の菌叢の構成は安定していたにも関わらず投与2~8週間にはHFAマウスから検出されなくなった。

考察

Hazenbergら (15) はGFマウスの腸内に再構成されたヒトの糞便菌叢の構成は、グラム染色で観察した限りでは投与したヒト糞便の菌叢構成と類似しており、ヒト糞便の 10^{-8} 希釈液の培養物を投与したHFAマウスの盲腸内菌叢の構成もまた投与

糞便の菌叢と類似していることを報告している。また、Ducluzeauら (7) や Raibaudら (37) もヒトの糞便を投与されたマウスの腸内菌叢は、*bifidobacteria*や *lactobacilli*といった一部の菌群を除いて、投与した糞便の菌叢と類似することを報告している。本章では、ヒト糞便を投与して作出したHFAマウスの糞便菌叢を、高度に嫌気的な培養方法を用いて詳細に検討し、*bifidobacteria*と *lactobacilli*を除くヒト糞便菌叢の主要な構成が糞便投与後8週ほどでHFAマウス腸内に再現できることを確認することができた。また、本章ではHFAマウスの糞便菌叢の形成の様子を経時的に検索したところ、2群のHFAマウスの好気性菌群と嫌気性菌群の遷移に共通した傾向が認められた。出生後の新生仔の腸内菌叢の形成過程には、動物種が違っても共通した傾向があることが知られている。*enterobacteriaceae*や *streptococci*などの好気性菌群は生後1~2日のうちに腸内に定着するが、これらの好気性菌群は時とともに次第に減少して比較的低い菌数で安定し、逆に遅れて出現した嫌気性菌群の菌数は増加してその後の一生を通じて最優勢菌叢を構成するようになる (27, 45)。本章で得られたHFAマウスの糞便菌叢における好気性菌群と嫌気性菌群の動態はこれらの報告と類似していた。試料Bを投与されたHFAマウスでは、投与1日目には既に嫌気性の菌叢は十分に形成されているようであったが、*enterobacteriaceae*の菌数が抑制されるにはやはり数日を要し、抑制後は以前の報告 (1) と同様に投与糞便よりやや低い菌数を維持することができた。これらの結果は、菌叢中の菌群が*enterobacteriaceae*をはじめとする好気性菌群の菌数を抑制し、その菌群は腸内に安定したバランスを維持するために一定の時間が必要であ

ることを示唆している。

今回の研究では、2検体のヒト糞便試料のうち1検体を投与されたHFAマウスで bifidobacteriaが徐々に減少してやがて検出されなくなり、HFAマウス腸内への bifidobacteriaの定着は投与した糞便の菌叢構成によると考えられた。bifidobacteriaはヒトの腸内菌叢の最優勢菌群の1つであり、腸管疾患 (20) や加齢 (14, 23, 31) によってその菌数が減少し、まれには消失することが疫学的、実験的に知られていることから、ヒトの健康の維持に非常に重要であると考えられている。また、腫瘍 (35) や下痢 (24) に対してbifidobacteriaが抑制的に作用することも報告されており、今回得られたbifidobacteria欠損HFAマウスは、bifidobacteriaのヒトの腸管内における役割を研究するための有用な実験モデルとなると考えられる。

第2章 HFAマウス腸内菌叢の安定性

序論

HFA動物の腸内菌叢の構成は、第1章やこれまでの報告(15、37)に示されるようにヒトの糞便菌叢の構成と類似している。しかし、HFA動物を実験動物としてさらに利用していくためには、HFAマウス腸内に定着したヒトの糞便菌叢が安定して長期間、マウス腸内で維持できることが重要であるが、HFAマウス腸内菌叢の安定性についての報告はこれまでなされていない。

本章では、HFAマウス腸内菌叢の安定性を知るため、HFAマウス新生仔の腸内菌叢の形成過程を経時的に検索し、HFAマウスの腸内菌叢が繁殖によってその仔に伝えられるかを検討するとともに、普通(CV)マウス新生仔やヒト新生児の菌叢形成過程と比較した。また、GFマウスをHFAマウスと同じケージ内に同居させることにより、HFAマウスの菌叢をGFマウスの腸内に移植することができるかどうかも検討した。

材料と方法

動物：CVとGFのBALB/cマウスは東京大学獣医公衆衛生学教室で繁殖、維持されているものを用いた。2群のHFAマウス(HFAマウスA、B)はそれぞれ23歳と26歳の健康男子の糞便の 10^{-3} 希釈液を経口投与することによって作出された。HFAマウス作出の手順は第1章に従い、動物の飼育も第1章と同様に行った。

マウス新生仔の腸内菌叢の形成過程：A、B両群のHFAマウスとCVマウスを繁殖し、その仔の腸内菌叢の形成過程を検索した。生後1、3、5日には動物をCO₂でと殺し、その全腸管を採取した。生後7、10、14日には同様にと殺した動物から大腸のみを採取した。新生仔は3週齢で離乳し、生後21、35、60日には糞便を、母マウスからは交配前に糞便を採取した。試料は各回3～5検体を用いた。

同居によるGFマウス腸内へのHFAマウス腸内菌叢の形成過程：HFAマウスAにヒト糞便希釈液を投与してから3週間後、新たに5週齢のGFマウスを同じアイソレータ内の同一ケージに同居させた(ex-GFマウス)。ex-GFマウスの糞便は同居1、2、3、5、8、13日後に採取し、その菌叢構成を検索した。

細菌学的検索：菌叢構成の検索は第1章と同様の方法で行った。CVマウスの検体にはマウス盲腸抽出液を添加したM10培地を用いた。

結果

CVマウス腸内菌叢の形成過程：CVマウス新生仔の腸内菌叢の形成過程をFig. 1.に示した。出生直後の1週間は図中に白抜きで示した通性嫌気性菌群のみが検出され、嫌気性菌は全く検出されなかった。lactobacilliは生後5日目に最優勢菌となり、その後検索期間中を通して安定して高い菌数を維持した。staphylococciは出生後徐々に菌数が増加し、糞便1g当たり約10⁷に達して安定した。その他の好気性菌群も出生後2週の間速やかに菌数が上昇したが、離乳期以降は減少した。特に aerobic Gram negative rodsは生後21日目を以降は検出されなくなった。一方、

bacteroidaceae, eubacteria, clostridia, fusiform-shaped bacteriaといった嫌気性菌群は生後10日目になって出現し、その後徐々に菌数が増加して生後21日目には好気性菌群に代わって最優勢菌叢を構成するようになった。この様にして、安定したCVマウスの腸内菌叢が生後3~5週間で形成された。

HFAマウス腸内菌叢の形成過程：2群のHFAマウス新生仔の腸内菌叢の形成過程をFig. 2, および 3. に示した。B群のHFAマウスの腸内菌叢には、A群のHFAマウスには定着しているbifidobacteriaが定着していないという違いがあるにも関わらず、bifidobacteria以外の腸内菌叢の形成の過程は両群で類似していた。enterobacteriaceaeとstreptococciの通性嫌気性菌群は生後最初の1週目から検出され、2週間の間最優勢菌叢を構成したが、生後3週目にはそれぞれの母親と同程度の菌数まで減少し、これ以降はその菌数を安定して維持した。嫌気性菌群は生後7日目に出現し、その後の2週間に菌数が上昇して、生後3週目以降は最優勢菌叢を構成するようになった。HFAマウスの腸内菌叢は生後3週間で新生仔の腸内に再構成された。

同居によるHFAマウス腸内菌叢のGFマウスへの移植：HFAマウスAの菌叢構成とこれと同一ケージ内に同居したex-GFマウスの菌叢構成の推移をFig. 4. に示す。ex-GFマウスの糞便菌叢では、同居1日目には好気性菌群が急速に菌数を増加して最優勢菌叢を構成し、嫌気性菌群はこれに比較して低い菌数であった。その後数日間で嫌気性菌群の菌数は増加して最優勢菌叢を構成するようになり、逆に好気性菌群の菌数は徐々に減少した。ex-GFマウスの糞便菌叢の構成は、同居8日目に

はHFAマウスAの菌叢構成とほぼ同様になり、以後その菌叢を維持した。

考察

これまでにGF動物には他の動物種由来の腸内菌であってもよく定着することができる（15、37）が、HFA動物には一部の菌群、すなわち bifidobacteriaやlactobacilliが定着しない場合もあることも報告されており（第1章、7）、これらの菌群が定着するかどうかは投与した糞便サンプルの菌叢構成によると考えられた（第1章）。従って、同じ菌叢構成を持ったHFAマウスを再び作り出すことは困難であり、HFAマウスを実験動物として用いる場合、マウス腸内に定着したヒトの腸内菌叢を長期に維持することが重要である。本研究では2群のHFAマウスの新生仔の腸内菌叢は、いずれも生後3週間で完成し、その構成はそれぞれの母親の腸内菌叢と同様であった。これらの結果からHFAマウスの腸内菌叢は繁殖によってその仔に安定して伝えられ、HFAマウスは繁殖によって継続的に生産が可能であることが明らかとなった。

CVマウスの新生仔の腸内菌叢の形成過程はこれまでに報告されており（5、25、26、43）、今回得られた結果はこれらの報告と一致した。また、ヒトの新生児の腸内菌叢の形成過程はCVマウスの新生仔とは異なることも報告されている（2、31）。ヒト新生児では、*E. coli*やstreptococciをはじめとする通性嫌気性菌群が出生直後から検出されるが、その後bacteroidaceaeとbifidobacteriaが速やかに増殖し、特にbifidobacteriaは生後1週間以内に最優勢菌となる。一方、今回検索したHFAマウ

スではA群のHFAマウスにはbifidobacteriaが高い菌数で定着していたにもかかわらず、新生仔の腸内菌叢でbifidobacteriaが最優勢となる時期は観察されなかった。これらの結果は、HFAマウスの菌叢構成はヒトの菌叢構成と類似しているものの、HFAマウス新生仔をヒトの新生児の腸内菌叢のモデルとすることは困難であることを示している。

さらにHFAマウスの腸内菌叢は同居によって他のGFマウスに、構成の変化なく移植することも可能であった (ex-GFマウス)。ex-GFマウスにおける菌叢の形成過程は、これまでに報告されている新生子の菌叢の形成過程 (27, 45) やHFAマウス作出時の菌叢の変化 (第1章) と同様の傾向を示した。今回得られた結果は、GFマウスをHFAマウスに同居させることによってたやすく比較的大規模なHFAマウス群を作り出すことが可能であることを示している。

以上の結果から、HFAマウスの腸内菌叢は、繁殖や同居により容易に他のマウスに伝えることが可能であり、実験モデルとして必要な安定性を十分に保持できることが明らかとなった。

第3章 HFAマウスの応用的研究：食餌成分の腸内菌叢に与える影響について

序論

ヒトの腸内菌叢は、食餌成分の組成によって影響を受けるといわれている(30)が、ヒトを対象に行われた研究(6、16、38)では、条件を一定にすることが困難なためか、かならずしも一致した結果は得られていない。

第1章、第2章に示したように、GFマウスにヒトの糞便を投与することにより、ヒト由来の腸内菌叢を保有するHFAマウスを作出する事ができ、その菌叢構成がヒトの糞便菌叢と類似しているため(第1章、15、37)、ヒトの腸内菌叢の生態や代謝活性の研究のための有用なモデル動物となると考えられている。

本章では、HFAマウスが食餌とヒトの腸内菌叢の関係を研究するための有用なモデル動物となるかどうかを明らかにするため、HFAマウスに高牛肉(HM)飼料や高フスマ(HB)飼料を給与し、菌叢構成の変化を検索して食餌成分の違いがHFAマウスの腸内菌叢に及ぼす影響を検索した。また、bifidobacteriaの増加により腸内環境を改善する事が報告されているフラクトオリゴ糖(FOS)(18)を給与した場合の菌叢構成の変化も同様に検索した。

材料と方法

HM飼料およびHB飼料の給与試験：HFAマウスは第2章においてHFAマウスと

同居させることによってヒト腸内菌叢を定着させたex-GFマウスを用いた。6匹のex-GFマウスを用い、HFAマウスと同居4ヶ月後、基礎飼料であるCMFからHM飼料（CMF 70%、牛肉粉 30%）に変更し、さらに3ヶ月後、HM飼料からHB飼料（CMF 80%、フスマ 20%）に切り替えて1ヶ月間飼育した。

FOSの投与試験：6匹のex-GFマウスを10週齢でFOS投与実験に用いた。FOSとしてネオシュガーP（明治製菓）を用い、蒸留水に溶解してろ過滅菌した後、飲水として投与した。ネオシュガーPの組成は、1-ketose 28%、nystose 60%、 1^F - β -fructofuranosylnystose 12%であった。ex-GFマウスは0.1%溶液を4ヶ月間投与された後、3週間の休止期間において0.5%溶液を1週間投与された。

細菌学的検索：菌叢構成の検索は第1章と同様に行った。

統計的解析：得られた成績は平均と標準偏差で表し、Studentのt-検定で有意差の判定を行った。

結果

ex-GFマウス腸内菌叢の構成に対するHM飼料とHB飼料の効果：各食餌を給与されたex-GFマウスの糞便菌叢の構成をTable 4.に示す。HM飼料の3ヶ月間の給与により、enterobacteriaceaeの菌数は有意に増加した。食餌がHM飼料からHB飼料に切り替えられると、1ヶ月の間に菌叢は大きく変動した。enterobacteriaceaeの菌数は減少して基礎飼料給与時の菌数に戻り、bacteroidaceaeとstreptococciの菌数も減少してHM飼料給与時、基礎飼料給与時よりも有意に低くなった。clostridiaもHB飼料の

給与により菌数が基礎飼料給与時よりも有意に低くなった。一方、bifidobacteriaはHB飼料によって増加し、HM飼料や基礎飼料を給与した場合よりも有意に高い菌数を示した。

ex-GFマウス腸内菌叢の構成に対するFOS投与の効果：FOSの投与によりbifidobacteriaの菌数に著しい変化は認められなかったが、総菌数に対する割合は0.1%FOSの4ヶ月間の投与により上昇し、投与を中止後もとの割合に戻った（Fig. 5.）。bifidobacteriaの割合は0.5%FOSの投与を開始すると再び上昇した。逆にenterobacteriaceaeの菌数は0.1%FOSの1週間の投与により6匹中4匹に減少がみられ、4ヶ月間の投与では全例で投与前に比べて減少した（Fig. 6.）。enterobacteriaceaeは投与を中止すると増加したが、0.5%FOSの投与を開始すると再び全例で減少がみられた。また、bacteroidaceaeの菌数もFOSの投与によって減少し、投与を中止後増加した（Fig. 7.）。ただし、これらの変化は平均値では統計的に有為な差はみられなかった。

考察

食餌や生活習慣の違いが大腸癌や乳癌などの発生と相関があることが知られており（4、46）、その影響は、腸内菌叢の構成と関連があると考えられている（9、36）。しかし、食餌と腸内菌叢の関係をヒトを用いて研究した報告では、肉食によって糞便菌叢に有意な変化を認めた報告（38）もあるが、食餌に牛肉やフスマを添加しても顕著な効果がみられない場合も多い（6、16）。今回HFAマウスを用

いてHM飼料とHB飼料を給与したところ、腸内菌叢の構成は食餌によって大きく影響を受けることが示された。enterobacteriaceaeの菌数はHM飼料で増加し、HB飼料で減少した。bacteroidaceaeやclostridia、streptococciもHB飼料で減少し、逆にbifidobacteriaはHB飼料で増加した。これらの結果は、HB飼料はHFAマウスの腸内菌叢の正常化に効果を持つことを示している。本章で得られた結果は、食餌成分の変化が腸内菌叢に与える影響の研究にHFAマウスを用いることにより、ヒトを用いるよりも明確にその効果を検出できる可能性を示唆した。

bifidobacteriaはヒトにおいて、加齢（14、31）やある種の疾病（20）にともなって菌数が減少し、時には消失することが知られている。また、食物繊維を多く摂取する老人は長生きをする傾向があり、その腸内にはbifidobacteriaが多く、clostridiaが少ないという報告（3）がある。FOSはbifidobacteriaの増殖によって腸内菌叢を正常化し、腸内環境を改善する事が知られている（18）食物繊維様の多糖類である。本章で用いた0.1%のFOS投与は、ヒトの臨床的な研究に一般的に用いられている用量である1日当り8g（17）にほぼ相当し、0.5%のFOS投与は、ヒトのFOS性の下痢の発生における最大無作用量である1日当り40g（10）にほぼ相当する。本章の研究では、得られた結果が統計的に有意ではなかったものの、ヒトに対する臨床的な用量に相当するFOS投与のHFAマウス糞便菌叢に対する効果は、健康成人を対象に行った研究（49）と同様の傾向がみられ、HFAマウスがFOSのヒト腸内菌叢に及ぼす影響を研究するためのモデルとなりうることを明らかにした。

以上の結果から、HFAマウスがヒトの腸内菌叢に対する食餌成分の影響を研究

するための有用な実験動物となると考えられた。

飼育の実際研究

（一）飼育の設備
（二）飼育の管理
（三）飼育の観察
（四）飼育の記録
（五）飼育の処分

飼育の方法

飼育の目的、飼育の場所、飼育の器具、飼育の材料、飼育の手順、飼育の注意、飼育の結果、飼育の考察、飼育の結論、飼育の参考文献

第4章 6検体の異なる糞便を投与されたHFAマウスの菌叢構成と代謝活性の比較研究

序論

ここまで、第1章、第2章においてHFAマウスの腸内菌叢はヒト糞便菌叢と構成が類似していることが示され、以前の研究においても、HFAマウスやHFAラットの菌叢構成(7、15、37)や腸内菌の酵素活性(29)が投与したヒト糞便のものと類似していることが報告されている。しかし、腸内菌叢によって産生される様々な代謝産物をはじめとするHFAマウスの性状はまだ十分に検討されているとはいえない。本章では、6人の異なる成人から得られた糞便をGFマウスに投与してHFAマウスを作出し、ヒトの腸内菌叢の構成がマウスの腸内に再構成されることを確認するとともに、腸内菌由来の発癌に関連するといわれる水解酵素や還元酵素の活性や短鎖脂肪酸(SCFAs)や腸内腐敗産物の濃度と構成がHFAマウスの腸内でヒトと同じ状態に再現されているかどうかを検討した。また、6群のHFAマウスを比較し、投与したヒト糞便に見られた個体差がHFAマウス群間に反映されるかどうかについても検討した。さらに、作出した各HFAマウスを繁殖し、第2章において示されたHFAマウス腸内菌叢の繁殖による安定性を各性状について検討した。

材料と方法

動物：GFとCVのマウスは当教室で繁殖、維持しているBALB/cマウスを用い、

HFAマウスは第1章と同様に飼育した。

HFAマウスとその仔の作出：各群5匹の8週齢のGF雌BALB/cマウスにステンレスアイソレータ（22）内で、6人の健康成人男子（23-33歳）から得られた新鮮糞便の 10^{-3} 希釈液を0.5mlずつカテーテルを用いて胃内に投与した。これらのHFAマウスは14週齢でそれぞれ2匹のGF雄BALB/cマウスと交配した。

試料の採取：ヒト糞便投与4週後に、それぞれのHFAマウスから個別に糞便を採取し、ただちに細菌学的検索と還元酵素の活性測定に供した。水解酵素の活性測定、SCFAsと腸内腐敗産物の濃度の測定には1日に2回ずつ1週間にわたって個別に採取した糞便を -80°C に凍結保存した。HFAマウスの仔の試料の採取は、12週齢時に同様にして行った。

細菌学的検索：菌叢構成の検索はプレートインボトル法に代わって嫌気性チャンバー法を用いた以外は第1章と同様に行った。

酵素活性の測定：細菌の酵素活性の測定はRowlandら（41）、Wisra（50）の報告に従い、嫌気性0.1Mリン酸緩衝液（pH7.0）で糞便の100倍希釈液を作成して行った。nitroreductaseの活性は*p*-ニトロ安息香酸からの*p*-アミノ安息香酸の生成で、nitrate reductaseの活性は硝酸からの亜硝酸の生成で測定した。 β -glucuronidaseと β -glucosidaseの活性はそれぞれ*p*-nitrophenyl- β -D-glucuronide、*p*-nitrophenyl- β -D-glucopyranosideを基質として用いて測定した。

腸内腐敗産物濃度の測定：糞便中のインドール、スカトール、*p*-クレゾール、フェノールの濃度は、Yoshiharaの方法（51、52）に準じて行った。試料は水蒸気

蒸留し、FIDを用いたガスクロマトグラフ（263-50；日立製作所）で測定した。内部標準として*p*-isopropylphenolを加え、Cromosorb W-HP（60/80 mesh）を担体とした17%silicon SE-30を充填したガラスカラム（2m x 3mm）を使用した。

SCFAs濃度の測定：糞便中のSCFAs濃度は、50%硫酸で試料を酸性にした後、ジエチルエーテルで抽出してFIDを用いたガスクロマトグラフにて測定した。内部標準としてクロトン酸を加え、Cromosorb WAW-DMCS（80/100 mesh）を担体とした1% H_3PO_4 加 10% FFAPを充填したガラスカラム（2m x 3mm）を使用した。

統計的解析：得られた成績は平均と標準偏差で表し、Studentの*t*-検定で有意差の判定を行った。

結果

糞便菌叢の構成：HFAマウスとCVマウスの糞便および投与したヒト糞便の菌叢構成をTable. 5.に示す。HFAマウス糞便では、eubacteria、peptococcaceaeおよびenterobacteriaceaeの菌数がCVマウス糞便に比べて有意に高く、ヒト糞便に類似した菌数であった。総菌数とbacteroidaceae、clostridia、streptococciの各菌数は、HFAマウスにおいてCVマウス、投与ヒト糞便のいずれよりも高かったが、これらの菌群の菌数はヒト糞便においてCVマウスよりも高く、HFAマウスの糞便菌叢は投与したヒト糞便の菌叢に類似していた。しかし、bifidobacteriaは6群のHFAマウスのうち3群で糞便菌叢から検出されなくなった。HFAマウスとその仔の糞便菌叢の構成を比較すると、いくつかの菌群において有意な差が見られたが、菌叢構成の全体

のバランスは親の菌叢と類似していた。

酵素活性：CVマウスの β -glucuronidase活性はヒトやHFAマウスに比べて極めて高く、HFAマウスの活性はヒト糞便よりもやや低かった（Table. 6.）。 β -glucosidase活性は同一群内の個体によるばらつきが大きく、HFAマウス、CVマウス、ヒトの間の差は明らかではなかった。nitroreductaseの活性は、HFAマウスにおいてCVマウス、ヒトのいずれよりも高く、HFAマウスのnitratereductaseの活性はヒトとCVマウスの中間の活性を示した。それぞれの酵素活性はHFAマウス群間でばらつきが見られたが、そのばらつきは投与したヒト糞便にみられたばらつきとは必ずしも相関しなかった。HFAマウスの仔の糞便中酵素活性は、HFAマウスD群で差が顕著だったこと以外は、それぞれの親の酵素活性と類似していた。

腸内腐敗産物濃度：ヒト糞便中の腸内腐敗産物の濃度には顕著な個体差がみとめられた（Table. 6.）。AとBの試料では主な腸内腐敗産物は*p*-クレゾールであったが、試料C、D、Fではインドールも*p*-クレゾールと同程度の濃度で検出された。試料Eからは低濃度の腸内腐敗産物しか検出されなかった。このように投与試料に大きな個体差が見られたにもかかわらず、作出されたHFAマウス糞便中では主な腸内腐敗産物はいずれの群においてもインドールであり、*p*-クレゾールも低濃度ながら検出されたが、HFAマウス群間の差は非常に小さかった。HFAマウス糞便における腸内腐敗産物濃度は、ヒト糞便に比べて極めて低くCVマウス糞便に近いものであったが、インドール濃度がCVマウス糞便に比較して有意に高く、また、CVマウスからは検出されなかった*p*-クレゾールが検出されるなど、ヒト糞便と類

似した点もあった。HFAマウスの仔においても*p*-クレゾールは検出されたが、インドール濃度はそれぞれの親よりも有意に低くなった群が多かった。

SCFAsの濃度と組成：ヒト糞便中のSCFAs濃度（Table. 7.）はCVマウス糞便に比べて有意に高く、その組成（Table. 8.）も明らかにCVマウス糞便とは異なっていた。HFAマウス糞便においては、総SCFAsはヒト糞便に比べて有意に低く、CVマウス糞便に近かったが、プロピオン酸やイソ酪酸の総SCFAsに対する割合はヒト糞便に類似しており、酢酸の比率はヒト糞便とCVマウス糞便の中間であった。HFAマウスの仔の糞便では親に比べてイソ酪酸と酪酸の濃度と比率が低下した。HFAマウス、HFAマウスの仔のいずれにも群間の差は観察されたが、投与したヒト糞便でみられた個体差とは相関は認められなかった。

考察

これまでGF動物にヒトの糞便菌叢を定着させたHFA動物が、ヒトの腸内菌叢を研究するためのモデルとして考えられ、利用されてきた（7、15、37）が、HFA動物の腸内菌叢がどれほどヒトの腸内菌叢の構成や代謝活性を反映しているかについては十分に検討されていない。

本章で、異なる6検体の糞便を用いてHFAマウスを作出して検討したところ、ヒトの糞便菌叢の構成はHFAマウスの腸内に大きな変化なく再現できることが確認されたが、*bifidobacteria*については第1章で示されたと同様に、半数のHFAマウス群で腸内から排除された。*bacteroidaceae*、*clostridia*、*peptococcaceae*、*streptococci*の

菌数は投与したヒト糞便にかかわらず、HFAマウスの方が投与試料よりも高かった。また、HFAマウス群間の菌叢構成の差は、ヒト糞便間の個体差よりも顕著ではなかった。これらの結果は、HFAマウスの腸内菌叢のバランスは、投与したヒト糞便の菌叢の構成だけでなく、マウス腸管の生理に大きく影響されることを示唆している。

HFAマウスの仔の糞便菌叢は、いずれの群においてもヒトの糞便菌叢と類似していた。この結果は、HFAマウスに定着したヒトの腸内菌叢の構成が、マウス腸管の中で長期に安定して維持することが可能であることを示している。

Mallettら (29) はヒトの腸内菌を定着させたラットで、ヒト腸内菌叢の持つ酵素活性を再現できることを報告した。本研究においてもHFAマウスの糞便中 β -glucuronidaseと β -glucosidaseの活性はヒト糞便に近かった。しかし、nitratoreductaseとnitroreductaseの活性はヒトともCVマウスとも異なった。さらに、ヒト糞便からは検出されるがCVマウス糞便からは検出されないp-クレゾールがHFAマウスから検出されたものの、HFAマウスにおける腸内腐敗産物の産生はヒト糞便とは大きく異なり、むしろCVマウス糞便に近かった。また、SCFAsも組成はヒト糞便の方により類似したものであったが、濃度はヒト糞便に比べて低く、CVマウス糞便に近かった。以上のように、HFAマウス腸内菌叢の構成はヒト糞便菌叢に類似していたにもかかわらず、その代謝活性の中には投与したヒト糞便の性状を反映しないものもあることが明らかとなった。これは、1) ヒト糞便をHFAマウスに投与することによって菌種レベルでの菌叢構成の変化があった、2)

ヒトとマウスでは腸管内の環境が異なるために菌叢の代謝が変化した、などが原因として考えられ、今後さらに検討が必要であろう。

HFAマウス群間の各性状のばらつきは、投与したヒト糞便間に比べて明らかではなく、また、投与したヒト糞便の個体差も反映していなかった。このことは、本研究では全てのHFAマウスは同一系統のBALB/cマウスを使用し、同一のCMF固型飼料を給与して飼育したため、様々な性状を持ったヒトの糞便菌叢が、マウス腸管内の均一な生理的状态によってコントロールされた結果、各ヒト糞便菌叢の特徴が反映されにくくなったと考えられる。HFAマウス腸内に定着したヒト糞便菌叢がその仔に安定して伝えられることも、ヒト糞便菌叢がマウスの腸管に適応したことを支持する。

第5章 ブタフローラ (PFA) マウスの作出

序論

これまで家畜の疾病予防や飼料効率向上に、飼料添加物として抗生物質や化学療法剤が多く用いられてきたが、耐性菌の出現や食肉等への残留の問題から、近年これらの薬剤を用いず、プロバイオティクスを利用する試みがなされている(11)。しかし、用いるプロバイオティクスの効果の研究に対象家畜そのものを用いることは、大きさや環境の制御の困難などのため容易ではなく、しばしば実験成績が安定しない。そこで本章では、ブタの腸内菌叢の構成の経時変化を検索するとともにGFマウスにブタ糞便希釈液を経口投与し、プロバイオティクスのスクリーニングや有効性の研究のための実験動物としてのブタフローラ (PFA) マウスを作出して、マウス腸内にどの程度ブタの腸内菌叢が定着できるかを検討した。

材料と方法

ブタ：東京大学附属牧場で繁殖したランドレース種と大ヨークシャ種の一代雑種のブタを用い、離乳前の生後20日と離乳後の生後40、60日に糞便を採取した。採取した糞便は一部を細菌学的検索のために直ちに嫌気性輸送培地(33)中に入れ、残りはSCFAsと腸内腐敗産物の濃度の測定のためにそのまま氷冷して研究室まで輸送した。

PFAマウスの作出：PFAマウスの作出に用いたGFマウスは当教室で繁殖、維持

しているBALB/cマウスを用いた。各群3匹の12-20週齢のGF雌BALB/cマウスにステンレスアイソレータ (22) 内で、生後20日、60日に採取したブタ糞便のうちの各1検体の 10^{-3} 糞便希釈液をそれぞれ0.5mlずつカテーテルを用いて胃内に投与した。PFAマウスの飼育は、第1章と同様に行った。

試料の採取：PFAマウスの試料はブタ糞便投与1週後、4週後に個別に糞便を採取し、ただちに細菌学的検索に供した。投与4週後には剖検して盲腸内容物を採取し、SCFAsと腸内腐敗産物の濃度の測定のために -80°C に凍結保存した。

細菌学的検索：菌叢構成の検索は、第4章に述べた方法と同様に行った。

腸内腐敗産物濃度の測定：糞便中のインドール、スカトール、*p*-クレゾール、フェノールの濃度は、第4章と同様の方法で測定した。

SCFAs濃度の測定：糞便中のSCFAs濃度の測定は、第4章に述べた方法と同様に行った。

統計的解析：得られた成績は平均と標準偏差で表し、Studentの*t*-検定で有意差の判定を行った。

結果

ブタ糞便菌叢の構成：ブタ糞便菌叢の主な菌群の経時的変化を Fig. 8. に示す。糞便菌叢は離乳の前後で変動した。離乳後は離乳前に比べ高度な嫌気度を必要とする菌群をはじめとする偏性嫌気性菌群の菌数が減少し、総菌数も減少した。一方、*Lactobacilli*は離乳前後とも高い菌数で検出され、特に離乳後は最優勢菌叢の一つと

なった。また、離乳前は検出された*Clostridium perfringens*は離乳後には検出されなかった。

20日齢ブタ糞便希釈液を投与したPFAマウスの糞便菌叢：Fig. 9.に20日齢のブタ糞便希釈液を投与したPFAマウスの主な糞便菌叢を示す。lactobacilli、bacteroidaceae、cubacteriaなどのブタ糞便菌叢の主要菌群がマウス腸内に定着することができたが、*Clostridium perfringens*はしだいに菌数が減少する傾向を示した。偏性嫌気性菌群の菌数と総菌数はブタ糞便に比較してやや増加し、enterobacteriaceaeはやや減少したが、菌叢構成は投与したブタ糞便の菌叢と類似したものとなった。

60日齢ブタ糞便希釈液を投与したPFAマウスの糞便菌叢：Fig. 10. に60日齢のブタ糞便希釈液を投与したPFAマウスの主な糞便菌叢を示す。lactobacilliの菌数は減少したものの、20日齢のブタ糞便希釈液を投与した場合と同様、ブタ糞便菌叢の主要菌群が定着することができた。偏性嫌気性菌群の菌数と総菌数はブタ糞便に比較して増加し、enterobacteriaceaeの菌数は20日齢の糞便を用いた場合と異なり嫌気性菌群とほぼ平行して増加した。

腸内腐敗産物の濃度：Fig. 11. にブタ糞便とPFAマウス盲腸内容物の腸内腐敗産物の濃度を示す。ブタ糞便では主に*p*-クレゾールとスカトールが検出されたが、PFAマウス盲腸内容物からは腸内腐敗産物が検出されず、マウス腸内にブタ糞便菌叢の代謝活性を再現することはできなかった。

SCFAsの濃度：Fig. 12. にブタ糞便とPFAマウス盲腸内容物のSCFAsの濃度を示

す。PFAマウス腸内でもブタ由来の菌叢の醗酵によりSCFAsが産生されていたが、その組成には、ブタ糞便では少量ながら検出されたイソ体（イソ酪酸、イソ吉草酸）がPFAマウス盲腸内容物からはほとんど検出されないという違いがみられた。

考察

これまでGF動物にヒトの糞便菌叢を定着させたHFA動物がヒトの腸内菌叢を研究するためのモデルとして利用されてきた（7、15、37）が、家畜においても同様の動物は応用価値が高い。本章で得られた成績より、PFAマウス腸内には一部の菌群を除きブタ糞便菌叢の主要菌群が定着することができ、菌叢構成も投与したブタ糞便菌叢の構成を反映したものとなることが示され、PFAマウスがブタの腸内菌叢構成の研究には有用なモデルであることが示唆された。また、本章では異なる菌叢として、離乳前の20日齢と離乳後の60日齢のブタ糞便を投与したPFAマウスを作出した。60日齢の糞便を投与したPFAマウスと20日齢の糞便を投与したPFAマウスの菌叢構成を比較すると、最優勢菌叢である偏性嫌気性菌群はいずれの群も同じ様に安定して高い菌数で定着したが、通性嫌気性菌群は60日齢の群では菌種に関わらず 10^8 /gレベルに定着したが、20日齢の群では投与した糞便の菌叢構成を反映して菌種によって定着した菌数に大きな差がみられた。この違いは、60日齢のブタの糞便菌叢はすでに安定した均衡状態にあることによると考えられた。

一方、腸内腐敗産物などブタ糞便菌叢の代謝活性はマウス腸内には十分に再現されなかった。コロニー形態からも菌群によっては菌種レベルでの構成の変化が

示唆されており、代謝活性の変化は、菌叢を構成する菌種の変化によるものであるか、同様の菌種構成でもマウスとブタの腸内環境や飼料の違いなどにより菌の代謝活性が変化したものであると考えられるが、今後の検討課題である。

総括

本論文で、HFAマウスやPFAマウスの腸内菌叢はヒトやブタの糞便菌叢と構成が類似しており、ヒトや家畜の腸内菌叢の研究にあたってCVマウスよりも優れたモデル動物となることが明らかとなった。さらにこれらの動物に定着した菌叢は、繁殖によって継続的に生産が可能であることも示された。HFAマウスやPFAマウスを実験モデルとして利用していくためには、その腸内菌叢が長期にわたって安定して維持できることは重要なことであり、このこともこれらの動物の有用性を示すものであった。

一方、腸内菌叢の持つ代謝活性の中には、HFAマウスやPFAマウスの腸内にヒトやブタの糞便の性状を十分に反映できないものもあり、研究の目的や内容によっては、これらの動物の利用が適さない場合もあることも明らかとなり、腸内菌叢の代謝活性は腸管の生理的状态に大きく影響されることが示唆された。本研究においては、ヒトやブタとHFAマウス、PFAマウスでは、菌種レベルでの菌叢構成の変化が示唆され、このことが代謝活性の違いにつながることが考えられた。今後菌種レベルでの菌叢構成の検索が望まれる。

また、ヒトやブタとHFAマウス、PFAマウスの腸内菌の代謝活性の違いはヒトやブタとマウスの飼料の組成の違いも大きな要因となると考えられる。Rumneyら(42)は、HFAラットを用いた腸内菌による変異原物質の活性化の研究において、変異原物質の生成は食餌によって大きく影響されることを報告し、特にHFAマウ

スにヒトの食餌を与えた場合にヒトでの研究に近い結果が得られることを示した。HFAマウスやPFAマウスをヒトや家畜の腸内菌叢の代謝の研究のためのより良いモデル動物とするためには、マウスに給与する飼料の組成の検討が必要と考えられる。

謝辞

稿を終わるにあたりまして、本論文の作成に際し御指導、御校閲を賜りました東京大学農学部 高橋英司教授ならびに伊藤喜久治助教授に深甚の謝意を表します。また、研究の遂行にあたり、終始御指導いただきました東京大学農学部 光岡知足名誉教授、土井邦雄教授ならびに河村晴次助手に厚く御礼申し上げます。

さらに、無菌動物の飼育に関して御指導くださいました理化学研究所 尾崎明氏、大和田勉氏ならびに本研究に御協力くださいました東京大学農学部獣医公衆衛生学教室及び実験動物学教室の各位に深く感謝いたします。

文献

1. Andremont A, Raibaud P, Tancrède C. (1983). Effect of erythromycin on microbial antagonisms: a study in gnotobiotic mice associated with a human fecal flora. *J. Infect. Dis.* **148**, 579-587.
2. Benno Y, Mitsuoka T. (1986). Development of intestinal microflora in human and animals. *Bifidobacteria Microflora* **5**, 13-25.
3. Benno Y, Endo K, Mizutani T, Namba Y, Komori T, Mitsuoka T. (1989). Comparison of fecal microflora of elderly persons in rural and urban areas of Japan. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**, 1100-1105.
4. Burkitt DP. (1978). Colonic-rectal cancer: fiber and other dietary factors. *Am. J. Clin. Nutr.* **31**, S58-S64.
5. Davis CP, McAllister JS, Savage D C (1973). Microbial colonization of the intestinal epithelia in suckling mice. *Infect. Immun.* **7**, 666-672.
6. Drasar BS, Jenkins DJA, Cummings JH. (1976). The influence of a diet rich in wheat fibre on the human faecal flora. *J. Med. Microbiol.* **9**, 423-431.
7. Ducluzeau R, Ladiré M, Raibaud P. (1984). Effect of bran ingestion on the microbial faecal floras of human donors and of recipient gnotobiotic mice, and on the barrier effects exerted by these floras against various potentially pathogenic microbial strains. *Ann. Microbiol.* **135A**, 303-318.

8. Ducluzeau R, Repine P, Couvalin C, Raibaud P. (1978). Transfer of the fecal microbial flora from holoxenic piglets and adult pigs to axenic piglets and axenic adult mice: effect of the animal host and of the dirt on the fecal microbial pattern of these animals. *Ann. Microbiol.* **129B**, 597-612.
9. Finegold SM, Sutter VL. (1978). Fecal flora in different populations, with special reference to diet. *Am. J. Clin. Nutr.* **31**, S116-S122.
10. Fishbein L, Kaplan M, Gough M. (1988). Fructooligosaccharides: A review. *Vet. Hum. Toxicol.* **30**, 104-107.
11. Fox SM. (1988). Probiotics: Intestinal inoculants for production animals. *Vet. Med.* **83**, 806-830.
12. Fujiwara S, Hirota T, Nakazato H, Mizutani T, Mitsuoka T. (1991). Effect of konjac mannan on intestinal microbial metabolism in mice bearing human flora and in conventional F344 rats. *Food Chem. Toxicol.* **29**, 601-606.
13. Gordon HA, Pesti L. (1971). The gnotobiotic animal as a tool in the study of host microbial relationships. *Bacteriol. Rev.* **35**, 390-429.
14. Haenel H. (1963). Über die Mikroökologie alter Menschen. *Zbl. Bakteriol. I. Abt. Orig.* **188**, 219-230.
15. Hazenberg MP, Bakker M, Verschoor-Burggraaf A. (1981). Effects of the human intestinal flora on germ-free mice. *J. Appl. Bacteriol.* **50**, 95-106.
16. Hentges DJ, Maier BR, Burton GC, Flynn MA, Tsutakawa RK. (1977). Effect of a

- high-beef diet on the fecal bacterial flora of humans. *Cancer Res.* **37**, 568-571.
17. Hidaka H, Eida T, Takizawa T, Tokunaga T, Tashiro Y. (1986). Effects of fructooligosaccharides on intestinal flora and human health. *Bifidobacteria Microflora* **5**, 37-50.
 18. Hidaka H, Tashiro Y, Eida T. (1991). Proliferation of bifidobacteria by oligosaccharides and useful effect on human health. *Bifidobacteria Microflora* **10**, 65-79.
 19. Hill M. (1988). Gut flora and cancer in humans and laboratory animals. In: Rowland IR (ed) *Role of the Gut Microflora in Toxicity and Cancer*. Academic Press, London, pp.461-502.
 20. Hoffmann K. (1965). Untersuchungen über die Beeinflussung der Stuhlflora durch Krankheiten. *Ernährungsforsh* **10**, 405-410.
 21. Itoh K, Mitsuoka T. (1980). Production of gnotobiotic mice with normal physiological functions. I. Selection of useful bacteria from feces of conventional mice. *Z. Versuchstierkd.* **22**, 173-178.
 22. Itoh K, Ozaki A, Yamamoto T, Mitsuoka T. (1978). An autoclavable stainless steel isolator for small scale gnotobiotic experiments. *Exp. Anim.* **27**, 13-16.
 23. Jantea Fm Nicolae D, Bad-Oprimescu D, Voina P. (1965). Beitrag zur Darmmikroflora bei Menschen im Alter von 45-100 Jahren. *Ernährungsforschung* **10**, 352-362.

24. Kimura N, Yoshikane M, Kobayashi A, Mitsuoka T. (1983). An application of dried bifidobacteria preparation to scouring animals. *Bifidobacteria Microflora* **2**, 41-55.
25. Koopman JP, Stadrouders AM, Boer H. (1981). De Darmflora van de Muis. *Tijdschr. Diergeneesk.* **106**, 748-755.
26. Lee A, Gordon J, Lee CJ, Dubos R. (1971). The mouse intestinal microflora with emphasis on the strict anaerobes. *J. Exp. Med.* **133**, 339-352.
27. Long SS, Swensen RM. (1977). Development of anaerobic faecal flora in healthy newborn infants. *J. Ped.* **91**, 325-333.
28. Maejima K, Sasaki J, Shimoda K, Kurosawa T. (1981). Bacterial flora of ex-germfree mice after oral inoculation of feces from various species of conventional animals. *Exp. Anim.* **30**, 157-160.
29. Mallett AK, Bearn CA, Rowland IR, Farthing MJG, Cole CB, Fuller R. (1987). The use of rats associated with a human faecal flora as a model for studying the effects of diet on the human gut microflora. *J. Appl. Bacteriol.* **63**, 39-45.
30. Mitsuoka T. (1982). Recent trends in research on intestinal flora. *Bifidobacteria Microflora* **1**, 3-24.
31. Mitsuoka T, Hayakawa K. (1972). Die Faekalflora bei Menschen. I. Mitteilung: die Zusammensetzung der faekalflora der verschiedenen Altersgruppen. *Zbl. Bakteriol. Mikrobiol. Hyg. I. Abt. Orig. A* **233**, 333-342.
32. Mitsuoka T, Morishita Y, Terada A, Yamamoto S. (1969). A simple method ('plate-

- in-bottle method') for the cultivation of fastidious anaerobes. *Jpn. J. Microbiol.* **13**, 383-385.
33. Mitsuoka T, Ohno K, Benno Y, Suzuki K, Namba K. (1976). Die Faekalflora bei Menschen. IV. Mitteilung. Vergleich des neu entwickelten Verfahrens mit dem bisherigen üblichen Verfahren zur Darmfloraanalyse. *Zbl. Bakteriol. Parasitenkd. Infekt. Hyg. I. Abt. Orig. A* **234**, 219-233.
34. Mitsuoka T, Segal T, Yamamoto S. (1965). Eine verbesserte Methodik der qualitativen und quantitativen Analyse der Darmflora von Menschen und Tieren. *Zbl. Bakteriol. Parasitenkd. Infekt. Hyg. I. Abt. Orig. A* **195**, 455-469.
35. Mizutani T, Mitsuoka T. (1983). Inhibitory effect of some intestinal bacteria on liver tumorigenesis in gnotobiotic C3H/He male mice. *Cancer Let.* **19**, 89-95.
36. Mizutani T, Benno Y, Mitsuoka T. (1982). Effect of dietary fiber of tumorigenesis and longevity: with special reference to the fecal microflora. *Nutr. Report Int.* **26**, 289-296.
37. Raibaud P, Ducluzeau R, Dubos F, Hudault S, Bewa H, Muller MC. (1980). Implantation of bacteria from the digestive tract of man and various animals into gnotobiotic mice. *Am. J. Clin. Nutr.* **33**, 2440-2447.
38. Reddy BS, Weisburger JH, Wynder EL. (1975). Effects of high risk and low risk diets for colon carcinogenesis on fecal microflora and steroids in man. *J. Nutr.* **105**, 878-884.

39. Rowland IR, Tanaka R. (1993). The effects of transgalactosylated oligosaccharides on gut flora metabolism in rats associated with a human faecal microflora. *J. Appl. Bacteriol.* **74**, 667-674.
40. Rowland IR, Mallett AK, Bearne CA. (1986). Enzyme activities of the hindgut microflora of laboratory animals and man. *Xenobiotica* **16**, 519-523.
41. Rowland IR, Mallett AK, Wise A. (1983). A comparison of the activity of five microbial enzymes from rats, mice and hamsters and response to dietary pectin. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **69**, 143-148.
42. Rumney CJ, Rowland IR, O'Neill IK. (1993). Conversion of IQ to 7-OHIQ by gut microflora. *Nutr. Cancer* **19**, 67-76.
43. Schaedler RW, Dubos R, Costello R. (1965). The development of the bacterial flora in the gastrointestinal tract. *J. Exp. Med.* **122**, 59-66.
44. Simon GL, Gorbach SL. (1984). Intestinal flora in health and disease. *Gastroenterol.* **86**, 174-193.
45. Smith HW, Crabb WE. (1961). The faecal bacterial flora of animals and man: its development in the young. *J. Pathol. Bacteriol.* **82**, 53-66.
46. Statland BE. (1992). Nutrition and cancer. *Clin. Chem.* **38**, 1587-1594.
47. Tancrede C. (1992). Role of human microflora in health and disease. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect Dis.* **11**, 1012-1015.
48. Tancrede C, Andreumont A, Kherbiche AM. (1981). Germfree mice associated with

- human flora as a means of bacteriological surveillance of neutropenic patients in sterile environments. In: Sasaki S, Ozawa A, Hashimoto K (eds) *Recent Advances in Germfree Research*. Tokai University Press, Tokyo, pp. 755-758.
49. Tokunaga T, Nakada Y, Tashiro Y, Hirayama Y, Hidaka H. (1993). Effects of fructooligosaccharides intake on the intestinal microflora and defecation in healthy volunteers. *Bifidus* **6**, 143-150. (in Japanese)
50. Wise A, Mallett AK, Rowland IR. (1982). Dietary fibre, bacterial metabolism and toxicity of nitrate in the rat. *Xenobiotica* **12**, 111-118.
51. Yoshihara I. (1979). Simultaneous gas chromatographic microdetermination of indole, skatole and *p*-cresol in gastrointestinal contents of domestic animals. *Agr. Biol. Chem.* **43**, 1985-1987.
52. Yoshihara I. (1981). Isothermal gas chromatographic analysis of putrefactive products in gastrointestinal contents and urine using the same dual column system. *Agr. Biol. Chem.* **45**, 1973-1975.

Table 1. Culture media and conditions for incubation

Medium	Organisms usually enumerated	Incubation method
Medium 10	Strict anaerobes	'Plate-in-bottle' method 37°C, 76 h
EG agar	Anaerobes	Steel wool method 37°C, 48 h
BL agar	Anaerobes	
NBGT agar	Bacteroidaceae	
BS agar	Bifidobacteria	
ES agar	Eubacteria	
VS agar	Veillonellaceae	
NN agar	Clostridia	
LBS agar	Lactobacilli	
TS agar	Aerobes	Aerobic 37°C, 24-48 h
DHL agar	Enterobacteriaceae	
TATAC agar	Streptococci	
PEES agar	Staphylococci	
PD agar	Yeasts, Molds	

Table 2. Composition of fecal flora of HFA mice inoculated with human feces from volunteer A. (n=3)

Bacterial group	Inoculum	After inoculation					
		1d	2d	3d	1wk	2wk	8wk ^e
Total bacteria	11.0 ^a	10.2±0.1 ^{b**}	11.0±0.1	11.2±0.0 ^{b**}	11.1±0.2	11.2±0.2	10.4
Bacteroidaceae	10.7	9.7±0.1 ^{b**}	10.9±0.1 ^{b*}	11.0±0.1 ^{b**}	10.9±0.3	11.0±0.2	10.0
Eubacteria	10.4	9.3±0.3 ^{a*}	10.1±0.1	10.4±0.2	10.4±0.2	10.4±0.1	10.0
Bifidobacteria	10.0	9.5±0.1 ^{a*}	10.2±0.3	10.1±0.2	9.6±0.4	8.8±0.3	7.0
Peptococcaceae	10.1	9.0±0.5	9.3±0.2 ^{a*}	8.7 ^d	9.7±0.3	9.9±0.4	9.0
Clostridia	9.3	9.3±0.2	9.7±0.2	9.4±0.1	9.8±0.2 ^{a*}	9.2±0.1	10.0
Veillonella	5.8	N.D. ^e	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Lactobacilli	3.6	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Enterobacteriaceae	8.0	9.5±0.2 ^{**}	8.1±0.2	6.8±1.4	6.8±0.4 ^{a*}	6.3±0.3 ^{a*}	6.2
Streptococci	7.9	4.7±0.2 ^{**}	3.5±0.3 ^{**}	3.7±0.6 ^{**}	4.4±0.4 ^{**}	3.9±0.3 ^{**}	3.3
Yeasts	5.4	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.

^aLog₁₀/g feces.

^bMean ± S.D. of log₁₀/g feces when the organism was presented.

^cNot detected.

^dDetected from 2/3 mice.

^en=1.

^{*}P<0.05, ^{**}P<0.01.

Table 3. Composition of fecal flora of HFA mice inoculated with human feces from volunteer B. (n=3)

Bacterial group	Inoculum	After inoculation					
		1d	2d	3d	1wk	2wk	8wk
Total bacteria	10.8 ^a	11.3±0.0 ^{b**}	11.6±0.2 [*]	11.3±0.1 [*]	11.5±0.2 [*]	11.4±0.1 ^{**}	11.5±0.0 ^{**}
Bacteroidaceae	10.5	11.1±0.1 [*]	11.4±0.2 [*]	11.1±0.1 ^{**}	11.3±0.2 [*]	11.2±0.1 ^{**}	11.3±0.0 ^{**}
Eubacteria	10.2	10.2±0.3	10.5±0.2	10.6±0.1 [*]	10.2±0.2	10.4±0.1	10.2±0.3
Bifidobacteria	9.3	10.0±0.3	10.2±0.3 [*]	9.3±0.4	8.5±0.4	7.0 ^e	N.D.
Peptococaceae	10.0	10.4±0.2	10.9±0.0 ^{**}	10.1±0.2	10.4±0.2	10.1±0.6	10.6±0.2 [*]
Clostridia	10.0	9.9±0.2	10.5±0.2 [*]	10.3±0.4	10.5±0.2 [*]	10.2±0.3	10.3±0.0 ^{**}
Megasphaera	8.3	N.D. ^e	8.0 ^d	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Lactobacilli	4.6	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Enterobacteriaceae	7.3	8.9±0.2 ^{**}	8.3±0.1 ^{**}	7.5±0.7	6.8±0.7	6.6±0.9	5.4±0.1 ^{**}
Streptococci	5.3	6.3±0.5	7.0±1.1	6.8±1.1	8.8±0.8 [*]	8.5±0.4 ^{**}	5.2±0.2

^aLog₁₀/g feces.

^bMean ± S.D. of log₁₀/g feces when the organism was presented.

^cNot detected.

^dDetected from 1/3 mice.

^eDetected from 2/3 mice.

^{*}P<0.05, ^{**}P<0.01.

Table 4. Composition of fecal flora of HFA mice fed 3 different diets. (n=6)

Bacterial group	Basal diet	HM diet	HB diet
Total bacteria	10.9±0.4 ^a	11.0±0.2	10.8±0.2
Bacteroidaceae	10.9±0.1 ^b	10.9±0.2 ^c	10.6±0.2 ^{b,c}
Eubacteria	10.2±0.1	10.1±0.1	10.1±0.2
Bifidobacteria	9.1±0.2 ^b	9.0±0.5 ^c	9.5±0.2 ^{b,c}
Peptococcaceae	9.8±0.4	9.4±0.2	9.5±0.2
Clostridia	9.8±0.3 ^b	9.6±0.2	9.4±0.2 ^b
Enterobacteriaceae	6.6±0.5 ^b	7.5±0.1 ^{b,c}	7.0±0.2 ^c
Streptococci	8.1±0.6 ^b	8.0±0.4 ^c	7.0±0.3 ^{b,c}

^aMean ± S.D. of log₁₀/g feces.

^b, ^cSignificant difference exists between mean value with the same superior letters. ($P < 0.05$)

Table 5. Composition of major bacterial components of the fecal microbiota of humans, CV mice, HFA mice and offspring of HFA mice.

Bacterial group	Human	Sample A		Sample B		Sample C	
		Inoculum	HFA mice	Inoculum	HFA mice	Inoculum	HFA mice
HFA mice	(n=6)		(n=5)		(n=5)		(n=5)
Total bacteria	10.9±0.2 ^{ac}	10.9 ^b	11.0±0.2 ^{cd}	10.8	11.3±0.1 ^{cd}	10.6	11.5±0.2 ^{cd}
Bacteroidaceae	10.4±0.2	10.2	10.8±0.2 ^{cd}	10.4	11.0±0.1 ^{cd}	10.2	11.3±0.2 ^{cd}
Eubacteria	10.2±0.4 ^b	10.4	10.4±0.2 ^b	9.8	10.5±0.1 ^c	9.6	10.5±0.2 ^{cd}
Bifidobacteria	10.0±0.2	10.2	N.D.	10.3	9.7±0.3 ^{cd}	9.8	8.6±2.0
Clostridia	9.9±0.3 ^b	10.3	10.1±0.2 ^c	9.9	10.7±0.1 ^{cd}	10.0	10.6±0.2 ^{cd}
<i>C. perfringens</i>	6.5±0.6	6.9	4.5±0.8	N.D.	3.6±0.6	N.D.	N.D.
Peptococcaceae	9.8±0.3	9.8	9.7±0.3	N.D.	10.2±0.3	9.3	10.2±0.4 ^c
Fusiform bacteria	N.D.	N.D.	N.D.	2.3	N.D.	N.D.	N.D.
Lactobacilli	3.3±1.2 ^c	4.9	7.3±0.5 ^{cd}	6.6	7.8±0.4 ^c	N.D.	6.5±0.4 ^{cd}
Enterobacteriaceae	7.2±0.7 ^c	7.3	7.7±0.5 ^{cd}	7.0	9.0±0.3 ^{cd}	7.9	8.7±0.3 ^{cd}
Streptococci	7.0±0.3	6.6	N.D.	N.D.	N.D.	7.1	N.D.
Staphylococci	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Offspring							
Total bacteria			(n=7)		(n=5)		(n=7)
Bacteroidaceae			11.3±0.2 ^{cd}		11.2±0.1 ^{cd}		11.4±0.1 ^{cd}
Eubacteria			11.0±0.2 ^{cd}		11.1±0.1 ^{cd}		11.1±0.1 ^{cd}
Bifidobacteria			10.6±0.2 ^c		10.2±0.2 ^{cd}		10.5±0.1 ^c
Clostridia			N.D.		8.9±0.4 ^{cd}		8.4±0.4 ^d
<i>C. perfringens</i>			10.4±0.1 ^{cd}		10.2±0.1 ^{cd}		10.8±0.3 ^{cd}
Peptococcaceae			N.D.		N.D.		N.D.
Fusiform bacteria			10.1±0.3		10.2±0.4		10.0±0.1
Lactobacilli			N.D.		N.D.		N.D.
Enterobacteriaceae			6.9±0.6 ^c		6.2±0.1 ^{cd}		7.2±1.2 ^c
Streptococci			7.5±0.5 ^c		7.5±0.2 ^{cd}		8.8±0.7 ^{cd}
Staphylococci			N.D.		N.D.		N.D.

^aMean ± S.D. of log₁₀/g feces when the organism was present. (Number of samples in which the organism was detected.)

^bLog₁₀/g feces.

^cSignificant difference from CV mice.

^dSignificant difference from humans.

^eSignificant difference from their mothers.

N.D.: Not detected.

Table 5. (Continued).

Bacterial group	Sample D		Sample E		Sample F		CV mice
	Inoculum	HF/A mice	Inoculum	HF/A mice	Inoculum	HF/A mice	
HF/A mice		(n=5)		(n=5)		(n=5)	(n=7)
Total bacteria	11.1	11.1±0.2 ^{cd}	10.9	11.5±0.1 ^{cd}	10.9	11.4±0.1 ^{cd}	10.5±0.1 ^d
Bacteroidaceae	10.7	10.8±0.2 ^{cd} (5)	10.6	11.2±0.1 ^{cd} (5)	10.3	11.2±0.2 ^{cd} (5)	10.3±0.2
Eubacteria	10.6	10.2±0.3 ^e (5)	10.2	10.4±0.3 ^e (5)	10.5	10.5±0.3 ^e (5)	9.2±0.4 ^d (7)
Blifidobacteria	9.9	N.D.	10.0	8.4±1.3 ^d (5)	9.8	N.D.	N.D.
Clostridia	10.2	10.4±0.3 ^{cd} (5)	9.9	10.8±0.1 ^d (5)	9.3	10.6±0.1 ^d (5)	9.0±0.5 ^d (7)
<i>C. perfringens</i>	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	6.1	N.D.	N.D.
Peptococcaceae	10.2	9.9±0.3 (5)	9.8	10.3±0.2 ^d (5)	10.0	10.2±0.2 ^d (5)	9.2
Fusiform bacteria	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	9.8±0.2
Lactobacilli	N.D.	N.D.	2.3	N.D.	3.6	N.D.	8.5±0.7 ^d (7)
Enterobacteriaceae	6.6	7.8±0.1 ^{cd} (5)	6.6	5.1±2.4 ^{cd} (5)	8.0	7.0±0.4 ^e (5)	6.2±0.3 ^d (7)
Streptococci	7.3	7.9±0.3 ^{cd} (5)	7.4	8.3±0.4 ^{cd} (5)	6.6	7.4±0.3 ^{cd} (5)	6.6±0.7 (7)
Staphylococci	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	5.2±0.2 (7)
Offspring		(n=7)		(n=6)		(n=5)	
Total bacteria		11.5±0.1 ^{cd}		11.4±0.1 ^{cd}		11.5±0.1 ^{cd}	
Bacteroidaceae		11.2±0.1 ^{cd} (7)		11.2±0.1 ^{cd} (6)		11.2±0.1 ^{cd} (5)	
Eubacteria		10.7±0.1 ^{ce} (7)		10.2±0.3 ^e (6)		10.5±0.2 ^e (5)	
Blifidobacteria		N.D.		N.D.		3.4±0.4 (3)	
Clostridia		10.8±0.2 ^{cd} (7)		10.6±0.1 ^{cd} (6)		10.7±0.1 ^{cd} (5)	
<i>C. perfringens</i>		N.D.		N.D.		N.D.	
Peptococcaceae		10.4±0.1 ^{de} (7)		10.0±0.0 (6)		10.5±0.2 ^d (5)	
Fusiform bacteria		N.D.		N.D.		N.D.	
Lactobacilli		N.D.		N.D.		N.D.	
Enterobacteriaceae		6.7±0.5 ^e (7)		N.D.		7.8±0.5 ^{ce} (5)	
Streptococci		7.1±0.6 ^e (7)		7.8±0.5 ^{cd} (6)		7.5±0.1 ^{cd} (5)	
Staphylococci		N.D.		N.D.		N.D.	

Table 6. Enzyme activities and concentrations of putrefactive products in feces of humans, CV mice, HFA mice and offspring of HFA mice.

	Sample A		Sample B		Sample C	
	Human	Inoculum	HFA mice	Inoculum	HFA mice	Inoculum
Enzyme activities (μ mol/h/g)						
HFA mice						
β -Glucosidase	155.9 \pm 71.8 ^a	143.3	125.3 \pm 47.5 ⁽ⁿ⁼⁵⁾	181.0	135.9 \pm 36.7 ⁽ⁿ⁼⁵⁾	166.7
β -Glucuronidase	80.3 \pm 38.2 ^b	74.1	17.3 \pm 6.0 ^{bc}	73.6	37.1 \pm 23.2 ^b	120.6
Nitrate reductase	0.1 \pm 0.1 ^b	0.1	2.8 \pm 1.0 ^{bc}	0.1	1.3 \pm 0.5 ^c	0.1
Nitroreductase	6.3 \pm 3.5	8.2	16.8 \pm 2.7 ^c	3.4	13.4 \pm 3.9 ^{bc}	4.1
Offspring						
β -Glucosidase			233.9 \pm 53.8 ^{cd}		98.4 \pm 22.7 ⁽ⁿ⁼⁵⁾	153.8 \pm 15.0 ⁽ⁿ⁼⁷⁾
β -Glucuronidase			26.1 \pm 9.7 ^{bc}		41.7 \pm 38.1 ^b	29.1 \pm 9.5 ^{bc}
Nitrate reductase			1.7 \pm 1.1 ^c		3.0 \pm 0.5 ^{bcd}	4.8 \pm 0.8 ^{bc}
Nitroreductase			18.1 \pm 4.0 ^c		17.5 \pm 2.0 ^c	13.4 \pm 3.0 ^{cd}
Putrefactive products (μ g/g)						
HFA mice						
Phenol	2.4 \pm 4.7 ^b	0.8	0.0 \pm 0.0 ^c	0.0	0.0 \pm 0.0 ^c	11.8
<i>p</i> -Cresol	178.0 \pm 99.3 ^b	309.6	3.0 \pm 2.1 ^{bc}	203.6	0.6 \pm 1.3 ^c	189.9
Indole	94.0 \pm 71.7 ^b	51.2	12.3 \pm 3.3 ^{bc}	47.9	10.5 \pm 1.8 ^c	184.9
Skatole	48.1 \pm 60.9 ^b	135.3	0.0 \pm 0.0 ^c	41.8	0.0 \pm 0.0 ^c	0.0
Offspring						
Phenol			0.0 \pm 0.0 ^c		0.0 \pm 0.0 ^c	0.0 \pm 0.0 ^c
<i>p</i> -Cresol			1.1 \pm 1.6 ^{bc}		1.1 \pm 1.0 ^{bc}	2.0 \pm 1.6 ^{bc}
Indole			5.0 \pm 1.1 ^{bcd}		6.6 \pm 1.1 ^{cd}	9.7 \pm 2.7 ^{cd}
Skatole			0.0 \pm 0.0 ^c		0.0 \pm 0.0 ^c	0.0 \pm 0.0 ^c

^aMean \pm S.D.

^bSignificant difference from CV mice.

^cSignificant difference from humans.

^dSignificant difference from their mothers.

Table 6. (Continued).

	Sample D		Sample E		Sample F		CV mice
	Inoculum	HFA mice	Inoculum	HFA mice	Inoculum	HFA mice	
Enzyme activities (μ mol/h/g)							
HF-Amicc							
β -Glucosidase	150.2	119.9 \pm 39.1 ⁽ⁿ⁼⁵⁾	36.1	93.6 \pm 26.2 ⁽ⁿ⁼⁵⁾	258.2	99.1 \pm 28.6 ⁽ⁿ⁼⁵⁾	222.8 \pm 143.2 ⁽ⁿ⁼⁷⁾
β -Glucuronidase	79.0	15.0 \pm 7.9 ^{bc}	16.3	42.0 \pm 26.9 ^b	118.4	176.6 \pm 67.3 ^c	295.3 \pm 227.3 ^c
Nitrate reductase	0.2	2.3 \pm 0.6 ^{bc}	0.1	0.8 \pm 0.2 ^{bc}	0.2	2.4 \pm 1.0 ^c	1.5 \pm 0.4 ^c
Nitroreductase	11.7	15.5 \pm 3.1 ^c	2.8	14.3 \pm 2.7 ^{bc}	7.5	12.6 \pm 1.9 ^{bc}	25.2 \pm 10.4 ^c
Offspring							
β -Glucosidase		213.9 \pm 34.1 ^d (n=7)		90.5 \pm 22.3 ^b (n=6)		140.1 \pm 30.2 (n=5)	
β -Glucuronidase		56.6 \pm 37.9 ^{bd}		52.8 \pm 25.5 ^b		230.6 \pm 100.3 ^{bc}	
Nitrate reductase		3.1 \pm 0.2 ^{bcd}		2.2 ^c		4.0 \pm 0.5 ^{bcd}	
Nitroreductase		14.9 \pm 1.0 ^{bc}		15.7 \pm 4.1 ^c		17.4 \pm 1.6 ^c	
Putrefactive products (μ g/g)							
HF-A mice							
Phenol	0.0	0.0 \pm 0.0 ^c (n=5)	1.8	0.0 \pm 0.0 ^c (n=5)	0.0	0.0 \pm 0.0 ^c (n=5)	0.0 \pm 0.0 ^c (n=7)
<i>p</i> -Cresol	184.8	2.0 \pm 0.5 ^{bc}	1.6	0.0 \pm 0.0 ^c	178.3	0.0 \pm 0.0 ^c	0.0 \pm 0.0 ^c
Indole	169.4	12.2 \pm 3.3 ^{bc}	6.4	5.3 \pm 2.0 ^c	104.4	2.9 \pm 0.7 ^{bc}	7.2 \pm 1.7 ^c
Skatole	0.0	0.0 \pm 0.0 ^c	0.0	0.0 \pm 0.0 ^c	111.2	0.0 \pm 0.0 ^c	0.0 \pm 0.0 ^c
Offspring							
Phenol		0.0 \pm 0.0 ^c (n=7)		0.0 \pm 0.0 ^c (n=6)		0.0 \pm 0.0 ^c (n=5)	
<i>p</i> -Cresol		0.6 \pm 0.6 ^{bcd}		5.2 \pm 6.2 ^{bcd}		0.0 \pm 0.0 ^c	
Indole		7.4 \pm 3.7 ^{cd}		7.3 \pm 3.2 ^c		5.4 \pm 1.7 ^{cd}	
Skatole		0.0 \pm 0.0 ^c		0.0 \pm 0.0 ^c		0.0 \pm 0.0 ^c	

Table 7. Concentrations of SCFAs in feces of humans, CV mice, HFA mice and offspring of HFA mice (μ mol/g)

	Human		Sample A		Sample B		Sample C	
	Human	Inoculum	HFA mice		HFA mice		HFA mice	
			Inoculum	HFA mice	Inoculum	HFA mice	Inoculum	HFA mice
HFA mice								
Total SCFAs	101.2 \pm 26.4 ^{ab} (n=6)	101.3	54.4 \pm 19.8 ^{bc} (n=5)	134.2	39.6 \pm 10.3 ^c (n=5)	68.8	35.5 \pm 11.0 ^c (n=5)	
Acetic acid	45.3 \pm 7.5 ^b	47.7	32.7 \pm 11.3 ^{bc}	43.5	26.6 \pm 6.7 ^{bc}	33.3	28.9 \pm 8.8 ^{bc}	
Propionic acid	18.3 \pm 5.9 ^a	13.0	10.8 \pm 4.6 ^{bc}	25.5	6.0 \pm 2.1 ^{bc}	16.9	5.6 \pm 2.2 ^c	
i-Butyric acid	11.0 \pm 8.4 ^a	11.0	1.4 \pm 0.5 ^{bc}	21.4	1.2 \pm 0.4 ^{bc}	2.0	0.1 \pm 0.1 ^c	
Butyric acid	16.4 \pm 5.7 ^{ab}	15.4	9.1 \pm 3.9 ^a	26.9	5.1 \pm 1.8 ^{bc}	11.9	0.5 \pm 0.1 ^{bc}	
i-Valeric acid	5.5 \pm 3.7 ^{ab}	7.6	0.2 \pm 0.1 ^c	11.2	0.2 \pm 0.1 ^c	4.2	0.3 \pm 0.1 ^c	
Valeric acid	3.8 \pm 2.8	4.8	0.1 \pm 0.0 ^c	5.5	0.6 \pm 0.2	0.4	0.0 \pm 0.1 ^c	
Offspring								
Total SCFAs			41.6 \pm 12.4 ^c (n=7)		29.8 \pm 6.3 ^c (n=5)		43.0 \pm 13.4 ^c (n=7)	
Acetic acid			31.1 \pm 9.6 ^{bc}		23.0 \pm 6.2 ^{bc}		29.7 \pm 14.7 ^{bc}	
Propionic acid			8.3 \pm 2.7 ^{bc}		5.4 \pm 1.3 ^{cd}		6.3 \pm 2.9 ^c	
i-Butyric acid			0.0 \pm 0.0 ^{cd}		0.0 \pm 0.0 ^{cd}		0.1 \pm 0.1 ^{bc}	
Butyric acid			1.5 \pm 0.4 ^{cd}		0.7 \pm 0.3 ^{bcd}		0.7 \pm 0.3 ^{bc}	
i-Valeric acid			0.2 \pm 0.1 ^c		0.1 \pm 0.1 ^c		0.4 \pm 0.2 ^c	
Valeric acid			0.1 \pm 0.0 ^c		0.4 \pm 0.1 ^c		0.1 \pm 0.0 ^c	

^aMean \pm S.D.

^bSignificant difference from CV mice.

^cSignificant difference from humans.

^dSignificant difference from their mothers.

Table 7. (Continued).

	Sample D		Sample E		Sample F		CV mice
	Inoculum	HF A mice	Inoculum	HF A mice	Inoculum	HF A mice	
HF A mice							
Total SCFAs	123.6	28.8 ± 8.4 ^e (n=5)	72.6	51.0 ± 26.2 ^e (n=5)	106.7	37.6 ± 13.2 ^e (n=5)	28.7 ± 15.9 ^e (n=7)
Acetic acid	51.8	17.4 ± 4.5 ^e	41.8	32.9 ± 15.2 ^e	53.9	27.3 ± 10.8 ^e	23.2 ± 14.0 ^e
Propionic acid	24.0	5.7 ± 2.4 ^{bc}	10.7	9.0 ± 6.3 ^{bc}	19.6	8.6 ± 2.0 ^{bc}	2.6 ± 1.1 ^e
i-Butyric acid	20.2	0.6 ± 0.3 ^{bc}	9.0	1.4 ± 0.3 ^{bc}	2.4	0.0 ± 0.0 ^e	0.1 ± 0.0 ^e
Butyric acid	16.3	4.8 ± 2.1 ^{bc}	10.9	7.6 ± 5.3 ^c	16.7	1.1 ± 0.6 ^{bc}	12.4 ± 1.6 ^c
i-Valeric acid	4.3	0.3 ± 0.1 ^e	0.3	0.1 ± 0.1 ^e	5.3	0.2 ± 0.0 ^e	0.1 ± 0.1 ^e
Valeric acid	6.4	0.1 ± 0.0 ^e	0.0	0.0 ± 0.1 ^e	5.7	0.3 ± 0.1 ^e	0.2 ± 0.1 ^e
Offspring							
Total SCFAs		11.9 ± 4.1 ^{bcd} (n=7)		43.8 ± 22.7 ^e (n=6)		29.1 ± 8.8 ^c (n=5)	
Acetic acid		9.4 ± 3.4 ^{bcd}		32.2 ± 16.2 ^{bc}		22.9 ± 6.5 ^{bc}	
Propionic acid		2.2 ± 0.7 ^{cd}		9.4 ± 5.2 ^{cd}		5.0 ± 2.1 ^e	
i-Butyric acid		0.0 ± 0.0 ^{bcd}		0.0 ± 0.1 ^{cd}		0.0 ± 0.1 ^e	
Butyric acid		0.3 ± 0.1 ^{cd}		1.7 ± 1.3 ^{cd}		0.7 ± 0.3 ^{bc}	
i-Valeric acid		0.2 ± 0.3 ^e		0.5 ± 0.3 ^{cd}		0.1 ± 0.0 ^e	
Valeric acid		0.0 ± 0.0 ^e		0.1 ± 0.1 ^e		0.3 ± 0.1 ^e	

Table 8. Composition of SCFAs in feces of humans, CV mice, HFA mice and offspring of HFA mice. (%)

	Human	Sample A		Sample B		Sample C	
		Inoculum	HFA mice	Inoculum	HFA mice	Inoculum	HFA mice
			(n=5)		(n=5)		(n=5)
HFA mice							
Acetic acid	46.3 ± 8.5 ^{ab}	47.1	61.3 ± 5.9 ^{bce}	32.4	67.6 ± 5.7 ^{bce}	48.4	81.6 ± 2.3 ^c
Propionic acid	18.1 ± 4.1 ^b	12.9	19.2 ± 3.4 ^b	19.0	14.9 ± 2.7 ^b	24.5	15.6 ± 2.3 ^b
i-Butyric acid	10.1 ± 6.2 ^b	10.8	2.7 ± 0.5 ^{bce}	16.0	2.9 ± 0.6 ^{bce}	3.0	0.2 ± 0.1 ^{ce}
Butyric acid	16.1 ± 2.4 ^b	5.2	16.1 ± 2.8 ^b	20.1	12.6 ± 2.3 ^b	17.3	1.4 ± 0.2 ^{bce}
i-Valeric acid	5.2 ± 2.9 ^b	7.5	0.4 ± 0.2 ^c	8.4	0.5 ± 0.3 ^{ce}	6.0	0.8 ± 0.4 ^{ce}
Valeric acid	3.3 ± 2.4 ^b	4.7	0.3 ± 0.1 ^c	4.1	1.4 ± 0.2	0.6	0.2 ± 0.1 ^{bce}
Offspring							
Acetic acid			74.7 ± 2.8 ^{bcd}		76.8 ± 6.1 ^{cd}		82.7 ± 2.5 ^c
Propionic acid			20.7 ± 2.4 ^b		18.7 ± 4.9 ^b		14.1 ± 2.8 ^b
i-Butyric acid			0.1 ± 0.1 ^{bcd}		0.1 ± 0.0 ^{bcd}		0.3 ± 0.3 ^{ce}
Butyric acid			3.8 ± 0.5 ^{bcd}		2.5 ± 1.1 ^b		1.5 ± 0.4 ^{bce}
i-Valeric acid			0.5 ± 0.1 ^c		0.5 ± 0.1 ^c		1.0 ± 0.6 ^{ce}
Valeric acid			0.3 ± 0.1 ^c		1.3 ± 0.3		0.2 ± 0.1 ^{bce}

^aMean ± S.D.
^bSignificant difference from CV mice.
^cSignificant difference from humans.
^dSignificant difference from their mothers.

Table 8. (Continued).

	Sample D		Sample E		Sample F		CV mice
	Inoculum	HFA mice (n=5)	Inoculum	HFA mice (n=5)	Inoculum	HFA mice (n=5)	
HFA mice							
Acetic acid	41.9	61.4 ± 7.3 ^{bc}	57.6	65.7 ± 7.8 ^{bc}	50.5	71.7 ± 3.5 ^{bc}	79.6 ± 4.9 ^e
Propionic acid	19.4	19.1 ± 3.8 ^b	14.7	16.9 ± 4.6 ^b	18.3	23.7 ± 3.1 ^{bc}	18.1 ± 4.1 ^e
i-Butyric acid	16.3	1.9 ± 0.7 ^{bc}	12.3	3.0 ± 1.0 ^{bc}	2.2	0.1 ± 0.1 ^{bc}	0.3 ± 0.1 ^e
Butyric acid	13.2	16.1 ± 3.2 ^b	15.0	14.2 ± 3.9 ^b	15.7	3.0 ± 1.1 ^{bc}	8.8 ± 3.1 ^e
i-Valeric acid	3.6	1.3 ± 0.6 ^c	0.4	0.1 ± 0.1 ^c	5.0	0.6 ± 0.1 ^c	0.5 ± 0.1 ^e
Valeric acid	5.2	0.3 ± 0.0 ^c	0.0	0.1 ± 0.1 ^c	5.3	0.8 ± 0.4 ^c	0.8 ± 0.4 ^e
Offspring							
Acetic acid		78.3 ± 2.8 ^{cd}		73.8 ± 4.0 ^{bc}		78.8 ± 2.1 ^{cd}	
Propionic acid		18.2 ± 1.9 ^b		21.1 ± 2.5 ^b		16.9 ± 2.0 ^{bd}	
i-Butyric acid		0.3 ± 0.1 ^{bcd}		0.1 ± 0.0 ^{cd}		0.2 ± 0.1 ^c	
Butyric acid		2.3 ± 1.0 ^{cd}		3.6 ± 1.4 ^{bcd}		2.3 ± 0.3 ^{bc}	
i-Valeric acid		0.7 ± 0.3 ^e		1.1 ± 0.4 ^{cd}		0.4 ± 0.2 ^c	
Valeric acid		0.4 ± 0.1 ^e		0.2 ± 0.1 ^e		1.3 ± 0.1 ^e	

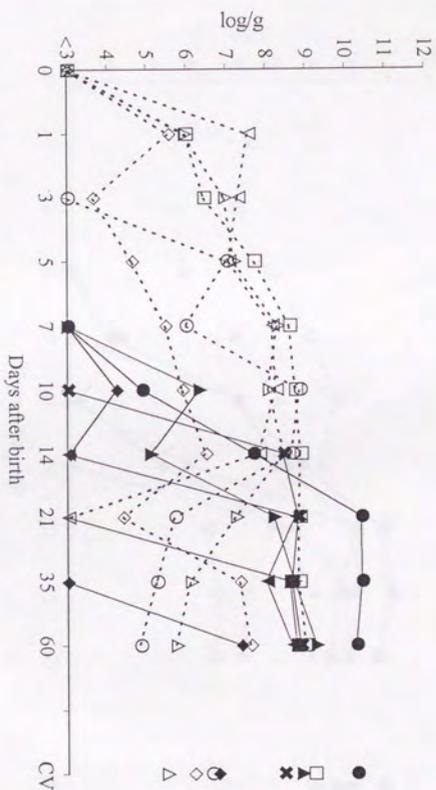


Fig. 1. Development of intestinal flora of CV mice.
 ●, bacteroidaceae; ▲, eubacteria; ◆, bifidobacteria; ■, clostridia; ✕, fusiform-shaped bacteria; ▼, anaerobic curved rods; ◆, lactobacilli; ○, enterobacteriaceae; △, streptococci; ◇, staphylococci; ▽, aerobic Gram negative rods; CV, mothers of CV mice.

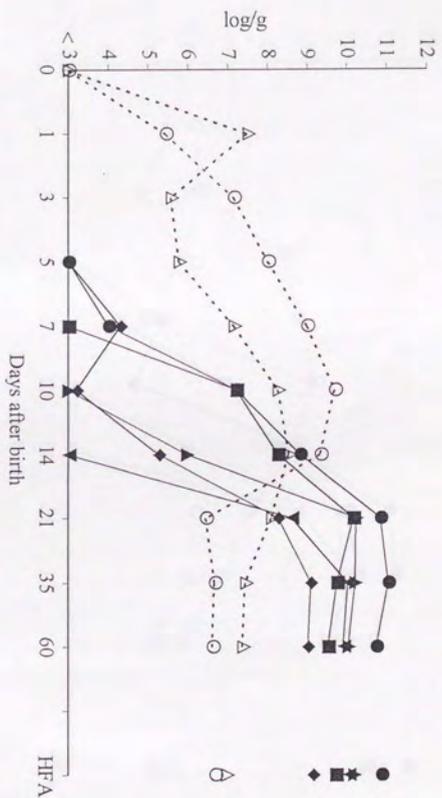


Fig. 2. Development of intestinal flora of HFA mice A.
 ●, bacteroidaceae; ▲, eubacteria; ◆, bifidobacteria; ■, clostridia; ▼, peptococcaceae; ○, enterobacteriaceae; △, streptococci; HFA, mothers of HFA mice A.

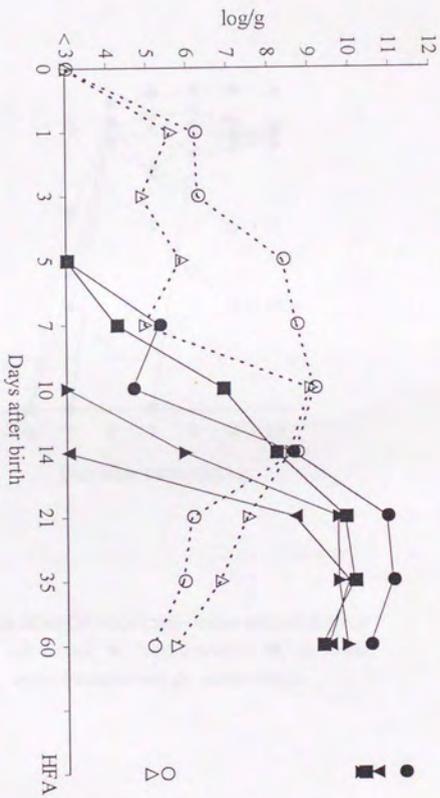


Fig. 3. Development of intestinal flora of HFA mice B.
 ●, bacteroidaceae; ▲, eubacteria; ■, clostridia; ▼, peptococcaceae; ○, enterobacteriaceae; Δ, streptococci HFA, mothers of HFA mice B.

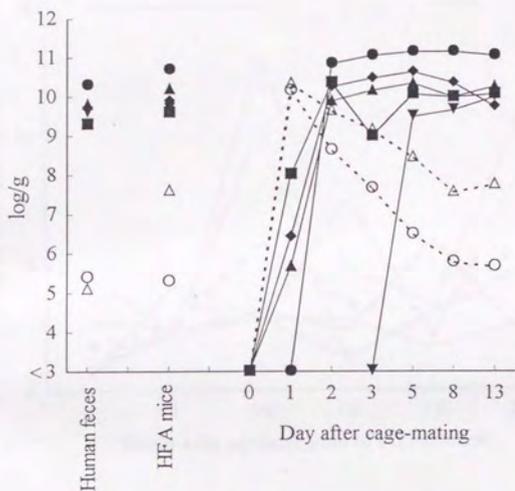


Fig. 4. Composition of fecal flora of ex-GF mice cage-mated with HFA mice.
 ●, bacteroidaceae; ▲, eubacteria; ◆, bifidobacteria; ■, clostridia;
 ▼, peptococcaceae; ○, enterobacteriaceae; △, streptococci.

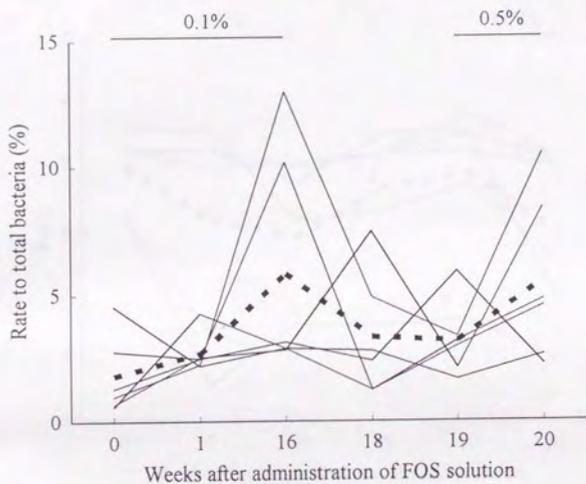


Fig. 5. Effect of administration of FOS solution on the rate of bifidobacteria to total bacteria.
 0.1%, administration of 0.1% FOS solution; 0.5%, administration of 0.5% FOS solution; ■ ■ , mean rate of bifidobacteria of 6 mice.

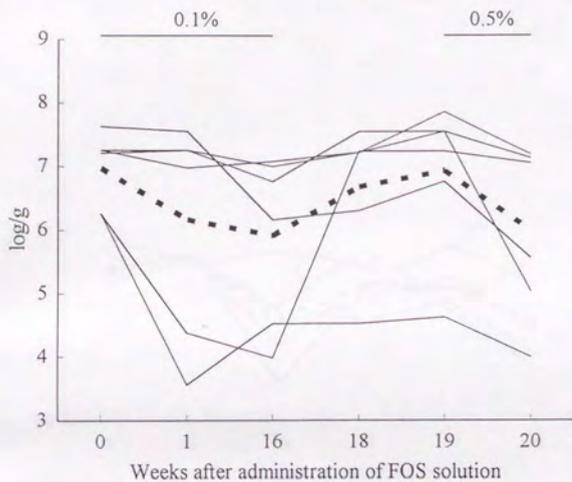


Fig 6. Effect of administration of FOS solution on the number of enterobacteriaceae. 0.1%, administration of 0.1% FOS solution; 0.5%, administration of 0.5% FOS solution; ■ ■ , mean rate of bifidobacteria of 6 mice.

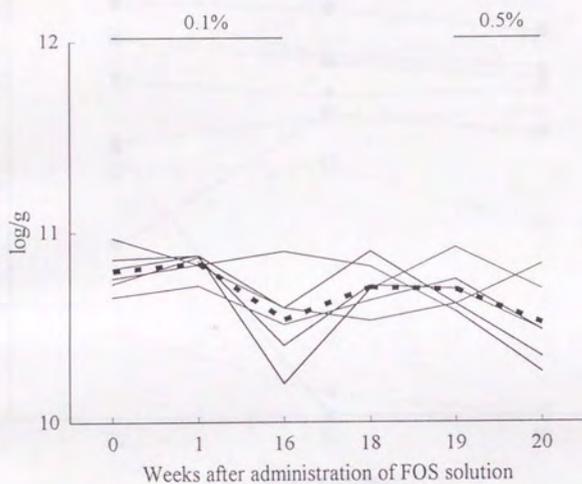


Fig. 7. Effect of administration of FOS solution on the number of bacteroidaceae.
 0.1%, administration of 0.1% FOS solution; 0.5%, administration of 0.5% FOS solution; ■ ■ , mean rate of bifidobacteria of 6 mice.

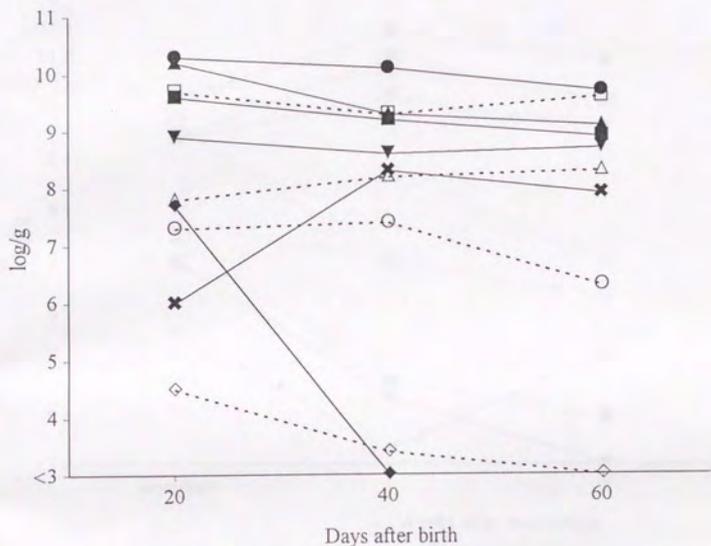


Fig. 8. Development of fecal flora of pigs.

- , bacteroidaceae; ▲, eubacteria; ■, clostridia; ◆, *C. perfringens*; ▼, peptococcaceae;
- ✕, veillonellaceae; □, lactobacilli; ○, enterobacteriaceae; △, streptococci;
- ◇, staphylococci.

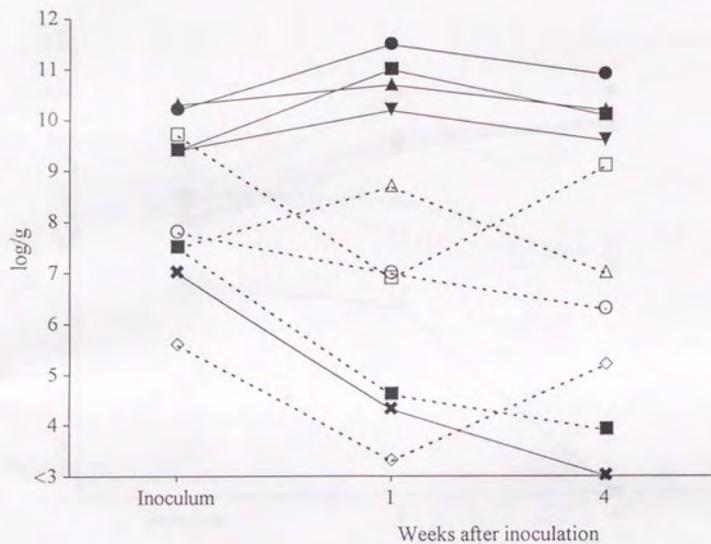


Fig. 9. Composition of fecal flora of PFA mice inoculated with feces from 20-day-old piglet.
 ●, bacteroidaceae; ▲, eubacteria; ■, clostridia; ◆, *C. perfringens*; ▼, peptococacaceae;
 ✕, veillonellaceae; □, lactobacilli; ○, enterobacteriaceae; △, streptococci;
 ◇, staphylococci.

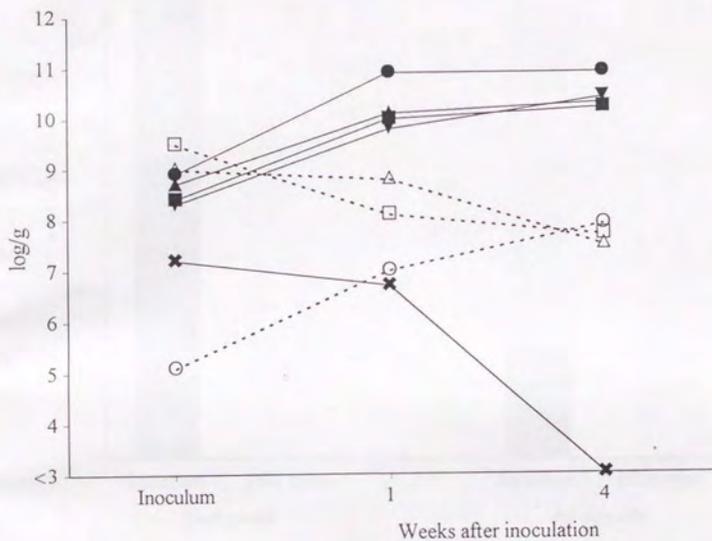


Fig. 10. Composition of fecal flora of PFA mice inoculated with feces from 60-day-old pig.
 ●, bacteroidaceae; ▲, eubacteria; ■, clostridia; ▼, peptococcaceae; ✕, veillonellaceae;
 □, lactobacilli; ○, enterobacteriaceae; △, streptococci.

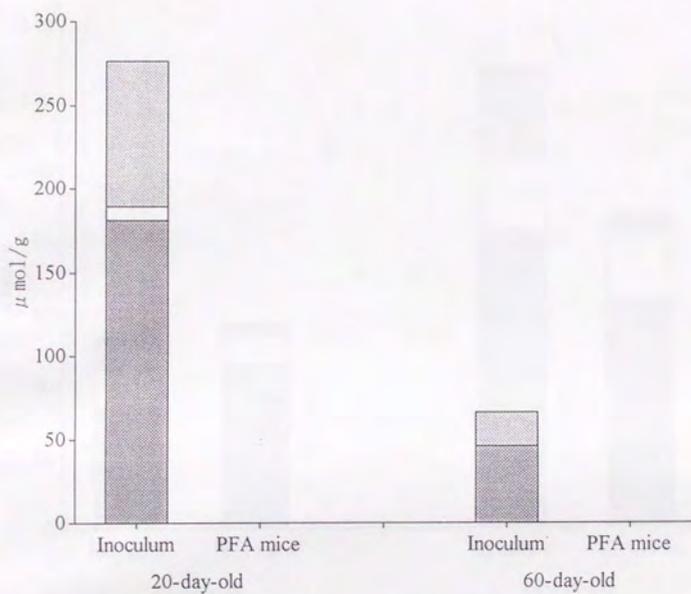


Fig. 11. Concentration of fecal putrefactive products of pigs and PFA mice.

■, skatol; □, indole; ▒, p-cresol; ●, phenol.

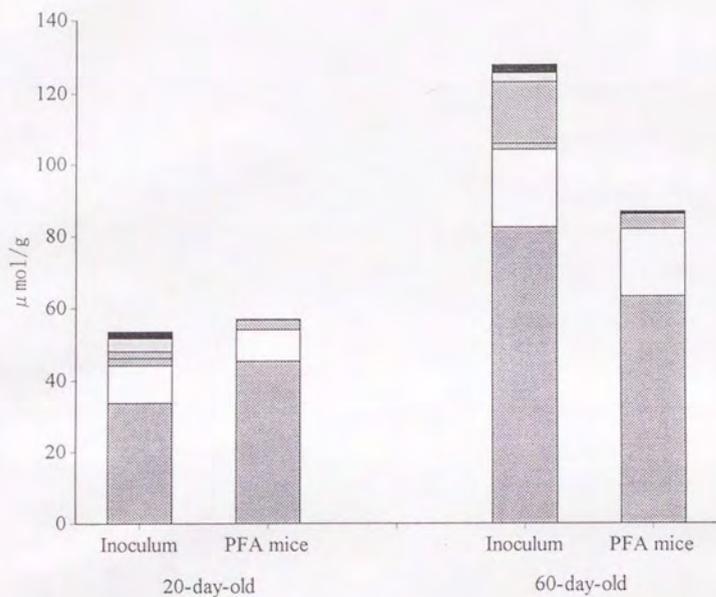
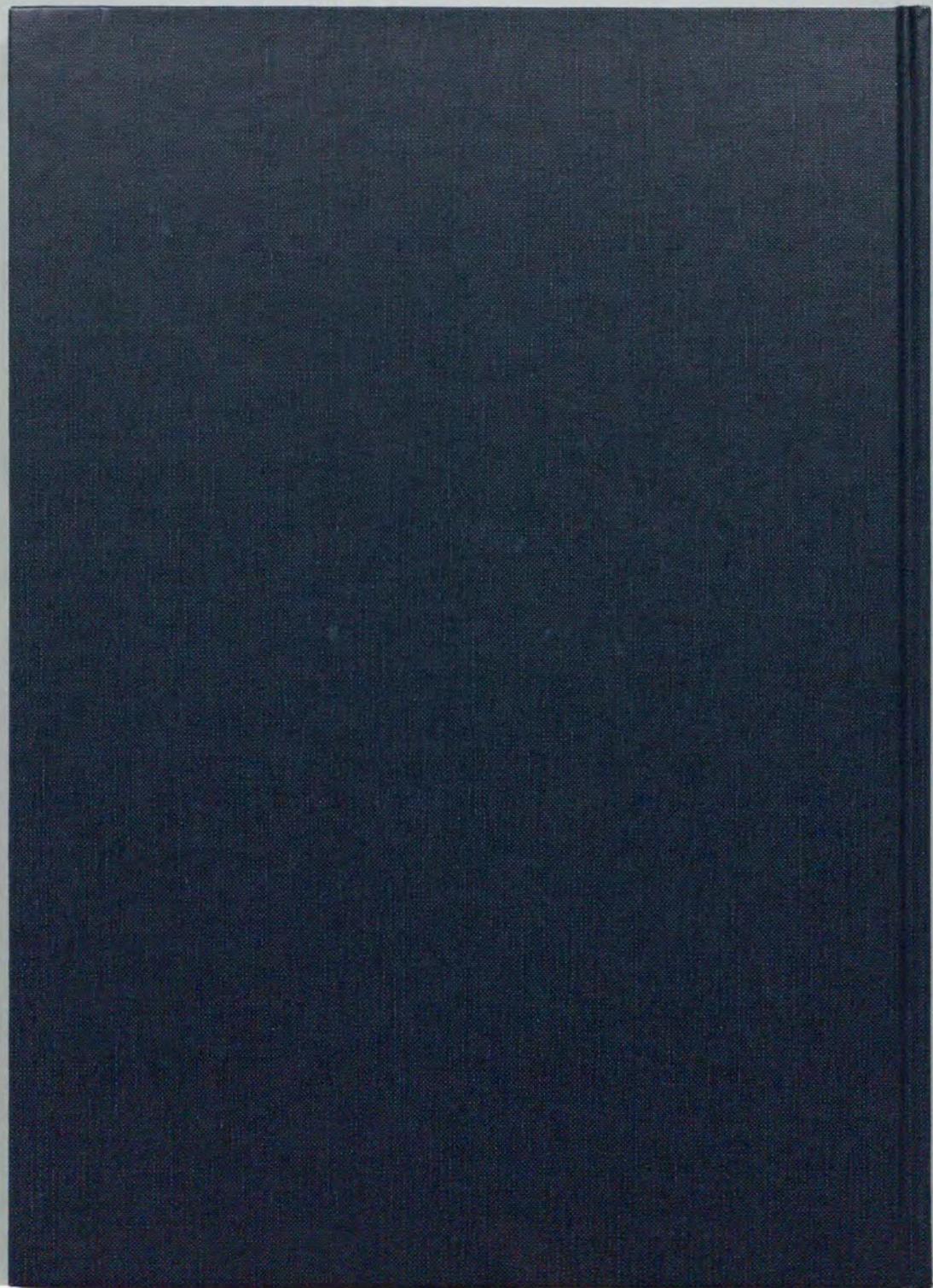
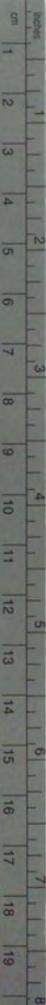


Fig. 12. Concentration of fecal SCFAs of pigs and PFA mice.

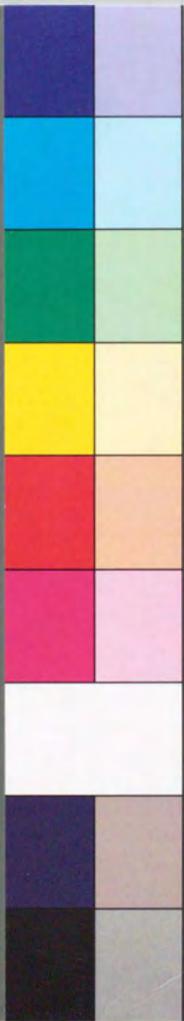
■, acetic acid ; ■, i-butyric acid ; □, i-valeric acid ;
 □, propionic acid ; ■, butyric acid ; ■, valeric acid .





Kodak Color Control Patches

Blue Cyan Green Yellow Red Magenta White 3/Color Black



Kodak Gray Scale

A 1 2 3 4 5 6 M 8 9 10 11 12 13 14 15 B 17 18 19



© Kodak, 2007 TM: Kodak