

令和 5 年 6 月 7 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2021～2022

課題番号：21K19176

研究課題名(和文)腸管を基軸とした幼若雛の健全育成を支えるニワトリ粘膜免疫学の創成

研究課題名(英文)Creation of avian mucosal immunology for healthy growth of young chicks based on the intestinal immune development

研究代表者

野地 智法 (NOCHI, TOMONORI)

東北大学・農学研究科・教授

研究者番号：10708001

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文): ニワトリの盲腸に多数発達するリンパ球集積(Cecal Patches: CP)の形態形成機序を明らかにすべく、粘膜免疫学および機能形態学的な研究を実施した。孵化前および孵化直後の盲腸にはCPの形成が全く認められなかったが、孵化2週間後では、B細胞およびT細胞が集積したCPの発達が確認された。このCPの形態形成はファブリキウス嚢に依存しており、事実、ファブリキウス嚢を除去したニワトリにおけるCPにはB細胞が消失していることが示された。また、CPに存在するB細胞およびT細胞の数は、抗生物質投与で著しく減少することが示され、CPの形態形成は腸内微生物に依存して促されることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ニワトリの健全育成を可能にすべく、雛の腸管に発達する免疫システムの形態形成機序を明らかにすることで、腸管の免疫機能強化を可能にするための分子・細胞標的の特定に迫ることができた。孵化直後の雛を感染症から予防するためにも、特に、幼若期の免疫機能形成に関するメカニズムの正しい理解は非常に重要であり、雛の発育に合わせ経時的に解析することを目的とした本研究の学術的意義は非常に高い。また、雛の腸管の免疫機能形成に関わる微生物の存在を特定できたことは、有用微生物を用いた免疫機能強化を可能にする戦略を見出す上でも非常に価値ある成果であり、家禽産業における社会的意義も非常に高い。

研究成果の概要(英文): To elucidate the mechanism by which numerous lymphoid follicles, called cecal patches (CP) develop in the cecum of chicks, immunological and morphological studies were conducted. No CP formation was observed in the cecum before and immediately after hatching; however, the development of CP containing B and T cells was sufficiently observed 2 weeks after hatching. The development of CP was dependent on the bursa of Fabricius since no B cells were accumulated in the CP when the bursa of Fabricius was surgically removed just after hatching. The number of B and T cells present in the CP was also shown to be significantly reduced by antibiotics treatment, indicating that CP morphogenesis is promoted in an intestinal microbiota-dependent manner.

研究分野：動物粘膜免疫学

キーワード：ニワトリ 粘膜免疫 腸管 盲腸 Cecal Patches

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

### 1. 研究開始当初の背景

ニワトリ（鶏）の免疫学に関する教科書には、骨髄で造血幹細胞から分化した B 細胞前駆細胞は、排泄腔近傍に存在するファブリキウス嚢で B 細胞へと分化し、その後、脾臓やパイエル板（回腸終末部）、盲腸扁桃（盲腸基部）といった免疫臓器で機能すると記載されている（Avian Immunology 2<sup>nd</sup> Edition）。一方で、我々は、広大な表面積を有する盲腸にも成熟した B 細胞が多数集積する濾胞構造が広範囲に発達していることを見出し、盲腸扁桃やパイエル板とは異なる、腸管に発達する新たな免疫臓器（Cecal patches: CP）の存在を明らかにしてきた。加えて、経時的に実施した形態学的解析を通して、CP は盲腸扁桃と同様に孵化後に形態形成されること、腸管の免疫機能に深く関わる IgA（免疫グロブリンのサブクラスの 1 つ）を産生する形質細胞への B 細胞からの最終分化が、盲腸扁桃やパイエル板以上に、CP で盛んに行われていることを見出し、既存の教科書には記載されていない、孵化後の鶏の腸管内で発達する CP を中心とした粘膜免疫システムの存在を提唱してきた。

### 2. 研究の目的

申請者は、家畜（ブタ）のパイエル板形成に関する形態学的／免疫学的研究にも精力的に挑戦しており、他の哺乳類と同様に（家禽とは異なり）、ブタの腸管内でパイエル板が発達する際の胎生期（出生前）特有の形態形成プログラムの重要性を示してきた。家畜および家禽の腸管免疫臓器の発達に関するこれらの研究成果は、形態形成時の外来刺激（例：微生物）に対する依存性が分類間で異なっていることを強く示唆するものであった。つまりは、CP を中心とした腸管内の免疫臓器が孵化後に形成される家禽の場合、盲腸内に定着する微生物の影響を強く受けている可能性が極めて高いと推測された。また、鶏腸管の免疫臓器の形態形成に関わる微生物種を同定することにより、①孵化直後の雛（初生雛）の CP／盲腸扁桃／パイエル板形成、②IgA 産生、③腸内の免疫・微生物環境の健全構築を可能にする、連鎖的機能向上型の新規雛用飼料としての応用開発の可能性も十分期待される。そこで、本挑戦的研究（萌芽）では、鶏腸管の免疫臓器（特に CP）の形態形成に関する機序解明、CP が有する免疫機能評価、CP の形態形成・機能成熟に影響を与える外来刺激の特定といった、基礎的かつ探索的課題から得られる学術知見を基盤としたニワトリ粘膜免疫学の学問創成が必要不可欠である。

### 3. 研究の方法

#### 〔課題 1〕 鶏腸管の免疫臓器の形態・機能変化を明らかにするための“組織学的”解析

**概要** 鶏腸管に発達する免疫臓器（パイエル板、盲腸扁桃、CP）における免疫担当細胞の集積時期を組織学的に解析することで、形態形成・機能成熟時期を明らかにする。

**方法** 孵化 1 週間前、直後、1, 2, 3 週間後の鶏（肉用鶏-Ross 308 / 卵用鶏-白色レグホン）より、回腸終末部、盲腸基部、盲腸を採材・固定し、薄切する。その後、組織切片を CD3、Bu-1 および MHC-II をマーカーとした免疫組織化学染色に供することで、腸管に

における各種免疫臓器の形態形成と、B 細胞、T 細胞、抗原提示細胞の局在変化を比較する。本課題を通して、鶏腸管における免疫臓器形成（＝腸管免疫の機能強化）に重要な時期を特定する。

#### [課題 2] 鶏腸管の免疫臓器の形成機序を明らかにするための“免疫学的”解析

**概要** 孵化前から形成されているファブリキウス嚢や脾臓とは異なり、鶏の腸管に発達する免疫臓器は孵化後に形態形成する。本課題では、孵化後のパイエル板、盲腸扁桃、CP の形態形成におけるファブリキウス嚢や脾臓の役割を解析することで、免疫臓器間の連関および免疫担当細胞の分化機序を明らかにする。

**方法** 初生雛のファブリキウス嚢、脾臓、もしくは双方を、全身麻酔下で外科的に摘出した。手術 3 週間後に、腸管の各種免疫臓器に存在する各種免疫担当細胞数をフローサイトメトリー解析により定量した。本課題を通して、鶏の腸管免疫臓器の形成に関わる免疫担当細胞の由来を特定した。

#### [課題 3] 鶏腸管の免疫臓器の形成を促す外来刺激を特定するための“微生物学的”解析

**概要** 鶏腸管の免疫臓器が孵化後に形態形成・機能成熟する事実は、その過程に関わる外来（例：微生物）刺激の存在を強く示唆するものであった。そこで、まず、孵化直後、孵化後 7, 14, 21, 50 日齢の盲腸内容物中の微生物叢をメタゲノム解析で、全細菌叢を Tuf の発現量をリアルタイム PCR 法でそれぞれ評価した。続いて、対照区に加えて孵化後の雛の腸内微生物環境を攪乱した試験区を作出し、腸管免疫臓器の形成に影響を与える微生物種の特定に迫った。

**方法** 初生雛に各種抗生物質を 3 週間投与する“攪乱区”を設け、形態学的／免疫学的手法を駆使した腸管免疫臓器形成に関する解析を実施する。また、各区の鶏の腸管免疫臓器内に発達する微生物叢を、メタゲノム解析により網羅的に分析する。

### 4. 研究成果

#### [課題 1] 鶏腸管の免疫臓器の形態・機能変化を明らかにするための“組織学的”解析

経時的な盲腸扁桃の組織学的・免疫学的解析を通じて、盲腸扁桃、パイエル板、盲腸（Cecal patches: CP）全ての腸管免疫臓器において、孵化前および孵化直後の時点では B 細胞の集積が認められなかった。盲腸扁桃やパイエル板では、1 週齢において成熟 B 細胞の集積が認められ、2 週齢時には B 細胞が多数集積した濾胞構造が複数観察された。一方で、CP では B 細胞の集積は、盲腸扁桃やパイエル板とは少し遅れた 2 週齢時に集積が開始し、その後 3 週齢時で濾胞構造の発達が確認できた。T 細胞については、いずれの免疫臓器においても B 細胞よりも先に集積することが確認でき、T 細胞が腸管に向けた B 細胞の細胞遊走に働きかけている可能性が強く示唆された。また、腸管粘膜面の IgA 産生細胞は、孵化後 2 週間後に出現し、その後は盲腸の濾胞構造の数の増加（日齢進行）とともに増加していくことが確認された。以上から、腸管の免疫臓器

では、孵化後に先ず T 細胞が原基に集積することで、続く B 細胞遊走が開始することが明らかになった。さらに、雛自身による腸管 IgA 産生は、腸管免疫臓器において濾胞が形成される 2 週齢以降に開始され、その後は CP の発達に伴って IgA の分泌量が増加していくことが示された。

## 【課題 2】 鶏腸管の免疫臓器の形成機序を明らかにするための“免疫学的”解析

盲腸扁桃や CP に存在するリンパ球、特に B 細胞および T 細胞の由来となる免疫臓器を特定するために、孵化直後の雛から全身麻酔下で脾臓、ファブリキウス嚢、およびその双方を外科的に切除した動物モデルを作出した。脾臓切除ニワトリ：SP(-)では、盲腸扁桃や CP の組織重量に変化は認められなかった一方で、ファブリキウス嚢切除ニワトリ：BF(-)および脾臓/ファブリキウス嚢切除ニワトリ：SP/BF(-)では盲腸扁桃や CP の重量の低下が確認できた。SP(-)、BF(-)および SP/BF(-)から採材した盲腸扁桃の組織構造を HE 染色によって観察したところ、全区で B 前駆細胞の集積によって形成される濾胞構造が発達していることが確認できた。一方で、CP の濾胞構造は、ファブリキウス嚢切除によって完全に消失した。次に、盲腸扁桃および Cecal patch における B 細胞と T 細胞の割合を FCM 解析で調べ、各臓器切除による影響を評価した。盲腸扁桃や CP 双方の臓器において、脾臓切除による B 細胞および T 細胞の数や割合に変化は認められなかった。一方で、HE 染色の結果に矛盾することなく、ファブリキウス嚢を切除した FB(-)および SP/FB(-)の盲腸扁桃において、擬似手術区と比較して減少はするものの一定数の B 細胞を検出することができた。しかしながら、CP では、ファブリキウス嚢切除によって、B 細胞の集団が完全に消失することが確認できた。以上の結果から、盲腸扁桃と CP の濾胞に存在する B 細胞の由来は大きく異なり、特に CP に存在する B 細胞はファブリキウス嚢に強く依存することが示された。

## 【課題 3】 鶏腸管の免疫臓器の形成を促す外来刺激を特定するための“微生物学的”解析

0, 7, 14, 21, 50 日齢の盲腸内容物中の微生物叢をメタゲノム解析で調べた結果、7 日齢において既に成長後 (50 日齢) と同等の細菌叢が形成されていることが確認できた。また、Tuf の発現量をリアルタイム PCR 法で定量することで全細菌数を評価した結果、盲腸内容物中の全細菌数は成長にともない持続的に増加し続けていることが確認できた。したがって、ニワトリ腸管免疫臓器の形態形成に関わる特定の微生物の定着は、孵化直後から開始していることが推察された。そこで、孵化直後から 3 週間、抗生剤を摂取し続けた鶏の各免疫臓器の機能を解析した結果、盲腸扁桃および CP の双方で B 細胞および各種 T 細胞サブセットの数の著しい低下が認められた。さらに、B 細胞数の低下のみならず、盲腸扁桃および CP の双方で、濾胞構造の数やサイズの低下が確認できた。抗生剤処理による腸管免疫臓器の機能低下にともない、腸管粘膜固有層に存在する IgA 産生細胞の数も有意に低下していることが確認できた。以上から、腸管での IgA 産生に働く盲腸扁桃および CP の濾胞構造の形成には、孵化後の腸管内に定着する特定の微生物の存在が不可欠であることが実証された。現在、抗生剤処理によって盲腸内容物中で減少した微生物種をメタゲノム解析によって検討している。

図 1、2：盲腸における B 細胞集積に関する経時的解析

図 1

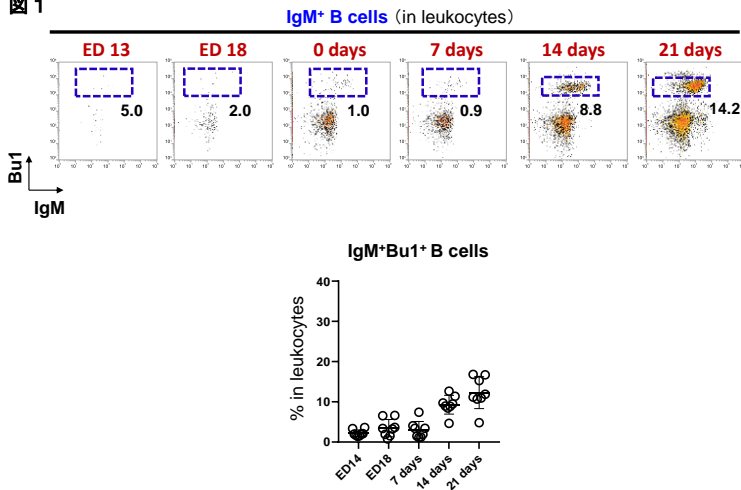


図 2

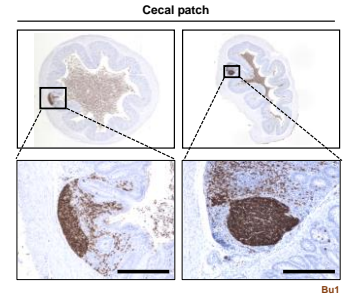


図 3、4：各種免疫臓器切除鶏の盲腸における B 細胞集積

図 3

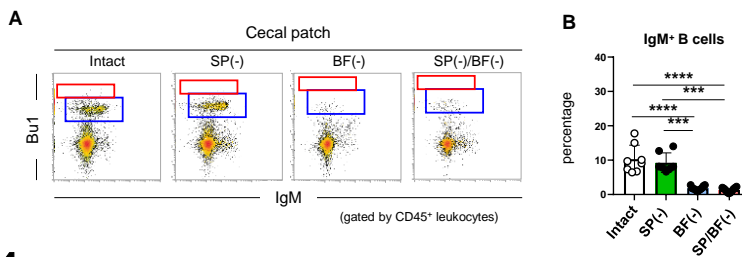
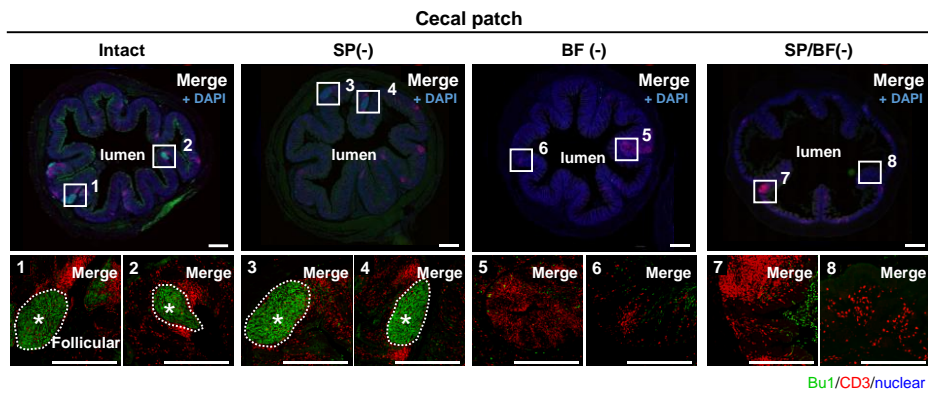


図 4



## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 8件）

1. 著者名 Islam Jahidul, Tanimizu Masae, Shimizu Yu, Goto Yoshiaki, Ohtani Natsuki, Sugiyama Kentaro, Tatezaki Eriko, Sato Masumi, Makino Eiji, Shimada Toru, Ueda Chise, Matsuo Ayumi, Suyama Yoshihisa, Sakai Yoshifumi, Furukawa Mutsumi, Usami Katsuki, Yoneyama Hiroshi, Aso Hisashi, Tanaka Hidekazu, Nochi Tomonori	4. 巻 10
2. 論文標題 Development of a rational framework for the therapeutic efficacy of fecal microbiota transplantation for calf diarrhea treatment	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Microbiome	6. 最初と最後の頁 31
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s40168-021-01217-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yamauchi Shinya, Furukawa Mutsumi, Kawahara Akio, Sugahara Tomohiro, Yamamoto Shuhei, Kitabayashi Masao, Sogabe Atsushi, Shimoda So, Hata Eiji, Watanabe Kouichi, Yoneyama Hiroshi, Aso Hisashi, Nochi Tomonori	4. 巻 38
2. 論文標題 Roles of mannosylerythritol lipid-B components in antimicrobial activity against bovine mastitis-causing Staphylococcus aureus	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 World Journal of Microbiology and Biotechnology	6. 最初と最後の頁 54
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11274-022-03243-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Lu Lu, Kuroishi Toshinobu, Tanaka Yukinori, Furukawa Mutsumi, Nochi Tomonori, Sugawara Shunji	4. 巻 12
2. 論文標題 Differential expression of CD11c defines two types of tissue-resident macrophages with different origins in steady-state salivary glands	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 931
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-022-04941-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Usami Katsuki, Niimi Kanae, Matsuo Ayumi, Suyama Yoshihisa, Sakai Yoshifumi, Sato sintaro, Fujihashi Kohtaro, Kiyono Hiroshi, Uchino Saeka, Furukawa Mutsumi, Islam Jahidul, Ito Kaori, Moriya Taiki, Kusumoto Yutaka, Tomura Michio, Hovey Russell C., Sugawara Junichi, Yoneyama Hiroshi, Kitzawa Haruki, Watanabe Kouichi, Aso Hisashi, Nochi Tomonori	4. 巻 36
2. 論文標題 The gut microbiota induces Peyer's patch-dependent secretion of maternal IgA into milk	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 109655 ~ 109655
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2021.109655	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Suzuki Yutaka, Chiba Sachi, Nishihara Koki, Nakajima Keiichi, Hagino Akihiko, Kim Won-Seob, Lee Hong-Gu, Nochi Tomonori, Suzuki Toru, Roh Sang-Gun	4. 巻 11
2. 論文標題 Chemerin Regulates Epithelial Barrier Function of Mammary Glands in Dairy Cows	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Animals	6. 最初と最後の頁 3194 ~ 3194
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ani11113194	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Islam Jahidul, Agista Afifah Zahra, Watanabe Kouichi, Nochi Tomonori, Aso Hisashi, Ohsaki Yusuke, Koseki Takuya, Komai Michio, Shirakawa Hitoshi	4. 巻 99
2. 論文標題 Fermented rice bran supplementation attenuates chronic colitis-associated extraintestinal manifestations in female C57BL/6N mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The Journal of Nutritional Biochemistry	6. 最初と最後の頁 108855 ~ 108855
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jnutbio.2021.108855	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Agista Afifah Zahra, Rusbana Tubagus Bahtiar, Islam Jahidul, Ohsaki Yusuke, Sultana Halima, Hirakawa Ryota, Watanabe Kouichi, Nochi Tomonori, Ardiansyah, Budijanto Slamet, Yang Suh-Ching, Koseki Takuya, Aso Hisashi, Komai Michio, Shirakawa Hitoshi	4. 巻 13
2. 論文標題 Fermented Rice Bran Supplementation Prevents the Development of Intestinal Fibrosis Due to DSS-Induced Inflammation in Mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nutrients	6. 最初と最後の頁 1869 ~ 1869
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/nu13061869	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Indo Yuhki, Kitahara Shugo, Tomokiyo Mikado, Araki Shota, Islam Md. Aminul, Zhou Binghui, Albarracin Leonardo, Miyazaki Ayako, Ikeda-Ohtsubo Wakako, Nochi Tomonori, Takenouchi Takato, Uenishi Hirohide, Aso Hisashi, Takahashi Hideki, Kurata Shoichiro, Villena Julio, Kitazawa Haruki	4. 巻 12
2. 論文標題 Ligilactobacillus salivarius Strains Isolated From the Porcine Gut Modulate Innate Immune Responses in Epithelial Cells and Improve Protection Against Intestinal Viral-Bacterial Superinfection	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 652923
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fimmu.2021.652923	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 大谷夏輝、杉山顕太郎、五島可祥、清水優、田中秀和、Jahidul Islam、野地智法
2. 発表標題 子牛難治性下痢症に対する糞便微生物移植（FMT）治療効果に寄与する因子の探索
3. 学会等名 家畜感染症学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山内清哉、川原顕生、菅原知宏、山本周平、北林雅夫、曾我部敦、秦英司、麻生久、米山裕、古川睦実、野地智法
2. 発表標題 MEL-Bの構成因子に着目した黄色ブドウ球菌の抗菌活性に関する作用機序解明
3. 学会等名 家畜感染症学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 桂哲平、遠藤佑真、庄涛、浦川めぐみ、吉村梢、高梨暁、林智人、菊佳男、長澤裕哉、浅野貴史、佐沢公子、横井允雄、吉田岳、中村武彦、上本吉伸、野地智法、麻生久
2. 発表標題 ホルスタイン種において乳汁中のIgAおよびIgM濃度の遺伝率は高い
3. 学会等名 日本乳房炎研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 平川良太、久松基史、古川睦実、佐藤幹、野地智法
2. 発表標題 ニワトリ腸管に発達する免疫臓器の機能解明に資する組織学的研究
3. 学会等名 日本家禽学会2021年度秋季大会
4. 発表年 2021年



1. 発表者名 伊東加織、内野紗江佳、宇佐美克紀、古川睦実、松本敬、南野昌信、麻生久、野地智法
2. 発表標題 乳汁IgAの産生制御因子としてのPolymeric immunoglobulin Receptor (PigR) の機構解明 M
3. 学会等名 第129回日本畜産学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 勅使河原杏莉、古川睦実、野地智法
2. 発表標題 3D可視化技術を用いた幼若期のパイエル板の形態学的解析
3. 学会等名 第70回東北畜産学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 内野紗江佳、宇佐美克紀、新貴香奈枝、古川睦実、野地智法
2. 発表標題 乳汁IgAが有する腸内微生物に対する特異性評価
3. 学会等名 第70回東北畜産学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 野地智法
2. 発表標題 X連鎖重症複合免疫不全症に対する胎生期治療の有用性 ~ 医療用免疫不全ブタを用いた動物モデル研究から見てきたこと ~
3. 学会等名 第12回関東甲越免疫不全症研究会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 野地智法
2. 発表標題 家畜の生産性向上を目指した粘膜免疫学研究の最前線
3. 学会等名 第156回鹿児島県家畜臨床研究会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 野地智法
2. 発表標題 腸内細菌が宿主免疫系に与える影響 ～腸内微生物－パイエル板－乳腺経路の発見～
3. 学会等名 第55回日本無菌生物ノートバイオロジー学会（招待講演）
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 乳汁中のIgA抗体含有量の増加剤	発明者 野地智法、宇佐美克紀、麻生久、清野宏、藤橋浩太郎、佐	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2021/30571	出願年 2021年	国内・外国の別 外国

〔取得〕 計0件

〔その他〕

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	イスラム ジャヒドゥル  (Islam Jahidul)  (20805569)	東北大学・農学研究科・特任助教   (11301)	
研究分担者	佐藤 幹  (Sato Kan)  (20250730)	東北大学・農学研究科・教授   (11301)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	喜久里 基  (Kikusato Motoi)  (90613042)	東北大学・農学研究科・准教授    (11301)	
研究分担者	陶山 佳久  (Suyama Yoshihisa)  (60282315)	東北大学・農学研究科・教授    (11301)	
研究分担者	松尾 歩  (Matsuo Ayumi)  (90868754)	東北大学・農学研究科・助教    (11301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関