

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月 9日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2009～2011

課題番号：21380164

研究課題名（和文） 家畜腸管パイエル板モデル培養系によるイムノバイオティック機構の解明とその応用戦略

研究課題名（英文） Basic and applied studies on immunobiotics by using intestinal peyer's patch model system of live stock animals

研究代表者

北澤 春樹 (KITAZAWA HARUKI)

東北大学・大学院農学研究科・准教授

研究者番号：10204885

研究成果の概要（和文）：

本研究は、世界に先駆けて樹立した家畜腸管上皮細胞株を用い、家畜対応型の的確なイムノバイオティクス選抜評価系の構築を進め、その実用性を検討した。その結果、ブタおよびウシ対応型の抗炎症性や抗ウイルス免疫性のイムノバイオティック評価系が確立でき、ブタにおけるインビボ試験により、その有用性が検証できた。本研究成果は、薬剤に頼らない家畜の健全育成技術の向上と関連産業の飛躍的発展に大きく貢献する。

研究成果の概要（英文）：

In this study, advanced immunobiotic assay systems for anti-inflammatory and anti-viral immunity was successfully developed by using originally established intestinal epithelial cells from live stock animals. The utility of these assay systems was verified by in vivo trial of selected immunobiotic candidate by these assay system in swine. This study may contribute to develop a safer technique without any drugs for livestock production.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	7,400,000	2,220,000	9,620,000
2010年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
2011年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
年度			
年度			
総計	15,100,000	4,530,000	19,630,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・草地学

キーワード：イムノバイオティクス、家畜、ブタ、ウシ、免疫、腸管上皮、腸管パイエル板、飼料

1. 研究開始当初の背景

食資源として極めて重要な家畜は、幼若期に毒素原性大腸菌、ロタウイルスおよび原虫の単独あるいは混合感染により、腸管感染性下痢症に罹患し慢性炎症が誘導され易く、その予防と成長促進のために抗菌剤の大量使用を余儀なくされ、結果として健

康危害に対する不安が増大した。

2006年1月に、ヨーロッパ連合(EU)では、食の安全性確保から、成長促進目的の抗菌剤使用が全面禁止となったが、一方で治療用抗菌剤の使用増加を招き、新たな健康危害リスクの増大が懸念されている。

我が国でも、家畜への抗菌剤使用軽減の気運が高まり、その規制の本格化が予想されることから、薬剤に頼らず、腸管感染性下痢の発症を予防する、有効かつ確な畜産食品生産技術の開発が急務の課題となっている。

現在、家畜の腸管免疫能を高め、抗菌剤使用を軽減するイムノバイオティクスなどの代替生菌剤の開発が期待されているが、その有効性評価は、家畜に対応した的確なインビトロ評価系がないため、インビボ試験に依存し、選抜から実証試験に費やされる時間とコストは膨大である。

2. 研究の目的

本研究は、食経験豊富な腸管免疫活性型乳酸菌「イムノバイオティクス」(2003年にプロバイオティクスの中で腸管免疫調節作用を発揮するものとして提唱された)による、薬剤に頼らない家畜の下痢症予防の実現に向け、世界に先駆けて樹立した家畜腸管上皮細胞株を用い、家畜に対応した的確なイムノバイオティクス選抜評価系の構築を実現させ、抗菌剤非依存型の畜産食品生産技術の飛躍的發展に貢献する。

3. 研究の方法

- (1) 家畜腸管上皮細胞におけるパターン認識受容体 (PRR) の発現解析
- (2) 家畜腸管上皮細胞における dsRNA 刺激による炎症応答解析と免疫パラメータの設定
- (3) 家畜腸管上皮細胞からの M 細胞誘導
- (4) ブタ腸管上皮 (PIE) 細胞と腸管パイエル板免疫担当細胞の共培養システム構築
- (5) 共培養系におけるイムノバイオティクス
- (6) イムノバイオティック機構の解析
- (7) PIE 細胞およびウシ腸管上皮 (BIE) 細胞における抗炎症機構の解析
- (8) 共培養系におけるイムノバイオティック機構の解析
- (9) イムノバイオティック評価システムの有用性検証

4. 研究成果

(1) ブタ腸管上皮 (PIE) およびウシ腸管上皮 (BIE) 細胞におけるパターン認識受容体 (PRR) の発現を解析し、ロタウイルス (RV) および毒素原性大腸菌 (ETEC) の認識性に関連する Toll 様受容体 3 および 4 の顕著な発現が遺伝子およびタンパクレベルで認められた (図 1)。

(2) dsRNA リガンド刺激による PIE 細胞からの炎症性サイトカイン発現について定量的リアルタイム PCR 法で解析し、評価系構築のための免疫応答

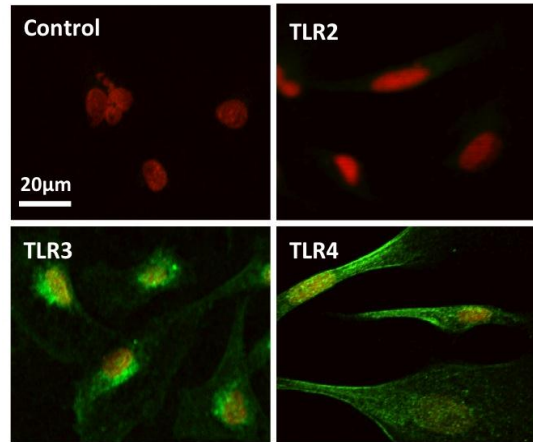


図 1 BIE 細胞における TLR のタンパク発現

答パラメータの候補を選定した。また、ETEC 刺激による BIE 細胞における免疫応答パラメータについても設定した。設定した免疫パラメータを基礎として、BIE 細胞や PIE 細胞を用いたイムノバイオティクスの抗ウイルス性免疫評価系を構築した (図 2)。

(3) PIE 細胞からの M 細胞分化誘導を、トランスウェルを用いた蛍光ビーズの通過を指標として試みたが、その誘導は困難であった。一方、BIE 細胞から M 細胞を分化誘導することができた。

(4) インターセル内で PIE 細胞を単層培養後、ブタ腸管パイエル板免疫担当細胞の培養ウェル上に移し、インターセルを介した共培養を構築した。

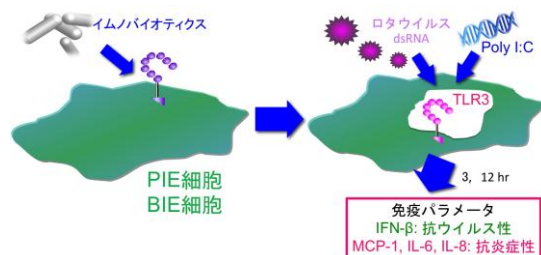


図 2 家畜腸管上皮細胞によるイムノバイオティクスの抗ウイルス性免疫評価系

(5) 上皮細胞側をイムノバイオティクスで刺激後、ETEC で刺激することで、PIE 細胞および免疫担当細胞からの炎症性および調節性サイトカイン発現を指標として、共培養系における抗炎症性評価が可能となった。

(6) PIE 細胞および BIE 細胞における、イム

ノバイオティクスの抗炎症機構について、TLR 上流と下流のシグナル調節性が示唆された。

(7) PIE 細胞およびBIE 細胞を選抜イムノバイオティクスで刺激し、ETEC で刺激後の抗炎症性発現機構について、遺伝子およびタンパクの両面より解析した。その結果、パターン認識受容体の発現には影響せず、細胞内のシグナル調節因子の発現および修飾制御により、抗炎症性を発揮することが明らかとなった。

(8) PIE 細胞と腸管パイエル板免疫担当細胞との共培養システムを用いて、ETEC 刺激に対する抗炎症機構について解析した結果、PIE 細胞における抗炎症性ととも、免疫担当細胞における免疫制御が認められ、両細胞間のサイトカインクロストークが解析できた。

(9) 選抜イムノバイオティクスのブタインビオ試験を行い、抗炎症効果や免疫機能の増強等が認められた。以上の結果から、家畜対応型のイムノバイオティック評価系の有用性が検証でき、詳細な機構解明が飛躍的に進むものと期待された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計15件)

- ① Hosoya, S., J. Villena, E. Chiba, T. Shimazu, Y. Suda, H. Aso, T. Saito, H. Kitazawa, Advanced application of porcine intestinal epithelial cells for the selection of immunobiotics modulating toll-like receptor 3-mediated inflammation. *J. Microbiol. Immunol. Infect.*, 査読有, (2012) in press.
- ② Chiba, E., J. Villena, S. Hosoya, N. Takanashi, T. Shimazu, H. Aso, M. Tohno, Y. Suda, Y. Kawai, T. Saito, K. Miyazawa, F. He, H. Kitazawa. A newly established bovine intestinal epithelial cell line is effective for in vitro screening of potential antiviral immunobiotic microorganisms for cattle. *Res. Vet. Sci.*, 査読有, (2012) in press.
- ③ Shimazu, T., J. Villena, M. Tohno, H. Fujie, S. Hosoya, T. Shimosato, H. Aso, Y. Suda, Y. Kawai, T. Saito, S. Makino, S. Ikegami, H. Itoh, H. Kitazawa, Immunobiotic *Lactobacillus jensenii* elicit anti-inflammatory activity in porcine intestinal epithelial cells by modulating negative regulators of the toll-like receptor signaling pathway. *Infect. Immun.*, 査読有, 80, 276-288 (2012).
- ④ Hosoya, S., J. Villena, T. Shimazu, M. Tohno, H. Fujie, E. Chiba, T. Shimosato, H. Aso, Y. Suda, Y. Kawai, T. Saito, S. Alvarez, S. Ikegami, H. Itoh, H. Kitazawa, Immunobiotic lactic acid bacteria beneficially regulate immune response triggered by poly(I:C) in porcine intestinal epithelial cells. *Vet. Res.*, 査読有, 42(111), 1-13 (2011).
- ⑤ Fujie, H., J. Villena, M. Tohno, K. Morie, T. Shimazu, H. Aso, Y. Suda, T. Shimosato, N. Iwabuchi, J.Z. Xiao, T. Yaeshima, K. Iwatsuki, T. Saito, M. Numasaki, H. Kitazawa, Toll-like receptor-2 activating bifidobacteria strains differentially regulate inflammatory cytokines in porcine intestinal epithelial cell culture system: finding new anti-inflammatory immunobiotics. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 査読有, 63, 129-139 (2011).
- ⑥ Tohno, M., T. Shimosato, H. Aso, H. Kitazawa, Immunobiotic *Lactobacillus* strains augment NLRP3 expression in newborn and adult porcine gut-associated lymphoid tissues. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 査読有, 144, 410-416 (2011).
- ⑦ Ueda, W., M. Tohno, T. Shimazu, H. Fujie, H. Aso, Y. Kawai, M. Numasaki, T. Saito, H. Kitazawa, Molecular cloning, tissue expression, and subcellular localization of porcine peptidoglycan recognition proteins 3 and 4. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 査読有, 143, 148-154 (2011).
- ⑧ 北澤、豚腸内感染症を制御するイムノバイオティクスおよびイムノジェニクスの探索. *動物疾病と腸内細菌シリーズ 第6回*, 査読無, pp1-5 (2011).
- ⑨ Hondo, T., T. Kanaya, I. Takakura, H. Watanabe, Y. Takahashi, Y. Nagasawa, S. Terada, S. Ohwada, K. Watanabe, H. Kitazawa, M. Rose, T. Yamaguchi, H. Aso, Cytokeratin 18 is a specific marker of bovine intestinal microfold (M) cell. *Am. J. Physiol-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 査読有, 300, G442-G453 (2011).

- ⑩ 北澤、須田、麻生、安全な持続的家畜生産のためのイムノバイオティック革命、日本家畜臨床感染症研究会誌、査読有、5、79-83 (2010).
- ⑪ Kitazawa, H., M. Tohno, T. Shimosato, Y. Suda and H. Aso, Development of Immunobiotic Evaluation System for Functional Foods and Feeds. *Proceedings of the 14th AAAP Animal Science Congress, Pingtung, Taiwan, ROC, Aug. 23-27., Vol.1 Plenary Sessions*, 査読無, 524-529 (2010).
- ⑫ Miyazawa K., T. Hondo, T. Kanaya, S. Tanaka, I. Takakura, W. Itani, M. T. Rose, H. Kitazawa, T. Yamaguchi, H. Aso, Characterization of newly established bovine intestinal epithelial cell line. *Histochem. Cell Biol.*, 査読有 133, 125-134 (2010).
- ⑬ Sato, K., K. Takahashi, M. Tohno, Y. Miura, S. Ikegami, H. Kitazawa, Immunomodulation in gut-associated lymphoid tissue of neonatal chicks by immunobiotic diets. *Poultry Sci.*, 査読有, 88, 2532-2538 (2009).
- ⑭ Shimosato, T., M. Tohno, T. Sato, J. Nishimura, Y. Kawai, T. Saito, H. Kitazawa, Identification of a potent immunostimulatory oligodeoxynucleotide from the *Streptococcus thermophilus* lacZ, 査読有, *Anim. Sci. J.*, 80, 597-604 (2009).
- ⑮ 遠野、北澤、パターン認識受容体を介するイムノバイオティックスの腸管免疫調節機構、*栄養生理研究会報*、査読有、53、19-33 (2009) .
- [学会発表] (計23件)
- ① 高梨、麻生、須田、川井、齋藤、北澤ら、ウシ対応型イムノバイオティックスの腸管炎症調節機構、日本畜産学会第115回大会、名古屋、2012年3月28-30日.
- ② 千葉、麻生、川井、齋藤、北澤ら、ブタ対応型イムノバイオティックスの腸管モデル共培養系による抗ウイルス性免疫評価、日本畜産学会第115回大会、名古屋、2012年3月28-30日 (優秀発表賞受賞) .
- ③ 北澤、抗菌剤に頼らない「イムノバイオティック飼料添加物」の開発戦略、シンポジウム「家畜衛生等技術のこれから～民間の力を生かして～」、名古屋、2011年12月19日 (招待) .
- ④ 村田、川井、齋藤、北澤ら、ウシ腸管上皮(BIE)細胞による抗炎症性イムノバイオティックスの選抜・評価、日本食品免疫学会第7回学術大会、東京、2011年10月18-19日.
- ⑤ 千葉、川井、齋藤、北澤ら、ウシ腸管上皮細胞によるイムノバイオティックスの抗ウイルス性免疫評価、日本食品免疫学会第7回学術大会、東京、2011年10月18-19日 (優秀ポスター賞受賞) .
- ⑥ 村田、麻生、川井、齋藤、北澤ら、ウシ対応型の抗炎症性イムノバイオティックスの選抜・評価、日本畜産学会第114回大会、十和田、2011年8月26-27日.
- ⑦ 千葉、麻生、川井、齋藤、北澤ら、ウシ腸管上皮細胞による抗ウイルス性イムノバイオティックスの評価系構築、日本畜産学会第114回大会、十和田、2011年8月26-27日.
- ⑧ 遠野、麻生、北澤ら、腸管免疫系におけるイムノバイオティック乳酸菌によるNLRP3受容体の発現増強、日本畜産学会第114回大会、十和田、2011年8月26-27日.
- ⑨ Fujie, H., H. Aso, Y. Suda, Y. Kawai, T. Saito, H. Kitazawa *et al.*, Toll-like receptor-2 activating Bifidobacteria strains regulate inflammatory response in porcine intestinal epithelial cells, FEMS2011, ジュネーブ、スイス、2011年6月26-30日.
- ⑩ Tohno, M., H. Aso, H. Kitazawa *et al.*, Toll-like receptor 4 recognizes extracellular polysaccharide from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, FEMS2011, ジュネーブ、スイス、2011年6月26-30日.
- ⑪ 北澤、安全な持続的家畜生産のためのイムノバイオティック革命、第5回日本家畜臨床感染症研究会総会・学術集会、東京、2010年12月10-11日 (招待) .
- ⑫ 北澤、腸管免疫能を強化するイムノバイオティック飼料添加物の開発、シンポジウム”飼料添加物をめぐる最新動向”、東京、2010年12月8日 (招待) .
- ⑬ Kitazawa, H., H. Aso *et al.*, Development of Immunobiotic Evaluation System for Functional Foods and Feeds, The 14th Animal Science Congress of the Asian-Australasian Association of Animal Production Science, Pingtung, Taiwan, 2010年8月23-27日 (Invited).
- ⑭ Suda, Y., J. Villena, H. Kitazawa *et al.*, Immunobiotics as antimicrobial alternatives increase productivity in swine, The 14th Animal Science Congress of the Asian-Australasian Association of Animal Production Science, Pingtung, Taiwan, 2010年8月23-27日.
- ⑮ Kitazawa, H. H. Aso *et al.* Evaluation

of anti-inflammatory immunobiotics in porcine intestinal epithelial cells, International Scientific Conference on Probiotics and Prebiotics-IPC2010, コシチェ、スロバキア, 2010年6月14～18日.

- ⑩ Suda, Y., J. Villena, H. Aso, H. Kitazawa *et al.*, Effect of immunobiotics on the immune performance and productivity of pigs. International Scientific Conference on Probiotics and Prebiotics-IPC2010, コシチェ、スロバキア, 2010年6月14日～6月18日.
- ⑪ 細矢、麻生、川井、齋藤、北澤ら、腸管上皮細胞による抗ウイルス性イムノバイオティクスの選抜・評価、日本食品免疫学会 第6回学術大会、東京、2010年6月1～2日.
- ⑫ 細矢、北澤ら、PIE細胞による抗ウイルス性イムノバイオティクスの評価系構築、日本畜産学会第112回大会、東京、2010年3月28～30日.
- ⑬ 高梨、北澤ら、ウシ対応型の抗炎症性イムノバイオティック評価、日本畜産学会第112回大会、東京、2010年3月28～30日.
- ⑭ 北澤、下里、イムノジェニクスとしてのオリゴスクレオチド構造と免疫機能性、日本食品免疫学会第3回シンポジウム、東京、2010年1月18日(招待).
- ⑮ 細矢、北澤ら、ブタ腸管上皮(PIE)細胞株によるイムノバイオティック飼料素材の抗炎症性評価、日本畜産学会第111回大会、那覇、2009年9月28～29日.
- ⑯ 高梨、北澤ら、ウシ腸管上皮(BIE)細胞株によるイムノバイオティック評価系構築、日本畜産学会第111回大会、那覇、2009年9月28～29日.
- ⑰ Shimazu, T., H. Kitazawa *et al.*, Regulation of inflammatory response by immunobiotics in swine intestinal epithelial cells via MKP-1, The 9th World Congress on Inflammation, Tokyo, 2009年7月6～10日.

[図書] (計4件)

- ① Villena, J., H. Aso, S. Alvarez, H. Kitazawa, Probiotics: Sources, Types and Health Benefits. Nova Science Publishers, Inc. (2012) in press.
- ② 北澤、食品免疫・アレルギーの事典(分担)、日本食品免疫学会編、朝倉書店 pp416-426 (2011).
- ③ 遠野、北澤、乳酸菌とビフィズス菌のサイエンス(分担)(日本乳酸菌学会編)、

京都大学学術出版会、 pp353-360 (2010).

- ④ Alvarez, S., J. Villena, M. Tohno, S. Salva, H. Kitazawa, Modulation of innate immunity by lactic acid bacteria: impact on host response to infections. *Curr. Res. in Immunology*, 3, 87-126 (2009).

[産業財産権]

○出願状況(計1件)

名称: 腸管免疫の抑制剤のスクリーニング方法

発明者: 北澤ら

権利者: (株)明治、東北大学

種類: 特願

番号: 2010-124889

出願年月日: 2010年5月31日

国内外の別: 国内、国外

○取得状況(計0件)

[その他]

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

北澤 春樹 (KITAZAWA HARUKI)

東北大学・大学院農学研究科・准教授

研究者番号: 10204885

(2) 研究分担者

齋藤 忠夫 (SAITO TADAO)

東北大学・大学院農学研究科・教授

研究者番号: 00118358

麻生 久 (ASO HISASHI)

東北大学・大学院農学研究科・教授

研究者番号: 50241625

川井 泰 (KAWAI YASUSHI)

東北大学・大学院農学研究科・助教

研究者番号: 00261496

(3) 連携研究者

なし