

課題番号 41

腸内細菌叢の攪乱による腸管関連リンパ組織の 形態維持への影響

〔1〕組織

代表者：古川 睦実

(東北大学大学院農学研究科)

対応者：小笠原 康悦

(東北大学加齢医学研究所)

分担者：

野地 智法 (東北大学大学院農学研究科)

平川 良太 (東北大学大学院農学研究科)

勅使河原 杏莉 (東北大学大学院農学研究科)

太田 実友子 (東北大学大学院農学研究科)

周 洲 (東北大学大学院農学研究科)

研究費：消耗品 13 万円

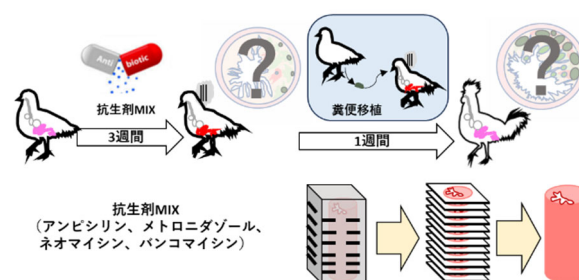
〔2〕研究経過

多くの動物の粘膜面では免疫グロブリンが分泌されており、それらは病原微生物の排除や共生微生物の定着に働き、生体の健康維持に寄与している。腸管における免疫グロブリンの誘導は、腸管関連リンパ組織 (GALT) を中心とした免疫システムによって行われおり、GALT はリンパ球である B 細胞が集積する濾胞構造と T 細胞が集積する傍濾胞構造から構成されている。鳥類の腸管は哺乳類と比較し、腸管における盲腸の割合が非常に高く、ニワトリ腸管に存在する GALT の中でも盲腸基部に発達する CT が主要な GALT であるとされている。しかしながら、その形態形成プロセスについては未解明な点が多く、特に、2 次元の組織切片画像からでは CT の発達における定量的なデータを得ることは困難であった。

これまで申請者らは、3 次元構築用ソフトウェアである Amira を駆使し、連続組織切片を重ね合わせた立体構築を用いることで、ニワトリ CT の形態変化を詳細に解析してきた。その結果、CT の形成過程において B 細胞と T 細胞がどのように局在・集積していくか、また、CT に存在する濾胞の数や体積の経時的に変化に関する定量的データなど、2 次元の組織切片画像のみでは得られないデータを得ることに成功してきた。

また、ニワトリ CT は孵化直後には全く形成されていないことから、孵化後に定着する細菌叢が CT の形態形成に寄与していることが類推される。そこで、本共同研究では、腸内細菌叢を攪乱したモデルと、攪乱後に正常個体の糞便を移植し、腸内細菌叢の回復を図った動物モデルを用いることにより、腸内細菌叢が CT の形態変化に及ぼす影響を 3 次元的に解析することを目的として研究を行った。

腸内細菌叢の攪乱がニワトリの腸管免疫に与える影響を明らかにするために、抗生剤 MIX (バンコマイシン、アンピシリン、ネオマイシン、メトロニダゾール) を 3 週間経口投与したニワトリおよび、抗生物質投与後に糞便移植 (FMT) または PBS を投与した個体から盲腸基部を採材し、パラフィン切片を作製した。その後、B 細胞の局在を確認するため抗 Bu1 抗体および T 細胞の局在を確認するために抗 CD3 抗体を用いた免疫組織化学染色に供した。さらに、光学顕微鏡で撮影した二次元画像データを画像処理ソフトウェア ImageJ を用いて色分解した後に、解析ソフトウェア (Amira) を用いて 3 次元立体構築を行うことで、CT を臓器レベルで解析した。これによって、腸内細菌叢の変化が及ぼす CT の構造への影響を評価した。



なお、本課題は加齢医学研究所教授の小笠原康悦先生が受入教員として参画し、メール等を介した打ち合わせを通して、免疫学的観点からの研究アドバイスを行っていただいた。

〔3〕成果

(3-1) 研究成果

抗生剤 MIX を投与したニワトリでは腸内細菌叢が攪乱されており、腸内細菌叢の多様性も変化していることが確認された。また、FMT 区に特有の微生物が

存在しており、それらの微生物自身もしくは、微生物による代謝産物がCTに働きかけることで、形態形成が促進され、機能成熟が進むことが示唆された。

また免疫組織学染色の結果により、全区間で腸管の径に大きな変化はなく、Bu1 陽性細胞と CD3 陽性細胞は筋層側および管腔側の双方に存在していることが明らかとなった。しかし、ABX 区と FMT 区、PBS 区では明確に Bu1 陽性細胞および CD3 陽性細胞の局在は異なっており、特に ABX 区の局在領域は減少していた。

Amira を用いて作成した 3D 構築物を定量的に解析し、区間で比較したところ、筋層側・管腔側の濾胞数は FMT 区で他の区に比べ有意に高い値を示した。また、FMT 区のみで筋層側濾胞数を管腔側濾胞数が有意に高くなっていた。さらに、濾胞体積を比較したところ、筋層側・管腔側の両方で FMT 区、PBS 区、ABX 区の順で有意に高く、その体積は PBS 区と比較し、FMT 区の筋層側では 1.5 倍、管腔側では 1.3 倍、また、ABX 区の筋層側では 0.6 倍、管腔側では 0.4 倍となっていた。

（3－2）波及効果と発展性など

本共同研究により、ニワトリ CT に形態維持は腸内細菌叢の影響を強く受け、さらには、特有の菌の存在によって維持されていることが明らかとなった。これらをプロバイオティクスに用いていくことで、畜産業へと貢献できると考える。

また、代表者（古川睦実）が申請した関連課題は、令和 7 年度の東北大学加齢医学研究所共同利用・共同研究として採択して頂いており、Amira を用いた三次元立体構築による粘膜免疫学の発展につながる研究成果の蓄積が、今後も期待される。

〔4〕成果資料

本研究課題の直接的な成果ではないが、本研究課題の基盤となった Amira を用いた解析についての原著論文を公表した。

1. **Teshigahara A**, Banba Y, Yoshida H, Kaji M, **Zhou Z**, Koyama N, Sakai Y, Karrow NA, **Ogasawara K**, **Hirakawa R**, Islam J, **Furukawa M**, **Nochi T**.

Formation of the junctions between lymph follicles in the Peyer's patches even before postweaning activation. Sci.Rep., 14: 15783, 2024