

称号及び氏名	博士(獣医学)	松本 弘輝
学位授与の日付	2021年8月31日	
論文名	毒素原性大腸菌による離乳後下痢症における子豚実験感染モデルの確立および対策混合飼料の開発について	
論文審査委員	主査	向本 雅郁
	副査	山崎 伸二
	副査	山岸 則夫
	副査	有満 秀幸(兵庫県立大学 環境人間学研究科)

## 論文要旨

### 緒言

子豚の離乳後下痢 (Post-weaning diarrhea: PWD) は、離乳後 3~10 日で主に腸管毒素原性大腸菌 (enterotoxigenic *Escherichia coli*: ETEC) によって引き起こされ、泥状から水様性の下痢を呈し、脱水による斃死もしくは発育低下・遅延が生じ、世界中の養豚産業に深刻な経済的損失をもたらしている。

PWD をコントロールするために、抗菌剤が使用されることが多いが、畜産現場における抗菌剤の多用により、耐性菌の出現が懸念されている。それゆえ、抗菌剤を用いなくとも、生産性を維持できる代替製品の開発が強く求められている。

本研究では、PWD 対策飼料による予防効果を正確に評価するために、豚側の要因として *MUC4* 遺伝子型、細菌側の要因として細胞付着能を精査することにより、全ての豚に下痢を発症させることが可能な PWD 実験感染モデルを確立した。確立したモデルを用いて既存品の PWD 予防効果を評価するとともに、高い PWD 発症軽減効果のみられた製品の組み合わせにより、コスト低減が見込める混合飼料を開発した。また、腸内細菌叢解析、血漿メタボローム解析およびリアルタイム PCR によるサイトカイン等の発現解析を実施することにより、開発した混合飼料の PWD 発症軽減メカニズムを解析した。

## 第1章 PWD 感染モデルの確立

PWD 対策の飼料を評価するために、感染菌株および感染豚の選定を行い、PWD 感染モデルの確立を目指した。

易熱性エンテロトキシン (LT)、耐熱性エンテロトキシン (STa、STb) 遺伝子を有する株を用いて、豚腸管上皮細胞株 (porcine intestinal epitheliocyte; PIE 細胞) に対する付着能を解析した。F4 線毛を有する株は、 $10^4 \sim 10^{6.4}$  cfu/mL の付着能を示し、同一の線毛遺伝子であっても、細胞付着能が異なることが明らかとなった。

次いで、付着能の高い株 ( $10^{6.1}$  cfu/mL、HA 株) と低い株 ( $10^{4.0}$  cfu/mL、LA 株) を異なる *MUC4* 遺伝子型 (SS 型、RS 型、RR 型) を有する豚に感染させ、PWD の発症について調査した。HA 株を  $10^{10}$  cfu/頭で感染させたグループでは、平均糞便スコア (1-3 dpi) が SS 型で 2.00、RS 型で 1.83、RR 型で 0.25 であり、*MUC4* 遺伝子型によって F4 ETEC に対する感受性が異なることが示された。また、SS 型および RS 型では、100% の下痢発症率がみられた。

さらに、RS 型の *MUC4* 遺伝子型を有する異なる品種の豚 (WL 種、LW 種、LL 種、WW 種、LWD 種) に HA 株を感染させ、PWD 発症の違いを評価した。平均糞便スコア (1-3 dpi) は、LL 種で 2.76 と最も高く、次いで LWD 種で 2.75、WW 種で 2.47 であり、大きな違いは認められなかったが、WL 種では 1.82、LW 種で 1.50 と有意に低いスコアを示した。同じ *MUC4* 遺伝子型を有する豚であっても、品種により感受性もしくは PWD 発症程度が異なることが示唆された。しかしながら、品種間で PWD 発症の程度が異なる可能性があるが、本研究では、品種によらず RS 型の豚に対して、100% の下痢発症率を達成した。

*MUC4* 遺伝子型が RS 型の豚に高付着能菌を投与することにより、全ての豚に下痢を発症させることが可能な感染モデルを確立した。感染モデルが確立されたことにより、実験動物数をむやみに増加させることなく、飼料の評価、開発が可能となり、動物福祉にも貢献できると考えられた。

## 第2章 PWD 感染モデルを用いた PWD 対策飼料の評価および新規混合飼料の開発

第1章で確立した感染モデルを用いて、フマル酸、乳酸、乳酸菌死菌体末 (EC-12)、さとうきび抽出物 (SCE) の飼料添加による PWD 予防効果について評価するとともに、より強い予防効果を示す組み合わせを見出し、新規混合飼料の開発を試みた。

フマル酸、乳酸を給与したグループでは、平均糞便スコア (1-7 dpi) がそれぞれ、1.09、0.91 とコントロールの 1.72 よりも有意に低かった。異なる濃度の EC-12 を給与したグループ (0.1%、0.01%、0.005%) では、平均糞便スコア (1-7 dpi) がそれぞれ、

0.17、0.66、0.78 と、コントロールの 1.72 よりも有意に低く、ETEC による下痢発症軽減効果が認められた。中でも、0.1%を給与したグループでは、増体量の改善、さらには下痢発症率の低下、発症期間の短縮、斃死率の低下と多項目にわたり、ETEC による PWD 発症が軽減され、EC-12 は非常に有用な対策飼料であることが明らかとなった。また、SCE を 1.0%給与したグループでは、平均糞便スコア (1-7 dpi) が 0.31 と、コントロールの 1.72 よりも有意に低く、増体量の改善、斃死率の低下もみられ、EC-12 に次いで、PWD 発症軽減効果が認められた。最も効果の認められた EC-12 と、次いで効果の高かった SCE を組み合わせて検討することとした。

混合給与 (EC-12; 0.005%、SCE; 0.25%) では、平均糞便スコア (1-7 dpi) が 0.47 であり、コントロールの 1.63 より有意に低減した。この値は、EC-12 単味を 0.01%で給与した時の平均糞便スコア (1-7 dpi) である 0.66 よりも低いものであった。これらのことから、EC-12 と SCE を混ぜて給与することにより、それぞれの効果が増強されることが示唆された。

### 第 3 章 新規混合飼料の ETEC 感染予防メカニズムの解析

第 2 章で EC-12 と SCE を組み合わせた新規混合飼料では、それぞれの効果がより増強されたことから、その作用メカニズムについて解析した。

腸内細菌叢の解析により、菌種の豊富さを表す  $\alpha$  多様性が、空腸および回腸において、対策飼料給与グループ (EC-12、SCE 単味および両者の組み合わせ) でコントロールよりも有意に増加し、生息する菌の種類が増加したと推察される。空腸および回腸においてコントロールでは腸内細菌科の細菌の相対存在率がそれぞれ 71.25%および 51.75%と多くを占めていたのに対し、EC-12 給与では 8.75%および 6.75%、SCE 給与では、13.50%および 34.25%、混合給与では 15.00%および 4.00%と、相対存在率が大幅に低下した。離乳豚の腸内環境が最適化され、その結果、ETEC の感染そのものが低減した可能性が示唆された。

加えてメタボローム解析により、免疫向上機能が知られている *N, N*-ジメチルグリシンは、コントロールと比較して EC-12 給与で 2.84 倍、SCE 給与で 2.13 倍、混合給与で 2.52 倍と全ての給与グループで増加した。

さらに、リアルタイム PCR により抗ウイルス活性やサルモネラの侵入を防ぐことが報告されている IFN- $\gamma$  の発現量が、EC-12 給与および混合給与グループで有意に増加した。

以上の結果より、EC-12 および SCE は整腸効果、免疫賦活作用を有し、ETEC による PWD 軽減効果が得られたと考えられた。

## 総括

1. F4 線毛遺伝子を有する ETEC は、株毎に PIE 細胞への付着能が異なっていた。
2. *MUC4* 遺伝子型が RS 型の豚に高付着能菌を投与することにより、豚の品種によらず下痢を発症させる感染モデルを確立した。
3. EC-12 もしくは SCE を子豚に 5 日間給与することにより、PWD 発症が有意に低減した。
4. EC-12 と SCE を組み合わせて給与することにより、効果を維持しつつコストを低減することができた。
5. EC-12、SCE には整腸作用や免疫賦活作用があり、その結果 PWD の発症が低減している可能性が示唆された。
6. 開発した混合飼料により、養豚産業の生産性向上に寄与できることが期待された。

## 審査結果の要旨

子豚の離乳後下痢 (Post-weaning diarrhea: PWD) は、離乳後 3~10 日で主に腸管毒素原性大腸菌 (enterotoxigenic *Escherichia coli*: ETEC) によって引き起こされ、泥状から水様性の下痢を呈し、脱水による斃死もしくは発育低下・遅延が生じ、世界中の養豚産業に深刻な経済的損失をもたらしている。PWD をコントロールするために、抗菌剤が使用されることが多いが、畜産現場における抗菌剤の多用により、耐性菌の出現が懸念されている。それゆえ、抗菌剤を用いなくとも、生産性を維持できる代替製品の開発が強く求められている。本研究では、PWD 対策飼料による予防効果を正確に評価するために、豚側の要因として *MUC4* 遺伝子型、細菌側の要因として細胞付着能を精査することにより、全ての豚に下痢を発症させることが可能な PWD 実験感染モデルを確立した。確立したモデルを用いて既存品の PWD 予防効果を評価するとともに、高い PWD 発症軽減効果のみられた製品の組み合わせにより、コスト低減が見込める混合飼料を開発した。また、腸内細菌叢解析、血漿メタボローム解析およびサイトカイン等の発現解析を実施することにより、開発した混合飼料の PWD 発症軽減メカニズムの解析を行い、以下の成果を得た。

第 1 章では、PWD 対策の飼料を評価するための感染菌株および感染豚の選定を行い、PWD 感染モデルの確立を目指した。易熱性エンテロトキシン (LT)、耐熱性エンテロトキシン (STa、STb) 遺伝子を有する株を用いて、豚腸管上皮細胞株 (PIE 細胞) に対す

る付着能を解析した。F4 線毛を有する株であっても、細胞付着能が異なることが明らかとなった。次いで、付着能の高い株 ( $10^{6.1}$  cfu/mL、HA 株) と低い株 ( $10^{4.0}$  cfu/mL、LA 株) を異なる *MUC4* 遺伝子型 (SS 型、RS 型、RR 型) を有する豚に感染させ、PWD による下痢発症の程度について調べた。その結果、品種によらず SS 型または RS 型の豚に対して、 $10^{10}$  cfu の HA 株を感染させることにより 100% の下痢発症率を達成し、EPEC 投与により、全ての豚に下痢を発症させる感染モデルを確立した。

第 2 章では、第 1 章で確立した感染モデルを用いて、フマル酸、乳酸、乳酸菌死菌体末 (EC-12)、さとうきび抽出物 (SCE) の飼料添加による PWD 予防効果について評価するとともに、より強い予防効果を示す組み合わせを見出し、新規混合飼料の開発を試みた。それぞれの飼料添加物を単独で基礎飼料に添加した場合、いずれの添加物においても基礎飼料のみと比較して有意に EPEC による下痢発症軽減効果が認められ、増体量の改善、さらには下痢発症率の低下、発症期間の短縮、斃死率の低下と多項目にわたり、EPEC による PWD 発症が軽減され、いずれの飼料添加物も非常に有用な対策飼料であることが明らかとなった。次いで効果の高かった EC-12 と SCE を組み合わせて検討することとした。混合給与 (EC-12; 0.005%、SCE; 0.25%) では、EC-12 のみを 0.01% で給与した時と比較して平均糞便スコアは低値を示した。以上の結果から、EC-12 と SCE を混合し給与することにより、それぞれの効果が増強されることが示唆された。

第 3 章では、EC-12 と SCE を組み合わせた新規混合飼料で、それぞれの効果がより増強されたことから、その作用メカニズムについて解析した。腸内細菌科細菌の相対存在率が EC-12 および SCE 単独給与で低下がみられ、混合給与では相対存在率が大幅に低下した。離乳豚の腸内環境が最適化され、その結果、EPEC の感染そのものが低減した可能性が示唆された。メタボローム解析により、免疫向上機能が知られている *N*, *N*-ジメチルグリシンは、混合飼料給与グループで増加した。さらに、リアルタイム PCR により抗ウイルス活性やサルモネラの侵入を防ぐことが報告されている IFN- $\gamma$  mRNA の発現量が、混合給与グループで有意に増加した。以上の結果より、EC-12 および SCE は整腸効果、免疫賦活作用を有し、EPEC による PWD 軽減効果が得られたと考えられた。

以上、本研究により *MUC4* 遺伝子型が RS 型の豚に PIE 細胞に対して高付着能の EPEC を投与することにより、豚の品種によらず下痢を発症させることができる感染モデルを確立した。EC-12 もしくは SCE を子豚に給与することにより、PWD 発症が有意に低減し、EC-12 と SCE を組み合わせて給与することにより、単独投与以上の効果を維持しつつコストを低減することが可能となった。EC-12、SCE には整腸作用や免疫賦活作用があり、その結果、PWD の発症が低減している可能性が示唆された。これらの成果は開発した混合飼料を普及させることで養豚産業の生産性向上に寄与できることが期待さ

れ、獣医学および畜産学の発展に貢献するものである。本論文の審査ならびに学力確認の結果と併せて博士（獣医学）の学位を授与することを適当と認める。