



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

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2021-11-19 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 松本, 弘輝 メールアドレス: 所属:
URL	https://doi.org/10.24729/00017529

大阪府立大学博士（獣医学）学位論文

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

松本 弘輝

2021 年

目 次

緒 論	-----	1
第一章 PWD 感染モデルの確立		
1. 緒言	-----	5
2. 材料と方法	-----	6
3. 結果	-----	12
4. 考察	-----	15
5. 図表	-----	19
第二章 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		
1. 緒言	-----	26
2. 材料と方法	-----	28
3. 結果	-----	31
4. 考察	-----	34
5. 図表	-----	37
第三章 新規混合飼料の ETEC 感染予防メカニズムの解析		
1. 緒言	-----	43
2. 材料と方法	-----	44
3. 結果	-----	48
4. 考察	-----	53
5. 図表	-----	59
総合考察	-----	67
結 論	-----	70
謝 辞	-----	71
引用文献	-----	72

緒論

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る。ETEC に感染した豚は通常、1~5 日間続く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 (Dubreuil *et al.*, 2016)。我が国においても、下痢を呈した離乳豚を検査したところ、大腸菌単独感染およびロタウイルス、コクシジウムなどとの混合感染を合わせると、半数以上 (52.6%) の豚から大腸菌が検出されており、本疾病に対する ETEC の重要性が伺える (Katsuda *et al.*, 2006)。PWD の原因となる ETEC は、易熱性エンテロトキシン (LT) や耐熱性エンテロトキシン (STa および STb) を産生し、腸管上皮細胞へ付着するための線毛を保有している。豚では主に、F4 および F18 線毛を発現する ETEC が検出され、F5、F6、F41 線毛を発現する ETEC の検出も報告されているが、検出頻度は低い (Fairbrother *et al.*, 2005)。

一般に、ETEC のような細菌による PWD をコントロール (予防・治療) するために抗菌剤が使用されることが多く、中でも *Paenibacillus polymyxa* によって産生されるポリミキシン系抗生物質であるコリスチンが豚で多く用いられていた (Tambadou *et al.*, 2015)。一方、ヒトでは、コリスチンは現在、*Pseudomonas aeruginosa*、*Acinetobacter baumannii*、*Klebsiella pneumoniae*、*Enterobacter* spp. などの多剤耐性グラム陰性菌による感染症治療のための最後

の治療選択肢と考えられている (Walkty *et al.*, 2009)。しかしながら、2015年に、大腸菌やサルモネラなどの特定のグラム陰性菌において、コリスチンに対する耐性を付与する安定なプラスミド媒介遺伝子 *mcr-1* が同定された (Rebelo *et al.*, 2018)。これまでコリスチン耐性機構は、非移行性のゲノム媒介変異しか確認されていなかったが、*mcr-1* の発見により水平伝播および種間移行の可能性もでてきたことから、ヒト医療においてコリスチンの有効性が低下することが懸念されている。実際に、国内の豚から分離された主要 O 群血清型(O139、O149、O116、OSB9)の病原性大腸菌 684 株について、コリスチン耐性および *mcr-1* の保有状況を調査した報告では、*mcr-1* 保有株は 2007 年分離株で初めて確認され、調査した 684 株における *mcr-1* の保有率は 2011 年以降に急増しており、*mcr-1* 保有株はすべてがコリスチン耐性株であった (Kusumoto *et al.*, 2016)。これらの事態を受け、我が国では内閣府食品安全委員会により家畜に対して硫酸コリスチンを使用することは中程度のリスク (ヒト用抗菌性物質による治療効果が減弱又は喪失する可能性は否定できない) であるとされ、2018 年 7 月 1 日をもって硫酸コリスチンの飼料添加物としての使用が禁止された。

国内では、飼料添加物として抗菌剤および抗生物質の添加がいくつか承認されているが、EU 加盟国では、耐性菌増加を抑制するために成長促進目的での抗菌剤および抗生物質の添加が 2006 年より禁止されており、世界中で同様の動きがみられる (Casewell *et al.*, 2003, Dębski., 2016, Nhung *et al.*, 2016)。耐性菌出現を管理し、同時に家畜の生産性を維持するためには、抗菌剤、特に豚用のコリスチンに代わるものを見つけることが強く求められている

(Rhouma *et al.*, 2017)。PWD をコントロールするために、抗菌剤代替品として酸化亜鉛や有機酸、プロバイオティクス、プレバイオティクスなどの飼料添加が広く研究されている (Badia *et al.*, 2012, Suiryanrayna *et al.*, 2015, Yang *et al.*, 2016, Zhu *et al.*, 2017)。PWD を予防し得る飼料を探索する最も効果的な評価方法は、豚を用いた感染試験である。しかしながら、これらの有効性評価において、発症に個体差が大きい不適切な感染モデルを使用した場合、新たな製品を開発するためにより多くの豚を用いた試験が必要となり、動物福祉の理念に相反する事態となり得る (Luise *et al.*, 2019a)。近年、豚における 13 番染色体上に位置するムチン 4 遺伝子 (*MUC4*) は F4 線毛受容体の発現と関連があるとされている (Jensen *et al.*, 2006, Roubos-van *et al.*, 2017)。豚の *MUC4* を標的とした DNA ベースのテストにより、F4 ETEC に対する抵抗性および感受性を調査することが可能となり、ETEC 実験感染による下痢の発症率は大きく改善したものの 100%には達しなかった (Roubos-van *et al.*, 2017)。

本研究では、第一章で、豚由来腸管上皮細胞株を用い ETEC の細胞付着能を評価し、遺伝子上では同一の F4 線毛遺伝子を有する ETEC であっても、株毎に細胞付着能が異なることを見出した。さらに、細胞に高い付着性を有する ETEC 株を感受性 (ホモ) もしくは感受性/抵抗性 (ヘテロ) の豚に攻撃することにより、100%下痢が発症する PWD 感染モデルを確立した。

第二章では、PWD 感染モデルを用いて、有機酸 (フマル酸、乳酸)、乳酸菌死菌体末、さとうきび抽出物の PWD 予防効果についてスクリーニングした。予防効果の高かった二つの

飼料を組み合わせ、低濃度（安価）でも効果が発揮される混合飼料を開発した。

第三章では、新規に開発した混合飼料を豚に給与し、次世代シーケンサー（Miseq）による腸内細菌叢メタゲノム解析や、CE-TOFMS による血漿メタボローム解析、リアルタイム PCR による腸管のサイトカイン等発現量を確認することにより、PWD 予防メカニズムを検証した。

第一章 PWD 感染モデルの確立

1. 緒言

PWD の原因となる ETEC は、易熱性エンテロトキシン (LT) や耐熱性エンテロトキシン (STa および STb) を産生し、腸管上皮細胞へ付着するための線毛を保有している。一般的に、経口的に侵入した ETEC は、線毛により腸管上皮細胞へ付着し、その場で増殖する。増殖した大量の ETEC から放出される毒素 (LT, STa, STb) により腸管外に水分が流出し、下痢が引き起こされると言われている。ETEC の毒素としては、腸管凝集性大腸菌耐熱性エンテロトキシン 1 (Enteroaggregative *E.coli* heat-stable toxin 1; EAST1) も知られているが、子豚への感染試験で下痢が発症しなかったという知見もあるため、本研究では調査対象外とした (Ruan *et al.*, 2012)。

また、豚側の感染成立の要因として近年、*MUC4* を標的とした DNA マーカーベースのテストにより、豚の F4 ETEC に対する抵抗性および感受性に関連する一塩基多型 (SNP) (DQ848681: g.8227C > G) が同定された (Jensen *et al.*, 2006)。*MUC4* の遺伝子型検査を用いることにより、豚は、F4 ETEC に対して、耐性ホモ (RR)、耐性/感受性ヘテロ (RS) および感受性ホモ (SS) の 3 つのグループに分類できるとされている。

本章では、当所保有の豚由来 ETEC 野外株の性状調査を実施し、どのような線毛遺伝子お

よび毒素遺伝子を保有しているのか調査した。また、EPEC 感染成立の重要なファクターである腸管上皮細胞への付着性について、LT、STa、STb すべての毒素遺伝子を有する株を用いて調査した。さらに、*MUC4* 遺伝子型が異なる豚 (Large White × Landrace; WL 種) に、*in vitro* で高付着能または低付着能を示した EPEC 株を接種し、下痢の発症について確認した。また、豚を用いる試験では、試験者が容易に入手できる品種であることも重要であるため、品種毎の感染性も確認し、高率に下痢が発症し、高い再現性の得られる PWD 感染モデルの確立を目指した。

2. 材料と方法

1) 供試菌株

JA 全農クリニックセンター (佐倉市) で分離された、豚由来 EPEC を 100 株用いた。分離方法は、検体を 5% 羊血液加寒天培地 (栄研化学) で一晩培養し、溶血活性を示す大腸菌様コロニーを単離した。大腸菌の確認のため、生化学性状 (TSI 寒天培地 (栄研化学) 発育性状、SIM 寒天培地 (栄研化学) 発育性状、インドール産生能) をさらに調べた。EPEC 株は 10% スキムミルク (BD Difco) 中で -80°C で保存した。各実験の前に 37°C で一晩、DHL 寒天培地 (栄研化学) で再培養した。

2) ETEC 株からの DNA 抽出と線毛遺伝子、毒素遺伝子の PCR による検出

DHL 寒天培地で 37°C、一晚培養した各 ETEC 株のコロニーから InstaGene Matrix (Bio-Rad Laboratories) を用いて細菌 DNA を抽出し、NanoDrop (Thermo Fisher Scientific) により吸光度比 (A260/A280) を測定し、DNA のクオリティチェック (品質と純度) を行った。抽出した DNA は、PCR に供試するまで -20°C で保存した。線毛遺伝子 (F4, F5, F6, F18, F41) および毒素遺伝子 (LT, STa, STb) は表 1 に示すプライマーを用いて PCR により増幅した。PCR 反応液は、細菌 DNA 2 µL に対し、各プライマー 1 µM、1.25 U の Ex Taq HS (TaKaRa Bio)、5 µL の 10×PCR Buffer (Mg²⁺プラス)、200 µM の dNTP Mixture を加え、PCR グレード水を反応液が 50 µL になるよう添加した。増幅反応は、熱変性 (94°C, 2 分)、30 サイクルの増幅反応 (94°C, 30 秒、55°C, 30 秒、72°C, 60 秒) 後、伸長反応 (72°C, 10 分) を行った。PCR 産物の検出は、増幅した DNA を 2% アガロースゲルで電気泳動し、エチジウムブロマイドで染色後、UV (Ultra Violet) 下でゲル中のバンドを確認した。

3) 豚腸管上皮細胞株の維持

豚腸管上皮細胞株 (Porcine intestinal epitheliocyte; PIE cell) (東北大学より分与) は、新生子豚の腸管上皮由来の形質転換していない培養細胞株である (Hosoya *et al.*, 2011)。PIE 細胞は、10% ウシ胎児血清加 DMEM (Gibco) を用いて、37°C、5% CO₂ 存在下で維持した。

4) ETEC 株の PIE 細胞への付着能測定

PIE 細胞を 6 ウェルプレートに約 5×10^5 細胞/ウェルで播種し、コンフルエントになるまで 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 存在下で培養した。各 ETEC 株は LB (Luria-Bertani) 培地 (Tryptone (BD) 5 g、Yeast Extract (BD) 2.5 g、NaCl (Wako) 5 g、Glucose (Wako) 0.5 g、蒸留水 500 mL) を用いて、 37°C で 6 時間振盪培養した。培養後、 $13,570 \times g$ で 15 分間遠心し、培養菌を回収した。DMEM を用いて 10^7 cfu/mL になるよう再懸濁したものを接種菌液とした。PIE 細胞を滅菌 PBS で 3 回洗浄し、菌液を 3 mL 接種した。プレートを 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 存在下で 1 時間インキュベートした後、滅菌 PBS を用いて付着しなかった ETEC を除去した。次いで、3 mL のトリプシン処理により PIE 細胞および ETEC を回収した。回収溶液を必要乗数まで希釈し、DHL 寒天培地にプレーティングし、 37°C で一晩培養した。翌日、発育コロニーを計測し、PIE 細胞に付着していた菌数を算出した。

5) 供試動物

すべての動物実験は、全農家畜衛生研究所動物実験審査委員会（承認番号第 324 号、366 号）の承認を得て、JA 全農家畜衛生研究所で実施した。WL (Large White \times Landrace)、LW (Landrace \times Large White)、LL (Landrace \times Landrace)、WW (Large White \times Large White)、LWD (Landrace \times Large White \times Duroc) の豚は、特定の病原体を持たない SPF 農場 (WL、WW は全農飼料畜産中央研究所より、LW、LL、LWD は全農畜産サービス関連農場より入

手)に由来するものを使用した。試験豚は離乳日(21日齢)に全農家畜衛生研究所に移送し、オープンペンによる個別飼育を行った。体重は導入時および、剖検時または斃死時に測定した。1日あたり約400gの飼料を給与し、水はプッシュドリンカーによる自由摂取とした。

6) *MUC4* 遺伝子タイピング

分娩直後の子豚から尾サンプルを採取し、QIAamp DNA Minikit (QIAGEN) を用いてゲノム DNA を抽出し、NanoDrop (Thermo Fisher Scientific) により吸光度比 (A260/A280) を測定し、DNA のクオリティチェック (品質と純度) を行った。*MUC4* 遺伝子は表 1 に示すプライマーを用いて PCR により増幅した。PCR 反応液は、ゲノム DNA 1 μ L に対し、各プライマー 0.1 μ M、0.5 U の Ex Taq HS (TaKaRa Bio)、2.5 μ L の 10 \times PCR Buffer (Mg^{2+} プラス)、200 μ M の dNTP Mixture を加え、PCR グレード水を反応液が 25 μ L になるよう添加した。増幅反応は、熱変性 (94 $^{\circ}$ C, 15 分)、35 サイクルの増幅反応 (95 $^{\circ}$ C, 15 秒、60 \sim 50 $^{\circ}$ C, 30 秒、72 $^{\circ}$ C, 30 秒) 後、伸長反応 (72 $^{\circ}$ C, 10 分) を行った。アニーリング温度は 60 $^{\circ}$ C で開始し、最初の 10 サイクルでは 1 サイクルあたり 1 $^{\circ}$ C ずつ温度を下げた。残りの 25 サイクルは 50 $^{\circ}$ C でアニーリング反応を行った。増幅した DNA は、*Xba*I (TaKaRa Bio) を用いて、Restriction fragment length polymorphism (RFLP) 解析を行った。反応条件は、37 $^{\circ}$ C で 2 時間とした。PCR-RFLP 産物の検出は、2% アガロースゲルで電気泳動し、エチジウムブロマイドで染色後、UV 下でゲル中のバンドを確認した。耐性アリル (R) は *Xba*I によって分解され

ず 367 bp に位置するのに対し、感受性アレル (S) は 2 つの断片 (151 bp, 216 bp) に分解される。得られる遺伝子型は、耐性ホモ (RR、367 bp)、耐性/感受性ヘテロ (RS、151 bp, 216 bp, 367 bp) および感受性ホモ (SS、151 bp, 216 bp) であった。

7) 感染菌株の準備および実験感染

PIE 細胞への付着性試験の結果から、高付着能を示す株 (Highly adherent; HA) と低付着能を示す株 (Lowly adherent; LA) をそれぞれ 1 株ずつ選抜した。選抜した ETEC 株は、100 µg/mL のリファンピシンを含む DHL 寒天培地 (RifDHL) で複数回継代し、人工的にリファンピシン耐性を付与した。各 ETEC 株は LB 培地を用いて、37°C で 6 時間振盪培養した。培養後、 $13,570 \times g$ で 15 分間遠心し、培養菌を回収、10% スキムミルクで 10^{10} cfu/mL もしくは 10^8 cfu/mL になるよう再懸濁した。

合計 28 頭の雄豚 (WL) を、感染菌株、*MUC4* 遺伝子型および感染菌量に基づいて 6 つのグループに振り分けた (グループ 1 (4 頭) : HA 株、 10^{10} cfu/頭、SS 型、グループ 2 (8 頭) : HA 株、 10^{10} cfu/頭、RS 型、グループ 3 (4 頭) : HA 株、 10^{10} cfu/頭、RR 型、グループ 4 (4 頭) : HA 株、 10^8 cfu/頭、RS 型、グループ 5 (4 頭) : LA 株、 10^{10} cfu/頭、SS 型、グループ 6 (4 頭) : LA 株、 10^{10} cfu/頭、RS 型)。導入翌日 (22 日齢) に HA もしくは LA ETEC を経口投与した。

次いで、品種別の実験感染を行った。合計 37 頭の雄豚を、品種に基づいて 5 つのグループ

に振り分けた（グループ 1（5 頭）：WL 種、グループ 2（5 頭）：LW 種、グループ 3（12 頭）：LL 種、グループ 4（10 頭）：WW 種、グループ 5（5 頭）：LWD 種）。導入翌日（22 日齢）に HA ETEC を 10^{10} cfu/頭で経口投与した。

両実験感染において、感染後 7 日目にキシラジン（20 mg/mL を 1.5 mL）とミダゾラム（5 mg/mL を 1.0 mL）で鎮静を掛け、ペントバルビタールナトリウム（64.8 mg/mL を 2.0 mL）による深麻酔下で放血殺を行った。

8) 糞便性状の観察およびスコアリング

感染後、毎朝に糞便性状を個別に観察した。糞便性状は以下のようにスコアリングした。スコア 0：正常、スコア 1：軟便、スコア 2：泥状便、スコア 3：水様便。下痢の発症率は、各グループでスコア 1 以上の値を示した個体の割合で求めた。下痢の発症期間は、スコア 1 以上を示した期間を個別に記録し、グループの平均を算出した。

9) 排菌数の測定

感染後、滅菌綿棒を用いて直腸スワブを個別に採材し、1 mL の滅菌生理食塩水に懸濁した。採材は、感染後 1、3、5、7 日目に実施した。スワブ懸濁液を必要乗数まで希釈し、RifDHL に塗抹後、37°Cで一晩培養した。翌日、発育コロニーを計測し、排菌数を算出した。

10) 統計解析

平均糞便スコアは、感染後日数をグループ内因子、試験グループをグループ間因子とした二元配置分散分析を行った後、Bonferroni/Dunn 法による多重比較を行った。下痢の発症率および斃死率は、グループ毎にフィッシャーの直接確立計算法を用いて解析した。すべての統計解析は、Excel2016 (Microsoft) のアドインソフト Statcel4 (OMS 出版) を用いて実施した。有意水準は $P < 0.05$ とした。

3. 結果

1) 線毛遺伝子および毒素遺伝子の検出

本試験で検討した 100 株のうち、F4 線毛遺伝子を有する株は 83 株、F18 線毛遺伝子を有する株は 13 株、F4/F5/F6/F18/F41 線毛遺伝子いずれにも該当しない株 (F_UT) は 4 株であった (表 2)。また、毒素遺伝子すべてを保有する株は、F4 株で 77 株、F18 株で 9 株、F_UT 株で 3 株であった。

2) ETEC 株の PIE 細胞への付着能測定

F4 線毛遺伝子を有する株では、 10^6 cfu/mL 以上の高い付着能を示す株が 17 株みられた (表 3)。一方、F18 線毛遺伝子を有する株や、F_UT 株では 10^6 cfu/mL 以上の付着能を示す株は

なく、 10^5 cfu/mL より低い付着能を示す株しか認められなかった。しかしながら、F4 株の中には、 10^5 cfu/mL より低い付着能を示す株も確認された。実験感染では、HA 株として $10^{6.1}$ cfu/mL の付着能を示した株を、LA 株として $10^{4.0}$ cfu/mL の付着能を示した株を選抜した。

3) 異なる *MUC4* 遺伝子型を有する豚 (WL) に対する HA 株もしくは LA 株感染による PWD の発症

平均糞便スコアは HA 株および LA 株の感染にかかわらず、1-3 の感染後日数 (Days post infection; dpi) で値が高く、4-7 dpi では糞便スコアが低下する傾向にあった (表 4)。*MUC4* 遺伝子型が SS 型の豚に HA 株を 10^{10} cfu/頭で感染させたグループ 1 では、平均糞便スコア (1-3 dpi) が 2.00 と最も激しい下痢を呈し、下痢の発症率は 100% に達した。RS 型の豚に、HA 株を 10^{10} cfu/頭で感染させたグループ 2 では、平均糞便スコア (1-3 dpi) が 1.83、下痢の発症率が 100%、下痢の発症期間が 3.4 日であり、グループ 1 と同程度の PWD 発症が認められた。一方、RR 型の豚に、HA 株を 10^{10} cfu/頭で感染させたグループ 3 では、平均糞便スコア (1-3 dpi) が 0.25 と SS 型および RS 型の豚より有意に低く、下痢の発症率も 25% にとどまった。また、RS 型の豚に HA 株を 10^8 cfu/頭で感染させたグループ 4 では、平均糞便スコア (1-3 dpi) が 0.50 と低く、下痢の発症率も 50% にとどまった。

LA 株を 10^{10} cfu/頭で感染させたグループ 5 (SS 型) および 6 (RS 型) では、平均糞便スコア (1-3 dpi) がそれぞれ 1.22 および 0.50 と低く、下痢の発症率も 50% にとどまった。

試験期間中の排菌数を図 1 に示す。SS 型の豚に HA 株を 10^{10} cfu/頭で感染させたグループ 1 では、 10^7 cfu/スワブ以上の排菌が 5 dpi まで継続した。次いで排菌数が多かったグループは RS 型の豚に HA 株を 10^{10} cfu/頭で感染させたグループ 2 および SS 型の豚に LA 株を 10^{10} cfu/頭で感染させたグループ 5 であり、 10^{6-7} cfu/スワブの排菌が 5 dpi まで継続した。すべての試験グループにおいて、7 dpi には排菌数が 10^4 cfu/スワブ以下となった。

4) 異なる品種の豚 (RS 型) に対する HA 株感染による PWD の発症

平均糞便スコア (1-3 dpi) は、WL 種で 1.82、LW 種で 1.50、LL 種で 2.76、WW 種で 2.47、LWD 種で 2.75 であった (表 5)。WL 種および LW 種の平均糞便スコア (1-3 dpi) は LL 種および LWD 種に比べて有意に低かった。また、LL 種の平均糞便スコア (4-7 dpi) は 1.58 であり、WL 種の 0.25、LW 種の 0.25、WW 種の 0.71 より有意に高かった。LL 種と LWD 種の平均糞便スコアは同程度であったが、斃死率に違いが認められた。LL 種の斃死率は 75% であったのに対し、LWD 種は 20%にとどまった。

試験期間中の排菌数を図 2 に示す。平均糞便スコアおよび斃死率が最も高かった LL 種では、1-3 dpi で 10^8 cfu/スワブ以上の排菌が認められた。他の品種では、排菌数に違いはみられなかった。

4. 考察

本研究では、100株の ETEC 野外分離株について、線毛遺伝子 (F4、F5、F6、F18、F41) および毒素遺伝子 (LT、STa、STb) の保有状況について調査した。調査した菌株では、F4 線毛遺伝子を有する株が 83% (83/100) と多数を占めていた (表 2)。他の報告でも (Hur *et al.*, 2011)、豚から分離された ETEC の多くが F4 線毛遺伝子を有しており、今回の結果と一致する。一方、Luppi *et al.* (2016) は F4 線毛遺伝子の割合が 45.1%と報告しており、これらの違いは本研究では Stx2e 遺伝子を持たない株を対象としたため Stx2e 遺伝子を保有する F18 株の検出が低下したためであると考えられた。また、今回の調査では検出されなかったが、F4 と F18 両方の線毛遺伝子を有する株の存在が報告されており、それらの機能性については明らかとなっていない (Luppi *et al.*, 2016)。さらに、線毛遺伝子にかかわらず、すべての毒素遺伝子を保有する株が 89% (89/100) と多数を占めていた (表 2)。各エンテロトキシンの PWD 発症に対する相互作用は未だ明らかとなっていないが、個々の毒素はすべて、下痢を誘発する可能性があると考えられている (Zhang *et al.*, 2009, Zhang *et al.*, 2006)。そのため、すべての毒素遺伝子を保有する株に絞って、PIE 細胞への付着能を調べた。

PIE 細胞への付着能測定結果から、F4 株は 10^5 cfu/mL 以上の高い付着能を示す株が 88.3% (68/77) と多くを占めていた (表 3)。しかしながら、同じ F4 株であっても、低い付着能 ($10^{4.0} \sim 10^{4.9}$ cfu/mL) を示す株も存在した。このことは、同一の線毛遺伝子を保有する ETEC

であっても株毎に腸管上皮細胞への付着能、すなわち病原性が異なることを示唆するものである。これら付着能に差異が生じた理由について、明らかにすることはできておらず、アミノ酸配列の変異調査などさらなる研究が必要であると考える。F18 株では、付着能が $10^{3.0} \sim 10^{4.9}$ cfu/mL と高い付着能を示した株はみられなかった。一方、豚の生体における F18 受容体は生後 20 日以降でなければ発現しないとされている (Nagy *et al.*, 1992)。本研究で用いた PIE 細胞は新生豚から樹立されたものであるため、F18 に対応する受容体が十分に発現していなかった可能性が示唆された。それゆえ、F18 ETEC の細胞付着能をより正確に評価するためには、異なる手法を用い、さらなる研究が必要であると考える。

異なる *MUC4* 遺伝子型を持つ豚 (WL) に HA 株もしくは LA 株を感染させた。SS 型の豚に、HA 株を 10^{10} cfu/頭で感染させたグループ 1 では、1-3 dpi で激しい下痢が観察されたが、4-7 dpi では観察されなかった (表 4)。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改めて示された。これらは Jensen *et al.* (2006) および Roubos-van *et al.* (2017) の報告と一致するが、SS 型だけではなく、RS 型においても下痢の発症率が 100% に達したことは本研究結果でのみ示された。また、RS 型の豚に、HA 株を 10^8 cfu/頭で感染させたグループ 4 では、平均糞便スコア (1-3 dpi) が 0.50 と低く、感染菌数も重要な因子であることが明らかとなった。一方、同一の *MUC4* 遺伝子型を持つ豚で比較すると、HA 株を 10^{10} cfu/頭で感染させたグループでは、平均糞便スコアお

よび下痢の発症率がそれぞれ SS 型（グループ 1）で、2.00 および 100%、RS 型で（グループ 2）、1.83 および 100%であったのに対し、LA 株を 10^{10} cfu/頭で感染させたグループでは、それぞれ SS 型（グループ 5）で、1.22 および 50%、RS 型で（グループ 6）、0.50 および 50%と、PWD 発症が大きく低下した。これらのことから、実験感染において PWD を発症させるためには、感染菌株の付着能を考慮することが非常に重要であることが示された。

RS 型の *MUC4* 遺伝子型を有する異なる品種の豚に HA 株を感染させ、PWD 発症の違いを評価した（表 5、図 2）。RS 型を有する WL 種の豚において、上述の平均糞便スコア（1-3 dpi）が 1.83 であり、今回のスコアは 1.82 と再現性が高いことが明らかとなった（表 4、表 5）。下痢の程度を示す平均糞便スコアにおいて、品種間で有意な差がみられた（表 5）。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。また、LL 種と LWD 種および WW 種において、斃死率がそれぞれ 75.0%、20.0%および 10.0%であり、有意な差は得られなかったが、斃死率が異なる傾向があった。これらの結果から、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。また、F4 ETEC に対する豚の感受性には *MUC4* 遺伝子だけでなく、*MUC13* 遺伝子も関与している可能性があるとの報告されており、これが下痢の程度や斃死率に影響した可能性も排除できない（Goetstouwers *et al.*, 2014, Sinha *et al.*, 2018）。さらに、豚繁殖・呼吸障害症候群ウイルスや豚サーコウイルス 2 型ウイルスなど、他

の疾病において、豚の感受性が品種間で異なるという報告もある（Liang *et al.*, 2017, Opriessnig *et al.*, 2009）。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。

以上の結果から、豚側の要因である *MUC4* 遺伝子型と細菌側の要因である細胞付着能を選別することで、豚の品種に関係なく高精度で高い再現性のある実験感染系（PWD 感染モデル）を確立することができた。本感染モデルの使用により、実験動物数をむやみに増やすことなく、PWD を予防し得る飼料の評価・開発が可能となった。

表 1. 線毛・毒素遺伝子および *MUC4* 遺伝子検出プライマー

遺伝子	プライマー配列 (5' to 3')	PCR 産物 (bp)	引用文献
F4	F:GGTGATTTCAATGGTTCGGTC R:ATTGCTACG TTCAGCGGAGCG	704	Choi <i>et al.</i> , 2001
F5	F:TGCGACTACCAATGCTTCTG R:TATCCACCATTAGACGGAGC	450	Choi <i>et al.</i> , 2001
F6	F:TCTGCTCTTAAAGCTACTGG R:AACTCCACCGTTTGTATCAG	333	Choi <i>et al.</i> , 2001
F18	F:GTGAAAAGACTAGTGTTTATTTTC R:CTTGTAAGTAACCGCGTAAGC	510	Ikwap <i>et al.</i> , 2016
F41	F:GAGGGACTTTCATCTTTTAG R:AGTCCATTCCATTTATAGGC	431	Choi <i>et al.</i> , 2001
LT	F:ATTTACGGCGTTACTATCCTC R:TTTTGGTCTCGGTCAGATATG	280	Choi <i>et al.</i> , 2001
STa	F:TCCGTGAAACAACATGACGG R:ATAACATCCAGCACAGGCAG	244	Choi <i>et al.</i> , 2001
STb	F:GCCTATGCATCTACACAATC R:TGAGAAATGGACAATGTCCG	278	Choi <i>et al.</i> , 2001
MUC4	F:GTGCCTTGGGTGAGAGGTTA R:CACTCTGCCGTTCTCTTTCC	367	Jensen <i>et al.</i> , 2006

表 2. 国内における豚由来 ETEC 株の線毛・毒素遺伝子の保有状況

線毛遺伝子	毒素遺伝子			株数
	LT	STa	STb	
F4	+	+	+	77
	+	-	+	6
F18	+	+	+	9
	+	+	-	3
	+	-	-	1
F_UT ¹⁾	+	+	+	3
	+	+	-	1

1) F4/F5/F6/F18/F41 のいずれにも該当しなかった株を示す。

表 3. PIE 細胞に対する ETEC 株の付着能の分布

線毛遺伝子	細胞付着菌数 (log ₁₀ cfu/mL)	株数 ¹⁾
F4	6.0 - 6.4	17
	5.0 - 5.9	51
	4.0 - 4.9	9
F18	4.0 - 4.9	5
	3.0 - 3.9	4
F_UT ²⁾	4.0 - 4.9	2
	3.0 - 3.9	1

1) 細胞付着菌数に示す範囲で計測された株数を示す。

2) F4/F5/F6/F18/F41 のいずれにも該当しなかった株を示す。

表4. 異なる MUC4 遺伝子型別の豚に対する HA 株もしくは LA 株の感染による PWD 発症評価

	感染菌株				HA 株				LA 株			
	10 ¹⁰				10 ⁸				10 ¹⁰			
	SS	RS	RR	RS	SS	RS	RR	RS	SS	RS	SS	RS
感染菌量 (cfu/頭)												
MUC4 遺伝子型												
グループ (頭数)	1 (4)	2 (8)	3 (4)	4 (4)	1 (4)	2 (8)	3 (4)	4 (4)	5 (4)	5 (4)	6 (4)	6 (4)
平均体重 (Kg) ¹⁾												
導入時	6.93 ± 0.49	6.51 ± 0.51	5.88 ± 0.13	6.00 ± 0.64	5.93 ± 0.47	6.30 ± 0.48						
剖検または斃死時	6.75 ± 0.43	6.88 ± 0.54	6.75 ± 0.32	7.13 ± 0.72	6.25 ± 0.78	7.00 ± 0.54						
平均一日増体量 (g) ¹⁾	-21.9 ± 16.4	19.3 ± 54.8	109.4 ± 29.9	140.6 ± 12.9	-53.1 ± 188.8	87.5 ± 38.5						
平均糞便スコア ¹⁾												
1-3 dpi	2.00 ± 0.28 ^a	1.83 ± 0.25 ^a	0.25 ± 0.18 ^b	0.50 ± 0.29 ^b	1.22 ± 0.43 ^{ab}	0.50 ± 0.29 ^b						
4-7 dpi	0.88 ± 0.27	0.43 ± 0.14	0	0.38 ± 0.20	0.25 ± 0.25	0						
下痢発症率 (%)												
1-3 dpi	100 ^{ab}	100 ^a	25 ^b	50 ^{ab}	50 ^{ab}	50 ^{ab}						
4-7 dpi	75 ^{ab}	71.4 ^a	0 ^b	25 ^{ab}	50 ^{ab}	0 ^b						
発症期間 (日) ¹⁾	4.8 ± 0.9	3.4 ± 0.7	0.5 ± 0.5	1.5 ± 0.12	2.0 ± 2.0	0.8 ± 0.5						
斃死率 (%)	0	12.5	0	0	50	0						

1) データは平均値±標準誤差で示されている。

(a-b) 同一項目において、異符号間で有意差があったことを示す (P<0.05)。

表5. 異なる品種の豚 (RS 型) に対する HA 株感染¹⁾による PWD 発症評価

品種	品種				
	WL	LW	LL	WW	LWD
グループ (頭数)	1 (5)	2 (5)	3 (12)	4 (10)	5 (5)
平均体重 (Kg)²⁾					
導入時	6.44 ± 0.22	6.34 ± 0.20	6.03 ± 0.25	6.44 ± 0.36	6.66 ± 0.22
剖検または斃死時	6.70 ± 0.41	6.70 ± 0.25	5.67 ± 0.31	6.30 ± 0.37	6.60 ± 0.24
平均一日増体量 (g)²⁾	-25.8 ± 94.7	45.0 ± 20.0	-150.0 ± 54.1	-20.2 ± 29.8	-19.5 ± 43.0
平均糞便スコア²⁾					
1-3 dpi	1.82 ± 0.26 ^{cd}	1.50 ± 0.24 ^{bd}	2.76 ± 0.09 ^a	2.47 ± 0.12 ^{ac}	2.75 ± 0.26 ^{ab}
4-7 dpi	0.25 ± 0.13	0.25 ± 0.12	1.58 ± 0.34	0.71 ± 0.17	1.00 ± 0.27
下痢発症率 (%)					
1-3 dpi	100	100	100	100	100
4-7 dpi	33.3	40	100	80	100
発症期間 (日)²⁾	4.0 ± 1.0	3.8 ± 0.6	5.0 ± 0.6	4.3 ± 0.3	5.5 ± 1.0
斃死率 (%)	40	0	75	10	20

1) 感染菌量は 10¹⁰ cfu/頭で実施した。

2) データは平均値 ± 標準誤差で示されている。

(a-d) 同一項目において、異符号間で有意差があったことを示す (P<0.05)。

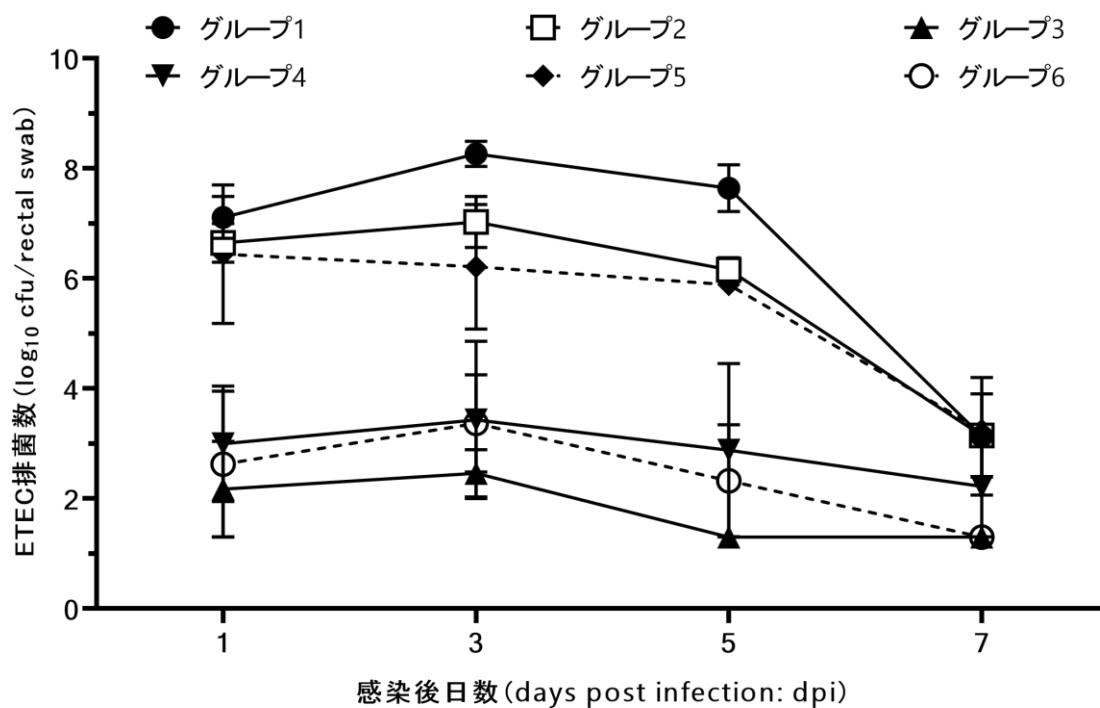


図1. 異なる *MUC4* 遺伝子型の豚に対する HA 株もしくは LA 株の感染による排菌数

直腸スワブ懸濁液を RifDHL に塗抹し、37°Cで一晩培養することにより、排菌数を算出した。検出限界値は、 2.0×10^2 cfu/rectal swab であり、エラーバーは標準誤差を示す。グループ 1; SS 型の豚に HA 株を 10^{10} cfu/頭で感染、グループ 2; RS 型の豚に HA 株を 10^{10} cfu/頭で感染、グループ 3; RR 型の豚に HA 株を 10^{10} cfu/頭で感染、グループ 4; RS 型の豚に HA 株を 10^8 cfu/頭で感染、グループ 5; SS 型の豚に LA 株を 10^{10} cfu/頭で感染、グループ 6; RS 型の豚に LA 株を 10^{10} cfu/頭で感染。

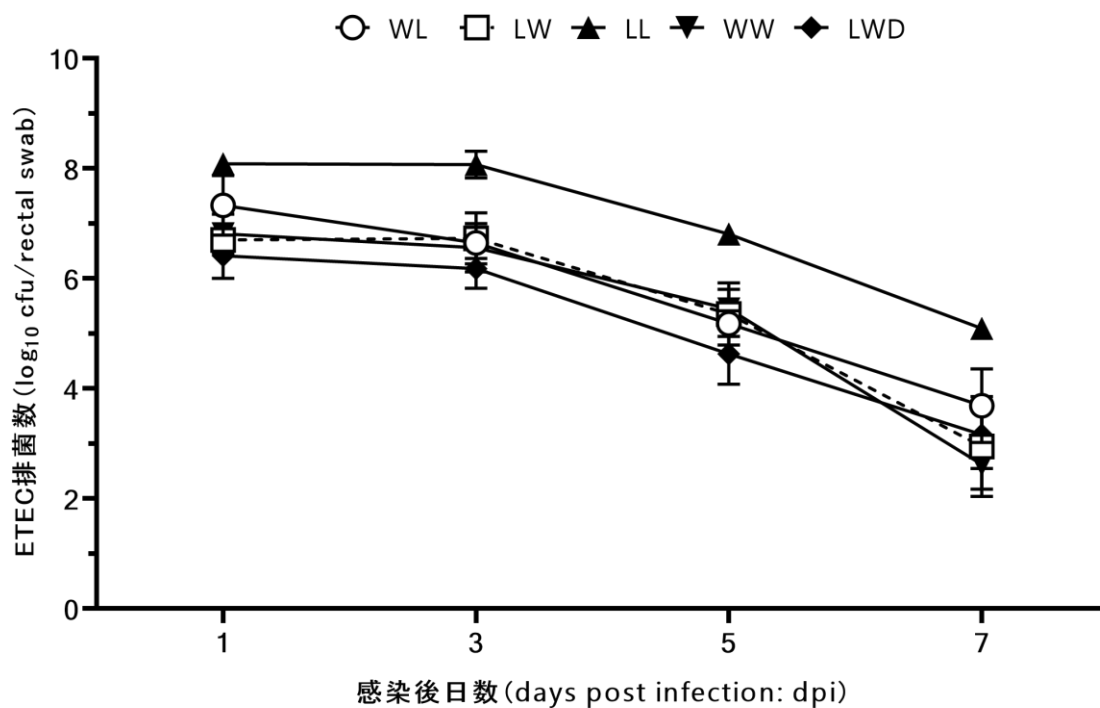


図2. 異なる品種の豚 (RS 型) に対する HA 株の感染による排菌数

直腸スワブ懸濁液を RifDHL に塗抹し、37°Cで一晩培養することにより、排菌数を算出した。検出限界値は、 2.0×10^2 cfu/rectal swab であり、エラーバーは標準誤差を示す。WL; Large White × Landrace、LW; Landrace × Large White、LL; Landrace × Landrace、WW; Large White × Large White、LWD; Landrace × Large White × Duroc を示す。

第二章 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

1. 緒言

ETEC によって引き起こされる PWD は、世界中の養豚産業で問題視されている疾病の一つである (Amezcuca *et al.*, 2002, Li *et al.*, 2020a)。PWD をコントロールするために、抗菌剤代替品として酸化亜鉛や有機酸、プロバイオティクス、プレバイオティクス、エッセンシャルオイルなどの飼料添加が研究されている (Badia *et al.*, 2012, Field *et al.*, 2017, Suiryanrayna *et al.*, 2015, Yang *et al.*, 2016, Zhu *et al.*, 2017)。

高濃度の酸化亜鉛を離乳期の豚に給与すると、ETEC による下痢の発症率が低下し、発育が改善することが報告されており、PWD をコントロールするためにも使用されている (Scott *et al.*, 2000, Wang *et al.*, 2009)。一方、酸化亜鉛は吸収、分解されにくく、多くが糞便中に排泄され、亜鉛による土壌汚染が懸念されている (Bosi *et al.*, 2003)。環境保護の観点から、EU では酸化亜鉛の飼料中への添加を禁止することも提言されている (Mukhopadhyaya *et al.*, 2019)。

飼料中に有機酸を混ぜて、豚に給与することにより、胃および小腸の病原性細菌の数が減少することが報告されている (Kluge *et al.*, 2006)。より詳細に述べると、クエン酸、フマル酸、乳酸、ギ酸などの有機酸を添加した飼料を子豚に与えると、胃内の pH が低下し、殺菌効果が付与されるため、子豚の成長や健康状態が改善されることが示されている (Roselli *et al.*,

2005, Stein *et al.*, 2006, Tsiloyiannis *et al.*, 2001)。有機酸の中でも、Owusu-Asiedu *et al.* (2003) はフマル酸を給与することにより、Tanaka *et al.* (2014)は乳酸を給与することにより ETEC による PWD を減少させることができたとしている。

乳酸菌死菌体末 (*Enterococcus faecalis* EC-12 株; EC-12) は、PWD 予防の飼料として期待できるバイオジェニックスの一つである。バイオジェニックスとは、腸内フローラを介することなく、直接、免疫賦活、コレステロール低下作用、血圧降下作用、整腸作用、腸内フローラ改善などの生体調節、疾病予防に働く食品のことである (Mitsuoka, 2014)。EC-12 を摂取することにより、リステリア菌感染の抑制、腸管内のビフィズス菌を増加させることが示されており、ヒト用のサプリメントとしても市販されている (Terada *et al.*, 2004, Tsukahara *et al.*, 2005)。一方、豚においては、EC-12 を 0.05% (w/w) 飼料中に添加することにより、浮腫病を予防することができたという報告がある (Tsukahara *et al.*, 2007)。

さとうきび抽出物 (Sugar cane extract; SCE) は、ポリフェノールや α グルカンを主成分とし免疫系を刺激することが知られている天然物であり、抗炎症、抗酸化、抗ストレス活性を有する (El-Abasy *et al.*, 2002, Nakasone *et al.*, 1996, Takara *et al.*, 2002)。家畜に対する応用では、鶏の *Eimeria tenella* 感染症に対する予防効果や、豚の免疫機能増強および発育改善が報告されている (El-Abasy *et al.*, 2003, Lo *et al.*, 2005, Lo *et al.*, 2006)。

我々が開発した PWD 感染モデル (第一章) を用いることにより、これらの評価がより一層正確になることが期待され、本章では、フマル酸、乳酸、EC-12、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、効果が高い組み合わせを見出し、新規混合飼料の開発を目的とした。

2. 材料と方法

1) 供試動物

すべての動物実験は、全農家畜衛生研究所動物実験審査委員会（承認番号第 335 号、343 号、350 号）の承認を得て、JA 全農家畜衛生研究所で実施した。豚（Landrace、雄）は、特定の病原体を持たない SPF 農場（全農畜産サービス関連農場）に由来するものを使用した。試験豚には、*MUC4* 遺伝子型が RS 型のものを用いた。*MUC4* 遺伝子型の検査は、第一章と同様の方法で実施した。試験豚は離乳日（21 日齢）に全農家畜衛生研究所に移送し、オープンペンによる個別飼育を行った。体重は導入時および、剖検時または斃死時に測定した。1 日あたり約 400 g の試験飼料を給与し、水はプッシュドリンカーによる自由摂取とした。

2) 感染菌株の準備および実験感染

第一章で用いた HA 株を、LB 培地を用いて、37°C で 6 時間振盪培養した。培養後、13,570 × g で 15 分間遠心し、培養菌を回収、10% スキムミルクで 10⁹ cfu/mL になるよう再懸濁した。

初めに、ETEC による下痢抑制効果の高い飼料を見出すために、スクリーニング試験を実施した。合計 68 頭の雄豚 (LL) を、飼料の種類および給与量に基づいて 9 つのグループに振り分けた (グループ 1 (10 頭) : コントロール、基礎飼料のみ、グループ 2 (8 頭) : フマル酸給与、基礎飼料に 1.0% (w/w) 添加、グループ 3 (8 頭) : 乳酸給与、基礎飼料に 1.0% (w/w) 添加、グループ 4 (5 頭) : EC-12 給与、基礎飼料に 0.1% (w/w) 添加、グループ 5 (8 頭) : EC-12 給与、基礎飼料に 0.01% (w/w) 添加、グループ 6 (8 頭) : EC-12 給与、基礎飼料に 0.005% (w/w) 添加、グループ 7 (5 頭) : SCE 給与、基礎飼料に 1.0% (w/w) 添加、グループ 8 (8 頭) : SCE 給与、基礎飼料に 0.5% (w/w) 添加、グループ 9 (8 頭) : SCE 給与、基礎飼料に 0.1% (w/w) 添加) (表 6)。

次に、スクリーニング試験において、ETEC による下痢を抑制する効果が優れていた EC-12 と SCE を組み合わせ、有効性を検証した。合計 24 頭の雄豚 (LL) を、飼料の種類および給与量に基づいて 3 つのグループに振り分けた (グループ 1 (8 頭) : コントロール、基礎飼料のみ、グループ 2 (8 頭) : EC-12 および SCE の混合給与、基礎飼料にそれぞれ 0.005% (w/w) および 0.25% (w/w) 添加、グループ 3 (8 頭) : EC-12 および SCE の混合給与、基礎飼料にそれぞれ 0.001% (w/w) および 0.05% (w/w) 添加) (表 6)。

両試験ともに、導入時 (21 日齢) から、試験が終了するまで、各グループの飼料を給餌した。試験開始 5 日目 (26 日齢) に、HA ETEC を 10^9 cfu/頭で経口投与した。両実験感染において、感染後 7 日目 (33 日齢) にキシラジン (20 mg/mL を 1.5 mL) とミダゾラム (5

mg/mL を 1.0 mL) で鎮静を掛け、ペントバルビタールナトリウム (64.8 mg/mL を 2.0 mL) による深麻酔下で放血殺を行った。

3) 糞便性状の観察およびスコアリング

感染後、毎朝に糞便性状を個別に観察した。糞便性状は以下のようにスコアリングした。

スコア 0：正常、スコア 1：軟便、スコア 2：泥状便、スコア 3：水様便。下痢の発症率は、各グループでスコア 1 以上の値を示した個体の割合で求めた。下痢の発症期間は、スコア 1 以上を示した期間を個別に記録し、グループの平均を算出した。

4) 排菌数の測定

感染後、滅菌綿棒を用いて直腸スワブを個別に採材し、1 mL の滅菌生理食塩水に懸濁した。

採材は、感染後 1、3、5、7 日目に実施した。スワブ懸濁液を必要乗数まで希釈し、RifDHL に塗抹後、37°C で一晚培養した。翌日、発育コロニーを計測し、排菌数を算出した。

5) 統計解析

平均糞便スコアは、感染後日数をグループ内因子、試験グループをグループ間因子とした二元配置分散分析を行った後、コントロールを対照群とした Dunnett 法による多重比較を行った。下痢の発症率および斃死率は、グループ毎にフィッシャーの直接確立計算法を用いて

解析した。体重、平均排菌数および下痢の発症期間は、バートレット検定により等分散であることを確認した後、一元配置分散分析を行い、コントロールを対照群とした Dunnett 法による多重比較を行った。すべての統計解析は、Excel2016 (Microsoft) のアドインソフト Statcel4 (OMS 出版) を用いて実施した。有意水準は $P < 0.05$ とした。

3. 結果

1) スクリーニング試験

基礎飼料のみを給与したコントロール (グループ 1) では、平均糞便スコア (1-7 dpi) が 1.72 と、全グループ間で最も高い値であった (表 7)。有機酸であるフマル酸、乳酸を給与したグループ (グループ 2、3) では、平均糞便スコア (1-7 dpi) がそれぞれ、1.09、0.91 とコントロールよりも有意に低かった。EC-12 を基礎飼料に 0.1%、0.01%、0.005% (w/w) 添加したグループ (グループ 4、5、6) では、平均糞便スコア (1-7 dpi) がそれぞれ、0.17、0.66、0.78 とコントロールよりも有意に低かった。また、SCE を基礎飼料に 1.0%、0.1% (w/w) 添加したグループ (グループ 7、9) では、平均糞便スコア (1-7 dpi) がそれぞれ、0.31、0.86 とコントロールよりも有意に低かった。

さらに、EC-12 を基礎飼料に 0.1% (w/w) 添加したグループ (グループ 4) では、下痢の発症率が 40%、下痢の発症期間が 1.0 日、斃死率が 0%であり、コントロールよりも有意な

低下がみられた。また、SCE を基礎飼料に 1.0% (w/w) 添加したグループ (グループ 7) でも、斃死率が 0% であり、コントロールよりも有意な低下がみられた。

導入時の体重は、試験グループ間で違いはなかったが、剖検もしくは斃死時の体重は、EC-12 を基礎飼料に 0.1%、0.01% (w/w) 添加したグループ (グループ 4、5) および SCE を基礎飼料に 1.0%、0.1% (w/w) 添加したグループ (グループ 7、9) において、コントロールよりも有意に増加していた。また、一日平均増体量では、コントロール (グループ 1) で -4.2 g と負の値を示し、フマル酸、乳酸を給与したグループ (グループ 2、3) では、125.0 g、62.5 g であり、EC-12 を基礎飼料に 0.1%、0.01%、0.005% (w/w) 添加したグループ (グループ 4、5、6) では、それぞれ 158.3 g、177.5 g、155.8 g であり、SCE を基礎飼料に 1.0%、0.5%、0.1% (w/w) 添加したグループ (グループ 7、8、9) では、それぞれ 116.7 g、51.7 g、117.5 g であった。

ETEC 感染後の排菌数 (\log_{10} cfu/rectal swab) は、コントロール (グループ 1) で 7.5 (1 dpi)、8.1 (3 dpi)、6.3 (5 dpi)、4.6 (7 dpi) と推移し、全てのグループ間で最も高い排菌数であった (図 3)。フマル酸、乳酸を給与したグループ (グループ 2、3) では、僅かな排菌数低下傾向が認められたものの、有意な差はみられなかった (図 3a)。EC-12 を基礎飼料に 0.1%、0.01%、0.005% (w/w) 添加したグループ (グループ 4、5、6) では、1 dpi の排菌数がグループ 4、6 で 4.4 および 4.9 であり、3 dpi の排菌数がグループ 4、5、6 でそれぞれ 4.9、4.2、5.2 とコントロールよりも有意に低減していた (図 3b)。また、SCE を基礎飼料に 1.0% (w/w)

添加したグループ（グループ7）では、1 dpiの排菌数が4.2と、コントロールよりも有意に低減していた（図3c）。

2) EC-12 および SCE の混合給与効果

基礎飼料のみを給与したコントロール（グループ1）では、平均糞便スコア（1-7 dpi）が1.63と、全グループ間で最も高い値であった（表8）。EC-12 および SCE の混合品を高濃度で給与したグループ（グループ2）では、平均糞便スコア（1-7 dpi）が0.47と、コントロールよりも有意に低かった。さらに、低濃度で給与したグループ（グループ3）でも、平均糞便スコア（1-7 dpi）が0.94と、コントロールよりも有意に低かった。

導入時の体重は、試験グループ間で違いはなかったが、剖検もしくは斃死時の体重は、EC-12 および SCE の混合品を高濃度もしくは低濃度で給与したグループ（グループ2、3）において、コントロールよりも有意に増加していた。また、一日平均増体量では、コントロール（グループ1）で9.3gと低値を示した一方、混合品を高濃度で給与したグループ（グループ2）では166.7g、低濃度で給与したグループ（グループ3）では104.2gと、両給与グループで有意に増加した。

ETEC 感染後の排菌数（log₁₀ cfu/rectal swab）は、コントロール（グループ1）で7.9（1 dpi）、8.0（3 dpi）、6.1（5 dpi）、3.8（7 dpi）と推移し、全てのグループ間で最も高い排菌数であった（図4）。EC-12 および SCE の混合品を高濃度で給与したグループ（グループ2）で

は、5.4 (1 dpi)、4.5 (3 dpi)、3.9 (5 dpi)、2.7 (7 dpi) と推移し、1、3、5 dpi でコントロールよりも有意に低減していた (図 4)。EC-12 および SCE の混合品を低濃度で給与したグループ (グループ 3) では、7.0 (1 dpi)、6.9 (3 dpi)、5.3 (5 dpi)、2.8 (7 dpi) と推移し、僅かな排菌数低下傾向が認められたものの、有意な差はみられなかった (図 4)。

4. 考察

有機酸であるフマル酸、乳酸を給与したグループ (グループ 2、3) 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 よりも有意に低く、ETEC による下痢発症軽減効果がみられた (表 7)。これらの結果は、Tsiloyiannis *et al.* (2001) の報告と一致する。しかしながら、EC-12 および SCE 給与グループほど、下痢発症軽減効果はみられなかった。また、乳酸を給与したグループ (グループ 3) では体重、平均一日増体量がコントロール (グループ 1) と相違ない結果であり、フマル酸、乳酸を給与したグループ (グループ 2、3) では、排菌数も有意な低減効果はみられなかった (表 7、図 3)。この時期に下痢を発症すると、以降の発育に影響がみられることから、単純に下痢の発症の有無だけでなく、体重にも着目することが、PWD 対策に重要なことである (Fairbrother *et al.*, 2005)。それゆえ、有機酸であるフマル酸および乳酸は、PWD 対策に資するには、十分な効果があるとは言えないと結論付けた。

異なる濃度の EC-12 を給与したグループ（グループ 4、5、6）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みられた（表 7）。中でも、最も高い濃度を給与したグループ（グループ 4）では、下痢による体重低下の軽減、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 は非常に有用な飼料であることが明らかとなった。一方、EC-12 の給与量を下げていくと、下痢発症軽減効果が明確に減弱した。これらのことから、EC-12 は濃度依存が強いことが示唆された。

異なる濃度の SCE を給与したグループ（グループ 7、9）では、平均糞便スコア（1-7 dpi）がそれぞれ、0.31、0.86 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みられた（表 7）。最も高い濃度を給与したグループ（グループ 7）では、下痢による体重低下の軽減、さらには斃死率の低下と、多項目にわたり、ETEC による PWD 発症が軽減され、EC-12 ほどではないが、SCE も非常に有用な飼料であることが明らかとなった。しかしながら、SCE も EC-12 と同様に給与量を下げると、効果が低減することが確認された。

以上のことから、EC-12 が PWD 対策の候補となり得るが、本研究で評価した他の飼料よりも 10 倍程度高価な飼料である。よって、EC-12 を軸として、低濃度の EC-12 でも PWD 軽減効果が得られるように、次いで効果が優れていた SCE を混ぜて給与することとした。混合給与のグループ 2（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（グループ 1）の 1.63 より有意に低減していた（表 8）。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 (表 7)。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、それぞれの効果が增強されることが示唆された。さらに、混合給与のグループ 2 (EC-12; 0.005%、SCE; 0.25%) では、コントロールの排菌数に比べ、1 dpi で 1/100 程度、3 dpi で 1/1000 程度まで有意に減少した。排菌数を低減させることは、農場内での ETEC 汚染拡大を抑制することに繋がり、農場衛生に大きく貢献すると考えられる。

以上の結果から、本研究によって、ETEC による PWD 対策として EC-12、SCE が有用であることを見出した。さらに、両飼料を混ぜて給与することにより、低濃度でも効果が発揮されることを確認し、コストを下げることに成功した。混合給与のグループ 2 (EC-12; 0.005%、SCE; 0.25%) の添加コストは、平均糞便スコア値が近い SCE (1.0%) および EC-12 (0.01%) の半分程度に抑えられた。

表 6. 試験グループの設定

試験グループ	給与飼料	添加濃度 (% , w/w)	頭数
スクリーニング試験			
1	—	—	10
2	フマル酸	1.0	8
3	乳酸	1.0	8
4	EC-12	0.1	5
5	EC-12	0.01	8
6	EC-12	0.005	8
7	SCE	1.0	5
8	SCE	0.5	8
9	SCE	0.1	8
混合給与試験			
1	—	—	8
2	EC-12 / SCE	0.005 / 0.25	8
3	EC-12 / SCE	0.001 / 0.05	8

表 7. 有機酸および EC-12、SCE を飼料に添加した時の PWD 発症評価

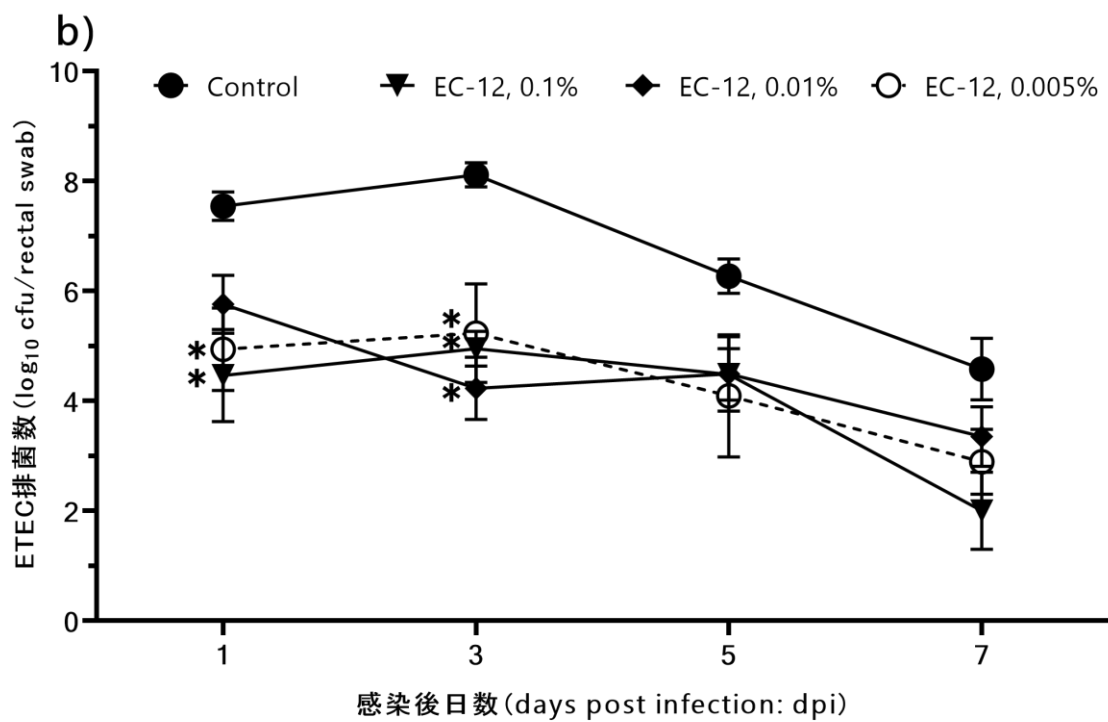
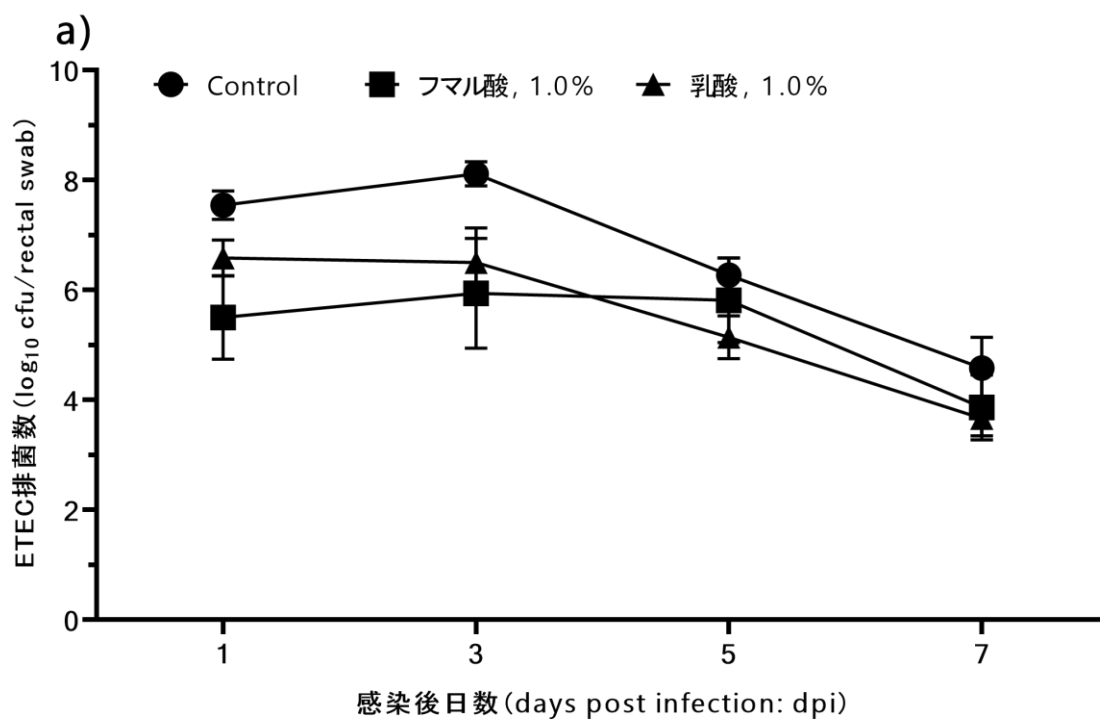
	飼料									
	コントロール	フマル酸	乳酸	EC-12	EC-12	EC-12	EC-12	SCE	SCE	SCE
飼料添加量 (% w/w)	1.0%	1.0%	1.0%	0.1%	0.01%	0.005%	1.0%	0.5%	0.1%	SEM
グループ (頭数)	1 (10)	2 (8)	3 (8)	4 (5)	5 (8)	6 (8)	7 (5)	8 (8)	9 (8)	
平均体重 (Kg)										
導入時	5.35	5.19	5.63	5.60	6.00	4.88	6.30	6.13	5.72	0.12
剖検または斃死時	5.30	6.69	6.50	7.50*	8.13*	6.75	7.70*	6.75	7.13*	0.18
平均一日増体量 (g)	-4.2	125.0*	62.5	158.3*	177.5*	155.8*	116.7*	51.7	117.5*	13.4
平均糞便スコア (1-7 dpi)	1.72	1.09*	0.91*	0.17*	0.66*	0.78*	0.31*	1.30	0.86*	0.05
下痢発症率 (%)	100	100	100	40*	75	86	80	75	100	
発症期間 (日)	5.0	3.8	3.5	1.0*	3.0	2.7	1.8	3.6	3.3	0.3
斃死率 (%)	60.0	25.0	25.0	0*	25.0	12.5	0*	12.5	37.5	

*) 同一項目において、コントロール (グループ 1) に対して有意差があったことを示す ($P < 0.05$)。

表 8. EC-12、SCE を混合給与した時の PWD 発症評価

飼料 飼料添加量 (% w/w) グループ (頭数)	コント ロール 1 (8)	EC-12 / SCE 0.005 / 0.25 2 (8)	EC-12 / SCE 0.001 / 0.05 3 (8)	SEM
平均体重 (Kg)				
導入時	5.06	5.31	5.38	0.23
剖検または斃死時	5.19	7.50*	6.69*	0.26
平均一日増体量 (g)	9.3	166.7*	104.2*	19.3
平均糞便スコア (1-7 dpi)	1.63	0.47*	0.94*	0.10
下痢発症率 (%)	100	71	100	
発症期間 (日)	4.5	2.3	4.0	0.5
斃死率 (%)	50.0	12.5	12.5	

* は同一項目において、コントロールに対して有意差があったことを示す ($P < 0.05$)。



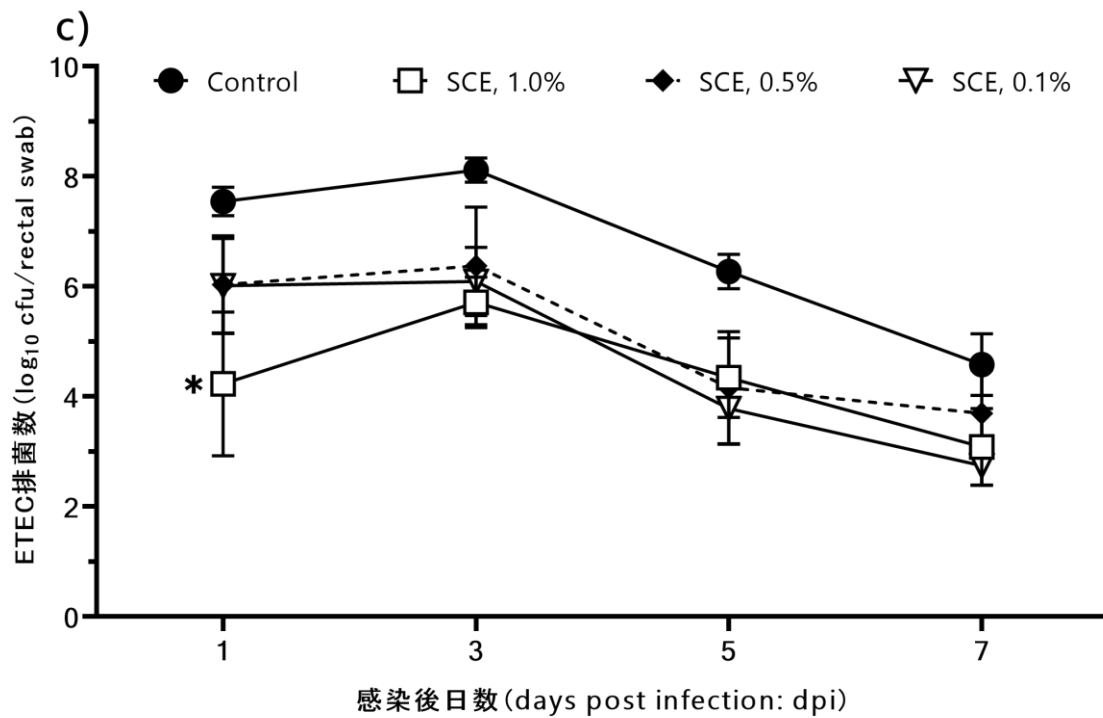


図3. 有機酸および EC-12、SCE を飼料に添加し、ETEC を感染させた時の排菌数

直腸スワブ懸濁液を RifDHL に塗抹し、37°Cで一晩培養することにより、排菌数を算出した。検出限界値は、 2.0×10^2 cfu/rectal swab であり、エラーバーは標準誤差を示す。*は同一感染後日数において、コントロールに対して有意差があったことを示す ($P < 0.05$)。a) コントロールおよび有機酸給与グループ、b) コントロールおよび EC-12 給与グループ、c) コントロールおよび SCE 給与グループを示す。

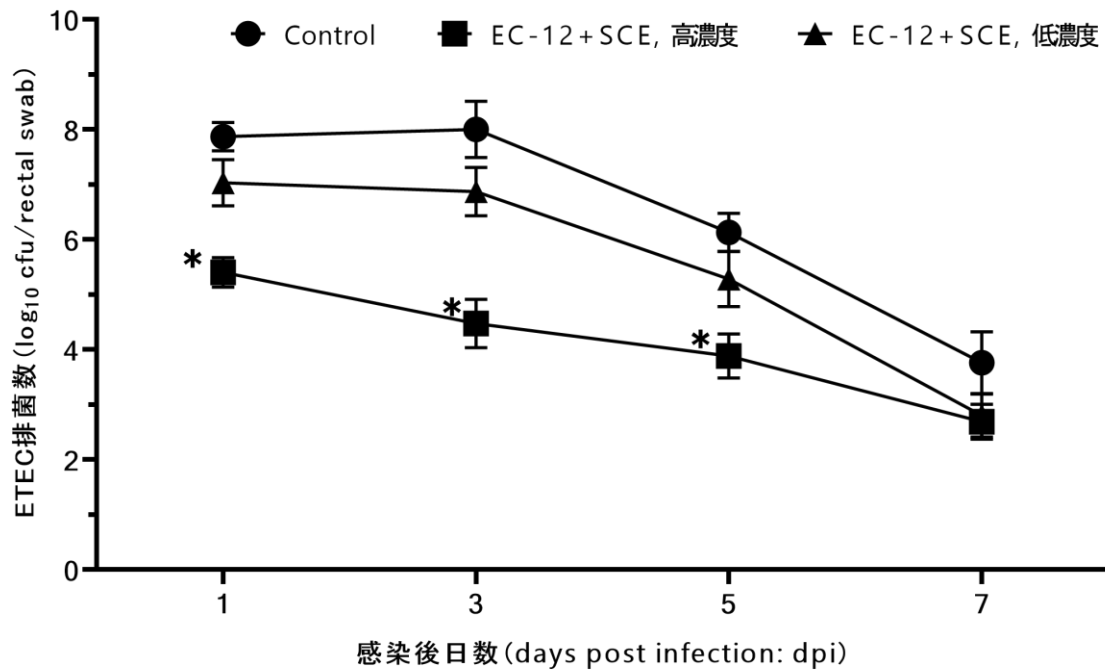


図 4. EC-12、SCE を混ぜて飼料に添加し、ETEC を感染させた時の排菌数

直腸スワブ懸濁液を RifDHL に塗抹し、37°Cで一晩培養することにより、排菌数を算出した。検出限界値は、 2.0×10^2 cfu/rectal swab であり、エラーバーは標準誤差を示す。*は同一感染後日数において、コントロールに対して有意差があったことを示す ($P < 0.05$)。EC-12+SCE, 高濃度は、EC-12 を 0.005% (w/w)、SCE を 0.25% (w/w) 給与を、EC-12+SCE, 低濃度は、EC-12 を 0.001% (w/w)、SCE を 0.05% (w/w) 給与したことを示す。

第三章 新規混合飼料の ETEC 感染予防メカニズムの解析

1. 緒言

哺乳類の腸管内には、生体の細胞数と同程度もしくはそれ以上の微生物が生息しており、腸内細菌叢として知られている。腸内細菌叢は、栄養吸収、代謝、免疫システムの発達、腸管上皮細胞の分化、腸管粘膜バリアの維持など宿主に多様な利益をもたらしており、動物の健康と疾患に深くかかわっている (Bahrndorff *et al.*, 2018, de Vadder *et al.*, 2018, Kabat *et al.*, 2014)。特に、ETEC による PWD のような腸管感染症と腸内細菌叢は関連性が深いことが知られている (Cui *et al.*, 2017, Lalles *et al.*, 2007)。また、腸内細菌叢の働きによって、様々な代謝産物が産生され、それらは宿主の体内にも取り込まれ利用されている。それゆえ、近年、次世代シーケンサーの台頭により、腸内細菌叢の解析がポピュラーなものとなっているが、腸内細菌の働きを理解するためにはメタボローム解析も重要である (Jin *et al.*, 2020, Luise *et al.*, 2019b)。

第二章において、EC-12 および SCE を飼料に添加し、子豚に給与することで、F4 ETEC 感染による PWD 発症を軽減させることが可能となった。しかしながら、EC-12 および SCE を給与することにより、下痢の軽減効果や排菌数の減少など、有効性を示す現象は確認できているものの、それらの作用メカニズムは明らかとなっていない。そこで、本章では、EC-12、

SCE およびこれらの混合品を豚に給与した際の生体内変化を観察し、予防メカニズム解析を試みた。

2. 材料と方法

1) 供試動物

すべての動物実験は、全農家畜衛生研究所動物実験審査委員会（承認番号第 401 号）の承認を得て、JA 全農家畜衛生研究所で実施した。豚（Landrace、雄）は、特定の病原体を持たない SPF 農場（全農畜産サービス関連農場）に由来するものを使用した。試験豚は、*MUC4* 遺伝子型が RS 型の豚を用いた。*MUC4* 遺伝子型の検査は、第一章と同様の方法で実施した。試験豚は離乳日（21 日齢）に全農家畜衛生研究所に移送し、オープンペンによる個別飼育を行った。1 日あたり約 400 g の試験飼料を給与し、水はプッシュドリンカーによる自由摂取とした。

2) 対策飼料給与試験および実験感染

合計 32 頭の雄豚（LL）を、飼料の種類および ETEC 感染の有無に基づいて 8 つのグループに振り分けた（グループ 1（4 頭）：コントロール、基礎飼料のみ、非感染、グループ 2（4 頭）：EC-12 給与、基礎飼料に 0.1%（w/w）添加、非感染、グループ 3（4 頭）：SCE 給与、

基礎飼料に 1.0% (w/w) 添加、非感染、グループ 4 (4 頭) : EC-12 と SCE の混合給与、基礎飼料にそれぞれ 0.005% (w/w)、0.25% (w/w) 添加、非感染、グループ 5 (4 頭) : コントロール、基礎飼料のみ、感染、グループ 6 (4 頭) : EC-12 給与、基礎飼料に 0.1% (w/w) 添加、感染、グループ 7 (4 頭) : SCE 給与、基礎飼料に 1.0% (w/w) 添加、感染、グループ 8 (4 頭) : EC-12 と SCE の混合給与、基礎飼料にそれぞれ 0.005% (w/w)、0.25% (w/w) 添加、感染) (表 9)。

実験感染に用いた感染菌液は、第一章で用いた HA 株を、LB 培地を用いて、37°C で 6 時間振盪培養した。培養後、 $13,570 \times g$ で 15 分間遠心し、培養菌を回収、10% スキムミルクで 10^9 cfu/mL になるよう再懸濁した。

導入時 (21 日齢) から、試験が終了するまで、各グループの飼料を給餌した。試験開始 5 日目 (26 日齢) に、感染グループ (グループ 5-8) へ HA ETEC を 10^9 cfu/頭で経口投与した。感染後 3 日目 (29 日齢) に全頭剖検した。剖検時には、キシラジン (20 mg/mL を 1.5 mL) とミダゾラム (5 mg/mL を 1.0 mL) で鎮静を掛け、ペントバルビタールナトリウム (64.8 mg/mL を 2.0 mL) による深麻酔下で放血殺を行った。

3) 血漿中の総 IgA 測定

試験開始 8 日目に、EDTA 採血管 (TERUMO) を用いて、非感染グループの豚 (グループ 1-4) から採血を実施した。血漿は、血液を $1,200 \times g$ 、10 分間遠心し、上清を回収するこ

とにより得た。血漿サンプルは、試験に供試するまで、 -80°C で保存した。総 IgA の測定は、Pig IgA ELISA キット (Bethyl Laboratories) を用い、付属のマニュアルに従い実施した。

4) 腸内細菌叢の解析

剖検時に、非感染グループ豚(グループ 1-4)の空腸および回腸、盲腸の内容物を採材した。腸管内容物から All Prep PowerViral DNA/RNA キット (QIAGEN) を用い、付属のマニュアルに従い細菌 DNA を抽出した。抽出した DNA は、NanoDrop (Thermo Fisher Scientific) により吸光度比 (A_{260}/A_{280}) を測定し、クオリティチェック (品質と純度) を行った。DNA は、試験に供試するまで -20°C で保存した。細菌 16S rRNA 遺伝子 V3-V4 領域を増幅し、インデックスを各サンプルに付与した。アンプリコン PCR およびインデックス PCR は、Illumina 16S Metagenomic Sequencing Library Preparation guide (Illumina Technical Note, 2014) に従って実施した。Qubit 3.0 蛍光光度計 (Thermo Fisher Scientific) を用いて、蛍光強度を測定し、精製産物の最終的な DNA 濃度を確認した。4 nM に調整したライブラリーを等量混合し、ライブラリープールを作製した。シーケンス解析は、Miseq システム (イルミナ) を用いて、 2×300 bp のペアエンドリードで実施した。得られた配列は、Operational Taxonomic Units (OTU)としてグループ化し、CLC Microbial Genomics Module ソフトウェア(QIAGEN)を用いてクラスタリングした。また、CLC Microbial Genomics Module を用いて、Chao1 (α)および Bray-Curtis (β) 多様性の解析を行った。

5) 血漿中のメタボローム解析

血漿サンプルは、総 IgA 測定に用いたものと同じサンプルを供試した。代謝物の抽出およびメタボローム解析は、ヒューマン・メタボローム・テクノロジーズ (HMT) で行った。前処理として、血漿サンプルをメタノールと混合し、限外濾過することにより、代謝物の抽出を行った。分析は、HMT の施設で Agilent 6210 TOFMS (Agilent Technologies) を搭載した Agilent CE システム (Agilent Technologies) を用いて実施した。

6) リアルタイム PCR による mRNA 相対発現量の測定

剖検時に、空腸組織および回腸組織を採材した。腸管組織から TRIzol 試薬 (Invitrogen) を用い、付属のマニュアルに従い total RNA を抽出した。抽出した RNA は、NanoDrop (Thermo Fisher Scientific) により吸光度比 (A260/A280) を測定し、クオリティチェック (品質と純度) を行った。RNA は、試験に供試するまで -80°C で保存した。Total RNA 2 µg を SuperScript IV VILO with ezDNase enzyme (Thermo Fisher Scientific) を用いて逆転写した。リアルタイム PCR 反応液は、20 倍希釈した cDNA 2 µL に対し、各プライマー (300 nM) (表 10) を 0.1 µL、10 µL の PowerUp SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems) を加え、PCR グレード水を反応液が 20 µL になるよう添加した。増幅反応は、熱変性 (95°C, 3 分)、40 サイクルの増幅反応 (95°C, 15 秒、60°C, 30 秒、72°C, 30 秒) を行った。蛍光取得は 72°C で、融解曲線解析は 65~95°C で行った。全反応の増幅効率 は 92 から 100% の範囲であ

った。相対的な遺伝子発現値は、 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法を用いて算出し、リファレンス遺伝子 (GAPDH) でノーマライズした (Livak *et al.*, 2001)。

7) 統計解析

IgA および Chao 1 指数 (α 多様性)、腸内細菌の相対存在量は、バートレット検定により等分散であることを確認した後、一元配置分散分析を行い、コントロールを対照群とした Dunnett 法による多重比較を行った。メタボローム解析によって得られた代謝物は、各グループを個別に、コントロールに対してウェルチの t 検定を用いて比較した。mRNA 遺伝子発現量は、 ΔCt 値を用いて、バートレット検定により等分散であることを確認した後、一元配置分散分析を行い、Bonferroni/Dunn 法による多重比較を行った。以上の統計解析は、Excel2016 (Microsoft) のアドインソフト Statcel4 (OMS 出版) を用いて実施した。また、 β 多様性の統計解析は、CLC Microbial Genomics Module を用いて、PERMANOVA 解析により実施した。有意水準は $P < 0.05$ とした。

3. 結果

1) 血漿における総 IgA 濃度の比較

EC-12 と SCE を混合給与したグループ (グループ 4) では、血漿中の IgA 濃度が 174.8

μg/mL であり、基礎飼料のみを与えたコントロール（グループ 1）の 87.3 μg/mL よりも有意に上昇していた（図 5）。また、SCE を給与したグループ（グループ 3）でも、IgA 濃度が 162.2 μg/mL と増加傾向を示した。一方、EC-12 を給与したグループ（グループ 2）では、88.0 μg/mL であり、コントロールと同程度であった（図 5）。

2) 空腸および回腸、盲腸での腸内細菌叢の比較

シーケンス解析の結果、クオリティチェック後の総リード数は、7,588,426 リードであり、各サンプルの平均は、161,456 リードであった。解析後、2,361 の異なる OTU が得られた。腸内細菌叢解析において、種の豊富さを表す α 多様性の指数を図 6 に示す。空腸および回腸において、すべての対策飼料給与グループ（グループ 2、3、4）で、コントロールよりも α 多様性の有意な増加が認められた。一方、盲腸の α 多様性は、空腸および回腸よりも高い値であったが、グループ間で有意な違いは認められなかった。菌の構成要素、比率を基にサンプル間を比較した β 多様性比較を図 7 に示す。個々のサンプルが一つずつプロットされている。空腸および回腸において、各グループで近しいクラスターの形成が確認され、すべての対策飼料給与グループ（グループ 2、3、4）で、コントロールと比較して、有意な β 多様性の違いが確認された。一方、盲腸の β 多様性は、グループ間で有意な違いは認められなかった。

空腸および回腸、盲腸において、優占していた上位 5 つの科の相対存在率を表 11 に示す。空腸において、基礎飼料のみを与えたコントロールでは、*Enterobacteriaceae* の相対存在率が

71.25%と最も高く、次いで *Pasteurellaceae* の 22.25%であった。一方、対策飼料給与グループ（グループ 2、3、4）では、*Enterobacteriaceae* の相対存在率がそれぞれ 8.75%、13.5%、15.0%であり、コントロールよりも有意な減少が認められた。また、*Clostridiaceae* の有意な増加が、EC-12 を給与したグループ（グループ 2）（36.33%）で確認された。*Lactobacillaceae* は、コントロールでは 0.03%と、ほとんど検出されなかったのに対し、EC-12 もしくは SCE を給与したグループ（グループ 2、3）で、それぞれ 5.37%、6.81%と有意な増加を示した。EC-12、SCE を混合給与したグループ（グループ 4）では、*Lactobacillaceae* は、2.32%であり、有意な差はなかったものの、増加傾向がみられた。さらに、SCE を給与したグループ（グループ 3）でのみ、*Weissellaceae* の有意な増加がみられた。

回腸において、基礎飼料のみを与えたコントロールでは、*Enterobacteriaceae* の相対存在率が 51.75%と最も高く、次いで *Pasteurellaceae* の 40.75%であり、空腸の細菌叢と同様の傾向を示した。対策飼料給与グループ（グループ 2、3、4）では、*Enterobacteriaceae* の相対存在率がそれぞれ 6.75%、34.25%、4.00%であり、コントロールよりも有意な減少が認められた。また、*Clostridiaceae* および *Lactobacillaceae* の有意な増加が、EC-12 を給与したグループ（グループ 2）（*Clostridiaceae* : 6.15%、*Lactobacillaceae* : 3.34%）で確認された。さらに、SCE および混合給与グループ（グループ 3、4）で、*Lachnospiraceae* の有意な増加（SCE : 1.50%、Mix : 3.25%）が認められた。

盲腸において、優占してみられた菌は、*Prevotellaceae*、*Ruminococcaceae*、*Lachnospiraceae*、

Lactobacillaceae、*Paraprevotellaceae* であり、グループ間で有意な違いは認められなかった。

3) 血漿中の代謝産物量の比較

CE-TOFMS により 239 種類の代謝物（陽イオン性物質 170 種類、陰イオン性物質 69 種類）が検出された。豚における必須アミノ酸（Lys - Val）および、コントロールと比較して有意な増減が認められた代謝物を表 12 に示す。表 12 では、コントロールに対する代謝物の比率が記載されている。

必須アミノ酸は、コントロールに対して 0.59 倍（Mix : Trp）から 1.77 倍（EC-12 : Met）と幅があったが、すべての対策飼料給与グループ（グループ 2、3、4）において、コントロールと有意な差は認められなかった。非必須アミノ酸である Ala は、EC-12 給与グループ（グループ 2）で 1.41 倍、Pro は、EC-12 および混合給与グループ（グループ 2、4）で 1.38 倍と有意な増加を示した。

酪酸の有意な増加が、EC-12 給与グループ（グループ 2）（1.76 倍）で確認された。また、混合給与グループ（グループ 4）でも 1.76 倍（ $P=0.06$ ）と、増加傾向が示された。

有機酸において、EC-12 給与グループ（グループ 2）で、クエン酸が 1.59 倍、イソクエン酸が 1.68 倍と有意な増加を示し、混合給与グループ（グループ 4）で、乳酸が 2.24 倍、クエン酸が 1.38 倍と有意な増加を示した。

メチオニンスルフォキシドは、すべての対策飼料給与グループ（グループ 2、3、4）におい

て、それぞれ 0.39 倍、0.27 倍、0.21 倍と有意に減少した。一方、*N,N*-ジメチルグリシンは、それぞれ 2.84 倍、2.13 倍、2.52 倍と有意に増加した。

さらに、EC-12 給与グループ（グループ 2）で、5-オキソプロリンが 1.38 倍、クレアチニンが 1.25 倍、 α -ケトグルタル酸が 1.53 倍、 N^6 -アセチルリジンが 1.39 倍と有意に増加した。SCE 給与グループ（グループ 3）で、ウレアが 0.65 倍、コール酸が 0.54 倍と有意に減少した。混合給与グループ（グループ 4）で、ウレアが 0.50 倍、 α -ケトグルタル酸が 1.68 倍と有意に増減した。

4) リアルタイム PCR による各遺伝子の mRNA 発現量の相対比較

サイトカインおよび免疫関連遺伝子の mRNA 発現量は、EPEC 非感染グループで（グループ 1-4）は、コントロールと比較して有意な違いが認められなかったため、EPEC 非感染グループのコントロール（グループ 1）および、EPEC 感染グループ（グループ 5-8）の結果を図 8 に示す。非感染のコントロールの各遺伝子の mRNA 発現量を 1 とした時の相対発現量を示す。また、空腸では、すべての試験グループ間で有意な差はみられなかった。それゆえ、以降は回腸について述べる。

IL (Interleukin) -12p40 の mRNA 発現量は、EC-12 給与グループ（グループ 6）で両コントロール（グループ 1、5）に対して、有意に増加した。T-bet、IFN- γ (Interferon-gamma) の mRNA 発現量は、EC-12、混合給与グループ（グループ 6、8）で両コントロール（グルー

プ 1、5) に対して、有意に増加した。また、 $ROR\gamma t$ 、IL-21 の mRNA 発現量は、EC-12 給与グループ (グループ 6) で ETEC 感染のコントロール (グループ 5) に対してのみ、有意に増加した。

AID の mRNA 発現量は、すべての対策飼料給与グループ (グループ 6、7、8) で両コントロール (グループ 1、5) に対して、有意に増加した。一方、pBD の mRNA 発現量は、すべての給与グループ (グループ 6、7、8) で ETEC 感染のコントロール (グループ 5) に対してのみ、有意に増加した。

4. 考察

EC-12、SCE およびそれらの混合品を豚へ給与し、ETEC 感染による PWD 予防メカニズムについて検討した。第二章で明らかになった通り、EC-12、SCE およびそれらの混合品を ETEC 感染前に給与することで PWD 発症軽減効果が得られていることから、これらの対策飼料を給与することにより、生体内で何かしらの変化が生じていると推察された。それゆえ、本章では、対策飼料を給与し、ETEC 非感染の豚を用いて腸内細菌叢、血漿メタボロームの解析等を実施した。一方、腸管におけるサイトカイン等の発現量は、ETEC 感染後に変動することが期待されるため (Wang *et al.*, 2019, Zhu *et al.*, 2014)、リアルタイム PCR による遺伝子発現量の測定には、豚に対策飼料を給与し、ETEC 感染、非感染の豚を用いて実施した。

菌種の豊富さを表す、 α 多様性において、飼料添加の有無にかかわらず、盲腸で最も高い値を示し、空腸・回腸よりも豊富な種類の菌が生息していた。Xiao *et al.* (2018) は、豚の品種によらず、 α 多様性は盲腸で最も高く、次いで直腸、空腸および回腸の順になることを報告しており、本研究結果と一致する。空腸および回腸において、EC-12、SCE およびそれらの混合品を豚へ給与したグループ（グループ 2、3、4）では、 α 多様性がコントロールよりも有意に増加していた（図 6）。これは、対策飼料を給与することにより、生息する菌の種類が増加したことを示す。離乳期以降、日齢があがるにつれて菌の多様性も増加することが報告されていることから（Nowland *et al.*, 2020）、対策飼料を給与した豚では、腸内細菌叢の発達が促進された可能性が示唆された。また、菌叢の構成比を示す β 多様性は、空腸および回腸において、EC-12、SCE およびそれらの混合品を豚へ給与したグループ（グループ 2、3、4）では、コントロールと有意に異なっていたことから、生息する菌の種類が増えただけでなく、構成比をも変化させることが明らかとなった（図 7）。一方、 α 多様性および β 多様性ともに、盲腸においてはコントロールと対策飼料給与グループで明確な違いはみられなかった（図 6、図 7）。これらのことから、EC-12、SCE およびそれらの混合品は、主に小腸で作用することが示唆された。

空腸および回腸において、コントロール（グループ 1）では、*Enterobacteriaceae* 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 給与グループ（グループ 2）では、8.75% および 6.75%、SCE 給与グループ（グループ 3）では、13.50%

および 34.25%、混合給与グループ（グループ 4）では、15.00%および 4.00%と、相対存在率が大幅に低下した（表 11）。一般に、*Enterobacteriaceae* は腸内細菌叢を構成する細菌の中で、初期に定着することが知られており（Favier *et al.*, 2002, Hong *et al.*, 2010）、 α 多様性と同様、対策飼料を給与した豚では、腸内細菌叢の発達が促進された可能性が示唆された。さらに、*Enterobacteriaceae* の構成比が増加することは、腸内細菌叢の乱れ（dysbiosis）を示し得るとされており、dysbiosis を判断するための非侵襲的なマーカーともされている（Ducatelle *et al.*, 2018, Eeckhaut *et al.*, 2016, Hughes *et al.*, 2017）。一方、健康な腸内環境では、病原性微生物が侵入してきたとしても、常在菌の存在により病原性微生物の定着および増殖が抑制される『コロナイゼーション レジスタンス』という現象が確認されている（Kim *et al.*, 2017）。これらのことから、EC-12、SCE およびそれらの混合品を給与することにより、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。

Clostridiaceae および *Lachnospiraceae* は、短鎖脂肪酸である酪酸を産生する菌を多く含んでいるファミリーである（Li *et al.*, 2020b, Wallace *et al.*, 2019）。EC-12 給与グループ（グループ 2）では、*Clostridiaceae* の相対存在率が空腸および回腸において、それぞれ 36.33%および 6.15%と、コントロールよりも有意に高かった（表 11）。また、SCE、混合給与グループ（グループ 3、4）では、*Lachnospiraceae* の相対存在率が回腸において、それぞれ 1.50%および 3.25%と、コントロールよりも有意に高かった（表 11）。そして実際に、血漿中の酪酸

濃度は、コントロールと比較して、EC-12 給与グループ（グループ 2）で有意に高く（1.76 倍）、混合給与グループ（グループ 4）でも 1.76 倍と増加傾向がみとめられた。短鎖脂肪酸には、腸環境の pH 低下や宿主免疫細胞を刺激する働きがあり、病原性細菌の定着を抑制するという報告がある（Caballero *et al.*, 2015）。中でも酪酸には、Caco-2 細胞を用いた研究によって、物理的バリアの指標である経上皮電気抵抗値が増加するという報告もある（Donohoe *et al.*, 2011）。*Clostridiaceae* および *Lachnospiraceae* による酪酸増加は、PWD 予防メカニズムの一助となった可能性が示唆された。

Luise *et al.* (2019b) は、*Bacillus* sp. をプロバイオティクスとして豚に給与し、ETEC 感染に対して予防効果があったことを報告している。また、同じ研究の中で、メタボローム解析も実施しており、*Bacillus* sp. を給与した豚ではグリシンとセリンの減少が確認された。これは、*Bacillus* sp. が芽胞を形成する際にグリシンとセリンを消費した可能性があると述べられている。一方、本研究では、EC-12、SCE および混合給与をしたグループにおいて、必須アミノ酸量に影響を与えなかった（表 12）。この結果は、EC-12、SCE を給与しても、豚に必要な栄養補給が阻害されないことを示すものであった。

血漿中のメチオニンスルフォキシドは、コントロールと比較して、EC-12 給与グループ（グループ 2）で 0.39 倍、SCE 給与グループ（グループ 3）で 0.27 倍、混合給与グループ（グループ 4）で 0.21 倍と全ての対策飼料給与グループで減少した（表 12）。老化した動物の組織中では、メチオニンスルフォキシドの上昇が観察されており、老化による細胞機能低下に関

与している可能性が考えられている (Baldensperger *et al.*, 2020)。アミノ酸の中で、メチオニン残基は最も酸化されやすく、生体の酸化ストレスに素早く反応してメチオニンスルフォキシドを形成する (Wojciechowska *et al.*, 2020)。EC-12、SCE を給与することによって、抗酸化作用が得られることが示唆された。一方、血漿中の *N,N*-ジメチルグリシンは、コントロールと比較して、EC-12 給与グループ (グループ 2) で 2.84 倍、SCE 給与グループ (グループ 3) で 2.13 倍、混合給与グループ (グループ 4) で 2.52 倍と全ての対策飼料給与グループで増加した (表 12)。*N,N*-ジメチルグリシンは、免疫応答改善や、アスリートおよび高齢者における身体的・精神的パフォーマンスの向上、心血管機能を改善させることが報告されている (Graber *et al.*, 1981)。免疫に関して、*N,N*-ジメチルグリシンは B 細胞および T 細胞の機能向上、サイトカインの産生調整に関与している (Lawson *et al.*, 2007)。これらの知見から、EC-12、SCE を給与することによって、子豚の免疫機能が向上した可能性が示唆された。

Tsuruta *et al.* (2013) は、離乳豚に EC-12 を給与することにより、脾臓で IFN- γ の mRNA 発現量が増加すると報告している。本研究においても、EC-12、混合給与グループ (グループ 6、8) で IFN- γ の mRNA 発現量が有意に増加した (図 8)。IL-12 の mRNA 発現増加や、Th1 細胞や 1 型自然リンパ球 (Innate lymphoid cell; ILC1) の転写因子である T-bet の mRNA 発現増加もみられたことから、IFN- γ は Th1 細胞もしくは、ILC1 から産生されたと考えられた。IFN- γ は、IFN- α や IFN- β より強い抗ウイルス活性を持っており (Hori *et al.*, 2002)、さらには、サルモネラのような病原体の侵入を防ぐことが報告されている (Mizuno, 2004)。

IL-17A、IL-17F、IL-21、IL-22 は ROR γ t を転写因子とする Th17 細胞や、ILC3 から産生され、細胞外細菌に対する防御において重要な役割を果たしている。特に、EC-12 給与グループ（グループ 6）で有意に増加した IL-21 の腸管免疫における中心的な役割は、ホメオスタシス維持、抗菌ペプチドの分泌誘導、ケモカイン発現トリガーである（Luo *et al.*, 2015）。

AID は、分泌型 IgA を産生する B 細胞のクラススイッチに必須の酵素であり、すべての対策飼料給与グループ（グループ 6、7、8）で有意に mRNA 発現量が増加した（図 8）。一方、血漿中の IgA 濃度は、SCE、混合給与グループ（グループ 3、4）でのみ有意に増加した（図 5）。これらの相違は、IgA 測定を腸管内容物ではなく、血漿で実施したことや、感染、非感染の影響によるものではないかと推察された。

以上の結果から、EC-12 および SCE を子豚に給与すると、*Enterobacteriaceae* の相対存在率の低下、酪酸を産生する *Clostridiaceae* および *Lachnospiraceae* の相対存在率の増加といった腸内環境を最適化する整腸作用（特に小腸）、免疫賦活機能が期待される *N,N*-ジメチルグリシンの増加などがみられた。これらの変化によって、ETEC による PWD 発症が軽減されたことが示唆された。

表 9. 試験グループの設定

試験グループ	給与飼料	添加濃度 (% , w/w)	頭数	ETEC 感染
1	—	—	4	無し
2	EC-12	0.1	4	無し
3	SCE	1.0	4	無し
4	EC-12 / SCE	0.005 / 0.25	4	無し
5	—	—	4	有り
6	EC-12	0.1	4	有り
7	SCE	1.0	4	有り
8	EC-12 / SCE	0.005 / 0.25	4	有り

表 10. リアルタイム PCR 供試プライマー

遺伝子	プライマー配列 (5' to 3')	PCR 産物 (bp)	引用文献
IL-12p35	F: TGCAGGCTCTGAATTTCAAC R: CACGAATTCTGAAGGCATGA	111	Daudelin <i>et al.</i> , 2011
IL-12p40	F: CTTCATCAGGGACATCATCAAAC R: GGTCCGTGAAGAGTTTATCTTTCT	196	Daudelin <i>et al.</i> , 2011
T-bet	F: TCAATCCTACTGCCCACTAC R: TTAGGAGACTCTGGGTGAAC	151	Luo <i>et al.</i> , 2015
IFN- γ	F: GAGCCAAATTGTCTCCTTCTACT R: CTGACTTCTCTTCCGCTTTCT	262	Luo <i>et al.</i> , 2015
IL-23p19	F: CCAAGAGAAGAGGGAGATGATGA R: TGCAAGCAGGACTGACTGTTGT	107	Luo <i>et al.</i> , 2015
ROR γ t	F: TTCAGTACGTGGTGGAGTTC R: TGTGGTTGTCAGCGTTGTAG	141	Luo <i>et al.</i> , 2015
IL-17A	F: ACTCCAAACGCTTCACCTCAC R: AGCCCACTGTCACCATCACTT	234	Luo <i>et al.</i> , 2015
IL-17F	F: GAGGCAGCAGCTCGGAAAAT R: TCCCGGGTGATGTTGTAATCC	173	Daudelin <i>et al.</i> , 2011
IL-22	F: TTGACCAGTCCAACCTCCAGCAGC R: GCAGCGCTCTCTCATATTGACTCC	143	Luo <i>et al.</i> , 2015
IL-21	F: GGCACAGTGGCCCATAAATC R: GCAGCAATTCAGGGTCCAAG	124	Luo <i>et al.</i> , 2015
AID	F: AGAAGTTTCAAAGCCTGGGAG R: TCAACCTCATAACAGGGGCAAA	92	Luo <i>et al.</i> , 2015
pBD	F: CCGACCACTACATATGTGCCAAGA R: TGCCACTGTAACAGGTCCCTTCAA	93	Daudelin <i>et al.</i> , 2011
GAPDH	F: GGGCATGAACCATGAGAAGT R: AAGCAGGGATGATGTTCTGG	230	Luo <i>et al.</i> , 2015

IL: Interleukin, T-bet: T-Box protein expressed in T cells, IFN: Interferon, ROR: Retinoic acid-related orphan receptor, AID: activation-induced cytidine deaminase, pBD: porcine beta-defensin

表 11. 各部位における腸内細菌の相対存在率 (%)

	試験グループ				SEM
	Cont	EC-12	SCE	Mix	
空腸					
<i>Enterobacteriaceae</i>	71.25	8.75*	13.50*	15.00*	6.67
<i>Pasteurellaceae</i>	22.25	22.25	21.75	13.9	4.70
<i>Clostridiaceae</i>	0.18	36.33*	1.15	0.05	4.83
<i>Lactobacillaceae</i>	0.03	5.37*	6.81*	2.32	0.92
<i>Weeksellaceae</i>	0	0.55	15.06*	0.01	2.00
Others	6.29	26.75	41.73	68.77	—
回腸					
<i>Enterobacteriaceae</i>	51.75	6.75*	34.25*	4.00*	5.12
<i>Pasteurellaceae</i>	40.75	65.00*	43.75	54.25*	2.89
<i>Lachnospiraceae</i>	0.01	0.18	1.50*	3.25*	0.35
<i>Clostridiaceae</i>	0.31	6.15*	0.43	2.00	0.74
<i>Lactobacillaceae</i>	0.04	3.34*	0.22	0.24	0.42
Others	7.14	18.58	19.85	36.26	—
盲腸					
<i>Prevotellaceae</i>	17.75	18.75	17.25	17.75	1.2
<i>Ruminococcaceae</i>	15.25	15.25	17.75	16.00	0.95
<i>Lachnospiraceae</i>	11.25	11.25	13.00	13.75	0.84
<i>Lactobacillaceae</i>	11.25	9.00	7.00	10.75	1.94
<i>Paraprevotellaceae</i>	10.50	8.75	9.75	9.75	1.35
Others	34.00	37.00	35.25	32.00	—

*) 同一項目において、コントロール (Cont) に対して有意差があったことを示す ($P < 0.05$)。

表 12. 血漿代謝物の比較

代謝物	比率 (vs Cont)			Pvalue (vs Cont)		
	EC-12	SCE	Mix	EC-12	SCE	Mix
Lys	1.59	1.01	1.00	0.15	0.97	0.99
His	1.45	1.67	1.37	0.14	0.06	0.2
Ile	1.07	0.78	0.84	0.53	0.16	0.17
Leu	0.99	0.70	0.72	0.95	0.10	0.05
Met	1.77	1.75	1.29	0.09	0.10	0.4
Cys	0.69	0.75	0.84	0.16	0.24	0.54
Phe	1.06	1.11	0.87	0.69	0.73	0.08
Tyr	1.47	1.63	0.80	0.06	0.48	0.05
Thr	1.08	0.71	0.74	0.77	0.21	0.36
Trp	1.03	0.86	0.59	0.87	0.54	0.08
Val	0.95	0.76	0.82	0.69	0.11	0.17
Ala	1.41*	1.08	1.44	0.02	0.81	0.13
Pro	1.38*	0.95	1.38*	0.02	0.57	0.03
酪酸	1.76*	1.52	1.76	0.02	0.22	0.06
乳酸	1.81	1.91	2.24*	0.09	0.13	0.01
クエン酸	1.59*	1.03	1.38*	0.02	0.81	0.02
イソクエン酸	1.68*	0.99	1.38	0.03	0.92	0.06
メチオニンスルフォキシド	0.39*	0.27*	0.21*	0.01	<0.01	0.01
<i>N,N</i> -ジメチルグリシン	2.84*	2.13*	2.52*	0.01	0.02	0.04
5-オキソプロリン	1.38*	1.13	1.25	0.04	0.26	0.27
クレアチニン	1.25*	0.97	1.15	0.04	0.73	0.1
ウレア	0.79	0.65*	0.50*	0.26	0.02	<0.01
α -ケトグルタル酸	1.53*	1.46	1.68*	0.04	0.14	0.04
コール酸	2.14	0.54*	2.17	0.48	0.03	0.16
<i>N</i> ⁶ -アセチルリジン	1.39*	0.92	1.00	0.01	0.63	0.98

*) 同一項目において、コントロール (Cont) に対して有意差があったことを示す ($P < 0.05$)。

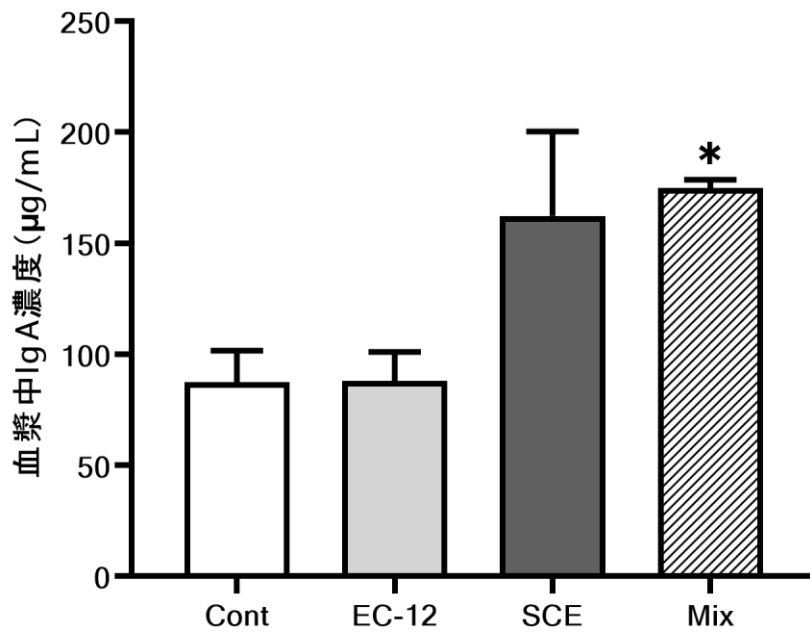


図5. 各飼料を給与した時の血漿 IgA 濃度の比較

ETEC 非感染グループ（グループ 1-4）の血漿を用いて、間接 ELISA により IgA 濃度を測定した。エラーバーは標準誤差を示す。*はコントロール（Cont）に対して有意差があったことを示す（ $P < 0.05$ ）。

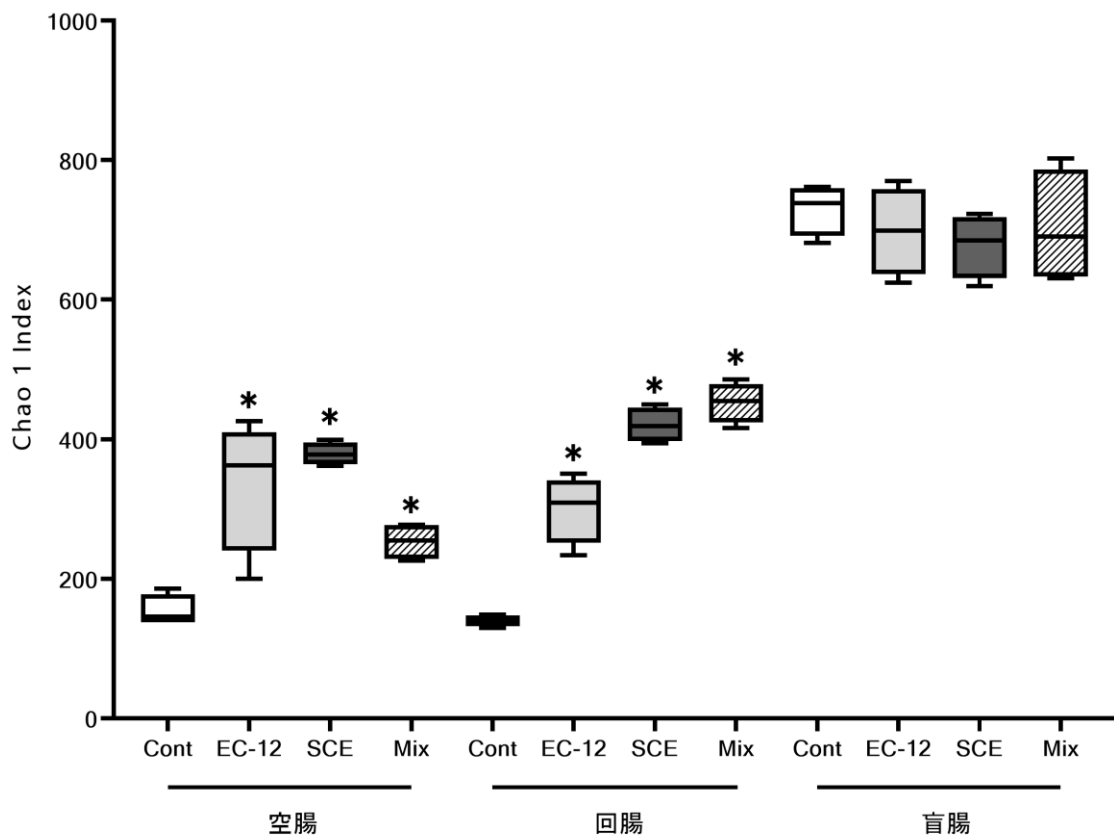


図 6. 各飼料を給与した時の腸管部位毎の α 多様性の比較

ETEC 非感染グループ (グループ 1-4) の腸管内容物を用いて、次世代シーケンサーによる 16S rRNA 解析を実施した。得られたシーケンス情報から Chao 1 指数を算出し、箱ひげ図で示す。*はコントロール (Cont) に対して有意差があったことを示す ($P < 0.05$)。

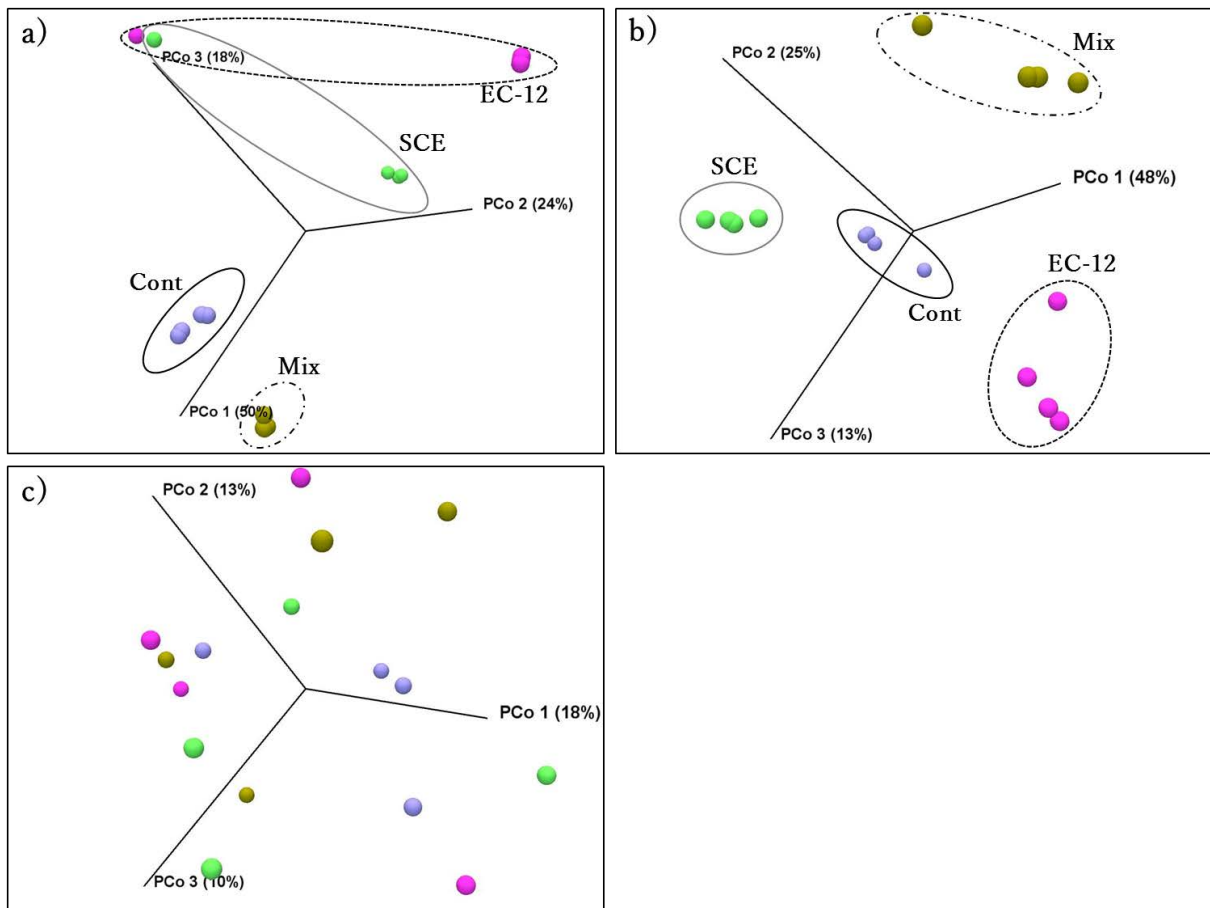


図7. 各飼料を給与した時の腸管部位毎のβ多様性の比較

ETEC 非感染グループ (グループ 1-4) の腸管内容物を用いて、次世代シーケンサーによる 16S rRNA 解析を実施した。得られたシーケンス情報から Bray-Curtis の類似度を算出し、サンプル毎にプロットした。a) 空腸、b) 回腸、c) 盲腸のサンプルを示す。青はコントロール (Cont) を、ピンクは EC-12 給与を、緑は SCE 給与を、黄は混合給与 (Mix) グループを示す。円で囲ったグループは、Cont に対して有意差があったことを示す ($P < 0.05$)。

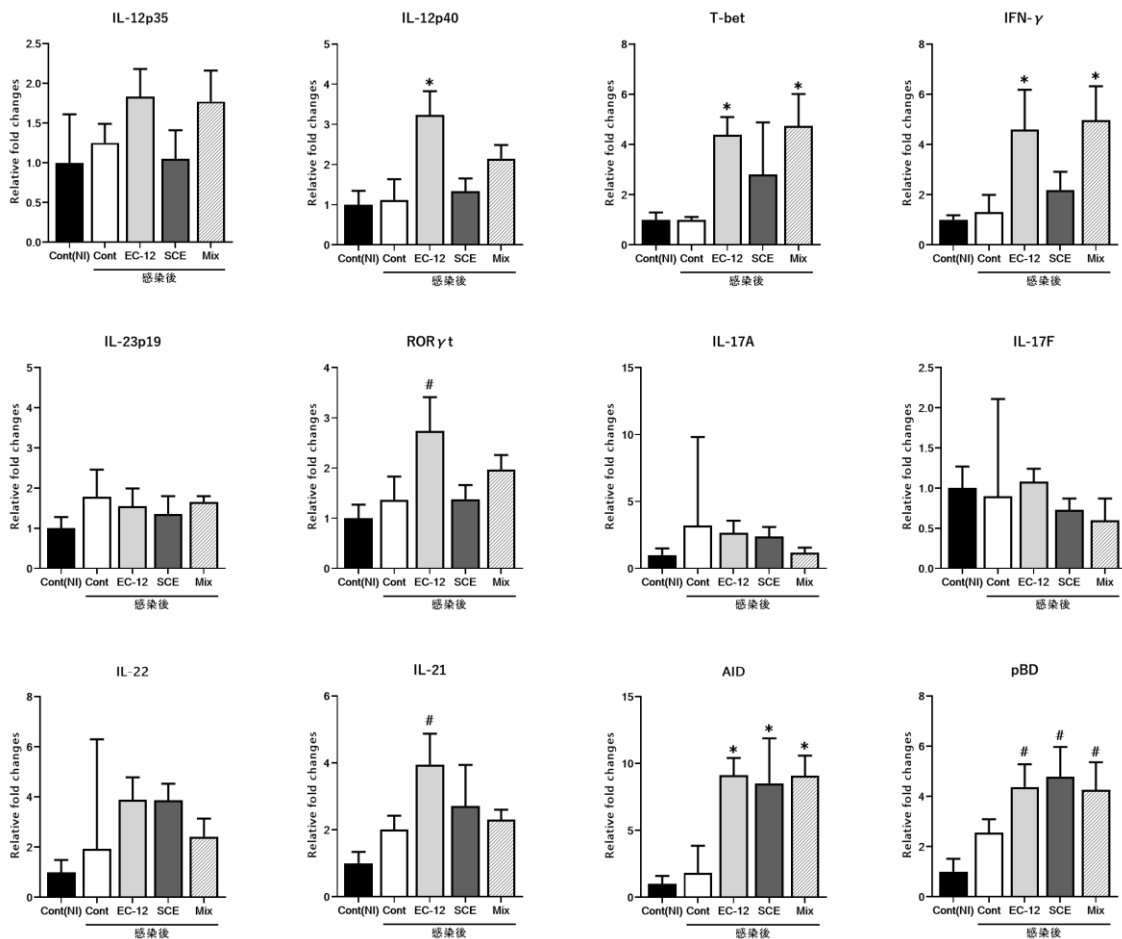


図 8. リアルタイム PCR による各遺伝子の mRNA 発現量の相対比較

ETEC 非感染、感染グループ（グループ 1、5-8）の腸管を用いて、リアルタイム PCR による mRNA 発現量を解析した。エラーバーは標準誤差を示す。*はコントロール（NI:非感染、感染）に対して有意差があったことを示す ($P < 0.05$)。#はコントロール（NI:非感染）に対して有意差があったことを示す ($P < 0.05$)。

総合考察

子豚の PWD は、離乳後 3～10 日で主に 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。一般に、ETEC のような細菌による 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。

PWD 対策飼料をより正確に評価するために、豚側の要因として *MUC4* 遺伝子型の確認、細菌側の要因として細胞付着能を確認し、*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、全ての豚に下痢の発症が可能な感染モデルを確立した。感染モデルの確立により、実験動物数をむやみに増加させることなく、対策飼料の評価、開発が可能となり、動物福祉にも貢献できると考えられる。また、本モデルは豚の品種によらず実施可能なものであり、供試豚の確保が容易になったと思われる。

対策飼料の評価を実施した試験では、有機酸（フマル酸、乳酸）、EC-12、SCE すべての対策飼料で糞便スコアの低下が確認された。しかしながら、有機酸では糞便スコアの低下が EC-12 や SCE よりも弱く、排菌数低減効果は見られなかったため、PWD 対策として十分な効果があるとは考えらず、EC-12 と SCE が PWD 対策に有用であると見出した。ただし、EC-12

は非常に高価な対策飼料であるため、高濃度で使用するとコストパフォーマンスが悪いと考えられる。それゆえ、比較的安価で PWD 軽減効果のあった SCE を EC-12 と共に給与することにより、低濃度の EC-12 でも十分に効果を発揮できる混合飼料を開発した。効果と費用を考慮して開発を進めることは、畜産経営の観点から非常に重要なことであり、開発品のコストを下げられたことは、畜産現場にとって有用なものとなり得ると考えられる。

EC-12 と SCE は、子豚の小腸において *Enterobacteriaceae* の相対存在率を減少させ、 α 多様性を増加させるといった整腸効果が確認された。整った腸内環境では、病原性のある細菌の定着を予防できる可能性を示しており、今後は腸内細菌叢をダイレクトに変更させる糞便移植なども PWD 対策に有用であると思われる。ただし、どのような細菌叢が最も良い状態なのか、移植後に定着できるのかなど、さらなる研究が必要であると考えられる。これらのように、次世代シーケンサーを用いた腸内細菌叢解析は、腸内環境を確認するためには有用であることが示された。一方、盲腸では細菌叢の違いを捉えることができず、非侵襲的な糞便を用いた解析でも違いを見出すことができるかは不明である。新たな評価方法を確立し、糞便を解析に用いることができれば経時的な変化を確認することができると考えられ、さらなる解析が可能になると考えられる。

EC-12 と SCE を給与することにより、血漿代謝物において *N,N*-ジメチルグリシンの増加が共通して確認された。*N,N*-ジメチルグリシンはヒトや馬ではサプリメントが市販されていることから、豚においても直接 *N,N*-ジメチルグリシンを投与することにより、より即時的な

免疫増強効果が期待される。

EC-12 と SCE を混ぜた混合飼料を開発したことにより、抗菌剤の乱用を防ぎ、薬剤耐性菌の出現を抑えながらも生産性維持、向上を目指せると思われる。

結論

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。

謝辞

本論文を作成するに当たり、多くの方にご支援いただきましたことに深甚の謝意を表します。

論文作成に当たり、終始懇切なる御指導ならびに御校閲を賜りました、大阪府立大学大学院生命環境科学研究科教授 向本 雅郁先生、同講師 幸田 知子先生に深く感謝いたします。

本論文をまとめるに当たり、貴重なご意見、ご指導賜りました、大阪府立大学大学院生命環境科学研究科教授 山崎 伸二先生ならびに同教授 山岸 則夫先生、兵庫県立大学大学院環境人間学研究科准教授 有満 秀幸先生に御礼申し上げます。

本研究の機会を与えて下さり、研究を進めるにあたりご協力と貴重なご助言を賜った全農家畜衛生研究所 今井 康雄所長および研究開発室 大角 貴幸室長をはじめとする研究開発室職員各位、クリニック北海道分室 並松 孝憲室長（前研究開発室長）ならびに全農ビジネスサポート株式会社 佐倉営業所の皆様に心より感謝致します。

引用文献

- Amezcuca, R., Friendship, R. M., Dewey, C. E., Gyles, C., & Fairbrother, J. M. 2002. Presentation of postweaning *Escherichia coli* diarrhea in southern Ontario, prevalence of hemolytic *E. coli* serogroups involved, and their antimicrobial resistance patterns. Canadian journal of veterinary research = Revue canadienne de recherche veterinaire. 66(2), 73–78.
- Badia, R., Zanello, G., Chevaleyre, C., Lizardo, R., Meurens, F., Martínez, P., Brufau, J., & Salmon, H. 2012. Effect of *Saccharomyces cerevisiae* var. Boulardii and β -galactomannan oligosaccharide on porcine intestinal epithelial and dendritic cells challenged in vitro with *Escherichia coli* F4 (K88). Veterinary research. 43(1), 4.
- Bahrndorff, S., de Jonge, N., Hansen, J. K., Lauritzen, J., Spanggaard, L. H., Sørensen, M. H., Yde, M., & Nielsen, J. L. 2018. Diversity and metabolic potential of the microbiota associated with a soil arthropod. Scientific reports. 8(1), 2491.
- Baldensperger, T., Eggen, M., Kappen, J., Winterhalter, P. R., Pfirrmann, T., & Glomb, M. A. 2020. Comprehensive analysis of posttranslational protein modifications in aging of subcellular compartments. Scientific reports. 10(1), 7596.
- Bosi, P., Merialdi, G., Sarli, G., Casini, L., Gremokolini, C., Preziosi, R., ... & Trevisi, P. 2003. Effects of doses of ZnO or Zn-glutamate on growth performance, gut characteristics, health

- and immunity of early-weaned pigs orally challenged with *E. coli* K88. Italian Journal of Animal Science. 2(sup1), 361-363.
- Caballero, S., & Pamer, E. G. 2015. Microbiota-mediated inflammation and antimicrobial defense in the intestine. Annual review of immunology. 33, 227–256.
- Casewell, M., Friis, C., Marco, E., McMullin, P., & Phillips, I. 2003. The European ban on growth-promoting antibiotics and emerging consequences for human and animal health. The Journal of antimicrobial chemotherapy. 52(2), 159–161.
- Choi, C., Kwon, D., & Chae, C. 2001. Prevalence of the enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 gene and its relationship with fimbrial and enterotoxin genes in *E. coli* isolated from diarrheic piglets. Journal of veterinary diagnostic investigation : official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc. 13(1), 26–29.
- Cui, Z. H. U., Li, W. A. N. G., WEI, S. Y., Zhuang, C. H. E. N., ZHENG, C. T., & JIANG, Z. Y. 2017. Effect of yeast *Saccharomyces cerevisiae* supplementation on serum antioxidant capacity, mucosal sIgA secretions and gut microbial populations in weaned piglets. Journal of integrative agriculture. 16(9), 2029-2037.
- Daudelin, J. F., Lessard, M., Beaudoin, F., Nadeau, E., Bissonnette, N., Boutin, Y., Brousseau, J. P., Lauzon, K., & Fairbrother, J. M. 2011. Administration of probiotics influences F4

- (K88)-positive enterotoxigenic *Escherichia coli* attachment and intestinal cytokine expression in weaned pigs. *Veterinary research*. 42(1), 69.
- de Vadder, F., & Mithieux, G. 2018. Gut-brain signaling in energy homeostasis: the unexpected role of microbiota-derived succinate. *The Journal of endocrinology*. 236(2), R105–R108.
- Dębski B. 2016. Supplementation of pigs diet with zinc and copper as alternative to conventional antimicrobials. *Polish journal of veterinary sciences*. 19(4), 917–924
- Donohoe, D. R., Garge, N., Zhang, X., Sun, W., O'Connell, T. M., Bunger, M. K., & Bultman, S. J. 2011. The microbiome and butyrate regulate energy metabolism and autophagy in the mammalian colon. *Cell metabolism*. 13(5), 517–526.
- Dubreuil, J. D., Isaacson, R. E., Schifferli, D. M. 2016. Animal Enterotoxigenic *Escherichia coli*. *EcoSal Plus*. 7(1)
- Ducatelle, R., Goossens, E., De Meyer, F., Eeckhaut, V., Antonissen, G., Haesebrouck, F., & Van Immerseel, F. 2018. Biomarkers for monitoring intestinal health in poultry: present status and future perspectives. *Veterinary research*. 49(1), 43.
- Eeckhaut, V., Wang, J., Van Parys, A., Haesebrouck, F., Joossens, M., Falony, G., Raes, J., Ducatelle, R., & Van Immerseel, F. 2016. The Probiotic *Butyricoccus pullicaecorum* Reduces Feed Conversion and Protects from Potentially Harmful Intestinal Microorganisms and Necrotic Enteritis in Broilers. *Frontiers in microbiology*. 7, 1416.

- El-Abasy, M., Motobu, M., Shimura, K., Na, K. J., Kang, C. B., Koge, K., Onodera, T., & Hirota, Y. 2002. Immunostimulating and growth-promoting effects of sugar cane extract (SCE) in chickens. *The Journal of veterinary medical science*. 64(11), 1061–1063.
- El-Abasy, M., Motobu, M., Na, K. J., Shimura, K., Nakamura, K., Koge, K., Onodera, T., & Hirota, Y. 2003. Protective effects of sugar cane extracts (SCE) on *Eimeria tenella* infection in chickens. *The Journal of veterinary medical science*. 65(8), 865–871.
- Fairbrother, J. M., Nadeau, É., & Gyles, C. L. 2005. *Escherichia coli* in postweaning diarrhea in pigs: an update on bacterial types, pathogenesis, and prevention strategies. *Animal health research reviews*. 6(1), 17.
- Favier, C. F., Vaughan, E. E., De Vos, W. M., & Akkermans, A. D. 2002. Molecular monitoring of succession of bacterial communities in human neonates. *Applied and environmental microbiology*. 68(1), 219–226.
- Field, D., Baghou, I., Rea, M. C., Gardiner, G. E., Ross, R. P., & Hill, C. 2017. Nisin in Combination with Cinnamaldehyde and EDTA to Control Growth of *Escherichia coli* Strains of Swine Origin. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*. 6(4), 35.
- Goetstouwers, T., Van Poucke, M., Coppieters, W., Nguyen, V. U., Melkebeek, V., Coddens, A., Van Steendam, K., Deforce, D., Cox, E., & Peelman, L. J. 2014. Refined candidate region for F4ab/ac enterotoxigenic *Escherichia coli* susceptibility situated proximal to MUC13 in

pigs. PloS one. 9(8), e105013.

Graber, C. D., Goust, J. M., Glassman, A. D., Kendall, R., & Loadholt, C. B. 1981.

Immunomodulating properties of dimethylglycine in humans. The Journal of infectious diseases. 143(1), 101–105.

Hong, P. Y., Lee, B. W., Aw, M., Shek, L. P., Yap, G. C., Chua, K. Y., & Liu, W. T. 2010.

Comparative analysis of fecal microbiota in infants with and without eczema. PloS one. 5(4), e9964.

Hori, T., Kiyoshima, J., Shida, K., & Yasui, H. 2002. Augmentation of cellular immunity and

reduction of influenza virus titer in aged mice fed *Lactobacillus casei* strain Shirota. Clinical and diagnostic laboratory immunology. 9(1), 105–108.

Hosoya, S., Villena, J., Shimazu, T., Tohno, M., Fujie, H., Chiba, E., Shimosato, T., Aso, H.,

Suda, Y., Kawai, Y., Saito, T., Alvarez, S., Ikegami, S., Itoh, H., & Kitazawa, H. 2011.

Immunobiotic lactic acid bacteria beneficially regulate immune response triggered by poly(I:C) in porcine intestinal epithelial cells. Veterinary research. 42(1), 111.

Hughes, E. R., Winter, M. G., Duerkop, B. A., Spiga, L., Furtado de Carvalho, T., Zhu, W.,

Gillis, C. C., Büttner, L., Smoot, M. P., Behrendt, C. L., Cherry, S., Santos, R. L., Hooper, L.

V., & Winter, S. E. 2017. Microbial Respiration and Formate Oxidation as Metabolic

Signatures of Inflammation-Associated Dysbiosis. Cell host & microbe. 21(2), 208–219.

- Hur, J., Lee, K. M., & Lee, J. H. 2011. Age-dependent competition of porcine enterotoxigenic *E. coli* (ETEC) with different fimbria genes - short communication. *Acta veterinaria Hungarica*. 59(4), 411–417.
- Ikwap, K., Larsson, J., Jacobson, M., Owiny, D. O., Nasinyama, G. W., Nabukenya, I., Mattsson, S., Aspan, A., & Erume, J. 2016. Prevalence of adhesin and toxin genes in *E. coli* strains isolated from diarrheic and non-diarrheic pigs from smallholder herds in northern and eastern Uganda. *BMC microbiology*. 16(1), 178.
- Jensen, G. M., Frydendahl, K., Svendsen, O., Jørgensen, C. B., Cirera, S., Fredholm, M., Nielsen, J. P., & Møller, K. 2006. Experimental infection with *Escherichia coli* O149:F4ac in weaned piglets. *Veterinary microbiology*. 115(1-3), 243–249.
- Jin, J., Jia, J., Zhang, L., Chen, Q., Zhang, X., Sun, W., Ma, C., Xu, F., Zhan, S., Ma, L., Zhou, G., & Chen, Q. 2020. Jejunal inflammatory cytokines, barrier proteins and microbiome-metabolome responses to early supplementary feeding of Bamei suckling piglets. *BMC microbiology*. 20(1), 169.
- Kabat, A. M., Srinivasan, N., & Maloy, K. J. 2014. Modulation of immune development and function by intestinal microbiota. *Trends in immunology* 35(11), 507–517.
- Katsuda, K., Kohmoto, M., Kawashima, K., & Tsunemitsu, H. 2006. Frequency of enteropathogen detection in suckling and weaned pigs with diarrhea in Japan. *Journal of*

- veterinary diagnostic investigation. 18(4), 350–354.
- Kim, S., Covington, A., & Pamer, E. G. 2017. The intestinal microbiota: Antibiotics, colonization resistance, and enteric pathogens. *Immunological reviews*. 279(1), 90–105.
- Kluge, H., Broz, J., & Eder, K. 2006. Effect of benzoic acid on growth performance, nutrient digestibility, nitrogen balance, gastrointestinal microflora and parameters of microbial metabolism in piglets. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*. 90(7 - 8), 316-324.
- Kusumoto, M., Ogura, Y., Gotoh, Y., Iwata, T., Hayashi, T., & Akiba, M. 2016. Colistin-Resistant mcr-1-Positive Pathogenic *Escherichia coli* in Swine, Japan, 2007-2014. *Emerging infectious diseases*. 22(7), 1315–1317.
- Lalles, J. P., Bosi, P., Smidt, H., & Stokes, C. R. 2007. Nutritional management of gut health in pigs around weaning. *Proceedings of the Nutrition Society*. 66(2), 260-268.
- Lawson, B. R., Belkowski, S. M., Whitesides, J. F., Davis, P., & Lawson, J. W. 2007. Immunomodulation of murine collagen-induced arthritis by N, N-dimethylglycine and a preparation of *Perna canaliculus*. *BMC complementary and alternative medicine*. 7, 20.
- Li, S., Wang, L., Zhou, Y., & Miao, Z. 2020a. Prevalence and characterization of virulence genes in *Escherichia coli* isolated from piglets suffering post-weaning diarrhoea in Shandong Province, China. *Veterinary medicine and science*. 6(1), 69–75.

- Li, R., Jiang, D., Zheng, M., Tian, P., Zheng, M., & Xu, C. 2020b. Microbial community dynamics during alfalfa silage with or without clostridial fermentation. *Scientific reports*. 10(1), 17782.
- Liang, W., Ji, L., Zhang, Y., Zhen, Y., Zhang, Q., Xu, X., & Liu, B. 2017. Transcriptome Differences in Porcine Alveolar Macrophages from Tongcheng and Large White Pigs in Response to Highly Pathogenic Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV) Infection. *International journal of molecular sciences*. 18(7), 1475.
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *methods*. 25(4), 402-408.
- Lo, D. Y., Chen, T. H., Chien, M. S., Koge, K., Hosono, A., Kaminogawa, S., & Lee, W. C. 2005. Effects of sugar cane extract on the modulation of immunity in pigs. *The Journal of veterinary medical science*. 67(6), 591–597.
- Lo, D. Y., Chien, M. S., Yeh, K. S., Koge, K., Lin, C. C., Hsuan, S. L., & Lee, W. C. 2006. Effects of sugar cane extract on pseudorabies virus challenge of pigs. *The Journal of veterinary medical science*. 68(3), 219–225.
- Luisse, D., Lauridsen, C., Bosi, P., & Trevisi, P. 2019a. Methodology and application of *Escherichia coli* F4 and F18 encoding infection models in post-weaning pigs. *Journal of animal science and biotechnology*. 10, 53.

- Luise, D., Bertocchi, M., Motta, V., Salvarani, C., Bosi, P., Luppi, A., Fanelli, F., Mazzoni, M., Archetti, I., Maiorano, G., Nielsen, B., & Trevisi, P. 2019b. *Bacillus* sp. probiotic supplementation diminish the *Escherichia coli* F4ac infection in susceptible weaned pigs by influencing the intestinal immune response, intestinal microbiota and blood metabolomics. *Journal of animal science and biotechnology*. 10, 74.
- Luo, Y., Van Nguyen, U., de la Fe Rodriguez, P. Y., Devriendt, B., & Cox, E. 2015. F4+ ETEC infection and oral immunization with F4 fimbriae elicits an IL-17-dominated immune response. *Veterinary research*. 46, 121.
- Luppi, A., Gibellini, M., Gin, T., Vangroenweghe, F., Vandenbroucke, V., Bauerfeind, R., Bonilauri, P., Labarque, G., & Hidalgo, Á. 2016. Prevalence of virulence factors in enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from pigs with post-weaning diarrhoea in Europe. *Porcine health management*. 2, 20.
- Mitsuoka T. 2014. Development of functional foods. *Bioscience of microbiota, food and health*. 33(3), 117–128.
- Mizuno, Y. 2004. Host defense mechanisms against *Salmonella* infection. *Nihon Rinsho Men'eki Gakkai kaishi= Japanese journal of clinical immunology*. 27(6), 367.
- Mukhopadhyaya, A., O'Doherty, J. V., & Sweeney, T. 2019. A combination of yeast beta-glucan and milk hydrolysate is a suitable alternative to zinc oxide in the race to alleviate post-weaning

- diarrhoea in piglets. *Scientific reports*. 9(1), 616.
- Nagy, B., Casey, T. A., Whipp, S. C., & Moon, H. W. 1992. Susceptibility of porcine intestine to pilus-mediated adhesion by some isolates of piliated enterotoxigenic *Escherichia coli* increases with age. *Infection and immunity*. 60(4), 1285–1294.
- Nakasone, Y., Takara, K., Wada, K., Tanaka, J., Yogi, S., & Nakatani, N. 1996. Antioxidative compounds isolated from Kokuto, non-centrifugal cane sugar. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*. 60(10), 1714-1716.
- Nhung, N. T., Cuong, N. V., Thwaites, G., & Carrique-Mas, J. 2016. Antimicrobial Usage and Antimicrobial Resistance in Animal Production in Southeast Asia: A Review. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*. 5(4), 37.
- Nowland, T. L., Torok, V. A., Low, W. Y., Barton, M. D., Plush, K. J., & Kirkwood, R. N. 2020. Faecal Microbiota Analysis of Piglets During Lactation. *Animals*. 10(5), 762.
- Opriessnig, T., Patterson, A. R., Madson, D. M., Pal, N., Rothschild, M., Kuhar, D., Lunney, J. K., Juhan, N. M., Meng, X. J., & Halbur, P. G. 2009. Difference in severity of porcine circovirus type two-induced pathological lesions between Landrace and Pietrain pigs. *Journal of animal science*. 87(5), 1582–1590.
- Owusu-Asiedu, A., Nyachoti, C. M., & Marquardt, R. R. 2003. Response of early-weaned pigs to an enterotoxigenic *Escherichia coli* (K88) challenge when fed diets containing spray-dried

porcine plasma or pea protein isolate plus egg yolk antibody, zinc oxide, fumaric acid, or antibiotic. *Journal of animal science*. 81(7), 1790–1798.

Rebelo, A. R., Bortolaia, V., Kjeldgaard, J. S., Pedersen, S. K., Leekitcharoenphon, P., Hansen, I. M., Guerra, B., Malorny, B., Borowiak, M., Hammerl, J. A., Battisti, A., Franco, A., Alba, P., Perrin-Guyomard, A., Granier, S. A., De Frutos Escobar, C., Malhotra-Kumar, S., Villa, L., Carattoli, A., & Hendriksen, R. S. 2018. Multiplex PCR for detection of plasmid-mediated colistin resistance determinants, *mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4* and *mcr-5* for surveillance purposes. *Euro surveillance : bulletin Europeen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin*. 23(6), 17-00672.

Rhouma, M., Fairbrother, J. M., Beaudry, F., & Letellier, A. 2017. Post weaning diarrhea in pigs: risk factors and non-colistin-based control strategies. *Acta veterinaria Scandinavica*. 59(1), 31.

Roselli, M., Finamore, A., Britti, M. S., Bosi, P., Oswald, I., & Mengheri, E. 2005. Alternatives to in-feed antibiotics in pigs: Evaluation of probiotics, zinc or organic acids as protective agents for the intestinal mucosa. A comparison of in vitro and in vivo results. *Animal Research*. 54(3), 203-218.

Roubos-van den Hil, P. J., Litjens, R., Oudshoorn, A. K., Resink, J. W., & Smits, C. 2017. New perspectives to the enterotoxigenic *E. coli* F4 porcine infection model: Susceptibility

- genotypes in relation to performance, diarrhoea and bacterial shedding. *Veterinary microbiology*. 202, 58–63.
- Ruan, X., Crupper, S. S., Schultz, B. D., Robertson, D. C., & Zhang, W. 2012. *Escherichia coli* expressing EAST1 toxin did not cause an increase of cAMP or cGMP levels in cells, and no diarrhea in 5-day old gnotobiotic pigs. *PloS one*. 7(8), e43203.
- Scott, M. E., & Koski, K. G. 2000. Zinc deficiency impairs immune responses against parasitic nematode infections at intestinal and systemic sites. *The Journal of nutrition*. 130(5S Suppl), 1412S–20S.
- Sinha, R., Sahoo, N. R., Kumar, P., Qureshi, S., Kumar, A., Ravikumar, G. V. P. P. S., & Bhushan, B. 2018. Comparative jejunal expression of MUC 13 in Indian native pigs differentially adhesive to diarrhoeagenic *E. coli*. *Journal of Applied Animal Research*. 46(1), 107-111.
- Stein, H. H., & Kil, D. Y. 2006. Reduced use of antibiotic growth promoters in diets fed to weanling pigs: dietary tools, part 2. *Animal biotechnology*. 17(2), 217–231.
- Suiryanrayna, M. V., & Ramana, J. V. 2015. A review of the effects of dietary organic acids fed to swine. *Journal of animal science and biotechnology*. 6, 45.
- Takara, K., Matsui, D., Wada, K., Ichiba, T., & Nakasone, Y. 2002. New antioxidative phenolic glycosides isolated from Kokuto non-centrifuged cane sugar. *Bioscience, biotechnology, and*

biochemistry. 66(1), 29–35.

- Tambadou, F., Caradec, T., Gagez, A. L., Bonnet, A., Sopéna, V., Bridiau, N., Thiéry, V., Didelot, S., Barthélémy, C., & Chevrot, R. 2015. Characterization of the colistin (polymyxin E1 and E2) biosynthetic gene cluster. *Archives of microbiology*. 197(4), 521–532.
- Tanaka T., Yasuo I., Naosuke K., Takashi S., Narutoshi O., Katsuyoshi U., Haruki K., Tadao S., Shizuo S. 2014. Quantitative Microbiological Evaluation of *Salmonella Typhimurium* Shed in Diarrhea, Loose, and Normal Stools of Infected Pigs. *Open Journal of Veterinary Medicine* 4(4), 58-66
- Terada, A., Bukawa, W., Kan, T., & Mitsuoka, T. 2004. Effects of the consumption of heat-killed *Enterococcus faecalis* EC-12 preparation on microbiota and metabolic activity of the faeces in healthy adults. *Microbial ecology in health and disease*. 16(4), 188-194.
- Tsiloyiannis, V. K., Kyriakis, S. C., Vlemmas, J., & Sarris, K. 2001. The effect of organic acids on the control of porcine post-weaning diarrhoea. *Research in veterinary science*. 70(3), 287–293.
- Tsukahara, T., Tsukahara, T., Bukawa, W., Kan, T., & Ushida, K. 2005. Effect of a cell preparation of *Enterococcus faecalis* strain EC-12 on digesta flow and recovery from constipation in a pig model and human subjects. *Microbial Ecology in Health and Disease*. 17(2), 107-113.

- Tsukahara, T., Inoue, R., Nakanishi, N., Nakayama, K., Matsubara, N., & Ushida, K. 2007. Evaluation of the low dose level of a heat-killed and dried cell preparation of *Enterococcus faecalis* to prevent porcine edema disease using experimental infection model with enterotoxemic *Escherichia coli* in weaning pigs. The Journal of veterinary medical science. 69(2), 103–109.
- Tsuruta, T., Inoue, R., Tsushima, T., Watanabe, T., Tsukahara, T., & Ushida, K. 2013. Oral Administration of EC-12 Increases the Baseline Gene Expression of Antiviral Cytokine Genes, IFN- γ and TNF- α , in Splenocytes and Mesenteric Lymph Node Cells of Weaning Piglets. Bioscience of microbiota, food and health. 32(4), 123–128.
- Walkty, A., DeCorby, M., Nichol, K., Karlowsky, J. A., Hoban, D. J., & Zhanel, G. G. 2009. In vitro activity of colistin (polymyxin E) against 3,480 isolates of gram-negative bacilli obtained from patients in Canadian hospitals in the CANWARD study, 2007-2008. Antimicrobial agents and chemotherapy. 53(11), 4924–4926.
- Wallace, J. G., Bellissimo, C. J., Yeo, E., Fei Xia, Y., Petrik, J. J., Surette, M. G., Bowdish, D., & Sloboda, D. M. 2019. Obesity during pregnancy results in maternal intestinal inflammation, placental hypoxia, and alters fetal glucose metabolism at mid-gestation. Scientific reports. 9(1), 17621.
- Wang, J., Chen, L., Li, P., Li, X., Zhou, H., Wang, F., Li, D., Yin, Y., & Wu, G. 2008. Gene

- expression is altered in piglet small intestine by weaning and dietary glutamine supplementation. *The Journal of nutrition*. 138(6), 1025–1032.
- Wang, Y., Yan, X., Zhang, W., Liu, Y., Han, D., Teng, K., & Ma, Y. 2019. *Lactobacillus casei* Zhang Prevents Jejunal Epithelial Damage to Early-Weaned Piglets Induced by *Escherichia coli* K88 via Regulation of Intestinal Mucosal Integrity, Tight Junction Proteins and Immune Factor Expression. *Journal of microbiology and biotechnology*. 29(6), 863–876.
- Wojciechowska, N., Alipour, S., Stolarska, E., Bilka, K., Rey, P., & Kalemba, E. M. 2020. Involvement of the MetO/Msr System in Two Acer Species That Display Contrasting Characteristics during Germination. *International journal of molecular sciences*. 21(23), 9197.
- Xiao, Y., Kong, F., Xiang, Y., Zhou, W., Wang, J., Yang, H., Zhang, G., & Zhao, J. 2018. Comparative biogeography of the gut microbiome between Jinhua and Landrace pigs. *Scientific reports*. 8(1), 5985.
- Yang, G. Y., Zhu, Y. H., Zhang, W., Zhou, D., Zhai, C. C., & Wang, J. F. 2016. Influence of orally fed a select mixture of *Bacillus* probiotics on intestinal T-cell migration in weaned MUC4 resistant pigs following *Escherichia coli* challenge. *Veterinary research*. 47(1), 71.
- Zhang, W., Berberov, E. M., Freeling, J., He, D., Moxley, R. A., & Francis, D. H. 2006. Significance of heat-stable and heat-labile enterotoxins in porcine colibacillosis in an additive

model for pathogenicity studies. *Infection and immunity*. 74(6), 3107–3114.

Zhang, C., Rausch, D., & Zhang, W. 2009. Little heterogeneity among genes encoding heat-labile and heat-stable toxins of enterotoxigenic *Escherichia coli* strains isolated from diarrheal pigs. *Applied and environmental microbiology*. 75(19), 6402–6405.

Zhu, Y. H., Li, X. Q., Zhang, W., Zhou, D., Liu, H. Y., & Wang, J. F. 2014. Dose-dependent effects of *Lactobacillus rhamnosus* on serum interleukin-17 production and intestinal T-cell responses in pigs challenged with *Escherichia coli*. *Applied and environmental microbiology*. 80(5), 1787–1798.

Zhu, C., Lv, H., Chen, Z., Wang, L., Wu, X., Chen, Z., Zhang, W., Liang, R., & Jiang, Z. 2017. Dietary Zinc Oxide Modulates Antioxidant Capacity, Small Intestine Development, and Jejunal Gene Expression in Weaned Piglets. *Biological trace element research*. 175(2), 331–338.