

論文内容要旨

豚マイコプラズマ性肺炎（MPS）病変、末梢血免疫能選抜
純粋種豚及びそれらの交雑豚の MPS 抵抗性と免疫特性
に関する研究

東北大学大学院農学研究科
資源生命科学専攻

陆拾柒

指導教員

佐藤 正寛 教授

緒論

近年、日本における養豚業は飼養戸数の減少と同時に規模拡大と集約的飼育が行われる一方で、飼育密度が高まることに伴い感染症の発生増加が養豚経営者にとって大きな問題となっている。こうした疾病に対して、ワクチン接種、投薬、公衆衛生、隔離及び特定病原菌フリー（SPF）化などの対策が実施されているが、衛生管理に伴う設備投資とワクチネーション等における治療コストの増加が養豚生産者にとって大きな経済的負担となっている。薬剤に依存せず家畜自身の抗病性を遺伝的に高める育種改良はこれらの諸問題を解決できる一つの方策であり、動物遺伝育種学領域の研究者にとって挑戦すべき大きな課題である。抗病性育種のためには直接病原菌に家畜を暴露する条件下での選抜、または、抗病性と密接に関連する免疫指標に基づく選抜のいずれかによる方法が考えられる。従来、末梢血免疫能を選抜指標とした試験の取り組みが行われてきたが、病原菌に家畜を暴露する方法による育種改良の取り組みは皆無であった。

こうした背景の下で、宮城県畜産試験場では常在菌であるマイコプラズマ・ハイオニューモニエの感染による肺炎（MPS）病変を選抜指標とし、ランドレース種豚について5世代の選抜育種を行い、MPS肺病変が少ない系統（La）を造成した。一方、日本ハム中央研究所では末梢血免疫能を選抜指標とし、大ヨークシャー種について6世代の選抜育種を行い、免疫能の高い系統（Wa）を造成した。いずれも東北大学大学院農学研究科動物遺伝育種学分野との共同研究である。Laについては、一部の免疫特性が調べられているが、詳細な免疫特性は未解明である。また、Waについても、MPS抵抗性及び詳細な免疫特性は明らかでない。さらに、純粋種で改良された抗病性や免疫能の遺伝的能力が、雑種第1代及び三元交雑豚でどの程度発揮されるかについては不明である。

本研究では、第1章ではMPS肺病変選抜ランドレース種と免疫能選抜大ヨークシャー種について、第2章と第3章ではこれらの両選抜純粋種豚の交雑F1豚及び三元交雑豚を対象とし、MPSワクチンまたは羊赤血球（SRBC）接種に対する末梢血、唾液及び免疫関連組織の各免疫形質及び内分泌ホルモンなどと屠畜時点でのMPS肺病変について、無選抜の純粋種やそれらの交雑豚と比較検討した。また、第4章では、MPS肺病変選抜ランドレース種維持集団の末梢血免疫形質と、肺病変との関連性を明らかにするため、遺伝的パラメーターの推定を行い、MPS抵抗性に関して有効な免疫指標を探索した。さらに、MPS抗病性に関わる免疫指標について総合考察を行った。

第1章:MPS 肺病変選抜ランドレース種及び末梢血免疫能選抜大ヨークシャー種豚の肺病変と免疫特性

第1節:MPS 肺病変選抜ランドレース種豚の肺病変と免疫特性

MPS 肺病変選抜ランドレース種 (La) の MPS 抵抗性と免疫学的特徴を明らかにするために、無選抜ランドレース種 (Lb) と比較した。試験は時期と対照となる豚の系統を変えて2度繰り返し行った。

試験設計と測定方法は以下の通りである。MPS ワクチン二次接種日を0日とし、-7、0、2、7、14日の計5回、供試豚より継時的に採血を行い、-7と0日において、採血後に MPS ワクチンを接種した。14日目の採血後に屠畜し、肺病変検査及び肺と腸管組織のサンプリングを行った。総白血球数は全自動血球計数器で測定し、食細胞活性はケミルミネッセンス法、免疫担当細胞割合はフローサイトメトリー法、抗体産生量は ELISA 法、サイトカイン発現量は ELISA 及び Real-time PCR 法、ホルモン濃度は RIA 法でそれぞれ測定した。末梢血免疫応答の継時的データ、MPS 肺病変スコア、ADG、免疫組織中サイトカイン及び TLRs の発現などについては、SAS プログラムを用いて分散分析と Tukey の多重比較検定を行った。

1回目の試験では、La と Lb 豚を各12頭用いた(平均17週齢、74kg)。その結果、選抜による遺伝的抵抗能力を反映し、La の肺病変スコアは Lb 豚に比べて有意に少なかった(図 1A a)。La 豚の末梢血中 B 細胞割合が Lb に比べて有意に減少したのに対し、ミエロイド、顆粒球の割合は有意に増加した(図 1B a、図 1C a、b)。また、末梢血中成長ホルモン (GH) は、La が Lb 豚に比較して0日目に有意に減少した(図 1B c)。IFN- γ 蛋白質発現は La が Lb 豚に比べて14日目で有意に増加した(図 1D a)。

2回目の試験では、La と Lb 豚を各6頭用い(平均16週齢、66kg)、1回目の試験と同様の調査を行った。その結果、La 豚が Lb 豚より有意に少ない肺病変スコアを示した(図 1A b)。B 細胞割合は、La が Lb 豚に比べて有意に減少し(図 1B b)、また MPS 特異的 IgG 産生も抑制された(図 1Dc)。GH の濃度も、La 豚が Lb 豚に比較して有意に抑制された(図 1B d)。一方、NK 細胞割合、唾液中 IgA 濃度及び IFN- γ mRNA 発現は La が Lb 豚に比較して有意に増加した(図 1C c ; 図 1D b、d)。

以上の結果から、La 豚が MPS 抵抗性に優れていることが確認され、また、ワクチン刺激に対して液性免疫能が抑制され、自然、細胞性及び粘膜性免疫能が活性化されることが明らかとなった。

第2節:末梢血免疫能選抜大ヨークシャー種豚の肺病変と免疫特性

免疫能選抜大ヨークシャー種 (Wa) と無選抜大ヨークシャー (Wb) を各 12 頭 (平均 18 週齢、68kg) 用い、MPS 肺病変と免疫学的特徴を調べた。試験計画、測定項目及び統計解析は第 1 節と同じである。その結果、MPS 肺病変スコアは、Wa が Wb 豚に比べて相対的に高い値を示した (図 2A a)。末梢血中 NK 細胞と T 細胞 ($CD3^+CD4^+CD8^+$ と $CD3^+CD4^+CD8^-$ T 細胞) の割合は Wb が Wa 豚と比較して有意に多かった (図 2B)。一方、食細胞活性と抗原特異的 IgG 産生量は Wa が Wb 豚に比較して有意に高く、唾液中 IgA は有意に低かった (図 2A b、c、d)。

これらの結果は、末梢血免疫能を高める方向への選抜は MPS 肺病変抵抗性に対して必ずしも有効ではないことを示唆している。また、Wa 豚は、ワクチン接種に対する液性免疫能と自然免疫能が活性化され、粘膜免疫能が抑制されることが示唆された。

第 2 章 : MPS 選抜ランドレース種と免疫能選抜大ヨークシャー種の交雑 F1 の肺病変と免疫特性

本章では、両選抜純粋種 (La と Wa) の MPS 抗病性や免疫能力が、それらの雑種第 1 代にどの程度引き継がれるかを検討した。試験は、交雑方法を変えて 2 度行った。

1 回目の試験では、La (16 週齢、64kg) と Wa (18 週齢、74kg) 豚を各 6 頭、それらの雑種第 1 代 LaWa (16 週齢、72kg) と一般雑種第 1 代 LbWb (12 週齢、63kg) を各 12 頭 (合計 36 頭) 用いた。試験計画、測定項目及び統計解析は第 1 章と同じである。その結果、MPS 病変スコアについて系統間で有意差は認められなかった (図 3A a)。末梢血中抗原特異的 IgG 産生量は、Wa が他の 3 系統より有意に増加した (図 3A b)。IL-17 発現量は、La 豚が他の 3 系統より有意に増加した (図 3A c)。GH 濃度は、LaWa 豚が La、Wa と同じく、LbWb より低い増加を示した (14 日目) (図 3A d)。

2 回目の試験では、La、LaWa、LaWb 及び LbWb の 4 系統 (平均 15 週齢、体重 65kg) をそれぞれ 6、6、10 及び 10 頭ずつ用いた。試験計画、測定項目及び統計解析は第 1 章と同じであり、異物として SRBC を接種した。その結果、MPS 病変スコアは、LbWb と比べ、La、LaWa 及び LaWb 豚は相対的に少なかった (図 3B a)。SRBC 刺激後、LaWb と LaWa は La と同様に、末梢血中単球数が増加した (図 3C a) のに対し、B 細胞、T 細胞数 (図 3C b、c)、SRBC 特異的 IgG 濃度 (図 3B b) 及び IL-13 発現 (図 3C d) が減少した。さらに、LaWb と LaWa の唾液中 IgA は La 豚に比べて低い値を示した (図 3B c)。

以上の結果から、La 豚の MPS 病変抵抗性及び両選抜純粋種のいくつかの免疫学的特徴は交雑第 1 代に引き継がれることが示唆された。

第3章：抗病性三元交雑豚の肺病変に関わる免疫特性

本章では、La と Wa の MPS 抵抗性と免疫能が三元交雑豚（LaWaD）にどの程度伝えられるかを検討した。材料として La（11 週齢、28kg）、LaWaD（LaWa 雌×デュロック種雄（D）：12 週齢、44kg）と一般の三元交雑豚（LbWbD：11 週齢、28kg）を各 12 頭、合計 36 頭を用い、MPS 肺病変と免疫特性を比較した。試験計画、測定項目及び統計解析は第 1 章と同じである。その結果、MPS 肺病変は、LaWaD が La と LbWbD の中間値を示した（図 4A a）。各種免疫細胞割合において、LaWaD に対する La の影響は小さかった（図 4B）。抗原特異的 IgG 産生量は LaWaD 豚が La 豚と同様に、LbWbD より有意に低い値で推移した（-7、0 及び 2 日目）が、14 日目に La 豚より有意に増加した（図 4A b）。更に LaWaD は La と LbWbD より唾液中 IgA 分泌量が高く推移した（図 4A c）。一方、免疫細胞機能で La 豚が LaWaD 豚に強く影響しており、末梢血中 IFN- γ 、IL-4、IL-6 及び TGF- β mRNA 発現量は LaWaD が La 豚と同じ傾向を示し、LbWbD より有意に増加した（図 4C）。

以上の結果から、LaWaD は LbWbD 豚と遺伝的に異なること、La の MPS 病変抵抗性及び両選抜種の免疫学的特性が三元交雑豚に影響していることが示唆された。

第4章：MPS 抵抗性を改良のための免疫指標に関する遺伝的パラメーターの推定

本章では、選抜効率を高める観点から、豚の成長の早い時期での選抜指標探索のため、MPS 病変選抜 La の維持集団での子豚約 240 頭に対し、8 週齢時で採血を行い、末梢血中各種サイトカイン濃度を調べ、選抜集団の MPS 肺病変測定値と血縁情報をもとに、MPS 肺病変と各種サイトカイン濃度の遺伝的パラメーターを推定した。

測定項目の IFN- γ と IL-17 の濃度は ELISA Development Kit により、IL-4、IL-6、IL-12、IL-1 β 及び IFN- α の濃度は ProcartaPlexTM Immunoassay Kit により測定した。遺伝的パラメーターの推定はアニマルモデル REML 法により、VCE6 プログラムを用いて行った。

その結果（表 1）、MPS 肺病変は低い遺伝率を示した 0.12 (0.06)。一方、MPS 肺病変は IL-17 濃度と高い負の遺伝相関（ -0.60 ± 0.22 ）を示した。以上の結果から、IL-17 濃度の高い方向への選抜が MPS 抵抗性の選抜指標として有効である可能性が示唆された。

総括

1. 純粋種豚の MPS 抵抗性と免疫特性

MPS 肺病変を選抜指標とした La について、MPS 病変抵抗性が強いという特徴を確認した。しかし、Wa について MPS 抵抗性は認められなかった。Wa で採用された免疫形質（食細胞活性、補体別経路活性及び豚丹毒特異的 IgG）は、予め MPS 病変に対する有効性が確認された免疫形質ではないため、今後、MPS 病変と密接に関連する免疫形質を選抜指標とすることで MPS 病変を低下させる可能性が期待できる。

免疫特性として、La 豚は Lb 豚に比べて IFN- γ 発現と IgA 産生を特徴とした細胞性及び粘膜性免疫能が活性化され、B 細胞と IgG 産生を特徴とした液性免疫能が抑制される。また、GH の分泌も抑制され、ストレスに対して抵抗性が強い可能性が示唆された。一方、Wa は Wb 豚に比べて IgG 産生と食細胞活性を特徴とした液性及び自然免疫能が活性化され、IgA 産生を特徴とした粘膜免疫能が抑制される。従って、抗原特異的 IgG を多く産生することは MPS 肺病変を悪化させる可能性があること、及び IFN- γ と IgA は MPS 抵抗性に関して重要な指標であることが考えられた。

2. 交雑豚の肺病変と免疫特性

2 回の試験から MPS に対する La 豚の遺伝的抵抗性が交雑 F1 に影響することが示唆された。また、両選抜純粋種（La と Wa）のいくつかの免疫応答が交雑 F1 で発現したことが確認された。以上のことより、純粋種での選抜により、抗病性雑種第 1 代豚を生産できる可能性が考えられた。さらに、三元交雑豚でも、LaWaD 豚の MPS 病変スコアは La と LbWbD 豚の中間値を示し、La の選抜による MPS の抵抗性が三元交雑豚でも発現することが示唆された。一方、LaWaD の末梢血中の IFN- γ 、IL-4、TGF- β 及び IL-6 発現は La と同じ傾向を示し、LbWbD に比べて有意に増加するなど免疫細胞機能で LaWaD に対する La 豚の影響を示す結果が得られ、La 豚の免疫学的特徴が三元交雑豚へ発現することが示唆された。一方、LaWaD の抗原特異的 IgG 産生量は La より有意に増加したことから、LaWaD は遺伝的に Wa の影響を受けた可能性が考えられた。

3. 免疫形質の遺伝的パラメーターの推定

MPS 肺病変と末梢血 IL-17 濃度は高い負の遺伝相関（ -0.60 ± 0.22 ）を示した。Sato ら（2015）は、La の系統造成過程の肺病変と血しょう中 IL-17 及び IFN- γ 濃度との関連を調べ、それぞれ負の高い遺伝相関（ -0.86 ± 0.13 ）と中程度の負の遺伝相関（ -0.45 ± 0.29 ）を報告し、5 世代の選抜を通して IL-17 と IFN- γ の推定育種価は有意に増加したことを報告している。以上の結果から、末梢血 IL-17 と IFN- γ を高い方向に選抜することは、MPS 肺病変の選抜指標として有効であると考えられた。

以上の結果から、免疫能を高めることによる間接的な選抜育種より、**MPS** 病変を直接低下させる選抜育種の有効性が明らかとなった。養豚産業では交雑生産が一般的だが、**MPS** 病変と免疫能の詳細な解析から純粋種の抗病性に対する選抜が交雑豚での抗病性に有効であることが明らかとなった。家畜の抗病性育種をすすめる上で、抗病性や免疫形質などの多くの形質は遺伝率が低く選抜育種が困難だが、抗病性形質と高い遺伝相関を示す容易に測定できる形質を探索し、選抜形質とすることが選抜の精度と効率を高める上で重要だと考えられる。これらの観点から、本研究で得られた成果をもとに豚集団の **MPS** に対する遺伝的抵抗性を高めるためには、液性免疫の指標である **IgG** 産生を抑制し、細胞性免疫の指標である **IFN- γ** 発現と粘膜免疫の **IgA**、さらには末梢血 **IL-17** を高める方向への選抜が有効であると結論づけた。

図表

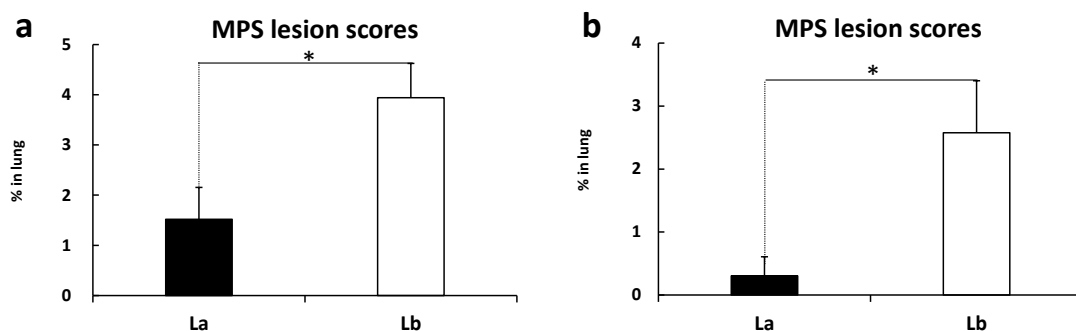


図 1A. MPS 病変選抜ランドレース La と無選抜ランドレース Lb 豚の MPS 肺病変スコアの 1 回目の試験 (a) と 2 回目の試験 (b) (平均値 \pm 標準誤差) の結果。* は採血日に系統間で有意差があることを示す (* <0.05)。

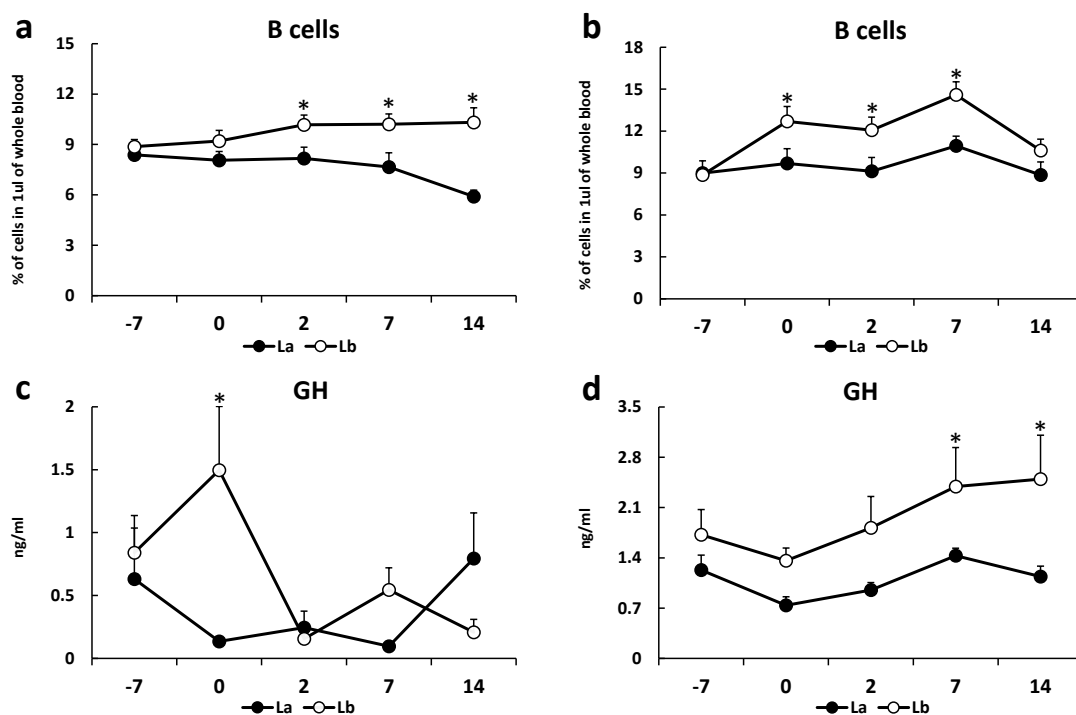


図 1B. MPS 病変選抜ランドレース La と無選抜ランドレース Lb 豚の末梢血 B 細胞割合の 1 回目の試験 (a) と 2 回目の試験 (b)、成長ホルモン濃度の 1 回目の試験 (a) と 2 回目の試験 (b) の変化 (平均値 \pm 標準誤差)。* は採血日に系統間で有意差があることを示す (* <0.05)。

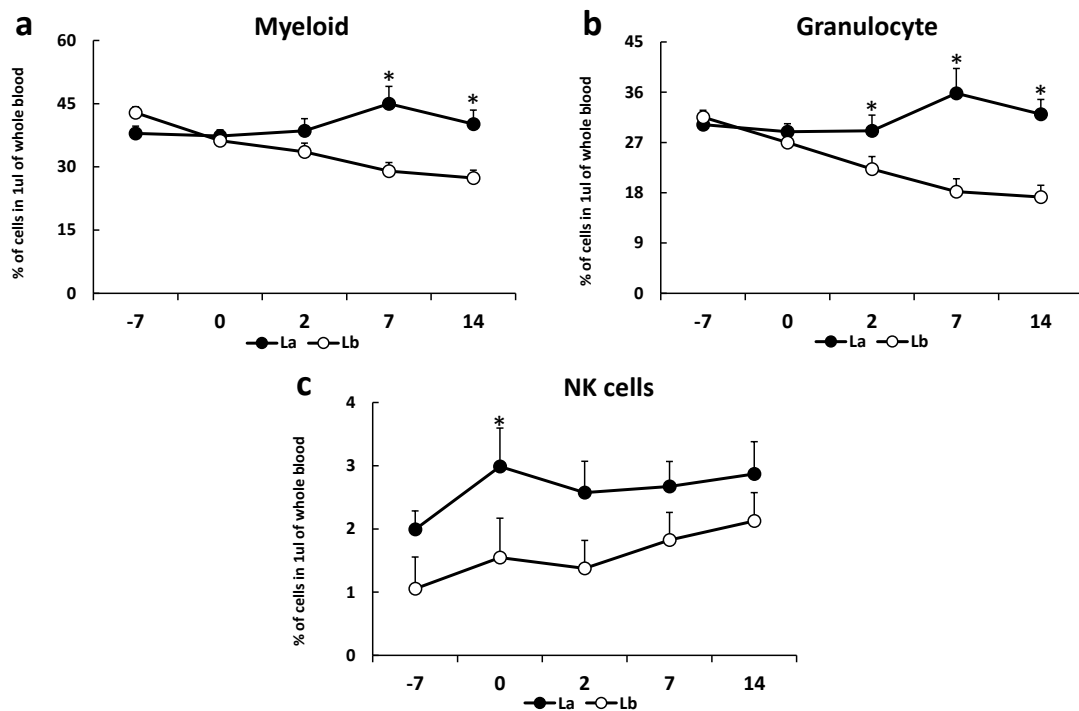


図 1C. MPS 肺病変選抜ランドレース La と無選抜ランドレース Lb 豚の末梢血ミエロイド (a)、顆粒球 (b) 及び NK 細胞 (c) 割合 (平均値 \pm 標準誤差)。* は採血日に系統間で有意差があることを示す (* <0.05)。

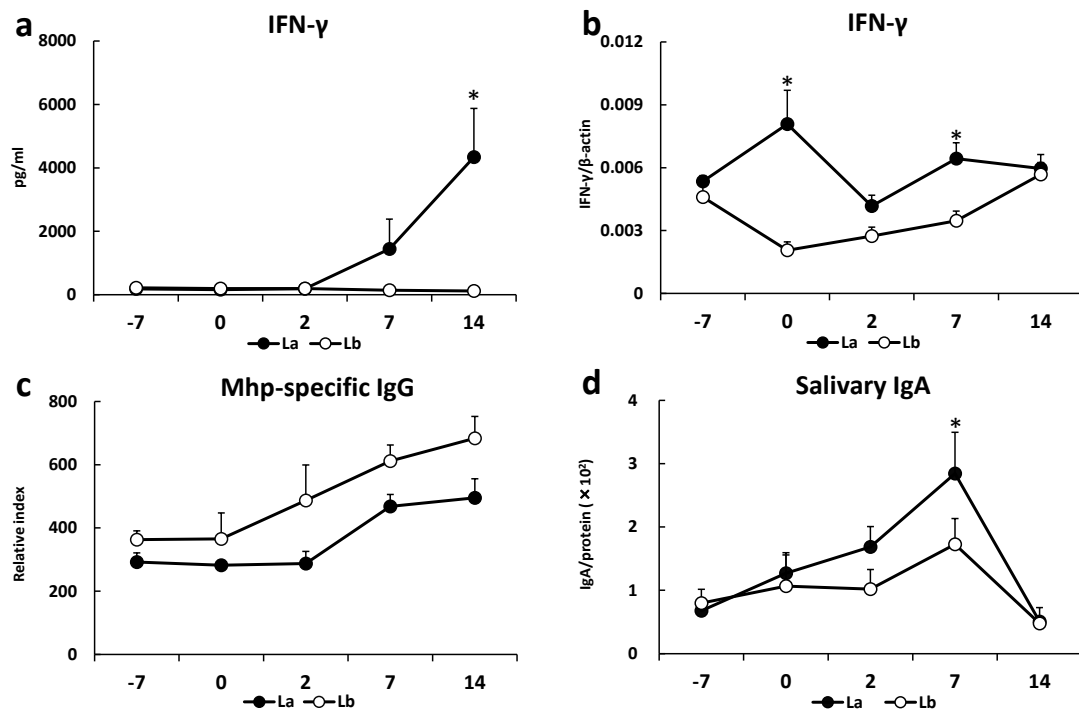


図 1D. MPS 肺病変選抜ランドレース La と無選抜ランドレース Lb 豚の末梢血中 IFN- γ 蛋白質発現 (a) と mRNA 発現 (b)、抗原特異的 IgG 濃度 (c) 及び唾液中 IgA 濃度 (d) の結果 (平均値 \pm 標準誤差)。* は採血日に系統間で有意差があることを示す (* <0.05)。

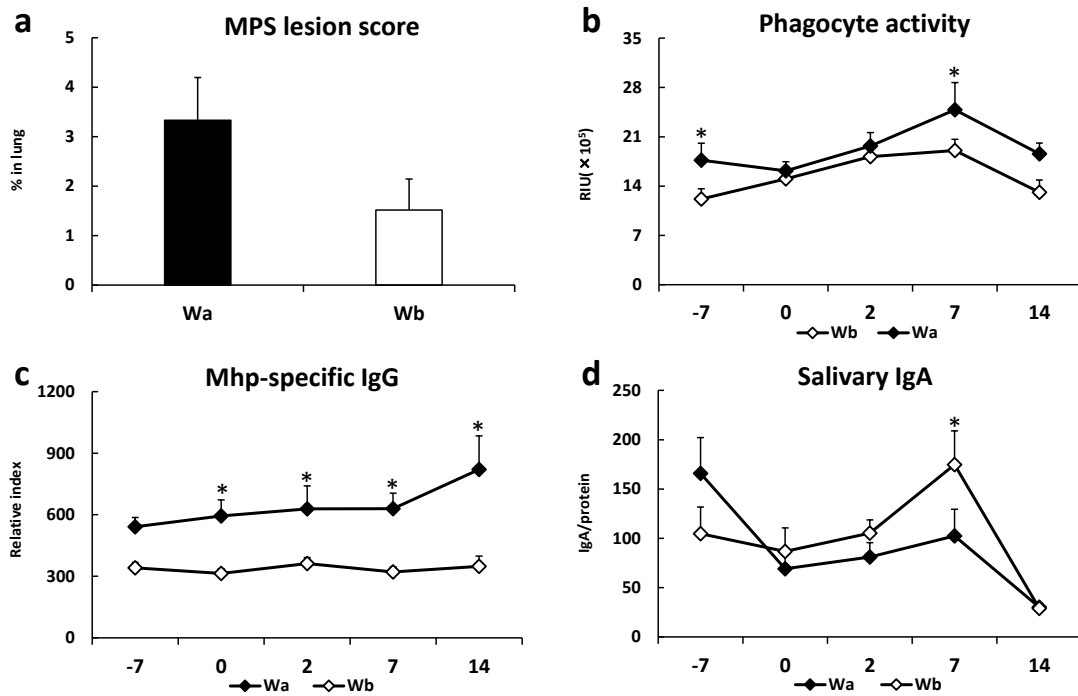


図 2A. 免疫能選抜大ヨークシャー種 Wa と無選抜大ヨークシャー種 Wb 豚の MPS 肺病変スコア (a)、食細胞活性 (b)、抗原特異的 IgG 濃度 (c) 及び唾液 IgA 濃度 (d) (平均値±標準誤差)。* は採血日に系統間で有意差があることを示す (*<0.05)。

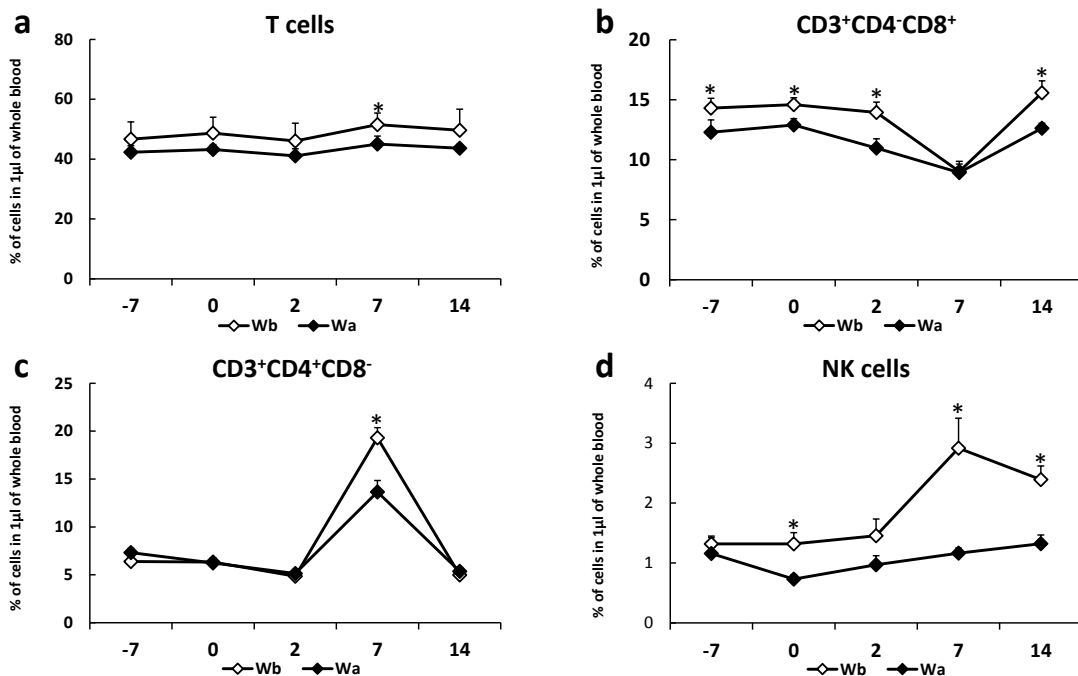


図 2B. 免疫能選抜大ヨークシャー種 Wa と無選抜大ヨークシャー種 Wb 豚の末梢血中 T 細胞 (a)、CD3⁺CD4⁻CD8⁺ (b)、CD3⁺CD4⁺CD8⁻ (c) 及び NK (d) 細胞割合 (平均値±標準誤差) の経時的変化。*は採血日に系統間で有意差があることを示す (*<0.05)。

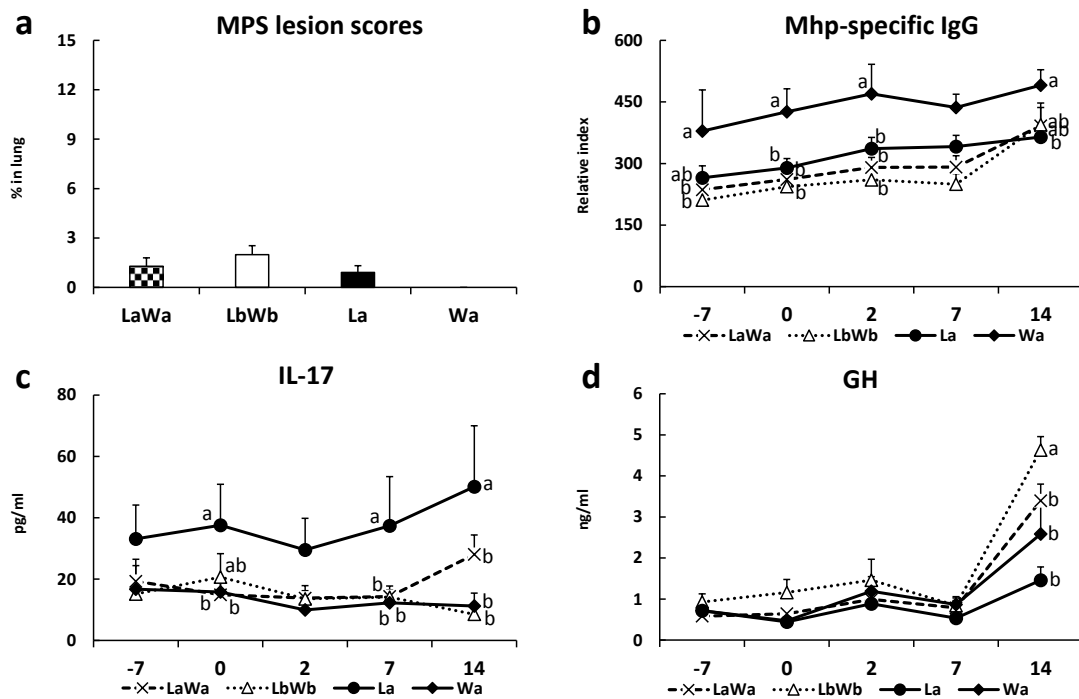


図 3A. 雑種 (F1) LaWa と LbWb、MPS 病変選抜 La と免疫能選抜 Wa 豚の MPS 肺病変スコア (a)、抗原特異的 IgG 濃度 (b)、IL-17 発現 (c) 及び成長ホルモン濃度 (d) (平均値 ± 標準誤差)。アルファベット文字の違いは採血日に系統間で有意差があることを示す (< 0.05)。

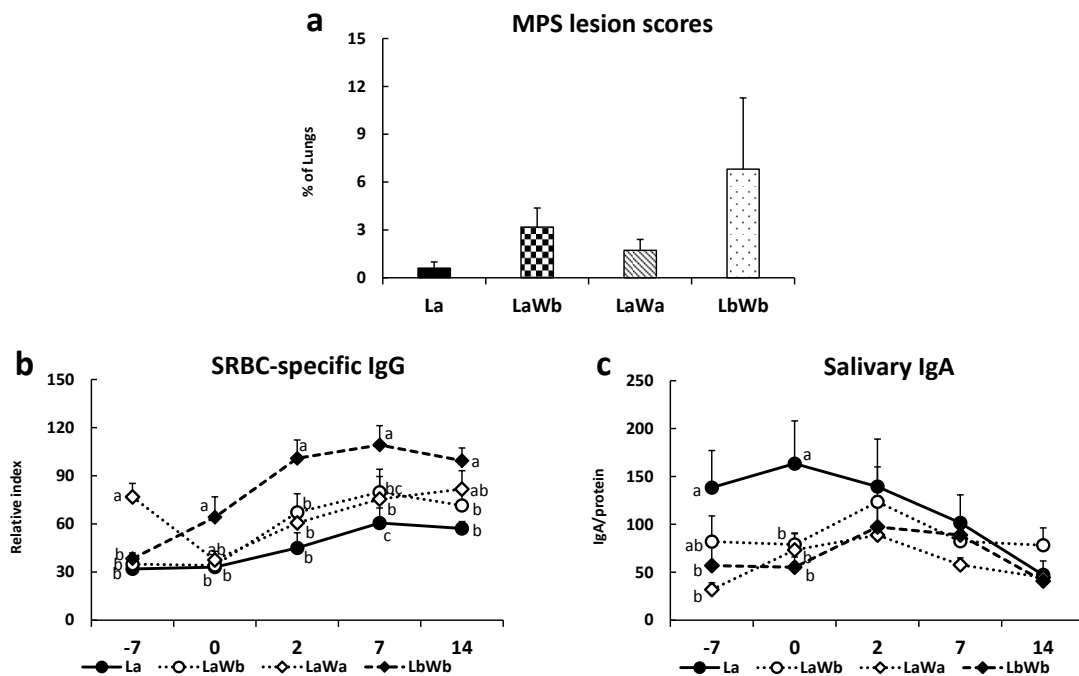


図 3B. MPS 病変選抜 La、雑種 (F1) の LaWb、LaWa と LbWb 豚の MPS 肺病変スコア (a)、抗原特異的 IgG 濃度 (b) 及び唾液中 IgA (c) 濃度 (平均値 ± 標準誤差)。アルファベット文字の違いは採血日に系統間で有意差があることを示す (< 0.05)。

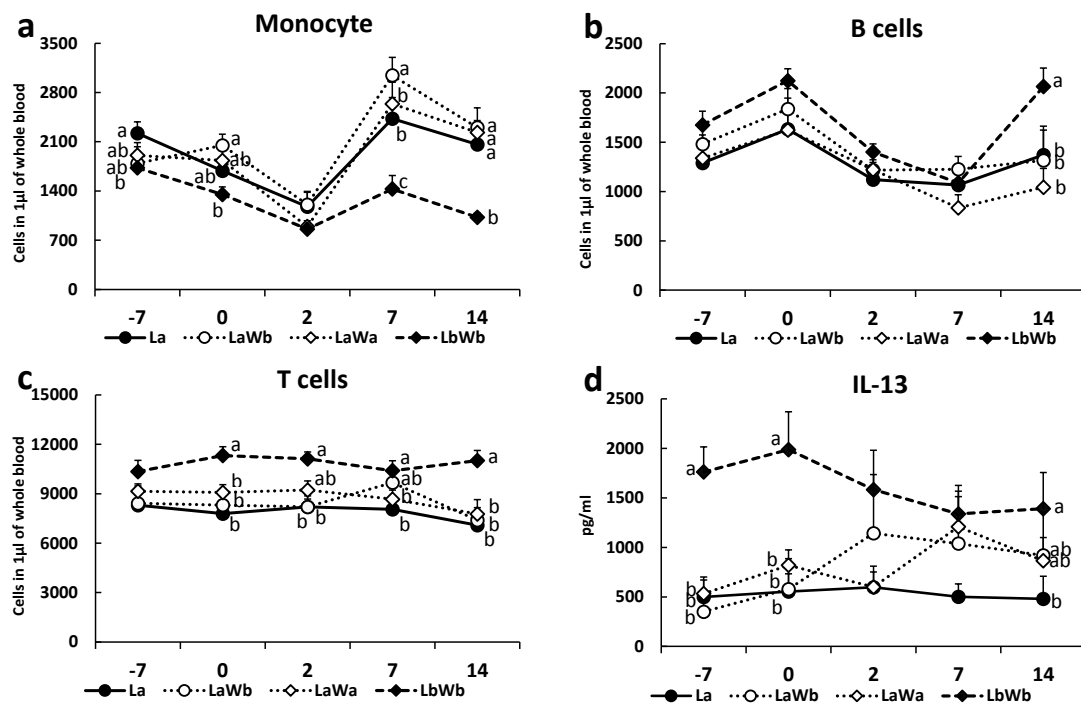


図 3C. MPS 病変選抜 La、雑種 (F1) の LaWb、LaWa と LbWb 豚の末梢血中単球 (a)、B (b)、T (c) 及び IL-13 蛋白質濃度 (d) (平均値±標準誤差) の継時的な変化。アルファベット文字の違いは採血日に系統間で有意差があることを示す (<0.05)。

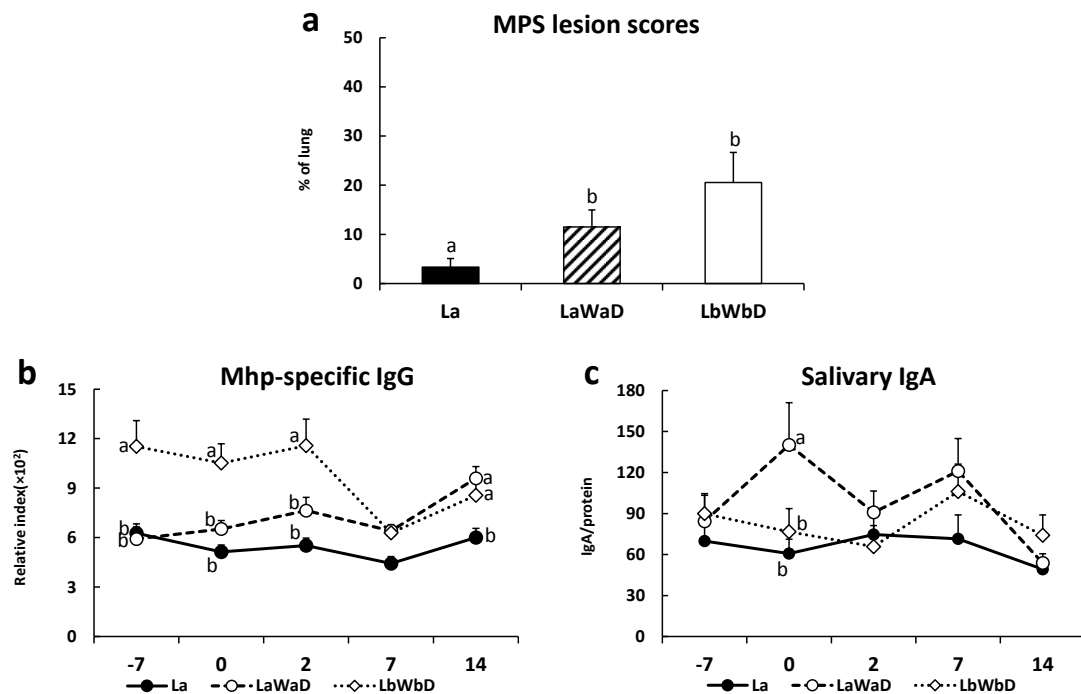


図 4A. MPS 病変選抜 La、三元交雑系の LaWaD と LbWbD 豚の MPS 肺病変スコア (a)、抗原特異的 IgG 濃度 (b) 及び唾液中 IgA (c) 濃度 (平均値±標準誤差)。アルファベット文字の違いは採血日に系統間で有意差があることを示す (<0.05)。

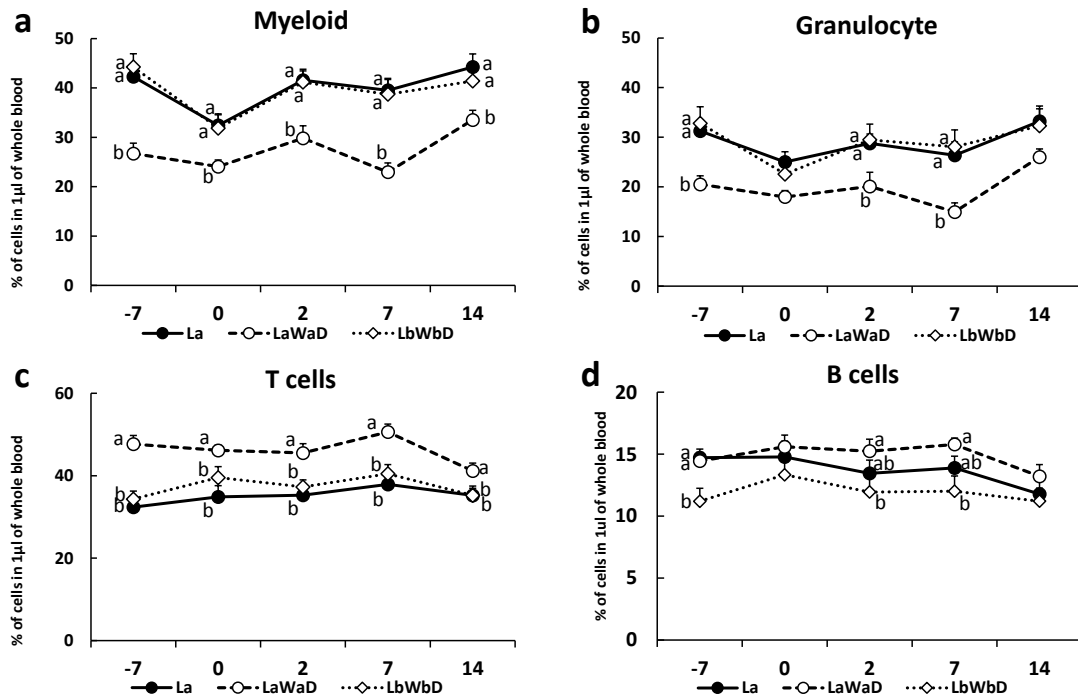


図 4B. MPS 病変選抜 La、三元交雑系の LaWaD と LbWbD 豚の末梢血中ミエロイド (a)、顆粒球 (b)、T (c) 及び B (d) 細胞数 (平均値±標準誤差) の継時的な変化。アルファベット文字の違いは採血日に系統間で有意差があることを示す (<0.05)。

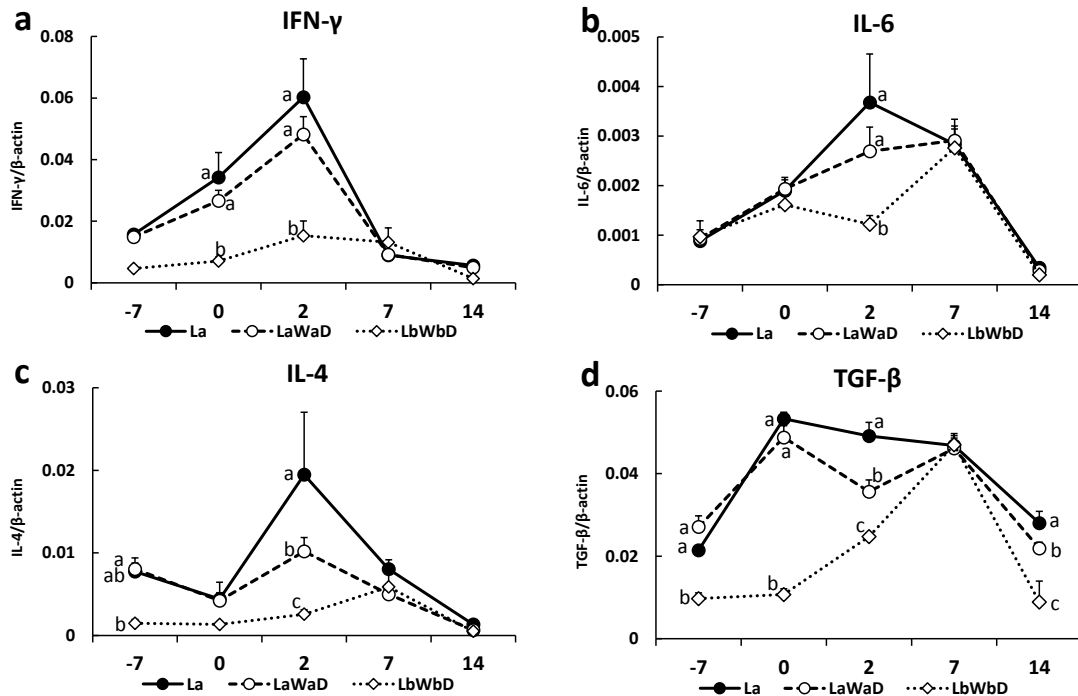


図 4C. MPS 病変選抜 La、三元交雑系の LaWaD と LbWbD 豚の末梢血中 IFN-γ (a)、IL-6 (b)、IL-4 (c) 及び TGF-β (d) の mRNA 発現 (平均値±標準誤差) の継時的な変化。アルファベット文字の違いは採血日に系統間で有意差があることを示す (<0.05)。

表1. La豚の選抜形質と各種サイトカインの遺伝率及び遺伝相関

形質	単位	頭数	IL-4	IL-6	IL-12	IL-17	IL-1 β	IFN α	IFN γ	遺伝率
DG	g/day	941	0.22 \pm 3.04	0.92 \pm 0.28	-0.23 \pm 0.41	-0.48 \pm 0.26	0.98 \pm 0.36	-0.50 \pm 0.61	-0.96 \pm 0.14	0.60 \pm 0.06
MPS	%	637	0.17 \pm 0.32	-0.16 \pm 0.79	-0.23 \pm 1.05	-0.60\pm0.22	-0.28 \pm 1.71	-0.04 \pm 0.18	-0.07 \pm 0.26	0.12\pm0.06
BF	cm	931	-0.77 \pm 1.04	0.54 \pm 0.54	0.08 \pm 0.34	-0.51 \pm 0.60	0.12 \pm 0.43	-0.70 \pm 0.52	-0.48 \pm 0.45	0.66 \pm 0.05
CORT	ugdL	1197	0.60 \pm 1.17	0.28 \pm 0.45	-0.13 \pm 0.70	-0.76 \pm 0.42	0.23 \pm 2.18	-0.37 \pm 0.88	-0.27 \pm 0.74	0.20 \pm 0.05
IL-4	pg/ml	65								0.43 \pm 0.58
IL-6	pg/ml	203								0.17 \pm 0.12
IL-12	pg/ml	237								0.94 \pm 0.10
IL-17	pg/ml	239								0.25 \pm 0.16
IL-1 β	pg/ml	180								0.01 \pm 0.05
IFN α	pg/ml	239								0.44 \pm 0.17
IFN γ	ng/ml	113								0.31 \pm 0.23

DG：一日平均増体量；MPS：豚マイコプラズマ性肺炎；BF：背脂肪厚；CORT：コルチゾール濃度。