

博士論文

豚におけるサルモネラおよび
大腸菌感染系の確立と
抗菌剤代替物質評価への応用

2014年8月

田中剛志

The development of infection models for
S. Typhimurium and *E. coli* and their application for
evaluation of antimicrobial substitution

Tsuyoshi Tanaka

目次

第一章 緒論	4
第二章 豚サルモネラ・ティフムリウム感染系の確立	11
第三章 豚サルモネラ・ティフムリウム感染系を用いた乳酸添加飼料の評価	35
第四章 豚大腸菌感染系の確立	47
第五章 豚大腸菌感染系を用いた乳酸添加飼料の評価	68
第六章 総括	81
論文目録	84
参考文献	85
謝辞	100

第一章

緒論

抗菌剤は、家畜の健康を守り、安全な畜産物の安定生産を確保する上で重要な資材であるが、その使用による薬剤耐性菌の出現からヒトや家畜に対する健康リスクが懸念されている[1]。家畜における健康リスクとは、病原細菌が対象動物に使用された薬剤に対して耐性化し、それによって治療が困難になるリスクである[2]。一方、家畜に対する抗菌剤の使用におけるヒトへの健康リスクとは、動物からヒトに耐性化した菌あるいは耐性遺伝子が感染あるいは伝播するリスクである[3]。

1969年の英国のスワンレポートにより、初めて家畜由来の薬剤耐性菌の公衆衛生への影響について注目されるようになった[4]。そこでは、「家畜に成長促進目的で使用される飼料添加の抗菌性物質が薬剤耐性菌やRプラスミドの増加を促す原因となり、ひいてはヒトおよび食用動物の健康を損なう恐れがあるため、十分な規制措置が必要」と報告されている。このスワンレポートを契機として、各国で家畜への抗菌性物質使用による薬剤耐性問題が立ち上がり、各種の対応が図られるようになった。例えば、デンマークでは、1999年から全ての抗菌性成長促進剤の使用が中止された[5]。しかし、デンマークでは抗菌性成長促進剤の使用が中止された後に治療用の抗菌剤の使用量が増加し、全体として抗菌剤の使用量を大幅に削減するまでには至らなかった[6]。一方EUでは、EU委員会傘下で飼料添加物の科学的評価を行う機関である家畜栄養科学委員会（SCAN）が「抗菌性飼料添加物の使用が家畜や人に危害を及ぼすという根拠がなく、動物由来の薬剤耐性遺伝子が人の消化管内細菌に伝達することを証明する新たな根拠は示されていない」との審査結果を提出したが[4]、EU委員会は疑いがある限りはその使用を中止すべきとする“予防の原則”に則った対応を行い、2006年1月から成長促進を目的とした抗菌性飼料添加物の使用が全面的に中止されることになった。

EUの抗菌剤をめぐる薬剤耐性菌への懸念は、その後治療用の動物用医薬品にも向けられ、特にヒト医療上重要度の高い、フルオロキノロン系薬剤、第三および第四世代セファロsporin系薬剤およびマクロライド系薬剤の3系統の薬剤に対するリスク評価が行われ、フルオロキノロン系薬剤と第三および第四世代セファロsporin系薬剤に対しては、他剤無効例にその使用を温存する、マクロライド系薬剤に対しては適正使用を強力に推し進める必要

があるといった、いわゆる“慎重使用”が打ち出されている[4]。このようにデンマークをはじめ EU 諸国では、薬剤耐性菌への懸念から家畜における抗菌剤の使用に厳しい目が向けられている。

また、EU 以外でも米国ではヒト医療上重要視される抗菌性物質の動物への治療的使用を中心に対策が進められており[4]、具体的には科学的にリスクを評価し、対策を考慮するというもので、現在までにセファロスポリン系およびマクロライド系のリスク評価が行われている。その他にもオーストラリア、カナダ、韓国など各国で動物における適切な抗菌剤使用への対策が進められている。

一方、我が国においては、諸外国の動きも受けて、平成 7 年度（1995 年度）から家畜病原細菌の薬剤耐性調査を開始し、平成 12 年度からは家畜衛生分野における薬剤耐性モニタリング体制（JVARM: Japan Veterinary Antimicrobial Resistance Monitoring System）を設立し、食用動物における抗菌剤使用量の調査および野外流行株や食品媒介病原性細菌等における薬剤耐性調査を実施し、これらの結果を「治療効果を最大化し、薬剤耐性菌の出現を最少化する」という“慎重使用”に反映させることとなっている[7]。我が国においては現在、ヒト医療での重要度が高いフルオロキノロン系、第三および第四世代セファロスポリン系およびマクロライド系を中心に臨床獣医師に対して“慎重使用”の呼びかけが行われている。実際、我が国の畜産領域での抗菌剤等抗菌性物質の使用量を、2001 年度と 2011 年度で比較すると飼料添加物として 2001 年は 233 トン、一方 2011 年度は 234 トン、動物用医薬品としては 2001 年で 1,059 トン、一方 2011 年度は 781 トンで、これらを合計した使用量は 2001 年度が 1,292 トンで、2011 年度は 1,015 トンと減少傾向にある[7、8]。しかしながら、2012 年度に我が国で使用された抗菌物質等の抗生物質の合計 1,693 トンの内飼料添加用に 175 トン、家畜の治療用に 727 トンの併せて 902 トンと、実に半分以上が畜産現場で使用されている[9]（図 1）。また、我が国の消費者からも抗菌性物質に関する責任ある慎重な使用を求める声が上がっており[10]、今後その使用量を減らす取り組みをさらに強化する必要がある。

一方、畜産現場において、抗菌剤は畜産物の安定生産には不可欠な資材と

して使用されている。畜種別にみると、2001年では動物用抗菌剤の販売高の実に54%を豚が占めており、次いで水産用に22%、鶏用に16%、牛用に8%となっている[7、8]。また、我が国でヒト医療上重要度が高いために、第二次選択薬として承認され特に強く“慎重使用”が求められている上記3系統（フルオロキノロン系、第三および第四世代セファロスポリン系およびマクロライド系）の動物用抗菌剤の中で、2012年度に使用実績があったフルオロキノロン系薬剤および第三および第四世代セファロスポリン系薬剤のそれぞれ25.5%および45.8%が豚で使用されており[11]、これら“慎重使用”を求められている薬剤でも豚での使用が多くなっている。このように治療用抗菌剤の使用量が豚で多い理由として、採卵鶏では産卵期間中の抗菌剤の使用は原則として禁じられており、またブロイラーでは飼養期間が短いために抗菌剤の使用による休薬期間を考慮すると実際に投薬できる期間が短いことがあげられる。一方で、牛や豚は飼養期間も長く休薬期間も守りやすいが、牛では個体診療による注射や飼料添加が中心で、豚では群での管理が一般的であり、群全体への投薬が行われるために豚での使用量が増えるものと考えられる。また、豚では呼吸器感染症や腸管感染症に多くの病気があり、その対策として、ワクチンと併せて抗菌剤の飼料添加が衛生プログラムに組み込まれている農場が多いことも一因となっている。

実際に多くの養豚場には複数の病原体が浸潤しており[12]、中でも豚の腸管感染症は多くの養豚場において頻繁に認められている。豚の腸管感染症の原因となる主な病原体としてサルモネラと大腸菌が挙げられる[13、14]。

豚のサルモネラ症は我が国での発症例の報告もあり[15]、豚の下痢便からも高率に分離されている[16]。加えて、サルモネラはヒト食中毒の主な原因菌としても知られており、特にEUでは1990年代に発生したヒトのサルモネラ食中毒の20%程度が豚肉の喫食と関連していたと報告されている[17]。そのためEU諸国では、生産農場から食卓まで全ての段階で畜産物の食中毒対策に取り組む“Farm to Table”を実践することで、ヒト食中毒の発生を減少させる成果を挙げており[18]、生産現場からのコントロールが有効であることが示されている。養豚場におけるサルモネラ対策としては、飼養環境の改善やオールイン・オールアウトの実践等と併せて、抗菌剤を用いた対策も

行われている[19、20]。しかし、サルモネラにおける薬剤耐性菌の出現が報告されており[21]、慎重使用が求められている第二次選択薬を使用せざるを得ない事例も発生している。

一方、大腸菌は豚では新生期下痢症、離乳後下痢症および浮腫病等の原因菌で、多くの農場から分離されており、我が国でも発症が認められている[22]。大腸菌の対策もサルモネラと同様に飼養管理の改善や飼養環境の整備と併せて生菌剤の給与や抗菌剤の投与が行われている。しかし、大腸菌でも薬剤耐性菌の出現が報告されている[23]。そのため、サルモネラと同様に、慎重使用が求められている第二次選択薬を使用せざるを得ない事例も発生している。

近年、これら抗菌剤の慎重使用の呼びかけや豚を含めた家畜における重要な病原体での薬剤耐性菌の出現を受け、抗菌剤代替物質の研究が活発に行われている[24、25]。抗菌剤代替候補物質としてプロバイオティクス、有機酸、ハーブ類などについて得に多く報告されており、実際に野外養豚場で応用されているものもある。しかし、これら代替物質の中で野外養豚場において安定した効果を示しているものは少ない[26、27]。その原因としてこれら代替物質の評価試験が *in vitro* や齧歯類では多く行われているが、対象動物である豚に対応した試験が十分に行われていないためと考えられる。例えば、ヒトの特定保健用食品でも対象となるヒトでの効果を確認する試験が求められており[28]、家畜でも同様に対象動物で効果を確認する試験が不可欠と考えられる。家畜を用いた抗菌剤代替物質の評価試験の中でも、特に病原体に対する効果を確認する感染試験を用いた評価はほとんど行われておらず、世界の先進国の中でも日本における取り組みは特に遅れている。そこで本研究では、まず豚の重要な病原体であるサルモネラと大腸菌の感染系の確立を目的とし、第二章で豚サルモネラ・ティフィムリウム感染系の確立を試み、第四章で豚大腸菌症感染系の確立を試みた。

また、第二章および第四章で確立した豚を用いた感染系が抗菌剤代替物質の評価に応用できるかを、有機酸の一種である乳酸を用いて検討した。有機酸は畜産分野では飼養効率の改善等を目的として使用実績があり、非乖離状態では直接的な殺菌作用がある[29]。殺菌作用の機序は非乖離型の有機酸が

細菌の中に侵入して細菌内の pH を低下させプロトンポンプを過剰に活動させ、細菌のエネルギーを枯渇させ死滅させるとされている。また、乳酸には野外養豚場でサルモネラや大腸菌対策として有効であるとの報告があり [30、31]、本研究で確立した感染系を評価するには適していると考えられる。そこで、第三章では豚サルモネラ・ティフィムリウム感染系を用いて乳酸添加飼料の評価を行い、第五章では豚大腸菌感染系を用いて同様に乳酸添加飼料の評価を実施した。

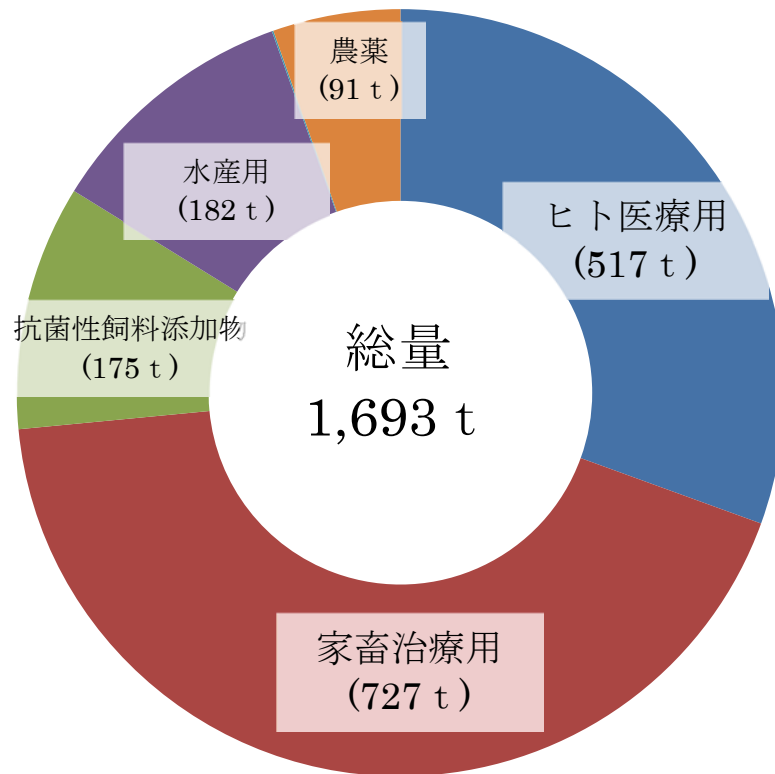


図 1 2012 年度に我が国で使用された抗生物質の目的別割合 [9]

第二章

豚サルモネラ・ティフィムリウム感染系 の確立

【諸言】

Salmonella には多くの血清型があり、豚から分離される血清型も多岐に渡るが、豚に対して病原性が強く、単独で臨床症状を起こす *Salmonella* は *Salmonella* Typhimurium と *Salmonella* Choleraesuis の 2 血清型と考えられている [13]。前者は主に下痢を発症し、後者は主に敗血症や肺炎を発症させる。*S. Typhimurium* を原因とした下痢は我が国でも頻繁に認められ、我が国の養豚場の下痢便から *Salmonella* の分離を試みた試験では *S. Typhimurium* が最も高率に分離されている [16]。さらに、*S. Typhimurium* はヒトの *Salmonella* を原因とした食中毒事例からも頻繁に分離されている [32]。日本では、2011 年度と 2010 年度に蒸し豚が原因のヒトのサルモネラ食中毒事例が発生しているが [33]、豚肉を原因としたヒト食中毒事例は少なく、豚肉からの *Salmonella* 分離率も 1~3% と低い値を示している [34]。一方、EU 諸国では 1990 年代に発生したヒトのサルモネラ食中毒の 20% 程度が豚肉の喫食と関係あるとされていたが、近年は農場段階から食卓まで全ての段階で食中毒対策に取り組む “Farm to Table” のを実践することで、ヒト食中毒の発生を低下させており [18]、農場での *Salmonella* コントロールがヒト食中毒にも有効であることが示されている。そこで、本章では *Salmonella* の中でも、豚とヒトの両方で注目される *S. Typhimurium* を用いた感染系の確立を目指した。

現在報告されている豚を用いた *Salmonella* 感染試験の多くは、肥育期の豚を対象としている。その背景には、EU 諸国では養豚場で下痢を伴う豚 *Salmonella* 症が殆ど発生していないこともあり、養豚場における *Salmonella* 対策が豚肉を介したヒト食中毒の予防に主眼が置かれており、生産現場においては出荷豚の *Salmonella* 陽性率を低下させることが求められているためである。そのため、農場において症状を伴わず糞便に間欠的に *Salmonella* を排泄する不顕性感染豚による豚群内での *Salmonella* 感染拡大を予防する方法が研究、提案されている。特に出荷豚の *Salmonella* 陽性率に直接関係する肥育期間中の豚群内での *Salmonella* 感染拡大の予防法について多くの提案がなされている [35-37]。それらの提案の中には、豚を用

いた感染試験で出荷豚や肥育豚を対象に下痢を伴わない不顕性の豚 *Salmonella* 感染を再現した報告もある。それら豚を用いた感染試験の中で、豚の *Salmonella* 感染は感染菌数が多いほど臨床症状が強く発現し、糞便中の菌数も多くなることが示唆されている [38、39]。豚群内での *Salmonella* の感染が主に糞口感染によることから、豚群内における *Salmonella* 感染拡大の予防には糞便中の菌数を減少させることが重要であると考えられている。

一方、我が国では下痢を伴う豚 *Salmonella* 症が発生しており [16]、その好発時期が離乳後であることから、EU 諸国の取り組みとは別に、離乳期の臨床症状を伴った *Salmonella* 症の対策を提案する必要がある。過去に離乳豚を用いた感染系も報告されているが [39]、糞便に含まれる *Salmonella* 数を測定した情報は少なく、特に下痢や軟便等の糞便性状とそれらに含まれている *Salmonella* 数についての調査は全く行われていない。そこで本試験では、糞便中に含まれる菌数を定量し、糞便性状との関連を調査することで、今後の抗菌剤代替物質の評価を行う際に糞便中の *Salmonella* 数が指標となりうるかも合わせて調査した。

【材料と方法】

1. 供試菌株の選抜

供試豚：21 日齢あるいは 22 日齢の SPF 豚 20 頭を当所に導入し、馴致期間中に糞便検査により *Salmonella* 陰性を確認し、試験に供試した。

供試菌株：それぞれ異なる野外養豚場から分離された *S. Typhimurium*-5 (ST-5) 株、*S. Typhimurium*-8 (ST-8) 株、*S. Typhimurium*-64 (ST-64) 株 および *S. Typhimurium*-116 (ST-1116) 株それぞれに当所でリファンピシン耐性を付与し、ST-5 Rif^r 株、ST-8 Rif^r 株、ST-64 Rif^r 株および ST-116 Rif^r 株として供試した。

接種菌の菌液調整では各株を DHL 寒天培地（栄研化学株式会社、東京）

にそれぞれ発育させ、発育した各株の単一コロニーを 200mL の SCD 液体培地にそれぞれ接種し 37°C で 5 時間振盪培養した後に、培養液の菌濃度を PBS で調整し、最後に等量の 20% Skim Milk と混合して接種菌液として供試した。

感染試験: 供試豚を導入時に各区 5 頭の 4 区 (ST-5 株区、ST-8 株区、ST-64 株区および ST-116 株区) に分け、5 日間の馴致期間を経た 26 日齢あるいは 27 日齢時に、4 区それぞれに異なる *S. Typhimurium* 株を経口で接種した。具体的には、ST-5 株区では ST-5 Rif^r 株を 1 頭あたり 4.1×10^9 CFU/mL を 10mL、ST-8 株区では ST-8 Rif^r 株を 1 頭あたり 2.6×10^9 CFU/mL を 10mL、ST-64 株区では ST-64 Rif^r 株を 1 頭あたり 2.0×10^9 CFU/mL を 10mL、ST-116 株区では ST-116 Rif^r 株を 1 頭あたり 2.0×10^9 CFU/mL を 10mL それぞれ経口で接種した。

観察期間中は臨床症状の観察を毎日行い、糞便性状のスコア化および糞便の採取を随時実施した。体温測定として直腸温度の測定を毎日実施した。剖検は経時的に実施し、接種後 3 日目、7 日目および 14 日目に各区からそれぞれ 1 頭、2 頭および 2 頭を無作為に選抜し剖検に供試した。

2. 接種菌数の検討

供試豚: 28 日齢の SPF 豚 15 頭を当所に導入し、馴致期間中に糞便検査および血清を用いた抗体検査によって *Salmonella* 陰性であることを確認し、供試した。

供試菌株: 野外養豚場から分離され、上記「1. 供試菌株の選抜」で選抜された ST116Rif^r 株を供試した。接種菌の菌液調整は「1. 供試菌株の選抜」と同様に実施した。つまり、DHL 寒天培地 (栄研化学株式会社、東京) に発育させた ST116Rif^r の単一コロニーを 200mL の SCD 液体培地に接種し 37°C で 5 時間振盪培養した後に、その培養液の菌濃度を PBS で調整し、最後に等量の 20% Skim Milk と混合して接種菌液として供試した。

感染試験：導入時に供試豚を各区 5 頭の 3 区（ST-9 区、ST-7 区および ST-5 区）に分け、7 日間の馴致期間を経た 35 日齢時に 3 区それぞれに異なる菌数の ST116Rif^r を経口で接種した。具体的には、ST116Rif^r を ST-9 区では 1 頭あたり 3.2×10^8 CFU/mL を 10mL、ST-7 区では 1 頭あたり 3.2×10^6 CFU/mL を 10mL および ST-5 区には 1 頭あたり 3.2×10^4 CFU/mL を 10mL それぞれ経口で接種した。

観察期間中は臨床症状の観察を毎日行い、糞便性状のスコア化および糞便の採取を随時実施した。体温測定として直腸温度の測定を毎日実施した。採血は毎週実施した。観察期間中に著しい脱水症状や沈鬱が認められた際には、ペントバルビタールを用いた安楽殺を施した。接種後 39 日目には耐過豚全頭の剖検を実施し、主要臓器および腸管内容物を採取した。

3. 観察および検査項目

糞便性状のスコア化：糞便性状は随時スコア化して記録した。すなわち、正常便をスコア 0、軟便をスコア 1、下痢便をスコア 2 とした。

糞便中および腸管内容物中の接種 *S. Typhimurium* 数の測定、増菌および遅延二次増菌培養：観察期間中の糞便の採取は各個体から直接行い、糞便採取後はすぐに接種 *S. Typhimurium* 数の測定を行った。菌数測定では糞便 1g を PBS で 10 倍段階希釈し、適切な希釈段階の糞便希釈液を $100 \mu\text{g/mL}$ リファンピシン含有 DHL 寒天培地（RFDHL）に塗抹し、 37°C で 24 時間培養後に発育したコロニー数を計測した。菌数測定で接種 *S. Typhimurium* が検出されなかった検体については、引き続き増菌培養を行った。増菌培養では糞便 1g を 10mL の PBS で希釈した上記の糞便希釈液から 1mL 採取し、それを 10mL のハーナ・テトラチオン酸塩培地（栄研化学株式会社）に接種し、 41.5°C で 24 時間培養後に RFDHL 寒天培地に塗抹し 37°C で 24 時間培養し、コロニー形成の有無を観察した。菌数測定および増菌培養で *S. Typhimurium* が検出されなかった際には遅延二次増菌培養を実施した。遅

延二次増菌培養では増菌培養で用いたハーナ・テトラチオン酸塩培地を増菌培養終了後に室温で1週間静置した後に、培養液を1mL採取し、10mLのハーナ・テトラチオン酸塩培地に接種し、41.5°Cで24時間培養した培養液をRFDHL寒天培地に塗抹し、37°Cで24時間培養後にRFDHL寒天培地でのコロニー形成の有無を観察した。

剖検時に採取した腸管内容物についても同様に菌数測定、増菌培養および遅延二次増菌培養を実施した。

各種臓器における *S. Typhimurium* の検出：剖検時には肝臓、肺、脾臓、腎臓、腸間膜リンパ節、空腸内容物および盲腸内容物を各1gずつ無菌的に採取した。腸管内容物以外の各臓器は表面を火炎滅菌した後に、10mLのハーナ・テトラチオン酸塩培地に懸濁し41.5°Cで24時間培養した。また、腸内容物も同様に10mLのハーナー・テトラチオン酸塩培地に懸濁し、41.5°Cで24時間培養した。臓器および腸内容物は培養終了後に培養液をRFEHL培地に塗抹し、37°Cで24時間培養し、コロニー形成の有無を観察した。発育が観察されなかった際には、上記と糞便中の *S. Typhimurium* の遅延二次増菌培養と同様に遅延二次増菌培養を実施した。

抗体測定：豚抗O4抗体を市販されているELISAキット（SALMOTYPE Pig Screen, Labor Diagnostik, Leipzig, Germany）を用いて測定した。キットの操作は全て使用説明書に従った。キットの説明書に従い、10 OD%以上を陽性とした。

統計処理：測定された *S. Typhimurium* 各株の菌数は対数変換し、検出限界以下となった検体は0とした。菌数測定では *S. Typhimurium* が検出されず、増菌培養あるいは遅延二次増菌培養で *S. Typhimurium* が検出された検体は一律に 10^2 CFU/g として統計処理を行った。 *S. Typhimurium* 数は Student's *t*-test で有意差の判定を行った。また、体温測定では試験「1. 供試菌株の選抜」では各区の接種前2日間の体温と、試験「2. 接種菌数の検討」では各区接種前5日間の体温と Student's *t*-test で比較して有意差を示

した際に発熱とした。糞便性状のスコアは Mann-Whitney *U*-test で統計処理を行った。特に記載のない場合には $p<0.05$ で有意差ありとした。

【結果】

1. 供試菌株の選抜

臨床症状: 全区全頭で試験期間中に著しい臨床状態の悪化を示す個体は認められず、全頭が生残耐過した。

ST-64 株区および ST116 株区では接種後 1 日目から糞便性状の悪化が認められ、接種後 2 日目および 3 日目にはほぼ全頭で下痢が認められた。両区とも接種後 5 日目以降は下痢が認められず、ST-116 株区では試験終了まで接種後 12 日目を除く各観察日で 1~2 頭で軟便が観察されたが、ST-64 株区では接種後 7 日目には全頭で正常便となり、その後は軟便の発現は散発的であった。一方、ST-5 株区および ST-8 株区では糞便性状の悪化は殆ど認められず、ST-5 株区で下痢および軟便が観察されたのは、接種後 3 日目に 1 頭が下痢を発現した 1 回のみであった (図 2、3)。

全区で接種翌日から体温上昇が見られたが、ST-8 株区では発熱には至らなかった。一方、ST-5 株区では接種後 1 日目から 3 日目に、ST-64 株区では接種後 1 日目から 4 日目にかけて、ST-116 株区では接種後 2 日目から 4 日目にかけて発熱が認められた (図 4)。各区とも接種後 1 週間以内に体温上昇は収まった。

糞便中の接種 *S. Typhimurium* 数の推移: 接種後 1 日目から全区全頭の糞便から *S. Typhimurium* が検出され、観察期間中には全頭の糞便から複数回検出された。各区の平均 *S. Typhimurium* 数も接種後 1 日目には 1×10^4 CFU/g 以上となった (図 5)。各区の糞便中 *S. Typhimurium* 数の平均のピークは ST-5 株区では接種後 2 日目の 2.3×10^6 CFU/g、ST-8 区では接種後 1 日目の 2.7×10^4 CFU/g、ST-64 株区では接種後 3 日目の 2.3×10^7 CFU/g および ST-116 株区では接種後 3 日目の 2.2×10^8 CFU/g となった。観察期

間を通じて ST-8 株区は他の 3 区と比べて低い菌数で推移し、接種後 2 日目には他の 3 区と、接種後 3 日目には ST-64 株区および ST-116 株区の両者と有意差が示された。ST-5 株区の平均 *S. Typhimurium* 数は接種後 2 日目までは ST-64 株区および ST-116 株区と同程度を示したが、3 日目以降は低値を示した。接種後 3 日目には ST-5 株区と ST-116 株区間で有意差が示された。ST-64 株区と ST-116 株区間では有意差は示されなかったが、全測定日で ST-116 株区の方が ST-64 株区よりも多い菌数を示した。

各種臓器からの接種 *S. Typhimurium* の分離：接種後 3 日目、7 日目および 14 日目に剖検を実施し、各種臓器から接種菌の分離を試みたが、最も高率に菌が分離されたのは各区とも接種後 7 日目であり、ST-5 株区、ST-64 株区および ST-116 株区では 10 検体中 9 検体で陽性となったが、ST-8 株区は 10 検体中 3 検体のみが陽性となった(表 1)。接種後 14 日目には ST-5 株区、ST-64 株区および ST-116 株区でも検出率が低下し、それぞれ 10 検体中 2 検体、3 検体および 3 検体が陽性となった。接種後 3 日目には ST-64 株区および ST-116 株区では 5 検体中それぞれ 3 および 4 で陽性となり、ST-5 株区および ST-8 株区では両区とも 5 検体中 2 検体が陽性となった。

2. 接種菌数の検討

臨床症状：全区に共通して下痢等の臨床症状は ST-116Rif^r 接種後 1 週間以内に多く観察され、それ以降は回復する傾向にあった(図 6)。

ST-9 区では著しい脱水症状と沈鬱を示したために ST-116Rif^r 接種後 3、4、5 および 7 日目にそれぞれ 1 頭ずつに安楽殺が施され、観察期間を耐過したのは 5 頭中 1 頭のみで、その 1 頭でも接種後 3 日目および 4 日目に下痢が観察された。一方、ST-7 区および ST-5 区では全頭が観察期間を耐過した。ST-7 区では接種後 3 日目に 2 頭および接種後 12 日目に 1 頭で下痢が観察され、全頭で軟便が観察された。ST-5 区では下痢は観察されなかったが、5 頭中 4 頭で軟便が観察された。接種後 3 日目には ST-5 区と他の 2 区の間で接種後 4 日目に ST-9 区と他の 2 区の間で糞便性状スコアで有意差が認めら

れた。

体温は接種翌日から上昇し、ST-9 区では接種後 1、3 および 5 日目、ST-7 区では接種後 2 日目から 6 日目、ST-5 区では接種後 2 および 4 日目に発熱が認められた (図 7)。

抗体価の推移: ST-9 区では接種後 3 週目には耐過した 1 頭で抗体が陽性となった (図 8)。ST-7 区でも接種後 4 週目には 5 頭中 3 頭で抗体陽性となり、39 日間の観察期間中に全頭で抗体陽性となった。一方、ST-5 区では接種後 5 週目でも 5 頭中 2 頭が抗体陽性となった。

糞便中 ST116Rif^r 数の推移: 各区の糞便中の ST116Rif^r 数は接種後 7 日目までにピークとなり、ピーク時の糞便中 ST116Rif^r 数は ST-9 区では 4.8×10^8 CFU/g、ST-7 区では 1.0×10^6 CFU/g および ST-5 区では 3.2×10^4 CFU/g となった (図 9)。有意差は接種後 3 日目および 4 日目に 3 区間ともに認められ、接種後 6 日目には ST-9 区と ST-5 区の間で認められた。

糞便性状毎の ST116Rif^r 数: 本試験では下痢便が ST-9 区および ST-7 区でそれぞれ 7 回と 3 回観察され、合計では 10 回観察された。一方、軟便は ST-9 区、ST-7 区および ST-5 区でそれぞれ 6 回、10 回および 9 回観察され、合計では 25 回観察された。正常便は 92 回観察された。本試験で観察された 10 個の下痢便中に含まれていた ST116Rif^r 数は平均で 1.0×10^8 CFU/g となった (表 2)。一方、25 個の軟便中および 92 個の正常便中に含まれていた ST116Rif^r 数は、それぞれ 1.6×10^4 CFU/g および 7.1×10^1 CFU/g となり、各糞便性状間で有意差が示された。また、正常糞便 95 検体中 5 検体において ST116Rif^r が 1×10^6 CFU/g 以上検出された。

剖検時臓器からの菌分離: 観察期間中に安楽殺を施された個体では臓器から高率に ST116Rif^r が分離されたが、39 日間の観察期間を耐過した豚では肝臓、肺、脾臓および腎臓からはほとんど分離されなかった (表 3)。一方、扁桃、腸間膜リンパ節、空腸および盲腸内容物中からは耐過豚でも高率に

ST116Rif^rが分離された。耐過豚の試験期間中の糞便性状と剖検時の各種臓器からの菌分離陽性率に関連は認められなかった。



図 2 *S. Typhimurium* 実験感染豚で再現された
下痢便（左）および下痢発症豚で観察された発育不良（右）

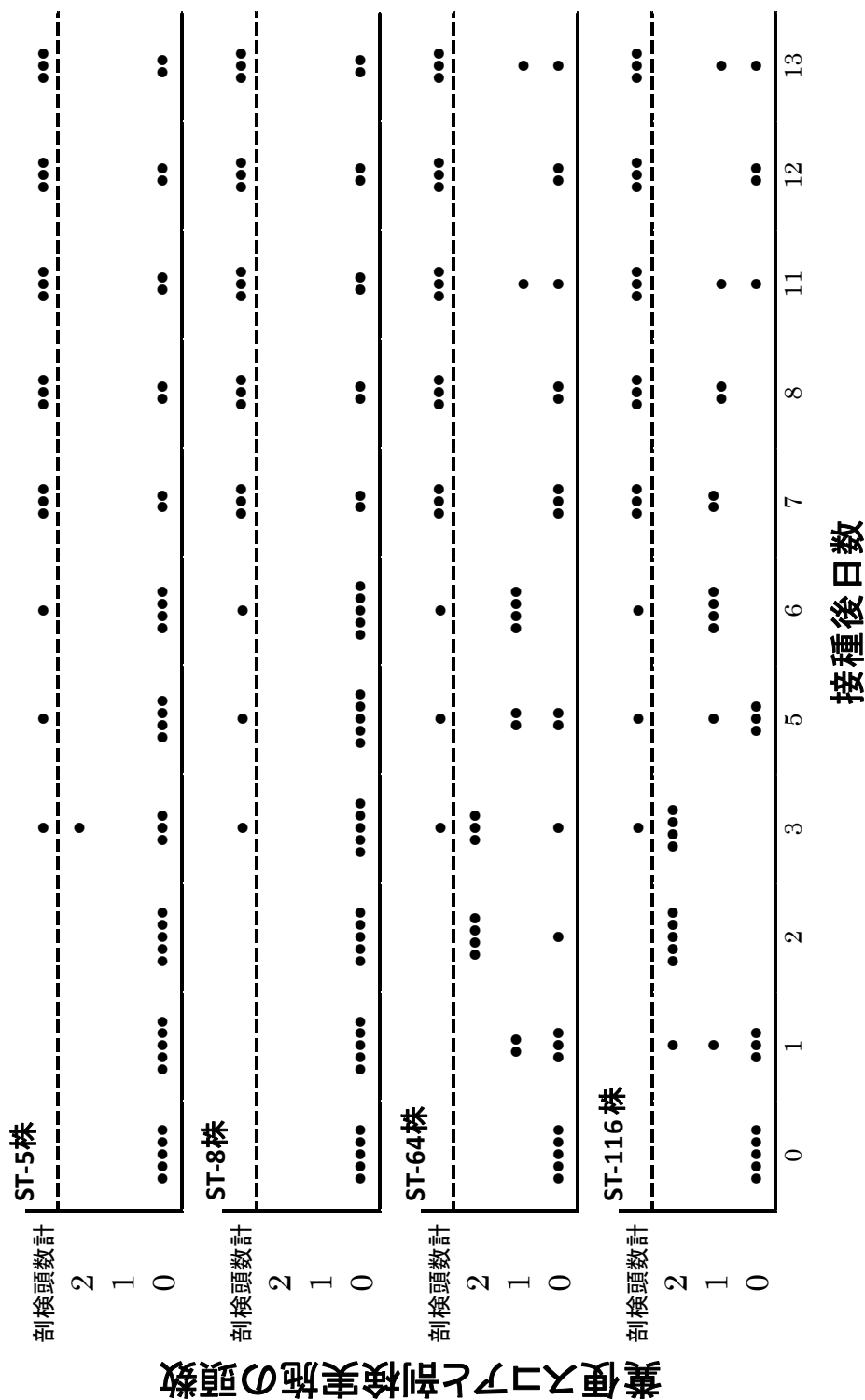


図3 *S. Typhimurium* 株接種後の糞便性状の推移と剖検頭数

各区の糞便性状スコアの推移と剖検頭数を示す。表中の●が供試豚1頭を示す。

糞便性状スコアは0が正常便、1が軟便および2が下痢便を示す。

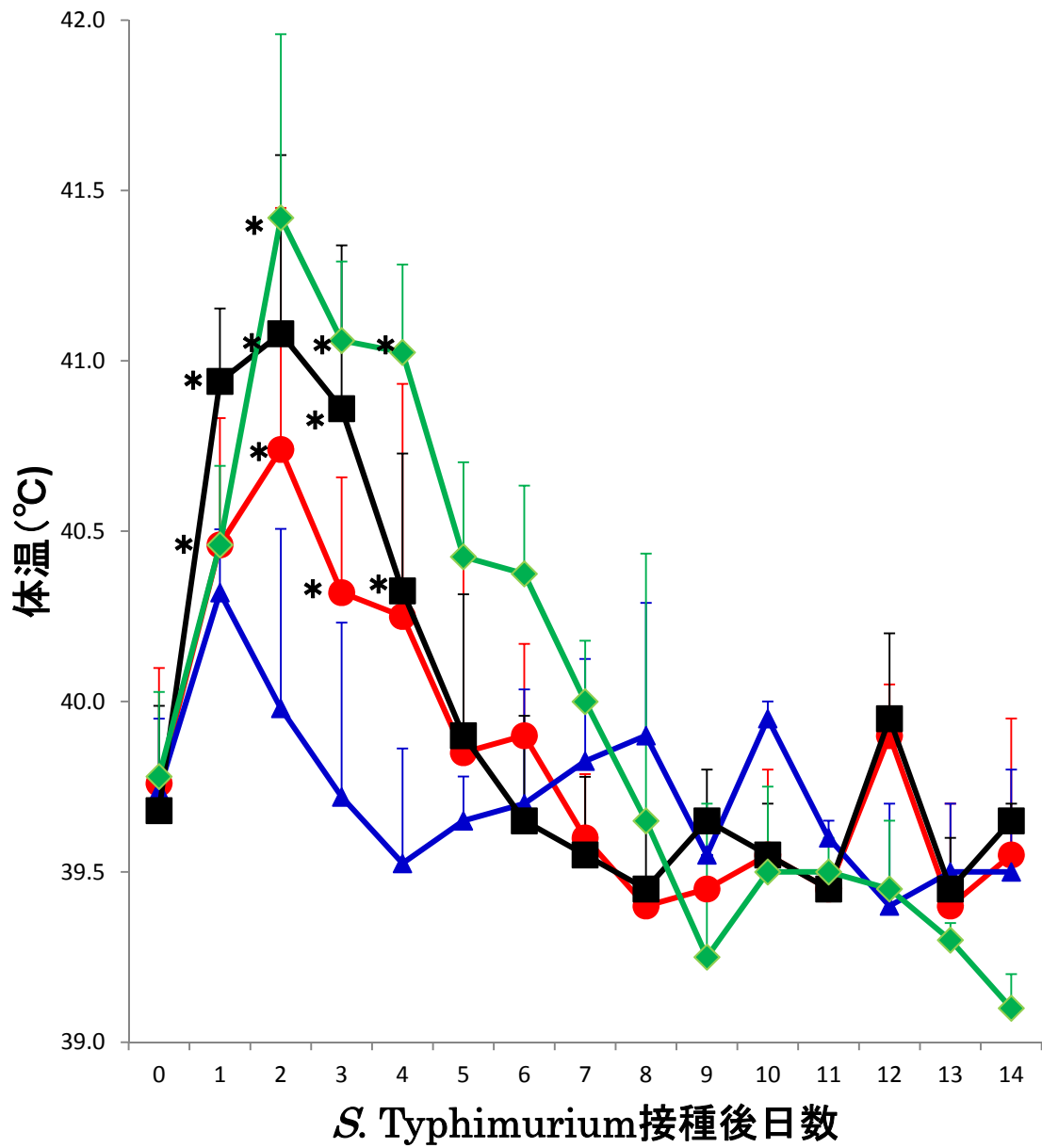


図 4 *S. Typhimurium* 株接種後の体温の推移

各区の平均体温を示す。各記号は●が ST-5 株区、▲が ST-8 株区、■が ST-64 株区および◆が ST-116 株区を示す。*は各区の接種前体温との有意差 ($p < 0.05$)を示す。

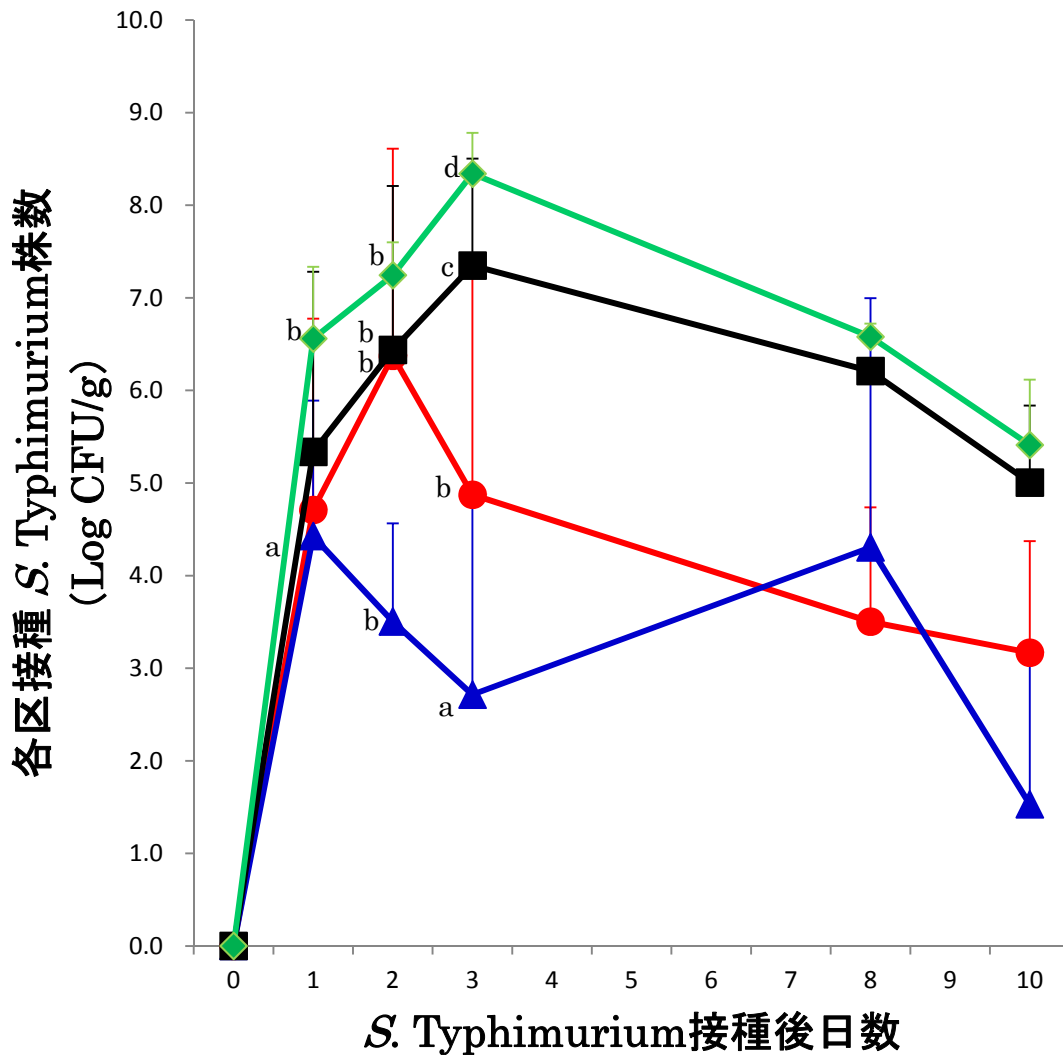


図 5 *S. Typhimurium* 株接種後の糞便中の *S. Typhimurium* 数の推移

各区の平均糞便中 *S. Typhimurium* 数を示す。各記号は●が ST-5 株区、▲が ST-8 株区、■が ST-64 株区および◆が ST-116 株区を示す。a, b は異符号間で有意差($p < 0.05$)を示す、接種後 3 日目は a と c および d、b と d で有意差($p < 0.05$)を示す。

表 1 4 株の *S. Typhimurium* 接種試験での剖検時の各種臓器からの
S. Typhimurium の分離率

接種後 日数	区	肺	肝臓	腎臓	脾臓	腸間膜 リンパ節	計
3	ST-5株	0/1*	0/1	0/1	1/1	1/1	2/5
	ST-8株	1/1	1/1	0/1	0/1	0/1	2/5
	ST-64株	0/1	0/1	1/1	1/1	1/1	3/5
	ST-116株	0/1	1/1	1/1	1/1	1/1	4/5
	小計	1/4	2/4	2/4	3/4	3/4	11/20
7	ST-5株	2/2	2/2	2/2	1/2	2/2	9/10
	ST-8株	1/2	1/2	0/2	0/2	1/2	3/10
	ST-64株	2/2	2/2	1/2	2/2	2/2	9/10
	ST-116株	2/2	2/2	2/2	1/2	2/2	9/10
	小計	7/8	7/8	5/8	4/8	7/8	30/40
14	ST-5株	1/2	0/2	0/2	0/2	1/2	2/10
	ST-8株	2/2	0/2	0/2	0/2	1/2	3/10
	ST-64株	1/2	1/2	0/2	0/2	1/2	3/10
	ST-116株	2/2	0/2	0/2	0/2	1/2	3/10
	小計	6/8	1/8	0/8	0/8	4/8	11/40
	合計	14/20	10/20	7/20	7/20	14/20	

* : 陽性検体数/供試検体数

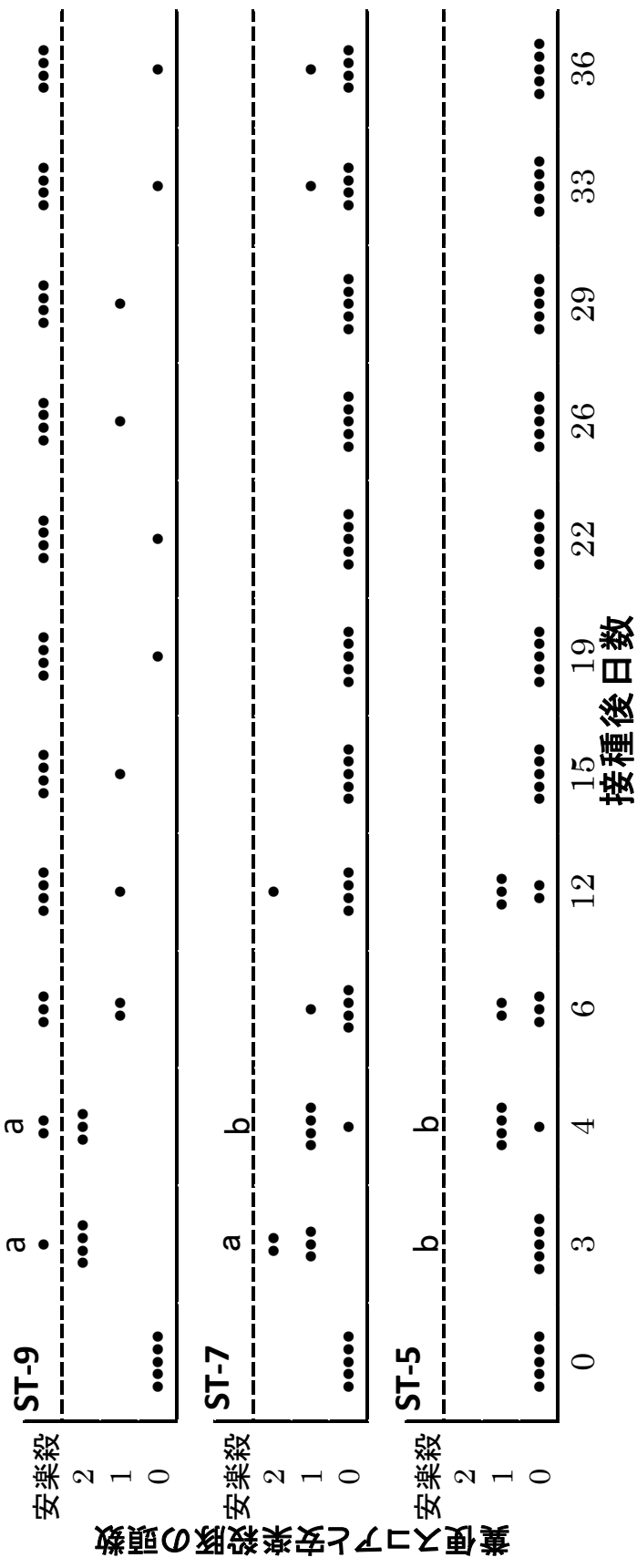


図 6 *S. Typhimurium* 接種後の糞便性状の推移および安楽殺頭数

各区の糞便性状スコアの推移と剖検頭数を示す。表中の●が供試豚 1 頭を示す。

糞便性状スコアは 0 が正常便、1 が軟便および 2 が下痢便を示す。

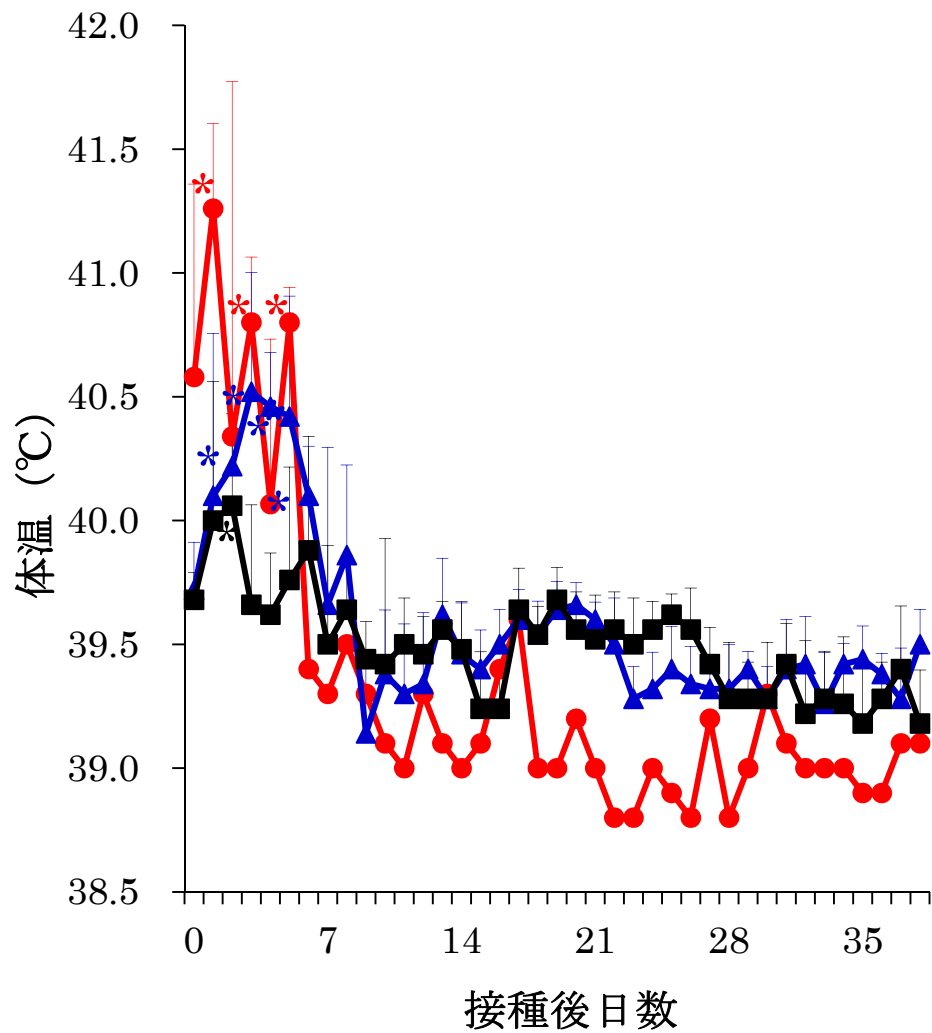


図 7 *S. Typhimurium* 接種後の体温の推移

各区の平均体温を示す。各記号は●が ST-9 区、▲が ST-7 区および■が ST-5 区を示す。*は各区の接種前体温との有意差($p < 0.05$)を示す。

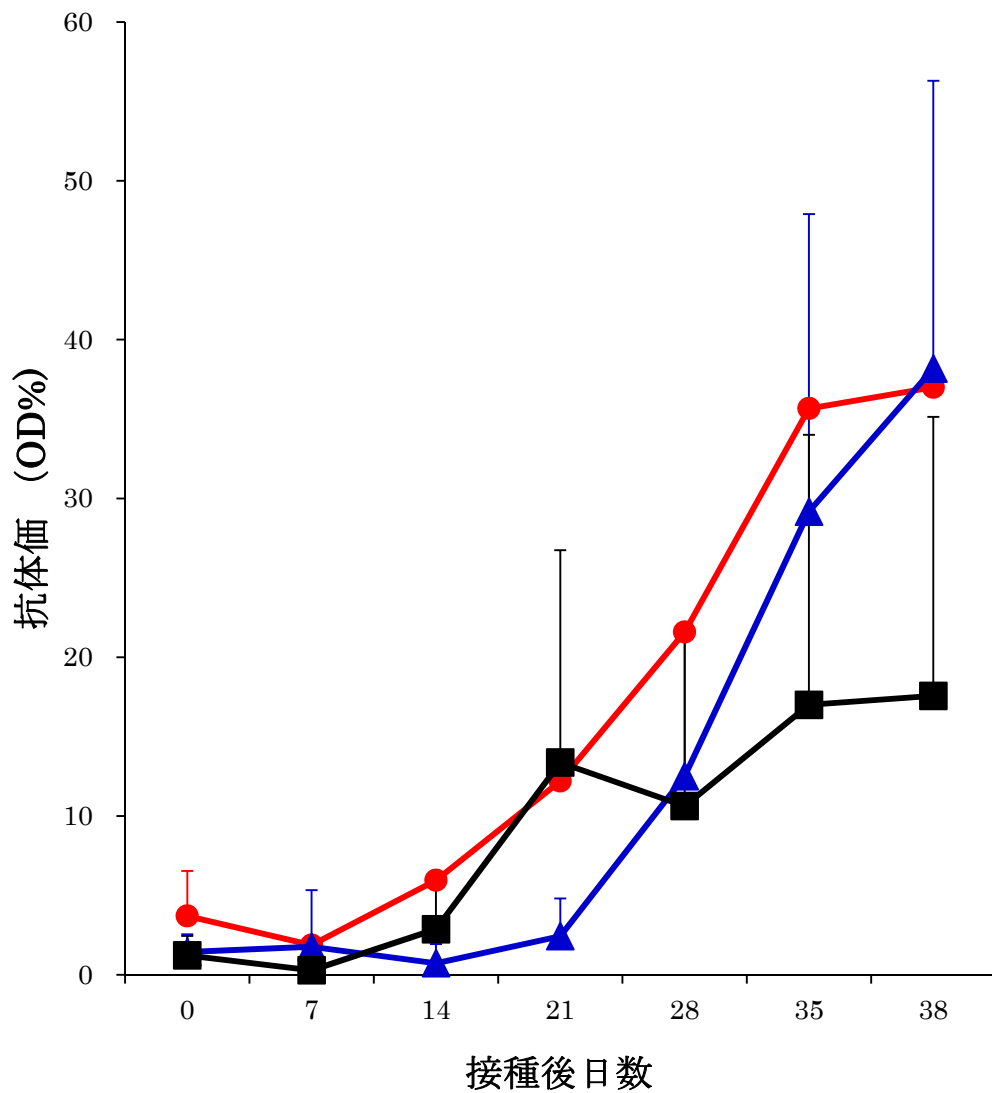


図 8 *S. Typhimurium* 接種後の抗 O4 抗体価の推移

各区の平均抗体価を示す。各記号は ● が ST-9 区、▲ が ST-7 区および ■ が ST-5 区を示す。

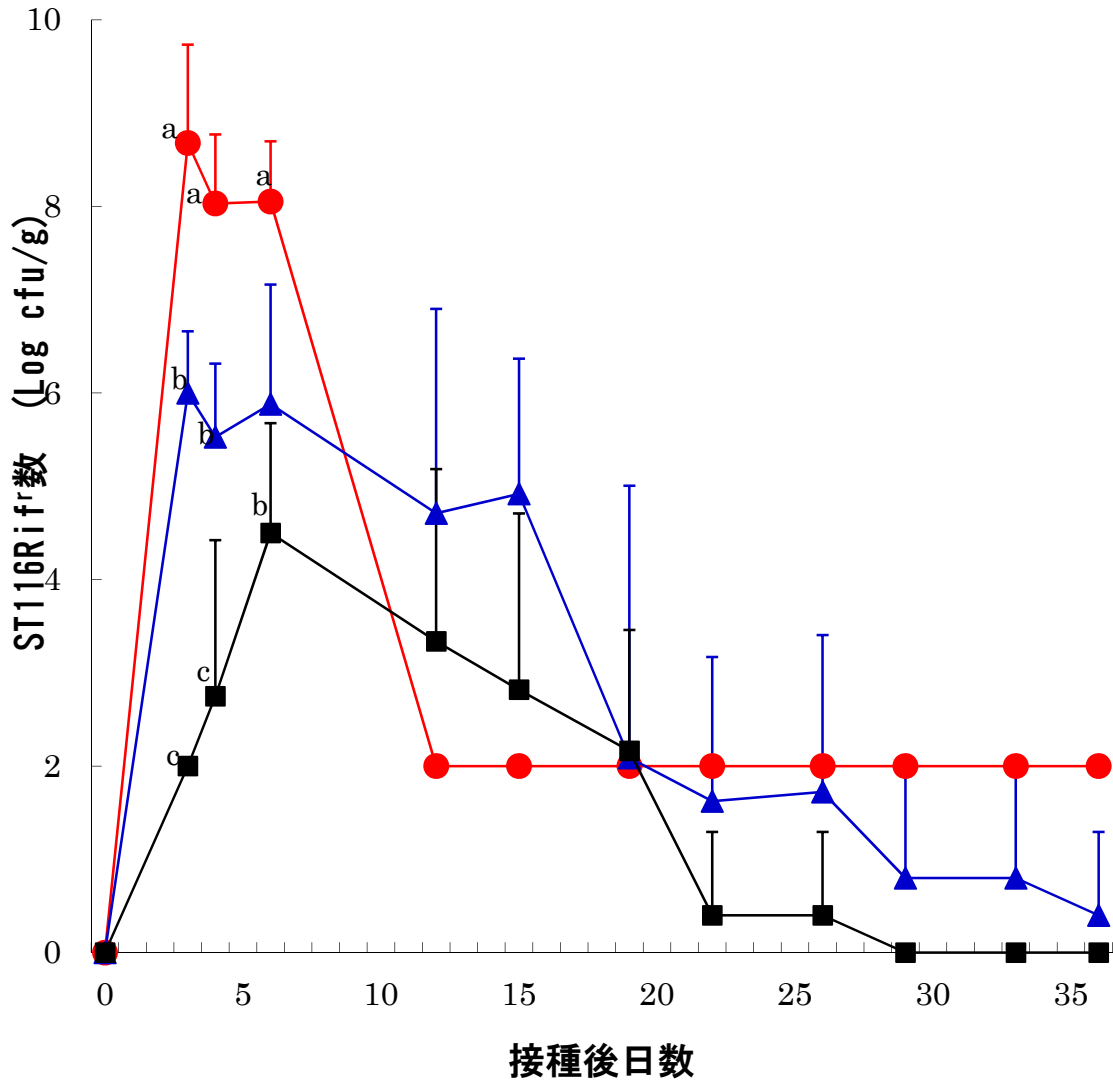


図 9 *S. Typhimurium* 接種後の糞便中の *S. Typhimurium* 数の推移

各区の平均糞便中 *S. Typhimurium*116Rif^r 数を示す。各記号は●が ST-9 区、▲が ST-7 区および■が ST-5 区を示す。a、b、c は異符号間で有意差 ($p<0.05$)を示す。

表 2 糞便性状別の *S. Typhimurium* 数

糞便性状	下痢 検体数	軟便 検体数	正常便 検体数
検出限界以下		2	40
2			26
<2.0-≦3.0			4
<3.0-≦4.0		3	7
<4.0-≦5.0		3	5
<5.0-≦6.0		5	5
<6.0-≦7.0	2	4	5
<7.0-≦8.0	2	1	
<8.0-≦9.0	4	1	
<9.0-≦10.0	2		
平均±標準誤差 (Log CFU/g)	8.01±1.08	4.20±2.27	1.85±2.01
有意差 ($p<0.05$)	a	b	c

表 3 各種臓器および腸管内容物からの *S. Typhimurium* 検出率

臨床症状	肝臓	肺	脾臓	扁桃	腎臓	腸間膜		腸管内容物	
						リンパ節	空腸	盲腸	盲腸
安楽殺豚	4/4 ^(a)	4/4	3/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4
下痢発症豚	0/3	0/3	0/3	3/3	0/3	1/3	3/3	3/3	3/3
耐過豚	1/7	1/7	1/7	6/7	2/7	3/7	5/7	3/7	3/7
非発症豚	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1

a : 陽性検体数/供試検体数

【考察】

本章では *S. Typhimurium* 感染系を確立するため、「1. 供試菌株の選抜」では異なる野外養豚場で分離された 4 株の *S. Typhimurium* を感染させ、豚に対する病原性を比較した。具体的にはそれぞれ 10^{10} CFU/頭程度を経口で接種し、糞便性状の悪化と糞便中に排泄される接種 *S. Typhimurium* 数等を測定した。その結果、4 株の *S. Typhimurium* 内の 2 株では供試豚に高率で下痢が認められたが、残りの 2 株では糞便性状の悪化は殆ど認められなかった。また、糞便中への *S. Typhimurium* の排菌数も、糞便性状を悪化させた 2 株の方が他の 2 株よりも高い値で推移した。近年の研究により *Salmonella* の病原因子は 200 種類以上が報告されており [40]、*S. Typhimurium* は株毎に病原性が異なっていることが知られている。例えば、Namimatsu らは死亡に至る敗血症を引き起こす *S. Typhimurium* は、病原性プラスミドを高率に保有していることを報告している [41]。また、毒素、線毛および鞭毛もその病原性の発現に関与することが報告されている [40]。本章の研究において、*S. Typhimurium* 株間で豚における病態に違いが認められた事も、それぞれの株が保有するこれら病原因子が異なるためと考えられる。各株がどのような病原因子を保有しているかについては、今後更なる研究が必要である。

次いで 4 株の中で臨床症状が強く発現し、糞便中からも多量の菌の排泄が認められた *S. Typhimurium* 株 1 株を用いて、適切な感染菌数を調査するため、*S. Typhimurium* の感染菌数を 3 段階に設定して豚に経口接種させた。その結果、感染菌数が多いほど生残率、下痢や軟便等の糞便性状および発熱が悪化することがわかった。豚での *Salmonella* 感染では感染菌数が多いほど臨床症状が悪化することは以前から報告されており、今回の結果もそれらを支持するものとなった [38、42-44]。また、*Salmonella* の感染菌数と *Salmonella* の糞便中への排菌数も、感染菌数が多くなるほど糞便中へ排泄される *S. Typhimurium* 数も多くなることが明らかとなり、これについても過去の報告を支持するものとなった [42、44]。

本試験により、今まで科学的な解析が十分に行われていなかった糞便性状毎の糞便中 *S. Typhimurium* 数について解析することができ、糞便性状が悪

化するほど糞便中の *S. Typhimurium* 数が多くなることを見出した。一方、正常便の中にも 1×10^6 CFU/g 以上の *S. Typhimurium* を含んでいる糞便が認められた。Pires らによると、*Salmonella* 陽性の野外養豚場から出荷される不顕性感染豚の糞便中で、 1×10^6 CFU/g 以上の *Salmonella* が検出されたと報告している[45]。このことは、離乳豚および肥育豚が排泄している正常便中にもまれに多量の *Salmonella* が含まれていることを示唆している。また、*Salmonella* 感染を成立させるために必要な *Salmonella* 数について、 5×10^2 CFU/g 程度の *S. Typhimurium* が含まれている糞便や[46]、 4×10^2 CFU/100cm² の *Salmonella* で汚染されている環境で、*Salmonella* の感染が成立すると報告されていることから[47]、正常便でも豚群内の *Salmonella* 感染源となることが示唆された。このことは、*Salmonella* 陽性の豚群内で *Salmonella* の感染拡大を予防するためには、野外養豚場において、*Salmonella* 症による臨床症状の悪化を予防することと同時に、臨床症状を示さない健康豚であっても、糞便中の *Salmonella* 数を低下させる取り組みが重要であることを示唆している。

【小括】

本章では豚における *S. Typhimurium* 実験感染系を確立し、野外より分離された ST116Rif^r 株を 10^9 CFU/頭程度経口感染させると下痢や著しい脱水症状を示し、 10^7 CFU/頭程度経口感染させると下痢や軟便を示し、 10^5 CFU/頭程度感染させると軟便程度の糞便性状等を示すことがわかった。また、感染菌数が 10^5 CFU/頭でも糞便中からは安定して ST116Rif^r が検出され、糞便性状により糞便に含まれる ST116Rif^r 数が異なることも示唆された。今後、本実験感染系において抗菌剤代替物質の評価を行う上で、臨床症状と共に糞便中の菌数を測定することで、臨床症状を抑える効果と、豚群内での感染予防効果を評価できるものと考えられた。

第三章

豚サルモネラ・ティフィムリウム感染系を 用いた乳酸添加飼料の評価

【諸言】

Salmonella は日本の養豚場の 22%から分離されたと報告されており [48]、また下痢便を対象とした調査でも 19%の農場から分離されたと報告されている [16]。*Salmonella* による下痢や軟便の発現は事故率の増加だけでなく、飼養効率の悪化を招くこともあるため対策が必要で、一部養豚場では陰性化に成功している [19、20]。

Salmonella 陰性農場における *Salmonella* 対策は、まず第一に、導入豚、ヒトおよび車両等を介した農場への *Salmonella* 侵入を防止するためのバイオセキュリティを確立することである [13]。一方、*Salmonella* 陽性農場では、サルモネラ症の発症による事故豚の増加、下痢や軟便の発現による飼養効率の悪化を防ぐことが必要となる。また、*Salmonella* 陽性農場では、*Salmonella* 陽性豚を出荷することにより、豚肉を介したヒト食中毒の発症のリスクがあるため、出荷豚の *Salmonella* 陽性率の低下に継続して取り組む必要がある。

下痢や死亡事故が見られる豚サルモネラ症の発生農場では、発症を抑えるために抗菌剤の投与が一般的に行われている。しかし、薬剤耐性化した *Salmonella* の出現が報告されており [49]、例えば *S. Typhimurium* DT104 のように 5 剤（アンピシリン、クロラムフェニコール、テトラサイクリン、ストレプトマイシンおよびサルファ剤）に対して耐性を示すような、複数の抗菌剤に対して耐性を示す多剤耐性化した *Salmonella* も国内養豚場から分離されている [50、51]。そのため、養豚場の中には通常使用している抗菌剤では効果が認められなくなったため、第二次選択薬を使用する事例も認められている。しかし、第二次選択薬であるフルオロキノロンや第三および第四世代セファロスポリンに対しても耐性化したサルモネラも報告されるようになり [52、53]、抗菌剤代替物質が益々求められている。

一方、豚サルモネラ症の発症が認められていない *Salmonella* 不顕性感染の養豚場においても、*Salmonella* 陽性豚の出荷による豚肉を介したヒトの食中毒発症のリスクを回避するため、出荷豚の *Salmonella* 陽性率を下げることが求められている [18]。出荷豚の陽性率をさげるためには、養豚場の豚群内における *Salmonella* の伝播を抑える必要がある [30、54]。養豚場での

Salmonella の伝播の主な経路は糞口感染であるが、感染菌数が少ない際には *Salmonella* の感染が成立しないこともある[46、47、55]。また、感染菌数が少ないほど、感染後の臨床症状や糞便中に含まれる *Salmonella* 数が少ないことが示唆されている[38、39]。これらのことから、不顕性感染豚群内の *Salmonella* 陽性率を下げるためには、糞便中の *Salmonella* 数を減少させることが重要な対策と考えられる。

以上のことから、*Salmonella* 対策に用いられる抗菌剤代替物質は、臨床症状を伴う豚サルモネラ症の発症を抑えられることと、*Salmonella* 不顕性感染豚の糞便中への排菌数を低下させられることが重要と考えられる。これまでに、豚 *Salmonella* 対策の抗菌剤代替物質として幾つかの候補が提案されており、その中にはプロバイオティクス[56]、有機酸[30、39]、ハーブ類[57]や発酵飼料などがある[58]。中でも本研究では、Jorgensen らが飼料に 2.8%添加した結果、*Salmonella* 陽性農場での陽性率を低下させたと報告している有機酸の一種である乳酸[30]に着目し、第二章で確立した感染系でその効果について評価した。

【材料と方法】

供試豚：21 あるいは 22 日齢の SPF 豚 20 頭を当所に導入した。導入豚は馴致期間中に糞便からの *Salmonella* 分離を試み、*Salmonella* 陰性であることを確認した後に試験に供試した。

供試菌株：本研究の第二章「豚サルモネラ・ティフィムリウム感染系の確立」で選抜された、野外から分離された *S. Typhimurium* 116 株にリファンピシン耐性を付与した *S. Typhimurium* 116 Rif^r 株（ST116Rif^r 株）を供試した。第二章で示したように、ST116Rif^r 株は豚に 1 頭あたり 10⁷CFU を経口接種することで下痢・軟便を発現し、10⁵CFU を経口接種することで軟便を発現する。また、どちらの感染菌数においても ST116Rif^r 接種後の糞便からは安定して ST116Rif^r が検出される。

接種菌液の調整も第二章「豚サルモネラ・ティフィムリウム感染系の確立」

と同様に行った、すなわち、DHL 寒天培地（栄研化学株式会社、東京）に発育させた ST116Rif^r の単一コロニーを 200mL の SCD 液体培地に接種し 37°C で 5 時間振盪培養し、その後培養液の菌濃度を PBS で調整し、最後に等量の 20% Skim Milk と混合して接種菌液として供試した。

感染試験：導入時に供試豚を各区 5 頭の 4 区（LA-hiST 区、LA-loST 区、C-hiST 区および C-loST 区）に分け、LA の 2 区では導入時から試験終了まで市販飼料に乳酸を 2.8% 添加した乳酸添加飼料を給与した。一方、C の 2 区では導入時から試験終了まで市販飼料を給与した。馴致期間が終了した 51 あるいは 52 日齢時に ST116Rif^r を hiST の 2 区では 1 頭あたり 5.6×10^6 CFU/mL を 10mL 経口で接種し、loST の 2 区では 1 頭あたり 5.6×10^4 CFU/mL を 10mL 経口で接種した。

観察期間中は臨床症状の観察を毎日行い、糞便性状のスコア化および糞便の採取を随時実施した。観察期間中に著しい脱水症状や沈鬱が認められた際には、ペントバルビタールを用いた安楽殺を行った。接種後 21 日目には耐過豚全頭の剖検を実施し、主要臓器および腸管内容物を採取した。

糞便性状のスコア化：糞便性状はスコア化して記録した。すなわち、正常便をスコア 0、軟便をスコア 1、下痢便をスコア 2 とした。

糞便中および剖検時の腸管内容物中の *S. Typhimurium* 116Rif^r 数の測定、増菌および遅延二次増菌培養：観察期間中の糞便は各個体から直接採取し、採取後すぐに ST116Rif^r 数の測定を行った。菌数測定では糞便 1g を PBS で 10 倍段階希釈し、適切な希釈段階の糞便希釈液を 100 μ g/mL リファンピシン含有 DHL 寒天培地（RFDHL）に塗抹し、37°C で 24 時間培養した後に発育したコロニー数を計測した。その後、菌数測定で ST116Rif^r が検出されなかった検体について増菌培養を行った。増菌培養では糞便 1g を 10mL の PBS で希釈した上記糞便希釈液から 1mL 採取し、それを 10mL のハーナ・テトラチオン酸塩培地（栄研化学株式会社）に接種し、41.5°C で 24 時間培養後に RFDHL 寒天培地に塗抹し 37°C で 24 時間培養後に、コロニー形成の

有無を観察した。菌数測定、増菌培養で ST116Rif^r が検出されなかった際には遅延二次増菌培養を実施した。遅延二次増菌培養では増菌培養で用いたハーナ・テトラチオン酸塩培地を増菌培養終了後に室温で 1 週間静置した後に、培養液を 1mL 採取し、10mL のハーナ・テトラチオン酸塩培地に接種し、41.5℃で 24 時間培養した培養液を RFDHL 寒天培地に塗抹し、37℃で 24 時間培養後に RFDHL 寒天培地でのコロニー形成の有無を観察した。。腸管内容物は上記の糞便中の ST116Rif^r の測定と同様に、ST116Rif^r 数の測定、増菌培養および遅延二次増菌培養を実施した。

臓器からの *S. Typhimurium*116Rif^r の分離：剖検時には肝臓、肺、脾臓、腎臓、扁桃、腸管膜リンパ節、回腸内容物および盲腸内容物をそれぞれ 1g ずつ無菌的に採取し、腸管内容物以外の各臓器は表面を火炎滅菌した後に、10mL のハーナ・テトラチオン酸塩培地に懸濁し 41.5℃で 24 時間培養した。培養終了後の培養液は RFDHL に塗抹し、37℃で 24 時間培養後にコロニー形成の有無を観察した。コロニー形成が観察されなかった際には、上記と同様に遅延二次増菌培養を実施した

統計処理：測定された ST116Rif^r 数は対数変換し、検出限界以下となった検体は 0 とした。菌数測定では ST116Rif^r が検出されなかったが、増菌培養あるいは遅延二次増菌培養で ST116Rif^r が検出された検体は 100CFU/g として統計処理を行った。ST116Rif^r 数は Student's *t*-test で有意差の判定を行った。また、ST116Rif^r 接種前 5 日間の体温と比較して優位差を示した際に発熱とした。糞便性状のスコアは Mann-Whitney *U*-test で有意差判定を行った。特に記載のない場合には $p < 0.05$ で有意差ありとした。

【結果】

臨床症状：LA-hiST 区では下痢・軟便等の糞便性状の悪化は認められなかったが、C-hiST 区では接種後 2 日目から軟便が観察され、接種後 6 日目には 5 頭中 4 頭で下痢が観察され、接種後 9 日目に 1 頭で軟便が観察され

た以降は、下痢および軟便は観察されなかった。6日目および7日目には LA-hiST 区と C-hiST 区間で有意差が認められた (図 10)。一方、LA-loST および C-loST では糞便性状の悪化は散発的であった。

LA-hiST 区では体温上昇は認められなかったが、C-hiST 区では接種後 2 から 9 日目にかけて発熱が認められた (図 11)。一方、LA-loST 区では体温上昇は認められなかったが、C-loST 区では接種後 5 から 8 日目にかけて発熱が認められた。

糞便中 *S. Typhimurium* 116Rif^r 数の推移：糞便中 ST116Rif^r のピーク時の菌数は LA-hiST 区では接種後 2 日目の 3.2×10^1 CFU/g、C-hiST 区では接種後 3 日目の 1.3×10^5 CFU/g となり、接種後 3、12 および 16 日目に LA-hiST 区と C-loST 区間で有意差が認められた (図 12)。一方、LA-loST 区のピーク時の糞便中 ST116Rif^r 数は接種後 7 日目の 2.5 CFU/g で、C-loST 区では接種後 9 日目がピークで 1.3×10^4 CFU/g となり、接種後 6、7、9 および 12 日目に LA-loST 区と C-loST 区間で有意差が認められた。

剖検時臓器および腸管内容物からの *S. Typhimurium* 116Rif^r の分離：接種後 21 日目に実施した剖検では肝臓、肺、脾臓および腎臓からは C-loST 区の肝臓の 1 検体のみで ST116Rif^r が検出された (表 4)。一方、扁桃、腸管膜リンパ節、空腸内容物および盲腸内容物中からは全区で ST116Rif^r が検出された。LA-hiST 区、C-hiST 区、LA-loST 区および C-loST 区 of 空腸内容物からの ST116Rif^r の検出率はそれぞれ 20%、80%、40% および 80% となり、盲腸内容物からの ST116Rif^r の検出率は 80%、100%、40% および 80% となった。盲腸内容物中の ST116Rif^r 数では LA-hiST の方が C-hiST より少なく、有意差が認められた。

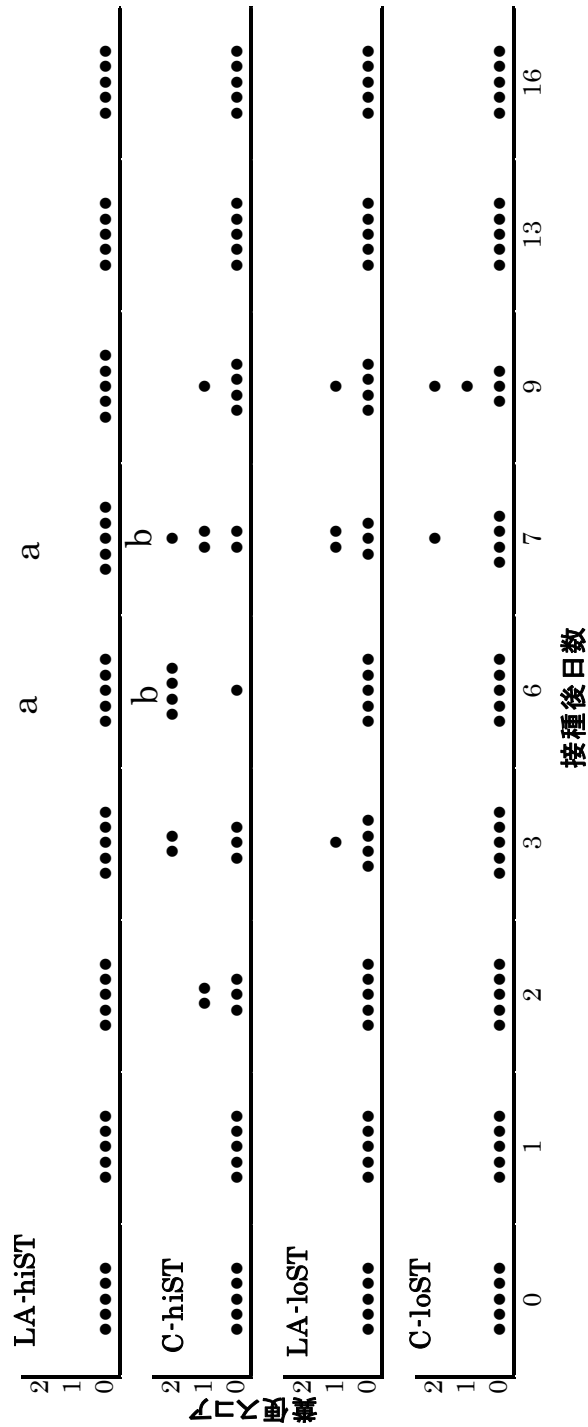


図 10 *S. Typhimurium* 接種後の糞便性状の推移

各区の糞便性状スコアの推移と剖検頭数を示す。表中の●が供試豚 1 頭を示す。

糞便性状スコアは 0 が正常便、1 が軟便および 2 が下痢便を示す。

a、b 異符号間で有意差あり。(p<0.05)

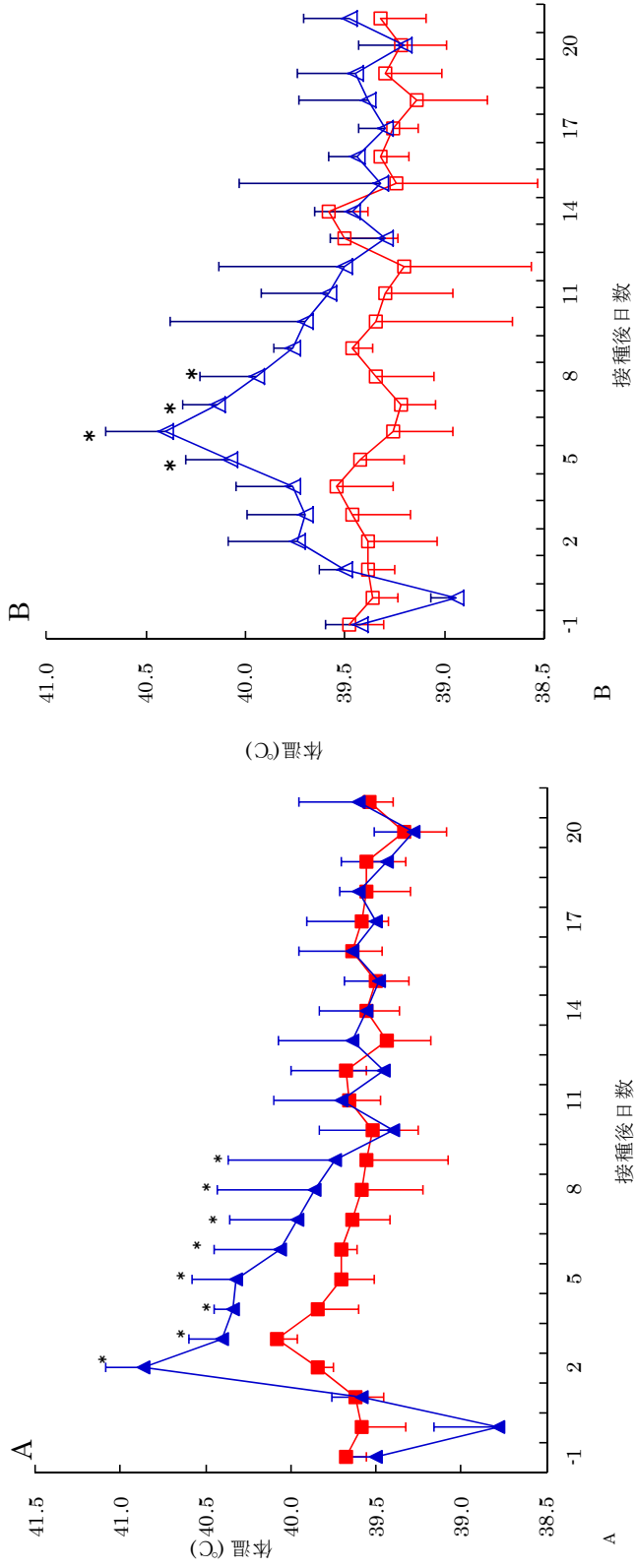


図 11. *S. Typhimurium* 接種後の体温の推移

各区の平均体温を示す。

左側のグラフ A は 1 頭あたり 5.6×10^7 CFU を経口接種した、■ は LA-hiST 区、▲ は C-hiST 区を示す。

右側のグラフ B は 1 頭あたり 5.6×10^5 CFU を経口接種した、□ は LA-loST 区、△ は C-loST 区を示す。

* は各区の接種前体温との有意差を示す ($p < 0.05$)。

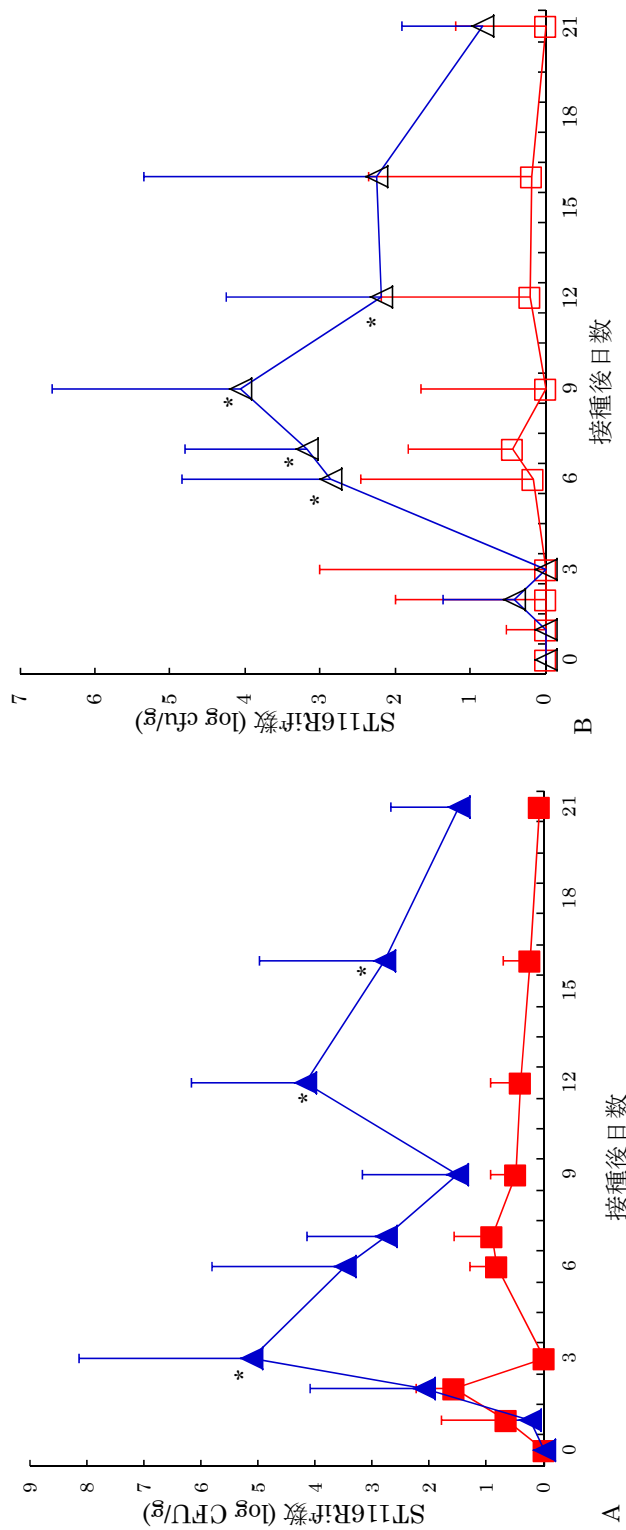


図 12. *S. Typhimurium* 接種後の糞便中 *S. Typhimurium* 数の推移

各区の平均糞便中 *S. Typhimurium* 116Rif^r 数を示す。

左側のグラフ A は 1 頭あたり 5.6×10⁷CFU を経口接種した、■ は LA-hiST 区、▲ は C-hiST 区を示す。

右側のグラフ B は 1 頭あたり 5.6×10⁵CFU を経口接種した、□ は LA-loST 区、△ は C-loST 区を示す。

* は LA-hiST 区と C-hiST 区間および、LA-loST 区と C-loST 区間の有意差を示す ($p < 0.05$)。

表 4. 剖検時の各種臓器からの *S. Typhimurium* の検出率

区	ST116Rif ^{rif} 検出率							各腸管内容物1g中のST116Rif ^{rif} 数 (Log CFU/g)		
	肝臓	肺	脾臓	腎臓	扁桃	腸間膜 リンパ節	空腸	盲腸	空腸	盲腸
LA-hiST	0/5 ^{a)}	0/5	0/5	0/5	5/5	2/5	1/5	4/5	0.32±0.49	0.89±1.22 ^{b)*}
C-hiST	0/5	0/5	0/5	0/5	4/5	3/5	4/5	5/5	1.52±1.26	2.02±1.30 ^{**}
LA-loST	0/5	0/5	0/5	0/5	1/5	4/5	2/5	2/5	0.18±0.40	1.40±1.03
C-loST	1/5	0/5	0/5	0/5	2/5	3/5	4/5	4/5	0.37±1.33	2.66±0.37

a:陽性検体数/検体数

b:*と**間で有意差あり (p<0.05)。

【考察】

本章では、第二章「豚サルモネラ・ティフィムリウム感染系の確立」で確立された *S. Typhimurium* 感染系を用いて 10^7 CFU/頭の経口接種により下痢を伴う豚サルモネラ症を再現し、また 10^5 CFU/頭の経口接種で糞便性状の悪化等の臨床症状は軽度だが安定した排菌が認められる *Salmonella* 不顕性感染を再現した。

今回、我々は豚 *S. Typhimurium* 感染系で不顕性感染を再現し、その感染系において 2.8%乳酸添加飼料により糞便中の *Salmonella* 陽性率が下がることを確認した。Jorgensen らは、*Salmonella* の不顕性感染が確認されている野外養豚場において、乳酸 2.8%添加飼料を給与することで、糞便中の *Salmonella* 陽性率が低下することを報告した[30]。我々はさらに糞便中に排泄される *S. Typhimurium* 数は乳酸無添加の対照飼料と比べて乳酸添加飼料の方が優位に減少しており、ピーク時でも 1×10^1 CFU/g 以下と豚群内の *Salmonella* 伝播に必要と報告されている 1×10^3 CFU/g 以下にまで菌数を低下したことを示した[46]。これらの結果から、2.8%乳酸添加飼料が *Salmonella* 不顕性感染豚群内の *Salmonella* 感染拡大防止に有効であることが示唆された。

一方、*S. Typhimurium* 感染系で再現された下痢を伴う豚サルモネラ症においても 2.8%乳酸添加飼料では下痢の発現が認められず、*S. Typhimurium* 感染による糞便性状の悪化を改善することが示唆された。第二章「豚サルモネラ・ティフィムリウム感染系の確立」で示されたように、*S. Typhimurium* による糞便性状の悪化には糞便中の *S. Typhimurium* 数の増加を伴うが[59]、本研究では 2.8%乳酸添加飼料が糞便中の *S. Typhimurium* 数を低下させること、盲腸における *S. Typhimurium* 数を低下させることが示された。これらのことから、乳酸添加飼料には腸管内での *S. Typhimurium* の増殖を抑制する効果があり、それらが糞便性状の悪化等の臨床症状発現の軽減につながるものと考えられた。

乳酸の殺菌作用は、pH3.7 の環境中では 3 時間で 1/100 まで *Salmonella* を減少させ、pH4.0 の環境中では 3 時間で 1/10 まで *Salmonella* を減少さ

せるが、pH4.4 の環境中では殺菌作用は発揮されない[60]。豚の胃の pH は 3.82-4.07 と報告されており[61]、胃では乳酸の殺菌作用が発揮される環境にあることが示唆されている。しかし、胃を通過した後の乳酸については、給与された乳酸は腸管に移行すると、すばやく酢酸、プロピオン酸、ギ酸に変換されるとの報告や[62]、乳酸は *Salmonella* の病原性に関与する遺伝子の発現に影響を与えることで鶏での感染防止に効果が認められたとの報告もある[63]。さらに、*Salmonella* 感染は腸内菌叢の変化の影響も受けると報告されており[56]、飼料に添加された乳酸の作用機序の詳細については今後の更なる研究が必要となる。

豚サルモネラ対策には、環境中の *Salmonella* 数を減らす飼養環境の改善やオールアウトの実施などと併せて、豚の体内における *Salmonella* の増殖を抑制する取り組みが必要となる。豚体内の *Salmonella* の増殖を抑制するには、現時点では、豚にストレスをかけないことと併せて[64]、抗菌剤の使用は避けられない。しかしながら近年の *Salmonella* 対策の報告では、飼養環境の改善と併せて、生菌剤等の使用が報告されており、抗菌剤代替物質の使用が広まりつつある[20]。本章では、2.8%乳酸添加飼料がそれら代替物質の一つとして豚 *Salmonella* 対策に応用できることを示唆するデータが得られた。また、第二章で確立した豚 *S. Typhimurium* 感染系が抗菌剤代替物質の評価に応用できることも示され、その有用性が大いに期待された。

【小括】

豚 *S. Typhimurium* 感染系を用いて 2.8%乳酸添加飼料の評価を行った。その結果、臨床症状を伴う豚サルモネラ症を再現した感染系では 2.8%乳酸添加飼料が糞便性状の悪化を抑制し、糞便中への *Salmonella* 排菌数も減少させることが明らかとなった。また、*Salmonella* 不顕性感染を再現した感染系でも糞便中への *Salmonella* 排菌数を減少させることが明らかとなった。

これらの結果から、第二章で確立した豚 *S. Typhimurium* 感染系が、抗菌剤代替候補物質の評価に応用できることが示唆された。また、乳酸添加飼料が *Salmonella* に対する抗菌剤代替物質として活用できることも示唆された。

第四章

豚大腸菌感染系の確立

【緒言】

大腸菌による感染症はヒト、豚、牛など多くの宿主で発生し、その病態は下痢、毒血症、敗血症および尿路感染などと多様である [14]。豚における大腸菌症は感染や発症機序の違いから、腸管感染症である下痢症（新生期下痢症、離乳後下痢症）およびエンテロトキセミア（浮腫病、脳脊髄血管症）、全身感染症である敗血症、局所感染である子宮内膜炎等に分けられる。これらの原因となる大腸菌はそれぞれ異なる病原因子を保有する特定の大腸菌株で、例えば下痢を起こす大腸菌の 1 種である毒素原性大腸菌（ETEC）では付着因子と下痢原性毒である易熱性エンテロトキシン（LT）や耐熱性エンテロトキシン（ST）の両方あるいは片方を保有していることが知られている。

我が国では、哺乳豚や離乳豚の下痢便から頻繁に ETEC が分離されており [22]、多くの農場で問題となっている [65]。ETEC による下痢が発症すると事故率の増加や飼養効率の悪化が認められ、経済的な損害を与えるために対策を行う必要がある [14]。

ETEC 対策として、新生期下痢症では飼養環境の改善と併せて抗菌剤の注射、移行抗体を介して子豚を守るための母豚へのワクチン接種等が行われている [66]。一方、離乳後下痢症でも飼養環境の改善と併せて、抗菌剤の飼料添加や注射が行われており [67]、大腸菌症対策では抗菌剤が広く使われている。しかし、抗菌剤の使用による薬剤耐性菌の問題や [68]、抗菌剤の使用量がより少ない畜産物を求める消費者からの要望もあり、抗菌剤の使用には厳しい目が向けられている。特に、薬剤耐性菌の問題では複数の抗菌剤に対して耐性を持つ多剤耐性の ETEC の出現や [23、69]、豚由来の薬剤耐性菌がヒトへ伝播することによるヒトの健康リスクの増大も危惧されており、各国で重要な問題となっており、抗菌剤に頼らない、抗菌剤代替物質による対策が求められている。

これらを背景として、ETEC 対策に応用できる抗菌剤代替物質の研究が活発に行われており、その候補物質として有機酸 [31、70]、生菌剤 [71] および鶏卵抗体 [72、73]、亜鉛 [74] 等の活用が報告されており、実際に養豚場で応用されている資材もある [31、70、75]。しかし、これら資材の中で養豚場に

においても安定した効果を示している資材は少ない [26、27]。その理由の一つとしてそれら資材の開発段階で対象動物である豚に対応した評価が十分に行われていないことが挙げられ、特に豚を用いた大腸菌感染対策での評価は遅れている。

そこで、本研究では抗菌剤代替物質の評価に適した豚大腸菌感染系の確立を目指すこととした。豚大腸菌感染系は過去にも報告されているが、離乳豚を用いた大腸菌感染系は再現性が難しいことが知られており、離乳豚での安定した感染系を確立するために感染時に胃酸中和剤の給与や[76]、接種大腸菌を胃を通過させるための腸溶性カプセルで覆ったり[77]、感染前に豚にストレスを与える等が行われている。また、離乳豚の豚大腸菌感染の発症には腸内菌叢が関与することも報告されており[78]、安定した豚大腸菌感染症を確立するには感染豚の腸内菌叢も考慮する必要がある。本研究が目指している、抗菌剤代替物質の評価に応用できる豚大腸菌感染系では、胃酸中和剤や豚にストレスを与える等の処理を避ける必要がある。そのことから、離乳豚ではなく哺乳豚を用いた豚大腸菌感染系の確立を目指した。

一方、哺乳豚の大腸菌症は移行抗体で防御できることが知られており[66]、安定した感染系を確立するには、移行抗体を接種していない豚を供試する必要がある。

そこで、本研究では移行抗体を接種しておらず、腸内菌叢の影響も排除できるように、帝王切開で作出し、初乳を摂取していない cesarean-derived, colostrum-deprived (CDCD) 豚を供試することで安定した豚大腸菌感染系の確立を目指した。

【材料と方法】

1. in vitro での菌株の選抜

供試菌株：野外より分離され、当所に保存されていた溶血性大腸菌 (*Enterotoxigenic Escherichia coli*; ETEC) 13株それぞれのリファンピシン (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan) 耐性株を当所

で選択し、リファンピシン耐性溶血性大腸菌 13 株を供試した。リファンピシン耐性株の選択は具体的には、リファンピシンを 100 μ g/mL の濃度に含む DHL 寒天培地 (Eiken Chemica, Co., Ltd., Tokyo, Japan) に供試菌株をそれぞれ濃厚に塗抹し、37°C で 24 時間培養し、それぞれの株で発育してきたコロニーをリファンピシン耐性株として供試した。

O 抗原の検出 : O8、O9、O20、O21、O45、O64、O101、O115、O138、O139、O141、O147、O149、O153 及び O157 の 15 種類の抗 O 血清 (Laboratorio de Referencia de E. coli, University of Santiago de Compostela, Santiago, Spain) を用いて定法に従い実施した。

付着因子の検出 : 毒素原性大腸菌線毛抗血清「生研」(Denka Seiken Co., Ltd. Tokyo, Japan) を用いて定法に従い実施した。

LT の検出 : 大腸菌易熱性エンテロトキシン検出用キット「コリスト EIA」(Denka Seiken Co., Ltd.) を用いて定法に従い実施した。

ST の検出 : 大腸菌耐熱性エンテロトキシン検出用キット「VET-RPLA」(Denka Seiken Co., Ltd.) を用いて定法に従い実施した。

病原因子遺伝子の検出 : 付着因子の F4ab、F4ac および F4ad[79]、毒素の LT、ST および Vero Toxin の遺伝子検出を PCR 法にて実施した[80]。

2. 豚を用いた供試菌株の選抜

供試豚 : 1 頭の母豚より作出された CDCD 豚 7 豚を供試した (図 13)。供試豚は作出日から 2 区 (EC389 区および BD2699 区) に区分けされ、各区別の部屋で単飼のケージで飼育された。

供試菌株 : 「1. in vitro での菌株の選抜」で選抜されたリファンピシン耐

性の毒素原性大腸菌（ETEC）EC389Rif^r株およびBD2699Rif^r株の2株を供試した。

接種菌の菌液調整では、それぞれの株をSCD寒天培地で培養し、発育してきたコロニーをMinca ISO vitalex寒天培地（BBL Microbiology Systems Cookeysville, Md）に塗抹し、37℃で一晩培養した。その後、Minca ISO vitalexに発育してきたコロニーを掻き取り生理食塩水に懸濁し、生理食塩水を用いて菌濃度を調整した後に接種菌液として供試した。

供試飼料：抗菌性飼料添加物および機能性飼料原料が添加されていない試験用代用乳飼料「SPF-LAC」（Borden Inc., Norfolk, VA）を作出当日から試験終了時まで給与した。

感染試験：4日齢時の供試豚にEC389区（n=4）にはEC389Rif^r株を、BD2699区（n=3）にはBD2699Rif^r株を、それぞれ1頭あたり 5.4×10^8 CFU/mLを10mLおよび 3.2×10^8 CFU/mLを10mL経口で接種した。

観察期間中は臨床症状の観察を毎日行い、糞便性状のスコア化と糞便の採取も毎日行った。観察期間中に著しい脱水や食欲不振が認められた際には、ペントバルビタールを用いた安楽殺を施した。接種後7日目に耐過豚全頭の剖検を実施し、主要臓器および腸内容物を無菌的に採取した。

3. 観察および検査項目

糞便性状のスコア化：糞便性状はスコア化して記録した。すなわち、正常便をスコア0、軟便をスコア1、下痢便をスコア2とした。

糞便中および消化管内容物中の接種ETEC数の測定：観察期間中の糞便の採取は各個体から直接行った。糞便は採取後すぐに接種ETECの菌数測定に供試した。菌数測定では糞便1gをPBSで10倍段階希釈し、適切な希釈段階の糞便希釈液を100 μg/mLリファンピシン含有DHL寒天培地（RFDHL）に塗抹し、37℃で24時間培養した後に発育したコロニー数を

計測した。

各種臓器における ETEC の分離：剖検時には全頭から肺、肝臓、心臓、腎臓、脾臓、扁桃、腸間膜リンパ節および脳を無菌的に採取し、観察期間中に安楽殺を施した個体からは上記の部位に加えて血液を無菌的に採取した。採取した血液以外の臓器は表面を火炎滅菌した後に各臓器検体の中央部で切断し、その断面を RFDHL 寒天培地に押し付け、37℃、24 時間培養後のコロニーの発育の有無で判定を行った。血液は直接 RFDHL 寒天培地に塗抹し、37℃、24 時間培養後のコロニーの有無で判定を行った。

4. 豚を用いた接種菌数の検討

供試豚：2 頭の母豚より作出された CDCD 豚 18 頭を供試した。供試豚は作出日に 4 区（ETEC-4、ETEC-6、ETEC-8 および陰性対照区）に区分けされ、各区はそれぞれ別の部屋で、単飼用のケージで飼育された。

供試菌株：「1. *in vitro* での菌株の選抜」および「2. 豚を用いた供試菌株の選抜」で選抜されたリファンピシン耐性を有する毒素原性大腸菌 EC389Rif^r 株を供試した。

接種菌の菌液調整は「2. 豚を用いた供試菌株の選抜」と同様に行った、すなわち EC389Rif^r 株を SCD 寒天培地で培養し、発育してきたコロニーを Minca ISO vitalex 寒天培地（BBL Microbiology Systems Cookeysville, Md）に継代、塗抹し、37℃で一晩培養した。その後、Minca ISO vitalex に発育してきたコロニーを掻き取り生理食塩水に懸濁し、菌濃度を調整した後に接種菌液として供試した。

供試飼料：抗菌性飼料添加物および機能性飼料原料が添加されていない試験用飼料「SPF-LAC」（Borden Inc., Norfolk, VA）を作出当日から試験終了まで供試した。

感染試験：供試豚は 4 日齢時に供試菌株である EC389Rif^r 株を経口で接種され、ETEC-8 区 (n=4) では 1 頭あたり 4.3×10^8 CFU、ETEC-6 区 (n=5) では 1 頭あたり 4.3×10^6 CFU、ETEC-4 区 (n=5) では 1 頭あたり 4.3×10^4 CFU を経口で接種され、陰性対照 (n=4) には生理食塩水を接種した。

観察期間中は臨床症状の観察を毎日行い、糞便性状のスコア化および糞便の採取は随時実施した。観察期間中に著しい脱水や沈鬱頭が認められた際には安楽殺を実施した。接種後 14 日目には耐過豚全頭の剖検を実施し、腸管内容物を採取した。

糞便性状のスコア化：糞便性状は随時スコア化して記録された。つまり、正常便をスコア 0、軟便をスコア 1 および下痢便をスコア 2 とした。

糞便中および腸管内容物中の *E. Coli* 389Rif^r 数の測定：観察期間中の糞便の採取は各個体から直接行った。糞便中の EC389Rif^r 数の測定では、糞便 1g を PBS で 10 倍段階希釈し、適切な希釈段階の糞便希釈液を $100 \mu\text{g/mL}$ リファンピシン含有 DHL (RFDHL) に塗抹し、37°C で 24 時間培養後に発育したコロニー数を計測した。

【結果】

1. in vitro での菌株の選抜

供試菌株の選抜：対象とした 13 株の内、付着因子は 12 株で F4 (K88) の発現および遺伝子が保持されていることが確認され、残りの 1 株は F5 の発現が確認された (表 5)。LT の遺伝子は 12 株で保有されており、その内の 2 株で発現が認められた。一方、ST は ST I 遺伝子が 5 株で、ST II 遺伝子が 12 株で保有されており、ST I 遺伝子および II 遺伝子の両方を保有していた 4 株の内 1 株で ST の発現が確認された。13 株全てで VT 遺伝子の保有は認められなかった。

本試験では、凝集因子の F4 の発現が認められ、毒素として LT の発現が

認められた EC389Rif^r 株および EC412Rif^r 株の 2 株の内 ST I および ST II 両方の遺伝子の保有が認められた EC389Rif^r 株と、F4 の発現が認められ、ST の発現および LT 遺伝子の保有も認められた BD2699Rif^r 株の 2 株を豚を用いた感染試験に供試し、最終選抜を実施することとした。

2. 豚を用いた供試菌株の選抜

臨床症状： EC389 区では安楽殺を実施したのは、接種後 1 日目の 1 頭のみであったが、BD2699 区では接種後 2 日目に 3 頭中 2 頭の安楽殺を実施した。

糞便性状の悪化については接種後 8 時間目には EC389 区および BD2699 区でそれぞれ 4 頭中 3 頭および 3 頭中 2 頭で軟便が観察された(図 14-15)。接種後 1 日目には EC389 区で 3 頭中 2 頭が下痢を発現し、BD2699 区では全頭で下痢が観察され。両株とも ETEC 接種後 1 日目には糞便性状の悪化が認められた。接種後 1 日目以降は観察期間を通じて耐過豚全頭で継続して下痢が観察された。

糞便中の ETEC 数推移：接種後 8 時間目には EC389 区および BD2699 区の両区全頭の糞便から接種 ETEC が検出され、糞便中にはそれぞれ 6.2×10^7 CFU/g および 2.5×10^8 CFU/g の接種菌数が検出された(図 16)。その後試験終了まで両区とも 10^8 CFU/g 以上の接種菌が継続して検出された。観察期間中を通じて両区に有意差は認められなかった。

消化管各部位の ETEC 数：7 日間の観察期間を生残耐過した供試豚では十二指腸では EC389 区および BD2699 区でそれぞれ 8.7×10^3 CFU/g および 1.4×10^7 CFU/g の菌が検出された。空腸では 2.0×10^7 CFU/g および 6.6×10^7 CFU/g の菌が検出され(図 17)、十二指腸および空腸で EC389 区の方が BD2699 区より少ない菌数を示した。

本研究で臨床症状が著しく悪化したために安楽殺を施した EC389 区の 2 頭および BD2699 区の 1 頭の 3 頭では十二指腸で 2.0×10^8 CFU/g の菌が検

出され、空腸でも 6.6×10^8 CFU/g の菌が検出された。安楽殺を施された豚の十二指腸の ETEC 数は EC389 区の生残豚と比べて有意に多かった。

各種臓器からの接種 ETEC の分離: EC389 区および BD2699 の耐過豚の肺、肝臓、腎臓、脾臓、心臓および扁桃からは接種 ETEC は分離されなかったが、EC389 区では 3 頭全頭の腸間膜リンパ節から分離された (表 6)。

一方、安楽殺を施された豚の肺、腎臓、扁桃からは接種 ETEC が分離され、さらに血液からも接種 ETEC が分離された。

3. 豚を用いた接種菌数の検討

臨床症状: ETEC-6 区および ETEC-8 区では接種後 1 日目にそれぞれ 5 頭中 4 頭および全頭で下痢を発現した (図 18)。一方、ETEC-4 区では接種後 1 日目では 5 頭中 1 頭で下痢が確認され、接種後 2 日目には全頭で下痢が確認された。ETEC-8、ETEC-6 および ETEC-4 区では接種後 10 日目以降では糞便性状の改善が認められた。

陰性対照区では接種後 2 日目に 4 頭中 2 頭で軟便が観察され、その後も軟便が観察され続け、接種後 6 日目には全頭で下痢を発現した。接種後 7 日目以降では陰性対照区の糞便性状には改善が認められた。

糞便中の *E. coli* 389Rif^r 数の推移: 糞便中の EC389Rif^r 数は接種後 1 日目には ETEC-6 区および ETEC-8 区で 10^8 CFU/g まで増加した (図 19)。一方、ETEC-4 区の糞便中 EC389Rif^r 数が 10^8 CFU/g まで増加したのは接種後 2 日目であった。その後は試験終了まで全区で 10^8 CFU/g 以上の菌数が検出された。

陰性対照区では試験期間中を通じて糞便から EC389Rif^r は検出されなかった。

剖検時腸管内容物中の *E. coli* 389Rif^r 数: ETEC-4、ETEC-6 および ETEC-8 区の EC389Rif^r 数は盲腸、結腸および直腸では 1×10^7 CFU/g 以上となった

(図 20)。一方、ETEC-8、6 および 4 区の 3 区全てで EC389rif^r 数は回腸、空腸、十二指腸と腸管上部に移行するに従い減少したが、区間で有意差は認められなかった。

陰性対照区からは全ての腸管部位で EC389Rif^r は検出されなかった。



図 13 CDCD 豚作出時の写真

内部を滅菌したチャンバーを用意する（左上）。
母豚とチャンバーを滅菌させ、母豚の術野を殺菌する（右上）。
チャンバー内で子宮から子豚を取り出す（左下）。

表 5 当所保存 ETEC 株の付着因子および毒素の遺伝子保有および発現

株名	O抗原	付着因子										毒素					
		F4 (K88)		F5 (K99)		F6 (987P)		LT (易熱性毒素)		ST (耐熱性毒素)		VT (Vero毒素)		PCR		PCR	
		凝集反応		凝集反応		凝集反応		凝集反応		凝集反応		凝集反応		凝集反応		凝集反応	
		F4ab	F4ac	F4ad	F4ab	F4ac	F4ad	LT I	LT II	PCR	PCR	ST I	ST II	PCR	PCR	ST I	ST II
EC374	O149	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EC376	O149	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EC379	O149	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EC382	O149	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EC389	O149	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EC412	O149	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EC415	O149	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EC420	O149	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EC432	O149	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EC452	O149	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EC459	O149	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ECB-41	O101	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
BD2699	O149	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-



図 14 ETEC 感染時の発症豚と下痢

下痢発症豚の外観（左）

発現した下痢便（右）

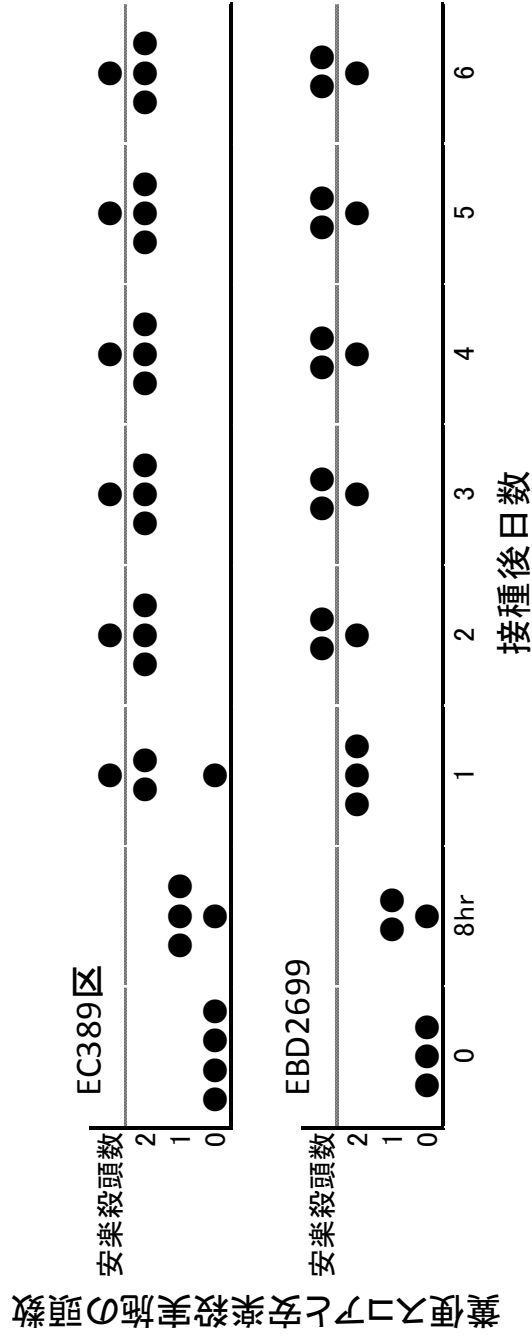


図 15 EC389Rif および EBD2699Rif 接種時の糞便性状の推移

各区の糞便性状スコアの推移と安楽殺頭数を示す。表中の●が供試豚 1 頭を示す。

糞便性状スコアは 0 が正常便、1 が軟便および 2 が下痢便を示す。

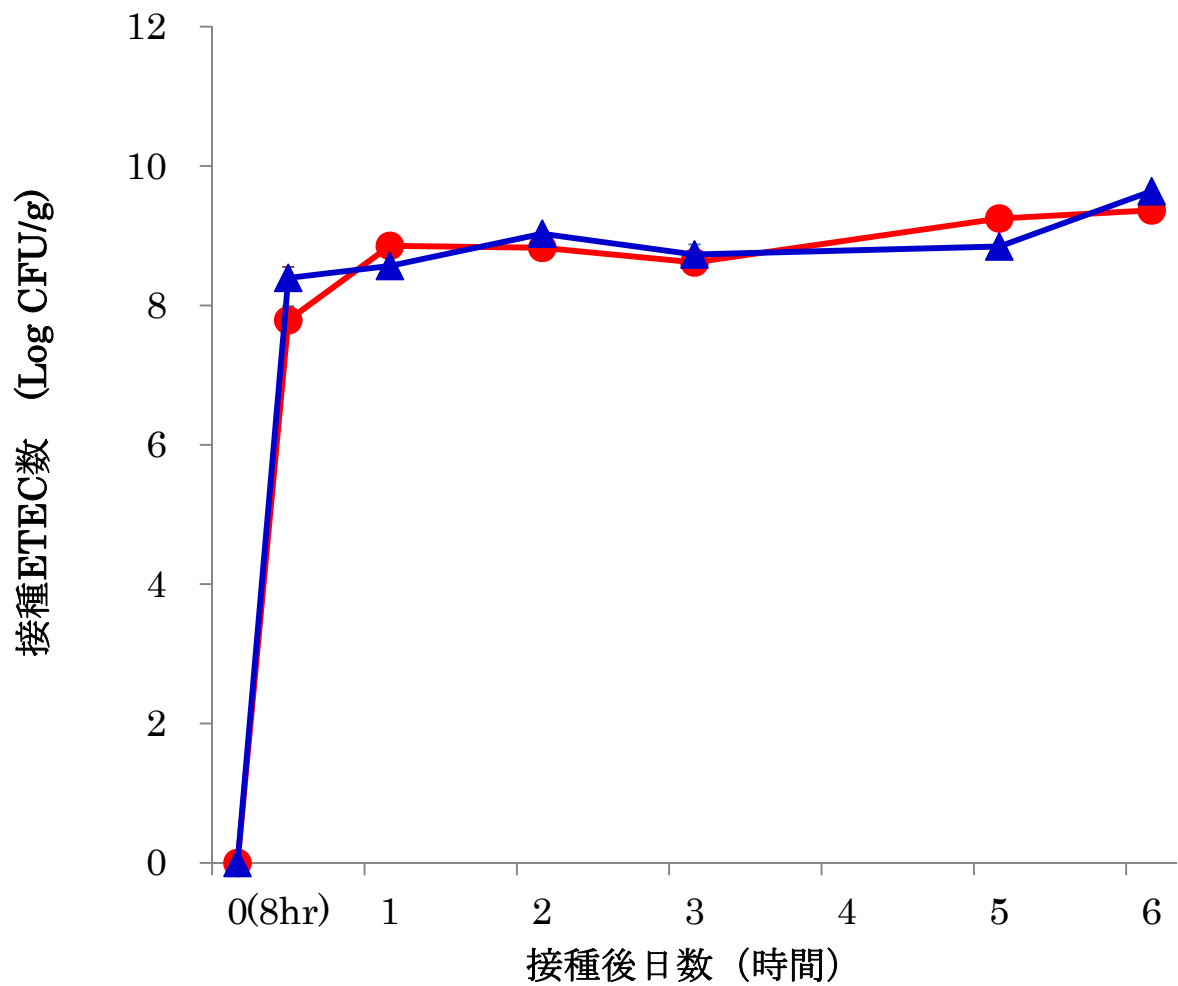


図 16 EC389Rif^r および BD2699Rif^r 接種時の糞便中接種 ETEC 数の推移

●は EC389 区、▲は BD2699 区を示す。EC389Rif^r 株あるいは BD2699Rif^r 株を経口接種した際に糞便中に排泄された接種菌の菌数を示す。

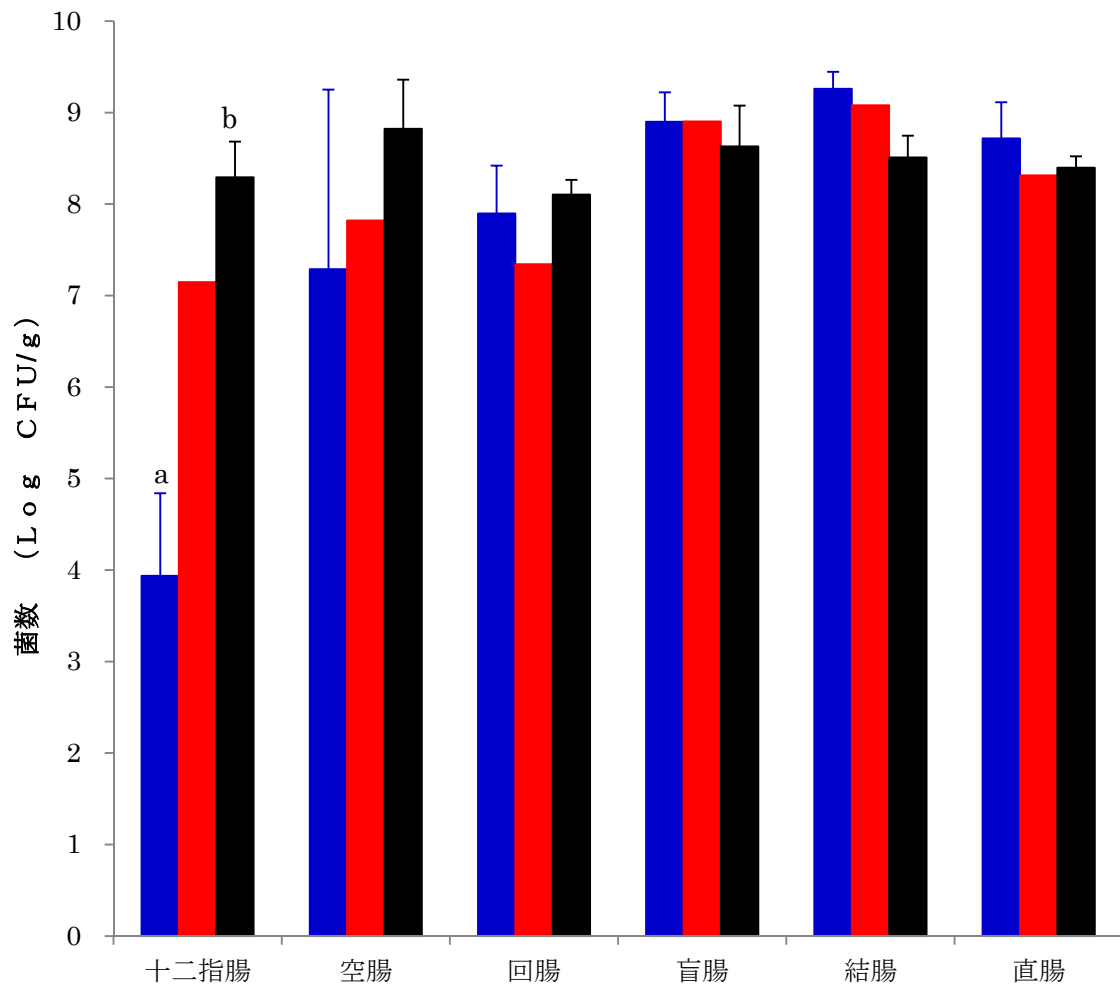


図 17 剖検時消化管各部位の EC389Rif^r および BD2699Rif^r 数

バーは左が EC389 区、中央が BD2699 区、右が安樂殺豚を示す。

a、b 異符号間で有意差あり ($p < 0.05$)

表 6 剖検時各種臓器および血液からの接種 ETEC の分離率

	肺	肝臓	腎臓	心臓	脾臓	扁桃	腸間膜 リンパ節	血清
EC389区	0/3 ^(a)	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	3/3	NT
耐過豚	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	NT
小計	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	3/4	NT
EC389区	1/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	1/1
安楽殺豚	1/2	0/2	1/2	0/2	0/2	2/2	1/2	2/2
小計	2/3	0/3	1/3	0/3	0/3	2/3	1/3	3/3

a:陽性検体数/検体数

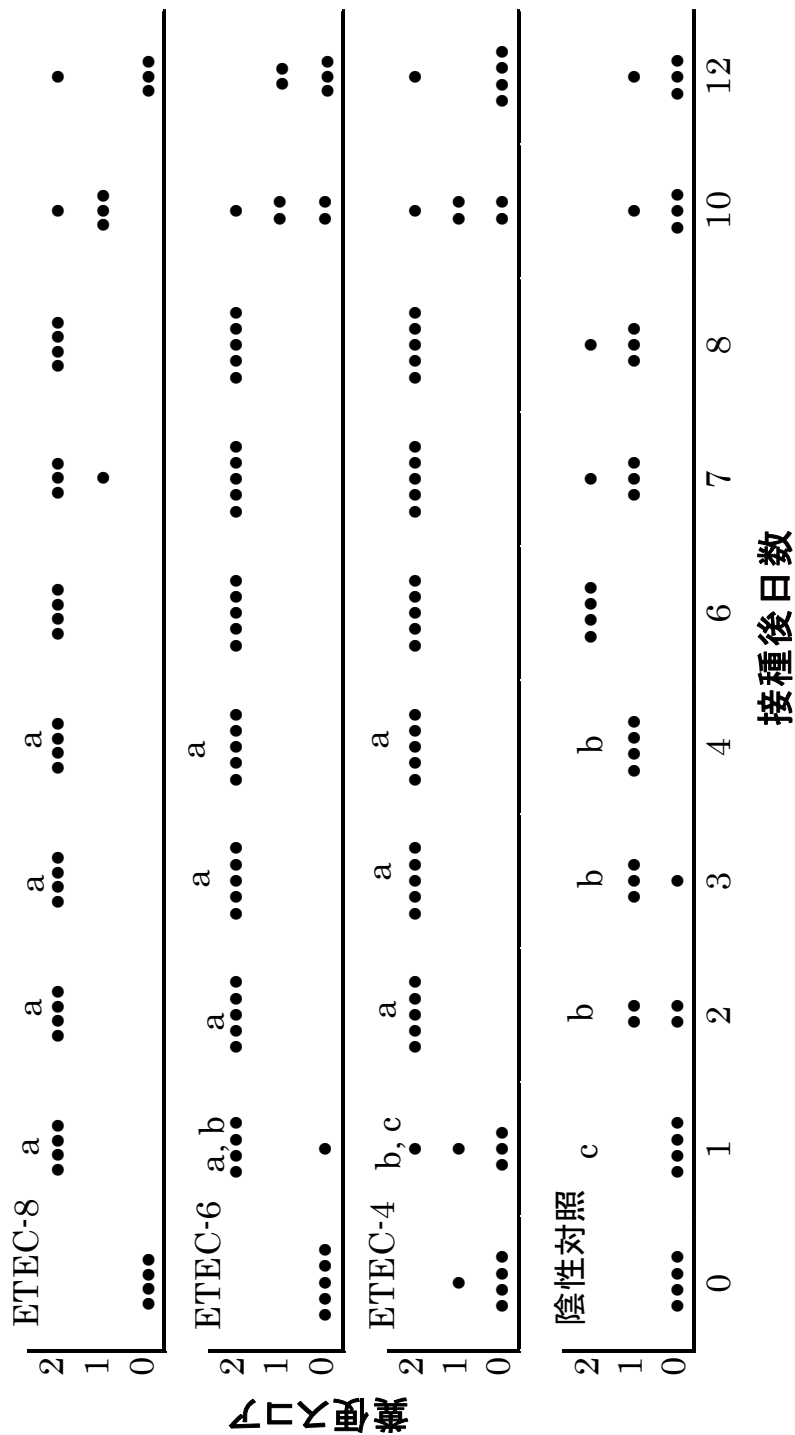


図 18 EC389Rif^r接種後の糞便性状の推移

各区の糞便性状スコアの推移を示す。表中の●が供試豚 1 頭を示す。
糞便性状スコアは 0 が正常便、1 が軟便および 2 が下痢便を示す。

a、b、c：異符号間で有意差を示す ($p < 0.05$)

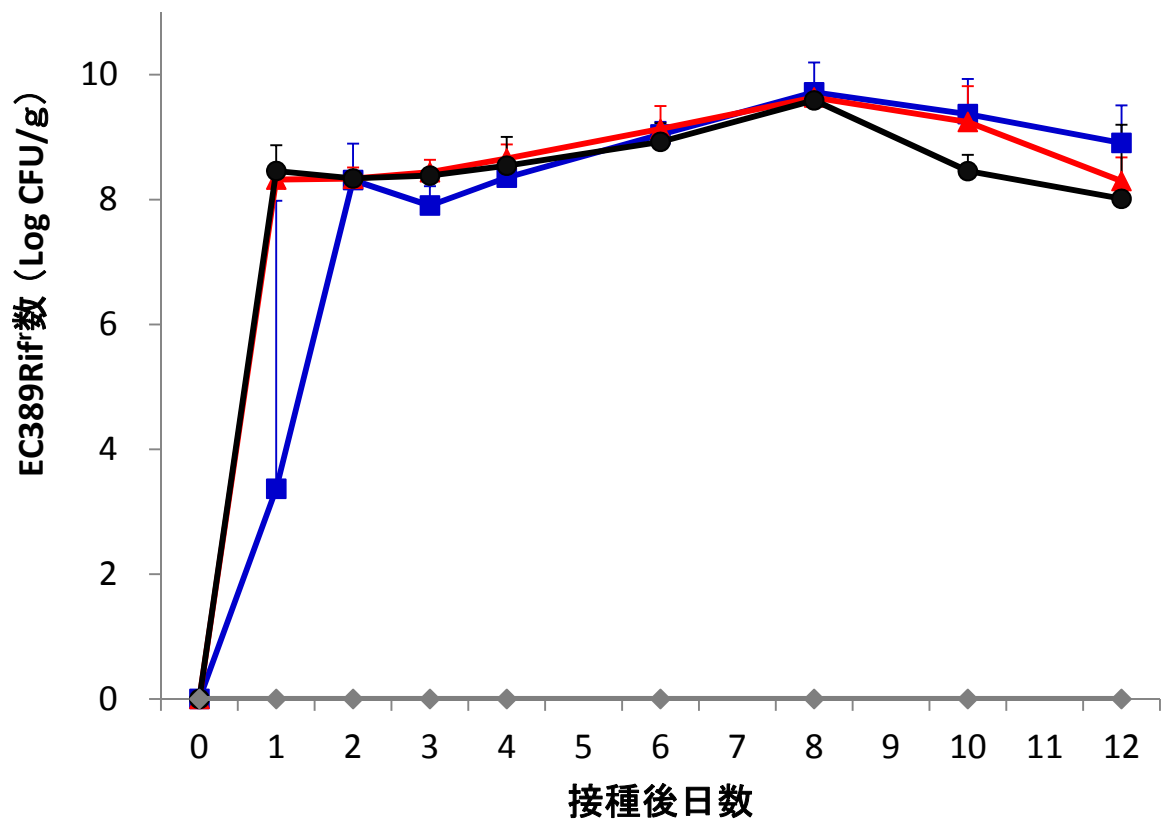


図 19 EC389Rif^r 接種時の糞便中接種 EC389Rif^r 数の推移

■は ETEC-4 区、▲は ETEC-6 区、●は ETEC-8 区、◇は陰性対照区を示す。EC389Rif^r 株あるいを 10^8 (ETEC-8 区)、 10^6 (ETEC-6 区)あるいは 10^4 (ETEC-4 区)CFU/頭経口接種した際に糞便中に排泄された EC389Rif^r 数の菌数を示す。

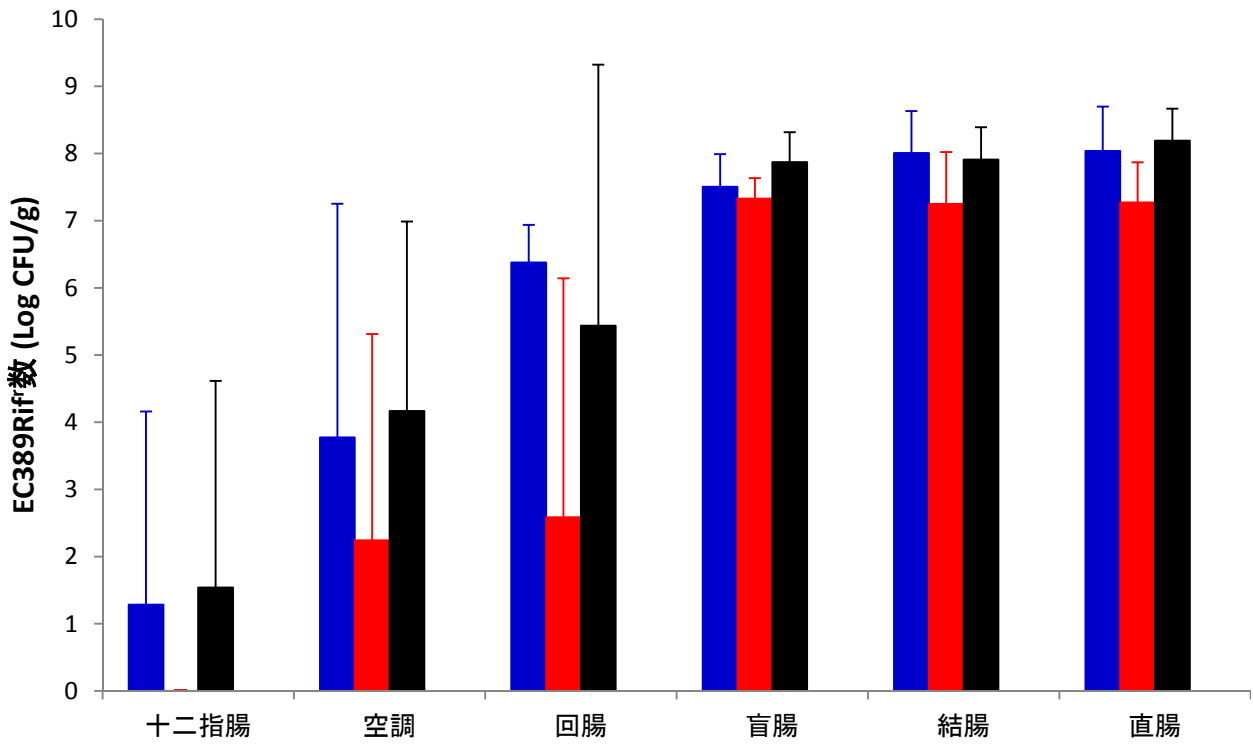


図 20 消化管各部位の EC389Rif^r 数

バーは左から ETEC-4 区、ETEC-6 区、ETEC-8 区を示す。

【考察】

本章では ETEC による下痢症の感染系を確立するために、当所に保存されていた大腸菌株を対象に供試菌株の選抜を実施した。選抜され、その後の感染試験に供試された EC389Rif^r 株は付着因子である F4 遺伝子、下痢原性毒である LT、ST I および ST II 遺伝子を保有し、それらの内 F4 および LT の発現が確認された。Katsuda らが我が国の哺乳豚・離乳豚の下痢便から分離した大腸菌を対象に行った調査では、付着因子と毒素の組み合わせで最も多かったパターンが F4、LT、ST I および ST II 遺伝子を保有しているもので[22]、このパターンは本研究で感染試験に供試した EC389Rif^r 株と同じであり、感染試験に供試した EC389Rif^r 株が保有している付着因子および毒素のパターンが野外養豚場に浸潤していることが示唆された。一方、当所保存大腸菌株で最も多かった付着因子遺伝子および毒素遺伝子の保有パターンは F4、LT および ST II を保有しているものであった。Katsuda らの報告で示された付着因子遺伝子および毒素因子遺伝子の保有パターンが当所保存菌株のそれと異なっていた理由としては、当所保存の大腸菌株が 13 株と少なかったこと、Katsuda らと当所保存菌株では分離された時期、地域、農場が異なっているためと考えられる。

豚を用いた大腸菌実験感染系では過去の報告と同様に接種後 1 日目あるいは 2 日目から下痢の発現が認められ、さらに接種 8 時間後には糞便中への排菌も確認された[81、82]。過去の哺乳豚を用いた大腸菌感染試験では 1 頭あたり 10⁸CFU/頭程度接種しているものが多く、本研究で供試した接種菌数より著しく多い。本研究とそれら過去の報告では、初乳を摂取していない点では一致する報告もある。しかし、哺乳豚の娩出方法が、本研究では帝王切開で無菌的に行い、過去の報告では通常通りに母豚から分娩された点が異なっている。過去の報告では分娩時に母豚や環境中の菌を取り込み腸内菌叢が形成されたために、いわゆる競合排除のような現象が起き[83]、無菌的に作出された哺乳豚と比較して、感染成立に多量の感染菌が必要となったと考えられる。

過去の豚を用いた大腸菌感染系では感染菌数と臨床症状や糞便中に排泄

される菌数についての報告は多くない。しかし、過去の報告では哺乳豚では感染菌数が 10^8 CFU/頭と比較的高濃度に接種している [84、85]。また、離乳豚を用いた感染系でも 10^{10} CFU/頭と高濃度の ETEC を接種していることを考慮すると [86]、少ない接種菌数では感染が成立しないあるいは臨床症状が認められなかったとも考えられる。一方、本研究では 10^4 CFU/頭の ETEC 接種でも下痢が発現し、糞便中からも安定して ETEC が検出された。これは、本研究では CDCD 豚が用いられた影響と考えられるが今後更なる検討が必要である。さらに、本研究では感染菌数を少なくすると臨床症状の発現および糞便中への ETEC 排泄の遅延が示されたが、このことについても接種 ETEC が少ないと ETEC が腸管内で発症レベルまで増殖するのに時間を要したためとも考えられるが、更なる研究が必要となる。

本研究では感染豚の糞中への排菌数は 10^8 CFU/g 程度で安定しており、過去の報告では1週齢健康豚の糞便中でも 10^9 CFU/g 程度の大腸菌群が排泄されていることから [87、88]、発症豚でも糞便中の大腸菌数は著しく増加していないことが示唆された。このことから、ETEC に対する抗菌剤代替物質の効果を評価する際の指標として糞便中 ETEC 数は応用できないと考えられた。

剖検時の消化管各部位の ETEC 数も回腸より下部の消化管では安楽殺を施した豚でも、耐過豚でも 10^8 CFU/g から 10^9 CFU/g 程度の ETEC が検出されており差は認められなかった。一方、接種した ETEC の 2 株の内、死亡頭数が少なかった EC389 株区では回腸より上部の消化管では ETEC 数が減少したが、もう一方の BD2699 株区や安楽殺を施された豚では消化管上部に向けて ETEC 数の減少は認められず、十二指腸では安楽殺した豚と EC389 株区で有意差が認められた。過去の報告でも ETEC の発症には消化管上部での増殖が重要であることが報告されており [89]、本研究でも消化管上部で増殖した株や個体では臨床症状が強く発現したと考えられる。

本研究では ETEC を接種していない陰性対照区でも下痢が認められた。本研究を実施した感染施設は入場時にはシャワーを浴び、高圧蒸気滅菌により滅菌された衣類の着用が行われている。また、持ち込む資材も燻蒸あるいは浸漬により滅菌してから持ち込まれている。更に、入気口には HEPA フ

フィルターが設置され、各室は陽圧に保たれている。そのため外部から病原体が侵入したために陰性対照区で下痢が発生した可能性は低いと考えられる。また、本研究では各区が独立した部屋で飼育されており、陰性対照区の給餌や健康状態の観察等は毎回一番最初に実施されており、試験期間を通じて陰性対照区から ETEC が分離されることもなかったことから、ETEC が誤って感染した可能性も低いと考えられる。そのため、陰性対照区での下痢の発生は感染症によるものではなく、生理的な原因によるものと考えられた。

【小括】

本章では、CDCD 豚を用いて豚大腸菌感染系の確立を試み、付着因子の F4、エンテロトキシンの LT および ST を保有する ETEC の EC389Rif^r 株を選抜し、感染系に供試することとした。EC389Rif^r 株を 10⁴CFU/頭経口接種すると、接種後 2 日目には全頭で下痢を発現し、糞便中への安定した排菌が認められた。また、抗菌剤代替物質を評価する際の指標として糞便中の ETEC 数ではなく、剖検時の小腸部での ETEC 数の方が活用できることが示唆された。本章では 14 日間の観察期間を設けたが、試験用代用乳の給与を開始した 11 日目以降には ETEC 接種区でも糞便性状が回復傾向にあることから、観察期間を試験用代用乳の給与期間である 7 日間程度に設定することが望ましいと考えられた。

第五章

豚大腸菌感染系を用いた 乳酸添加飼料の評価

【緒言】

毒素原性大腸菌（ETEC）感染による豚の新生期および離乳後下痢症の対策には、環境中および豚体内の両方において ETEC 数を減少させる必要がある。環境中の ETEC 数を減少させるためには、オールアウトの実施、豚舎や豚房の洗浄、消毒および乾燥が有効とされているが[90]、末吉は特に ETEC が乾燥に弱いことを報告している [67]。

一方、豚体内において ETEC 数の増加を抑えるためには、まず第一に飼養環境の改善が挙げられる[91]。飼育環境を豚の適温に調整することで豚大腸菌症に改善が認められた事例や、隙間風を防ぐことも有効と報告されている[92]。しかし、ETEC による下痢が発生している農場では、これら飼養環境の改善に併せて抗菌剤による対策が不可欠となっている[92]。しかしながら、ETEC にも薬剤耐性菌の出現が認められており[8]、中には複数の抗菌剤に対して耐性を示す多剤耐性化した ETEC や[69]、我が国で特に慎重使用が求められている「第二次選択薬」に対する耐性菌の出現も報告されている[93]。そのため、農場では過去に ETEC 対策で効果を示した抗菌剤を使用しても、ETEC が耐性化したために十分な効果が得られない例も出てきている。また、消費者からは抗菌剤の使用量がより少ない畜産物が求められている。そのため、ETEC 対策に有効な抗菌剤代替物質の探索が続けられており、その開発も急務の課題として進められている。

ETEC 対策に提案されている抗菌剤代替物質等には、生菌剤 [75]、有機酸 [1]、ハーブ類 [31]、鶏卵抗体 [72、94]、飼料中の蛋白含量を減らす方策 [95、96]、亜鉛 [97] 等がある。第三章「豚サルモネラ・ティフィムリウム感染系を用いた乳酸添加飼料の評価」でサルモネラへの効果が認められた乳酸等の有機酸の ETEC に対する効果については、Tsiloyiannis らが野外の ETEC による離乳後下痢症発症農場において、1.6%乳酸添加飼料と併せて 1.0%プロピオン酸、1.2%ギ酸、1.2%リンゴ酸、1.5%クエン酸および 1.5%フマル酸添加飼料の 6 種類の有機酸添加飼料の ETEC による下痢の発現、死亡率および糞便からの ETEC の検出率と増体重や飼養効率を比較している [31]。その結果、有機酸添加飼料は無添加飼料よりも下痢の発現、

事故率および飼養効率等で改善が認められ、特に乳酸添加飼料に改善が認められたと報告されている。

Tsiloyiannis らの報告では乳酸の作用機序についての詳細な検討は行われなかったが、Cole らや Thomlinson らは有機酸添加により消化管内の pH が低下することを見出し、pH が低下した結果 ETEC の増殖が抑制されると考察している [98、99]。一方、Li らは豚を用いた ETEC 実験感染で、ETEC に有機酸添加飼料が有効であることを報告しているが、有機酸添加飼料が腸管の pH には影響を与えていないと報告しており、有機酸添加飼料が腸内菌叢に影響を与えることで ETEC に効果を示すと考察している [100]。このように、有機酸添加飼料の作用機序の詳細について、特に腸管内 pH 低下の影響については明確にされていない。

そこで、本試験では乳酸添加飼料の 2 段階に設定し、ETEC に対する乳酸の濃度による ETEC に対する効果について、ETEC 感染系で検証すると共に、乳酸添加飼料による消化管内の pH 低下についても検証した。

【材料と方法】

供試豚：2 頭の母豚から帝王切開で作出され、初乳を摂取していない (caesrean-derived and colostrum-derived) CDCD 豚を 18 頭供試した。供試豚は作出日に 4 区 (2%LA 区、1%LA 区、陽性対照区および陰性対照区) に区分けされ、各区別の部屋で単飼ケージで飼育された。

供試菌株：前章で選抜した EC389Rif^r 株を供試した。前章では EC389Rif^r を 1 頭あたり 4.3×10^4 CFU を経口接種すると全頭で下痢を発現し、糞便中からも安定して EC389Rif^r が検出されることが明らかとなった。

接種菌株の調整は前章と同様に実施した。すなわち、EC389Rif^r を SCD 寒天培地で培養し、発育してきたコロニーを Minca ISO vitalex 寒天培地 (BBL Microbiology Systems Cookeysville, Md) に継代、塗抹し、37°C で一晩培養した。その後、Minca ISO vitalex に発育してきたコロニーを掻き取り生理食塩水に懸濁し、生理食塩水に菌濃度を調整した後に接種菌液とし

て供試した。

供試飼料：陽性対照区および陰性対照区には機能性飼料原料や抗菌性飼料添加物を含まない試験用代用乳（SPF-LAC）を供試した。2%LA 区では試験用代用乳に乳酸を 2%添加し、1%LA 区では試験用代用乳に乳酸を 1% 添加して給与した。各区ではそれぞれの飼料を作出当日から試験終了まで給与した。

感染試験：供試豚を 4 区に分け、2%LA 区（n=5）、1%LA 区（n=5）、陽性対照区（n=5）および陰性対照区（n=3）にそれぞれの飼料を作出日から給与した。4 日齢時に 2%LA 区、1%LA 区および陽性対照区では EC389Rif^r 株を 1 頭あたり 5.1×10^3 CFU 経口接種した。

観察期間中は臨床症状の観察を毎日行い、糞便性状のスコア化および糞便の採取を随時実施した。期間中に著しい脱水症状や沈鬱が認められた際には、ペントバルビタールを用いた安楽殺を施した。接種後 7 日目には耐過豚全頭の剖検を実施し、腸管内容物を採取した。

糞便性状のスコア化：糞便性状は随時スコア化して記録された。すなわち、正常便をスコア 0、軟便をスコア 1、下痢便をスコア 2 および水様便をスコア 3 とした。

糞便中および消化管内容物中の *E. coli* 389Rif^r 数の測定：観察期間中の糞便の採取は各個体から直接行った。糞便は採取後すぐに EC389Rif^r 数の測定を行った。菌数測定では糞便 1g を PBS で 10 倍段階希釈し、適切な希釈段階の糞便希釈液を 100 μ g/mL リファンピシン含有 DHL（RFDHL）に塗抹し、37°C で 24 時間培養後に発育した後に発育したコロニー数を計測した。

各種臓器における *E. coli* 389Rif^r の分離：剖検時には肺、肝臓、腎臓、心臓、脾臓および扁桃を採取した。観察期間中に安楽殺を施した豚からは併せて血液も採取した。採取した血液以外の臓器は表面を火炎滅菌した後に中央を切

断し、その断面を RFDHL 寒天培地に接種し 37℃、24 時間培養後のコロニーの発育の有無で判定を行った。血液は直接 RFDHL 寒天培地に塗抹し、37℃、24 時間培養後のコロニーの有無で判定を行った。

消化管内容物の pH の測定：剖検時には胃、十二指腸、空腸、回腸、盲腸および結腸を採取した。採取後の各部位の内容物はイオン交換水で 10 倍に希釈し、希釈された各検体の pH を測定した。

【結果】

臨床症状：陽性対照区では接種後 3 日目までに 5 頭中 3 頭が安楽殺され、残りの 2 頭でも 4 日目以降では水溶性下痢が観察された（図 21）。1%LA 区では接種後 3 日目に 5 頭中 1 頭が安楽殺された。1%LA 区の残りの 4 頭でも糞便性状の悪化は観察され、2 頭で水溶性下痢、1 頭で下痢、1 頭で軟便が観察された。一方、2%LA 区では全頭が生存耐過し、糞便性状の悪化も下痢および軟便がそれぞれ 1 および 2 回観察されるにとどまった。

陰性対照区では接種後 3 日目をピークに軟便が観察されたが、試験期間を通じて下痢は観察されなかった。

糞便中の EC389Rif^r 数の推移：糞便中の EC389Rif^r 数がピークの 10¹⁰CFU/g 程度まで増加したのは、陽性対照区では接種後 2 日目、1%LA 区および 2%LA 区では接種後 3 日目となった（図 22）。接種後 3 日目以降は全区とも 10¹⁰CFU/g 程度の EC389Rif^r が試験終了まで継続して検出された。

剖検時腸管内容物中の EC389Rif^r 数：胃では陽性対照区では 4.1×10⁶CFU/g の EC389Rif^r 数が認められ、2%LA 区では全頭が検出限界以下となり、両者の間で有意差が認められた（図 23）。また、胃より下部の消化管各部位でも 2%LA 区の方が、1%LA 区および陽性対照区より少ない EC389Rif^r 数を示しており、十二指腸では陽性対照区と 2%LA 区間で、空腸では陽性対照区と 2%LA 区および 1%LA 区でそれぞれ有意差が認められた。盲腸、結腸および

直腸での EC389Rif^r 数は陽性対照区および 1%LA 区で 2×10^9 CFU/g 程度を示した。一方、2%LA 区では 2×10^8 CFU/g 程度を示し、陽性対照区と 2%区間で結腸および直腸内容物中で有意差が示された。

各種臓器における EC389Rif^r の分離：各区の耐過豚では殆ど全ての豚の臓器から EC389Rif^r は分離されなかった(表 7)。陽性対照区の耐過豚で肝臓、腎臓および扁桃からそれぞれ 1 検体で EC389Rif^r が分離されたが、それらは全て同一豚に由来していた。

一方、安楽殺豚では肺、腎臓、心臓、脾臓および扁桃から EC389Rif^r が分離され、4 頭中 2 頭では血液からも EC389Rif^r が検出された。

剖検時消化管内容物の pH：各区の pH に差は認められず、各区の平均 pH は胃では 3.6 から 3.9 で、十二指腸から回腸における小腸では 6.1 から 6.4、盲腸から直腸における大腸では 6.6 から 7.5 を示した (図 24)。各区間で有意差は認められなかった。

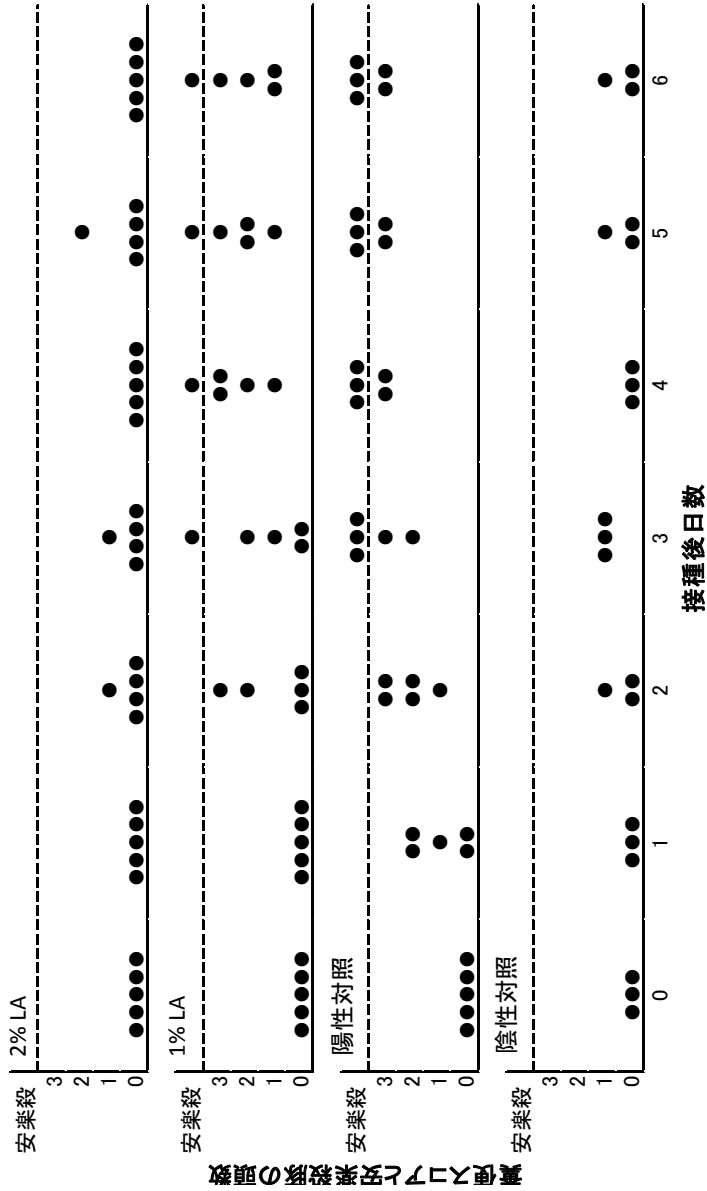


図 21 EC389Rif^r株接種時の糞便性状の推移

各区の糞便性状スコアの推移と剖検頭数を示す。表中の●が供試豚 1 頭を示す。
 糞便性状スコアは 0 が正常便、1 が軟便、2 が下痢便および 3 が水様性下痢を示す。

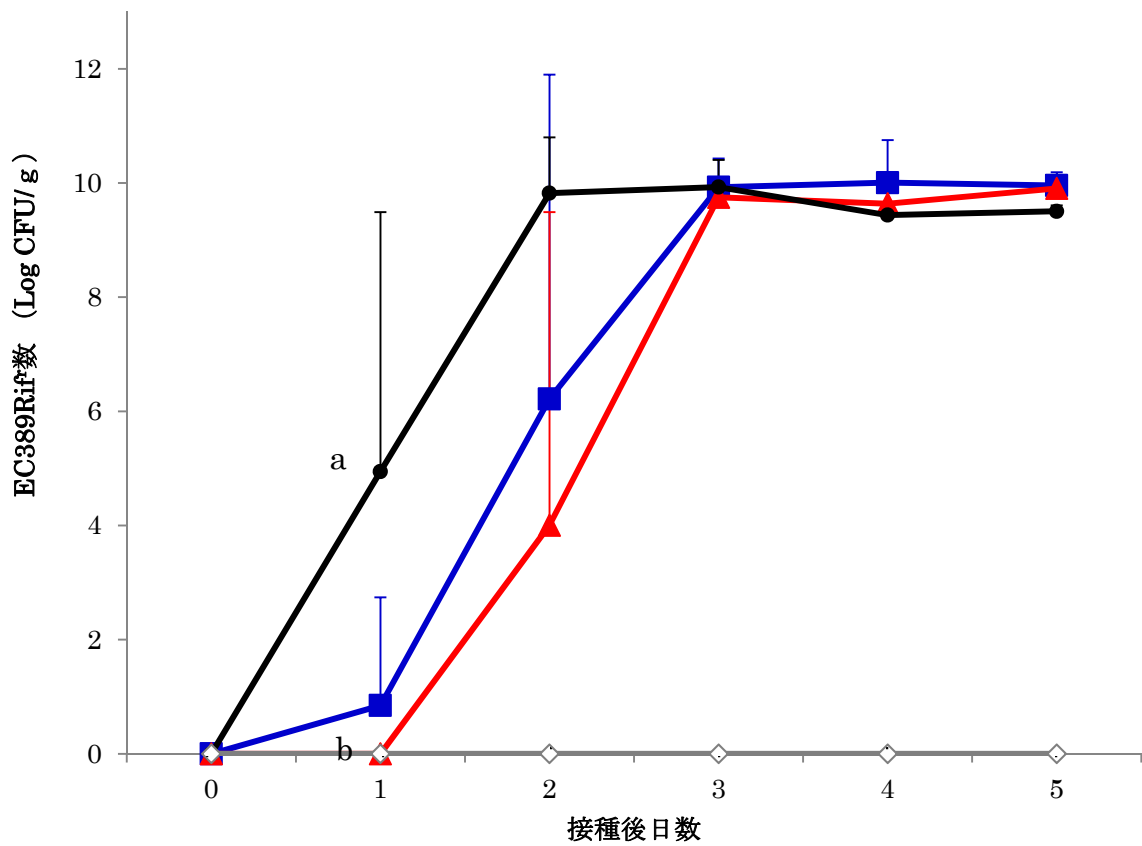


図 22 EC389Rif^r 接種時の EC389Rif^r 数の推移

■が 2%LA 区、▲が 1%LA 区、●が陽性対照区および◇が陰性対照区を示す。

a、b 異符号間で有意差あり ($p < 0.05$)

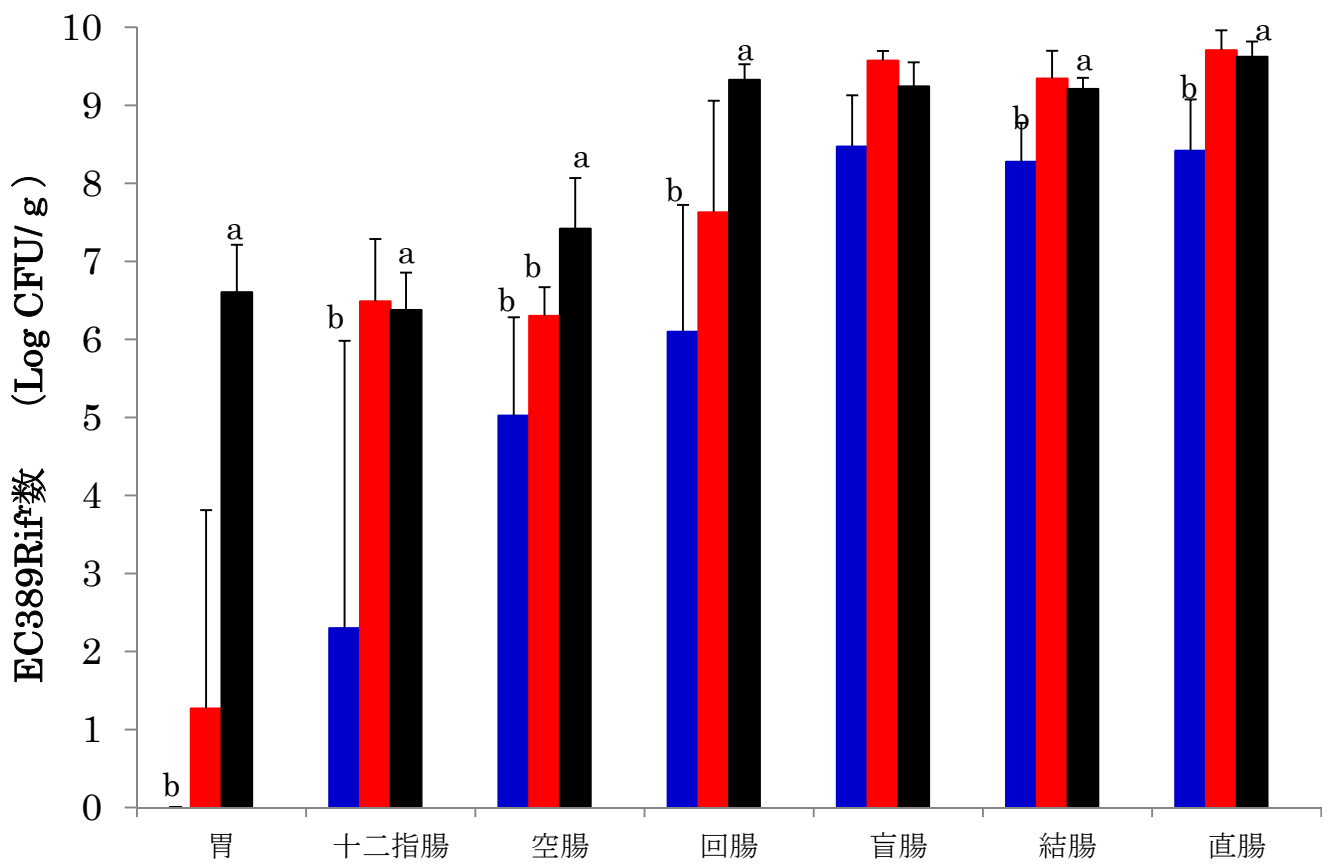


図 23 消化管各部位における EC389Rif^r 数

バーは左から青色が 2%LA 区、赤色が 1%LA 区および黒色が陽性対照区をそれぞれ示す。

a、b 異符号間で有意差あり ($p < 0.05$)

表 7 臓器、組織および血清からの EC389Rif^r 分離率

	肺	肝臓	腎臓	心臓	脾臓	扁桃	血清
耐過豚	2%LA 0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	NT
	1%LA 0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	NT
	陽性対照 0/2	1/2	1/2	0/2	0/2	1/2	NT
	陰性対照 0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	NT
	小計 0/14	1/14	1/14	0/14	0/14	1/14	
安楽殺豚	1%LA 0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	1/1	0/1
	陽性対照 1/3	0/3	2/3	1/3	1/3	1/3	2/3
	小計 1/4	0/4	2/4	1/4	1/4	2/4	2/4

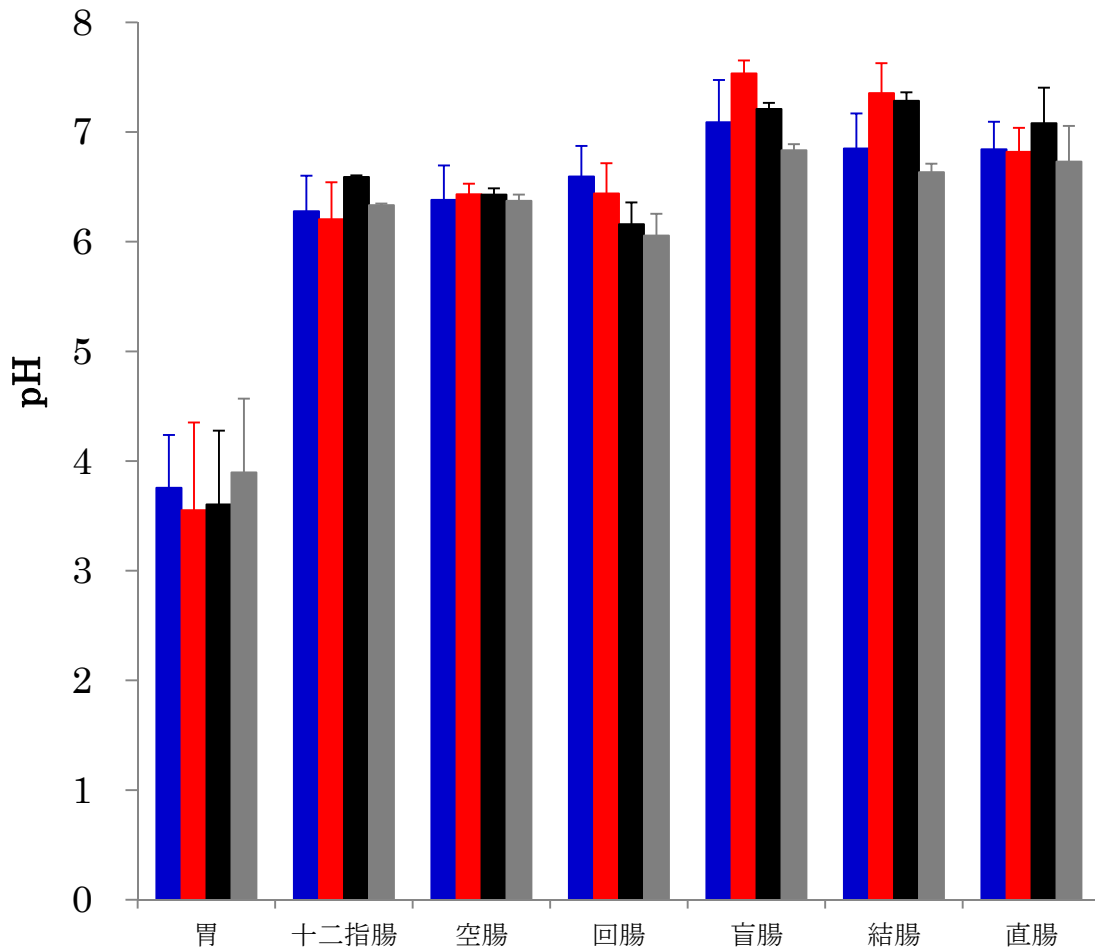


図 24 消化管各部位における pH

バーは左から青色が 2%LA 区、赤色が 1%LA 区、黒色が陽性対照区およびグレーが陰性対照区をそれぞれ示す。

【考察】

本章では、第四章「豚大腸菌感染系の確立」で確立した豚大腸菌感染系を用いて、2%および1%乳酸添加飼料の下痢症緩和に対する評価を行った。その結果、1%乳酸添加飼料では ETEC 感染による糞便性状の悪化が遅延し、2%乳酸添加飼料では糞便性状が悪化せず、剖検時の消化管各部位の ETEC 数も減少していた。これらの結果から、2%乳酸添加飼料が ETEC 対策に有効であることが示唆されると共に、第四章で確立した豚大腸菌感染系の抗菌剤代替評価への有用性が示された。

本試験は第四章で確立した大腸菌感染系を用いて実施したが、陽性対照区では第四章と同様に ETEC 接種翌日には糞便性状の悪化と、糞便中への ETEC の排泄が認められた。さらに、接種後2日目には糞便中への排菌数がほぼピークに到達したが、これは感染後数日で糞便中への排泄がほぼピークに達した第四章の陽性対照区と同様である。また、剖検時の消化管各部位の ETEC 数は盲腸、結腸および直腸では第四章と同様にほぼ一定の菌数を示していたが回腸より上部の消化管では、第四章の1. 接種菌株の検討と同様に十二指腸、空腸および回腸でも比較的高い ETEC 数が測定された。一方、第四章の2. 接種菌数の検討では盲腸より上部の消化管では ETEC 数が減少していた。これは第四章の2. 接種菌数の検討では剖検時に臨床症状が回復していたためと考えられる。

本試験では乳酸の添加濃度を2%と1%の2段階に設定し、乳酸の添加濃度についても検討を行った。その結果、乳酸1%添加では糞便性状の悪化が遅延し、乳酸2%添加では糞便性状の悪化が認められなかった。このことから、乳酸添加濃度が高い方が糞便性状の悪化を抑制する効果が強いことが示唆された。また、消化管各部位の菌数も乳酸2%添加の方が乳酸1%添加よりも少ない菌数で推移し、特に上部消化管では大幅な減少が認められ、消化管での ETEC の増殖を抑制する効果も乳酸添加濃度が高い方が強いことが示唆された。ETEC 感染の発症時には上部消化管で ETEC が増殖していることが知られており[89]、乳酸2%添加には消化管での ETEC の増殖を抑制したために糞便性状が悪化しなかったとも考えられる。

一方、糞便中に排泄される ETEC 数は乳酸 2%添加と乳酸 1%添加で差は認められなかった。これは剖検時に直腸で乳酸 2%添加と 1%添加でほぼ同程度の菌数を示していたことと一致する。

乳酸の殺菌作用は周囲の pH が 4.0 では発揮されるが、4.4 では発揮されないと報告されており[60]、本研究における剖検時の pH から、胃では殺菌作用が期待できるが、十二指腸より下部の消化管では pH6.0 以上であるため、乳酸の殺菌作用は胃で発揮されることが示唆された。Li らも胃、十二指腸、回腸の pH をそれぞれ 3.27、5.75、6.94 と報告している[100]。今回の研究では、胃および腸管の pH に乳酸の影響は認められなかった。2%乳酸添加飼料が ETEC による糞便性状の悪化を軽減できたことの一理由の一つとして、乳酸の添加濃度が高い 2%の方が胃で殺菌される ETEC が多かったためと考えられる。

一方、第三章で実施した *Salmonella* Typhimurium 感染系を用いた乳酸添加飼料の評価では、2.8%乳酸添加飼料が糞便中の *S. Typhimurium* 数を著しく低下させることがわかったが、本章でも 2%乳酸添加飼料区では盲腸以下の大腸では ETEC 数は減少させたが、*S. Typhimurium* で観察された程度の著しい ETEC 数の低下は認められなかった。この異なる結果は、病原体や供試豚の影響と考えられるが、詳細については今後の更なる検討が必要である。

【小括】

第四章で確立された、豚大腸菌感染系を用いて乳酸添加飼料の評価を実施した。その結果、2%添加飼料を給与した群では、糞便中へ排泄される ETEC 数は低下しなかったが糞便性状の悪化が抑制され、接種後 7 日目に実施した剖検では 2%乳酸添加飼料した区の小腸上部での ETEC 数が低下していた。これらのことから乳酸を 2%添加することで豚大腸菌症の発現を抑制することが示唆された。また、本研究で確立した豚大腸菌感染系が、抗菌剤代替物の評価に応用できることが示唆された。

第六章

総括

本研究では抗菌剤に依存しないサルモネラおよび大腸菌感染症対策の確立に不可欠な *S. Typhimurium* (ST) および毒素原性大腸菌 (ETEC) 感染系を豚において確立し、その有用性を乳酸添加飼料で検証した。その結果、乳酸添加飼料が豚 ST 感染系および豚 ETEC 感染系においてその抑制効果が示された。このことから、本研究で確立した感染系の有用性が検証でき、また、乳酸添加飼料が抗菌剤代替物質として活用できることが示唆された。

具体的には第二章では、豚を用いた ST 感染系の確立を試み、供試した ST116Rif^r 株を 10⁹CFU/頭程度経口感染させると下痢や著しい脱水症状を示し、10⁷CFU/頭程度経口感染させると下痢や軟便を、また 10⁵CFU/頭程度感染させると軟便程度の糞便性状の悪化を示すことが示唆された。一方、感染菌数が 10⁴CFU/頭でも糞便中からは安定して ST116Rif^r が検出された。本試験では糞便性状により糞便に含まれる ST116Rif^r 数が異なることも示唆され、今後の抗菌剤代替物質の評価試験では臨床症状の観察と糞便中の菌数を測定することで、臨床症状を抑える効果と、豚群内での感染拡大を防止できるかを考察できる結果を得られると考えられた。

第三章では、第二章で確立した豚 ST 感染系を用いて乳酸 2.8%添加飼料の評価を行った。その結果、臨床症状を伴うサルモネラ症を再現した実験感染系では 2.8%乳酸添加飼料が糞便性状の悪化を抑制し、糞便中へのサルモネラ排菌数も減少させることが明らかとなった。また、不顕性のサルモネラ感染を再現した実験感染系でも糞便中へのサルモネラ排菌数を減少させることが明らかとなった。これらの結果から、豚 ST 感染系が確立され、抗菌剤代替物質の評価に応用できることが示唆された。

第四章では、安定した ETEC 感染系を確立するために、CDCD 豚を用いて豚大腸菌感染系の確立を試み、EC389Rif^r を 1 頭あたり 10⁴CFU 経口接種することで、全頭で下痢が発現し、糞便中からも安定した排菌が認められた。しかし、ETEC 非接種の対照群でも糞便性状の悪化が認められたこと、14 日間の観察期間では ETEC 接種の陽性対照区でも糞便性状が回復傾向にあることから、観察期間を試験用代用乳の給与期間である 7 日間程度に設定することが望ましいと考えられた。

第五章では、第四章で確立された、豚大腸菌感染系を用いて乳酸添加飼料

の評価を実施した。その結果、2.0%乳酸添加飼料を給与した区では、糞便中へ排泄される ETEC 数は低下しなかったが糞便性状の悪化が抑制され、接種後 7 日目に実施した剖検では 2%乳酸添加飼料した区の小腸上部での ETEC 数が低下していた。これらのことから乳酸を 2%添加することで豚大腸菌症の発現を抑制することが示唆された。また、本研究で確立した豚大腸菌感染系が、抗菌剤代替物の評価に応用できることが示唆された。

2013 年 10 月から我が国でも大流行し、アジア各国および米国でも同様に猛威を振るっている豚流行性下痢は、原因病原体がウイルスと本研究とは異なるものの、的確な生物学的製剤がなく、ワクチン製造も追いつかない状況下で、その発生件数も急激に増加し蔓延し続けている[101]。このような流行性疾病の予防には、日頃からの家畜の健全育成が重要なカギとなる。本研究によって得られた知見は、薬剤に依存しない健全畜産の技術向上につながり、安全・安心な畜産食品の持続的供給からヒトの健康生活の向上に貢献するものと期待される。

論文目録

主論文

Tsuyoshi Tanaka*, Yasuo Imai, Naosuke Kumagae, Takashi Sasaki, Narutoshi Ochiai, Katsuyoshi Uruno, Haruki Kitazawa, Tadao Saito and **Shizuo Sato** (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 (査読有)

Tsuyoshi Tanaka*, Yasuo Imai, Naosuke Kumagae, Takashi Sasaki, Narutoshi Ochiai, Haruki Kitazawa and **Shizuo Sato**

Establishment of ETEC experimental infection model of CDCD pigs and evaluate the effect of lactic acid supplemented feed.

Open Journal of Animal Science (投稿予定)

その他の公表論文

田中剛志*, 北澤春樹 (2013) 冬場の呼吸器病に打ち勝つ 養豚の友 11月号:17-20 (査読無)

参考文献

1. Aarestrup, Frank Møller. (1999). Association between the consumption of antimicrobial agents in animal husbandry and the occurrence of resistant bacteria among food animals. *International journal of antimicrobial agents* 12.4. 279-285.
2. Bywater, R. J. (2004). Veterinary use of antimicrobials and emergence of resistance in zoonotic and sentinel bacteria in the EU. *Journal of Veterinary medicine, Series B*, 51(8 - 9), 361-363.
3. Hsueh, P. R., Teng, L. J., Tseng, S. P., Chang, C. F., Wan, J. H., Yan, J. J., Lee, C. M., Chuang, Y. C., Huang, W. K., Yang, D., Shyr, J. M., Yu, K. W., Wang, L. S., Lu, J. J., Ko, W. C., Wu, J. J., Chang, F. Y., Lau, Y. L., Liu, Y. C., Liu, C. Y. Ho, S. W. and Luh, K. T. (2004). Ciprofloxacin-resistant *Salmonella enterica* Typhimurium and *Choleraesuis* from pigs to humans, Taiwan. *Emerging infectious diseases*, 10(1), 60-68.
4. 最新データ 動物用抗菌剤マニュアル 第2版 動物用抗菌剤研究会編 interzoo 185-199 “動物用抗菌剤をめぐる国際動向”
5. 川島健司 (2008) “デンマークでの抗菌性飼料添加物禁止後の現状と取り組み” *All About Swine*, 32. 22-25
6. DANMAP (2013) “013)2-25 Swine, 止後の現状と取り組み” seng, S. P., Cha
7. Takahashi T., Asai T., Kojima A., harada K., Ishihara K., Morioka A., Kijima M. and Tamura Y. "Present situation of national surveillance of antimicrobial resistance in bacteria isolated from farm animals in Japan and correspondence to the issue." *Kansenshogaku zasshi. The Journal of the Japanese Association for Infectious Diseases* 80.3 (2006): 185-195.

8. Asai, T., Kojima, A., Harada, K., Ishihara, K., Takahashi, T., and Tamura, Y. (2005). Correlation between the usage volume of veterinary therapeutic antimicrobials and resistance in *Escherichia coli* isolated from the feces of food-producing animals in Japan. *Japanese journal of infectious diseases*, 58(6), 369.
9. 深沢茂樹、深沢巨樹. “抗生物質の汎用と抗生物質不使用食品の展望. *生城西国
際大学紀要* 21.8. (2013),17-28
10. 金山紀久、仙北谷康、窪田さと子、樋口昭則、中川隆 (2007) 抗菌剤無添加飼料による養豚経営の現段階、*農業経営研究*、45 (1)、51-55
11. 農林水産省 動物薬医薬品検査所 (2012) 動物用医薬品等販売高年報 (別冊)
12. 金田正彦、岡田宗典、鷺谷敏一、佐々木隆志 (2009) PCV2 ワクチンが農場の病原体浸潤動向に与えた影響、*豚病研究会報*、55、13-15
13. Jiffer J. Zimmerman, Locke A. Karriker, Alejandro Ramirez, Kent J. Schwartz and regory W. Stevenson (2012), *Salmonella*, Diseases of Swine, 10th Edition, 739-754.
14. Jiffer J. Zimmerman, Locke A. Karriker, Alejandro Ramirez, Kent J. Schwartz and regory W. Stevenson (2012), *Escherichia coli* infedtions, Diseases of Swine, 10th Edition, 639-674.
15. C. Sakano, Y. Morita, K. Goto, Y. Yokota, H. Annaka, M. Fujita, S. Kobatake, T. Ishioka, T. Hoshino, S. Boonmar, S. Pulsrikarn, A. Nishina, K. Kozawa, S. Yamamoto and H. Kimura (2011), “Prevalence and Genotype of *Salmonella* Choleraesuis in Gunma Prefecture, Japan,” *Thai Journal of Veterinary Medicine*, Vol. 41, No. 3, 321-326.

16. Asai, T., Otagiri, Y., Osumi, T., Namimatsu, T., Hirai, H., & Sato, S. (2002). Isolation of Salmonella from diarrheic feces of pigs. *The Journal of veterinary medical science/the Japanese Society of Veterinary Science*, 64(2), 159-160.
17. Steinbach, G., & Hartung, M. (1999). [Attempt to estimate the share of human Salmonella infections, which are attributable to Salmonella originating from swine]. *Berliner und Munchener Tierarztliche Wochenschrift*, 112(8), 296-300.
18. Nielsen, B., Alban, L., Stege, H., Sørensen, L. L., Møgelmoose, V., Bagger, J., ... & Baggesen, D. L. (2000). A new Salmonella surveillance and control programme in Danish pig herds and slaughterhouses. *Berliner und Munchener Tierarztliche Wochenschrift*, 114(9-10), 323-326
19. Dahl, J., Wingstrand, A., Nielsen, B., & Baggesen, D. L. (1997). Elimination of Salmonella typhimurium infection by the strategic movement of pigs. *Veterinary record*, 140(26), 679-681.
20. Kure, K. (2007). Field Experience of Eradication of Salmonella Typhimurium in Swine Farrow to Finish Farms in Japan Proc, Jpn. Pig Vet Soc 51, 19-24
21. Esaki, H., Morioka, A., Ishihara, K., Kojima, A., Shiroki, S., Tamura, Y., & Takahashi, T. (2004). Antimicrobial susceptibility of Salmonella isolated from cattle, swine and poultry (2001–2002): report from the Japanese Veterinary Antimicrobial Resistance Monitoring Program. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 53(2), 266-270.
22. 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.

23. Harada, K., Asai, T., Kojima, A., Sameshima, T., & Takahashi, T. (2007). Contribution of Multi - Antimicrobial Resistance to the Population of Antimicrobial Resistant Escherichia coli Isolated from Apparently Healthy Pigs in Japan. *Microbiology and immunology*, 51(5), 493-499.
24. Vondruskova, H., Slamova, R., Trckova, M., Zraly, Z., & Pavlik, I. (2010). Alternatives to antibiotic growth promoters in prevention of diarrhoea in weaned piglets: a review. *Veterinarni Medicina*, 55(5), 199-224.
25. 財団法人畜産生物科学安全研究所（平成 15 年）抗菌剤非依存型畜産のガイドライン〔農畜産業振興事業団指定助成事業 農林水産省生産振興総合対策事業〕
26. Jacela, J. Y., DeRouche, J. M., Tokach, M. D., Goodband, R. D., Nelssen, J. L., Renter, D. G., & Dritz, S. S. (2013). Feed additives for swine: Fact sheets—prebiotics and probiotics, and phytogenics.
27. Jacela, J. Y., DeRouche, J. M., Tokach, M. D., Goodband, R. D., Nelssen, J. L., Renter, D. G., & Dritz, S. S. (2013). Feed additives for swine: Fact sheets – acidifiers and antibiotics
28. 厚生労働省、平成 13 年、保健機能食品制度の創設に伴う特定保健用食品の取り扱い等について
29. Kirsi H. Partanen and Zdzislaw Mroz, 1999, Organic acids for performance enhancement in pig diets, *Nutrition research Reviews*, 12, 117-145
30. Jorgensen, L. 2002, Weaner feed that reduces Salmonella: the effects of the form of the feed and of addition of lactic acid on the prevalence of Salmonella, Lawsonia, gastro-intestinal health, and productivity. Danish Pig Production, Report. no. 543.

31. Tsiolyiannis, 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.
32. 財団法人 畜産技術協会 平成 22 年 内閣府食品安全委員会事務局 平成 21 年度食品安全確保総合調査 食品により媒介される感染症等に関する文献調査報告書
33. 厚生労働省 食中毒事件一覧速報
34. 厚生労働省 平成 24 年 平成 23 年度食品の食中毒菌汚染実態調査の結果について
35. Österberg, J., Lewerin, S. S., & Wallgren, P. (2010). Research Direct and indirect transmission of four *Salmonella enterica* serotypes in pigs.
36. Rostagno, M. H., Eicher, S. D., & Lay Jr, D. C. (2011). Immunological, physiological, and behavioral effects of *Salmonella enterica* carriage and shedding in experimentally infected finishing pigs. *Foodborne pathogens and disease*, 8(5), 623-630.
37. Hurd, H. S., Gailey, J. K., McKean, J. D., & Rostagno, M. H. (2001). Rapid infection in market-weight swine following exposure to a *Salmonella* Typhimurium-contaminated environment. *American journal of veterinary research*, 62(8), 1194-1197.
38. Osterberg, J., & Wallgren, P. (2008). Effects of a challenge dose of *Salmonella* Typhimurium or *Salmonella* Yoruba on the patterns of excretion and antibody responses of pigs. *The Veterinary Record*, 162(18), 580-586.
39. Tanaka T, Imai Y, Kumagai N and Sato S. (2010) The effect of feeding lactic acid to *Salmonella* Typhimurium experimentally infected swine. *Journal of Veterinary Medicine*,

72 (7), 827-831.

40. Asten, A. J., & Dijk, J. E. (2005). Distribution of “classic” virulence factors among *Salmonella* spp. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 44(3), 251-259.

41. Namimatsu T, Asai T, Osumi T, Imai Y, and Sato S. (2006) Prevalence of the virulence plasmid in *Salmonella* Typhimurium isolates from pigs. *Journal of Veterinary Medical Science*, 68, 187-188.

42. Loynachan, A. T., & Harris, D. L. (2005). Dose determination for acute *Salmonella* infection in pigs. *Applied and environmental microbiology*, 71(5), 2753-2755.

43. Boyen, F., Pasmans, F., Van Immerseel, F., Donné, E., Morgan, E., Ducatelle, R., & Haesebrouck, F. (2009). Porcine in vitro and in vivo models to assess the virulence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium for pigs. *Laboratory animals*, 43(1), 46-52.

44. Proux, K., Cariolet, R., Fravallo, P., Houdayer, C., Keranflech, A., & Madec, F. (2001). Contamination of pigs by nose-to-nose contact or airborne transmission of *Salmonella* Typhimurium. *Veterinary research*, 32(6), 591-600.

45. Pires, A. F., Funk, J. A., Lim, A., & Bolin, S. R. (2013). Enumeration of *Salmonella* in Feces of Naturally Infected Pigs. *Foodborne pathogens and disease*, 10(11), 933-937.

46. Fedorka-Cray, P. J., Whipp, S. C., Isaacson, R. E., Nord, N., & Lager, K. (1994). Transmission of *Salmonella typhimurium* to swine. *Veterinary microbiology*, 41(4), 333-344.

47. Boughton, C., Egan, J., Kelly, G., Markey, B., & Leonard, N. (2007). Rapid infection of pigs following exposure to environments contaminated with different levels of *Salmonella* Typhimurium. *Foodborne pathogens and disease*, 4(1), 33-40.

48. Kishima, M., Uchida, I., Namimatsu, T., Osumi, T., Takahashi, S., Tanaka, K., ... & Yamamoto, K. (2008). Nationwide surveillance of Salmonella in the faeces of pigs in Japan. *Zoonoses and public health*, 55(3), 139-144.
49. Asai, T., Esaki, H., Kojima, A., Ishihara, K., Tamura, Y., & Takahashi, T. (2006). Antimicrobial resistance in Salmonella isolates from apparently healthy food-producing animal from 2000 to 2003: the first stage of Japanese veterinary antimicrobial resistance monitoring (JVARM). *The Journal of veterinary medical science/the Japanese Society of Veterinary Science*, 68(8), 881-884.
50. Esaki, H., Morioka, A., Kojima, A., Ishihara, K., Asai, T., Tamura, Y., ... & Takahashi, T. (2004). Epidemiological Characterization of Salmonella Typhimurium DT104 Prevalent among Food - Producing Animals in the Japanese Veterinary Antimicrobial Resistance Monitoring Program (1999–2001). *Microbiology and immunology*, 48(7), 553-556.
51. Kawagoe K., Mine H., Asai T., Kojima A., Ishihara K., Hsarada K., Ozawa M., Hidemasa I., Watanabe H., Honda E., Takahashi T. and Sameshima T., (2007), Changes of multi-drug resistance pattern in Salmonella enterica subspecies enterica serovar Typhimurium isolated from food-producing animals in Japan, *Journal of veterinary medical science*, 69, 1211-1213.
52. Malorny, B., Schroeter, A., & Helmuth, R. (1999). Incidence of quinolone resistance over the period 1986 to 1998 in veterinary Salmonella isolates from Germany. *Antimicrobial agents and Chemotherapy*, 43(9), 2278-2282.
53. Delsol, A. A., Woodward, M. J., & Roe, J. M. (2004). Effect of a 5 day enrofloxacin treatment on Salmonella enterica serotype Typhimurium DT104 in the pig. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 53(2), 396-398.

54. Wales, A. D., Cook, A. J. C., & Davies, R. H. (2011). Producing Salmonella-free pigs: a review focusing on interventions at weaning. *Veterinary Record*, *168*(10), 267-276.
55. Hurd, H. S., Gailey, J. K., McKean, J. D., & Rostagno, M. H. (2000). Experimental rapid infection in market swine following exposure to a Salmonella contaminated environment. *Berliner und Munchener Tierarztliche Wochenschrift*, *114*(9-10), 382-384.
56. Casey, P. G., Gardiner, G. E., Casey, G., Bradshaw, B., Lawlor, P. G., Lynch, P. B., ... & Hill, C. (2007). A five-strain probiotic combination reduces pathogen shedding and alleviates disease signs in pigs challenged with Salmonella enterica serovar Typhimurium. *Applied and Environmental Microbiology*, *73*(6), 1858-1863.
57. Lee, M. H., Kwon, H., Kwon, D. Y., Park, H., Sohn, D. H., Kim, Y. C., ... & Lee, J. H. (2006). Antibacterial activity of medicinal herb extracts against *Salmonella*. *International journal of food microbiology*, *111*(3), 270-275.
58. van Winsen, R. L., Lipman, L. J. A., Biesterveld, S., Urlings, B. A. P., Snijders, J., & van Knapen, F. (2001). Mechanism of Salmonella reduction in fermented pig feed. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *81*(3), 342-346.
59. Tanaka, T., Imai, Y., Kumagae, N., Sasaki, T., Ochiai, N., Uruno, K., Sato, S. (2014). Quantitative Microbiological Evaluation of *Salmonella* Typhimurium Shed in Diarrhea, Loose, and Normal Stools of Infected Pigs. *Open Journal of Veterinary Medicine*, 2014.
60. Jung, Y. S., & Beuchat, L. R. (2000). Sensitivity of multidrug-resistant *Salmonella typhimurium* DT104 to organic acids and thermal inactivation in liquid egg products. *Food Microbiology*, *17*(1), 63-71.

61. Risley, C. R., Kornegay, E. T., Lindemann, M. D., Wood, C. M., & Eigel, W. N. (1992). Effect of feeding organic acids on selected intestinal content measurements at varying times postweaning in pigs. *Journal of Animal Science*, 70(1), 196-206.
62. Ushida, K., Ushida, K., & Ushida, K. (2002). ¹³C-NMR Studies on Lactate Metabolism in a Porcine Gut Microbial Ecosystem. *Microbial ecology in health and disease*, 14(4), 242-247.
63. Van Immerseel, F., Russell, J. B., Flythe, M. D., Gantois, I., Timbermont, L., Pasmans, F. & Ducatelle, R. (2006). The use of organic acids to combat Salmonella in poultry: a mechanistic explanation of the efficacy. *Avian Pathology*, 35(3), 182-188.
64. Callaway, T. R., Morrow, J. L., Edrington, T. S., Genovese, K. J., Dowd, S., Carroll, J. & Nisbet, D. J. (2006). Social stress increases fecal shedding of Salmonella typhimurium by early weaned piglets. *Current issues in intestinal microbiology*, 7(2), 65-72.
65. Wada, Y., Nakaoka, Y., Kondo, H., Nakazawa, M., & Kubo, M. (1996). Dual infection with attaching and effacing *Escherichia coli* and enterotoxigenic *Escherichia coli* in post-weaning pigs. *Journal of comparative pathology*, 114(1), 93-99.
66. 永井英貴 (2011) 日本で使用されている動物用ワクチン 豚用ワクチンの概説 12 豚大腸菌性下痢症ワクチン (不活化ワクチン) 及びクロストリジウム・パーフリングENS. 感染症ワクチン (混合不活化ワクチン) 、日本獣医学会誌、64、194-197
67. Sueyoshi, M. (2006), edema disease with diarrhea of piglets (Enterotoxaemia by *Escherichia coli* of piglets), *Proceedings of Japan Pig Veterinary Society*, 48, 7-13

68. Uemura, R., Sueyoshi, M., Nagayoshi, M., & Nagatomo, H. (2003). Antimicrobial Susceptibilities of Shiga Toxin - Producing *Escherichia coli* Isolates from Pigs with Edema Disease in Japan. *Microbiology and immunology*, 47(1), 57-61.
69. Mathew, A. G., Saxton, A. M., Upchurch, W. G., & Chattin, S. E. (1999). Multiple Antibiotic Resistance Patterns of *Escherichia coli* Isolates from Swine Farms. *Applied and environmental microbiology*, 65(6), 2770-2772.
70. Tsiloyiannis, V. K., Kyriakis, S. C., Vlemmas, J., & Sarris, K. (2001). The effect of organic acids on the control of post-weaning oedema disease of piglets. *Research in veterinary science*, 70(3), 281-285.
71. Krause, D. O., Bhandari, S. K., House, J. D., & Nyachoti, C. M. (2010). Response of nursery pigs to a synbiotic preparation of starch and an anti-*Escherichia coli* K88 probiotic. *Applied and environmental microbiology*, 76(24), 8192-8200.
72. Imberechts, H., Deprez, P., Van Driessche, E., & Pohl, P. (1997). Chicken egg yolk antibodies against F18ab fimbriae of *Escherichia coli* inhibit shedding of F18 positive *E. coli* by experimentally infected pigs. *Veterinary microbiology*, 54(3), 329-341.
73. Yokoyama, H., Hashi, T., Umeda, K., Icatlo Jr, F. C., Kuroki, M., Ikemori, Y., & Kodama, Y. (1997). Effect of oral egg antibody in experimental F18+ *Escherichia coli* infection in weaned pigs. *The Journal of veterinary medical science/the Japanese Society of Veterinary Science*, 59(10), 917-921.
74. Sargeant, H. R., McDowall, K. J., Miller, H. M., & Shaw, M. A. (2010). Dietary zinc oxide affects the expression of genes associated with inflammation: Transcriptome analysis in piglets challenged with ETEC K88. *Veterinary immunology and immunopathology*, 137(1), 120-129.

75. Kyriakis, S. C., Tsiloyiannis, V. K., Vlemmas, J., Sarris, K., Tsinas, A. C., Alexopoulos, C., & Jansegers, L. (1999). The effect of probiotic LSP 122 on the control of post-weaning diarrhoea syndrome of piglets. *Research in veterinary science*, 67(3), 223-228.
76. Sarmiento, J. I., Casey, T. A., & Moon, H. W. (1988). Postweaning diarrhea in swine: experimental model of enterotoxigenic *Escherichia coli* infection. *American journal of veterinary research*, 49(7), 1154-1159.
77. Tsukahara, T., Nakanishi, N., Nakayama, K., Matsubara, N., & Ushida, K. (2005). Experimental infection of enterotoxemic *Escherichia coli* associated with porcine edema disease and its pathologic characteristics in the intestine. *The Journal of veterinary medical science/the Japanese Society of Veterinary Science*, 67(11), 1167-1171.
78. Li, X. Q., Zhu, Y. H., Zhang, H. F., Yue, Y., Cai, Z. X., Lu, Q. P., ... & Wang, J. F. (2012). Risks associated with high-dose *Lactobacillus rhamnosus* in an *Escherichia coli* model of piglet diarrhoea: intestinal microbiota and immune imbalances. *PloS one*, 7(7), e40666.
79. Choi, C., & Chae, C. (1999). Genotypic prevalence of F4 variants (ab, ac, and ad) in *Escherichia coli* isolated from diarrheic piglets in Korea. *Veterinary microbiology*, 67(4), 307-310.
80. Johnson, W. M., Pollard, D. R., Lior, H., Tyler, S. D., & Rozee, K. R. (1990). Differentiation of genes coding for *Escherichia coli* verotoxin 2 and the verotoxin associated with porcine edema disease (VTe) by the polymerase chain reaction. *Journal of clinical microbiology*, 28(10), 2351-2353.

81. Wray, C., Piercy, D. W. T., Carroll, P. J., & Cooley, W. A. (1993). Experimental infection of neonatal pigs with CNF toxin-producing strains of *Escherichia coli*. *Research in veterinary science*, 54(3), 290-298.
82. Jensen M L. Cilieborg, M. S., Ostergaard. M. V., Bering S. B., Oregnsen C. B., and sanglid P. T. (2012) *Escherichia coli* challenge in newborn pigs. *Journal of Animal Science*, 90, 43-45
83. Mead, G. C. (2000). Prospects for ‘competitive exclusion’ treatment to control salmonellas and other foodborne pathogens in poultry. *The Veterinary Journal*, 159(2), 111-123.
84. Jensen, M. L., Cilieborg, M. S., Østergaard, M. V., Bering, S. B., Jørgensen, C. B., & Sangild, P. T. (2012). *Escherichia coli* challenge in newborn pigs. *Journal of animal science*, 90(Supplement 4), 43-45.
85. Staley, T. E., Corley, L. D., & Jones, E. W. (1970). Early pathogenesis of colitis in neonatal pigs monocontaminated with *Escherichia coli*. *The American journal of digestive diseases*, 15(10), 923-935.
86. Bhandari, S. K., Xu, B., Nyachoti, C. M., Giesting, D. W., & Krause, D. O. (2008). Evaluation of alternatives to antibiotics using an *Escherichia coli* K88+ model of piglet diarrhea: Effects on gut microbial ecology. *Journal of animal science*, 86(4), 836-847.
87. 光岡知足、(1994)、第5章 ビフィズス菌を中心とする腸内フローラの生態、*ビフィズス菌の研究*、158-220
88. 乳酸菌研究集談会編、(1996)、VII 生体における乳酸菌のエコロジー、*乳酸菌の科学と技術*、287-903

89. Staley, T. E., Jones, E. W., & Corley, L. D. (1969). Attachment and penetration of *Escherichia coli* into intestinal epithelium of the ileum in newborn pigs. *The American journal of pathology*, 56(3), 371.
90. Ellis-Versen, J., & Van Winden, S. (2008). Control of E-coli O157 (VTEC) by applied management practices. *CATTLE PRACTICE*, 16, 54-54.
91. Dowd, S. E., Callaway, T. R., & Morrow-Tesch, J. (2007). Handling may cause increased shedding of *Escherichia coli* and total coliforms in pigs. *Foodborne pathogens and disease*, 4(1), 99-102.
92. 渡邊章子 (2013) 管内養豚場で発生した豚の大腸菌症対策 平成 24 年度全国家畜保健衛生業績発表会講演要旨
93. Sato, T., Okubo, T., Usui, M., Yokota, S. I., Izumiyama, S., & Tamura, Y. (2014). Association of Veterinary Third-Generation Cephalosporin Use with the Risk of Emergence of Extended-Spectrum-Cephalosporin Resistance in *Escherichia coli* from Dairy Cattle in Japan. *PloS one*, 9(4), e96101.
94. Zúñiga, A., Yokoyama, H., Albicker - Rippinger, P., Eggenberger, E., & Bertschinger, H. U. (1997). Reduced intestinal colonisation with F18 - positive enterotoxigenic *Escherichia coli* in weaned pigs fed chicken egg antibody against the fimbriae. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 18(3), 153-161.
95. Wellock, I. J., Fortomaris, P. D., Houdijk, J. G. M., & Kyriazakis, I. (2008). Effects of dietary protein supply, weaning age and experimental enterotoxigenic *Escherichia coli* infection on newly weaned pigs: health.
96. Erik, K., & Knudsen, B. (2001). Development of antibiotic resistance and options to replace antimicrobials in animal diets. *Proceedings of the Nutrition Society*, 60(03),

291-299.

97. Sargeant, H. R., McDowall, K. J., Miller, H. M., & Shaw, M. A. (2010). Dietary zinc oxide affects the expression of genes associated with inflammation: Transcriptome analysis in piglets challenged with ETEC K88. *Veterinary immunology and immunopathology*, *137*(1), 120-129.

98. Cole, D. J., Beal, R. M., & Luscombe, J. R. (1968). The effect on performance and bacterial flora of lactic acid, propionic acid, calcium propionate and calcium acrylate in the drinking water of weaned pigs. *Veterinary Record*, *83*(18), 459-464.

99. Thomlinson, J. R., & Lawrence, T. L. (1981). Dietary manipulation of gastric pH in the prophylaxis of enteric disease in weaned pigs: Some field observations. *Veterinary Record*, *109*(6), 120-122.

100. Li, Z., Yi, G., Yin, J., Sun, P., Li, D., & Knight, C. (2008). Effects of organic acids on growth performance, gastrointestinal pH, intestinal microbial populations and immune responses of weaned pigs. *ASIAN AUSTRALASIAN JOURNAL OF ANIMAL SCIENCES*, *21*(2), 252.

101. 末吉益雄 (2014) , 2014年パンデミックと化した豚流行性下痢 (PED) 、
家畜診療、61 (7) 、395-406.

謝辞

本稿を終えるにあたり、終始懇切なるご指導、ご鞭撻を賜り、かつ本研究の発表の機会を賜りました東北大学大学院 農学研究科 生物産業創成科学専攻 動物資源化学分野 准教授 北澤春樹先生、並びにご助言を賜りました同分野教授の齋藤忠夫先生に謹んで感謝の意を表します。

本研究を遂行するにあたり、副査として細部にわたって数々の御助言、ご指導を賜りました東北大学大学院農学研究科 生物産業創成科学専攻 食品機能健康学講座 栄養学分野教授 駒井 三千夫先生、東北大学大学院農学研究科 応用生命科学専攻 動物機能科学講座 機能形態学分野 教授 麻生久先生に深く感謝致します。

また、本研究の機会を与えていただきました全国農業協同組合連合会 家畜衛生研究所長 落合成年 様、ならびに同研究所 前所長 佐々木隆志博士、ならびに同研究所元所長 柴田勲博士に深く感謝いたします。

本研究を遂行するにあたり、多大なご協力をいただきました、全国農業協同組合連合会 家畜衛生研究所 佐藤静夫博士、今井康雄博士並びに同研究所の皆様、全農ビジネスサポート筑波支店佐倉営業所の皆様に感謝いたします。