

原著論文

HPCD 子豚への *Salmonella enterica* serovar Choleraesuis 実験感染；
病態の再現と TLR5 一塩基多型 (C1205T) の影響検証の試み溝呂木聖子^{1),2)}、矢ヶ部陽子²⁾、芝原友幸²⁾、秋庭正人^{3),4)}、楠本正博³⁾、佐久間晶子⁵⁾、中條満⁵⁾、新開浩樹⁶⁾、上西博英^{6),7)}、宗田吉広^{1),2)}

(¹⁾東京理科大 生命科学、²⁾(独)農業・食品産業技術総合研究機構 動物衛生研究所 病態研究領域、³⁾(独)農業・食品産業技術総合研究機構 動物衛生研究所 細菌・寄生虫研究領域、⁴⁾大阪府大院 生命環境、⁵⁾宮城県畜産試験場、

⁶⁾(独)農業生物資源研究所 動物生体防御研究ユニット、⁷⁾(独)農業生物資源研究所 家畜ゲノム研究ユニット)

Mizorogi, S., Yakabe, Y., Shibahara, T., Akiba, M., Kusumoto, M., Sakuma, A., Nakajo, M., Shinkai, H., Uenishi, H. and Muneta, Y. (2014). Experimental infection of *Salmonella enterica* serovar Choleraesuis to HPCD piglets and trial to validate the effect of a TLR5 SNP (C1205T).

Proc. Jpn. Pig Vet. Soc. 63, 6-11.

キーワード；豚サルモネラ症、HPCD 子豚、*Salmonella enterica* serovar Choleraesuis、SNP、TLR5

要約

Toll-like receptor 5 (TLR5) は細菌のべん毛タンパク質 (flagellin) を認識するパターン認識受容体で、豚ゲノムの解析においてサルモネラの flagellin 及び *Salmonella enterica* serovar Choleraesuis (SC) の認識を低下させる TLR5 一塩基多型 (single nucleotide polymorphism: SNP) (C1205T) が報告されている。

当該 SNP がヘテロ型のランドレース豚の雌雄を交配して得られる妊娠母豚の子宮切除術によって作出された hysterectomy produced colostrum deprived (HPCD) 子豚へ SC を無菌ミルクに混ぜて 2 回の経口実験感染を行った結果、HPCD 子豚への SC 経口感染により、これまで再現が困難であった下痢や敗血症を特徴とする、豚サルモネラ症の病態モデルの再現ができた。しかし当該 TLR5 SNP の SC 感染に対する影響については、感染初期での排菌量に有意差は認められず、生存日数への影響についても 2 回の実験からは確かめられなかった。その理由として HPCD 子豚では flagellin 刺激に対する IL-6 応答の顕著な低下が原因である可能性が示唆された。

背景と目的

豚サルモネラ症は日和見感染症であり、急性の敗血症疾患または下痢を伴う慢性腸炎として、主に離乳期から 4 か月齢前後の幼豚において発生が見られる。し

ばしば不顕性感染が成立し、成豚が保菌化することから、農場に常在化し、食肉汚染など公衆衛生上においても重要である^{7),12)}。発生は届出伝染病の対象である *Salmonella enterica* serovar Choleraesuis (SC) と、*Salmonella enterica* serovar Typhimurium (ST) によることが多い。SC は敗血症型、ST は下痢型を特徴とした症状を呈する。

豚サルモネラ症の対策として、抗生物質の投与や飼料添加などが行われているが、薬剤投与のコストによる経済的な損失や耐性菌の出現リスクおよび、近年の畜産物の安全性に対する消費者の関心の高まりなどからも宿主側からの抗病性の向上が求められている。

これまでも SC の実験感染を行った報告がある^{1),4)}が、上記に示した本感染症の特徴といえる下痢や敗血症の病態を再現できている報告ではなかった。この理由として、本感染症が日和見感染症であることから、実験感染させた感染豚すべてを発症させることが難しいということがあげられる。豚サルモネラ症の再現が成功すれば、本感染症に対する治療法や予防法の開発に貢献でき、本研究の最終目標となる遺伝的にサルモネラに強い豚の育種 (抗病性育種) への第一歩となる。

これまで、ヒトやマウスの TLR 遺伝子の SNP と疾患感受性との関連について数多くの報告がある。例えば、ヒトの TLR5 SNP (C1174T) と類鼻疽について、TLR5^{I174C} に対して TLR5^{I174T} は、その原因となる *Burkholderia pseudomallei* 誘導性 NF- κ B 活性化に関与せず、血中サイトカインの減少を誘導し、炎症反応を軽減することで、死亡率が低くなると報告されている¹⁵⁾。

ブタのTLRにも多数のアミノ酸変異を伴う多様性があり、病原体認識に直接関与する細胞外領域に集中していることが知られている^{8),9)}。ブタのTLR2 SNP (C406G) とマイコプラズマ肺炎について、TLR2_{406C} に対してTLR2_{406G} は、その原因となる *Mycoplasma hyopneumoniae* の認識を低下することで、ノトバイオート豚を用いた実験感染の系で、炎症性サイトカイン応答、抗体応答が低下し、肺炎の程度を軽減することが報告されている⁶⁾。

今回着目したブタのTLR5 SNP (C1205T) について、Shinkai ら¹⁰⁾ により *in vitro* でその影響を調べられているが、点突然変異を導入したTLR遺伝子とNF- κ B依存性ルシフェラーゼレポーター遺伝子をHuman Embryonic Kidney 293 (HEK293) 細胞に導入し、リガンド刺激後のルシフェラーゼ活性を測定することにより、NF- κ B活性量を比較している。この結果、SC死菌体及びST由来のflagellin刺激後のNF- κ B活性がCC型に対してTT型で有意に低下し、SC菌体およびflagellinの認識が低下しているという成績を報告している。さらにこのT型SNPは、ランドレース種のみが存在するSNPであるということが報告されている⁸⁾。

そこで、本研究ではhysterectomy produced colostrum deprived (HPCD) ランドレース種子豚に対するSCの実験感染を実施して、病態モデルの確立およびTLR5 SNP (C1205T) の影響を *in vivo* レベルで解析することを目的とした。

材料

宮城県畜産試験場より供与された当該TLR5 SNPがCT型のランドレースの雌雄を交配して得られた妊娠母豚より作出されたHPCD子豚を使用した。実験1では23頭、実験2では21頭のHPCD子豚が作出された。作出された子豚のTLR5遺伝子型別については既報に従って行った^{8),10)}。

TLR5遺伝子型について、1205番目の塩基がCのホモ型をCC型、CとTのヘテロ型をCT型、Tのホモ型をTT型という表現を用いた。

SCはATCC7001株を使用し、LB培地により16時間培養し、約 10^9 cfu/mlに調整したSC菌液を実験感染に用いた。

方法

実験1.

1週齢時のHPCD子豚に 10^7 cfu/頭のSCを無菌ミ

ルクに混ぜて経口感染させた。感染群CC型7頭、CT型6頭、TT型6頭とし、感染群とは別にコントロールとして非感染のCT型4頭を用意した。

SC感染後の病態の変化、直腸スワブ採取による経時的な排菌状況（感染後1, 3日目）、死亡に至るまでの生存日数、死亡時の各臓器のHE染色及び *Salmonella* O7抗原に対する免疫組織化学染色をサルモネラ免疫血清（デンカ生研）を用いて実施して比較検討した。すべての統計学的解析は市販の統計解析ソフト（STAT VIEW）を用いてt検定によって群間の比較をした（動物衛生研究所 動物実験承認番号 12-052）。

実験2.

1週齢時のHPCD子豚に 10^4 cfu/頭のSCを無菌ミルクに混ぜて経口感染させた。感染群としてCC型5頭、CT型12頭、TT型4頭を用意した。また、SC感染前に採血した全血をそれぞれflagellin（ST 14028株由来、Adipogen, $10\mu\text{g/ml}$ ）、SC死菌（ 10^7 cfu/ml）、*Escherichia coli* LPS（Sigma, $10\mu\text{g/ml}$ ）で72時間刺激した。その上清を分離し、IL-6産生をELISA（Porcine IL-6 Duo Set Economy Pack, R&D system）を用いて調べた。その他の方法は実験1と同様にして行った。（動物衛生研究所 動物実験承認番号 13-016）。

結果

1. 実験1

1-1 SC感染後の下痢の発症と排菌

全ての感染豚がSC感染後1日目から黄色下痢を発症して（図1）、感染後8日目までに全頭死亡した。これにより、SC感染による豚サルモネラ症の下痢の病態を再現することができた。



図1 SC経口感染後1日目の肉眼写真：実験1黄色下痢を発症している

SC感染後1日目、3日目での直腸スワブ採取により、排菌量を調べたところ、感染後1日目からSCの排菌が確認できた。また、3日目の方が排菌量が多かった(図2)。SC感染後1日目、3日目で型別比較による排菌量に有意差はなかった。

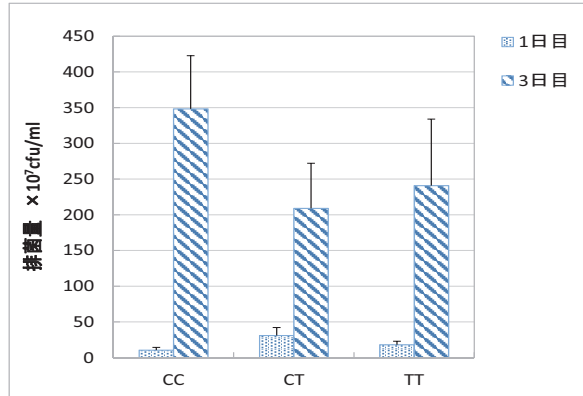


図2 SC経口感染後1日目、3日目の排菌量：実験1

1-2 病理組織学的検索

HE染色で肝臓に巣状壊死、免疫組織化学染色でその周囲に*Salmonella* O7抗原が検出された(図3)。全身の主要臓器でも*Salmonella* O7抗原が見られ(表1)、感染豚は敗血症を呈していたことが確認された。

1-3 生存日数の比較

死亡に至るまでの生存日数を型別に比較したところ、CC型が 3.71 ± 0.36 日^a、CT型が 5.50 ± 0.50 日^b、TT型が 4.00 ± 0.63 日^aで、CT型がCC型、TT型に対して有意な生存日数の延長(a vs b, $p < 0.01$)が認められた。また、感染後4日目の生存率はCT型では100%であったが、CC型およびTT型では16.7%であった(図4)。

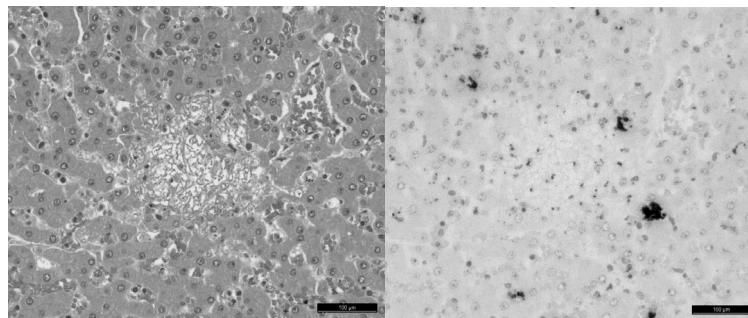


図3 肝臓の病理組織像：実験1

左：HE染色 (Bar=100μm)

右：免疫組織化学染色 (*Salmonella* O7 抗原) (Bar=100μm)

表1 主要臓器および腸管におけるSC抗原の検出状況：実験1

臓器名 処置 TLR5型	肝臓		胆嚢	肝リンパ節	脾臓	腎臓	副腎	心臓	肺左		肺右		気管	食道	胃	膵臓	十二指腸	空腸			回腸			盲腸	結腸直腸	腸間膜リンパ節(空腸)
	外側左葉	内側右葉				左	右		前葉前部	前葉後部	後葉	前葉	中葉	後葉				上部	中部	下部	上部	中部	下部			
非感染OT	-	-	-	NT	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	-	-	-	NT	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	-	-	-	NT	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	-	-	-	NT	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SC感染	CC	+	+	+++	+	+	-	+	+++	-	+	+	-	+	+	+	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
		+++	+++	+++	NT	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	NT	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
		+++	+++	+++	NT	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
		+++	+++	+++	NT	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	CT	+++	+++	+++	+	+++	+++	+++	+++	+	+	+	+	+	+	+	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
		+++	+++	+++	NT	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
		+++	+++	+++	NT	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
		+++	+++	+++	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	TT	+++	+++	+++	NT	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
		+++	+++	+++	NT	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
		++	+	+++	NT	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+++	+++	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
		++	+	+++	NT	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+++	+++	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++

Salmonella O7抗原：-：陽性なし、

+: 少数(+: 200倍以上の視野で抗原を検出できた検体)、

++: 中程度(++: 100倍の視野で容易に抗原を検出できた検体)、

+++ : 多数(+++: 40倍の視野で容易に抗原を検出できた検体)、

NT: 実施せず

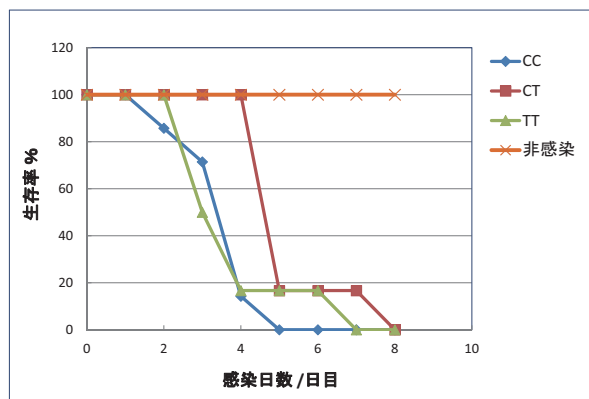


図4 SC経口感染後のTLR5遺伝子型別の生存率：実験1

2. 実験2

2-1 排菌量と生存日数の比較と病理組織学的検索

すべての豚がSC感染後1日目から黄色下痢を発症して、感染後5日目までに全頭死亡した。死亡に至るまでの型別の生存日数を比較したところ、CC型で 4.40 ± 0.40 日、CT型が 4.23 ± 0.20 日、TT型が 3.88 ± 0.43 日で、型別の有意差はなかった。感染後1、3日目の排菌量にも有意差はなかった(図5)。また、病理組織学的検索を行い、実験1と同様の結果を得た。

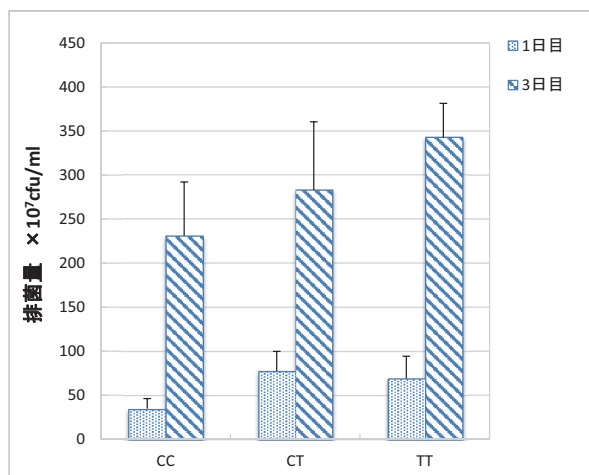


図5 SC経口感染後1日目、3日目の排菌量：実験2

2-2 HPCD子豚と離乳子豚の全血刺激時のIL-6応答

本試験の1週齢のHPCD子豚と、コンベンショナル条件下で同様の感染試験を行った6～7週齢の離乳子豚から、SC感染前に採血した全血を同条件下で刺激培養した。その上清のIL-6産生をELISA法を用いて調べた。

その結果、HPCD子豚ではflagellin刺激に対するIL-6応答がほとんど認められなかったが、コンベンショナル条件下の離乳子豚の血液ではflagellin刺激に対するIL-6応答が認められた(図6)。

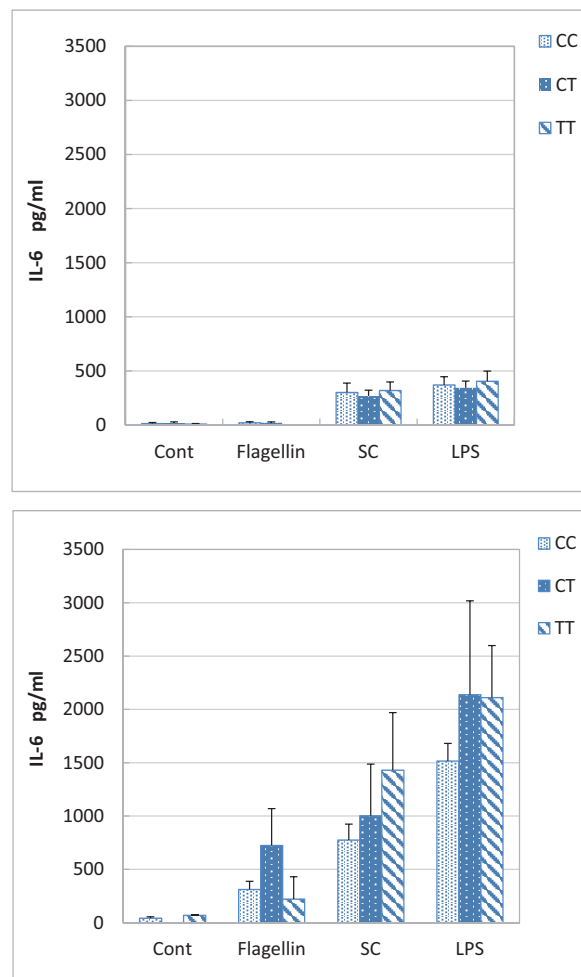


図6 SC感染前の全血を72時間刺激培養した後の培養上清中へのIL-6産生
上：HPCD子豚(1週齢)：実験2
下：コンベンショナル離乳子豚(6～7週齢)

考察

SC感染による豚サルモネラ症は日和見感染症であり、宿主の様々な要因(飼養環境の変化やストレス等)により発症するため、その病態の再現は困難である。

過去の報告では、Andersonら¹⁾によってコンベンショナル条件下で2週齢の離乳子豚に 10^8 cfu/頭のSC(*kunzendorf*株)の実験感染を行い、すべての実験感染豚の腸リンパ節から100%菌分離が認められたが、直腸スワブでは70%しか菌分離されていない。さらに 10^4 cfu/頭まで投与菌量を減らすと腸リンパ節感染率は10%となり、直腸スワブからの菌分離もなかった。こ

の報告では、全身の臓器からは菌分離されておらず、便からの SC 排菌量も個体差があり、排菌が見られない個体もあった。このことから、SC 感染による豚サルモネラ症の特徴である下痢や敗血症の病態を再現できているとはいえない。また、HPCD 子豚を用いた豚サルモネラ症の実験感染では、ST によるノトバイオーム感染の報告はあるが¹¹⁾、SC による HPCD 子豚への実験感染例の報告はこれまで存在しなかった。

今回の実験感染で SC 感染による豚サルモネラ症の病態モデルの再現ができた理由について、HPCD 条件で子豚を飼育したことが一番の要因であると考えられる。HPCD 子豚は、母豚の子宮切除によって取り出された豚だが、自然な分娩において生まれてくる豚は、産道を通ることで、母豚の細菌叢に触れ、腸内細菌を獲得する一つの機会となっている。産道を通らず、子宮切除により、直接アイソレーターへ移された HPCD 子豚は母豚の細菌叢と接触する機会を失うことで、腸内細菌叢の定着が妨げられている。

また、初乳が与えられていないことも重要な要素である。通常母豚より得られる初乳には、抗体やサイトカインが含まれているが、実験飼育期間中、無菌ミルクを与えることで、免疫未発達の状態が維持されている。

このように、SC 感染による豚サルモネラ症の病態モデルを再現するためには、極端に腸内細菌叢が少ない条件を維持させ、免疫未成熟状態を維持できる環境で実験感染を行うことが、非常に重要であるといえる。

本研究で用いた、HPCD 子豚への SC 経口感染では、下痢や敗血症を特徴とする SC 感染によるサルモネラ症の病態がよく再現でき（図 1 および表 1）、SC 感染による豚サルモネラ症の病態を *in vivo* レベルで解析するために、本実験系は有用であることが示された。我々の実験系では、 10^4 cfu/頭の SC 経口感染でも 100% の感染成立ができ、病態の再現もできたことから、本実験系ではより少ない菌量の経口投与による SC 感染で、豚サルモネラ症を再現した実験感染を行うことができるといえる。

Chang ら³⁾は SPF 条件下で 4 週齢の離乳子豚に対して、2 種類の乳酸菌とハーブの 1 種を経口摂取させた後、SC を 10^{10} cfu/頭で経口感染させた。その結果、乳酸菌とハーブを摂取させた感染豚では小腸からの菌分離数が有意に低下していることから、SC 感染に対する乳酸菌とハーブの有効性が評価できたと報告している。本試験で確立した HPCD 子豚を用いた SC 実験感

染モデルは、常在細菌叢を持たない子豚を使用することで、乳酸菌製剤等のプロバイオティクスなど、有用菌や有用物質単独の SC 感染防御効果をより明確に評価する病態モデルとして適当であると考えられる。

しかしながら、TLR5 SNP (C1205T) の影響においては、各遺伝子型間で SC 感染初期の排菌量の有意差はなく（図 2 および図 5）、生存日数の比較においても、実験 1 と 2 で再現性が得られなかった。

Shinkai ら¹⁰⁾は、*in vitro* で当該 TLR5 SNP の TT 型では flagellin や SC 認識を低下させるという成績を報告しており、我々が今回の実験感染とは別に実施したコンベンショナル条件下での離乳子豚を用いた SC 実験感染においても、SC 感染後の全血を今回と同様の方法で刺激した結果、TT 型では、flagellin 刺激に対する IL-6 産生等のサイトカイン応答が低下し、SC の排菌量は約 100 倍多くなることを確認している（投稿準備中）。

しかし、今回 HPCD 子豚を使った 2 回の実験感染では、病態モデルの再現はよくできたものの、当該 TLR5 SNP の SC 感染に対する影響について確かめることができなかった。Hayashi ら⁵⁾の報告によると、IL-6 は flagellin 刺激による TLR5 依存性の自然免疫応答をよく反映するサイトカインであることから、本研究で実施した HPCD 子豚の全血抗原刺激試験（図 6）において IL-6 応答が離乳子豚と比べ顕著に低かったことは、HPCD 子豚における TLR5 の発現の低さを示唆するものであり、各遺伝子型間で排菌量や菌投与後の生存日数に有意差が認められず、当該 TLR5 SNP の影響の検証がうまくいかなかった原因の 1 つとなったと考えられる。

一方で、このことは今回実施した 2 回の実験感染において、HPCD 子豚における IL-6 応答を含む自然免疫応答の弱さにつながり、少ない菌量（ 10^4 cfu/頭）の経口投与で本病態モデルの確立を成功させることができた要因となったと考えられる。

豚の TLR の発現については、これまでに初乳を与えていない 0 日齢の子豚の腸で TLR2、TLR9 の mRNA レベルでの発現が確認され、免疫組織染色でもタンパク質の発現が観察されている¹³⁾。5 週齢の離乳子豚では腸の mRNA レベルで TLR2、4 および 9 の発現が確認されている²⁾。また、8 週齢の離乳子豚で血液中の末梢血単核球を刺激培養した場合、TLR2、TLR4 の発現が特に高く、差異はあるものの、TLR1～10 すべての発現が確認されている¹⁴⁾。しかし、豚 TLR5 の発現レベ

ルに関する報告はこれまで存在せず、今後の解析が必要となり、HPCD 子豚に関しても TLR5 の発現の有無やその発現時期、発現誘導条件等について検討したいと考えている。

謝辞

本研究において、ご協力頂いた小林勝様、嶋田恵美様、安家望美様、安藤正視様、瀧麻美様、金森健太様、三好洋嗣様、清水春菜様、仙波裕信様に感謝いたします。また、本研究は農林水産省委託プロジェクト研究「DNA マーカー育種の高度化のための技術開発」AGB1001、1002により実施されました。

引用文献

- 1) Anderson RC, et al. (1998) Experimental and natural infection of early weaned pigs with *Salmonella* choleraesuis. Res Vet Sci, 64:261-262.
- 2) Burkey TE, et al. (2009) Expression of Toll-like Receptor 2, 4 and 9 gene transcript in the presence of lipopolysaccharide and *Salmonella enterica* serovars Typhimurium and Choleraesuis. Vet Immunol Immunopathol, 130:96-101.
- 3) Chang CH, et al. (2013) Application of *Scutellariae radix*, *Gardeniae fructus*, and Probiotics to prevent *Salmonella enterica* Serovar Choleraesuis infection in swine. Evid Based Complement Alternat Med, 2013:Article ID 568528, 8 pages.
- 4) Gray Jeffrey T, et al. (1995) Influence of inoculation route on the carrier state of *Salmonella* choleraesuis in swine. Vet Microbiol, 47:43-59.
- 5) Hayashi F, et al. (2001) The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. Nature, 410:1099-1103
- 6) 宗田吉広ら (2009) *Mycoplasma hyopneumoniae* 宿主認識分子の多型解析と豚マイコプラズマ肺炎抑制技術への応用. 日本マイコプラズマ学会雑誌, 36:52-55.
- 7) 鯨島俊哉 (2011) 豚のサルモネラ症. 見上彪監修 獣医微生物学 第3版, p72, 文永堂出版, 東京.
- 8) Shinkai H, et al. (2006) Biased distribution of single nucleotide polymorphisms (SNPs) in porcine Toll-like receptor 1 (TLR1), TLR2, TLR4, TLR5, and TLR6 genes. Immunogenetics, 58:324-330.
- 9) 新開浩樹ら (2008) ブタ抗病性育種のための Toll 様受容体遺伝子研究の現状. 動物遺伝育種研究, 36:63-70.
- 10) Shinkai H, et al. (2011) Porcine Toll-like receptors: Recognition of *Salmonella enterica* serovar Choleraesuis and influence of polymorphisms. Mol Immunol, 48:1114-1120.
- 11) Splachal I, et al. (2007) Susceptibility of germ-free pigs to challenge with protease mutants of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. Immunobiology, 212:577-582.
- 12) 末吉益雄 (2011) 豚のサルモネラ症. 明石博臣ら編 動物の感染症 第3版, p188-189, 近代出版, 東京.
- 13) Tohno M, et al. (2006) Toll-like receptor 2 and 9 are expressed and functional in gut-associated lymphoid tissues of presuckling newborn swine. Vet Res, 37:791-812.
- 14) Uddin MJ, et al. (2012) Expression dynamics of Toll-like receptors mRNA and cytokines in porcine peripheral blood mononuclear cells stimulated by bacterial lipopolysaccharide. Vet Immunol Immunopathol, 147:211-222.
- 15) West TE, et al. (2013) Impaired TLR5 functionality is associated with survival in melioidosis. J Immunol, 190:3373-3379.