

家畜における薬剤耐性問題と抗菌剤削減を目指した腸内細菌の
豚への利用法に関する研究

**Drug resistance in livestock and study on the utilization of intestinal
bacteria in pigs for the reduction of antimicrobial agents.**

2024年3月

貞弘 恵

Megumi Sadahiro

目次

第1章 緒言	1
第2章 家畜由来サルモネラの薬剤耐性の検証.....	6
第1節 牛サルモネラ症原因菌の性状解明	6
2.1.1. 背景および目的	6
2.1.2. 材料および方法	6
2.1.2.1. 発生農場	6
2.1.2.2. 病理解剖および組織学的検査.....	7
2.1.2.3. 細菌学的検査	7
2.1.2.4. 薬剤感受性試験	8
2.1.2.5. ESBL 遺伝子解析.....	8
2.1.3. 結果.....	9
2.1.3.1. 病理解剖および組織学的検査.....	9
2.1.3.2. 細菌学的検査	9
2.1.3.3. 薬剤感受性試験.....	10
2.1.3.4. ESBL 遺伝子解析.....	11
2.1.4. 考察.....	12
第2節 健康豚由来サルモネラの性状解明.....	13
2.2.1. 背景および目的	13

2.2.2. 材料および方法	14
2.2.2.1. 材 料	14
2.2.2.2. サルモネラ保菌調査	14
2.2.2.3. 追跡調査.....	14
2.2.2.4. 血清型別検査.....	14
2.2.2.5. 薬剤感受性試験	14
2.2.3. 結 果.....	15
2.2.3.1. サルモネラ保菌調査	15
2.2.3.2. 追跡調査.....	16
2.2.3.3. 血清型別検査.....	16
2.2.3.4. 薬剤感受性試験	17
2.2.4. 考 察.....	19
2.3. 小 括.....	21
第3章 豚離乳期の下痢症に関する検討.....	22
3.1. 背景および目的	22
3.2. 材料および方法	23
3.2.1. 対象農場	23
3.2.2. 材 料.....	23
3.2.3. <i>A. muciniphila</i> 16S rRNA 遺伝子の検出.....	23

3.2.4.	ふん便中のムチン濃度測定	24
3.2.5.	ふん便中の有機酸濃度測定	24
3.2.6.	統計処理	24
3.3.	結 果	24
3.3.1.	<i>A. muciniphila</i> 16S rRNA 遺伝子の検出	24
3.3.2.	ふん便中のムチン濃度測定	25
3.3.3.	ふん便中の有機酸濃度測定	25
3.4.	考 察	26
3.5.	小 括	27
第 4 章	豚離乳期の下痢症予防に関する腸内細菌の検討	29
4.1.	背景および目的	29
4.2.	材料および方法	29
4.2.1.	材 料	29
4.2.2.	ライブラリー調製と 16S アンプリコン解析	30
4.2.3.	配列データ解析	30
4.3.	結 果	31
4.4.	考 察	39
4.5.	小 括	43

第 5 章 総 括	44
第 6 章 要 約	47
謝 辞	52
参考文献	53

第1章 緒言

畜産は、家畜の健康を維持し、その持つ能力を十分に発揮させ、生産量を高めることが命題とされ取り組まれてきた。そのため、家畜の能力が遺伝・育種の技術によって高められるとともに、その能力を発揮させるべく飼養管理技術が高められてきた。しかし、家畜の健康を阻害する因子として大きく影響する疾病の防御は容易ではなく、栄養バランスの崩れに起因して病原体の感染による感染症や様々な疾病が発生する。その中でも感染症に対する対応は疾病を引き起こす病原体の排除や侵入抑制など予防衛生的な対応を整えることが重要と考えられる。これまで予防衛生の場面で利用されてきたのが、抗生物質や合成抗菌剤等（以後、抗菌剤とする）である。抗菌剤は、家畜の体内に侵入して疾病を誘発する細菌の死滅や増殖抑制により、動物の健康を守り、畜産物の安定生産を確保するうえで重要な資材であり、畜産業において欠かせないものである。古くは昭和36年（1961年）に制定された法律第145号（薬事法、現：医薬品医療機器等法）に定められ、感染症の治療目的で利用されてきた。さらに、1940~1950年代には低濃度の抗菌剤を飼料に添加して家畜に給与することで、飼料効率が上がり、単位飼料摂取量当たりの増体量が増えることが見出され[1-5]、治療目的としての利用に加え、家畜の成長促進を目的として活用されるようになった。このように畜産における抗菌剤の活用は高密度状態で経済動物を飼養する近代の家畜生産システムの発展を支えてきた。現在、畜産業における抗菌剤には、動物の治療のための動物用医薬品と動物の健全な発育のための飼料添加物がある。動物用医薬品として使用される抗菌剤は、医薬品医療機器等法によって、その品質、有効性、安全性等を確認した上で使用が認められている。また、同法に規定する要指示医薬品制度により、獣医師の診察に基づく指示による使用が義務付けられ、農林水産省省令により抗菌剤ごとに使用対象動物、用法、用量、使用禁止期間等が詳細に定められている。一方で飼料添加物として使用される抗菌剤は、飼料の安全性の確保及び品質の改善に関する法律によって必要性が高く効果が明らかで、かつ安全性の確認されたもののうちから必要最低限の範囲において指定する方針が示されている。

畜産分野における抗菌剤の使用量が増加するにつれて、薬剤耐性を有する細菌の出現や、生産物である畜産食品に対する残留問題（ポジティブリスト制度）などが注目されるようになった。特に薬剤耐性の問題は、耐性菌の出現と、それに対する

新たな抗菌剤の開発を交互に繰り返すようになっている。すなわち抗菌剤には、その使用により抵抗性を持つ薬剤耐性菌が選択されるリスクが常に存在し、抗菌剤の使用量と薬剤耐性率には相関が示されている[6].

2019年の日本の抗菌剤の販売量を図1-1に示す。原末換算量で総計1,803トン(100%)であり、そのうち動物用医薬品は841トン(47%)、飼料添加物が226トン(12%)、農薬が136トン(8%)である[7]。一方、人体用抗菌剤は600トン(33%)であり、動物には人体用の約2倍の抗菌剤が使用されていることがわかる。

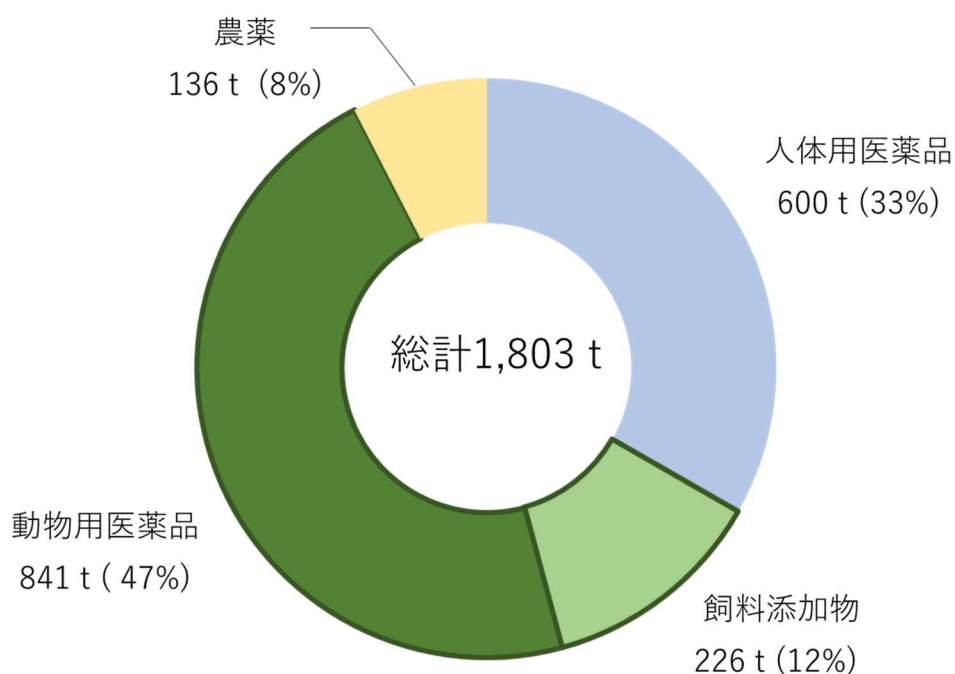


図1-1. 日本の抗菌剤販売量(2019年)

出典：厚生労働省薬剤耐性ワンヘルス動向調査検討会，(2022)薬剤耐性ワンヘルス動向調査年次報告書[7]を改変

これを動物種別の販売量で見ると、動物用医薬品としての抗菌剤841トンのうち、450トンが豚に使用され、養豚における抗菌剤の使用量が極めて高くなっていることが分かる(図1-2)[7].

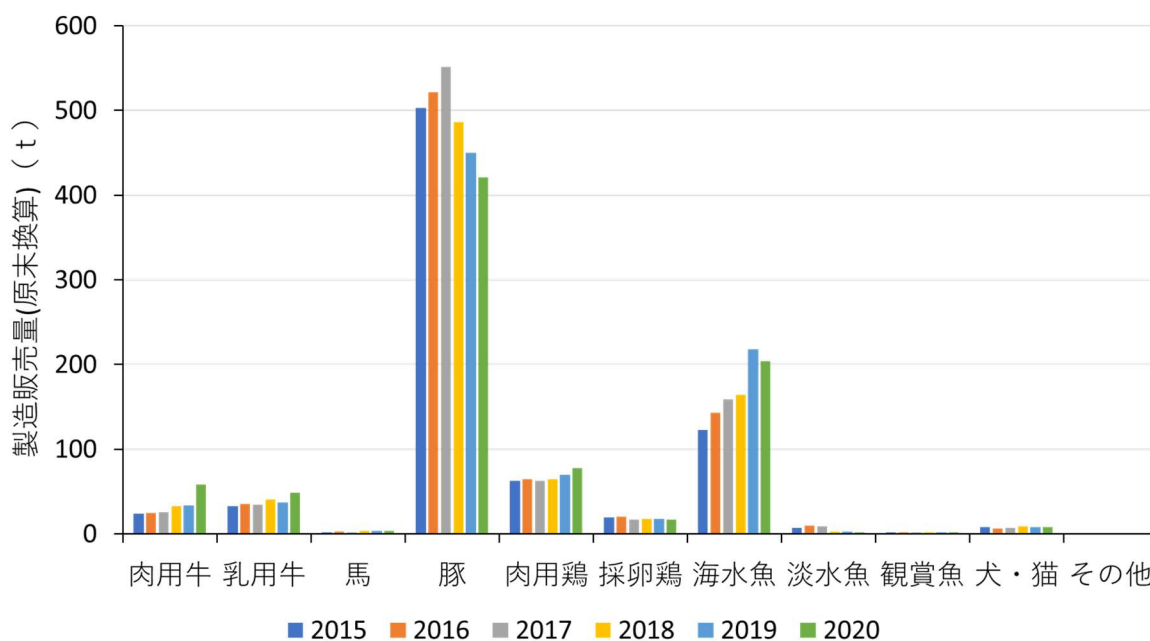


図 1-2. 動物種別の抗菌剤年間販売量（原末換算）

出典：厚生労働省薬剤耐性ワンヘルス動向調査検討会，（2022）薬剤耐性ワンヘルス動向調査年次報告書[7]を改変

養豚では治療を目的とする動物用医薬品としてテトラサイクリン系抗菌剤が大量に経口投与されており，その影響から系統別販売量においてもテトラサイクリン系抗菌剤が最も多くなっている [8]．養豚業におけるテトラサイクリン系抗菌剤の多用は豚における耐性菌の出現を促すことが懸念され，畜産現場における薬剤耐性菌の出現を注視する必要がある．さらに家畜体内で発生した薬剤耐性菌や家畜に使用した抗菌剤が土壌や河川，湖沼を汚染し，環境中に耐性遺伝子のプールが形成され，畜水産物や衛生昆虫等の接触を介して人に伝達されることが示唆されている[9, 10]．このように家畜における薬剤耐性菌は，獣医療における抗菌剤の有効性の低下のみならず，人医療における抗菌剤治療を困難にするリスクも懸念され，抗菌剤が普及し始めた 1940 年ごろから次々と検出されるようになり，その後急速に拡散していった[11]．そして 1993 年には，多剤耐性を持つ細菌に対しても効果があるカルバペネム系抗菌剤にも耐性を持つカルバペネム耐性腸内細菌が発見され[12]，今なお世界に拡散している．今後耐性菌に対する有効な対策をとらなければ，2050 年までに耐性菌を原因とする死亡者が 1000 万人となり，現在の死因の第一位であるガンを超えるとの試算が 2016

年に公表[13]されるなど、耐性菌への対応は国際的に喫緊の課題となっている。わが国でも2016年に「薬剤耐性（AMR）対策アクションプラン（2016–2020）」[14]が制定・公表された。このアクションプランでは、畜産の生産現場における感染予防・管理により抗菌剤の使用機会を削減するとともに、抗菌剤の適正な使用を推進している。さらに抗菌剤に頼らない家畜管理および畜産物生産を目標とする研究が励行され、成果の還元が求められている。抗菌剤に頼らない畜産物の生産体制を構築するためには、これまでの抗菌剤による治療や予防を前提とした飼養管理から、ワクチンや抗菌剤の代替薬剤や試薬あるいは飼料添加物の利用等による疾病予防を中心とした飼養管理への転換が必要となる。

疾病予防を考えるうえで、抗菌剤に依存せずに家畜自らの抵抗力を高めることが重要と考えられるようになってきた。人や家畜の健康維持には腸内細菌が深く関わっていることが広く知られている。近年、人の常在腸内細菌叢が炎症性腸疾患、代謝性疾患、アレルギー性疾患など様々な慢性疾患と密接に関係していることが次々と報告され[15–19]、腸内細菌叢が腸疾患だけでなく、全身性疾患にも関わるようになってきた。また畜産分野においても家畜の腸内細菌叢と生産性との関りが示され[20–23]、腸内細菌叢の改善が健康維持や生産性向上にも有効であり、ひいては抗菌剤の使用機会の削減に繋がるとされている。

腸内細菌の中で腸管の健康に関わる細菌として近年注目されているのが *Akkermansia muciniphila* である。本菌は *Verrucomicrobia* 門に属し、楕円形、非運動性、グラム陰性、嫌気性細菌で、腸管上皮細胞に近い粘液層に存在し、粘液の主成分であるムチンを分解する[24]。その一方で、ムチン代謝の過程で産生される短鎖脂肪酸（酢酸およびプロピオン酸）が腸管上皮細胞のエネルギー源となり、杯細胞の密度を増加させ、ムチンの産生を亢進し、腸管粘液層を肥厚させることが示されている[25, 26]。腸管の杯細胞から分泌されるムチンは高分子糖タンパク質で、腸管において二つの役割を果たしている。一つ目は物理的バリアの形成である。腸管上皮を覆う非特異的バリアを形成し、腸管上皮への物理的刺激や微生物感染を防ぐ役割を持つ[27]。二つ目は共生因子としての役割である。ムチンは高密度に糖鎖化されており小腸では難消化性であるが、大腸では腸内細菌の生息環境を提供すると同時に発酵基質としても利用され、腸内細菌と宿主との共生を支えている[27]。腸管粘液層に常在する細菌は病原微生物の定着や増殖を阻害することが知られており、腸管バリアを構成する重

要な因子として古くから注目されてきた[28]. *A. muciniphila* も腸管粘液層に生息し、ムチンを代謝する過程でオリゴ糖を産生し、腸管粘液層への細菌の定着および増殖を促進し、腸内細菌叢の形成を助けることで、病原性微生物の粘液層侵入を防ぐ可能性が示唆される[29]など、腸管の恒常性維持に重要な役割を果たすと考えられている。さらにマウスを対象とした実験では肥満防止やII型糖尿病改善などへの効果が明らかにされつつあり[26]、新しいプロバイオティクスの一つとして評価されている[30, 31]. *A. muciniphila* は広く脊椎動物の腸管内に存在し[32]、人やマウスで研究が進んでいるが、豚における機能は明らかにされていない。腸管内に元来生息する本菌は生物にとって安全性が高く、また、抗菌剤の使用量が最も多い豚[7]において *A. muciniphila* の機能を活用した疾病予防、とりわけ養豚現場で多発する下痢症予防への応用研究に取り組むことは抗菌剤使用量を削減する上で重要と考えられる。

本研究では以上の背景に基づき、第2章で家畜由来サルモネラの薬剤耐性検証として、第1節で牛サルモネラ症の症例から分離されたサルモネラ菌株について、その薬剤耐性を明らかにした。結果は2021年、畜産環境学会誌へ投稿し、19/20巻、p. 34～41に掲載された。第2節では、健康豚から分離されたサルモネラ菌株について、その薬剤耐性を明らかにした。結果は2022年、家畜衛生学雑誌、48巻、p. 65～72に掲載された。

第3章では、豚の下痢症に関し、下痢症が多発する農場と下痢発生が少ない農場のふん便中の乳酸量や短鎖脂肪酸量の測定、腸管ムチンの分泌量の比較、そして腸管ムチンの資化性を示す *A. muciniphila* に関して、その存在を比較検討した。結果は2023年、家畜衛生学雑誌、48巻、p. 177～180に掲載された。

第4章では、第3章の結果に加え下痢症が多発する農場と下痢発生が少ない農場の菌叢の特徴を明らかにし、豚の下痢症に関した *A. muciniphila* の機能を検討した。

以上の項目から畜産現場における薬剤耐性菌出現の実態を把握するとともに、その対策として豚における *A. muciniphila* の機能性の解明に取り組み、抗菌剤の使用削減を目指した腸内細菌の利用法を考えることを目的とした。

第2章 家畜由来サルモネラの薬剤耐性の検証

第1節 牛サルモネラ症原因菌の性状解明

2.1.1. 背景および目的

セファロスポリン系抗菌剤は、多くのグラム陰性菌に対して効果を発揮することから人医療において重要な抗菌剤であり、広く使用されている。獣医療においても、セファロスポリン系抗菌剤は第一選択薬の効果が認められなかった時の切り札として利用されており、その重要性が高まっている。セファロスポリン系抗菌剤の利用が高まるにつれて問題となるのが耐性菌の出現である。

セファロスポリン系抗菌剤に対する耐性機構で特に問題となっているのが、基質特異性拡張型 β ラクタマーゼ (ESBL: Extended-Spectrum β -Lactamase) による薬剤の不活化である。ESBL 遺伝子を保有するプラスミドが人や家畜に対して病原性の高い *Salmonella enterica* を含めた *Enterobacteriaceae* に水平伝達する危険性があることが報告されており [33]、家畜と人との間で伝播することが懸念されている。そこで静岡県内で発生した牛サルモネラ症症例から分離された菌株について、細菌学的性状を解明するとともに、薬剤耐性遺伝子の解析を行った。

2.1.2. 材料および方法

2.1.2.1. 発生農場

発生農場はフリーストール牛舎で乳用牛 310 頭を飼養する酪農場である。当該農場では、購入粗飼料、配合飼料におから等の食品残さを加えた自家製 TMR (Total Mixed Ration) を給与していた。またサルモネラ症ワクチンは接種しておらず、2012 年 12 月以降の牛の移出入はなかった。

2013 年 4 月初旬に分娩直後の成牛 3 頭に 40°C の発熱、食欲不振、水様性下痢および血便が確認され、4 月 9 日に 1 頭、同 14 日に 2 頭が相次いで死亡した。管理獣医師によるアンピシリン投薬も行われたが、4 月中旬、新たに 2 頭が同様の症状を呈したことから、2013 年 4 月 22 日に畜主および管理獣医師から病性鑑定の依頼に基づき次の検査を実施した。その後も下痢症状を示す牛は増加し、5 月中旬までに合計 6 頭が死亡した (表 2-1-1)。

表 2-1-1 下痢症状を呈した死亡牛の概要

No.	発症日	死亡日	発症月齢	主な症状
1	2013/4/2	2013/4/9	57	下痢、発熱
2	2013/4/2	2013/4/14	31	第四胃変位、下痢、発熱
3	2013/4/6	2013/4/14	45	ケトーシス、起立不能、下痢、発熱
4 (病性鑑定牛)	2013/4/14	2013/4/23	76	暗赤色水様性下痢、起立不能、発熱
5	2013/4/26	2013/5/7	79	下痢、発熱
6	2013/5/7	2013/5/14	66	食欲不振、下痢、発熱

2.1.2.2. 病理解剖および組織学的検査

水様性下痢，起立不能を呈し，死亡した牛（表 2-1-1，No.4）を解剖し，主要な臓器を採材した．病理組織学的検査として，ヘマトキシリン・エオジン（HE）染色を施した．また一部の組織標本について，サルモネラ O4 群抗血清（デンカ株式会社）を用いた免疫組織化学染色を実施した．

2.1.2.3. 細菌学的検査

解剖で採材した主要臓器および下痢発症牛，同居牛の直腸便について，5% 綿羊血液加トリプトソイ寒天培地，DHL（Deoxycholate Hydrogen sulfide lactose）寒天培地を用い，ガスパック法による CO₂ 培養（アネロパック・CO₂，三菱ガス化学）と 5% 綿羊血液加トリプトソイ寒天培地を用いたガスパック法による嫌気培養（アネロパック・ケンキ，三菱ガス化学）を実施した．さらに直腸便についてハーナーテトラチオン酸塩培地で 42°C，20 時間増菌培養後，DHL 寒天培地を用いた好気培養を実施した．生化学的性状検査を TSI 寒天培地（栄研化学），シモンズクエン酸ナトリウム培地（栄研化学），SIM 培地（栄研化学），リジン脱炭酸試験用培地（栄研化学）にて実施した．サルモネラ免疫血清「生研」（デンカ）にて血清型別を実施するとともに，同定のため *Salmonella* serovar Typhimurium (ST) Identification Kit（タカラバイオ）を用いて PCR を実施した．さらに，サルモネラの 2 相 H 抗原遺伝子 (*fljB*) を検出する PCR[34]を行った．

2.1.2.4. 薬剤感受性試験

分離株の薬剤感受性試験は、薬剤感受性用ディスク（センシディスク，日本 BD）を用い、一濃度ディスク拡散法により実施した。供試薬剤はアンピシリン(ABPC)、セファゾリン(CEZ)、セフォキシチン(CFX)、セフォタキシム(CTX)、セフトジジム(CAZ)、セフェピム (CFPM)、セフピロム(CPR)、クロラムフェニコール (CP)、テトラサイクリン(TC)、カナマイシン(KM)、ゲンタマイシン(GM)、ナリジクス酸(NA)およびシプロフロキサシン(CPFX)の 13 薬剤である (表 2-1-2)。さらに ESBL 産生性を確認するため Double Disc Synergy Test[35]および P/Case Test (日水製薬) を実施した。

表 2-1-2 供試薬剤一覧

系統名		抗菌剤名	略称
ペニシリン系		アンピシリン	ABPC
セフェム系	第1世代	セファゾリン	CEZ
	第2世代	セフォキシチン	CFX
	第3世代	セフォタキシム	CTX
		セフトジジム	CAZ
	第4世代	セフェピム	CFPM
		セフピロム	CPR
クロラムフェニコール系		クロラムフェニコール	CP
テトラサイクリン系		テトラサイクリン	TC
アミノグリコシド系		カナマイシン	KM
		ゲンタマイシン	GM
		ナリジクス酸	NA
キノロン系		シプロフロキサシン	CPFX

2.1.2.5. ESBL 遺伝子解析

β ラクタマーゼ遺伝子型を決定するために、Akiba らの報告 [36] にあるプライマーを用いて、報告に従い PCR を行った。増幅した β -ラクタマーゼ遺伝子について、ダイレクトシーケンス法で塩基配列を決定した後、Basic Local Alignment Search Tool[37] (BLAST: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) を用いて相同性検索を行い、 β -ラクタマーゼ遺伝子型を決定した。さらに、分離株におけるプラスミドの存在ならびに β -ラクタマーゼ遺伝子の存在位置を確認するため、Shahada らの報告[38]に従い、S1ヌクレアーゼ (タカラバイオ) で消化し、パルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) 後、サザンブロット解析を行った。PFGE の条件は、電圧 6 V/cm、パルス時間 5~50 秒、泳動時間 20 時間とした。加えて、ゲノム DNA を認識配列が長い

エンドヌクレアーゼである I-CeuI(New England BioLabs)で消化し、泳動した PFGE 像を用いて同様に解析した。PFGE の条件は、電圧 6 V/cm, パルスタイム 5~20 秒および 20~70 秒, 泳動時間 8 時間および 12 時間とした。

2.1.3. 結果

2.1.3.1. 病理解剖および組織学的検査

解剖では、主要臓器は全体的に煮肉様で、腸管粘膜からの出血が顕著に認められ、第四胃には潰瘍が認められた。組織学的に第四胃では、粘膜上皮の剥離、粘膜固有層から粘膜下組織に至る炎症細胞浸潤、出血が認められた。子宮では粘膜上皮における細菌を伴う炎症細胞浸潤内膜炎が認められた。サルモネラ O4 群抗血清を用いた免疫組織化学染色では回腸、盲腸、腸間膜リンパ節、第四胃 (図 2-1-1A) および子宮 (図 2-1-1B) でサルモネラ O4 群の陽性反応が認められた。

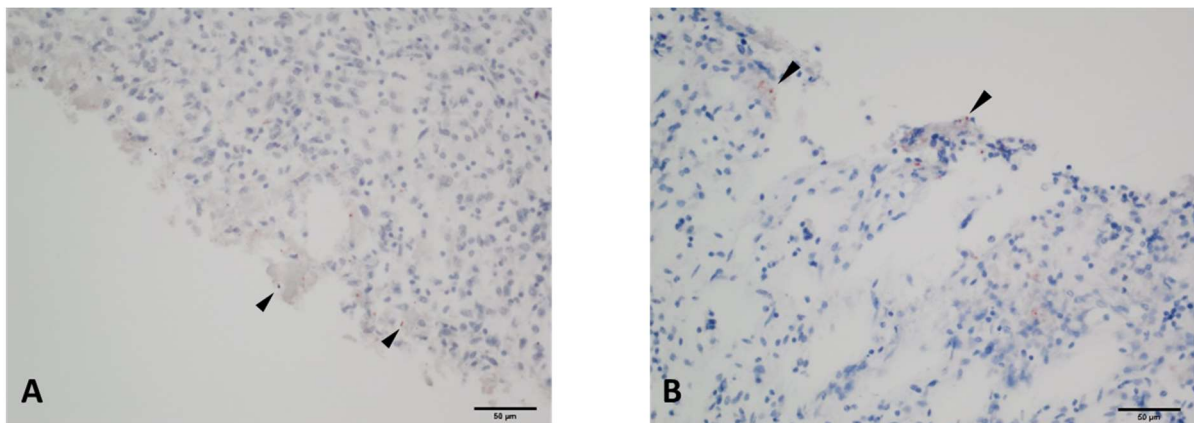


図 2-1-1 解剖牛の病理組織所見

第四胃 (A)、子宮 (B) において *Salmonella* O4 群に対する陽性反応 (矢頭) が認められた。(*Salmonella* O4 群抗血清による免疫組織化学的染色 Bars = 50 μ m)

2.1.3.2. 細菌学的検査

解剖牛の腸間膜リンパ節、盲腸内容、結腸内容および子宮内容、さらに下痢発症牛の直腸便から *Salmonella* spp. が分離された。血清型別の結果、サルモネラの抗原構造は 4 : i : - と判定された。確認のために実施した ST 同定 PCR では、サルモネラが共通に保有する遺伝子 (*invA*: 605 bp) および ST が特異的に保有する遺伝子 (94 bp,

196 bp, 303 bp) が検出されたが (図 2-1-2A), *fljB* 遺伝子 (394 bp) は検出されなかった (図 2-1-2B).

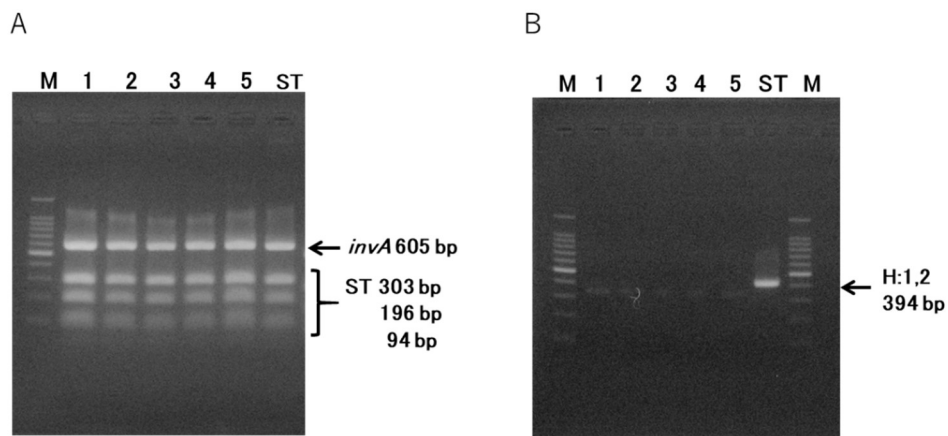


図 2-1-2 サルモネラ血清型別 PCR 結果

A : *S. Typhimurium* 同定 PCR B : *fljB* (第 2 相 H 遺伝子) PCR

1~5 : 被検菌, ST : *Salmonella Typhimurium*, M : 100 bp マーカー (タカラバイオ)

2.1.3.3. 薬剤感受性試験

分離株は, キノロン系, 第 2 世代セフェム系 (セファマイシン系) には感受性を示したが, ABPC, CEZ に加え, 第 3, 第 4 世代セフェム系の CTX, CFPM および CPR に耐性を示した (表 2-1-3). さらに CP, TC および GM にも耐性を示し, 供試した 13 薬剤のうち 8 薬剤に耐性を示した.

表 2-1-3 薬剤感受性試験結果

	ABPC	CEZ	CFX	CTX	CAZ	CFPM	CPR	CP	TC	KM	GM	NA	CPFX
病性鑑定 牛由来株	R	R	S	R	I	R	R	R	R	I	R	S	I
同居牛 由来株	R	R	S	R	I	R	R	R	R	I	R	S	I

R : 耐性、I : 中間、S : 感性

Double Disc Synergy Test では, 供試した 4 薬剤 (CTX, CAZ, CFPM および CPR) で, いずれも阻止帯が形成され, β ラクタマーゼ阻害剤であるクラブラン酸による阻

害効果が認められた（データ未記載）。これに加え P/Case Test によりペニシリナーゼ陽性，セファロスポリナーゼ陰性であったことから，ESBL 産生菌と判定された。

2.1.3.4. ESBL 遺伝子解析

本菌の ESBL の遺伝子型はその配列から *bla*_{CTX-M-55} と判定された。また，S1-PFGE ではプラスミドのバンドは認められず，その後のサザンブロット解析で染色体由来フラグメントに *bla*_{CTX-M-55} プローブのシグナルが認められた。I-CeuI-PFGE 後のサザンブロット解析においても染色体由来のフラグメントに *bla*_{CTX-M-55} プローブのシグナルが認められた(図 2-1-3)。以上の結果から *bla*_{CTX-M-55} が染色体上に存在することが明らかとなった。

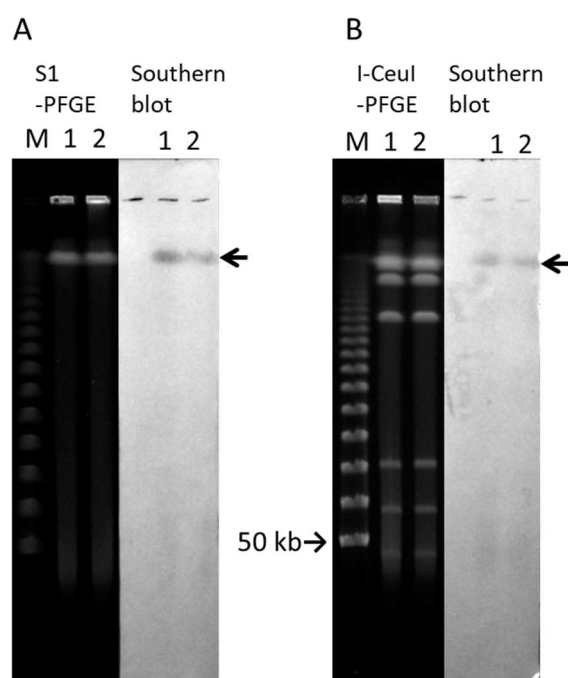


図 2-1-3 β -ラクタマーゼ遺伝子に関するサザンブロット解析

A : S1ヌクレアーゼ処理，B : I-Ceu I 処理

M : ラムダラダーマーカー，レーン 1 : 病性鑑定牛分離株，レーン 2 : 同居牛分離株。

いずれも左側は PFGE 像，右側はサザンブロット。矢印はサザンブロットで検出されたバンド位置を示す。

2.1.4. 考 察

今回の症例から分離されたサルモネラ *S.* 4:i:-は ST の 2 相鞭毛抗原が発現しない変異株であり、その病原性は ST と同等であることから、2018 年 4 月 1 日より、本菌も届出伝染病として扱うことになった[39]。 *S.* 4:i:-は人や家畜のサルモネラ症の原因菌として増加傾向にあり、わが国における牛サルモネラ症の約 10%は本菌が原因で発生している[40]。また乳用牛、肉用牛ともに本菌の分離頻度が 2012 年以降に増加しており[40]、静岡県においても、全国の流行と一致して *S.* 4:i:-が侵入していたことが明らかとなった。

今回の症例から分離されたサルモネラは、ESBL を産生し、第 3, 4 世代セファロスポリンを含む複数の抗菌剤に耐性を示す多剤耐性菌であった。ESBL 遺伝子は CTX-M-55 型で、染色体上に存在していた。セファロスポリン系抗菌剤の使用頻度が高い人医療では、ESBL 遺伝子の中でも特に CTX-M 型が流行しており[41, 42]、大きな問題となっているが、近年、家畜を含む動物からの分離報告も増えている[43, 44]。さらに、CTX-M 型遺伝子は伝達性のあるプラスミド上に存在することが一般的であり[45, 46]、耐性遺伝子を保有するプラスミドが *Salmonella enterica* を含めた *Enterobacteriaceae* に伝達する危険性があることが報告されている[33]。今回の症例で分離されたサルモネラは *bla*_{CTX-M-55} を染色体上に保有していたことから、何らかの形でプラスミドから染色体へ転移したものと推測された。本菌は薬剤耐性遺伝子を染色体に保有していることから、プラスミド性の薬剤耐性遺伝子と比較して伝達性は低いものの、耐性株として安定していることが示唆された。今回の症例は 2013 年に発生したものであるが、2019 年に Zhang らが中国において *bla*_{CTX-M-55} 遺伝子を染色体上に持つサルモネラの出現と流行を報告しており[47]、その動向について今後も注視していく必要がある。

セファロスポリン系抗菌剤は人医療において多用されている抗菌剤の一つであり、特に第 3, 4 世代セファロスポリンは小児サルモネラ症の主要な治療薬である。それらに耐性を示すサルモネラが家畜から分離されたことから、公衆衛生上、特段の注意を払う必要があると考えられた。

第2節 健康豚由来サルモネラの性状解明

2.2.1. 背景および目的

抗菌剤は、人医療だけでなく獣医療においても感染症の治療に重要な役割を果たしている。しかし、その使用により薬剤耐性菌が選択される可能性が常に存在することを見逃すことはできない。家畜由来耐性菌の問題として、家畜衛生上では獣医療における抗菌剤の有効性の低下があげられる[48-51]。公衆衛生上の問題としては、家畜への抗菌性物質の使用により選択された薬剤耐性菌が食品や環境を通じて、あるいは直接、人に伝達される可能性が指摘されている[9, 10]。人に伝達された薬剤耐性菌が感染症を引き起こした場合、抗菌性物質による治療に影響を与える可能性がある。そのため、1999年から動物医薬品検査所を中心にわが国の動物由来耐性菌のモニタリング調査が行われており、JVARM (Japanese Veterinary Antimicrobial Resistance Monitoring System) として現在国内外に広く認知されている。

わが国では家畜に使用されている抗菌剤のうち養豚における使用量が極めて高くなっている(図1-2)[7, 52]。JVARMの報告を見ると、最も多用されているテトラサイクリン系抗菌剤に耐性を示す家畜由来大腸菌は、2017年では肉用牛で21%であるのに対し、肉用鶏で46%、豚では55.4%と高く、豚における腸内細菌の薬剤耐性獲得状況およびその推移を把握することが重要と言える。

さらに近年、腸内細菌の中でもサルモネラ (*Salmonella*) の多剤耐性化が家畜診療および公衆衛生上の問題となっている[53]。特に豚はサルモネラに感染しても常に臨床症状を示すとは限らず、無症状の保菌豚となり、長期間にわたり排菌する[54]ことから、と畜時に直接的、またはと畜場環境を介して間接的に食肉を汚染する可能性が指摘されている[55]。サルモネラに汚染された豚肉および豚肉製品は人のサルモネラ症の原因となり得ることから公衆衛生上も重要な疾病である。

そこで、と畜場に搬入された健康豚の盲腸内容物を用い、サルモネラ保菌状況を把握するとともに、サルモネラ陽性農場の追跡調査を実施し、分離菌の血清型および薬剤耐性の変化を調査した。

2.2.2. 材料および方法

2.2.2.1. 材 料

2005年7月～2006年3月に、群馬県内のと畜場に搬入された48農場、595頭の外見上健康で、と畜後の内臓検査で異常が認められなかった個体を対象に盲腸内容物を採取し次の2つの調査に供した。

2.2.2.2. サルモネラ保菌調査

48農場471頭から採取した盲腸内容物約1gをハーナ・テトラチオン酸塩培地（栄研化学）15mlに接種し、37℃で18時間増菌培養後、DHL寒天培地（栄研化学）とブリリアントグリーン寒天培地（栄研化学）各1枚に塗抹し、37℃、24時間培養した。各分離培地上でサルモネラ属菌を疑うコロニーを1頭あたり8個程度釣菌した。サルモネラの同定にはTSI寒天培地（栄研化学）、SIM培地（栄研化学）、シモンズクエン酸塩寒天培地（栄研化学）による鑑別検査、チトクローム・オキシダーゼ試験（チトクローム・オキシダーゼ試験用ろ紙；日水製薬）、VP反応（VP半流動培地；栄研化学）、マロン酸利用能（マロン酸塩培地；栄研化学）、リシン脱炭酸試験（リシン脱炭酸試験用培地；栄研化学）による性状検査を実施した。

2.2.2.3. 追跡調査

保菌調査の7か月後に実施した追跡調査では、保菌調査でサルモネラが検出された16農場（農場A～P）のうち、2006年3月に盲腸内容物を採取できた13農場（農場A～M）を対象に、保菌調査と同様に再度サルモネラの分離、血清型別を実施した。各農場8～10頭を採材し、合計124頭について検査した。

2.2.2.4. 血清型別検査

サルモネラと同定された株はすべてKauffmann-Whiteの抗原構造に基づく抗血清（Difco Laboratories）を用いて、菌体（O）抗原、鞭毛（H）抗原のI相とII相の凝集反応を行い、血清型を同定した。

2.2.2.5. 薬剤感受性試験

保菌調査および追跡調査で分離されたサルモネラについて、CLSIの定める寒天平

板希釈法で最小発育阻止濃度（MIC）を測定した。ブレイクポイントは CLSI ガイドライン[56]および Asai らの報告[57]で規定している値を引用した。供試薬剤はアンピシリン（ABPC）、セファゾリン（CEZ）、ジヒドロストレプトマイシン（DSM）、カナマイシン（KM）、ゲンタマイシン（GM）、オキシテトラサイクリン（OTC）、コリスチン（CL）、クロラムフェニコール（CP）、ナリジクス酸（NA）、オフロキサシン（OFLX）、スルファジメトキシシン（SDMX）の 11 剤を使用した（表 2-1-2）。精度管理株として *Escherichia coli* ATCC 25922 を用いた。

2.2.3. 結 果

2.2.3.1. サルモネラ保菌調査

保菌調査における農場ごとのサルモネラ検出状況および分離血清型を表 2-2-1 に示した。48 農場中 16 農場（33.3%）、471 頭中 31 頭（6.6%）からサルモネラが検出された。16 農場中 13 農場で 2 頭以下（10～22.2%）の豚から検出された一方、4 頭、5 頭（40～50%）と高頻度に検出された農場も存在した。続いてサルモネラが検出された 13 農場について追跡調査を実施した。

表 2-2-1 保菌調査における農場ごとのサルモネラ検出状況

農場	検査頭数	サルモネラ検出頭数	検出率(%)
A	10	1	10.0
B	10	1	10.0
C	10	2	20.0
D	9	2	22.2
E	9	1	11.1
F	10	2	20.0
G	10	4	40.0
H	10	5	50.0
I	10	2	20.0
J	10	1	10.0
K	10	3	30.0
L	10	1	10.0
M	10	2	20.0
N	10	2	20.0
O	9	1	11.1
P	10	1	10.0
他32農場	314	0	0
計48農場	471	31	6.6

2.2.3.2. 追跡調査

追跡調査における農場毎のサルモネラ検出状況および分離血清型を表 2-2-2 に示した。調査した 13 農場中 5 農場 (38.5%), 124 頭中 15 頭 (12.1%) からサルモネラが分離された。

表 2-2-2 追跡調査における農場ごとのサルモネラ検出状況

農場	検査頭数	サルモネラ 検出頭数	追跡調査 検出率(%)	保菌調査 検出率(%)
A	10	0		10.0
B	10	3	30.0	10.0
C	10	2	20.0	20.0
D	9	0		22.2
E	10	0		11.1
F	10	4	40.0	20.0
G	9	3	33.3	40.0
H	10	0		50.0
I	10	0		20.0
J	9	0		10.0
K	10	0		30.0
L	8	3	37.5	10.0
M	9	0		20.0
計13農場	124	15	12.1	6.6

2.2.3.3. 血清型別検査

サルモネラの保菌調査および追跡調査の分離サルモネラの血清型と分離頻度を表 2-2-3 にまとめた。両調査とも最も多く検出された血清型は Typhimurium であった。保菌調査では Typhimurium, Give, Derby, Salinatis, および Schwarzengrund の 5 種類の血清型が検出されたのに対し、追跡調査で検出されたのはいずれも Typhimurium の 1 種類であった。

表 2-2-3 分離サルモネラの血清型と分離頻度

血清型	保菌調査		追跡調査	
	菌株数 (%)	検出農場数	菌株数 (%)	検出農場数
Typhimurium	23 (63.9)	14	16 (100)	5
Give	8 (22.2)	4		
Derby	3 (8.3)	3		
Salinatis	1 (2.8)	1		
Schwarzengrund	1 (2.8)	1		
計	36	23	16	5

2.2.3.4. 薬剤感受性試験

分離された 52 株のサルモネラの各種薬剤の MIC 分布と耐性率を表 2-2-4 に示した。各薬剤の耐性率は ABPC, DSM および CP は 65.4%, OTC は 78.8%, NA は 5.8%, SDMX は 90.4%であった。CEZ, KM, GM, CL および OFLX に対してはすべての菌株が感受性を示した。

表 2-2-4 分離サルモネラ 52 株の薬剤感受性

	MIC範囲	MIC ₅₀	MIC ₉₀	ブレイクポイント	耐性株数	耐性率(%)
ABPC	1 - >128	>128	>128	32 ¹⁾	34	65.4
CEZ	1 - 8	2	4	32 ¹⁾	0	0
DSM	4 - >128	64	>128	32 ¹⁾	34	65.4
KM	2 - 4	2	2	64 ¹⁾	0	0
GM	0.125 - 0.5	0.25	0.5	16 ¹⁾	0	0
OTC	1 - >64	>64	> 64	16 ¹⁾	41	78.8
CL	0.25 - 1	0.5	0.5	16 ¹⁾	0	0
CP	4 - >128	>128	>128	32 ¹⁾	34	65.4
NA	2 - >256	4	4	32 ¹⁾	3	5.8
OFLX	0.06 - 1	0.06	0.125	2 ¹⁾	0	0
SDMX	128 - >2048	>2048	>2048	512 ²⁾	47	90.4

1) Asai らの報告を引用 [57], 2) CLSI ガイドライン引用 [56]

保菌調査および追跡調査の農場別分離サルモネラの血清型と薬剤耐性型を表 2-2-5 に示した。供試した 52 株はすべて 1 薬剤以上に耐性を示した。血清型別の薬剤耐性型を見ると、保菌調査で分離された *S. Typhimurium* 23 株のうち 21 株は ABPC, CP, DSM, OTC および SDMX の 5 剤に耐性を示し、残り 2 株はさらに NA を加えた 6 剤に対して耐性を示した。*S. Derby* の 3 株中 2 株は SDMX 単剤に耐性、1 株が OTC と SDMX の 2 剤に耐性であった。*S. Give* 8 株、*S. Salinatis* 1 株はそれぞれ SDMX 単剤に耐性を示した。*S. Schwarzengrund* は OTC, SDMX および NA の 3 薬剤に耐性を示した。追跡調査では *S. Typhimurium* 16 株中、11 株が ABPC, CP, DSM, OTC, SDMX の 5 薬剤に耐性を示し、5 株が OTC 単剤に耐性を示した。

サルモネラが検出された 16 農場のうち、14 農場から 5 剤もしくは 6 剤に耐性の *S. Typhimurium* が検出された。また、追跡調査を行った 13 農場のうち 5 農場で再びサルモネラが検出され、その耐性型を比較すると 4 農場（農場 B, C, G および L）で保菌調査と同じ ABPC, CP, DSM, SDMX および OTC の 5 薬剤に耐性の *S. Typhimurium* が再び検出され、2 農場（農場 F, G）で OTC 単剤耐性を示す *S. Typhimurium* が新たに分離された。

表 2-2-5 農場別分離サルモネラの血清型と薬剤耐性型

農場	保菌調査			追跡調査				
	血清型	耐性型	菌株数	個体数	血清型	耐性型	菌株数	個体数
A	Typhimurium	(ABPC,CP,DSM,OTC,SDMX)	1	1				
B	Typhimurium	(ABPC,CP,DSM,OTC,SDMX)	1	1	Typhimurium	(ABPC,CP,DSM,OTC,SDMX)	3	3
C	Typhimurium	(ABPC,CP,DSM,OTC,SDMX)	2	2	Typhimurium	(ABPC,CP,DSM,OTC,SDMX)	2	2
D	Typhimurium	(ABPC,CP,DSM,OTC,SDMX)	2	2				
E	Typhimurium	(ABPC,CP,DSM,OTC,SDMX)	1	1				
F	Typhimurium	(ABPC,CP,DSM,OTC,SDMX)	2	2	Typhimurium	(OTC)	4	4
G	Typhimurium	(ABPC,CP,DSM,OTC,SDMX)	3	3	Typhimurium	(ABPC,CP,DSM,OTC,SDMX)	2	2
	Typhimurium	(ABPC,CP,DSM,OTC,SDMX)	1	1	Typhimurium	(ABPC,CP,DSM,OTC,SDMX)	1	1
H	Give	(SDMX)	1	1	Typhimurium	(OTC)	1	1
	Give	(SDMX)	4	4				
I	Typhimurium	(ABPC,CP,DSM,OTC,SDMX)	1	1				
	Give	(SDMX)	1	1				
J	Give	(SDMX)	1	1				
K	Typhimurium	(ABPC,CP,DSM,OTC,SDMX)	2	2				
	Typhimurium	(ABPC,CP,DSM,OTC,SDMX)	1	1				
	Derby	(SDMX)	1	1				
L	Typhimurium	(ABPC,CP,DSM,OTC,SDMX)	1	1	Typhimurium	(ABPC,CP,DSM,OTC,SDMX)	3	3
	Derby	(OTC,SDMX)	1	1				
M	Typhimurium	(ABPC,CP,DSM,OTC,SDMX)	1	1				
	Derby	(SDMX)	1	1				
	Salinatis	(SDMX)	1	1				
N	Typhimurium	(ABPC,CP,DSM,OTC,SDMX,NA)	2	2	-	-	-	-
O	Typhimurium	(ABPC,CP,DSM,OTC,SDMX)	1	1	-	-	-	-
P	Schwarzengrund	(OTC,SDMX,NA)	1	1	-	-	-	-
計			36	31			16	15

2.2.4. 考 察

国内の豚を対象としたサルモネラの個体検出率についてはこれまで多くの報告がある[58-61]. 吉田ら[61]は盲腸内容物を用いた調査で 1970 年代後半では 23.1%, 1980 年代後半では 5.7%の検出率を, Futagawa-Saito ら[58]はふん便を用いた調査で 1998~1999 年に 2.2%, 2004~2005 年に 3.3%の検出率をそれぞれ報告している. その後, 2005 年の報告では, 7.3%であったことが報告され[60], 同時期にあたる本調査の検出率 6.6%とほぼ同様の傾向が認められた. 本調査以降の検出率の推移を見ると,「農林水産省の食品安全に関する有害微生物の実態調査結果集」[62]では, 2010~2013 年の保菌率を 0~4%と公表しており, 佐藤らは 2018~2019 年に 5.2%の検出率を報告している[59]. 以上のように, わが国におけるサルモネラの検出率は 1980 年代後半から急激に低下したものの, 依然として数%程度の豚が保菌していると考えられた.

今回の調査農場での検出率は 33.3%で, 調査した農場の 1/3 でサルモネラが検出された. 前述の農林水産省調査結果は 2010~2013 年の農場保菌率を 0~24%と公表されており, また同省の「監視伝染病発生年報」[63]においても 2022 年に全国で 76 戸の農場での豚サルモネラ症の発生が報告されていることから, 国内の養豚場が未だに広くサルモネラに汚染されていることがうかがえる. また, 農場ごとの検出率は 20%程度の散発的な保菌が多くを占めたが, 中には 40~50%の割合で検出される農場もあり, 農場によって農場内の汚染の広がりには違いがあることが明らかとなった.

本調査にて分離されたサルモネラの血清型は, Typhimurium, Give, Derby, Salinatis, および Schwarzengrund の 5 血清型であり, 最も分離頻度が高かったのが Typhimurium であった. 前述の農林水産省調査結果でも, Typhimurium の分離頻度が最も高く, 次いで Derby と公表しており, 同様の傾向が認められた.

分離された *S. Typhimurium* の大半は ABPC, CP, DSM, SDMX, および OTC の 5 薬剤に耐性を示す多剤耐性株 (ACSSuT) であった. わが国では多剤耐性 (ACSSuT) を示す *S. Typhimurium* フェージタイプ DT104 (以下, ST-DT104 とする) が 1980 年代後半に侵入し, 1990 年から家畜で分離され始め, その後国内に広く分布したことが知られている[64]. Esaki らは 1999 年~2001 年には家畜より分離された *S. Typhimurium* の半数が ST-DT104 であったと報告している[65]. 本研究では, ST-DT104 を識別する PCR は実施していないが, 分離株の耐性パターンが ST-DT104

のそれと一致することから、2005年から2006年にかけて分離された *S. Typhimurium* は ST-DT104 である可能性が高いと推測された。

保菌調査でサルモネラが分離された 13 農場を追跡調査した結果、5 農場で再びサルモネラが分離された。そのうち 4 農場から保菌調査と同じ ABPC, CP, DSM, SDMX および OTC の 5 薬剤に耐性を示す *S. Typhimurium* (ACSSuT) が分離された。養豚場では肥育豚は出生から約半年で出荷され、次々と入れ替わっているにもかかわらず同じ耐性型の *S. Typhimurium* が分離されたことから、検出された 4 農場では 5 剤耐性 *S. Typhimurium* が母豚による保菌や農場環境への残存により農場内に常在化し、豚への感染が持続していたことが推察された。

追跡調査では、複数農場から、保菌調査では検出されなかった OTC 単剤耐性 *S. Typhimurium* が新たに分離された。国内の多くの養豚場では呼吸器病や腸管感染症の治療薬としてテトラサイクリン系抗菌剤を飼料に添加し継続的に投与しており、腸管内の細菌は長期間にわたり抗菌剤にさらされ、選択圧がかかっていると言える。今回の調査農場における薬剤使用状況は不明であるが、全国的な薬剤の使用状況からテトラサイクリン系抗菌剤の長期使用により、OTC を含む 5 薬剤に耐性を示す多剤耐性 *S. Typhimurium* と OTC 単剤耐性 *S. Typhimurium* が選択され、分離されてきた可能性がある。

「動物用医薬品等販売高年報」(農林水産省動物医薬品検査所)によると、令和 2 年(2020 年)の豚における抗菌剤の推定販売数量は、本調査を実施した当時から大きく減少している。しかし他の家畜と比較して豚における抗菌剤使用量は未だ多く、テトラサイクリン系抗菌剤(経口投与剤)を多用する傾向は変わらない。本調査において、農場での抗菌剤使用により特定の株が選択された可能性が示されたように、畜産農場では抗菌剤の使用は耐性菌を選択することを念頭に置き、今後も責任ある抗菌剤の慎重使用を継続するとともに、抗菌剤に頼らない疾病対策に取り組んでいくことが求められる。

2.3. 小 括

第 2 章 家畜由来サルモネラの薬剤耐性検証

本章では、病畜および健康畜から分離されたサルモネラの薬剤耐性に関する性状について調査し、以下のことが明らかとなった。

第 1 節 牛サルモネラ症原因菌の性状解明

静岡県で発生した成牛のサルモネラ症症例から分離されたサルモネラの薬剤耐性に関する性状を調査した。分離株は *Salmonella enterica* 血清型 4:i:- であり、基質特異性拡張型 β -ラクタマーゼ遺伝子 *bla*_{CTX-M-55} を染色体上に保有することが確認された。セファロスポリン系抗菌剤は人医療において多用されている抗菌剤の一つであり、特に第 3, 4 世代セファロスポリンは小児サルモネラ症の主要な治療薬である。それらに耐性を示すサルモネラが家畜から分離されたことから、公衆衛生上、特段の注意を払う必要があると考えられた。

第 2 節 健康豚から分離されたサルモネラの性状解明

2005～2006 年に群馬県内のと畜場に搬入された健康豚において、サルモネラの保菌調査およびサルモネラ陽性農場に対する追跡調査を実施し、分離株の血清型、薬剤耐性を比較した。追跡調査でサルモネラが分離された 5 農場のうち 4 農場では、保菌調査と同じ耐性型の *S. Typhimurium* が再び分離され、農場内の常在化、豚への感染持続が推察された。さらに OTC を含む多剤耐性 *S. Typhimurium* に加え、新たに OTC 単剤耐性 *S. Typhimurium* が複数農場で分離され、農場での薬剤使用により特定の株が選択された可能性が示唆された。

第3章 豚離乳期の下痢症に関する検討

3.1. 背景および目的

前章において、養豚場での抗菌剤の長期使用により豚の腸管内で耐性菌が選択された可能性が示された。養豚業で抗菌剤の使用量が増える原因の一つに離乳子豚の下痢症への対応がある。離乳子豚に発生する下痢症はその後の成長に大きく影響し、経営を悪化させることから、下痢症の予防、また発症時の治療のために抗菌剤が多量に使用される。しかし、抗菌剤の多用は薬剤耐性菌発生の温床となるなど公衆衛生上の懸念となっている。そのため、離乳期の腸内環境を良好に保ち、順調に経過させることが養豚における重要な管理点の一つであり、抗菌剤の使用機会を削減することに繋がる。

現代の養豚形態では生産性向上のため3~4週齢で人為的に離乳させるが、そもそも豚の自然離乳は2~4か月齢[66]であることから、子豚にとっては大きなストレスとなる。離乳によって食餌が脂肪分の多い液体である母乳から炭水化物の多い固形飼料へ変化することは、小腸絨毛の構造[67]や機能[68]に変化をもたらす。食餌の劇的な変化の他に、母子分離、群再編成による闘争など複合的なストレスにより、離乳子豚ではエネルギー摂取量が離乳前の約四分の一に低下し[69]、小腸絨毛の萎縮が起こる[70, 71]。その変化は離乳後3~4日で最大となり、小腸絨毛の萎縮は水分吸収の阻害や粘膜の物理的障害、酵素活性低下の要因となる[71]。その結果、電解質や栄養分の分解吸収に異常が生じ、腸管内の浸透圧が高まり、生理的下痢が発生する[72]とされる。

さらに離乳期は母豚からの移行抗体による免疫から、獲得免疫へ変わる過渡期に当たる。そのため、豚の生涯で最も免疫力が低い時期であり、病原体の感染を受けた感染性下痢へ移行しやすく、離乳子豚の下痢症の約90%でロタウイルスと大腸菌が高率に検出されている[73]。

これに対して、健康な豚の腸管表面は杯細胞から分泌される糖タンパク質のムチンによって覆われ、物理的刺激や微生物感染を防ぐ非特異的バリアが形成されている[74, 27]。ムチンは防御因子としてだけでなく、栄養因子として一部の腸内細菌に利用され、正常な腸内細菌叢の形成および維持に寄与している[27]。そこで、離乳子豚の腸内環境を良好に保つため、ムチン分泌の誘導に関連している腸内細菌 *Akkermansia muciniphila* の豚における機能解明を目的に *A. muciniphila* と豚の下痢症の関係を検

討した。

3.2. 材料および方法

3.2.1. 対象農場

離乳期に下痢症が多発する静岡県内の農場（母豚 380 頭一貫経営，コンベンショナル農場，以下，下痢発生農場）1 件と下痢発生が少ない農場（母豚 700 頭一貫経営，SPF（Specific Pathogen Free）農場，以下，対照農場）1 件を対象とした。両農場ともに離乳日齢は平均 24 日で，哺乳期間中に離乳後の飼料の馴致を行っていた。また下痢，肺炎予防のため，誕生直後もしくは 3 日齢で抗生物質を注射し，その後飼料の切り替えに合わせて，離乳後から 120 日齢まで抗生物質を飼料中に添加していた。下痢発生農場では過去に離乳豚において豚ロタウイルス A, B および大腸菌の混合感染による下痢が発生していた。

3.2.2. 材 料

両農場ともに 2020 年 12 月に三元交雑豚（LWD）の哺乳豚（10～20 日齢，11 頭），離乳豚（28～35 日齢，6 頭），育成豚（42～60 日齢，6 頭）から肉眼的に正常な新鮮ふん便を採取して氷冷下で実験室に持ち帰り，以降の分析に供するまで -80°C で保管した。哺乳豚は 4 頭の母豚から 2～3 頭，離乳豚および育成豚は 3 区画から 2 頭ずつ抽出した。

3.2.3. *A. muciniphila* 16S rRNA 遺伝子の検出

Morita らの方法[75]に従い，ふん便の洗浄および DNA 抽出を行った。直腸便約 1 g を洗浄し，洗浄したふん便サンプル 0.1 g から抽出した DNA をテンプレートとし，*A. muciniphila* 特異的プライマー（AM1 および AM2）[76]を用いて PCR 法で *A. muciniphila* の検出を行った。反応液量は 25 μl とし，EmeraldAmp PCR Master Mix（タカラバイオ），プライマー最終濃度 0.5 μM ，鋳型 DNA 100 ng で実施した。PCR 条件は 94°C 5 分の後， 94°C 30 秒， 60°C 30 秒， 72°C 20 秒を 45 サイクル，最終伸長を 72°C 5 分とした。得られた 327 bp の PCR 増幅バンドをアガロースゲルから抽出し同プライマーにてシーケンス解析を実施し，*A. muciniphila* であることを確認した。

3.2.4. ふん便中のムチン濃度測定

ふん便ムチン測定キット（コスモ・バイオ）を用いて励起波長 336 nm，蛍光波長 383 nm で測定した。標準液の蛍光値より検量線を作成し，検体ふん便 1 g あたりのムチン含量を算出した。

3.2.5. ふん便中の有機酸濃度測定

ポストカラム方式有機酸分析システム（島津製作所）を用いて測定した。なお，有機酸分析用カラム Shim-pack SCR101H（300×φ7 mm，島津製作所）を用い，5 mM パラトルエンスルホン酸（pTS，和光純薬）を移動相とし，5 mM pTS/100 μM EDTA（同仁堂）/20 mM Bis-Tris（和光純薬）をポストカラム相として，乳酸，酪酸，酢酸およびプロピオン酸を検出した。

3.2.6. 統計処理

試料間の統計学的有意差性は Student t-test を用いて検定した。危険率 5%未滿を有意差ありとし，値は平均値±標準偏差で示した。

3.3. 結果

3.3.1. *A. muciniphila* 16S rRNA 遺伝子の検出

発育ステージごとの *A. muciniphila* 検出率は，対照農場では，哺乳豚 100%（11/11 頭），離乳豚 33.3%（2/6 頭），育成豚 33.3%（2/6 頭）であった。一方，下痢発生農場では哺乳豚 63.6%（7/11 頭），離乳豚 66.7%（4/6 頭），育成豚 16.7%（1/6 頭）と，対象農場の哺乳豚における *A. muciniphila* 検出率が高い傾向を示した(表 3-1)。

表 3-1 発育ステージごとの *A. muciniphila* 検出率

	哺乳豚 (n=11)	離乳豚 (n=6)	育成豚 (n=6)
下痢発生農場	63.6%	66.7%	16.7%
対照農場	100%	33.3%	33.3%

3.3.2. ふん便中のムチン濃度測定

発育ステージごとのふん便中のムチン濃度は、対照農場では下痢発生農場と比較して哺乳豚（ $P<0.05$ ）、離乳豚および育成豚（ $P<0.01$ ）のすべての発育ステージで有意に高かった（図 3-1）。

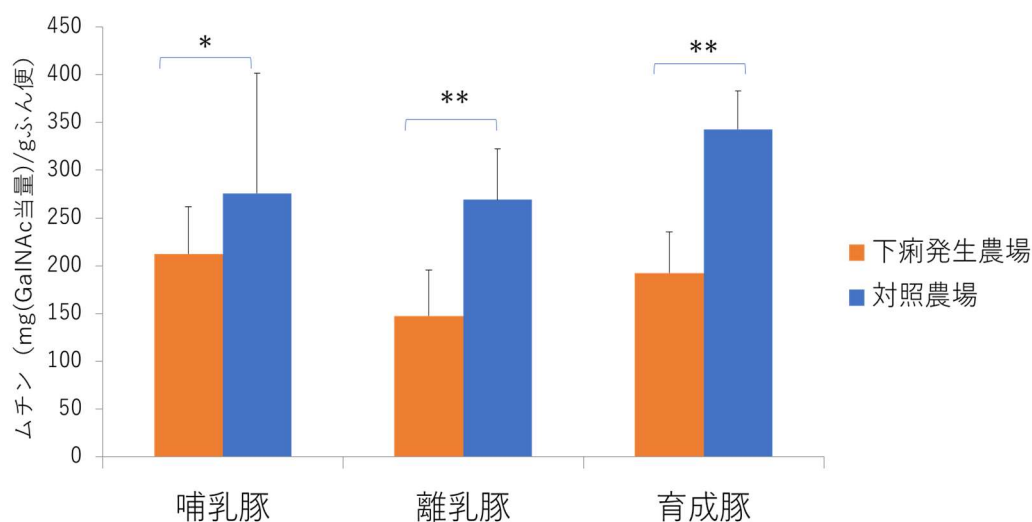


図 3-1 ふん便中ムチン濃度の比較

*は 5%水準，**は 1%水準で有意差があることを示す。

3.3.3. ふん便中の有機酸濃度測定

ふん便中の有機酸濃度は、対照農場が下痢発生農場と比較して、哺乳豚の酪酸濃度が高かった（ $P<0.01$ ）。また育成豚では酪酸，酢酸，プロピオン酸の濃度が高い傾向が認められた。一方，下痢発生農場では哺乳豚の酢酸濃度が高かった（ $P<0.05$ ）。またすべての発育ステージにおいて乳酸濃度が高い傾向を示し，特に哺乳豚（ $P<0.01$ ）と育成豚（ $P<0.05$ ）で有意に高かった（表 3-2）。

表 3-2 ふん便中の有機酸濃度の比較

有機酸 ($\mu\text{mol/g}$ of wet feces)	農場	哺乳豚 n=11	離乳豚 n=6	育成豚 n=6
乳酸	下痢発生	2.08 ± 1.51	3.99 ± 1.74	2.24 ± 1.43
	対照	0.57 ± 0.50		
酪酸	下痢発生	1.95 ± 1.71	14.28 ± 13.17	23.13 ± 7.09
	対照	5.01 ± 1.36		
酢酸	下痢発生	24.72 ± 8.19	49.36 ± 14.36	52.23 ± 6.44
	対照	17.99 ± 5.89		
プロピオン酸	下痢発生	7.21 ± 2.88	20.04 ± 9.29	36.76 ± 5.84
	対照	11.66 ± 9.70		

平均値 \pm 標準偏差；t 検定により，* は 5%水準，** は 1%水準で有意差があることを示す。

3.4. 考 察

本試験では，*A. muciniphila* と豚の下痢症の関係を検討するため，離乳期に下痢症が多発する農場と下痢発生が少ない農場における豚のふん便性状を発育ステージごとに比較した。

対照農場では調査した哺乳豚 11 頭全頭が *A. muciniphila* を保菌していた。また，哺乳豚を含むすべての発育ステージでふん便中のムチン濃度が下痢発生農場の同ステージと比較して有意に高い状態であった。マウスでは *A. muciniphila* により杯細胞の密度が増し，ムチン産生を亢進することが明らかとなっている [25]。本試験において，*A. muciniphila* を保菌した対照農場の哺乳豚でふん便ムチン濃度が有意に高いことから，豚においても同様の作用が示唆され，ムチンによる腸管の物理的バリアが高まり，離乳後も維持されていると考えられた。

さらに，哺乳豚ではふん便中の酪酸濃度が有意に高かった。酪酸は腸管上皮細胞の直接的なエネルギー源 [77] となり，絨毛の代謝促進 [78]，アミノ酸やグルコース輸送タンパク質の合成促進 [79] など，短鎖脂肪酸の中でも腸管への生理活性が高い。加えて，酢酸やプロピオン酸よりも低濃度でムチン分泌を刺激することが確認されている [80]。この酪酸の作用により哺乳期に腸内環境が良好に保たれた可能性が考えられた。そして離乳を経た育成期にはすべての短鎖脂肪酸濃度が高い傾向を示した。Piao らは成豚のふん便中の有機酸濃度を酪酸 29.1 ± 17.6 mmol/kg，酢酸 98.8 ± 22.6 mmol/kg，

プロピオン酸 48.0 ± 21.1 mmol/kgと報告している[81]。本試験において育成豚で検出されたふん便中の短鎖脂肪酸濃度は、成豚と同等レベルに達していることから、対照農場では育成期には腸内細菌が安定し、腸管の発酵機能が備わっていると考えられた。

一方、下痢発生農場では、哺乳期に *A. muciniphila* が検出されない個体も存在し、ふん便中のムチン濃度が哺乳期を含むすべての発育ステージで対照農場と比較して低かったことから、腸管の粘膜バリア形成が不十分であり、細菌感染を受けやすい腸内環境であると推察された。さらに、下痢発生農場ではすべての発育ステージにおいてふん便中の乳酸濃度が高い傾向を示した。乳酸は上皮細胞への吸収が非常に遅く、水分および電解質の吸収を促進しないことから[82]、乳酸が内腔に蓄積すると消化物の水分が増加し、下痢を誘発する可能性がある[83]。本試験に用いたふん便は肉眼的には正常であったが、下痢発生農場では哺乳期から生理的下痢および感染性下痢を生じやすい腸内環境にあると推察された。

以上の結果から、下痢発生農場と対照農場を比較すると、生後まもない哺乳豚の時期から腸管の状態が異なり、哺乳豚における *A. muciniphila* の存在は短鎖脂肪酸を介して腸管の健全性に寄与し、離乳豚の下痢症を防ぐ一つの要因となる可能性が示唆された。一方で、*A. muciniphila* はムチン分解の過程で酢酸とプロピオン酸を産生する[24]が、酪酸は産生しない。対照農場の哺乳豚で酪酸濃度が高くなった要因は不明である。今後、*A. muciniphila* と他の腸内細菌との相互作用や、下痢発生農場と対照農場で菌叢全体における *A. muciniphila* の占有率の違いなど詳細な検討が必要である。

3.5. 小 括

抗菌剤使用量削減を目指し、豚における下痢症発生に関し、*Akkermansia muciniphila* の機能性を解明するため、離乳後に下痢が多発する農場(下痢発生農場)と下痢発生が少ない農場(対照農場)で調査を行った。哺乳豚、離乳豚、育成豚の3つの発育ステージのふん便中の *A. muciniphila* 検出率、有機酸濃度、ムチン濃度を比較したところ、下痢発生農場では哺乳豚の *A. muciniphila* 検出率が 63.6%で、*A. muciniphila* を保菌していない個体が存在し、すべての発育ステージでムチン濃度が有意に低く、乳酸濃度が高い傾向を示した。一方、対照農場では、哺乳期のすべて

の子豚から *A. muciniphila* が検出され、下痢発生農場と比較して哺乳期の酪酸およびムチン濃度が有意に高かった。マウスでは *A. muciniphila* によりムチン産生が亢進することが明らかとなっているが、豚においても同様の作用が示唆された。また、育成豚ではすべての短鎖脂肪酸濃度が高い傾向を示し、ムチン濃度も有意に高くなった。このように生後まもない哺乳豚の時期から腸管の状態が異なることが明らかとなり、哺乳豚における *A. muciniphila* の存在は短鎖脂肪酸を介して腸管の健全性に寄与し、離乳豚の下痢症を防ぐ一つの要因となる可能性が示唆された。

第4章 豚離乳期の下痢症予防に関する腸内細菌叢の検討

4.1. 背景および目的

前章において、哺乳豚における *A. muciniphila* の存在は短鎖脂肪酸を介して腸管の健全性に寄与し、離乳豚の下痢症を防ぐ一つの要因となる可能性が示唆された。一方で、*A. muciniphila* はムチン分解の過程で酢酸とプロピオン酸を産生する[24]が、酪酸は産生しない。対照農場の哺乳豚では下痢発生農場と比較して酪酸濃度の高まりが確認されたが、その要因は不明である。また、*A. muciniphila* と他の腸内細菌との相互作用や、下痢発生農場と対照農場で菌叢全体における *A. muciniphila* の占有率の違いなど詳細な検討が必要である。

そこで、下痢発生農場と対照農場の各発育ステージの腸内菌叢を次世代 DNA シーケンサーによる 16S rRNA 遺伝子 V3~V4 領域のアンプリコン解析により比較し、両農場の菌叢の特徴や成長に伴う菌叢の変化の違いを明らかにし、豚下痢症に関する *A. muciniphila* の機能について検討した。

4.2. 材料および方法

4.2.1. 材 料

第3章と同一の材料である下痢発生農場と対照農場ともに哺乳豚（10~20日齢，7頭），離乳豚（28~35日齢，6頭），育成豚（42~60日齢，5頭）のそれぞれ18頭分のふん便を使用した。そのサンプル状況を表4-1に示した。

表 4-1 サンプル状況

サンプル番号	生育段階	サンプル番号	生育段階	解析用区分
A：対照農場		B：下痢発生農場		
2, 3, 10, 11	10日齢	2, 3, 10, 11	10日齢	哺乳豚
17, 18, 19	20日齢	14, 15, 16	20日齢	哺乳豚
21, 22, 23	28日齢	18, 19, 20	28日齢	離乳豚
29, 30, 31	35日齢	22, 23, 24	35日齢	離乳豚
35, 36, 37	42日齢	26, 27, 28	42日齢	育成豚
39, 40	60日齢	34, 35	60日齢	育成豚

4.2.2. ライブラリー調製と 16S アンプリコン解析

Morita らの方法[75]に従い，ふん便洗浄および DNA 抽出を行った．直腸便約 1 g を洗浄し，洗浄したふん便サンプル 0.1 g から抽出した DNA をテンプレートとし，1 回目の PCR では，V3~V4 領域を増幅する 357F/806R プライマーペアに相当するプライマーを使用した．増幅された産物をビーズ精製し 2 回目の PCR の鋳型として用いた．2 回目の PCR では Index 付きプライマーを使用した．使用したプライマーを表 4-2 に示す．DNA シーケンシングのためのライブラリーの調製は，イルミナ社のプロトコールに従って実施した．シーケンスは MiSeq Reagent Kit V3 600cycle(300×2, 2500 万クラスター) 試薬を用い，MiSeq(イルミナ社)にてペアエンドシーケンスを行った．なお，最終的なライブラリー調製と配列解析はゲノムリード(株)(香川県高松市)に依頼した．

4.2.3. 配列データ解析

MiSeq で得られたリードは，Index 配列で仕分け後，Qiime2(qiime2-amplicon-2023.9 を使用)[84]をプラットフォームとしたプラグインアプリケーションにより解析を行なった．まず初めに DADA2 [85]により，得られたリードのトリミングとデノイズ，そしてキメラチェックを行なった．トリミングは，5'末端側から 10 塩基削除したのち 260 塩基長のリードと 3'末端型 10 塩基削除し 230 塩基長のリードを用い，マージした配列を作成した．キメラを除いたすべてのアンプリコンシーケンス (All amplicon sequence variants, ASVs) を使用し MAFFT [86]によりアライメントし，fasttree [87]により系統解析に用いた．得られた系統解析群の内容を評価するため， α 多様性指数[88]を求めた．次に，16S rRNA 配列データベースである silva-138-99-515-806-nb.classifier[89, 90]に対して系統解析を実施し，菌叢を解析した．得られたそれぞれの系統解析の有意性を確認するために，それぞれの内で形成された遺伝子群 (OTU あるいは ASVs と呼ばれる) の多様性を評価するため Shannon 指数[91]を調べた．得られた菌叢解析データは，クロロプラストや Unassigned などの配列を削除した後，門，綱，目，科，属，および種レベルで比較した．種や属レベルの菌叢解析は個体差が大きく，傾向を掴みにくいことから，短鎖脂肪酸と同様に，酪酸菌群，乳酸菌群でまとめて比較した．

表 4-2 使用プライマーおよび Index 配列一覧

1stPCRプライマー:下線部が357Fおよび806Rプライマー配列

・フォワード側プライマー

5'-ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTNNGTGC

CAGCMG CCGCGGTAA-3'

・リバーズ側プライマー

5'-GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTNNGGAC

TACHVG GGTWTCTAAT-3'

2nd PCRプライマー (index配列の組み合わせは以下の表に示す)

・フォワードプライマー:

5'-AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC index

ACAATATTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT-3'

・リバーズプライマー:

5'-CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT index

GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT-3'

	Index 1	T501	T502	T503	T504
Index 2	塩基配列	TATAGCCT	ATAGAGGC	CCTATCCT	GGCTCTGA
T713	TCCCCTTA	#1	#11	#21	#31
T714	CTAGTACG	#2	#12	#22	#32
T715	TTCTGCCT	#3	#13	#23	#33
T716	GCTCAGGA	#4	#14	#24	#34
T717	AGGAGTCC	#5	#15	#25	#35
T718	CATGCCTA	#6	#16	#26	#36
T719	GTAGAGAG	#7	#17	#27	#37
T720	CCTCTCTG	#8	#18	#28	#38
T721	AGCGTATC	#9	#19	#29	#39
T722	CAGCCTCG	#10	#20	#30	#40

4.3. 結 果

MiSeq による配列解析で得られたリード数, そしてそれらをマージし, キメラなどを除き系統解析に用いたリード数についてのまとめを表 4-3 に示す.

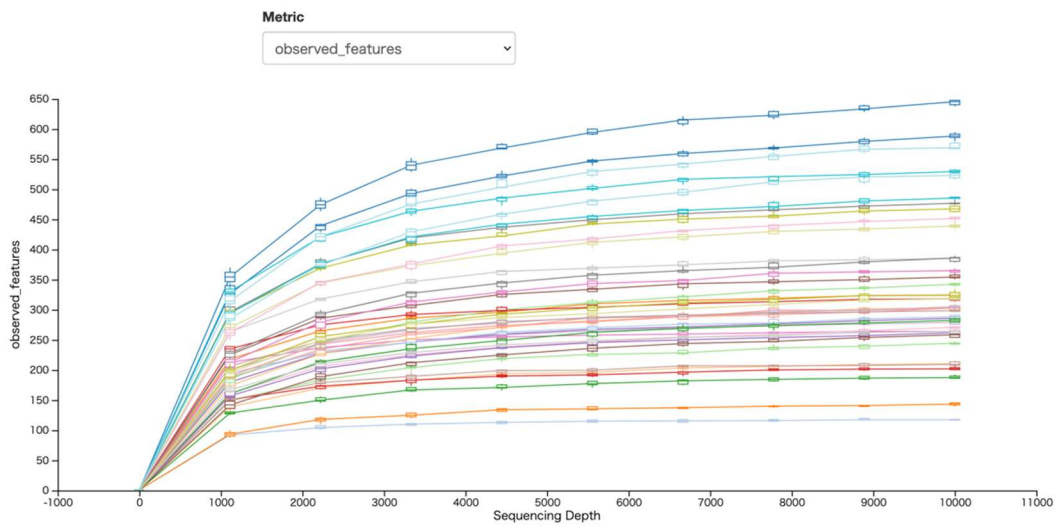
表 4-3 アンプリコン解析で得られた有効リード数

sample-id	input	filtered	percentage of input passed filter	denoised	merged	percentage of input merged	non-chimeric	percentage of input non-chimeric
A2	142579	107616	75.48	105726	102076	71.59	44198	31
A3	204687	154253	75.36	151391	145144	70.91	60905	29.76
A10	159519	123547	77.45	122229	118442	74.25	46776	29.32
A11	180970	137040	75.73	135733	132655	73.3	65700	36.3
A17	148780	109017	73.27	107829	106441	71.54	63753	42.85
A18	136708	98592	72.12	97179	95877	70.13	58564	42.84
A19	167984	127920	76.15	125994	122750	73.07	61904	36.85
A21	165283	122805	74.3	120627	116245	70.33	58071	35.13
A22	156095	113954	73.00	111730	107413	68.81	54424	34.87
A23	129389	95028	73.44	92976	88379	68.3	42422	32.79
A29	193146	142642	73.85	138999	130286	67.45	58606	30.34
A30	94481	60306	63.83	59118	57455	60.81	27863	29.49
A31	155743	117828	75.66	115496	109259	70.15	55217	35.45
A35	145250	105343	72.53	101835	94967	65.38	48226	33.2
A36	114005	76679	67.26	74001	68041	59.68	37528	32.92
A37	161983	117217	72.36	113434	104877	64.75	53344	32.93
A39	154027	113637	73.78	110783	103683	67.31	50634	32.87
A40	152691	111126	72.78	107699	100028	65.51	51473	33.71
B2	186851	139602	74.71	137618	134259	71.85	65865	35.25
B3	179588	134762	75.04	131742	126137	70.24	65697	36.58
B10	167066	126590	75.77	124010	119124	71.3	59437	35.58
B11	166587	122786	73.71	120520	116121	69.71	55191	33.13
B14	194985	144869	74.30	142692	139310	71.45	77144	39.56
B15	183572	134015	73.00	131756	127293	69.34	67080	36.54
B16	196700	148894	75.70	146297	141901	72.14	86500	43.98
B18	105726	77290	73.10	76028	74522	70.49	38189	36.12
B19	166434	124012	74.51	122346	119748	71.95	57417	34.5
B20	177639	131415	73.98	129808	126727	71.34	51190	28.82
B22	186375	138698	74.42	136888	132189	70.93	77896	41.8
B23	89879	68206	75.89	66528	63041	70.14	35368	39.35
B24	169187	130859	77.35	128469	123368	72.92	70256	41.53
B26	163135	121414	74.43	118200	111959	68.63	60728	37.23
B27	185103	136872	73.94	133991	127652	68.96	63934	34.54
B28	158196	117440	74.24	115855	112345	71.02	50399	31.86
B34	164511	124374	75.60	122249	117241	71.27	62062	37.73
B35	145792	108759	74.60	105428	99315	68.12	51827	35.55

編みかけ部分の配列数を菌叢解析に用いた。

1 サンプルにつき 10 万リードの獲得を目指してシーケンスを実施し、多くのサンプルでそれを満たすリード数は得られた。品質チェックしたところ、最終的にはリード数が少ないサンプルもあった。α多様性解析の結果、検出された種の数と均一性を評価した指数である Shannon 指数は深度 1112 でプラトーに達したことから、リード数深度が 1112 以上のリードを用いて解析することに問題ないことが確認された (図 4-1)。

Alpha rarefaction



Alpha rarefaction

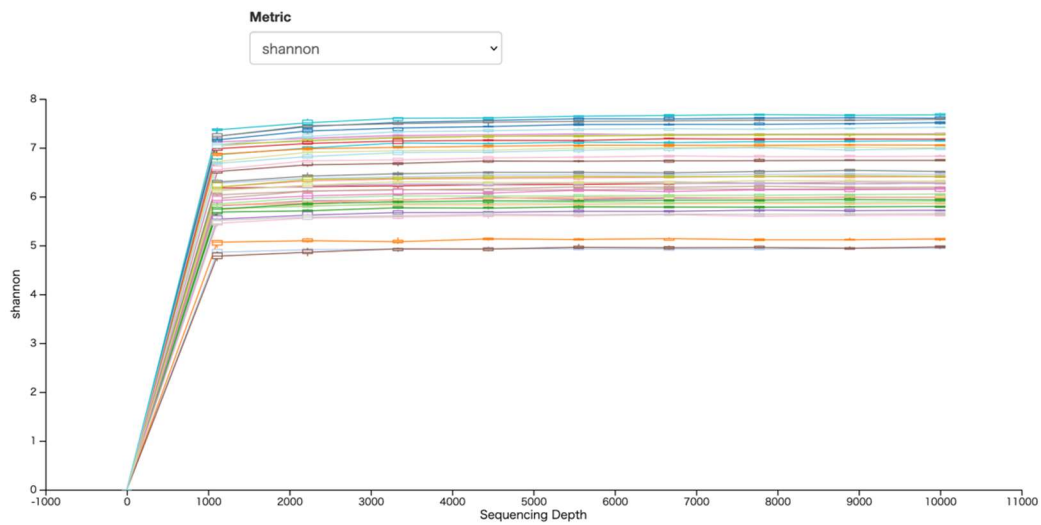


図 4-1 OUT の評価

Rarefaction カーブを 10000 で実施した。菌種によるもの 10000 まで徐々に増加する傾向であったが（上段）、Shannon 指数では 1000 程度で一定となった（下段）。そのため、1000 以上の深度を持ったデータでの評価で問題ないことが示された。

そこで、これらのデータから農場間の菌叢の違いを比較した。対照農場と下痢発生農場で各発育ステージの腸内菌叢を科レベルでその性質を以下のようにまとめ比較

したところ、成長にともなう菌叢の変化に違いが認められた（図 4-2）。菌叢を構成する科の中で占有率が高く、代謝産物として酪酸を産生する菌を多く含む *Clostridiaceae*, *Lachnospiraceae*, *Ruminococcaceae* および *Erysipelotrichaceae* を選抜し酪酸産生菌とした。同様に乳酸産生菌として *Enterococcaceae*, *Lactobacillaceae* および *Streptococcaceae* を選抜した。酪酸産生菌は、対照農場では離乳前後で 15.3% から 43.8% に変化し、成長に伴いその割合が 2.8 倍に増加した。一方、下痢発生農場では離乳前後で 23.6% から 23.7% とほぼ一定の値を示した（図 4-3）。

乳酸産生菌は、対照農場では成長に伴い、その割合が 41.8% から 27.4% と減少した。一方、下痢発生農場では離乳前後で 40.0% から 49.8% と増加した（図 4-3）。対照農場、下痢発生農場ともに、哺乳豚の乳酸産生菌占有率は約 40% を占めていたが、対照農場ではその内、*Lactobacillaceae* が 23%、*Streptococcaceae* 17% であったのに対し、下痢発生農場では乳酸産生菌占有率のほぼすべてが *Lactobacillaceae* であった（図 4-2）。

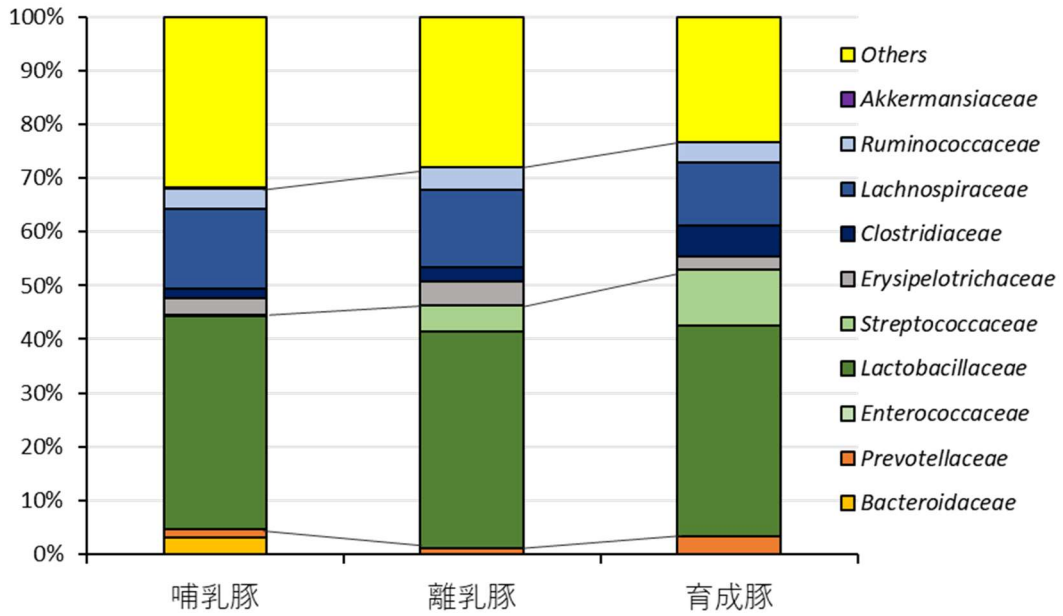
乳酸を利用して酪酸を産生する *Eubacterium* 属と *Megasphaera* 属（乳酸利用性酪酸産生菌）は、対照農場の哺乳豚では 0.7% であったのに対し、下痢発生農場の哺乳豚では 0.05% と、対照農場で占有率が 14 倍高かった。しかし、離乳後の育成豚では、対照農場で 0.6% とほぼ一定の値を示したのに対し、下痢発生農場では 3.4% と乳酸利用性酪酸産生菌の顕著な増加が認められた（図 4-3）。

ムチン分解菌である *Akkermansiaceae* は、両農場ともに哺乳豚では検出された。有意差は認められなかったが、その占有率は対照農場では約 1%、下痢発生農場では約 0.1% で 10 倍の違いが認められた（図 4-4）。また、両農場とも離乳後の育成豚では検出されなかった。

各発育ステージの菌叢を対照農場と下痢発生農場で比較して有意差が認められた科を哺乳豚について図 4-5、育成豚について図 4-6 に示した。占有率 1% 以上の科に注目すると、哺乳豚では対照農場で *Streptococcaceae* が有意に高くなった。一方、下痢発生農場では *Lactobacillaceae*, *Oscillospiraceae*, *Erysipelothrichaceae* および *Christensenellaceae* が有意に高くなった。

育成豚では対照農場で *Clostridiaceae*, *Erysipelotrichaceae*, *Peptostreptococcaceae*, *Anaerovoracaceae* および *Clostridia_UCG-014* が有意に高くなり、下痢発生農場では *Lactobacillaceae* の占有率が有意に高くなった。

下痢発生農場



対照農場

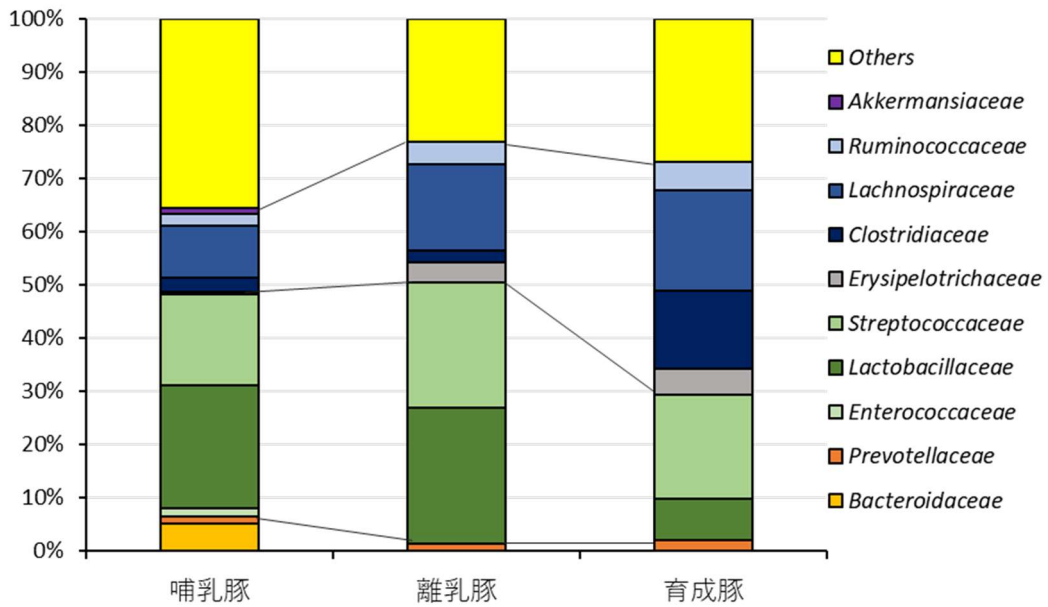


図 4-2 発育ステージごとの菌叢変化

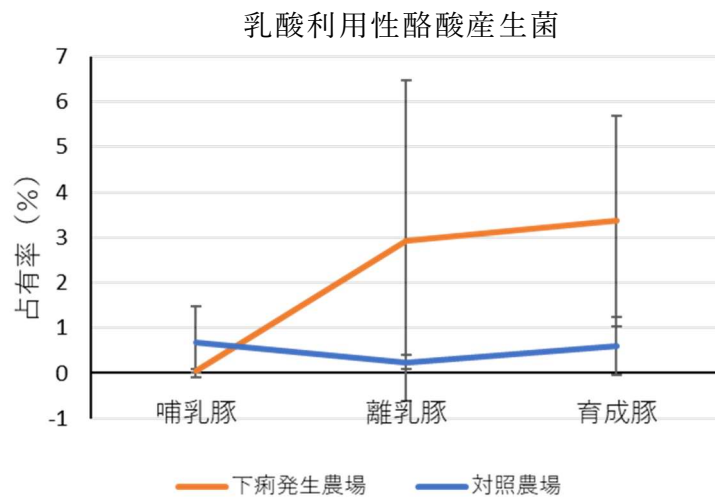
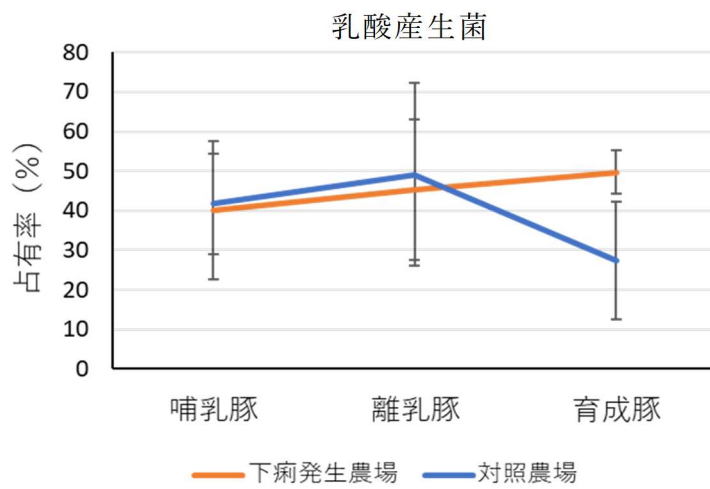
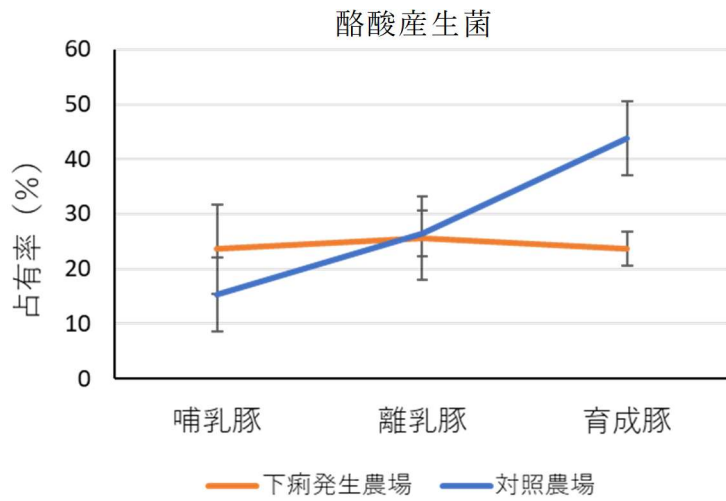


図 4-3 酪酸産生菌，乳酸産生菌および乳酸利用性酪酸産生菌の発育ステージごとの占有率の変化

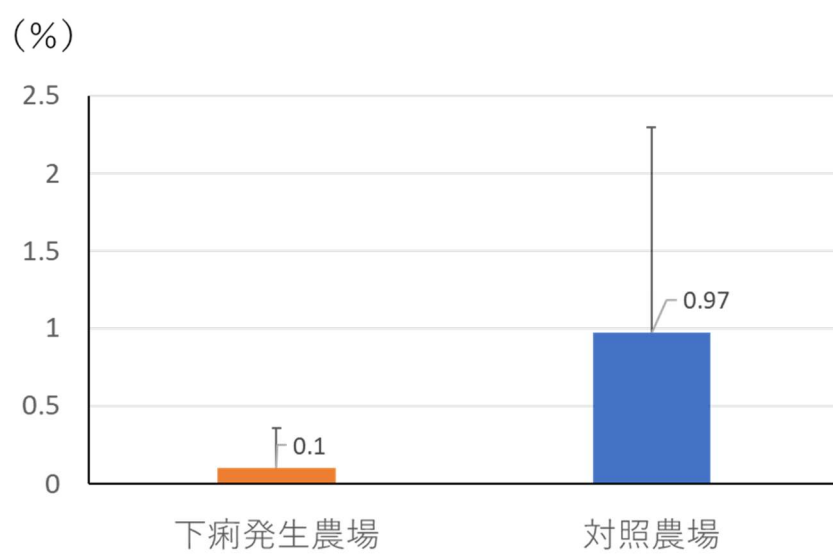


図 4-4 哺乳豚における *Akkermansiaeae* 占有率

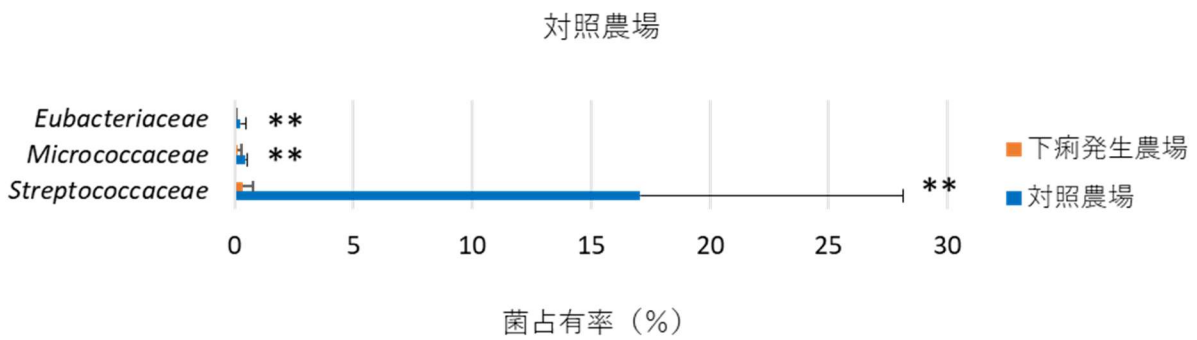
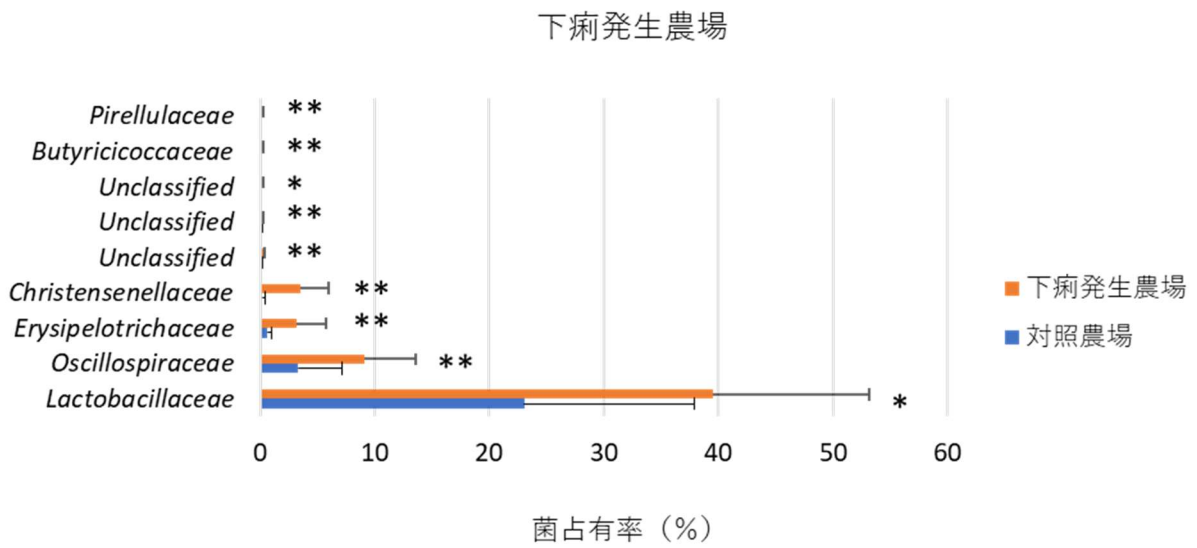


図 4-5 下痢発生農場と対照農場で有意差が認められた細菌科の相対量 (哺乳豚)

*は5%水準, **は1%水準で有意差があることを示す

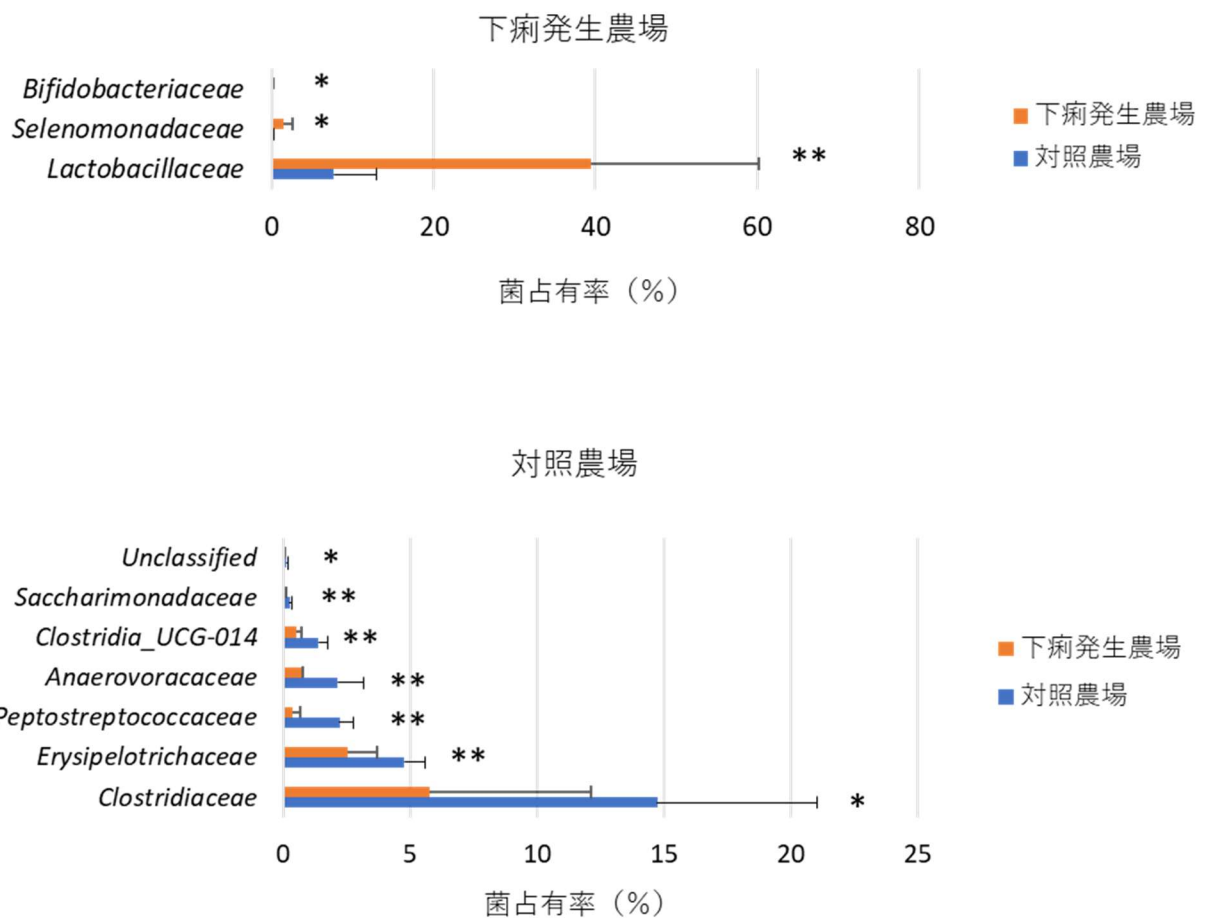


図 4-6 下痢発生農場と対照農場で有意差が認められた細菌科の相対量（育成豚）

*は5%水準，**は1%水準で有意差があることを示す

4.4. 考 察

離乳期に下痢が多発する農場（下痢発生農場）と発生の発生が少ない農場（対照農場）で、哺乳豚、離乳豚、育成豚の3つの発育ステージの腸内菌叢解析を実施し、その違いについて検討した。

対照農場では、離乳前後で乳酸産生菌が上位を占める菌叢から酪酸産生菌が上位を占める菌叢へと変化した。哺乳豚の菌叢は乳酸産生菌が全菌叢の42%を、酪酸産生菌は15%を占め、乳酸産生菌の方が優勢であったが、前章のふん便中有機酸濃度の結果

では、下痢発生農場と比較して乳酸濃度は有意に低く ($P < 0.01$)、酪酸濃度は有意に高く ($P < 0.01$) になった。またプロピオン酸濃度も高い傾向を示した。腸管内の短鎖脂肪酸の産生源として食物中の難消化性多糖類が知られているが、腸管上皮の杯細胞から分泌されるムチンも内因性の発酵基質として利用されており、腸管内の短鎖脂肪酸量を高める。その作用は食餌性の食物繊維やオリゴ糖に比べても効果的で、特に酪酸産生量を高める [92]。腸管内で産生された短鎖脂肪酸は粘膜上皮から速やかに吸収され、代謝エネルギーとして利用され [93]、杯細胞からのムチン分泌を促進するという循環が継続していると考えられている [80, 94, 95]。

対照農場では前章の結果から哺乳豚におけるふん便中のムチン濃度が下痢発生農場と比較して有意に高く ($P < 0.05$)、また菌叢解析の結果、ムチン分解菌である *Akkermansiaceae* が約 1% 存在していた。*Akkermansiaceae* の存在量はムチン濃度と正の相関があることから [96]、対照農場の哺乳豚では *Akkermansiaceae* が豊富に存在していたと考えられる。*Akkermansiaceae* はムチン糖鎖分解に関連する一連の酵素を備えており [24, 97]、これら酵素のうち、N-アセチルグルコサミニダーゼ、L-フコシダーゼ、ガラクトシダーゼはムチンが豊富な条件下で遺伝子の発現が誘導される [25]。また、ムチン糖鎖を構成する GlcNAc は酪酸を、フコースはプロピオン酸を特異的に増加させることが明らかになっている [98]。本試験において対照農場の哺乳豚では腸管に定着した *Akkermansiaceae* によってムチン糖鎖が分解され、単離された糖が基質となり、酪酸産生菌やプロピオン酸生成経路を持つ菌によって効率的に短鎖脂肪酸が産生された結果、酪酸濃度、プロピオン酸濃度が高まったと考えられた。加えて対照農場では乳酸利用性酪酸産生菌の占有率も下痢発生農場と比較して 14 倍高く、乳酸産生菌により生じた乳酸がこれらの菌によって資化され酪酸へ変換されたことで、ふん便中の乳酸濃度の低下と酪酸濃度の増加に繋がった可能性がある。

育成豚では下痢発生農場と比較して酪酸産生菌を多く含む *Clostridiaceae*, *Erysipelotrichaceae* の存在量が有意に高く、菌叢全体として酪酸産生菌の占有率が高まった。これはふん便中の酢酸、酪酸、プロピオン酸の濃度が下痢発生農場より高い傾向を示した前章の結果と一致する。腸管内の短鎖脂肪酸濃度が高まることで、杯細胞からのムチン分泌が促進し、ふん便ムチン濃度が下痢発生農場と比較して有意に高くなったと考えられた。

一方、下痢発生農場では哺乳豚から育成豚まで一貫して乳酸産生菌が上位を占める

菌叢であり、離乳前後で乳酸産生菌の占有率が 40.0% から 49.8% と増加した。一方、酪酸産生菌の増加は認められなかった。下痢発生農場では前章ですべての発育ステージにおいて乳酸濃度の高まりが確認されており、結果が一致した。乳酸は短鎖脂肪酸に比べ腸管上皮からの吸収速度が遅く、また pKa 値が低いため腸管内の pH を著しく低下させる[99]。このような低 pH 環境下では多くの細菌が増殖を抑制されるのに対し、乳酸産生菌は低 pH 耐性を示すため、いっそう優勢になり、乳酸産生が助長されたと考えられた。

さらに乳酸産生菌の種類を見ると、すべての発育ステージを通して対照農場では *Streptococcaceae* と *Lactobacillaceae* が 1:1 もしくは *Streptococcaceae* の方が優勢であったのに対し、下痢発生農場では乳酸産生菌の大部分が *Lactobacillaceae* であった。*Lactobacillaceae* の低 pH 耐性は *Streptococcaceae* よりも高く、*Lactobacillus acidophilus* では外部環境 pH3.5 まで増殖が可能であるのに対し、*Streptococci* は pH4.5 で増殖が抑制されることが知られている[100]。下痢発生農場では乳酸の蓄積が進んで腸管内 pH が対照農場と比べて低くなり、*Lactobacillaceae* が優勢になったと推察された。腸管内 pH の低下はムチンの分解を引き起こす。Hansson らにより組換え体 Muc2 ムチンを用いた *in vitro* 試験において、Muc2 ムチンを pH6 以下の条件でインキュベートした時、時間に依存して非酵素的に分解されることが報告されている[101]。また Tsukahara らはラットに 10% フラクトオリゴ糖飼料を 7 日間摂取させると盲腸上皮のムチン層が消失したことを報告している[102]。フラクトオリゴ糖のような資化速度の極めて速い基質を摂取すると乳酸およびコハク酸の蓄積と内容物 pH の低下、乳酸産生菌の増殖が起こる[103, 104]。腸管内の低 pH 内容物の滞留がムチン層の崩壊を招いたと推定されている[104]。同様の現象が下痢発生農場の豚の腸管内で起こっている可能性も考えられ、哺乳豚においてふん便中の乳酸濃度が有意に高い ($P < 0.01$) ことが、ムチン分解を引き起こし、腸管の物理的バリアの低下を招き、そのような状態で離乳を迎えることで離乳期の下痢症の発生に繋がった可能性がある。

下痢発生農場では離乳後も *Lactobacillaceae* が上位を占める菌叢であり、乳酸濃度も有意に高い ($P < 0.01$) 状態であったが、低 pH 環境に適応した乳酸利用性酪酸産生菌が離乳前後で 0.05% から 3.4% に増加し、蓄積した乳酸を資化して酪酸が産生される Metabolic cross-feeding が成立していると考えられた。

以上より、下痢発生農場と対照農場で哺乳豚、離乳豚、育成豚の3つの発育ステージの腸内菌叢、有機酸濃度、ムチン濃度を比較した結果、対照農場では、哺乳豚において、腸管に定着した *Akkermansiaceae* がムチン分解で糖鎖を供給し、酪酸産生菌によって利用され、効率的に短鎖脂肪酸産生が進んだ結果、杯細胞からのムチン分泌が促進し、より一層 *Akkermansiaceae* が増殖するという循環が継続していると考えられた。したがって、哺乳期に *A. muciniphila* を保菌し、ムチンを利用した短鎖脂肪酸産生を促すことが腸管の健全な発育につながり、腸管の物理的バリアが高まった状態で離乳を迎えることが離乳豚の下痢症予防となる可能性がある。

豚離乳期の下痢症予防として哺乳期の腸管内に *A. muciniphila* が定着するためには、母豚の管理が重要となる。哺乳子豚の腸内細菌叢の多くが生後初期に接触した環境（母豚の腔や皮膚、腸管、母乳）に由来した菌叢によって形成される[105]。腸内への細菌の定着は生後初日から始まり、生後直後の大腸の菌叢は母乳由来の細菌で形成されるが、徐々に消失し、35日齢までに母豚のふん便由来細菌に置き換わる[105]。母親由来の腸内細菌は他の伝播源の菌叢よりも子の腸管内で持続性があり、生態学的に適応していることが示されており[106]、母豚から子豚への腸内細菌叢の伝播は予防的手段となり得る。

また、本試験では腸管ムチンに着目して *A. muciniphila* の機能を検討したが、人ではムチン糖鎖と母乳に含まれるミルクオリゴ糖の構造が類似していることから、ムチン糖鎖に作用する酵素の多くはミルクオリゴ糖の分解にもかかわることが知られている[107, 108]。また、母乳中に *A. muciniphila* が存在し[109]、ミルクオリゴ糖を分解し、増殖することが確認されている[110, 111]。今後、母豚のふん便や母乳の菌叢確認に加え、ミルクオリゴ糖に着目した *A. muciniphila* の機能を検討したい。そして哺乳豚腸管への *A. muciniphila* 定着を目指し、母豚の腸内で *A. muciniphila* を増加させるプレバイオティクス素材の検討など、*A. muciniphila* の機能を応用した健康な腸管づくりを軸とした研究が、豚離乳期の下痢症予防と抗菌剤使用量削減に寄与すると考える。

4.5. 小 括

下痢発生農場と対照農場で哺乳豚、離乳豚、育成豚の3つの発育ステージにある豚の腸内菌叢を比較した結果、哺乳豚における酪酸産生菌、乳酸産生菌の割合に差はなかったが、対照農場で *Akkermansiaceae* および乳酸利用性酪酸産生菌の占有率が高い傾向を示した。離乳を経た育成期では対照農場は酪酸産生菌の占有率が高まり、ふん便中の短鎖脂肪酸濃度およびムチン濃度が有意に高くなったのに対し、下痢発生農場では乳酸産生菌の占有率が増加し、乳酸濃度が有意に高くなった。対照農場では、哺乳豚において、腸管に定着した *Akkermansiaceae* がムチン分解で糖鎖を供給し、酪酸産生菌がそれらを利用して、効率的に短鎖脂肪酸産生が進んだ結果、杯細胞からのムチン分泌が促進し、より一層 *Akkermansiaceae* が増殖するという循環が継続していると考えられた。したがって、哺乳期に *A. muciniphila* を保菌し、ムチンを利用した短鎖脂肪酸産生を促すことが腸管の健全な発育に繋がり、腸管の物理的バリアが高まった状態で離乳を迎えることが離乳豚の下痢症予防となる可能性がある。

第5章 総括

抗菌剤は動物の健康を守り、安全な畜産食品の安定した生産を確保するうえで重要な資材であり、畜産業において欠かせないものである。2019年の日本の抗菌剤販売量のうち、動物に使用される動物用医薬品と飼料添加物を合わせると全体の60%を占め、人体用の約2倍の抗菌剤が動物に使用されている。抗菌剤の使用には薬剤耐性菌が選択されるリスクが伴い、薬剤耐性率と抗菌剤使用量には相関が示されている。畜産での抗菌剤多用は家畜体内で薬剤耐性菌の出現を促し、獣医療における抗菌剤の有効性を低下させるだけでなく、畜産物や環境を介して人へ伝播し、人の抗菌剤治療を困難にするリスクも懸念されている。畜産現場における薬剤耐性菌の出現を監視する必要がある。そこで、病畜および健康畜から分離されたサルモネラの薬剤耐性に関する性状について調査を実施した。

静岡県内で発生した牛のサルモネラ症症例から分離されたサルモネラの薬剤耐性に関する性状を調査した。分離株は *Salmonella enterica* 血清型 4:i:- であり、基質特異性拡張型 β -ラクタマーゼ遺伝子 *bla*_{CTX-M-55} を染色体上に保有することが確認された。セファロスポリン系抗菌剤は人医療において多用されている抗菌剤の一つであり、特に第3,4世代セファロスポリンは小児サルモネラ症の主要な治療薬である。それらに耐性を示すサルモネラが家畜から分離されたことから、公衆衛生上、特段の注意を払う必要があると考えられた。

さらに2005~2006年に群馬県のと畜場に搬入された健康豚において、サルモネラの保菌調査およびサルモネラ陽性農場に対する追跡調査を実施し、分離株の血清型、薬剤耐性を比較した。追跡調査でサルモネラが分離された5農場のうち4農場では、保菌調査と同じ耐性型の *S. Typhimurium* が再び分離され、農場内の常在化、豚への感染持続が推察された。さらに OTC を含む多剤耐性 *S. Typhimurium* に加え、新たに OTC 単剤耐性 *S. Typhimurium* が複数農場で分離され、農場での薬剤使用により特定の株が選択された可能性が示唆された。

現在、薬剤耐性菌対策として、畜産の生産現場における感染予防・管理により抗菌剤の使用機会を削減することが求められている。近年、人や家畜の健康維持には腸内細菌が深く関わっていることが明らかになってきた。その中で、腸管の健康に関わる細菌として *Akkermansia muciniphila* が注目されており、人やマウスで研究が進ん

でいる一方で、豚における機能は明らかにされていない。抗菌剤使用量が最も多い豚において *A. muciniphila* の機能を活用した疾病予防、とりわけ養豚現場で発生が多い下痢症予防に取り組むことは抗菌剤使用量を削減する上で重要である。そこで、豚における下痢症発生に関した、*A. muciniphila* の機能性の解明に取り組んだ。

離乳後に下痢が多発する農場（下痢発生農場）と発生が少ない農場（対照農場）の哺乳、離乳、育成の3つの発育ステージのふん便中の *A. muciniphila* 検出率、有機酸濃度、ムチン濃度を比較した。下痢発生農場では哺乳豚で *A. muciniphila* 検出率が63.6%で、*A. muciniphila* を保菌していない個体が存在し、すべての発育ステージでムチン濃度が有意に低く、乳酸濃度が高い傾向を示した。一方、対照農場では、調査した哺乳期のすべての子豚から *A. muciniphila* が検出され、下痢発生農場と比較して哺乳豚での酪酸およびムチン濃度が有意に高かった。マウスでは *A. muciniphila* によりムチン産生が亢進することが明らかとなっているが、本研究において豚でも同様の作用が示唆された。また、育成豚ではすべての短鎖脂肪酸濃度が高い傾向を示し、ムチン濃度も有意に高くなった。このように生後まもない哺乳の時期から腸管の状態が異なることが明らかとなった。さらに、両農場で腸内細菌叢を解析、比較したところ、下痢発生農場では哺乳豚から育成豚にかけて一貫して乳酸産生菌が優位な菌叢であり、酪酸産生菌の占有率の増加は認められなかった。また、哺乳豚における *Akkermansiaceae* の占有率は約0.1%であった。腸管の乳酸蓄積は腸管上皮を刺激し生理的下痢を引き起こすとともに、pHの低下によりムチンの非酵素的分解が生じ、腸管の物理的バリアを低下させる要因にもなる。下痢発生農場では哺乳豚から生理的下痢および感染性下痢を生じやすい腸内環境にあると考えられた。対して対照農場では離乳前後で乳酸産生菌が優位な菌叢から、酪酸産生菌が優位な菌叢へと変化した。さらに哺乳豚において *Akkermansiaceae* の占有率が約1%であり、下痢発生農場と比較して高い傾向が認められた。対照農場では、哺乳豚において、腸管に定着した *Akkermansiaceae* がムチン分解で糖鎖を供給し、酪酸産生菌がそれらを利用し、効率的に短鎖脂肪酸産生が進んだ結果、杯細胞からのムチン分泌が促進し、より一層 *Akkermansiaceae* が増殖するという循環が継続していると考えられた。したがって、哺乳期に *A. muciniphila* を保菌し、ムチンを利用した短鎖脂肪酸産生を促すことが腸管の健全な発育につながり、腸管の物理的バリアが高まった状態で離乳を迎えることが離乳豚の下痢症予防となる可能性がある」と結論された。豚離乳期の下痢症対策と

して従来の病因に焦点を当てた抗菌剤の使用ではなく、腸内細菌 *A. muciniphila* の機能を応用し、宿主の腸管の健常化に取り組むことが、養豚現場における抗菌剤使用量削減に寄与すると考える。

今後、哺乳豚における *A. muciniphila* の定着と増殖に関わる要因として、母豚の腸内細菌叢とミルクオリゴ糖に着目した *A. muciniphila* の機能解明に加え、母豚の腸内で *A. muciniphila* を増加させるプレバイオティクス素材の検討など、豚離乳期の下痢症予防として *A. muciniphila* の応用を発展させたい。

Drug resistance in livestock and study on the utilization of intestinal bacteria in pigs for the reduction of antimicrobial agents.

1. Introduction

Antimicrobial agents are important for protecting animal health and the stable production of livestock products and are indispensable in the livestock industry. In 2019, the veterinary drugs and feed additives used together for animals accounted for 60% of all antimicrobial agent sales in Japan [7], which was approximately twice the amount used for human consumption. Among these, the use of tetracycline in pigs is extremely high, and its overuse is considered problematic. The use of antimicrobial agents carries the risk of selection for drug-resistant organisms, and a correlation has been demonstrated between the rate of drug resistance and the amount of antimicrobial agents used [6]. The high use of antimicrobial agents in the livestock industry not only encourages the emergence of drug-resistant bacteria in livestock and reduces the effectiveness of antimicrobial agents in veterinary medicine but also poses the risk of spreading to humans via livestock products and the environment, making antimicrobial treatment in human medicine more difficult [9,10]. Therefore, it is necessary to monitor the emergence of drug-resistant bacteria during livestock production. Therefore, I conducted a survey on the characteristics of drug resistance in *Salmonella* isolates from sick and healthy livestock.

In addition, there is a need to reduce the use of antimicrobial agents through infection prevention and control at livestock production sites as a measure against drug-resistant bacteria. In recent years, it has become clear that intestinal bacteria maintain human and livestock health [15-19]. Among these, *Akkermansia muciniphila* has attracted attention as a bacterium that is involved in intestinal tract health [30,31]. *A. muciniphila* is a gram-negative, anaerobic bacterium found in the mucus layer near the intestinal epithelial cells that degrades mucin, the main component of mucus. Short-chain fatty acids (acetic and propionic acids)

produced during mucin metabolism have been shown to provide an energy source for the intestinal epithelial cells, increase goblet cell density, enhance mucin production, and thicken the intestinal mucus layer [25,26]. The intestinal mucus layer is a nonspecific barrier that covers the intestinal epithelium and provides a habitat for intestinal bacteria, which are thought to play an important role in maintaining intestinal homeostasis [27]. Therefore, to reduce the use of antimicrobial agents, I used *A. muciniphila* to prevent diarrhea during the weaning period in pigs.

2. Drug resistance verification of *Salmonella* from livestock

(1) Characterization of the bacteria causing bovine salmonellosis

We investigated the characteristics of drug resistance in *Salmonella* isolated from bovine salmonellosis on dairy farms in Shizuoka prefecture, Japan. The isolate was *Salmonella enterica* serotype 4:i:-, a multidrug-resistant strain that was resistant to ampicillin (ABPC) and cefazolin (CEZ), as well as the third and fourth generation cephem antibiotics cefotaxime (CTX), cefepime (CFPM), cefpirome (CPR), chloramphenicol (CP), tetracycline (TC), and gentamicin (GM). In addition, the extended-spectrum β -Lactamase gene *bla*_{CTX-M-55} was carried on the chromosome. Cephem antibiotics are among the most widely used antimicrobial agents in human medicine, and third- and fourth-generation cepheims are the primary treatment for pediatric salmonellosis. Since *Salmonella* resistant to these agents has been isolated from domestic animals, it was considered necessary to pay special attention to them from the viewpoint of public health.

(2) Characterization of *Salmonella* from healthy pigs

Using the cecum contents of healthy pigs delivered to slaughterhouses in Gunma prefecture from 2005 to 2006, we conducted a survey of *Salmonella* carriage and a follow-up survey of *Salmonella*-positive farms and compared the serotypes and drug resistance of isolates. *Salmonella* was detected in 16 of the 48 farms (33.3%)

and 31 of the 471 pigs (6.6%), indicating that pig farms are widely infected with *Salmonella*. *Salmonella* Typhimurium resistant to five (ABPC, CP, dihydrostreptomycin (DSM), oxytetracycline (OTC), and sulfadimethoxine (SDMX) or six (ABPC, CP, DSM, OTC, SDMX, and Nalidixic Acid) drugs was detected in 14 of the 16 farms where *Salmonella* was detected. In four of the five farms where *Salmonella* was isolated in the follow-up survey, *S. Typhimurium* was again isolated in the same resistant form as in the surveillance, suggesting that *S. Typhimurium* is endemic to the farms and causes persistent infection in pigs. In addition to multidrug-resistant *S. Typhimurium* and new OTC monodrug-resistant *S. Typhimurium* were isolated from several farms, suggesting that specific strains may have been selected for on-farm drug use.

3. Study on diarrhea in pigs during the weaning period

Fresh feces were collected from suckling pigs (10–20 days old, n = 11), weaned pigs (28–35 days old, n = 6), and growing pigs (42–60 days old, n = 6) at three developmental stages on farm with and without diarrhea after weaning. The detection rates of *A. muciniphila*, organic acid concentrations, and mucin concentrations in feces were compared.

The results showed that the detection rate of *A. muciniphila* in suckling pigs was 63.6% in diarrheal farm, whereas some pigs did not have *A. muciniphila*, and all developmental stages showed significantly lower mucin concentrations and higher lactic acid concentrations.

In contrast, *A. muciniphila* was detected in all suckling pigs from the control farm, and the butyrate and mucin concentrations in the suckling pigs were significantly higher. It has been shown that mucin production is enhanced by *A. muciniphila* in mice [25], and similar effects were suggested in pigs. All short-chain fatty acid concentrations tended to be higher in growing pigs, and mucin concentrations were significantly higher. These results suggest that the condition of the intestinal tract of suckling pigs of diarrheal farm differs from that of control pigs in the early postnatal period and that the presence of *A. muciniphila* in

suckling pigs may be a factor that prevents diarrhea in weaning pigs. In contrast, *A. muciniphila* produces acetic and propionic acids, but not butyric acid, during mucin degradation [24]. The reason for the higher butyric acid levels in control pigs is unknown. Further studies are needed to investigate the interaction between *A. muciniphila* and other enterobacteria and the differences in the occupancy of *A. muciniphila* in the total flora between diarrheal and control farm.

4. Study on prevention of diarrhea in weaning pigs

Based on the results of the previous section, I compared the intestinal microbiota of diarrhea and control farm at various developmental stages by amplicon analysis of the V3-V4 regions of the 16S rRNA gene using MiSeq, a next-generation DNA sequencer to clarify the characteristics of the microbiota in the two farms and differences in growth-related changes in the microbiota. The results showed that lactic acid-producing bacteria consistently dominated the flora from suckling to growing pigs in farm with diarrhea, and there was no increase in the occupancy of butyrate-producing bacteria. The abundance of *Akkermansiaceae* in suckling pigs was approximately 0.1%. Lactic acid accumulation in the intestinal tract irritates the intestinal epithelium and causes physiological diarrhea [83], whereas a decrease in pH results in non-enzymatic degradation of mucin [101], which lowers the physical barrier of the intestinal tract. Diarrheal farm have an intestinal environment that is prone to physiological and infectious diarrhea in suckling pigs.

In contrast, in the control farms, the flora changed from a predominance of lactic acid-producing bacteria to a predominance of butyrate-producing bacteria before and after weaning. In addition, *Akkermansiaceae* accounted for approximately 1% of the total suckling pigs, which was higher than that in diarrheal farm. *Akkermansiaceae* possess a series of enzymes related to the degradation of mucin glycans [24,97]. In the control farm, *Akkermansiaceae*, which settled in the intestinal tract of suckling pigs, degraded mucin and provided sugar chains, which were utilized by butyrate-producing bacteria to efficiently produce short-chain fatty acids, resulting in enhanced mucin secretion and further growth of

Akkermansiaceae, suggesting that the cycle continued. Therefore, it was concluded that the retention of *A. muciniphila* during the suckling period and the promotion of short-chain fatty acid production using mucin may lead to healthy development of the intestinal tract and that physical barrier of the intestinal tract may prevent diarrhea in weaning pigs. The intestinal flora of suckling piglets is formed by the flora derived from the environment (sow's vagina, skin, intestinal tract, and milk) that comes into contact with during the early postnatal period [105]. Transmission of flora from sows to piglets is a means of preventing weaning diarrhea. We believe that the application of the function of the intestinal bacterium *A. muciniphila* to the normalization of the host intestinal tract will contribute to a reduction in antimicrobial use in swine production.

謝 辞

終わりに臨み、懇切なるご指導を賜りました、秋田県立大学生物資源科学部応用生物科学科教授，福島淳 博士および，准教授，志村洋一郎 博士に心より深謝いたします。

さらに，有益なるご助言を賜りました，秋田県立大学生物資源科学部応用生物科学科准教授，村口元 博士，麻布大学名誉教授，押田敏雄 博士，静岡県立農林環境専門職大学教授，祐森誠司 博士に深謝いたします。

また，調査にご協力いただきました，群馬県食肉衛生検査所職員の皆様，静岡県西部地域の養豚場の皆様に感謝いたします。

参考文献

- [1] Bartley E.E., Fountaine F.C., Atkeson F.W. (1950). The effects of an APF concentrate containing aureomycin on the growth and well-being of young dairy calves. *Journal of Animal Science* **9**: 646-647.
- [2] Jukes T.H., Stokstad E.L.R., Tayloe R.R., Combs T.J., Edwards H.M., Meadows G.B. (1950). Growth promoting effect of aureomycin on pigs. *Archives of Biochemistry* **26**: 324-330.
- [3] Loosli J.K., Wallace H.D. (1950). Influence of APF and aureomycin on growth of dairy calves. *Proceedings of the Society of Experimental Biology and Medicine* **75**: 531-533.
- [4] Moore P.R., Evenson A., Luckey T.D., McCoy E., Elvehjem, E.A., Hart E.B. (1946). Use of sulphasuccidine, streptothricin and streptomycin in nutrition studies with the chick. *Journal of Biological Chemistry* **165**: 437-441.
- [5] Stokstad E.L.R., Jukes T.H., Pierce J., Page A.C.Jr., Franklin A.L. (1949). The multiple nature of the animal protein factor. *Journal of Biological Chemistry* **180**: 647-654.
- [6] Asai T., Kojima A., Harada K., Ishihara K., Takahashi T., 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 Disease* **58**: 369-372.
- [7] 厚生労働省薬剤耐性ワンヘルス動向調査検討会. (2022). 薬剤耐性ワンヘルス動向調査年次書. <https://www.mhlw.go.jp/content/10900000/001182435.pdf>
- [8] 農林水産省動物医薬品検査所. (2021). 令和3年動物用医薬品, 医薬部外品及び医療機器販売高年報
- [9] You Y., Silbergeld E.K. (2014). Learning from agriculture: understanding low-dose antimicrobials as drivers of resistome expansion. *Frontiers in Microbiology* **5**: 284.
- [10] 白井優 (2019). 獣医療や環境における薬剤耐性問題の実態とその対策. 家畜感

染症学雑誌 8: 89-97.

- [11] Zhu Y.G., Zhao Y.I., Li B., Huang C.L., Zhang S.Y., Yu S., Chen Y.S., Zhang T., Gillings M.R., Su J.Q. (2017). Continental-scale pollution of estuaries with antibiotic resistance genes. *Nature Microbiology* **2**: 1-7.
- [12] Naas T., Nordmann P. (1994). Analysis of a carbapenem-hydrolyzing class A beta-lactamase from *Enterobacter cloacae* and of its LysR-type regulatory protein. *Proceedings of National Academy of Sciences, USA* **91**(16): 7693-7697.
- [13] Jim O'Neill. (2016). Review on antimicrobial resistance: tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations.
- [14] 厚生労働省. (2016). 国際的に脅威となる感染症対策関係閣僚会議, 薬剤耐性菌 (AMR)対策アクションプラン 2016-2020.
- [15] Honda K., Littman D.R. (2016). The microbiota in adaptive immune homeostasis and disease. *Nature* **535**: 75-84.
- [16] Ley R.E., Turnbaugh P.J., Klein S., Gordon J.I. (2006). Human gut microbes associated with obesity. *Nature* **444**: 1022-1023.
- [17] Png C.W., Lindén S.K., Gilshenan K.S., Zoetendal E.G., McSweeney C.S., Sly L.I., McGuckin M.A., Florin T.H. (2010). Mucolytic bacteria with increased prevalence in IBD mucosa augment *in vitro* utilization of mucin by other bacteria. *Official Journal of the American College of Gastroenterology* **105**: 2420-2428.
- [18] Swidsinski A., Dörffel Y., Loening-Baucke V., Theissig F., Rückert J.C., Ismail M., Rau W.A., Gaschler D., Weizenegger M., Kühn S., Schilling J., Dörffel W.V. (2011). Acute appendicitis is characterised by local invasion with *Fusobacterium nucleatum* / *necrophorum*. *Gut* **60**: 34-40.
- [19] Turnbaugh P.J., Ley R.E., Mahowald M.A., Magrini V., Mardis E.R., Gordon J.I. (2006). An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature* **444**: 1027-1031.
- [20] Uryu H., Tsukahara T., Ishikawa H., Oi M., Otake S., Yamane I., Inoue R. (2020). Comparison of productivity and fecal microbiotas of sows in commercial farms. *Microorganisms* **8**: 1469.

- [21] Ramayo-Caldas Y., Mach N., Lepage P., Levenez F., Denis C., Lemonnier G., Leplat J.J., Billon Y., Berri M., Doré J., Rogel-Gaillard C., Estellé J. (2016). Phylogenetic network analysis applied to pig gut microbiota identifies an ecosystem structure linked with growth traits. *The ISME Journal* **10**: 2973-2977.
- [22] Wang H., Ji Y., Yin C., Deng M., Tang T., Deng B., Ren W., Deng J., Yin Y., Tan C. (2018). Differential analysis of gut microbiota correlated with oxidative stress in sows with high or low litter performance during lactation. *Frontiers in Microbiology* **9**: article 1665.
- [23] Luise D., Le Sciellour M., Buchet A., Resmond R., Clement C., Rossignol M.N., Jardet D., Zemb O., Belloc C., Merlot E. (2021). The fecal microbiota of piglets during weaning transition and its association with piglet growth across various farm environments. *PLoS One* **16**: e0250655.
- [24] Derrien M., Vaughan E.E., Plugge C.M., de Vos, W.M. (2004). *Akkermansia muciniphila* gen. nov., sp. nov., a human intestinal mucin-degrading bacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **54**: 1469-1476.
- [25] Shin J., Noh J.R., Chang D.H., Kim Y.H., Kim M.H., Lee E.S., Cho S., Ku B.J., Rhee M.S., Kim B.C., Lee C.H., Cho B.K. (2019). Elucidation of *Akkermansia muciniphila* probiotic traits driven by mucin depletion. *Frontiers in Microbiology* **10**: article 1137.
- [26] Everard A., Belzer C., Geurts L., Ouwerkerk J.P., Druart C., Bindels L.B., Guiot Y., Derrien M., Muccioli G.G., Delzenne N.M., de Vos W.M., Cani P.D. (2013). Cross-talk between *Akkermansia muciniphila* and intestinal epithelium controls diet-induced obesity. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **110**: 9066-9071.
- [27] Marcobal A., Southwick A.M., Earle K.A., Sonnenburg J.L. (2013). A refined palate: bacterial consumption of host glycans in the gut. *Glycobiology* **23**: 1038-1046.
- [28] Kim S., Covington A., Pamer E.G. (2017). The intestinal microbiota:

- Antibiotics, colonization resistance, and enteric pathogens. *Immunological Reviews* **279**: 90-105.
- [29] Belzer C., De Vos W.M. (2012). Microbes inside—from diversity to function: the case of *Akkermansia*. *The ISME Journal* **6**: 1449-1458.
- [30] Cani P.D., de Vos W.M. (2017). Next-generation beneficial microbes: the case of *Akkermansia muciniphila*. *Frontiers in Microbiology* **8**: article 1765.
- [31] EFSA Panel on Nutrition, Novel Foods and Food Allergens (NDA), Turck D., Bohn T., Castenmiller J., De Henauw S., Hirsch - Ernst K.I., Maciuk A., Mangelsdorf I., McArdle H.J., Naska A., Pelaez C., Pentieva K., Siani A., Thies F., Tsabouri S., Vinceti M., Cubadda F., Frenzel T., Heinonen M., Marchelli R., Neuhäuser-Berthold M., Poulsen M., Maradona M.P., Schlatter J.R., van Loveren H., Ackel R., Knutsen H.K. (2021). Safety of pasteurised *Akkermansia muciniphila* as a novel food pursuant to Regulation (EU) 2015/2283. *EFSA Journal* **19**: e06780.
- [32] Geerlings S.Y., Ouwerkerk J.P., Koehorst J.J., Ritari J., Aalvink S., Stecher B., Schaap P.J., Paulin L., de Vos W.M., Belzer C. (2021). Genomic convergence between *Akkermansia muciniphila* in different mammalian hosts. *BMC Microbiology* **21**: 1-13.
- [33] Carattoli A. (2009). Resistance plasmid families in *Enterobacteriaceae*. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* **53**: 2227-2238.
- [34] Echeita M.A., Usera M.A. (1998). Rapid identification of *Salmonella* spp. phase 2 antigens of the H1 antigenic complex using "multiplex PCR". *Research in Microbiology* **149**: 757-761.
- [35] Chaudhary U., Aggarwal R. (2004). Extended spectrum β -lactamases (ESBL)—An emerging threat to clinical therapeutics. *Indian Journal of Medical Microbiology* **22**: 75-80.
- [36] Akiba M., Sekizuka T., Yamashita A., Kuroda M., Fujii Y., Murata M., Lee K., Josha D.I., Balakrishna K., Bairy I., Subramanian K., Krishnan P., Munuswamy N., Sinha R.K., Iwata T., Kusumoto M., Guruge K.S. (2016). Distribution and relationships of antimicrobial resistance determinants

- among extended-spectrum-cephalosporin-resistant or carbapenem-resistant *Escherichia coli* isolates from rivers and sewage treatment plants in India. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **60**: 2972-2980.
- [37] Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W., Lipman D.J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* **215**: 403-410.
- [38] Shahada F., Sekizuka T., Kuroda M., Kusumoto M., Ohishi D., Matsumoto A., Okazaki H., Tanaka K., Uchida I., Izumiya H., Watanabe H., Tamamura Y., Iwata T., Akiba M. (2011). Characterization of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium isolates harboring a chromosomally encoded CMY-2 beta-lactamase gene located on a multidrug resistance genomic island. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **55**: 4114-4121.
- [39] 農林水産省消費・安全局動物衛生課. (2018). サルモネラ (4:i:-) の取り扱いについて：平成 30 年 3 月 29 日：29 消安第 6791 号.
- [40] 秋庭正人. (2017). 平成 28 年度戦略的監視・診断体制整備事業（病原体（サルモネラ(4:i:-)）の収集・解析委託事業）調査報告書.
- [41] Okubo T., Sato T., Yokota S., Usui M., Tamura Y. (2014). Comparison of broad-spectrum cephalosporin-resistant *Escherichia coli* isolated from dogs and humans in Hokkaido, Japan. *Journal of Infection and Chemotherapy* **20**: 243-249.
- [42] 吉川晃司, 森武潤, 鈴木鑑, 吉良慎一郎, 小出晴久, 清田浩, 堀 誠治. (2014). 尿路由来基質特異性拡張型 β -ラクタマーゼ産生大腸菌の検出状況および薬剤感受性の検討. *日本化学療法学会雑誌* **62**: 198-203.
- [43] 原田和紀, 浅井鉄夫. (2015). 動物に由来する CTX-M 型基質拡張型 β -ラクタマーゼ産生大腸菌. *日本化学療法学会雑誌* **63**: 181-186.
- [44] 佐藤宏樹, 山上左都子, 高橋恵, 平泉美栄子, 森山泰穂. (2021). ブロイラー養鶏場およびその種鶏場から分離された基質特異性拡張型 β -ラクタマーゼ産生菌の遺伝学的性状. *鶏病研究会報* **57**: 27-30.
- [45] Bonnet R. (2004). Growing group of extended-spectrum β -Lactamases, the CTX-M enzymes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **48**: 1-14.
- [46] Winokur P.L., Vonstein D.L., Hoffman L.J., Uhlenhopp E.K., Doern G.V.

- (2001). Evidence for transfer of CMY-2 AmpC β -Lactamase plasmids between *Escherichia coli* and *Salmonella* isolates from food animals and humans. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **45**: 2716-2722.
- [47] Zhang C.Z., Ding X.M., Lin X.L., Sun R.Y., Lu Y.W., Cai R.M., Webber M.A., Ding H.Z., Jiang H.X. (2019). The Emergence of chromosomally located *bla*_{CTX-M-55} in *Salmonella* from foodborne animals in China. *Frontiers in Microbiology* **10**: article 1268.
- [48] Inamoto T., Takahashi H., Yamamoto K., Nakai Y., Ogimoto K. (1994). Antibiotic susceptibility of *Mycoplasma hyopneumoniae* isolated from swine. *Journal of Veterinary Medical Science* **56**: 393-394.
- [49] Inamoto T., Kikuchi K., Iijima H., Kawashima Y., Nakai Y., Ogimoto K. (1994). Antibacterial activity of tilmicosin against *Pasteurella multocida* and *Actinobacillus pleuropneumoniae* isolated from pneumonic lesions in swine. *Journal of Veterinary Medical Science* **56**: 917-921.
- [50] Katsuda K., Kohmoto M., Mikami O., Uchida I. (2009). Antimicrobial resistance and genetic characterization of fluoroquinolone-resistant *Mannheimia haemolytica* isolates from cattle with bovine pneumonia. *Veterinary Microbiology* **139**: 74-79.
- [51] 木口陽介, 小嶋暢, 遠藤千春, 齋藤友佳, 楠本正博. (2014). ブロイラーから分離された大腸菌の β -ラクタマーゼ産生性及び分子疫学的性状に関する研究. *日本獣医学会誌* **67**: 739-746.
- [52] 浅井鉄夫. (2017). 豚における薬剤耐性菌対策. *All about swine* **50**: 2-6.
- [53] 貞弘恵, 鈴木一步, 室伏淳一, 松井小雪, 秋庭正人. (2021). CTX-M-55 β ラクタマーゼ産生性 *Salmonella enterica* 血清型 4:i:-による牛サルモネラ症発生事例と薬剤耐性遺伝子の解析. *日本畜産環境学会会誌* **19-20**: 34-41.
- [54] Fedorka-Cray P.J., Whipp S.C., Isaacson R.E., Nord N., Lager K. (1994). Transmission of *Salmonella* Typhimurium to swine. *Veterinary Microbiology* **41**: 333-344.
- [55] 田中饒. (1974). 公衆衛生の立場からみたサルモネラをめぐる最近の諸問題. *日本獣医師会雑誌* **27**: 475-481.

- [56] CLSI (2002) Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals. 2nd ed. *Approved Standard M31-A2*.
- [57] 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). *Journal of Veterinary Medical Science* **68**: 881-884.
- [58] Futagawa-Saito K., Hiratsuka S., Kamibeppu M., Hirose T., Oyabu K., Fukuyasu T. (2008). *Salmonella* in healthy pigs: prevalence, serotype diversity and antimicrobial resistance observed during 1998–1999 and 2004–2005 in Japan. *Epidemiology & Infection* **136**: 1118-1123.
- [59] 佐藤博, 齊藤こずえ, 原智之, 阿部久司. (2021). 肥育豚の盲腸内容物と回結腸リンパ節からのサルモネラの分離. *日本獣医師会雑誌* **74**: 255-258.
- [60] 高田勇人, 井上伸子, 天田貴昌, 信澤敏夫, 中嶋隆, 石岡大成, 藤田雅弘, 森田幸雄. (2008). 豚におけるサルモネラの保菌状況と分離菌の血清型, 薬剤感受性およびゲノム型. *日本獣医師会雑誌* **61**: 65-69.
- [61] 吉田孝治, 高橋勇, 澤田拓士. (1995). 1975～1989年に食肉衛生検査所へ搬入された健康豚のサルモネラ保菌状況とその血清型. *日本細菌学雑誌* **50**: 537-545.
- [62] 農林水産省. (2017). 食品安全に関する有害微生物の実態調査の結果集 (畜産物). <https://www.maff.go.jp/j/syouan/seisaku/kekka/butaniku/sal/01.html>
- [63] 農林水産省消費安全局動物衛生課. (2022). 監視伝染病発生年報. https://www.maff.go.jp/j/syouan/douei/kansi_densen/attach/pdf/kansi_densen-115.pdf
- [64] Sameshima T., Akiba M., Izumiya H., Terajima J., Tamura K., Watanabe H., Nakazawa M. (2000). *Salmonella* Typhimurium DT104 from livestock in Japan. *Japanese Journal of Infectious Diseases* **53**: 15-16.
- [65] Esaki H., Morioka A., Kojima A., Ishihara K., Asai T., Tamura Y., Izumiya H., Terajima J., Watanabe H., 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**: 553-556.
- [66] 末吉益雄. (2014). 最新家畜衛生ハンドブック. 51頁. 日本家畜衛生学会編, 養賢堂, 東京.
- [67] Cera K.R., Mahan D.C., Cross R.F., Reinhart G.A., Whitmoyer R.E. (1988). Effect of age, weaning and postweaning diet on small intestinal growth and jejunal morphology in young swine. *Journal of Animal Science* **66**: 574-584.
- [68] Inoue R., Tsukahara T., Nakatani M., Okutani M., Nishibayashi R., Ogawa S., Harayama T., Nagino T., Hatanaka H., Fukuta K., Romero-Pérez G.A., Ushida K., Kelly D. (2015). Weaning markedly affects transcriptome profiles and Peyer's patch development in piglet ileum. *Frontiers in Immunology* **6**: article 630.
- [69] De Lange C.F.M., Pluske J., Gong J. (2010). Strategic use of feed ingredients and feed additives to stimulate gut health and development in young pigs. *Livestock Science* **134**: 124-134.
- [70] Tsukahara T., Inoue R., Nakatani M., Fukuta K., Kishino E., Ito T., Ushida K. (2016). Influence of weaning age on the villous height and disaccharidase activities in the porcine small intestine. *Animal Science Journal* **87**: 67-75.
- [71] Hedemann M.S., Højsgaard S., Jensen B.B. (2003). Small intestinal morphology and activity of intestinal peptidases in piglets around weaning. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* **87**: 32-41.
- [72] 清水実嗣. (1984). 豚のウイルス性胃腸炎. *日本獣医師会雑誌* **37**: 349-356.
- [73] 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**: 350–354.
- [74] Hansson G.C., Johansson M.E.V. (2010). The inner of the two Muc2 mucin-dependent mucus layers in colon is devoid of bacteria. *Gut Microbes* **1**: 51-54.
- [75] Morita H., Kuwahara T., Ohshima K., Sasamoto H., Itoh K., Hattori M., Hayashi T., Takami H. (2007). An improved DNA isolation method for metagenomic analysis of the microbial flora of the human intestine. *Microbes*

and Environments **22**: 214-222.

- [76] Collado M.C., Derrien M., Isolauri E., de Vos W.M., Salminen S. (2007). Intestinal integrity and *Akkermansia muciniphila*, a mucin-degrading member of the intestinal microbiota present in infants, adults, and the elderly. *Applied and Environmental Microbiology* **73**: 7767-7770.
- [77] Leonel A.J., Alvarez-Leite J.I. (2012). Butyrate implications for intestinal function. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care* **15**: 474-479.
- [78] Bartholome A.L., Albin D.M., Baker D.H., Holst J.J., Tappenden K.A. (2004). Supplementation of total parenteral nutrition with butyrate acutely increases structural aspects of intestinal adaptation after an 80% jejunioileal resection in neonatal piglets. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition* **28**: 210-222.
- [79] Dalmasso G., Nguyen H.T.T., Yan Y., Charrier-Hisamuddin L., Sitaraman S.V., Merlin D. (2008). Butyrate transcriptionally enhances peptide transporter PepT1 expression and activity. *PLoS One* **3**: e2476.
- [80] Shimotoyodome A., Meguro S., Hase T., Tokimitsu I., Sakata T. (2020). Short-chain fatty acids, but not lactate or succinate, stimulate mucus release in the rat colon. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular and Integrative Physiology* **125**: 525-531.
- [81] Piao S.J., Tsukahara T., Itoh M., Shiga A., Adachi Y., Ushida K. (2007). The organic acid profiles in the feces of pigs at *Brachyspira hyodysenteriae*- or *B. pilosicoli*-positive farms. *Journal of Veterinary Medical Science* **69**: 425-428.
- [82] Umesaki Y., Yajima T., Yokokura T., Mutai M. (1979). Effect of organic acid absorption on bicarbonate transport in rat colon. *Pflügers Archive* **379**: 43-47.
- [83] Tsukahara T., Ushida K. (2001). Organic acid profiles in feces of pigs with pathogenic or non-pathogenic diarrhea. *Journal of Veterinary Medical Science* **63**: 1351-1354.
- [84] Bolyen E., Rideout J.R., Dillon M.R., Bokulich N.A., Abnet C.C., Al-Ghalith

- G.A., Alexander H., Alm E.J., Arumugam M., Asnicar F., Bai Y., Bisanz J.E., Bittinger K., Brejnrod A., Brislawn C.J., Brown C.T., Callahan B.J., Caraballo-Rodríguez A.M., Chase J., Cope E.K., Da Silva R., Diener C., Dorrestein P.C., Douglas G.M., Durall D.M., Duvallet C., Edwardson C.F., Ernst M., Estaki M., Fouquier J., Gauglitz J.M., Gibbons S.M., Gibson D.L., Gonzalez A., Gorlick K., Guo J., Hillmann B., Holmes S., Holste H., Huttenhower C., Huttley G.A., Janssen S., Jarmusch A.K., Jiang L., Kaehler B.D., Kang K.B., Keefe C.R., Keim P., Kelley S.T., Knights D., Koester I., Kosciolk T., Kreps J., Langille M.G.I., Lee J., Ley R., Liu Y.X., Loftfield E., Lozupone C., Maher M., Marotz C., Martin B.D., McDonald D., McIver L.J., Melnik A.V., Metcalf J.L., Morgan S.C., Morton J.T., Naimey A.T., Navas-Molina J.A., Nothias L.F., Orchanian S.B., Pearson T., Peoples S.L., Petras D., Preuss M.L., Pruesse E., Rasmussen L.B., Rivers A., Robeson M.S., Rosenthal P., Segata N., Shaffer M., Shiffer A., Sinha R., Song S.J., Spear J.R., Swafford A.D., Thompson L.R., Torres P.J., Trinh P., Tripathi A., Turnbaugh P.J., Ul-Hasan S., van der Hooft J.J.J., Vargas F., Vázquez-Baeza Y., Vogtmann E., von Hippel M., Walters W., Wan Y., Wang M., Warren J., Weber K.C., Williamson C.H.D., Willis A.D., Xu Z.Z., Zaneveld J.R., Zhang Y., Zhu Q., Knight R., and Caporaso J.G. (2019). Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nature Biotechnology* **37**: 852-857.
- [85] Callahan B.J., McMurdie P.J., Rosen M.J., Han A.W., Johnson A.J.A., Holmes S.P. (2016). DADA2: high-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature Methods* **13**: 581-583.
- [86] Katoh K., Misawa K., Kuma K., Miyata T. (2002). MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic Acids Research* **30**:3059-3066.
- [87] Price M.N., Dehal P.S., Arkin A.P. (2010). FastTree 2—approximately maximum - likelihood trees for large alignments. *PLoS ONE* **5**: e9490.
- [88] Faith D.P. (1992). Conservation evaluation and phylogenetic diversity.

Biological Conservation **61**: 1 - 10.

- [89] Robeson M.S., O'Rourke D.R., Kaehler B.D., Ziemski M., Dillon M.R., Foster J.T., Bokulich N.A. (2020). RESCRIPt: Reproducible sequence taxonomy reference database management for the masses. *bioRxiv* 2020.10.05.326504; doi: <https://doi.org/10.1101/2020.10.05.326504>.
- [90] Bokulich N.A., Kaehler B.D., Rideout J.R. Dillon M., Bolyen E., Knight R., Huttley G.A., Caporaso J.G. (2018). Optimizing taxonomic classification of marker-gene amplicon sequences with QIIME 2's q2-feature-classifier plugin. *Microbiome* **6**: article no. 90. <https://doi.org/10.1186/s40168-018-0470-z>
- [91] Shannon C.E. (1948). A mathematical theory of communication. *The Bell System Technical Journal* **27**: 379-423.
- [92] Tanabe H., Ito H., Sugiyama K., Kiriya S., Morita T. (2006). Dietary indigestible components exert different regional effects on luminal mucin secretion through their bulk-forming property and fermentability. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **70**: 1188–1194.
- [93] Sakata T. (2018). Pitfalls in short-chain fatty acid research: A methodological review. *Animal Science Journal* **90**: 1-13.
- [94] Barcelo A., Claustre J., Moro F., Chayvialle J.A., Cuber J.C., Plaisancié P. (2000). Mucin secretion is modulated by luminal factors in the isolated vascularly perfused rat colon. *Gut* **46**: 218-224.
- [95] Sakata T., Setoyama H. (1995). Local stimulatory effect of short-chain fatty acids on the mucus release from the hindgut mucosa of rats (*Rattus norvegicus*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology* **111**: 429-432.
- [96] Van den Abbeele P., Gerard P., Rabot S., Bruneau A., Aidy S.E., Derrien M., Kleerebezem M., Zoetendal E.G., Smidt H., Verstraete W., Van de Wiele T. (2011). Arabinoxylans and inulin differentially modulate the mucosal and luminal gut microbiota and mucin-degradation in humanized rats. *Environmental Microbiology* **13**: 2667-2780.
- [97] Tailford L.E., Crost E.H., Kavanaugh D., Juge N. (2015). Mucin glycan for

- aging in the human gut microbiome. *Frontiers in Genetics* **6**: article 81.
- [98] Hino S., Mizushima T., Kaneko K., Kawai E., Kondo T., Genda T., Yamada T., Hase K., Nishimura N., Morita, T. (2020). Mucin-derived O-glycans act as endogenous fiber and sustain mucosal immune homeostasis via short-chain fatty acid production in rat cecum. *The Journal of Nutrition* **150**: 2656-2665.
- [99] Hoshi S., Sakata T., Mikuni K., Hashimoto H., Kimura S. (1994). Galactosylsucrose and xylosylfructoside alter digestive tract size and concentrations of cecal organic acids in rats fed diets containing cholesterol and cholic acid. *The Journal of Nutrition* **124**: 52-60.
- [100]金子勉.(1994) . 異常環境下における乳酸菌の適応. *Japanese Journal of Dairy and Food Science* **43**: 25-34.
- [101]Lidell M.E., Johansson M.E.V., Hansson G.C. (2003). An autocatalytic cleavage in the c terminus of the human MUC2 mucin occurs at the low pH of the late secretory pathway. *Journal of Biological Chemistry* **278**: 13944-13951.
- [102]Tsukahara T., Iwasaki Y., Nakayama K., Ushida K. (2002). An improved technique for the histological evaluation of the mucus-secreting status in rat cecum. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology* **48**: 311-314.
- [103]Morita T., Kasaoka S., Ohhashi A., Ikai M., Numasaki Y., Kiriya S. (1998). Resistant proteins alter cecal short-chain fatty acid profiles in rats fed high amylose cornstarch. *The Journal of Nutrition* **128**: 1156-1164.
- [104]Genda T., Sasaki Y., Kondo T., Hino S., Nishimura N., Tsukahara T., Sonoyama K., Morita T. (2017). Fructo-oligosaccharide-Induced Transient Increases in Cecal Immunoglobulin A Concentrations in Rats Are Associated with Mucosal Inflammation in Response to Increased Gut Permeability. *The Journal of Nutrition* **147**: 1900-1908.
- [105]Liu H., Zeng X., Zhang G., Hou C., Li N., Yu H., Shang L., Zhang X., Trevis P., Yang F., Liu Z., Qiao S. (2019). Maternal milk and fecal microbes guide the spatiotemporal development of mucosa-associated microbiota and barrier function in the porcine neonatal gut. *BMC Biology* **17**: 1-15.

- [106] Ferretti P., Pasolli E., Tett A., Asnicar F., Gorfer V., Fedi S., Armanini F., Truong D.T., Manara S., Zolfo M., Beghini F., Bertorelli R., De Sanctis V., Bariletti I., Canto R., Clementi R., Cologna M., Crifo T., Cusumano G., Gottardi S., Innamorati C., Mase C., Postai D., Savoi D., Duranti S., Lugli G.A., Mancabelli L., Turrone F., Ferrario C., Milani C., Mangifesta M., Anzalone R., Viappiani A., Yassour M., Vlamakis H., Xavier R., Collado C.M., Koren O., Tateo S., Soffiati M., Pedrotti A., Ventura M., Huttenhower C., Bork P., Segata N. (2018). Mother-to-infant microbial transmission from different body sites shapes the developing infant gut microbiome. *Cell Host & Microbe* **24**: 133-145.
- [107] Kitaoka M. (2012). Bifidobacterial enzymes involved in the metabolism of human milk oligosaccharides. *Advances in Nutrition*. **3**: 422S-429S.
- [108] Katayama T. (2016). Host-derived glycans serve as selected nutrients for the gut microbe: human milk oligosaccharides and bifidobacteria. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **80**: 621-632.
- [109] Collado M.C., Laitinen K., Salminen S., Isolauri E. (2012). Maternal weight and excessive weight gain during pregnancy modify the immunomodulatory potential of breast milk. *Pediatric Research* **72**: 77-85.
- [110] Luna E., Parkar S.G., Kirmiz N., Hartel S., Hearn E., Hossine M., Kurdian A., Mendoza C., Orr K., Padilla L., Ramirez K., Salcedo P., Serrano E., Choudhury B., Paulchakrabarti M., Parker C.T., Huynh S., Cooper K., Flores G.E. (2022). Utilization efficiency of human milk oligosaccharides by human-associated *Akkermansia* is strain dependent. *Applied and Environmental Microbiology* **88**: e01487-21.
- [111] Kostopoulos I., Elzinga J., Ottman N., Klievink J.T., Blijenberg B., Aalvink S., Boeren S., Mank M., Knol J., de Vos W.M., Belzer C. (2020). *Akkermansia muciniphila* uses human milk oligosaccharides to thrive in the early life conditions in vitro. *Scientific Reports* **10**: 14330.