

## (9) 豚腸炎における肉眼所見とサイトカイン遺伝子発現量の関係

○岡田珠里亜、西村 肇、黒岩俊裕、鈴木麻弥、佐々木秀樹

### はじめに

と畜検査とは、疾病や異常のある獣畜の肉等が流通しないよう、食用不適として排除するための検査であり、と畜場法に基づいて行われる検査である。疾病や異常の有無は獣医師であると畜検査員がと畜検査実施要領に基づき、望診及び触診を基本として肉眼所見で判断している。

肉眼所見では判断が不可能な場合には保留措置とし、微生物学的検査、病理学的検査または理化学的検査のいずれかの精密検査が行われる。このうち病理学的検査は、薄切・染色した組織を光学顕微鏡で観察し、組織構造や細胞形態の異常の有無等を診断する検査で、当検査所では主に白血病等の腫瘍が疑われる場合に実施される。診断は異常を呈した病変を中心に展開されるため、これまで当検査所では病変周囲に生じている免疫反応についてはあまり検討してこなかった。しかしながら、近年、腫瘍性病変を評価するうえで、腫瘍細胞と反応性に集簇した正常免疫系細胞を識別して診断を行う必要のある症例[1]に遭遇するなど、周囲で起こる反応の評価も欠かせなくなってきた。そこで、病変の有無のみでなく周辺の免疫反応の状態を明らかにし、それらと肉眼所見との関連を検討することで検査精度の向上を図ることを目的として本調査を行った。

### 材料及び方法

#### ・材料

動物種はL系雑種の豚、年齢は6か月齢で、当検査所で所管すると畜場において腸炎と判断され廃棄対象となった腸及び腸間膜リンパ節30頭分を検体とした。

#### ・方法

##### (1) 肉眼的重症度の評価

肉眼評価として、腸漿膜及び粘膜における出血、水腫や偽膜形成の有無等をもとに、表1のとおり1から5の5段階評価を行った。腸壁の軽度肥厚または菲薄化、腸間膜に軽度の水腫が認められたものを重症度1、1に加えて腸粘膜に軽微な出血が認められたものを2、中等度の出血と粘液の増加が認められたものを3、重度の出血が認められているものを4、腸壁の著しい肥厚や重度の水腫、偽膜の形成が認められたものを5とした。なお、リンパ節については重度の出血が認められた個体を除き肉眼所見に差が認められなかったため、評価の指標とはせず、腸炎の重症度と同一とみなした。

表1 肉眼評価

| 0   | 1   | 2   | 3   | 4   | 5   |
|---|---|---|---|---|---|
| 正常  | 腸壁の軽度肥厚・菲薄化<br>軽度腸間膜水腫  | 腸壁の肥厚・菲薄化<br>腸粘膜の軽微な出血（点状出血）  | 腸粘膜の中等度の出血<br>粘液の増加   | 腸粘膜の重度の出血   | 腸壁の肥厚<br>偽膜形成<br>腸間膜水腫  |
|  |  |  |  |  |  |

##### (2) 組織学的重症度の評価

腸及び腸間膜リンパ節を10%中性緩衝ホルマリン液で固定し、定法に従ってパラフィン標本を作製後、

ヘマトキシリン・エオジン染色を実施した。好中球やリンパ球・マクロファージといった炎症細胞の浸潤度合い、出血、潰瘍形成や壊死等の程度を基に1から5の5段階で評価した[2]。

最後に肉眼的重症度と組織学的重症度を総合して重症度を決定した。肉眼的重症度と組織学的重症度に乖離は認められなかったため、得られた5段階評価を重症度とした。

### (3) Total RNA 抽出

組織はRNA抽出まで規定量のRNAlater (MERCK, Germany)で保存した。保存した組織からRNeasy kit (QIAGEN, Netherlands)にてtotal RNA(tRNA)を抽出した。BioSpectrometer (Eppendorf, Germany)によりtRNAの核酸濃度を測定し、試験に供した。

### (4) Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

(3)にて抽出したtRNA1  $\mu\text{g}$ を使用し、ReverTra Ace® qPCR RT Master Mix with gDNA Remover (東洋紡、大阪府)を用いて各々にgDNA Remover 加 4x DN Master Mix 及び超純水を加え16  $\mu\text{l}$ としたものを37°Cで5分加熱してgenomeDNAの除去を行った。その後5x RT Master Mix IIを加え20  $\mu\text{l}$ としたものを37°C、50°C、98°C加熱してcDNA化した。各サンプルのcDNA1  $\mu\text{l}$ を使用し、 $\beta$ -actinプライマー及びTaKaRa Ex Premier DNA Polymerase (タカラバイオ、滋賀県)を用い初期熱変性94°C5分、熱変性94°C30秒、アニーリング55°C30秒、伸長反応72°C30秒で35サイクル反応させた。PCR反応後、Loading Bufferを混合した10  $\mu\text{l}$ の増幅産物をエチジウムブロマイド加1.5%TAEアガロースゲルで30分電気泳動した。紫外線照射下で増幅産物があることを確認した。

### (5) Quantitative reverse transcription-PCR (qRT-PCR)

TB Green Premix Ex Taq II (タカラバイオ、滋賀県)とqTOWER<sup>3</sup>G (analytikjena, Germany)を用いてmRNA発現量の解析を行った。それぞれのプライマー配列は表2に示した。それぞれのプライマー対は融解曲線分析を行い、増幅産物が単一であることを確認した。Thermal cyclingはInterleukin (IL)-10で初期熱変性95°C30秒の後、熱変性94°C30秒、アニーリング55°C30秒、伸長反応72°C30秒の3つを1サイクルとし、40サイクル行った。その他のサイトカイン遺伝子については初期熱変性95°C30秒の後、熱変性95°C5秒、伸長反応58°C30秒の2つを1サイクルとし、40サイクル行った。融解曲線分析を用いてPCR後に、反応液の温度を55°Cから1°Cずつ95°Cまで上昇させ、TB Greenのシグナルを検出した。標準曲線は、RT-PCRの増幅産物をNucleoSpin® Gel and PCR Clean-up (タカラバイオ、滋賀県)を用いて精製した。各遺伝子についての標準曲線は $10^7$ 、 $10^6$ 、 $10^5$ 、 $10^4$ 及び $10^3$ コピーのテンプレートを用いて効率を確認した。それぞれの遺伝子のコピー数の発現量は検量線法を用いて計算し、 $\beta$ -actinを内部標準として標準化し、相対値を算出した。

### (6) 統計処理

統計ソフトEZR[4]を用いて相関係数の算出、一元配置分散分析とDunnnett検定を実施した。有意水準は5%未満( $p < 0.05$ )とした。

表2 本試験で使用したプライマー

| Gene name      |    | primer sequence(5'-3') | Amplicon size(bp) | Reference |
|----------------|----|------------------------|-------------------|-----------|
| $\beta$ -actin | F: | GCATTGTCATGGACTCTGGG   | 197               |           |
|                | R: | CTTCTCCTTGATGTCCCGCA   |                   |           |
| IL-4           | F: | CAACCCTGGTCTGCTTACTG   | 167               | [3]       |
|                | R: | TCGTGTGTTCTCTGGGGCA    |                   |           |
| IL-6           | F: | GGCAGAAAAAGACGGATGCT   | 151               |           |
|                | R: | AATCTGCACAGCCTCGACAT   |                   |           |
| IL-10          | F: | AGCCAGCATTAAAGTCTGAGAA | 394               |           |
|                | R: | CCTCTCTTGGAGCTTGCTAA   |                   |           |
| IL-17          | F: | CCAGACGGCCCTCAGATTAC   | 130               | [3]       |
|                | R: | TCAGCATTGATACAGCCCGA   |                   |           |
| IFN- $\gamma$  | F: | CCAGGCCATTCAAAGGAGC    | 147               |           |
|                | R: | TCACTGATGGCTTTGCGCTG   |                   |           |
| TNF- $\alpha$  | F: | TTGAGCATCAACCCTCTGGC   | 123               |           |
|                | R: | GGCATACCCACTCTGCCATT   |                   |           |

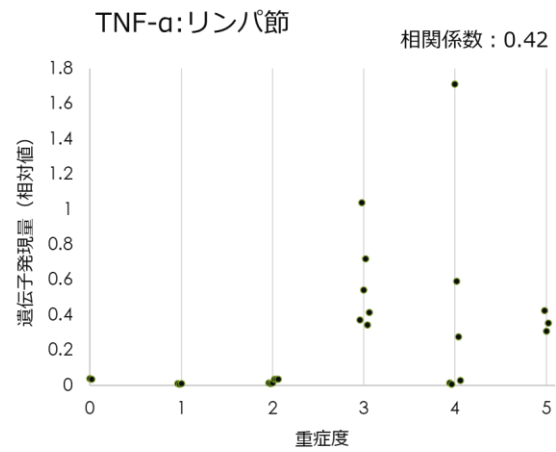
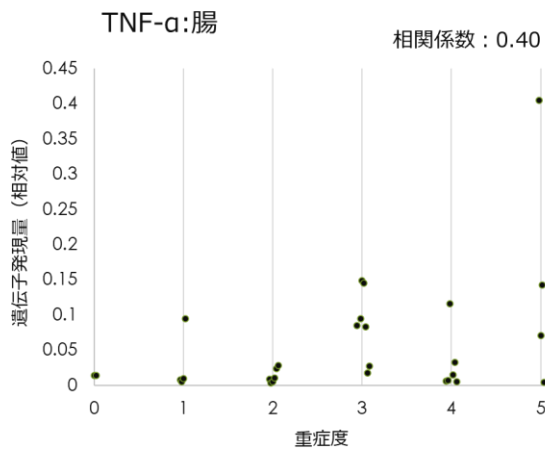
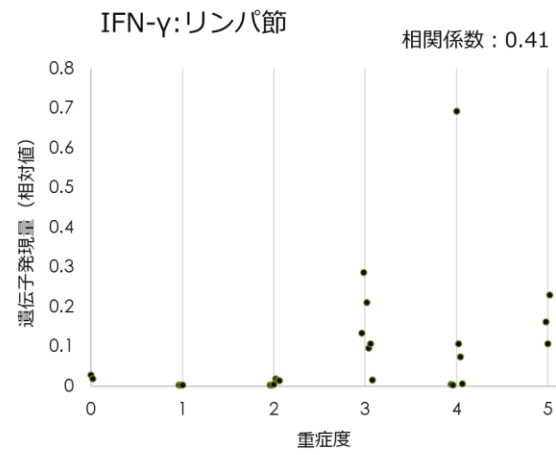
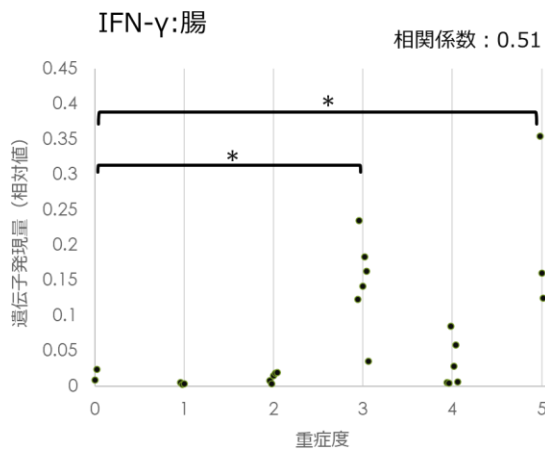
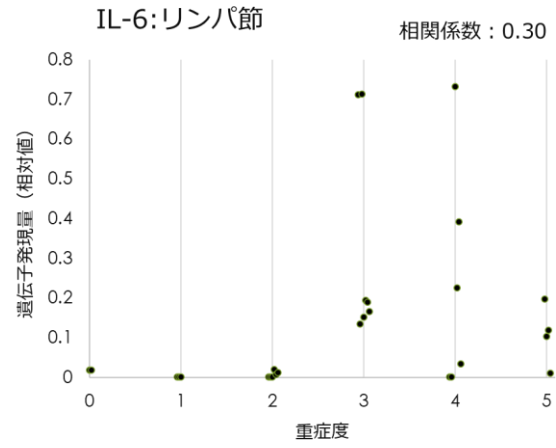
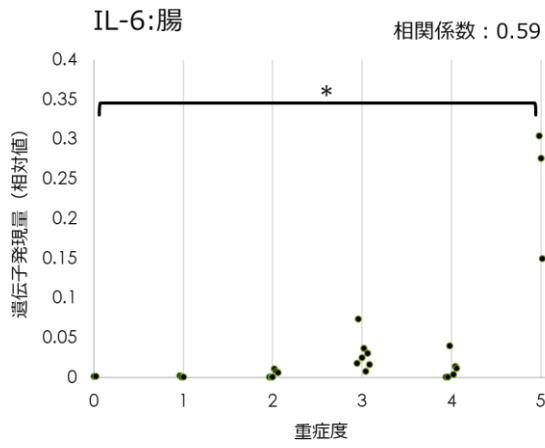
## 結果

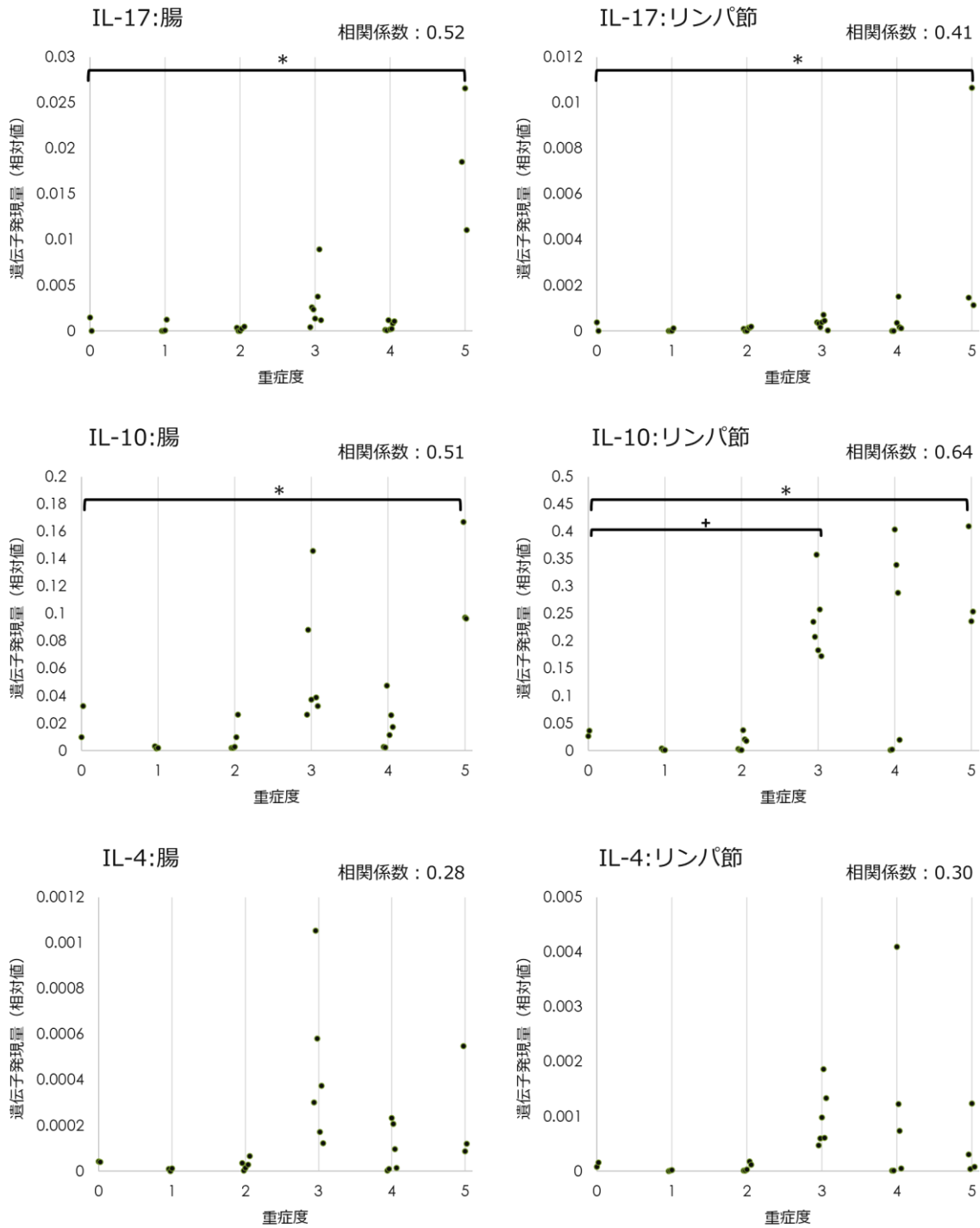
各重症度に対する個体数を表3に示した。採材頭数は、A,B,C 農場から4頭、D 農場から2頭、他16農場から1頭ずつとなった。このうち、腸炎が複数頭採材されたA~C農場での重症度は、A農場で重症度1~3、B農場で2または3、C農場で3~5であった。肉眼的重症度と組織学的重症度に大きな乖離は認められなかった。本調査で認められた腸炎の組織学的分類はカタル性、出血性、線維索性、壊死性の4型であった。

重症度ごとの各サイトカイン遺伝子発現量を図1に示した。腸におけるIL-6の遺伝子発現量の相対値と重症度の相関係数は0.59で、中度の正の相関が認められた。重症度5群の遺伝子発現量の相対値は正常群と比較して有意( $p < 0.05$ )に増加した。リンパ節では相関係数は0.3を示し、どの重症度においても有意差は認められなかった。Interferon (IFN)- $\gamma$ の遺伝子発現量の相対値に対する相関係数は腸で0.51を示し、中度の正の相関が認められた。重症度3群及び5群において、正常群と比較して有意( $p < 0.05$ )な増加が認められた。リンパ節では相関係数0.41を示し、弱い正の相関が認められたが、有意差は認められなかった。Tumor Necrosis Factor (TNF)- $\alpha$ の遺伝子発現量の相対値に対する相関係数は、腸で0.40、リンパ節で0.42を示し、弱い相関が認められた。IL-17の遺伝子発現量の相対値に対する相関係数は腸で0.52を示し、中度の正の相関が認められた。重症度5群において、正常群と比較して有意( $p < 0.05$ )に増加した。リンパ節では相関係数は0.42を示し、弱い相関が認められた。重症度5群において正常群と比較して有意( $p < 0.05$ )な増加が認められた。IL-10の遺伝子発現量の相対値に対する相関係数は腸で0.51、リンパ節で0.64を示し、中度の正の相関が認められた。遺伝子発現量の相対値は腸及びリンパ節ともに重症度5群において正常群と比較して有意( $p < 0.05$ )に増加した。IL-4の遺伝子発現量の相対値に対する相関係数は腸で0.28、リンパ節で0.30を示し、相関は弱く、有意差は認められなかった。

表3 各重症度に対する個体数

| 重症度 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 計  |
|-----|---|---|---|---|---|----|
| 個体数 | 4 | 6 | 8 | 7 | 5 | 30 |





\* :  $p < 0.05$       + :  $p < 0.1$

図1 サイトカイン mRNA 発現量

### 考察

炎症とは組織傷害に対する生体反応で、組織修復の過程と密接に関わっている。炎症の本来の目的は最初に組織傷害をもたらした原因を排除し、傷害によって生じた壊死組織を取り除くことである。炎症は大きく急性と慢性に分けられ、急性炎症の場合は体液等の滲出、好中球の遊走を特徴とする。慢性炎症は急性炎症に続く反応で、数日から数年という長い経過をたどり、リンパ球やマクロファージといった炎症細胞が炎症部位に集まり、血管の増生や線維化を特徴とする[5]。腸炎とは腸の炎症の総称で、炎症

の特性により、カタル性腸炎、線維素性腸炎、出血性腸炎、肉芽腫性腸炎、増殖性腸炎および壊死性腸炎に分類される[6]。当検査所において腸炎は最もよく認められる炎症性疾患であり、一般的に認められる病変として本調査の採材対象とした。本調査では、カタル性、出血性、線維素性、壊死性の4型が認められた。これらの原因は一般的には細菌、ウイルス及び寄生虫とされている。今回認められなかった肉芽腫性腸炎及び増殖性腸炎は原因が特定の細菌であることが多く、腸炎像にも特徴がある。細菌を原因とする腸炎が多く認められた結果は妥当なものと考えられた。

複数頭の腸炎を認めた生産農場は、腸炎廃棄率の高い農場であった。その重症度には偏りが認められ、炎症の度合いや腸炎の発生率は農場の衛生状況が影響している可能性が考えられた。今回、各生産農場の飼養状況は不明であり、ランダムに腸炎を採材したため、個々の免疫状態に差があったと思われる。同一農場から採材し、重症度とサイトカイン遺伝子発現量を比較することでより精度の高いデータが得られる可能性がある。

サイトカインは免疫、生体防御、炎症、アレルギー、発生と分化、造血、内分泌、神経など生体内で起こる様々な現象に関与し、またその破綻による各種疾病の発生に関係している[5]。炎症に関係するサイトカインは免疫担当細胞が産生し、CD4陽性ヘルパーT(Th)1細胞からIFN- $\gamma$ 、Th2細胞からIL-4、Th17細胞からIL-17、Treg細胞からIL-10が産生される。マクロファージからはTNF- $\alpha$ が産生され、IL-6はマクロファージを主として様々な細胞から産生される[7]。本調査ではIL-4以外のサイトカインについて、サイトカイン遺伝子発現量と重症度に低度から中度の正の相関が認められ、重症になるにつれ、免疫担当細胞が活性化する傾向にあることが示された。Th2細胞により産生されるサイトカインは主に寄生虫やアレルギーに関係するとされている[8]。本調査では腸回虫等の寄生虫の存在は認められていないため、IL-4の遺伝子発現量の上昇が弱かったものと思われた。IL-6は主に急性期、IL-17は主に慢性期炎症に関係するサイトカインであり[5]、重症度5を示した腸炎は急性期から慢性期への過渡期であると考えられた。

腸管の特性として外界と連続しており、様々な感染因子や毒素等の抗原が持続的に存在していることがあげられる。そのため、小腸ではリンパ組織を含む局所防御機構が腸全域に分布している[9, 10]。この局所防御機構のことを腸管関連リンパ組織(GALT)と呼び、腸間膜リンパ節及びパイエル板の他、好中球やマクロファージといった免疫細胞も含まれる[10]。これら組織は微生物に対する防御機構となり、小腸は免疫反応が活発な組織である。既報にて、小腸培養細胞や病原体フリー豚に豚伝染性胃腸炎ウイルス等を感染させ、腸炎を発症させたモデルにおいて炎症性サイトカイン遺伝子発現量や産生量の有意な増加が認められており[11]、本調査でも同様の結果が認められた。重症度とサイトカイン遺伝子発現量に正の相関が認められたことから、腸炎において、腸の肉眼所見と免疫反応に大きな乖離はないと考えられた。リンパ節についても重症度とサイトカイン遺伝子産生量に正の相関が認められ、重症化が進むにつれて免疫反応が活発になっていることが示唆された。しかしながら、リンパ節については肉眼所見と免疫反応の関連が乏しく、肉眼所見による廃棄判断の指標とはならないことが示された。

以上より、肉眼的重症度と組織内の免疫反応には正の相関があること、腸炎において、腸の肉眼所見と免疫反応に大きな乖離はなく、正確にと畜検査が実施されていることが確認された。

## 謝辞

本調査に多大なるご指導、ご助言を賜りました石巻専修大学理工学部 奈良英利教授に感謝申し上げます。

## 参考文献

[1] 岡田 珠里亜、浅沼 まりな:豚で認められた肉芽腫性炎症を伴うB細胞性リンパ腫の一例、令和6年度全国食肉及び食鳥肉衛生技術発表会

- [2] 難治性炎症性腸管障害に関する調査研究(鈴木班):第二版炎症性腸疾患の疾患活動性評価指標集 第2版(2021)
- [3] Meurens F, Berri M, Auray G, Melo S, Levast B, Virlogeux-Payant I, Chevaleyre C, Gerdtts V, Salmon H :Early immune response following Salmonella enterica subspecies enterica serovar Typhimurium infection in porcine jejunal gut loops. Vet Res. 2009 Jan-Feb;40(1):5. doi: 10.1051/vetres:2008043. Epub 2008 Oct 16. PMID: 18922229; PMCID: PMC2695014.
- [4] Y.kanda: Investigation of the freely available easy-to-use software ‘EZR’ for medical statistics Bone Marrow Transplantation (2013) 48, 452-458 & 2013 Macmillan Publishers Limited All rights reserved 0268-3369/13
- [5] 動物病理学総論 第4版 日本獣医病理学専門家協会編 文永堂出版 p.119, 158, 159
- [6] 動物病理学各論 第3版 日本獣医病理学専門家協会編 文永堂出版 p.173
- [7] 炎症誘発性サイトカインの概要 : <https://www.thermofisher.com/jp/ja/home/life-science/cell-analysis/cell-analysis-learning-center/immunology-at-work/proinflammatory-cytokines-overview.html>
- [8] サイトカイン一覽 免疫調節因子の種類と機能解 : <https://chigasaki-localtk.com/saitokainichirahuruitokinoukaisetsu/> 2025.6.28
- [9] Mörbe UM, Jørgensen PB, Fenton TM, von Burg N, Riis LB, Spencer J, Agace WW :Human gut-associated lymphoid tissues (GALT); diversity, structure, and function. Mucosal Immunol. 2021 Jul;14(4):793-802. doi: 10.1038/s41385-021-00389-4. Epub 2021 Mar 22. PMID: 33753873.
- [10] 名倉 宏:腸リンパ装置 GALT からみた生体防御機構 日本内科学会雑誌 第 82 巻 第 5 号(84-90)
- [11] Zhang Y, Yang N, Li Y, Tan C, Cai Y, Rui X, Liu Y, Fu Y, Liu G :Transmissible gastroenteritis virus induces inflammatory responses via RIG-I/NF- $\kappa$ B/HIF-1 $\alpha$ /glycolysis axis in intestinal organoids and *in vivo*. J Virol. 2024 Jun 13;98(6):e0046124. doi: 10.1128/jvi.00461-24. Epub 2024 May 23. PMID: 38780247; PMCID: PMC11237398.