コクシジウム寄生を伴った *Clostridium perfringens*

A 型菌による子牛のエンテロトキセミア

岩松 茂* 森尾 篤* 合沢正哲* 山下 謙* 吉野久信*

(昭和 61 年 4 月 25 日受理)

Enterotoxemia due to *Clostridium perfringens* Type A in a Calf with Coccidiosis
SHIGERU IWAMATSU et al. (Chuo Livestock Hygiene Service Center, Isahaya,
Nagasaki 854)

SUMMARY

A 30-day-old calf died suddenly on a farm in July, 1982. At necropsy, it revealed severe hemorrhage in the small intestine. Histologically, the mucous membrane of the small intestine presented necrotic enteritis, growth of rods and a large number of coccidial gametes. Toxin from the jejunal contents was proved by inoculation to mice. Toxigenic *Clostridium perfringens* Type A (108 CFU/g) was isolated. The disease was diagnosed as enterotoxemia caused by *C. perfringens* Type A. It may have been induced by coccidial infection.

要 約

1982 年 7 月、長崎市の一農家で 10 日齢で導入された 30 日齢乳用雄子牛 1 頭が急死した。

剖検の結果、小腸から結腸の内容物は暗赤色泥状で粘膜面の出血が著しく、組織学的には腸粘膜の変性・壊死、桿菌の増殖と多数のコクシジウムのガメートの寄生がみられた。細菌学的検査では空腸内容物から α -毒素が証明され、*Clostridium perfringens* A 型菌有毒株が 10^8 CFU/g と多数分離された。

以上の成績から、*C. perfringens* A 型菌によるエンテロトキセミアと診断され、発症誘因としてコクシジウムの寄生が考えられた。

わが国における *Clostridium perfringens* (*C. perfringens*) A 型菌による牛の壊死性腸炎およびエンテロトキセミアの発生は、各地に散発的な発生が報告されている。*C. perfringens* A 型菌は腸管内の常在菌の 1 つといわれており^{1,3,10)}、この菌による発病にはなんらかの誘因が関与していると考えられているが、その要因を特定することは一般に困難であり、未だ不明な点が多い。いっぽう、鶏においては腸内菌叢、とくに *C. perfringens* とコクシジウムの関係について述べた報告が多数あり^{2,6,8,9,14)}、コクシジウム寄生によって *C. perfringens* が異常増殖する事例が知られている。

われわれは、*C. perfringens* A 型菌による子牛のエンテロトキセミアの症例において、その発症誘因の 1 つにコクシジウム寄生が考えられる症例に遭遇したので、その概要について報告する。

1. 材料および方法

1) 検査材料

検体は 30 日齢の乳用雄子牛 1 頭で、1982 年 7 月 6 日午後 10 時頃急死し、死後約 15 時間経過したものである。

2) 検査方法

(1) 病理組織学的検査：剖検後、主要臓器を 10% ホルマリン液で固定し、常法によりパラフィン切片を作製し、ヘマトキシリンエオジン染色およびワーチン・スターレー染色を施し鏡検した。なお、腸管におけるコクシジウムの寄生状況を知るために、空腸 16 枚、回腸 2 枚および結腸 10 枚の横断切片中にみられるコクシジウムのシズント、ガメートおよびオーシストの寄生数を算出した。

(2) 細菌学的検査

① 細菌分離：実質臓器は 5% 馬血液加寒天培地、DHL 寒天培地およびチョコレート寒天培地を用い、37

* 長崎県中央家畜保健衛生所 (長崎県諫早市貝津町 3118)

℃ 48 時間, 好気性・微好気性 (ローソク法) および嫌気性 (ガスバック法) 培養を行った. いっぽう, 空腸内容物は滅菌生理食塩液で 10 倍段階希釈を行い, 変法 VL 寒天培地を用い, 37℃ 48 時間嫌気性 (ロールチューブ法) に培養した. なお, 分離菌の発酵生産物はガスクロマトグラフィーにより分析し, VPI マニュアル⁷⁾ を参照して同定した.

② 空腸内毒素の証明: 空腸内容物約 3 ml にクロロホルム 1 滴を加え, 7,000 rpm で 15 分遠心し, その上清と上清に抗 A 型毒素血清 (千葉県血清研究所) を加えたものをそれぞれ 2 匹のマウス尾静脈に 0.5 ml ずつ接種し, その生死を 24 時間観察した.

③ 分離 *C. perfringens* の毒素型別¹⁾ と α -毒素値の測定: 分離菌をクックドミート培地 (pH 7.3, 自製) に 37℃ 18 時間培養し, その菌液 0.2 ml を 1% フルクトース加クックドミート培地に接種し, さらに 37℃ で 12 時間培養した. 培養菌液を 7,000 rpm で 15 分遠心し, その遠心上清を供試毒素液とした. 毒素型別は毒素液と毒素液に抗 A 型毒素血清を添加したものをそれぞれ 2 匹のマウス尾静脈に 0.5 ml ずつ接種し, その生死により判定した. また, α -毒素値の測定は EVANS⁴⁾ の方法に従い実施した.

④ 薬剤感受性試験: 一濃度ディスク (昭和) を用い, 10 種薬剤 (表 3) に対する感受性を GAM 寒天培地で測定した.

(3) 出荷元酪農家におけるコクシジウムおよび *C. perfringens* の浸潤状況調査: 出荷元酪農家の搾乳牛 35 頭と哺乳子牛 3 頭の糞便について, コクシジウムのオーシスト数をマックマスターの虫卵計算板により, また, *C. perfringens* A 型菌の分離培養には 10% 卵黄加 CW 寒天培地 (カナマイシン含) を用い, 37℃ 48 時間嫌気性培養 (ガスバック法) を実施した. 分離 *C. perfringens* の毒素型別は上記の方法に従い実施した.

2. 成 績

1) 発 生 状 況

発生農家は今回発症した乳用雄子牛 1 頭のみを飼育しており, この子牛は約 3 週間前に 10 日齢で県内の大村市より導入され, 代用乳による哺育がなされていた.

1982 年 7 月 6 日昼には元気・食欲等に異常は認められなかったが, 夕刻には元気がなく哺乳しなくなった. 21 時頃横臥し血便を排泄したので, 畜主は獣医師に診療を依頼した. しかし, 徐々に腹囲が膨満し 22 時頃死亡した.

2) 病 理 学 的 所 見

おもな剖検所見は腹囲膨満と暗赤色腹水の貯留で, また, 小腸上部から結腸の内容物は暗赤色泥状で粘膜面の出血が著しく, 腸間膜リンパ節は腫大していた.

病理組織学的には, 空腸から結腸にわたりその粘膜上

写真 1 回腸粘膜の変性・壊死とコクシジウムのガメートの寄生

皮から筋層にかけて変性・壊死が著しく, 桿菌の増殖, 粘膜下織の血管拡張と水腫, リンパ濾胞の腫大等がみられ, また, コクシジウムのガメートの寄生が 1 横断切片当たり空腸で平均 8.2 個 (0~49), 回腸で平均 179 個 (78, 202), 結腸で平均 177.8 個 (59~285), コクシジウムのオーシストの寄生が回腸で平均 2 個 (0, 4), 結腸で平均 13.1 個 (0~24) みられた. その他, 脾臓, 腎臓および腸間膜リンパ節には軽度の変性・融解がみられた.

3) 細菌学的検査

(1) 細菌分離成績: 分離培養の成績をまとめると, 表 1 に示したとおり肝臓, 脾臓から *C. parapatrificum* が, 心臓, 肝臓, 脾臓, 腎臓および腸間膜リンパ節から *C. sordellii* が, また, 空腸内容物からは 10^8 CFU/g という多数の *C. perfringens* が分離された. 表 2 に分離菌の各生化学的性状および発酵生産物の成績を示した.

(2) 空腸内毒素の証明: 空腸内容物の上清の接種でマウスは死亡し, 抗 A 型毒素血清の添加により中和されたことから, α -毒素が証明された.

(3) 分離 *C. perfringens* の毒素型別および α -毒素値: 空腸内容物から分離された *C. perfringens* 3 株について毒素産生能およびその型別試験を実施した結果, 3 株

表 1 細菌検査成績

臓 器	分 離 菌
心 臓	<i>Clostridium sordellii</i>
肺	—
肝 臓	<i>C. sordellii</i> <i>C. parapatrificum</i>
脾 臓	<i>C. sordellii</i> <i>C. parapatrificum</i>
腎 臓	<i>C. sordellii</i>
腸 間 膜 リンパ節	<i>C. sordellii</i>
脳	—
空 腸 内 容 物	<i>C. perfringens</i> (10^8 CFU/g)

表2 分離した各 *Clostridium* 属の性状

項 目	1*	2**	3***
グラム染色	陽性	陽性	陽性
菌 形	大桿菌	大桿菌	大桿菌
好気発育	—	—	—
嫌気発育	+	+	+
運動性	—	—	—
溶血性	+	・	・
ゼラチン液化	+	+	—
インドール産生	—	+	—
エスクリン分解	—	+	+
デンプン分解	+	—	+
硝酸塩還元	—	—	+
尿素分解	—	+	—
ミルク	Sf	C, D	C
レシチナーゼ	+	+	—
レシチナーゼ中和	+	+	・
糖分解			
グルコース	+	+	+
マンノース	—	—	+
マンニット	—	+	—
マルトース	+	+	・
シュクロース	+	—	+
ラクトース	+	—	+
サリシン	—	—	・
フルクトース	・	・	+
キシロース	・	・	—
発酵生産物	A, B, L	A, L	L, A, B

注) Sf: あらし状発酵 C: 凝固 D: 消化

A: 酢酸 B: 酪酸 L: 乳酸

*: *C. perfringens* **: *C. sordellii*

***: *C. paraputrificum*

表3 分離した *C. perfringens* の薬剤感受性試験

薬 剤	判定
ペニシリン	卅
アンピシリン	卅
クロラムフェニコール	卅
エリスロマイシン	卅
キタサマイシン	卅
テトラサイクリン	+
リンコマイシン	+
オレアンドマイシン	+
スピラマイシン	+
カナマイシン	—

注) 一濃度法

表4 出荷元酪農家の飼育牛の糞便からのコクシジウム・オーシストおよび *C. perfringens* の検索

	コクシジウム・オーシスト (OPG)	<i>C. perfringens</i> A型菌有毒株 (CFU/g)
搾乳牛	2/35(100)	5/35($1.0 \times 10^2 \sim 3.3 \times 10^3$)
哺乳子牛	2/3(300, 600)	3/3($1.0 \times 10^2 \sim 2.3 \times 10^3$)

注) 検出頭数/検査頭数

ともそれぞれの培養上清の接種でマウスはすべて死亡し、抗A型毒素血清により中和されたことから、A型毒素産生株と判定された。また、 α -毒素値は3株とも0.5であった。

(4) 薬剤感受性試験: 分離した *C. perfringens* 3株はペニシリン、アンピシリン、エリスロマイシン、クロラムフェニコールに対し高い感受性を示したが、カナマイシンには全く感受性を示さなかった(表3)。

4) 子牛の出荷元酪農家におけるコクシジウムおよび *C. perfringens* の浸潤状況調査

表4に示したように、コクシジウムのオーシストは搾乳牛 35 頭中2頭 (OPG: 100) と哺乳子牛 3 頭中2頭 (OPG: 300 および 600) から検出された。 *C. perfringens* A型菌有毒株は搾乳牛 5/35 頭と哺乳子牛 3/3 頭から分離され、その検出菌量はいずれも $10^2 \sim 10^3$ CFU/g 程度であった。なお、哺乳子牛 3 頭中2頭からはコクシジウムのオーシストおよび *C. perfringens* A型菌有毒株の両方とも分離された。

3. 考 察

C. perfringens A型菌によるエンテロトキセミアの診断には腸管内に毒素が証明され、かつ多数の *C. perfringens* A型菌有毒株の分離が必要とされている¹⁾。今回、血便を排し急死した 30 日齢の乳用雄子牛 1 頭の病性鑑定を実施した結果、本症例は空腸内容物から α -毒素が証明され、さらに 10^8 CFU/g もの *C. perfringens* A型菌有毒株が分離されたことから、 *C. perfringens* A型菌によるエンテロトキセミアと診断された。

C. perfringens A型菌によるエンテロトキセミアの発生には2つの要因が考えられる。その1つは、牛の腸内正常菌叢の構成菌といわれている本菌^{1,3,10)} が異常に増殖するような内因的な場合と、もう1つは桜井ら¹³⁾ が報告しているように *C. perfringens* に汚染された飼料を介して *C. perfringens* A型菌有毒株が経口的に接種され発症するような外因的な場合とである。今回、空腸内容物から分離された *C. perfringens* A型菌有毒株が外来性のものであるか否かは不明であるが、出荷元酪農家におけるコクシジウムおよび *C. perfringens* の浸潤状況を調査した結果、搾乳牛 5 頭と哺乳子牛全頭 (3 頭) から *C. perfringens* A型菌有毒株が、搾乳牛 2 頭と哺乳子牛 2 頭からコクシジウムのオーシストが検出された。さらに、病理組織学的に死亡子牛の回腸から結腸にかけてコクシジウムのガメー

トおよびオーシストの寄生がみられた。これらのことから、死亡子牛も出荷前から腸内に *C. perfringens* A 型菌有毒株を保有し、コクシジウムに感染していたことは確実である。FITZGERALD ら⁵⁾ は子牛に *Eimeria bovis* のオーシスト約 50 万個を投与後、盲腸および結腸に 18 日目より多数のガメートおよびオーシストが観察されることを報告している。

腸内における *C. perfringens* の増殖メカニズムについては不明な点が多いが、鶏では、木村⁹⁾、JOHANSEN ら⁸⁾ および BRADLEY ら²⁾ は *Eimeria tenella* 感染により、また、平澤⁶⁾ および富永¹⁴⁾ は *Eimeria necatrix* 感染により *C. perfringens* が異常増殖することを報告しているように、コクシジウム感染と *C. perfringens* の異常増殖とは密接な関係があるといわれている。いっぽう、牛においては、佐藤¹²⁾は腸内容からコクシジウムは検出されたが、腸粘膜にコクシジウムによる組織病変がみられず、*C. perfringens* A 型菌の異常増殖との関係は薄かったと報告している。今回の症例では剖検時、腸内容物についてのコクシジウムの検査は実施されていなかったが、組織学的に空腸・回腸および結腸の横断切片におけるコクシジウムのシズント、ガメートおよびオーシストの寄生数を算出した結果、回腸から結腸にかけて 1 横断切片当たり約 180 個のコクシジウムのガメートと少数のオーシストの寄生がみられた。また、ENGLISH³⁾によると *C. perfringens* は腸の運動機能が低下し、栄養価の高い飼料で飼育されている時に急速に増殖し毒素を産生するという。したがって、代用乳で哺育されていた本症例は、コクシジウム寄生による粘膜の損傷が腸管の機能低下をきたし、その結果、腸内の *C. perfringens* A 型菌有毒株が異常増殖し毒素を産生したものと推察される。

C. sordellii および *C. paraputrificum* が胸腔および腹腔内の各臓器から分離されたが、*C. sordellii* は悪性水腫の原因菌の 1 つとされ¹⁾、また、腸管内にも分布するといわれている¹⁰⁾。森尾¹¹⁾は *Clostridium* 属菌接種マウスと未接種マウスの各臓器の死後変化を病理組織学的に観察し

た結果、接種マウスでは死亡前に接種菌が各臓器に分布し、死後 12 時間経過すると細菌増殖を伴った著しい融解がみられることを報告している。本症例は死後約 15 時間経過していたが、腸管を除く各臓器の病理組織所見は腸間膜リンパ節、腎臓および脾臓に軽度の変性・融解がみられるのみであったことから、これらの 2 種の検出菌は死後、2 次的に汚染されたものと考えられる。

引用文献

- 1) 東 量三：牛病学，大森常良ら編，第 1 版，435～468，近代出版，東京（1981）。
- 2) BRADLEY, R. E. and RADHAKRISHMAN, C. N.: *Avian Dis.*, 17, 461～476 (1973)。
- 3) ENGLISH, J. E.: *J. Amer. Vet. Med. Assoc.*, 149, 1565～1568 (1966)。
- 4) EVANS, D. C.: *J. Pathol. Bacteriol.*, 57, 75～85 (1949)。
- 5) FITZGERALD, P. R. and MANSFIELD, M. E.: *Am. J. Vet. Res.*, 47, 130～133 (1986)。
- 6) 平澤博一，高田俊也，佐藤良彦，ほか：畜産の研究，37, 1419～1423 (1983)。
- 7) HOLDMON, L. V., CAPO, E. P. and MOORE, W. E. C.: *Anaerobe Laboratory Manual*, 4th ed., V. P. I. Anaerobe Laboratory, Virginia Polytechnic Institute and State University, Virginia (1977)。
- 8) JOHANSEN, K. R. and SARLES, W. B.: *J. Bacteriol.*, 56, 635～647 (1948)。
- 9) 木村修武：鶏病研報，19 (増刊号) 25～31 (1983)。
- 10) 光岡知足：腸内菌の世界—嫌気性菌の分離と同定，叢文社，東京 (1980)。
- 11) 森尾 篤，岩松 茂，吉野久信，ほか：第 25 回長崎県家畜衛生業績発表会集録，105～109 (1983)。
- 12) 佐藤良彦，望月明義，平澤博一，ほか：日獣会誌，38, 122～125 (1985)。
- 13) 桜井健一，渡辺文男，松岡俊和，ほか：日獣会誌，38, 587～590 (1985)。
- 14) 富永 潔，田形 弘，上田武利，ほか：鶏病研報，19 (増刊号) 33～40 (1983)。

//////地区大会・学会の開催案内//////

中国地区の大会・学会

日時：昭和 61 年 11 月 6・7 日 大会：6 日 (木) 学会：6 日 (木)・7 日 (金)

場所：山口グランドホテル〔山口県吉敷郡小郡町 (新幹線駅前) TEL 08397-2-7777〕

担当：山口県獣医師会 (吉敷郡小郡町下郷東蔵敷 1080-3 TEL 08397-2-1174)