ブロイラーに発生したウェルシュ菌と大腸菌の混合感染症

村上覚史*¹⁾ 岡崎好子*¹⁾ 風間達也*²⁾ 鈴木達郎*¹⁾ 岩渕 功*¹⁾ 桐岡寛司*¹⁾

(平成元年 4 月 21 日受理)

A Dual Infection of *Clostridium perfringens* and *Escherichia coli* in Broiler Chicks

SATOSHI MURAKAMI (Chiba Prefectural Institute of Animal Health, Iwatomi-cho,

Sakura-shi, Chiba 285) YOSHIKO OKAZAKI, TATUYA KAZAMA

TATSURO SUZUKI, ISAO IWABUCHI and KANJI KIRIOKA

SUMMARY

Two hundred and thirty-five, 4-week-old broilers died suddenly on a poultry farm raising 19,500 broiler chicks. The main clinical signs of broilers submitted for diagnosis were depression, anemia, and labored breathing. Pathological examinations revealed necrotic enteritis with fibrinous exudate in the duodenum and the first half of the jejunum, purulent pneumonia in the lungs, centrilobular coagulative necrosis and hemosiderin deposition in the liver, as well as necrotic foci and fibrinous exudate in perfollicular and periellipsoidal regions of the spleen. No coccidial infection could be detected in any of the affected chicks. Immunerable *Clostridium perfringens* type A were isolated from the lung, heart, liver, spleen and small intestine of the affected chickens examined. *E. coli* was also isolated at high rates from these same organs.

Based on these findings, the present cases were diagnosed as a dual infection of *C. perfringens* and *E. coli*.

——— *J. Jpn. Vet. Med. Assoc.*, 42, 405~409 (1989).

要 約

4 週齢のブロイラー 19,500 羽を飼養する 1 農家で、235 羽が前駆症状をほとんど示すことなく急死した。検査鶏の主な臨床症状は、元気消失、貧血および呼吸器症状であった。病理学的検査により、十二指腸から小腸中部にかけて線維素滲出を伴う壊死性腸炎が見られ、化膿性肺炎、肝臓における小葉中心性凝固壊死と被膜の肥厚および血鉄素沈着、ならびに脾臓における壊死巣および茨組織と濾胞周囲の線維素の滲出が観察された。これらの病変にコクシジウムの寄生は認められなかった。罹患鶏の肺、心臓、肝臓、脾臓および小腸から *Clostridium perfringens* A 型菌が分離され、 α -毒素値は 0.2~0.5 であった。また同一臓器から高率に大腸菌が分離された。以上のことから、これらの発生例は病理組織学的および細菌学的にウェルシュ菌と大腸菌の混合感染症と考えられた。

ウェルシュ菌 (*Clostridium perfringens*) を病原とする鶏の壊死性腸炎の発生は、わが国では 1977 年に鈴木ら¹⁶⁾がブロイラーにおいて最初に報告して以来、採卵鶏および種鶏を含め多くの報告がある^{15, 18)}。海外での壊死

性腸炎の報告では主として若雛に発生し⁶⁾、またコクシジウムの寄生が野外における本病の発生に関与すると考えられている⁹⁾。わが国で報告されているブロイラーの発生例では、コクシジウムの寄生を伴う症例は比較的少ない¹⁹⁾。

著者らは、ブロイラーの急性死に遭遇し、病理学的および細菌学的に検索したところ、コクシジウムの寄生が認められないウェルシュ菌および大腸菌による混合感染症を認めたので、その発生概況と検査成績について報告する。

*¹⁾ 千葉県家畜衛生研究所 (佐倉市岩富町 497)

*²⁾ 千葉県南部家畜保健衛生所 (鴨川市八色 52)

Key Words: ブロイラー, ウェルシュ菌, 大腸菌, 混合感染症.

図1 死亡雛の発生状況および治療状況

1. 材料および方法

1) 検査鶏

1 養鶏場においてブロイラーの急性死例が発生したため、1988年3月10日に27日齢の病雛を4羽（うち1羽は死亡、3羽は放血殺）また3月15日に23日齢の病雛4羽（うち1羽は死亡、3羽は放血殺）計8羽を入手して病性鑑定した。

2) 病理組織学的検査

肉眼所見の観察後、主要臓器を20%中性緩衝ホルマリン液で固定した。これらの各組織片をパラフィン包埋し、薄切後、ヘマトキシリン・エオジン（HE）染色および必要に応じて燐タングステン酸ヘマトキシリン（PTAH）、ベルリン青、胆汁色素およびグラム染色などの特殊染色を実施した。

3) 細菌学的検査

検査した8例の実質臓器および脳は、10%馬血液加トリプトソーヤ寒天培地とDHL寒天培地に直接塗抹し、37℃24～48時間好気性培養を行った。なお、5%卵黄加CW寒天培地を用い、ガスバック法により嫌気培養をおこなった。うち4例の腸管内容については10倍階段希釈し、DHL寒天培地とガスバック法による嫌気培養で5%卵黄加CW寒天培地を用い定量培養を行った。マイコプラズマの分離には、ペニシリンGとβ-NADH添加のFrey液体培地で約1カ月間培養した。分離菌はグラム染色し、常法の生化学的性状検査により同定した。

ウェルシュ菌の型別とα-毒素値の測定は、A型抗毒素血清を用い、東ら³⁾の方法に従って実施した。分離した大腸菌検査は、市販品の抗病原性大腸菌型別セット（北研）を用い血清型別を試みた。

写真1 十二指腸の絨毛先端部の著明な壊死を示す（HE染色 ×100）

4) 薬剤感受性試験

1 濃度ディスク法（栄研）により14種類の薬剤（アンプシリン、アモキシリン、ペニシリン、バシドランシ、クロラムフェニコール、エリスロマイシン、リンコマイシン、テトラサイクリン、オキシテトラサイクリン、カナマイシン、ストレプトマイシン、ポリミキシン、ナリジキシックアシド）について検査した。

2. 成績

1) 発生状況

発生農家は1棟約4,000羽収容の平飼、解放鶏舎5棟を有し、19,500羽を飼養するブロイラー農家であった。飼料添加剤としてナイカルバジンを0.05%の割合で、また納豆菌BN株の乾燥粉末を生菌剤として0.1%の割合で混合した飼料を給与していた。その養鶏場では、ワクチンは初生時にマレック病および鶏痘生ワクチンを、10日齢時にニューカッスル病、伝染性気管支炎の混合生ワクチンを、21日齢時にニューカッスル病生ワクチンを接種していた。死亡例の発生は1988年3月8日（25日齢）から3月15日（32日齢）にかけて隣接した2棟の鶏舎にのみ局限していた。この期間の死亡羽数は235羽で、発生鶏舎での死亡率は約3.1%であった。3月10日より発生鶏舎の鶏群に対しペニシリン系抗生物質のアモキシシリンの飼料添加を体重1kgあたり10～50mg、5日間行い、鶏舎の消毒を実施したところ数日のうちに死亡鶏は減少し、発生は終息した。この発生鶏群の死亡および薬剤による治療状況を図1に示した。

2) 臨床所見

25日齢前後に一部の雛に食欲不振、動作緩慢が見られたが、ほとんどの雛は前駆症状を示すことなく、両脚を開脚した状態で死亡していた。死亡雛を除く検査雛6羽の主な症状は、元気消失、鼻汁の排泄や開口呼吸などの呼吸器症状であり、特に重症雛2羽では貧血が著明で

写真2 十二指腸絨毛壊死部に多数のグラム陽性桿菌が認められる(グラム染色 ×200)

写真3 肺の第3次気管支腔は無数の偽好酸球によって満たされている(HE染色 ×200)

あった。また体重は減少し栄養不良であった。

3) 剖検所見

主な肉眼病変は小腸と実質臓器に観察された。小腸には充血と一部に膨満があり、粘膜面は粗造となり灰褐色から灰黄色の顆粒状付着物が全面に認められた。この病変は十二指腸から空腸中部にかけて顕著であった。一部の雛の小腸の漿膜面にはチーズ様の滲出物が付着していた。肝臓では肝腹膜囊の肥厚と肝被膜との癒着があり、肝臓の壊死巣の多発した例も見られた。肺では肺胸膜に少量のチーズ様滲出物が付着していた。ファブリキウス嚢は萎縮性であった。その他心嚢水および腹水の増量した例も見られた。

4) 病理組織学的所見

十二指腸粘膜の絨毛の中間部から先端部にかけて広範囲な壊死があった(4/8例)。壊死部には線維素の滲出と、多数のグラム陽性桿菌の集簇および若干のグラム陰性桿菌が観察された。陰窩は拡張し、一部の拡張した陰窩から絨毛先端部に沿ってグラム陽性桿菌の増殖が認められた。絨毛炎症巣には、主として単核細胞が浸潤していたが(3/4例)、多数の偽好酸球の浸潤を示す例もあった(1/4例)。また漿膜炎を伴った例もあった(2/8例)。空腸にも十二指腸と同様の病変が観察されたが、空腸下部での病変は軽く、全く病変のない例も見られた。全例を通じてコクシジウムの寄生は認められなかった。盲腸扁桃には十二指腸における病変と同様の変化が認められたが、その程度は軽く、コクシジウムの寄生は認められなかった。

1例の心臓に心外膜炎が見られ、その部にグラム陰性桿菌が散見された。また他の1例に心内膜炎が見られた。

肺には偽好酸球浸潤を特徴とする肺炎巣があり、その部に多数のグラム陰性桿菌が認められた。また呼吸性細気管支の毛細血管内皮細胞は腫大し、血鉄素を貧食した細胞が認められた(3/8例)。

写真4 脾臓組織周囲の線維素の滲出と壊死巣の形成(HE染色 ×200)

肝臓には小葉中心性の凝固壊死があり(3/8例)、Kupffer 星細胞は腫大し(6/8例)、壊死性腸炎の見られた例では血鉄素を貧食していた(3/4例)。

脾臓には壊死巣があり(2/8例)、また英組織と濾胞周囲に線維素が滲出していた。この病変部には1例に少数のグラム陰性桿菌が認められた。壊死性腸炎の見られた4例中2例の赤脾髄の細網細胞は腫大し、血鉄素を貧食していた。

ファブリキウス嚢にはリンパ球の減数が見られた(2/4例)(写真1, 2, 3, 4)。

5) 細菌学的検査

検査した実質臓器から大腸菌が++~∞の範囲で分離された(6/8例)、またウェルシュ菌が+~+++の範囲で分離された(3/4例)。小腸内容から大腸菌が $10^5 \sim 10^9$ 個/g、*Clostridium sp.* が $10^3 \sim 10^6$ 個/g分離された(表1)。

分離した *Clostridium sp.* 5株の性状は表2に示した。レシチナーゼ陽性、牛乳培地上の特徴的な凝固、A型

抗毒素濾紙での中和試験の成立からウェルシュ菌と同定した(表2)。

ウェルシュ菌の型別の毒素中和試験において、小腸由来株8株および肺由来株3株の毒素液を接種された全マウスは24時間以内に死亡したが、A型抗毒素血清で中和したマウスはすべて生存した。このことからこの11株はA型のウェルシュ菌と同定した。分離菌の*in vitro*における α -毒素値は0.2~0.5であった。

また分離大腸菌20株についての血清型別検査を実施したが、01, 02, 015, 078等鶏に病原性を示すとされているいずれの血清型にも該当しなかった。なおマイコプラズマは分離されなかった。

6) 薬剤感受性試験成績

分離されたウェルシュ菌4株には、アンピシリン、アモキシシリン(卅)、ペニシリン、バシトラシン(卅~卅)に高い感受性がみられたが、カナマイシンおよびストレプトマイシンには耐性を示した。また分離された大腸菌6株には、アンピシリン(卅)、アモキシシリン、

クロラムフェニコール、ポリミキシン(卅~卅)に高い感受性がみられたが、ストレプトマイシン、リンコマイシンおよびバシトラシンに耐性を示した。

以上の検査成績から、検査した8羽の雛のうち4羽に壊死性腸炎が認められ、このうち3羽および他の1羽に急性敗血症型および亜急性漿膜炎型の大腸菌症が確認された(表3)。

3. 考 察

ブロイラーに見られる壊死性腸炎は主として空回腸に発生するが、十二指腸にまで壊死性、線維素性炎が観察され出血を伴う例も報されている^{19,20)}。本発生例の腸病変は、十二指腸から空回腸にわたる壊死性、線維素性炎であり、これらの病変は板倉¹⁰⁾が指摘したように、粘膜深部へ波及せず絨毛部に限られていた。また回腸部には、病変はほとんどなく、いっぽう、盲腸扁桃には軽度の壊死性、線維素性病変が見られた。全例の小腸に出血は観察されなかった。

LONG⁹⁾、およびHELMBOLDTとBRYANT⁷⁾のブロイラーにおける報告では、壊死性、線維素性腸炎の存在する部位にコクシジウムの寄生が観察された。わが国でのブロイラーの壊死性腸炎例に関する報告^{4,11,16,17,20)}では、コクシジウムの寄生を伴う例は少ない。しかし、これらの報告において、飼料中への抗コクシジウム剤の添加については言及されていない。今回の発生農家では抗コクシジウム剤のナイカルバジン¹²⁾を添加しており、病理組織学的にコクシジウムが観察されなかった理由として、抗コクシジウム剤の添加の関与が考えられた¹²⁾。

壊死性腸炎を示した鶏の肝臓および肺には血鉄素の沈着が見られた。AL-SHEIKHLY^{1,2)}らは肝臓、脾臓で赤血球の貧食像を観察し、それがA型ウェルシュ菌の産生する α -毒素による溶血作用と関連すると述べている。著者らが観察した壊死性腸炎は出血を伴わず、また分離されたウェルシュ菌は α -毒素産生のA型菌であることを考え合わせると、貧血や肝臓、脾臓および肺の血鉄素沈着は、AL-SHEIKHLYらが述べた α -毒素による溶血現象との関連が推察された。

NAKAMURA¹³⁾は、鶏の大腸菌症の野外例および実験例の病理学的検索において、大腸菌症を急性敗血症型と亜急性漿膜炎型の2病型に分けている。今回の検査で大腸菌症と診断した4羽を彼らの区分に従って分類すれば、2羽は急性敗血症型に、他の2羽は亜急性漿膜炎型に属すると思われた。

当養鶏場では、今回の発生防禦としてペニシリン系抗生剤のアモキシシリンを迅速に飼料添加したが、ウェルシュ菌および大腸菌の感染防止に有効であったと思われる。

鶏の壊死性腸炎および大腸菌症の発生機構は、また十

表1 細菌培養成績

細菌名 検体No	<i>E. coli</i>								<i>C. perfringens</i>			
	1	2	3	5	5	6	7	8	5	6	7	8
心 臓	+	-	-	卅	卅	卅	-	卅	卅	+	-	-
肺	卅	-	-	卅	∞	∞	卅	∞	卅	卅	-	卅
肝 臓	卅	-	-	卅	∞	卅	-	+	卅	卅	-	-
脾 臓	卅	◆	-	!	卅	∞	-	+	卅	卅	-	-
腎 臓	卅	-	-	卅	卅	∞	卅	卅	卅	卅	-	卅
十二指腸	◆	◆	◆	◆	10 ⁸	10 ⁶	◆	10 ⁵	10 ⁵	10 ⁴	◆	10 ⁶
空 回 腸	◆	◆	◆	◆	10 ⁹	10 ⁶	◆	10 ⁵	10 ⁵	10 ³	◆	10 ⁶

注) ◆:実施せず

表2 分離 *Clostridium* の性状

グ ラ ム 染 色	陽性	ゼ ラ チ ン 液 化	+
菌 形	桿菌	硝 酸 塩 環 元	+
好 気 培 養	-	イ ン ド ー ル 産 生	-
嫌 気 培 養	+	グ ル コ ー ス	+
溶 血 性	+	マ ル ト ー ス	+
レシチナーゼ反応	+	サ ッ カ ロ ー ス	+
レシチナーゼ反応中和	+	サ リ シ ン	-
リトマスミルク	C.SF	乳 糖	+
ガ ス 産 生	+	ア ラ ビ ノ ー ス	-

表3 各検査鶏の診断成績

疾 病 名	鶏 No.							
	1	2	3	4	5	6	7	8
壊死性腸炎	+	-	-	+	+	-	-	+
大腸菌症								
急性敗血症型	+	-	-	+	-	-	-	-
亜急性漿膜炎型	-	-	-	-	-	+	-	+

注) +:当てはまるもの - :当てはまらないもの

分に解明されていない。疾病は細菌側の病原因子の関与もさることながら、宿主側の因子に負うところが多いと考えられている^{14,19)}。最近 FUKATA ら⁵⁾は、無菌若雛におけるウェルシュ菌と α -毒素の経口投与試験で、市販鶏の小腸内の常在菌がウェルシュ菌の異常な増殖を抑制する働きをもともとと考察している。またコクシジウム症の予防や治療の目的でサルファ剤を経口投与すると、壊死性腸炎を誘発する可能性のあることが知られており^{8,20)}、薬剤投与によって小腸内の細菌叢が乱れ、ウェルシュ菌の増殖を許すこともあると考えられている。

今回の壊死性腸炎では、その発生にコクシジウムや薬剤投与の関与を認めなかった。壊死性腸炎を示した鶏は大腸菌症を合併しており、この大腸菌感染の影響も加わって、何らかの要因により腸内細菌叢の乱れがあったのではないかと推察される。これらの感染症の発生機構については、さらに検討を重ねる必要があると思われた。

稿を終えるにあたり、ご指導いただいた農林水産省家畜衛生試験場飼料安全部毒性病理研究室長の前田 稔先生およびご助言をいただいた同研究室の末吉益雄研究員ならびに平野孝一研究員に感謝いたします。

引用文献

- 1) AL-SHEIKHLY, F., TRUSCOTT, R. B.: *Avian Dis.*, 21, 230~240 (1977).
- 2) AL-SHEIKHLY, F., TRUSCOTT, R. B.: *Avian Dis.*, 21, 241~255 (1977).
- 3) 東 量三, 近藤房生: 鶏病研報, 17, 1~20 (1981).
- 4) 番場久雄: 家畜衛生週報, No. 1524, 369 (1978).
- 5) FUKATA, T., HADATE, Y., BBAB, E., et al.: *Res. Vet. Sci.*, 44, 68~70 (1988).
- 6) GROSS, W. B.: *Disease of poultry*, HOFSTAD, M. S., et al., eds., 8thed., 259~588, Iowa State University Press, Ames, Iowa (1984).
- 7) HELMBOLDT, C. F., BRYANT, E. S.: *Avian Dis.*, 15, 775~780 (1970).
- 8) 平沢博一, 高田俊也, 佐藤良彦, ほか: 畜産の研究, 37, 21~25 (1983).
- 9) LONG, J. R., PETTIT, J. R., BARNUM, D. A.: *Can. J. Comp. Med.*, 38, 467~474 (1974).
- 10) 板倉智敏: 鶏病病理学カラーアトラス, 第1版, 67~68, 学窓社, 東京 (1988).
- 11) 伊藤英雄, 界外 昇: 東海・北陸地区鶏病技術検討会要旨, 30 (1986).
- 12) 桐岡寛司, 岩渕 功, 村上寛史: 千葉家衛研報, 15, 33~40 (1988).
- 13) NAKAMURA, K., MAEDA, M., IMADA, Y., et al.: *Vet. Pathol.*, 22, 592~597 (1985).
- 14) 関崎 勉: 鶏病研報, 24, 13~22 (1988).
- 15) 白砂 勇, 今村一也, 平島勝教, ほか: 鶏病研報, 19, 41~43 (1983).
- 16) 鈴木達郎, 金子 晋, 藤井 修, ほか: 第84回日本獣医学会講演要旨集, 127 (1977).
- 17) 鈴木達郎: 養鶏の友, 186, 18~19 (1977).
- 18) 鈴木達郎, 小泉 勉, 村嶋孝志, ほか: 畜産の研究, 35, 662~666 (1981).
- 19) 鈴木達郎, 合田光昭, 橋本和典, ほか: 鶏病研報, 23, 55~65 (1987).
- 20) 富永 溥, 田形 弘, 上田武利, ほか: 鶏病研報, 19, 33~40 (1983).
- 21) 和田政夫, 内崎宗延, 繁田孝美, ほか: 鶏病研報, 15, 123~126 (1979).

《海外文献要録》

鶏における実験的レオウイルス性腱鞘炎の病理発生：感染経路の影響

Pathogenesis of Experimental Reovirus Tenosynovitis in Chickens: Influence of the Route of Infection
M. R. ISLAM, R. C. JONES and D. F. KELLY: *J. Comp. Pathol.*, 98, 325~336 (1988).

本論文は、鶏関節指向性レオウイルス R2 株を SPF 初生雛に経口、皮下、右趾蹠、右足関節腔内に接種し、足関節と肝臓の病理学的変化、排泄腔および足関節からのウイルス分離、ELISA、ゲル沈、中和テストによる血清学的反応を比較検討したものである。

ウイルス接種例は顕著な臨床症状を示さなかったが、いずれの接種経路においても滑膜の増殖、リンパ球浸潤を伴った関節炎、腱鞘炎が接種後2週より認められた。趾蹠、関節腔内接種群においては、接種後2~3週で病変が他の接種経路群よりも進行し、かつ重度の炎症反応を伴い、関節軟骨に変性が観察された。関節軟骨変性は

接種後42日~12週で認められる関節潰瘍の前駆病変と考えられた。

足関節、排泄腔からのウイルス分離結果は、どの接種経路においても接種後4、5週にはウイルス分離率が低下し、持続感染の状態になっていることが示唆された。

抗体価の上昇はいずれの検出方法においても、接種後2週より各接種群で認められたが、接種経路による有意差は認められなかった。

以上の結果より、趾蹠接種法が病変の早期再現に最も効率的かつ簡便であると結論づけている。

(日本獣医師会雑誌編集委員会)