腸管接着性微絨毛消滅性大腸菌感染による下痢子牛の死亡例

宇野健治 武居和樹 布藤雅之 谷 浩

滋賀県湖東家畜保健衛生所 (近江八幡市西本郷町 226-1 〒523)

(平成 3 年 6 月 17 日受付・平成 4 年 5 月 22 日受理)

Case Report of Calf Diarrhea Caused by Attaching and Effacing *Escherichia coli*

KENJI UNO, KAZUKI TAKESUE, MASAYUKI FUTO, HIROSHI TANI

Koto Livestock Hygiene Service Center, Shiga Prefecture, Ohmi-hachiman-shi, Shiga-ken 523

SUMMARY

Attaching and effacing *Escherichia coli* (AEEC) infection with muco-hemorrhagic diarrhea occurred in 3 calves raised on separate farms in Shiga Prefecture from 1989 to 1990. The calves died 5, 11 and 17 days after birth, respectively. Characteristic findings observed by postmortem examinations were congestion in the mucous membrane from the jejunum through colon and swelling of the mesenteric lymph node. Microscopically, enteric lesions observed in the ileum through rectum consisted of a catarrhal inflammation accompanying with attaching of a lot of small rod-shaped bacteria to the surface of epithelial cells. An electron microscopic observation revealed the effacing of microvilli of epithelial cells attached by bacteria. The bacteria observed in the tissue of each calf possessed *E. coli* O 26, O 119 and O 111 antigen respectively which were determined by an immunoperoxidase technique. Although a few cases of AEEC infection were reported in Japan, the results indicated that of incidence the disease might not be rare.

—Key Words: calf diarrhea, attaching and effacing *Escherichia coli*, Immunoperoxidase technique.

-----*J. Jpn. Vet Med Assoc.*, 45, 650~654 (1992)

要 約

1989 から 1990 年にかけて滋賀県内の別々の農場で飼育されていた 3 頭の子牛が粘血性下痢を呈し、それぞれ、5、11 および 17 日齢で死亡した。死亡した子牛は腸管接着性微絨毛消滅性大腸菌 (AEEC) 感染症と診断された。主な剖検所見は小腸および大腸粘膜の充血と、腸間膜リンパ節の充血および腫大であった。病理組織学的には回腸から直腸にわたって粘膜表面に多数の短桿菌の付着を伴ったカタル性腸炎が認められた。電子顕微鏡検査では菌が付着した腸粘膜上皮細胞において微絨毛の消失が観察された。また、免疫組織化学的検査により各症例の腸管粘膜に付着した菌はそれぞれ O 26、O 119 および O 111 抗原を有していた。この調査により、これまでわが国では発生報告が少なかった牛の AEEC 感染症が野外において散見されることが示された。

—キーワード: 子牛の下痢, 腸管接着微絨毛消滅性大腸菌, 酸素抗体法。

-----*日獣会誌* 45, 650~654 (1992)

下痢原性大腸菌は、腸管病原性大腸菌 (EPEC)、腸管毒素原性大腸菌 (ETEC)、腸管侵襲性大腸菌 (EIEC)、腸管出血性大腸菌 (EHEC) の 4 種に区分されており^{9, 13)}、子牛の大腸菌性下痢は、ETEC 感染によるものが多い^{10, 14)}。いっぽう、最近、EPEC に属する腸管接着性微絨毛消滅性大腸菌 (AEEC) による子牛の赤痢様症候群が英国²⁾および米国⁶⁾で報告され、新しい病原性大腸菌による疾病として注目されている。わが国においても 1989 年に富永¹⁵⁾により子牛の AEEC 分離例が初めて報告され、分離菌による子山羊での下痢の再現性試験に成功している。また、1990 年には Iijima ら⁴⁾により本菌の自然感染による子牛下痢症例が報告された。

今回、滋賀県内における 3 例の子牛下痢死亡例が病理形態学的に AEEC 感染症と診断されたことから、本症

例が野外に散見されることが示唆された。

材 料 お よ び 方 法

子 牛

検体は下痢を主徴として死亡した 3 頭の子牛で死後約 4~17 時間を経たものであった。症例 1 は黒毛和種繁殖農家 (約 20 頭飼育) の 5 日齢の死亡例、症例 2 および 3 はホルスタイン種哺育育成農場 (約 100 頭飼育) の 11 日齢および 17 日齢の死亡例で、いずれも単発例であった。

病 理 学 的 検 査

病理解剖後、主要臓器ならびに空腸、回腸、結腸、直腸の各部位の腸管を採材し病理学的検査に供した。材料は 10% 中性緩衝ホルマリン液で固定後、パラフィン包

埋, 薄切し, 常法のごとくヘマトキシリン・エオジン染色を施し鏡検した。必要に応じてフェノール・クリスタルバイオレットのグラム染色を実施した。

電子顕微鏡検査

症例1および3の回腸のホルマリン固定組織について走査型および透過型電子顕微鏡検査を実施した。

走査型電子顕微鏡: 1%オスミウム酸で後固定した組織を常法に従い臨界点乾燥後, 金蒸着し, JSM-35C 走査型電子顕微鏡 (日本電子) で観察した。

透過型電子顕微鏡: 1%オスミウム酸で後固定した組織を常法に従い樹脂包埋し, 超薄切片を作成後, 酢酸ウランと三重鉛で電子染色し, JEM-100CX 透過型電子顕微鏡 (日本電子) で観察した。

免疫組織化学的検査

パラフィン包埋した空腸, 回腸, 結腸の各腸管組織についてベクタステイン ABC エリートキット (フナコシ薬品) による酵素抗体法を実施した。使用した抗血清は抗大腸菌ポリクローナル血清, 抗 K99 線毛抗原血清, 抗大腸菌 OK 混合 1, OK 混合 2, OK 混合 3 血清ならびに O 5, O 26, O 55, O 111, O 119, O 124 および O 146 に対する抗血清 (デンカ生研) であり (表 2), これらの抗血清は 128 倍～512 倍に希釈して用いた。

細菌学的検査

主要臓器ならびに腸管内容について 5% 羊血液寒天培地ならびに DHL 寒天培地による好気培養を実施し, 生菌数を測定するとともに api20E (アスカ純薬) により分離菌を固定した。分離大腸菌は抗 K99 血清 (デンカ生研) を用いて平板凝集反応を実施した。大腸菌の産生するエンテロトキシン ST の検出はコリスト EIA (デンカ生研) を用いて酵素抗体法により行った。LT の検出は VET-RPLA (デンカ生研) を用いて逆受身ラテックス凝集反応により行った。ペロトキシンの検出には Vero 細胞を用いた。O 群血清型別は平板凝集反応により実施した。

また, 腸管内容について 5% CW カナマイシン含有卵黄加寒天培地を用い, 37°C, 72 時間カタリスト法による嫌気培養を行った。C. perfringens の同定には α 抗毒素濾紙を用いた。

ウイルス学的検査

腸管内容についてロタセルキットを用いて逆受身赤血球凝集抑制反応試験を実施し, ロタウイルス抗原の検出を試みた。

寄生虫学的検査

直腸便について直接法ならびに飽和蔗糖液を用いた浮遊法により虫卵およびオースト検査を実施するとともに, コクシジウムおよびクリプトスポリジウムについては腸管粘膜上皮を病理組織学的に検査した。

成 績

臨床所見

症例 1: 自家生産の黒毛和種で 3 日齢頃から白色下痢を呈し元気消失した。2 日間カナマイシンおよびストレプトマイシンとペニシリンの合剤のほか, 利胆剤, 強心剤, ブドウ糖製剤が投薬されたが 5 日齢時に死亡した。

症例 2: 9 日齢で酪農家から導入され, 導入時から時に粘血便を混じた黄色泥状下痢を呈しており 11 日齢時に死亡した。治療は行われていなかった。

症例 3: 7 日齢で酪農家から導入され, 14 日齢時から血便を伴った水様性下痢を呈したのでテトラサイクリン, カナマイシンのほか, 強心剤, 強肝剤, ブドウ糖製剤が投薬されたが 17 日齢時に死亡した。

病理学的所見

剖検所見: 3 例に共通して小腸下部から大腸にかけて腸管粘膜の充血が認められた。症例 1 の腸管内容は黄褐色粘液性であり, 症例 2 と 3 では赤褐色泥状を呈していた。また, 3 例に共通して腸間膜リンパ節の腫大と充血がみられた。なお, 他の主要臓器には著変は認められなかった。

病理組織学的所見: 3 症例に共通して短桿菌の付着を伴ったカタル性腸炎が認められた (表 1)。症例により病変部位は若干異なるが, 症例 2 では空腸から直腸にかけ病変が認められたのに対し症例 1 と 3 では病変は回腸以下に認められた。

小腸の絨毛ないし陰窩上皮細胞は好酸性を呈し, 一部は壊死に陥り, 剝離し, 上皮細胞には多数のグラム陰性短桿菌の付着がみられた (図 1)。菌付着部では刷子縁が不明瞭となり, 上皮表面の凹凸が目だった。さらに, 絨毛固有層内および腸管腔内には好中球, リンパ球, 組

表 1 腸管の病理組織学的検査結果

臓器	組織学的変化	症 例		
		No. 1	No. 2	No. 3
空	粘膜上皮変性剝離	⦿	⦿	⦿
	固有層内細胞浸潤	+	⦿	+
腸	出 血	—	⦿	+
	上皮細胞菌付着	—	+	—
回	粘膜上皮変性剝離	⦿	⦿	⦿
	固有層内細胞浸潤	⦿	⦿	⦿
腸	出 血	⦿	⦿	⦿
	上皮細胞菌付着	⦿	⦿	⦿
結・直腸	バイエル板内リンパ球減少	+	+	+
	粘膜上皮変性剝離	⦿	⦿	⦿
腸	固有層内細胞浸潤	+	⦿	⦿
	出 血	+	⦿	⦿
腸間膜リンパ節	上皮細胞菌付着	+	+	⦿
	洞カタル	⦿	⦿	⦿

—: 病変無し + ~ ⦿: 病変の程度を示す

図1 症例3の回腸：カタル性炎をなし絨毛先端部の上皮細胞に多数の短桿菌が付着しているのが認められる。(グラム染色 ×400)

図2 症例3の回腸：大腸菌は絨毛上皮細胞内に埋まり込んでいる。(走査電顕 ×7800)

織球性細胞の浸潤が認められた。腔内の変性した剝離上皮にも多数の菌の付着が観察され、症例1ではマクロファージの菌貪食像が認められた。固有層内ではうっ血や出血もみられ、特に症例2では細胞反応が強く、出血、フィブリン析出、血管壁の線維素性変性が随所に認められた。また、パイエル板のリンパ球は、核濃縮、核崩壊に陥り減少し、腸間膜リンパ節においては洞カタルがみられた。

大腸においても小腸と同様、陰窩上皮に短桿菌の付着を伴ったカタル性腸炎が認められた。特に、症例3では広範囲にわたる菌の付着が観察された。なお、他の主要臓器には病変は認められなかった。

電子顕微鏡学的所見：走査電顕による観察では、症例1では菌は上皮表面に一樣に付着した粘膜に埋没していた。症例3では菌が微絨毛を押し分けるように微絨毛間に入り込んでいた(図2)。

透過電顕所見では菌付着部位の微絨毛は萎縮、消滅し、粘膜上皮細胞は菌形にそってやや隆起ないしは陥凹し菌が密着していた(図3)。

図3 症例1の回腸：大腸菌が細胞膜に密着した部位では微絨毛が消滅している。(透過電顕 ×9400)

表2 腸管組織における免疫組織化学的検査結果

使用抗血清	症 例		
	No. 1	No. 2	No. 3
E. coli ポリ抗体	+	+	+
K 99	—	—	—
OK I 混合	+	—	—
OK II 混合	—	+	+
OK III 混合	—	—	—
O 26*	+	—	—
O 119*	—	+	—
O 111*	—	—	+
O 55*	—	—	—
O 146*	—	—	—
O 112	—	—	—
O 124	—	—	—
O 5	—	—	—

OK混合血清1：O 26, O 86, O 127, O 136, O 144

OK混合血清2：O 55, O 111, O 112, O 119, O 124, O 146

OK混合血清3：O 28, O 44, O 125, O 126, O 128, O 143

*：腸管病原性大腸菌血清型

免疫組織学的所見：すべての症例の腸管粘膜に付着した菌は、大腸菌ポリクローナル抗体に対して陽性反応を示した(表2)。そのほか、症例1の菌はOK混合1とO 26、症例2の菌はOK混合2とO 119、症例3の菌はOK混合2とO 111の各抗血清に対して陽性反応を示した(図4)。

病原学的所見

症例1の空腸内容から大腸菌が $10^{8.7}$ CFU/g分離された。分離菌はK99凝集反応陰性、ST、LTおよびベロトキシン非産生株であった。その血清型は用いた58種類の抗O群血清に凝集せず不明であった。症例2では空腸内容から大腸菌が $10^{8.6}$ CFU/g分離されたほか、乳糖非分解性の大腸菌も $10^{7.9}$ CFU/g分離された。この乳糖非分解性の大腸菌はウレアーゼ陰性、ソルビット陰性、

図4 症例1の回腸：粘膜に付着している菌は抗大腸菌O 26血清に特異反応を示している。(ABC染色 ×200)

表3 病原学的検査結果

		症 例		
		No. 1	No. 2	No. 3
分及 離菌 細菌 数	空 腸	9.7 (EC)	8.6 (EC)	8.8 (EC)
	回 腸	NT	7.9 (EC)	6.3 (CP)
	結 腸	NT	NT	9.6 (EC)
				8.1 (CP)
分離大腸菌の性状	K99線毛抗原	—	—	—
	STエンテロトキシン	—	—	—
	LTエンテロトキシン	—	—	—
	ペロサイトトキシン	—	NT	NT
	血 清 型	不明*	NT	NT
	運 動 性	—	—	NT
	ウレアーゼ	—	—	NT
	ソルビット	+	—	NT
	ロタウイルス RPHA 価	X128	NT	NT
	コクシジウム	—	—	—
	クリプトスポリジウム	—	—	—

EC : *E. coli* CP : *Clostridium perfringens* 菌数 : log 10CFU/g NT : 未検査 * : 58種類のO群血清に凝集せず

運動性陰性の株であった。症例3では空腸内容から大腸菌が $10^{8.8}$ CFU/g、結腸内容から $10^{9.6}$ CFU/g分離されたがエンテロトキシン非産生の株であった。症例2、3の分離大腸菌のO抗原血清型別ならびにペロトキシン産生能試験は実施しなかった。

症例1では空腸内容からロタウイルス抗原が128倍の凝集価で検出された。症例3の空腸内容から*C. perfringens* が $10^{6.3}$ CFU/g、結腸内容から $10^{8.1}$ CFU/g分離さ

れた。コクシジウムならびにクリプトスポリジウムの寄生は全例とも認められなかった。

考 察

MOON ら⁷⁾は1983年に動物の病原性大腸菌 (EPEC) に属する大腸菌として、腸粘膜上皮細胞の微絨毛を萎縮ないし消滅させる大腸菌の存在を報告し、病理形態学的に Attaching and effacing *E. coli* (AEEC) と名付けた。その後、子牛の赤痢様症候群が報告され^{2,8)}、本菌の関与が確認された。今回の3例は血便を伴った下痢を主徴とし、病理組織学的に回腸から大腸の粘膜表層に大腸菌の付着を伴ったカタル性腸炎が観察された。また、電顕的には菌が付着した上皮細胞では微絨毛が消滅しているのが確認された。以上の所見はMOON ら⁷⁾の報告にあるAEEC感染の病理形態学的所見に一致した。

一般に、子牛の大腸菌性下痢の主体をなしているETEC感染症は1週齢以内の新生子牛に集団発生する極めて死亡率の高い疾病であり、甚急性で激しい水様性下痢を特徴とする。これに対して、今回のAEEC感染例は単発的な発生で2週齢の子牛にもみられ、粘血便を特徴としていた。また、AEECは腸管内では大腸粘膜に主に定着すると考えられているが^{1,3,12)}、今回の例においても主に回腸から大腸にかけて定着し、増殖部位が比較的限定していた。このことから、ETEC感染例では主に空回腸が定着増殖部位となるため¹⁴⁾、AEEC感染例の腸管における病変の分布とETEC感染例のそれとは明らかに異なっていた。さらに、ETEC感染症では菌に対する腸管病変部の細胞反応がきわめて乏しいのに対し、AEEC感染例は腸管病変部の出血性の変化や炎症性変化が強く臨床的な血便や粘液便の所見を傍証するものであった。

いっぽう、病原学的にはAEECはエンテロトキシンを産生しないが、ペロ細胞を破壊するペロトキシンを産生することが報告され^{6,16)}、本菌の病原因子の1つと考えられている。わが国においてもペロトキシン産生性が確認されたAEECの子牛からの分離が報告されている^{4,15)}。今回の症例1では分離大腸菌のペロトキシン産生能を調べたが付着菌と分離菌が異なったため、付着大腸菌のペロトキシン産生能は明かでなかった。症例2、3ではペロトキシン産生能の試験を実施しなかったが、症例2の分離大腸菌はソルビット非分解性であった。この性状はペロトキシン産生性EHECの特徴的な性状の1つに挙げられている⁵⁾。このことから、症例2の付着大腸菌はペロトキシン産生性の可能性も示唆されるが、ペロトキシンを非産生のAEECの発生報告もあり¹¹⁾、AEECとペロトキシン産生性との関連については今後の症例において分離株の血清型、毒素産生性および生物学的性状等と合せて十分に検討したい。

分離された大腸菌のO群血清型は最終的に病原性の有無を判定するものではないが、下痢原性大腸菌のO群血清型はかなり限局されている^{10,13)}。本症例では酵素抗体法により付着菌がそれぞれO 26, O 111 およびO 119であることが確認された。わが国ではO 26のAEEC感染例はすでに報告されているが⁴⁾、O 111, O 119のAEEC感染例についての報告はまだない。しかし、これらの血清型はすべてEPECのO群血清型に含まれるものであり¹³⁾、本例においてもベロトキシンを含む何らかの病原因子を有する大腸菌の侵襲を受けているものと推察された。

ベロトキシン産生性大腸菌による人の集団食中毒においてその汚染源として牛から由来した可能性が指摘されている今日⁵⁾、同様にベロトキシンの関与が強く示唆されている牛のAEEC感染状況についてより一層の調査、研究が必要である。

稿を終えるにあたり、電子顕微鏡検査を実施していただいた農林水産省家畜衛生試験場総合診断研究部病理診断研究室 播谷 亮技官および小林 勝技官に深謝いたします。

引用文献

- 1) BRUCE H J, DAVID H F, JAMES E C et al.: J Am Vet Med Asso, 196, 897~901 (1990)
- 2) HALL G A, REYNOLDS D J, CHANTER N et al.: Vet Pathol, 22, 156~163 (1985)
- 3) HALL G A, CHANTER N, BLAND A P: Vet Pathol, 25, 205~210 (1988)
- 4) IJIMA T, SUEYOSHI M, YAMAMOTO T et al.: Jpn J Vet Sci, 52, 1347~1350 (1990)
- 5) 伊藤 武, 甲斐明美: モダンメディア, 34, 12~23 (1988)
- 6) MAINIL J G, DUCHESNES C J, WHIPP S C et al.: Am J Vet Res, 48, 743~748 (1987)
- 7) MOON H W, WHIPP S C, ARGENZIO R A et al.: Infect. Immun., 41, 1340~1351 (1983)
- 8) MOXLEY R A, FRANCIS D H: Infect. Immun., 53, 339~346 (1986)
- 9) 中沢宗生: 臨床獣医, 5, 26~31 (1987)
- 10) 中沢宗生, 大宅辰夫, 片岡康ほか: 日細菌誌, 46, 125 (1991)
- 11) PEARSON G R, WATSON C A, HALL G A et al.: Vet Rec, 124, 297~299 (1989)
- 12) POSPISCHIL A, MAINIL J G, BALJER G et al.: Vet. pathol. 24, 330~334 (1987)
- 13) 坂崎利一, 田村利満: メディヤサークル, 34, 117~122 (1989)
- 14) 武居和樹, 田中裕泰, 宇野健治: 獣医畜産新報, 812, 145~148 (1989)
- 15) 富永 潔, 中沢宗生, 播谷 亮ほか: 日獣会誌, 42, 775~779 (1989)
- 16) WRAY C, McLAREN I, PEARSON G R: Vet Rec, 125, 365~368 (1989)

牛・馬・豚の繁殖障害の治療に 牛の受精卵移植に 豚の分娩誘発に

天然型プロスタグランジンF_{2α}製剤

動物用医薬品

パナセラン®

劇
要指示薬

筋肉内注射に・子宮内注入に

パナセラン®・Hi

パナセラン®・F 液

発売元 第一製薬株式会社 東京都中央区日本橋三丁目14番10号

製造元 富士薬品工業株式会社 富山県高岡市長慶寺530番地