

## 8 山羊クロストリジウム・パーフリンゲンス D 型菌

### 感染症の一症例

○林 朋弘 藤森 英雄 齋藤 秀一 竹内 美穂 寺崎 敏明

#### 要 約

平成 29 年 4 月、山羊 5 頭および採卵鶏約 100 羽を飼養する農場より、水様性の下痢を呈して死亡した山羊 1 頭の病性鑑定の依頼があった。剖検所見で十二指腸から盲腸にかけての暗赤色化・腸壁の菲薄化が見られたが、主要臓器については目立った病変は認められなかった。病理組織学的検査では、小腸は出血傾向で、粘膜面深層まで壊死し表面にグラム陽性の桿菌が多数確認された。卵黄加 CW 寒天培地を用いた培養により内容物から  $5.8 \times 10^7$  CFU/g の *Clostridium perfringens* (Cp) を分離した。PCR 等の結果、既知の Cp 株との系統関係は推定出来なかったが、 $\alpha$  および  $\epsilon$  毒素を持つ CpD 型菌であることが確認され、本症例は CpD 型菌によるクロストリジウム・パーフリンゲンス感染症と診断した。

地 *Clostridium perfringens* (Cp) はグラム陽性の嫌気性桿菌で、人間や動物の腸内細菌叢における主要な構成菌であるとともに、環境中にも広く分布している。また、食中毒菌として公衆衛生の面でも重要視されているほか、主要な 4 種の毒素産生能の組み合わせによる 5 つの毒素型が知られている。先般、Cp の毒素型の一つである D 型菌による一症例に遭遇したので、その概要について報告する。

#### 発生概要

平成 29 年 4 月 5 日、山羊 5 頭、採卵鶏約 100 羽を飼養する都内一農場より、日本ザーネン種、11 カ月齢の雌山羊 1 頭が死亡したことによる病性鑑定依頼があった。

聞き取りでは、死亡 2 日前から水様性の下痢を呈し、飼養者がシリンジを用いて水に溶かした整腸剤を経口投与していた。死亡前夜には便に血が混じりだしたためコクシジウム症を疑って動物病院へ連れて行く予定であったが、翌日昼前に突然激しい痙攣を起こして死亡し、午後、飼養者によって死体が搬入された。

給与飼料は自家産の野菜くずと購入した牛用の乾草で、時折散歩に連れていく際に野草を食べることがあった。また、敷料を長期間交換していなかったとのことであった（表 1）。

表 1 発生概要

農家概要	山羊 5 頭 採卵鶏 100 羽を飼養
病性鑑定家畜	山羊 (日本ザーネン種 雌 11 ヶ月齢)
H29 年 4 月 3 日	朝から水様性下痢、食欲・飲水・嘔吐なし 整腸剤を経口投与
4 月 4 日	整腸剤を経口投与、 夜の便には血が混ざっていた
4 月 5 日	昼前に痙攣を起こして死亡、 午後に飼養者が死体を家保に搬入

※ 給与飼料は野菜くずと購入乾草、敷料は長期間交換せず

#### 検査結果

##### 剖検所見

死亡した山羊は肛門周囲に若干の汚れがあったものの栄養状態は良好で、天然孔からの出血はなかった。また、痙攣による四肢の強直の跡は見られたが、これといった外傷もなかった。

剖検所見では、第四胃から盲腸にかけて暗赤

色を呈し、腸壁は菲薄化し暗赤色水溶性の内容物を容れ、盲腸では偽膜様物が浮遊していた(図1, 2)。直腸には内容物はなかった。また、主要臓器の病変としては左肺の一部辺縁部に肝変化が見られたのみであり、反芻獣の Cp 感染症で時折見られるとされる脳浮腫や髄質様腎<sup>1)</sup>は認められなかった。

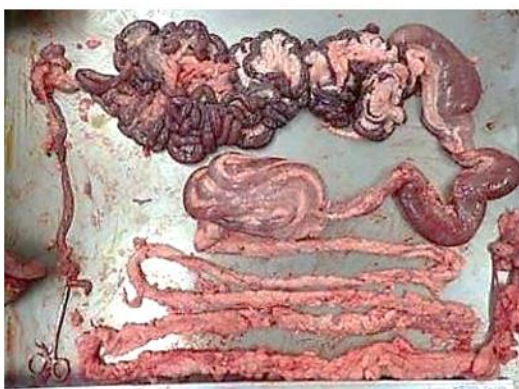


図1 小腸から盲腸にかけて暗赤色化腸壁の菲薄化

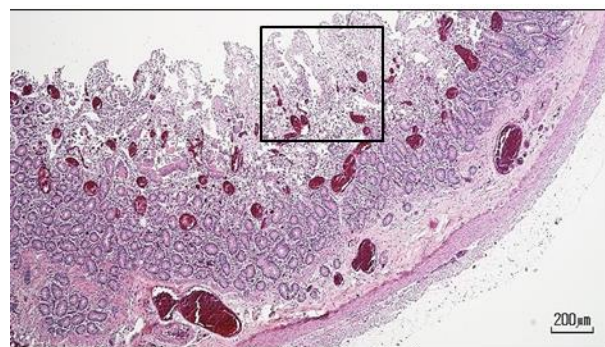


図2 腸管の病変(肉眼所見)

### 病理組織学的検査

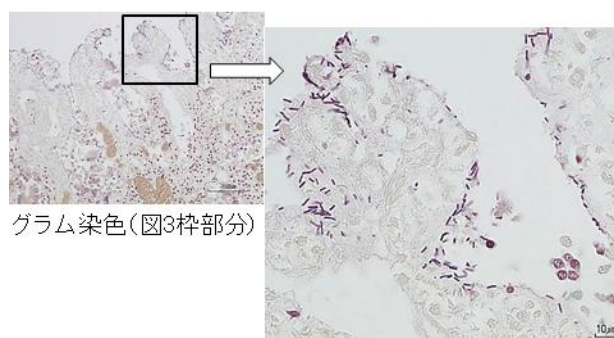
小腸は全般的に出血傾向で、粘膜面は深層まで壊死し、表面には多数のグラム陰性桿菌が認められた。盲腸では、一部出血が見られたが粘膜表層での壊死は小腸より軽度であった(図3, 4)。腎臓も出血傾向で、髄質の一部の細血管内に異物を認めた。その他の臓器には著変は観察されなかった。

### ウイルス学的検査



十二指腸 HE染色

図3 腸粘膜上皮細胞の壊死と粘膜固有層～筋層の出血



グラム染色(図3枠部分)

図4 壊死した腸粘膜表面のグラム陽性桿菌

小腸および盲腸内容物を用いて、Fukuda Mらの方法により、ロタウイルス(A、B、C群)、コロナウイルス、トロウイルスについて、RT-PCR実施した<sup>2)</sup>。また、血清を材料に、Vilcek Sらの方法により牛ウイルス性下痢・粘膜病について、RT-r PCR検査<sup>3)</sup>を実施したが、遺伝子は検出されなかった。

### 寄生虫検査

小腸および盲腸内容物の飽和食塩水浮遊法による検査を実施したが、虫卵は検出されなかった。

### 細菌検査

細菌検査のうち小腸および盲腸内容物の直接塗抹鏡検で図5のとおり、グラム陽性の大型

桿菌が多数認められた。

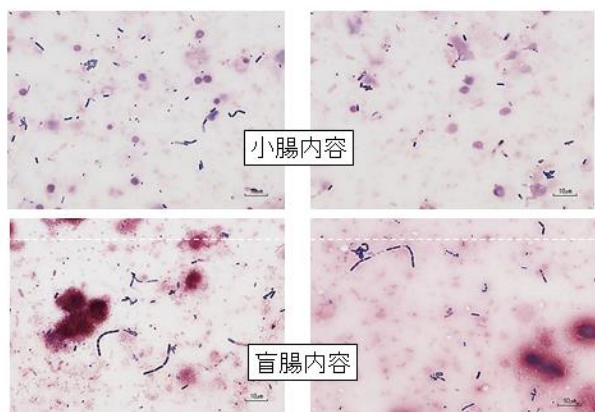


図5 腸内容物の直接塗抹標本(グラム染色)

このため、小腸および盲腸内容物からの細菌分離を行った。Cp をターゲットに、50%卵黄加カナマイシン含有 CW 寒天培地にて嫌気培養を行ったところ、コロニー周囲の白濁化や培地の黄変といった特徴を示す菌が  $5.8 \times 10^7$  CFU/g 分離され、市販の同定キット (rapid ID32A アピバイオメリュー・ジャパン (株)) により Cp と判定された。なお、小腸および盲腸内容物のサルモネラは陰性であった。

主要臓器のスタンプについては肺から大腸菌が、肺および心臓から *Serratia* 属菌が分離されたが、分離された大腸菌に病原性は認められなかった (表 2)。

表2 細菌培養検査

検査材料	肺	心	空回腸内容物	盲腸内容物
分離菌				
<i>Escherichia coli</i>	+	-	+	+
<i>Serratia ficaria</i>	+	+	-	-
<i>Salmonella spp</i>	NT	NT	-	-
<i>Clostridium perfringens</i>	-	-	+(※)	+

※  $5.8 \times 10^7$  CFU/g

- ・ 肝臓、腎臓、脾臓、大脳からの有意菌分離なし

また、肝臓・腎臓のほか脾臓・大脳からの有意菌の分離はなかった。

分離された Cp (当該株) は一濃度ディスク法により、表 3 にある 23 薬剤について感受性試験を実施したところ、ペニシリン系およびセフェ

ム系には感受性を示したが、テトラサイクリン系には中間、アミノグリコシド系には耐性を示した。

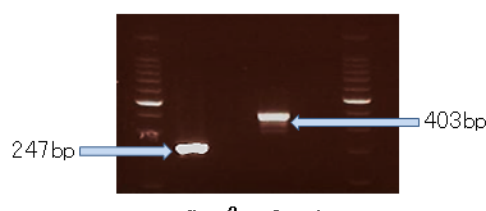
表3 当該株の薬剤感受性試験

一濃度ディスク法にて実施

ペニシリン系			セフェム系			テトラサイクリン系		
ABPC	PCG	AMPC	CEZ	CTX		TC	OTC	DOXY
S	S	S	S	S		I	I	I
アミノグリコシド系				マクロライド系		リコマイン系		ホリブド系
KM	GM	SM	FRM	EM	LCM			CL
R	R	R	R	I	R			R
クロラムフェニコール系		キノロン系				その他		
CP		NA	OFLX	CPF	ERFX	FOM	NB	ST
S		I	S	I	S	S	I	R

### 当該株の遺伝子検査

当該株の毒素型別について Uza1 FA らの方法により PCR<sup>4)</sup> を実施し、図 6 のとおり  $\alpha$  および  $\epsilon$  毒素の遺伝子が確認された。また、当該株と Cp 既知参照株 (A 型菌: PB6K 株、B 型菌: NIAH 10231 株、D 型菌: NIAH 10237 株) との 16S rDNA 塩基配列における比較では、いずれの株とも同一性が 99.8% 以上と非常に高かったため特定の毒素型との系統関係の推定までは出来なかったが、当該株の 396bp 遺伝子断片の増幅産物における推定アミノ酸配列が  $\epsilon$  毒素のものと 99% 一致したことで、D 型菌であることが確認された (表 4)。



#### 毒素の組織等への作用

- $\alpha$  毒素: 組織破壊作用
- $\beta$  毒素: 組織破壊作用
- $\epsilon$  毒素: 神経毒性
- $\iota$  毒素: 細胞毒性

#### 菌型と主要毒素の種類

- A型菌:  $\alpha$  毒素
- B型菌:  $\alpha, \beta, \epsilon$  毒素
- C型菌:  $\alpha, \beta$  毒素
- D型菌:  $\alpha, \epsilon$  毒素
- E型菌:  $\alpha, \iota$  毒素

図6 毒素型別 PCR検査

表4 遺伝子検査による比較

- ・ 16S rDNA塩基配列における、既知参照株との比較
  - A型(PB6K) : 99.80% (1490 / 1493 bp)
  - B型(NIAH10231) : 99.93% (1479 / 1480 bp)
  - D型(NIAH10237) : 99.93% (1495 / 1496 bp)
- いずれの参照株とも相同性が非常に高く、**特定の毒素型との系統関係の推定不能**
- ・ 396bp遺伝子断片の増幅産物推定アミノ酸配列がε毒素のものと99%一致
  - **D型菌であることが遺伝学的に確認**

### 考 察

腸粘膜の壊死と出血性の組織病変が多数認められ、腸粘膜面にグラム陽性桿菌確認された。また、腸内容から Cp が分離され、毒素型別より D 型菌と確認されたことから、本症例は Cp の D 型菌によるエンテロトキセミア（出血性壊死性腸炎）と診断した（表 5）。なお、肺病変で見られたグラム陰性桿菌は、大腸菌もしくは *Serratia* 属菌のいずれかと考えられ、整腸剤経口投与時の誤嚥による可能性が高く、直接の死因ではないものと判断した。

表5 検査結果

- ・ 小腸の暗赤色化、内容物は赤色水様
- ・ 腸粘膜表面にグラム陽性桿菌
- ・ 腸粘膜の壊死と出血性の組織病変
- ・ 腸内容から、*Clostridium perfringens* を分離
- ・ 毒素型別PCRによりD型菌と確認
- ・ 主要臓器は、出血傾向

### 診断

*Clostridium perfringens* D型菌による  
クロストリジウム・パーフリゲンズ感染症  
(エンテロトキセミア)

エンテロトキセミアは Cp の毒素による激しい溶血や全身の痙攣等によって、人間でも発症後数時間以内に死亡する場合がある劇症型の感染症である<sup>5)</sup>。本症例では下痢の発症から死亡まで2日ほど経過しているが、稟告の「便に血が混じた」という時点で腸管内の当該株が急激に増殖してα毒素による腸管の壊死が起こる

とともに、他の臓器が壊死する前にε毒素による全身の痙攣を起こすことで、急激に容態が悪化して死亡したものと考えられた。

### 農家指導

結果報告のため現地に立ち入りしたところ、死亡した山羊がいた場所は敷料が除去され、消石灰にて消毒がなされていた。Cp は常在菌として環境中にも広く分布しており、長期間交換していなかった敷料が本事例の原因の可能性として疑われたことから、飼養場所全体のこまめな敷料交換に加え、死亡した山羊がいた場所を中心に消毒を継続して行うよう指導した(表 6)。

表6 指導事項

- ・ 飼養場所の敷料交換と消毒
- ・ 飼料の急変を避ける
- ・ 同様の症状が見られた際は、直ちに獣医師に通報・診療を依頼



また、Cp 感染症は給与飼料の急変によって生じることが知られている。野菜くずであっても給与する種類や量の急変は避け、今後同様の症状が見られた場合には直ちに獣医師へ通報し、診療を依頼するよう併せて指導した<sup>4)</sup>。その後、Cp 感染を疑う下痢が2例あったものの、獣医師への適切な通報～処置により死亡事例はなく現在に至っている。

近年全国的に、愛玩のほか、除草目的での山羊の小規模飼養者が増えているが、今後とも幅広い病性鑑定の依頼に対応できるよう努めたい。

### 謝辞

執筆に際して、当該株の遺伝子検査、Cp 感染症で発生し得る病変について、ご指導を賜りま

した、国立研究開発法人 農研機構 動物衛生研究部門 細菌・寄生虫研究領域 ヨーネ病ユニット長、大崎慎人先生に深謝致します。

#### 引用文献等

- 1) ZOETIS AUSTRALIA : PULPY KIDNEY  
<https://www.zoetis.com.au/diseases/pulpy-kidney.aspx>
- 2) Fukuda M, et al. (2012) Development and application of one-step multiplex reverse PCR for simultaneous detection of five diarrheal viruses in adult cattle. Arch Virol 157. 1063-1069
- 3) Vilcek S, et al (1994) Pestiviruses isolated from pigs, cattle and sheep can be allocated into at least three genogroups using polymerase chain reaction and restriction endonuclease analysis. Arch Virol 136. 309-323
- 4) Uzal FA, et al. (1997) PCR detection of *Clostridium perfringens* producing different toxins in faeces of goats. Lett Appl Microbiol 25 339-344
- 5) 福原淳子ほか：血管内溶血を起こし、短時間で死亡した劇症型 *Clostridium perfringens* 感染症の1例, 感染症学雑誌 第76巻 第7号, 562-565, 2002