

子牛におけるK99保有大腸菌症の発生と抗体調査

誌名	日本獣医師会雑誌 = Journal of the Japan Veterinary Medical Association
ISSN	04466454
著者	音井, 威重 東城, 孝良 東條, 秀徳
巻/号	43巻3号
掲載ページ	p. 193-196
発行年月	1990年3月

子牛における K 99 保有大腸菌症の発生と抗体調査

音井威重*¹⁾ 東城孝良*²⁾ 東條秀徳*²⁾ 橋本 稔*²⁾

(平成 1 年 12 月 22 日受理)

Outbreak of K99⁺ *Escherichia coli* Infection and Serological Survey in Calves

TAKESHIGE OTOI (Tokusima meat Laboratory, Prefecture of Tokusima, anan 774),
TAKAYOSHI TOUJOU, HIDENORI TOUJOU and MINORU HASIMOTO

SUMMARY

The isolation of K99⁺ *Escherichia coli* (K99 *E. coli*) was performed using diarrheal stool which occurred in calves from January through October, 1988. Moreover, bacteriological examination of isolated K99 *E. coli* and the adherent condition of K99 antigen in the intestinal canal of a dead calf was observed. In addition an epidemiological survey mainly including antibody examination of adult cattle were made. Out of 50 cases of diarrheal stools collected from calves, 11 strains of K99 *E. coli* were isolated. The toxin-producing ability of K99 *E. coli* thus isolated was all ST-positive and LT-negative, and O antigen was 09 and 08 in 9 and 2 cases, respectively. The adhesion of K99 antigen in the intestinal canal was remarkable in the jejunum and ileum. K99 antibody examination of 100 cattle selected at random from 92 farms revealed that 34 adult cattle (34%) showed a more than fourfold antibody titer. The K99 antibody titer of those cattle belonging to the farms, where the diarrheal calves occurred, became positive in 6~9 months after the disease occurred.

—————*J. Jpn. Vet. Med. Assoc.*, 43, 193~196 (1990).

要 約

1988 年 1 月から 10 月にわたり、子牛に発生した下痢便からの K 99 保有大腸菌 (以下、K 99 大腸菌) の分離を試みた。さらに、分離した K 99 大腸菌の細菌学的検査および死亡した子牛の腸管内における K 99 抗原の付着状況の観察、ならびに成牛の抗体検査を中心とした疫学的調査を行った。子牛から採取した下痢便 50 例から 11 例の K 99 大腸菌が分離された。分離した K 99 大腸菌の毒素産生能はすべて ST 陽性、LT 陰性で、O 抗原は 09 が 9 例、08 が 2 例であった。腸管内の K 99 抗原の付着は空回腸で著明であった。また、無作為に選んだ 92 戸、100 頭における K 99 抗体検査で、4 倍以上の抗体価を示した成牛が 34 頭 (34%) であった。さらに、発生農家における同居牛の K 99 抗体価は 6 から 9 カ月で陽転した。

近年、わが国において毒素原性大腸菌による子牛下痢症の発生が見られ^{4,8,9,10)}、子牛の育成上甚大な経済的損失を与えている。また、その病原因子として K 99 抗原が重要な因子として明らかにされ^{1,6)}、おもに生後 4~5 日齢以内の子牛に致死的な下痢症を引き起こし、さらに発生農家においては長期にわたる発生が見られている¹⁰⁾。そこで今回、下痢便からの K 99 保有大腸菌 (以下、K 99 大腸菌) の検出、ならびに死亡した子牛につ

いて腸管内における K 99 抗原の付着状況を観察した。また、K 99 抗原に対する抗体検査を中心とした疫学的調査を行ったので、その概要を報告する。

1. 材料および方法

1) 発生状況調査

K 99 大腸菌が分離された 5 戸の農家において、発生期間、下痢発症日齢、発生頭数、死産頭数について聞き取り調査を行った。

2) 細菌学的検査

(1) 検査材料：1988 年 1 月から 10 月にわたり管内酪農家および哺育農家で発生した子牛の下痢便 50 例について細菌学的検査を行った。

*¹⁾ 徳島県肉畜試験場 (阿南市下大野町渡り上り)

*²⁾ 徳島県鴨島家畜保健衛生所 (麻植郡鴨島町麻植塚)

Key Words : K 99, 空回腸, 抗体価.

(2) 分離培養：分離培養は、滅菌生食液で下痢便材料を100倍段階希釈し、各希釈の0.05 mlをコンラージ棒でDHL平板上に塗抹後、37°Cで12時間培養を行った。最高希釈で赤色コロニーとして発育した菌、5株について保存検査した。

(3) 血清型別：K抗原については、分離菌株をGUINEE²⁾の方法により、Minca-Isovitalex 寒天培地で37°Cで一晩培養し、スライド上で抗血清（デンカ生研）との凝集の有無により判定した。

O抗原については、2時間半オートクレープ処理した培養菌を検体とし、抗血清によるスライド凝集反応法で実施した。

(4) 毒素産生能：ST検出は、CAYE培地での培養上清を検体とし、乳飲みマウス胃内投与法で実施した。LT検出は、CAYE培地での培養沈査を検体とし、逆受身ラテックス凝集反応（VET-RPLA生検）で実施した。

(5) 生化学的性状：分離菌についてムコイド性、運動性およびその他の性状はTSI培地、IDテストEB-20（日水製薬）で検査した。

3) 腸管内のK99抗原の確認

4日齢で死亡した1頭の子牛の腸管を10%中性ホルマリン液で固定後、市販抗血清（デンカ生研）を用い、ピオチン-ストレプトアビジン法を利用して顕微鏡的に観察した。

4) 抗体調査

(1) 供試血清：無作為に選んだ92戸の酪農家で、ブルセラ検査時の余剰血清を用い100頭の成牛血清を使用した。また、K99大腸菌症の発生農家で、同一牛舎内

の成牛10頭の血清について、発生後4か月から9か月にわたり計4回追跡採取した。

(2) 受身血球凝集反応：V型マイクロプレートを用い大橋ら⁷⁾による受身血球凝集反応により実施し、凝集を認めた最高希釈倍数を抗体価とした。なお、使用した抗原は、K99プラスミドを伝達されたK-12株（農林水産省家畜衛生試験場より分与）の線毛K99抗原を塩析法で抽出後、ビルビックアルデヒド固定羊血球により感作血球（抗原）としたもので、感作血球および固定血球は日本全薬工業株式会社中央研究所から分与を受けた。

2. 成 績

1) 発生状況

K99大腸菌が分離された農家における新生子牛の下痢症の発生期間は、4から13か月と長期にわたり、また発症日齢は7日齢以下で、死亡率は約20から75%と高い価を示した（表1）。

2) 菌分離成績

子牛の下痢便50例のうち、11例からK99大腸菌が分離された。

3) K99大腸菌の性状

分離大腸菌は、09が9例、08が2例認められ、STはすべて陽性を示し、またLTは陰性を示した（表2）。なお、生化学的性状はムコイド状のコロニーを形成し、運動性、アドニットともすべて陰性であった。No. 10

表3 K99大腸菌の生化学的性状

性状\No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
ムコイド	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
運動性	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
アドニット	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ぶどう糖発酵	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
オキシダーゼ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
硫化水素	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
エスクリン	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PPA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
インドール	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
VP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
クエン酸	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
リジン	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
アルギニン	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
オルニチン	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ONPG	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
尿素	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
マロン酸	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
イノシトール	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ラフィノース	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
ラムノース	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ソルビトール	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
白糖	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
マンニット	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
アラビノース	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

表1 発生状況

発生農家	発生期間	発症日齢	死産頭数/発生頭数
A	10か月	2~7	4/7
B	9か月	3~5	2/9
C	4か月	2~5	6/8
D	13か月	2~4	8/16
E	4か月	5~7	4/6

表2 分離大腸菌の血清学的性状

牛 No.	血清型		エンテロトキシン	
	定着因子	O群	ST	LT
1	K99	8	+	-
2	K99	8	+	-
3	K99	9	+	-
4	K99	9	+	-
5	K99	9	+	-
6	K99	9	+	-
7	K99	9	+	-
8	K99	9	+	-
9	K99	9	+	-
10	K99	9	+	-
11	K99	9	+	-

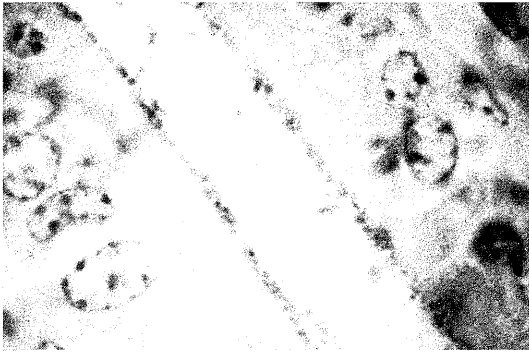


写真1 K99大腸菌の回腸微絨毛への付着像：ピオチン-ストレプトアビジン法によるペルオキシダーゼ染色

表4 腸管内のK99抗原の観察

部 位	K99大腸菌付着程度
第 四 胃	—
十 二 指 腸	—
空 腸	+
回 腸	++
盲 腸	+
結 腸	+

表5 産歴による成牛のK99抗体保有頭数の分布

産歴(頭数)	陰 性	陽 性		
		4 倍	8 倍	16 倍
未経産 (n=8)	4	4	0	0
1産 (n=21)	14	3	1	3
2産 (n=20)	13	2	3	2
3産 (n=20)	12	5	2	1
4産 (n=14)	10	1	3	0
5産以上 (n=12)	10	2	0	0

とNo. 11においては、アルギニン陽性 (No. 10)、ラフィノース陽性 (No. 11) と、他と性状を異にしていた (表3)。

4) 腸管内におけるK99抗原の付着状況

特異的な茶褐色に染まるK99抗原保有菌体が確認された (写真1)。菌体の粘膜上皮の付着は空回腸と盲結腸で認められたが、おもに空回腸で著明であった (表4)。

5) K99抗体保有状況

今回検査した成牛100頭の抗体保有頭数は、4倍が18頭、8倍10頭、16倍6頭の計34頭で、陰性は66頭であった (図1)。抗体価4倍以上を陽性と判定すると、抗体陽性率が34%であった。

また、産歴による抗体陽性率は表5に示したように未経産が50%、1産33%、2産35%、3産40%、4産28%および5産以上が16%であり、4産までは高い傾向が認められ、また抗体価の高い成牛は1産から4産に

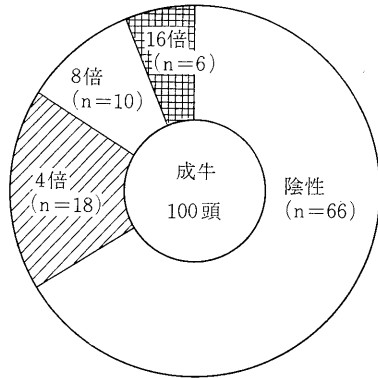


図1 成牛のK99抗体保有頭数

表6 発生農家における同居成牛のK99抗体価の推移

牛 No.	発 生 後			
	4 カ月	5 カ月	6 カ月	9 カ月
1	16	32	32	8
2	4	4	4	4
3	<4	<4	4	4
4	<4	<4	<4	4
5	<4	<4	<4	8
6	<4	<4	<4	8
7	<4	<4	<4	8
8	<4	<4	<4	8
9	<4	<4	<4	8
10	<4	<4	<4	8

見られた。

発生農家における同居成牛10頭の血中抗体の推移は、発生4カ月後に2頭が陽性となり、ついで6カ月後に1頭が、さらに9カ月後には残りの7頭すべてが陽転した (表6)。

3. 考 察

K99大腸菌感染による子牛の下痢症は多数報告されている^{8,9,10}。本症例は、武居⁹、八木ら¹⁰の報告と同様に新生子牛に致死的な下痢を引き起こし、発生農家においては分娩産子が次々に感染発症した。また、発生農家の聞き取り調査では4から13カ月の長期にわたる発症が認められた。いっぽう、同居牛のK99抗原に対する抗体獲得には4カ月から9カ月を要し、抗体は低い価であった。このように、発生が長期にわたる要因として、母牛に十分な感染防御抗体がなく、しかも抗体獲得に長期間を要することなどがあげられ、加えて本菌による畜舎の汚染などが発病誘因となって、畜舎疫の感を呈するものと考えられる。

また、Acress¹⁾、大橋⁶⁾らは母牛のK99抗原に対する自然抗体の保有率が3から4%未満であったと述べているが、今回の調査では34%の成牛が抗体を保有し

ており、本県においてK99大腸菌が広く浸潤しているものと思われた。

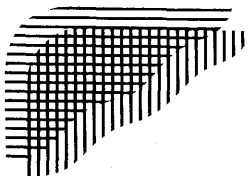
JAMESら³⁾は実験感染子牛の腸内容の検索から、毒素原性大腸菌は12指腸には付着せず、空回腸に付着が認められ、とくに空回腸に病理組織学的変化が強いと述べている。今回の4日齢死亡例における腸管内の観察でも同様の結果が認められ、主として空回腸がK99大腸菌の付着増殖の場であることが示唆された。

稿を終るにあたり、大腸菌のO型別、ST検査ならびにご助言をいただいた日本全業工業株式会社中央研究所の大橋秀一先生に深謝します。

引用文献

1) ACRES, S. D.: *J. Dairy. Sci.*, 68, 229~256 (1985).

- 2) GUINEE, P. A. M., VELDKAMP, J. and JANSEN, W. H.: *Infect. Immun.*, 15, 676~677 (1977).
- 3) JAMES, E. C. and STEPHEN, D.: *Am. J. Vet. Res.*, 40, 1391~1397 (1979).
- 4) 久利俊二, 平田和則, 井上英幸, 竹内康裕, 太田正熙, 植村嘉昭: 畜産の研究, 42, 1266~1270 (1988).
- 5) MOON, H. W., WHIPP, S. C. and SKARTVEDT, S. M.: *Am. J. Vet. Res.*, 37, 1025~1029 (1976).
- 6) 大橋秀一: 臨床獣医, 5, 92~95 (1987).
- 7) 大橋秀一, ほか: 第97回日本獣医学会講演要旨, 143 (1984).
- 8) 恒光 裕, 工藤卓二, 八田忠雄, 森 清一, 尾上貞雄, 平井網雄, 清水実嗣: 日獣会誌, 39, 631~635 (1986).
- 9) 武居和樹, 田中裕泰, 宇野健治, 来本作治: 獣畜新報, 812, 5~8 (1989).
- 10) 八木 充, 山内靖隆, 碓井 茂: 畜産技術, 336, 5~11 (1983).



慢性肝疾患の 肝機能異常を改善する...

健保適用

●適応症 「慢性肝疾患における肝機能異常の改善」

●用法・用量 1日1回, 40mlを静脈内に注射する。
年齢, 症状により適宜増減する。

■グリテリチン製剤

強力ネオミノファーゲンシー

包装 20ml 10管・30管, 5ml 5管・50管, 2ml 10管・100管

→使用上の注意などについては、添付文書をご参照下さい。

NEO 畜産 ミノファーゲン製薬本舗 営業本部 〒107 東京都港区赤坂8-10-22 TEL(402)6201

健保略称
強ミノC

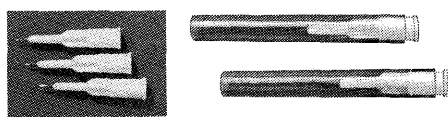
TB用連続注射器・TB針ディスプレイザブル

畜産現場の要求に答え
安全性と能率を追求しました



- 分注量 0.1ml
- 使いやすく疲れない独特の形状と構造
- ワンステップエア抜き機
- 針基 1先

衛生的で使いやすく確実な注射針



- ディスプレイザブル
- 1グロス入パッケージ
- 1基
- E.O.G滅菌済
- 着脱はキャップにより安全に確実にできます

承認番号 62畜A5182・62畜A3853