

繁殖豚におけるClostridium novyi A型感染症の集団発生

誌名	日本獣医師会雑誌 = Journal of the Japan Veterinary Medical Association
ISSN	04466454
著者名	中林,大 荻野,博明 渡辺,大成 鍋谷,政広 遠藤,恭介 藤原,信子 鷺沢,潤 若林,光伸 宮越,浩修
発行元	日本獣医師会
巻/号	49巻3号
掲載ページ	p. 159-163
発行年月	1996年3月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



繁殖豚における *Clostridium novyi* A 型感染症の集団発生

中林 大* 荻野博明 渡辺大成 鍋谷政広 遠藤恭介

藤原信子 鷲沢 潤 若林光伸 宮越浩修

新潟県中央家畜保健衛生所 (〒959-04 新潟県西蒲原郡西川町旗屋 686)

(1995年5月10日受付・1995年11月17日受理)

要 約

繁殖豚 30 頭の群で、鼻出血を主徴とする疾病が発生し、11 頭が急死し、死亡 3 例で各臓器が融解し、肝臓被膜下に気泡が密発してスポンジ状を呈していた。組織学的には各臓器の壊死性変化が著明で、大型桿菌が多数みられ、蛍光抗体法で肝臓塗抹標本に *Clostridium novyi* (Cn) が確認された。3 例中 1 例の各臓器からガス噴射法で Cn-A 型が分離された。生存例 19 頭は分離 Cn-A 型に対する間接赤血球凝集抗体価 1:128~512 を示した。アンピシリン筋肉注射および抗菌剤の飼料添加により終息したが、抗菌物質添加配合飼料を給与していた子豚および育成豚は発症しなかったことから、原因は残飯給与によると推察された。——キーワード: *Clostridium novyi* A 型, 集団発生, 豚。

日獣会誌 49, 159~163 (1996)

牛の *Clostridium novyi* (Cn) 感染症はわが国で散発的な発生が認められている [2]。しかし、豚での発生は少なく [1, 7]、経過が甚急性であるため、生前の診断が困難であり、治療効果等に関する報告は少ない。また、発生の多くは単発例であるが、近年、繁殖豚の集団発生例 [5, 9] も報告されている。

Cn 感染症の感染経路はほとんど創傷感染である [1]。しかし、今回、繁殖養豚場において、11 頭の繁殖豚が急死した集団発生例に遭遇し、病理検索を試みたところ、Cn に汚染した飼料に起因すると思われる経口感染例と診断された。また、病豚に対しては早期の抗生物質投与により効果が認められた。ここでは分離菌の生化学的諸性状を検討するとともに、分離菌に対する抗体検査を実施し、県内の抗体保有状況を調査した。

材料および方法

供試材料: 1990年5月23日および25日に死亡した繁殖豚3頭を供試した。

疫学調査には、給与していた残飯1検体、豆腐かす1検体および Cn-A 型に対する間接赤血球凝集反応 (IHA) による抗体検査のため、発生農家の 19 頭、県内未発生農家の繁殖豚 20 戸 100 頭、肥育豚 20 戸 100 頭、計 41 戸 219 頭から採取した豚血清を供試した。

病理組織学的検査: 剖検後、常法により各種臓器を 10%ホルマリン液で固定後、薄切し、ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色を施し鏡検した。

細菌学的検査: 肝臓の直接塗抹標本を作製し、トキソ

プラズマ蛍光抗体 (FA) 法^{a)}および抗 Cn 蛍光標識家兔血清 (愛知県東三河家畜保健衛生所、伊藤裕和氏から分与) を用いた FA 法を実施した。

菌分離は各臓器を直接スタンプ法で 7%めん羊血液加寒天培地、DHL 寒天培地および CW 寒天培地に塗布し、37°C、18~48 時間、好気性培養、10%CO₂ 培養およびスチールウール法による嫌気性培養を実施した。また、各臓器をガラスホモジナイザーを用い、滅菌 PBS で 10 倍乳剤を作製し、それぞれをロールチューブに 0.1ml 接種し、ガス噴射法^{b)}で嫌気性培養をあわせて実施した。

分離菌の同定はそれぞれをグラム染色後、鏡検し菌形を確認した後、成書 [3, 6] により同定した。

毒素産生能試験では、分離菌を変法 VL 培地に接種し、37°C、48 時間培養した上清濾液を、体重約 20g の ddY 系マウス 3 匹の尾静脈に 0.4ml 接種し生死により判定した。

分離菌の揮発性脂肪酸 (VFA) 産生の判定は、変法 VL 培地に接種し、37°C、48 時間培養した上清に、24% (V/V) の割合にメタリン酸を含んだ 3N 硫酸を 20% (V/V) の割合に加え、その上清に等量のクロトン酸を (3mM/dl) を加えてガスクロマトグラフィーの試料とした。水素イオン化デテクター (FID) を装着したガスクロマトグラフィー^{c)}を用い、ガラスカラム温度 140°C、検出温度 250°C で分析した。また、肝臓中の VFA については、蒸留水で 5 倍乳剤とし、上記と同様

^{a)} 微生物化学研究所, 京都。 ^{b)} 三栄製作所, 東京。

^{c)} GC-4CM, 島津製作所, 京都。

* 現所属: 新潟県下越家畜保健衛生所 (〒957 新発田市東新町 1-5-23)

繁殖豚における *Clostridium novyi* A 型感染症の集団発生

表1 急性死亡繁殖豚の病理解剖学的検査成績

所 見	豚 No.		
	1	2	3
死亡発見日時	1990/5/23 ¹⁾ 朝	1990/5/25朝	1990/5/25朝
解剖日時	1990/5/23午後	1990/5/25午後	1990/5/25午後
推定体重(kg)	200	250	250
鼻腔より血様液漏出	+ ²⁾	+	+
脳 : 融解	+	+	+
心臓 : 脆弱化顕著	+	+	+
暗赤色心嚢水貯留	-	+	+
肺 : 暗赤色水腫性	+	+	+
気管支腔内に暗赤色泡沫液	+	+	-
肝臓 : スポンジ状	+	+	+
脆弱化顕著	+	+	+
脾臓 : 脆弱化顕著(剖面タール状)	+	+	+
実質に気泡が貯留し膨隆	-	+	-
腎臓 : 脆弱化顕著(融解)	+	+	+
気泡貯留	-	+	-
髄質に出血	+	-	+
胃 : 未消化食渣で充満	+	+	+
粘膜水腫性	+	+	+
腸 : 悪臭のガス貯留し膨隆	+	+	+
粘膜の脆弱化顕著	+	+	+
小腸の一部粘膜充血	+	+	-
腸間膜リンパ節 : 融解	+	+	+
膀胱 : 混濁した尿を入れる	+	+	+
羊水 : 桃色を呈しこん濁	-	+	+
胎子 : 腐敗	-	+	+

¹⁾ 年/月/日; ²⁾ + : 所見を認める; - : 所見認めず。

の方法で VFA を測定した。

薬剤感受性試験はベンジルペニシリン (PCG), アミノベンジルペニシリン (ABPC), ジヒドロストレプトマイシン (DSM), カナマイシン (KM), フラジオマイシン (FM), テトラサイクリン (TC), オキシテトラサイクリン (OTC), エリスロマイシン (EM), オレアンドマイシン (OM), キタサマイシン (KT), スピラマイシン (SPM), タイロシン (TS), コロスチン (CL), ポリミキシン B (PL)), クロラムフェニコール (CP), チアンフェニコール (TP), ノボビオシン (NB), バシトラシン (BC), リンコマイシン (LM), スルファモノメトキシシン (SMM), スルファジメトキシシン (SDM), フラゾリドン (FZ), ニトロフラントイン (NF), ナリジキ酸 (NA), オキソリン酸 (OA) の 25 薬剤について一濃度ディスク法⁴⁾により実施した。

給与飼料はそれぞれ 1g について、菌分離と同様の方法で定量培養を行った。

抗体価の測定には、Sawada ら [8] のマイクロプレート法による IHA を実施した。抗原として No. 3 の肝臓由来 CnN2-402 株のホルマリン不活化洗浄死菌を 9kHz, 200W, 20 分超音波処理⁵⁾後, 10,000rpm 20 分遠心した上清を用いた。反応には抗 Cn 家兔高度免疫血清 (神奈

川県家畜病性鑑定所, 稲垣靖子氏から分与) とのボックスタイトレーションにより 4 単位を使用した。感作赤血球は Tamura ら [10] の方法により作製した。

ウイルス学的検査: 脳, 肺, 肝臓, 脾臓, 腎臓および小腸をイーグル MEM 液で 10 倍乳剤とし, その遠心上清を豚腎株化 (CPK) 細胞培養試験管に接種後, 37°C, 回転培養し, 細胞変性効果 (CPE) を指標とし, ウイルス分離を試みた。

成 績

発生状況および臨床所見: 繁殖豚 30 頭, 育成豚 12 頭および子豚 130 頭, 計 172 頭を飼養する繁殖専門農家において, 1990 年 5 月 18 日に 2 頭の繁殖豚が鼻腔から出血し急死した。さらに同月 19 日 1 頭, 20 日 2 頭, 22 日 2 頭, 23 日 1 頭, 24 日 1 頭, 25 日 2 頭, 計 11 頭の繁殖豚が同様の症状で死亡した。

死亡豚の一部は元気・食欲消失し翌日に死亡したが, 多くは前日まで元気・食欲とも正常で, 翌日の早朝に死

⁴⁾ 昭和薬品化工, 東京。(タイロシンは明治製薬, オキシソリン酸は三共製薬から分与)

⁵⁾ 久保田製作所, 東京。

表2 急性死亡繁殖豚の病理組織学的検査成績

所 見	豚 No.		
	1	2	3
脳 : 実質に多数の大型桿菌	+ ¹⁾	+	+
グリア細胞増殖	+	+	+
心臓 : 間質に多数の大型桿菌	+	+	+
心筋細胞壊死	+	+	-
肺 : 間質水腫	+	+	+
うっ血水腫	+	+	+
肝臓 : 血管腔を中心に多数の大型桿菌	+	+	-
小葉中心性に空胞形成	+	+	+
グリソン鞘, 類洞に多数の大型桿菌	+	+	+
肝細胞壊死	+	+	+
脾臓 : 融解し固有構造を欠く	-	+	-
多数の大型桿菌	+	+	+
赤脾髄にび慢性壊死	+	-	+
腎臓 : 融解し固有構造を欠く	-	+	+
髓質を中心に壊死し間質水腫	+	-	-
多数の大型桿菌	+	+	+
上皮脱落	+	+	+
胃 : 漿膜, 筋層に多数の大型桿菌	-	+	+
粘膜固有層変性	+	+	+
腸 : 粘膜固有層~漿膜まで壊死	+	+	+
多数の大型桿菌	+	+	+

¹⁾ + : 顕著な所見を認める ; + : 所見を認める ; - : 所見認めず.



図1 肝臓の直接塗抹標本で芽胞を有するグラム陽性大桿菌を認める (グラム染色 ×1,000).

亡した。給与飼料は繁殖豚では全量を残飯 (学校給食) で、育成豚および子豚には残飯と市販の配合飼料を給与していた。最近1年間、豚の導入はなく、繁殖豚は自家育成を行っていた。

病理組織学的所見 : 3例とも各臓器は脆弱化が著しく、脳、脾臓、腎臓および腸間膜リンパ節は融解し、腸管は腐敗臭ガスを充満し風船状に膨隆していた。また、特徴的な所見として、肝臓被膜下に気泡が密発しスポンジ状を呈していた (表1)。

3例の各臓器に大型桿菌を多数認め、細胞はほとんどが壊死していた (表2)。

表3 急性死亡繁殖豚からの菌分離成績

臓 器	豚 No.		
	1	2	3
大 脳	- ¹⁾	-	Cn 4.1 ³⁾
心 臓	-	-	Cn 8.2
肺	E ² # C #	-	Cn 8.2
肝 臓	-	-	Cn 9.1
脾 臓	-	-	Cn 8.2
腎 臓	-	-	Cn 8.2
胃	E #	E #	E +
十二指腸	E #	E ∞	E ∞
空 回 腸	E # C #	E ∞	E ∞ C #
結 腸	E ∞ C #	E ∞	E ∞ C #
直 腸	E ∞ C #	E ∞ C ∞	E ∞ C ∞

¹⁾ - : 接種平板上に発育したコロニー数 0個 ; + : 接種平板上に発育したコロニー数 <10個 ; # : 接種平板上に発育したコロニー数 10~30個 ; ∞ : 接種平板上に発育したコロニー数 >100個.

²⁾ E : *E. coli*; C : *Clostridium perfringens*; Cn : *Clostridium novyi*.

³⁾ Cn については 1g 中のコロニー数を log で示した.

細菌学的検査成績 : 肝臓の塗抹標本はトキシプラズマに対する FA 法では陰性であったが、Cn に対する FA 法では全例陽性を示した。

菌分離では、好気性培養、10% CO₂ およびスチールウール法による嫌気性培養では菌は分離されず、ガス噴射法では3例中1例の各実質臓器から直径1mm縮毛状透明のコロニーを形成する亜端に楕円形のラケット状芽胞を有するグラム陽性大桿菌 (図1) が、10⁴~10⁹ CFU/g 分離された (表3)。

分離菌の生化学的性状は、肝臓および肺由来2株は同一の性状を示した。すなわち、溶血性を有し、レシチナーゼ、リパーゼ、硫酸塩還元およびゼラチン液化陽性で、インドールおよびウレアーゼは陰性であった。炭水化物分解能はブドウ糖、マンノース、マンニット、果糖、麦芽糖およびソルビットを分解し、乳糖、白糖、キシロース、トレハロース、メリビオース、ズルシットおよびサリシンの分解性を欠いた。

分離菌の毒素産生能試験では、上記2株の培養上清をマウス尾静脈に接種したところ、8時間以内に全例死亡し、毒素産生能は陽性であった。

分離菌の VFA 産生能試験では、酪酸およびプロピオン酸が検出された (図2)。以上の成績から、分離菌は、Cn-A 型と同定された。

薬剤感受性試験では、PCG, ABPC, DSM, KM, FM, TC, OTC, EM, OM, KT, SPM, TS, CP, TP, NB, BC, LM, FZ, NF, NA および OA の11種にきわめて高い感受性を示したが、CL, PL, SMM および SDM の4種類には耐性を示した。

肝臓中の VFA 検出試験では、Cn が分離されなかった残り 2 例の肝臓についても VFA 検出を試みたところ、酪酸、プロピオン酸が検出され、Cn の VFA 産生パターンと一致した (図 3)。

給与飼料の細菌検査では、給与されていた残飯から生菌数で $10^{8.6}$ CFU/g、*E. coli* が $10^{8.1}$ CFU/g、*Clostridium perfringens* が $10^{6.2}$ CFU/g と分離されたが、Cn は単離できなかつた (表 4)。

Cn 抗体保有状況：発生農家 19 頭の IHA 価は発生後 1 カ月に 1 : 128~512 を示し、幾何平均 (GM) 抗体価は

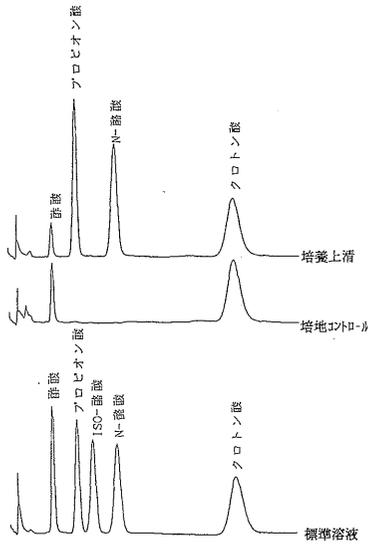


図 2 N2-401 株の培養上清中の VFA 産生パターン

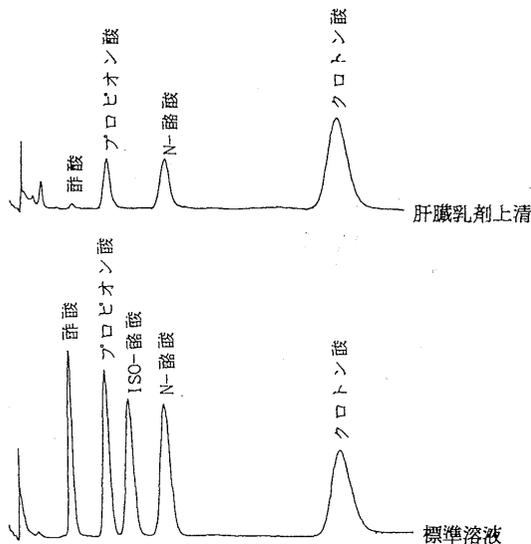


図 3 症例 No. 2 の肝臓乳剤中の VFA パターン

1 : 213.3 であり、きわめて高い価を示した。いっぽう、未発生農家では、1 : 8 以上を示した繁殖豚は農家戸数で 20 戸中 3 戸、頭数で 100 頭中 3 頭 (GM 抗体価 1 : 2.1)、肥育豚で 20 戸中 4 戸、100 頭中 5 頭 (GM 抗体価 1 : 2.3) であった (表 5)。

ウイルス学的検査成績：CPE を示す病原ウイルスは分離されなかつた。

考 察

Cn は *Clostridium* 属のなかでも高い嫌気度を要求し、分離が困難とされている [1]。今回の例でも芽胞形成率の最も低い個体からのみ菌分離に成功したが、死後は時間の経過ともなつて菌分離は困難になるものと思われる。しかし、死後かなり時間が経過した材料でも、また、ガス噴射法の器具がない場合でも、肝臓の被膜下における泡沫発酵および肝臓実質のスポンジ状などの特徴的所見とその直接塗抹標本中にラケット状芽胞を有するグラム陽性大型桿菌が多数認められた場合、FA 法による診断 [4] および被検臓器からの VFA 産生試験成績から診断は可能である。

今回の分離株は生化学的性状 [6] およびガスクロマトグラフィーによる VFA の産生パターン [3] から A 型と同定し、マウス致死性の有毒株であった。

Cn 発生例として、瀬能ら [9] は放牧場における Cn B 型による繁殖豚の死亡例、伊藤ら [5] は Cn-A 型による繁殖豚の死亡例を報告しているが、いずれも感染源を特定していない。今回の発生例では、給与飼料から Cn の単離はできなかつたが、罹病豚が残飯のみを与えられていた繁殖豚に限られ、その半数近くが死亡する集団発生であった。いっぽう、残飯の他に抗菌剤が含まれていた配合飼料を給与していた育成豚や、配合飼料のみ給与し

表 4 飼料からの菌分離成績

検 体	生菌数	E ¹⁾	EN	C	Cs
飼料 とうふかす	8.6 ²⁾	8.1	8.3	6.2	6.1
給与混合餌	7.1	6.5	6.1	<3	3.1

¹⁾ E : *E. coli*; EN : *Enterobacter* spp; C : *Clostridium perfringens*; Cs : *Clostridium* spp.

²⁾ 菌量 (log CFU/g)。

表 5 IHA による新潟県内飼養豚の分離菌 (CnN2-402 株) に対する抗体検査

区 分	繁 殖 豚			肥 育 豚		
	戸数	頭数	GM 抗体価	戸数	頭数	GM 抗体価
未発生農家	3/20 ¹⁾	3/100	2.1	4/20	5/100	2.3
発生農家	1/1	19/19	213.3	NT ²⁾	NT	

¹⁾ 陽性頭数 (抗体価 1 : 8 以上) / 検査頭数。

²⁾ 検査実施せず。

ていた子豚は発症しなかったことから、残飯の汚染に起因した経口感染例であると推察された。感染源については、今回の症例が残飯給与という特殊な養豚経営であり、残飯は加熱後与えられていたが、給与飼料から *Clostridium* 属が 10^6 CFU/g 分離され、発生月の5月は現地では気温が高いこともあって、野外に置かれた飼料が非常に腐敗しやすい悪条件であった。

豚での Cn 抗体調査の報告は少ないが、当該農家で発生1カ月後に調査した Cn 抗体価は 1:128~512 に分布し、GM 抗体価は 1:213.3 を示し、未発生農家 (GM 抗体価 1:2.1) と比較して有意差が認められ、Cn の高度汚染が推察された。

対策として、病性鑑定実施時にクロストリジウム感染症が疑われたため、繁殖豚に ABPC の筋肉注射、PCG および DSM の合剤を飼料に添加した。また、ヨード剤による畜舎消毒を実施し、給与していた残飯を廃棄し、残飯の保存および攪拌に用いた容器は十分に洗浄、消毒したところ、その後の発生は認められていない。

今回の症例から分離された Cn は多くの薬剤にきわめて感受性が高く、本症例でも ABPC を注射された繁殖豚は死亡を免れており、早期に ABPC 等の抗生物質を投与することで、発症豚に対する治療効果が期待できるものと考えられた。

野外における Cn 感染症は甚急性の疾病であり、感染豚はほとんど症状を示すことなく急死するため、生前の診断が非常に困難である。また、Cn 感染症と診断されたからでは同居豚に対する措置が間に合わない場合があ

る。その予防対策として牛では牛クロストリジウム病3種混合不活化ワクチンが市販されているが、豚に使用できるワクチンは製造されていない。Cn 感染症の確実な予防のために、豚用ワクチンの早期開発が望まれるところである。

稿を終えるにあたり、Cn 蛍光標識抗体を分与していただいた愛知県東三河家畜保健衛生所、伊藤裕和氏ならびに Cn 高度免疫家兎血清を分与していただいた神奈川県家畜病性鑑定所、稲垣靖子氏に深甚なる謝意を表する。

引用文献

- [1] 東 量三:日獣会誌, 29, 361~370 (1976)
- [2] 東 量三:牛病学, 清水高正, 他編, 第2版, 266~268, 近代出版, 東京 (1988)
- [3] Holdeman LV, Cato EP, Moore WEC: Anaerobe Laboratory Manual, 4th ed, 1-152, VPI Anaerobe Laboratory Virginia Polytechnic Institute and State University, Virginia (1977)
- [4] 伊藤裕和, 内田正記, 杉浦 均, 他:日獣会誌, 40, 365-369 (1987)
- [5] 伊藤裕和, 岡田正二, 杉山弘行, 他:獣医畜産新報, 41, 489-493 (1988)
- [6] 小酒井 望, 鈴木祥一郎:嫌気性菌と嫌気性菌症, 123-135, 医学書院, 東京 (1968)
- [7] 尾田 進:豚病臨床図説, 石井泰明, 他編, 第1版, 129-138, 日本畜産振興会, 東京 (1985)
- [8] Sawada T, Rimler RB, Rhoades KR: J Clin Microbiol, 15, 752-756 (1982)
- [9] 瀬能 昇:臨床獣医, 3, 67-72 (1985)
- [10] Tamura Y, Makie H, Tanaka S: Vet Microbiol, 10, 315-324 (1985)

Outbreak of Malignant Edema due to *Clostridium novyi* Type A in Breeding Pigs

Dai NAKABAYASHI*, Hiroaki OGINO, Taisei WATANABE, Masahiro NABEYA, Kyousuke ENDOU, Nobuko HUJIWARA, Jun WASHIZAWA, Mitunobu WAKABAYASHI and Koshu MIYAKOSHI

* Chuo Livestock Hygiene Service Center, Niigata Prefecture, Nishikawa-machi, Nishikanbara, Niigata 959-04, Japan

SUMMARY

In a breeding pig farm 11 animals died acutely showing nasal hemorrhage within 7 days, and 3 autopsy cases revealed all the organs including the liver were considerably softened and spongy with numerous gas. Histologically, all the organs were severely necrotized in the presence of gram positive large bacilli, which were identified as *Clostridium novyi* Type A (Cn-A). The Cn-A organisms were isolated by the CO₂ gas jet culture method, and the surviving 19 animals showed indirect hemagglutination titers of 1:128~512 against the Cn-A isolate. The present outbreak seemed to result from food contamination.

—Key words: *Clostridium novyi* type A, outbreak, pig.

* Present address: Kaetsu Livestock Hygiene Service Center, Niigata Prefecture, 1-5-23 Toshin-cho, Shibata 957, Japan

J. Jpn Vet. Med. Assoc., 49, 159~163 (1996)