

牛の腸管内におけるClostridium perfringensの保有状況

誌名	日本獣医師会雑誌 = Journal of the Japan Veterinary Medical Association
ISSN	04466454
著者	武居, 和樹 村上, 賢司 布藤, 雅之 宇野, 健治 東, 量三
巻/号	44巻6号
掲載ページ	p. 577-580
発行年月	1991年6月

牛の腸管内における *Clostridium perfringens* の保有状況武居和樹¹⁾ 村上賢司¹⁾ 布藤雅之¹⁾宇野健治¹⁾ 東 量三²⁾

1) 滋賀県湖東家畜保健衛生所 (近江八幡市西本郷 226-1, 〒523)

2) 東京農業大学畜産学科 (東京都世田谷区桜丘 1-1-1, 〒154)

(平成2年7月9日受付・平成3年2月8日受理)

Proliferation of *Clostridium perfringens* in the Intestines of Cattle

KAZUKI TAKESUE*, KENJI MURAKAMI, MASAYUKI HUTO, KENJI UNO and RYOUZOU AZUMA

(* Koto Livestock Hygiene Service Center, Shiga Prefecture, Omi-hachiman, Shiga 523)

SUMMARY

In order to study the etiological background of bovine necrotic enteritis, 51 animals having various diseases, including 14 animals with necrotic enteritis were examined for *Clostridium perfringens* and *Escherichia coli*, especially as regards their ages. Normal 107 Holstein and 81 Japanese Black Cattle were also examined in like manner. In the former group, intestinal content of postmortem animals was used as material for isolating the organisms and for the latter group, feces were used. The results obtained are as follows: In 37 diseased animals, 12 of 20 less than 60 days of age and 12 of 17 more than 60 days of age had both *C. perfringens* and *E. coli* with a high bacterial order, 10^{5-8} cfu/g and 10^8 cfu/g, respectively. In feces of normal animals less than 60 days of age, Holstein cattle had *C. perfringens* at an 80% isolation rate with $10^{5.9}$ cfu bacterial count and Japanese Black Cattle in 19.3% with ca. $10^{5.5}$ cfu/g at such a rate and count. For *E. coli* in the former, it was $10^{6.2}$ cfu/g and in the latter, $10^{7.7}$ cfu/g both on the average for all-age-group animals. The results with 4 or 5 times' samplings of feces until their 72-80 days of age for 3 Holstein and 13 Japanese Black Cattle also showed a similar trend regarding *C. perfringens*. Besides, 5 calf-replacers and 5 calf-starters used for Holstein cattle did not show any existence of *C. perfringens*. From these results, it is suggested that a greater number of *C. perfringens* in feces of Holstein calves less than 60 days of age may be due to a calf-replacer feeding system and *E. coli* could increase in any diseased condition.

—Key Words : bovine necrotic enteritis, *Clostridium perfringens*, intestinal bacterial flora.

—J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 44, 577~580 (1991)

要 約

牛の壊死性腸炎の発生要因を知る目的で壊死性腸炎牛 14 頭, 各種の病牛 37 頭, さらに健康牛としてホルスタイン種 107 頭および黒毛和種 81 頭について, *Clostridium perfringens* と大腸菌の保有状況を定量的に調べた。また, ホルスタイン種 3 頭および黒毛和種 13 頭について, 出生直後から 80 日齢までの期間, *C. perfringens* の出現状況を経時的に調べた。

病牛 37 頭では 60 日齢以下の 20 頭中 12 頭から, また 60 日齢以上の 17 頭中 12 頭から, *C. perfringens* は 10^{5-6} cfu/g, 大腸菌は 10^8 cfu/g の程度に分離された。60 日齢以下の正常糞便ではホルスタイン種は 80% の分離率で平均菌数は $10^{5.9}$ cfu/g であり, 黒毛和種は同 19.3%, $10^{5.2}$ cfu/g であった。大腸菌は全例の牛から 10^{6-8} cfu/g の範囲で分離された。また, 経時的な検査では *C. perfringens* は人工乳哺育のホルスタイン種子牛に多く出現したのに対し, 母乳哺育の黒毛和種では稀であった。

以上のことから, 60 日齢以下のホルスタイン種の糞便における *C. perfringens* の増殖は代用乳の給与によるものであろうということ, および大腸菌は如何なる病的状況の牛でも増加することが示唆された。

—キーワード : 牛の壊死性腸炎, *C. perfringens*, 牛の腸管内バクテリアフローラ。

最近、牛の *Clostridium perfringens* 壊死性腸炎およびガス壊疽の発生事例が全国的に増加の傾向にある^{1,10)}。本菌は動物の腸管および土壌中に分布し、腸管内では腸内細菌叢の一菌種とされている。

いっぽう、本病は散発的に発生することが多く、その場合でも他の疾病と混合感染することが多い。しかし、本病の発生誘因については不明な点が多く、さらにエンテロトキセミアと呼ばれる腸管感染症の発病機序についてもほとんど解明されないままにある。また、大腸菌は本病の成立に伴い、空腸での異常増殖が認められているものの、その意義については不明である。

そこで今回、本病の発生誘因および発生機序に関する基礎的知見を得る目的で、病牛および健康牛における *C. perfringens* ならびに大腸菌の保有状況を定量的に調べた。

材料および方法

供試牛

本調査で供試した牛は病牛および健康牛計 255 頭で、種々の日齢のものが含まれる。なお、これらはすべて滋賀県下の一般農家で飼育されたものである。

病牛の内訳は壊死性腸炎に罹患したものの 14 頭、*C. perfringens* 以外の病原体による腸管感染症の病牛 18 頭および全身感染症や局所感染を呈した腸管感染症以外のもの 19 頭の計 51 頭である。また、健康牛は外見上異常を認めない 188 頭で、各発育段階のものを供試した。その内訳はホルスタイン種 107 頭（肉用 61 頭、乳用 46 頭）および黒毛和種は 81 頭である。

さらに菌の消長を経時的に観察するため、同一の農家で飼育された健康なホルスタイン種人工乳哺育子牛 3 頭、およびそれ以外の 3 農家由来黒毛和種の母乳哺育子牛 13 頭をそれぞれ供試した。

なお、供試子牛に給与されていた代用乳 5 検体および人工乳 5 検体について *C. perfringens* の検索を実施した。

細菌学的検査

C. perfringens の定量培養は、病牛については原則として小腸内容物、また健康牛では直腸便または排泄直後の糞便について採材後すみやかに実施した。すなわち、あらかじめ糞便や腸内容物の一定量が秤量できる白金耳量を自製し、新鮮な材料の 1 白金耳を滅菌生食液 2 ml に入れ 400 倍希釈液とした。この液 0.1 ml をとり 1.9 ml 滅菌生食液を入れた試験管の系列を作り、20 倍希釈を 3 段階作った。また、人工乳および代用乳は粉碎処理後 1 g を秤量し、9 ml の滅菌生食液に混じり 10 倍段階希釈を行った。

分離用培地には卵黄加カナマイシン含有 CW 寒天培地（ニッスイ）を用い、平板 1 枚を 4 分画し、各分画に上記の希釈系列からそれぞれ 0.05 ml を接種し均等に塗

抹した。カタリスト法により 37°C で一夜の嫌気培養を行い、平板上の集落数を計測して供試材料 1 g 当たりの菌数 (cfu/g) を算出した。飼料の場合は、さらに 1 g をクックドミート培地 (DIFCO) 10 ml に増菌培養し、上記と同様の培地、培養条件で行った。なお、菌数の測定にあたっては、平板培地上のレシチナーゼを産生し、かつ乳白色の層を周辺に生じたクロストリジウムの特有な集落を数えた。さらに、血液寒天培地に移植し、好気培養では発育しないことを確認した。

各供試材料から分離した *C. perfringens* の最終的な同定は卵黄加 CW 寒天培地上の乳糖分解能とレシチナーゼ生産、 α 抗毒素血清濾紙（ニッスイ）によるレシチナーゼの抑制、変法 VL 培地のガスの産生と菌の形態、10% ゼラチン分解陽性および牛乳培地でのいわゆる「嵐の発酵」(stormy fermentation) の確認により行った。さらに、菌の型別は健康牛から分離した 7 株と病牛から分離した 3 株について α 抗毒素（千葉血清製）を使用し、東の記載²⁾に従って行った。

大腸菌の分離は上記の *C. perfringens* と同一の希釈液について行い、DHL 寒天培地に塗抹、37°C で一夜培養した。DHL 培地上で赤色コロニーを形成したコロニーを大腸菌として菌数を測定した。

成績

病牛の検索成績

供試病牛は壊死性腸炎、その他の原因による腸管感染症およびそれら以外の感染症 3 病型に分類し、それぞれの腸内容物または糞便について *C. perfringens* および大腸菌の検索を定量的に行った。その成績は表 1 に示すとおりである。この表から明らかなように、壊死性腸炎の罹患牛では *C. perfringens* および大腸菌とも日齢とは関係なく、それぞれ $10^{7.3-7.5}$ cfu/g および $10^{6.3-6.7}$ cfu/g であった。

いっぽう、他の腸管感染症にはコクシジウム病、サルモネラ症、ロタウイルス病等種々の疾病が含まれるが、

表 1 病牛腸内容物からの *C. perfringens* および大腸菌の分離

病 型	分離頭数 ¹⁾ / 供試頭数	日 齢	分離菌数 ²⁾	
			<i>C. perfringens</i>	大腸菌
壊死性腸炎	5/5	9~60	7.5	8.7
	9/9	61<	7.3	8.3
他原因の腸管感染症 ³⁾	10/15	<60	6.7	8.4
	3/3	61<	5.7	8.8
腸管感染症以外の疾病 ⁴⁾	2/5	<60	8.4	8.7
	9/14	61<	7.1	8.6

注：1) *C. perfringens* が分離された頭数、2) 検体 1 g 当たり平均分離菌数の対数値、3) コクシジウム病、サルモネラ症、ロタウイルス病等、4) ヘモフィルス・ソムナス感染症、悪性水腫、肺炎等

表2 健康牛糞便からの *C. perfringens* および大腸菌の分離成績

日 齢	品 種 ¹⁾	分離項数 ²⁾ / 供試頭数	分離菌数 ³⁾	
			<i>C. perfringens</i>	大腸菌
<20	H	10/14	5.5	8.1
	B	5/23	5.7	8.4
21~60	H	18/21	6.1	7.4
	B	6/36	5.3	7.6
61~300	H	0/27	—	6.8
	B	0/17	—	6.9
301<	H	3/45	4.9	5.0
	B	0/5	—	7.6

注：1) Hはホルスタイン種, Bは黒毛和種, 2) *C. perfringens* が分離された頭数, 3) 検体 1g 当たり平均分離菌数の対数値

供試牛 18 頭のうち 60 日齢以下の 15 頭中 10 頭から *C. perfringens* が分離された。その菌数は $10^{6.7}$ cfu/g であり、壊死性腸炎のそれに比較して明らかに少なかった。また、61 日齢以上の 3 頭では全頭から *C. perfringens* が分離されたが、その菌数は $10^{5.7}$ cfu/g とさらに少なかった。

さらに、腸管感染症以外のものに分類した感染症にはヘモフィルス・ソムナス感染症、悪性水腫、肺炎等が含まれるが、供試牛 19 頭のうち 11 頭から *C. perfringens* が分離されたが、その菌数は 60 日齢以下のもので $10^{8.4}$ cfu/g、また 61 日齢以上のものでは $10^{8.1}$ cfu/g と比較的多かった。

健康牛検索成績

ホルスタイン種および黒毛和種の健康牛 188 頭について各発育段階ごとに糞便中の *C. perfringens* および大腸菌の検索を行った。その成績は表 2 に示すとおりである。この表から明らかなように *C. perfringens* の保有状況は発育段階で異なり、その分離率は 60 日齢以下の若齢牛では 71~86% に及び、かつ菌数は $10^{5.5-6.1}$ cfu/g に達した。その反面、61 日齢以上の牛では大部分のものは検出限界 (8×10^3 cfu/g) 以下であり、301 日齢以上のホルスタイン種のうち 3 頭から分離されたに過ぎず、しかも菌数は $10^{4.9}$ cfu/g と少数であった。他方、大腸菌は各発育段階とも 100% の分離率であったが、菌数は日齢の増加に伴い減少の傾向を示した。

健康子牛の経時的検索成績

健康牛の糞便中における *C. perfringens* および大腸菌の消長を観察するため同一個体について経時的に検索を行った。図 1 はホルスタイン種 3 頭の成績であり、*C. perfringens* は 17 日齢では $10^{7.8}$ cfu/g に達した 1 頭を除き、他の 2 頭は検出限界以下の菌数であった。しかし、31 日齢および 44 日齢では 3 頭とも $10^{4.2-7.4}$ cfu/g の水準で存在し 61 日齢で検出限界以下となった。また、大

菌数 (log₁₀cfu/g)

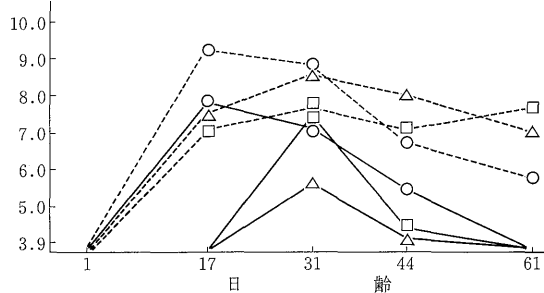


図1 ホルスタイン種健康子牛からの *C. perfringens* と大腸菌の経時的分離

表3 黒毛和種子牛正常便からの *C. perfringens* の経時的分離成績 (同一母乳給与子牛の追跡)

農 家	日 齢			
	~10日	21~30日	41~50日	71~80日
A	0/6	0/6	0/6	0/6
B	3/5	0/5	0/5	0/5
C	1/2	1/2	1/2	0/2
計	4/13	1/13	1/13	0/13

腸菌は 17~31 日齢で $10^{7.3-9.3}$ cfu/g に達し、以後は下降するか、観察期間中 10^7 cfu/g の程度で推移した。

他方、黒毛和種の子牛では表 3 に示すとおり、A 牧場の子牛 6 頭の *C. perfringens* の分離は毎回陰性の成績であった。しかし、B 牧場の子牛 5 頭では 10 日齢以下の検索で 3 頭から分離されたが、21 日齢以上のものからはもはや分離されなかった。また、C 牧場の子牛 2 頭では 50 日齢まで毎回 1 頭のみから分離された。

なお、飼料中の *C. perfringens* の検索は 10 検体について直接培養および増菌培養によって行ったが、本検索の範囲ではいずれの検体からも本菌は分離されなかった。

分離 *C. perfringens* の型別

病牛由来 3 株と健康牛由来 7 株についてそれぞれ毒素液を作製し、その毒素液をマウスに接種したところ、1 株を除いてすべて毒性を示しマウスは死亡または衰弱した。毒素の産生が確認された株について、これらの毒素と A 型抗毒素を感作したものをマウスに接種したところ、マウスは全て生存したことから検査した 9 株は全て A 型と判定された。

考 察

わが国での牛の正常糞便中の *C. perfringens* の検索は近藤ら⁶⁾によるものがあり、菌の分離率は 70% で菌数は 10^4 cfu/g とされている。今回の成績では *C. perfrin-*

gens は菌検出限界 (8×10^3 cfu/g) 以下のものを除き、60 日齢以下の健康なホルスタイン種牛の糞便からの分離率は 80%、また菌数は $10^{5.9}$ cfu/g であった。他方、60 日齢以下の健康な黒毛和種糞便では 31 ~ 40 日齢のものを除き、分離率 19.3% 菌数はほぼ $10^{5.5}$ cfu/g であった。このように、今回の調査範囲ではホルスタイン種牛の方が分離率でも菌数でも黒毛和種牛のそれらに比較して明らかに高い。このような品種による差の原因として次のことが考えられる。

ホルスタイン種の乳用雄子牛の場合、現在慣行の早期離乳法⁹⁾に準じて初乳吸飲後ただちに母牛から離され、それ以後はほぼ 8 週齢まで代用乳が給与される。また、人工乳は初乳吸飲時あるいは代用乳給与開始時から漸増的に給与され続ける。今回、供試したホルスタイン種子牛に対する代用乳および人工乳の給与スケジュールについては明らかにし得なかった。しかし、概ね上記の給与スケジュールに従って飼われていたものと容易に想像され、代用乳給与期間がまさに *C. perfringens* の分離率が高く、かつ菌数の多い時期に一致する。さらに、このことはホルスタイン種牛の経時的な検索成績においても代用乳給与期間に限定して本菌が出現しており、これを裏書しているといえよう。その一方で 60 日齢を過ぎて *C. perfringens* が分離されなくなるのは、ルーメンでの粗飼料消化活動が活発になって、その結果として腸内菌叢が相応なバランスを保持するようになり、*C. perfringens* が排除されるものとみられる。

これに反して、黒毛和種の子牛は常に母牛から哺乳される飼養形態であり、しかも授乳期間は少なくとも 4 カ月に及ぶ。したがって、今回供試のホルスタイン種と黒毛和種の飼料の質は明かに異なっているといえる。さて、人間での人工乳児の大便秘菌叢では *Bifidobacterium*, *Bacterides*, *Peptostreptococcus*, *Fusobacterium* 等がほぼ均等に優勢菌群として存在し、*Clostridium* も少数ながらにみられたのに反し、母乳児の大便秘菌叢では *Bifidobacterium* が全く単一の菌群として存在していたといわれる¹¹⁾。このことから類推して、今回、糞便の細菌叢全体については明らかにしていないが、*Clostridium* の分離率の差は母乳と代用乳の差を反映したものとみなされる。そのほかに、母乳哺育の場合、母牛が *C. perfringens* に対する血中抗体⁸⁾を持つと予想され、その移行抗体が本菌の保有状態に影響していると思われる。

壊死性腸炎の発生誘因として、飼料の急変、例えば冬期の貯蔵飼料から窒素含有量の多い青刈飼料への急激な変更、気象、外気温等の環境変化があり、その際の体調の変化に乗じて腸内の *C. perfringens* が増加し、その結

果として毒素の産生も高くなり発生するといわれる^{3,5)}。また、Bernhart⁴⁾はラットに馬肉と脱脂乳を飼料に加えて飼育すると、糞便中の *C. perfringens* が増加し安定に推移したと報じ、飼料内容の変化が本菌の増殖を招くと述べている。このように飼料の質の差によって容易に *C. perfringens* の消長が左右される事実からも、飼料の急変が本病の発生誘因として無視できないことは明白である。ハムスターで常用飼料に牧草を加えて飼育すると腸に常在する *Clostridium difficile* が増加し壊死性腸炎が起こったという報告⁷⁾があり、腸内に存在する *Clostridium* には共通な易増殖性があるといえるかも知れない。

また、今回の調査では *C. perfringens* は壊死性腸炎に限らず、それ以外の原因による腸管感染症等の病的状態の牛でも本菌は健康牛が糞便中に保有する菌数より 10 ~ 100 倍程度高い値を示した。この事実は本菌が種々の要因に対して容易に変動することを示しており、さらに病変の形成や毒素産生性の有無等今後検討しなければならない課題である。

今回、大腸菌の検索も同時に行ったが、正常糞便中における菌数はホルスタイン種で日齢の増加と共に漸減する傾向があったほかは各種要因の違いの差はそれほど明かではなかった。壊死性腸炎を含む各種疾病の際は、本菌が増殖する傾向が認められたがこれは周知の事実である。

引用文献

- 1) 東 量三：獣畜新報, 805, 475 ~ 479 (1988).
- 2) 東 量三, 近藤房生：鶏病研究会報, 17, 1 ~ 20 (1981).
- 3) 東 量三：牛病学, 大森常良ほか編, 第 1 版, 453 ~ 468, 近代出版, 東京 (1980).
- 4) BERNHART E. W., DURBIN G. T., LINDEN E., et al.: *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.*, 470 ~ 473 (1952).
- 5) COTTEREAU P.: *Economie et Med. Anim.*, 10, 258 ~ 274 (1969).
- 6) 近藤房生, 尾形 学：日本細菌学雑誌, 30, 477 ~ 484 (1975).
- 7) 三浦克洋, 中沢宗生, 浜岡隆文, ほか：日獣学誌 96 回講演要旨, 136 (1983).
- 8) 中林 大, 萩野博明, 渡辺大成, ほか：獣畜新報, 43, 593 ~ 597 (1990).
- 9) 杉原敏弘：乳用雄牛による肉生産の手引き, 水下善之ほか編, 36 ~ 53, 農林水産省北海道農業試験場, 札幌 (1980).
- 10) 武居和樹：獣畜新報, 805, 480 ~ 484 (1988).
- 11) 田中隆一郎, 山下哲郎, 岩淵 明, ほか：ヤクルト研究所研究報告集, 1, 24 ~ 28 (1970).