

廃用牛における腸管内細菌の生体内移行に関する調査

村上覚史^{1)†} 金澤美緒¹⁾ 村田 亮¹⁾ 関口真樹²⁾ 大場剛実³⁾

1) 東京農業大学農学部 (〒243-0034 厚木市船子1737)

2) 千葉県中央家畜保健衛生所 (〒285-0072 佐倉市岩富町497)

3) 富山県新川厚生センター (〒938-0025 黒部市堀切新343)

(2012年2月24日受付・2012年9月10日受理)

要 約

廃用牛における腸管内細菌の生体内移行 (bacterial translocation : BT) を解明するため、廃用牛12頭の臓器を細菌学的、病理学的及び免疫組織化学的手法を用いて調べた。その結果、腸間膜リンパ節 (MLN) の91.7%、肝臓の100%及び脾臓の66.7%から腸管内細菌が分離された。グラム陰性菌では、*Escherichia coli*がMLNの16.7%及び肝臓の8.3%から、*Klebsiella pneumoniae*と*Pseudomonas aeruginosa*が肝臓の8.3%から分離された。グラム陽性菌では、*Bacillus*属、*Enterococcus*属あるいは*Streptococcus*属及び*Staphylococcus*属が分離された。*S. aureus*の分離率はMLNで8.3%、肝臓で25%、脾臓で8.3%であった。抗*E. coli*ポリクローナル及び抗*S. aureus*抗体陽性抗原は両菌種が分離された臓器から免疫組織化学的手法で検出された。病理組織学的所見では、多くの検査牛の脾臓濾胞周縁帯に好中球集積層が出現し、MLN及び脾臓の濾胞にセロイド顆粒の蓄積が目立った。これらの成績から検査した肝臓に異常がみられた廃用牛でBT及び消耗状態が確認された。

—キーワード：bacterial translocation, 廃用牛, 腸内細菌。

----- 日獣会誌 66, 65~69 (2013)

本来、人も含めて哺乳動物の肝臓や脾臓などの腸管外臓器は無菌の状態である。ところが、われわれが過去にと畜場に搬入された肥育豚の腸間膜リンパ節 (MLN)、肝臓及び脾臓を調べたところ、腸管内細菌の移行現象が起きており、検査したこれらの臓器の多くは無菌ではないことが明らかになった [1]。腸管内細菌が腸管粘膜を越え、腸管外臓器に移行する現象は“腸管内細菌の生体内移行：bacterial translocation (BT) [2]”といわれている [3]。医学領域では、細菌の感染病巣がないにもかかわらず、全身的な消耗状態の人や免疫抑制状態にある人が敗血症になり、多臓器不全で死亡することがある。その原因の一つにBTが考えられており、特に外科領域で重要視されている [4]。BTは腸内細菌叢の変動による菌数の増加、物理的もしくは化学的腸粘膜防御能の障害、さらに宿主免疫能の低下が引き金となり、これら3条件のいずれか、あるいはこれらの条件が重複した時に発生する [5, 6]。また、ストレスが加わったことでもBTが発生する [7]。腸管粘膜を越えた細菌はリンパ行性もしくは血行性ルートで腸管外臓器に移行する [5,

6]。

搾乳牛が乳房炎、蹄葉炎、関節炎などで搾乳不適となった場合や乳量の低下が理由で多くは廃用となり、食用用としてと畜場に送られる。したがって、これらの廃用牛は何らかの病原体の感染や搾乳によるストレスを受け、消耗していたことが推察され、BTが発生しやすい状態になっていると考えられる。

今回、食用センターに搬入された廃用ホルスタイン牛においてBTが存在するかについて、MLN、肝臓及び脾臓から細菌を分離するとともに、これらの臓器を病理組織学的及び免疫組織化学的に調べることにより検討した。

材料及び方法

A食用センターへ2010年に経済性的問題から外貌上問題がなく、一般畜として搬入された廃用ホルスタイン牛12頭を用いた。と畜検査後、食用不適となった牛の肝臓 (左葉)、同一牛の脾臓及び空腸領域のMLNを現場においてただちにと畜検査員から受取り、外貌を観察

† 連絡責任者：村上覚史 (東京農業大学農学部畜産学科家畜衛生学研究室)

〒243-0034 厚木市船子1737 ☎・FAX 046-270-6604 E-mail : slmuraka@nodai.ac.jp

した。

細菌学的検査では、肝臓は任意の3カ所及び脾臓は1カ所について、熱したスパーテルで臓器表面、約5cm²を変色するまで焼絡し、1.5cm³のブロックにして無菌的に採材した。摘出した組織ブロックは、さらに90%エタノールに浸漬し、表面を軽く焼き殺菌した。MLNは90%エタノールに浸漬し、同様に表面を軽く焼いた。これらの材料は4℃で冷蔵保存し、BSE検査陰性を確認後、翌日、病理組織材料とともに、冷蔵保存のまま東京農業大学農学部家畜衛生学研究室に搬入した。その後、ただちに材料1gに対して9mlのペプトン水を加えたガラスホモゲナイザー（メカニカル制御攪拌機RW20デジタル、イカ・ジャパン株、大阪）で10%乳剤を作製した。これらの乳剤100μlを5%馬血液添加普通寒天(BA)培地に直接塗抹した。37℃、24時間好気培養後、コロニー数を計測し、形態を観察した。1コロニーを単離後、グラム染色を実施し、グラム陽性菌はカタラーゼ及びオキシダーゼ産生能を確かめた。*Staphylococcus*属はプロテインA及びクランピング因子の存在を市販のキット(PSラテックス、栄研化学株、東京)で確認し、デオキシリボスクレアゼ産生(DNA寒天培地、栄研化学株、東京)を調べた。さらに、卵黄加マンニット食塩寒天培地(栄研化学株、東京)上で卵黄反応とマンニットの分解能及び集落周囲の白色環形成の有無を観察し、*S. aureus*とcoagulase negative *Staphylococcus*(CNS)を区別した。桿菌については、さらに1週間好気培養し、芽胞形成の有無を観察した。

大腸菌群数の測定を目的として、MPN (most probable number) 法を実施した。乳剤の1ml、0.1ml及び0.01mlをそれぞれ3本のbrilliant green lactose broth (BGLB) (栄研化学株、東京) 10mlに接種した。37℃、24時間好気培養後、ダーラム管にガスが確認された試験管の本数から最確数(MPN)を算出した。ガス陽性となったBGLB培地をマッコンキー寒天培地(栄研化学株、東京)に画線塗抹して37℃、24時間好気培養した。マッコンキー寒天培地で発育した分離菌はコロニー形状と色調をみて、異なるコロニー1株について単離を行った。単離されたコロニーはTSI寒天培地(栄研化学株、東京)、SIM(栄研化学株、東京)、シモンズ・クエン酸ナトリウム培地(栄研化学株、東京)、尿素培地(栄研化学株、東京)及びブドウ糖ペプトン培地(栄研化学株、東京)に接種し、37℃、24時間好気培養後、分離菌の生化学的性状を確定した。市販のキット(api20E、日本ビオメリユー・バイテック株、東京)で菌種の同定を行った。分離された*Escherichia coli*のO群血清型は、市販の混合血清(病原性大腸菌免疫血清「生研」、デンカ生研株、東京)を用いてスクリーニングを行い、凝集が確認された場合、該当した混合血清に含

まれるO群血清を用いて凝集の有無を確認した。

病理組織学的検査では、細菌学的検査用に採材した肝臓と脾臓の採材跡周辺組織をただちに切り出し、MLNとともに20%ホルマリン液で固定した。その後、パラフィン切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン(HE)染色を行った。組織中の褐色色素については、ベルリンブルー染色によって赤血球の破壊や溶血の指標となるヘモジゲリンを、シュモール反応によって細胞障害の指標となるセロイド・リポフスチン顆粒を鑑別した。

免疫組織化学的検査は、BA培地で4log cfu/g以上の*S. aureus*を含むグラム陽性菌及びBGLBで1,100/g以上の大腸菌群が検出された臓器のパラフィンブロックについて実施した。この基準は経験上、分離された細菌数が3log cfu/g以上でない組織切片内に存在する細菌抗原を見つけることがきわめて困難となるからである。一次抗体は市販の抗*E. coli*ポリクローナルウサギ抗体(非形質転換株K12、C600種;ダコ・ジャパン株、東京)を1:3,200で、また動物衛生研究所より分与された抗*S. aureus*北見3-9D株抗体を1:5,120に希釈し、streptavidin biotin conjugate (SAB)法(ヒストファインSAB-PO[®]キット、株ニチレイ、東京)で免疫染色した。陰性対照は一次抗体を反応させない切片を使用した。なお、抗*E. coli*ポリクローナルウサギ抗体は腸内細菌科の数種及び*Pseudomonas aeruginosa*と強い交差反応を起こすことが判明している[1]。

成 績

肉眼的に12頭の肝臓は、被膜の混濁と横隔膜及び脾臓との癒着があり、6頭の肝実質に大小不同の出血斑が散見された。脾臓は、肝臓との癒着領域の被膜における肥厚以外、著変はみられなかった。MLNの明白な腫大は観察されなかった。

細菌学的所見では、BA培地で12頭すべての牛から細菌が分離された。臓器別には、MLNは11頭(91.7%)、肝臓はすべて(100%)及び脾臓は8頭(66.7%)から細菌が分離された。菌数が4log cfu/g以上となった臓器は、MLNで1例、肝臓で2例及び脾臓で3例であった。菌数が2log~4log cfu/g未満の臓器は、MLN及び肝臓が各10例、脾臓が5例であった。

好気性グラム陰性菌の分離頭数とその菌種を表1に示した。このうち大腸菌群の最確数が1,100/g以上となった材料は1頭のMLN及び肝臓のみであった。その他の牛のMLN、肝臓及び脾臓から分離された大腸菌群数は少なく最確数が4/gに止まった。分離された*E. coli*の血清型は、いずれの混合血清にも凝集しなかった。

好気性グラム陽性菌が分離された牛の頭数及び分離菌種を表2に示した。*Staphylococcus*属は6頭から分離され、*S. aureus*は3頭から、CNSは5頭から分離された。

表1 廃用ホルスタイン牛12頭の腸管外臓器における大腸菌群数及びグラム陰性菌の分離状況

臓器	分離頭数／ 検査頭数(%)	平均大腸菌群数* (MPN/g)	<i>Escherichia coli</i> **	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	その他
MLN	3/12 (25)	>94.5 (4, >1,100)	2***	0	0	0
肝臓	6/12 (50)	>94.6 (4~>1,100)	1	1	1	5
脾臓	1/12 (8.3)	4	0	0	0	1

MLN：腸間膜リンパ節（空腸リンパ節）

*：<3は3/gとして計算した。

**：MLN及び肝臓から>1,100/g以上分離された。

***：検出頭数

表2 廃用ホルスタイン牛12頭の腸管外臓器におけるグラム陽性菌の分離状況

臓器	分離頭数／ 検査頭数(%)	<i>Bacillus</i> 属	<i>Enterococcus</i> 属 or <i>Streptococcus</i> 属	<i>Staphylococcus</i> 属		その他
				<i>S. aureus</i>	CNS	
MLN	10/12 (83.3)	2*	3	1	1	5
肝臓	11/12 (91.7)	1	5	3	5	2
脾臓	7/12 (58.3)	1	3	1	2	1

CNS：コアグラールゼ陰性ブドウ球菌

MLN：腸間膜リンパ節

*：検出頭数

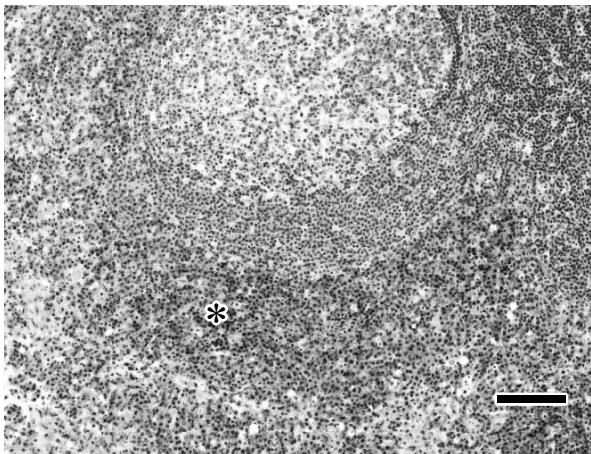


図1 脾臓濾胞の活性化と濾胞周縁帯（*）における好中球の集積（HE染色 Bar = 100 μm）

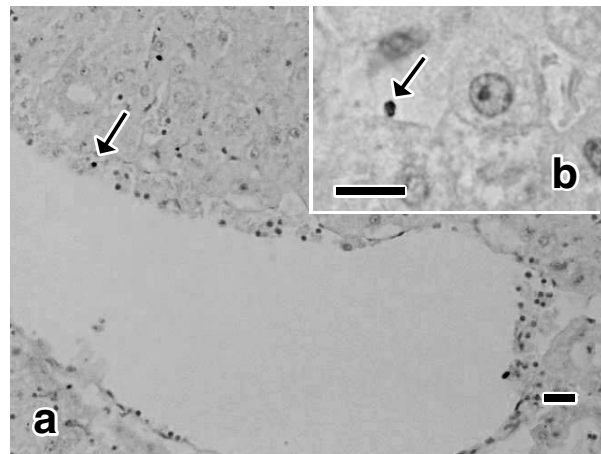


図2 a：肝臓の中心静脈拡張とその周囲で検出された抗*E. coli*抗体陽性抗原（矢印）（SAB染色 Bar = 10 μm）

b：肝類洞で検出された抗*E. coli*抗体陽性抗原（矢印）（HE染色 Bar = 10 μm）

このうち1頭の肝臓と脾臓から *S. aureus* が、肝臓とMLNからCNSが分離された。この牛の *S. aureus* の分離細菌数は肝臓と脾臓で4log cfu/g以上であった。別の1頭の肝臓とMLNから *S. aureus* が、脾臓からCNSが分離された。CNSが肝臓と脾臓から重複して分離された牛は1頭のみであった。その他、1頭の肝臓から *S. aureus* が、3頭の肝臓からCNSが分離された。

病理組織学的検査の結果、肝臓では、巣状壊死が3例（25%）、限局して鬱血を伴った類洞の拡張と出血病変が6例（50%）にみられた。また著しい小葉間結合組織

の肥厚領域に好酸球浸潤を伴ったものが1例みられた。9例（75%）の肝類洞に好中球が散見されたが、クッパー星細胞の腫大はなかった。脾臓では、濾胞が明瞭で、胚中心にベルリンブルー陰性、シュモール反応陽性顆粒の貪食像がみられた。また、反応に強弱はあるものの、すべての例で、濾胞周縁帯に好中球の集積層が形成されていた（図1）。赤脾髄では、ベルリンブルー染色陽性のヘモジデリンが顕著に蓄積した例が多かった。MLNでは、胚中心が明瞭で、髓洞の拡張を伴ってマクロファージに貪食されたベルリンブルー陰性、シュモール反応陽

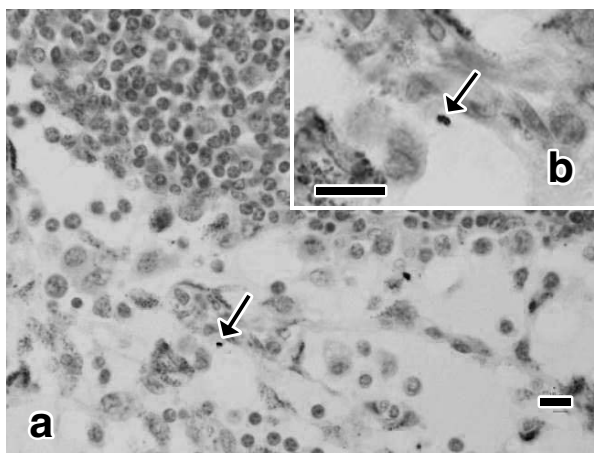


図3 a : 空腸リンパ節の髄洞で検出された抗*E. coli* 抗体陽性抗原 (矢印) (SAB 染色 Bar = 10 μ m)
b : a の抗*E. coli* 抗体陽性抗原 (矢印) の強拡大像 (SAB 染色 Bar = 10 μ m)

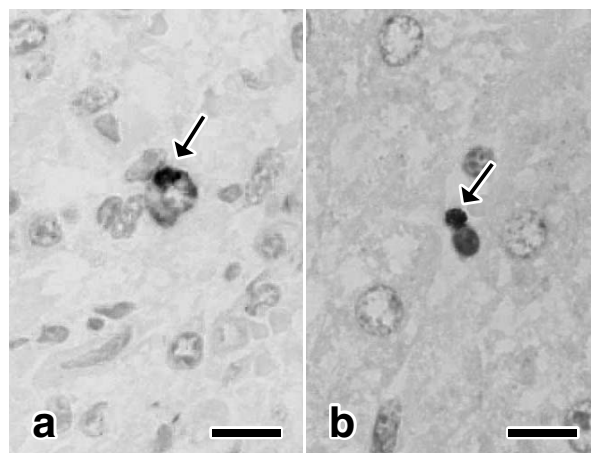


図4 a : 赤脾髄のマクロファージで検出された抗*S. aureus* 抗体陽性抗原 (矢印) (HE 染色 Bar = 10 μ m)
b : 肝類洞で検出された抗*S. aureus* 抗体陽性抗原 (矢印) (HE 染色 Bar = 10 μ m)

性顆粒が目立った。

1,100MPN/g 以上の大腸菌群数が検出された肝臓の中心静脈周囲 (図2a) や肝類洞 (図2b) 及び別個体1頭のMLNの髄洞 (図3a, b) で免疫組織化学的に抗*E. coli* 抗体陽性抗原が検出された。BA培地から4log cfu/g 以上で細菌が分離され、グラム陰性菌の分離がなかった1頭の脾臓の赤脾髄もしくは濾胞辺縁帯 (図4a) 及び肝類洞 (図4b) で抗*S. aureus* 抗体陽性抗原が検出された。

考 察

腸管外臓器から細菌が分離されること、特にMLNからの分離がBTの証明として広く用いられている [5, 6]。今回、調査した廃用牛のMLN、肝臓及び脾臓から*E. coli* を含む腸内細菌科の細菌、*P. aeruginosa*、*Enterococcus* 属あるいは *Streptococcus* 属及び *Staphylococcus* 属が分離された。これらの細菌はラットやマウスを用いた実験動物でBTをよく起こすことが知られている [5, 8]。さらに、抗*E. coli* 抗体陽性抗原がMLN及び肝臓で、抗*S. aureus* 抗体陽性抗原が肝臓と脾臓で検出された。したがって、今回検査した廃用ホルスタイン牛では、BTがごく普通に起きていたことが判明し、今後、頭数と検査部位を増やして廃用牛のBTの実態を調査する必要がある。

脾臓濾胞周縁帯は、血流によって運ばれてきた抗原や微生物などの微小な物体を処理する免疫フィルターとしての重要な場を提供し [9, 10]、炎症の早期に好中球が最も早く出現する部位として知られている [9, 11]。今回検査した牛のほとんどに脾臓濾胞周縁帯における好中球集積層の形成所見が観察されており、血流を介して何らかの抗原が脾臓に到達していたことが示唆される。

BTを起こす細菌は一見、宿主にとって病原性を発現する株と思われがちだが、BTを起こした*E. coli* は宿主にとって非病原性であることがほとんどで [12, 13]、*Staphylococcus* 属も病変部と関わりなく腸管外臓器から分離されてくる [1]。したがって、BTを起こした細菌が今回の脾臓所見に関与していたかどうかは不明である。

腸内細菌叢が混乱すると健康な動物でもMLNから腸管内細菌が分離されることがある。しかし菌叢が回復すればMLNはふたたび無菌状態となる [14]。本調査で肝臓や脾臓から腸内細菌が分離されたことは、肝門脈から、もしくはMLNを通過してこれらの臓器に至った可能性が推察された。

ヘモジデリンを除くMLN及び脾臓でみられた褐色顆粒はマクロファージに蓄積していた。リポフスチンは障害を受けた細胞内小器官や細胞構成成分の自己食食過程で形成され、脳神経細胞や実質細胞に発現するのに対し、セロイドはもっぱらマクロファージの異物食食過程で発生し、過酸化物質と脂質や蛋白質とが重合して形成される [15]。したがって、マクロファージに蓄積した色素顆粒はリポフスチンというよりセロイドであると考えられる。この顆粒はフリーラジカルによる組織損傷の結果生じる [15, 16] ことから、ほとんどの廃用牛は消耗状態だと畜場に搬入されてきたものと思われる。

われわれは外見上問題のない豚においてもBTがごく普通に起きていることを報告した [1]。今回、健康と判断された牛は検査していないので、その実態は不明であるが、検査した廃用牛にBTが起きていることが初めて確認された。今後、牛におけるBTの実態を解明することは「食の安全と安心」という観点からきわめて重要である。

細菌学的検査に協力した当時の学部生に感謝する。

引用文献

- [1] Murakami S, Kanazawa M, Sugishima M, Ogawa A, Ohba T : Relationship between bacterial translocation and isolation of enteric bacteria from extraintestinal organs in slaughtered pigs. *J Vet Med Sci*, 73, 1553-1560 (2011)
- [2] Berg RD, Garlington AW : Translocation of certain indigenous bacteria from the gastrointestinal tract to the lymph nodes and other organs in a gnotobiotic mouse model, *Infect Immun*, 23, 403-411 (1979)
- [3] 小玉正智：序，バクテリアルトランスロケーション，小玉正智編，第1版，2，メジカルセンス，東京（1998）
- [4] 谷 徹，小林知恵，近藤浩之：発生病態と臨床報告，バクテリアルトランスロケーション，小玉正智編，第1版，18-33，メジカルセンス，東京（1998）
- [5] Berg RD : Bacterial translocation from the gastrointestinal tract, *Trends Microbiol*, 3, 149-154 (1995)
- [6] Berg RD : Bacterial translocation from the gastrointestinal tract, *Mechanisms in the pathogenesis of enteric diseases 2*, Paul PS, Francis DH, eds, 11-30, Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York (1999)
- [7] Bailey MT, Engler H, Sheridan JF : Stress induces the translocation of cutaneous and gastrointestinal microflora to secondary lymphoid organs of C57BL/6 mice, *J Neuroimmunol*, 171, 29-37 (2006)
- [8] Steffen EK, Berg RD, Deitch EA : Comparison of translocation rates of various indigenous bacteria from the gastrointestinal tract to the mesenteric lymph node, *J Infect Dis*, 157, 1032-1038 (1988)
- [9] 伊藤正文，浅井淳平：脾臓における防御機構，*病理と臨床*，6，1389-1395（1988）
- [10] 笹生俊一：脾微小循環とその異常，*病理と臨床*，6，1407-1412（1988）
- [11] 柳井徳磨：脾臓，*動物病理学各論*，日本獣医病理学会編，第2版，59-66，文永堂出版，東京（2010）
- [12] Reddy BS, MacFie J, Gatt M, Macfarlane-Smith L, Bitzopoulou K, Snelling AM : Commensal bacteria do translocate across the intestinal barrier in surgical patients, *Clin Nutr*, 26, 208-215 (2007)
- [13] Berg RD, Berg ME, Block FJ : Comparison of translocation of *Escherichia coli* strains from the gastrointestinal tract, *Germ free life and its ramifications*, Hashimoto K, et al eds, 53-58, XII ISG publishing committee, Shiozawa (1996)
- [14] Berg RD, Owens WE : Inhibition of translocation of viable *Escherichia coli* from the gastrointestinal tract of mice by bacterial antagonism, *Infect Immun*, 25, 820-827 (1979)
- [15] 高橋 潔，内藤 眞：ライソゾーム，*現代病理学体系第2巻A総論，細胞・組織の基本病変I*，飯島宗一編，第1版，251-305，中山書店，東京（1990）
- [16] 田代欣二：細胞障害のメカニズム，*動物病理学総論*，日本獣医病理学会編，第4版，13-22，文永堂出版，東京（2003）

Investigation of Bacterial Translocation in Culled Cows

Satoshi MURAKAMI*†, Mio KANAZAWA, Ryo MURATA,
Maki SEKIGUCHI and Takemi OHBA

* *Department of Animal Science, Tokyo University of Agriculture, 1737 Funako, Atsugi, 243-0034, Japan*

SUMMARY

To investigate the presence of bacterial translocation (BT) in cattle, twelve culled cows were examined bacteriologically, pathologically, and immunohistochemically. Enteric bacteria were isolated from 91.7% of mesenteric lymph nodes (MLN), 100% of livers, and 66.7% of spleens examined. Isolated gram-negative bacteria were identified as *Escherichia coli* in 16.7% of MLN and 8.3% of livers examined, and as *Klebsiella pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa* in 8.3% of livers. The isolated gram-positive bacteria from these organs were identified as the genera *Bacillus*, *Enterococcus*, or *Streptococcus* and *Staphylococcus*. *S. aureus* was also isolated from 8.3% of MLN, 25% of livers and 8.3% of spleens. Using anti-*E. coli* polyclonal and anti-*S. aureus* antibodies, we were able to detect antigens in the organs where these bacteria were isolated. Pathologically, we observed large accumulations of neutrophils in the marginal zone of the spleens, as well as large depositions of ceroid granules in the MLN and spleens. These results confirmed the presence of BT and a wasting state in culled animals with macroscopic abnormalities in their livers.

— Key words : bacterial translocation, culled cow, enteric bacteria.

† *Correspondence to : Satoshi MURAKAMI (Department of Animal Science, Tokyo University of Agriculture)
1737 Funako, Atsugi, 243-0034, Japan
TEL · FAX 046-270-6604 E-mail : s1muraka@nodai.ac.jp*

J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 66, 65 ~ 69 (2013)