

下痢の子豚にみられた回腸粘膜上皮細胞に付着する セグメント細菌

矢口裕司^{1)†} 芝原友幸²⁾ 楠原 徹³⁾ 小林 勝²⁾ 小林秀樹²⁾

1) 茨城県北家畜保健衛生所 (〒310-0002 水戸市中河内町 966-1)

2) ㈱農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究所 (〒305-0856 つくば市観音台 3-1-5)

3) 茨城県鹿行家畜保健衛生所 (〒311-1517 鉾田市鉾田 1367-3)

(2014年4月23日受付・2014年10月27日受理)

要 約

下痢及び発育不良が認められた40日齢離乳豚3頭について、病性鑑定を実施した。肉眼的に、回腸粘膜が肥厚し、パイエル板も腫大し、明瞭に認められた。組織学的には、回腸粘膜パイエル板における多数のリンパ小節形成及び同部位の粘膜絨毛の萎縮が認められた。さらに回腸粘膜上皮細胞には多数のフィラメント状細菌の付着が認められた。この細菌は、数珠状を呈し、グラム染色には陽性または陰性を示した。電顕的には、同細菌はセグメント細菌 (Segmented filamentous bacteria: SFB) の形態的特徴を示した。検索した3頭とも回腸には本菌の存在以外に、下痢に関係すると思われる要因は検出されなかった。以上のことから、豚の回腸においてSFB重度感染により、下痢が誘発される可能性が示唆された。——キーワード：下痢，子豚，セグメント細菌。

----- 日獣会誌 68, 107~111 (2015)

SFBは分節を有するフィラメント状の腸内細菌の総称である [1]。SFBは、宿主特異性をもつ腸管内共生菌 [2, 3] と考えられ、宿主の腸粘膜上皮細胞にきわめて強く接着する [1, 4]。SFBは独特の生活環をもち、その中でさまざまな細胞形態 (フィラメント状, “止め金状; holdfast” 及び芽胞状) を呈する [1]。SFBは、豚 [3-5]、牛 [6]、サル [7]、犬 [7]、マウス [1, 8]、ラット [8]、鶏 [9]、魚、昆虫及び人 [10] で確認されている。マウス及びラットのSFBは腸管免疫の中心となるTh17細胞を誘導し、パイエル板を発達させることが知られる [8]。

豚のSFBに関する報告は非常に少ない [3-5]。豚のSFBは分離培養が困難なため [3, 4]、その生物学的な特徴、生体に及ぼす影響等はほとんど解明されていない。今回、下痢の原因究明のために病性鑑定を実施したところ、回腸粘膜上皮細胞に多数のSFBが付着した症例に遭遇したため、その概要を報告する。

材料及び方法

発生状況と材料：2013年5月25日に、母豚80頭を飼養する一貫経営農場で、約30日齢の離乳豚の約60頭のうち20頭程度に下痢が認められた。5月28日以降に、飼料に酸化亜鉛を2,000ppm添加したものの、症状の改善はみられず、6月2日にそのうち2頭が死亡した。6月4日に、下痢の原因究明を目的とし、40日齢離乳豚3頭 (豚No. 1~3) を脳通電失神後、放血殺し病性鑑定を実施した。その後、同居豚の下痢は、加齢とともに回復していった。

血液生化学検査：剖検時の血液について、血液生化学検査を実施した。

病理学的検査：剖検後、主要臓器を10%中性緩衝ホルマリンで固定し、定法に従いパラフィン包埋、薄切後、切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色を実施した。SFBのみられた回腸についてグラム染色及び過ヨウ素酸シッフ (PAS) 反応を実施した。

回腸絨毛の萎縮の原因を調べる目的で、回腸パラフィ

† 連絡責任者：矢口裕司 (茨城県北家畜保健衛生所)

〒310-0002 水戸市中河内町 966-1

☎ 029-225-3241 FAX 029-224-6661

E-mail: y.yaguchi@pref.ibaraki.lg.jp

表1 臨床症状とSFBの関係

No.	日齢	体重 (kg)	体温 (°C)	臨床症状	SFBの形態及び数
1	40	4.5	38.0	削瘦	数珠状の分節を有するSFB多数付着 長さ: 15~28 μm
2	40	5.5	37.6	削瘦 泥状下痢	分節に乏しくNo. 1よりも短いSFB多数付着 長さ: 7~16 μm 時折SFB周囲に鞘状構造物認める
3	40	9.0	39.0	泥状下痢	数珠状の分節を有するSFB少数付着

表2 血液生化学所見

項目	単位	No. 1	No. 2	No. 3	参考基準値*
WBC	×10 ² /μl	130	-	254	87~379
RBC	×10 ⁴ /μl	691	-	693	530~800
Hb	mg/dl	13.9	-	12.5	9.0~14.0
Ht	%	45.4	-	42.1	26.0~41.0
PLT	×10 ⁴ /μl	15.6	-	43.7	6.6~31.5
A/G		0.88	0.87	0.87	0.5~2.2
総Chol	mg/dl	98	<50	67	41~128.4
TP	mg/dl	5.5	4.6	5.1	4.4~7.4
BUN	mg/dl	14	10	8	8.1~24.9
GOT	IU/l	46	87	38	21~94
LDH	IU/l	426	538	628	380~634**
CK	IU/l	289	>2000	1257	81.0~1586.0
総Bil	mg/dl	0.4	0.3	0.2	0~1.0**
Glu	mg/dl	137	196	128	63.1~133.3
GGT	IU/l	14	68	47	17.0~249.0
ALP	IU/l	373	409	1163	142~891
Cre	mg/dl	1.3	1.5	1.5	1.0~2.7***
iP	mg/dl	4.4	6.7	6.9	4.5~10.7
Mg	mg/dl	2.7	2	1.7	1.9~3.1
Ca	mg/dl	12.9	11.3	13.9	8.1~12.9
Na	mmol/l	120	131	142	135~150**
K	mmol/l	6.2	7.4	6.0	4.4~6.7**
Cl	mmol/l	83	95	100	94~106**

*: 豚病学第四版, 近代出版, 東京 (1999) を参照

** : 家畜共済における臨床病理検査要領 (平成 17 年改定), 全国農業共済協会を参照

*** : 獣医臨床生化学第四版, 近代出版, 東京 (1991) を参照

ン切片に対して, 一次抗体に抗豚流行性下痢 (PED) ウイルス (NK94P6 トリブシン非依存株) 家兎血清 (独動物衛生研究所, 茨城), 抗伝染性胃腸炎 (TGE) ウイルス (TO163 株) 家兎血清 (独動物衛生研究所, 茨城) 及び抗ロタウイルス (α22R 株) 家兎血清 (独動物衛生研究所, 茨城) を用いた免疫染色を実施した。

走査型電子顕微鏡検査として, ホルマリン固定した回腸 (豚 No. 1 及び 2) を, 定法に従いオスミウム酸固定後, アルコール脱水しトブチルアルコールで凍結乾燥し, オスミウム・プラズマコーターで蒸着した。走査型



図1 豚 No. 1 回腸

パイエル板においてリンパ小節の増数と絨毛の萎縮が認められる。(HE 染色 Bar=500 μm)

電子顕微鏡 (JSM-7600F, 日本電子(株), 東京) を用いて観察した。

透過型電子顕微鏡検査として, ホルマリン固定した回腸 (豚 No. 1 及び 2) を, 定法に従いオスミウム酸固定, エポキシ樹脂包埋及び超薄切により切片を作製し, 酢酸ウラニル・クエン酸鉛の二重染色を施した。次いで, 透過型電子顕微鏡 (H-7500, (株)日立製作所, 東京) を用いて観察した。

細菌学的検査: 主要臓器及び腸内容物について 5% 脱線維めん羊血液 (株) 日本生物材料センター, 東京) 加トリプトソイ寒天培地 (日水製薬(株), 東京), DHL 寒天培地 (日水製薬(株), 東京) を用いて 37°C 48 時間, 好気培養及び嫌気培養を実施した。

ウイルス学的検査: 脳, 扁桃, 腎臓, 脾臓及び副腎の 10% 乳剤を材料とし, CPK 細胞を用いてウイルス分離を実施した。また, 腸内容物中のロタウイルス抗原を検出するために, 市販の簡易検出キット (ディップステック栄研ロタ, 栄研化学(株), 栃木) を用いて検査を実施した。

成 績

肉眼所見: 豚 No. 1 及び 2 は顕著に削瘦していた。いずれの回腸においても, パイエル板が顕著に腫大し粘膜の肥厚を伴っていた。豚 No. 2 及び 3 の結腸内容はいずれも泥状を呈していた (表 1)。

血液生化学的検査: ヘマトクリット値 (Ht) は豚 No. 1 及び 3 で増加していた。血清ナトリウム濃度 (Na) は豚 No. 1 及び 2 で低下し, 血清クロール濃度 (Cl) は豚 No. 1 で低下しており, 脱水を示唆する所見がみられた (表 2)。

病理組織学的所見: 共通する組織所見として, 回腸絨毛が萎縮し, パイエル板のリンパ小節の数が増加してい

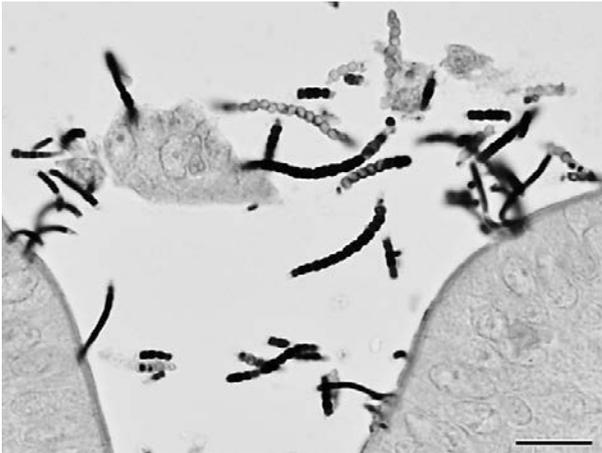


図2 豚 No. 1 回腸
萎縮した絨毛上部の腸粘膜上皮細胞に付着する多数のSFBが認められる。(グラム染色 Bar=10 μ m)

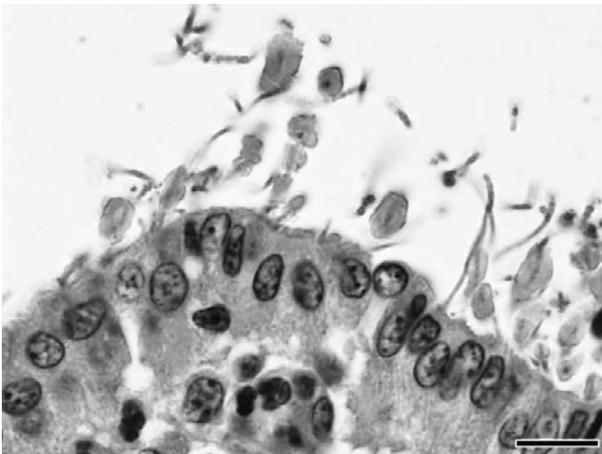


図3 豚 No. 2 回腸
多数のSFBの周囲に鞘状構造物が認められる。(HE染色 Bar=20 μ m)

た(図1)。豚 No. 1 及び 2 の回腸絨毛上部の粘膜上皮細胞には多数(図2)、豚 No. 3 では少数のSFBの付着がみられた。豚 No. 1 では、数珠状に分節するフィラメント状のSFBが多数みられた。豚 No. 2 では、より短いSFBが多く、まれにSFBを取り囲む鞘状構造物が観察された(図3)。豚 No. 3 では豚 No. 1 と同様の長いSFBが認められた。SFBはグラム陽性ないし陰性を示し、PAS陰性であった。豚 No. 2 でみられた鞘状構造物はPAS反応で陽性を示した。豚 No. 1 及び 2 の結腸には、バランチジウムが確認されたものの、その数は少なく、バランチジウムに関連する病変は認められなかった。

免疫組織化学的検査では、いずれの個体においてもPEDウイルス、TGEウイルス及びロタウイルスの抗原は認められなかった。

走査型電子顕微鏡による検査では、回腸絨毛上部に観

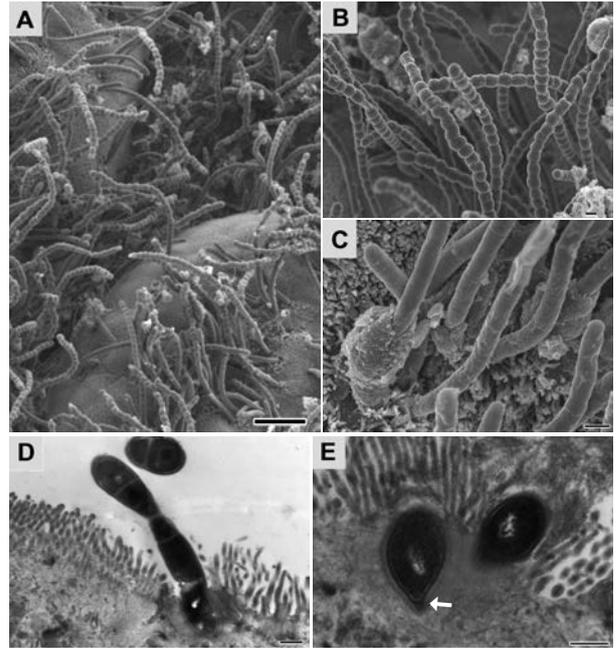


図4 A: 豚 No. 1 回腸
絨毛上部の腸粘膜上皮細胞に突き刺さるように付着する多数のSFBが認められる。(走査型電子顕微鏡 Bar=10 μ m)
B: 豚 No. 1 回腸
SFBには明瞭な分節があり、細胞体は球状から俵状を呈し、球数珠状になっている。(走査型電子顕微鏡 Bar=1 μ m)
C: 豚 No. 2 回腸
SFBの周囲に鞘状の構造物が確認できる。分節は不明瞭である。(走査型電子顕微鏡 Bar=1 μ m)
D: 豚 No. 1 回腸
SFB細菌壁に沿うように腸粘膜上皮細胞の細胞壁が陥凹する“bite”像が確認される。(透過型電子顕微鏡 Bar=500nm)
E: 豚 No. 2 回腸
腸粘膜上皮細胞に入り込んでいるSFBの先端にニップル様“止め金状: holdfast”の構造(矢印)がみられる。SFB先端部周囲の細胞質の電子密度は一樣となり、細胞内小器官が認められない。(透過型電子顕微鏡 Bar=500nm)

察されたSFBは、いずれも腸粘膜上皮細胞に突き刺さるように付着していた(図4A)。豚 No. 1 のSFBは、直径0.9~1.2 μ m、長さ15~28 μ mであり、ほぼ等間隔に分節していた(図4B)。各分節の一つの細胞体は球状から俵状で、長さは0.9~1.1 μ mであり、それらが連続し数珠状を呈していた。豚 No. 2 では、直径0.9~1.1 μ m、長さ7~16 μ mとやや短いものが多く、豚 No. 1 でみられた明瞭な分節をもつものは少なかった。しばしば、SFBを取り囲む鞘状構造物(直径2.0~2.3 μ m、長さ4.0~5.0 μ m)が観察された(図4C)。

透過型電子顕微鏡による検査では、回腸絨毛上部に付

着したSFBは腸粘膜上皮細胞の一部を窪ませていた(図4D)。この部分では、SFBの細菌壁に沿うように腸粘膜上皮細胞の細胞壁が陥凹する像が確認された。腸粘膜上皮細胞の内部に入り込んだSFBの先端にはニップル様の構造が認められた(図4E)。SFBが付着した腸粘膜上皮細胞では、SFB先端部周囲の細胞質の電子密度が一様となっていた。SFBに対する食作用などの反応は確認できなかった。豚No. 2のSFB周囲の鞘状構造物は電子密度が一様で均質無構造であった。

細菌学的検査：病原細菌は分離されなかった。

ウイルス学的検査：2代まで継代したがCPEは認められず、ウイルスは分離されなかった。また、腸内容物からはロタウイルス抗原は検出されなかった。

考 察

検索した3症例には下痢と回腸絨毛の萎縮が認められた。しかし、豚に下痢と絨毛の萎縮を引き起こすPEDウイルスなどの病原微生物の関与は確認できなかった。また、結腸(豚No. 1及び2)ではバランチジウムが少数確認されたものの、粘膜上皮細胞に関連する病変がみられないことや、バランチジウムは健康個体でもしばしば認められる[11]ことから、今回の下痢の原因としての可能性は低いと考えられた。

今回の3症例の回腸病変部に共通して確認されたのはSFBであった。カナダの豚2,766頭について、病理組織学的検査によりSFBの有無を調べたところ、15頭(2~13週齢)の回腸に確認され、うち5頭に下痢が認められているものの、その原因はクリプトスポリジウムの寄生、豚赤痢、大腸菌症及び非特異性大腸炎によるものと判断されていた[4]。一方、牛ではSFBによる多発性肉芽腫性空腸炎が報告されている[6]。今回の3症例は30日齢で下痢を発症し40日齢でSFBが確認されている。カナダの調査ではおもに4週齢以上(2~13週齢)の豚[4]に、アメリカの調査では4~5週齢の豚[5]にSFBが確認されている。SFBの腸管への定着は、食餌、離乳、環境及び免疫状態によって影響される[12]。また、SFBは離乳後に最も多く増殖し、腸管免疫の賦活化の開始とともに、次第に消失していくと報告されている[13]。今回の発症豚群においても日齢が進むとともに下痢が回復していることから、SFBによって腸管免疫が賦活化されたと推察される。

今回の症例における下痢とSFBの関係については、下痢の直接的な原因であった病原体はSFBの腸管免疫賦活能によってすでに排除されてしまったか、SFBが多数付着した場合には、一時的な増殖とはいえ、物理的な栄養吸収障害により下痢を増悪させた可能性が示唆された。豚におけるSFBの感染源、感染経路については不明であり、今後、生体への影響について詳細に調べる

必要がある。

豚のSFBについて透過型電子顕微鏡[4, 5]あるいは走査型電子顕微鏡[5]を用いて検索した報告は非常に少ない。今回のように明瞭な数珠状のSFBが確認されたのは豚では初めてである。今回確認されたさまざまな形態(フィラメント状, “止め金状; holdfast”)は、マウスのSFBの生活環の各ステージに認められる形態に非常に類似していた[1]。豚No. 2のSFBは長さが短く、豚No. 1のSFBは長く分節しているものが多かったため、豚No. 1の方が生活環の中でより後期のステージであり、より多くのSFBが増殖しているものと考えられた。また、豚No. 2でみられたSFBの周囲を取り囲む鞘状構造物は、PAS反応で陽性を示したが、その由来については不明であった。

稿を終えるにあたり、抗PEDウイルス家兎血清と抗TGEウイルス家兎血清を提供いただいた動物衛生研究所 宮崎綾子博士、抗ロタウイルス家兎血清を提供いただいた動物衛生研究所 恒光 裕博士に深謝する。多くの助言をいただいた動物衛生研究所 川島健司博士、三上 修博士、嶋田恵美技師、静岡県東部家畜保健衛生所 金森健太主任、兵庫県姫路家畜保健衛生所 瀧 麻香主任に深謝する。

引 用 文 献

- [1] Pamp SJ, Harrington ED, Quake SR, Relman DA, Blainey PC : Single-cell sequencing provides clues about the host interactions of segmented filamentous bacteria (SFB), *Genome Res*, 22, 1107-1119 (2012)
- [2] Caselli M, Cassol F, Gentili V, Di Luca D : Genome sequences of segmented filamentous bacteria in animals: implications for human research, *Gut Microbes*, 3, 401-405 (2012)
- [3] Tajima K, Ohmori H, Tohno M, Ohtsu H, Tsukahara T, Aminov R : Segmented filamentous bacteria are a major group in terminal ileum of piglets, *Anaerobe*, 23, 109-111 (2013)
- [4] Sanford SE : Light and electron microscopic observations of a segmented filamentous bacterium attached to the mucosa of the terminal ileum of pigs, *J Vet Diagn Invest*, 3, 328-333 (1991)
- [5] Meyerholz DK, Stabel TJ, Cheville NF : Segmented filamentous bacteria interact with intraepithelial mononuclear cells, *Infect Immun*, 70, 3277-3280 (2002)
- [6] Ibaraki Y, Shibahara T, Kobayashi H, Ito N, Shinozuka Y, Kasuya K, Murakoshi N, Chikuba T, Kubo M : Multifocal granulomatous jejunitis associated with an argyrophilic gram-positive segmented filamentous bacterium in a Holstein cow, *J Comp Pathol*, 145, 118-121 (2011)
- [7] Klaasen HL, Koopman JP, Van den Brink ME, Bakker MH, Poelma FG, Beynen AC : Intestinal, segmented, filamentous bacteria in a wide range of vertebrate species, *Lab Anim*, 27, 141-150 (1993)
- [8] Prakash T, Oshima K, Morita H, Fukuda S, Imaoka A,

- Kumar N, Sharma VK, Kim SW, Takahashi M, Saitou N, Taylor TD, Ohno H, Umesaki Y, Hattori M : Complete genome sequences of rat and mouse segmented filamentous bacteria, a potent inducer of Th17 cell differentiation, *Cell Host Microbe*, 10, 273-284 (2011)
- [9] Snel J, Heinen PP, Blok HJ, Carman RJ, Duncan AJ, Allen PC, Collins MD : Comparison of 16S rRNA sequences of segmented filamentous bacteria isolated from mice, rats, and chickens and proposal of "*Candidatus Arthomitus*", *Int J Syst Bacteriol*, 45, 780-782 (1995)
- [10] Yin Y, Wang Y, Zhu L, Liu W, Liao N, Jiang M, Zhu B, Yu HD, Xiang C, Wang X : Comparative analysis of the distribution of segmented filamentous bacteria in humans, mice and chickens, *ISME J*, 7, 615-621 (2013)
- [11] Nakauchi K : A survey on the prevalence rate of *Balantidium coli* in pigs in Japan, *Jpn J Parasitol*, 39, 351-355 (1990)
- [12] Jiang HQ, Bos NA, Cebra JJ : Timing, localization, and persistence of colonization by segmented filamentous bacteria in the neonatal mouse gut depend on immune status of mothers and pups, *Infect Immun*, 69, 3611-3617 (2001)
- [13] Snel J, Hermsen CC, Smits HJ, Bos NA, Eling WM, Cebra JJ, Heidt PJ : Interactions between gut-associated lymphoid tissue and colonization levels of indigenous, segmented, filamentous bacteria in the small intestine of mice, *Can J Microbiol*, 44, 1177-1182 (1998)

Segmented Filamentous Bacteria attached to the Epithelial Cells of the Ileum in Piglets with Diarrhea

Yuji YAGUCHI^{1)†}, Tomoyuki SHIBAHARA²⁾, Toru KUSUHARA³⁾, Masaru KOBAYASHI²⁾ and Hideki KOBAYASHI²⁾

- 1) *Ibaraki Prefectural Kenhoku Livestock Hygiene Service Center, 966-1 Nakagachicho, Mito, 310-0002, Japan*
- 2) *National Institute of Animal Health, National Agricultural and Food Research Organization, 3-1-5 Kannondai, Tsukuba, 305-0856, Japan*
- 3) *Ibaraki Prefectural Rokkou Livestock Hygiene Service Center, 1367-3 Hokota, Hokota, 311-1517, Japan*

SUMMARY

Three 40-day-old piglets showed diarrhea and poor growth, and were euthanized for a laboratory examination. The necropsies revealed that the mucosa of the ileum were thickened with enlarged and prominent Peyer's patches. Histologically, the number of lymphatic follicles was increased in the ileal Peyer's patches, and atrophy of the villi in the ileum was detected. Numerous filamentous bacteria were attached to the epithelial cells of the ileum. They had a beaded appearance and stained gram positive or negative. The ultrastructure of the organisms was consistent with that of segmented filamentous bacteria (SFB). None of the piglets had any lesions other than SFB-like ones. It is suggested that severe SFB infection in the epithelial cells of the ileum may accelerate diarrhea in wasting pigs. — Key words : diarrhea, piglet, segmented filamentous bacteria.

† Correspondence to : Yuji YAGUCHI (*Ibaraki Prefectural Kenhoku Livestock Hygiene Service Center, Ibaraki Prefecture*)
 966-1 Nakagachicho, Mito, 310-0002, Japan
 TEL 029-225-3241 FAX 029-224-6661 E-mail : y.yaguchi@pref.ibaraki.lg.jp

J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 68, 107 ~ 111 (2015)