

Clostridium difficile が関与した新生豚の 線維索性結腸炎

竹馬 工^{1)†} 辻 まりこ¹⁾ 伊藤秋久¹⁾ 下田智彦¹⁾ 齋藤亮太²⁾
赤松 茂³⁾ 鈴木義久¹⁾ 芝原友幸⁴⁾

- 1) 三重県中央家畜保健衛生所 (〒514-0061 津市一身田上津部田1742-1)
2) 三重県南勢家畜保健衛生所 (〒515-0217 松阪市早馬瀬町83-2)
3) 豊里家畜診療所 (〒514-2221 津市高野尾町5010)
4) 国研農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究部門 (〒305-0856 つくば市観音台3-1-5)

(2016年10月28日受付・2017年4月10日受理)

要 約

2014年8月、三重県内の養豚場において、1週齢以下の豚が黄色水様下痢を呈した。発生から8日間で下痢は終息したが、その間、計15頭が死亡した。剖検では共通所見として結腸間膜水腫が認められた。*Clostridium difficile* 検出試薬を用いて結腸内容物を検査したところ、病変の認められた検体で抗原陽性と判定され、細菌学的検査により結腸や直腸から *C. difficile* が分離された。病理組織学的検査では結腸粘膜に特徴的な「噴火口状」の壊死が認められ、壊死部にはグラム陽性の桿菌及び芽胞が認められた。また、抗 *Clostridium* 属菌免疫血清を用いた免疫組織化学的検査では壊死部に陽性抗原が認められた。以上から、本症例は *C. difficile* 感染症が疑われた。

—キーワード：*Clostridium difficile*, 線維索性結腸炎, 新生豚。

-----日獣会誌 70, 516～521 (2017)

Clostridium difficile (CD) は芽胞を形成するグラム陽性、偏性嫌気性桿菌で、TcdA, TcdB などの毒素を産生し、人、牛、馬、犬、猫などの腸管内や土壤中に存在する [1]。また、CD は *Clostridium difficile* 感染症 (CDI) を引き起こすことが知られており [2]。豚では、7日齢以下の新生豚で認められ、黄色水様下痢を呈し、結腸間膜水腫や、噴火口状の粘膜壊死を伴う線維索性盲結腸炎が特徴的である [3]。

海外では、米国の新生豚の下痢症の2/3がCDIによるとする報告 [3] や、オーストラリアの新生豚の70%がCDを保菌しているとの報告 [4] がある。このようにCDIの報告は、近年各国からあげられているが、国内におけるCDIの発生報告はない。今回、三重県でCDIを疑う新生豚の下痢症が発生したため、その概要を報告する。

材料及び方法

発生状況と材料：発生農場は、母豚400頭を飼養す

る一貫経営農場で、発生豚舎は3棟ある分娩舎のうち2棟 (A, B) であった。2014年8月19日の朝、従業員が分娩舎Aにおいて3腹10頭に黄色水様下痢を確認した。すぐに管理獣医師が治療としてアンピシリンを注射したが、当日に4頭が死亡した。8月27日に下痢は終息したものの最終的な死亡豚の合計は15頭に及んだ。また、分娩舎Bでも8月24日分娩の子豚が翌日から下痢を呈し、最終的に5頭に発症。発症を確認するのと同時に管理獣医師がアンピシリンを注射したが1頭が死亡した。さらに、8月27日分娩の子豚が8月30日から下痢を呈し、最終的に3頭に発症した。発症個体はすべて7日齢以下の新生豚 (品種：LWD) であった。

病理学的検査：病理解剖は、2014年8月19、27及び30日の計3回実施した (表1)。19日に発症豚4頭 (No. 1～4)、死亡豚4頭 (No. 5～8)、27日に発症豚4頭 (No. 9～12)、30日に発症豚1頭 (No. 13) の計13頭 (発症豚9頭、死亡豚4頭) について臨床症状を確認した後、

† 連絡責任者：竹馬 工 (三重県中央家畜保健衛生所)

〒514-0061 津市一身田上津部田1742-1

☎ 059-246-8611 FAX 059-221-6331

E-mail : chikut00@pref.mie.jp

表1 解剖豚の概要

解剖日	豚 No.	生死	日齢	母豚 No.	分娩舎	治療	その他
8月19日	1	安楽殺	6				
	2	安楽殺	6	A-1			
	3	安楽殺	6				
	4	安楽殺	4	A-2	A	アンピシリン注射	
	5	死亡	4				
	6	死亡	7	A-3			
	7	死亡	6				
	8	死亡	6	A-1			
8月27日	9	安楽殺	3		B	アンピシリン注射	
	10	安楽殺	3	B-1			
	11	安楽殺	3				
	12	安楽殺	3				
8月30日	13	安楽殺	3	B-2	B	なし	病理検査のみ実施

解剖を実施した。肝臓、脾臓、腎臓、心臓、肺、大脳、小脳、脳幹部、胃、十二指腸、空腸、回腸、盲腸、結腸、直腸及び消化管内容物を採材し、病理組織学的検査、細菌学的検査及びウイルス学的検査に供した。

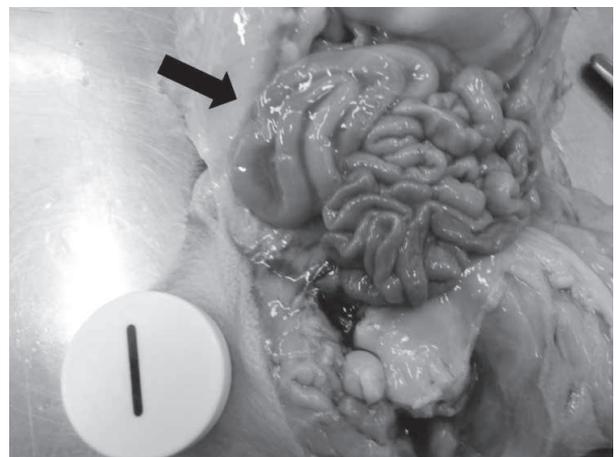
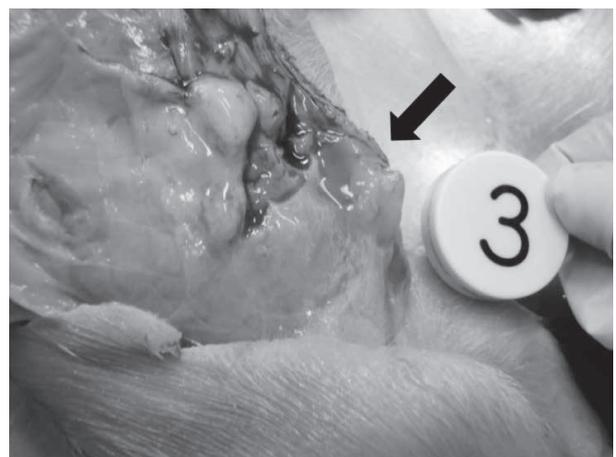
病理組織学的検査では採取した主要臓器を20%中性緩衝ホルマリン液で固定し、定法に基づきパラフィン包埋後、切片を作成した。これらの切片にヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色を実施し、結腸病変部の切片については、グラム染色及び抗 *Clostridium* 属ウサギ血清 (Virostat Inc, U.S.A.) を一次抗体に用いた免疫組織化学的検査 (免疫染色) を実施した。

細菌学的検査: イムノクロマトグラフ法による CD 検出試薬 (C. DIFF QUIK CHEK コンプリート, アリーア メディカル(株), 東京) を用いて、結腸内容物から CD の抗原及び毒素 (TcdA, TcdB) の検出を行った。検査はキットの手順書に則って実施した。

CD の分離・同定検査では結腸または直腸をゼラチン緩衝液に融解し細切後、懸濁液をクックドミート培地 (日本ベクトン・ディッキンソン(株), 東京) 10ml に接種し、37°C で2日間培養した。その後、培養液とエタノールを同量混合・攪拌し、30分間室温に静置して芽胞選択を行った後、予備還元 (嫌気環境下で一夜保存) した CCFA 培地 (クロストリジウムデフィシル寒天基礎培地 (サーモフィッシャーサイエンティフィック(株), 神奈川) に選択サプリメント (サーモフィッシャーサイエンティフィック(株), 神奈川) 及びウマ脱繊維血液 (株) 日本バイオテスト研究所, 東京) を添加) に 100 μ l をコンラージ棒で塗布し、37°C で2日間嫌気培養を行った。CCFA 培地に R 型コロニー、グラム陽性菌の発育を確認後、酵母エキス (0.5% イーストエキストラクト, 日本ベクトン・ディッキンソン(株), 東京) 加 7% 馬血液 (株)



図1 豚 No. 6 の臀部に付着した黄色水様下痢

図2 豚 No. 9 の腹腔内の肉眼写真
結腸間膜に水腫が認められる。図3 豚 No. 11 の剥皮後の肉眼写真
鼠径部に皮下水腫が認められる。

日本バイオテスト研究所, 東京) トリプトソーヤ寒天培地 (日本水製薬(株), 東京) に継代し、2日間嫌気培養した。芽胞菌の増殖を確認後、細菌同定キット (Api20A, シスメックス・バイオメリュー(株), 東京) を用いた生化学的

表2 剖検所見, 組織所見, CD 検出試薬, CD 分離培養, CD 毒素検査, 分離菌性状確認検査, 免染の結果

豚 No.	剖検所見	組織所見	CD 検出試薬 ^{*1}		CD 分離培養		CD 毒素 ^{*2} PCR		分離菌性状確認			病理免染 ^{*4}
			抗原	毒素	結腸	直腸	結腸内容	直腸内容	Api20A	16S rDNA PCR	CD 毒素 PCR ^{*3}	
1			-	-	+	+	-	NT	CD 99%	+	-	NT
2	結腸間膜水腫	線維索性結腸炎	+	-	-	NT	-	NT				+
3	結腸間膜水腫		+	-	+	+	-	NT	CD 99%	+	-	NT
4			-	-	-	NT	-	NT				NT
5			NT	NT	NT	NT	NT	NT				NT
6	結腸間膜水腫, 結腸漿膜に線維素析出	線維索性結腸炎	NT	NT	NT	NT	NT	NT				+
7	結腸間膜水腫, 皮下水腫		NT	NT	-	NT	-	NT				NT
8		線維索性結腸炎	NT	NT	NT	NT	NT	NT				-
9	結腸間膜水腫, 皮下水腫, 心外膜点状出血		-	-	-	NT	-	NT				NT
10	結腸粘膜偽膜形成, 皮下水腫	線維索性結腸炎	+	-	NT	NT	NT	-				+
11	結腸間膜水腫, 皮下水腫	線維索性結腸炎	+	-	+	+	-	NT	NT	+	-	+
12		線維索性結腸炎・空腸炎, 線維索性漿膜炎	-	-	NT	NT	NT	-				+
13	結腸間膜水腫	線維索性結腸炎・盲腸炎	NT	NT	NT	NT	NT	NT				+

NT: 未検査 - : 陰性 + : 陽性

*1: C. DIFF QUIK CHEK コンプリート

*3: TcdA, TcdB, CDT 遺伝子を検出する PCR

*2: TcdA, TcdB 遺伝子を検出する PCR

*4: 病変部に *Clostridium* 属陽性抗原が認められたもの

性状検査及び Kikuchi ら [5] の PCR による 16S rDNA の遺伝子検査結果から CD と同定した。また、分離菌の 16S rRNA 遺伝子の部分塩基配列決定により CD 標準株 (DSM1296T=ATCC9689T) との相同性を比較した。

Clostridium perfringens 菌数の測定は小腸内容物について、カナマイシン含有卵黄加 CW 寒天培地 (日水製薬(株), 東京) を用いて定量培養 (37°C, 24 時間, 嫌気培養) を実施した。

大腸菌数の測定は小腸内容物について、DHL 寒天培地 (日水製薬(株), 東京) を用いて定量培養 (37°C, 24 時間, 好気培養) を実施した。

一般細菌分離は肝臓, 脾臓, 腎臓, 心臓, 肺, 大脳について DHL 寒天培地・血液寒天培地 (栄研化学(株), 東京) を用い, 37°C, 好気及び微好気的条件下で 24 時間培養を行い, 一般細菌分離を実施した。

遺伝子検査は, 結腸内容物または直腸内容物について TcdA, TcdB 遺伝子を実験的に検出する PCR [6] を, 分離された CD について TcdA, TcdB 及び CDT (binary toxin) 遺伝子を実験的に検出する PCR [6, 7] を実施

した。また, 小腸内容物を用いて大腸菌の線毛遺伝子である K88, K99 及び 987P を特異的に検出する PCR を実施した [8]。

ウイルス学的検査: 小腸内容物から抽出した RNA を材料とし, 豚流行性下痢ウイルス, 伝染性胃腸炎ウイルス, 豚デルタコロナウイルス及びロタウイルス (A, B 及び C 群) 遺伝子を実験的に検出する RT-PCR 法 [9-11] を実施した。また, 扁桃, 脾臓及び腎臓の各 10% 乳剤 (No. 5~8) から抽出した RNA を材料とし, 豚コレラウイルス遺伝子を実験的に検出する RT-PCR 法 [12] を実施した。

成 績

病理解剖所見: 臨床症状として全頭で黄色水様下痢が認められた (図 1)。剖検所見では 13 検体中 7 検体で結腸間膜水腫 (図 2) が, 4 検体で皮下水腫 (図 3) が認められた (表 2)。

病理組織学的所見: 組織学的に 13 検体中 7 検体で結腸粘膜の壊死が認められた。結腸粘膜表層部は分節性~全周性に壊死しており (図 4), 結腸腔内に滲出した好

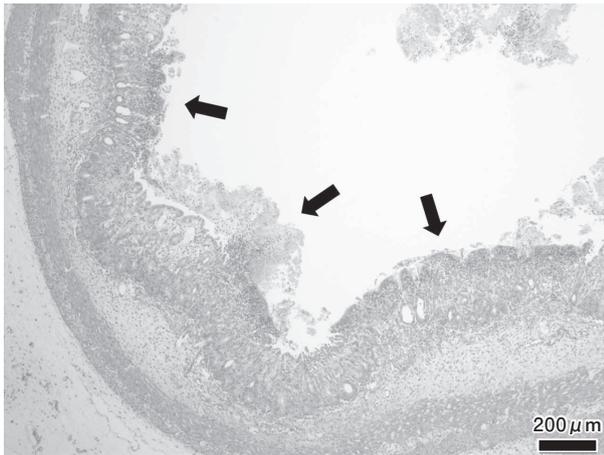


図4 豚 No. 13 の結腸の組織写真
分節性に粘膜表層部の壊死が認められる (HE 染色 Bar=200µm).

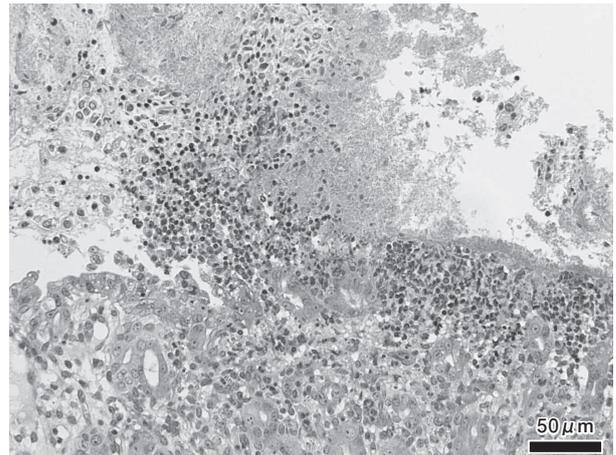


図5 豚 No. 13 の結腸の組織写真
粘膜表層部は壊死し、結腸腔内に滲出した好中球や線維素により「噴火口状」の病変を形成している (HE 染色 Bar=50µm).

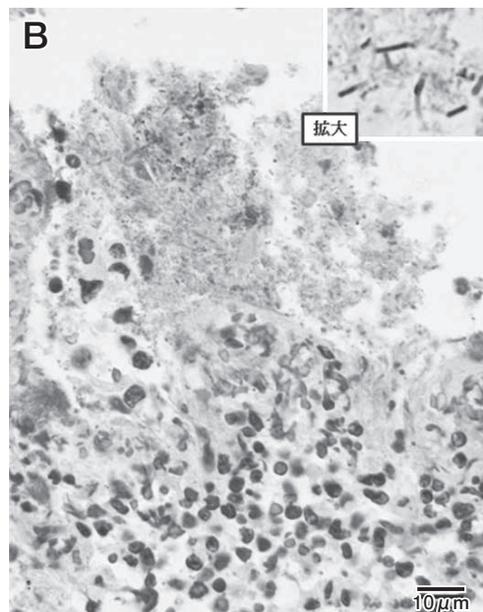
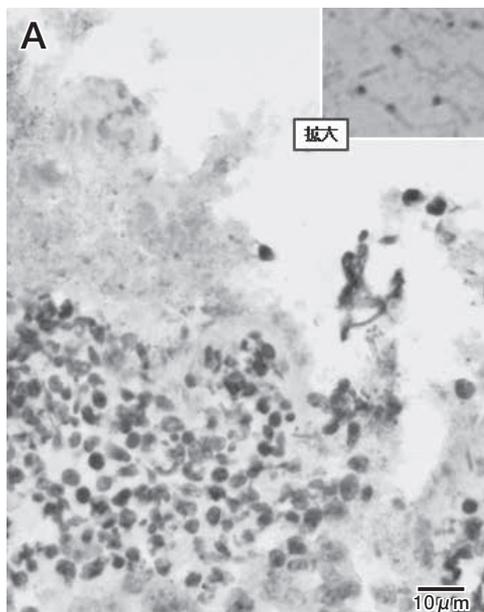


図6 豚 No. 13 の結腸の組織写真
A: 壊死部周囲の細胞退廃物に多数の陽性抗原が認められる。抗原は菌端部(芽胞)に認められた (拡大図) (免疫染色 Bar=10µm).
B: 同部位にグラム陽性桿菌が認められる。一部には芽胞形成が認められた (拡大図) (グラム染色 Bar=10µm).

中球や線維素により「噴火口状」の病変を形成したもの(図5)や粘膜固有層における変性した好中球浸潤とその上層における線維素析出により粘膜が隆起した病変が認められた。肉眼で水腫の認められた結腸間膜は組織学的に水腫性に肥厚し、一部の血管腔やその周囲に単核系細胞や好中球の浸潤が認められた。

免染では13検体中6検体で結腸粘膜壊死部周囲の細胞退廃物内の桿菌に *Clostridium* 属陽性抗原が認められた。抗原は菌端部(芽胞)に多く認められた。また、免

染で *Clostridium* 属陽性抗原が認められた部位についてグラム染色を実施したところ、グラム陽性桿菌が認められた。また、一部では菌体の端が染色されず、薄いピンク色を呈する芽胞が認められた(図6)。

細菌学的検査: CD 検出試薬を用いた検査では4検体で抗原陽性反応が認められたが、TcdA, TcdB は全検体で陰性であった(図7)。

分離培養検査では3頭の結腸または直腸から分離された細菌が、細菌同定キット及びPCRによりCDと同定

表3 *C. difficile* 分離株と基準株の細菌同定キット (Api20A) による生化学的性状検査結果

	IND	URE	GLU	MAN	LAC	SAC	MAL	SAL	XYL	ARA	GEL	ESC	GLY	CEL	MNE	MLZ	RAF	SOR	RHA	TRE	CAT
<i>C. difficile</i> 分離株	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-
<i>C. difficile</i> ATCC9689T	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-

IND : L-tryptophane, URE : urea, GLU : D-glucose, MAN : D-mannitol, LAC : D-lactose, SAC : D-saccharose, MAL : D-maltose, SAL : salicin, XYL : D-xylose, ARA : L-arabinose, GEL : gelatin, ESC : esculin ferric citrate, GLY : glycerol, CEL : D-cellobiose, MNE : D-mannose, MLZ : D-melezitose, RAF : D-raffinose, SOR : D-sorbitol, RHA : L-rhamnose, TRE : D-trehalose, CAT : CATalase

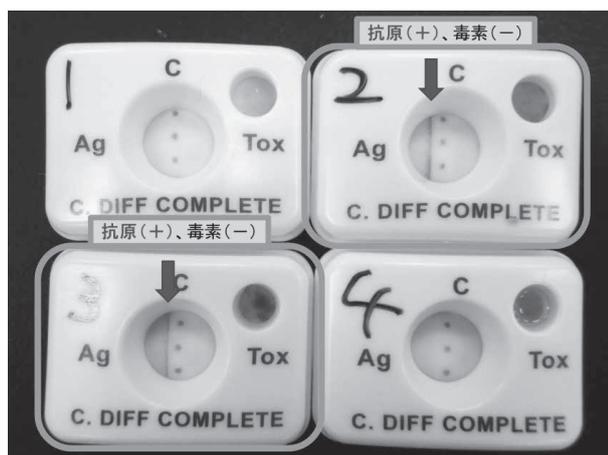


図7 CD 検出試薬結果
豚 No. 2, 3 の抗原ラインに陽性反応が認められる

された (Api20A プロファイル 番号 : 41244103, 99.0%) (表3). 分離菌の 16S rRNA 遺伝子部分塩基配列決定による相同性解析では CD 標準株と高い相同性を示した (99.65%).

また, 小腸内容物から *C. perfringens* は分離されなかったが, 大腸菌は $10^5 \sim 10^8$ 個/g 検出された. その他の臓器から病原細菌は分離されなかった.

遺伝子検査では分離された CD 及び結腸内容物または直腸内容物から TcdA, TcdB 及び CDT は検出されなかった. また, 大腸菌の線毛遺伝子は全検体から検出されなかった.

ウイルス学的検査で実施したすべての項目で, 全検体から特異遺伝子は検出されなかった.

考 察

7日齢以下の新生豚が下痢を呈した場合, 類症鑑別として, 豚流行性下痢, 伝染性胃腸炎, 豚コレラ, ロタウイルス感染症, 大腸菌症, クロストリジウム感染症, 豚糞線虫症, コクシジウム症などがあげられる [13]. 細菌検査では, 小腸内容物から大腸菌が $10^5 \sim 10^8$ 個/g 検出されたが, 線毛遺伝子が検出されなかったことや, 病理組織学的検査結果から大腸菌症の可能性は低いと考えられた. また, その他の疾病の関与はみられなかった.

豚における CDI は, いまだ公式な診断基準は定めら

れておらず, 診断は臨床症状 (7日齢以下の新生豚の黄色水様下痢), 剖検所見 (結腸間膜水腫), 組織所見 (噴火口状の線維索性盲結腸炎), 菌分離, 毒素検出状況に基づき, 総合的に判断する必要があるとされている [14]. 今回, CD について毒素の存在は証明できなかったが, 臨床症状, 剖検所見, 組織所見, 菌分離結果から本症例は CDI である可能性が最も高いと判断した.

CD には TcdA, TcdB ともに産生する株 (A+/B+株), TcdA, TcdB どちらか一方を産生する株 (A+/B-株, A-/B+株), 毒素非産生株 (A-/B-株) があり, 本症例では毒素は証明できず, 今回分離された毒素非産生株と本症例との因果関係は不明である. 人においては, CDI の病変形成に TcdA あるいは TcdB が関与しているとされているが [1], 豚においては関与が強く疑われているものの, いまだ因果関係は証明されていない [14]. また近年, 第3の毒素である CDT の存在が明らかになる [1] など, CDI は不明な点が多く残る感染症であり, 今後, 豚の病態形成のメカニズムが解明されることを期待する.

近年, 豚の CDI の報告は各国からあげられているが, 国内における発生報告はない. その原因として, 菌分離がきわめて困難であること, 検出試薬を使用している検査機関が少ないこと, 7日齢までの病気であり, 短時間で終息するため原因究明をしていない可能性があげられる. 今後, 豚の CD の国内における浸潤状況を把握していくためにも, まず認知度が向上される必要がある. 肉眼で特徴病変が認められる場合, 検出試薬などを活用し, 確定診断された症例の情報を蓄積していくことが, 今後の CD による新生豚の CDI の診断技術向上につながると思われる.

稿を終えるに当たり, 16S rRNA 塩基配列解析を実施していただいた, 動物衛生研究部門 勝田 賢博士, 指導, 助言をいただいた, 動物衛生研究部門 小林 勝技師, 嶋田恵美技師, 福島県中家畜保健衛生所 今井直人獣医師, 動物検疫所成田支所 小林芳史獣医師に深謝する.

引 用 文 献

- [1] 神谷 茂 : ディフィシル菌感染症の基礎と臨床, モダンメディア, 56, 233-241 (2010)
- [2] Arroyo LG, Kruth SA, Willey BM, Staempfli HR, Low

- DE, Weese JS : PCR ribotyping of *Clostridium difficile* isolates originating from human and animal sources, *J Med Microbiol*, 54, 163-166 (2005)
- [3] Songer JG, Post KW, Larson DJ, Jost BH, Glock RD : Infection of neonatal swine with *Clostridium difficile*, *J Swine Health Prod*, 8, 185-189 (2000)
- [4] Knight DR, Squire MM, Riley TV : Laboratory detection of *Clostridium difficile* in piglets in Australia, *J Clin Microbiol*, 52, 3856-3862 (2014)
- [5] Kikuchi E, Miyamoto Y, Narushima S, Itoh K : Design of species-specific primers to identify 13 species of *Clostridium* harbored in human intestinal tract, *Microbiol Immunol*, 46, 353-358 (2002)
- [6] Kato H, Kato N, Katow S, Maegawa T, Nakamura S, Lyerly DM : Deletions in the repeating sequences of the toxin A gene of toxin A-negative, toxin B-positive *Clostridium difficile* strains, *FEMS Microbiol Lett*, 175, 197-203 (1999)
- [7] Stubbs SL, Rupnik M, Gibert M, Brazier JS, Duerden BI, Popoff MR : Production of actin-specific ADP-ribosyltransferase (binary toxin) by strains of *Clostridium difficile*, *FEMS Microbiol Lett*, 186, 307-312 (2000)
- [8] Vu-Khac H, Holoda E, Pilipcinec E, Blanco M, Blanco JE, Dahbi G, Mora A, López C, González EA, Blanco J : Serotypes, virulence genes, intimin types and PFGE profiles of *Escherichia coli* isolated from piglets with diarrhea in Slovakia, *Vet J*, 174, 176-187 (2007)
- [9] Kim SY, Song DS, Park BK : Differential detection of transmissible gastroenteritis virus and porcine epidemic diarrhea virus by duplex RT-PCR, *J Vet Diagn Invest*, 13, 516-520 (2001)
- [10] Paton D, Ibata G, Sands J, McGoldrick A : Detection of transmissible gastroenteritis virus by RT-PCR and differentiation from porcine respiratory coronavirus, *J Virol Meth*, 66, 303-309 (1997)
- [11] Wang L, Byrum B, Zhang Y : Detection and genetic characterization of deltacoronavirus in pigs, *Emerg Infect Dis*, 20, 1227-1230 (2014)
- [12] Vilcek S, Herring AJ, Herring JA, Nettleton PF, Lowings JPL, Paton DJ : Pestiviruses isolated from pigs, cattle and sheep can be allocated into at least three genogroups using polymerase chain reaction and restriction endonuclease analysis, *Arch Virol*, 136, 309-323 (1994)
- [13] Ramirez A : Differential diagnosis of diseases, *Disease of Swine*, Zimmerman JJ, et al eds, 10th ed, 18-31, Blackwell Publishing, Ames, Iowa (2012)
- [14] Arruda PH : *Clostridium difficile* infection in neonatal piglets: Pathogenesis, risk factors, and prevention, Doctoral dissertation, Iowa State University (2014)

Fibrinous Colitis Associated with *Clostridium difficile* in Neonatal Piglets

Takumi CHIKUBA^{1)†}, Mariko TSUJI¹⁾, Akihisa ITOU¹⁾, Tomohiko SHIMODA¹⁾,
Ryouta SAITOU²⁾, Shigeru AKAMATU³⁾, Yoshihisa SUZUKI¹⁾
and Tomoyuki SHIBAHARA⁴⁾

- 1) *Mie Prefectural Central Livestock Hygiene Service Center, 1742-1 Isshinden-Kozubeta, Tsu, 514-0061, Japan*
- 2) *Mie Prefectural Nansei Livestock Hygiene Service Center, 83-2 Hayamasechou, Matusaka, 515-0217, Japan*
- 3) *Toyosato Domestic Animal Hospital, 5010 Takanoochou, Tsu, 514-2221, Japan*
- 4) *National Institute of Animal Health, National Agricultural and Food Research Organization, 3-1-5 Kannondai, Tsukuba, 305-0856, Japan*

SUMMARY

Neonatal piglets less than one week old had watery yellowish feces on a swine farm in Mie Prefecture, Japan in August 2014. Although the diarrhea ended in the farrowing house after eight days, fifteen piglets died in the meantime. At the necropsy, common gross lesions included mesocolonic edema. The colonic contents were assayed with a commercially available enzyme immunoassay that detects *Clostridium difficile* (CD) or its toxin, and CD was detected in piglets that had fibrinous colitis. CD was isolated from the colonic and/or rectum contents of the piglets. Histopathologically, segmental erosions were observed in the colonic mucosa, producing volcano lesions (exudation of neutrophils and fibrin into the lumen). Gram-positive bacteria and *Clostridium* antigens were detected around segmental erosion by Gram staining and immunohistochemical staining using anti-*Clostridium*. The present case was suspected to be *Clostridium difficile* infection.

— Key words : *Clostridium difficile*, fibrinous colitis, neonatal piglets.

† Correspondence to : Takumi CHIKUBA (*Mie Prefectural Central Livestock Hygiene Service Center*)

1742-1 Isshinden-Kozubeta, Tsu, 514-0061, Japan

TEL 059-246-8611 FAX 059-221-6331 E-mail : chikut00@pref.mie.jp

J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 70, 516 ~ 521 (2017)