

全身皮下気腫を呈し死亡した子牛からの *Paeniclostridium sordellii* の分離

大橋郁代^{1)†} 古田信道¹⁾ 佐藤遼太¹⁾ 福澤知夏²⁾ 木崎あゆみ³⁾
小菅千恵子⁴⁾ 上野勇一⁵⁾ 高松大輔^{5),6)}

- 1) 山形県中央家畜保健衛生所 (〒990-2161 山形市漆山736)
- 2) 山形県最上家畜保健衛生所 (〒996-0002 新庄市金沢大道上2034)
- 3) 岩手県中央家畜保健衛生所 (〒020-0605 滝沢市砂込390-5)
- 4) 神奈川県県央地域県政総合センター農政部 (〒243-0004 厚木市水引2-3-1)
- 5) 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)
- 6) 岐阜大学大学院連合獣医学研究科 (〒501-1193 岐阜市柳戸1-1)

(2020年7月6日受付・2020年12月10日受理)

要 約

山形県、岩手県及び神奈川県で、気腫疽に類似する重度の全身性皮下気腫を伴った子牛の急死事例が認められ、すべての症例から *Paeniclostridium sordellii* が分離された。これら皮下気腫症例由来 *P. sordellii* 5株と、気腫が認められなかった牛と羊の症例由来の同菌種25株の病原性遺伝子 (*tcsL*, *tcsH* 及び *nanH*) 保有状況を比較した結果、両者に違いはなく、またハウスキーピング遺伝子に基づく系統解析において皮下気腫症例由来株が特定の系統に属することはなかった。薬剤感受性試験では、いずれの株もペニシリンに高い感受性を示した。本報では、*P. sordellii* が牛に皮下気腫を起こすことが初めて示唆され、気腫の形成には、菌株の特性よりも宿主や飼養環境など他の要因が関与する可能性が高いと考えられた。——キーワード：薬剤感受性、牛、遺伝学的解析、*Paeniclostridium sordellii*、皮下気腫。

-----日獣会誌 74, 367~375 (2021)

Paeniclostridium sordellii は悪性水腫の原因菌の一つであり、2016年に *Clostridium* 属から再分類された菌種である [1]。牛の悪性水腫では一般に出血性、浮腫性の腫脹が認められるが、原因菌の違いや菌が産生する毒素によって多彩な病変が形成され [2]、*Clostridium septicum* や *Clostridium perfringens* に起因した症例では重度の気腫が認められることがある [3, 4]。一方、*P. sordellii* は、土壌、人及び動物の体内に常在するガス産生菌だが [5, 6]、これまで牛に気腫疽様の激しい皮下気腫を引き起こした事例は報告されていない。

P. sordellii の主な病原因子は、致死毒素 (TcsL) と、TcsL 遺伝子 (*tcsL*) 保有株の一部が持つ出血性毒素 (TcsH) である [7-10]。しかし、ほとんどの臨床検体由来株は単離後に *tcsL* が失われ、毒素非産生株になると考えられている [7, 11-13]。また、人や動物が本菌

の感染により致命的経過をたどる際には、末梢血白血球数の著しい増加が認められるが、これには菌が産生するノイラミニダーゼ (NA) が関与すると考えられている [14, 15]。

悪性水腫ではワクチンが市販されている他、感染初期の治療や同居牛の予防にペニシリン (PCG) の投与が推奨されている [2]。(家畜疾病総合情報システム、(公社)日本獣医師会、<http://nichiju.lin.gr.jp/tksn/illness/c45.html>)、(参照2020-07-01)。しかし、国内の畜産分野では、*P. sordellii* の薬剤感受性の調査報告は少ない [16]。

今回、山形県で重度の全身性皮下気腫を呈して急死した子牛からの *P. sordellii* の分離事例に遭遇し、類似症例を調査したところ、過去にも国内で同様の事例が認められていたことが判明した。

† 連絡責任者：大橋郁代 (山形県中央家畜保健衛生所)

〒990-2161 山形市漆山736 ☎023-686-4410 FAX023-686-5715 E-mail: ohashiik@pref.yamagata.jp

表1 細菌学的検査の材料及び方法

| | 症例 1 | 症例 2 | 症例 3 | 症例 4 |
|---|--|--|--|---|
| 主な材料 ¹⁾ | | | | |
| 心臓 | ○ | ○ | ○ | |
| 肺, 肝臓, 脾臓, 腎臓, 脳, 筋肉及び血液 | ○ | ○ | ○ | ○ |
| 皮下組織 | | | ○ | |
| 浅頸, 腸骨下, 空腸部及び 回腸部腸間膜リンパ節 | | | ○ | |
| 直接鏡検: 直接塗抹の染色法 ²⁾ | レビーゲル染色・ グラム染色 | レビーゲル染色・ グラム染色 | NT | レビーゲル染色 |
| 分離培養検査 ²⁾ | | | | |
| 5%炭酸ガスまたは好気培 養に使用した培地 | 羊血液寒天培地 | 羊血液寒天培地 | 羊血液寒天培地 DHL寒天培地 | 羊血液寒天培地 DHL寒天培地 |
| 嫌気培養 ³⁾ に 使用した培地 | 馬血液 ABCM 寒天 培地 ⁴⁾ 強化クックド・ミー ト培地 [17] | 馬血液 ABCM 寒天 培地 ⁴⁾ 強化クックド・ミー ト培地 [17] | 卵黄加変法 GAM 寒天培地 ⁵⁾ クックドミート培地の増菌培 養菌液の PCR ⁶⁾ (皮下組織, 筋肉) 卵黄加 CW 寒天培地 (空腸内容) | ツアイスラー血液寒 天培地 GAM 寒天培地 卵黄加 CW 寒天培地 |
| 菌種同定法 | | | | |
| 生化学的検査 | 簡易同定キットでの同定 ⁷⁾ 及びウレアーゼ試験 [18] | | | |
| 遺伝学的検査 | <i>Paeniclostridium sordellii</i> 菌種特異的 PCR [19], PCR ⁶⁾ , または 16S rRNA 遺伝子の塩基配列 解析 [21] | | | |
| Direct PCR ^{2), 8)} | (皮下組織, 筋肉) | | | NT |
| <i>Clostridium chauvoei</i> の 蛍光抗体検査 ^{2), 9)} | (上段「主な材料」の 塗抹標本, 分離菌株) | (上段「主な材料」の 塗抹標本, 分離菌株) | NT | (肝塗抹標本, 肝由 来菌株) |

1) ○: 検査材料として使用

2) 材料に, 上段の「主な材料」を供試した. その他の材料を用いた場合は材料を括弧書きで示した. NT: 検査実施せず.

3) 酸素吸収剤 (アネロパッケンキ, 三菱ガス化学(株), 東京) を用いた嫌気ジャー法で 37℃ 24~48 時間培養

4) 市販培地 (ABCM 寒天培地, 栄研化学(株), 栃木) を用い, 馬血液 (馬無菌脱繊維血, (株)日本生物材料センター, 東京) 5%, L-システイン (L-システイン-塩酸塩, 富士フィルム和光純薬(株), 大阪) 0.1%, 寒天 (寒天粉末, 富士フィルム和光純薬(株)) を寒天濃度 3% となるよう添加

5) 市販培地 (変法 GAM 寒天培地「ニッスイ」, 日水製薬(株), 東京) を用い, L-システイン (L-システイン-塩酸塩, 富士フィルム和光純薬(株)) 0.1% 及び卵黄液 4.5% となるよう添加

6) 市販培地 (クックドミート培地「ニッスイ」, 日水製薬(株)) による増菌培養菌液について, *Clostridium chauvoei*, *Clostridium novyi* types A 及び B, 及び *Clostridium septicum* の Multiplex 及び Monoplex PCR [20] を実施

7) 簡易同定キット (アピケンキ (API20A), ビオメリュー・ジャパン(株), 東京)

8) 市販キット (DNeasy Blood & Tissue Kit, QIAGEN, Germany) を用いて DNA を抽出し, 6) の PCR を実施

9) 蛍光抗体 (FITC 標識抗体 CLOSTRIDIUM CHAUVOEI FITC FA CONJUGATE, Veterinary Medical Research & Development, U.S.A.) を用いて実施

本稿では, 国内の計 4 症例について病性鑑定の所見を述べるとともに, *P. sordellii* 株について, PCR による病原性遺伝子の検出, 系統解析及び薬剤感受性試験を行ったので, その結果を報告する.

材料及び方法

発生状況: 4 症例はいずれもホルスタイン種雌牛の急死事例であった. 症例 1, 2 は 2019 年 1~2 月に, 山形県の 1 農場で, 3 カ月齢牛 2 頭に相次いで発生した. 両牛は死後 4~10 時間以内に病性鑑定に供された. 症例 3 は 2011 年 2 月, 岩手県の 2 カ月齢牛 1 頭で発生し,

この牛は死後 24 時間以内に病性鑑定に供された. 症例 3 が発生した農場では, 前年の秋以降, 皮下気腫を伴う子牛の急死事例が散発していた. 症例 4 は 2012 年 9 月, 神奈川県 6 カ月齢牛 1 頭で発生し, この牛は死亡した翌日に病性鑑定に供された.

細菌学的検査: 各症例の検査法を表 1 に示す.

ウイルス学的検査: 症例 1, 2 では, 肺材料を用いて PCR 及び RT-PCR による呼吸器疾病関連ウイルスの検出 [22-28] を行った. 症例 3 では, ウイルス学的検査を実施しなかった. 症例 4 では, 肺材料を用いて MDBK-SY 細胞によるウイルス分離培養検査を行った.

表2 *Paeniclostridium sordellii* の系統解析に使用したプライマー及び PCR の反応条件

| 標的遺伝子 | プライマー名 | プライマー配列 (5'-3') | 酵 素 | 反応条件 |
|-------------|----------|-----------------------------|----------------------|--|
| <i>adk</i> | Ps-adkF | TTACTTGGACCTCCTGGTGC | KOD FX (東洋紡株, 大阪) | 94℃ 2分 ↓ 98℃ 10秒 50℃ 30秒 68℃ 45秒 (35 サイクル) ↓ 68℃ 1分 |
| | Ps-adkR | TATTTTTCACCTCCTAGAGC | | |
| <i>atpA</i> | Ps-atpAF | CATGTATTAATAGTATATGATGAC | | |
| | Ps-atpAR | GCGTTTGTTAATCTTGAGTG | | |
| <i>dxr</i> | Ps-dxrF | GTACTTTTAACTGCTATAGTAGG | | |
| | Ps-dxrR | CCAATCTTTCAAATCGTTAAG | | |
| <i>glyA</i> | Ps-glyAF | ATAGCTGATGAAGTAGGGGC | | |
| | Ps-glyAR | ATAACTGTTTCCCTAGCCTC | | |
| <i>recA</i> | Ps-recAF | CAGTAATGAAGTTAGGTGAAGC | | |
| | Ps-recAR | CTCCATACATTATGTCAAATTCAC | | |
| <i>sodA</i> | Ps-sodAF | GTTTAATAAAAATAACATTACCATATG | | |
| | Ps-sodAR | GTAATAAGCATGTTCCCAAACATC | | |
| <i>tpi</i> | Ps-tpiF | ATGAGAAAACCTATAATAGCAG | | |
| | Ps-tpiR | TTGTTAGGCTTAACACTTCCACC | | |

病理学的検査：各症例について剖検後，常法により病理組織標本を作製し，ヘマトキシリン・エオジン（HE）染色後に鏡検した。

分子系統解析：*P. sordellii* 株について，病原性遺伝子 (*tcsL*, *TcsH* 遺伝子 (*tcsH*) 及び NA 遺伝子 (*nanH*)) の PCR による検出 [11, 29] 及びハウスキーピング遺伝子の塩基配列に基づく系統解析を行った。解析には，今回の気腫 4 症例由来の 5 株（症例 1, 3 及び 4 由来各 1 株，症例 2 由来 2 株）に，皮下気腫が認められなかった 24 症例由来の 25 株（2005～2020 年に 1 道 5 県で牛及び羊から分離された株）を加えた計 30 株を用いた。症例 1 及び 2 については，継代中に病原性遺伝子 (*tcsL* 及び *tcsH*) が失われる可能性を考慮して，菌株の他に，心臓，肺，肝臓，脾臓，腎臓，脳，筋肉及び血液を嫌気条件下で増菌培養した菌液計 16 検体も PCR に供した。

系統解析では，*Clostridioides difficile* の Multilocus sequence typing 法 [30] に用いられる遺伝子を参考にして 7 つのハウスキーピング遺伝子 (*adk*, *atpA*, *dxr*, *glyA*, *recA*, *sodA* 及び *tpi*) の塩基配列解析を実施した。まず，表 2 に示したプライマーと PCR 条件で，これら標的遺伝子の一部を増幅し，市販キット (QIAquick PCR Purification Kit, QIAGEN, Germany) を用いて PCR 産物を精製した。さらに，市販キット (BigDye terminator V3.1 cycle sequencing kit, Applied Biosystems, U.S.A.) 及び遺伝子解析装置 (3130xl Genetic Analyzer, Applied Biosystems, U.S.A.) を用いて精製 PCR 産物の塩基配列を決定した後，遺伝子解析ソフトウェア [31] (Molecular Evolutionary Genetics Analysis software, ver. 7.0) を用いて，近隣接合法による系統樹を作成した [32-34]。

薬剤感受性試験：Clinical and Laboratory Standards Institute (2007) のガイドラインに従い，PCG, アンピシリン (ABPC), セファゾリン (CEZ), カナマイシン (KM), エリスロマイシン (EM), テトラサイクリン (TC), クロラムフェニコール (CP), リンコマイシン (LCM), エンロフロキサシン (ERFX), メトロニダゾール (MNZ) の 10 薬剤の最小発育阻止濃度 (MIC) を寒天平板希釈法により測定した。また，精度管理株として *Bacteroides fragilis* ATCC 25285 を用いた。

成 績

細菌学的検査：各症例の成績を表 3 に示す。皮下気腫が認められた 4 症例すべてから *P. sordellii* が分離され，症例 1 では *Clostridium novyi* type B, 症例 3 では *C. septicum* も同時に分離された。

ウイルス学的検査：いずれの検査も陰性であった。

病理学的検査：剖検及び組織学的所見を表 4 に示す。すべての症例で，体幹から四肢に渡る全身の皮下織において重度の気腫（図 1）が認められ，症例 1, 2 では皮下織の捻髪音も認められた。また筋間にも気腫が認められ，気腫付近の筋肉は明赤色であった（症例 1, 2, 4）。組織学的には肺水腫（症例 1, 2）（図 2A）及び多発性の出血巣（症例 1～3）が認められた。症例 1 の心臓と肝臓には大桿菌が認められ，その周囲には空胞が観察されたが，白血球浸潤等の炎症反応は認められなかった。

病原性遺伝子の検出：供試した 30 株のうち，*tcsL* は皮下気腫が認められなかった牛由来の 2 株（島根 601-2, 岩手 18-551（図 3））でのみ PCR 増幅が認められ，皮下気腫症例由来株では増幅が認められなかった。また症例 1 の心臓の増菌培養菌液からも *tcsL* が検出されたが，

表3 細菌学的検査成績

| | 症例1 | 症例2 | 症例3 | 症例4 |
|--|---|--|--|--|
| 直接鏡検： 観察された菌 | グラム陽性桿菌 (心臓, 肺, 肝臓, 腎臓, 脳, 筋肉, 血液) | グラム陽性桿菌 (腎臓, 筋肉) | NT | 桿菌 (肝臓, 血液) |
| 分離培養検査： 分離菌種 | <i>Paenicrostridium sordellii</i> (腎臓) <i>Clostridium novyi</i> type B (脳) | <i>Paenicrostridium sordel- lii</i> (腎臓, 筋肉) | <i>Paenicrostridium sordel- lii</i> (肝臓, 腎臓, 血液, 空腸部腸間膜リンパ節) <i>Clostridium septicum</i> (回腸部腸間膜リンパ節) | <i>Paenicrostridium sordel- lii</i> (肺, 肝臓, 脾臓, 腎 臓, 脳, 筋肉, 血液) |
| Direct PCR： 検出菌種 | <i>Clostridium novyi</i> type B (心臓, 肺, 肝臓, 血液) | - | - | NT |
| <i>Clostridium chau- voei</i> の蛍光抗体検 査：特異蛍光 | - | - | NT | - |

検出箇所を括弧書きで示した。NT：検査実施せず。



図1 剖検所見 (症例1 皮下気腫)
皮下織において、大きなものは約2cm大の気泡を伴う気腫 (矢印) が認められた

最終的に *tcsL*-PCR 陽性を示す *P. sordellii* 株は分離されなかった。供試株はすべて *tcsH*-PCR 陰性、*nanH*-PCR 陽性であった。

分子系統解析：決定したハウスキーピング遺伝子の塩基配列は日本 DNA データバンクに登録した(アクセッション番号：LC555744-LC555953)。図3に示す通り、皮下気腫症例由来株 (図中の太字の株) は特定の系統には属しておらず、その他の株と系統樹上で混在していた。

薬剤感受性試験：各薬剤の MIC 値を表5に示す。すべての株は PCG 及び ABPC に高い感受性を示した。また、Sasaki ら [16] の報告と同様に、CEZ 及び EM は低濃度で発育を阻止し、LCM の MIC は2峰性の分布を示した (MIC： $\leq 0.125\mu\text{g/ml}$ 3株, $1\sim 8\mu\text{g/ml}$ 27株)。TC には牛及び羊由来の2株 (山形 22-116, 福岡 1 (図3)) が耐性 (MIC： $\geq 16\mu\text{g/ml}$) であった。

考 察

皮下気腫の4症例では、*P. sordellii* 感染症の剖検所
日獣会誌 74 367~375 (2021)

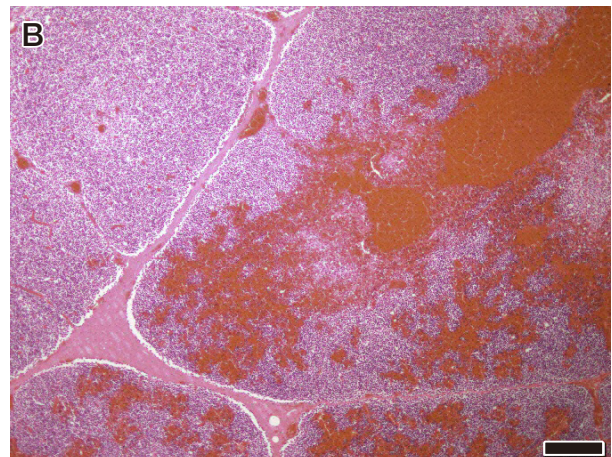
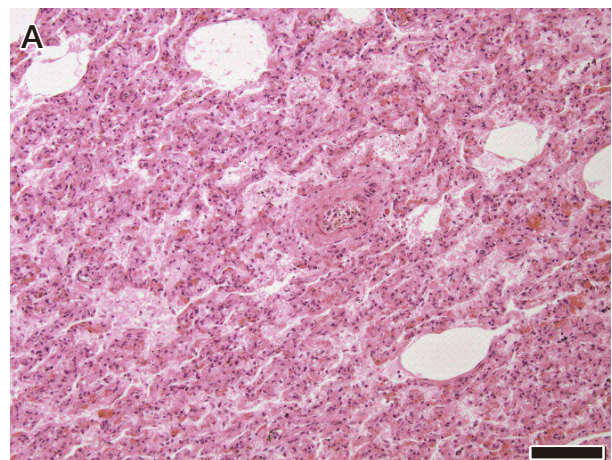


図2 病理組織学的所見 (HE 染色) (症例1)
A：肺水腫 肺胞腔内に好酸性に富む漿液の貯留が認められた (Bar=100 μm)
B：胸腺 広範囲な出血巣が多病巣性に認められた (Bar=200 μm)

見 [36] と同様に、び漫性の点状出血 (図2B) を伴う胸腺の腫大 (症例1)、胸膜における線維素析出 (症例1, 3)、臓器の脆弱化 (症例1~4) 及び複数臓器における出血 (症例1~3) が認められた (表4)。また、同感染

表4 病理学的検査成績

| 部位 | Paeniclostridium sordellii 実験感染牛の剖検所見 [35] | 剖検所見 ¹⁾ | | | | 組織学的所見 ²⁾ | | | | | | |
|------|---|--------------------|------|------|------|----------------------|-------------------------------|--------|------|------|------|----|
| | | 所見 | 症例 1 | 症例 2 | 症例 3 | 症例 4 | 所見 | 症例 1 | 症例 2 | 症例 3 | 症例 4 | |
| 外貌 | 口腔粘膜で充血, わずかな潰瘍 | 外傷 | | | | | | | | | | |
| | | 腹囲膨満 | + | + | | + | | | | | | |
| | | 鼻出血 | + | | + | | | | | | | |
| 皮膚 | 記述なし | 無毛部の赤色化 | + | + | | | | | | | | |
| 皮下 | 骨盤入口に出血, 浮腫 | 体幹~四肢の全身で重度の皮下気腫 | + | + | + | + | N/A | | | | | |
| | | 皮下織の捻髪音 | + | + | | | | | | | | |
| | | 頸部で赤色化 | | | | + | | | | | | |
| 体腔 | 記述なし | 軽度の血様胸水及び腹水貯留 | | | | | | | | + | | |
| 筋肉 | 接種部位で広範な出血性筋炎 本菌の接種部位に小泡形成 死後4時間以内(-) 死後10時間後(+) | 明赤色の筋間に気腫 | + | + | | + | 水腫 | + | | | | |
| | | 水腫 | | | + | | | | | NT | NT | |
| | | 骨格筋の煮肉様変性 | + | + | | | | | | | | |
| 胸腺 | 腫大 全体に点状出血 | うっ血, 出血 | | + | + | | | | | + | | |
| | | 腫大 | + | | | | リンパ球減少 | + | | NT | NT | |
| | | 出血 | + | | + | | 広範な多発性出血巣 | + | NT | + | NT | |
| 気管 | 喉頭に及ぶ広範囲な重度な粘膜下うっ血, 斑状出血 | 粘膜全域で出血 | + | + | | | 出血または充うっ血 | + | + | + | | |
| | | 泡沫貯留 | + | + | | | 粘膜固有層から粘膜下織の単核球浸潤 | + | + | | NT | |
| | | | | | | | 粘膜固有層のリンパ球浸潤 | | | | + | |
| 心臓 | 左心室の心内膜下で顕著な出血 心冠状溝の点状出血 | 右心室の心内膜下出血 | + | | | | 心筋の出血または充血 | + | | + | | |
| | | 心冠部点状出血 | + | | | | 大桿菌と炎症反応を伴わない菌体周囲の空胞 | + | | | NT | |
| | | | | | | | 肺水腫 | + | + | | | |
| 肺 | 充血 | 前葉で肝変化 | + | + | | | 充血 | | | + | | |
| | | | | | | | 肺胞に単核球浸潤 | + | + | | NT | |
| | | | | | | | 肺胞及び肺胞壁にリンパ球と好中球の浸潤 | | | | + | |
| 胸膜 | 線維素析出 | 線維素析出, 肺に癒着 | + | | + | | 気管支のうっ血, 出血 | | | | + | |
| | | 褪色, 脆弱 | + | + | + | + | NT | | | | | |
| | | のこずく肝 | | + | | | 死後変化様の壊死または自己融解 | + | + | | + | |
| 肝臓 | わずかに充血 | 軽度うっ血 | + | | | | 軽度充血, 肝細胞の腫大 | | | + | | |
| | | | | | | | 大桿菌と炎症反応を伴わない菌体周囲の空胞 | + | | | NT | |
| | | | | | | | 出血または充うっ血 | + | + | + | | |
| 脾臓 | 脆弱 | 脆弱 | | | | + | リンパ濾胞減少 | + | + | + | | |
| | | | | | | | 死後変化様の自己融解 | | | | + | |
| | | | | | | | 腎皮質間質で出血巣 | + | + | | | |
| 腎臓 | わずかに充血 | 腎皮質の一部で出血 | + | | | | 充血, 尿管上皮の混濁腫脹 | | | + | NT | |
| | | 褪色, 脆弱 | + | + | | + | 死後変化様の壊死 | + | + | | | |
| | | 結腸粘膜で充血 | | | + | | | | | | | |
| 消化管 | 記述なし | 空腸部腸間膜リンパ節周囲気腫 | + | | | | 死後変性 | + | | + | + | |
| | | 胃内容物は配合飼料(粗飼料なし) | | | + | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | |
| 脳 | 記述なし | 著変なし | | | | | 軽度出血及び充血 | | | + | | |
| | | | | | | | 化膿性髄膜炎 | | | | + | |
| リンパ節 | 腸骨下リンパ節の腫脹, 出血 | 全身リンパ節で顕著なうっ血及び出血 | | | + | | 気管リンパ節でリンパ球減少 | + | NT | | NT | |
| 眼球 | 記述なし | 著変なし | | | | | 髄洞の軽度拡張 | | | + | | |
| 動脈 | 記述なし | | N/A | | | | | 脈絡膜の出血 | NT | NT | + | NT |
| | | | | | | | 小口径動脈壁の変性(肺, 第一胃及び腸間膜リンパ節で顕著) | | | + | | |

1) + : 所見あり, 空欄 : 所見なし, 太字 : P. sordellii 実験感染牛との共通所見, 太明朝体 : 4 症例の共通所見, NT : 検査実施せず, N/A : 該当せず

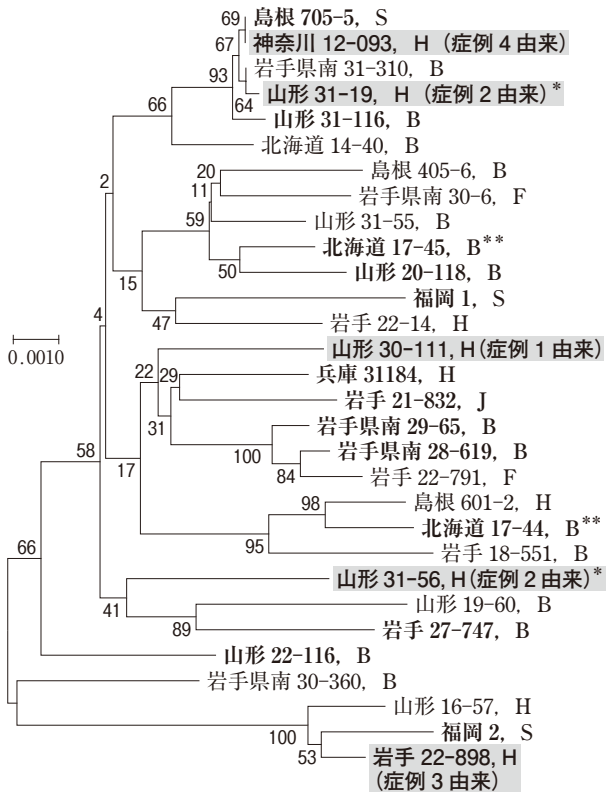


図3 *Paeniclostridium sordellii* のハウスキーピング遺伝子 (*adk*, *atpA*, *dxr*, *glyA*, *recA*, *sodA*, *tpi*) の配列に基づく近隣接合法による系統樹

ブートストラップテストを1,000回繰り返した結果得られた各クラスターが再現された確率(ブートストラップ確率, %)を対応する枝の隣に記す。図中のスケールは一塩基当たりの変異頻度を示す。

太字アミ: 皮下気腫が認められた症例1~4由来株。

太字: 皮下気腫が認められなかった症例由来株のうち、その疾病の原因として関与した可能性が高い株。

由来家畜は、

- H: 牛 ホルスタイン種, B: 牛 黒毛和種,
- J: 牛 日本短角種, F: 牛 交雑種及びS: 羊で示す。
- *, **: 各々、同一個体から分離された株。

症の組織学的な特徴である、炎症細胞の反応を伴わない菌体周囲の空胞 [36] が認められた (症例1)。

今回、本菌以外にも *C. novyi* type B や *C. septicum* が分離された症例があり、これらが気腫の形成に関与した、あるいは病変形成に関与していない *P. sordellii* が死後に増殖した結果分離された可能性も完全には否定できない。しかし、すべての症例において *P. sordellii* が分離されたことや、*P. sordellii* の実験感染牛 [36] との共通所見から、死亡原因に *P. sordellii* が関与していたことが示唆され、4症例に共通してみられた激しい皮下気腫の病変形成にも本菌が関与したことが強く疑われた。また、いずれの症例にも外傷はなかったため、本菌は消化管粘膜から侵入したことが推察された。

P. sordellii 分離株の遺伝学的な比較解析の結果、皮

表5 2005~2020年に国内の牛及び羊の病性鑑定において分離された *Paeniclostridium sordellii* 30株の薬剤感受性試験結果

| 抗菌薬 | 略号 | MIC ¹⁾ (μg/ml) | | |
|------------|------|---------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| | | 範囲 | MIC ₅₀ ²⁾ | MIC ₉₀ ³⁾ |
| ペニシリン | PCG | ≤ 0.125 | ≤ 0.125 | ≤ 0.125 |
| アンピシリン | ABPC | ≤ 0.125 | ≤ 0.125 | ≤ 0.125 |
| セファゾリン | CEZ | ≤ 0.125 ~1 | 0.5 | 0.5 |
| カナマイシン | KM | 64~512< | 256 | 512 |
| エリスロマイシン | EM | ≤ 0.125 ~0.25 | 0.125 | 0.25 |
| テトラサイクリン | TC | ≤ 0.125 ~16 | ≤ 0.125 | ≤ 0.125 |
| クロラムフェニコール | CP | 1~4 | 2 | 2 |
| リンコマイシン | LCM | ≤ 0.125 ~8 | 4 | 8 |
| エンロフロキサシン | ERFX | 1~4 | 1 | 2 |
| メトロニダゾール | MNZ | 0.25~1 | 0.5 | 1 |

1) 最小発育阻止濃度 (minimum inhibitory concentration)

2) 50%の菌株の発育を阻止した MIC

3) 90%の菌株の発育を阻止した MIC

皮下気腫の症例由来株とその他の株との間で、病原性遺伝子 (*tscL*, *tscH* 及び *nanH*) の検出率に差はなかった。また、系統解析の結果から、皮下気腫症例由来株はさまざまな系統に属することが明らかとなった (図3)。今回の皮下気腫症例由来株が気腫発症に関与する未知の病原因子や特性を有している可能性も否定できないが、本解析結果からは、皮下気腫の発生は菌株側の要因よりも、宿主の状態、感染ルート、飼養管理及び飼養環境の衛生状態などの要因によって左右される可能性が高いと考えられた。

同一農場内で発生した症例1及び2由来株は、系統樹上で離れた枝に位置していた。また、同一個体から分離された株 (山形31-19と山形31-56及び北海道17-44と北海道17-45) がそれぞれ異なる系統に属することも明らかとなった (図3)。この結果は、系統の異なる複数の株が一つの症例に関与する可能性を示唆している。

今回報告した *P. sordellii* が関与する皮下気腫の4症例は、発生の状況、臨床及び病理学的所見がいずれも気腫疽に酷似していた。*P. sordellii* 感染症の実態をより正確に把握することは気腫疽との類症鑑別においても重要であるため、今後も知見を積み重ね、本菌と皮下気腫との関連性を精査していくことが必要と考えられた。

本研究で供試したすべての株が PCG に高い感受性を示したことから、*P. sordellii* 感染症の感染初期の治療や同居牛の予防には、PCGは有効であると推察された。本菌はまれに人でも致死的な疾病の原因となる [7、

14]. 人から分離された株は系統学的に動物由来株と近縁であることも踏まえ [11], 今後も動物由来株の薬剤耐性動向を注視する必要があると考えられた。

稿を終えるに当たり、本研究にご協力いただいた北海道石狩家畜保健衛生所の伊藤史恵氏、菌株を分与いただいた兵庫県農政環境部農林水産局畜産課の今橋大輔氏、鳥根県農畜産課家畜病性鑑定室の原由香氏及び福岡県中央家畜保健衛生所の濱田恭平氏と、多くの助言をいただいた国研農研機構の大崎慎人氏に深謝する。

引用文献

- [1] Sasi Jyothsna TS, Tushar L, Sasikala C, Ramana CV : *Paraclostridium benzoelyticum* gen. nov., sp. nov., isolated from marine sediment and reclassification of *Clostridium bifermentans* as *Paraclostridium bifermentans* comb. nov. Proposal of a new genus *Paeniclostridium* gen. nov. to accommodate *Clostridium sordellii* and *Clostridium ghonii*, Int J Syst Evol Micr, 66, 1268-1274 (2016)
- [2] 田村 豊 : 18. 悪性水腫, 牛病学, 明石博臣, 江口正志, 神尾次彦, 加茂前秀夫, 酒井 豊, 芳賀 猛, 眞鍋 昇編, 第3版, 288-289, 近代出版, 東京 (2013)
- [3] Junior CAO, Silva ROS, Lobato FCF, Navarro MA, Uzal FA : Gas gangrene in mammals: a review, J Vet Diagn Invest, 32, 175-183 (2020)
- [4] Askari N, Ghanbarpour R, Kheirandish R, Tajik J, Alimolaei M : Detection of *Clostridium perfringens* bacterium in the clinical specimens from blackleg calves: a report of two cases, Comparative Clinical Pathology, 26, 255-259 (2017), (online), (DOI: 10.1007/s00580-016-2386-y), (accessed 2020-03-09)
- [5] Cunniffe JG : *Clostridium sordellii* bacteraemia, J Infection, 33, 127-129 (1996)
- [6] Balseiro A, Oleaga Á, Polledo L, Aduriz G, Atxaerandio R, Kortabarria N, García Marín JF : *Clostridium sordellii* in a brown bear (*Ursus arctos*) from Spain, J Wildlife Dis, 49, 1047-1051 (2013)
- [7] Vidor C, Awad M, Lyras D : Antibiotic resistance, virulence factors and genetics of *Clostridium sordellii*, Res Microbiol, 166, 368-374 (2015)
- [8] Martinez RD, Wilkins TD : Purification and characterization of *Clostridium sordellii* hemorrhagic toxin and cross-reactivity with *Clostridium difficile* toxin A (enterotoxin), Infect Immun, 56, 1215-1221 (1988)
- [9] Popoff MR : Purification and characterization of *Clostridium sordellii* lethal toxin and cross-reactivity with *Clostridium difficile* cytotoxin, Infect Immun, 55, 35-43 (1987)
- [10] Genth H, Pauillac S, Schelle I, Bouvet P, Bouchier C, Varela-Chavez C, Just I, Popoff MR : Haemorrhagic toxin and lethal toxin from *Clostridium sordellii* strain vpi9048: molecular characterization and comparative analysis of substrate specificity of the large clostridial glucosylating toxins, Cell Microbiol, 16, 1706-1721 (2014)
- [11] Couchman EC, Browne HP, Dunn M, Lawley TD, Songer JG, Hall V, Petrovska L, Vidor C, Awad M, Lyras D, Fairweather NF : *Clostridium sordellii* genome analysis reveals plasmid localized toxin genes encoded within pathogenicity loci, BMC Genomics, 16, 392 (2015)
- [12] Bouvet P, Sautereau J, Le Coustumier A, Mory F, Bouchier C, Popoff MR : Foot infection by *Clostridium sordellii*: case report and review of 15 cases in France, J Clin Microbiol, 53, 1423-1427 (2015)
- [13] Voth DE, Martinez OV, Ballard JD : Variations in lethal toxin and cholesterol dependent cytolysin production correspond to differences in cytotoxicity among strains of *Clostridium sordellii*, FEMS Microbiol Lett, 259, 295-302 (2006)
- [14] Aldape MJ, Bryant AE, Stevens DL : *Clostridium sordellii* infection: epidemiology, clinical findings, and current perspectives on diagnosis and treatment, Clin Infect Dis, 43, 1436-1446 (2006)
- [15] Aldape MJ, Bryant AE, Ma Y, Stevens DL : The leukemoid reaction in *Clostridium sordellii* infection: neuraminidase induction of promyelocytic cell proliferation, J Infect Dis, 195, 1838-1845 (2007)
- [16] Sasaki Y, Yamamoto K, Tamura Y, Takahashi T : Tetracycline-resistance genes of *Clostridium perfringens*, *Clostridium septicum* and *Clostridium sordellii* isolated from cattle affected with malignant edema, Vet Microbiol, 83, 61-69 (2001)
- [17] Kurazono H, Shimosawa K, Hosokawa M, Sakaguchi G : Procedures for large-scale production and purification of *Clostridium botulinum* C1 toxin for preparation of toxoid, FEMS Microbiol Lett, 30, 47-51 (1985)
- [18] 鈴木祥一郎 : 性状検査法, 嫌気性菌と嫌気性菌症, 小酒井 望, 鈴木祥一郎編, 第1版, 69-84, 医学書院, 東京 (1968)
- [19] Kikuchi E, Miyamoto Y, Narushima S, Itoh K : Design of species-specific primers to identify 13 species of *Clostridium* harbored in human intestinal tracts, Microbiol Immunol, 46, 353-358 (2002)
- [20] Sasaki Y, Kojima A, Aoki H, Ogikubo Y, Takikawa N, Tamura Y : Phylogenetic analysis and PCR detection of *Clostridium chauvoei*, *Clostridium haemolyticum*, *Clostridium novyi* types A and B, and *Clostridium septicum* based on the flagellin gene, Vet Microbiol, 86, 257-267 (2002)
- [21] Arai R, Tominaga K, Wu M, Okura M, Ito K, Okamura N, Onishi H, Osaki M, Sugimura Y, Yoshiyama M, Takamatsu D : Diversity of *Melissococcus plutonius* from honeybee larvae in Japan and experimental reproduction of European foulbrood with cultured atypical isolates, PLoS One, 7, e33708 (2012), (online), (DOI:10.1371/journal.pone.0033708), (accessed 2020-07-01)
- [22] Vilcek S, Elvander M, Ballagi-Pordány A, Belák S : Development of nested PCR assays for detection of bovine respiratory syncytial virus in clinical samples, J Clin Microbiol, 32, 2225-2231 (1994)
- [23] Vilcek S, Herring AJ, Herring JA, Nettleton PF, Lowings JP, 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)
- [24] Yason CV, Harris LM, McKenna PK, Wadowska D, Kibenge FS : Establishment of conditions for the detection of bovine herpesvirus-1 by polymerase chain reaction using primers in the thymidine kinase region, *Can J Vet Res*, 59, 94-101 (1995)
- [25] Hoet AE, Nielsen PR, Hasoksuz M, Thomas C, Wittum TE, Saif LJ : Detection of bovine torovirus and other enteric pathogens in feces from diarrhea cases in cattle, *J Vet Diagn Invest*, 15, 205-212 (2003)
- [26] 尾宇江康啓, 榊原道子, 成田雅子, 佐藤雄太, 菅野 徹 : 北海道における牛パラインフルエンザウイルス 3 型の分子疫学的解析と迅速診断法の検討, *日獣会誌*, 70, 363-369 (2017)
- [27] Maluquer de Motes C, Clemente-Casares P, Hundesa A, Martín M, Girones R : Detection of bovine and porcine adenoviruses for tracing the source of fecal contamination, *Appl Environ Microb*, 70, 1448-1454 (2004)
- [28] Tsunemitsu H, Smith DR, Saif LJ : Experimental inoculation of adult dairy cattle with bovine coronavirus and detection of coronavirus in feces by RT-PCR, *Arch Virol*, 144, 167-175 (1999)
- [29] Popoff MR : Detection of toxigenic Clostridia, PCR Detection of Microbial Pathogens, *Methods in Molecular Biology Series*, Sachse K, Frey J, 216, 137-152, Humana Press, Totowa (2003)
- [30] Griffiths D, Fawley W, Kachrimanidou M, Bowden R, Crook DW, Fung R, Golubchik T, Harding RM, Jeffery KJ, Jolley KA, Kirton R, Peto TE, Rees G, Stoesser N, Vaughan A, Walker AS, Young BC, Wilcox M, Dingle KE : Multilocus sequence typing of *Clostridium difficile*, *J Clin Microbiol*, 48, 770-778 (2010)
- [31] Kumar S, Stecher G, Tamura K : MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets, *Mol Biol Evol*, 33, 1870-1874 (2016)
- [32] Saitou N, Nei M : The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees, *Mol Biol Evol*, 4, 406-425 (1987)
- [33] Felsenstein J : Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap, *Evolution*, 39, 783-791 (1985)
- [34] Nei M, Kumar S : *Molecular Evolution and Phylogenetics*, Oxford University Press, New York (2000)
- [35] Coleman JD, Hill JS, Bray HT, Armstrong DA, Morgan CO : Prevention of sudden death caused by *Clostridium sordellii* in feedlot cattle, *Vet Med Sm Anim Clin*, 70, 191-195 (1975)
- [36] Tsokos M, Schalinski S, Paulsen F, Sperhake JP, Püschel K, Sobottka I : Pathology of fatal traumatic and nontraumatic clostridial gas gangrene: a histopathological, immunohistochemical, and ultrastructural study of six autopsy cases, *Int J Legal Med*, 122, 35-41 (2008)

Isolation of *Paeniclostridium Sordellii* from Calves that Died with Systemic Subcutaneous Emphysema

Ikuyo OHASHI^{1)†}, Nobumichi FURUTA¹⁾, Ryota SATO¹⁾, Chinatsu FUKUZAWA²⁾,
Ayumi KIZAKI³⁾, Chieko KOSUGE⁴⁾, Yuichi UENO⁵⁾
and Daisuke TAKAMATSU^{5),6)}

- 1) Yamagata Prefectural Central Livestock Hygiene Service Center, 736 Urushiyama, Yamagata, 990-2161, Japan
- 2) Yamagata Prefectural Mogami Livestock Hygiene Service Center, 2034 Omichigami, Kanazawa, Shinjo, 996-0002, Japan
- 3) Iwate Prefectural Central Livestock Hygiene Service Center, 390-5 Sunakomi, Takizawa, 020-0605, Japan
- 4) Agriculture Division, Ken-o Resion Prefectural Administration Center, Kanagawa Prefectural Government, 2-3-1 Mizuhiki, Atsugi, 243-0004, Japan
- 5) Division of Bacterial and Parasitic Disease, National Institute of Animal Health, National Agriculture and Food Research Organization, 3-1-5 Kannondai, Tsukuba, 305-0856, Japan
- 6) The United Graduate School of Veterinary Sciences, Gifu University, 1-1 Yanagido, Gifu, 501-1193, Japan

SUMMARY

Severe subcutaneous emphysema was found throughout the body in cases of sudden death of calves in Yamagata, Iwate and Kanagawa prefectures, and *Paeniclostridium sordellii* was isolated from all cases. In this study, we compared the characteristics of 5 *P. sordellii* strains isolated from the subcutaneous emphysema cases and 25 *P. sordellii* strains from cattle and sheep with no emphysema. There were no clear differences in the prevalence of virulence genes (*tcsL*, *tcsH* and *nanH*) between strains from the subcutaneous emphysema cases and those from the cases without emphysema. Moreover, strains from the subcutaneous emphysema cases belonged to mutually different lineages on the phylogenetic tree constructed on the basis of housekeeping gene sequences of the strains. In the antimicrobial susceptibility tests, it was found that all strains were highly susceptible to penicillin. This is the first report on subcutaneous emphysema in cattle in which *P. sordellii* was involved, and our results suggest that host and environmental factors are more important than bacterial factors in causing subcutaneous emphysema in animals.

— Key words : antimicrobial susceptibility, cattle, genetic analysis, *Paeniclostridium sordellii*, subcutaneous emphysema.

† Correspondence to : Ikuyo OHASHI (Yamagata Prefectural Central Livestock Hygiene Service Center)
736 Urushiyama, Yamagata, 990-2161, Japan
TEL 023-686-4410 FAX 023-686-5715 E-mail : ohashiik@pref.yamagata.jp

— J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 74, 367 ~ 375 (2021)