

氏名(本籍)	はらぎ えつじ 函 城 悦 司 (兵庫県)
学位の種類	獣医学博士
学位記番号	乙第272号
学位授与の要件	学位規則第3条第2項該当
学位論文題名	内毒素による壊疽性乳房炎に関する研究
論文審査委員	(主査) 教授 田 淵 清 (副査) 教授 清 水 武 彦 教授 松 浦 健 二

論 文 内 容 の 要 旨

乳牛の壊疽性乳房炎は、近年飼養規模の拡大に伴い、飼養管理の省力化ならびに抗生物質の頻用による菌交代現象によって多発の傾向にある。とくに、本症は甚急性の経過をとり、急激な全身症状と乳房の局所症状を伴い、そのほとんどのものが治療効果がなく、死亡および廃用の転帰をとるため、家畜衛生上重要な問題を提起している。

しかし、本症の実態および発生機序については今なお不明な点が多く、原因菌の検出状況、血液生化学的所見についても系統的な研究が少なく、未だに論議が多い。

これらのいわゆる壊疽性乳房炎の発生機序については、臨床症状、血液学および病理組織学的所見などから、グラム陰性桿菌による内毒素中毒が疑われている。

このようなことから、筆者は家畜における内毒素の基礎的研究を行うとともに野外で発生した壊疽性乳房炎について内毒素の検出を試みたところ、本症の多くはグラム陰性桿菌による内毒素中毒であることを明らかにした。

さらに、本症の発生機序を探るために臨床的、細菌学的、病理学的、血液生化学的検査を実施し、発生機序についての検討を行った。

本研究の概要は次のとおりである。

1. 発生状況

1974年から1984年までの11年間における兵庫県淡路地方について、壊疽性乳房炎の発生状況を調査した。発生総数は794頭で総死廃頭数16,142頭の4.9%、乳房炎死廃頭数2,069頭、38.4%を占めており、年々増加する傾向がみられた。

発症時期は分娩と密接な関係があり、分娩後7日以内に81.3% (204/251頭)のものが発病し、経過が急激であるため発症後3日以内に78.5% (197/251頭)のものが死亡あるいは廃用の転帰をとっていた。

主要な症状として、元気消失、食欲廃絶、心悸亢進、起立不能、悪臭のある下痢などの全身症状と乳房の紫斑、冷感、腫大、乳汁の変化が見られた。

2. 細菌学的検索

1974年から1984年までの11年間に臨床的に壊疽性乳房炎と診断したホルスタイン種乳牛65頭、急性乳房炎牛12頭および異常の認められない健康対照牛26頭について、細菌、病理、血液ならびに内毒素の検索を行った。

壞疽性乳房炎発症牛の乳汁の細菌検査では、*Escherichia coli* 50.8% (33/65)、*Pseudomonas aeruginosa* 16.9% (11/65) とこの両者の菌種が主に分離され、次いで *Klebsiella pneumoniae* 4.6% (3/65)、*Enterobacter aerogenes* 4.6% (3/65)、*Alcaligenes faecalis* 1.5% (1/65)、*Acinetobacter anitratus* 1.5% (1/65) などグラム陰性桿菌が全体の 80.0% を占めていた。これに対しグラム陽性菌は全体の 20.0% (13/65) であり、*Bacillus cereus*、*Clostridium perfringens*、*Streptococcus* sp.、*Actinomyces pyogenes*、*Staphylococcus aureus* などが分離された。

主要臓器の細菌培養では、罹患乳房からはほぼ純粋に起因菌を分離したが、その他の臓器のうち肝、脾、腎などからはほとんど分離出来なかったことから本症の発生機序は起因菌の菌体毒素の作用によることを確認した。

また分離菌の血清型別では、*E. coli* 24株について0群別を行ったところ02が5株、08、075、088がそれぞれ2株ずつ、09、064、076、089が1株ずつ、型別不能9株であった。*P. aeruginosa* 22株の血清型別はGが6株、E、F、Iがそれぞれ3株ずつ、Aが2株、B、Kが1株ずつであり、両菌種ともにはば限られた血清型のパターンがみられた。このことから糞便あるいは腸管由来のこれらの細菌が、内因的もしくは外因的な感作を受けて感染し、さらに発病に至ったものと考えられる。

3. 病理組織学的検索

病理解剖所見では、罹患乳房を剥皮すると皮下織は顕著な浮腫、点状出血が認められた。剖面は暗赤色もしくは淡褐色を呈し、強い出血と間質の浮腫が広い範囲でみられ、健康部と病変部との境界は明瞭であった。主要臓器では、肝はやや腫大し、淡黄色脂肪化ならびにうっ血が認められた。

腎には充血と一部点状出血がみられ、脾は腫大し脾柱不明瞭で、肺および心において暗赤色斑が認められた。

病理組織所見では、乳房腺胞内の出血、腺胞上皮細胞の変性壊死、水腫、血管の線維索性壊死が認められた。また、血栓形成は罹患乳房に最も多くみられ、次いで肝、腎、肺の順に認められたことは、ヒトの内毒素血症にみられる血管内凝固症候群ときわめて類似する所見であった。主要臓器の病変では、肝の脂肪変性、出血、壊死、血栓形成、腎の出血、尿細管上皮細胞の変性壊死、肺のうっ血および出血、心の小壊死巣がみられた。このことから、細菌の毒素により直接的に組織障害を引き起こし、重篤な症状を呈するものと考えられた。

4. 血液生化学的検索

壞疽性乳房炎牛では、赤血球数、ヘマトクリット値の増加、白血球数の減少、好酸球、分葉核好中球および単球の減少と桿状核好中球の増加が認められた。とくに、分葉核好中球の減少は罹患乳房内への大量の移動と内毒素の刺激による好中球の辺縁趨向によるものと考えられる。

また、血清総蛋白量、アルブミン、グロブリンおよび血清カルシウム量の減少と血清尿酸素量、血清無機リンの増加が認められた。血清酵素量では、GOT、GPT、LDHは有意に高く、ALP、 γ -GTPも全般的に高値であった。これは罹患した乳腺組織および主要臓器中でのこれらの酵素活性値が著しく低下しており、内毒素による臓器障害、とくに乳腺組織の破壊によりこれらの酵素が血液中に逸脱したためと考えられる。

血液凝固系の検査では、血小板数の減少、プロトロンビン時間、活性部分トロンボプラスチン時間の延長、血漿フィブリノーゲンの著減が認められたことは、ヒトの内毒素血症にみられる血管内凝固症候群ときわめ

て類似する所見であった。

5. 内毒素の検索

本症牛の発生機序の解明ならびに予後診断の目的で内毒素の基礎的検討を行った。健康牛の血漿および乳汁中には合成基質を直接水解する非特異的アミダーゼ活性が存在していることが判明したため、PCA 前処理を行いリムス反応影響因子を除去し、合成発色基質法により、血漿および乳汁中の内毒素を高精度に再現性よく定量する方法を確立した。

そこで、健康牛 ($n=36$) の血漿および乳汁中の内毒素量を測定したところ、すべて 10 pg/ml^{-1} 以下であった。また、急性乳房炎牛でグラム陰性桿菌が分離された症例 ($n=12$) は、血漿中の内毒素量はすべて 10 pg/ml^{-1} 以下であったが、乳汁中では $1,147.0 \pm 766.8 \text{ pg/ml}^{-1}$ と高い値を示した。しかし、グラム陽性菌が分離された症例 ($n=6$) は、血漿および乳汁中の内毒素量はすべて 10 pg/ml^{-1} 以下であった。

壊疽性乳房炎牛のうちグラム陰性菌感染群 ($n=30$) の血漿中の内毒素量は、 $89.6 \pm 68.2 \text{ pg/ml}^{-1}$ と高値を示した。乳汁中の内毒素量は血漿中のそれよりも著しく高く $9.1 \pm 5.2 \times 10^6 \text{ pg/ml}^{-1}$ であったことから、グラム陰性菌群 (感染) による本症は内毒素血症によるものであることが確認された。一方、グラム陽性菌感染群 ($n=3$) は、血漿および乳汁中の内毒素量はすべて 10 pg/ml^{-1} 以下であった。

また、本症発症牛の内毒素陽性牛は陰性牛に比べて、重度な臨床症状を示すものが多く、廃用までの日数が短い傾向がみられた。また、内毒素によってのみ活性化される因子に合成発色基質を加えたエンドスペンサーテストで検討したところ、きわめて高い特異性で内毒素が検出されたことから、本症牛のうちグラム陰性菌感染群の発生要因は、内毒素によることが再確認された。

このように合成発色基質法を用いたリムステストにより本症牛のうち、グラム陰性菌感染群の血漿および乳汁中から高濃度に内毒素が検出されたことから、グラム陰性桿菌による急性および壊疽性乳房炎の早期診断となり、さらに効果的な治療法と予後判定に有用な指標となると考えられる。

以上に述べた成績から、グラム陰性菌群による壊疽性乳房炎の発生機序は、以下のとおり結論づけられた。

本症は、分娩直後に多発し、病性が急激なため治療を施す余裕もなく死亡および廃用の転帰をとるものが多い。感染経路として、主に乳頭口から侵入したグラム陰性桿菌が、乳腺乳槽および乳管内で増殖し、その結果、大量の内毒素を産生する。これら産生された内毒素が乳腺上皮から循環血液中に流入して血液凝固線溶系や補体系へ作用し、血管内凝固症候群を引き起こす。また、内毒素の直接的な作用により乳房および主要臓器の出血、壊死、血栓形成などの組織障害を起こすとともに、全身性シュワルツマン反応が加わって、死亡するものと考えられる。

さらに、本症の発生誘因として、分娩によるストレス、飼養環境の不良、高栄養の飼料給与による脂肪肝、代謝障害、潜在性乳房炎など母体に病原菌の侵入を容易にするような条件が加わったことも十分考えられる。

論文審査の結果の要旨

牛の乳房炎はその発生率が高く、牛乳生産を著しく阻害することから、家畜衛生上最も重視される疾病の1つに数えられている。なかでも、壊疽性乳房炎は甚急性に経過して治療困難であり、しかも、ほとんどの発症牛が死亡または廃用となるために酪農経営上からも重要な問題となっている。しかしながら、この壊疽

性乳房炎に関する系統的研究は比較的少なく、その実態については今なお不明な点が多い。

著者は本症の実態および発生機序を解明する目的で研究に着手し、野外での本症の発生状況を調査するとともに、罹患牛の細菌学的・病理組織学的・血液生化学的検索を実施し、さらに、変法 Limulus テスト(合成発色基質法など)により乳汁ならびに血漿中における内毒素(LPS)を測定・検討した。その結果、Gram 陰性菌による壊疽性乳房炎の発症には内毒素が密接に関係していることを明らかにした。

本論文の概要は次のとおりである。

1. 発生状況

1974年～1984年の11年間の兵庫県淡路地方における壊疽性乳房炎の発生は、総死廃頭数の4.9%(794/16,142)、乳房炎死廃頭数の38.4%(794/2,069)であり、年々増加する傾向にあった。本症は分娩後7日以内に発症するものが81.3%(204/251)に認められ、発病後3日以内に死亡または廃用となるものが78.5%(197/251)に達していた。主要症状としては元気消失・食欲廃絶・心悸亢進・起立不能・下痢などの全身症状と乳房の紫斑・冷感・腫大および乳汁の異常であった。

2. 細菌学的検索

1974年～1984年の11年間に臨床的に壊疽性乳房炎と診断されたホルスタイン種65頭を中心にして、罹患乳房乳汁につき原因菌を検索した結果、Gram 陰性桿菌によるものが全体の80.0%(52/65)を占め、その内訳は *Escherichia coli* 50.8%(33/65)、*Pseudomonas aeruginosa* 16.9%(11/65)、*Klebsiella pneumoniae* と *Enterobacter aerogenes* 各4.6%(3/65)、*Alcaligenes faecalis* と *Acinetobacter anitratus* 各1.5%(1/65)であった。Gram 陽性菌としては *Bacillus cereus*、*Clostridium perfringens*、*Actinomyces pyogenes*、*Streptococcus* sp.、*Staphylococcus aureus* などが検出された。

主要臓器の細菌培養では罹患乳房からは純培養状に起因菌を検出したが、他の肝臓・脾臓・腎臓などは培養陰性であった。

3. 病理組織学的検索

Gram 陰性桿菌による壊疽性乳房炎の病理学的所見の特徴は、乳腺胞内の出血、腺胞上皮細胞の変性壊死・水腫、血管の線維索性壊死であり、特に血栓形成は常に罹患乳房で多数生じており、次いで肝臓・腎臓・肺の順に認められた。本所見は人内毒素血症における播種性血管内凝固症候群(DIC)の所見ときわめて類似していた。

4. 血液生化学的検索

Gram 陰性桿菌による壊疽性乳房炎罹患牛では赤血球数・ヘマトクリット値の増加、白血球数の減少、分葉核好中球減少と桿状核好中球増加が認められた。血清総蛋白量・アルブミン・グロブリン・血清カルシウムの減少と血清尿酸窒素・血清無機リンの増加があり、血清酵素量ではGOT、GPT、LDHが有意に高値を示した。また血小板数の減少、プロトロンビン時間・活性部分トロンボプラスチン時間の延長、血漿フィブリノーゲンの著減が認められ、DIC症候群ときわめて類似する所見であった。

5. 内毒素の検索

外観健康牛36頭、急性乳房炎罹患牛18頭(12 Gram 陰性菌症例と6 Gram 陽性菌症例)、壊疽性乳房炎罹患牛33頭(30 Gram 陰性菌症例と3 Gram 陽性菌症例)の合計87頭(87乳房)について、過塩素酸前処理した血漿および罹患乳房由来乳汁中のLPS濃度を変法 Limulus テスト(合成発色基質法)にて測定した。

その結果、健康牛および Gram 陽性菌による急性乳房炎罹患牛の血漿ならびに乳汁中の LPS 濃度はいずれも 10 pg/ml 以下であった。しかし、Gram 陰性菌による急性乳房炎罹患牛の血漿では 10 pg/ml 以下であったが、乳汁中では $1.2 \pm 0.8 \times 10^3 \text{ pg/ml}$ と高い値を示した。

壊疽性乳房炎罹患牛のうち、Gram 陰性菌感染例の血漿中 LPS 濃度は $89.6 \pm 68.2 \text{ pg/ml}$ であり、乳汁中では $9.1 \pm 5.2 \times 10^6 \text{ pg/ml}$ と著しく高値であった。しかし、Gram 陽性菌感染例の血漿ならびに乳汁中の LPS 濃度は 10 pg/ml 以下であった。

著者は、前述のような検索結果から、Gram 陰性菌による壊疽性乳房炎の発症はこれら原因菌に由来する高濃度の LPS により主として血管内凝固が起こることによるものと結論し、さらに LPS 測定法は本症の早期診断・予後判定に応用可能であることを提示した。本研究は獣医微生物学並びに臨床獣医学上に寄与するところ大であり、獣医学博士の学位を授与するにふさわしい業績として評価する。