

Salmonella Infantis が関与したブロイラーの脊椎膿瘍

小笠原一憲・佐々木 淳[†]・川崎武志¹⁾・御領政信

岩手大学農学部共同獣医学科獣医病理学研究室, 〒020-8550 盛岡市上田 3-18-8

¹⁾人と鳥の健康研究所, 〒099-3119 北海道網走市鱒浦 2-7-1

要 約

ブロイラー農場において出荷直前に自主的に廃棄された44から52日齢の鶏, 61例を病理学的・細菌学的に検索した。臨床的に, ほとんどの鶏は発育不良, 脚弱または脚麻痺を示していた。肉眼的に脊椎に形成された膿瘍は61例中7例(11.5%)で認められ, 第六胸椎の椎体に主座していた。病理組織学的に, 脊椎膿瘍は多数のグラム陰性菌を伴う壊死性化膿性肉芽腫性骨髄炎及び関節炎の組織像を呈していた。一方, 脊椎症以外の症例の第五, 第六, 第七胸椎関節部では出血を伴った関節軟骨の亀裂・断裂が多数認められ, 2例では病変部または関節腔にも細菌塊がみられた。脊椎膿瘍病変部より分離された菌株は, 7例中4例が血清型別により *Salmonella* Infantis と同定され, 3例は大腸菌群であった。

キーワード: ブロイラー, 関節軟骨, *Salmonella* Infantis, 脊椎膿瘍

緒 言

著者らはこれまでブロイラー農場で脚弱や脚麻痺, 発育不良などにより出荷直前に自主的に廃棄された鶏を検索し, 主に第六胸椎の椎体に主座して膿瘍の形成がみられる, いわゆるブロイラーの脊椎膿瘍を報告してきた^{3,4)}。脊椎膿瘍は, 肉眼的には椎体の腫大や変形, 前後の椎体同士の癒合などをきたし, 脊髄を背側へ圧迫することによって脚弱または脚麻痺の原因となる例が多く, 病理組織学的には, グラム陽性球菌やグラム陰性短桿菌などを伴った壊死性化膿性肉芽腫性骨髄炎・関節炎が特徴である³⁻⁵⁾。原因学的には, 黄色ブドウ球菌や大腸菌群, *Salmonella* 属菌など人の食中毒起因菌をはじめ, 近年では *Enterococcus* 属菌^{2,6,7,10)} の関与が報告されているが, 主に第六胸椎の椎体に限局して病変が形成される本症特有の病理発生メカニズムと原因菌の感染経路は未だ解明されていない。

そこで今回, ブロイラーでみられる脊椎膿瘍の病理発生メカニズムの解明を目的として, 新たに3農場で自主廃棄されたブロイラーを剖検し, 病理学的・細菌学的検索を行った。

材 料 と 方 法

1. 供試鶏

岩手県内の3カ所のブロイラー農場で2011年7月から8月の間に自主廃棄されたブロイラー61症例(雄25例, 雌36例)を, 農場ごとにA群(20例, 44日齢), B群(20例, 52日齢), C群(21例, 51日齢)として検査を行った。臨床症状を確認し, 体重を測定後に剖検した。体重が2.0kg以下の症例を発育不良と判定した。胸椎の一部(第六胸椎を中心に前後2cmの領域)は, 滅菌したマイクロームブレードを用いて無菌的に正中を割断した。

2. 病理組織学的検査

剖検時, 各症例の主要臓器と胸椎の一部を採材し, 10%ホルマリン液で固定後, 常法に従いパラフィン包埋ブロックを作製した。胸椎をはじめ病変の認められた骨組織は10%ギ酸ホルマリン液で脱灰・固定を行った。パラフィン包埋ブロックはマイクロームを用いて4μmの厚さに薄切した後, ヘマトキシリン・エオジン(HE)染色を行い, 光学顕微鏡にて病理組織学的に検索した。また, HE染色標本による検索の結果, 細菌塊が認められた胸椎骨や大腿骨, 脛骨についてはグラム染色(Brown Hopps法)も行った。

3. 免疫組織化学的検索

一次抗体に抗 *Salmonella* 属菌抗体 (Viro Stat, USA)

2012年9月10日受付

[†]連絡責任者: 佐々木 淳

鶏病研報 49 巻 2 号, 112~117 (2013)

を用いて、胸椎骨や大腿骨、脛骨病変部の免疫組織化学的染色を行った。パラフィン包埋薄切標本を脱パラフィン後、常法に従い Labeled Streptavidin Biotin 法 (ダコ LSAB™ + キット - ユニバーサル, DAKO JAPAN, 東京) を実施した。

4. 細菌学的検査

肉眼的に脊椎膿瘍または胸椎骨以外に骨病変がみられた症例について細菌学的検査を行った。病変部を滅菌綿棒で無菌的に採材し、普通寒天培地 (NA) (日水製薬, 東京) に塗抹後、37℃ で 24 時間好気培養した。培養 24 時間後に形成されたコロニーから釣菌して、純培養を目的として NA へ継代培養した。純培養されたコロニーについてグラム染色を行い、さらにデソキシコレート寒天培地 (栄研化学株式会社, 東京), 10% 卵黄加マンニト食塩寒天培地 (日水製薬, 東京), TSI 寒天培地 (日水製薬, 東京) にそれぞれ移植し、20~24 時間培養後にそれぞれ判定した。生化学的検査としてカタラーゼ及

びオキシダーゼ試験もそれぞれ行い、サルモネラ属菌と判定された株については血清型別を行った。

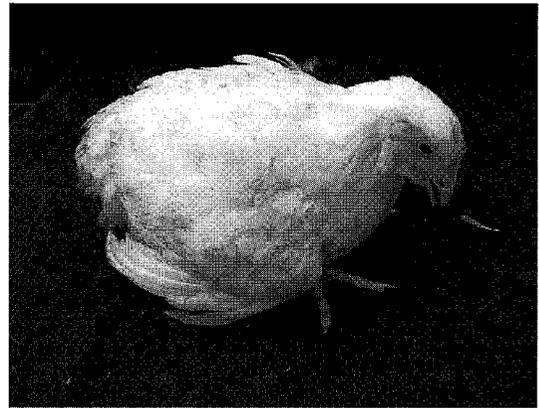


写真 1. 脊椎膿瘍がみられた鶏の起立状態。脚弱によりうずくまる姿勢を示している。

表 1. 自主廃棄鶏の主要肉眼病変と例数

農場	A	B	C	計	
日齢	44	52	51		
羽数	20	20	21		61
平均体重 (kg)	1.56	2.31	1.66		1.84 ± 0.41 ^{b)}
肝臓 (g)	51.2	65.9	50.4		55.8 ± 8.73
脾臓 (g)	2.5	3.4	2.5		2.8 ± 0.52
ファブリキウス囊 (g)	1	1.2	0.8		1.0 ± 0.2
脚弱	17	16	16		49
脚麻痺	3	2	5		10
病変の内訳 ^{a)}				羽数	(%)
脊椎症	6	8	13	27	44.2
脊椎滑り症	3	8	8	19	31.1
脊椎膿瘍	3	0	4	7	11.5
脊椎湾曲症	0	0	1	1	1.6
大腸菌症	2	0	1	3	4.9
化膿性骨頭炎 (脛骨)	0	1	0	1	1.6
化膿性骨髓炎 (大腿骨)	0	0	3	3	4.9
化膿性関節炎	3	0	2	5	8.2
筋間膿瘍	0	1	1	2	3.3
卵管炎	2	0	0	2	3.3
著変なし (発育不良・削瘦)	7	10	4	21	34.4

^{a)} 重複あり

^{b)} 平均±標準偏差

成 績

1. 臨床症状

B群を除くA、C群のほとんどの症例は発育不良に該当し、B群の2例を除くすべての症例は脚弱あるいは脚麻痺を示していた(図1)。各群の平均体重は、A群 1.12~2.09 kg (平均 1.56 kg)、B群 1.63~2.73 kg (平均 2.31 kg)、C群 0.90~2.25 kg (平均 1.66 kg)であった。

2. 肉眼所見

3農場別の主要な肉眼病変と例数は表1に示す通りであった。脊椎症(27例)が最も多く見られ、内訳は脊椎滑り症が19例、脊椎膿瘍が7例であった。7例の脊椎膿瘍のうち、5例が雄であった。

脊椎膿瘍を有する症例の第六胸椎は、生殖器や腎臓、副腎を取り除くと黄白色を呈して腫大・変形していた(図2)。剖断面では第五・第六胸椎または第六・第七胸椎の関節部を中心として膿瘍の形成が認められ(図3)、重

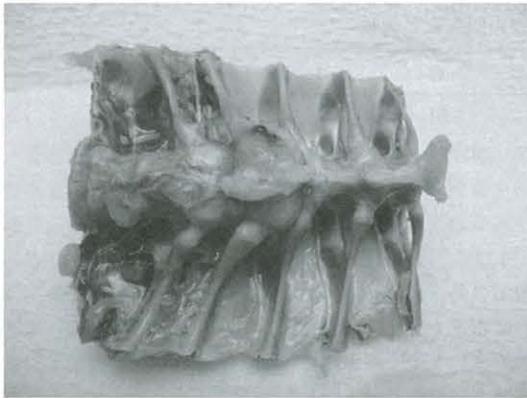


写真 2. 脊椎膿瘍がみられた鶏の第六胸椎。椎体は黄白色を示して腫大している。



写真 3. 脊椎膿瘍の正中矢状断面。第六・七胸椎関節部に主座して黄色を呈する膿瘍がみられ、変形した椎体が脊髄を上方へ圧迫している。

度の症例では第五から第七胸椎の広範な部位において黄褐色の壊死巣や、暗赤色の出血巣などが混在してみられた。

大腸菌症(3例)や脛骨骨頭炎・大腿骨骨髓炎(4例)、関節炎(5例)などの化膿性病変もそれぞれみられたが、脊椎膿瘍との併発は認められなかった。

3. 病理組織学的所見

脊椎膿瘍の病変部では重度のものでは既存の組織構造はほとんどみられず、胸椎骨の椎体や関節部において細菌塊を伴う巨大な壊死巣や偽好酸球、類上皮細胞、多核巨細胞からなる壊死性化膿性肉芽腫性骨髓炎・関節炎が認められた(図4)。一部では肉芽組織の形成や線維化などもみられた。このような症例では、第五、第六胸椎あるいは第六、第七胸椎それぞれの関節面が不明瞭になっていた。変形した椎体により圧迫された脊髄では、重度の症例の場合、白質変性や軸索膨化、出血などが認められた。脊椎膿瘍の症例では、ファブリキウス嚢や胸腺などのリンパ組織における様々な程度の萎縮がみられた以外に、全身諸臓器において組織学的に著変は認められなかった。

脊椎膿瘍または脊椎滑り症などの脊椎症以外の症例では、第五、第六、第七胸椎のいずれかの関節軟骨において、出血や好酸性滲出物を伴った関節軟骨の亀裂や断裂、変形などが認められ(表2、図5)、1例では関節軟骨病変部に細菌塊が認められた。それら全ての症例の関節腔では赤血球や好酸性滲出物、細胞退廃物などが認められ、1例では細菌塊を伴っていた。

グラム染色(Brown Hopps法)を行った結果、脊椎膿瘍の7例中6例や脛骨骨頭炎、大腿骨骨髓炎などでみられた細菌塊のほとんどはグラム陰性であったが(図6)、



写真 4. 第六胸椎における脊椎膿瘍。椎体部・関節部に壊死性化膿性肉芽腫性骨髓炎が認められる。(HE染色)。

表 2. A, B, C 群の第五, 第六, 第七胸椎関節部における病理学的検索結果

病変	第五胸椎 関節軟骨 (関節後部)		第六胸椎 関節軟骨				第七胸椎 関節軟骨 (関節前部)	
	亀裂・出血	細菌塊	関節前部		関節後部		亀裂・出血	細菌塊
			亀裂・出血	細菌塊	亀裂・出血	細菌塊		
脊椎膿瘍	1 / 4	0 / 4	0 / 4	0 / 4	0 / 1	0 / 2	0 / 2	0 / 2
脊椎滑り症	11 / 19	0 / 19	3 / 19	0 / 19	8 / 19	0 / 19	8 / 19	0 / 19
脊椎症以外の症例	21 / 33	0 / 33	3 / 33	0 / 33	17 / 32	1 / 32	13 / 32	0 / 32
計	33 / 56	0 / 56	6 / 56	0 / 56	25 / 52	1 / 53	21 / 53	0 / 53

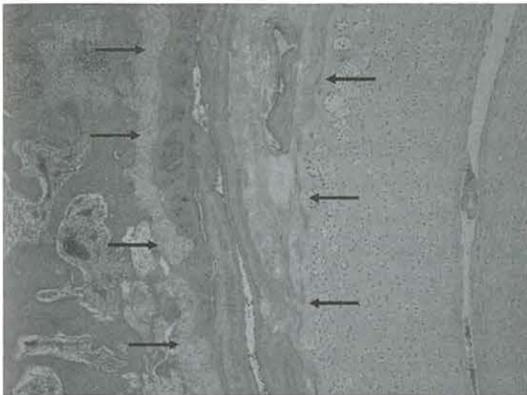


写真 5. 第六胸椎関節軟骨の断裂 (矢印) が広範囲に認められる。(HE 染色)。

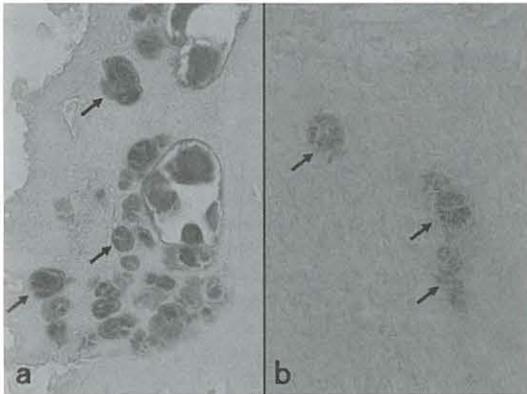


写真 6. 脊椎膿瘍における細菌塊 (矢印)。(a: Gram 染色, b: 抗 *Salmonella* 属菌抗体を用いた免疫組織化学的染色)。

関節腔に細菌塊がみられた 1 例ではグラム陽性を示した。

4. 免疫組織化学的検索結果

脊椎膿瘍で認められたグラム陰性菌は, 抗 *Salmonella* 属菌抗体に陽性を示した (図 6)。

5. 細菌学的成績

脊椎膿瘍病変部よりサルモネラ属菌が C 群の 4 例, 大腸菌群が A 群の 3 例からそれぞれ分離された。分離されたサルモネラ属菌の血清型別を実施したところ, 脊椎膿瘍, 脛骨骨頭炎, 大腿骨骨髄炎より分離された全てのサルモネラ属菌は *Salmonella* *Infantis* (O:7H:r1,5) であった (表 3)。

考 察

今回検索した 3 農場における自主廃棄鶏の 61 例中, 27 例 (44.2%) が脊椎症と診断された。このうち脊椎滑り症は 19 例 (31.1%) と高い罹患率を示しており, 脊椎膿瘍の 7 例 (11.5%) はこれまでの報告^{3,4)}と比較して低い発症率であったものの, 脊椎滑り症と脊椎膿瘍はプロイラー農場において従来通り潜在的に発生していることが確認された。今回の検索でみられた脊椎膿瘍の肉眼的および病理組織学的特徴は従来の報告³⁻⁵⁾とほぼ同様であった。

今回の検索では脊椎膿瘍や脛骨骨頭炎, 大腿骨骨髄炎などの病変部より *S. Infantis* が分離・同定されたが, これまでのところ *S. Infantis* を原因とする脊椎膿瘍は報告されていない。*S. Infantis* は鶏の化膿性肉芽腫性心膜炎の病変部から分離されたとの報告⁹⁾があり, 鶏肉からも高頻度で検出されることから食中毒の原因としても知られている。今回の検索で脊椎膿瘍病変部からこれまで報告されていない *S. Infantis* が分離されたことより, 本菌も脊椎膿瘍の原因菌となりうることが示され, 岩手県内のプロイラー農場においても *S. Infantis* の汚染が拡散している可能性が考えられた。

脊椎膿瘍の原因としては, 従来, 黄色ブドウ球菌や大腸菌群, *Salmonella* 属菌などの関与^{1,3,4)}が報告されてきたが, 近年諸外国では *Enterococcus* 属菌などの病原体が注目されている^{2,6,7,10)}。*Enterococcus* 属菌はオキシ

表 3. A, B, C 群における細菌学的検索結果

群	鶏 No	病変	分離菌
A	14	脊椎膿瘍	大腸菌群
	16	脊椎膿瘍	大腸菌群
	19	脊椎膿瘍	大腸菌群
B	8	脛骨骨頭炎	<i>Salmonella</i> Infantis (O : 7H : r1, 5)
	3	脊椎膿瘍	<i>Salmonella</i> Infantis (O : 7H : r1, 5)
	11	脊椎膿瘍	<i>Salmonella</i> Infantis (O : 7H : r1, 5)
C	14	脊椎膿瘍	<i>Salmonella</i> Infantis (O : 7H : r1, 5)
	17	脊椎膿瘍	<i>Salmonella</i> Infantis (O : 7H : r1, 5)
	5	大腿骨骨髓炎	大腸菌群
	10	大腿骨骨髓炎	<i>Salmonella</i> Infantis (O : 7H : r1, 5)
	15	大腿骨骨髓炎	大腸菌群

ダーゼ、カタラーゼ陰性を示すグラム陽性球菌であり、鳥類やほ乳類動物の消化管内常在菌とされているが、日和見的に病原菌になりうると考えられている。今回の検索における脊椎膿瘍でみられた細菌塊のほとんどはグラム陰性であったことから、黄色ブドウ球菌や *Enterococcus* 属菌の関与は否定されたが、今回検索した 1 例の胸椎関節腔においてグラム陽性球菌が組織学的に確認されたことから、本邦においても *Enterococcus* 属菌を原因とした脊椎症が発生している可能性が示唆された。

本症は主に第六胸椎の椎体に発生することが特徴であり³⁻⁵⁾、Martin ら⁸⁾も椎骨の脊柱管より上部の椎弓などには病変が認められないことを報告しているが、第六胸椎椎体に限局して発生するメカニズムについては解明されていない。今回の我々の検索によって、脊椎症の症例以外でも第五、第六、第七胸椎の関節軟骨や関節軟骨下骨組織では、出血や好酸性滲出物を伴った関節軟骨の亀裂や断裂が高率に発生していることが明らかとなり、さらに、それらの病変部には細菌塊を伴う症例もみられた。これらの検索結果より、ブロイラーでは可動性のある第六胸椎とその前後の胸椎関節部における物理的ダメージなどによる関節軟骨の損傷が先行病変として発生し、原因菌が血行性に損傷部位に到達すると推察され、それら胸椎関節病変は脊椎膿瘍の初発病変として重要な役割を演じている可能性が示唆された。関節軟骨に対する傷害の原因としては、ストレスや密飼いなどの環境要因や急激な増体が著しいなどのブロイラーにおける品種特異的な影響が考えられた。De Herdt ら²⁾は、脊椎膿瘍罹患鶏のほとんどは雄で占められることを報告しており、今回検索した脊椎膿瘍の 7 例中 5 例は雄であったことから、本症の発生傾向には性差があることが示唆された。

脊椎膿瘍の原因菌が胸椎病変部へ到達する感染経路としては、血行性あるいはリンパ行性の他、気嚢などを介した経気道感染の可能性が考えられている⁹⁾。Martin ら⁸⁾は、脊椎膿瘍野外例の病変部より分離した *Enterococcus cecorum* を用い、血行性、経口性、経気道など三つの感染経路の相違による再現実験を行い、気嚢への接種では本症は再現できず、経口接種および血管内接種によって病変の再現がなされたことを報告しており、本症の起原菌は血行性に病変部へ到達すると考察している。本研究においてブロイラーの第六胸椎に気嚢を認めたのは 61 例中 7 例であったが、脊椎膿瘍の症例には気嚢構造は認められず、今回の検索では本症の感染経路を特定するには至らなかった。

文 献

- 1) Barnes, H.J., Nolan, L.K. and Vaillancourt, J.P. : Colibacillosis. pp. 691-737. In : Diseases of Poultry, 12th ed. (Saif, Y.M. et al. eds.), Blackwell Publishing, Iowa (2008)
- 2) De Herdt, P. et al. : *Enterococcus cecorum* osteomyelitis and arthritis in broiler chickens. *Vlaams Diergene. Tijds.* 78, 44-48 (2008)
- 3) 木南藍子ら：淘汰ブロイラー鶏における脊椎膿瘍。日獣会誌 62, 289-293 (2009)
- 4) 木南藍子ら：一ブロイラー農場における廃棄鶏の病理。鶏病研報 43, 213-218 (2007)
- 5) 鶏病研究会：ブロイラー農場における自主淘汰鶏の実態。鶏病研報 46, 241-251 (2010)
- 6) Kolbjørnsen, Ø., David, B. and Gilhuus, M. : Bacterial osteomyelitis in a 3-week-old broiler chicken associated with *Enterococcus hirae*. *Vet. Pathol.* 48, 1134-1137 (2011)
- 7) Makrai, L. et al. : Association of *Enterococcus cecorum* with vertebral osteomyelitis and spondylolisthesis in broiler parent chicks. *Acta Vet. Hung.* 59, 11-21 (2011)
- 8) Martin, L.T., Martin, M.P. and Barnes, H.J. : Experimental reproduction of Enterococcal spondylitis in male

- broiler breeder chickens. *Avian Dis.* 55, 273-278 (2011)
- 9) 村瀬真子ら：ブロイラーの *Salmonella* Infantis 感染症例における病理学的観察. 鶏病研報 34, 108-113 (1998)
- 10) Stalker, M.J. *et al.* : Arthritis and osteomyelitis associated with *Enterococcus cecorum* infection in broiler and broiler breeder chickens in Ontario, Canada. *J. Vet. Diagn. Invest.* 22, 643-645 (2010)

Thoracic Vertebral Abscesses Associated with *Salmonella* Infantis in Broiler Chickens

Kazunori Ogasawara, Jun Sasaki[†], Takeshi Kawasaki¹⁾ and Masanobu Goryo

Iwate University, 3-18-8 Ueda Morioka-shi Iwate, 020-8550

¹⁾ Research Office Concerning the Health of Humans and Birds,
2-7-1 Masuura, Abashiri-shi, Hokkaido 099-3119

Summary

Sixty-one 44 to 52-day-old diseased and defective chickens were collected from three broiler farms before shipment for meat inspection and examined pathologically and bacteriologically. Most of affected chickens showed poor growth, lameness and paralysis. Macroscopically, 7 chickens had abscesses at 6th thoracic vertebrae (11.5%). Histopathologically, necrotizing purulent granulomatous osteomyelitis and arthritis with gram-negative bacilli was observed in the affected vertebra. Many cases showed a separation of articular cartilage at the fifth, sixth and seventh thoracic vertebrae except for cases of thoracic spondylopathy, and two cases had bacterial clumps. *Salmonella* Infantis and *Escherichia coli* was isolated from vertebral lesion.

(J. Jpn. Soc. Poult. Dis., 49, 112-117, 2013)

Key words : articular cartilage, broiler, *Salmonella* Infantis, thoracic vertebral abscess