

Escherichia coli TK18-A 株の気嚢内人工感染による 初生ヒナに対する virulence について

村田昌芳・川口 忍・三谷克之輔*・徳永三則*

広島大学生物生産学部 衛生微生物学講座

* 同附属農場

1980年4月30日 受理

On the Virulence of *Escherichia coli* Strain TK18-A Artificially Induced into the Air Sac of Day-Old Chicks

Masayoshi MURATA, Shinobu KAWAGUCHI, Katsunosuke MITANI* and Mitsunori TOKUNAGA*

Department of Microbiology and Hygiene, and *Experimental Farm, Faculty of Applied
Biological Science, Hiroshima University, Fukuyama 720

(Figs. 1-16, Tables 1-4)

近年、鶏の大腸菌症 (avian colibacillosis) は特に6~9週令のブロイラーに多発する疾病として注目されてきた。最近のブロイラー飼養形態は、特に密飼い、換気不良等により大腸菌の鶏個体間における急速な伝播をもたらすなど、鶏舎内環境が本疾病の発生に適当な条件を与える傾向がある^{3,9)}。一方、本病の発生は産卵鶏においてもその集団飼育に伴って増加し、飼養管理上の誘因に負うところが大きい^{3,9,10,18,37)}。

本病は、主として急性全身性の致死性病型と、慢性消耗性の病型とに大別される。それらの病型の中で最も注目され、多数報告されているものは敗血症である。その主な病変としては、心膜炎、肝包膜炎、気嚢炎などがあげられ⁹⁾、養鶏経営上はヒナの飼料要求率の悪化および肉質低下などの原因となり、重症例ではしばしば一度に多数のヒナが死亡する。

本病は特定の血清型²³⁾の *E. coli* に起因する場合が多い^{14,19,24,27,29,30,36,37,43,49)}。一般に鶏の大腸菌症は *E. coli* O群2による場合が最も多く、その他O群78、O群1などの血清型が注目されている。*E. coli* は人獣の腸管における常在菌であるにもかかわらず、ヒトや家畜・家禽の健康状態や飼養条件悪化の下での宿主の感染抵抗性の低下と、本菌による高度の環境汚染の結果発症に至るものと理解される^{3,8,9,16,18,31,37,49)}。

しかし、*E. coli* の起病性についてはなお論議の多いところで、その感染発症については種々の誘因または一次的原因の存在が必要であると一般に考えられている^{3,7,9,10,19,37)}。

鶏の大腸菌症における病型は、前述の病型のほか肉芽腫症 (coli-granulomatis)、出血性腸炎、関節炎、死ごもり卵および初生ヒナの卵黄感染 (yolk sac infection)、臍帯炎 (omphalitis)、全眼球炎 (panophthalmitis)、卵嚢性腹膜炎 (egg peritonitis)、卵管炎 (sulpingitis) などがよく知られている^{10,37)}。その他、本菌は他の疾病への二次的または混合感染因子として重要な役割を演ずるが、特に *Mycoplasma gallisepticum* (MG) による鶏呼吸器性マイコプラズマ病に混合感染し、その症状を増悪せしめ、養鶏産業上大きな被害を及ぼすことはよく知られるところである^{2,6,9,10,37,38,41,48)}。

大腸菌の病原性に関しては、O抗原群に関する前述のような疫学的な面、ならびに主として本菌の宿主の腸内細菌叢や感染防御機構に対する抵抗性との関係²⁵⁾、侵襲性²⁶⁾、起炎性や内毒素など、種々の角度からの解析・検討がなされている^{1,4,7,9-11,13,17,19,24,27,28,36,37,41-43,45,46,49-51)}。それらの研究のほかに、最

近は本菌の産生する enterotoxin その他の易熱性または耐熱性の毒素およびそれらを支配する plasmid などが、本菌の病原性との関連において重要な役割をもつことが注目され、活発に研究が進められている^{3, 5, 33, 35, 42, 46, 49}。

一方、*E. coli* による鶏への種々の人工感染実験においては、血管内、気嚢内あるいは腹腔内接種以外では、死亡例や肉眼病変が現われにくいといわれる^{9, 18, 34, 43}。

従来、当研究室では鶏のMG感染症とその混合感染に対する薬剤による予防・治療に関する一連の研究²⁰⁻²²)を行ってきた。それらの研究における基礎的検討の一環として、上記疾病の *in vivo* での実験法を確立する為に、村田ら²¹)はさきに感染実験用MG株の初生ヒナに対する virulence とその実験方法について報告した。それに続いて、村田、江副ら⁶)はまた同様の目的で初生ヒナに対するMGおよび *E. coli* による実験的混合感染における起病性、病像等についても検討を行っている。

今回の実験では、さらに以上の研究と同様の目的ならびに鶏大腸菌症に関する基礎実験の一部として、それらの実験に用いられた *E. coli* TK 18 - A 株の初生ヒナに対する単独実験感染における virulence を、種々の角度から検討した。

材料と方法

供試ヒナ：エンヤ株式会社由来、ハバード系ブロイラー専用種の雄初生ヒナ（鶏痘、マレック病ワクチン接種済）200羽を購入して、餌付前に体重37g前後のものを140羽抽出し、実験に供した。

飼料：船橋農場製のブロイラー肥育前期用飼料（抗コクシジウム剤添加、抗菌剤無添加）を使用した。

ヒナ飼育法：試験全期間を通し平面式金網床育雛器を用い、2週令までは35℃前後で保温飼育し、それ以降4週令までは室温で飼育した。また飼料および飲水は自由摂取（不断給与）とした。

供試菌：供試菌は農林水産省家畜衛生試験場佐藤静夫博士から分与を受けたもので、ブロイラーの大腸菌症、気嚢由来 *E. coli* (O群2)、菌株TK 18 - Aで、1964年に佐藤ら⁴⁰)により分離されたものである。

接種菌液調製法および人工感染法：最初に供試菌のトリプトソイブイオン培地（栄研）、20時間培養（元培養菌液）を、MG接種の場合と条件を同一にする為に、Freyの液体培地^{32, 39})（基礎培地：Mycoplasma broth base, Pfizer社、抗菌剤無添加）を用いて、20倍希釈し、以後10倍段階希釈して所定の接種菌液を調製した。そして元培養菌液を $2 \times 10^2 \sim 10^7$ 倍希釈したものの0.4 ml/ヒナを、供試ヒナの右後胸部気嚢内に、皮下用1/4注射針を用いて接種した。

実験群別：実験ヒナは1群20羽とし、下記の7群を設定した。

各群ヒナへの接種菌数は、第1群： 5.4×10^5 CFU*、第2群： 5.4×10^4 CFU、第3群： 5.4×10^3 CFU、第4群： 5.4×10^2 CFU、第5群： 5.4×10 CFU、第6群： 5.4×1 CFU、および第7群：非接種対照とした。

観察項目：毎日、各群ヒナの臨床症状を観察し、死亡ヒナについては死亡発見直後、また試験終了時まで生残したヒナについては試験終了時に殺し（ただし生残ヒナ羽数の多かった少数菌接種群については、成績陰性の可能性が強いため生残ヒナ中10羽を無作為抽出殺した）、剖検した。また1週ごとに各群ヒナの平均増体量、飼料摂取量を測定した。

剖検法：主として肺、心、左右後胸部気嚢、肝、脾について肉眼病変の有無や *E. coli* 分離について調べた。*E. coli* 分離法としては、肺、肝、脾については臓器小片を、心は心血を、気嚢は左右別個に滅菌脱脂綿小片（タンボン）で内面をぬぐい、それらをマッコンキー寒天培地（栄研）に塗抹した。

肉眼病変判定法：肉眼病変⁵³)判定の規準および記録の方法は下記のとおりとした。

1) 心では主として線維素性心膜炎の程度により、2) 気嚢では膜の肥厚、混濁およびチーズ様滲出物等による気嚢炎の程度により、3) 肝では主として線維素性肝包膜炎、壊死巣、出血等の程度により、4)

* Colony forming unit.

肺・脾では炎症、出血、硬変（大きさ、色調、硬度、弾力）等の病変の程度により、それぞれ弱度：+、中等度：++、強度：+++とした。

なお、病変陰性の場合は、全て“-”とした。

E. coli 分離判定法：各臓器からの *E. coli* 分離成績は、20 時間分離培養後、培地上の集落所見が明らかに接種菌とみられる発育集落数を、下記の基準により判定記録した。

0：“-”，1～20：+，21～50：++，50<：+++。

成 績

ヒナ臨床症状：全群試験全期間を通して、死亡以外は、呼吸器症状ならびに頸部捻転・脚麻痺等の特異な臨床症状はみられなかった。

ヒナ死亡率：Table 1 および Fig. 1 にみられるとおり、菌接種された第 1～6 群（ $10^5 \sim 1$ CFU 接種）

Table 1. Progressive observation on death of chick inoculated with *E. coli* into the air sac.

Group of chicks		1	2	3	4	5	6	7
Inoculum size (5.4 X, CFU)		10^5	10^4	10^3	10^2	10	1	Non-infected control
Age in weeks of chicks	1 ¹⁾	11 ²⁾	13					
	2	7	3	6	3			
	3		2	4	2	1		
	4	1			3		1	
	5			1				
	6	1		1				
	7							
Total No. of dead chicks		20	18	12	8	1	1	0
%		100 ³⁾	90	60	40	5	5	
1	8							
	9							
	10		1					
	.							
	.							
2	14		1					
	Total No. of dead chicks			2	0	0	0	0
	%			10				
3	15							
	.							
4	.							
	28							
Total No. of dead chicks				0	0	0	0	0
Total No. of dead chicks		20	20	12	8	1	1	0
%		100	100	60	40	5	5	

1) Days post inoculation. 2) Number of dead chicks.

3) Percentage mortality for number of chicks examined.

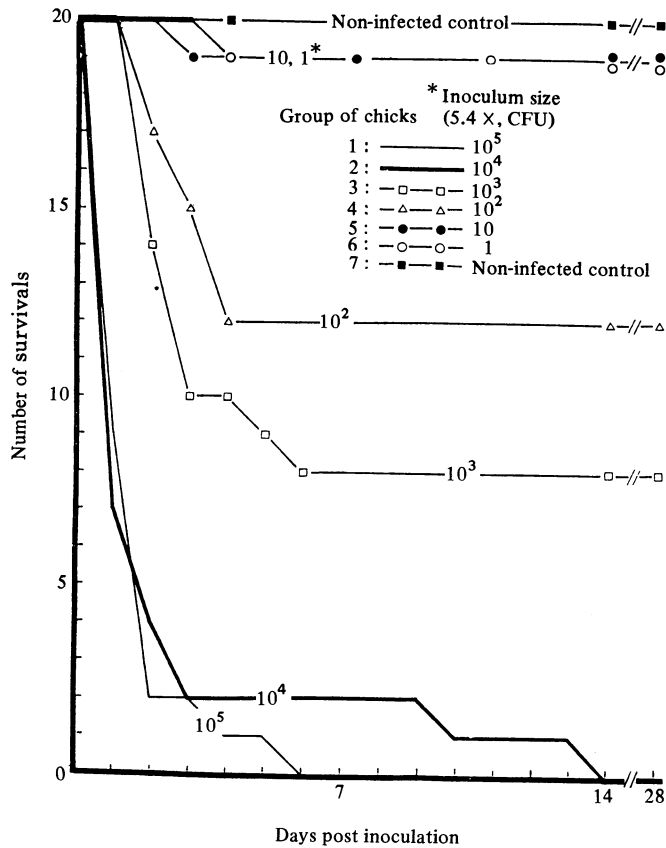


Fig. 1. Mortality curve of chicks in the each group inoculated with *E. coli* into the air sac.

に至る各群ヒナの死亡は主に感染後7日以内にみられ、例外的に第2群 (10^4 CFU 接種) において10および14日後に1例ずつの死亡がみられた。各ヒナ群の死亡率は、第1群 (接種菌数: 10^5 CFU) および第2群 (同: 10^4 CFU) で100%, 第3群 (同: 10^3 CFU) で60%, 第4群 (同: 10^2 CFU) で40%, 第5群 (同: 10 CFU) および第6群 (同: 1 CFU) で5%, 非接種対照の第7群では0%であった。各ヒナ群の死亡率から、BEHRENS-KÄRBERの方法⁴⁷⁾により今回の実験条件下での供試菌のLD₅₀は $5.4 \times 10^{2.4}$ CFUと算定された。接種菌数10 CFU以下の群では死亡率は極めて低く、また接種菌数が減少するに従い、ヒナの死亡のピークがやや遅延する傾向がみられた。

ヒナ平均増体量、平均飼料摂取量および飼料要求率: それらの成績は、Table 2, Fig. 2 に示した。試験全期間における各群ヒナの平均増体量については、40%のヒナが生残した第3群が、接種菌数がそれ以下のヒナ群よりも概略110~130 g 少なかった。一方、第4~7群の各群相互間では、平均増体量に有意差がみられず、LD₅₀の菌数を境にして明確な差が認められた。飼料要求率に関して第4~7群各群相互間の成績を比べると、接種菌数の最も多い第4群が最高値を示した。

Table 2. Weight gain, food intake, and feed conversion of chicks in the each group through experimental period.

Group of chicks	Inoculum size (5.4 X, CFU)	Mean weight of chicks ¹⁾ (g)	Mean weight gain of chicks (g)	Mean food intake (g)	Feed conversion
1	10 ⁵	* 37.0	*	*	*
2	10 ⁴	* 36.2	*	*	*
3	10 ³	666.9 37.7	629.4	981.2	1.56
4	10 ²	781.7 36.6	745.9	1190.5	1.60
5	10	773.7 37.3	736.3	1136.4	1.54
6	1	800.0 37.0	762.9	1144.1	1.50
7	Non-infected control	765.3 37.4	727.8	1111.1	1.53

1) The upper indicates the mean weight of chicks on 4 weeks of age, and the lower indicates the mean weight of day-old chicks at inoculation.

* All of chicks died within 2 weeks post inoculation.

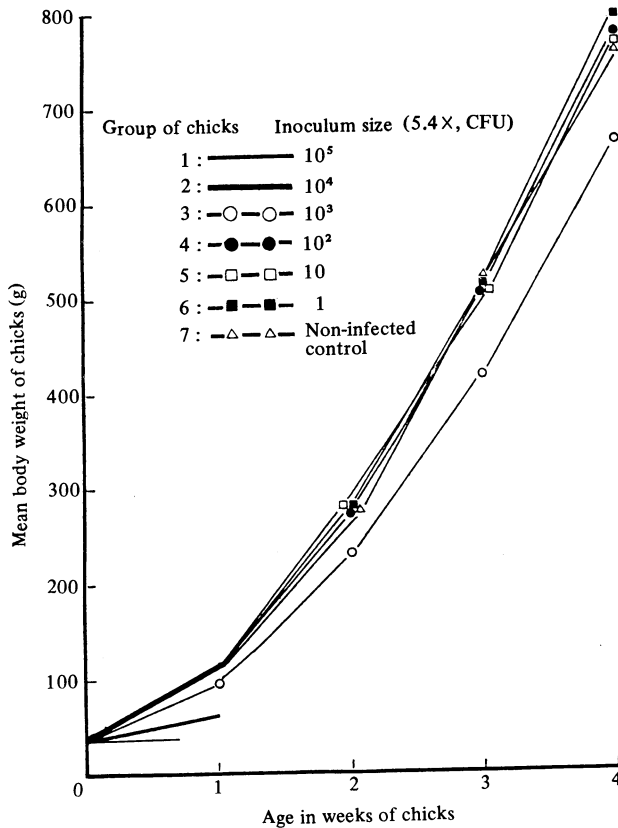


Fig. 2. Growth curve of chicks in the each group inoculated with *E. coli* into the air sac.

ヒナ肉眼病変出現率：各ヒナ群の試験全期間における肉眼病変出現率は、Table 3 に示したとおりである。

第1群のヒナにおいては、菌接種側右気嚢での病変出現率が78.9%で、他臓器でのそれに比べて最も高く、次いで肺：68.4%，左気嚢：57.9%，心：21.1%，肝：5.7%の順であった。

Table 3. Gross lesion score of chicks in the each group through experimental period.

Group of chicks	Inogulum size (5.4 X, CFU)	Number of chicks examined	Lung	Air sac		Heart	Liver	Spleen
				Left	Right			
1	10 ⁵	19 ¹⁾	68.4 ²⁾	57.9	78.9	21.1	5.3	0
2	10 ⁴	20	100	65.0	95.0	40.0	10.0	0
3	10 ³	20	50.0	40.0	50.0	60.0	10.0	0
4	10 ²	20	30.0	20.0	35.0	20.0	0	0
5	10	11 ³⁾	9.1	0	0	0	0	0
6	1	11 ³⁾	9.1	0	0	9.1	0	0
7	Non-infected control	10 ³⁾	0	0	0	0	0	0

1) A chick was not examined for the reason of its severe decomposition.

2) Positive ratio (%): Number positive/number examined of chicks.

3) As a high possibility that the negative results will be obtained in the group of chicks inoculated with a small number of the organisms was expected, ten out of chicks survived up to 4 weeks post inoculation were sampled at random in the group.

第2群ヒナでの病変出現率は、肺が100%で最も高く、次いで右気嚢：95%，左気嚢：65%，心：40%，肝：10%の順であった。なお、腺胃に点状出血 (Fig. 3) が3例みられた。

第3群のヒナにおいては、第1、2群に比べて全般に病変の程度や出現率は低かった。しかし、気嚢炎、チーズ様滲出物、線維索性心膜炎および線維索性肝包膜炎等の顕著な病変がみられ (Fig. 4, 5)，特に線維索性心膜炎の出現率は60%で、各ヒナ群を通して最も高かった。また、少数例に腺胃周辺脂肪の点状出血、十二指腸に斑状出血がみられた (Fig. 6, 7)。

第4群ヒナでの病変出現率は、右気嚢が35%で最も高く、次いで肺：30%，左気嚢および心：20%の順であり、肝には病変がみられなかった。第4群は、第1～3群に比べて明らかに病変出現率が低かった。

第5、6群ヒナでの病変出現率は、第6群で線維索性心膜炎が1例みられた以外は、殆ど病変はみられなかった。

非接種対照の第7群での病変出現率は、全例陰性であった。

各ヒナ群の試験全期間における肉眼病変出現率を部位別にまとめてみると、剖検実施ヒナ全例において最も病変出現率の高かった部位は、肺および右気嚢で、次いで左気嚢、心、肝の順で、脾は全例陰性であった。また、各培養部位を通して、肉眼病変出現率と接種菌数とはほぼ比例する傾向がみられ、接種菌のLD₅₀の前後で病変出現率の差が顕著にみられた。

各ヒナ群を通して、菌接種後1～2日までに早期死亡したヒナにおけるよりも、それ以後に死亡したヒナにおいて気嚢、心および肝に強度な病変がみられた。一方、4週令まで生残したヒナでは、殆ど病変はみられなかった。

なお、今回の実験において顕著な肉眼病変がみられたヒナ臓器についての病理組織学的検討^{9,45,46,52-54}の結果は、下記のとおりである。

気嚢においては、漿液滲出を伴う急性滲出性炎 (Fig. 8)，または漿液・線維索性滲出、中皮細胞の増殖、偽好酸球・組織球浸潤等の亜急性滲出性炎が認められた。肺においては、呼吸性細気管支内の漿液滲出・上皮細胞の軽度の腫大を伴う肺水腫 (Fig. 9)，または気管支肺炎が認められた。心においては、漿液滲出、充血等の急性滲出性心膜炎、心外膜の浮腫 (Fig. 10)，または漿液・線維索性滲出、偽好酸球・組

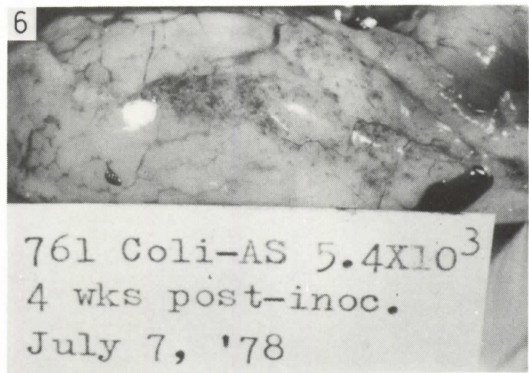
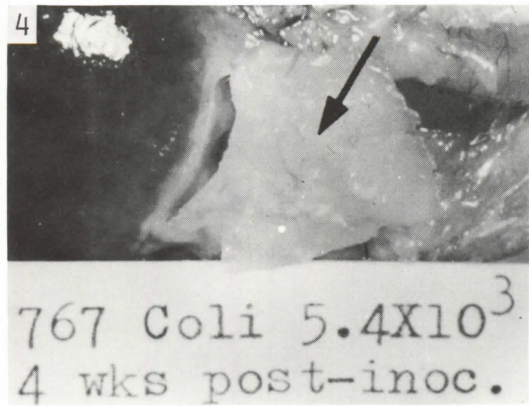


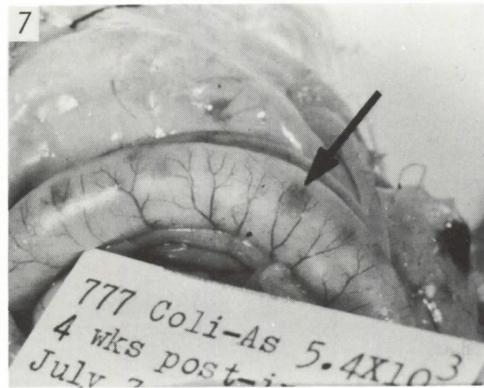
Fig. 3. Petechiae in the proventriculus of a day-old chick died within 24 hours post inoculation with 5.4×10^4 CFU of *E. coli* strain TK18-A.

Fig. 4. An enormous caseous exudate appeared in the air sac of a 4-week-old chick killed 4 weeks post inoculation with 5.4×10^3 CFU of *E. coli* strain TK18-A.

Fig. 5. Caseous exudates (arrow) and fibrinous pericarditis and perihepatitis in a 5-day-old chick died 5 days post inoculation with 5.4×10^3 CFU of *E. coli* strain TK18-A.

Fig. 6. Petechiae in the adipose tissue of the proventriculus of a 4-week-old chick killed 4 weeks post inoculation with 5.4×10^3 CFU of *E. coli* strain TK18-A.

Fig. 7. Ecchymoses in the duodenum of a 4-week-old chick killed 4 weeks post inoculation with 5.4×10^3 CFU of *E. coli* strain TK18-A.



織球浸潤を伴う亜急性性滲出性心膜炎 (Fig. 11) が認められた。肝においては、類洞の拡張・漿液浸潤、肝細胞の変性・壊死、クッパー細胞の菌貪食 (Fig. 12) を伴う急性肝炎 (Fig. 13), またはクッパー細胞の腫大が認められた。肝包膜においては、漿液滲出性の肝包膜炎、または漿液・線維素性滲出、偽好酸球・組織球浸潤を伴う漿液・線維素性肝包膜炎 (Fig. 14) が認められた。小腸においては漿液性漿膜炎 (Fig. 15) がみられた。

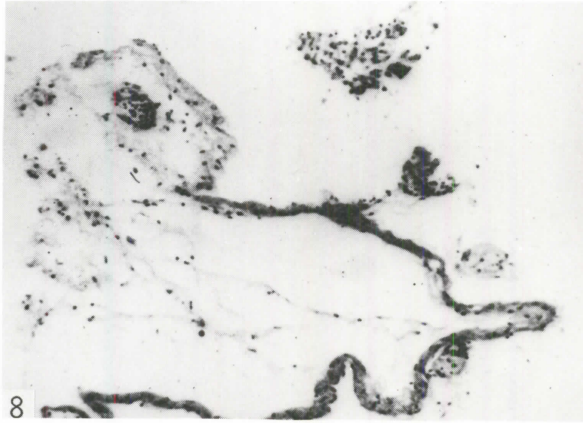


Fig. 8. Edema in the air sac of a day-old chick died within 24 hours post inoculation with 5.4×10^5 CFU of *E. coli* strain TK18-A. H & E stain, $\times 116$.

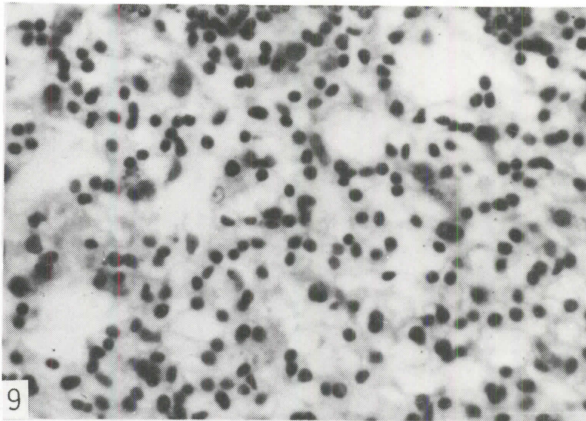


Fig. 9. Swelling of epithelium of the air capillary in the lung of a 5-day-old chick died 5 days post inoculation with 5.4×10^3 CFU of *E. coli* strain TK18-A. H & E stain, $\times 464$.



Fig. 10. Edema in the pericardium of a day-old chick died within 24 hours post inoculation with 5.4×10^5 CFU of *E. coli* strain TK18-A. H & E stain, $\times 116$.

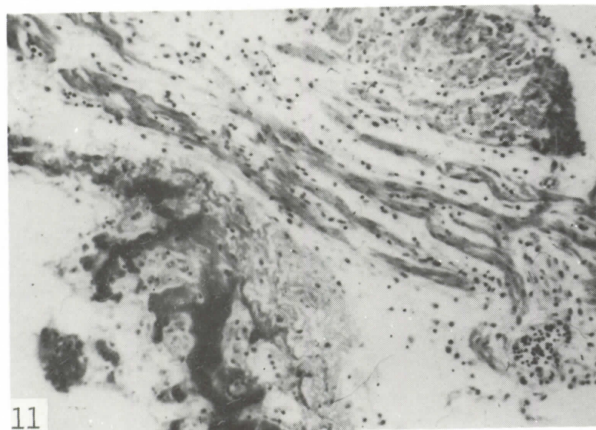


Fig. 11 Sero-fibrinous pericarditis of a 5-day-old chick died 5 days post inoculation with 5.4×10^3 CFU of *E. coli* strain TK18-A. H & E stain, $\times 116$.

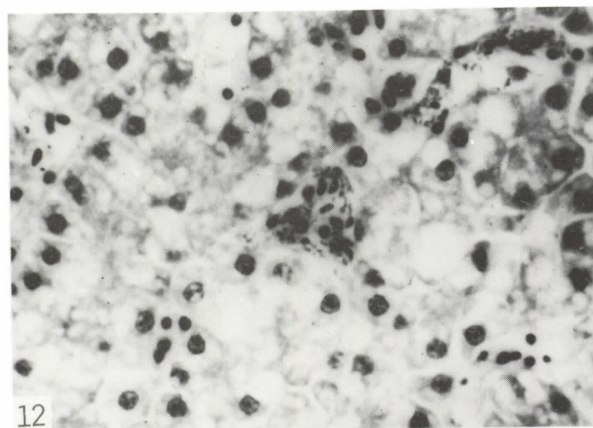


Fig. 12. Engulfed bacteria in Kupper cells in the liver of a day-old chick died within 24 hours post inoculation with 5.4×10^3 CFU of *E. coli* strain TK18-A. H & E stain, $\times 464$.

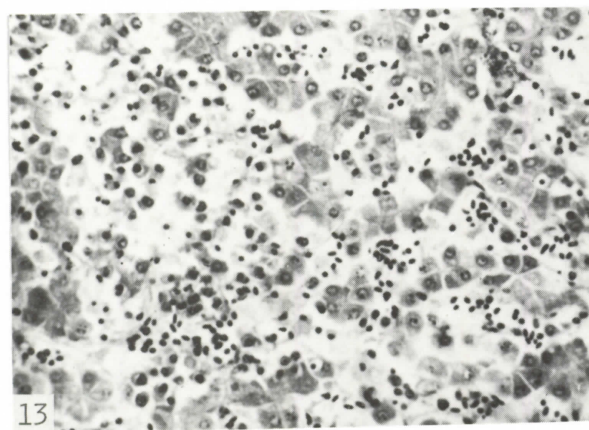


Fig. 13. Focal necrosis and bacterial masses in the liver of a 2-week-old chick died 2 weeks post inoculation with 5.4×10^4 CFU of *E. coli* strain TK18-A. H & E stain, $\times 232$.

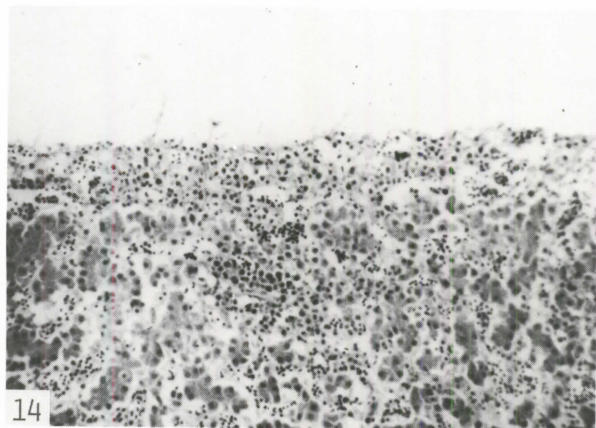


Fig. 14. Sero-fibrinous perihepatitis of a 2-week-old chick died 2 weeks post inoculation with 5.4×10^4 CFU of *E. coli* strain TK18-A. H & E stain, x116.

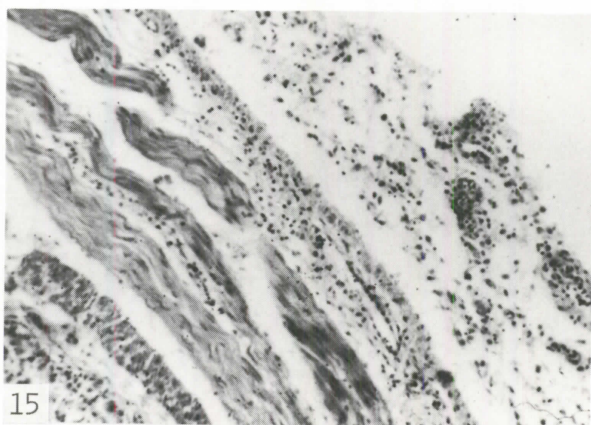


Fig. 15. Serous serositis of the small intestine of a 5-day-old chick died 5 days post inoculation with 5.4×10^4 CFU of *E. coli* strain TK18-A. H & E stain, x116.

以上のような顕著な病変がみられたヒナについては、同時に脾、ファブリキウス嚢、腹膜等においても、細胞・組織の変性、壊死等の病変が認められた。

E. coli 分離率：第1～4群の死亡ヒナの培養臓器全例から *E. coli* が分離された。また4週令まで生

Table 4. Recovery of *E. coli* from organs of chicks in the each group through experimental period.

Group of chicks	Inoculum size ($5.4 \times$, CFU)	Number of chicks examined	Lung	Air sac		Heart blood	Liver	Spleen
				Left	Right			
1	10^5	19 ¹⁾	100 ²⁾	100	100	100	100	100
2	10^4	20	100	100	100	100	100	100
3	10^3	20	80.0	65.0	70.0	70.0	65.0	65.0
4	10^2	20	45.0	40.0	40.0	40.0	40.0	45.0
5	10	11 ³⁾	9.1	9.1	9.1	0	9.1	0
6	1	11 ³⁾	9.1	9.1	9.1	9.1	9.1	9.1
7	Non-infected control	10 ³⁾	10,0	0	0	0	0	10.0

1) A chick was not examined for the reason of its severe decomposition.

2) Positive ratio (%): Number positive/number examined of chicks.

3) As a high possibility that the negative results will be obtained in the group of chicks inoculated with a small number of the organisms was expected, ten out of chicks survived up to 4 weeks post inoculation were sampled at random in the group.

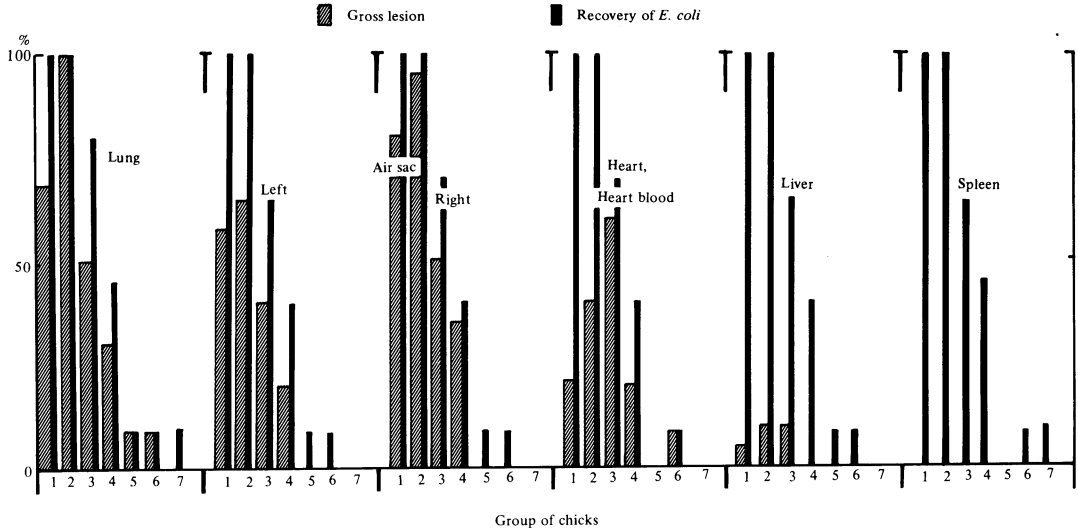


Fig. 16. Gross lesion score and recovery of *E. coli* of chicks in the each group through experimental period.

残したヒナでは、殆ど *E. coli* は分離されなかった。

Table 4 に示したとおり、剖検実施ヒナ全例において最も *E. coli* 分離率の高かったヒナ部位は肺で、次いで右気嚢および脾、左気嚢、心血および肝の順に低下した。また、ヒナの各培養部位を通して、*E. coli* 分離率と接種菌数とはほぼ比例する傾向がみられた。

一方、各ヒナ群を通しての肺および左右気嚢における肉眼病変出現率と *E. coli* 分離率とは、ほぼ平行する傾向がみられた (Fig. 16)。

考 察

今回の実験において、接種菌数に比例してヒナの死亡率が高いこと、ヒナの死亡は殆どが菌接種後 7 日以内にみられたこと、また死亡ヒナの殆ど全例から *E. coli* が分離されたが、生残ヒナからは殆ど分離されなかったことなどから、ヒナの死亡は主として *E. coli* の高度感染による重篤な急性敗血症に起因するものと思われる。

接種菌数の少ない群では接種菌数の多い群に比べヒナの死亡のピークがやや遅延する傾向がみられたが、この事は接種菌がヒナ体内で感染増殖し、ヒナの死を来すまでの時間の差によるものと思われる。

微生物の病原性を知る上で、ひとつの指標とされているものに LD_{50} があげられるが、各ヒナ群の死亡率から BEHRENS-KÄRBER⁴⁷⁾ の方法により、供試菌株の LD_{50} は $5.4 \times 10^{2.4}$ CFU と算定された。なお、 LD_{50} 以下の菌数を接種した第 5～7 群では死亡率が極めて低く、それら各群間の死亡率には有意差が認められなかった。これらの少数菌接種群では、ヒナは感染に抵抗し、回復生残したものと思われる。

一方、各ヒナ群の成長 (平均増体量、飼料要求率) についてみた場合、第 1～4 群のように早期における急性死亡例が多く、生残ヒナが少なかった群もあるので、各群全体を一律に比較することは困難である。しかし 40% 以上のヒナが生残した第 3～7 群の各群相互間でヒナの成長について比較した場合、第 3 群と他の 4 群との間に平均増体量についての有意差がみられた。また、平均増体量では各群相互間で有意差がみられなかった第 4～7 群の中でも、第 4 群 (10^2 CFU 接種) の飼料要求率が最も高かった。

以上のことから、接種菌数が 10CFU 以下の場合には、1 例の死亡しかみられず殆どヒナに対して影響がないものと思われる。

なお、第 4 群 (10^2 CFU 接種) では、40% の死亡率がみられたにもかかわらず、それよりも死亡率がずっと低かった第 5～7 群との間で、肉眼病変出現率、*E. coli* 分離率および前述の生残ヒナの増体量を比べても、それらの間では有意差がみられなかった。この事から、第 4 群における死亡ヒナと生残ヒナとの差

はヒナの個体差によるものと言えよう。

剖検実施ヒナ全例において、肉眼病変が認められた臓器は肺、左右気嚢、心および肝である。接種菌数と肉眼病変出現率とはほぼ比例したこと、*E. coli* 分離率と肉眼病変出現率とが主として肺および左右気嚢において平行していることなどから、病変は *E. coli* 感染によるものと考えられる。

これらの病変のみられた臓器の代表的なものについて、病理組織学的にも検討を行った。一般に、細菌感染による全身性疾病は、原因菌の種類、毒性、経過等によって毒素性、滲出性および増殖性の炎症病変に区別されている^{11,12,16,44,46)}。本実験におけるヒナの病変を総括してみると、それらの特徴は、肝およびファブリキウス嚢では変性の変化が、また漿膜では増殖性の変化がみられたが、全体として滲出性炎症が主体の病相であると言えよう。以上の所見は、従来記載されている鶏大腸菌症の病理組織学的所見とよく一致するものである^{9,15,54)}。

剖検実施ヒナ全例における *E. coli* 分離率は、肺において最大で、次に右気嚢および脾、心血、肝および左気嚢の順であった。また菌接種後1～2日までに早期に急性死亡したヒナにおいては肺および気嚢に顕著な病変が多数みられたが、それ以降に死亡したヒナにおいては肺および気嚢より、むしろ心および肝に顕著な病変が現われる傾向がみられた。そして、供試菌 10^3 CFUを接種した第3群ヒナにおいては、第3群ヒナにおけるよりも多数の菌を接種した第1および2群ヒナにおけるよりも、心に顕著な病変が多数みられ、その出現率は全ヒナ群を通してみても、また第3群ヒナの各臓器を通してみても、いずれの場合も最高を示した。

以上のことから、*E. coli* 増殖または感染の重篤度に伴って、気嚢、心嚢、肝という経路で病変が進行していったものと考えられる。このようなことから、接種菌数、菌増殖および病変の進行等と死亡経過との間には密接な関係のあることが知られる。以上のことは、*E. coli* 人工感染実験について従来から知られている成績^{3,6,9,10,18,37)}とよく一致するものである。

また今回の *E. coli* 単独感染実験における死亡率、チーズ様滲出物を伴った気嚢炎、線維索性心膜炎および線維索性肝包膜炎などの肉眼病変の成績は、さきに村田・江副ら⁶⁾により行われた初生ヒナの MG・*E. coli* 混合感染実験における成績とはほぼ一致している。それ故、初生ヒナに対する MG・*E. coli* 混合感染実験における急性、致死性の重篤な病像は、両接種菌のうちの主として *E. coli* の起病性によるものと理解される。

一方、今回の実験において認められた心冠脂肪、腺胃および十二指腸等に見られた点状出血などの顕著な病変は、いずれも接種 *E. coli* による典型的な病変と思われる。

以上述べてきたとおり、今回の実験に供試した *E. coli* TK18-A株は、気嚢内接種により初生ヒナに対しかなり高度な病原性をもつものと思われる。

また、供試菌のLD₅₀は、単に死亡率のみならずその他の観察項目との間に密接な関係をもち、供試菌の病原性を表わす極めて有意義な指標を示しているものと言えよう。以上のことは当に供試菌の 10^2 CFUの接種菌数が、ヒナに影響を及ぼしうるか否かの境界にあることを示しており、LD₅₀の意味が極めて明確に示されたものと言える。なお、本菌株のAID₅₀とLD₅₀の菌数はほぼ同一とみられた。

以上のことから、今回の供試菌株、感染経路、ならびに適切な菌数を用いることにより、当初目的とした初生ヒナを用いての *in vivo* における *E. coli* 単独または MG・*E. coli* 混合人工感染による実験を行うことができ、今後種々の関係薬剤についての、*in vivo*での薬効試験等の実験系として役立つものと思われる。

要 約

鶏呼吸器性マイコプラズマ病に関する基礎的検討の一環として、本病の一実験感染系確立の為に、さきに著者ら(1980)²¹⁾は *M. gallisepticum* (MG) 1RF株を用いて、今回と同様な実験を行った成績について報告した。今回は鶏大腸菌症の原因ならびにMG感染症の混合感染菌として重要な、*E. coli* の気嚢内人工感染による初生ヒナに対する virulence の程度を知る目的で本実験を行った。

E. coli TK18-A株 (O群2) 液体培養の10倍段階希釈 ($5.4 \times 10^{0-5} / 0.4 \text{ ml}$) を、ブロイラー初生ヒナ (雄) の右後胸気嚢内に接種し、4週間観察した。各実験群20羽宛のヒナにつき、臨床症状、増体量、飼料要求率、病理変状、各臓器からの *E. coli* 分離等の項目につき検討し、下記の成績が得られた。

1) 全群呼吸器症状はみられず、各群ヒナの死亡は主に感染後7日以内にみられ、例外的に10及び14日後1例ずつの死亡がみられた。菌接種0～ 10^5 CFU各群の死亡率は、それぞれ0, 5, 5, 40, 60, 100, 100%であった。供試菌のLD₅₀は $5.4 \times 10^{2-4}$ CFUであり、接種菌10CFU以下では死亡率は極めて低く、また接種菌数が減少するに従い、死亡時期がやや遅延する傾向がみられた。2) 増体量・飼料要求率については、早期死亡例が多く、各群間の比較は困難であった。40%のヒナが生残した 10^3 CFU菌接種群とそれ以下の菌接種群での成長曲線では、 10^3 CFU菌接種群が最低を示した。3) 肉眼病変出現率と接種菌数とはほぼ平行する傾向がみられ、LD₅₀以上の菌接種群で病変陽性の傾向がみられた。気嚢病変は菌接種側で高率にみられた。 10^3 CFU菌接種死亡例で顕著な病変が多数みられた。気嚢病変は、 10^{2-5} CFU菌接種群にみられた。4) 以上の病変は、病理組織学的にも、全体的に滲出性の炎症病相が主体で、従来記載の大腸菌性敗血症病変とよく一致した。5) *E. coli* 分離率は接種菌数とほぼ平行し、 10^{4-5} CFU菌接種群死亡例では100%で、大部分のヒナは典型的な急性敗血症とみられた。6) 本菌株のAID₅₀とLD₅₀の菌数はほぼ同一とみられた。

謝 辞

供試菌株の分与ならびに種々御助言を賜った佐藤静夫博士 (農林水産省家畜衛生試験場)、および病理組織学的検討について御協力を賜った前田稔博士 (同上、鶏病支場) に深謝する。また、終始協力を頂いた当教室大学院生、田丸正司君に感謝する。

本研究の一部は、第87回日本獣医学会 (1979年4月) で口頭発表した。

文 献

- 1) 天野恒久, 植竹久雄, 福見秀雄 (編) : 岩波講座, 現代生物科学, 11, ウイルス・細菌とその感染症, 岩波書店, 東京 (1975).
- 2) 安藤敬太郎: 鶏のマイコプラズマ病, pp. 595-609, *In* 越智勇一 (監修): 最新家畜伝染病, 南江堂, 東京 (1970).
- 3) BUXTON, A. and FRASER, G. : *Animal microbiology*, Vol. 1, pp. 93-102, Blackwell Scientific Publ., Oxford (1977).
- 4) 腸管感染研究会 (編) : 感染モデルの組み方, 近代出版, 東京 (1973).
- 5) DORNER, F. : *Escherichia coli* enterotoxin, purification and partial characterization, pp. 242-251, *In* SCHLESSINGER, D. (ed.): *Microbiology-1975*, Am. Soc. Microbiol., Washington, D.C. (1975).
- 6) 江副伸介: *Mycoplasma gallisepticum* と *Escherichia coli* の実験的混合感染による初生ヒナに対する病原性について, 広島大学水畜産学部卒業論文 (1978).
- 7) FINKELSTEIN, R. A. : Pathogenic mechanisms in bacterial diseases, pp. 103-340, *In* SCHLESSINGER, D. (ed.): *Microbiology-1975*, Am. Soc. Microbiol., Washington, D.C. (1975).
- 8) GRAEVENITZ, A. V. : The Role of opportunistic bacteria in human disease, *Annu. Rev. Microbiol.*, **31**, 447-471 (1977).
- 9) GROSS, W. B. : Colibacillosis, pp. 321-330, *In* HOFSTADT, M. S., CALNEK, B. W., HELMBOLDT, C. F., REID, W. M. and YODER, H. W. Jr. (eds.): *Diseases of poultry*, 7th ed., Iowa State Univ. Press, Ames, Iowa (1978).
- 10) 橋本和典: 鶏の大腸菌症, 鶏病研報, **8**, 13-20 (1972).

- 11) 飯島宗一(編) : 岩波講座, 現代生物科学, 12, 炎症と生体防御, 岩波書店, 東京 (1976).
- 12) 今井環(編) : 新病理学提要 (大野章三創著), 南江堂, 東京 (1970).
- 13) INGRAM, P. L. : Some factors influencing the response of young domesticated animals to *Escherichia coli*, In TAYLOR, J. (ed.) : Microbial behaviour, 'in vivo' and 'in vitro', Fourteenth Symposium of the Society for General Microbiology, Cambridge Univ. Press, London (1964).
- 14) JACKS, T. M. and GLANTZ, P. J. : Virulence of *Escherichia coli* serotypes for mice, *J. Bacteriol.*, **93**, 991-995 (1967).
- 15) JUBB, K. V. F. and KENNEDY, P. C. : Pathology of domestic animals, Vols. 1 and 2, 2nd ed., Acad. Press, New York (1970).
- 16) 川喜田愛郎 : 感染論, 岩波書店, 東京 (1964).
- 17) 甲野禮作, 水谷裕迪 (訳) : 感染症-感染と免疫のしくみ, 講談社, 東京 (1979) [MIMS, C. A. : The pathogenesis of infectious disease, Acad. Press, London, Grune & Stratton, New York (1976)].
- 18) 三浦四郎 : 鶏の大腸菌症, 獣医界, 第113号, 17-28 (1978).
- 19) MOON, H. W. : Pathogenesis of enteric diseases caused by *Escherichia coli*, *Adv. Vet. Sci. Comp. Med.*, **18**, 179-211 (1974).
- 20) 村田昌芳 : 鶏マイコプラズマ症の抗生物質による予防, 治療に関する最近の見聞-特に *Mycoplasma gallisepticum* 及び大腸菌による, 単独または混合実験感染ヒナを用いた実験成績を中心として-, 家畜の耐性菌研究会報, 第1号, 16-21 (1980).
- 21) 村田昌芳, 藤井英明, 矢野真二, 三谷克之輔, 徳永三則 : *Mycoplasma gallisepticum* 1RF株の気嚢内人工感染による初生ヒナに対する virulence について, 広大生物生産紀要, **19**, 69-84 (1980).
- 22) 村田昌芳, 梶川道治, 国安主税, 吉田佳充 : 1969~1971年に分離された *Mycoplasma gallisepticum* の主な抗生物質感受性, 広大生物生産紀要, **19**, 55-68 (1980).
- 23) 中谷林太郎, 坂崎利一 (訳) : 腸内細菌同定法, 一成堂, 東京 (1964) [EDWARDS, P. R. and EWING, W. H. : Identification of enterobacteriaceae, Burgess Publ. Co., Minneapolis, Minn. (1962)].
- 24) 波岡茂郎 : 腸内細菌科, pp. 270-290, In 平戸勝七 (編) : 獣医微生物学, 養賢堂, 東京 (1964).
- 25) NAMIOKA, S. and MURATA, M. : Studies on the pathogenicity of *Escherichia coli*. II. The effect of a substance obtained from pseudoeosinophils of rabbits on the organism, *Cornell Vet.*, **52**, 289-296 (1962).
- 26) NAMIOKA, S., MURATA, M. and SAKAZAKI, R. : Studies on pathogenicity of *Escherichia coli* an observation on virulence of *Escherichia coli* for mice treated with wetting agent, *Jpn. J. Med. Sci. Biol.*, **14**, 11-20 (1961).
- 27) 波岡茂郎, 坂崎利一 : 家畜の大腸菌症, pp. 383-398, In 越智勇一 (監修) : 最新家畜伝染病, 南江堂, 東京 (1970).
- 28) NAMIOKA, S., URUSHIDO, M. and SAKAZAKI, R. : *Escherichia coli* isolated from transmissible gastro-enteritis in pigs, *Jpn. J. Med. Sci. Biol.*, **11**, 141-151 (1958).
- 29) NIVAS, S. C., PETERSON, A. C., YORK, M. D., POMEROY, B. S., JACOBSON, L. D. and JORDAN, K. A. : Epizootiological investigation of colibacillosis, *Avian Dis.*, **21**, 514-530 (1977).
- 30) 尾田進, 鍋谷政広, 鶴巻藤太郎, 熊倉紘 : プロイラー養鶏場に発生したヒナの大腸菌症, 鶏病研報, **13**, 23-27 (1977).
- 31) OGAWA, H., NAKAMURA, A. and SAKAZAKI, R. : Pathogenic properties of "enteropathogenic" *Escherichia coli* from diarrheal children and adults, *Jpn. J. Med. Sci. Biol.*, **21**, 333-349 (1968).
- 32) OLSON, N. O. : *Mycoplasma synoviae* infection, pp. 261-270, In HOFSTADT, M. S., CALNEK, B. W., HELMBOLDT, C. F., REID, W. M. and YODER, H. W. Jr. (eds.) : Diseases of poultry, 7th ed.,

Iowa Univ. Press, Ames, Iowa (1978).

- 33) 大橋誠, 善養寺浩: 大腸菌エンテロトキシン, 日細菌誌, **32**, 455-468 (1977).
- 34) PIERCY, D. W. T. and WEST, B. : Experimental *Escherichia coli* infection in broiler chickens, course of the disease induced by inoculation via the air sac route, *J. Comp. Pathol.*, **86**, 203-210 (1976).
- 35) RICHARDS, K. L. and DOUGLAS, S. D. : Pathophysiological effects of *Vibrio cholerae*, enterotoxigenic *Escherichia coli* and their exotoxins on eucaryotic cells, *Microbiol. Rev.*, **42**, 592-613 (1978).
- 36) 坂崎利一: 腸内細菌, pp. 523-579, *In* 福見秀雄, 牛場大蔵, 三橋進, 山本正 (編): 病原微生物学, 細菌編, 改訂第2版, 医学書院, 東京 (1966).
- 37) 佐藤静夫: 鶏の大腸菌症, 一大腸菌性敗血症を中心として一, 動生協会会報, **10**(4), 1-15 (1977).
- 38) 佐藤静夫: 鶏のマイコプラズマ症, 日獣会誌, **30**, 421-430 (1977).
- 39) 佐藤静夫: *Mycoplasma synoviae* 感染症, 鶏病研報, **15**, 1-12 (1979).
- 40) SATO, S., NONOMURA, I. and HASHIMOTO, K. : *Escherichia coli* serotypes isolated from chickens infected with *Mycoplasma gallisepticum*, *Natl. Inst. Anim. Health Q. (Jpn.)*, **12**, 63-68 (1972).
- 41) SMITH, H. and PEARCE, J. H. (eds.) : Microbial pathogenicity in man and animals, Twenty-second Symposium of the Society for General Microbiology, Cambridge Univ. Press, London (1972).
- 42) SMITH, H. W. : The exploitation of transmissible plasmids to study the pathogenesis of *Escherichia coli* diarrhoea, pp. 227-242 (with the additional 5 pages of photographs), *In* SKINNER, F. A. and CARR, J. G. (eds.) : Microbiology in agriculture, fisheries and food, Acad. Press, London (1976).
- 43) SOJKA, W. J. and CARNAGHAN, R. B. A. : *Escherichia coli* infection in poultry, *Res. Vet. Sci.*, **2**, 340-352 (1961).
- 44) 竹内正, 飯島宗一, 笹野伸昭, 田中健蔵, 濱島義博, 林秀男, 渡辺五郎, 西塚泰章: 最新病理学, 文光堂, 東京 (1977).
- 45) TAYLOR, J., WILKINS, M. P. and PAYNE, J. M. : Relation of rabbit gut reaction to enteropathogenic *Escherichia coli*, *Br. J. Exp. Pathol.*, **42**, 43-52 (1961).
- 46) THOMSON, R. G. : General veterinary pathology, W. B. Saunders Co., Phila. London, Toronto (1978).
- 47) 東京大学医科学研究所学友会 (編): 細菌学実習提要, 改訂5版, 丸善, 東京 (1977).
- 48) YODER, H. W. Jr. : *Mycoplasma gallicepticum* infection, pp. 236-250, *In* HOFSTADT, M. S., CALNEK, B. W., HELMBOLDT, C. F., REID, W. M. and YODER, H. W. Jr. (eds.) : Diseases of poultry, 7th ed., Iowa State Univ. Press, Ames, Iowa (1978).
- 49) 善養寺浩, 工藤泰雄 (訳): 大腸菌と感染症, 近代出版, 東京 (1976) [COOKE, E. M. : *Escherichia coli* and man, Churchill Livingstone, New York, (1974)].
- 50) ACRES, S. D. (ed.) : Proceedings, Second International Symposium on Neonatal Diarrhea, Oct. 3-5, 1978, Univ. of Saskatchewan, VIDO (Vet. Inf. Dis. Org.), Saskatoon, Saskatch. (1979).
- 51) WILLINGER, H. and WEBER, A. (eds.) : *Escherichia coli* infections in domestic animals, Proceedings of the symposium held during the XII International Congress of Microbiology in Munich on Sept. 3-8, 1978, Advances in Veterinary Medicine, No. 29, P. Paurey, Hamburg and Berlin (1979).
- 52) 榎本真, 林裕造, 田中寿子 (編): 実験動物の病理組織—その検査法と観察の要点—, pp. 221-234 ほか, ソフトサイエンス社, 東京 (1980).
- 53) 堀内貞治, 川村斉, 関令二 (編): 鶏病図説, pp. 187-211, 437-454, 日本畜産振興会, 東京 (1968).
- 54) CHEVILLE, N. F. and ARP, L. H. : Comparative pathologic findings of *Escherichia coli* infection in birds, *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, **173**, 584-587 (1978).

SUMMARY

The present experiments were performed to investigate the virulence of *E. coli* strain TK18-A⁴⁰ (O-group 2) induced artificially into the air sac of day-old chicks. This was done with the further purpose to establish an experimental system using chicks for fundamental experiments on the efficacy *in vivo* of the antibacterial agents that control the avian colibacillosis and the avian respiratory mycoplasmosis complicated with *E. coli*.

The inocula of 0.4 ml/chick of ten-fold serial dilutions of broth culture were artificially induced into the right posterior thoracic air sac of day-old male broiler chicks, and these chicks were observed during 4 weeks. The experimental groups were designed as groups of 20 chicks each, 6 groups included a non-infected control and 5 infected groups. The inoculum sizes of the organisms of the chicks ranged from 5.4×1 to 10^5 CFU* in 5 dilutions of the broth culture. The following results were obtained.

1) No clinical symptoms were observed except that some chicks died. Death of the chicks was mostly observed within 7 days post inoculation, exceptionally 2 chicks only died 10 and 14 days post inoculation. Mortalities in the group of chicks inoculated with 0– 10^5 CFU were 0, 5, 5, 40, 60, 100 and 100%, respectively. The LD₅₀ of the organisms was determined as being $5.4 \times 10^{2.4}$ CFU. A remarkably low mortality was observed in the chicks inoculated with organisms less than 10 CFU. A delaying tendency of the lethal period of the chicks was noticed in accordance to the decrease of the number of organisms inoculated.

2) As a large number of chicks died in the early stage of the experiments, it was difficult to determine a comparison of weight gain and feed conversion for the chicks of each group. In the groups of chicks inoculated with 10^3 or less CFU of the organisms, 40% or more survived ratios were observed. In comparison of the growth curve of these groups, the group inoculated with 10^3 CFU of the organisms showed the lowest curve.

3) An almost parallel tendency was observed between the gross lesion score and the inoculum size of the organisms. The positive tendency of the gross lesion score was investigated in the group of chicks inoculated with a number larger than LD₅₀ of the organisms. An higher gross lesion score was observed on the inoculated side of the air sac of chicks. A large number of severe lesions was observed in chicks that had died after inoculation of 10^3 CFU of the organisms. Air sac lesions were observed in the group of chicks inoculated with 10^2 – 10^5 CFU of the organisms.

4) The major finding observed in the histopathological examination of chicks was generally an exudative inflammatory manifestation. These findings were similar to those of the septicemic avian colibacillosis described by many workers.

5) The recovery ratio of the organisms ran mostly parallel with the number of the inoculated organisms. One hundred percent ratios were observed in 2 groups of chicks inoculated with 10^4 – 10^5 CFU of the organisms. It was considered that most cases of the dead chicks were due to coli-septicemia.

6) The AID₅₀ of the organisms in the present experimental conditions was estimated as almost the same number (CFU) of the organisms as that of the LD₅₀.

* Colony forming unit.