

# 15 肉用鶏の *Enterococcus cecorum* による化膿性脊椎炎

中央家畜保健衛生所

寺山 好美・前田 将誌

*Enterococcus cecorum* (EC)は、グラム陽性球菌で鶏の腸内細菌叢のひとつであり、健康な馬、牛、豚、犬、カナリア、鳩および七面鳥等からの分離が報告されている<sup>8)</sup>。ECは肉用鶏や肉用鶏種鶏で心膜炎、肝被膜炎、脊椎炎および大腿骨頭壊死を引き起こし、死亡率上昇や跛行を呈す enterococcal spondylitis (ES) の原因菌として知られ、2002年にオランダ、スコットランドで初発生が確認されて以降、ヨーロッパ、アメリカ、アフリカおよびアジアの各地で発生がみられ、損害が大きい新興感染症として注目されている<sup>1, 4, 6, 7, 12)</sup>。しかし、国内での報告は少ないため<sup>2, 11)</sup>、国内の実態については不明な点が多い。今回、長崎県内の複数の肉用鶏飼養農場において、脚弱や起立不能を呈し死亡・淘汰羽数が増加する事例が発生し、1事例については脊椎病変部からECが分離された。そこで、国内で発生したEC感染症についての知見を提供するべく、県内発生事例で確認された病理組織学的検査および分離株の分子疫学解析を実施したので報告する。

## 1 発生状況

令和4年2月以降、県内3戸4農場の肉用鶏飼養農場において、共通して脚弱を呈し死亡・淘汰羽数の増加が認められたため病性鑑定を実施した(表-1)。発地域は県中央部、北部、南部とさまざまであり、飼養羽数は35,000~146,000羽で、1鶏舎での発生が多いものの3鶏舎で発生がみられた症例もあった。症状を確認してから病性鑑定を実施するまでの期間の死亡・淘汰率は1.0%~12.0%であった。鶏種は全

てチャンキーで導入元は同一会社であったが、種鶏の飼養農場は全て異なっていた。

表-1 県内肉用鶏農場における発生状況

	症例1	症例2	症例3	
発地域	県中央部	県北部	県南部	県南部
農場	A農場	B農場	C-1農場	C-2農場
発年月日	R4.2.7	R4.2.10	R4.10.3	R4.10.21
発生日齢	27日齢	31日齢	12日齢	24日齢
病性鑑定日齢	34日齢	43日齢	37日齢	31日齢
飼養羽数	146,000羽 (8鶏舎)	35,000羽 (3鶏舎)	72,700羽 (10鶏舎)	72,600羽 (5鶏舎)
発生鶏舎羽数	18,250羽 (1鶏舎)	10,700羽 (1鶏舎)	各9,600羽 (3鶏舎)	15,000羽 (1鶏舎)
飼養形態	セミアウトウレス	開放	アウトウレス	開放
期間死亡率*	3.6%	12.0%	3.3~4.8%	1.0%
備考			C-1、2農場間の距離は400m 飼養管理者は同一	

\*症状確認日から病性鑑定までの死亡・淘汰率

## 2 病性鑑定

### (1) 解剖検査および病理組織学的検査

症例1~3の各症例から、鶏2~3羽(31~43日齢)の計9羽(No. 1~9)の解剖検査実施後、主要臓器、器官および第6胸椎病変部について、10%中性緩衝ホルマリン液で固定後、定法に従いパラフィン包埋切片を作製して、ヘマトキシリン・エオジン(HE)染色およびBrown-Hopps法によるグラム染色を実施した。

### (2) 細菌学的検査

9羽の主要臓器および脳、4羽(No. 6~9)の第6胸椎病変部について、5%馬血液寒天培地(日水製薬)およびDHL寒天培地(日水製薬)を用いて好気培養で細菌検索を実施し、分離菌はラピッドID32ストレップアピ(バイオメリュウ・ジャパン社)により同定した。

3羽(No. 6~8)の第6胸椎病変部分離されたEC4株を用いて、大倉らの報告<sup>13)</sup>に基づき制限酵素 *Sma*I を用いたパルスフィールドゲル電気

泳動 (pulsed-field gel electrophoresis ; PFGE) 解析による遺伝子型別検査を実施した。さらに同株を用いて、Borst らの報告<sup>3)</sup>で発症鶏由来株に特徴的に認められた遺伝子領域のうち4遺伝子 (*wzx*, *cas3*, *virB4*, *lip*) を検出するマルチプレックス PCR 検査を実施した。4羽 (No. 5~8) から分離された EC 4株の薬剤感受性試験として、アンピシリン (ABPC)、アモキシシリン (AMPC)、オキシテトラサイクリン (OTC)、オフロキサシン (OFLX)、ノルフロキサシン (NFLX)、エンロフロキサシン (ERFX) について、ミューラーヒントン培地 (日本ベクトン・ディッキンソン社) および5%馬血液寒天培地を用いて1濃度ディスク拡散法 (BD センシ・ディスク、日本ベクトン・ディッキンソン社) により実施した。

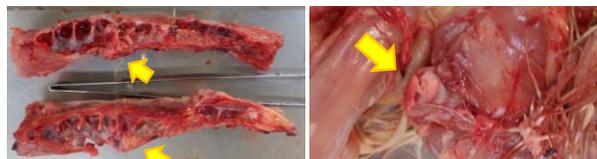
### 3 成績

#### (1) 解剖検査および病理組織学的検査

発症鶏9羽は共通して両脚を前に伸ばして開脚姿勢をとり、起立不能を呈していた。剖検所見では、6羽 (No. 4~9) で第6胸椎の膨隆が認められたほか、1羽 (No. 5) で大腿骨頭の脆弱化が認められた (写真-1、表-2)。



<開脚姿勢で起立不能を呈する鶏 (症例3)>



<第6胸椎椎体の膨隆 (症例2)>

<第6胸椎椎体の膨隆 (症例2)>

写真-1 外貌および剖検所見

病理組織学的検査では、9羽中8羽 (No. 1~8) に共通して第6胸椎椎体部に出血を伴う膿瘍が形成され、椎体構造は破壊され膨隆し、同部位の胸髄を圧迫していた (写真-2)。関節軟骨には出血や炎症細胞を伴う亀裂が確認され、亀裂部や膿瘍周辺部には線維素に取り囲まれた多数のグラム陽性球菌が認められた (写真-3)。

一部の軟骨領域では、炎症細胞を伴わず細菌塊が認められ、軟骨細胞の変性がみられる領域もあった。膿瘍周囲の骨髓腔には、多数の好中球や線維芽細胞の浸潤や線維性結合組織の増生が認められ、破骨細胞の増数および骨組織の吸収像も認められた。圧迫された胸髄は粗しょう化し、軸索の膨化が多発していた。その他、3羽 (No. 1~3) で化膿性心膜炎、3羽 (No. 3、4、8) で化膿性気管炎が認められたほか、5羽 (No. 1~5) の大腿骨頭や足関節にごく軽度から軽度の化膿性骨髓炎および化膿性関節炎が確認された (表-2)。

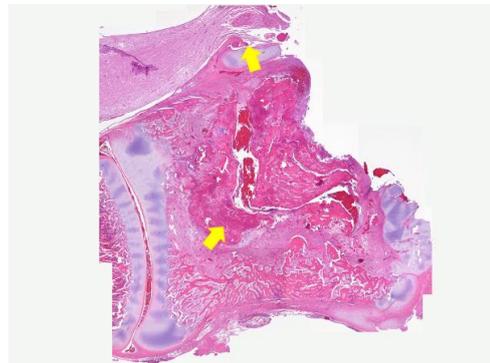


写真-2 第6胸椎椎体部に膿瘍形成、脊髄圧迫

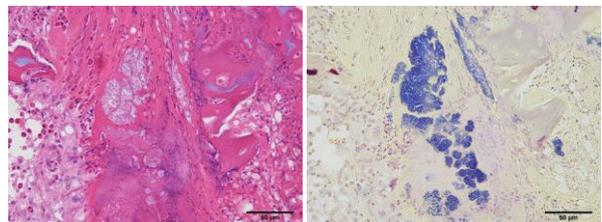


写真-3 膿瘍周辺部のグラム陽性球菌

表-2 剖検所見および病理組織学的所見

	症例1		症例2		症例3				
	A農場			B農場		C-1農場		C-2農場	
	No.1	No.2	No.3	No.4	No.5	No.6	No.7	No.8	No.9
剖検所見									
大腿骨頭の脆弱化	-	-	-	-	+	-	-	-	-
第6胸椎の膨隆	-	-	-	+	+	+	+	+	+
組織所見									
化膿性心膜炎	+	+	+	-	-	-	-	-	-
化膿性気管炎	-	-	+	+	-	-	-	+	+
大腿骨頭の化膿性骨髓炎	NT	NT	NT	NT	+	NT	NT	NT	NT
足関節の化膿性関節炎	+	±	±	+	+	NT	NT	NT	NT
第6胸椎にグラム陽性球菌を伴う化膿性骨髄炎	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	+

病変の強度:- (病変なし), ± (きわめて軽度), +(軽度), ++ (中等度), +++ (高度), NT (検査未実施)

#### (2) 細菌学的検査

1羽 (No. 5) の肝臓および脾臓、3羽 (No. 6~8) の第6胸椎病変部から EC が分離された。なお、分離菌4株の薬剤感受性試験では、全ての株が ABPC、AMPC に感受性を示し、OTC、NFLX 耐性が確認された (表-3)。

表-3 細菌検査および薬剤感受性試験成績

	症例1			症例2		症例3			
	A農場			B農場		C-1農場		C-2農場	
	No.1	No.2	No.3	No.4	No.5	No.6	No.7	No.8	No.9
細菌分離成績									
肝臓	-	-	-	-	EC	-	-	-	-
脾臓	-	-	-	-	EC	-	-	-	-
腎臓	-	-	-	-	-	-	-	-	-
心臓	-	-	-	-	-	-	-	-	-
肺	-	-	-	-	-	-	-	-	-
脳	-	-	-	-	-	-	-	-	-
第6胸椎病変部	NT	NT	NT	NT	NT	EC	EC	EC	-
薬剤感受性試験成績									
ABPC	NT	NT	NT	NT	S	S	S	S	NT
AMPC	NT	NT	NT	NT	S	S	S	S	NT
OTC	NT	NT	NT	NT	R	R	R	R	NT
OFLX	NT	NT	NT	NT	I	S	I	I	NT
NFLX	NT	NT	NT	NT	R	R	R	R	NT
ERFX	NT	NT	NT	NT	I	R	R	R	NT

EC: *E. coli*, -: 分離陰性, NT: 検査未実施  
 ABPC: アンプシリン, AMPC: アモキシシリン, OTC: オキシテトラサイクリン, OFLX: オフロキサシン, NFLX: ノルフロキサシン, ERFX: エンロフロキサシン  
 判定結果: S(感性), I(中間), R(耐性)

No. 6～8由来のEC 4株のPFGE解析では、症例3のC-1農場の3株 (No. 6、7由来株) は同一パターンを示し、C-2農場の1株 (No. 8由来株) とは異なるパターンを示したもののそのパターンは非常に類似していた (写真-4)。

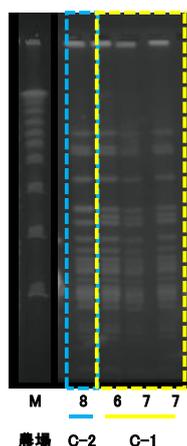


写真-4 PFGE解析

発症鶏由来株に特徴的に認められた4遺伝子を検出する遺伝子検査では、EC 4株は全て莢膜合成関連遺伝子 (*wzx*) およびIV型分泌機構関連遺伝子 (*virB4*) を保有していた。

#### 4 考察

今回検査した3症例において、全症例に共通して第6胸椎にグラム陽性球菌を伴う化膿性脊椎炎が認められ、症例3で脊椎病変部からECが分離されたことから、ECによる化膿性脊椎炎と診断された。他の2症例については、主要臓器からECが分離された個体が確認されたものの、脊椎病変部からの細菌分離を実施しておらず、確定診断には至らなかった。

EC感染症は菌血症から心膜炎、肝被膜炎等の

病変を呈した後、脊椎病変に移行するという病態をとり<sup>9)</sup>、EC感染症の発症鶏では早くも1週齢で腸管内にECのコロニーが形成されるとともに、この時期から遅くとも3週齢までには菌血症に至ることが報告されている<sup>5)</sup>。加えて、同時期から自由胸椎である第6胸椎において離断性骨軟骨症 (osteochondritis dissecans, OCD) が生じることでEC感染症が引き起こされるとされている<sup>5)</sup>。本症例においても、胸椎の関節軟骨において出血や炎症細胞ならびに多数のグラム陽性球菌を伴う亀裂が確認されたことから、OCDを発症していたと考えられ、OCDがEC感染症の発症要因のひとつであることを裏付けていた。

分離菌の薬剤感受性試験では、ペニシリン系薬剤に感受性を示し、テトラサイクリン系、ニューキノロン系薬剤に耐性傾向を示した。発症鶏由来のECは、エリスロマイシン (EM)、TC、OTCおよびERFXに対して薬剤耐性を示すことが報告されており<sup>4)</sup>、本症例の成績と一致していた。本病の対策として薬剤投与が有効と考えられるものの、脊椎に病変を形成した後では治療効果が見込めないものと推察され、敗血症期における投薬でも効果がみられなかった報告もあり<sup>11)</sup>、有効な治療方法については、さらなる検討が必要と考えられた。

PFGE解析結果から、症例3の2農場では導入元農場は異なっていたものの、株間の疫学的な関連性が示唆された。このことは、何らかの要因により発生鶏舎から他の鶏舎へECが持ち込まれ、その後PFGEパターンが変化する遺伝的な変異イベントが起こった株が疾病の発症に寄与したことが推察された。分離株は、既報で発症鶏由来株に特徴的に認められた4遺伝子のうち、*wzx*および*virB4*を保有していることが判明した。しかしながら、本遺伝子が発症鶏由来株に特徴的に認められる遺伝子であるかを特定するにはさらなる調査が必要である。今後も症例を蓄積し、発症鶏由来株のPFGE解析等をすすめ、EC感染症の発生予防につなげていきたい。

## 5 参考文献

- (1) Aitchison, H *et al.* : Enterococcal-related vertebral osteoarthritis in South African broiler breeders : a case report. *J S Afr Vet Assoc.* 85(1), 1-5 (2014)
- (2) 有吉理佳子ら : *Enterococcus cecorum* によるブロイラーの化膿性脊椎炎. *鶏病研報* 59, 69-74(2023)
- (3) Borst, L.B. *et al.* :Comparative genomic analysis identifies divergent genomic features of pathogenic *Enterococcus cecorum* including a type IC CRISPR-Cas system, a capsule locus, an epa-like locus, and putative host tissue binding proteins. *PLOS ONE.* 10(4):e01214294 (2015)
- (4) Borst, L.B. *et al.* :Molecular epidemiology of *Enterococcus cecorum* isolates recovered from enterococcal spondylitis outbreaks in the southeastern United States. *Avian Pathol.* 41, 479-485 (2012)
- (5) Borst, L.B. *et al.* :Pathogenesis of enterococcal spondylitis caused by *Enterococcus cecorum* in broiler chickens. *Vet. Pathol.* 54, 61-73 (2017)
- (6) Devriese, L.A. *et al.* : *Enterococcus cecorum* septicemia as a cause of bone and joint lesions resulting in lameness in broiler chickens. *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift.* 71, 219-221 (2002)
- (7) Herdt, P.D. *et al.* : *Enterococcus cecorum* osteomyelitis and arthritis in broiler chickens. *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift,* 78(1), 44-48(2009)
- (8) Jung, A. *et al.* :Comparison of pathogenic and non-pathogenic *Enterococcus cecorum* strains from different animal species. *BMC Microbiology.* 17:33 (2017)
- (9) Jung, A. *et al.* :Comprehensive report of an *Enterococcus cecorum* infection in a broiler flock in Northern Germany. *BMC Vet. Res.* 10, 311(2014)
- (10) Kense, M. J *et al.* : *Enterococcus cecorum* infections in broiler breeders and their offspring: *molecular epidemiology.* *Avian Pathol.* 40, 603-512(2011)
- (11) 黒田萌黄ら : 宮崎県内のブロイラーに発生した *Enterococcus cecorum* 感染症. *鶏病研報* 59, 75-79(2023)
- (12) Laurentie, J. *et al.* :Comparative genome analysis of *Enterococcus cecorum* reveals intercontinental spread of a lineage of clinical poultry isolates. *ASM mSphere.* 8(6):e00495-22 (2023)
- (13) Okura, M. *et al.* : Genotypic diversity of *Streptococcus suis* and the *S. suis*-like bacterium *Streptococcus ruminantium* in ruminants. *Vet. Res.* 50, 94 (2019)