

## ***Fusobacterium necrophorum* subsp. *funduliforme* および *Arcanobacterium pyogenes* のマウス実験感染における共力作用**

田中慶康<sup>1)</sup>・新城敏晴<sup>2)</sup>・三澤尚明<sup>3)</sup>・後藤義孝

宮崎大学農学部家畜微生物学講座

<sup>1)</sup> 現在所属：中外医科学研究所鎌倉センター（元家畜微生物学講座）

<sup>2)</sup> 宮崎大学名誉教授（元家畜微生物学講座）

<sup>3)</sup> 獣医公衆衛生学講座

(2006年1月25日 受理)

### **Pathogenic synergy between *Fusobacterium necrophorum* subsp. *funduliforme* and *Arcanobacterium pyogenes* in an experimental mouse model**

Noriyasu TANAKA<sup>1)</sup>, Toshiharu SHINJO<sup>2)</sup>, Naoaki MISAWA<sup>3)</sup> and Yoshitaka GOTO

Department of Veterinary Microbiology, Faculty of Agriculture, University of Miyazaki

<sup>1)</sup> Chugai Medical Science Institute, Kamakura Center

<sup>2)</sup> University of Miyazaki Emeritus Professor

<sup>3)</sup> Department of Veterinary Public Health

**Summary :** Synergism *in vivo* between *Fusobacterium necrophorum* subsp. *funduliforme* and *Arcanobacterium pyogenes* that are co-isolated from bovine liver abscess and heifer mastitis was investigated in three groups of two mono-infections and one mixed infection groups consisting of 5 mice each. Mortality rate in the cases of *F. necrophorum* subsp. *funduliforme* mono-infection, *A. pyogenes* mono-infection and mixed sample infections was 0 % (0/5), 0 % (0/5) and 100 % (5/5), respectively. Liver abscess formation rate in the three groups was 40 % (2/5), 20 % (1/5) and 100 % (5/5), respectively. Bacteria were recovered from one liver of an *F. necrophorum* subsp. *funduliforme* infected mouse, from two livers and one spleen, kidney and lung of an *A. pyogenes* infected mouse and from all livers, spleens, kidneys and lungs of mixed infection group. It was suggested that there was synergism between *F. necrophorum* subsp. *funduliforme* and *A. pyogenes* *in vivo*.

**Key words :** Synergism, *Fusobacterium necrophorum* subsp. *funduliforme*, *Arcanobacterium pyogenes*,  
Mouse experimental infection

#### 緒言

*Fusobacterium necrophorum* の亜種の一つで、弱病原性の *F. necrophorum* subsp. *funduliforme* は牛の肝膿瘍や未経産牛乳房炎において、*Arcanobacterium pyogenes* その他の菌と混在し

て分離されることが多い（新城 1981, 1986）。ここでは *F. necrophorum* subsp. *funduliforme* とともに高い頻度で分離される *Arcanobacterium pyogenes* と本菌の混合菌液をマウスに接種して、肝膿瘍形成における両菌の共力作用を調べた。

## 材料と方法

### 使用菌株

牛肝膿瘍由来の2菌株, *F. necrophorum* subsp. *funduliforme* Fn 45 (=JCM3717) と *Arcano-bacterium pyogenes* CP 2 の2株を供試し, 各単独接種群および混合菌液接種群の3群とし, マウスはICR系の体重30 g前後の♂および♀を各5匹使用した。

### 接種菌液の調製

BPY培地 (Shinjo, et al. 1981) で37°C, 24時間培養した菌液を単独接種の時はそのまま, 両株の混合接種の時はその半量を混合して, 予め酸素不含炭酸ガスを充填し, ブチルゴム栓で密栓した小試験管に移して3,000 rpm, 20分間遠心した。その上清を捨て, 煮沸急冷したPBSで元の量に戻し, 酸素不含炭酸ガスを30秒間試験管空気相に噴射して密栓後, 転倒混合したものを接種菌液とした。

### マウス門脈内接種

マウスはソムノペンチール (ピットマン・ムーア社) を腹腔内接種 (50 mg/kg) し, 仰臥位で保定し, 腹部を外科手術に準じて剃毛, 消毒した後, 正中を切開した。ランセットを装着して門脈を露出し, 0.05 mlの菌液 (各群の接種生菌数はTable 3に表示) を接種し, アロンアルファA (三共) で止血し, 縫合, 閉腹して, 麻酔から覚醒するまで温浴槽に浮かせたケージ内で保温した。また, 必要に応じてエーテルを追加吸入麻酔薬として使用した。接種前および接種後の体重測定は毎朝9時前後に行った。

### マウスの剖検および細菌学的検査

実験期間中死亡したマウスはその都度, 生残したマウスは菌接種7日後に頸椎脱臼により屠殺し, 剖検した。膿瘍を形成している肝臓は膿瘍を含む肝臓を, 形成のない肝臓は正常部を秤量後ホモジナイズして10倍階段希釈を行い, 定法通りに定量培養を行った。また, 脾臓, 腎臓および肺は寒天平板培地にスタンプして定性的に菌を回収した。

### 組織学的検査

肝臓, 脾臓, 腎臓および肺を10%ホルマリン

で固定, パラフィン包埋, 薄切を行い, ヘマトキシリンエオジン染色して観察した。また, 必要に応じてアザン染色, グラム染色も実施した。

## 結果

### マウスの臨床症状および剖検所見

*F. necrophorum* subsp. *funduliforme* と *A. pyogenes* の単独接種および両菌株の混合接種を行った3群の死亡率および肝膿瘍形成率をTable 1に示した。単独接種例では7日間の観察期間中斃死するものはなく, 若干の元気消失がみられただけであったが, 混合菌液接種例では全てのマウスが著しい体重減少をきたし, 接種5~7日後に死亡した。肝膿瘍は*F. necrophorum* subsp. *funduliforme* 接種群で2匹, *A. pyogenes* 接種群で1匹, 混合菌液接種群では全例に形成された。単独接種例では小膿瘍形成であったが, 混合菌液接種例では全葉に膿瘍が多発し, 膿瘍は自壊して腹膜炎を併発した。これらの例では脾腫が認められた (Table 2)。

感染マウスからの接種菌の分離成績は, 混合菌接種群では肝臓から, *F. necrophorum* subsp. *funduliforme* が  $1.0 \times 10^7 \sim 1.3 \times 10^{10}/g$ , *A. pyogenes* が  $2.2 \times 10^8 \sim 7.2 \times 10^9/g$  と高い菌数で, また脾臓, 腎臓および肺のすべてから両菌種が分離されたが, *F. necrophorum* subsp. *funduliforme* 単独接種群では5例中1例の肝臓のみから, *A. pyogenes* 単独接種群では5例中2例の肝臓およびその中の1例の肝臓, 脾臓, 腎臓および肺から菌が回収された (Table 3)。

組織学的検査においては, *F. necrophorum* subsp. *funduliforme* 接種群では全例の肝臓 sinusoid 内に白血球が多数認められ, 小細胞浸潤巣

Table 1. Death and liver abscess formation among three groups of experimentally infected mice

Bacterial inoculum	Number of mouse	Number of died mouse (%)	Number of with liver abscesse (%)
Fnf*	5	0(0)	2(40)
Ap**	5	0(0)	1(20)
Fnf+Ap	5	5(100)	5(100)

\*Fnf: *Fusobacterium necrophorum* subsp. *funduliforme*

\*\*Ap: *Arcanobacterium pyogenes*

Table 2. Body weight, liver abscess formation and splenomegaly among three groups of experimentally infected mice

Bacterial inoculum	Mouse No.	Body weight		Liver abscess formation	Splenomegaly
		Initial	Final		
Fnf*	1	30	31	+	+++
	2	34	34	-	+
	3	30	30	+	+++
	4	32	32	-	+
	5	32	30	-	+
Ap**	6	32	31	-	-
	7	30	29	-	-
	8	32	27	+	+++
	9	33	32	-	++
	10	31	30	-	+
Fnf+Ap	11	34	28	+	++
	12	34	27	+	++
	13	36	26	+	+
	14	38	28	+	++
	15	38	27	+	+

\*Fnf: *Fusobacterium necrophorum* subsp. *funduliforme*\*\*Ap: *Arcanobacterium pvogenes*

Table 3. Liver abscess formation and distributions of inoculated bacteria in organs among three groups of experimentally infected mice

Bacterial inoculum	Mouse No.	Days after inoculation	No. of bacteria (log no. of bacteria/mouse)	Liver abscess formation	Recovery of inoculated bacteria from			
					Liver***	Spleen****	Kidney****	Lung****
Fnf*	1			+	-	-	-	-
	2			-	-	-	-	-
	3	7	8.18	+	6.30	-	-	-
	4			-	-	-	-	-
	5			-	-	-	-	-
Ap**	6			-	-	-	-	-
	7			-	4.20	-	-	-
	8	7	7.04	+	10.15	+	+	+
	9			-	-	-	-	-
	10			-	-	-	-	-
Fnf+Ap	11	6		+	Fnf: 8.90 Ap: 8.90	+	+	+
	12	6		+	Fnf: 9.91 Ap: 9.62	+	+	+
	13	7	Fnf: 7.58 Ap: 7.26	+	Fnf: 10.08 Ap: 9.76	+	+	+
	14	5		+	Fnf: 10.11 Ap: 9.86	+	+	+
	15	6		+	Fnf: 9.00 Ap: 8.30	+	+	+

\*Fnf: *Fusobacterium necrophorum* subsp. *funduliforme*\*\*Ap: *Arcanobacterium pvogenes*

\*\*\*Results of quantitative culture are represented (the numerical value represents log no. of bacteria/g tissue and represents &lt; 2.30/g).

\*\*\*\*Recovery of inoculated bacteria by a direct plating culture is represented (+: positive, -: negative).

が存在した。膿瘍中心部には配列を失った肝細胞と好中球を主とする浸潤細胞が存在し、その外層は結合織層で、それを取り囲むようにマクロファージが配列した。膿瘍中心部には接種菌が認められた。*A. pyogenes*単独接種群では、膿瘍が形成された肝臓でジヌソイド内の多数の白血球の存在と細胞浸潤巣の散在が認められた他には著変は認められなかった。膿瘍は中心に変性した肝細胞と浸潤細胞があり、その周囲にマクロファージが配列した。膿瘍周囲の肝細胞は広域に変性がみられた。混合菌液接種群の肝臓ではジヌソイド内に白血球が多数存在し、マクロファージを主とする大小の細胞浸潤巣が多発した。肝膿瘍は二層で構成され、中心部は無構造で、その外層は変性した肝細胞層であった。白血球は膿瘍中心部周辺と変性した肝細胞層の間を中心に存在したが、層として明確ではなく、結合織もほとんど認められなかった。*F. necrophorum* subsp. *funduliforme*は膿瘍中心部と辺縁に存在し、特に後者において菌が密であった。*A. pyogenes*は肝臓全体に散在し、病変を伴っていないようであった。

## 考 察

嫌気性菌は通性嫌気性菌との混合感染が多く、弱病原性菌も通性嫌気性菌との共生作用により病巣形成に関与することが推測される。牛肝膿瘍や未経産牛乳房炎において弱病原性嫌気性菌である*F. necrophorum* subsp. *funduliforme*が通性嫌気性菌である*A. pyogenes*と混在して分離されることが多い。今回この両菌の共生作用を検討するため、2菌単独および2菌混合のマウス門脈内接種により病原性を比較した。

これまで、*F. necrophorum* subsp. *funduliforme*と*A. pyogenes*との共生作用についての報告はない。*Sorensen* (1980)は被検菌と同一菌種で、強病原性の*F. necrophorum* subsp. *necrophorum*と*A. pyogenes*の共生関係について、*F. necrophorum* subsp. *necrophorum*が*in vitro*で*A. pyogenes*の増殖を促進すると報告した。一方、*Roberts* (1967)は*in vitro*における両菌の共力作用はないと報告した。

*In vivo*では、*Takeuchi et al.* (1984)は*F. necrophorum* subsp. *necrophorum*と*A. pyogene*

*s*をマウスの尾静脈内に接種して調べたところ、共力作用は顕著ではなかったが、膿瘍内で*A. pyogenes*の増殖があったと報告した。今回、マウスにおいて肝膿瘍形成能の弱い*F. necrophorum* subsp. *funduliforme*と、混在菌として頻度の高い*A. pyogenes*の混合菌液をマウスの門脈内に接種した結果、肝膿瘍形成能や主要臓器からの接種菌の回収率は高くなり、*in vivo*における両菌の共力作用が認められた。

*Sorensen* (1980)は*F. necrophorum* subsp. *necrophorum*と*A. pyogenes*の混合感染では前者のexotoxinが食細胞に障害を与えて後者を宿主の防御機構から守ることによって後者の組織への定着、増殖が可能となり、病変をさらに悪化させると報告した。しかし、今回の結果では*F. necrophorum* subsp. *funduliforme*は膿瘍内に、*A. pyogenes*は膿瘍と関係なく臓器全体に散在し、増殖巣は観察できず、*F. necrophorum* subsp. *funduliforme*による*A. pyogenes*の増殖促進効果は確認できなかった。今回はロイコシジン産生能の弱い亜種である*F. necrophorum* subsp. *funduliforme*を用いたために白血球が障害をうけず、白血球が*F. necrophorum* subsp. *funduliforme*を標的細胞として集簇するので、結果的に*A. pyogenes*に対する攻撃が緩和され、そのため*A. pyogenes*は生存を許容されて増殖し、その結果産生された種々のexotoxinによって膿瘍形成が促進されたと考えられた。

混合菌液接種群の肝臓の組織学的観察結果から考察すると、*A. pyogenes*は食食を免れ肝臓全体に存在するが、*F. necrophorum* subsp. *funduliforme*は膿瘍内に局限されており、マクロファージや好中球の標的細胞は*F. necrophorum* subsp. *funduliforme*と考えられた。

## 要 約

牛の肝膿瘍や未経産牛乳房炎から混在して分離される*Fusobacterium necrophorum* subsp. *funduliforme*と*Arcanobacterium pyogenes*のマウスにおける両菌の共力作用を調べた。*F. necrophorum* subsp. *funduliforme*、*A. pyogenes*および混合菌を接種したマウスの死亡率は0% (0/5)、0% (0/5) および100% (5/5)で、肝膿瘍形成率は40% (2/5)、20% (1/5)

および100 % (5/5) であった。肝臓、脾臓、腎臓および肺からの接種菌の回収は*F. necrophorum* subsp. *funduliforme*接種マウスにおいて1例の肝臓から、*A. pyogenes*において2例の肝臓、1例の脾臓、腎臓および肺から、混合菌接種では全例の全ての臓器から回収された。*F. necrophorum* subsp. *funduliforme* と *A. pyogenes* との間にはin vivoで共力作用が認められた。

#### 引用文献

- Roberts, D. S. (1967) The pathogenic synergy *Fusiformis necrophorus* and *Corynebacterium pyogenes*. I. Influence of the leucocidal exotoxin of *F. necrophorus*. Br. J. Exp. Pathol., **48**, 665-673.
- 新城敏晴 (1981) 未経産牛乳房炎に關与する細菌, 未経産牛乳房炎 (幡谷正明 監修), 学窓社, 東京, pp. 73-97.
- 新城敏晴 (1986) 牛の肝膿瘍, 腸内フローラと感染症 (光岡知足編), 学会出版センター, 東京, pp. 161-190.
- Shinjo, T., Yoshitake, M., Kiyoyama, H., and Misawa, N. (1981) Liver abscess production in mice by intraportal injection of *Fusobacterium necrophorum* biovar A strain. Jpn. J. Vet. Sci., **43**, 912-921.
- Sorensen, G. H. (1980) Comparative studies on *Corynebacterium pyogenes* toxin formation in monocultures and mixed cultures. Acta Vet. Scand., **21**, 438-447.
- Takeuchi, S., Nakajima, Y. and Hashimoto, K. (1984) Pathogenic synergism of *Fusobacterium necrophorum* and other bacteria in formation of liver abscess in BALB/c mice. Jpn. J. Vet. Sci., **45**, 775-781.