

Haemophilus somnus感染症に関する臨床的並びに実験的研究

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード: Haemophilus somnus, endotoxin, cattle, Shwartzman reaction, DIC 作成者: 小前, 博文 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/8497

Haemophilus somnus 感染症に関する臨床的並びに実験的研究

金沢大学医学部病理学第一講座 (主任: 中西功夫教授)

小 前 博 文

Haemophilus somnus 感染症の病態を解明するために、野外症例の臨床、病理学的変化を精査し、野外株の菌液およびその内毒素 (lipopolysaccharide, LPS) を調整してウサギに投与し、モデル実験を行った。臨床例のウシ3頭は気温差の著しい季節に、入牧後2ヶ月以内に突然発症し、死亡した。病理所見は血栓性髄膜炎と、病変局所のフィブリン血栓と全身の血管内皮障害であり、これはシュワルツマン反応を示唆した。ウサギのモデル実験における髄膜炎形成率は菌液接種群で1/6、LPS投与群で2/4であった。第一頸髄硬膜下に菌液を接種し、更に耳静脈的にLPSを投与することによって惹起させたモデル実験では、時間単位で病変を形成する臨床例を再現しえた。病理所見は髄膜炎のほか血管内皮細胞障害と播種性血管内凝固に集約された。血液凝固・線溶系の変化はプロトロンビン時間および活性部分トロンボプラスチン時間の反応遅延、フィブリノーゲン、フィブリン/フィブリノーゲン分解産物の増加であり、更にエンドトキシンの増加も確認された。従って、本疾患は常在する本菌が種々の環境因子により、菌体が破壊されエンドトキシンを遊離して血栓性髄膜炎を誘発し、播種性血管内凝固症候群を併発して突発死を引き起こすという病態であることが判明した。

Key words *Haemophilus somnus*, endotoxin, cattle, Shwartzman reaction, DIC

Haemophilus somnus (*H. somnus*) 感染症は、1956年アメリカの Griner ら¹⁾によって初めて報告され、その後カナダ^{2,3)}、ドイツ⁴⁾等で発生が確認されたきわめて重篤なウシの疾患である。国内では、1981年島根県で上野ら⁵⁾、原ら⁶⁾によって報告され、引きつづいて1982年青森県の附田ら⁷⁾の報告より急速に全国に知られるようになった。

この疾患は、放牧中の肉用仔牛や若牛および放牧牛を侵し8~9ヶ月齢の若齢牛で、外気温の高低差が著しい春先や秋口に多発する傾向がみられ、発生は散発的である。症状は、あまり高くない発熱(40.0℃~41.5℃)、元氣消失を示し、突然の運動失調と多くは起立不能、昏睡を呈し甚急性ないし急性に経過、数時間から24時間以内に死の転帰をとり、一般的には予後不良で致死率が高い経済的損失の大きい感染症である。

H. somnus はグラム陰性、短小桿菌で莢膜・線毛を欠き、V-X 因子非要求性、溶血性の性状をもち、ウシに対してのみ、特異的に血栓性髄膜炎を起こす起病菌として知られている。従って、本病はウシに特異的で、しかも突発性のため病態の把握ができないのが現状である。またその組織変化は、細血管のフィブリン血栓と出血および髄膜炎を主徴とするのであるが、特に血栓および血管病変は、局所あるいは全身のシュワルツマン反応と理解され⁸⁾、ヒトにおける播種性血管内凝固症候群 (disseminated intravascular coagulopathy, DIC) に極めて類似しているといわれている。

一方、DIC は抗原-抗体複合体、組織損傷、血管内容血、内毒素、全身過敏症、血流の停滞を招来する各種の基礎疾患に併

発あるいは続発し、重篤な事例では多臓器不全⁹⁾に陥ることが報告されている。また分類された原因疾患頻度の中で、感染症および敗血症に起因するものが20~40%と上位をしめている^{10,11)}。このような感染症にかかる問題は、家畜動物の領域においても菌交代現象、ステロイドホルモン・免疫抑制剤の使用および侵襲の大きな外科手術などによって、感染の機会が増加していることが一因でもある。とりわけ、グラム陰性常在細菌の日和見的発症、敗血症あるいは内毒素血症にともなって発症するDICが本疾患の本態なのかも知れない。

そこで野外で発症した *H. somnus* 感染牛の臨床学的病態ならびに病理学的変化を精査し、分離野外株の菌液および本菌から抽出した内毒素を用い、ウサギにおけるモデル実験を行ない、本感染症の病変修飾を比較観察するとともに、DICを形成する血液凝固・線溶動態について検討しその病態を解析した。

材料および方法

I. 臨床症例

1. 対象

1987年から1989年の3年間の間に、公共放牧場に預託されたホルスタイン種乳用育成牛が、各放牧場で死亡し、家畜保健衛生所において検索された感染牛3頭を対象とした。

2. 方法

1) 細菌学的検査

ベータ・ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド (β -nicotinamide adenine dinucleotide, β -NAD) 添加羊血液加寒天培地

平成5年11月5日受付、平成5年12月16日受理

Abbreviations: APTT, active partial thromboplastin time; β -NAD, β -nicotinamide adenine dinucleotide; BUN, blood urea nitrogen; CFU, colony forming unit; CPK, creatine phosphokinase; DIC, disseminated intravascular coagulopathy; Ent, endotoxin; Fbg, fibrinogen; FDP, fibrin/fibrinogen degradation product; GOT, glutamic oxaloacetic transaminase; GPT, glutamic pyruvic transaminase; *H. somnus*, *Haemophilus*

(heart infusion agar, HIA) に各臓器を塗抹し、5% 炭酸ガス下、37°C で18時間培養した。分離菌の同定は Garcia-Delgado ら¹²⁾の方法に準じた。

2) 病理学的検査

死亡牛は病理解剖学的に肉眼観察を行ない、諸臓器を15% 中性緩衝ホルマリン液で固定、パラフィン包埋、薄切し、常法に従ってヘマトキシリン-エオジン (hematoxylin-eosin, H-E) 染色を施し鏡検した。また、抗原検索・分布は酵素抗体法を施し観察した。すなわち、脳組織固定パラフィン切片に内因性ペルオキシダーゼ阻害後、一次抗体としてウサギ抗 *H. somnus* 血清を512倍に希釈して浸漬させた。以後、アビジン-ビオチンワサビペルオキシダーゼ複合体 (avidin-biotin-complex immunoperoxidase, ABC) 法でベクタステイン ABC エリートラビット IgG キット (Vectastain ABC Elite rabbit IgG kit, Vector Lab., Burlingame, CA, USA) を用いた。なお、切片の一部は陰性対照として免疫前のウサギ血清を使用した。

II. ウサギモデル実験

1. 菌液調整

ウシ由来の *H. somnus* 野外株を β -NAD 添加 HIA 培地で37°C 18時間5% 炭酸ガス培養を施した。菌量は平板希釈培養法で生菌数を測定し、 10^8 コロニー形成単位 (colony forming unit, CFU)/ml に調整した。

2. 菌体内毒素の抽出および活性判定

HIA 培地で培養した新鮮な *H. somnus* 菌を遠心で集め、滅菌生理食塩水、蒸留水およびアセトンで洗浄、脱水して減圧乾燥菌体 (40g) とし、温フェノール水抽出法¹³⁾によりリポ多糖 (lipopolysaccharide, LPS) を抽出した。

活性判定は、動物舎に長期間飼育した雑種ウサギ3羽を用い、*H. somnus* 菌 10^8 CFU/g, LPS 0.2mg を滅菌生理食塩水 0.2ml にそれぞれ溶解し、菌液は第一頸髄硬膜下に、その24時間後に LPS を耳静脈へ全量投与しシュルツマン反応を惹起させ、血栓形成を確認した。

3. ウサギ

日本白色在来種 (Kb1: JW 種)、雌、3.3ヶ月齢、体重 3.10 ± 0.04 Kg 9羽 (内3羽は対照) を菌液接種群 (A群)、同種、雌、4.0ヶ月齢、体重 2.93 ± 0.18 Kg 5羽 (内1羽は対照) を LPS 投与群 (B群) とし、いずれも微生物学的検査陰性のものを導入後直ちに実験に供した。

4. 感染および採血方法

1) A群

実験群6羽は、使用前日に培養した新鮮な菌 10^8 CFU を滅菌生理食塩水 0.2ml に浮遊し、第一頸髄硬膜下に全量接種した。

血液は接種前 (0時間) と接種後4、8、24および48時間に耳静脈から採血した。

対照3羽は、同量の滅菌生理食塩水を実験群同様に処置、採血した。

2) B群

実験群4羽は、A群と同様に処置、菌液を接種し、その24時間後に LPS 0.3mg を滅菌生理食塩水 0.3ml に溶解し耳静脈へ投与し、シュルツマン反応を惹起させた。

血液は LPS 投与前 (0時間) と LPS 投与後1、6時間に耳静脈から採血した。

対照の1羽は A群同様に処置し、採血は実験群と同様に0、1、6時間目に行った。

5. 血液・血清生化学的検査

体温および臨床観察のほか、一般血液検査として赤血球数 (red blood cell, RBC)、白血球数 (white blood cell, WBC)、白血球百分率を算定し、クレアチニン、ビリルビン、乳酸脱水素酵素 (lactic dehydrogenase, LDH)、血液尿素窒素 (blood urea nitrogen, BUN)、クレアチニン酸酵素 (creatinine phosphokinase, CPK)、グルタミン酸オキサロ酢酸トランスアミナーゼ (glutamic oxaloacetic transaminase, GOT)、グルタミン酸ピルビン酸トランスアミナーゼ (glutamic pyruvic transaminase, GPT) を市販のキットを用い血清成分分析器 (Ra BA-Σ, 京都第一科学, 京都) で測定した。

1) エンドトキシン

250°C、2時間、乾熱滅菌した器具を用い、エンドトキシン陰性の試薬を加えて、1ml ヘパリン血漿をエンドトキシンテスト-D (生化学工業, 東京) で比色法により吸光度 545nm で測定した。

2) 凝固系検査

i. 血小板数 (platelet, PLT)

エチレンジアミン四酢酸 (ethylene diamine tetraacetic acid, EDTA) 加血液を THOMA-ΣEISS 計算板を用いピペット法により算定した。

ii. フィブリノーゲン

コアグロメーター KC (Heinrich Amelung GMBH, Lemgo, Germany) を用い、フィブリノーゲンB-テストワコー (和光純薬工業, 大阪) によりフィブリノーゲン (fibrinogen, Fbg) 量を検査線から求めた。

iii. プロトロンビン時間

コアグロメーターを使用し、PT-テストワコー (和光純薬) によりプロトロンビン時間 (prothrombin time, PT) を測定した。

iv. 活性部分トロンボプラスチン時間 (active partial thromboplastin time, APTT)

コアグロメーターを使用し、APTT-テストワコー (和光純薬) により APTT を測定した。

3) 線溶系検査

i. フィブリン/フィブリノーゲン分解産物 (fibrin/fibrinogen degradation product, FDP)

脱フィブリン血漿は、血漿 0.1ml、アプロチニン 250KIE/ml 0.2ml、0.02M、CaCl₂ 0.1ml、ウシトロンビン 100U/ml 0.1ml を加えた原液を5倍量に希釈し、37°C 10分加温、凍結、融解し肉眼的にフィブリン塊を確認して用いた。

測定方法は、抗ウサギフィブリノーゲン抗体ヒツジ IgG (IgG fraction sheep anti-rabbit fibrinogen, CAPPEL, タームハウトキ, ベルギー)、ウサギフィブリノーゲン (rabbit fibrinogen, SIGMA, セントルイス, アメリカ) および抗ウサギフィブリノーゲン抗体ヤギ IgG (plasma protein antisera GAR/Fbg, NORDIC, ティルベルグ, オランダ) にペルオキシダーゼ標識

somnus; H-E, hematoxylin-eosin; HIA, heart infusion agar; LDH, lactic dehydrogenase; LPS, lipopolysaccharide; OD, optical density; PAS, periodic acid Schiff; PLT, platelet; PT, prothrombin time; PTAH, phosphotungstic acid hematoxylin; RBC, red blood cell; WBC, white blood cell

を施し、サンドイッチ固相酵素免疫測定法 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) により検量線を作成、波長 414nm における吸光度 (optical density at 414nm, OD414nm) で測定した値を次の最適多項式から FDP 濃度を求めた。

- a. 0.400 以上 1.000 以下の場合
 $y = 116 - 65.85x + 1342x^2 - 1049x^3 + 299.1x^4$ ($r = 1.00$)
- b. 0.250 以上 0.399 以下の場合
 $y = -4.138 + 18.91x + 23.14x^2$ ($r = 0.99$)
- x: OD414nm y: FDP 濃度 (ng/ml) r: 相関係数

6. 病理学的検査

死亡直後あるいは実験終了時点で塩酸ケタミン 50mg/Kg による麻酔を施し安楽死させ、病理解剖後主要臓器を 15% 中性緩衝ホルマリン液で固定、パラフィン包埋、薄切し、常法に従って H-E 染色、必要に応じてリンタングステン酸ヘマトキシリン (phosphotungstic acid hematoxylin, PTAH)、過ヨウ素酸 Schiff (periodic acid Schiff, PAS) 染色を施し鏡検した。また電子顕微鏡検査は、腎組織を 2.5% グルタルアルデヒド (0.05M カコジル酸ナトリウム緩衝液) で固定し、常法に従いエポキシ樹脂包埋、超薄切片を作製後、酢酸ウランとクエン酸鉛で二重電子染色を施し、透過型電子顕微鏡 (日立 H-500) を用い、75KV で観察した。

7. 統計学的処理

各検査項目の成績につき、項目ごとに平均値と 95% 信頼限界による標準偏差を求め、A および B 群の 0 時間と各測定時間の成績を Fisher の直接確率計算法により 5% の危険率で有意差を検定するとともに単回帰分析を行った。

成 績

I. 臨床症例

1. 臨床経過

発症群はいずれも 12~14 ケ月齢のホルスタイン種乳用育成牛で、入牧後 1~2 ケ月の間に発症した。前駆症状は症例 1 で四肢の異常を認めない跛行が 6 日間みられたのみで、症例 2, 3 は突然、右または左側横臥位で発見され、その後、呼吸速迫、呼吸困難、頭頸部の伸張および神経症状の共通徴候を呈し、発症から 7 時間あるいは 24 時間で死亡した (表 1)。

2. 細菌学的検査

脳、脊髄および主要臓器を β -NAD 添加 HIA 培地に塗抹培養したところ、いずれの症例も光沢のある黄色を帯びた小円形コロニーが形成され、グラム陰性小桿菌が 10^6 CFU/g, ml 以上分離された。

性状検査ではカタラーゼ (-)、オキシダーゼ (+)、硝酸塩還元 (+)、インドール (+)、オルニチンデカルボキシラーゼ (+)、0-ニトロフェニール- β -D-ガラクトピラノサイド (+) から *H. somnus* と同定した。

3. 病理学的検査

1) 病理解剖学的検査

肉眼観察では、病変は中枢神経系に主座し、症例 1 は前頭葉、症例 2 は後頭葉から脳幹部および小脳にそれぞれとくに強い髄膜の血管充盈がみられた。断面では脳内に小壊死巣と出血が散在して認められた。その他の臓器には著変は認められなかった。

2) 病理組織学的検査

3 症例の共通所見は、髄膜の好中球を主体とする化膿性炎症と実質の出血・壊死を伴う微小膿瘍の形成であった。病巣は、症例 1 では前脳皮質部 (図 1-A)、症例 2 では後脳髄質、中脳および橋 (図 1-B)、症例 3 は後脳、中脳、橋、延髄および小脳の髄質 (図 1-C) にとくに病変が強く認められた。病巣内およびその周囲には、細血管壁のフィブリノイド変性、血管壊死、フィブリン血栓および菌栓塞がみられた。また、細血管壁の硝子様変性、内腔の狭窄、内皮細胞の腫大等の血管病変は全身性に認められた。その他の臓器では、肝臓の巣状壊死あるいは類壊死が散在してみられた。

酵素抗体法では、*H. somnus* 抗原は脳の微小膿瘍と壊死が認められた部位に多数観察された。しかし髄膜炎を形成する軟膜、クモ膜では認められなかった。また *H. somnus* 抗原の局在では、壊死巣内に浸潤したマクロファージ内に認められることが多かった (図 1-C, inset)。

II. ウサギモデル実験

1. A 群

1) 臨床経過

A 群では、接種後 4 時間からすべてに 0.8℃ の体温上昇が見られた。観察した 4, 8, 24, 32 および 48 時間に体温は 39.9 ± 0.4 ℃ (平均値 \pm SD) で推移し、菌液接種後 8 時間に 1 羽 (A-5) が死亡した。対照は 37.1 ± 0.3 ℃ で推移した。

Table 1. Fatal cases of cattle with *Haemophilus somnus* (*H. somnus*) infection

Case number	Age/Sex (month)	Clinical symptom	Duration of clinical symptom	Therapy	Pathology of CNS ^{b)}
1	12/F ^{a)}	High fever Recumbency Convulsion	1 day	Antibiotics Infusion	Thromboembolic meningoencephalitis
2	12/F	Dyspnea Recumbency Convulsion	7 hrs	Antibiotics Infusion	Thromboembolic meningoencephalitis
3	14/F	Respiratory distress Metearism Convulsion	1 day	Antibiotics Infusion	Thromboembolic meningoencephalitis

^{a)} Female, ^{b)} Central nervous system.

症状は、接種直後から呼吸速迫、振戦が認められたが48時間後には死亡した1羽を除いて全て回復した。

2) 血液・血清生化学的検査

i. 一般血液・血清生化学的検査

RBCの減少、WBCの増加で推移したが、クレアチニン、ビリルビン、LDH、BUN、CPK、GOT、GPTに著変は認められなかった。また対照も著変はなかった。

ii. 血液凝固・線溶動態

各血液凝固指数 (PLT, Fbg, PT, APTT), FDP およびエンドトキシンの推移は表2, 3に示した。PLTは、8時間以後有意な減少を示し48時間では、 $375 \pm 68 \text{ } 10^3/\mu\text{l}$ であった。しかし、対照も著しい減少を示した。

Fbgは、接種4時間から徐々に増加し、24, 48時間にそれぞれ $453 \pm 121 \text{ mg/dl}$, $447 \pm 120 \text{ mg/dl}$ と高値となり、接種後時間との間には回帰直線が得られた。しかし、個別別には表2に示すようにA-1, 2, 3は48時間に回復傾向を示した。対照には、数値の変動は認められるが大きな増加はなかった。

PTは、24時間までは著変はみられず48時間で 9.6 ± 1.2 秒 (接種前、 7.9 ± 0.7 秒) とやや延長傾向を示した。対照は変動は認めなかった。

APTTは、24時間で 25.0 ± 3.6 秒をピークに若干の延長が認められたが、48時間には回復傾向を示した。対照は、増減の変動が認められるが、48時間では17.2秒と接種前の値以下を示し

た。

FDPは、8時間以後徐々に増加が見られた。個体差はあるものの48時間では、 900.2 ng/ml (接種前、 34.5 ng/ml) と接種後時間と共に有意な増加を示した。対照は、若干の増減の変動を示すのみであった。

エンドトキシン (endotoxin, Ent) は、接種後4時間から増加がみられ8時間で 60.24 pg/ml と最高値を示したが、その後減少し48時間では、 $21.0 \pm 7.4 \text{ pg/ml}$ (接種前、 $19.6 \pm 2.7 \text{ pg/ml}$) とほぼ回復した。対照は変動を示さなかった。

3) 病理学的検査

i. 病理解剖学的検査

主要臓器の肉眼的観察では、全例に脾臓のうっ血が顕著で、ほかに肝臓の微小白斑がA-1, 2に散見され、肺臓の充血・出血および浮腫がみられた。また、死亡症例のA-5では、中枢脳溝髄膜の血管充盈が認められた。対照には著変はみられなかった。

ii. 病理組織学的検査

a. 光学顕微鏡所見

全身性のうっ血および脾における好中球浸潤は全例にみられた。とくに死亡例のA-5においてはうっ血は高度であった。フィブリン血栓の形成は腎 (A-2, 3, 6) に認められたが、その程度は低く、二臓器以上のフィブリン血栓はなかった (図2-A a, b)。一方、肺の中・小動脈では血栓を伴う内膜炎 (A-3, 4, 6) を

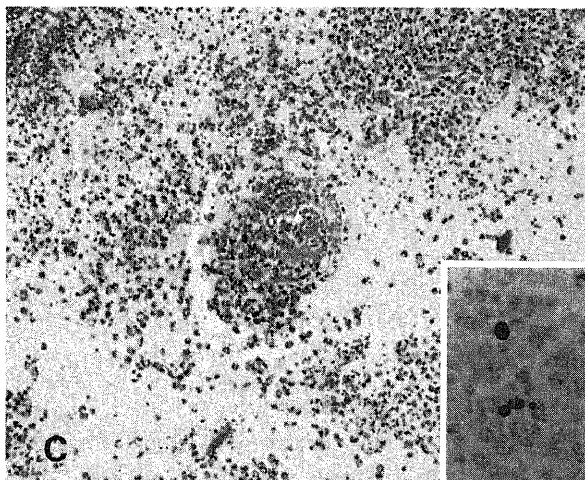
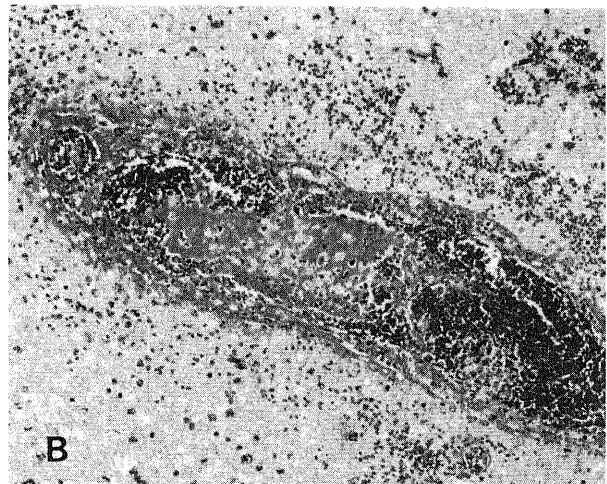
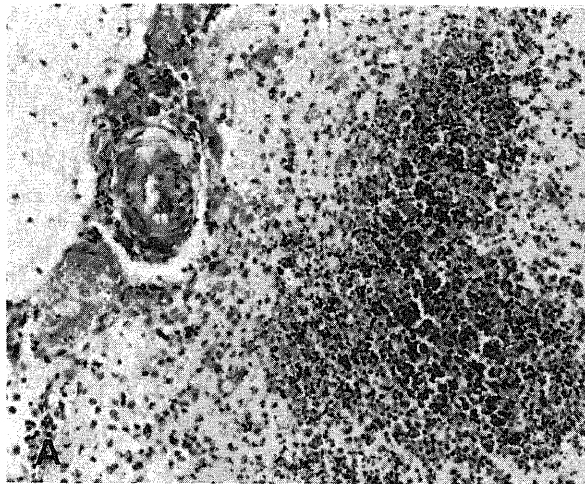


Fig. 1. Thromboembolic meningoencephalitis of clinical cases. A, suppurative meningoencephalitis in case 1; B, thromboembolic encephalitis in case 2; C, thromboembolic encephalitis in case 3; H-E stain, $\times 150$. Inset of C shows immunohistochemical identification of *H. somnus* in macrophages by using the rabbit antiserum. H-E stain, $\times 300$.

みた (図 2-B). 死亡した A-5 の脳所見は、髄膜に好中球を主体としてマクロファージを混える浸潤がみられ、好中球は皮質内、実質の血管周囲にも認められた (図 2-C). この様な血管壁はフィブリノイド変性を呈し血栓形成を伴っていた。対照はフィブリンの析出が若干認められる程度であった。

b. 電子顕微鏡所見

腎糸球体における毛細血管内腔には後術の B 群におけるようなフィブリン塊の充満は明瞭ではなかったが、A-5 を除いて微小のフィブリン線維を認めることができた (図 3, 4). A-1 から 6 まで、程度の差はあるものの血管内皮細胞の細胞質の水疱状変化、粗面および滑面小胞体の空胞化、ミトコンドリアの膨化

が認められた。

基底膜、上皮細胞、メサングウム細胞あるいはメサングウム基質には著変は認められなかった。対照は特に著変はみられなかった。

2. B 群

1) 臨床経過

B 群では、LPS 投与後に急激な体温低下 ($38.2 \pm 1.5^\circ\text{C}$) を認め、元氣消失、呼吸速迫～困難、軟便あるいは下痢便、振戦がみられ末期には麻痺が頻発し、LPS 注射 4 時間後に 2 羽、6 時間後に 2 羽が死亡した。対照は $39.9 \pm 0.2^\circ\text{C}$ で推移し、著変は認められなかった。

Table 2. Laboratory data of rabbits inoculated subdurally with *H. somnus* (A) and control rabbits (C)

Case number	Hr	Laboratory data ^{a)}					
		PLT ($10^3/\mu\text{l}$)	Fbg (mg/dl)	PT (sec)	APTT (sec)	FDP (ng/ml)	Ent (pg/ml)
C	0	822	184	8.3	19.1	62	19
	4	505	257	9.5	24.7	20	19
	8	504	215	7.8	19.0	59	22
	24	479*	347*	8.4	31.9	30	18
	48	352*	255	10.1	17.2	80	20
A-1	0	760	305	7.3	13.3	13	24
	4	1432	320	9.3	17.7	42	296*
	8	470	367	7.7	16.4	23*	269*
	24	497	530*	8.2	30.7	29*	74*
	48	412*	285	10.8	15.3	85	16
A-2	0	750	250	7.5	18.0	19	18
	4	647	285	9.7	23.7	30	408*
	8	458	86	8.8	21.4	101*	301*
	24	548	480*	7.8	25.9	51*	47*
	48	455	360	9.4	18.9	2512	17
A-3	0	660	210	7.4	15.3	29	23
	4	554	260	7.5	16.8	26	181*
	8	509	360	7.7	19.6	48*	106*
	24	216*	530*	8.2	22.8	64*	52*
	48	397*	485	9.8	18.0	1789	23
A-4	0	834	230	8.1	18.6	11	18
	4	423	205	7.4	18.4	34	110*
	8	310	196	8.0	20.4	43*	88*
	24	295*	240*	8.6	21.3	81*	35*
	48	303*	540	7.7	14.8	59	16
A-5	0	771	255	8.0	16.0	26	16
	8	307	205	8.7	18.2	78*	826*
A-6	0	523	260	7.4	13.2	24	20
	4	NT	200	7.6	16.4	77	NT
	8	446	330	8.0	15.6	156*	2025*
	24	196*	485*	7.6	24.5	155*	89*
	48	306*	565	10.1	20.4	56	33

^{a)} PLT, platelet; Fbg, fibrinogen; PT, prothrombin time; APTT, active partial thromboplastin time; FDP, fibrin/fibrinogen degradation product; Ent, endotoxin.

* $P < 0.05$ as compared with value of 0 hr by Fisher's exact probability test.

NT, not tested.

2) 血液・血清生化学的検査

i. 一般血液・血清生化学的検査

B群は菌液接種後にWBCは増加するが、LPSの投与で6時間後には 1550 ± 212 と急激な減少を示した。

LDHはLPS投与前の 429 ± 140 WUにくらべ 512 WU以上、特にB-4では1時間後に 3498 WUと増加を示した。

BUNは全て減少傾向 18.9 ± 3.3 mg/dl (LPS投与前、 23.8 ± 3.4 mg/dl)で推移するがB-2のみ6時間で 40.5 mg/dlを

示した。

GOTは4時間で $48 \sim 110$ KU (LPS投与前、 37 ± 22 KU)、6時間で 84 KUと著しく増加した。対照には著変はみられなかった。

ii. 血液凝固・線溶動態

各血液凝固・線溶およびEntの推移については表4、5に示した。

PLTは、B-1が6時間で著しい減少を示したが、B-2~4は若

Table 3. Blood coagulation abnormalities in rabbits with subdural inoculation of *H. somnus*

Parameter ^{a)}	Value (mean \pm SD) at the indicated times (hr) after inoculation of <i>H. somnus</i>				
	0 (9) ^{b)}	4 (5)	8 (6)	24 (5)	48 (5)
PLT ($10^3/\mu$ l)	752 ± 104	764 ± 455	$417 \pm 86^*$	350 ± 162	$375 \pm 68^*$
Fbg (mg/dl)	229 ± 71	254 ± 52	257 ± 113	$453 \pm 121^*$	$447 \pm 120^*$
PT (sec)	7.9 ± 0.7	8.3 ± 11.1	8.2 ± 0.5	8.1 ± 0.4	9.6 ± 1.2
APTT (sec)	16.8 ± 3.4	18.6 ± 3.0	18.6 ± 2.3	25.0 ± 3.6	17.5 ± 2.4
FDP (ng/ml)	34.5 ± 23.5	41.8 ± 25.6	74.7 ± 50.7	$76.0 \pm 59.7^*$	$900.2 \pm 1452.1^*$
Ent (pg/ml)	19.6 ± 2.7	$248.4 \pm 130.9^*$	$602.4 \pm 746.7^*$	$59.5 \pm 27.0^*$	21.0 ± 7.4

^{a)}PLT, platelet; Fbg, fibrinogen; PT, prothrombin time; APTT, active partial thromboplastin time; FDP, fibrin/fibrinogen degradation product; Ent, endotoxin.

^{b)}Number of rabbits tested.

* $P < 0.05$ as compared with value of 0 hr by Fisher's exact probability test.

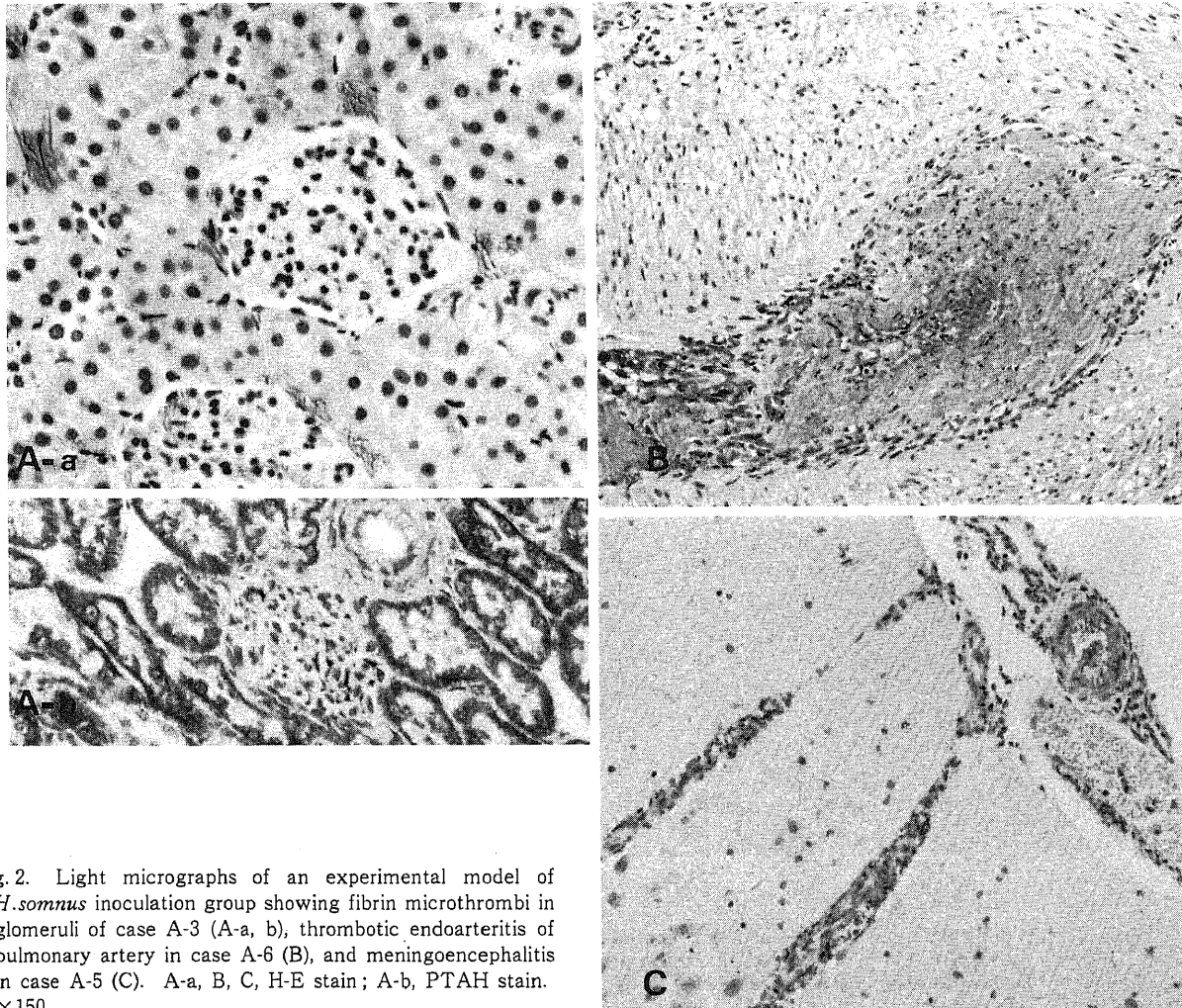


Fig. 2. Light micrographs of an experimental model of *H. somnus* inoculation group showing fibrin microthrombi in glomeruli of case A-3 (A-a, b), thrombotic endoarteritis of pulmonary artery in case A-6 (B), and meningoencephalitis in case A-5 (C). A-a, B, C, H-E stain; A-b, PTAH stain. $\times 150$.

干の減少あるいは増加が認められた。有意差はなかった。対照は変動を認めなかった。

Fbg は、LPS 投与1時間で $524 \pm 59 \text{ mg/dl}$ (LPS 投与前, $329 \pm 133 \text{ mg/dl}$) と急激な増加を示し、6時間では $387 \pm 33 \text{ mg/dl}$ と減少傾向がみられた。しかし B-2 では6時間で 177 mg/dl の著しい減少を示した。対照は1時間に一過性の現象を示すが6時間で回復した。

PT は、6時間で 9.9 ± 0.1 秒 (LPS 投与前, 8.6 ± 0.3 秒) とはじめて延長傾向を示すが有意な延長ではなかった。また B-3 では時間の短縮がみられた。対照は変動を認めなかった。

APTT は、6時間で 27.2 ± 2.9 秒 (LPS 投与前, 15.7 ± 2.1 秒) と延長傾向がみられた。対照は著変を認めなかった。

FDP は1時間から増加を示し、6時間では 3786.5 ng/ml (LPS 投与前, 98.1 ng/ml) と著しい増加を示したが個体差も顕著であった。対照は逆に6時間で 169 ng/ml と減少を示した。

Ent は、LPS 投与1時間で、 36592.1 pg/ml と急激な上昇で最

高値を示した。6時間では 17231.8 pg/ml と半減するものの LPS 投与前, $5.7 \pm 1.9 \text{ pg/ml}$ にくらべ高値を持続した。対照は変動を示さなかった。

3) 病理学的検査

i. 病理解剖学的検査

主要臓器の肉眼的観察では、脾臓のうっ血が全例で顕著に認められた。肝臓では微小白斑が B-1, 2 で中等度にみられた。肺臓では充血・出血および浮腫がみられた。脳では脳溝髄膜の血管充盈と断面では B-3 で小脳の小壊死、B-4 で大脳実質の出血斑が認められた。対照は著変を認めなかった。

ii. 病理組織学的検査

a. 光学顕微鏡所見

検索した主要臓器 (肝, 脾, 腎, 肺, 中枢神経系) における主な病変は、DIC と敗血症によるものであった。

フィブリン血栓の形成は B-1, 2 において、それぞれ脳, 肺, 肝, 腎; 脳, 肺, 腎に、B-3, 4 では髄膜脳炎に伴った形で少数

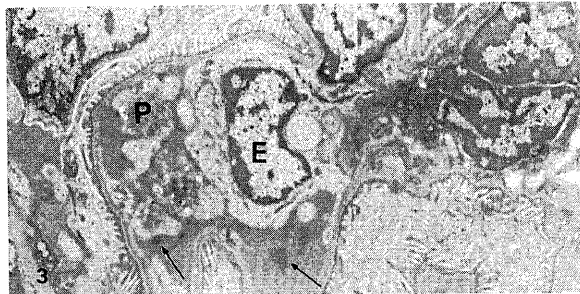


Fig. 3. Electron micrograph of the glomerulus in case A-4 showing swollen endothelial cells (E), platelet aggregation (P), minute fibrin aggregates (arrows) in the glomerular capillaries. $\times 3,000$.

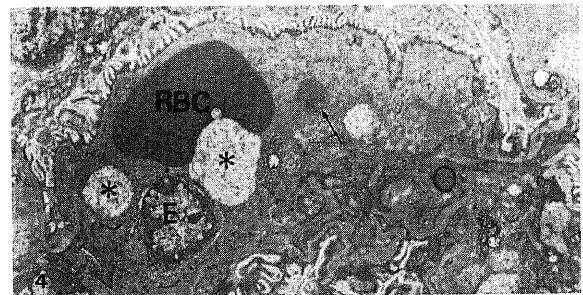


Fig. 4. Electron micrograph of the glomerulus in case A-6 showing bleb-like cytoplasmic projections (stars) of endothelial cells (E), the presence of erythrocyte (RBC) and minute fibrin aggregates (arrow). $\times 6,000$.

Table 4. Laboratory data of rabbits inoculated subdurally with *H. somnus* and followed by intravenous injection of lipopolysaccharide (LPS) extracted from *H. somnus* (B) and control rabbit (C)

Case number	Time after intravenous injection (hr)	Laboratory data ^{a)}					
		PLT ($10^3/\mu\text{l}$)	Fbg (mg/dl)	PT (sec)	APTT (sec)	FDP (ng/ml)	Ent (pg/ml)
C	0	670	329	8.5	14.4	324	6
	1	673	148	9.4	22.3	264	3
	6	682	330	8.7	19.3	155	6
B-1	0	714	225	9.1	14.2	19	8
	1	590	610*	8.3	18.2	59*	56*
	6	551	410	9.9	29.2	3857*	19312*
B-2	0	555	540	8.6	14.1	97	0
	1	485	490	8.9	14.7	312*	46*
	6	608	363	9.8	25.1	3716*	15151*
B-3	0	662	255	8.3	17.1	12	0
	1	813	485*	5.4	21.3	285*	1797*
B-4	0	877	245	8.5	18.7	38	4
	1	827	510*	8.4	29.3	155*	144470*

^{a)} PLT, platelet; Fbg, fibrinogen; PT, prothrombin time; APTT, active partial thromboplastin time; FDP, fibrin/fibrinogen degradation product; Ent, endotoxin.

* $P < 0.05$ as compared with value of 0 hr by Fisher's exact probability test.

Table 5. Blood coagulation abnormalities in rabbits with subdural inoculation of *H. somnus* followed by intravenous injection of *H. somnus*-derived LPS

Parameter ^{a)}	Value (mean±SD) at the indicated times (hr) after intravenous injection of <i>H. somnus</i> -derived lipopolysaccharide		
	0 (5) ^{b)}	1 (4)	6 (2)
PLT (10 ³ /μl)	670±116	679±169	580±403*
Fbg (mg/dl)	329±133	524±59*	387±33*
PT (sec)	8.6±0.3	7.8±1.6	9.9±0.1
APTT (sec)	15.7±2.1	20.9±6.2	27.2±2.9
FDP (ng/ml)	98.1±162.2	202.8±187.1*	3786.5±895.8*
Ent (pg/ml)	5.7±1.9	36592.1±71923.3*	17231.8±2942.4*

^{a)} PLT, platelet; Fbg, fibrinogen; PT, prothrombin time; APTT, active partial thromboplastin time; FDP, fibrin/fibrinogen degradation product; Ent, endotoxin.

^{b)} Number of rabbits tested.

*P<0.05 as compared with value of 0 hr by Fisher's exact probability test.

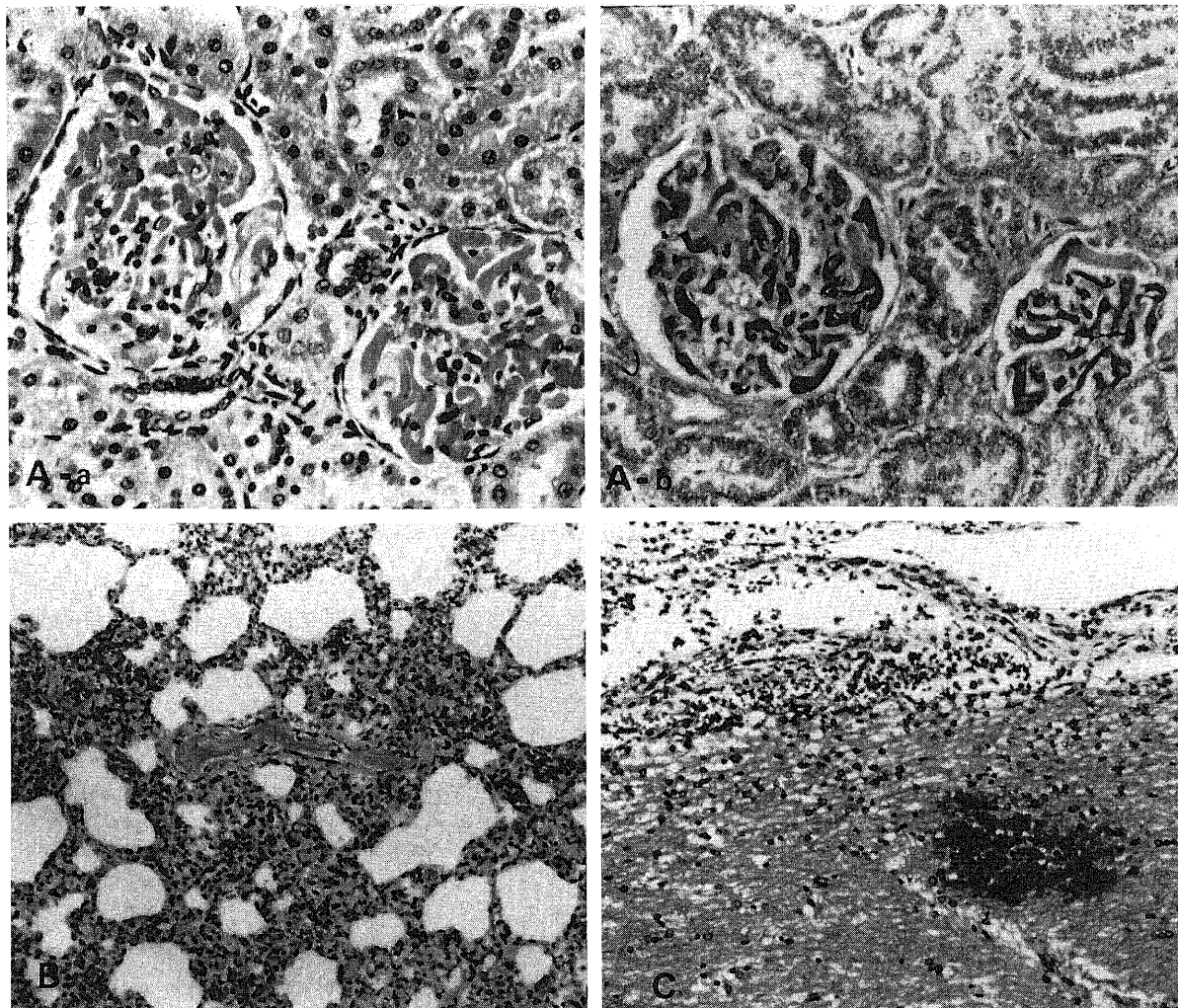


Fig. 5. Light micrographs of an experimental model of *H. somnus* inoculation followed by LPS-intravenous injection group showing disseminated intravascular fibrin aggregates in glomeruli of case B-1 (A-a, b), intravascular fibrin aggregates in small blood vessels of lungs in case B-2 (B), and meningoencephalitis with focal hemorrhages in case B-3 (C). A-a, B, C, H-E stain; A-a, ×300, and B, C, ×150. A-b, PTAH stain; ×300.

みとめられた。とくに腎臓では B-1 に高度 (図 5-Aa, b), 肺臓で B-2 に高度を示した (図 5-B)。血栓形成の著しい細血管壁は水腫性, フィブリノイド変性を示し, 内皮細胞は腫大, 核濃縮や好中球の粘着を呈し内膜は空胞を伴っていた。

中枢神経系における病理所見は 4 時間で死亡した B-3, 4 では髄膜に好中球を主体としてマクロファージ, リンパ球を混える浸潤がみられた (図 5-C)。B-4 では, フィブリンの析出を伴い好中球の皮質内への浸潤と実質では血管周囲腔の拡張, 血管中心性の巣状出血が認められた。B-3 では, 小脳髄質の小壊死巣がみられた。対照は著変を認めなかった。

b. 電子顕微鏡所見

腎糸球体においては, 光学顕微鏡で多数のフィブリン血栓をみた B-1, 2 において, 電顕的にも不正形のフィブリン線維塊が毛細血管腔に嵌頓する形で多発しているのを認めた。一部では

内皮細胞下の基底膜にフィブリン小塊をみた (図 6a, b)。光顕的にフィブリン血栓を腎糸球体に確認できなかった B-3 においても微小のフィブリン線維をみた。

毛細血管内皮細胞の変性は A 群におけるよりも全般に高度であり, とくに B-3, 4 においては, 腫大した空胞, 水胞状の細胞質の突起が内腔に突き出していた (図 7)。毛細血管内皮細胞の細胞質変性が高度であるにも拘らず, ポドサイト, 基底膜, 細尿管上皮細胞に著変はみられなかった。

以上の A 群ならびに B 群の主要臓器における病理所見については表 6 にまとめて示した。

3. A 群ならびに B 群の死亡時における FDP, Ent 値と血栓形成の関連

A 群および B 群の FDP 値, Ent 値, 各臓器におけるフィブリン血栓の有無を表 7 に示した。A 群のうち実験途中の 8 時間

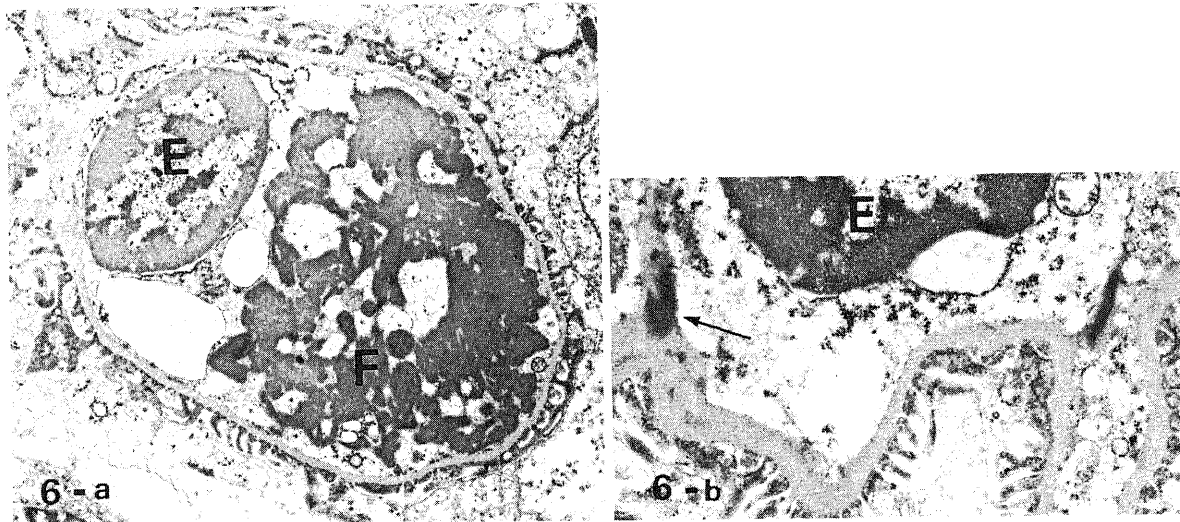


Fig. 6. Electron micrograph of the glomerulus in case B-1 showing fibrin aggregates (F) impacted in the capillary with swollen endothelial cells (E) (a) and minute fibrin (arrow) in their underlying basement membrane (b). a, $\times 6,000$; b, $\times 12,000$.

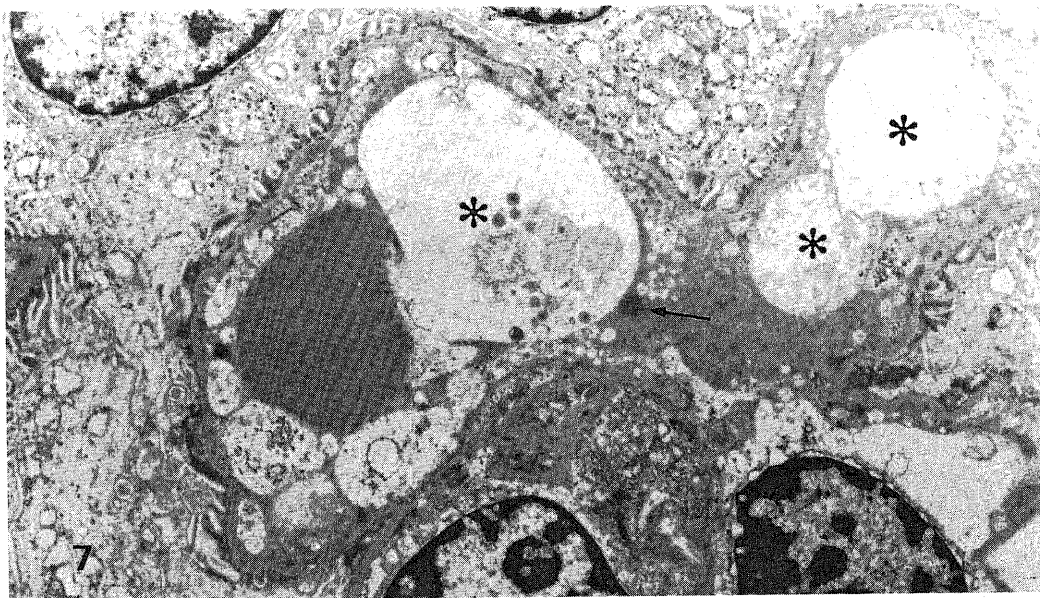


Fig. 7. Electron micrograph of the glomerulus in case B-3 showing marked swelling and vacuolar degeneration of endothelial cells, and minute fibrin (arrow) in the lumen. $\times 6,000$.

目に死亡した A-5 においては, Ent が 826pg/ml と極めて高いにも拘らず FDP は軽度上昇 (78ng/ml) に留まっていた。また, この A-5 では顕微鏡的に全身各臓器には血栓形成はなく, 髄膜脳炎に伴って局所に血栓をみるのみであった。これに対して FDP 値の高い A-2, A-3 においては腎臓糸球体に多発性の血栓形成をみた。また, 少数ながら A-6 においてもフィブリン血栓は観察された。

電子顕微鏡で腎糸球体を精査すると, 毛細血管内に微小なフィブリン塊が A-5 を除いて全症例に認められた。

B 群においては A 群に比べ変化は著しく, LPS 投与後 6 時間目には全てのウサギは死亡した。4 時間目に死亡した B-3, B-4 では A 群における A-5 と同様に FDP の値よりも Ent 値がきわめて高値であり, これは脳の局所におけるシュワルツマン反応による血栓性髄膜脳炎であることを示していた。一方, B-1, B-2 では Ent のみならず FDP が高く, 同時に全身にフィブリン血栓を形成する DIC の病態であり, 全身性のシュワルツマン反応が惹起されていることを示していた。

Table 6. Major pathological findings of rabbits inoculated intradermally with *H. Somnus* (A) and with *H. somnus* inoculation followed by intravenous injection of LPS extracted from *H. somnus* (B)

Case number	Major pathological findings in					
	CNS ^{a)}	Lung	Liver	Spleen	Kidney	EM ^{b)}
A-1		Hemorrhage				Fibrin (±) End-Deg. (+)
A-2					Fibrin thrombi	Fibrin (±) End-Deg. (+)
A-3		Thrombotic endoarteritis			Fibrin thrombi	Fibrin (±) End-Deg. (+)
A-4		Thrombotic endoarteritis				Fibrin (±) End-Deg. (+)
A-5*	Meningoencephalitis	Congestion	Congestion	Splenitis	Congestion	Fibrin (-) End-Deg. (+)
A-6		Thrombotic endoarteritis			Fibrin thrombi	Fibrin (±) End-Deg. (+)
B-1	Fibrin thrombi Hemorrhage	Fibrin thrombi Thrombotic endoarteritis	Fibrin thrombi	Splenitis	Fibrin thrombi	Fibrin (++) End-Deg. (++)
B-2	Fibrin thrombi	Fibrin thrombi Thrombotic endoarteritis	Microabscess	Splenitis	Fibrin thrombi	Fibrin (+) End-Deg. (++)
B-3*	Meningoencephalitis	Hemorrhage	Congestion	Microabscess	Congestion	Fibrin (±) End-Deg. (++)
B-4*	Meningoencephalitis Hemorrhage	Hemorrhage	Congestion	Congestion	Congestion	Fibrin (-) End-Deg. (++)

^{a)} Central nervous system.

^{b)} Electron microscopic findings of renal glomeruli. Fibrin (-), absence of fibrin; Fibrin (±), minute aggregates of fibrin; Fibrin (+), small aggregates of fibrin; Fibrin (++) , large mass of fibrin; End-Deg. (+), focal cytoplasmic degeneration of endothelial cells; End-Deg. (++) , extensive cytoplasmic degeneration of endothelial cells.

* died during experiment by endotoxin shock.

Table 7. Correlation of microscopic fibrin-thrombus formation and elevation of fibrin/fibrinogen degradation product (FDP) or endotoxin (Ent) in experimental rabbits inoculated with *H. somnus* (A) and with *H. somnus* inoculation followed by LPS injection (B) and control data (C) obtained prior to inoculation

Case number	Value (mean±SD) of plasma of rabbits examined		Fibrin thrombus formation				
	FDP ^{a)} (ng/ml)	Ent ^{b)} (pg/ml)	Brain	Lung	Liver	Spleen	Kidney (EM) ^{c)}
C	20.3±6.6	19.8±6.9					
A-1	85	16					(±)
A-2	2512	17					+
A-3	1789	23					+
A-4	59	16					(±)
A-5*	78	826	+				(-)
A-6	56	33					+
C	41.5±33.4	3±3.3					
B-1	3857	19312	+	+	+		++
B-2	3716	15151	+	++			+
B-3*	285	1797	+				(±)
B-4*	155	144470	+				(-)

^{a)} fibrin/fibrinogen degradation product, ^{b)} endotoxin, ^{c)} Electron microscopic findings of renal glomeruli.

Symbols: *, died during experiment; +, occasionally observed; ++, extensively observed; (-), no fibrin; (±), minute aggregates of fibrin; (+), small aggregates of fibrin; (++) , large mass of fibrin.

考 察

ウシの *H. somnus* 感染症は Griner ら¹⁾によって初めて報告されて以来, Kennedy ら¹⁴⁾, Dreumel ら³⁾, などの多数の研究者によって確認されたウシに対してのみ特異的に血栓性髄膜炎を起す疾患である。本感染症は疫学的, 臨床学的, 細菌学的, 病理学的にかなり詳しく検討されている^{15)~19)}がその病態については現在でも必ずしも明らかではなく, いくつかの疑問が残っている。例えば, 中枢神経系の病理変化については Griner ら¹⁾や Panciera ら¹⁵⁾は菌栓を伴う敗血症性の髄膜炎であるとしているが, Nakajima ら⁸⁾はグラム陰性菌の保有する内毒素に起因するシュワルツマン反応によって起った髄膜炎であると報告している。また, Stephens ら¹⁷⁾は DIC の役割を重視している。一方, Kennedy ら¹⁴⁾, Panciera ら¹⁵⁾が行ったマウス, ウサギ, モルモット, スナネズミ, ヒツジなどの実験モデルによる解析では, *H. somnus* の投与によって動物は死に至るものの, 臨床例にみられる伝染性血栓性髄膜炎の病巣は形成されることがないと報告している。もともと *H. somnus* 感染症は若年齢牛が肥育中において散発的に突然発症する日和見的疾患にすぎないのであるが, この常在細菌が血栓性髄膜炎, 内毒素血症および DIC という重篤で致死的な疾患を発症することに関しては次のような仮説がなされている。即ち, 季節(気温変動), ウシの移動, 抵抗力の減少など種々の環境因子およびウシに特異的な生体反応が複合されて, この常在菌が増殖する機会に遭遇すると, 遊走した好中球, マクロファージによって菌体は破壊され Ent が放出される結果, 血液凝固系の異常を招来して発病するというものである。そこで, 今回, 臨床的並びに実験的研究による本病の病態解析を試みた。

まず第一に野外で発症した *H. somnus* 感染牛 3 頭の臨床的变化ならびに病理学的変化を調べ, 従来の報告と一致していることを確認した。次に実験的に手軽に入手可能で採血量も十分確保できる Kbl: JW 種ウサギに, ウシ由来の *H. somnus* 野外株の菌液およびそれより抽出した LPS を投与して臨床的にみられる血栓性髄膜炎の発症を検討した。今回, 本疾患を再現性良く惹起させるために第一頸髄硬膜下接種という人工感染法を採用した。また, 全身性シュワルツマン反応が十分考えられるのでそのモデルとして菌液接種後 LPS を耳静脈的に注入した。このようなウサギモデルを用いて, 本感染症の病変修飾を野外例と比較観察するとともに, DIC を形成する血液凝固・線溶動態について検討しその病態を解析したものである。

野外で発生した臨床 3 症例は Smith ら¹⁸⁾, Simonson ら¹⁶⁾, Stephen ら¹⁶⁾¹⁷⁾, Stöber ら⁹⁾の報告と同様, 春または初冬の時期に 12~14 ヶ月齢の若齢放牧牛で移動後 1~2 ヶ月に突然発症し呼吸器, 運動器, 神経症状を呈して 7~24 時間で死亡した。しかしこの疾患は 3 症例とも各放牧場で散発していることから, 感染-発病の様式が伝播性, 集団的に生じたものではないことは明らかである。これに関しては, すでに Corstvet ら²⁰⁾, Miller ら²¹⁾²²⁾が健康牛の鼻腔, 気管ぬぐい液, 膈から *H. somnus* を分離・同定したことや, Stöber ら⁹⁾が施行した抗体検査において高率に抗体保有が認められたことから本疾患においては感染と発病とは異なっていることが支持されている。本例についても種々の条件によって散発という発症をとったものと考えられる。本例の 3 症例とともに Kennedy ら¹⁴⁾,

Panciera ら¹⁵⁾の報告と同様であったが病理組織学的には出血を伴う微小膿瘍の形成部位が前脳部, 後脳部, 脳幹部および小脳とそれぞれ異なっていた。しかし, 髄膜炎という病変形態に変化が認められないことから本菌が定着, 増殖した部位による差であろうと考えられる。また出血壊死に陥った部位の細血管は菌栓, 血栓形成が顕著で周囲組織との境界は明瞭であった。その他の臓器に血栓形成は認められなかった。これは, 血栓と好中球集簇が脳以外の全身臓器でも認められるとした Panciera ら¹⁵⁾の報告とは異なり, 本例が中枢神経系にとくに限局した反応のためと思われる。今回行われた *H. somnus* の免疫染色において, 抗原の *H. somnus* が壊死巣内のみならずマクロファージの細胞質内に認められたことは注目に値する。好中球やマクロファージが菌体を破壊し, Ent を放出させ, ついで菌体の一部をマクロファージが貪食していることを示すものと考えられるからである。中島²³⁾や Syrogiannopoulos ら²⁴⁾はグラム陰性菌による髄膜炎例では内毒素の LPS が病変形成に重要な役割を果たすことを指摘している。また, Thorgeirsson ら²⁵⁾は内毒素による変化は血管内皮細胞に最も障害をもたらすことを示しているので, 本例の全身性の血管内皮細胞の変化は内毒素によるものと思われる。

ウサギモデル実験において予備実験で行った *H. somnus* の活性判定では, 動物舎に長期間飼育したウサギ 3 羽を使用したところ, 3 羽ともに顕著な血栓性髄膜炎が誘発された。これに対して同じ菌液および LPS を用いたにも拘らず本試験のそれは, A 群で 1/6, B 群で 2/4 に髄膜炎を惹起させたにすぎなかった。これは予備実験に使用したウサギの病原体感作有無と関係があるものと思われる。おそらく, 準備因子以前の潜在的感染が惹起因子の投与で脳に強いシュワルツマン反応を起こさせたのであろう。

臨床経過では, A 群は接種後 4 時間からすべてに 0.8℃ の体温上昇がみられ, 6 羽中 5 羽は 48 時間には回復し典型的な一過性の細菌感染状態を示した。今回, 本実験では細菌陰性のウサギを用いたにも拘らず, 1 羽 (A-5) は, 4 時間以後の急激な体温低下 (38.5℃) および後述する血液凝固・線溶異常と髄膜炎で 8 時間で死亡した。この例は臨床症例ならびに LPS 投与の B 群と類似しているため接種された *H. somnus* が一部破壊されて内毒素を放出してエンドトキシンショックを起こしたものと考えられる。B 群では, LPS 投与後急激な体温低下を示し全羽が 8 時間以内に死亡した。これらのうち B-1, 2 は DIC の目立つエンドトキシンショック, B-3, 4 は髄膜炎の目立つエンドトキシンショックと考えられるが, 一般に, 敗血症性ショックは温かいショックといわれ体温低下を来さない。中間ら²⁶⁾は *E. coli* Ent の点滴投与のイヌで体温が上昇したと報告している。Ent の少量長時間投与の場合には, 持続的な細菌感染症に等しく, ショックも DIC もゆっくりと慢性経過をとり, 温かいショックの症状を呈するもので, 今回のように致死的な急激なショックとは異なるものである。

一般血液・血清生化学的検査成績では, A 群では典型的な細菌感染症にみられる好中球の増加のみで, 生化学的検査値に著変はみられなかった。これは Stöber ら⁹⁾の報告と同様であった。しかし B 群ではエンドトキシンショックに伴う体温低下, WBC の減少および LDH 512~3498 WU, GOT 48~110 KU と増加し, 組織学的にも肺炎, 微小膿瘍, DIC, 血管炎, 髄膜炎をみると, これらは LPS 投与によって全身性シュワルツマン反

応を惹起させたことによるものと考えられる。

血液凝固・線溶動態では、PLT は A 群で、8 時間以後有意な減少を示し、48 時間では $375 \pm 68 \text{ } 10^3/\mu\text{l}$ であった。これは敗血症に起因して凝固能が亢進したものと考えられるが、Fbg も FDP もむしろ増加した。Hamilton ら²⁷⁾ はイヌで、少量のトロンボプラスチンを数日あるいは数週間にわたって実験的に注入すると、PLT は減少するが DIC によって誘発された凝固因子は代償性に増加すると報告している。A-2, 3, 6 に微小血栓が腎糸球体にみとめられるものの A 群では DIC といえる程度に広汎な血栓形成はみとめられなかった。一方、対照の 3 羽では同様に PLT の著しい減少が認められた。Calaresu ら²⁸⁾ は、ラットで 10% 食塩水を腹腔内注射によりストレスを与えると PLT の減少を来し出血して死亡率は上昇すると報告している。本実験でも滅菌生理食塩水を使用したことによるストレスがウサギでも生じたのかも知れない。B 群では、WBC も PLT も減少し、敗血症に伴う急激な WBC の消費、血小板凝集、および急性期蛋白として Fbg の上昇が起こったと考えられる。とくに B-1, 2 では FDP の異常高値、全身のフィブリン血栓がみられ DIC が惹起されていることは明らかであった。この様な変化は Anderegg ら²⁹⁾ も *E. coli* Ent を使用したラットで同様の報告をしている。今回、PLT の減少はあったものの出血傾向はほとんど認められなかった。これに関し、Gaydos ら³⁰⁾ は循環血小板数と出血発現との関係を検討し、PLT が $20,000/\mu\text{l}$ 以上の場合には肉眼的に明らかな出血が起こることは稀であると報告しているので、十分説明されるものと思われる。

Fbg では、Gans ら³¹⁾ はイヌで Ent 点滴注射後 Fbg は一時的に減少することを報告しているが、著者の成績は両群ともむしろ増加を示した。これはまず動物種による差異が考えられるが、少なくとも急性期反応としての Fbg の産生と凝固亢進による消耗の差が若干の増加につながるとみるべきであろう。また PT では、Hardaway ら³²⁾ の不適合輸血犬および中間²⁹⁾ の *E. coli* Ent 点滴犬の報告と異なり、いずれの群も有意な延長ではなかった。これは A 群においては肝臓に著しい病変を来さなかったために十分代償しえたこと、B においては早期に死に至ってしまったことによると思われる。

APTT では、A 群には著変は認められないが、B 群の 6 時間で接種前の値にくらべ 10~12 秒の延長傾向を示した。これは PT に変動がみられないことおよび組織損傷程度が A 群より強いことからトロンボプラスチン活性に由来する凝固促進状態があるものと考えられる。B 群における FDP の著しい増加がこれを裏付けているであろう。動物における FDP やプラスミンに関する知見は乏しい。Cliffon ら³³⁾ が同種の動物血漿間でも大きな差があることを報告しているように、著者の成績でも個体差がきわめて大きかった。A 群の FDP は 900.2 ng/ml (接種前, 34.5 ng/ml)、B 群の FDP は 3786.5 ng/ml (LPS 投与前, 98.1 ng/ml) であるが、単位をヒトで用いられている $\mu\text{g/ml}$ に換算すると測定値はかなり低いものであった。しかし、個体差を堪案して同一個体で接種前と接種後の値で比較すると A 群で 26 倍、B 群で 38 倍の上昇を示すことから、ウサギにおける線溶状態は明らかに亢進していたと解される。その内では、A 群ではフィブリン血栓が散見されることから一次線溶、B 群ではフィブリン血栓が高度であることから二次線溶状態と推定される。しかし、Hamilton ら²⁷⁾ は、ウサギに生ずる内毒素誘発性の

DIC はフィブリン溶解活性を伴うことなくむしろフィブリン溶解能が抑えられるという特徴を指摘している。従って FDP の値のみで線溶を推定するべきではないであろう。

Ent では、A 群は接種後 4 時間から増加がみられ 8 時間で 602.4 pg/ml と最高値を示したが、その後減少し 48 時間では、 21.0 pg/ml と回復している。従って、人工的に接種された菌体の破壊は軽微であったと判定される。しかし、6 羽中 1 羽においては Ent の高値と髄膜炎を発症して死亡したので個体によっては *H. somnus* の感染に引きつづいて致死性のエンドトキシンショック、脳に局限したシュワルツマン反応が起こりうると考えられる。全身性シュワルツマン反応を惹起させた B 群は、LPS 投与前にくらべ 1 時間で Ent は約 10,000 倍に増加し、以後高値が持続した。Berczi ら³⁴⁾、Culbertson ら³⁵⁾ は Ent の毒性に関して、動物種、系統発生の差がみられることを報告しているが、今回用いた Kbl: JW 種ウサギでは高い感受性があるものと判断される。また Kennedy ら¹⁴⁾ も *H. somnus* はウサギ、マウス、モルモットを殺傷するが伝染性血栓性髄膜炎の病巣を形成しないとされている。しかし、A 群で 1/6 例、B 群で 2/4 例に髄膜炎は惹起された。さらに、Kurtz ら^{36,37)} は LPS が DIC を示唆する変化を呈すると報告しているように、B 群の腎糸球体および肺胞壁の毛細血管で播種性のフィブリン血栓を確認した。

死亡あるいは鑑定殺前の血液凝固・線溶成績とフィブリン血栓発現頻度を比較してみるといくつかの興味ある相関を指摘することができる。A 群のうち FDP の増加のみられた A-2, 3 では腎糸球体にフィブリン血栓をみる事ができたが、A-5 では FDP より Ent が圧倒的に優勢であり、血栓形成よりもエンドトキシンショックで死亡したことを物語っていた。このことは、グラム陰性の弱毒菌である *H. somnus* といえども、菌液の一回投与でも内毒素血症を誘発することが可能であることを証明したものである。従って、野外における *H. somnus* 感染牛においても菌体の破壊程度によっては A-5 同様に致死的な病態に落ちることが判明した。また、死亡に至らず回復した実験群においてもわずかではあるが凝固・線溶亢進とフィブリン血栓を残存することが判明した。

B 群では実験群のいずれもが死亡した。接種後 4 時間で死亡した B-3, 4 は臨床例にきわめて類似した病理所見を呈し、Fbg の増加、APTT の延長傾向、FDP、Ent の増加を示し、脳にとくに強いシュワルツマン反応とエンドトキシンショックを起したものであると思われる。西川³⁸⁾ は、Ent は循環不全による臓器の有効血液量の減少、組織や細胞の代謝障害を生じ DIC、多臓器不全、ショックを招来すると述べているが、B 群の全てにこれはあてはまる。

病理解剖学的検査では、中枢神経病変の形成は B 群で強く、出血壊死を伴う髄膜の血管充盈が 2/4 例認められた。また A-5 および B の実験群すべてに脾臓のうっ血、肺臓の充血および浮腫を呈する循環障害に代表されるショックを示唆する所見が得られた。

光学顕微鏡所見では、髄膜炎を再現した A-5, B-3, 4 のうち B 群の反応は、ウンでみられた病変をよく再現したのみならず、Thompson ら³⁹⁾ が報告した *H. somnus* の血管親和性を示す所見、即ち血管壁のフィブリノイド変性、内皮細胞の変性がみられた。しかし野外例にくらべ微小壊死の形成は少なく、これはウンとウサギという動物種による差と思われる。B 群の腎糸

球体、肺胞壁および髄膜炎を起こした中枢実質のそれぞれの細血管に局限して認められたフィブリン血栓は、Hamilton ら²⁰⁾、Mori ら⁴⁰⁾の報告を裏付ける全身性シュワルツマン反応と解される。また、DIC に伴う、またはそれに先立つ内皮細胞の変化については、相川ら⁴¹⁾は DIC に併発する腎疾患では糸球体細血管内皮細胞の腫大のほか、基底膜の肥厚があると述べ、また Thorgeirsson ら²⁹⁾も毒素に対する一般的な反応として内皮の腫大、増生および剝離、基底膜の露出があると報告している。著者は腎糸球体について電顕的に調べてみたが基底膜に著変はみられず、内皮細胞の水腫変性および空胞形成と、微小フィブリン塊の形成が主な病変であった。Hamilton ら²⁰⁾は微小循環における血小板凝集とフィブリン沈着の同定が DIC の最もよい証拠であろうと述べているが、今回、PLT の凝集はきわめて少なく、むしろ微小なフィブリンの集塊をほぼ全例にみることができた。電子顕微鏡所見の詳細では、フィブリン血栓に相当するフィブリン塊は糸球体毛細血管腔内に高い電子密度の線維状集塊として観察され、変性、腫大した内皮細胞の内腔面に接して認められた。相川ら⁴¹⁾は、溶血性尿毒症候群、血小板減少性紫斑病、進行性全身性硬化症等の事例では、内皮細胞と基底膜との間にフィブリン線維が沈着することがあると報告している。ヒトにおける疾患と本疾患モデルと同じように比較することは必ずしも適切ではないかも知れない。しかし、少なくとも最も広汎にフィブリン集塊をみた B-1 の糸球体では、内皮細胞直下に微小のフィブリン集塊をみることができた。これは変性、腫大した内皮細胞の細胞間隙から、血管内で形成された一部のフィブリンが通過し、基底膜に補足されて沈着したものと考えられる。Stern ら⁴²⁾は損傷をうけた内皮細胞表面で血栓形成が促進されると報告しているように、このような所見は凝固反応が著しいことを示しているものであろう。血管内皮細胞質内に形成された大小不同の空胞は、滑面小胞体または粗面小胞体およびファゴライゾームに由来していた。また膨化・腫大した細胞質が水疱状に突出していることが共通してみられたことや、急死した A-5, B-3, 4 においてとくに高度であったことを考え合わせるとこれらは Ent による細胞障害を示しているものと考えられる。本菌は一般に血管親和性があることが従来より指摘されている。おそらく菌由来の Ent が血管内皮細胞をとくに傷害することに主因があるようにみえる。臨床例の中中枢神経系の微小壊死形成部において局限して顕著にみられた血管病変は、局所における Ent による内皮細胞障害であると考えられる。以上のようにウシの *H. somnus* 感染症は脳に主座をおく局所性シュワルツマン反応の形で発症する致死性疾患であり、一部は全身性シュワルツマン反応の DIC を惹起するということが判明した。また、一過性で回復する *H. somnus* 感染症においても微小フィブリン塊を形成するなど内皮障害と凝固異常を発生することが特徴であり、発症の有無はむしろ血管内に発生する微小血栓の清掃にたざさわるマクロファージ系の食細胞機能活性性によって決まるものと思われる。

結 論

ウシの *H. somnus* 感染症の病態を明らかにするために臨床例 3 頭の病理変化を精査し、さらに実験モデルとして *H. somnus* 菌液をウサギの第 1 頸髄硬膜下に注入、または *H. somnus* より抽出した LPS を耳静脈的に注射してシュワルツマン反応を誘発させた感染ウサギの凝固・線溶動態と病理組織

学的所見を検討し、次の結果と結論を得た。

1. 臨床例 3 頭から *H. somnus* が検出された。病理組織学的には血栓性髄膜炎であり、壊死巣とマクロファージ内に *H. somnus* 抗原を免疫組織学的に同定することができた。

2. A 群では 6 羽中 1 羽、B 群では 4 羽中 2 羽に臨床例に対比しうる突然死と髄膜炎を誘発させることができた。

3. A 群では Ent が一過性に上昇、つづいて FDP が上昇するという経過をたどり回復した。回復した 5 羽中 3 羽に腎糸球体にフィブリン血栓が、3 羽の肺には血栓性肺動脈内膜炎がみられた。

4. B 群では LPS 投与後 4 時間で 2 羽が、6 時間で 2 羽が死亡した。4 時間で死亡した 2 羽には Ent が特に高値で、髄膜炎が認められた。これに対し、6 時間で死亡した 2 羽は Ent のみならず FDP が高値であり、全身には DIC に相当するフィブリン血栓の多発をみた。

5. 電顕的に腎糸球体を観察した結果、A 群では 6 羽中 5 羽、B 群では 4 羽中 3 羽に毛細血管内フィブリン塊を確認し、全例に血管内皮細胞の腫大・変性をみた。

以上より、日和見のグラム陰性菌である *H. somnus* 感染症はさまざまな環境因子をうけて菌体が破壊され、Ent の放出によって引き起こされる局所性および全身性のシュワルツマン反応であることが証明された。

謝 辞

稿を終えるに臨み、ご指導、ご校閲を賜りました恩師の中西功夫教授に深甚なる感謝の意を表します。また、多大なご教示を賜りました金沢大学医学部内科学第三講座松田 保教授ならびに朝倉英策博士に心から感謝致します。研究遂行にご協力いただきました第一病理学教室ならびに石川県家畜保健衛生所の各位に厚くお礼申し上げます。

文 献

- 1) Griner, L. A., Jensen, R. & Brown, W. W.: Infectious embolic meningo-encephalitis in cattle. J. Am. Vet. Assoc., 129, 417-421 (1956).
- 2) MacDonald, D. W., Christian, R. G. & Chalmers, G. A.: Infectious thromboembolic meningoencephalitis: Literature review and occurrence in Alberta, 1969-71. Can. Vet. J., 14, 57-61 (1973).
- 3) Dreumel, A. A., Curtis, R. A. & Ruhnke, H. L.: Infectious thromboembolic meningoencephalitis in Ontario feedlot cattle. Can. Vet. J., 11, 125-131 (1970).
- 4) Stöber, M. & Pittermann, D.: Infektiöse septikämisch-thrombosierende meningoencephalitis in einem mastbullenbestand. Dtsch. Tierärztl. Wschr., 82, 97-102 (1975).
- 5) 上野八郎, 原文男, 白石忠昭, 岡田雪男, 笠井俊平: 肥育牛群に発生した化膿性髄膜炎。I. 臨床および病理学的所見。日獣会誌, 34, 268-272 (1981).
- 6) 原文男, 上野八郎, 白石忠昭, 岡田雪男, 加藤和好: 肥育牛群に発生した化膿性髄膜炎。II. *Haemophilus somnus* の分離と抗体調査成績。日獣会誌, 35, 355-359 (1982).
- 7) 附田彰二, 佐々木英和, 古谷真, 繁左家民次郎, 花田岩雄, 斉藤健二, 仙北富士男, 浦田圭一郎: 放牧牛の *Haemophilus somnus* 感染による線維素性化膿性髄膜炎。日獣会誌, 34, 319-323 (1981).

- 8) Nakajima, Y. & Ueda, H.: Shwartzman reaction in the brain induced by *Haemophilus somnus* and *Escherichia coli* lipopolysaccharide in rabbits. *J. Comp. Pathol.*, **100**, 231-236 (1989).
- 9) Asakura, H., Jokaji, H., Saito, M., Uotani, C., Kumabashiri, I., Morishita, E., Yamazaki, M. & Matsuda, T.: Plasma levels of soluble thrombomodulin increase in cases of disseminated intravascular coagulation with organ failure. *Am. J. Hematol.*, **38**, 281-287 (1991).
- 10) Siegal, T., Seligsohn, U., Aghai, E. & Modan, M.: Clinical and laboratory aspects of disseminated intravascular coagulation (DIC): A study of 118 cases. *Thrombos. Haemostas. (Stuttg.)*, **39**, 122-134 (1978).
- 11) Spero, J. A., Lewis, J. H. & Hasiba, U.: Disseminated intravascular coagulation. Findings in 346 patients. *Thromb. Haemostasis*, **43**, 28-33 (1980).
- 12) Garcia-Delgado, G. A., Litte, P. B. & Barnum, D. A.: A comparison of various *Haemophilus somnus* strains. *Can. J. Comp. Med.*, **41**, 380-388 (1977).
- 13) 医科学研究所学会編: 細菌学実習提要, 改良5版, 351-365頁, 丸善, 東京, 1976.
- 14) Kennedy, P. C., Biberstein, E. L., Howarth, J. A., Frazier, L. M. & Dungworth, D. L.: Infections meningoencephalitis in cattle, caused by a *Haemophilus*-like organism. *Am. J. Vet. Res.*, **21**, 403-409 (1960).
- 15) Panciera, R. J., Dahlgren, R. R. & Rinker, H. B.: Observations on septicemia of cattle caused by a *Haemophilus*-like organism. *Pathol. Vet.*, **5**, 212-226 (1968).
- 16) Stephens, L. R. & Little, P. B.: Ultrastructure of *Haemophilus somnus*, causative agent of bovine infectious thromboembolic meningoencephalitis. *Am. J. Vet. Res.*, **42**, 1638-1640 (1981).
- 17) Stephens, L. R., Little, P. B., Wilkie, B. N. & Barnum, D. A.: Infectious thromboembolic meningoencephalitis in cattle: A review. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, **178**, 378-384 (1981).
- 18) Smith, B. P. & Biberstein, E. L.: Septicemia and meningoencephalitis in pastured cattle caused by a *Haemophilus*-like organism ("*Haemophilus somnus*"). *Cornell. Vet.*, **67**, 300-305 (1977).
- 19) Simonson, R. R. & Maheswaran, S. K.: Host humoral factors in natural resistance to *Haemophilus somnus*. *Am. J. Vet. Res.*, **43**, 1160-1164 (1982).
- 20) Corstvet, R. E., Panciera, R. J., Rinker, H. B., Starks, B. L. & Howard, C.: Survey of tracheas of feedlot cattle for *Haemophilus somnus* and other selected bacteria. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, **163**, 870-873 (1973).
- 21) Miller, R. B., Barnum, D. A. & McEntee, K. E.: *Haemophilus somnus* in the reproductive tracts of slaughtered cows: location and frequency of isolations and lesions. *Vet. Pathol.*, **20**, 515-521 (1983).
- 22) Miller, R. B., Camp, S. D. & Barnum, D. A.: The effects of intra-amniotic inoculation of *Haemophilus somnus* on the bovine fetus and dam. *Vet. Pathol.*, **20**, 574-583 (1983).
- 23) 中島靖之: グラム陰性細菌による髄膜炎と内毒素. 家畜衛試研究報告, **96**, 259-264 (1991).
- 24) Syrogiannopoulos, G. A., Hansen, E. J., Erwin, A. L., Munford, R. S., Rutledge, J., Reisch, J. S. & McCracken, G. H. Jr.: *Haemophilus influenzae* type b lipooligosaccharide induces meningeal inflammation. *J. Infect. Dis.*, **157**, 237-244 (1988).
- 25) Thorgeirsson, G. & Robertson, A. L.: The vascular endothelium-pathobiologic significance: A review. *Am. J. Pathol.*, **93**, 803-948 (1978).
- 26) 中間寛徳, 田中幹郎, 春日俊郎, 小松孝義: エンドトキシン投与による犬の播種性血管内凝固症候群 (DIC) モデルの作製. 日獣会誌, **37**, 715-719 (1984).
- 27) Hamilton, P. J., Stalker, A. L. & Douglas, A. S.: Disseminated intravascular coagulation: A review. *J. Clin. Pathol.*, **31**, 609-619 (1978).
- 28) Calaresu, F. R. & Jaques, L. B.: Thrombocytopenia in the experimental production of hemorrhagic death by multiple factors. *Can. J. Biochem. Physiol.*, **38**, 1275-1279 (1960).
- 29) Anderegg, K. A., Anzeveno, P., Cook, J. A., Halushka, P. V., McCarthy, J., Wagner, E. & Wise, W. C.: Effects of a pyridine derivative thromboxane synthetase inhibitor and its inactive isomer in endotoxic shock in the rat. *Br. J. Pharmac.*, **78**, 725-732 (1983).
- 30) Gaydos, L. A., Freireich, E. J. & Mantel, N.: The quantitative relation between platelet count and hemorrhage in patients with acute leukemia. *New Eng. J. Med.*, **266**, 905-909 (1962).
- 31) Gans, H. & Krivit, W.: Effect of endotoxin shock on the clotting mechanism of dogs. *Ann. Surg.*, **152**, 69-76 (1960).
- 32) Hardaway, R. M., McKay, D. G., Wahle, G. H., Tartock, D. E. & Edelstein, R.: Pathologic study of intravascular coagulation following incompatible blood transfusion in dogs. *Am. J. Surg.*, **91**, 24-31 (1956).
- 33) Clifton, E. E. & Downie, G. R.: Variations in proteolytic activity of serum of animals including man. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **73**, 559-562 (1950).
- 34) Berczi, I., Bertok, L. & Berezna, T.: Comparative studies on the toxicity of *Escherichia coli* lipopolysaccharide endotoxin in various animal species. *Can. J. Microbiol.*, **12**, 1070-1071 (1966).
- 35) Culbertson, R. Jr. & Osburn, B. I.: The biologic effects of bacterial endotoxin: A short review. *Vet. Sci. Commun.*, **4**, 3-14 (1980).
- 36) Kurtz, H. J. & Quast, J.: Effects of continuous intravenous infusion of *Escherichia coli* endotoxin into swine. *Am. J. Vet. Res.*, **43**, 262-268 (1982).
- 37) Kurtz, H. J. & Short, E. C. Jr.: Pathogenesis of edema disease in seine: Pathologic effects of hemolysin, autolysate, and endotoxin of *Escherichia coli* (0141). *Am. J. Vet. Res.*, **37**, 15-24 (1976).

- 38) 西川浩平: エンドトキシンショックのメディエータ. 代謝, 26, 453-463 (1989).
- 39) Thompson, K. G. & Little, P. B.: Effect of *Haemophilus somnus* on bovine endothelial cells in organ culture. Am. J. Vet. Res., 42, 784-754 (1981).
- 40) Mori, W.: The Shwartzman reaction: A review including clinical manifestations and proposal for a univisceral or single organ third type. Histopathology, 5, 113-126 (1981).
- 41) 相川正道, 翠川修: 図説, 腎疾患の病理と臨床, 生検を中心に, 第1版, 205-227頁, 南山堂, 東京, 1980.
- 42) Stern, D., Nawroth, P., Handley, D. & Kisiel, W.: An endothelial cell-dependent pathway of coagulation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 2523-2527 (1985).

Clinical and Experimental Studies on *Haemophilus somnus* Infection Hirohumi Komae, Department of Pathology (I), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. Juzen Med Soc., **102**, 919—933 (1993)

Key words *Haemophilus somnus*, endotoxin, cattle, Shwartzman reaction, DIC

Abstract

In order to elucidate the pathogenesis of *Haemophilus somnus* infection of cattle, clinical and pathological examinations of feedlot cows affected by *H. somnus* were performed, and an experimental model of rabbits induced by the bacterial inoculation and further injection of the endotoxin (lipopolysaccharide, LPS) was investigated. Three clinical cases which suddenly died in the field during unstable temperature conditions showed thromboembolic meningoencephalitis, fibrin thrombi in the brain and vascular damage in generalized organs, suggestive of Shwartzman reaction. In the experimental model of rabbits meningoencephalitis simulating the clinical disease occurred 1/6 in the bacterial inoculation group and 2/4 in the bacterial inoculation plus LPS injection group. Major pathological findings in experimental rabbits consisted of meningoencephalitis, endothelial cell damage and disseminated intravascular coagulation. Abnormalities of blood clotting and the fibrinolysis system were prolongation of prothrombin time and active partial thromboplastin time, increase of fibrinogen and fibrin/fibrinogen degradation product, and elevation of endotoxin. Therefore, the pathogenesis of this particular disease in cattle can be explained as follows; endotoxin released from the microorganism by various environmental factors induces thromboembolic meningoencephalitis and disseminated intravascular coagulopathy which result in the sudden death of infected cattle.