

県内1農場で発生した牛ボツリヌス症

県央家畜保健衛生所

池田 知美 後藤 裕克
荒木 尚登 和泉屋 公一

緒 言

牛ボツリヌス症は、グラム陽性偏性嫌気性桿菌であるボツリヌス菌 *Clostridium botulinum* が産生する神経毒素（以下、B o NT）による疾病である。牛が *C. botulinum* もしくはB o NTそのものを経口摂取すると、小腸などから吸収されたB o NTが血行性に末梢神経に達し、神経伝達物質アセチルコリンの放出を阻害するため、筋肉の収縮は阻害され、弛緩性の麻痺を引き起こす。このため、後躯麻痺、起立不能などが認められ、呼吸筋の麻痺による呼吸困難に陥り死亡する¹⁾。

B o NTは、抗原性の違いによりAからGの7種の血清型に区別される。牛はCおよびD型毒素に感受性があり、これらの毒素を産生する菌の中には、「モザイク型毒素」を産生する株が存在する（図1）。たとえばD/Cモザイク型毒素の場合、D型の構造のうち、一部がC型の構造となっている³⁾。B o NTは、検体を型別抗血清と混合してマウスに接種し、特有症状を示して死亡するか否かを見る「毒素中和法」で血清型別を確認する。D型毒素の場合、D型抗血清で毒素が中和されてマウスは生存するが、「D/Cモザイク型」の場合、C型抗血清でも一部中和されるため、マウスが死亡するまでの時間が延長したり、生存することがある。

県内1肥育牛農場で、平成28年7月及び平成29年1月、起立不能と死亡が発生し、1月の発症牛を牛ボツリヌス症と診断したので、その概要を報告する。

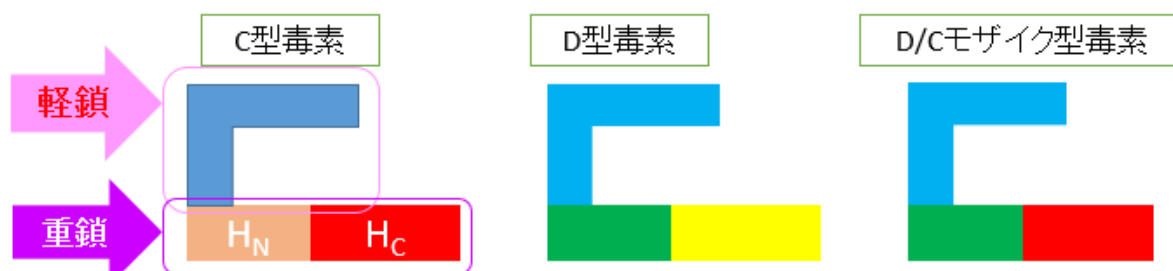


図1 C型・D型毒素の抗原構造

発生概要

発生農場(写真1)は、約40頭を飼養する肥育農場で、配合飼料と乾草を購入して給与していた。夏場は雑草を含む青刈り飼料も給与しており、水は井戸水を給与。素牛の導入は不定期で、牛舎にはカラスの侵入が多く見られた。

平成28年7月中旬以降、起立不能と死亡が続発し、2頭死亡、3頭起立不能になった時点で診療獣医師から検診依頼があり、死亡牛2頭、起立不能牛2頭、野鳥糞便、敷料についてボツリヌス検査を含む病性鑑定を実施した。

その後本農場では牛ボツリヌス症のワクチン接種を継続していたが、平成29年1月にワクチン未接種導入牛で再び急死事例が発生し、起立不能も続発。病性鑑定は死亡牛1頭、起立不能牛1頭の直腸便、野鳥糞便に加え、今回は無症状の同一房同居牛1頭(後に起立不能)の直腸便、6箇所(牛床由来材料)について実施した。



写真1 発生農場

一般病性鑑定 材料と方法

1 供試材料

7月の発生では死亡牛2頭を、1月の発生では死亡牛1頭を供試した。

2 方法

(1)細菌学的検査

死亡牛の主要臓器および第四胃・直腸内容物について、 β -NAD加羊血液寒天培地(37℃、24~48時間、好気および微好気)、DHL寒天培地(37℃、24~48時間、好気)、CW寒天培地(37℃、24時間、嫌気、7月のみ)での分離培養を実施した。

(2)ウイルス学的検査

死亡牛の主要臓器からのウイルス分離を実施した。

(3)病理学的検査

死亡牛の主要臓器を 10%中性緩衝ホルマリンで固定し、パラフィン包埋、薄切後、ヘマトキシリン・エオジン染色して観察した。

(4) 生化学的検査(7月のみ)

死亡牛 2 頭の肝臓、腎臓、胃内容について、シェーレル法(黄リン)、シェーンバイン・パーゲンステッヘル法(青酸)、ラインシュ法(砒素、アンチモン、水銀)にて対象の検出を実施した。

一般病性鑑定 結果

1 細菌学的検査

7月の死亡牛のうち、肺炎症状を示した1頭の肺から *Mannheimia haemolytica* が分離されたが、死亡との関係は不明。その他の検体から有意な菌は分離されなかった。

2 ウイルス学的検査

全ての検体からウイルスは分離されなかった。

3 病理学的検査

7月死亡の2頭に小腸小動脈・細動脈のフィブリノイド変性が共通して認められ、肺炎症状を示した1頭では壊死性化膿性気管支肺炎や線維索性胸膜肺炎像が認められた。また、1月の事例では、第一胃に潰瘍性胃炎、肺の一部に化膿性肺炎が認められたが、どちらの事例も死亡に直接関与するような所見は見られなかった。

4 生化学的検査

全ての検体において、全項目陰性であった。

ボツリヌス検査 材料と方法

検診時の状況から牛ボツリヌス症を疑い、一般細菌の検査に並行して、農研機構動物衛生研究部門の定めるマニュアル²⁾ に準じたボツリヌス検査を実施。本来は、まず検体から直接毒素の検出を試み、その後増菌培養液からの検出を行うが、当所ではマウスの調達に時間がかかることから、直接検出は行わず、加熱処理増菌培養液のみ検査を実施。市販のPCRプライマーセットによる毒素遺伝子検索も実施した。

1 供試材料

(1)7月の発生

死亡牛2頭の第一胃内容物と直腸内容物、敷料（3牛房分を1プール）、野鳥糞便を供試した。

(2)1月の発生

死亡牛1頭の第一胃内容物と直腸内容物、採材時無症状（後に起立不能）の同一房同居牛1頭の直腸便、起立不能牛1頭の直腸便、敷料（6箇所）、野鳥糞便を供試した。

2 方法

(1)7月の発生

検体を強化クックドミート培地で37°C3~7日間嫌気培養し、4倍希釈した培養上清をマウス腹腔内に接種して最長4日間観察。腹壁の振動・陥凹などの特有症状を呈して死亡したものを毒素陽性とした（毒素検査）。また、培養上清について、市販のプライマーセットを用いたPCR法による毒素遺伝子スクリーニング（以下、PCR）も実施した。毒素検査陽性検体については、C型及びD型抗血清と混合し、最終濃度4倍としてマウス腹腔内に接種。マウス生死により毒素型別を行った（毒素中和法）。

(2)1月の発生

検体を強化クックドミート培地で37°Cで4ないし10日間嫌気培養後、7月に使用したのと同じプライマーセットでPCRを実施した。PCR陽性検体については、マウス腹腔内接種による毒素検査を実施後、陽性検体のみ、7月と同様に毒素中和法による毒素型別を実施した。

ボツリヌス検査 結果

1 7月の発生

毒素検査では、死亡牛由来材料や敷料はPCR・マウス接種による毒素検査ともにすべて陰性であり、野鳥の糞便のみ、PCRではD型陽性、マウス接種による毒素検査でも陽性であった。

毒素型別では、D型抗血清と混合した検体を接種したマウスのみ生存した。これにより、野

表1 毒素検査結果(7月)

材料	PCR結果	マウス接種法結果
死亡牛 (胃・直腸内容)	陰性	陰性
起立不能牛 (直腸便)		
発症牛飼養牛房 敷料		
野鳥糞便	D型陽性	陽性

鳥糞便検体の中にはD型のB o N Tが存在することが証明された。

表 2 毒素型別(毒素中和法)結果(7月)

材料	試験区分	結果
野鳥糞便	コントロール	死亡
	C型中和	死亡
	D型中和	生存

2 1月の発生

死亡牛の直腸内容と同一房同居牛の直腸便でPCRがD型陽性であり、マウス接種による毒素検査でも陽性であった。敷料は6箇所のうち4箇所がPCRでD型陽性、マウス接種でも陽性であった。起立不能牛直腸便と野鳥糞便はPCRで陰性となった。

毒素型別では、同一房同居牛の直腸便と、敷料のうち2箇所においては、D型抗血清のマウスのみ生存し、これらの検体についてはD型のB o N Tが存在することが証明された。しかし、死亡牛直腸内容と敷料のうち1箇所については、C型・D型どちらの抗血清を接種したマウスも生存し、残りの敷料1箇所については、コントロールとして培養上清のみを接種したマウスも含め、全てのマウスが生存した。これらの結果から、死亡牛直腸内容および敷料の1箇所については、B o N Tは存在するものの血清型は不明、敷料残り1箇所については、判定不能となった。

このため、血清型が特定できなかった検体について、検体からの菌分離とPCRによる毒素遺伝子型別を大阪府立大学に依頼した。このPCRは、前述の市販キットとは違い、モザイク型毒素も

表 3 毒素検査結果(1月)

材料	PCR結果	マウス接種法結果
死亡牛(胃・直腸内容)	D型陽性※	陽性※
同一房同居牛(直腸便)	D型陽性	陽性
発症牛飼養牛房敷料	D型陽性※※	陽性※※
起立不能牛(直腸便)	陰性	NT
野鳥糞便		

※：直腸内容のみ陽性 ※※：採材6箇所中4箇所のみ陽性

表 4 毒素型別(毒素中和法)結果(1月)

材料	試験区分	結果
同一房同居牛(直腸便)敷料(2箇所)	コントロール	死亡
	C型中和	死亡
	D型中和	生存
死亡牛(直腸内容)敷料(1箇所)	コントロール	死亡
	C型中和	生存
	D型中和	生存
敷料(1箇所)	コントロール	生存
	C型中和	生存
	D型中和	生存

型別できるもの⁴⁾で、本来は菌分離をして寒天培地上に発育したコロニーを検体とする。今回の事例では、菌分離はできなかつたため、増菌培養液の上清を用いて実施したところ、敷料1箇所の検体からD/Cモザイク型毒素遺伝子が検出された。

診 断

一般病性鑑定及びボツリヌス検査において、7月の症例では、野鳥糞便のみボツリヌスD型毒素が検出され、牛由来材料からは非検出であった。しかし臨床症状などから牛ボツリヌス症を疑い、ワクチンを起立不能牛以外全頭に接種、その後続発がなかつたことから、牛ボツリヌス症であった可能性が高いと考える。

1月の症例では、死亡牛直腸便は型別不明となったものの、採材後に起立不能となった同一房同居牛および敷料からD型毒素が検出されたことや、発症牛の大半がワクチン未接種牛だったことから、牛ボツリヌス症と診断した。さらに、毒素遺伝子型別PCRで敷料からD/Cモザイク型毒素遺伝子が検出されたことや、毒素中和法による型別でもCおよびD型両方のマウスが生存したことから、本症例にはD/Cモザイク型毒素産生株が関与していたものと考えられた。

考 察

牛ボツリヌス症の症例では、必ずしも発症牛からB o N Tやその遺伝子が検出されているわけではなく、発症牛や環境材料を含む検体からのB o N T遺伝子の検出率は、数%~30%というデータもある⁵⁾。今回の7月の事例では牛由来材料からは検出されなかつた。本事例は、毒素ではなく菌（芽胞）を経口摂取し、消化管内で発芽・増殖した菌が産生したB o N Tが吸収され、血行性に末梢神経に達して発症したものと思われ、芽胞を摂取してから発症までタイムラグがあると考えられる。腸管内で栄養型菌ばかりになった場合や、菌数が少ない場合などは、当所が実施している検査法（芽胞を増菌培養液中で加熱により発芽・増殖させ、十分にB o N Tを産生させてから検出することを想定）では、増菌培養しても十分な量のB o N Tが産生されない可能性があると考えられる。また、牛床等の環境の汚染度が低い場合、複数箇所をプールした材料では、検出できない可能性がある。このような場合、1月の事例のように、見かけ上健康な同居牛も採材することで、体内に摂取された芽胞や菌数が減少する前に検査に供することができ、培養上清に十分量のB o N Tを産生させることができる。

また、今回のようなモザイク型毒素による牛ボツリヌス症でも、検体中のB o N T量が十分ならば

毒素の型別は可能である。しかし、検体中のB o N T量が微量の場合、C型抗血清でも一部中和されてマウスが生存するなど、判定不能となることもある。1月の事例で毒素型別が「型別不能」や「判定不能」となったのは、毒素検査時には致死量を越えるB o N Tが検体に含まれていたためにマウスは特有症状を示して死亡したが、毒素型別を実施するまでの準備に時間がかかり、培養上清中のB o N Tが分解され、マウス致死量を下回ったためと思われる。

今後、牛ボツリヌス症をより確実に診断するため、採材時には、発症牛だけでなく未発症同居牛も必ず採材することが重要である。初発生農場など、環境汚染度が低いと思われる農場では、敷料は個別に検査するのが望ましいと考える。また、検査においては、保存時に毒素が減少しないよう希釈濃度を調整するなど、培養上清の保存方法を検討し、検査精度を上げてゆきたい。あわせて、可能な限り毒素検査と毒素型別を同時並行で実施するなど、臨機応変に手順を変更し、迅速な診断につとめたい。

謝辞：毒素型別P C R及び菌分離を実施していただいた、大阪府立大学生命環境科学研究科獣医感染症学研究室の幸田知子先生に深謝いたします。

引 用 文 献

- 1) 函城悦司：MP アグロジャーナル、No. 6、12-19（2011）
- 2) 国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構 動物衛生研究部門 細菌検査マニュアル http://www.naro.affrc.go.jp/niah/disease/bacteria_man/botulinus/index.html
- 3) 小崎俊司、幸田知子、中村桂司：家畜診療、59 巻 3 号、131-138（2012）
- 4) Nakamura K et al. :Veterinary Microbiology、140、147-154（2010）
- 5) 田原鈴子、澤田勝志：日獣会誌、68、629-633（2015）