乳用牛のリステリア症の発生と給与中のサイレージからのリステリア菌の分離

叶内恒雄^{*1)} 小林正人^{*2)} 鶴田 実^{*2)} 蘇武秀名^{*3)} 新関博夫^{*4)} 早坂恭二^{*3)}

(昭和 62 年 10 月 16 日受理)

Listeriosis in a Dairy Cow and Simultaneous Isolation of the Causative Agent from Silage.

TSUNEO KANAUCHI (Yamagata Prefectural Animal Husbandry Experiment Station, Higashine, Yamagata 999-37), MASATO KOBAYASHI, MINORU TSURUTA, HIDENA SOBU, HIROO NIIZEKI and KYOJI HAYASAKA

SUMMARY

In May, 1985, a Holstein cow suffered from nervous symptoms and was condemned within a day. Pathological examination revealed local necrosis, degeneration of nerve cells and perivascular infiltration mainly in the brain stem. *Listeria monocytogenes* type 4b was isolated from the brain stem. Simultaneously, the same bacteria were isolated from the deteriorated silage feed. This result showed a good agreement with the isolated from the cow biochemically and serologically. Consequently, the silage seemed to be responsible for the disease.

要 約

1985 年 5 月、ホルスタイン種雌成牛 1 頭に神経症状を伴った疾病が発生し、翌日に鑑定殺された。病理組織学的検査で脳幹部に壊死巣、神経細胞の変性および囲管性細胞浸潤などが認められた。また、細菌学的検査では、脳幹部より *Listeria monocytogenes* type 4b が分離され、同時に給与されていた変敗サイレージからも同じ血清型の本菌が分離された。分離した 2 株の生物学的および生化学的性状は一致するものであった。

以上の成績から、本症例は給与されていたサイレージの汚染に起因するものと考えられた。

わが国における家畜のリステリア症の初発例は、田島¹⁾により病理学的観察例が報告されている。次いで旭²⁾が山羊からリステリア菌を分離して以来、本菌による家畜の散発例は数多く報告されている。

本病の感染源についての疫学的研究は比較的少ない。OLAFSON³⁾, GRAY^{4, 5)}, PALSON⁶⁾らはめん羊の本病の発生について、感染源として変敗サイレージをあげており、旭¹⁰⁾もまた、めん羊リステリア脳炎の集団発生例について、本菌に汚染した草サイレージ給与が原因となったことを明らかにしている。しかし、これらの報告はいずれもめん羊の発生例と感染源の追求であり、牛についてこ

の種の報告は見当たらない。

今回、著者らはデントコーンサイレージの給与との係わりが示唆された牛のリステリア症の 1 症例に遭遇し、若干の知見を得たのでその概要を報告する。

1. 材料および方法

1) 材 料

1985 年 5 月 2 日に鑑定殺したホルスタイン種成牛および給与されていたデントコーンサイレージを検査材料とした。

2) 病 理 学 的 検 査

放血殺して肉眼的に病変を観察した後、各臓器を 10% ホルマリン液で固定し、常法にしたがい薄切してヘマトキシリン・エオジン染色を施して病理組織学的に観察した。

3) 細 菌 学 的 検 査

(1) 分離培養：鑑定殺牛の主要臓器を 10% 羊血液寒

*1) 山形県立畜産試験場 (東根市東根甲 7477-1)

*2) 山形県最上家畜保健衛生所 (新庄市金沢字大道上 2034)

*3) 山形県中央家畜保健衛生所 (山形市漆山 736)

*4) 山形県西村山地方事務所 (寒河江市西根字石川西 355)

天, DHL 寒天および GAM 寒天培地に直接塗抹して好気培養およびガスバック法による嫌気培養を実施した。さらに, 脳幹部をブイヨン加乳剤とし, 4℃ 7 日間増菌した後, 上記寒天培地を用いて菌分離を試みた。いっぽう, 供試サイレージ 5 g に滅菌リン酸緩衝液 50 ml を加え, 乳鉢で磨砕し, ガーゼ濾過した後, 7,000 rpm 30 分遠心し, その沈渣を培養材料とした。

(2) 生物学的・生化学的性状: 生物学的性状 21 項目および炭水化物の分解能 14 項目について調べた。なお, 参照株として羊由来 *Listeria monocytogenes* 4b 株を用いた。

4) 動物試験

分離菌をブレインハートインフュージョンに 37℃ で 1 夜培養して得られた 10⁹ 個/ml のものを接種菌液とした。

(1) ウサギ接種試験: 体重約 2 kg のウサギ 2 頭の眼結膜嚢内に菌液を 1 滴接種した。さらに, 体重約 3 kg のウサギ 3 頭を用い, 0.5 ml を 1 頭に, 0.2 ml を 2 頭の耳静脈内に接種し, 経時的に採血して血液学的検査を行うとともに, 死亡例については剖検し菌分離を試みた。

(2) マウス接種試験: 体重 25 g のマウス 11 頭を用い, 菌液 0.2 ml を腹腔内 (4 頭) に, 口唇部皮下 (4 頭) に各々接種し, 他の 3 頭を無処置対照とした。死亡例については剖検し, 菌分離を試みた。

5) 薬剤感受性試験

一濃度ディスク法 (昭和) により, 参照株としてめん羊由来 4b 株を用いた。

2. 検査成績

1) 発生状況

発生農家は山形県最上郡大蔵村に所在し, ホルスタイン種成牛 7 頭を飼育していたが, 1985 年 5 月 1 日に 1 頭が発病した。患畜は前駆症状を伴わず, 起立困難と発熱 (39.0℃) で発見され, 加療により一時起立したが再び嚥下困難, 挙動不安, 知覚過敏, 斜頸等の神経症状を示し, 開口呼吸, 流涎もみられた。翌日には横臥, 呼吸促迫, 知覚反射消失に陥り鑑定殺された。

同居牛に異常は認められなかったが, 給与されていたデントコーンサイレージは変敗臭が強く, pH 4.8~7.0 でカビの発生がみられた。

2) 病理学的検査成績

(1) 血液学的検査: ヘマトクリット値 40, 白血球数 14,400, 白血球百分比は Ba: 0, Eo: 0, Met: 3, St: 7, Seg: 55, Ly: 26, Mo: 7, その他: 2 で, 血液濃縮と核の左方転移を判った好中球増多が認められた。

(2) 剖検所見: 外貌所見では右眼球の陥没および角膜の白濁と乾燥, 腰背部皮下の軽度の気腫がみられ, 口腔内に乾草が充満していた。剖検所見では肺の間質性気腫がみられたほか著変は認められなかった。

写真 1 中脳実質の粗鬆化と好中球浸潤グリアの増殖 (HE 染色 ×150)

写真 2 大脳脚, リンパ球を主体にした囲管性細胞浸潤 (HE 染色 ×60)

(3) 組織所見: 病変は中脳および脳橋を中心とした脳幹部に主座し, 好中球, グリア細胞および組織球系細胞の集簇を伴った大小の壊死巣, 神経細胞の変性, 円形細胞を主体とした囲管性細胞浸潤, 大脳脚の壊死巣周囲に多核巨細胞の出現等がみられた。

3) 細菌学的検査成績

(1) 菌分離: 脳幹部乳剤の増菌材料から溶血性を示す乳青色, 露滴状のコロニーが発育し, サイレージからも同様のコロニーが分離された。しかし, 主要臓器の直接塗抹培養では菌は分離されなかった (表 1)。

表 1 細菌検査成績

材 料	血液寒天	GAM 寒天	DHL 寒天
脳幹部増菌乳剤*	+	+	—
大 脳	—	—	—
小 脳	—	—	—
延 髄	—	—	—
主要臓器など**	—	—	—
サイレージ	+	+	—

注) *: 脳幹部乳剤を 4℃ に 7 日間静置, 増菌した

** : 肺, 肝臓, 腎臓, 心臓および腎部筋肉を検査した

表2 分離菌の生物学的性状

項 目	分離菌	参照株
形	短小桿菌	短小桿菌
グラム	+	+
運動性	+	+
カタラーゼ	+	+
オキシダーゼ	—	—
溶血性	+	+
V. P	+	+
M. R	+	+
エスクリン	+	+
硝酸塩還元	—	—
ゼラチン液化	—	—
ウレアーゼ	—	—
アルギニン	—	—
クエン酸	—	—
4℃ 発育	+	+
15℃ 発育	+	+
45℃ 発育	+	+
鞭 毛	+	+
6% 以上食塩耐性	+	+
炭水化物の分解	F	F
ブドウ糖ガス産生	—	—
グルコース	+	+
ラクトース	+	+
マルトース	+	+
マンニット	—	—
サリシン	+	+
サッカロース	—	—
トレハロース	+	+
キシロース	—	—
アラビノース	—	—
ソルビトール	—	—
ガラクトース	—	—
ラフィノース	—	—
メリビオース	—	—
スターチ	—	—

(2) 分離菌の生物学的・生化学的性状および血清型：分離菌は表2に示したように、グラム陽性の短小桿菌で短連鎖を示すものもみられ、運動性があり、 β 溶血を示し、ゼラチン液化、硫化水素産生および硝酸塩還元はいずれも陰性で、カタラーゼ、VP, MR, 4℃ での発育および6% 食塩耐性試験はいずれも陽性を示した。また、糖分解能では、グルコース、ラクトース、マルトース、サリシン、トスハロースを分解し、マンニット、サッカロース、その他の炭水化物を分解しなかった。これらの諸性状から、分離菌は *Listeria monocytogenes* (以下、L 菌) と同定された。また、血清型別では 4b 型に属した。

4) 動物試験成績

(1) ウサギ眼接種：No. 1 は、2 日目に接種側の眼結膜の充血、3 日目には大量の膿性眼じ付着および強度の角結膜炎に陥り、Anton の眼反応陽性が確認された。

図1 静脈内接種したウサギの白血球数と単球の比率の変化

表3 マウスに対する接種試験成績

投与方法	頭数	症状及び転帰	菌の回収
腹腔内	4	1 日後死亡	+
口唇部皮下	4	結膜炎、震戦、2 日後死亡	+
対 照	3	異常なし	・

注) 菌は培養液 (10^9 個/ml) を 0.2 ml 接種した

No. 2 は、少量の眼じが認められたが、回復した。

(2) ウサギ静脈内接種：菌液 0.5 ml を接種したウサギ No. 1 は 3 日目に死亡し、脳、肺、肝臓、腎臓、心臓、脾臓から接種菌が純粋の形で回収された。菌液 0.2 ml を接種したウサギ 2 頭のうち、No. 2 は接種後 4 日目から単球が増加し、7 日目に殺処分した。また、No. 3 は図1に示したように接種後 2 日目から単球が増加し、3 日目にピークとなり、以後減少した。

(3) マウス接種試験：腹腔内接種群は接種後 1 日目に 4 頭とも死亡した。また、口唇部皮下接種群は 1 日目に全例とも強度の結膜炎と眼じ、および震戦がみられ、2 日目に全例死亡した。剖検の結果、全例の肝に灰白色の壊死斑が認められ、脳と肝について菌分離を試みたところ、全例から接種菌を純粋に回収することができた。

5) 薬剤感受性試験成績

分離菌について 11 種の薬剤感受性を調べた結果、アミノペンシリン、テトラサイクリン、オキシテトラサイクリン、エリスロマイシン、カナマイシンに対して卅、ペニシリン、ストレプトマイシン、クロラムフェニコールに対して卅の感受性を示したが、フラジリド、サルファ剤 2 種については感受性がなかった。

3. 考 察

本症例は当初、皮下気腫の存在から嫌気性菌感染症が疑われたが、稟告による嚥下困難、斜頸等の神経症状の存在、細菌検索の結果 L 菌が分離されるに至り、リス

リア症と診断された。また、本症例の病理組織所見、分離菌の生物学的・生化学的性状、血清型(4b)、実験動物に対する病原性、薬剤感受性は従来の多くの記載^{8,9,13,15)}に一致するものであった。わが国の家畜の本症発生は、北日本に多く^{7-9,12-14)}、春に多発し、脳炎型が最も多いとされているが、流死産例^{15,19,20)}も少数報告されている。本症例は脳炎型に一致するものであった。山形県下での本症の発生歴としては1958年人の髄膜炎例¹⁶⁾の報告があり、その後牛の類似疾病例¹⁷⁾、めん羊の発生例¹⁸⁾がある。

アイスランドでは、1910年頃から本症とサイレージの係わりが想定されていて、めん羊のサイレージ症として知られていた。MURRAYらがウサギの敗血症例からグラム陽性小桿菌を分離し、*Listeria monocytogenes*と命名した。その後、GILLがめん羊の旋回病の原因がL菌によることを明らかにしている。しかし、本症の感染源についての疫学的研究は比較的少ない。OLAFSON³⁾、GRAY^{4,5)}、POLSON⁶⁾らは、めん羊の発生例について感染源として変敗サイレージをあげており、わが国では、旭¹⁰⁾がめん羊のリステリア脳炎の集団発生例について、L菌に汚染した草サイレージ給与が原因になったことを明らかにしている。今回、著者らは単発例ではあるが、神経症状を示した乳用牛の脳および給与中のデントコーンサイレージから同一血清型(4b型)のL菌を同時に分離することができた。このことは、L菌に汚染したサイレージの給与が本症を引き起こしたことを示唆している。旭¹¹⁾は、サイレージ内でのL菌は6~18℃、pH 5.5以上で発育増殖する可能性があることを述べており、今回L菌が分離された給与サイレージもpH 4.8~7.0でカビの発生も認められた変敗サイレージであった。

従来、臓器からL菌を分離する場合には直接塗抹培養法と臓器乳剤の低温増菌法とを併行して行っている。また、旭¹⁰⁾はサイレージからL菌を分離する場合も可検サイレージを低温処理した後に37℃で分離培養を行っている。今回、著者らは、可検サイレージからL菌を分離するにあたり遠心操作を用いL菌を分離した。したがって、菌量の少ないと思われる試料からL菌を分離するう

えて今後試みるべき方法として考えられる。

終わりに、リステリア菌参照株を分与していただいた農林水産省家畜衛生試験場東北支場、血清型別のご配慮をいただいた北里大学獣医畜産学部獣医衛生学教室の椿志郎教授、また種々ご協力をいただいた山形県農業共済組合連合会最上家畜診療所の諸先生方に深謝いたします。

引用文献

- 1) 田島正典：日獣誌，12，241~248 (1950)。
- 2) 旭 興正，細田哲哉，秋山 綽，ほか：家畜試験報告，27，289 (1953)。
- 3) OLAFSON, P.: *Cornell Vry.*, 39, 141~150 (1940)。
- 4) GRAY, M. L.: *The Veterinary Bulletin*, 241 (1961)。
- 5) GRAY, M. L.: *The Veterinary Bulletin*, 260 (1964)。
- 6) PALSON, P. A.: *The Veterinary Bulletin*, 260 (1964)。
- 7) 細田哲哉，旭 興正，秋山 綽，ほか：日獣会誌，7，493~497 (1954)。
- 8) 久米常夫，左々木 昇，附田政三：日獣会誌，12，67~70 (1959)。
- 9) 秋山 綽，伊左山康郎，柴田重孝，ほか：家畜試験報告，54，1~12 (1976)。
- 10) 旭 興正：家畜試年報，Ⅵ，129~130 (1966)。
- 11) 旭 興正：家畜試年報，Ⅶ，171~176 (1967)。
- 12) OHSHIMA, K., MIURA, S., NUMAKUNAI, S., et al.: *Jpn. J. Vet. Sci.*, 36, 183~185 (1974)。
- 13) 岡 基，石野清之，照井信一，ほか：日細菌誌，30，529 (1975)。
- 14) 芝田英一，中野良宣，大岩 良，ほか：日獣会誌，31，345~347 (1978)。
- 15) 原文男，上野八朗，白石忠昭，ほか：日獣会誌，36，205~209 (1983)。
- 16) 伊藤泰一，左々間友男，内海治郎，ほか：新潟医学会雑誌，73，872~876 (1959)。
- 17) 佐藤 彪，ほか：山形県獣医師会報特集号，第2巻，41~44 (1982)。
- 18) 斉藤文生，ほか：山形県獣医師会報，44，5~8 (1986)。
- 19) 清水亀平次，白幡敏一，黒川俊男，ほか：日獣誌，28 (学会号) 465 (1966)。
- 20) 中村英樹，吉田幸雄，桐原陽子：日獣会誌，38 (学会特集号) 185~186 (1985)。