

## 7 搾乳牛で発生した脳炎型リステリア症について

中央家畜保健衛生所

○石田 扇子・森谷 翠・松本 祐治

### I はじめに

*Listeria monocytogenes* (以下、Lm) は広い宿主域をもつグラム陽性無芽胞性短桿菌である。4℃で発育する低温増殖能や細胞内寄生といった特徴を持つほか、食中毒の原因にもなることから公衆衛生上重要な菌である。血清型は O 抗原 (菌体) と H 抗原 (鞭毛) の組み合わせにより 10 以上に型別されるが、人や動物から分離される株は 4b 型が大部分を占める<sup>1)</sup>。

牛リステリア症の病原体は主に Lm であり、発生時期は春先の 3～6 月が多い。発生は散発的で、原因は主に変敗サイレージ等の汚染飼料の経口摂取と言われており、口腔粘膜内の傷から菌が侵入すると斜頸や旋回運動等の神経症状、腸管から菌が侵入すると敗血症や流産を起こすとされる<sup>2)</sup>。

埼玉県内の農場における Lm の分離例は長年みられなかったが、今回、県内の一農場で流涎や神経症状を起こした牛から Lm が分離され、脳炎型の牛リステリア症と診断されたのでその概要を報告する。

### II 発生概要

令和 5 年 5 月 25 日、乳用牛 50 頭を飼養する農場において、74 カ月齢 (妊娠 3 か月) の当該牛に流涎、左眼瞼浮腫及び歩様不安定の症状がみられた。体温が 39.6℃と高かったため、担当獣医師による治療が行われたが、翌日も症状は改善せず神経症状がみられた。この時点で同居牛に異常はなく、畜主も飼養継続を希望したため、生体や環境から検体を採取し、原因究明と治療方針決定のため、1 回目の病性鑑定を実施した。その後も症状が悪化し、同月 27 日から起立不能や食欲廃絶がみられ、28 日に畜主が予後不良と判断後、29 日朝に死亡したため、改めて 2 回目の病性鑑定を実施した。

### III 材料および方法

#### 1 材料

##### (1) 5 月 26 日搬入

EDTA 加血、ヘパリン加血、血清、直腸便、鼻腔スワブ、サイレージを検査に供した。サイレージは当該牛に給与した現物が残っていなかったため、同ロットのものを採取した。

(2) 5 月 29 日搬入

死体 1 頭のほか、死亡直前に採材した EDTA 加血と血清を検査に供した。

2 方法

(1) 病理学的検査

剖検後、定法に従い、病理組織標本を作製し、HE 染色・グラム染色を行った。

(2) 血液生化学検査

EDTA 加血液は、血液一般検査（赤血球数（RBC）、白血球数（WBC）、ヘマトクリット値（Ht）、白血球百分比：アークレイ社、CB - 1000、京都）に供し、フィブリノーゲン値（Fib）を加熱沈殿法で測定、血清は生化学検査（グルコース（Glu）、総蛋白質（TP）、アルブミン（Alb）、アルブミン/グロブリン比（A/G）、LDH、総コレステロール（T-Cho）、AST、 $\gamma$ -GTP、総ビリルビン（T-Bil）、尿素窒素（BUN）、トリグリセリド（TG）、クレアチニン（Cre）、カルシウム（Ca）、無機リン（iP）、マグネシウム（Mg）、ナトリウム（Na）、カリウム（K）、クロール（Cl）：アークレイ社、スポットケム D、京都）に供した。

(3) 細菌学的検査

①一般細菌分離

母牛の肝臓、脾臓、腎臓、心臓、肺、心嚢水、左右大脳、延髄、脊髄液、羊膜、羊水、鼻腔スワブ及び胎子の肝臓についてコロンビア 5%羊血液寒天培地（ベクトン・ディッキンソン社）を用いて 37°C 5%CO<sub>2</sub> 下で 48 時間培養を行った。また DHL 寒天培地（栄研化学）を用いて 37°C 好気条件下で 24 時間培養を行った。

②Lm 増菌・分離

母牛の肝臓、脾臓、腎臓、心臓、肺、左右大脳、延髄、羊膜及び胎子の肝臓については、各臓器乳剤をブレインハートインフュージョンブロス（ベクトン・ディッキンソン社）に接種後 4°C 10 日間静置し、クロモアガーリステリア培地（関東化学）に塗抹後、37°C 24 時間培養により Lm の分離を試みた。

母牛の直腸便およびサイレージについては、UVM- I 培地（OXOID 社）で 30°C 24 時間培養後、さらにフレーザー培地（OXOID 社）で 37°C 24 時間培養し、PALCAM 培地及びクロモアガーリステリア培地に塗抹し、37°C 24 時間培養を行い分離を試みた。

培地上に Lm を疑うコロニーが生えた場合は簡易同定キット（アピコリネ及びアピリステリア、バイオメリユー・ジャパン社）による生化学性状試験で同定した。Lm と同定された株はリステリア型別用免疫血清「生研」（デンカ）を用いて血清型別検査を行った。

③Lm 遺伝子検査

②で分離された Lm コロニーと母牛の直腸便およびサイレージについて、hly、

prfA を標的遺伝子とする Lm 遺伝子検査を行った<sup>3)</sup>。コロニーとサイレージは、インスタジーンマトリクス (Bio-rad 社)、直腸便はヨーネピュアスピン (ファスマック) により抽出した。

(4) ウイルス学的検査

死亡前の臨床症状に基づき、牛アストロウイルス、牛伝染性鼻気管炎ウイルス、牛ヘルペスウイルス 5 型、流行性出血病ウイルス、牛伝染性リンパ腫の 5 種について遺伝子検査を行った。

(5) BSE 検査

牛海綿状脳症に関する特定家畜伝染病防疫指針に基づき、母牛の延髄を材料として ELISA 検査を実施した。

#### IV 検査成績

##### 1 病理学的検査

(1) 剖検

死亡前に数日間絶食した影響から、外貌は重度削瘦、眼球陥没、歯肉や舌の蒼白、皮下組織の重度乾燥がみられた。口腔内に肉眼で確認できる傷等はみられなかった。中枢神経系においては、脳の血管充盈と軟膜の軽度白濁がみられた。(図 1)



図 1 剖検所見

(2) 病理組織学的所見

中脳、橋、延髄及び脊髄では、リステリア症に特徴的なリンパ球やマクロファージなどの単核細胞を主体とする炎症細胞浸潤が血管周囲及び脳実質に認められた。

特に延髄では、軸索の膨化及び脳実質の粗鬆化もみられた。脊髄ではリステリア症の初期病変とされる微小膿瘍がみられたほか、グラム染色ではグラム陽性小桿菌が認められた。(図 2) なお、胎子の肝臓に著変は認められなかった。

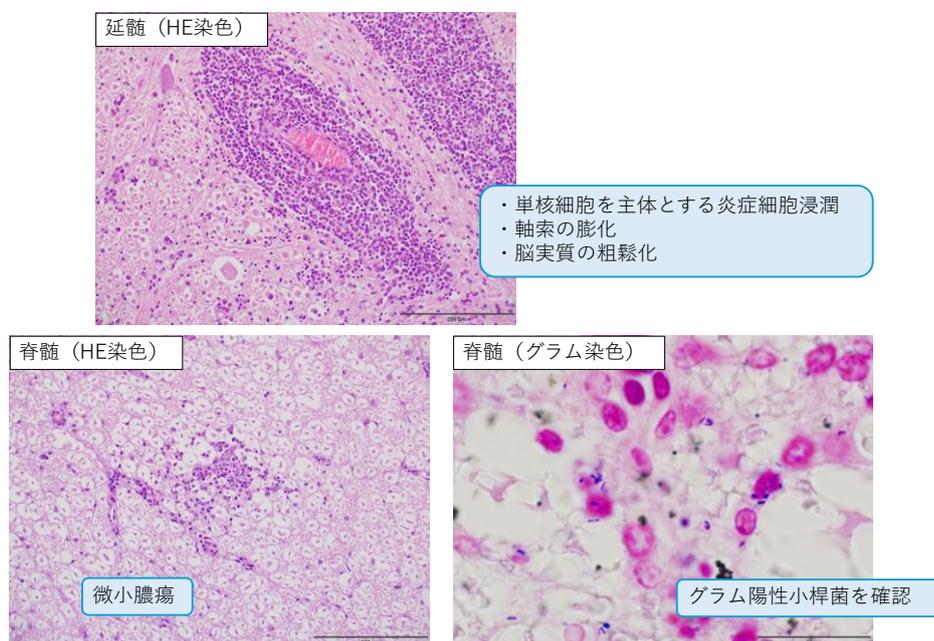


図 2 病理組織学的所見

## 2 血液生化学検査

血液検査では、好中球数とフィブリノーゲンの増加がみられたことから、細菌感染や炎症が疑われた。血液生化学検査では、Glu、TP、Alb、A/G、LDH、AST、 $\gamma$ -GTP、T-Bil、BUN、Cre、iP、Mg、K の増加がみられたことから、脱水、肝障害、腎障害が疑われた。

## 3 細菌学的検査

### (1) 一般細菌分離

すべての材料について、有意な菌は分離されなかった。

### (2) Lm 増菌・分離

延髄からクロモアガーリステリア培地上で白色ハローを伴う水色コロニーが分離された。簡易同定キットによる生化学性状試験では、アピコリネで Lm/*L.innocua* (98.9%)、アピリステリアで Lm (98.5%) と判定され、血清型別検査の結果、Lm の 4b 型と同定された。

直腸便及び胎子の肝臓、サイレージから Lm の分離を試みたが分離されなかった。

### (3) Lm 遺伝子検査

(2)で分離された Lm コロニーから Lm 特異的遺伝子が検出された。直腸便及びサイレージからはいずれも検出されなかった。

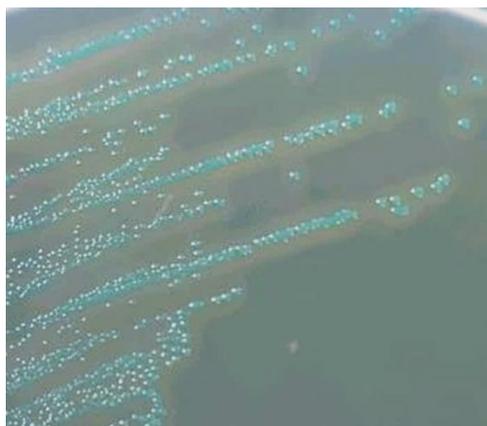


図3 Lm コロニー

#### 4 ウイルス学的検査

5種のウイルスすべてにおいて特異的遺伝子は検出されなかった。

#### 5 BSE 検査

ELISA 検査の結果は陰性であった。

### V まとめと考察

本症例では、病理組織学的検査で中枢神経系全般に単核球主体の囲管性細胞浸潤が確認され、脊髄では微小膿瘍やグラム陽性小桿菌が確認された。また、細菌学的検査でも延髄から Lm が分離されたことから、当該牛は脳炎型の牛リステリア症と診断された。

牛のリステリア症は変敗サイレージを摂取してから発症までに 1~2 カ月かかるとも言われている<sup>1)</sup>。サイレージの品質が不安定であるという畜主の稟告から、原因は変敗サイレージと推察されたが、今回は検査に供した直腸便とサイレージから Lm が分離されなかった。また、当該牛に給与したサイレージの現物がなかったことに加え、Lm が農場の外部から野生動物などにより持ち込まれた可能性も考えられたため、原因の特定に至らなかった。当該農場でその後続発は確認されていない。

牛のリステリア症は重症化するまで診断が難しく、特に脳炎型は本症例のように Lm 分離に 10 日以上を要することがあるため<sup>4)</sup>、発生を見逃す一因になっていると考えられる。リステリア症の診断には、従来の増菌・分離検査に加えて当日に結果が判明する遺伝子検査を併用することが重要である。また、農場内の Lm の浸潤状況調査として直腸便や環境材料を対象に遺伝子検査を実施することで、リステリア症の発生防止や発生後の原因究明につながると考える。

今回の事例では直腸便やサイレージから特異的遺伝子は検出されなかったが、Lm は農場周辺に限らず自然環境中に常在するとされている<sup>1) 5)</sup>。牛リステリア症はどの牛農家でも発生する可能性があり、特にサイレージを給与している農家はさらに発生リスク

が高まることを改めて県内農家にも注意喚起する必要がある。また、浸潤状況調査を行った場合はその結果を活用し、牛舎内で汚染が疑われる場所の清掃消毒やサイレージの調製・保存管理の徹底指導を行うことが重要である。

## VI 謝辞

菌株分与に御協力いただき、また発表に対する御助言を賜りました、群馬県 家畜衛生研究所 微生物係の古屋裕崇技師に深謝いたします。

## VII 参考文献

- 1) 勝部ら(1991)：わが国の家畜におけるリステリア症,日獣会誌,44,681-689(1991)
- 2) 農林水産省消費・安全局監修：病性鑑定マニュアル第 4 版,194
- 3) A Bubert *et al.* (1997):Isolation of catalase-negative *Listeria monocytogenes* strains from listeriosis patients and their rapid identification by anti-p60 antibodies and/or PCR, J Clin Microbiol. Jan;35(1):179-83.
- 4) 小久保彌太郎(1991)：食品を対象とした *Listeria monocytogenes* の検査法,J Food Microbiol.,8(1),1-11
- 5) A Belias *et al.*:(2021): Small Produce Farm Environments Can Harbor Diverse *Listeria monocytogenes* and *Listeria* spp. Populations J Food Prot January01. 84(1):113-121