

5. 黒毛和種繁殖農場で発生したリステリア症

宇佐家畜保健衛生所

○佐伯美穂 長谷部恵理 山中恒星 (病鑑) 武石秀一

家畜や人に病原性を示す主なリステリア属菌は *Listeria monocytogenes* (以下 Lm) で、本菌は土壌、家畜、家きん、野生動物など、自然界に広く分布している。リステリア症は、変敗して菌が増殖したサイレージの給与により感染・発症することが指摘されており、感染経路によって化膿性脳炎、敗血症や死流産を起こす。

また、Lm は食細胞に貪食されてもその中で増殖できる細胞内寄生細菌で、食細胞の殺菌機構から逃れるとされている。

今回、管内 2 農場で Lm による死産が発生し、対策及び追加検査を実施したので、その概要を報告する。

【事例 1】

1 農場概要及び発生状況

成牛 44 頭、育成牛 8 頭を飼養している黒毛和種繁殖農場で、WCS、イタリアン、オーツヘイ、野草及び配合飼料を給与している。

2019 年 1 月 18 日に、分娩房で母牛 1 頭が食欲不振になり、20 日に胎齢 260 日で死産、翌 21 日に胎子の病性鑑定を実施した。

2 病性鑑定

(1) 材料及び方法

血液検査、解剖検査、病理組織学的検査及び細菌学的検査を定法に従い実施した。

(図 1)

(2) 成績

①母牛の血液検査所見：総白血球数が 3000/ μ l に減少し、GOT は 264U/l に上昇していた。(表 1)

②剖検所見：体幹や頭部で皮下水腫がみられ、血様の胸水及び腹水が貯留していた。また、肝臓は著しく融解していた。(図 2)

③病理組織学的検査：諸臓器で小型のグラム陽性菌による菌塞栓が認められた。(表 2、図 3)

④細菌学的検査：胎子の全臓器、母牛の胎盤と糞便、未使用敷料から Lm が分離された。(表 3)

●血液検査
 ◆材料：血液（母牛）

●解剖検査
 ◆材料：胎子

●病理組織学的検査
 ◆材料：胎子（主要臓器、脳、消化管、眼球及び骨格筋）、胎盤
 ◆方法：定法によるHE染色
 菌塊がみられた場合はグラム染色（Brown-Hopp法）を実施

●細菌学的検査
 ◆材料：①胎子（主要臓器及び脳）
 ②胎盤
 ③母牛の糞便
 ④倉庫内の未使用敷料
 ◆方法：①5%綿羊血液加寒天培地（好気・嫌気）及びDHL寒天培地を用いた菌分離検査
 →分離された菌についてアピを用いて菌種同定
 ②③④各検体の乳剤を、UVM培地を用いて増菌
 →Fraser培地を用いて増菌
 →クロモアガーシステリア培地を用いて分離培養
 ※増菌培養液（Fraser培地）のうち2代目までで分離がみられなかったものについてはPCR法を実施

図1 病性鑑定（材料及び方法）

表1 病性鑑定成績-1

●血液検査所見（母牛）

検査項目	測定値	単位
WBC	30 ↓	$\times 10^3 / \mu\text{l}$
RBC	587 ↓	$\times 10^6 / \mu\text{l}$
Ht	32.4	%
GOT	264 ↑	U/l
GGT	20	U/l
BUN	6.5	mg/dl
CPK	348 ↑	U/l
TP	5.7 ↓	mg/dl
T-CHO	36 ↓	mg/dl
Alb	2.5 ↓	g/dl
Na	85 ↓	
K	2.6 ↓	
Cl	57 ↓	
A/G比	0.78	

好中球 白血球百分比 (%)	桿状	1
	2分葉	1
3分葉	2	
4分葉	0	
好塩基球	0	
好酸球	0	
単球	4	
リンパ球	92	

●剖検所見

皮下水腫 皮下水腫

胸水貯留 腹水貯留 融解

図2 病性鑑定成績-2

表2 病性鑑定成績-3

●病理組織学的検査

臓器	組織所見
肝臓	死後融解が顕著であった。残存する細胞や血管壁には茶褐色色素や好塩基性の構造物沈着していた。
脾臓	同上
腎臓	小型の菌による菌塞栓が散見された。
心臓	心筋線維や血管壁に茶褐色色素や好塩基性の構造物が沈着していた。血管内に棒型のグラム陽性菌による菌塞栓が散見された。
肺	死後融解が顕著であった。残存する細胞や血管壁に茶褐色色素や好塩基性の構造物沈着し、小型のグラム陽性菌による菌塞栓が散見された。
脳・脳幹・脊髄	小型のグラム陽性菌による菌塞栓が多数認められた。
第一胃～四胃	小型のグラム陽性菌による菌塞栓が多数認められた。
空腸～結腸	小型の菌による菌塞栓が多数認められた。
骨格筋	小型の菌による菌塞栓が認められた。
眼球	小型の菌による菌塞栓が多数認められた。
胎盤	胎盤膜では小型のグラム陽性菌による菌塊、好中球の浸潤や血管の変性・壊死、出血が認められた。

●病理組織学的検査

◆大脳

血管内に小型の菌の集塊がみられる (対照×40)

血管内に小型のグラム陽性菌がみられる (対物×40) グラム染色

◆胎盤

菌形浸潤がみられる (対物×20)

小型の菌による菌塊、好中球浸潤がみられる (対物×40)

図3 病性鑑定成績-4

表3 病性鑑定成績-5

●細菌学的検査 (Lm)

検体	分離	PCR	
胎子	肝臓	+	NT
	脾臓	+	NT
	腎臓	+	NT
	心臓	+	NT
	肺	+	NT
母牛	胎盤	+(3代目)	+
	糞便	+(1代目)	NT
未使用敷料	No.1	-	NT
	No.2	-	NT
	No.3	+(1代目)	NT

※NT: 未実施

(3) まとめ

胎子の諸臓器の血管内に小型のグラム陽性菌による菌塞栓が認められ、胎子の主要臓器、脳、胎盤及び母牛の糞便から Lm が分離されたため、リステリア症（牛）と診断した。

3 対策

当該母牛の治療、WCS の給与の中止、牛舎と飼料や敷料を保管している倉庫の清掃及び消毒を指導した。その後、死産から 2 ヶ月後に母牛の糞便と敷料の検査を実施したが、Lm は分離されず、遺伝子も検出されなかった。

【事例 2】

1 農場概要及び発生状況

成牛 5 頭を飼養している黒毛和種繁殖農場で、飼養形態は単房式、わら、イタリアン、クローバー、ソルゴー及び丸大豆等を給与している。

2019 年 5 月 13 日に胎齢 250 日で死産し、同日、胎子の病性鑑定を実施した。

2 病性鑑定

(1) 材料および方法

血液検査、解剖検査、病理組織学的検査及び細菌学的検査を定法に従い実施した。

(図 4)

(2) 成績

- ①母牛の血液検査所見：総白血球数が 3500/μl に減少し、GOT は 123U/l に上昇していた。(表 4)
- ②剖検所見：体形異常は認めず、血様胸水の貯留がみられた。また、肝臓と腎臓は著しく融解しており、脾臓には一部血腫を認めた。(図 5)
- ③病理組織学的検査：肝臓では多発性に巣状壊死が観察され、壊死巣中心部には小型のグラム陽性菌の菌塊がみられた。肺では、肺胞や気管支腔内に小型のグラム陽性菌による菌塊、好中球の浸潤がみられた。脳では、大脳の一部血管内に小型の菌による菌塊がみられた。(表 5、図 6、図 7)
- ④細菌学的検査：胎子の全臓器及び脳、母牛の糞便と膣スワブ等の検体全てから Lm が分離された。なお、肝臓のスタンプ標本をグラム染色したところ、小型のグラム陽性菌がみられた。(表 6)

●血液検査
◆材料：血液(母牛)

●解剖検査
◆材料：胎子

●病理組織学的検査
◆材料：胎子(主要臓器、脳、消化管、眼球及び骨格筋)
◆方法：事例 1 と同様

●細菌学的検査
◆材料：①胎子(主要臓器及び脳)
②糞便
③膣スワブ
④臍窩
⑤牛床拭き取りスワブ
⑥水(ウォーターカップ内)

◆方法：事例 1 と同様

母牛 ※②～⑥：2019.5.23採材

図 4 病性鑑定(材料及び方法)

表 4 病性鑑定成績 - 1

●血液検査所見(母牛)

検査項目	測定値	単位
WBC	35 ↓	×10 ³ /μl
RBC	538 ↓	×10 ⁶ /μl
Ht	31.8 ↓	%
GOT	123 ↑	U/l
GGT	56	U/l
BUN	11.5	mg/dl
TP	7.3	mg/dl
T-CHO	74 ↓	mg/dl
Alb	2.7	g/dl
Ca	9.9 ↓	mg/dl
IP	7.5 ↓	g/dl
Mg	1.1 ↓	g/dl
A/G比	0.59	

白血球百分比 (%)	好中球		桿状	3
	2分葉			16
	3分葉			2
	4分葉			0
	好塩基球			0
	好酸球			5
単球			0	
リンパ球			74	

●剖検所見

体形異常は認めず

胸水貯留

融解

融解

血腫を認める

図 5 病性鑑定成績 - 2

表 5 病性鑑定成績 - 3

●病理組織学的検査

臓器	組織所見
肝臓	多発性に巣状壊死が観察され、壊死巣中心部には小型の菌による菌塊が認められた。 壊死巣中心部にみられた菌塊はグラム陽性菌であった。
脾臓	死後融解が顕著であった。
腎臓	微小出血が散見された。
肺	肺胞や気管支腔内に小型の菌による菌塊、好中球の浸潤がみられた。 また、胎便や羊膜上皮細胞とみられる構造物も認められた。 肺胞や気管支腔内にみられた菌塊はグラム陽性菌であった。
脳・脳幹	大脳の一部血管内に小型の菌による菌塊が認められ、髄膜には好中球が軽度浸潤していた。
骨格筋	奇変認められず。

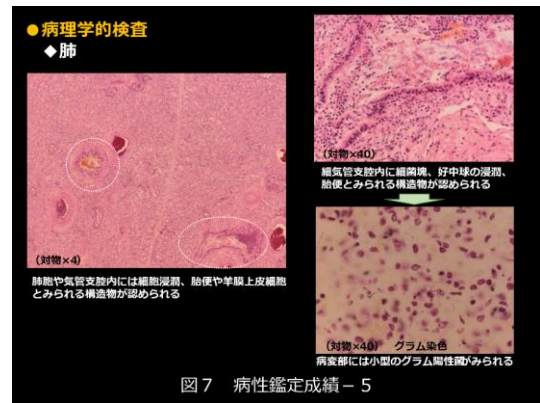
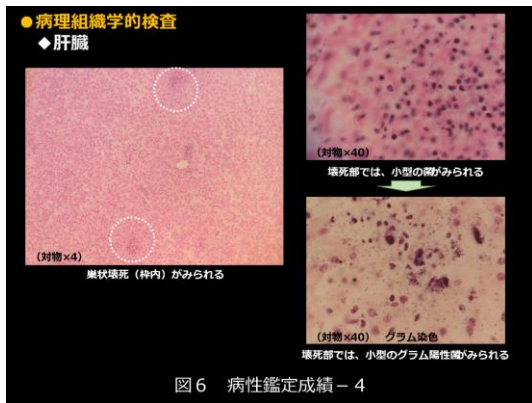


表6 病性鑑定成績 - 6

●細菌学的検査 (Lm)

検体	分離	PCR
胎子		
肝臓	+	+
脾臓	+	+
腎臓	+	+
心臓	+	+
肺	+	+
脳	+	+
糞便	+	+
母牛		
膈スワブ	+	+
臍露	+	+
牛床	+	+
水 (ウォーターカップ内)	+	+

※肝臓
スタンプ標本のグラム染色
(油膜 対物×100)

小型のグラム陽性菌がみられる

(3) まとめ

胎子の主要臓器及び脳の全てから Lm が分離されたため、リステリア症 (牛) と診断した。

3 対策

当該母牛の治療、牛舎の清掃及び消毒を指導した。

4 対策後の環境等の検査

10 日毎に消石灰による消毒を継続したにも関わらず、7 月の環境等の検査においても 4 牛房の牛床と水浸漬大豆から Lm が分離された。そのため、大豆飼料の給与の中止と牛床のゴムマットの撤去を指示し、10 日毎の消毒を継続したところ、8 月及び 11 月に実施した検査において全て分離陰性となった。(表 7、表 8)

表7 対策後の環境等検査成績 - 1

2019.7. 5 検出

牛房番号	採材箇所	Lm 分離	牛房番号	採材箇所	Lm 分離
A	糞便	-	E	糞便	-
	臍粘液スワブ	-		臍粘液スワブ	-
	水 (ウォーターカップ内)	-		水 (ウォーターカップ内)	-
	牛床①	-		牛床①	+
	牛床②	+		牛床②	-
B	糞便	-	飼料等	大豆 (一晩水に浸漬)	+
	臍粘液スワブ	-		丸大豆 (乾燥)	+
	水 (ウォーターカップ内)	-		わら+イタリアン	-
	牛床①	-		イタリアン	-
	牛床②	-		クローバー	-
C	糞便	-	牛房 (C)	★	
	臍粘液スワブ	+	牛房 (E)	★	
	牛床①	+	牛房 (D)	★	
D	糞便	-	牛房 (B)	★	
	臍粘液スワブ	-	牛房 (A)	★	
	水 (ウォーターカップ内)	-	パトック		
	牛床①	-	飼料庫		
	牛床②	+			

30 検体中 5 検体 (牛床 4 検体、飼料 1 検体) から Lm が分離された

表8 対策後の環境等検査成績 - 2

牛房番号	採材箇所 (牛床)	2019.5.23	対策①	2019.7.5	対策②	2019.8.30	2019.11.15
A	①	NT	清掃・10 日毎に消毒を実施	-	大豆の給与を中止、牛床・ゴムマットを撤去、10 日毎に消毒を実施	-	-
	②	+		+		-	
B	①	NT	-	-	-	-	
	②	NT	-	-	-	-	
C	①	NT	+	+	-	-	
	②	NT	-	-	-	-	
D	①	NT	-	-	-	-	
	②	NT	+	+	-	-	
E	①	NT	-	-	-	-	
	②	NT	-	-	-	-	

※NT: 未実施

大豆飼料の給与を中止
ゴムマットを撤去
8 月以降は環境から Lm が分離されなくなった。

5 大豆飼料からの Lm 分離再現試験

乾燥丸大豆と農場で使用している水からは Lm は分離されなかったものの、一晩水に

浸漬した大豆から Lm が分離されたことから、当該農場で使用しているバケツ内で Lm が増殖していたものと推察し、当該農場で使用しているバケツを用いて大豆飼料からの Lm 分離再現試験を実施した。

(1) 材料

当該農場の丸大豆と蒸留水

(2) 資材

当該農場使用バケツ 2 個と当所のバケツ

(3) 方法

同量の乾燥丸大豆に同量の蒸留水を加え、40 時間後の材料（水浸漬大豆）を用いて Lm 分離検査を実施

(4) 結果

15 時間半後から当該農場のバケツで発酵し始めたものの 40 時間後の全ての水浸漬大豆から Lm は分離されなかった。（図 8）



【まとめ及び考察】

管内 2 農場で Lm による死産が発生した。

2 事例の共通所見として、胎子は臓器、特に肝臓と腎臓の融解度が著しく高く、血様胸水及び腹水の貯留がみられ、母牛の血液検査所見では総白血球数が 3,000/ μ L 程度の減少と GOT の高値がみられた。2 事例しかなく、今後も例数を重ねる必要があるものの、これらの所見があった場合には Lm の関与を疑う必要があると思われた。

感染源の確定には至らなかったものの、事例 1 は石や土が多く混入した WCS、事例 2 は水浸漬大豆が感染源と考えられた。成書には変敗サイレージによるリスクが指摘されているが、今回は自家製大豆飼料から Lm が分離されたことから、感染源としてサイレージ以外も考える必要があることが分かった。

事例 2 では、バケツを洗浄しないままに使い続けたことで、バケツに混入した Lm が増加したと推察した。飼養衛生管理基準の『器具の定期的な清掃及び消毒等』と『給餌設備、給水設備等への野生動物の排せつ物等の混入の防止』の遵守で発生予防が可能であったと考えられた。

これら Lm が関与した死産事例について、県の機関紙『家保通信』で記事を掲載し、啓発を行った。今後も、変敗飼料の給与による死産リスクについて啓発を続けたい。