2009～2014年に岡山県で流行した牛ボツリヌス症の解析と対策

誌名	日本獣医師会雑誌 = Journal of the Japan Veterinary Medical Association
ISSN	04466454
著者名	田原,鈴子 澤田,勝志
発行元	日本獣医師会
巻/号	68巻10号
掲載ページ	p. 629-633
発行年月	2015年10月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council Secretariat

原　著

2009～2014年に岡山県で流行した牛ボツリヌス症の解析と対策

田原鈴子†　　澤田勝志

岡山家畜保健衛生所（〒709-2123　岡山市北区御津河内2770-1）

（2015年3月12日受付・2015年6月11日受理）

要　約

岡山県では，2009年1月～2014年3月の間，牛ボツリヌス症（D型）が11農場で発生した．糞便からボツリヌス毒素が検出された11農場から採取した環境材料（飼料，水，牛舎スワブ，野生動物糞便）のうち，野生動物糞便からの検出率が8農場中4農場と最も高率であった．11農場中2農場で，D/Cモザイク型の*C. botulinum*が分離され，パルスフィールドゲル電気泳動解析の結果，これらの菌株は同一の泳動パターンを示した．発生農場のうち，9戸が直径20kmの範囲内に位置し，菌株が分離された2戸の農場は，疫学的関連がなかった．ボツリヌスワクチン導入農場において，ワクチン未接種牛で本症が発生し，環境材料から高率にボツリヌス毒素が検出された．以上のことから，*C. botulinum*の伝播には野生動物が関与していることが示唆された．ワクチン接種は本症の発症抑制に効果的であるが，*C. botulinum*の排菌は抑制しない．*C. botulinum*の拡散防止のためには，農場内の清掃及び消毒の徹底と，野生動物の侵入防止措置などの清浄化対策が最も重要である．

――キーワード：牛ボツリヌス症（D型），D/Cモザイク型毒素，拡散防止，ワクチン，野生動物．

日獣会誌　68，629～633（2015）

牛ボツリヌス症は，グラム陽性偏性嫌気性の有芽胞桿菌である*Clostridium botulinum*（以下*C. botulinum*）が産生する神経毒素（以下BoNT）により発症する．*C. botulinum*は産生する毒素の抗原構造により，A型からG型に分類され，牛は主としてC型及びD型に高感受性である［1］．

牛ボツリヌス症は，BoNTまたは*C. botulinum*の経口摂取により発症する．体内に取り込まれたBoNTは，小腸などの消化管から末梢神経に到達し，神経伝達物質（アセチルコリン）の放出を抑制する．この結果，筋肉の収縮が阻害され，弛緩性の麻痺を引き起こす．発症牛は後躯麻痺による起立不能，呼吸筋の麻痺による呼吸困難から死亡に至る．

わが国ではじめて牛ボツリヌス症が報告されたのは，1994年の北海道で，C型毒素によるものであった［2］．2004年以降は毎年発生報告があり，全国的に牛ボツリヌス症が増加傾向にある［3, 4］．2009年12月にはボツリヌス用のワクチンが認可され，翌年6月に市販が開始された．

本県で牛ボツリヌス症が発生したのは1998年で，C型毒素によるものであった．2009年には，D型毒素による本症が発生し，その後毎年続発している．そこで，2009年1月～2014年3月に発生した本症について，分離菌の遺伝子解析，農場の疫学調査から*C. botulinum*の伝播経路について若干の知見を得たことから牛ボツリヌス症の防疫対策について報告する．

材料及び方法

発生農場：2009年1月～2014年3月に，起立不能を主訴として県内家畜保健衛生所に持ち込まれた病性鑑定事例のうち，BoNTが糞便等の牛由来材料から検出された農場とした．

毒素検出用材料：牛由来材料として，第一胃や腸などの消化管内容物及び糞便，環境材料として給与飼料（粗飼料，配合飼料，飼料添加物），給与水（水槽，ウォーターカップ，貯水タンク槽），牛舎内材料（敷料，牛舎

† 連絡責任者（現所属）：田原鈴子（岡山県農林水産部畜産課）
〒700-8570　岡山市北区内山下2-4-6　☎086-226-7431　FAX 086-224-2155
E-mail : reiko_tahara@pref.okayama.lg.jp

表1　発生農場の概要

農場	経営形態	発生時期	死廃頭数	死廃率（%）	ワクチン接種
A	肥育	2009.1～5	15	15.0	－
		2012.3	4	4.0	無
B	肥育	2010.1～6	36	4.5	－
C	一貫	2010.2～5	18	12.9	－
D	肥育	2010.7	1	0.02	無
E	酪農	2010.11	4	12.9	無
F	繁殖	2010.11	2	0.75	無
G	酪農	2011.11	1	4.2	有*
H	酪農	2012.2	4	2.8	無
I	酪農	2013.2	5	8.8	無
J	酪農	2013.4	1	2.5	有*
K	酪農	2014.3	4	8.0	無

（注）一貫：繁殖肥育一貫経営
死廃率：死廃頭数／飼養頭数
－：ワクチン市販前
＊発症牛はワクチン未接種

表2　BoNT Type D 遺伝子検出及び菌分離

農場	消化管内容	糞便	飼料	水	牛舎内材料	野生動物の便
A	1/10	8/13	1/10	1/10*	7/12	1/3
B	0/3	1/9*	0/11	NT	0/4	NT
C	0/3	1/9	0/4	0/4	0/9	1/10
D	1/1	1/1	0/11	NT	NT	0/1
E	NT	1/7	0/3	0/1	0/11	1/1
F	NT	1/12	0/2	0/2	1/2	0/8
G	0/1	2/2	0/1	1/1	3/3	2/2
H	0/1	1/5	0/2	0/2	0/1	NT
I	0/6	1/2	NT	1/3	0/11	0/1
J	0/1	1/1	0/1	0/1	0/4	NT
K	0/4	1/3	0/1	0/1	0/7	0/2

（注）1：BoNT 遺伝子陽性数／検体数
2：NT 検査せず
＊A 農場ウォーターカップ水及び B 農場糞便から *C. botulinum* 分離

内スワブ，飼料残渣），牛舎内に落下していたカラス等と考えられる野生動物の便を用いた．

C. botulinum 及び BoNT の検出は，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所の C 型及び D 型ボツリヌス症診断プロトコール［http://www.naro.affrc.go.jp/niah/disease/bacteria_man/botulinus/index.html］を参考に下記のとおり実施した．

***C. botulinum* の分離**：材料を強化クックドミート培地で，37℃，3～4 日間嫌気培養し，増菌したのち，培養上清を卵黄加 GAM 寒天培地で 37℃，2 日間嫌気培養した．得られたコロニーについて強化クックドミート培地で 37℃，2 日間培養後，PCR 検査により同定した．PCR 検査は培養上清中の毒素遺伝子検出のために C 型，D 型毒素遺伝子検出用プライマー（タカラバイオ㈱，滋賀）を使用し，分離菌の型別のために Nakamura ら［5］の D/C モザイク型毒素検出用プライマーを用いた．

BoNT 検出：マウス接種試験により検出した．診断プロトコールに従い作成した材料の直接抽出液または培養上清 0.5m*l* をマウスの腹腔内に接種後，ボツリヌス様症状（腹部陥凹，呼吸促迫，後躯麻痺）を 4 日間観察した．マウスがボツリヌス様症状を呈し，死亡した検体については，中和試験を行い，確定診断とした．中和試験は，抗 C 型及び抗 D 型毒素血清（大阪府立大学，大阪）を使用した．材料の直接抽出液または培養上清と抗 C 型（2IU/m*l*）及び抗 D 型毒素血清（20IU/m*l*）それぞれ等量混合し，30 分室温で静置後，マウスの腹腔内に 0.5m*l* 接種し，死亡抑制を 4 日間観察した．

パルスフィールドゲル電気泳動（以下 PFGE）：Nakamura ら［5］の方法に従い，分離菌株について制限酵素（*Sac* Ⅱ）を用いて消化し，菌株間の泳動パターンを比較した．

成　　績

発生農場の概要：県下の牛飼養農場 11 戸（延べ戸数 12 戸）で本症の発生が認められた（表 1）．飼養形態は肥育経営 3 戸，和牛繁殖経営 1 戸，繁殖肥育一貫経営 1 戸，酪農経営 6 戸であり，牛の品種は，ホルスタイン種，F1，黒毛和種，ジャージー種で，共通性はなかった．発生時期については，D を除き，11 月～4 月に集中し，発生時の死廃頭数は 1～36 頭，死廃率は最大で 15.0% であった．ワクチン接種は 2 戸のみ実施していた．

A 農場は，初発が 2009 年 1 月で，約 5 カ月後に終息したが，2012 年 3 月に再発した．G 及び J 農場は，近隣の E 及び I 農場で本症が発生したため，ワクチンを導入したものの，接種のタイミング等により，発症牛はワクチン未接種であった．各農場における発症牛は，いずれも後躯脱力による起立不能及び正常からやや低い体温を示した．

BoNT 検出結果及び菌分離成績：検出した BoNT は，A 農場の牛の糞便及び第一胃内容以外はすべて培養上清からであった．検出した BoNT はすべて D 型で，全農場の牛の糞便から検出された．環境材料では野生動物の便での検出率が最も高く，8 戸中 4 戸で，また給与水についても 2 戸でウォーターカップ内から，1 戸で水槽の水から BoNT が検出された．菌が分離されたのは，A 農場の給与水（ウォーターカップ内）及び B 農場の糞便であった．G 農場については，環境材料のうち牛舎内材料，野生動物の便から BoNT が検出され，*C. botulinum* の農場内汚染度が高かった（表 2）．野生動物の便については，色が白っぽく尿酸が含まれていると考えられたことや，カラスが牛舎周辺で確認されていることから，大半がカラスのものと推測された．採材に際しては，落

下便や牛舎の壁等に付着するなど，量の少ないものは綿棒等での拭き取りにより採取した．BoNTが検出されたのはすべてこれらの材料を増菌培養した培養上清からであった．

分離株のPCR及びPFGE解析結果：近年多く発生報告のあるD型牛ボツリヌス症は，D/Cモザイク型と呼ばれる毒素型によるものであり，これはD型毒素の重鎖がC型毒素の重鎖に置換した，D型の軽鎖とC型の重鎖から構成されている．今回A及びB農場で分離された株について，C型，D型，C/D型及びD/C型の判別が可能なPCR検査を実施したところ，両株ともD/Cモザイク型毒素であった（図1）．

また，*Sac* II消化によるPFGEの結果，両株の泳動パターンが一致した．また，近年国内で分離された*C. botulinum*（図2のOFD04，05，08，16，17，24，30，31）と比較したところ，A及びB農場の分離株は，OFD17，OFD05及びOFD08と相同性が80%以上であった．

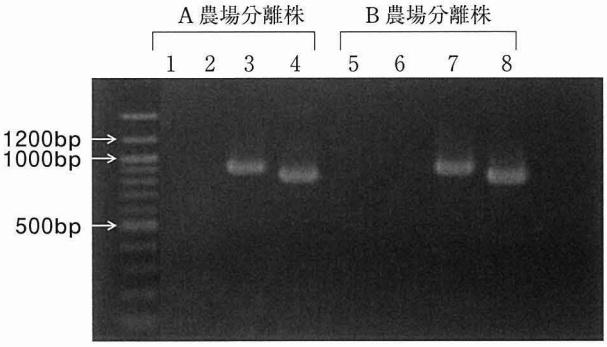

図1　分離株のPCR結果
Lane 1, 5：C型軽鎖　2, 6：D型軽鎖
3, 7：C型重鎖　4, 8：D型重鎖

考　　察

発生農場11戸は，D及びH農場を除いた9戸が直径20kmの範囲内に位置しており，B，C及びI，J農場は約200mの距離で隣接していた．発生時期は，2010年に5戸（B～F）と集中し，最初に発生したB農場は死廃頭数が36頭と最大の発生となり，約1カ月ののちに隣接したC農場にも発生を認めた．その後D農場に1頭の発生を認めたが，本農場はB農場との間で牛の移動及び人の往来があったため，*C. botulinum*がB農場からD農場に伝播したと考えられた．

B，C，D農場のグループとA，E農場及びF農場にはそれぞれ直接的な関連はなかったが，A農場の環境材料とB農場の糞便から分離された*C. botulinum*が，D/Cモザイク型毒素を産生する株であること，*C. botulinum*のPFGEパターンが一致したことから，2010年に県内で発生した牛ボツリヌス症は分子疫学的には同一である可能性が高いと考えられる．また，A，C，E農場のカラス等と思われる野生動物の便の培養上清からもBoNTが検出されたことから，2009～2010年の発生はこれら野生動物の伝搬によるものと考えられた．

2010年6月にワクチンの市販が開始されてから，発生地域においてワクチンを導入する農場がみられたこと，また本症の発生確定直後に緊急ワクチン接種を実施したことなどから，ワクチン市販前と比較して発生農場

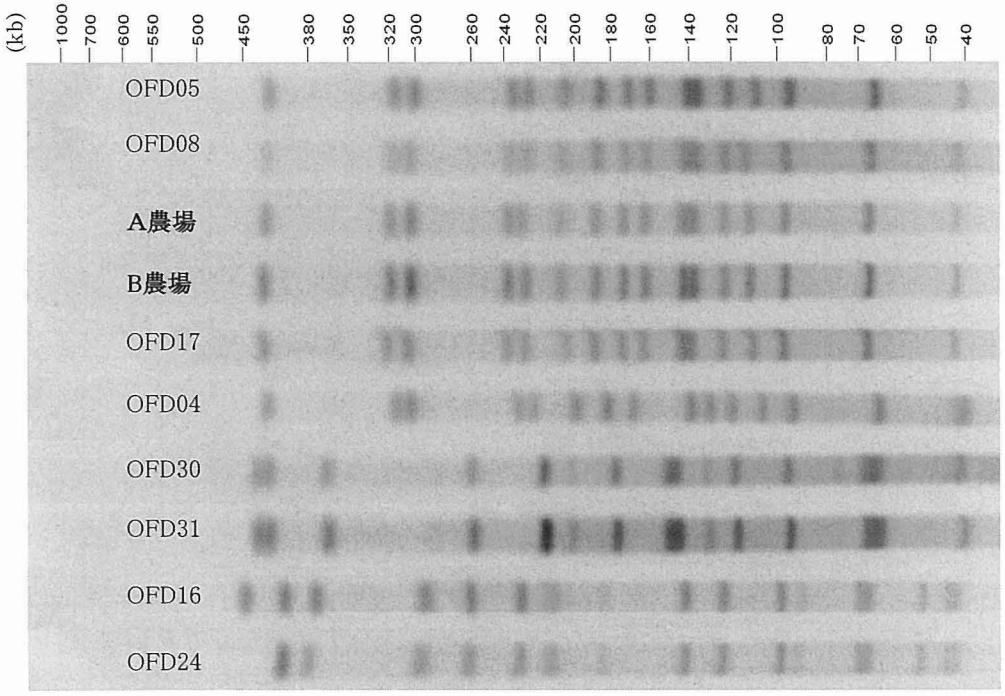

図2　分離菌株の*Sac* II消化PFGE像．OFD：他県分離株

数及び発生農場における死廃頭数が減少した．2010年のE農場での発生を受け，G農場では同年12月に全頭ワクチン接種を実施した．しかしながら2011年11月，3カ月齢の子牛が起立不能を呈し，検査の結果本症と診断された．G農場では，ワクチンは1年に一度時期を決めて接種する方針であったため，本牛はワクチン未接種であった．確定後実施した環境検査で，牛舎内材料等からBoNTが高率に検出されたことから，G農場の汚染度は高く，これまで発生が抑えられていたのはワクチンによるものと推察された．

2013年2月及び4月のI及びJ農場の発生については，農場間の距離が200mと非常に近いことから，B及びC農場と同じくI農場の*C. botulinum*がJ農場に伝播して発生したと考えられた．J農場はI農場の発生を受け，2013年4月ワクチン接種を行ったものの，当該牛はと畜場に出荷予定だったためワクチン未接種であったことから発症に至ったと考えられた．

2009～2013年に岡山県内で発生した牛ボツリヌス症は，体内に取り込まれた*C. botulinum*が増殖し，BoNTを産生して発症する芽胞摂取型であると推察された．その理由として，給与飼料からのBoNTの検出が1件のみであること，飼料がBoNTに汚染された場合は牛群に占める発症頭数が多いと考えられるが，本県の場合はその頭数が少ないこと，発生期間が一過性ではなく比較的長いことがあげられる．また，近年発生のみられるD/Cモザイク型毒素による牛ボツリヌス症は，小崎ら［6］により，その病原性が確定され，同一地域で分離された菌株はPFGEパターンは同一であるとされ，本県でもA及びB農場の分離菌株のPFGEパターンは一致したことから，同一菌株が特定の地域で流行していると推察された．

岡山県では，ワクチン市販後は晩秋から春に牛ボツリヌス症が続発しており，その地域は徐々に拡大している．その最大の要因は発生農場付近で頻繁に確認されるカラスであり，山科鳥類研究所の報告（ハシボソガラス Corvus coroneの縄張り非所有個体の採食地と塒の利用）ではその移動距離は10～20km程度といわれている．さらにカラスは雑食性であること，時には死体も食べることなどからBoNTに対する免疫を獲得しているとも考えられ［7］，*C. botulinum*の運び屋の可能性が強く示唆される．

ボツリヌスワクチンは発症抑制効果が大きく，本症発生農場では生産性を守る上でも必要不可欠なものであるが，*C. botulinum*の感染防御及び排菌抑制はできない．本症発生後，最も重要なことは，農場内の清掃及び消毒の徹底と，カラスなどの野生動物の侵入防止措置を確実に実施するなどの清浄化対策である．これらを厳重に行うことにより農場内の*C. botulinum*汚染を低減し，周囲への*C. botulinum*の拡散防止に努めなければならない．

*C. botulinum*の分離，D/Cモザイク型毒素PCR及びPFGE解析を実施していただき，かつ多大なるご助言をいただいた小崎俊司先生並びに大阪府立大学生命環境科学研究科 幸田知子先生に深謝する．

引 用 文 献

［1］久保周一郎：ボツリヌス神経毒素の構造と機能，日獣会誌，43，5-11（1990）

［2］中島義之，加藤　肇，中本慎二，船越　衛，山下彰一，西脇　集，清水克彦，伊藤　昊，佐生　明，田中　昇：北海道の一酪農家で集団発生した牛のボツリヌス症，家畜診療，390，13-16（1995）

［3］白井彰人，濱崎幸一，宮里俊光，渡邉　学：乳用牛に集団発生したD型ボツリヌス症からの原因菌の国内初分離事例，獣医畜産新報，61，393-396（2008）

［4］春田竜也，宇崎岳彦，小宮誠子，志賀　慧，吉田さやか：牛ボツリヌス症と診断された乳用牛の急死事故多発事例，家畜診療，58，489-493（2011）

［5］Nakamura K, Kohda T,Umeda K,Yamamoto H, Mukamoto M, Kozaki S：Characterization of the D/C mosaic neurotoxin produced by *Clostridium botulinum* associated with bovine botulism in Japan.：Veterinary Microbiology, 140, 147-154 (2010)

［6］小崎俊司，幸田知子，中村佳司：わが国で発生している牛ボツリヌス症由来菌の特徴，家畜診療，59，131-138（2012）

［7］Ohishi I, Sakaguchi G, Riemann H, Behymer D, Hurvell B：Antibodies to *Clostridium botulinum* Toxin in Free-living Birds and Mammals, Journal of Wildlife Diseases, 15, 3-9 (1979)

Epidemiological Analysis and Countermeasures Against Bovine Botulism in Okayama, Japan, 2009-2014

Reiko TAHARA† and Katsushi SAWADA

**Okayama Prefecture Okayama Livestock Hygiene Service Center, 2770-1 Mitsukouchi, Kitaku, Okayama, 709-2123, Japan*

SUMMARY

Bovine botulism of *Clostridium botulinum* type D occurred in 11 farms from January 2009 to March 2014 in Okayama Prefecture, Japan. In the 11 farms where botulism neurotoxin type D was detected in bovine feces, among the environmental samples (cattle feed, water, farm swabs, wild animal feces), the detection rate was highest in wild animal feces (from four of eight farms). *C. botulium* type D was isolated from two cases, and these isolates were a mosaic of type D and C neurotoxins (D/C mosaic neurotoxin). These isolates showed the same band pattern as a result of pulsed-field gel electrophoresis analysis. Nine of the farms were located within a 20-km radius, and the two farms where the strain was isolated did not have any epidemiological relationship. At the farm where the vaccine was used, a cow to which the vaccine had not yet been administered developed bovine botulism, and in this case, high levels of botulinum neurotoxin were detected in the environmental samples in the cowshed. These results suggest that wild animals were involved in the spread of *C. botulium*. The vaccination of cattle is effective in suppressing the occurrence of bovine botulism, but it is unable to inhibit *C. botulium* discharge in feces. For prevention of the spread of *C. botulium* between farms, the most important measures are to thoroughly clean and disinfect the cowsheds and to prevent the intrusion of wild animals into the farm.

—— Key words : *Clostridium botulinum* Type D, D/C mosaic neurotoxin, prevention of spread, vaccine, wild animals.

† *Correspondence to (Present address) : Reiko TAHARA (Livestock Division Okayama Prefectural Government)*
2-4-6 Uchisange, Kitaku, Okayama, 700-8570, Japan
TEL 086-226-7431 FAX 086-224-2155
E-mail : reiko_tahara@pref.okayama.lg.jp

J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 68, 629～633 (2015)