

入来牧場の黒毛和種牛におけるレプトスピラ浸潤状況の調査

阿久沢正夫・高橋隆之・中村康男・竹之下浩和・原 由香

森園 充・中西喜彦^{*1}・柳田宏一^{*2}

(獣医学科家畜内科学研究室, ^{*1}畜産学科家畜繁殖学研究室, ^{*2}入来牧場)

昭和62年8月10日 受理

A Survey of Leptospira Infection in Japanese Black Cattle in Iriki Livestock Farm of Kagoshima University

Masao AKUZAWA, Takayuki TAKAHASHI, Yasuhiro NAKAMURA,

Hirokazu TAKENOSHITA, Yuka HARA, Mitsuru MORIZONO,

Yoshihiko NAKANISHI^{*1}, Koichi YANAGITA^{*2}

(Laboratory of Veterinary Medicine, ^{*1}Laboratory
of Animal Reproduction, ^{*2}Iriki Livestock Farm)

緒 言

レプトスピラ症はスピロヘータ科 (*Spirochaetaceae*), レプトスピラ属の菌の感染によって発症する。家畜では牛の罹患率が最も高く, 本症による流産, 泌乳量の低下, 体重減少, 二次的な死亡などによって経済的損失は大きい³⁾。本症は牛では不顕性あるいは慢性型が多く, 腎臓に菌が定着して保菌状態となり感染後数カ月間は尿中に菌が排泄される^{4, 5)}。菌で汚染された敷藁, 飼料, 土, 水などから皮膚の傷や口, 鼻, 眼などの粘膜をとおし, あるいは吸入によって体内に侵入する¹¹⁾。多くの野生動物がキャリアとなることが知られているが⁸⁾, なかでも嚙歯類は尿中にレプトスピラを排出するため, 感染の媒介者として重要視されている^{1, 5)}。

1983年10月に, 鹿児島大学農学部附属農場入来牧場(以下入来牧場)で放牧飼育されていた生後50日令の黒毛和種の仔牛が血尿を排出し死亡した。剖検時に得た血液からはレプトスピラに対する抗体は検出されなかったが, 組織検査では腎臓および肝臓にレプトスピラの菌体が認められた⁹⁾。この死亡例が出た以前に流産, 血尿などからレプトスピラ症の疑われる牛が散発的に認められ, これらの牛の血清中にレプトスピラの抗体が検出された。このため, 当牧場で飼育される黒毛和種牛におけるレプトスピラの浸潤状況を調査するために, レプトスピラ抗体価測定, 血液学検査および生化学検査を行ったが, さらに, 当牧場で飼育されているホルスタイン種の乳牛についてもレプトスピラ抗体の測定を行った。また, 鹿児島県内で飼育される牛

について浸潤状況を知るために, 鹿児島市食肉検査センターに搬入される県下の牛について, 屠殺放血時に採血してレプトスピラ抗体の保有状況を調査した。その結果をここに報告する。

材 料 と 方 法

1. 動 物

(1) 入来牧場で放牧されている黒毛和種牛について, 1985年4月から1986年9月まで, 分娩後の親牛51頭と仔牛69頭の計120頭について, 親牛はのべ77回, 仔牛はのべ348回採血して検査を行った。このうち分娩直後に親と仔から同時に採血できたのは29例であった。妊娠が確認されている牛を毎日観察し, 初めて仔牛を連れているのを認めた日を仔牛の出生日とした。当牧場では, 仔牛は出生後親と共に放牧し, 約14週齢で離乳する。離乳後仔牛だけを集めて畜舎内で飼育するが, 43週齢以後はまた放牧に移している。採血は月1回行い, そのとき各仔牛の日齢を記録した。仔牛はその後月1回ずつ採血して, ほとんどの牛は21週齢で終了した。その後の採血は42-43週齢で3頭, 57-77週齢で12頭について行った。

(2) 当牧場で放牧されている2-7才のホルスタイン種乳牛13頭について, レプトスピラの抗体を検査した。乳牛が放牧されている牧区は, 黒毛和種牛とは一部を除いてことになっている。

(3) 鹿児島市食肉センターにおいて1986年5月から1984年4月までの間に, 搬入された成牛について毎月1回, 屠殺放血時に血液を採取し検査に用いた。総計120頭の牛の産地および頭数は, 指宿市12頭, 伊集

院町4頭、串良町8頭、鹿屋市26頭であった。

2. 検 査

(1) 血 液

頸静脈より採取後、凝血防止剤 (EDTA・2K) を加えたもので血液検査を、4,000rpm で10分間遠心して得た血清でレプトスピラ抗体価測定および生化学検査を行った。

(2) レプトスピラ抗体価測定

(a) 使用抗原：抗体測定用の抗原として使用したレプトスピラは当研究室で保存しているもので、その血清型はわが国に認められている6種⁶⁾、*autumnalis* (秋疫A)、*hebdomadis* (秋疫B)、*australis* (秋疫C)、*icterohaemorrhagiae*、*canicola*、*pyrogenes*、およびわが国では認められないが外国で発生の多い2種 *pomona*^{2, 10, 15)}、*hardjo*¹²⁾ の計8種を用いた。

(b) 測定法：マイクロタイタープレートの各孔 (well) に Korthof 液を 50μl ずつ注入する。次に被験血清を第1列の well に 10μl 加え、内容をよく混和した後隣の well に 10μl を注入し、以後最後の well まで同じ操作を繰り返す。最後の well ではよく混和した後、10μl を捨てる。抗原培養液 50μl を各 well に加える。Korthof 液を 50μl と抗原培養液 10μl を注入した well を対照とする。プレートは静かに振盪して内容を攪拌した後、蒸発防止のために蓋をのせ、37°C で3時間インキュベートした。判定は血清を添加していない well を対照として、各 well から白金耳で液を1滴とりスライドガラスの上にのせ、暗視野顕微鏡により100倍で鏡検し行った。1視野に5個以上の菌凝集が認められる場合、あるいは対照と比較して菌の運動性の低下あるいは菌数の減少が認められる場合を陽性と判定し、陽性を示した最終希釈倍率を抗体価とした。

(3) 血液検査項目

赤血球数と白血球数は Coulter counter Model D、PCV (ヘマトクリット) は毛細管法、ヘモグロビン量は SLS ヘモグロビン法、フィブリノーゲン (Fibri) は Schalm 法、白血球百分比分類はメイグムザ染色をした血液塗抹により行った。血清は血糖 (GOD 法) アルカリフォスファターゼ (King-Armstrong 単位)、GOT (Karmen 単位)、Na と K (電極法)、Ca と Mg (蛍光法)、無機リン (Pi: モリブデンブルー直接法)、尿素窒素 (BUN: Urease indophenol 法)、総蛋白量 (アタゴ屈折計)、蛋白分画 (セルローズアセテート膜による電気泳動法) について測定した。

結 果

1. 一般症状

本研究に用いた入来牧場で飼育される黒毛和種牛およびホルスタイン種乳牛の群において、研究期間中に症状に異常が認められた例はなかった。

2. レプトスピラ抗体

(1) 入来牧場で飼育される黒毛和種牛の血清中に検出されたのは *autumnalis* に対する抗体だけであって、他の7種の血清型については抗体は検出されなかった。

黒毛和種牛の親と仔における *autumnalis* 抗体価と例数は (Table 1)、母牛はのべ77回の採血において 1:432 の抗体価が 49.3% (38回) と最も多く、一方仔牛はのべ348回の採血において 1:72 の抗体価のものが 35.0% (122回) で最も多かった。

出産後の初回採血時の親と仔の抗体価は (Table 2)、一般に抗体価の高い親では仔の抗体価も高い傾向が見られた。母牛は抗体を持つが仔牛からは検出されない例が3例あり、また母牛の抗体が検出されない例では、仔牛も抗体は検出されなかった。

仔牛の成長にともなって抗体価は変化し (Table 3)、各期間の平均値は生後2-4週齢で軽度増加し、その後次第に減少して17週齢以後ごく低い値しか検出されなくなった。その後57-77週齢において高い抗体価が検出され、最も高い例では 1:15, 552 に達するほどであった。

(2) 入来牧場で飼育されている乳牛を検査したところ、12頭中3頭から5種のレプトスピラ血清型に対する抗体が検出された。すなわち、*canicola* (抗体価 1:72) に対する抗体をもつ6才の牛、*autumnalis* (抗体価 1:72)、*canicola* (抗体価 1:432)、*pyrogenes* (抗体価 1:432) の3種の血清型に対する抗体をもつ4才の牛、*hebdomadis* (抗体価 1:72)、*australis* (抗体

Table 1. The number of dams and calves of the Japanese black cattle classified by the titer of microscopic agglutination test to *L. autumnalis*

Titers	Dams	Calves
0	2	94
12	0	45
72	20	122
432	38	60
2592	11	24
15552	0	3

価 1:72) の 2 種の血清型に対する抗体をもつ 2 才の牛が認められた。

(3) 鹿児島市食肉センターの牛では、検査した 120 頭においてレプトスピラの抗体は全く検出されなかった。

3. 血液検査

本研究で用いた黒毛和種牛について行った検査の結果

Table 2. Serum microscopic agglutination titers in the pairs of dams and calves of the Japanese black cattle detected after birth

Animal No.		Titers	
Dams	Calves	Dams	Calves
1343	601	72	72
1371	602	432	72
1265	604	72	432
1162	607	432	72
1211	608	72	432
1350	612	432	432
23	615	432	432
941	616	432	432
17	620	432	72
5	623	432	432
25	627	72	0
13	628	432	432
296	629	2592	432
305	631	432	2592
260	633	432	0
373	634	0	0
28	635	2592	432
11	637	432	2592
240	640	72	432
14	642	432	2592
408	644	2592	2592
26	645	32	2592
210	646	2592	72
339	647	72	432
340	648	2592	432
299	650	432	72
257	651	432	432
20	653	72	72
237	655	432	2592
Mean		694	725

Table 3. Age related change of calves' titers of microscopic agglutination test to *L. autumnalis* in the Japanese black cattle

Age	0—1 Day	2—7 Day	1—2 Week	2—4 Week	4—6 Week	6—8 Week
Titers	576	558	461	739	365	297
Age	8—11 Week	11—13 Week	13—17 Week	17—21 Week	21—43 Week	57—77 Week
Titers	253	198	161	24	16	3700

果を集計して Table 4 に示した。55—77 週齢にみられた抗体価の高い例でも、とくに検査値に異常は認められなかった。また、市食肉センターで採取した血液試料 120 例においても、異常値は検出されなかった。

考 察

黒毛和種成牛からは *autumnalis* に対する抗体だけが検出され、ほとんどの牛がこの抗体陽性であり、また出生直後の仔において既に抗体が認められることから、当牧場の黒毛和種牛には *autumnalis* が常在していると考えられる。しかし、育成期の放牧が始まるまで抗体価の著しい上昇はなく、牛舎内および 2 カ所の放牧地で捕獲したネズミ (8 匹) の血液および腎臓から菌が分離されなかったことから、レプトスピラの感染は、畜舎外において特定の放牧地で起こることが推測された。また、当牧場内で飼育されているホルスタイン種乳牛からは、*canicola*, *autumnalis*, *pyrogenes*, *hebdomadis*, *australis* の 5 種の血清型に対する抗体が認められたことから、黒毛和種牛とホルスタイン牛の間では感染は起こっていないと考えられた。黒毛和種牛に 1 種の血清型だけが維持されることは、当牧場では黒毛和種牛の導入および搬入がほとんど行われないこと、家畜を飼育する他の農家と離れていることも影響していると考えられた。

鹿児島市食肉センターで 1 年間にわたって採取した 120 頭の牛の血液中に、レプトスピラに対する抗体が検出されなかったことは、本県の不用犬における抗体保有調査で、23.5% の陽性例が認められていること¹⁴⁾ から考えると意外であった。これは、肥育牛の飼育がほとんどが畜舎内に限られ、また飼料は一定のものを与えられるだけであるが、犬は拘束されていないため行動範囲が広く、そのためレプトスピラに汚染されたものを摂取する可能性が高いことが一因と考えられた。

仔牛は初乳の摂取により生後 24 時間以内に血中に抗体が認められるようになり、その抗体価は母乳の抗体価に近い¹³⁾。本研究では、出産後の初回採血時の親牛と仔牛の抗体価の平均値はそれぞれ 1:694 と 1:725 と近い値であること、最も頻度の高い抗体価は親牛 1:

Table 4. Summary of hematological and biochemical examination of the Japanese black cattle in Iriki Livestock Farm of Kagoshima university

(February 1985 — October 1986)								
	RBC ×10 ⁴	WBC ×10 ³	Hb mg / dl	Ht %	MCV μ m ³	MCH pg	MCHC %	Fibri g / dl
No.	347	347	170	347	347	347	347	128
Mean	823.6	16.7	9.7	29.9	37.9	6.6	16.5	0.6
SD	226.0	6.4	2.4	6.1	7.6	7.0	17.0	0.3
Differential of leukocytes (%)								
Neutrophile					Lymph	Eos	Mono	
	Band	Seg-2	Seg-3	Seg-4				
No.	347	347	347	347	347	347	347	347
Mean	1.3	5.6	6.7	3.6	1.1	72.7	1.4	7.5
SD	1.9	4.7	4.4	3.1	1.8	11.0	2.3	3.4
	Glucose mg / dl	ALP KAU	GOT KU	Na mEq / L	K mEq / L	Ca mg / dl	Mg mg / dl	Pi mg / dl
No.	86	347	348	184	184	201	200	88
Mean	90.6	14.3	40.5	138.4	4.9	4.8	1.3	7.4
SD	17.4	9.0	15.8	3.3	0.5	0.4	0.4	1.5
TP		Electrophoresis (%)				A / G	BUN	
	g / dl	Alb	α	β	γ		mg / dl	
No.	348	348	348	348	348	348	348	
Mean	5.8	52.9	14.9	14.6	17.7	1.2	16.8	
SD	0.8	6.3	3.0	3.6	6.9	0.3	5.3	

432, 仔牛 1:72 でそれほど高値ではないこと, また 1 例ではあるが親に抗体価が検出されなかった例では仔も抗体が検出されなかったことから, 生後間もない時期の仔牛が持つ抗体はレプトスピラの感染によるものではなく, 初乳の摂取によるものと考えられた。

仔牛の抗体価は出生後まもなく増加するが, その後減少して 21 週齢頃には極めて低値となり, この授乳期間中には母仔ともにレプトスピラ感染はなかったため, 初乳摂取で得た抗体は低下したと考えられた。その後 55—77 週齢にはふたたび高い抗体価が認められた。これは仔牛の放牧が 42 週齢以後に始まっていることとほぼ一致し, またレプトスピラの実験的感染では, 抗体価は菌接種後 4 日目から検出され, 10 日から 20 日で最高に達する^{4, 13)}ことから, この時期よりそれほど遠くない過去の放牧中に感染が起こったためと考えられた。牛のレプトスピラ症は軽症例では無症状であることも多い^{4, 5, 9, 12)}。本研究の期間中に, 牛の一般症状および血液検査の値にはとくに異常は認められなかったことから, 感染は軽度であったと思われる。

初乳の摂取によって得た抗体が低下する 17 週齢以後

の時期は, レプトスピラ発症の危険性が高いことが本研究によって示唆された。また, 17 週齢以後はレプトスピラの感染だけでなく, 他の疾患に対しても抵抗力が低下していることが推測されるため, 牛の疾病予防のうえから重要な時期であると考えられる。当牧場の黒毛和種牛にはレプトスピラ抗体の血清型が 1 種であるにもかかわらず, ホルスタイン種乳牛には 5 種の血清型が検出された原因として, 両者の飼育される牧区が一部を除いて異なっていることが重要と考えられるが, 今後さらに検討が必要と考えられた。

要 約

入来牧場で飼育されている黒毛和種牛の親仔およびホルスタイン種乳牛, また県下で飼育される牛については鹿児島市食肉センターに搬入される牛において, 凝集溶菌反応試験によりレプトスピラ抗体を測定し, その浸潤状況を調査した。黒毛和種牛では, 親仔ともに *Leptospira autumnalis* に対する抗体が検出され, この血清型のレプトスピラの常在が示された。仔牛の抗体は出生直後から認められ初乳による移行抗体

と考えられたが、2-4週齢で抗体価は軽度増加しその後減少する傾向を示した。14週齢で離乳し畜舎内で仔牛だけをまとめて飼育する間、さらに減少して17週齢以後ごく低い値が続いた。43週齢に再度放牧に移された後57週齢には抗体価は著しく増加したが、全身状態および血液検査所見には、とくに異常は認められなかった。当牧場内に飼育される乳牛では *canicola*, *autumnalis*, *pyrogenes*, *hebdomadis*, *australis* の5種の血清型に対する抗体が認められたが、黒毛和種牛には *autumnalis* 以外のこれらの血清型は認められなかった。鹿児島市食肉センターに搬入される牛については1年間調査を行ったが、レプトスピラ抗体は全く検出されなかった。

謝辞 本研究の遂行にあたり多忙な日常作業があるにも関わらず献身的にご助力下さった入来牧場技官松山義弘、内村利美、片平清美、松元里志の諸氏および農学部附属家畜病院技官益山貢二氏に心から感謝いたします。

文 献

- 1) Everard, C.O.R., Fraser-Chanpong, G.M., Bhagwandin, L. J., Race, M. W. and James, A. C.: Leptospire in wildlife from Trinidad and Grenada. *J. Wildl. Dis.*, **19**, 192-199 (1983)
- 2) Hancock, C.R., Wilks, C.R., Kotiw, M. and Allen, D.: The long term efficacy of a *Hardjo-pomona* vaccine in preventing leptospirosis in cattle exposed to natural challenge with *Leptospira interrogans* serovar *harjo*. *Aust. vet. J.*, **61**, 54-56 (1984)
- 3) Hanson, L. E., Leptospirosis.: in Howard, J. L. (ed). Current veterinary therapy: Food animal Practice. p.729-731, W. B. Saunders, Philadelphia (1981)
- 4) Mackintosh, C. G., Marshall R. B. and Thompson J. C.: Experimental infection of sheep and cattle with *Leptospira interrogans* serovar *balcanica*. *N. Z. vet. J.*, **29**, 15-19 (1981)
- 5) Marshall, R. B., Schollum, L. M. and Dymock, B. L.: Prevention of *Leptospira interrogans* serovar *pomona* infection in cattle. *N. Z. vet. J.*, **30**, 177-179 (1982)
- 6) 尾形 学・坂崎利一・柴田重孝: 家畜微生物学. p.196-197, 朝倉書店, 東京 (1977)
- 7) Redetzke, K. A. and McCann, M. J.: Isolation of *Leptospira* from desert rodents of west texas. *J. Wildl. Dis.*, **16**, 333-337 (1980)
- 8) Shimizu, M.M.: Environmental and biological determinants for the prevalence of leptospirosis among wild small mammal hosts, island of Hawaii. *Int. J. Zoon.*, **11**, 173-188 (1984)
- 9) Shimizu, T., Kono, I., Yasuda, N. and Akuzawa, M.: Acute leptospirosis in a calf-Possibly preceding seroconversion of the herd. *Mem. Fac. Agr. Kagoshima Univ.*, **21**, 167-174 (1985)
- 10) Songer, G. J., Chilelli, B. S., Marshall, M. M., Noon, T.H. and Meyer, R.: Serologic survey for leptospirosis in Arizona beef cattle in 1981. *Am. J. Vet. Res.*, **44**, 1763-1764 (1983)
- 11) 川上善三: レプトスピラ病. 其田三夫監修, 牛の臨床, p.375-376, デーリイマン社, 札幌 (1983)
- 12) Sullivan, N. D.: Further observations on *Leptospira hardjo* infections in pregnant cows. *Aust. vet. J.*, **48**, 388-390 (1972)
- 13) Thiermann, A. B.: Experimental leptospiral infections in pregnant cattle with organisms of *Hebdomadis* serogroup. *Am. J. Vet. Res.*, **43**, 780-783 (1982)
- 14) 渡辺 茂・坂本 紘: 南九州地区における犬レプトスピラ症に関する研究. 鹿大農学術報告, No. **32**, 133-140 (1982)
- 15) White, F.H., Sulzer, B.S. and Engel, B.S.: Isolation of *Leptospira interrogans* serovars *hrdjo*, *balcanica*, and *pomona* from cattle at slaughter. *Am. J. Vet. Res.*, **43**, 1172-1173 (1983)

Summary

Dams and calves of the Japanese black cattle and Holstein dairy cattle in the Iriki Livestock Farm of Kagoshima University together with the cattle brought to the Slaughter-house of Kagoshima-city were examined with the use of the microscopic agglutination-test for measuring the leptospiral antibodies.

In cases of the Japanese black cattle, only one serovar of antibody to *L. autumnalis* was detected. Due to the fact that antibodies of calves were detected immediately after their birth, they were assumed to have been derived from the colostrum. The titers of antibodies continued to be increasing during the age from 2 to 4 weeks and began to be decreasing after the age of 4 weeks. This tendency accelerated during the feeding period in the pen. The lowest titers were detected after the age of 17 weeks. Calves were fed in the pasture again after the age of 43 weeks. The titers of calves increased remarkably after the age of 57 weeks; however no abnormality was observed both in the bodily symptoms and in the hematological findings.

Dairy cattle in this farm were shown to be in possession of antibodies to the five serovars, *canicola*, *autumnalis*, *pyrogenes*, *hebdomadis* and *australis*.

In cases of the cattle brought to the Slaughter-house of Kagoshima-city no antibody to *Leptospira* was detected during the survey period lasting one year.