

→類似疾病検査

- ① 180 分娩性低カルシウム血症
- ② シュウ酸塩中毒
- ③ 有機塩素剤、192 有機リン剤中毒
- ④ 177 硝酸塩中毒

○ 病原体: *Clostridium botulinum* 主にC、D型毒素産生菌

(1) 疫学調査

- ① 放牧地、採草地における養鶏残渣の肥料としての使用の有無
- ② 放牧地、採草地に野生水禽が集まる水場等の有無
- ③ グラスサイレージ等に野生小動物の死体が混入
- ④ 低品質のサイレージ、乾草等の給与
- ⑤ リン欠乏等による異嗜の有無
- ⑥ 飼料に起因した中毒性疾病の疫学的特徴の有無

(増菌培養)。

- ④ 各培養液を用いて毒素検査を行い、ボツリヌス毒素を確認する(マウス接種法、PCR)。
- ⑤ 毒素が確認された増菌培養液から新鮮な卵黄加システイン強化 GAM 寒天培地を用いて 37℃で 2～3 日間嫌気培養する(分離培養)。
- ⑥ 集落は乳光反応を伴う半透明扁平辺縁部根足状(卵黄加システイン強化GAM寒天培地)を呈する。ただし、乳光反応の程度および集落の形状は様々

(2) 臨床検査

- ① 後肢から始まる進行性弛緩性麻痺が特徴
- ② 起立不能、腹式呼吸、舌の下垂、嚥下障害
- ③ 体温、知覚は正常

(5) 毒素検査(マウス接種法/PCR)

(マウス接種法)

- ① 発症(死亡)牛の、血清、消化管内容物、糞便、腹水、培養液、分離菌からボツリヌス毒素を検出する。
- ② 毒素試料希釈用緩衝液および乳剤作製は 0.2%ゼラチン加里ン酸緩衝液(0.1M pH6.2)を用いる。
- ③ 材料 0.5mlをマウス腹腔内に接種し、ボツリヌス毒素に特徴的な症状(腹部陥凹、腰部麻痺)の発現と致死を観察する。検体等に余裕があれば対照として100℃、10分間加熱処理した材料を同様に接種し、発症しないことを確認する。
- ④ 特徴的症狀を伴ってマウスを死亡させた試料はボツリヌス毒素陽性と判定し、抗毒素血清を用いて毒素型を決定する。
- ⑤ 原因と疑われる飼料等の検査も同時に行う。

(3) 剖 検

特に特徴的な所見はない。

発症や死亡に結びつくような病変がないことを確認する。

(PCR^{1), 2)}

検体数が多い等マウス接種法による毒素検査が困難な場合、スクリーニングの目的で利用できる。毒素型も同時に確認できるが検出された遺伝子が機能していることを確認するためマウス接種法により毒素産生性の有無を確認しなければならない。

(4) 細菌培養試験(直接・増菌・分離培養)

牛ボツリヌス症においては、原因菌の分離は困難である。また、消化管内や飼料から菌が分離されても診断的意味を吟味する必要がある。

- ① 発症(死亡)牛の血清、ルーメンおよび各種腸内容物、糞便、原因と推定される変敗サイレージ、乾草等の飼料および飼料原料から分離を試みる。
- ② 材料 20g 程度を遠心処理し、卵黄加システイン強化GAM 寒天培地に画線塗抹(直接培養)あるいは数本の増菌培地(CaCO₃-FCM)の深部に移植する。
- ③ 増菌培地の一部は 75℃15分加熱後、残りは非加熱で37℃、2～3日(最長7日)嫌気培養する

材料は、増菌または分離培養した検体を BHI にて培養した検体を用いる。

市販のプライマーが利用できる。

より詳細な検査法は以下のサイトを参照

http://www.naro.affrc.go.jp/niah/disease/bacteria_man/botulinus/index.html

(6) 毒素型別(毒素中和法)

確定診断のため必須である。抗毒素血清は動物衛生研究所等専門機関から入手できる。動物衛生研究所では要望に応じて抗 C 型、抗 D 型血清を配布している。

動物衛生研究所の抗血清を用いる場合は、サンプルはゼラチン希釈液で 2~4 倍程度に希釈する。3 本の小試験管に 0.5ml ずつ取り分け、それぞれ以下の通り処理する。

1. 0.5ml のゼラチン希釈液と混合
2. 0.5ml の C 型抗毒素血清(2 IU/ml)と混合
3. 0.5ml の D 型抗毒素血清(20 IU/ml)と混合

これらをそれぞれマウスに 0.5ml ずつ腹腔内接種し、観察する。毒素が抗血清で中和された群のマウスは生存する(毒素中和法)。

他の毒素型(A、B、E、F 型等)菌による毒素は、抗 C 型、抗 D 型血清では中和されない。

(7) 病理組織検査

特異的な所見はない。他の疾病を疑う病変がないことを確認することが重要である。

その他:

(分離培地)

① 増菌培地(CaCO₃-FCM)

(基礎培地)

酵母エキス	1.0%
硫酸アンモニウム	1.0%
ブドウ糖	1.0%
可溶性澱粉	0.5%
L-システイン塩酸塩	0.1%
加温溶解し、10% NaOH で pH 7.6 に調整後、炭酸カルシウムを最終濃度 0.5% になるように加える(溶けないので分注の際は攪拌しながら行う。)	

(CaCO₃-FCM)

基礎培地	10ml
クックドミート培地	1.25g
100℃で5~10分湯煎後、115℃15分滅菌し、流水または氷水で急冷する。	

② 卵黄加システイン強化 GAM 寒天培地

(システイン溶液)

L-システイン塩酸塩	0.275g (最終濃度 0.1%)
蒸留水	250ml
10% NaOH で pH 7.3 に調整	

(基礎培地)

GAM 寒天培地	20.35g (最終濃度 7.4%)
システイン溶液	250ml
115℃、15分滅菌	

基礎培地(55℃に保温)	250ml
50%卵黄生食液	25ml

(参考文献)

- 1) Heffron, A. & Poxton, I.R.: J. Med. Microbiol. 56, 196-201 (2007).
- 2) Fach, P., et al.: FEMS Immunol. Med. Microbiol. 13, 279-285 (1996).