

黒毛和種繁殖牛に認められた輸入ストローによる ライグラススタッガーの1症例

石井択径^{1)†} 坂口善二郎²⁾ 是枝輝紀¹⁾ 森木 啓¹⁾
田原則雄¹⁾ 山中典子³⁾

- 1) 鹿児島県鹿児島中央家畜保健衛生所 (〒899-2201 日置市東市来町湯田1678)
- 2) 鹿児島県鹿児島中央家畜保健衛生所徳之島支所和泊町駐在機関 (〒891-9112 大島郡和泊町和泊500-4)
- 3) (独)農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究所 (〒305-0856 つくば市観音台3-1-5)

(2012年3月22日受付・2012年6月13日受理)

要 約

繁殖雌牛33頭を飼養する黒毛和種牛繁殖農場において、輸入ペレニアルライグラスストローを1日1頭あたり6kg給与したところ、4頭が給与6～7日目に食欲不振となり、うち1頭が振戦、後弓反張及び起立不能を呈して死亡した。種子内に、エンドファイト様菌糸が確認された。同ストロー中ロリトレムB濃度は約2,000 μ g/kgであり、繁殖雌牛は毒性量のロリトレムBを摂取したと考えられた。死亡牛の急性硝酸塩中毒、低カルシウム血症、低マグネシウム血症、大脳皮質壊死症、BSE、脳脊髄炎及びコリンエステラーゼ阻害物質による中毒が否定された。以上から、死亡牛の神経症状をライグラススタッガーと診断した。黒毛和種牛におけるロリトレムBの毒性量などの詳しい病態に関する情報は少ないため、本症例で得られた知見は有益である。——キーワード：牛、ロリトレムB、ライグラススタッガー。

----- 日獣会誌 65, 762～766 (2012)

ペレニアルライグラス (*Lolium perenne* L.) は、世界中の温帯地域に分布する多年生イネ科植物で、牧草及び芝草として用いられている [1, 2]。米国北西部では、その種子が主要な農産物であり、収穫後のストローは、かつては焼却処分されていたが、煙による環境汚染が問題となり、わが国を含むアジア諸国に、家畜用粗飼料として大量に輸入されるようになった [3, 4]。これら輸入ペレニアルライグラスの芝草用品種は、害虫や干ばつに対する耐性を向上させる目的で、エンドファイト (植物内生菌) を感染させたものが多い [1, 2, 5, 6]。しかし、ペレニアルライグラスのエンドファイトである *Neotyphodium lolii* は、ロリトレムBやエルゴバリンなどのアルカロイドを産生し [3-6]、特にロリトレムBは、神経組織のカルシウム依存性カリウムチャンネルを阻害して、活動電位の再分極を抑制する作用が強い [7, 8]。そのため、高濃度のロリトレムBを含むペレニアルライグ

ラスを摂取した牛、羊及び馬では、震えや運動失調が認められ、これらの中毒症は、ライグラススタッガーと呼ばれる [4, 6, 7]。

今回、鹿児島県沖永良部島において、輸入ストローを給与された黒毛和種繁殖牛が神経症状を呈して死亡した事例をライグラススタッガーと診断したので報告する。

発 生 概 要

繁殖雌牛33頭、子牛20頭を飼養する鹿児島県沖永良部島の黒毛和種牛繁殖農場において、繁殖雌牛4頭が食欲不振となり、うち1頭が神経症状を呈して死亡した。この農場の繁殖雌牛への飼料給与体系は、従来、1日1頭あたり、自家産ローズグラス乾草またはサトウキビの葉6kg、配合飼料1kg及び購入ルーサンアルファルファヘイキューブ0.3kgであり、牛の栄養状態は良好であった。また、以前から衛生管理は適切であった。しかし、

† 連絡責任者：石井択径 (鹿児島県鹿児島中央家畜保健衛生所)

〒899-2201 日置市東市来町湯田1678 ☎099-274-7555 FAX 099-274-7556

E-mail : ishii-takumichi@pref.kagoshima.lg.jp

表 血液検査成績

牛	No.	年齢	CK (U/l)	AST (U/l)	LDH (U/l)	Ca (mg/dl)	Mg (mg/dl)	TCHO (mg/dl)	V.A (IU/dl)	V.E (μ g/dl)	WBC (/ul)	RBC ($\times 10^4$ /ul)	Ht (%)	PLT ($\times 10^4$ /ul)
死亡牛		13	19,670	319	3,300	8.4	3.0	70	36.3	259	8,500	847	47.5	4.2
	1	3	247	73	1,152	10.1	2.0	118	45.5	476	7,300	892	43.9	5.1
発症牛	2	12	143	53	821	9.4	1.8	114	55.3	571	5,600	803	45.4	13.7
	3	10	54	53	1,184	9.2	2.0	84	55.7	294	5,800	709	36.3	16.7
	1	2	83	52	959	9.8	2.4	94	52.3	331	8,600	927	44.3	22.1
非発症牛	2	3	83	63	1,268	10.5	2.2	75	44.2	311	9,400	909	41.4	25.8
	3	6	100	47	877	9.6	2.1	125	57.2	389	5,700	685	38.0	14.1
	4	2	119	62	793	9.0	2.2	123	48.5	491	5,800	766	33.4	16.1

CK: クレアチニンキナーゼ, AST: アスパラギン酸トランスフェラーゼ, LDH: 乳酸デヒドロゲナーゼ, Ca: カルシウム, Mg: マグネシウム, TCHO: 総コレステロール, V.A: ビタミンA, V.E: ビタミンE, WBC: 白血球数, RBC: 赤血球数, Ht: ヘマトクリット, PLT: 血小板数

2011年初春に、沖永良部島では天候不良が続き、この農場では自家産粗飼料の在庫が不足した。そこで、代替粗飼料として、輸入ストロー（商品名：イタリアンストロー）を購入し、2011年4月19日から、繁殖雌牛全頭に1日1頭あたり6kgの給与を開始した。給与6日目に2頭（発症牛No. 1, 2）が食欲不振を呈したため、発症牛2頭の粗飼料を、子牛用粗飼料として購入していたオーツヘイに切り替え、整腸剤と抗生物質を投与したところ、同日中に食欲が回復した。7日目にも、別の1頭（発症牛No. 3）が食欲不振を呈したが、同牛の粗飼料を購入オーツヘイに切り替えたところ、やはり発症同日中に食欲が回復した。しかし、7日目の夕方に、さらに別の1頭が食欲廃絶、泡沫性流涎、四肢振戦、後弓反張、歩様蹠踏を呈して起立不能となり、輸入ストローの給与中止、補液、強心剤、強肝剤、マグネシウム剤、ステロイド及び抗生物質による治療を実施したが、給与8日目11時に死亡した。

材料及び方法

輸入ストローの流通経路を調査した。また、飼槽内の残飼と、飼料庫内に保管されていた飼料各1kgを採取して、異物混入の有無の確認及び小穂形態の観察を実施した。Sahaら [9]の方法に従って、種子中のエンドファイト菌糸を検索した。ストロー中のロリトレムBとエルゴバリンの各濃度の測定は、独農林水産消費安全技術センターに依頼し、それぞれGallagherら [10]とShelbyら [11]の方法を一部改変した高速液体クロマトグラフィー（HPLC）法（飼料分析基準：平成20年4月1日付け農林水産省消費・安全局長通知、19消安第14729号）で実施した。ストロー中の硝酸態窒素濃度は、水抽出液中濃度を反射式光度計（RQflex plus, Merck, Germany）を用いて測定した。

輸入ストローの給与開始8日目の9時に、発症牛3頭、発症後死亡した牛（死亡牛）1頭及び臨床症状が認めら

れなかった同居牛4頭（非発症牛No. 1-4）から血球数測定用のヘパリン加血液及び血清分離用のプレーン血液を採血した。プレーン血液を1200G、10分間遠心分離して得た血清を、測定まで遮光、4℃で保存した。血球数は自動血球計算装置（多項目自動血球計算装置K-4500, シスメックス株, 兵庫）を用いて、一般生化学検査（表）は生化学自動分析装置（日立自動分析装置7070, 株日立ハイテクノロジーズ, 東京）を用いてそれぞれ測定した。HPLC法 [12, 13]によってレチノールと α コフェロールを定量して、ビタミンA及びE濃度とした。

死亡牛を病理解剖し、大脳、小脳、脊髄、心臓、肺、肝臓、腎臓、脾臓、第一胃、第二胃、第三胃、第四胃の各臓器を病理組織学的に検索した。細菌学的検査として、大脳、脊髄、心臓、肺、肝臓、腎臓、脾臓、腸間膜リンパ節及び空腸内容を材料として、5%綿羊血液加トリプチックソイ寒天培地とDHL寒天培地を用いた好気培養、チョコレート寒天培地を用いた微好気培養、5%綿羊血液加GAM寒天培地を用いた嫌気培養を実施した。Miyazakiら [14]の方法により腎臓周囲脂肪中ロリトレムB濃度を測定した。Marksonら [15]の方法に従って大脳皮質に波長365nmの紫外線を照射して、自家蛍光の有無を確認した。延髄門部を試料として、エライザ法（フレライザBSE, 富士レジオ株, 東京）により、牛異常プリオン蛋白の定性試験を実施した。尿を試料として、コリンエステラーゼ阻害物質の簡易定性試験（Agri-screen ticket, Neogen Co., U.S.A.）を実施した。

成 績

輸入ストローは、添付されていた品質検査証明書によると、米国オレゴン州産ベレニアルライグラスであったが、当該農場に輸入ストローを納品した業者は、国内の仲介業者からイタリアンストローという商品名で同スト

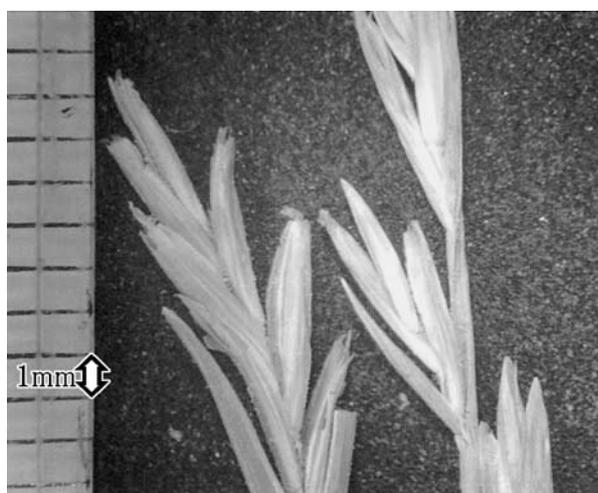


図1 輸入ストローの小穂、小穂同士が密着せず、芒がない

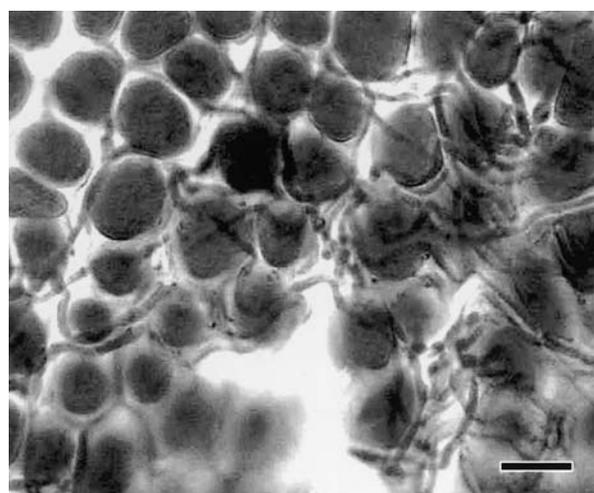


図2 種子内の菌子、種子糊粉層細胞間に糸くず様のエンドファイトが認められる（ローズベンガル染色 Bar = 20 μ m）

ローを入手して販売した。なお、この証明書によると、オレゴン州立大学によるロリトレム B 濃度の測定値は、100 μ g/kg 未満であった。

農場で採取した輸入ストローは、小穂同士が密着せず、無芒（図1）であり、ペレニアルライグラスの特徴を有していた。飼槽内の残飼はすべての牛房でごく少量であり、ライグラス以外の植物や異物は認められなかった。種子の糊粉層細胞間に、一部染色性が悪い捻れた菌糸が確認された（図2）。飼槽内の残飼及び未給与ストロー中ロリトレム B 濃度は、1,800 及び 2,600 μ g/kg であり、エルゴバリン濃度は、490 及び 650 μ g/kg であった。硝酸態窒素濃度は、原物中濃度として 57mg/kg 未満であった。

血球数測定では、死亡牛と発症牛 No. 1 の血小板数が 4.2 及び $5.1 \times 10^4/\mu$ l と低値であった。血清一般生化学検査では、死亡牛において、クレアチニンキナーゼ（CK）値の著増、アスパラギン酸トランスフェラーゼ（AST）及び乳酸デヒドロゲナーゼ（LDH）の高値が認められた。また、検査した 8 頭全頭の血清ビタミン A 濃度が低水準であった（表）。

死亡牛の解剖所見として、心臓及び脾臓の斑状出血、肺のうっ血、気管内泡沫が認められた。組織学的所見として、心筋間の出血及びその周囲の筋線維の変性・壊死、脾臓被膜下の高度な出血、肝臓の多発性巣状壊死及び線維化が認められた。その他の臓器に著変は認められなかった。細菌学的検査において、有意菌は分離されなかった。腎臓周囲脂肪中ロリトレム B 濃度は、46 μ g/kg であった。大脳皮質の自家蛍光は認められなかった。延髄の牛異常プリオン蛋白は検出されなかった。尿からコリンエステラーゼ阻害物質は検出されなかった。

考 察

当該農場の繁殖雌牛に給与された輸入ストローは、商品名としてはイタリアンストローであったが、草種は小穂の形態からペレニアルライグラスと鑑別できた。種子内に認められた菌糸は、その形態からエンドファイト [16] であると判断できた。同ストロー中ロリトレム B 濃度は 2,000 μ g/kg 程度であり、添付証明書の値とは大きく異なっていた。実測濃度から算定される 1 日 1 頭あたりのロリトレム B 摂取量は、ストローの給与量が 6kg であったことから、およそ 12mg であった。

牛におけるロリトレム B の毒性量について、Tor-Agbidye ら [6] は、緬羊を用いた実験成績から、飼料中濃度の閾値は 1,800～2,000 μ g/kg であると提唱している。しかし、国内で発生した牛のライグラススタッガー症例における飼料中ロリトレム B 濃度は 1,068～3,740 μ g/kg [17] であり、Miyazaki ら [17] は、牛における毒性量には品種や年齢などの要因による個体差があり、感受性の高い個体では提唱された閾値に比べて低い値で発症すると述べている。また、黒毛和種雌牛を用いたエンドファイト感染ペレニアルライグラスの給与試験において、ロリトレム B 摂取量を 1 日 1 頭あたり 7.8mg に設定したところ、給与 12～15 日目にライグラススタッガーを発症している [14]。したがって、当該農場における繁殖雌牛のロリトレム B 摂取量は、毒性量以上であったと考えられた。

検査成績から、急性硝酸塩中毒、低カルシウム血症、低マグネシウム血症、大脳皮質壊死症、BSE、脳脊髄炎及び有機リン農薬等のコリンエステラーゼ阻害物質による中毒を否定した。以上のことから、発生概況とあわせて、死亡牛の神経症状をライグラススタッガーと診断した。

死亡牛の腎臓周囲脂肪中ロリトレムB濃度は、既報値 [14] と比べて低値であったが、これはロリトレムBを摂取した期間が短かったためと推察された。また、死亡牛の血清ビタミンA値は黒毛和種繁殖牛の既報値 [18, 19] と比べて低値であり、肝臓の多発性巣状壊死の誘因 [20] となっていたと考えられた。肝機能障害の所見からも死亡牛の肝臓における毒素の代謝・排泄機能は低下しており、ロリトレムBの影響を受けやすくなっていたと推察された。死亡牛では、CK値とAST値の上昇から筋変性が、心臓、肺、脾臓の所見から急性循環障害が示唆された。血小板数の減少は、出血性病変を反映したものと考えられた。これら主要臓器の病変は、ロリトレムBの急性神経毒性による死戦期の組織障害であると推察された。

本症例では、飼料中からエルゴバリンも検出されている。牛におけるエルゴバリンの中毒症として、冬季に血管収縮作用により四肢や尾端に壊疽を起こすフェスクフット [6, 21, 22] や夏季に体温及び呼吸数増加を引き起こすフェスクトキシコーシス [22] が知られており、飼料中濃度の発症閾値は400～750 $\mu\text{g}/\text{kg}$ [4, 6] とされている。黒毛和種繁殖牛では、1日1頭あたりの摂取量が7.4mgの場合にフェスクフットを発症したが、5.5mgでは発症しなかった [21] と報告されている。また、フェスクフットの発症には低温感作が大きく関与しており、牛では平均気温15.9 $^{\circ}\text{C}$ での発症報告 [6] がある。なお、ペレニアルライグラス給与により、ロリトレムBとエルゴバリンを同時摂取した場合には、ロリトレムBの毒性発現が早いために、エルゴバリンの毒性は不明瞭である [4] とされている。国内で発生したライグラススタッガー症例においても、飼料中エルゴバリン濃度は355～1,300 $\mu\text{g}/\text{kg}$ と比較的高値であったが、エルゴバリンによる中毒症を疑わせる臨床症状は認められていない [17]。本症例では、輸入ストロー中エルゴバリン濃度は発症閾値と同程度であったが、1日1頭あたりのエルゴバリン摂取量は3～4mg程度と比較的少なく、ストロー給与中の沖永良部島の平均気温は16.2～20.8 $^{\circ}\text{C}$ であり比較的温暖であった。さらに高濃度のロリトレムBによる毒性の発現が早かったために、エルゴバリンによる症状が認められなかったものと推察された。

牛、特に黒毛和種牛におけるライグラススタッガーについては、ロリトレムBの毒性量をはじめとする病態の詳細な情報が少ない。本症例では粗飼料として輸入ストローのみを給与していたため、繁殖雌牛のロリトレムB摂取量及び毒性量の推定が可能であった。発症と年齢との関係は不明であった。また、給与開始から発症までの期間が短いことや脂肪中ロリトレムB濃度が低いことなど、給与試験の報告 [14] と異なる点があった。短期間で発症した理由として、1日あたりのロリトレムB摂取

量が多かったことや、血清ビタミンA値が低水準であったことから、潜在的に肝機能が低下していた可能性が考えられた。本症例で得られた知見は、黒毛和種牛におけるライグラススタッガーの病態を検討する上で、有益な情報であると考えられた。

引用文献

- [1] 清水矩宏, 宮崎 茂, 森田弘彦, 廣田伸七: 牧草・飼料作物編, 牧草・毒草・雑草図鑑, 清水矩宏ら編, 70-71, (社畜産技術協会, 東京 (2005))
- [2] 前嶋敦夫, 雑賀 優, 井上達志, 築城幹典: ペレニアルライグラス流通品種における種子中のエンドファイト感染率及びアルカロイド含有率, 日本草地学会誌, 46, 52-57 (2000)
- [3] Fisher MJ, Bohnert DW, Ackerman CJ, Schauer CS, DelCurto T, Craig AM, Vanzant ES, Harmon DL, Schrick FN: Evaluation of perennial ryegrass straw as a forage source for ruminants, J Anim Sci, 82, 2175-2184 (2004)
- [4] Hovermale JT, Craig AM: Correlation of ergovalin and lolitrem B levels in endophyte-infected perennial ryegrass (*Lolium perenne*), J Vet Diagn Invest, 13, 323-327 (2001)
- [5] Porter JK: Analysis of endophyte toxins: Fescue and other grasses toxic to livestock, J Anim Sci, 73, 871-880 (1995)
- [6] Tor-Agbidye J, Blythe LL, Craig AM: Correlation of endophyte toxins (ergovalin and lolitrem B) with clinical disease: Fescue foot and perennial ryegrass staggers, Vet Hum Toxicol, 43, 140-146 (2001)
- [7] Imlach WL, Finch SC, Dunlop J, Meredith AL, Aldrich RW, Dalziel JE: The molecular mechanism of "ryegrass staggers," a neurological disorder of K^+ channels, J Pharmacol Exp Ther, 327, 657-664 (2008)
- [8] Dalziel JE, Finch SC, Dunlop J: The fungal neurotoxin lolitrem B inhibits the function of human large conductance calcium-activated potassium channels, Toxicol Lett, 155, 421-426 (2005)
- [9] Saha DC, Jackson MA, Johnson-Cicalese JM: A rapid staining method for detection of endophytic fungi in turf and forage grasses, Phytopathology, 78, 237-239 (1988)
- [10] Gallagher RT, Hawkes AD, Stewart JM: Rapid determination of the neurotoxin lolitrem B in perennial ryegrass by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection, J Chromatogr A, 321, 217-226 (1985)
- [11] Shelby RA, Flieger M: Improved method of analysis for ergovaline in tall fescue by high-performance liquid chromatography, J Agr Food Chem, 45, 1797-1800 (1997)
- [12] 月田 潔, 勝井五一郎: ビタミンA, ビタミン学実験法 [I] 脂溶性ビタミン, 日本ビタミン学会編, 1-26, 東京化学同人, 東京 (1983)
- [13] 大森正英, 武藤泰敏: ビタミンA, ビタミンハンドブック③ビタミン分析法, 日本ビタミン学会編, 1-9, (株化

- 学同人, 京都 (1989)
- [14] Miyazaki S, Ishizaki I, Ishizaka M, Kanbara T, Ishiguro-Takeda Y : Lolitrem B residue in fat tissues of cattle consuming endophyte-infected perennial ryegrass straw, *J Vet Diagn Invest*, 16, 340-342 (2004)
- [15] Markson LM, Wells GAH : Evaluation of autofluorescence as an aid to diagnosis of cerebrocortical necrosis, *Vet Rec*, 111, 338-340 (1982)
- [16] Koga H, Tsukiboshi T, Uematsu T : Incidence of the endophytic fungus *Acremonium coenophialum* in tall fescue (*Festuca arundinacea*) in Japan, *Journal of Japanese Grassland Science*, 40, 373-380 (1995)
- [17] Miyazaki S, Fukumura M, Yoshioka M, Yamanama N : Detection of endophyte toxins in the imported perennial ryegrass straw, *J Vet Med Sci*, 63, 1013-1015 (2001)
- [18] 牧村 進, 松尾修輔, 薄井萬平, 片山英美 : 黒毛和種牛の血清および肝臓中のレチノール, β -カロテンおよび α -トコフェロールの高速液体クロマトグラフィーによる同時定量, *日獣会誌*, 44, 328-332 (1991)
- [19] Katamoto H, Yamada Y, Nishizaki S, Hashimoto T : Seasonal changes in serum vitamin A, vitamin E, and β -carotene concentrations in Japanese black breeding cattle in Hyogo prefecture, *J vet med sci*, 65, 1001-1002 (2003)
- [20] Jones TC, Hunt RD : Hepatic abscesses and related conditions, *Veterinary pathology*, Jones TC, et al eds, 5th ed, 1423-1426, Lea & Febiger, USA (1983)
- [21] 加茂前仁弥, 秋山敬孝, 岡田啓延, 宮崎 茂 : 黒毛和種繁殖牛にみられた輸入ストローによるフェスクフット症例, *日獣会誌*, 63, 125-129 (2010)
- [22] Bacon CW : Toxic endophyte-infected tall fescue and range grasses : historic perspectives, *J Anim Sci*, 73, 861-870 (1995)

A Case of Ryegrass Staggers Induced by Imported Straw in Japanese Black Cows

Takumichi ISHII^{*†}, Zenjirou SAKAGUCHI, Terunori KOREEDA, Hiraku MORIKI,
Norio TABARA and Noriko YAMANAKA

** Kagoshima Central Livestock Hygiene Service Center, 1678 Yuda, Higashiichiki, Hioki, 899-2201, Japan*

SUMMARY

A herd of 33 Japanese black breeding cows were fed with imported perennial ryegrass straw. Among the herd, 4 cows showed anorexia on the 6th or 7th day of feeding, and one showed tremors, opisthotonus, and astasia, leading to death. Endophyte-like hyphae were observed in the straw seeds. Each cow was fed 6 kg of straw per day. The approximate concentration of lolitrem B was 2,000 $\mu\text{g}/\text{kg}$. This strongly suggested that the cows ingested toxic levels of lolitrem B. Acute nitrate poisoning, hypocalcemia, hypomagnesemia, cerebrocortical necrosis, BSE, encephalomyelitis, or poisoning by choline esterase inhibitor was ruled out by clinical examination. On the basis of these observations, neurological symptoms observed in the dead cow were determined to be due to ryegrass staggers. These findings in the present case can provide further information about the pathogenesis of ryegrass staggers, including toxic levels of lolitrem B for Japanese Black cattle.

—Key words : cattle, lolitrem B, ryegrass staggers.

† Correspondence to : Takumichi ISHII (Kagoshima Central Livestock Hygiene Service Center)

1678 Yuda, Higashiichiki, Hioki, 899-2201, Japan

TEL 099-274-7555 FAX 099-274-7556 E-mail : ishii-takumichi@pref.kagoshima.lg.jp

J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 65, 762 ~ 766 (2012)