

乳用哺乳子牛におけるホルムアルデヒド中毒の1例

阿部憲章[†] 高橋真紀 熊谷芳浩 後藤満喜子 昆野 勝

岩手県南家畜保健衛生所 (〒023-0003 奥州市水沢区佐倉河字東館41-1)

(2013年7月24日受付・2013年10月22日受理)

要 約

岩手県内の1酪農場で、前日までと異なる発酵乳が給与された哺乳牛10頭中9頭が虚脱及び呼吸速迫を示して急死した。病牛2頭の第四胃と近位十二指腸に出血を伴う壊死性炎が観察され、同牛の第四胃内容並びに哺乳牛に与えた発酵乳からホルムアルデヒドが検出された。ホルムアルデヒドの代謝産物とみなされるギ酸が病牛4頭の血清から検出され、同濃度は8.5～42.6mg/lであった。得られた成績から、本事例をホルムアルデヒド中毒と診断し、同化学物質が混入した発酵乳を中毒の原因と特定した。——キーワード：ホルムアルデヒド中毒，ホルマリン摂取，哺乳子牛。

----- 日獣会誌 67, 129～133 (2014)

ホルムアルデヒドは無色透明で刺激性を有する水溶性の気体であり、ホルムアルデヒドを約40%含有する水溶液がホルマリンと呼ばれる [1, 2]。ホルマリンは器具や室内の消毒薬として用いられ [3]、酪農場では蹄病予防を目的に蹄浴槽での使用が推奨されている [4]。海外では、防腐効果を期待して、子牛へ給与する初乳や家畜飼料穀物に添加されている [5]。

ホルマリンは経口摂取、ガスの吸入、皮膚への接触により毒性を示し、接触部に組織傷害と炎症を引き起こすとともに体内に容易に吸収される [2]。ホルマリンを誤飲した人の中毒例では、消化器粘膜の腐食性変化に加えて、体内に吸収されたホルムアルデヒドの代謝産物に起因するアシドーシスがみられ [1, 6]、後者に関連する循環障害や中枢神経系障害などの諸症状 [7] を伴う。

ホルマリンの誤飲による家畜の中毒は牛でいくつか報告されており、原因として蹄浴槽の溶液 [8] やミルク [9] がある。多量のホルマリンを含むミルクを摂取した子牛は胃腸炎を引き起こして急死し、流涎、腹痛、下痢、眼窩の陥凹、呼吸困難の諸症状を示す [5, 9]。

国内において牛のホルムアルデヒド中毒の発生報告は著者らが知るかぎりみあたらない。この報告では、ホルマリンの誤飲によるホルムアルデヒド中毒と診断した乳用哺乳子牛の検査成績を述べ、その病理発生を考察した。

材料及び方法

2012年3月28日、乳用成雌牛130頭と子牛20頭を飼養する酪農場で、発酵乳を人工的に与えられていた10頭中9頭が虚脱して起立不能に陥った。病牛は呼吸速迫、知覚の鈍麻、眼窩の陥凹及び流涎を伴い、すべてが発病後12時間以内に死亡した。

当農場では7～60日齢の子牛に発酵乳を給与し、1日1頭あたり最大3.6lを朝、昼、晩の3回に分けて与えていた。本病発生日は、発酵乳を調整している容器を新たに開封し、同じ容器内の発酵乳を朝と昼に与えた。同日の1頭あたりの推定給与量は、発病した9頭では1.2～2.4l、未発病であり離乳間近の1頭では0.5lと算定された。

発酵乳の調整方法について調査するとともに、発酵乳を給与された8～49日齢の子牛6頭(死亡牛1頭: No. 1, 瀕死期の病牛4頭: Nos. 2～5, 未発病牛1頭: No. 6), 75～91日齢で離乳後の同居牛4頭 (Nos. 7～10) の合計10頭並びに子牛に与えた発酵乳を以下のように検索した。

病理学的検査: 病牛2頭 (Nos. 1, 2) の剖検を行い、全身諸組織から得た検査材料を10%緩衝ホルマリン液で固定してパラフィン包埋後薄切し、ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色を施して鏡検した。1頭 (No. 2) は死亡直後に剖検に供した。

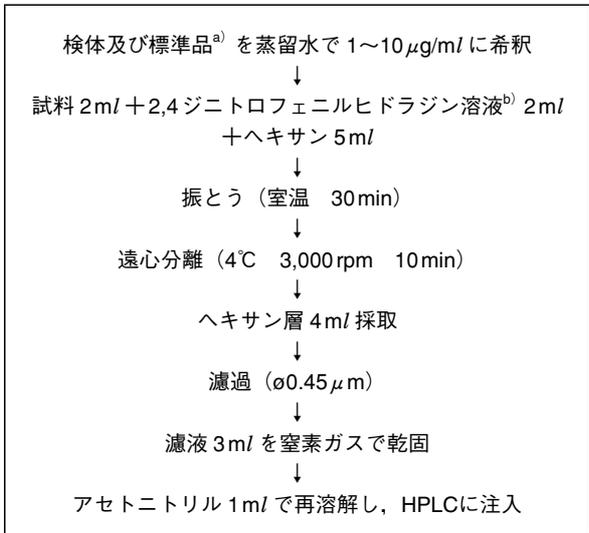
血液生化学的検査: 病牛4頭 (Nos. 2～5), 未発病

[†] 連絡責任者: 阿部憲章 (岩手県南家畜保健衛生所)

〒023-0003 奥州市水沢区佐倉河字東館41-1

☎0197-23-3531 FAX 0197-23-3593

E-mail: noriaki-abe@pref.iwate.jp



カラム	mightysil RP-18 GP250-4.6 (5μm)
カラム温度	37℃
流速	1.0ml/min
検出	UV 345nm
移動相	蒸留水：メタノール 60：40

図1 ホルムアルデヒドの抽出法及びHPLCの条件
 a) ホルムアルデヒド標準液1,000mg/l (関東化学, 東京)
 b) DNPH (関東化学, 東京) 1.4g/2N 塩酸100ml

牛 (No. 6) 及び同居牛4頭から発病日に採取した血液を材料とした。病牛と未発病牛の血液はすべて発酵乳給与後に採取し、病牛4頭 (Nos. 2~5) からは瀕死期に採取した。赤血球数 (RBC), 赤血球容積比 (Ht), ヘモグロビン量 (Hb) 及び白血球数 (WBC) を常法に従い測定した。血清は採取後速やかに分離し、以下の検査時まで-20℃で保存した。血清中の総蛋白 (TP), 総コレステロール (TCHO), アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST), γ-グルタミルトランスフェラーゼ (GGT), クレアチンホスホキナーゼ (CK), 血液尿素窒素 (BUN), クレアチニン (Cre), ナトリウム (Na), カリウム (K), クロール (Cl) をドライケミストリー法 (富士ドライケム3500V, 富士フィルムメディカル株, 東京), ギ酸及び乳酸を酵素法 (Fキット, 株J.K.インターナショナル, 東京) により分析した。

ホルムアルデヒドの検出: 子牛に与えた発酵乳, 剖検牛2頭の第四胃内容, 並びに剖検牛 (No. 2), 未発病牛 (No. 6), 同居牛4頭の血清を材料とし, Kaminskiら [10] の方法に従い, 高速液体クロマトグラフィー (HPLC, LaChrom L-7420, 株日立ハイテックフィールドイグ, 東京) を用いて測定した。抽出法及びHPLCの条件は図1のとおりとした。発酵乳と剖検牛の第四胃内容については, 小型反射式光度計 (RQフレックスプラス, メルク株, 東京) を用いた測定も行った。

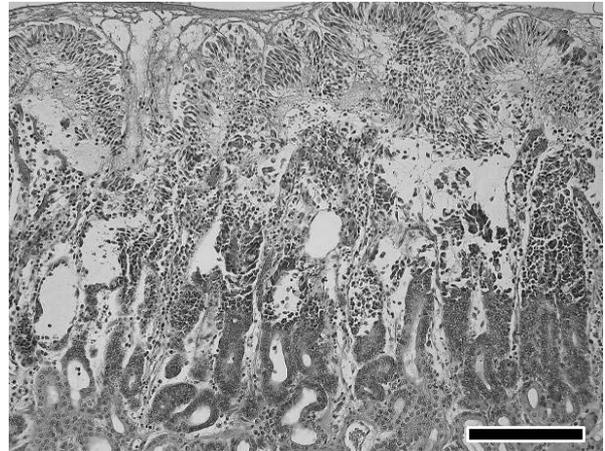


図2 第四胃
 粘膜表面層は凝固壊死して剥離し, 拡張した腺腔内に細胞頽廃物が存在する。残存する固有層にうっ血及び細胞浸潤がみられる。(HE染色 Bar = 200μm)

細菌学的検査: 剖検牛2頭の肝臓, 脾臓, 腎臓, 心臓, 肺及び脳を, 37℃の好気性及び嫌気性下で48時間培養した。好気性培養には5%羊血液加及びDHL寒天培地を, 嫌気性培養には5%卵黄加GAM寒天培地を用い, 後者はガスバック法で培養した。

成 績

発酵乳の調整方法: 発生農場では, 成牛の蹄浴資材にホルマリンを用い, ホルマリンの空き容器を洗浄して発酵乳の調整容器に使用していた。ホルマリンが入った容器と使用後の空き容器は別々の場所に保管されていたが, まれに隣り合った場所に置かれていることもあった。発酵乳の調整作業には複数の管理者が従事し, 空き容器の洗浄, 容器への原乳の投入, 原乳への生菌剤の添加及び発酵状況の確認の作業担当は特定されていなかった。

本病発生日に実施した聞き取り調査により, 発生日に与えた発酵乳の調整開始時期にあたる2~3週間前に, ホルマリンが入った容器が置き場所から消えていた事実が確認された。同日, 当家畜保健衛生所の獣医師が発酵乳の官能検査を実施し, ホルマリン様の臭気を確認した。

病理学的検査成績: 剖検牛2頭の肉眼病変は消化管に限局し, 第四胃と近位十二指腸において顕著に認められた。粘膜は水腫性に肥厚してうっ血及び出血を伴い, 白色の浸出物を伴う多量の粘液により覆われていた。第四胃内に残存した凝固乳は前述の白色粘液を混じ, ホルマリン様の臭気を呈した。

組織学的に主要な病変は第四胃及び十二指腸に存在し, 出血を伴う壊死性炎が観察された。粘膜の上皮細胞層と直下の固有層の表面層は層状ないし巣状に凝固壊死し

表1 血液生化学検査成績

項目	病牛 ¹⁾				未発病牛 ²⁾	同居牛 ³⁾			
	No. 2	No. 3	No. 4	No. 5	No. 6	No. 7	No. 8	No. 9	No. 10
RBC ($\times 10^4/\mu l$)	1,758	1,676	1,960	1,040	1,258	1,478	1,042	932	1,520
Ht (%)	60	53	62	35	34	34	30	30	34
Hb (g/dl)	21.8	21.2	21.6	11.8	12.4	12.0	11.8	10.9	13.3
WBC ($\times 10^2/\mu l$)	201	172	155	220	126	118	81	88	108
TP (g/dl)	8.2	5.2	5.4	4.8	6.0	6.2	6.4	6.2	6.0
TCHO (mg/dl)	244	84	41	39	145	56	52	74	53
AST (U/l)	82	59	127	39	54	94	81	75	87
GGT (U/l)	71	323	126	53	31	28	36	24	25
CK (U/l)	167	1,386	202	132	72	419	114	84	177
BUN (mg/dl)	17.0	15.0	28.5	16.0	14.8	9.7	13.9	9.7	13.1
Cre (mg/dl)	1.1	1.2	1.3	1.0	1.1	0.7	0.5	0.5	0.7
Na (mEq/l)	140	140	137	133	140	139	139	139	140
K (mEq/l)	7.7	9.9	8.2	5.9	4.7	5.2	5.1	4.2	4.6
Cl (mEq/l)	102	101	96	97	103	99	96	97	99
ギ酸 (mg/l)	10.5	42.6	27.3	8.5	ND*	ND	ND	ND	ND
乳酸 (mg/dl)	6.7	8.8	6.1	3.6	3.6	1.9	1.4	6.7	6.7

*ND: 検出されず

1) 病牛: 発酵乳摂取 (推定量1.2~2.4 l/頭/日)

2) 未発病牛: 発酵乳摂取 (推定量0.5 l/頭/日)

3) 同居牛: 離乳子牛, 発酵乳未摂取

て剥離し、壊死部に多量の粘液と線維素が付着していた。露出した固有層にはうっ血、出血及び好中球と単核細胞の浸潤がみられた。粘液分泌細胞及び十二指腸腺上皮細胞は分泌亢進を示し、粘液を満たして拡張した腺腔内に変性した上皮細胞を容れていた (図2)。巣状のび爛が、空腸及び回腸に散在した。肝臓、腎臓、肺、心臓、中枢神経系を含む他の臓器や組織に著変は認められなかった。

血液生化学的検査成績: 表1に示すとおり、病牛3頭 (Nos. 2~4) にRBC, Ht, Hb及び血清Kの高値がみられた。病牛4頭 (Nos. 2~5) の血清からギ酸が検出され、その濃度は8.5~42.6mg/lの範囲であった。

ホルムアルデヒドの検出: HPLCを用いた分析により、発酵乳、剖検牛2頭の第四胃内容、剖検牛1頭の血清からホルムアルデヒドが検出され、他からは検出されなかった。HPLC及び小型反射式光度計を用いて測定したホルムアルデヒド濃度は、発酵乳では21,226及び19,886 $\mu\text{g/ml}$ 、第四胃内容では223~344及び376~413 $\mu\text{g/ml}$ であった (表2)。

細菌学的検査成績: いずれからも有意菌は培養されなかった。

考 察

1酪農場で集団的に急死した子牛を検索した結果、第四胃に出血を伴う壊死性が観察され、同胃内容からホルムアルデヒドが検出された。ホルムアルデヒドは同牛に与えた発酵乳からも検出された。得られた成績から、本

表2 各検体のホルムアルデヒド濃度 ($\mu\text{g/ml}$)

検体	分析機	発酵乳	病牛 ¹⁾		未発病牛 ²⁾	同居牛 ³⁾
			No.1	No.2	No.6	Nos.7-10
発酵乳	HPLC	21,226				
	光度計	19,886				
第四胃内容	HPLC	223	344	NT	NT	
	光度計	413	376	NT	NT	
血清	HPLC	NT*	0.45	ND**	ND	

*NT: 測定せず **ND: 検出されず

1) 病牛: 発酵乳摂取 (推定量1.2~2.4 l/頭/日)

2) 未発病牛: 発酵乳摂取 (推定量0.5 l/頭/日)

3) 同居牛: 離乳子牛, 発酵乳未摂取

事例をホルムアルデヒドによる中毒と診断し、発酵乳を中毒物質の起源と特定した。飼養管理者からの聞き取り調査の結果、発酵乳を調整する過程でホルマリンが混入した可能性が疑われた。

本事例で子牛に与えられたホルムアルデヒドの量を、発酵乳の検査値と推定給与量及び日本飼養標準に記載されている乳用子牛の標準発育体重をもとに概算すると、1頭あたりの給与量は病牛で25~50g (340~1,132mg/kg)、未発病牛で10g (142mg/kg)と推定された。これらの量は、過去に子牛の急性中毒例で報告された推定摂取量の3倍から18倍に相当し [9]、ホルムアルデヒドを経口投与されたモルモットあるいはラットにおける50%致死量 (体重1kgあたり260mgあるいは800mg [2, 11])と同等以上であった。病牛の臨床経過

からも、病牛の摂取量が急性中毒を起こし得る致死量を超えていたことが示唆された。

ホルムアルデヒドの代謝経路は実験動物及び人において同様であり、体内で産生あるいは体外から摂取されたホルムアルデヒドは、さまざまな組織や細胞においてギ酸に急速に酸化されて最終的に水と二酸化炭素に分解される [1]。血液中においてもホルムアルデヒドの代謝は速やかに行われ、同物質を静脈内投与されたサルやホルマリンを誤飲した人の中毒例の血液の中では、ホルムアルデヒド濃度が速やかに低下し、ギ酸塩やギ酸の濃度が増加することが報告されている [6, 12-14]。

ホルムアルデヒド及びギ酸が病牛の血清から検出され、それらの濃度はそれぞれ $0.45 \mu\text{g/ml}$ 及び $8.5 \sim 42.6 \text{mg/l}$ の範囲を示し、未発病牛や同居牛の血清からは検出されなかった。分析法は異なるものの、検出されたホルムアルデヒド濃度は、ホルマリンを含まない飼料を与えた健康な子牛 [15] の血中濃度（平均 $0.512 \mu\text{g/g}$ ）と同程度であり、過去に子牛の急性中毒例 [9] で報告された値（ $20 \sim 40 \mu\text{g/ml}$ ）に比較して低い値を示した。以上の事実から、病牛の血液においてホルムアルデヒドが急速に酸化されて代謝産物であるギ酸の濃度が増加したことが推察され、人の中毒例 [6, 13, 14] で示されているように代謝性アシドーシスの病態であった可能性が疑われた。

生体内の電解基平衡を維持する緩衝調節機構の一つとして細胞内外のイオン交換作用があり、アシドーシスの病態では細胞内から K^+ が放出されて高 K 血症となる [16]。病牛に認められた血清 K の高値は、血清ギ酸濃度の増加に関連したと考えられた。同牛には高度な脱水を示唆する血液所見もみられたことから、血液濃縮の影響も考慮する必要があるが [16]、血清 Na 及び Cl の値に増加はみられず、影響の程度は低いと思われた。

病牛の血清ホルムアルデヒド濃度が既報の中毒例に比べて低かった正確な理由は不明であるが、ホルムアルデヒドが血液中で速やかに代謝される事実から [1, 6, 12-14]、ホルムアルデヒド摂取から採血までの時間が影響した可能性が考えられた。ホルムアルデヒド中毒を疑う事例を診断する際は、血清ギ酸濃度をあわせて測定することが必要と考えられた。

ホルマリンには、ホルムアルデヒドの重合を避ける目的で、15%未満のメタノールが加えられていることから [1, 2]、メタノールによる毒性も考慮する必要がある [1]。メタノールは体内でホルムアルデヒドに酸化された後、同様の代謝機序によりギ酸に酸化されて毒性を発現する [1, 12, 17]。本事例においても、メタノールの代謝産物が臨床症状を憎悪した可能性が疑われたが、メタノールのホルマリン含有量や、経口摂取後の血液吸収割合が低い事実から [17]、その程度は軽微であったと

思われた。

ホルムアルデヒドによる消化管障害の程度は、同化学物質との接触時間に比例し、人では重篤な病変が胃に主座する [1, 6, 13]。検索牛の主要な消化管病変は化学物質による急性期病変の特徴を有し [18]、第四胃と近位十二指腸に限局していた。この病変分布は既報の子牛の中毒例と一致し [9]、新生子牛の未発達な反芻胃構造と関連すると考えられた [19]。すなわち、飲用後の発酵乳が第二胃溝を経て第四胃に直接流入した結果と推察された。

ホルマリンの誤飲が疑われた本事例では、ホルムアルデヒドの測定に小型反射式光度計を用いた検査手法を活用し、簡易な手技で迅速に成績が得られた。本検査手法の成績のみからホルムアルデヒド中毒を診断することはできないものの、HPLCを含む精密機器を保有しない施設での簡易診断に有用な手法であると思われた。

酪農場におけるフリーストールの普及に伴い、蹄病予防にホルマリンを使用する農場が増加するものと懸念される。蹄浴槽のホルマリン溶液を牛が誤飲することを防止するとともに、同溶液が牛に与える飼料やミルクに混入することを防ぐ適正な管理について啓発する必要がある。

引用文献

- [1] Pandey CK, Agarwal A, Baronia A, Singh N : Toxicity of ingested formalin and its management, *Hum Exp Toxicol*, 19, 360-366 (2000)
- [2] 森本兼義 : ホルムアルデヒド, 産業中毒便覧, 後藤 稠編, 1089-1090, 医歯薬出版, 東京 (1977)
- [3] 小林晴男, 湯山 章 : 消毒薬, 改訂獣医薬理学, 柳谷岩雄編, 258-263, 文永堂出版, 東京 (1992)
- [4] Raven ET : 蹄浴, 牛のフットケアと削蹄, 幡谷正明監訳, 107-113, チクサン出版社, 東京 (1990)
- [5] Radostits OM, Gay CC, Hinchcliff KW, Constable PD : *Miscellaneous farm chemicals, Veterinary Medicine, A textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats*, Radostits OM, et al eds, 10th ed, 1846, Saunders Elsevier, Philadelphia (2007)
- [6] Koppel C, Baudisch H, Schneider V, Ibe K : Suicidal ingestion of formalin with fatal complications, *Intens Care Med*, 16, 212-214 (1990)
- [7] Lim S : Metabolic acidosis, *Acta Med Indones*, 39, 145-150 (2007)
- [8] Mitchell GB, Law JM : Formaldehyde poisoning in cattle, *Vet Rec*, 115, 283-284 (1984)
- [9] Egyed MN, Nobel TA, Shlosberg A, Perl S, Yakobson B, Klopfer U, Neria A : Acute formalin poisoning in calves, *Refuah Vet*, 38, 31-35 (1981)
- [10] Kaminski J, Atwal AS, Mahadevan S : Determination of formaldehyde in fresh and retail milk by liquid column chromatography, *J Assoc Off Ana Chem Int*, 76, 1010-1013 (1993)
- [11] Smyth HF Jr, Seaton J, Fischer L : The single dose

- toxicity of some glycols and derivatives, *J Ind Hyg Toxicol*, 23, 259-268 (1941)
- [12] McMartin KE, Martin-Amat G, Noker PE, Tephly TR : Lack of a role for formaldehyde in methanol poisoning in the monkey, *Biochem Pharmacol*, 28, 645-649 (1979)
- [13] Burkhart KK, Kulig KW, McMartin KE : Formate levels following a formalin ingestion, *Vet Hum Toxicol*, 32, 135-137 (1990)
- [14] Eells JT, McMartin KE, Black K, Virayotha V, Tisdell RH, Tephly TR : Formaldehyde poisoning. Rapid metabolism to formic acid, *J Am Med Assoc*, 246, 1237-1238 (1981)
- [15] Buckley KE, Fisher LJ, MacKay VG : Levels of formaldehyde in milk, blood, and tissues of dairy cows and calves consuming formalin-treated whey, *J Agr Food Chem*, 36, 1146-1150 (1988)
- [16] 河合 忠 : 血清電解質と血液ガス検査, 異常値の出るメカニズム, 河合 忠他編, 第5版, 205-239, 医学書院, 東京 (2008)
- [17] Von Burg R : Methanol, *J Appl Toxicol*, 14, 309-313 (1994)
- [18] Loeb PM, Eisenstein AM : Caustic injury to the upper gastrointestinal tract, Sleisenger and Fordtran's gastrointestinal and liver disease: Pathophysiology, diagnosis, management, Feldman M, et al. eds, 335-342, Saunders, Philadelphia (1998)
- [19] 岡本全弘 : 子牛の栄養と代謝, 子牛の科学, 日本家畜臨床感染症研究会編, 124-130, チクサン出版社, 東京 (2009)

A Case of Formaldehyde Poisoning in Dairy Suckling Calves

Noriaki ABE[†], Maki TAKAHASHI, Yoshihiro KUMAGAI,
Makiko GOTOU and Masaru KONNO

* *Iwate Prefecture Southern Regional Livestock Hygiene Service Center, 41-1 Higashidate, Sakurakawa, Mizusawa-ku, Oushu, 020-0003, Japan*

SUMMARY

On a dairy farm in Iwate Prefecture, nine out of 10 suckling calves died within one day, demonstrating collapse and tachypnea. The fermented milk for these suckling calves was found to be different than the milk they had been given on previous days. Histologically, a necrotic inflammation with hemorrhage was found in the abomasum and proximal duodenum of two of the affected calves. Formaldehyde was identified in the abomasum contents of those calves as well as the fermented milk given to the calves. Formic acid, which is considered to be a formaldehyde metabolite, was detected in the sera of 4 of the affected calves, with a concentration ranging from 8.5 to 42.6 mg/l. Based on these results, the disease was diagnosed as poisoning caused by formaldehyde, and the source of the poisoning was its presence in the fermented milk.

— Key words : formaldehyde poisoning, formalin ingestion, suckling calf.

[†] *Correspondence to : Noriaki ABE (Iwate Prefecture Southern Regional Livestock Hygiene Service Center)
41-1 Higashidate, Sakurakawa, Mizusawa-ku, Oushu, 020-0003, Japan
TEL 0197-23-3531 FAX 0197-23-3593 E-mail : noriaki-abe@pref.iwate.jp*

— *J. Jpn. Vet. Med. Assoc.*, 67, 129 ~ 133 (2014)