

原著論文

飼料中の *Aspergillus fumigatus* が泌乳牛群に与える影響と 酵母細胞壁混合飼料の効果

和田賢二^{1)*} 遠藤 洋¹⁾ 高橋純子¹⁾ 矢野 啓²⁾ 渡辺栄次²⁾
 小屋正人²⁾ 阿部省吾²⁾ 加藤敏英²⁾ 小形芳美²⁾

1) 山形県農業共済組合連合会置賜家畜診療所
 (〒999-0002 山形県米沢市窪田町矢野目3668-3)

2) 山形県農業共済組合連合会中央家畜診療所
 (〒990-2171 山形県山形市大字七浦字北川原286-1)

*連絡担当者：和田賢二

山形県農業共済組合連合会 置賜家畜診療所 診療課
 (〒999-0002 山形県米沢市窪田町矢野目3668-3)

TEL 0238-37-6286

FAX 0238-37-6049

MAIL: wada_k@yynosai.or.jp

【要約】

出血性腸症候群 (Hemorrhagic Bowel Syndrome : HBS) は疝痛およびタール状便の排泄などの症状を示す疾病として人や牛で報告されている。その原因のひとつとして *Aspergillus fumigatus* (Afm) の局所感染が指摘されているが、泌乳牛群に対する影響はほとんど報告がない。今回6戸の酪農場における給与飼料中のAfm-DNAを定量するとともに、HBS発生予防を目的とした酵母細胞壁混合飼料を添加し、その前後における血液および生化学的項目、血中Afm-DNA濃度、白血球サブpopulationおよび疾病発生状況について比較した。すべての検査飼料でAfm-DNAが検出され、2/16検体で 1×10^6 spore equivalents 以上を示した。混合飼料添加後各個体における血中Afm-DNA陽性率の減少およびAfm-DNA濃度の低下が認められた。血液検査成績ではRBC数およびHt値が上昇し、添加中止10日後に低下した。白血球サブpopulation解析ではCD8⁺CD45⁺細胞、MHC⁺CD14⁺細胞数の増加が認められた。疫学的には消化器病および乳房炎の発生頭数が減少した。以上の結果から牛の給与飼料にAfmが高率に存在することが明らかになり、酵母細胞壁混合飼料はAfmの消化管内における定着および増殖を阻害し、泌乳牛群に対する悪影響を軽減させる効果があると思われる。

【キーワード：アスペルギルス・フミガタス、出血性腸炎症候群、酵母細胞壁混合飼料】

【結論】

出血性腸症候群 (HBS) は空腸上部の出血性腸炎による食欲廃絶、腹部疝痛、タール状便の排泄、貧血などを主徴とし、多くは乳牛で報告されている死亡率の非常に高い疾病である[1, 4]。本県においても2005年頃から年間5～6例の発症が確認されているが、すべての患畜が死亡または廃用の転帰をとっている。一般的な泌

乳牛群における発生率は1～2%とされているが、Berghausら [2] は開腹手術を実施した乳牛の9.1%にHBSが観察されたと報告している。HBSの原因としては *Aspergillus fumigatus* (Afm) あるいは *Clostridium perfringens* (Cp) の日和見的な腸管内局所感染を指摘している報告があるが、現在のところ明らかにはされていない [1, 4-6, 10]。さらに酪農場における飼料

中Afmの潜在的な生産性への影響が懸念されるものの、それについての報告はみあたらない。

今回著者らは酪農場の給与飼料におけるAfmの汚染状況を調査し、Afmが泌乳牛群に及ぼす影響とHBS発生予防を目的とした酵母細胞壁混合飼料の効果について検討した。

【材料と方法】

調査期間：2005年9月～2006年8月

調査対象：過去1年以内にHBSの発生が見られたA農場(70頭)、B農場(56頭)、C農場(41頭)および生産性が低く繁殖成績の不振なD農場(15頭)、E農場(22頭)、F農場(65頭)の計6農場とした(図1)。

飼料中Afm孢子数(spore equivalents)測定：各農場で給与されている粗飼料、配合飼料およびTMR飼料(A農場：3点、B農場：3点、C農場：4点、D農場：2点、E農場：2点、F農場：2点)についてそれぞれ10～15カ所の部位から50g程度ずつ採取混合しものを乾燥して検体とした。その検体はオレゴン州立大学において以下に示すForsbergらの方法を用いてAfm孢子数を測定した[8]。乾燥飼料50mgを粉碎しQIAamp DNA-Kit(Qiagen社)を用いてDNAを抽出した。DNA遺伝子増幅にはMyiQ thermocycler(BioRad社)を使用した。試料は全て2重測定とし、DNA 1 μ L, PrimerはAfm-ITS-1(USA-OregonUNIV,original)、標準株はA.fumigatus-genomic-DNA standard(Brussels, Belgium, BCCM/IHEM Culture Collection-Mycology Section Scientific Institute of Public Health)を用いた。Sybergreenを用いた3ステップインターカレーター法(95 $^{\circ}$ C3min、95 $^{\circ}$ C30sec、62 $^{\circ}$ C30sec、80 $^{\circ}$ C15sec、83 $^{\circ}$ C5sec、45cycle、55 $^{\circ}$ C1min、80cycle/0.5 $^{\circ}$ C/10seconds/step 80 $^{\circ}$ C)にて定量した。最終産物DNAはサブマリン電気泳動法にて分子量を確認し、Afm-DNA(pg) \times 0.135 = spore equivalentsとし

て乾物飼料1g中のAfm孢子数を算出した。

酵母細胞壁混合飼料：OmniGen-AF(OG; Prince-Agri Product, Quincy, IL)を全農場の成牛に対して試験期間中58g/頭/日使用した。

血液生化学的検査：A、B、C農場から任意に抽出した搾乳牛それぞれ10頭、計30頭を対象にOG添加前、添加60日後および添加中止10日後に同一個体から採血した。血液学的検査(AU-640, Olympus)としてRBC, WBC, Ht, Hb, MCV, MCHを、血液生化学的検査(K-2000, Sysmex)としてTP, Alb, GGT, BUN, Cre, LDH, T-cho, NEFA, Ca, P, Fe, VA, 3-HB, AcAcを測定した。

血液中Afm-DNA濃度測定：全農場においてOG添加前および添加60日後に採血(3.8%クエン酸ナトリウム加試験管)を行い、Fosbergらの方法[8]に従いDNA抽出(Quick Gene-800, Fuzifilm)後、RT-PCR(Mini Opticon, Bio-RAD)によりAfm-DNA濃度を測定した。

白血球サブポピュレーション解析：D、E農場において任意に抽出した10頭からOG添加前および添加60日後に採血を行った。分離した末梢血単核球をCD8, CD45R, WC1, MHCclass-II抗体を用いて間接蛍光抗体法で染色後、フローサイトメーター(FACScan, Becton Dickinson, USA)で白血球表面抗原を測定した。

疫学的調査：A、B、C農場においてOG添加前5カ月間と添加後5カ月間に発生した疾病発生状況を病類別に調査した。

統計処理：OG添加前および添加60日後における血中Afm-DNA陽性頭数、陽性個体の平均DNA量および白血球サブポピュレーションはマンホイットニーのU検定を用いて比較した。OG添加前、添加60日後およびOG中止10日後における血液学的および生化学的項目の比較は一元配置分散分析法を用いた。疫学的調査の比較は χ^2 検定を用いて実施した。

【結果】

飼料中Afm孢子数 (spore equivalents) 測定成績：すべての検査飼料からAfmが検出されたが、A、B、CおよびE農場で孢子数の多い飼料が認められた。とくにA農場の発酵飼料では、 2.6×10^6 spore equivalents/g、E農場のデントコーンサイレージでは 1.3×10^6 spore equivalents/g検出された (表1)。

血液中Afm-DNA濃度測定成績：酵母細胞壁混合飼料添加前に比較して添加60日後では各農場でAfm-DNAの陽性率が低下しており、全体では添加前で52.8% (28/53頭) が陽性であったのに対し、添加後は19.3% (11/57頭) と有意に低下した ($p < 0.01$)。陽性個体における血中Afm-DNA濃度も 212 ± 773 pg/mLから 27 ± 131 pg/mLに減少した (表2)。

血液生化学的検査成績：OG添加60日後にA、B、Cそれぞれの農場でRBC数、Ht値が上昇し、添加中止10日後に低下した ($p < 0.01$)。Hb量においても有意差は認められなかったものの同様の傾向を示した (図2)。WBC数および生化学的検査項目ではOGの添加および中止との間に明らかな関係は認められなかった。

白血球サブpopulation解析成績：OG添加前に比べ $CD8^+CD45^+$ 細胞数、 MHC^+CD14^+ 細胞数がOG添加後に有意に増加した ($p < 0.05$) (図3)。

疫学的調査結果：出血性腸症候群は3農場とも発生が認められなかった。消化器病発症頭数はC農場で15頭から2頭に有意に減少した ($p < 0.05$)。乳房炎発症頭数はB農場で20頭から10頭に、C農場では7頭から0頭に有意に減少した ($p < 0.05$) (表3)。

【考察】

現在ウシにおいてHBSを発症させる原因微生物はAfmあるいはCpとするさまざまな報告がある [1, 4-6, 10]。ヒトの腸管アスペルギル

ス症は、癌の化学療法に起因する好中球減少など、免疫低下状態にある患者で発生がみられる。臨床的には貧血や腹部疼痛、タール状便の排泄を特徴とし、病理学的には空腸上部における局所的な出血、腸粘膜の壊死および腸閉塞などが認められ、血液および糞便からAfm-DNAが検出される [3, 11, 12]。これらの所見はウシのHBSのそれと極めて類似している。さらにTresalletsら [12] はヒトの腸管アスペルギルス症で糞便からしばしば検出されるCpは腸管出血の直接的な原因ではないとしている。したがってウシにおけるHBSの原因微生物はヒトと同様Afmの日和見的な局所感染である可能性が高いと考えられる。

Afmは土壌中に多く存在する腐生性のカビであり、自然環境に広く分布している。飼料などの有機物上では酸素と高水分の状態によって急速に増殖することから、飼料に含まれるカビの中では最も多く検出されるカビのひとつとされている [7, 9]。Santosら [9] はサイレージの調査で27/39検体でAfmが検出され、 1×10^5 CFU/g以上の高い検体も認められたと報告している。今回の調査においても16種類すべての飼料からAfmが検出され、また 1×10^6 spore equivalents/gを超える高濃度の汚染が2点の飼料で認められたことから、ウシでは日常的に非常に多くのAfmが消化管内に取り込まれていることが示唆された。したがって宿主の慢性疾患、分娩、飼料給与失宜など様々なストレスに起因する免疫機能の低下によって、通常消化管粘膜には定着できないAfmが日和見的に感染増殖し、出血性腸炎を引き起こす可能性が考えられた。

Afmが産生するグリオトキシンや他のマイコトキシンは好中球機能を阻害し、マクロファージに形態学的なダメージを与えることが報告されている [7, 14, 15]。また、今回使用したOGはAfmによるHBSの発生防止を目的として製

造された酵母細胞壁成分が主体の混合飼料であり、とくに好中球機能にとって重要であるL-セレクチンおよびIL-1 β の産生を促進し、免疫機能の恒常性を維持するとされている [8, 13]。今回の調査で、OGの添加により血液中Afm-DNA陽性率およびAfm-DNA濃度の低下、免疫細胞とくにMHC⁺CD14⁺で識別されるマクロファージの増加が認められたほか、調査した3農場では消化器病および乳房炎の発症率が低下していた。これらのことから、飼料中に含まれるAfmとそれにより産生されたマイコトキシンが牛群の免疫機能に影響していた可能性が考えられた。

現在、Afm汚染農場における代謝プロファイルテストの特徴的な所見は示されていない。本調査ではOGの添加後に赤血球数の増加およびヘマトクリット値の上昇が認められ、添加中止により減少および低下したが、栄養指標となる生化学的検査項目のAlb, T-cho, BUNなどにはそのような変化が認められなかった。したがって赤血球指数の変化は乾物摂取量の増減などによる栄養学的な変化ではなく、消化管粘膜からの持続的な微量出血を表している可能性が推察された。

以上のことから飼料に含まれるAfmは牛群における対して免疫機能低下や疾病発生の要因のひとつになっている可能性があり、この対策として酵母細胞壁混合飼料の添加が有効であると考えられた。

【謝辞】

飼料中Afm-DNA測定の実施ならびに血中Afm-DNA測定に関して御指導をいただいたオレゴン州立大学Forsberg先生に深謝いたします。また白血球サブpopulation解析を実施していただいた北里大学大塚浩通先生に感謝いたします。

【引用文献】

1. Abutarbush, S. M. and Radostits, O. M. 2005. Jejunal hemorrhage syndrome in dairy and beef cattle: 11 cases (2001 to 2003). *Can. Vet. J.* 46:711-715.
2. Berghaus, R. D., McCluskey, B. J. and Callan, R. J. 2005. Risk factors associated with hemorrhagic bowel syndrome in dairy cattle. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 226:1700-1706.
3. Caudhary, A., Jain, V., Dwivedi, R. S. and Misra, S. 2006. Invasive aspergillosis causing small bowel infraction in a patient of carcinoma breast undergoing chemotherapy. *J. Carcinog.* 5:18.
4. Dennison, A. C., VanMetre, D. C., Callon, R. J., Dinsmore, P., Mason, G. L. and Ellis, R. P. 2002. Hemorrhagic bowel syndrome in dairy cattle: 22 cases (1997-2000). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 221:686-689.
5. Dennison, A. C., VanMetre, D. C., Morley, P. S., Callon, R. J., Plampin, E. C. and Ellis, R. P. 2005. Comparison of the odds of isolation, genotypes, and in vivo production of major toxins by *Clostridium perfringens* obtained from the gastrointestinal tract of dairy cows with hemorrhagic bowel syndrome or left-displaced abomasum. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 227:132-138.
6. Jensen, H. E., Schonheyder, H. and Basse, A. 1991. Acute disseminated Aspergillosis in a cow with special reference to penetration and spread. *J. Comp. Pathol.* 104:411-417.
7. Morgavi, D. P., Boudra, H., Jouany, J. P. and Michalet-Doreau, B. 2004. Effect and stability of gliotoxin, an *Aspergillus fumigatus* toxin, on in vitro rumen

- fermentation. *Food Addit. Contam.* 21:871-878.
8. Puntenny, S. B., Wang, Y. Q. and Forsberg, N. E. 2003. Mycotic infection in livestock: Recent insights and studies on etiology, diagnosis and prevention of Hemorrhage Bowel Syndrome. *Proc. S. W. Anim. Nutr. Manag. Conf.* 49-62.
 9. Santos, V. M., Dorner, J. W. and Carreria, F. 2002. Isolation and toxigenicity of *Aspergillus fumigatus* from moldy silage. *Mycopathol.* 156:133-138.
 10. Sarfati, J., Jensen, H. E. and Latge, J. P. 1996. Route of infections in bovine aspergillosis. *J. Med. Vet. Mycol.* 34:379-383.
 11. Tay, M. H., Balram, C., Foo, K. F., Busmanis, I., Raman, S. and Khoo, K. S. 2003. Unusual case of bowel infraction with invasive *Aspergillus* in an immunocompromised patient. *Ann. Acad. Med. Singapore.* 32:122-125.
 12. Tresallet, C., Nguyen-Thanh, Q., Aubriot-Lorton, M. H., Akakpo, J. P., Al Jijakli, A., Cardot, V., Chigot, J. P. and Menegaux, F. 2004. Small-bowel infraction from disseminated aspergillosis. *Dis. Colon. Rectum.* 47:1515-1518.
 13. Wang, Y. Q., Puntenny, S. B. and Forsberg, N. E. 2004. Identification of the mechanisms by which Omnigen-AF, a nutritional supplement, augments immune function in ruminant livestock. *Proceedings, Western Section, Am. Soci. Anim. Science.* 55.
 14. Watanabe, A., Kamei, K., Sekine, T., Higurashi, H., Ochiai, E., Hashimoto, Y. and Nishimura, K. 2004. Cytotoxic substances from *Aspergillus fumigatus* in oxygenated or poorly oxygenated environment. *Mycopathologia* 158:1-7.
 15. Watanabe, A., Kamei, K., Sekine, T., Waku, M., Nishimura, K., Miyaji, M., Tatsumi, K. and Kuriyama, T. 2004. Effect of aeration on gliotoxin production by *Aspergillus fumigatus* in its culture filtrate. *Mycopathologia* 157:19-27.



Fig.1. Evacuation of tar-like feces (left) and localized hemorrhage in jejunum (right).
The cow suffered from HBS in B-farm

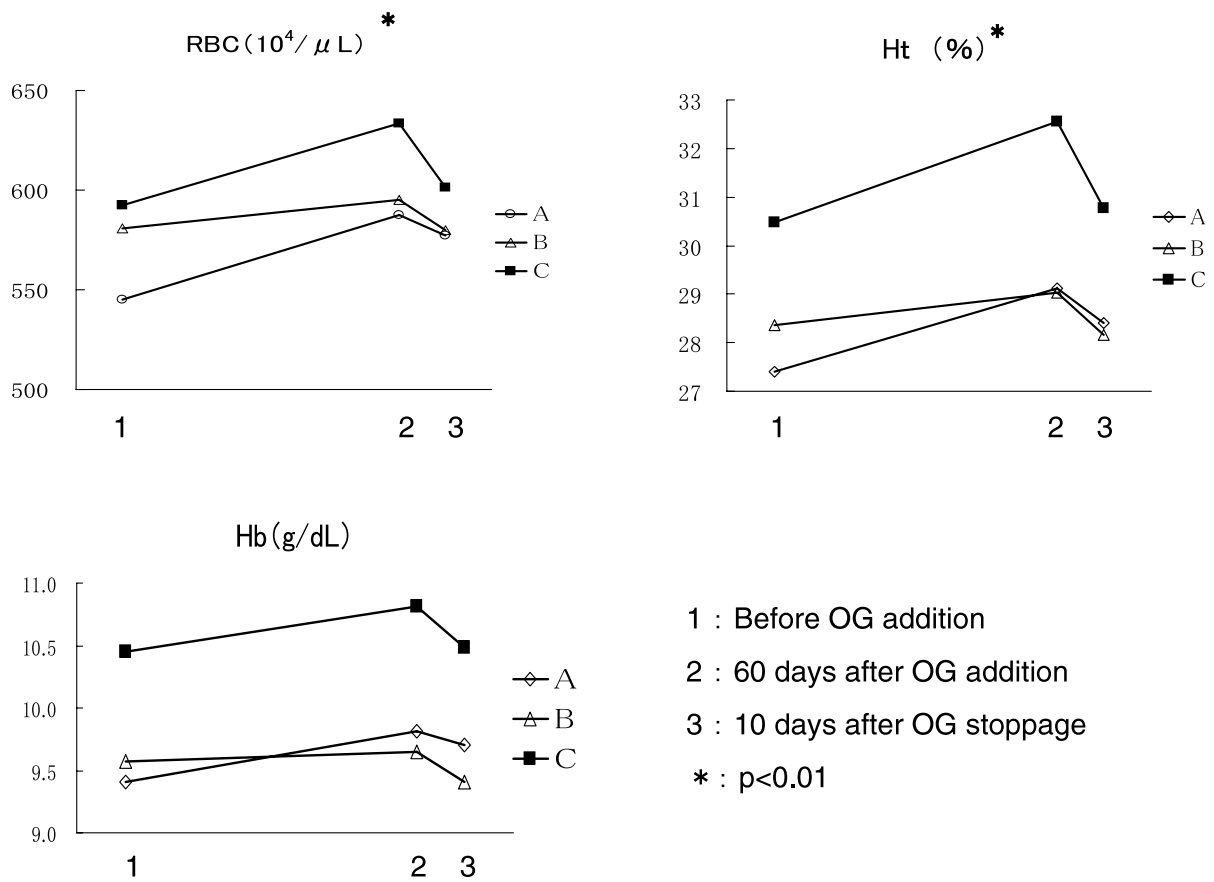


Fig.2. In each farm (n=10), mean RBC and Ht increased by addition of OG, and decreased by removal of OG. Hb showed similar trend of RBC and Ht.
Changes in RBC index in A , B and C farm-by addition of OG

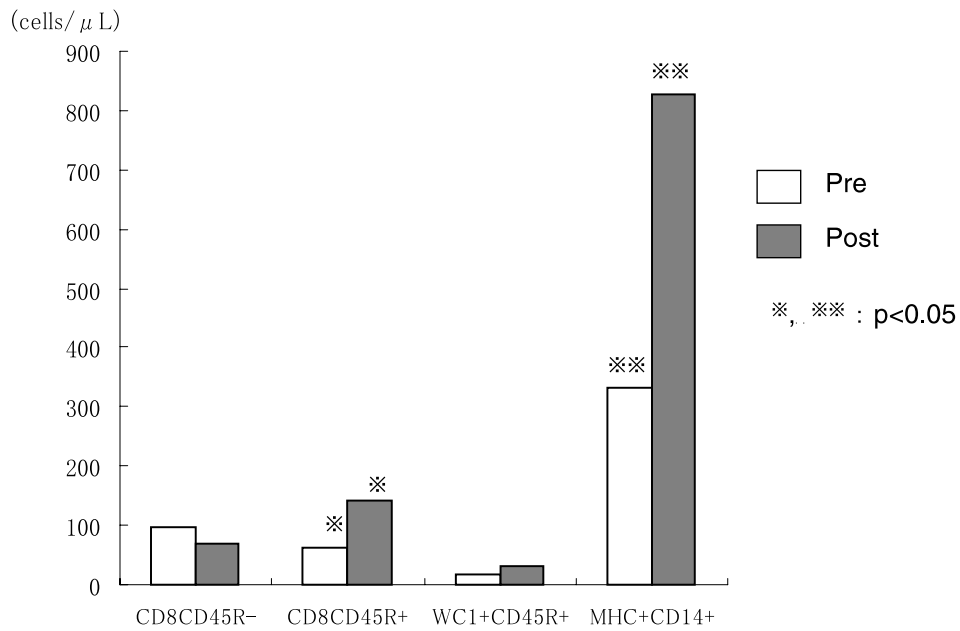


Fig.3. CD8 + CD45R + and MHC + CD14 + increased after addition of OG. Each value is presented as the mean value (n=10). Comparison of mononuclear cell subpopulation before and after addition of OG in D- and E-farm

Table 1. All feed samples were contaminated with Afm, and more than 1 × 10⁶ spore equivalents were detected in 2/16 samples. Number of Afm spore equivalents in feed from each farm

Farm	Feed	Spore equivalents/g
A	Fermented feed	2,670,015.4
	Timothy hay	1,427.5
	Glass silage	8,471.0
B	Fermented feed	66,112.5
	Sudan hay	17,587.9
	Fesque hay	8,866.7
C	Farm made grain mix	69,201.2
	Dent corn silage	13,997.9
	Oats hay	1,494.1
	Timothy hay	2,252.5
D	Glass silage	8,866.7
	Farm cropped hay	2,152.9
E	Glass silage	1,346,058.0
	Rice straw	540,087.1
F	TMR	17,587.9
	Glass silage	15,336.4

Fermented feed: Fermented semi-completed feed on the market

Table 2. Number of blood Afm-positive cows and concentrations of Afm-DNA decreased by addition of OG.

Comparison of Afm-DNA in blood before and after addition of OG

Farm	Afm-DNA positive / tested	
	Pre	Post
A	5 / 10	3 / 10
B	9 / 10	3 / 10
C	6 / 10	4 / 10
D	3 / 6	0 / 5
E	3 / 5	0 / 4
F	2 / 12	1 / 18
Total	28 / 53 *	11 / 57 *
Afm-DNA (pg/mL) (mean ± SD)	212 ± 773 **	27 ± 131 **

*, **: p < 0.01

Table 3. Incidence of digestive disease decreased in C-farm, and mastitis decreased in B- and C-farm by addition of OG.

Comparison of incidence of digestive disease and mastitis before and after addition of OG in A-, B- and C-farm

Farm	Digestive disease		Mastitis	
	Pre	Post	Pre	Post
A	3	4	1	2
B	3	2	20 *	10 *
C	15 **	2 **	7 ***	0 ***

*, **, *** : p < 0.05

Influence of *Aspergillus Fumigatus* in feeds and effect of the yeast cell wall-mixed additive on dairy herd

Kenji Wada¹⁾, Hiroshi Endo¹⁾, Junko Takahashi¹⁾, Hiraku Yano²⁾, Eiji Watanabe²⁾,
Masato Koya²⁾, Shougo Abe²⁾, Toshihide Katoh²⁾ and Yoshimi Ogata²⁾

1) Yamagata Prefecutural Federation of Agricultural Mutual Aid Associations,
Okitama Food Animal Clinic and 2) Central Food Animal Clinic
(286-1 Kitagawara, Nanaura, Yamagata-shi, Yamagata 990-2171)

ABSTRACT

Hemorrhagic Bowel Syndrome (HBS) is a disease reported in human and cattle causing abdominal colic and evacuation of tar like feces. Localized infection of *Aspergillus fumigatus* (Afm) has been suspected as a cause of HBS, however, there are few reports about the influence of this agent on lactating cow. In this report, quantities of Afm-DNA in feeds that were fed in 6 dairy farms were measured. A feed additive containing yeast cell wall to prevent HBS, were added to cow feeds in each dairy farm. Blood chemistry values, blood Afm-DNA concentration, mononuclear cells subpopulation and disease incidence were compared before and after addition of the feed additive. Afm-DNA were detected in all feed samples and 2 of the samples showed more than 1×10^6 spores equivalents. At sixty days after addition of the feed additive, blood Afm-DNA positive rate and blood Afm-DNA concentrations decreased. RBC and Ht values increased after the feed additive supplementation, and both decreased at 10 days after removal of the feed additive. In mononuclear cells subpopulation analysis, CD8⁺CD45⁺ cells and MHC⁺CD14⁺ cells increased. Epidemiologically incidences of digestive disease and mastitis were decreased by supplementation of the feed additive. These results suggest that some cattle feeds contain high concentrations of Afm and yeast cell wall-mixes feed additive may inhibit adhesion and reproduction of Afm in digestive tract and reduce the harm of Afm on lactating cows.

【Key word : *Aspergillus fumigatus*, hemorrhagic bowel syndrome, yeast cell wall-mixed feed additive】