

広島県獣医学会雑誌第20号記念誌の発刊によせて

広島県獣医師会

会長 瀧口次郎

広島県獣医学会は、昭和29年第1回を開催して以来、本年をもって第50回を数えるに至っているところであります。

この学会において発表された方達は、日常の業務を遂行する中で課題をとらえ、熱心に研究を重ね発表された貴重なものであります。これらを編集のうえ会員に配布し永く保存活用されることは、誠に意義深いものであることから、昭和61年広島県獣医学雑誌とし、ISSN（国際標準逐次刊行物番号）に登録し、国際的に広く紹介することとなり、本年をもって記念すべき20回を発行することが出来たことは、編集委員各位の御努力によることは勿論のことではありますが、当初、故岸本敬之元学会長におかれましては、登録事務から英訳にいたるまで尽力されたところであり、これを受け継ぎ武井直己先生には、現在まで献身的な努力をいただいているところであり、改めて敬意と感謝の意を表すものであります。

顧みるに、戦後、獣医師の職務は、畜産を主軸とし活動してきましたが、時代の変遷と共に公衆衛生・環境衛生に加え動物愛護など活動範囲は、巾広く拡大してきたところであります。

小動物にあつては、番犬、猟犬、ペットなどの目的飼養からアニマルコンパニオンとして家族的パートナーとして、意識は大きく変化してきたところであります。

獣医療においても、人と同様な高度医療を望まれるところとなり、開業者においても施設整備を図ると共に、不断の研究を重ね研鑽に努め、この技術水準の向上は隔世の感があります。

又、BSE発生以来、食の安全・安心の確保などに加え、高病原性鳥インフルエンザの発生により、動物に由来する感染症に対する警戒が一層高まり、公衆衛生上密接な連携を図ることが必要となり、獣医師の業務は、更に、複雑多岐となると共に、期待の度は一層増してきているところであり、これがため獣医師にあつては、専門技術に加え生命科学的な視野に立って、職責を果たすことが求められているところであります。

これらを背景とし、学会運営においても各部門において、高度な獣医学術的分野を基本とし、巾広く研究し、成果発表のうえ論議を重ね、これらを会誌に収録し更なる獣医学術の向上に資することが肝要であります。

終わりに、会員各位におかれましては、益々研鑽を重ね御活躍されますことを念願し挨拶とします。

広島県獣医学会雑誌
編集委員長 武井直巳

昭和61年7月本学会誌創刊号が発刊されて、平成17年をもって20号となり、20歳・成人式を迎えることになりました。振り返りますと創刊号出版までの1年はThe longest yearでありましたが、その後はあっという間でありました。なにはともあれ、まずは成人式おめでとうございます。

さて、昭和30年8月に第1回の広島県獣医学会が開催されて以来、昭和60年の第31回までの発表演題数は、実に862題に達し、毎回活発な討論のもと学会員の調査・研究の発表の場として、また研修の場として学会の発展に大きく寄与してまいりました。しかしながら、一方で、このように多くの研究発表がなされ、いずれも貴重な調査・研究であるにもかかわらず、学会での口頭発表のみに終わり、発表された演題の詳しい記録がないため、その内容・成果が発表者だけのものになってしまい、その後学会員に十分生かされ、あるいは評価されていないのではないかとことも議論されるようになりました。そのような状況の中から、発表を改めて論文として残すため、それらを掲載する場として、広島県獣医学会雑誌を刊行することが、本学会のこれからの一層の発展と獣医学術の発展に寄与するのではないかと結論を得て、瀧口次郎獣医師会長や故岸本敬之博士をはじめとした関係者のご努力と多くの方々のご支援・ご理解によって新たに編集委員会が組織され、本誌の誕生をみた次第です。また、本誌は翌年ISSN0913-1418も取得しました。

本誌は年刊で、その年の県獣医学会に発表され、学会審査委員から優秀と認められた演題を論文としたものを「推薦投稿」として掲載することにしておりますが、その点が本誌の特徴になっています。そのほかに、学会に発表されないものであっても、学会員が投稿を希望するものは「一般投稿」として掲載しています。また、編集委員会がその年々のトピック的話題等について、特に依頼して寄稿してもらった「特別投稿：総説」の欄や、「報告」、「技術研究レポート」等の紙面も設けています。そのほか、学会員の他誌への投稿も本学会の業績と考えており、その要約を記載し、積極的に紹介するようにしています。

当初は論文の提出の遅れや、ややもすると論文の形式からはずれたものもありましたが、号が進むに従って形・内容とも整ってくるようになりました。創刊号から第20号までの各分野別の掲載論文等の数は、産業動物は、原著：107題、報告：1題、他誌投稿：17題、公衆衛生では、原著：109題、報告：6題、他誌投稿：24題、小動物では、原著：113題、報告：3題、他誌投稿：5題となっています。これらのうち、原著論文は各分野とも近い数になっておりますが、これは各分野とも会員の積極的な発表があることを示しているものと思われます。同時に、その内容も年々充実したものになってきています。また、本誌が世界に誇れるものとして、故今田忠信氏の原爆被爆馬の診療に当たられた記録「馬の原爆症に関する研究」があります。大変貴重な報告と思います。本誌の題3号に記念報告として掲載されていますので是非一読いただきたいと思います。

今後の獣医界を思いますに、動物（生命）倫理とか動物の権利といったような観点の広がりからしますと、今後、種の壁を乗り越えて、生命というものを見つめ合うような、新しい人と動物のかかわり方が求められるようになるのではないかと思います。今後はこの面に関しても論文の増えることが期待されます。

次の20年に踏み出すに当たって、本誌の発刊当時は正直なところ、今日の姿を想像することはできませんでした。これからの20年では、パソコンという優れた情報伝達方法がありますので、それらと相まっていろいろな伝達方法を取りうるとは思いますが、いずれにせよ、創刊当初の精神を基に本誌がますます発展して参りますようお願い申し上げます。

終わりに当たりまして、本誌の創刊に、また編集委員長として先頭に立ってご尽力下さった故岸本敬之博士に深遠なる謝意を表し、ご冥福をお祈り申し上げますと共に、これまで本誌の発刊・編集に多大の御盡力をいただきました諸先生方を始め、終始御支援と御協力をいただきました会員の皆様に深く感謝申し上げます。

目 次

広島県獣医学会雑誌第20号記念誌の発刊によせて

広島県獣医師会会長 瀧口次郎
広島県獣医学会雑誌編集委員長 武井直己

総 説

ウエストナイルウイルス感染症

後藤 義之

(独) 農業・生物系特定産業技術研究機構 動物衛生研究所 1

呼吸器病牛の鼻汁から分離される病原性が明らかにされていないウイルス

山下 秀之

(社) 広島県獣医師会 3

産業動物

乳質改善の取り組み — 多変量解析によるアプローチ —

篠塚 康典 7

クローン技術を利用した種雄牛造成の効率化

尾形 康弘, 谷本 陽子, 松重 忠美, 栗原 順三, 今井 昭, 堀内 俊孝 11

レシピエント卵子の保存時期が核移植後の胚発生に及ぼす影響

谷本 陽子, 福馬 敬紘, 尾形 康弘, 名越 吉史, 松重 忠美, 堀内 俊孝 16

削蹄カルテを利用した一蹄病多発農家へのアプローチと蹄底潰瘍への対応策の検討

大下 克史, 鈴木 俊彦 21

呼吸器 5 種混合不活化ワクチンを用いた牛呼吸器病対策

廻野 智典, 玉野 光博, 明見 高三 24

公共牧場におけるピロプラズマ病対策

清水 和, 廻野 智典 28

乳用牛における BVD-MD 持続感染牛の摘発

日高 英子, 廻野 智典 31

小 動 物

頸部の疼痛を呈して来院した犬44例の鑑別診断と予後についての検討

田村 慎司, 田村由美子 34

犬の硝子体出血の 2 例 — ヨウ素レシチン製剤の 2 使用例 —

上岡 尚民, 上岡 孝子, 利田 堯史 41

犬の脛骨遠位成長板早期閉鎖に対する矯正骨切り一例

櫻田 晃, 板本 和宏, 和田 安弘 47

尿酸アンモニウム結石を伴った肝血管肉腫のフェレットの 1 例

角田 睦子, 勝矢 朗代, 佐野 博子, 伊藤 雄悟, 角田 利一, 平野 健 51

SDCTとMDCTにおける形態診断について

谷浦 督規, 谷浦 直美, 谷浦 倉之 55

公衆衛生

学校等における動物飼育の現状と問題点

石田 学, 大原佳世子, 土井 章三, 居神 憲男, 高橋 峰雄, 松田 政明 61

マイクロプレートを用いた牛胆汁中の <i>Campylobacter</i> の定量と保菌状況について	
栗原 健, 岡田 麻由, 児玉 実, 佐伯 幸三, 山岡 弘二	66
検食保存中におけるカンピロバクターの消長について	
— 原因施設不明となったカンピロバクター食中毒事例再考 —	
長澤 元, 恩田かおる, 田川 陽子, 柳本 慎治, 久保 滋, 石川 憲司, 田組 義雄, 立脇 邦雄, 瀬川 和幸, 中富美津江, 佐々木実己子	70
リアルタイムPCRおよびSSCP法による志賀毒素STX 1, STX 2 の毒素型別・遺伝子型別に関する研究	
古田 喜美, 下村 佳, 橋渡 佳子, 佐々木敏之, 山本美和子, 毛利 好江 石村 勝之, 萱島 隆之, 河本 秀一, 平崎 和孝, 松本 勝, 荻野 武雄	74
国内9頭目の牛海綿状脳症陽性事例	
山根 伸久, 赤木 雅彦, 寺地 靖子, 辻 正康, 田口 和史, 仲宗根智彦 瀬尾 豊記	82
広島市における動物取扱業及び動物美容業の実態調査	
城仙 哲宣, 坂本 稜, 平野 正敏, 久保 盛恵	87
食中毒発生時における給食確保対策について	
— 危機管理マニュアル(食中毒編)作成のためのチェックリスト —	
勝部由起子, 海嶋 照美, 渡邊 昭廣, 野島 誠治, 武田由美子, 塚本ツヤ子 渡邊 傳枝	92
地域に対応した食品衛生教育(リスクコミュニケーション)の試み	
矢野美奈子, 常田 展代, 徳永 克志, 山本 和則, 石井 清士, 石原 長造	97
他紙掲載論文要約	
小児髄膜炎患者からの日本脳炎ウイルス遺伝子の検出	
桑山 勝, 伊藤美佳子, 高尾 信一, 島津 幸枝, 福田 伸治, 宮崎佳都夫, 倉根 一郎, 高崎 智彦	100

ウエストナイルウイルス感染症

後 藤 義 之

独立行政法人 動物衛生研究所

(受付：平成17年8月5日)

West Nile Virus infection: The Guidelines for Surveillance in Japan

YOSHIYUKI GOTO

National Institute of Animal Health

3-1-5 Kannondai, Tsukuba, Ibaraki Japan

はじめに

1999年秋、突然ニューヨーク市で流行したウエストナイルウイルス（以下WNVと略）感染症は、2004年までにニューヨーク州から全米各州へと流行地域が拡大し、人、馬での感染発病、野鳥の大量死が確認されてきた。なかでも2002年には米国西海岸へ到達するとともに爆発的流行による発生が続き2003年人では45州の9,862名が発症、うち284名が死亡した。馬においては2002年40州で14,717頭が発病している。しかし全米に拡大した2004年における発生数はやや終息する傾向がみられている。このようにWNV感染症は、吸血昆虫とくに蚊を介して人を含む多くの動物間で感染流行する人畜共通アルボウイルス感染症である。

(1) WNVの特徴と伝播様式：WNVは、フラビウイルス科フラビウイルス属日本脳炎ウイルス血清グループに分類され抗原的には日本脳炎、セントルイス脳炎、マレーバレー脳炎ウイルスなどと近縁関係にあり、蚊（米国ではイエカ属が主体）の媒介によって伝播するが他の吸血昆虫（ヒメダニ、マダニ、シラミバエ）からも分離されている。伝播は、鳥-蚊-鳥の伝播サイクルにより維持され、流行が拡大する。また他の脊椎動物（人や馬）の感染は、伝播サイクルとは別にたまたまWNVを保有した蚊に刺されることにより感染するものと考えられているが、鳥-蚊-人や鳥-蚊-ほ乳動物での伝播サイクルは明らかでない。

(2) 世界におけるWNVの流行と疫学：WNVは1937年ウガンダ ウェストナイル州で風土病として存在して

おり、人の血液から分離されたものが最初である²⁾。その後、人ではアフリカ各地、中近東、地中海北部、ヨーロッパ諸国、ロシアへと拡大し、アジアではインド、パキスタンに至るまで世界の広範囲な地域で発生している。一方、北米ではカナダ、メキシコにも拡大し中米のエルサルバドル、キューバでも流行がみられている。また馬ではエジプトで中近東馬脳炎と呼ばれ³⁾、昔から脳炎症状が認められるとともに高い致死率を示している。さらに1962~65年フランスで約50頭が発病、1998年イタリアでは14頭が発病6頭死亡し、ポルトガルとモロッコでは94頭が発病し42頭が死亡するなど馬での影響は大きい。このように馬はWNVに対し高い感受性を有し脳炎など強い神経症状を引き起こし死亡する例も少なくない。もちろん米国における馬の発生状況は述べたとおりである。

(3) WNV感染における蚊と野鳥の役割

①米国における蚊の生態学：1999年の発生以来、WNVは36種類の蚊から分離されている、これらの蚊が媒介蚊として重要な役割を担っていることは確かであると思われるが、蚊の生態については、ほとんど明らかになっていない。一般に蚊の種類でイエカ類は通常、成虫で越冬することが知られており、とくに気温が氷点下にならないような場所、例えば地下の下水道、洞穴の水たまりなど、ある程度湿度が保たれているところで越冬する。一方、ヤブカ類は通常、卵の形態で越冬する、WNVが1999年に初めてニューヨークでの流行が確認されたことから、WNVが越冬し翌年に流行が再び起こるか否か注目されていた。Nasciらは⁴⁾、2000年の1月と2月にニューヨーク市の下水道でイエカ類を2,383匹採集

し、3検体(0.3%)からRT-PCRでWNV遺伝子が検出され、Vero細胞で1検体(0.1%)から分離された。これらのことからWNVは確かにイエカの体内で越冬し、2002年末までに米国の広大な地域に流行が拡大していったものと推察されている。

② 鳥類と蚊、他の吸血昆虫におけるWNV感染サイクル：WNVは、イエカ類の蚊(*Culex pipiens*; アカイエカ, *C. restuans*, *C. quinquefasciatus*)と鳥類の間に感染サイクルを形成するものと推察されている。とくにアカイエカは住宅周辺で鳥類に嗜好性の強い蚊であり都市にも多く生息している、この蚊は1999年ニューヨークにおける流行に際し、鳥類間でのおもな媒介蚊とみられているが、人への伝播に際してどのような役割を演じたのかは明らかでない。さらに*C. quinquefasciatus*は米国南部に生息し、住宅周辺に飛来する蚊であり都市での流行に関与している可能性は十分にある。なお2002年の流行時にWNVはマダニ類、シラミバエからも分離されているが、自然界での流行にこれら吸血昆虫が媒介にどのように関与しているかは明らかでない。一方、鳥類が自然界におけるWNVレゼルボア(ウイルスを体内に保有し感染源となる動物)であり増幅動物でもあることは確かで、これら鳥類のなかでもスズメ目とチドリ目の鳥類がウイルス血症の力価と持続からレゼルボアとしての能力が高く、とくにアオカケス、オオクロムクドリモドキ、メキシコマシコ、アメリカカラス、イエスズメなどの感受性が高いことが報告されている。米国でのサーベイランスにより1999年から2004年までの流行において162種類の野鳥が感染し死亡していることから蚊と野鳥間で感染サイクルを保ちながら鳥類が他州へ移動することにより感染が拡大し伝播していったものと推察されている。

(4) 各種動物におけるWNV感染

従来、フラビウイルスは特定の動物と蚊の間で感染サイクルが成立し、人や動物にさまざまな疾病を引き起こすことが知られている⁷⁾。しかし、米国におけるWNV感染様相の特徴は、多数の動物種が感受性を示し広い感染スペクトルをもつことである。これまで感染が報告されている動物は、馬、アルパカ、オオコウモリ、犬、猫、グレーリス、ラマ、オオカミ、キツネリス、ヒツジ、シマリス、シマスカンク、トナカイ、オットセイ(アザラシ)さらには爬虫類のアリゲータまで感染が確認されている。

(5) わが国におけるWNV感染症の対策

① 鳥類の輸入検疫強化

米国におけるWNV感染症の発生状況から日本へ侵入する可能性として航空機によって輸送される人に対する空港での検疫強化、航空機内の蚊の収集など厚労省側の

監視体制も継続されている。一方、輸入鳥類(とくに指定外鳥類)を介して感染することも充分考えられるため、農水省は平成15年3月19日付けで輸入鳥類の検疫強化を指示し実施されている。

② 蚊及び死亡野鳥のサーベイランス

「ウエストナイル感染症防疫マニュアル」に基づくサーベイランスで都道府県は蚊の捕集及び死亡野鳥の脳を採材するとともに動衛研に送付し、病原学的検査やPCR法によるWNV遺伝子検索が実施されている。

これまで、なぜWNVが米国に侵入し流行するに至ったのか、感染ルートや疫学的背景など依然として不明なままである。さらに欧米からの旅行者や輸入動物など航空機により頻りに往来するわが国の対応であるが、人に対する空港での監視体制とともに輸入動物の検査を徹底する必要がある。幸いにも現在のところ、わが国でのWNV感染症の発生は確認されていない。しかしわが国は、世界でも有数の渡り鳥の飛来地が多数存在し、毎年多種の野鳥が飛来し棲息しているWNVが米国のみならず欧州や極東ロシアなど渡り鳥の繁殖地周辺で流行していることから考えるとわが国で越冬中死亡した野鳥等の検査の実施、野鳥での疫学サーベイランス等、獣医疫学的視点からも今後研究検討して行かなければならないと考える。

参 考 論 文

- 1) Curtis, GH. West Nile Fever. The Arboviruses: Epidemiology and Ecology Volume V Chapter 49: 59-88 1989.
- 2) Komar N, Langevin S, Hinten S, Nemeth N, Edwards E, Hettler D, Davis B, Bowen R, Bunning M. Experimental Infection of North American Birds with the New York 1999 Strains of West Nile Virus. *Emerg. Infect. Dis.* 9:311-322, 2003.
- 3) Mclean RG, Ubico SR, Bourne D, Komar N. West Nile Virus in Livestock and Wild life. *Curr Top in Microbiol and Immunol* 267: 272-308 2002.
- 4) Murgue B, Zeller H, Deubel V. The Ecology and Epidemiology of West Nile Virus in Africa, Europe and Asia Current Topics in Microbiology and Immunology. 267: 196-221 2002.
- 5) Nasci RS, Savage H M, White DJ et al. West Nile Virus in Overwintering Culex Mosquitoes, New York City, 2000. *Emerg.Infect.Dis.* 7: 626-630 2001.

呼吸器病牛の鼻汁から分離される病原性が 明らかにされていないウイルス

山下 秀之

社団法人 広島県獣医師会

(受付：平成17年8月5日)

Viruses with unknown pathogenicity isolated from
nasal discharge of cattle with respiratory disease

HIDEYUKI YAMASITA

The Official Organ of the Hiroshima Prefectural Association of
Veterinary Medicine

4-2, Tanna-cho, Minami-ku, Hiroshima 734-0033

はじめに

最近の肉用牛、乳用牛の飼養は、企業の経営体への移行が進行し、飼養規模の拡大とそれに伴う省力化、合理化が図られている。さらにこれらの農場では、子牛・育成牛等の導入が定期的あるいは頻繁に行われ、そのルートは広域化すると共に同時に、牛の導入と併行してさまざまな病原体が持ち込まれる結果を招いている。このため複合感染病、日和見感染病が発生し疾病が複雑、多様化の傾向にある。

牛ウイルス性呼吸器病は、病原性が明らかにされていないウイルスについては、そのワクチンが開発され、応用されるようになり大きな流行は見られなくなっている。

一方において、病原性が明らかでない微生物を含めた多様な病原体の単独、或いは複合感染による呼吸器病の発生は依然として見られ大きな生産性の阻害要因となっている。

今回、広島県で発生した牛の呼吸器病の病性鑑定を実施する中で、病原性が明らかにされていないウイルスが発生牛の鼻汁から分離され、更に、これらのウイルスの牛群での抗体の動き等から呼吸器病への関与について整理した。

1. 牛ウイルス性呼吸器病の診断方法

1973年から1984年の間に広島県下の各家畜保健衛生所から、牛呼吸器病の診断のために依頼のあった264発生

牛群1,566頭の病牛鼻汁材料について、牛腎培養細胞(BK)、牛辜丸細胞、牛胎児筋肉培養細胞(BFM)、Vero細胞およびMDBK細胞を用いてウイルス分離を行った。分離したウイルスの同定は、常法に準じ、物理・化学的、血清学的性状より同定した。

抗体調査は、広島県内飼育牛で1歳以上の牛を1972年から1991年の間に採血した総計10,759頭と発生牛群の急性期と回復期の血清について牛伝染性鼻気管炎ウイルス(IBRV)、パラインフルエンザウイルス3型(PIV-3)、BRV-1・2・3型(BRV-1・2・3)、BRSV、牛アデノウイルス3・7型(BAdV-3・7)、牛ウイルス性下痢-粘膜病ウイルス(BVD-MDV)、牛パルボウイルス(BPV)、牛コロナウイルス(BCV)、牛流行熱ウイルス(BEFV)、イバラキウイルス(IV)を用いて実施した。

2. 牛ウイルス性呼吸器病の診断結果

ウイルスは、264発生牛群のうち83牛群の病牛鼻汁材料から241株のウイルスが分離された。これらの分離株数と分離率の内訳は、IBRV：99株 52%、PIV-3：59株 36%、BRV：57株 26%、BRSV：9株 24%、BAdV：5株 19%、BPV：3株 12%、BVD-MDV：6株 100%、末同定ウイルス：3株 10%であった。なお、BRV 57株の血清型別では、1型が51株、残り6株は既知のBRVの血清型と一致せず新しい血清型の3型と命名した。

さらに、ウイルスの分離と急性期と回復期の血清の有

意な抗体上昇の成績から呼吸器病264発生牛群の流行例を診断すると83牛群がウイルス感染に起因するものと判定され、その内訳は、IBR：30牛群、PIV-3：17牛群、BRV感染症：25牛群、BRSV感染症：5牛群、BAdV感染症：3牛群、BPV感染症：2牛群、およびBVD-MD：1牛群であった。残りの181牛群は診断出来なかった。

これら主要なウイルス感染のうち、IBRおよびPIV-3等については以前から良く知られているが、病原性があまり明らかでないBAdV-3やBPV感染症が認められる共に、BRV感染症が25牛群と意外に高い発生率であることが明らかとなった。

3. BRV感染症とPIV-3

BRV感染症25発生牛群のうち22牛群は、生後1年未満の若齢牛の発生であり、発熱、発咳、鼻漏は必発で呼吸促迫、下痢も半数内外に認められた。ウイルスの分離成績からみると、25発生牛群のうちBRV単独感染が15牛群であり、残りの10牛群はPIV-3(8牛群)、BAdV(1牛群)、IBR(1牛群)との混合感染であったことが注目された。

この25牛群について抗体上昇面から検討したところ、BAdV-7(10牛群)、BRSV(7牛群)、PIV-3(8牛群)のいずれかの組み合わせでの混合感染が推定された。さらに3種以上のウイルスの混合感染が推測される群が10牛群もあり、BRVの単独感染によるものは4牛群のみであった。しかも、このうち3牛群はBRVの1・2・3型または1型と3型の混合感染で、単一ウイルスの型だけの発生例は3型による1牛群だけであった。また、2型は分離されなかったが、血清学的に2型が関与していたものが3牛群みられた。

このうち、3発生牛群28頭のうち5頭の鼻汁から、融合化(S)と円形化(R)の2種類の細胞変性効果(CPE)を示すウイルスが分離された。

この5頭からのウイルス分離材料にはCP像およびこれら5頭の抗体調査で2~4種のウイルスに対する抗体価の有意な上昇が同時に見られることから、少なくとも2種類のウイルスが混在していることが強く疑われ、各種の処理によりR株にはS、S株にはRのCPEは認められなくなった。これらの株を改めて同定した結果、これらのうちS株はPIV-3免疫血清で、R株はBRV-1免疫血清で中和された。

鼻汁からPIV-3とBRVの2種類のウイルスが同時に分離された牛はそれぞれのウイルスに対する有意な抗体価の上昇が認められた。

したがって、一部の病牛では少なくともPIV-3とBRV-1の2種類のウイルスの同時感染と増殖があり、また、抗体調査結果からもPIV-3、BRV-1の他に、BRSV、BAdV-7等のウイルスの混合感染があったことが明らかにされた。

今回の、抗体調査から、BRVの3つの型(BRV-1,2,3)

は日本の牛の間に高率に伝播していることが推測され、若齢牛のウイルス性呼吸器病の約30%に関与していることが明らかになった。しかし、牛ではBRV1、2及び3に対する抗体保有率が80%と高いにもかかわらず、発生例が比較的少ないのは、単独感染では軽症の上気道感染として経過し見過される例が多いものと考えられた。このことに関連して他のウイルス特にPIV-3との混合感染が多いことが注目され、今後BRVとPIV-3との複合感染での病原性について検討が必要と思われる。

4. BAdV-3感染症

肉用牛250頭を飼養する農家に北海道から乳用雄子牛を29頭導入したところ、導入10日後からこれまで飼育していた7~12ヶ月齢のものに発熱、鼻漏、発咳、流涙、下痢を主徴とする疾病が64頭に発生した。

これら発病牛10頭の鼻汁から、2株のBAdV-3が分離された。

発病牛の抗体検査の結果、BAdV-3に対する有意な抗体上昇が9頭中6頭に認められ、分離ウイルス(BAdV-3)が今回の呼吸器・下痢疾患の主病因と推察された。しかし、一部の牛ではBAdV-7に対する抗体上昇もあり本ウイルスの関与も認められた。

BAdV-3の牛に対する病原性については、初乳未摂取子牛の気管および鼻腔内にWBR 1株と5 C株を接種した報告がある。これらの結果では、発熱、流涙、鼻漏、発咳、下痢等が出現し、死亡牛も認められている。

一方、抗体保有の面からみると、広島県内飼育牛のBAdV-3に対する抗体保有率は60.1%であったが、山形県(植松ら)は70%と報告しており、本ウイルスが育成初期における呼吸器病の発病要因となっていることが推察される。

BAdV-3は一見健康な牛の結膜のスワブ、肺炎及び腸炎を示した牛の結膜スワブから分離されているのみで、呼吸器・下痢症状を伴った鼻汁からの分離報告はみられなかったが、その後、山形県(種市ら)、等において呼吸器病牛からBAdV-3の分離と関与が報告されている。家畜衛生情報によるとBAdV感染症は、毎年1~7件の発生報告があり、死廃率は8.5%と高い。また、山形県(大貫ら)においてBAdV-2の呼吸器病への関与も報告されており、今後、BAdVの病原性について調査すると共に、野外におけるBAdV感染について、さらに広範な調査や研究が必要と思われる。

5. BPV感染症

県内の、肉用牛150頭を飼養する農家において、1~5ヶ月齢の9頭に水様性鼻汁の漏出、発咳等の呼吸器症状とメヤニ、微熱(38, 8~41, 0℃)、食欲減退が認められた(発生牛群56-44)。また、肉用牛160頭を飼養する農家において、8ヶ月齢の19頭に水様から膿様の鼻汁の漏出、発咳等の呼吸器症状と水様性下痢、メヤニ、発熱(39, 2~42, 0℃)、食欲減退が認められた(発生牛群

50-101).

これらの発症牛の鼻汁，下痢便からBPVが分離された。

呼吸器症状のみが認められた発生牛群56-44については抗体調査から，BPVに対する抗体のみ全頭上昇していることから，今回の呼吸器疾患に本ウイルスの関与があったものと思われる。

これとは別に，発生牛群50-10の例では呼吸器および下痢症状が認められ，抗体調査から，BPVに対する有意な抗体上昇は11頭中3頭に認められるのみで，本症への関与については不明であった。

BPVはこれまで健康な子牛の腸管，下痢便，流産胎児から分離されており，呼吸器症状を呈した牛の鼻汁からの分離例の報告はこれまでない。BPVの病原性については必ずしもシビアではないが，BPVの実験感染牛において，鼻漏，発咳，呼吸困難等の呼吸器症状と下痢などの消化器症状が認められるほか，妊娠牛で，流産，死産の原因となることも確かめられている。本ウイルスに対する中和抗体の調査成績において，県内飼育牛は90%と高率に抗体を保有しており，今後，多方面からの調査，研究が必要と思われる。

6. BCV感染症・レオウイルス (RV) 感染

BCV感染による成牛の伝染性下痢と軽い呼吸器症状が見られることは知られているが，桑山らは呼吸器症状を呈する牛の鼻汁からBCVを検出し，単独でも呼吸器症状を起こす可能性があるとして報告している。RVについては，黒木らが呼吸器症状を呈する牛の鼻汁からRVを検出し呼吸器症状への関与を報告している。

7. 乳用雄子牛の哺育・育成農場でのウイルス感染の調査

生後約1週齢時から16週齢時までの，臨床症状，ウイルス分離および抗体調査結果は次のとおりであった。

1) 臨床症状：呼吸器症状は2週目から認められる様になり3，7，10，11，13および15週目に多かった。下痢は導入時に一部の牛に認められたが，2，3，7および11週目に多かった。

2) ウイルス分離は，鼻汁からBRVが導入時，2，6および7週目にかけて3株，PIV-3は7，8，9，10および11週目から5株，IBRは9，10および13週目に4株が分離された。糞からは牛エンテロウイルスが導入時，1，3，5，6，7，8，9，10，11，12，13および16週目から36株，BPVは5および10週目から3株，レオウイルス (RV) は9，12および14週目に3株分離された。

3) 各種のウイルスに対する有意な抗体上昇はBRVで9週目から，IBRで10，13および15週目から，BRSVは7および12週目から，BAdV-1は9および14週目から，BAdV-2は7，9，13週目から，BAdV-3型は1，2，3，8，13および14週目から，BAdV-7型は6，7，8および10週目から，BVD-MDVは3週目から，BPVは5，7お

よび8週目から，牛ロタウイルスは3および13週目から，BCVは3，4，6，7および8週目からそれぞれ認められた。

以上のように1週齢の導入時から16週齢時までに多種類のウイルス感染が認められ，牛の導入と集団飼育により病原体がまん延する現象が確認された。

8. 各種ウイルスの浸潤状況

各ウイルスの抗体保有状況はIBR 11.6%，PIV-3 70.5%，BRSV 51.7%，BAdV-3 70.5%，BAdV-7 75.5%，BVD-MDV 43.1%，BPV 90.0%，BCV 83.4%，BEFV 0.7%，IV 78.4%であった。

BRV-1・2・3に対する抗体保有状況はBRV-1で86%，BRV-2で88%，BRV-3で83%であった。他県からの導入時の抗体検査においてもBRV-1・2・3に対する抗体保有牛が高率に認められた。

9. まとめ

今回，牛呼吸器病から分離されるウイルスの同定及びウイルス分離牛群のペア血清の抗体調査から病原性が明らかにされていないウイルスについて，呼吸器病への関与について整理した。

その結果，呼吸器症状を呈した牛の鼻汁からこれまで病原性が明らかにされていないBRV，BAd-3及びBPVが多数分離され，さらに発生牛群の発生時と2から3週間後の対血清の抗体検査においても有意な抗体上昇が確認され呼吸器病への関与が推察された。

また，BCVやRVの呼吸器病への関与についても報告されており，これらのウイルスの単独あるいは複合感染による呼吸器病の発生があるものと思われる。

抗体調査においても，これらのウイルスは広く牛群に浸潤しており，かつ，乳用牛の子牛の哺育・育成牧場における抗体調査においても牛群内での感染が確認されており，移行抗体の消失あるいはウイルスの流行により感染を受けているものと思われる。

牛の呼吸器病は，病原性が明らかにされているウイルスについてはワクチンが開発され，広く応用され発生予防に効果を上げている。

しかしながら，移行抗体の消失時期とワクチンの接種時期の問題，発生を予期しないためのワクチン未接種に加え，新しい牛の導入が極めて長期間されていない牛群での抗体保有率の低下，あるいは飼育環境の問題，更には細菌，マイコプラズマ等の感染等により発生が見られている。

一般にワクチンを接種しているから呼吸器病は大丈夫と言う考え方があるが，前記のことを考慮すれば，導入牛の病原体の持ち込みの対策，ワクチンの的確な使用方法及びや飼養衛生管理が極めて重要と考える。

野外では，ウイルス分離，抗体調査から，牛の呼吸器病には，BRV-1・2・3，BAdV-2・3，BPV及びRV等が疾病に関与しているものと推定され，さらに，これらのウイルスの，単独感染，複合感染あるいは他の微生物と

の同時感染等によって更に病原性を強くしているものと推定される。

最後に、呼吸器病の発病誘引として飼養管理失宜、飼育環境の不良、密飼、輸送、気象の変化等のストレスや初乳給与不足があげられるが、加えて、病原性のわかっていないウイルス、細菌やマイコプラズマ等の感染も考えられる。

従って、呼吸器病対策として、導入牛の選定、飼育環境の改善、微生物の進入防止対策、病牛の早期発見と治療・淘汰、定期的あるいは適切な時期でのワクチン接種、適正な抗菌剤、抗生物質、ビタミン剤の投与等について、適切な対応を取ることが必要と思われる。

参 考 文 献

- 1) 山下秀之ら, 畜産技術, No, 257, 8-16 (1976)
- 2) 山下秀之ら, 獣医畜産新報, No, 692, 176-178 (1979)
- 3) 山下秀之ら, 獣医畜産新報, No, 732, 390-393 (1979)
- 4) 山下秀之ら, 日獣会誌, 32, 25-30 (1979)
- 5) 山下秀之ら, 日獣会誌, 35, 227-232 (1982)
- 6) 山下秀之ら, 日獣会誌, 36, 677-680 (1983)
- 7) Yamashita, H, et al, Auch, Viro1, 83, 113-116 (1985)
- 8) 山下秀之ら, 日獣会誌, 38, 436-442 (1985)
- 9) 山下秀之, 畜産技術, No, 409, 1-5 (1989)
- 10) 山下秀之, 日獣会誌, 38, 514-520 (1985)
- 11) 山下秀之ら, 日獣会誌, 39, 774-780 (1986)
- 12) 山下秀之ら, 広島県獣会誌, 2, 49-61 (1987)
- 13) 山下秀之ら, 広島県獣会誌, 4, 75-80 (1989)
- 14) 山下秀之ら, 日獣会誌, 45, 919-923 (1992)
- 15) 山下秀之ら, 日獣会誌, 46, 741-745 (1993)

乳質改善の取り組み

— 多変量解析によるアプローチ —

篠塚 康典

(受付：平成17年3月29日)

Improvement of milk Quality

— The Multivariate Analysis Approach —

YASUNORI SHINOZUKA

Seibu Veterinary Center, Hiroshima P.F.A.M.A.A

461-1, Haruki, Kitahiroshima-cho, Yamagata-gun Hiroshima 731-1531

SUMMARY

In order to search for the factor which exerts the most influence on the somatic cell counts in bulk milk the relationship between somatic cell counts in bulk milk and bulk milk cultivation was scrutinized by multivariate analysis. The some relationship was further studied by multivariate analysis after conducting an investigation about the milking technique and environment. As a result, *Staphylococcus aureus* was found to be as a cause of mastitis the bacteria that has the strongest impact on the somatic cell counts in bulk milk.

Furthermore the research on the relationship between somatic cell counts in bulk milk and the milking techniques showed that the farms where pre-dipping was implemented tend to have less *Staphylococcus aureus* counts; and the farms where pre-squeezes were implemented tend to have less other *Staphylococcus* and other *Streptococcus* counts. The farms where pre-dipping and one-towel-per-cow method were practiced tend to less counts of all bacterial species and are considered the most recommendable techniques for farmers

要 約

バルク乳中の体細胞数に影響を与える要因を探ることを目的として、バルク乳中体細胞数とバルク乳細菌培養検査結果との関係を多変量解析を用いて分析した、また、搾乳方法、搾乳環境について聞き取り調査を実施しバルク乳細菌検査結果との関係を多変量解析により分析した。その結果、バルク乳中の体細胞数に最も影響を与える乳房炎原因菌は黄色ブドウ球菌であった。また、搾乳方法との関係ではプレディッピング実施農家では黄色ブドウ球菌が、前搾りを行っている農家ではその他のレンサ球菌・その他ブドウ球菌が少なく分離されるケースが少ない傾向にあった。プレディッピングと一頭一布を実施している農家は分離されるすべての菌種が少ない傾向にあり、最も推奨される方法と考えられた。

序 文

消費者に支持される安全で良質な牛乳の生産のために広島県では酪農家が共同で生乳出荷できる基準として乳質改善基準値を設け、生乳の取引基準としている(表1)。その中で、夏以降バルク乳中の体細胞数(以下SCC)の基準を満たさないケースが目立ち、ペナルティの支払いなど酪農家の経営を圧迫している(図1)。SCCは主として感染に应答して乳腺内に侵入した好中球からなり、感染をコントロールすることがSCC低減には不可欠である。そのためには、どのような病原体がどの程度SCCに影響を与えているか、またその病原体をどのようにすればコントロールできるかを調べる必要がある。しかしながら農家ごとの搾乳環境や搾乳方法は千差万別でその個々についてこれらの関係の一つ一つ証明していくことは現実的ではない。そこで複雑なデータを一気に解析して有効な情報を見つける統計的な手法である多変量解析を用いてこれらの関係を分析した。

表1 広島県乳質改善基準値

対象項目	乳質改善基準値
乳脂肪率	3.5%以上
乳蛋白質率	3.05%以上
無脂肪固形分率	8.4%以上
細菌数	30万/ml以下
生菌数	10万/ml以下
体細胞数	30万/ml以下
風味	生乳特有の風味を有し、異常な風味が感じられない。

よびバルク乳細菌培養検査は平成15年6月に広島県酪農業協同組合が実施した結果を用いた。バルク乳細菌培養検査結果は、検査を依頼した十勝臨床検査センターの分類に従ってその菌種と菌数により正常、やや多い、多い、非常に多い、の4段階にわけスコア化した(表2)。目的変数をSCCとし説明変数(要因)をバルク乳より分離された菌スコアとして多変量解析(数量化理論I類)により分析し、説明変数(要因)の影響度を求めた。また、培養検査を実施した内の41戸について搾乳方法、搾乳環境等について聞き取り調査を実施した。聞き取り調査は搾乳方法に関して6項目(前搾り・ストリップカップ使用・搾乳前の乳頭消毒方法・一頭一布・乳頭乾燥・ポストディッピング方法)、搾乳環境に関して4項目(手袋装着・搾乳ワゴン使用・ユニット離脱方法・乾乳軟膏の使用)の計10項目について行った(表3)。目的変数を分離された菌スコアとし説明変数(要因)を搾乳方法・環境として多変量解析(数量化理論I類)により分析し、説明変数(要因)の影響度を求めた。

表2 バルク乳細菌検査結果評価

細菌種	(個/ml)			
	正常	やや多い	多い	非常に多い
無乳性レンサ球菌(SAG)	0	<200	<400	400<
黄色ブドウ球菌(SA)	0	<150	<250	250<
環境性レンサ球菌(OS)	<700	<1200	<2000	2000<
大腸菌群(CO)	<100	<400	<700	700<
環境性ブドウ球菌(CNS)	<100	<200	<400	400<
スコア	0	1	2	3

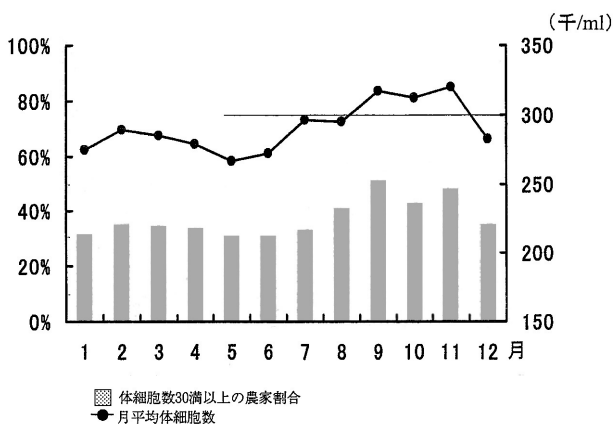


図1 バルク乳体細胞数とペナルティ

材料と方法

NOSAI広島県西部家畜診療所管内酪農家65戸についてSCCとそれに対する原因菌の影響度を調査するためにSCCとバルク乳細菌培養検査結果を分析した。SCCお

表3 搾乳衛生に関するパラメータ

1. 前搾り
2. ストリップカップ
3. 乳頭消毒(プレディッピング・タオル搾乳)
4. 乳頭清拭一頭一布
5. 乳頭の乾燥
6. ポストディップ(スプレー 浸漬)
7. ミルカー離脱方法(手動 自動)
8. 手袋
9. 搾乳ワゴン
10. 乾乳軟膏

成績

広島県酪農業協同組合の実施したバルク乳培養検査の結果、伝染性乳房炎原因菌は黄色ブドウ球菌(以下SA)が約9割の農家から分離され最も深刻な状況だった。無乳性レンサ球菌(以下SAG)はほとんど分離されなかった(図2)。環境性乳房炎原因菌については大腸菌群(以下CO)およびその他のレンサ球菌(以下OS)は

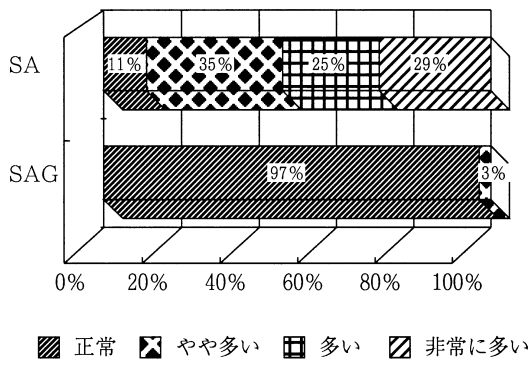


図2 調査65戸におけるバルク乳中の伝染性乳房炎原因菌

7割の農家で正常値だったがその他のブドウ球菌（以下CNS）が正常値を示したのは半数の農家に過ぎなかった（図3）. 今回検査した5種類の菌がすべて正常値だった農家はわずか1軒で、どの農家も問題があるようであった. SCCに対するバルク乳分離菌の影響度を分析したところSCCに対し最も悪い影響を与える原因菌はSAで次にSAG, OSの順であった（図4）.

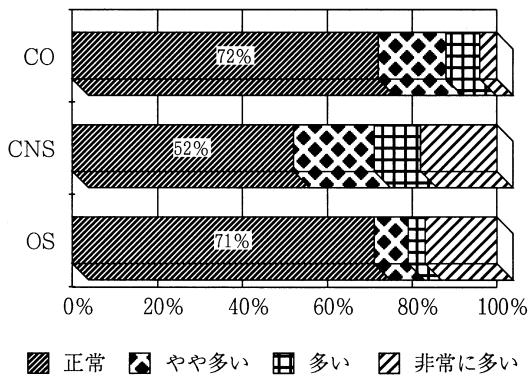


図3 調査65戸におけるバルク乳中の環境性乳房炎原因菌

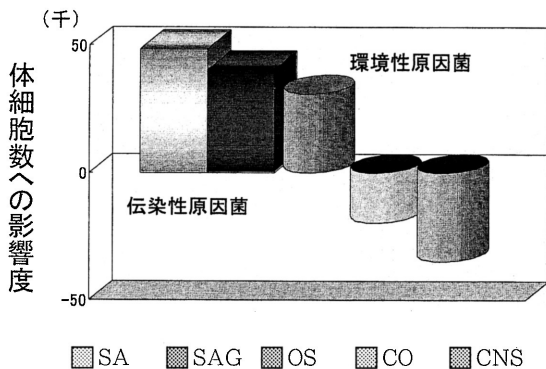


図4 バルク乳体細胞数に及ぼす乳房炎原因菌の影響度

乳搾方法・衛生に関する聞き取り調査の結果、前搾りの実施率は92.7%、ストリップカップ使用、一頭一布、乳頭乾燥の実施率は半数強であった。搾乳前の乳頭消毒

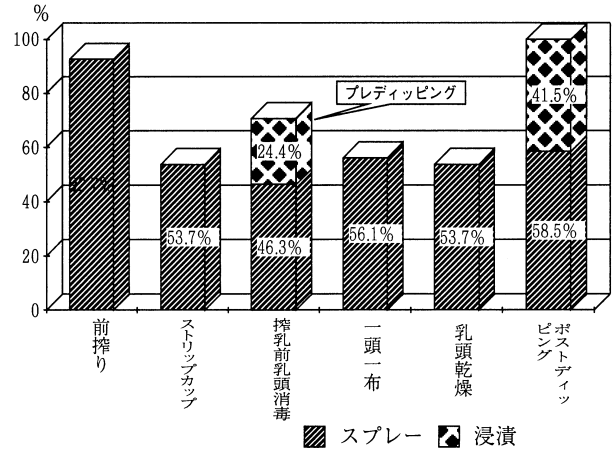


図5 調査41戸における搾乳方法に関する実態調査結果

を行っている農家は70%でそのうち46%がプレディッピングを行っていた。ポストディッピングはすべての農家で行われていたが、6割近くがスプレー式であった。（図5）. 搾乳環境については手袋装置が46%、搾乳ワゴン使用36%であった（図6）. 搾乳方法および搾乳環境について調査した10項目のバルクより分離される各菌種それぞれについての影響度を調査した結果、SAを減少させるために最も影響を与える要因はプレディッピングであった。OS, CNSを減少させる要因は前搾りであった。COは各項目とも影響度が少なかった（図7）. 搾乳環

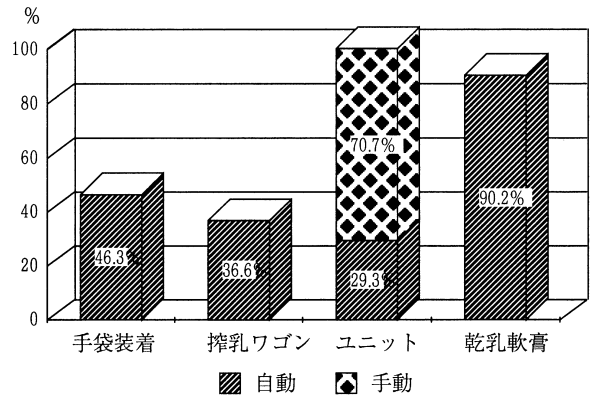


図6 調査41戸における搾乳環境に関する実態調査結果

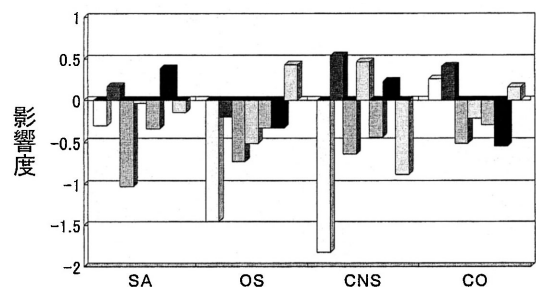


図7 搾乳方法とバルク乳培養結果

境との関係では乾燥軟膏を使用している農家でCNSが多く分離される傾向にあった。他の項目の影響度は少なかった(図8)。SAGについては聞き取り調査対象農家では分離されなかった。

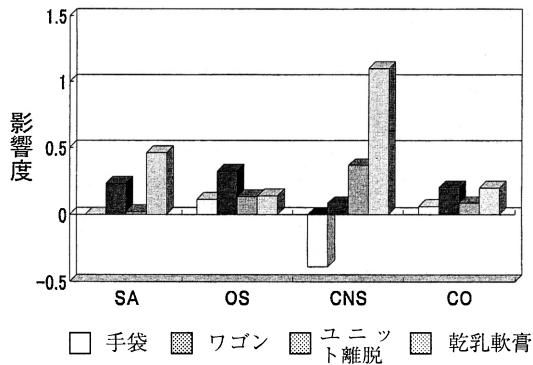


図8 搾乳環境とバルク乳の培養結果

考 察

SCCは乳腺由来の上皮細胞と好中球が大部分でその増加の原因は感染がほとんどといわれている。今回の結果でSCCに対しSA, SAG, OSの順に強い影響度が認められた。潜在性乳房炎の原因菌はCNS, OS, SAがほとんどを占めているという報告¹⁾もあり、今回調査した結果ではSAは潜在化した場合乳腺細胞へのダメージはOSより大きいことが考えられた。SAはバルク乳からも9割近くの農家で正常値以上に分離されていて、SCC改善のためにもっとも優先してコントロールすべき菌であると考えられた。また、CNS分離バルク乳でSCCが低い傾向にあったのは、他の原因菌と比べCNSの乳腺細胞に及ぼす影響が低い可能性が考えられた。

搾乳方法・環境との関係においてプレディッピング実施農家でSAの分離が少ない傾向にあった。プレディッピングは搾乳前の乳頭に付着している細菌を殺菌する手法で環境性乳房炎の予防に効果があるといわれており²⁾、SAが環境性に感染している可能性が考えられた。

OS, CNSは前搾り実施農家で分離されるケースが少なかった。搾乳前の乳頭槽には多数の細菌が存在し^{3,4)}、前搾りはこれらの細菌を排除させる手法である。また、前搾りは乳頭を刺激することによって泌乳ホルモンを放出させて生理的に泌乳をもたらす⁵⁾。このことによって過搾乳による乳頭口の損傷も減少させ、細菌感染の機会を減らすこともできる。前搾りはOS, CNSといった環境性乳房炎の原因菌への抑制効果がもっとも顕著に現れる方法として考えられた。しかし、同様に環境性乳房炎原因菌であるCOについては今回調査した各項目とも

影響度はほとんどなかった。これはCOは敷料の影響が大きいといわれており⁶⁾、今回聞き取り対象としなかったためだと考えられる。

今回の試みはSCCを低減させる目的でその原因とSCCの関係を明らかにすることであった。その手法として乳房炎原因菌とSCCの関係、搾乳方法・環境と菌の関係を個々について科学的に検証していく方法ではなく、複数の要因がどの程度SCCまたは菌数に影響しているかを統計学的に解析する手法をとった。個々の要因とSCCの関係はこれまでに複数報告されている^{7,8)}が今回の帰納的なこの手法によって多くの共通点が得られたことは非常に興味深い。

SCCを増加させている要因は農家によってさまざまに個々のケースにそれぞれ対応する必要がある。各農家の様々な搾乳方法・環境や労働力の相違を踏まえ、さらに原因菌を特定し搾乳方法等の対策を適切に行うことが重要で、今回の要因分析結果は農家ごとの原因菌に応じた改善すべき搾乳方法・環境など優先順位を示して指導するためには有用であると考えられる。そのためにはバルク乳検査の継続的なモニターが不可欠であり、農家との十分な検討も必要であると考えられた。

また、今回の調査で搾乳の基本的技術の不徹底、SAの環境からの新規感染の可能性などが新たに示された。この点について継続して調査・検討していく必要性を強く感じた。

文 献

- 1) 板垣昌志, 2003, 臨床獣医 21, 10-16
- 2) Andrew P.J. イリノイ大学特別セミナー講義録 (1993) 米国におけるプロダクションメディスンの最新情報, 83-104, 共立商事株式会社, 東京 (1994)
- 3) 久米恒夫, 牛の乳房炎, 乳房の感染と抵抗 —その一断面—, 第一版, 29-36, 近代出版, 東京 (1984)
- 4) 元村泰彦, 柚子弘之, 上村俊一ら, 家畜診療, 387, 33-35 (1995)
- 5) 古村圭子, 時代はミルク, イメージからの脱却, 岩船修監修, 第1版, 145-147, デーリイマン社, 北海道 (1995)
- 6) 山本久光, 寺田益子, 前場重紀ら, 家畜診療, 217, 34-36 (1981)
- 7) 矢光潤, 近藤寧子, 秀島潤ら, 家畜診療, 389, 23-27 (1995)
- 8) 中川尚, 古川寿郎, 中島正夫, 家畜診療, 407, 27-31 (1997)

クローン技術を利用した種雄牛造成の効率化

尾形 康弘¹⁾ 谷本 陽子¹⁾ 松重 忠美¹⁾
栗原 順三¹⁾ 今井 昭²⁾ 堀内 俊孝³⁾

(受付：平成17年 3月30日)

Increased efficiency of sire production using cloning technology

YASUHIRO OGATA¹⁾, YOKO TANIMOTO¹⁾, TADAMI MATSUSHIGE¹⁾,
JYUNZOU KURIHARA¹⁾, AKIRA IMAI²⁾, and TOSHITAKA HORIUCHI³⁾

- 1) Hiroshima Prefectural Livestock Technology Research Center 584,
Nanatsuka-cho, Shobara, Hiroshima 727-0023
- 2) Fukuyama Livestock Hygiene Service Center 396-1 Fukae, jyouge-cho,
Fuchu, Hiroshima 729-3421
- 3) Prefectural University of Hiroshima 562, Nanatsuka-cho, Shobara,
Hiroshima 727-0023

SUMMARY

The efficiency of sire production can be increased by incorporating cloning technology into the identical twin technique.

The efficiency of male pair production by the identical twin technique in combination with cloning technology is about 1.5 times that by the conventional identical twin technique alone.

Accurate male production is possible by incorporating the sex discrimination technique into the clone test.

Since plural cloned steers for the test of meat productivity can be produced, both the test accuracy and accuracy as a selection parameter increase.

By this combination method, we could produce a candidate bull for sires and 2 cloned steers.

要 約

分割卵検定にクローン技術を組み込むことで、種雄牛造成の効率化を図ることができる。クローン技術の組み込みで従来の分割卵技術の1.5倍の効率で雄ペアを生産可能である。クローン検定に性別判別技術を組み込むことで、確実な雄生産が可能となる。産肉能力検定用のクローン牛が複数頭生産できるため、検定精度が向上し、選抜指標としての確実性が高まる。

この方法で、実際に種雄牛候補牛と検定用クローン牛2頭を生産することができた。

序 文

広島県では、育種価と分割卵検定を組合せ種雄牛の短

期造成を行っている。この分割卵検定手法では、種雄牛造成期間が後代検定を利用した場合の約半分の3年半で種雄牛選抜が可能なことや、産肉能力検定に用いる牛が

1/10の1頭で済むなど大きなメリットがあるものの、顕微操作で2分割した胚を受胎牛に移植してもペア作出率が低く、分娩まで性別が不明であるなど技術的な問題があった。

そこで我々は、分割卵検定の中にクローン技術を組み込むことで、現在よりも効率的にペア個体が得られる技術連携について検討を行った。

材料と方法

1. 経膈採卵

採卵は、経膈穿刺用7.5Mhzコンバックス探触子（アロカ社UHT-9106-7.5）、超音波画像診断装置（アロカ社SSD-1200）及び穿刺針は、ダブルルーメンニードル（クック社K-MAR-5115）を用いて行った。

回収液は乳酸加リンゲル1000mlにつき3mlの牛胎仔血清（Fetal Calf Serum:FCS）と90ユニットのヘパリンNaを添加し、1頭につき50mlの回収液で未成熟卵子の回収を行った。

回収時の吸引圧は115mmHg、吸引速度は0.10ml/minで行った。

回収液をセルコレクターでろ過した後、卵子のみをM2液に集卵し、2回以上洗浄した後、10%FCS添加TCM-199培地で22-24時間体外成熟を行った。

2. 体外受精

体外受精は、当センターの常法に従い 6.0×10^6 /mlの精子濃度で6時間媒精後、3mg/ml牛血清アルブミン（Bovine Serum Albumin:BSA）添加m-SOF培地で5%の低酸素条件下で72時間培養後、10%FCS及びインスリン $10 \mu\text{g/ml}$ 添加m-SOF培地で48時間Vero細胞シート上で共培養した。

3. 割球2分離

体外受精後22時間目に2細胞に発育した胚を0.1%プロナーゼ溶液中で透明帯を溶解した。

2細胞期胚を0.02%EDTA添加0.125%トリプシン酵素液中で、ピペッティングにより機械的に割球2個に分離した。

分離した割球をM2液で洗浄後、1割球当たり $20 \mu\text{l}$ のm-SOF微小ドロップで48時間低酸素条件下で培養した。

その後、体外受精胚と同様にVero細胞と共培養を行った。

4. 核移植

核移植に用いるレシピエント卵子は、経膈採卵により、当センター所有の黒毛和種から採取した。

採取した未成熟卵子は、体外成熟を行った後、0.1%ヒアルロニダーゼ溶液中で顆粒層細胞を除去し、第1極体を放出した卵子のみを細胞核の除核に用いた。

除核はマイクロマニピレーターで第1極体とその直下の細胞質を透明帯の外に押し出すことにより行った。

除核卵子は、成熟培養24時間目に $10 \mu\text{M}$ カルシウムイオノフォアと $25 \mu\text{g/ml}$ イノシトール3リン酸で5分間処理した後、 $100 \mu\text{g/ml}$ ピューロマイシンで6時間複合活性化処理を施した。

ドナー胚の処理は、割球分離由来桑実期胚の片側を、0.02%EDTA添加0.125%トリプシン酵素液中でピペッティングにより細胞割球を単離し、複合活性化処理を施したレシピエント卵子に1個ずつ挿入した。

細胞融合は、チンマーマン氏液で1mm幅ステンレスチャンバーを用い交流パルス8.5V/mm 5 sec、直流パルス75V/mm $50 \mu\text{sec} \times 2$ の印加を施した。

体外培養は、72時間目までを3mg/mlBSA添加CR1aa培地で、それ以降を10%FCS及び $10 \mu\text{g/ml}$ インスリン添加CR1aa培地でVero細胞との共培養を行った。

5. 胚移植

割球分離由来胚盤胞期胚及びクローン胚の移植は、当センター所有のホルスタイン種未経産牛を発情後7日目の黄体期に同期化し、頸管経由法で子宮内に移植した。

6. 妊娠鑑定

移植28日前後で超音波画像診断装置により、子宮内腔及び胎児心拍の存在の有無によって確認を行った。

成績

1. 経膈採卵成績

経膈採卵による未成熟卵子の回収成績は、透明帯表面の顆粒層細胞の付着度合で分類した結果、延べ181頭の採卵でAランク289（1.6個/頭）、Bランク592個（3.3個/頭）、Cランク1,932個（10.7個/頭）及びその他849個（4.9個/頭）であり、1頭の採卵で、AからCランクの15.6個の卵子が利用できることが確認された。

表1 経膈採卵成績

ラ ン ク	採卵個数（1回当たり）
A（顆粒層3層以上）	181回
B（顆粒層2層）	289（1.6）
C（顆粒層1層以下）	592（3.3）
そ の 他	1,932（10.7）
合 計	894（4.9）
	3,707（20.5）

2. 割球2分離胚の体外発生成績

経膈採卵・体外受精を行い受精後24時間目までに2細胞期胚まで発育した21個をピペッティングにより42個に割球分離し、培養した結果、66.7%（28/42個）が胚盤

表2 経膈・体外受精胚の分離後の発生成績

供試胚数	8細胞期数	桑実期数	胚盤胞期数	ペア胚組数
42 (21胚)	35 (73.0)	28 (66.7)	28 (66.7)	12 (57.1)

胞期胚まで発育した。

このうち、ペア胚発生率は、57.1% (12/21個)であった。

3. 核移植成績

割球を2分離した体外受精胚をドナー細胞として、核移植を行った結果、融合率93.8% (121/129)、桑実期率65.1% (84/129)及び胚盤胞期率62.0% (80/129)であった。

クローン胚をドナー細胞として継代核移植を行った結果、融合率88.1% (52/59)、桑実期率55.9% (33/59)及び胚盤胞期率55.9% (33/59)であった。

核移植によって8.4倍まで胚数を増幅することができた。継代核移植によっても6.6倍まで同様に増幅することができた。

表3 核移植成績

試験区	供試胚数	融合数	桑実期数	胚盤胞期数
クローン (10回反復)	129	121 (93.8)	84 (65.1) (8.4個/1回)	80 (62.0)
リクローン (5回反復)	59	52 (88.1)	33 (55.9)	33 (55.9) (6.6個/1回)

4. 移植成績

体外受精由来の割球分離胚の受胎率は、61.1% (11/18)で核移植を2回行ったリクローン胚の受胎率は、66.6% (10/15)であった。

表4 移植成績

移植胚	移植頭数(頭)	受胎頭数(頭)	受胎率 (%)
割球分離胚	18	11	61.1
リクローン胚	15	10	66.6

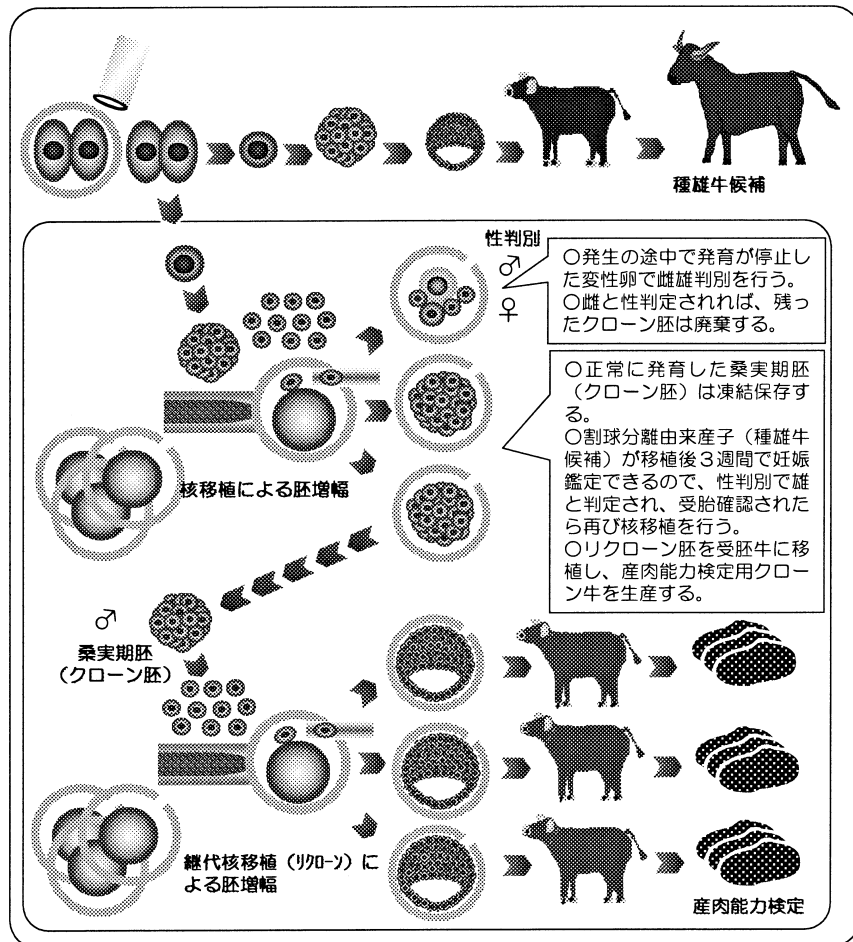


図1 クローン技術を活用した種雄牛造成システム

考 察

種雄牛造成は、多くの試験牛と7~8年の歳月をかけて行う必要があり、これらの正確性の向上や造成期間の短縮等効率化が求められている。

広島県では、種雄牛造成に必要な期間が後代検定法の半分の3年半で行える分割卵検定法を平成9年度から取り入れ、その手法によって宮島や安芸茂1などの種雄牛造成に成功している。

しかしながら、この分割卵検定法は、高度な技術の組合せ(牛過剰排卵・回収技術、胚分割技術、受精胚移植技術)によって成り立っており、この技術の一つでも成功しなければ、分割卵由来産子をペアで得ることは不可能となる。

現に、広島県においては、平成13年~15年の3年間に200個の体内受精由来2分離胚を移植したが、37ペア(18.5%)の受胎しか得られていない。

これらの低いペア作出割合を改善するためには、体内受精胚でなく体外受精胚の作出による胚の生

産効率向上が必要である。

分離した割球は、通常の体外受精胚と同様の発育を示し、受胎性も十分有する^{1,2)}ので、これを種雄牛候補として受胎牛に移植した。

今回、新鮮胚を移植したもののうち66.1% (11/18) が受胎し、これらは通常の受精胚移植と同等の受胎率を示していた。

人為的に一卵性双子を生産することは、受胎率50%として理論上ペアができる確率は25%と決して高くない、

そこで我々は、産肉能力検定牛をクローン技術で複数生産することで、ペア生産率を飛躍的に向上させることを計画した。

今回、割球2分離胚をドナー細胞として核移植を行い、1回当たり8.4個のクローン胚が継代核移植用のドナー胚として確保することができ、更にこのドナー胚を継代核移植し、1回当たり6.6個の移植可能な胚盤胞期胚(リクローン胚)が得られており、このことから数回の継代核移植で数多くのクローン胚を作出できる可能性がある。

仮に受胎率を50%としても約27頭の産肉能力検定牛を得られ、割球2分離胚が受胎すればほぼ確実にペア作出ができることとなる。

これまで、胚盤胞期胚の2分割による一卵性双子の生産や相似性の検討が行われており³⁾、他県の報告例でも、173頭移植して12ペアと生産効率は13.8%と本県の成績と同様に⁴⁾、効率的とは言い難い。

しかし、その相似性は、筋肉の形状、肉や脂肪の理化学的性状で高く⁵⁾検定牛としての信頼性も高いと推測される。

受精胚クローン牛の相似性の検討でも、発育成績及び枝肉成績の相似性は高いとの報告⁶⁾があり、これら2つの結果からも、一卵性双子とクローンの相似性も高いと考えられる。

古川⁷⁾もクローン技術を利用した育種改良の中で、受精卵クローン検定の世代間隔が3.5年と最も短く、フィールドやステーション検定システム時の必要頭数が10頭なのに対し、クローン検定では1頭で済むなど省力化が可能であることを示している。

今回、我々のデータをもとに、種雄牛造成効率を計算してみると、1回の採卵当たり分割卵技術では、0.6ペア、クローン技術では、0.9ペアと、1回の採卵では雄ペアの作出は出来ないこととなる。

これを1年間に直すと、分割卵技術で2.3組に対し、クローン技術では47.7組の雄ペアを作出でき、その効率は20倍以上になることが判明した。

検定精度も分割胚と同等かそれ以上で、造成効率も分割胚をはるかに凌ぐクローン技術は、種雄牛造成の効率化に大きく貢献できる。

これまで、種雄牛造成での問題点は、生産効率と性の

表5 種雄牛造成効率の推測値

	分割卵検定	クローン検定
採卵回数/年	4回	52回
胚作出個数/回	6.2個	3.0個
胚の受胎率	18.5%	61.1%
ペア数/採卵	1.2ペア	1.8ペア
雄ペア数/採卵	0.6ペア	0.9ペア
年間雄ペア数	2.3ペア	47.7ペア
生産最短期間	4ヶ月	2週間

コントロールにあったが、性判別については、最近LAMF法による判別⁸⁾が可能となり、これらを組み込むことで、確実に雄ペアのみの生産が十分可能であり、これらの技術を利用すれば、無駄な移植を減らし、確実にほしいペアの生産を実現する⁹⁾ものと考えられる。



写真1 割球分離由来産子(左)と検定用クローン牛(右)

今回、これらの方法を組み合わせて、種雄牛造成を行い、1個の割球分離由来産子と2頭の産肉能力検定用クローン牛を生産することができた。今後、これらの産肉能力検定をもとに、成績が良ければ、種雄牛として実際に供用されることとなる。

文 献

- 1) 後藤充宏ら：単離割球を利用した一卵性多子生産技術の検討，徳島県畜試研報，37：5-8，(1966)
- 2) 今井昭ら：経膈採卵・体外受精由来ウシ2細胞期胚の割球分離による一卵性双子生産，広島県獣医学会雑誌，17：9-13，(2002)
- 3) 志賀一穂ら：黒毛和種一卵性双子による種雄牛造成試験(第2)，大分県畜産試験場試験成績報告書，25：1-6，(1996)
- 4) 堤知子ら：鹿児島県畜産試験場研究報告，28：7-19，(1995)
- 5) 野崎聡ら：クローン検定の実証試験(第1報クローン牛の直接検定)，鹿児島県肉用牛改良研究所研究

- 報告, 3 : 6-9, (1998)
- 6) 野崎聡ら : クローン検定の実証試験 (第2報初期胚クローン牛の肥育試験), 鹿児島県肉用牛改良研究所研究報告, 4 : 9-15
- 7) 古川 力 : クローン技術を応用した肉牛の育種システム, 日本胚移植, 23 (3) : 88-94 (2001)
- 8) 陰山聡一, 平山博樹 : 新しい遺伝子増幅法 (LAM P) による牛胚の性判別, 日本胚移植学雑誌, 25 (3) : 136-140 (2003)
- 9) 南橋 昭 : ウシ胚の性判別技術と受精卵クローン技術への利用, 研究ジャーナル, 26 (5) : 26-33 (2003)

レシピエント卵子の保存時期が核移植後の 胚発生に及ぼす影響

谷本 陽子¹⁾ 福馬 敬紘²⁾ 尾形 康弘²⁾
名越 吉文²⁾ 松重 忠美²⁾ 堀内 俊孝³⁾

(受付：平成17年4月8日)

Effect of Preservation Stage of Recipient Oocytes on the Developmental Capacity of Reconstructed Embryo After Nuclear Transfer

YOKO TANIMOTO¹⁾, TAKAHIRO FUKUMA²⁾, YASUHIRO OGATA²⁾,
YOSHIFUMI NAGOSHI²⁾, TADAMI MATUSHIGE²⁾, and TOSHITAKA HORIUCHI³⁾

- 1) Hiroshima-gyu Breeding Center
2188, Yuki-otu, Jinsekikogen, Jinseki-gun, Hiroshima 720-1812
- 2) Hiroshima Prefectural Livestock Technology Research Center
584, Nanatsuka-cho, Shobara, Hiroshima 727-0023
- 3) Hiroshima Prefectural University Syobara Campus
562, Nanatsuka-cho, Shobara, Hiroshima 727-0023

SUMMARY

The vitrification of bovine oocytes before and after activation using the microdroplet method was investigated.

The enucleation rate of vitrified bovine oocytes was 90.9%, and it is considered that vitrification does not reduce the enucleation rate.

There was no significant difference in the developmental capacity of parthenogenetic embryo by the preservation stage.

The developmental rate of reconstructed embryos after nuclear transfer to blastocysts was 37.3% (22/59) in the Post-Act group vitrified after activation and 14.3% (6/43) in the Pre-Act group vitrified before activation. The Post-Act group was significantly higher than the Pre-Act group.

These results suggest that it is suitable that recipient oocytes for use in nuclear transplant are vitrified after enucleation and activation.

要 約

ウシ未受精卵子を活性化処理前後にマイクロドロプレット法によりガラス化保存した。ガラス化保存後の除核率は90.9%で、ガラス化保存による除核率の低下は認められなかった。単為発生胚の発生率においては保存時期による差は無かった。核移植胚の胚盤胞発生率は、活性化処理後に保存したPost-Act区37.3% (22/59) が、活性化

1) 広島牛改良センター (〒720-1812 広島県神石郡神石高原町油木乙2188)
2) 広島県立畜産技術センター (〒727-0023 広島県庄原市七塚町584)
3) 広島県立大学庄原キャンパス (〒727-0023 広島県庄原市七塚町562)

処理前に保存したPre-Act区14.3% (6/43) よりも有意に高かった。

以上のことから、核移植用レシピエント卵子は除核、活性化処理後にガラス化保存するのが適当であると思われた。

序 文

ウシ未受精卵子の保存は、体外受精胚の作出はもとより核移植の作業効率向上のためにも重要であるが、細胞質の大きな未受精卵子は凍結が難しく、技術の確立までには至っていない。

しかし、近年、高濃度の耐凍剤を添加した微量の溶液で急速に冷却することが可能なガラス化法の1つであるマイクロドロプレット法を用いて保存した未受精卵子の体外受精後の発生率は従来の凍結保存法より飛躍的に向上し、ガラス化保存した卵子から産子が得られたことがPapisら¹⁾によって示された。我々もマイクロドロプレット法が核移植レシピエント卵子の保存に適用可能であることを報告している²⁾が、卵子の最適な保存時期については検討していない。

そこで、今回我々は、ウシ未受精卵子を活性化処理後にガラス化保存し、その後の発生率を調査することにより、核移植用レシピエント卵子として最適な保存時期の検討を行った。

材料および方法

1. ウシ卵子の採取と成熟培養

と体卵巣に存在する直径7mm以下の卵胞から注射器(注射針:21G)を用いて卵胞液と共に卵子を吸引採取した。採取したウシ未成熟卵子は、卵丘細胞の付着度および卵子の形態的観察によりA~Eランクに分別し、卵丘細胞が2層以上付着し、かつ卵細胞質が均一であるBランク以上の卵子を試験に供した。

成熟培養は、10%ウシ胎仔血清(FCS)、50mg/ml上皮成長因子(EGF)、0.12au/ml卵胞刺激ホルモン(FSH)を添加したTCM199培地にて5%O₂・95%air条件下で22~24時間行った。

成熟培養終了後、0.1%ヒアルロンダーゼ、0.1%コラゲナーゼを添加したM2培地中でピペティングにより顆粒層細胞を除去し、囲卵腔内に第一極体を放出した成熟卵子のみを以降の実験に供した。

2. マイクロドロプレット法によるウシ卵子のガラス化保存・融解

活性化処理前(Pre-Act区)および活性化処理後(Post-Act区)のウシ未受精卵子を10%エチレングリコール、1.0Mシュクロース、20%FCSを添加したTCM199培地中で5分間平衡した後、30%エチレングリコール、20%FCSを添加したM2培地で30秒以内に3回以上洗浄した後、ピペットを用いて5μl前後のドロップとして液体窒素上に滴下した。ドロップは10秒程度液体窒素上を

浮遊したのち、液体窒素内に沈下した。

融解は、37℃加温の0.3Mシュクロース、20%FCSを添加したM2培地にドロップを直接投入して、2分間保持させることで行い、その後20%FCSを添加したTCM199培地にて洗浄した。

3. 除核率の調査

ガラス化保存前(Post-Act区)およびガラス化保存後(Pre-Act区)の卵子を顕微鏡下で極体を目印にした細胞質押し出し法により細胞核を除去し、ヘキスト染色後、蛍光顕微鏡下にて核が含まれていないことにより除核を確認した。

4. ウシ卵子の単為活性化処理

成熟培養後にカルシウムイオノフォア10μMとイノシトール3リン酸25μg/mlで5分間処理した後、ピューロマイシン100μg/mlとサイトカラシンD2.5μg/mlを添加したウシ血清アルブミン(BSA)3mg/mlを添加したCR1aa培地で6時間培養後、チンマーマン氏液中にて交流8.5V/mm5sec、直流75V/mm50μsec×2回の電気パルスを加えることにより複合単為活性化処理を行った。

5. 核移植

カルシウムイオノフォアとイノシトール3リン酸およびピューロマイシンで複合活性化処理を施した除核卵子に、体外受精胚をドナー細胞としてマイクロマニピレーターにて挿入後、電気パルスを加えることにより細胞融合を行った。

6. 単為発生胚および核移植胚の体外培養

電気インパルス印加後、72時間目までは3mg/mlBSA添加CR1aa培地にて5%O₂・5%CO₂・90%N₂・38.5℃の条件下で、72時間目以降は10%FCS添加CR1aa培地にてVero細胞との共培養³⁾を行った。

7. 胚盤胞の構成細胞調査

7日目に胚盤胞に発育したものについて、単為発生胚はヘキスト染色による総細胞数を、核移植胚はIwasakiら⁴⁾の方法に準じて2重蛍光染色による分染により内細胞塊細胞数と栄養膜細胞数をカウントした。2重蛍光染色はすなわち、胚の透明帯を0.25%アクチナーゼEを添加したM2培地にて除去、10mM Trinitrobenzene Sulfic Acidを添加したPBS(-)溶液中で10分処理、30%rabbit-anti-DNP-BSAを添加したTCM199培地で30分処理、25%モルモット補体を添加したTCM199培地で15分処理することにより栄養膜細胞に特異的に障害を与え、その後ヘキストとヨウ化プロピジウムにより染色することにより内細胞塊核がライトブルーに、栄養膜細胞核はピンクに分染される。細胞数は、蛍光顕微鏡下にて核数を速

やかにカウントすることにより確認した。

成 績

1. ガラス化保存前後の除核率

ガラス化保存前後の除核率はPre-Act区90.9% (50/55) Post-Act区94.1% (48/51) であり、両区間に有意な差は認められなかった。(表1)。

表1 ガラス化保存前後の除核率

	供試卵数	除核卵数	除核率
Pre-Act区	55	50	90.9%
Posr-Act区	51	48	94.1%

2. ウシ未受精卵子の単為活性化処理成績および核移植成績

ガラス化保存したウシ未受精卵子による単為発生成績は、Pre-Act区で活性化率90.2% (55/61), 卵割率82.0% (50/61), 8細胞期率54.1% (33/61), 桑実期率44.3% (27/61), 胚盤胞期率26.2% (16/61), Post-Act区で活性化率93.4% (57/61), 卵割率86.9% (53/61), 8細胞期率68.9% (42/61), 桑実期率57.4% (35/61), 胚盤胞期率41.0% (25/61) で胚盤胞発生率においてPost-Act区がPre-Act区より高い傾向にあった(表2)。

表2 ガラス化保存した未受精卵子による単為発生胚の発生率

供試卵数	活性化数 (%)	卵割数 (%)	8細胞期数 (%)	桑実期数 (%)	胚盤胞数 (%)	
Pre-Act区	61	55 (90.2)	50 (82.0)	33 (54.1)	27 (44.3)	16 (26.2)
Posr-Act区	61	57 (93.4)	53 (86.9)	42 (68.9)	35 (57.4)	25 (41.0)

単為活性化処理後7日目に胚盤胞に発生した胚の総細胞数はPost-Act区が85.9±32.0個で、Pre-Act区の67.4±25.6個より多い傾向にあった(表3)。

表3 単為発生胚の総細胞数

	供試卵数	総細胞数	範 囲
Pre-Act区	16	67.4±25.6	29~117
Posr-Act区	25	85.9±32.0	25~137

平均細胞数±S.D.

ガラス化保存したレシピエント卵子による核移植成績は、Pre-Act区で融合率97.7% (42/43), 卵割率88.4% (38/43), 8細胞期率46.5% (20/43), 桑実期率25.6% (11/43), 胚盤胞期率14.0% (6/43), Post-Act区で融合

率100% (59/59), 卵割率94.9% (56/59), 8細胞期率50.8% (30/59), 桑実期率44.1% (26/59), 胚盤胞期率37.3% (22/59) であり、胚盤胞発生率はPost-Act区がPre-Act区より有意に高かった(表4)。

表4 ガラス化保存したレシピエント卵子による核移植胚の発生率

	供試卵数	融合数 (%)	卵割数 (%)	8細胞期数 (%)	桑実期数 (%)	胚盤胞数 (%)
Pre-Act区	43	42 (97.7)	38 (88.4)	20 (46.5)	11 (25.6)	6 ^a (14.0)
Posr-Act区	59	59 (100)	56 (94.9)	30 (50.8)	26 (44.1)	22 ^b (37.3)

異符号間に有意差 (P<0.05)

核移植後7日目に胚盤胞に発生した胚の細胞構成はPre-Act区で内細胞塊細胞数21.0±12.0個, 栄養膜細胞数51.5±13.6個, Post-Act区で内細胞塊細胞数29.7±15.0個, 栄養膜細胞数68.8±27.5個であり、総細胞数においてPost-Act区がPre-Act区より多い傾向にあった(表5)。

表5 核移植胚の細胞数

	Pre-Act区	Post-Act区
供 試 胚 数	6	12
内 細 胞 塊	21.0±12.0	29.7±15.0
栄 養 膜 細 胞	51.5±13.6	68.8±27.5
総 細 胞 数	72.5±25.0	98.5±39.3

平均細胞数±S.D.

考 察

クローン胚作出において、ドナー細胞とレシピエント卵子の由来が異なると、核DNAと細胞質の由来が異なる不完全なクローン個体が作出されるが、近年、生きた雌ウシからの反復採卵が可能な経膈採卵法が開発され、ドナー細胞とレシピエント卵子を同一個体から採取して核DNAと細胞質の由来が同一な、完全なクローン個体を生産することが可能となった。ここでレシピエント卵子の保存が可能となれば、反復して経膈採卵を行うことで、核移植用レシピエント卵子を確保することが可能となるため、ドナー細胞と同様、核移植の作業効率も大幅に向上させることができる。

これまでにWhittingham³⁾ がマウスにおいて凍結未受精卵子由来の産子を得て以来、ヒト⁴⁾ やウサギ⁵⁾ など他の哺乳動物においても未受精卵子の凍結保存の成功例が報告されている。ウシにおいてはFukura⁶⁾, Otoi⁷⁾ が緩慢凍結法で凍結した未受精卵子由来の産子を得たと報告しているが、凍結融解後の生存率や体外受精後の発生率は極めて低く、凍結保存の確立には至らなかった。

ウシ未受精卵子の凍結保存が困難な要因の1つとして、卵子の低温感受性が極めて高いとされている⁸⁾。近年、オープンプルドストロー (Open Pulled Straw:OPS)⁹⁾ やゲルローディングチップ¹⁰⁾、今回用いたマイクロドロップレット¹¹⁾ など、高濃度の耐凍剤を添加した微量の溶液で急速に冷却を行うことで低温障害を最小限に抑えることができるガラス化法がウシ未受精卵子の保存に有効であるという報告がなされている。

しかし、これまでの報告では成熟培養後の卵子を保存した例が多く、核移植用レシピエント卵子として活性化処理後などに保存した例¹²⁾ は少ない。そこで今回我々は、ウシ未受精卵子を活性化処理の前後でマイクロドロップレット法によりガラス化保存し、その後の発生率を調査して核移植用レシピエント卵子の最適な保存時期の検討を行った。

最初にガラス化保存した卵子の除核率を調査した。除核操作は、成熟培養後、第一極体を放出したMⅡ期卵子を用いて顕微鏡下で極体を目印にした細胞質押し出し法により行った。Atabayら¹³⁾ はウシ卵子において卵丘細胞を除去するためのボルテックスでの処理時間が延長すると第一極体が移動しやすくなり、除核率が低下するとしている。同様にガラス化保存処理によっても、第一極体の移動が起これば除核率の低下につながるとは思われたが、保存処理後の卵子における除核率は90.9% (50/55) であり、無処理卵子の除核率94.1% (48/51) と有意な差は無く、ガラス化による除核率の低下は認められなかった。このことから第一極体を放出した卵子をガラス化しても極体は移動せず、保存処理後も確実な除核が可能であることが判明した。

単為活性胚では、胚盤胞発生率および7日目胚盤胞の総細胞数は活性化処理後に保存したPost-Act区が、活性化処理前に保存したPre-Act区よりも大きくなる傾向がみられた。核移植胚では、除核・活性化処理後にガラス化保存したPost-Act区が、除核・活性化処理前に保存したPre-Act区よりも胚盤胞発生率が上がったが、両区間の融合率および卵割率に有意な差が無かった。また、7日目胚盤胞の細胞構成は両区間に有意な差は認められなかったが、総細胞数においてはPost-Act区がPre-Act区よりも多い傾向がみられた。未受精卵子は凍結すると紡錘体が障害を受け、前核形成不全となるとされている¹⁴⁾ が、我々の単為活性化率は両区間ともに90%以上出あり、MD法は紡錘体へのダメージが少ないことが示唆された。また、核移植胚の融合率にも問題が無く、ガラス化による細胞膜の変化はないものと考えられた。これはHeymanら¹⁵⁾ のウサギ卵子での報告と一致している。

体外成熟後の卵子の核相はMⅡ (Metaphase Ⅱ) 期にあり、細胞質内のMPF (Maturation/M-phase promoting factor:成熟/M期促進因子) 活性は高い状態に維持されているが、精子侵入の刺激が起こると、粗面小

胞体より細胞質内にカルシウムイオンが放出されてカルシウム波が発生し、MPFが不活化して第二減数分裂が再開する¹⁶⁾。レシピエント卵子においても、自然の受精時と同様なカルシウム波を人為的に起こしてMPF活性を低下させ、正常な発生を促進させるために、複合活性化処理を行っており、我々の単為発生胚および核移植胚の活性化率は両区間に差が無く、ガラス化保存処理はMPF活性に影響せず、卵子の活性化は正常になされていると思われた。

Kikuchiら¹⁷⁾ はブタ卵子においてMⅡ期卵子は大きな脂質小滴が観察されるが、精子侵入後、前核形成期の卵子では脂質小滴の大きさと数が減少すると報告している。ウシやブタの卵細胞質には多数の脂質小滴が含まれることが凍結時の低温障害の原因の1つとされており、ウシ卵子の脂質小滴もブタと同様の変化が生じるとすれば、活性化処理後は、活性化処理前よりもガラス化による低温障害を軽減することが考えられる。また、Sathananthanら¹⁸⁾ はMⅡ期のヒト卵子において、細胞質内で均等に多数観察されたミトコンドリアが前核形成期では前核の周囲に集合し、その後の細胞分裂中には中心体や細胞骨格、染色体へのエネルギー供給を担うために紡錘体の周辺に移動するとしている。また、その後の胚盤胞への分化や拡張、孵化にも重要な役割を果たすとしており、ガラス化によるミトコンドリアへのダメージの程度が活性化処理前後で異なる可能性もあり、卵細胞質の微細構造の比較も必要であろう。

これらのことから、活性化処理前の卵子は活性化処理後と比べてガラス化によるダメージを受けやすく、核移植後に融合、卵割はするが、胚盤胞まで至らず途中で発生が止まるものが多くなると思われた。以上のことにより、核移植用レシピエント卵子の保存は、除核、活性化処理後に行うのが適当であることが示唆された。今後は、これらの方法で保存したレシピエント卵子を用いて作出した核移植胚の受胎性やその産子の正常性を検討して行きたいと考えている。

謝 辞

卵巣採材にあたり、ご協力をいただいた広島市食肉衛生検査所および広島県食肉衛生検査所の職員の方々に感謝いたします。

参 考 文 献

- 1) Papis, K., et.al. : Factors affecting the survival of bovine oocytes vitrified in droplets, *Theriogenology.*, 54, 651-658 (2000)
- 2) 尾形ら : マイクロドロップレット法で凍結保存したウシのレシピエント卵子による核移植成績, *広島県獣医学会雑誌*, 15, 33-36 (2000)
- 3) Whittingham, D.G. : Fertilization in vitro and

- development to term of unfertilized mouse oocytes previously stored at -196 degrees C, *J Reprod Fertil.*, 49 (1) 89-94 (1977)
- 4) Chen, C. : Pregnancy after human oocyte cryopreservation, *Lancet.*, 1 (8486), 884-886 (1986)
 - 5) Al-Hasani, S., et al. : Successful embryo transfer of cryopreserved and in-vitro fertilized rabbit oocytes, *Hum Reprod.*, 4 (1), 77-79 (1989)
 - 6) Fuku, E., et al. : In vitro fertilization and development of frozen-thawed bovine oocytes, *Cryobiology.*, 29 (4), 485-92 (1992)
 - 7) Otoi, T., et al. : Developmental capacity of bovine oocytes frozen in different cryoprotectants, *Theriogenology.*, 40 (4), 801-807 (1993)
 - 8) Shaw, J.M., et al. : Fundamental cryobiology of mammalian oocytes and ovarian tissue, *Theriogenology.*, 53 (1), 59-72 (2000)
 - 9) Vajata, G., et al. : Open pulled straw (OPS) vitrification: A new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos, *Mol. Reprod., Dev.*, 51, 53-58 (1998)
 - 10) Tominaga, K., et al. : Gel-Loading Tip as container for vitrification of in vitro-produced bovine embryos, *J Reprod and Dev.*, 47, 267-273 (2001)
 - 11) Paris, K., et al. : The effect of vitrification solution, equilibration time and direct dilution method on survivability of equilibrated or vitrified bovine in vitro matured oocytes, *Theriogenology.*, 43, 293 (1999)
 - 12) Booth, P.J., et al. : Full-term development of nuclear transfer calves produced from Open-Pulled Straw (OPS) vitrified cytoplasts: Work in Progress, *Theriogenology.*, 51, 999-1006 (1999)
 - 13) Atabay, E.C., et al. : Factors affecting enucleation rates of bovine and porcine oocytes after removal of cumulus cells by vortexing, *J. Reprod.*, 47, 365-371 (2001)
 - 14) 志水 学 : 卵子・胚の培養と凍結保存, *研究ジャーナル*, 21 (9), 25-30 (1998)
 - 15) Heyman, Y., et al. : Cryopreservation of recipient oocytes for nuclear transfer in the rabbit species, *Proc CRYO.*, 91 (1991)
 - 16) Jaffe, L.F. : The path of calcium in cytosolic calcium oscillations : A unifying hypothesis, *Proc Natl Acad Sci USA.*, 88, 9883-9887 (1991)
 - 17) Kikuchi, K., et al. : Morphological features of lipid droplet transition during porcine oocyte fertilisation and early embryonic development to blastocyst in vivo and in vitro, *Zygote.*, 10, 355-366 (2002)
 - 18) Sathananthan, A.H., et al. : Mitochondrial morphology during preimplantational human embryogenesis, *Hum Reprod.*, 15 Suppl 2, 148-159 (2000)

削蹄カルテを利用した一蹄病多発酪農家への アプローチと蹄底潰瘍への対応策の検討

大下 克史¹⁾ 鈴木 俊彦²⁾

(受付：平成17年4月11日)

Approaching to Cure Hoof Disease by Using Trimming Cards in a Dairy Farm Where Many Cases Occurring and Study for Measures Taking Against Sole Ulcer

KATSUFUMI OOSHITA¹⁾, and TOSHIHIKO SUZUKI²⁾

- 1) Akitakata Branch of Seibu Veterinary Clinical Center, Hiroshima
P.F.A.M.A.A.
1755, Hongou, Midori-chou, Akitakata, Hiroshima 731-0612
- 2) Veterinary Clinical Training Center, Hiroshima P.F.A.M.A.A.
284-1, Inaki, Takaya-chou, Higashihiroshima, Hiroshima, 739-2106

SUMMARY

Recently economic loss causing by limb-hoof diseases is very serious problem in dairy farms. In many cases veterinarians carry out only treatment for them and actually it is very difficult to face the problem by herd health system. I tried to make the hoof trimming card in order to clarify the tendency of hoof disease occurring in a farm which has many cases. Consequently it is clarified that sole ulcer and Digital Dermatitis are serious problem in the farm. Between two diseases especially I carried out Heal less method for sole ulcer three month after hoof trimming. As a result the number of sole ulcer decreased to three from eleven at the next trimming time and I found only one new case at that time. So I think this result suggest it is one of the effective method for reducing sole ulcer to carry out sustained hoof care at short interval after trimming.

要 約

近年問題となっている乳牛の肢蹄疾患への対応は現場では個体への火消し的な対応が主で、牛群へのアプローチは実際には苦慮しているのが現状である。この度、一蹄病多発農家で、蹄病の発生傾向をつかむことを目的に削蹄カルテを作成した。その結果、蹄底潰瘍と蹄皮膚炎が本農家の問題点であることがわかった。このうち蹄底潰瘍について削蹄から3ヶ月後にヒールレステクニックを用いて処置したところ、次の蹄底潰瘍は11頭から3頭に減少し、新たに確認されたものは1頭だけだった。このことから削蹄後の短い間隔での継続的なケアは蹄底潰瘍に対して効果的な治療の一方法であると思われた。

1) NOSAI広島西部家畜診療所安芸高田支所 (731-0612 広島県安芸高田市美土里町本郷1755)

2) NOSAI広島家畜臨床研修所 (〒739-2106 広島県東広島市高屋町稲木284-1)

序 文

近年問題となっている乳牛の肢蹄疾患への対応は現場では個体への火消しの対応が主で、牛群へのアプローチは実際には苦慮しているのが現状である。この度削蹄カルテに基づき一蹄病多発農家の問題点を掘り起こし、解決方法について検討、実行した結果、一定の成果が得られたのでその概要を報告する。

材料および方法

対象農場は搾乳牛35頭を飼育する酪農家である。対尾式タイストールで、床はゴムマットで敷料はなく消石灰が散布されている。馬栓棒はなくゆるやかに係留されており、牛は飼槽いっぱいまで前へ出て座り、牛床半ばで糞尿を排泄するため、足下環境は湿潤した状態であった。削蹄は年2回はほぼ定期的に行われており、過長変型蹄は認められなかったが、高蹄になる傾向があった。

この農家では以前より蹄病が多発しており(図1)、そして死産事故は年間一割以上発生、その多くに運動器病が関与していた(図2)。しかし漠然とこのようなことがわかっていても、実際にはどのような蹄病がどのような頭数割合で発生しているのかはわかっておらず、対応には苦慮していた。

そこでまず蹄病の発生傾向をつかむことを目的に平成15年10月の削蹄時に削蹄師に依頼して削蹄カルテを作成してもらった。削蹄カルテは削蹄作業に支障をきたさな

い程度に簡単に病変を記入してもらった。また平成16年1月から2月に潰瘍病変の治療調査と処置を行い、同年5月の削蹄時に再び削蹄カルテを作成し、蹄病の発生率を前回と比較した。

成 績

平成15年10月の病類別発生率は、蹄底潰瘍31%、白線病6%、蹄球びらん17%、趾間ふらん3%、趾皮膚炎29%、蹄葉炎3%、趾間過形成3%であった。これらのうち、多発している蹄底潰瘍と趾皮膚炎の発生状況を見ると蹄底潰瘍は高齢牛を中心に、趾皮膚炎は若齢牛を中心に発生していることがわかった(図3)。平成15年10月の削蹄から次回の搾蹄までの中間である3ヶ月後の平成16年1月に、前回の削蹄時点で蹄底潰瘍があった11頭のうち9頭の後肢について治療調査した結果、病変があった部位18ヶ所中7ヶ所(9頭中5頭)は角化しておらず、真皮が露出、治療していないことがわかった。そこで対策として、治療調査時に認められた5頭7ヶ所の潰瘍病変についてヒールレステクニックを用いて処置、一ヶ月の間に必要に応じて1~2回の治療を行い、病変部位が角化するかどうかの調査を行った。ヒールレステクニックは北海道の削蹄師真鍋氏が提唱されている蹄病処置方法で、患部側の踵を落として患部に体重がかからないように処置を施す削蹄テクニックである(写真1)。このような処置を行った結果、7ヶ所中6ヶ所の角化および圧痛の消失が認められた。平成16年5月の削蹄時の病類別発生率は、蹄底潰瘍9%、白線病9%、蹄球びらん19%、趾間ふらん6%、趾皮膚炎34%、趾間過形成6%であった(図4)。蹄底潰瘍は11頭から3頭に減少し、新たに確認されたものは1頭だけだった。しかし趾皮膚炎は新たに発生したものが7頭もあり、全体で11頭に増加し、感染牛の年令層も幅広く、牛群に蔓延しつつあることが確認された。

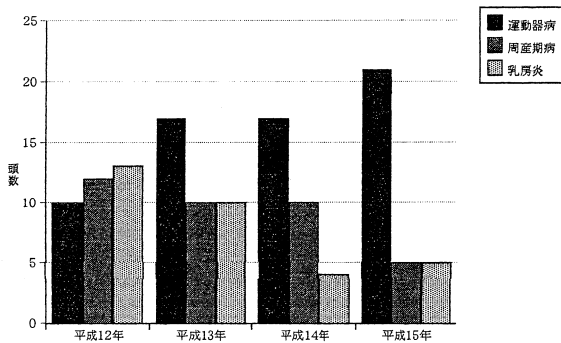


図1 年次別疾病発生頭数

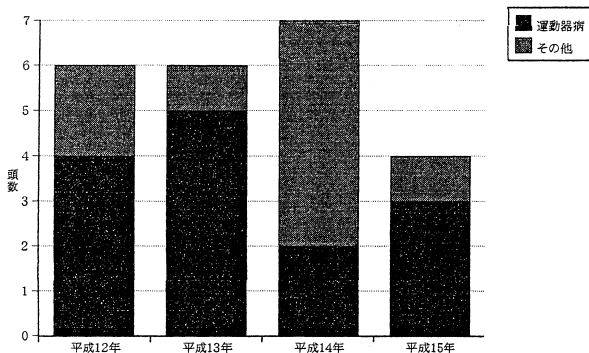


図2 年次別死産頭数

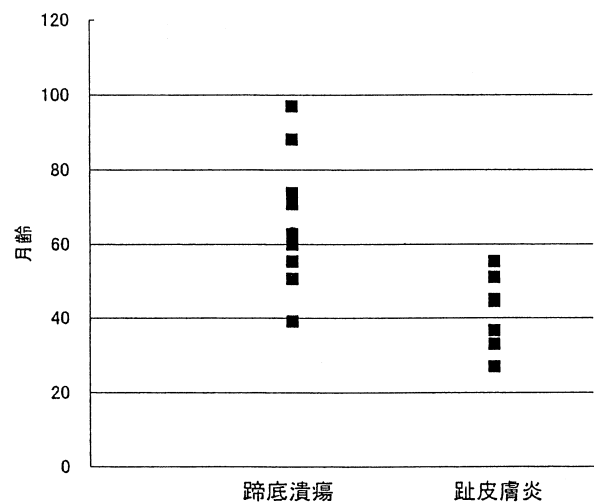


図3 月齢による疾病発生状況



写真1 ヒールレストテクニック

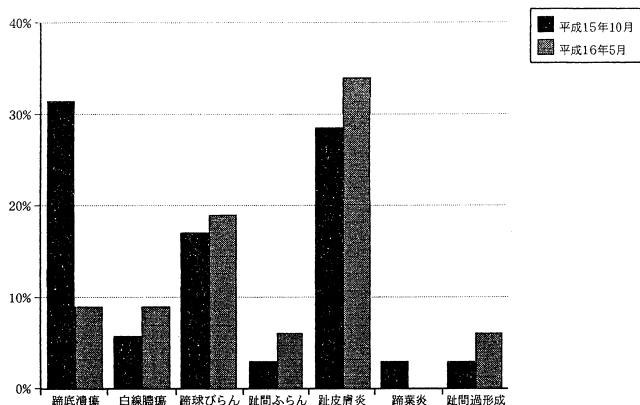


図4 疾病別発生状況の比較

考 察

今回のような削蹄カルテを作成することは初めての試みであったが、これを分析することにより、蹄病多発農家の問題点を明確にすることができた。さらにカルテを作成するにあたり、削蹄師と獣医師の連携がとれ現場

での意見交換や意志統一がはかれたことは大きな収穫であった。潜在病変についての細かい記入は複雑になるため今回実施してもらわなかったが、疾病予防の面からも今後削蹄師と話し合っ検討していかなければならない事項だと考える。対象農家では蹄底潰瘍と趾皮膚炎が高率に発生しており、本農家の問題点であることがわかった。蹄底潰瘍は趾骨と牛床に圧迫された真皮の壊死にともない発生し、ルーメンアシドーシスに起因する蹄葉炎や過長蹄が原因であるとされている^{1, 2)}。

趾皮膚炎はトレポネーマ属の関与する伝染性皮膚疾患である³⁾。このうち趾皮膚炎については消毒薬や抗生物質のスプレーで対応することとし、ここでは特に蹄底潰瘍の多発についての対策を検討することにした。治療調査の結果39%が治癒していないことが判明し、これは癒痕組織となった病変部が繰り返し潰瘍を形成しているものと推測された。これらに対してはヒールレストテクニックを用いた処置を継続的に行った結果、蹄底潰瘍罹患牛を減らすことができた。このことから削蹄後の短い間隔での継続的なケアは今回のような蹄底潰瘍に対して効果的な治療の一方法であると思われた。一方、趾皮膚炎に対しては従来の方法ではコントロールできなくなっており、さらに徹底した対策を取ることが急務であると考え

引用文献

- 1) Krnt H.Hoblet, DVM, MS, and William Weiss, PhD:Lameness, David E.Anderson, DVM, MS, quest editor, 111-128, 獣医輸液研究会, 北海道 (2004)
- 2) Roger Blowey:牛のフットケアガイド, 10-12, チクサン出版社, 東京 (1997)
- 3) 大竹 修: 山口獣医学雑誌, 30号, 45-46, 山口県獣医師会, 山口 (2003)

呼吸器 5 種混合不活化ワクチンを用いた牛呼吸器病対策

廻野 智典¹⁾ 玉野 光博²⁾ 明見 高三³⁾

(受付：平成17年 6 月 8 日)

Measures for Bovine Respiratory Disease with 5-way Inactivated Vaccine

TOMONORI KAINO¹⁾, MITSUHIRO TAMANO²⁾, and KOZO MYOKEN³⁾

- 1) Fukuyama Livestock Health & Hygiene Service Center, Hiroshima Prefecture 396-1, Fukae, Joge-cho Fuchu, Hiroshima 727-0011
- 2) Bihoku Livestock Health & Hygiene Service Center, Hiroshima Prefecture 1-4-1, Higashihonmachi Shobara, Hiroshima 727-0011
- 3) Hokubu Veterinary Clinical Center, P.F.A.M.A.A. 2-21-20, Nishihonmachi, Shobara, Hiroshima 727-0013

SUMMARY

In the A and B Japanese cattle fattening farms that maintain 140 and 120 animals, respectively, and show frequent occurrence of viral respiratory disease, we have used a 5-way inactivated vaccine (5KV) since September, 2003. This method reduced the incidence of respiratory disease from 64.7% (99/153) to 13.8% (12/87) in the A farm and from 47.7% (63/132) to 0% (0/63) in the B farm. As a result, the annual medical cost including the vaccination cost/animal decreased from, 10,620 yen to 2,812 yen in the A farm and from 5,068 yen to 1,640 yen in the B farm, also showing economical effects.

要 約

ウイルス性の呼吸器病が多発している140頭飼養のA及び120頭飼養のB和牛肥育農場において、平成15年9月から5種混合不活化ワクチン(5KV)を用いた対策を実施、検討した。その結果、呼吸器病の発症率がA農場で64.7%(99/153頭)から13.8%(12/87頭)、B農場で47.7%(63/132頭)から0%(0/63頭)に減少した。これに伴いワクチンの接種経費などを含めた1頭あたりの年間診療費が、A農場で10,620円から2,812円、B農場で5,068円から1,640円に減少し、経済的にも有効であることが確認された。

序 文

牛の呼吸器病は多くの和牛肥育農場で発生がみられ、その対策に苦慮されている。特に子牛市場からの導入牛では、導入後数ヶ月間の予防対策が重要視されている¹⁾。今回、導入牛に牛伝染性鼻気管炎(IBR)、パラインフ

ルエンザウイルス3型感染症(PI-3)及び牛RSウイルス感染症(BRS)の関与する呼吸器病が多発している和牛肥育農場において、導入時に5種混合不活化ワクチン(5KV)接種プログラムを策定、指導したところ、良好な成績を得たのでその概要を報告する。

1) 広島県福山家畜保健衛生所(〒729-3421 広島県府中市上下町深江396-1)
2) 広島県備北家畜保健衛生所(〒727-0011 広島県庄原市東本町1-4-1)
3) NOSAI 広島北部家畜診療所(〒727-0013 広島県庄原市西本町2-21-20)

材料及び方法

1 発病状況調査と微生物学的血清学的調査

平成15年9月から平成16年7月

1) 材料

検査牛は、黒毛和種去勢牛を肥育するA農場（140頭飼育）においてM家畜市場から平成15年9月及び11月に導入した8～10ヶ月齢の黒毛和種去勢肥育素牛16頭とした。なお、導入牛は導入約2ヶ月前に5種混合生ワクチン（5LV）を接種していた。

2) 調査方法

導入時に接種したワクチンによって対象牛16頭を5LV接種群（4頭）、5KV接種群（4頭）及び非接種群（8頭）の3群に分けた。導入後2週間継続して体温、呼吸器症状などについて検査した。発熱及び呼吸器症状を呈し、臨床的に治療が必要と認められたものを発病牛とした。発病牛については約50cmの滅菌綿棒を用いて鼻腔内ぬぐい液を採材し、ウイルス・細菌検査を行い、感染症の特定を行った。一方、抗体保有状況及び感染動向調査として、対象牛全頭について導入時と2週間後に採血、ペア血清とし、それらについてIBR、PI-3、BRS及びアデノウイルス7型（BAd-7）に対する抗体価を測定した。また5KV接種群については、追跡調査として導入時、8及び32週後の血清について上記4種のウイルスに対する抗体価を測定した。なお抗体価の測定はIBR及びBRSについては中和試験で、PI-3及びBAd-7についてはHI試験で測定した。

2 モニタリング調査

1) 調査期間

平成14年3月から平成16年11月

2) 材料

対象農場は黒毛和種去勢牛を肥育するA農場及びB農場（120頭飼育）とし、対象牛は両農場がM家畜市場から導入した8～10ヶ月齢の広島県内産の黒毛和種合計432頭とした。なお、対象牛はいずれも約6ヶ月齢時に5LVを接種している。

3) 調査方法

これら対象牛のワクチン歴は、A及びB農場が平成15年12月から平成16年11月の間に導入した牛群は、導入時に5KVを接種した牛143頭と、他方平成15年11月以前に導入され、導入時5KVを接種しなかった牛289頭で、それらを対象に呼吸器病の発生状況を比較した。発生状況については診療記録をもとにその診療歴・診療費用を調査した。

調査成績

1 発病状況と微生物学的検査・血清学的検査

1) 臨床検査

臨床検査では導入時に5KV接種群及び非接種群の各

1頭が軽度の呼吸器症状を呈していたが、2週間後には5LV接種群3頭、5KV接種群1頭及び非接種群5頭に新たに呼吸器症状が認められた。

2) 微生物学的・血清学的検査

呼吸器症状を呈した5LV接種群3頭、5KV接種群2頭及び非接種群6頭の鼻汁をそれぞれ採材し、微生物学的検査を実施した。いずれの個体からも呼吸器病の原因となるウイルスは分離されなかった。細菌検査においては5LV接種群の1頭から *Mannheimia hemolytica*、非接種群の2頭から *Mannheimia hemolytica* 及び *Pasteurella multocida* が分離された。

3) 抗体検査

導入時の抗体検査では、IBRは2倍未満15頭、4倍1頭、PI-3は10倍未満8頭、10倍3頭、20倍1頭、40倍3頭、80倍、1頭、BRSは2倍未満14頭、4倍2頭及びBAd-7は10倍未満12頭、40倍2頭、80倍2頭であった（表1）。供試いずれのウイルスに対しても、感染防御に有効とされる抗体価を有していない個体が全ての群にお

表1 発病状況調査のための検査牛16頭の導入時の抗体検査

		中和抗体価(倍)			
抗原	検体数	< 2	2	4	8
IBR	16	15		1	
BRS	16	14	2		

		HI抗体価(倍)				
抗原	検体数	< 10	10	20	40	80
PI-3	16	8	3	1	3	1
BAd-7	16	12		2	2	

いて半数以上を占めた。導入2週間後、LV接種群の平均抗体価は供試いずれの抗原に対しても上昇を認めなかったものの、5KV接種後の平均抗体価は全頭ともBAd-7を除く他のウイルスに対し有意な上昇が認められた（図1）。また非接種群の3頭はIBR、PI-3及びBRSウイル

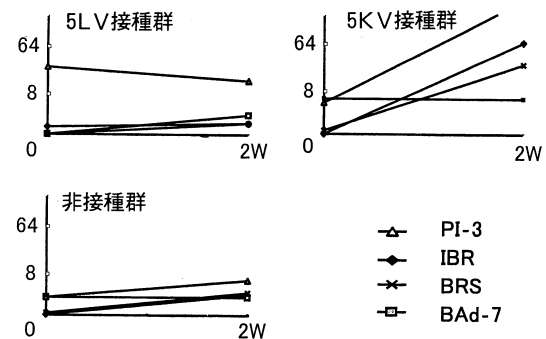


図1 検査牛の5LVおよび5KV接種による抗体価の推移

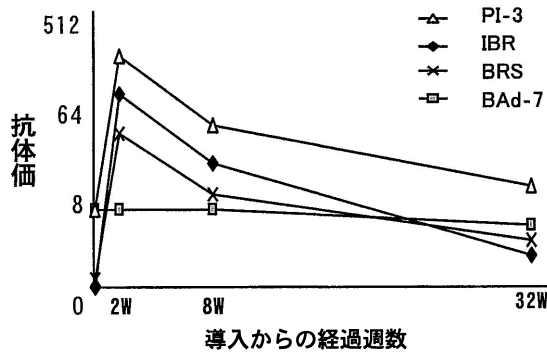


図2 KV接種群の抗体価の推移

スに対する抗体価が上昇し、また臨床症状も認められたことから野外感染と診断した。導入8週間後には5KV接種群のIBR及びBRSウイルスに対する平均抗体価が低下し始め、32週間後には4倍以下に低下した(図2)。PI-3に対しても1頭が10倍未満に低下した。なお、5KV接種群はBAd-7に対する抗体価に変動が認められていないが、これは5KVにBAd-7が含まれていないことに起因していると思われる。

2 モニタリング調査

A及びB農場の呼吸器病の発生状況を調査したところ、5KV接種が開始された平成15年12月以前には、平成15年5月にB農場でBRS、7月にA農場でIBR、PI-3及びBRSの関与する呼吸器病の発生が確認されている。またA及びB農場で飼育する5KV非接種牛で呼吸器病発症した牛のうち、牛が農場に導入された後発症するまでの経過日数の分布を調査したところ、両農場とも発症牛の7割以上が導入後約100日までに集中的に発症しているのが認められた(図3)。

5KV接種を開始後、両農場とも呼吸器病による診療頭数が減少し、呼吸器病の発生は激減している(図4)。また、モニタリング調査からA農場では5KV非接種牛の呼吸器病の発症率が64.7%(99/153頭)であったのに対し、5KV接種牛は13.8%(12/87頭)に減少、B農場においても47.7%(63/132頭)から0%(0/63頭)

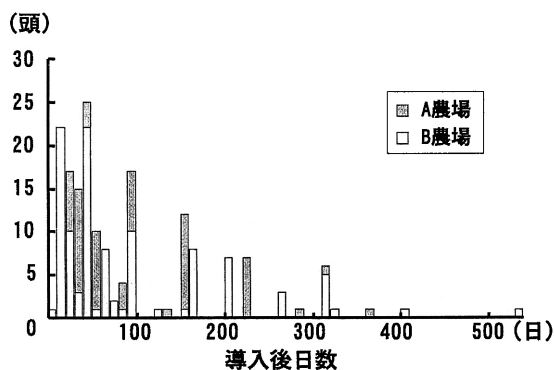


図3 モニタリング調査における呼吸器病の発生状況

に減少した。これに伴い診療費も減少し、呼吸器病に対するワクチンの接種経費などを含めた1頭あたりの年間診療費が、A農場では10,620円から2,812円にB農場では5,068円から1,640円に減少している(表2)。

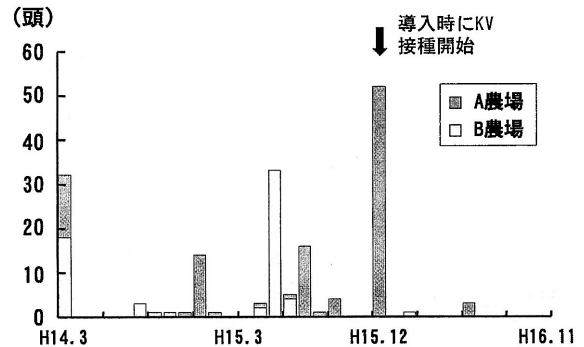


図4 モニタリング調査における呼吸器病による診療頭数の推移

表2 呼吸器病発症率及び衛生費査

	農場	KV非接種牛	KV接種牛
呼吸器の発症率	A	64.7%	13.8%
	B	47.7%	0%
衛生費	A	10,620円/頭	2,812円/頭
	B	5,068円/頭	1,640円/頭

考 察

A及びB農場の導入牛は全頭約6ヶ月齢時に5LV接種があるにもかかわらず、導入時にメーカーの推奨する有効抗体価(16倍以上)を保有していない個体が多数認められているので、ワクチンの追加接種の必要があると考えられる。今回、5KV接種群は5LV接種群及び無処置群と比較し、抗体価が有意に上昇し、呼吸器症状も軽く推移したことから、その有効性が示唆された。

導入時に全頭に5KV接種を開始後、両農場ともに呼吸器病の発生が減少した。両農場では呼吸器病の発生が導入後100日以内に集中していたが、これは抗体価の低値、移動ストレス及び飼養環境の変化などが複合的に関与して発生していたと考えられる。導入時の5KV接種により抗体価が上昇し、感染及び発病の抑制に効果をあげたと思われる。また、発生の減少に伴い衛生費を削減できたことから、経済的な面からも導入時の5KV接種は有用であることが確認された。しかしながら5KV接種32週間後には抗体価が低下しており、発症の危険性が示唆される。そのためウイルスの動向によってはその対応が課題となる。今後、この問題について考慮しつつ、本対策を呼吸器病対策として広く指導・普及したいと考えている。

文 献

- 1) 市川健一ほか：導入直後の肉用牛の呼吸器病，畜産の研究第41巻7号，865－867，(1987)

公共牧場におけるピロプラズマ病対策

清水 和¹⁾ 廻野 智典²⁾

(受付：平成17年6月15日)

The Antiprotozoal Attempt for *Theilelia Sergenti* in Public Pasture

MADOKA SHIMIZU¹⁾ and TOMONORI KAINO²⁾

1) Bihoku Livestock Hygiene Service Center, Hiroshima Prefecture
1-4-1, Higashi-honmachi, Shoubara, Hiroshima 727-0011

2) Fukuyama Livestock Hygiene Service Center, Hiroshima Prefecture
396, Fukae, Jyouge-cho Fuchu, Hiroshima 729-3421

SUMMARY

We investigated the infection with small Piroplasma protozoa in dairy cattle pasture during summer and detected protozoa in 6 of 20 cows. As treatment, flumethrin was administered 3 times at 2-week intervals for the extermination of ticks, and 8-aminoquinoline derivatives as an antiprotozoan drug was administered 3 times at 10-day intervals. As a result, tick parasitism could be prevented, and the hematocrit value recovered, and the erythrocyte parasitism rate of protozoa decreased. However, these initial effects disappeared after the 3rd administration in some cows, suggesting the development of resistance to the antiprotozoan drug. It may be important to avoid the use of antiprotozoan drugs if possible, and to reduce opportunities for infection with small Piroplasma protozoa by continuous extermination of ticks.

要 約

夏期放牧されている育成乳用牛においてピロプラズマ原虫の感染状況を調査したところ、調査牛20頭中6頭で原虫を確認した。治療としてフルメトリン製剤によるダニの駆除を2週間毎に、抗原虫薬としてアミノキノリン製剤の投与を10日間毎に3回にわたって行った。その結果、ダニの寄生を防ぐことができ、ヘマトクリット値の回復及び原虫の赤血球寄生率の低下を認めた。しかし、当初は効果を認めたものの、3回目の投与後に効果を認めなくなった個体があり、抗原虫薬に耐性が出現したことが疑われた。このことから、抗原虫薬の使用はなるべく控え、継続的なダニの駆除によりピロプラズマの感染の機会を減らすことが重要であると思われた。

序 文

近年、牛の牛の飼養形態において省力的かつ低コストな飼育管理方式及び土地の有効利用として、休耕田や林野を利用した放牧や、夏山冬里方式での飼育が見直されつつある。しかし、放牧を行う上で、マダニの媒介によ

る小型ピロプラズマ(*Theilelia sergenti*)の感染は避けられない問題である。今回、夏期放牧されている育成乳用牛のピロプラズマ原虫感染状況を調査したところ、調査牛20頭中6頭で原虫を確認し、その対策を行ったので概要を報告する。

1) 広島県備北家畜保健衛生所 (〒727-0011 広島県庄原市東本町1-4-1)

2) 広島県福山家畜保健衛生所 (〒729-3421 広島県府中市上下町深江396)

材料と方法

1. 調査期間

平成15年6月から10月

2. 検査対象

育成ホルスタイン種・日本短角種計20頭を夏期放牧している公共牧場において、臨床検査を実施するとともに、臨床的に異常を認めたホルスタイン種6頭について血液検査を実施した。材料は、AからFの各牛について入牧後4.7.8.10.14および18週の計6回採取した。

3. 検査項目及び方法

同牧場のピロプラズマ病対策を調査し、原虫及びマダニに対する対策を中心に検討した。検査項目及び方法は、(1)臨床検査、(2)血液検査：赤血球数及び白血球数は自動血球計算器で、ヘマトクリット値（以下Ht値）は高速遠心法で実施した。(3)血液生化学検査：尿素窒素、総ビリルビン（以下T-bil）、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼについて、ドライケミストリー法を用いて測定した。(4)ピロプラズマ検査：血液塗沫標本を作成後、ギムザ染色をして鏡顕した。

検査成績

1. 発生状況

入牧後4週目の最初の検査で、A及びDの2頭で若干のヘマトクリット値の低下が見られたものの、いずれもピロプラズマ原虫を確認できなかった。しかし、入牧後7週目の検査ではA、D及びFの3頭で原虫の感染を確認し、赤血球数232万/ml以下、Ht値16%以下と大幅に低下した。特にDでは寄生率が3.7%と高値を示し、赤血球数の著明な減少に加え、血液生化学検査においてT-bilが1.2/dlと高値を示した。8週目には、6頭全てに原虫の感染を認め、6頭中5頭でHt値が14%から26%と低値を示した（表1）。

表1 血液検査成績

検査牛	A				B				C				D				E				F			
	4	7	8	10	4	7	8	10	4	7	8	10	4	7	8	10	4	7	8	10	4	7	8	10
赤血球 (×10 ⁹ /μl)	715	232	308	389	712	335	539	511	656	420	353	346	509	177	171	221	677	539	470	443	594	176	339	379
ヘマトクリット (%)	26	16		21	31	24	33	27	30	25	22	23	25	13	14	15	30	28	26	25	29	15	24	24
T-bil値 (mg/dl)		0.6	20	0.2		0.5		0.3		<0.2		0.2		1.2		0.4		0.4		0.2		0.9		0.2
ピロプラズマ寄生率*	-	++	+++	++	-	-	+++	+	-	++	++	++	-	+++	++	++	-	-	++	++	-	+++	+	±

*：ピロプラズマ寄生率 -：0%，±：0.1%以下，+：0.1~1%，++：1~2%，+++：2~4%

臨床検査では、いずれの牛においても、牛体へのマダニの付着は確認できなかった。しかし、血液塗沫標本において重度の感染を認めたA、D及びFでは、可視粘膜が蒼白となり、黄疸を認めた。

血液検査を実施しなかったその他の14頭については、特に臨床的な異常を認めなかった。

2. 対策指導

同牧場で行っていた対策を調査したところ、予備放牧等は行っておらず、全頭に対して入牧時にモキシデクチン製剤のPour onによるダニ駆除を、またその2週間後に予防目的で、抗原虫薬であるアミノキノリン製剤の投与を行っていた（図1）。この対策で、ダニ駆除に用いているモキシデクチン製剤は、内部寄生虫及びヒゼンダニ、ウシホソジラミといった外部寄生虫に対する薬剤であり、ピロプラズマの重要な感染源であるフタトゲチマダニに対しては適用外であった。

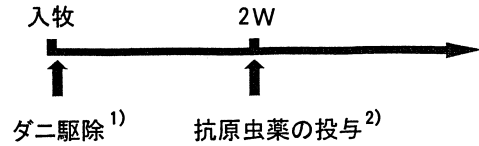


図1 ピロプラズマ病対策（変更前）

- 1) モキシデクチン製剤のPour on
- 2) アミノキノリン製剤の投与

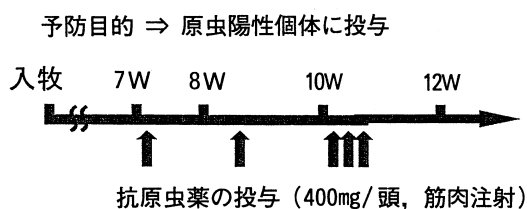
入牧後2週目以降は、ダニ駆除及びピロプラズマ病に対する対策が何ら行われていなかったことから、これらの見直しを行った。ダニの駆除剤は、マダニに対する有効性の観点からモキシデクチン製剤からフルメトリン製剤に変更した。ダニ駆除の時期については、入牧時のみ実施していたものを、2週間間隔でPour on法を行うこととし、貧血を呈した牛はダニの再感染を防ぐため、牛舎内で飼養するよう指導した。

予防目的で用いていた抗原虫薬のアミノキノリン製剤は、投与後の半減期が2時間程度と短く¹⁾、治療目的以外での使用ではほとんど効果がないと考えられた。よって、必要以上の投薬を避けるため、ピロプラズマの感染を認めた個体にのみ投与することとした。

抗原虫薬の投与は、AからFの6頭に約10日の間隔で計3回

行なった。3回目の投与については、この薬剤の性質上、一度に大容量を投与するよりも連続投与を行ったほうがより効果的である²⁾ことから、3日間連続して投与した。なお、1回の投与量は1頭あたり400mgとし、連続投与の場合もこれと同量を3回投与した。投与後には血液検査を実施し、その効果を確かめた（図2）。

・抗原虫薬（アミノキノリン剤）の使用法の変更



・ダニ駆除剤及び駆除実施時期の変更

モキシデクチン製剤 → フルメトリン製剤

・実施時期の変更

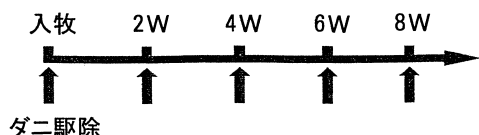


図2 ピロプラズマ病対策（変更後）

3. 対策後の状況

定期的なダニ駆除及び抗原虫薬の投与を開始後、6頭のHt値は27%から34%を示し、いずれも回復傾向にあり、臨床症状も改善された。また、牛体へのマダニの寄生も認めなかった（図3）。

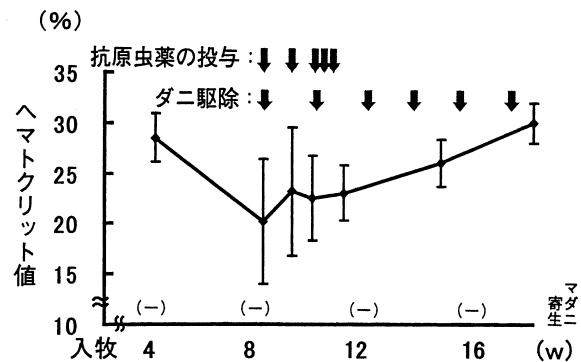


図3 ヘマトクリット値の推移

ピロプラズマの赤血球寄生率は、A、D及びFでは約4%に達し、その他の牛では0.1%から1.9%であった。抗原虫薬の投与により、軽症例も含めいずれの個体も寄生率が低下した。しかし、3回目の投与後、Dでは寄生率の上昇を認めた。また、14週目の検査では寄生率がやや上昇する個体を認めたが、臨床症状の悪化は認めなかったため、治療は実施しなかった。その後は、すべての個体で下牧時までピロプラズマ原虫が血中から消失しなかった（図4）。

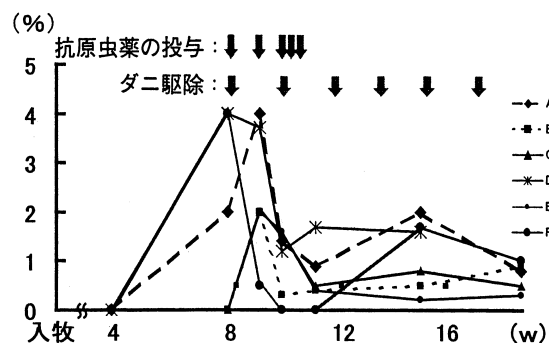


図4 ピロプラズマの赤血球寄生率の推移

考 察

夏期放牧されている育成乳用牛群においてピロプラズマ原虫の感染状況を調査したところ、20頭中6頭にHt値の低下などの症状を認め、対策を実施した。

放牧前の対策ではピロプラズマ病の予防が十分ではなく、ピロプラズマ原虫に感染した牛への対策も取られていなかった。放牧にあたっては、経過を追って、検査及びそれに伴う治療を行うことが重要であると考えられた。

今回の例では、適切な薬剤の選択と、定期的なダニの駆除により、その寄生を防ぐことができた。また、ピロプラズマ原虫の感染を認めた個体への抗原虫薬の投与を行うことで、Ht値の回復、ピロプラズマの血球寄生率の低下を認めた。

しかし、抗原虫薬として用いたアミノキノリン製剤は、投与を繰り返すことで薬剤に耐性の原虫が出現することが報告されている³⁾。今回の例でも、当初は効果が認められたものの、数回の投与の後、効果を認めなくなった個体があり、その可能性が疑われた。現在、小型ピロプラズマ病に対する治療は、アミノキノリン製剤以外に効果的な治療薬がないとされている。定期的なダニ駆除により、ダニの寄生を防ぐことができたことから、耐性原虫の出現が疑われる抗原虫薬の使用はなるべく控え、定期的かつ継続的なダニの駆除によって、ピロプラズマの感染の機会を減らすことが重要であると思われた。

その他にも、今後はダニに汚染されている放牧地を変更し、本放牧をする前に予備放牧を行い慣れさせるといった対策についても検討の必要があると思われる。

参考文献

- 1) 農林省家畜衛生試験場編：ピロプラズマ病技術の手引き 2
- 2) C.G.Zubrod, T.J.Kennedy, J.A.Shannon : Journal of Clinical Investigation vol. 27
- 3) 藤永徹・南哲郎：獣医住血微生物病 近代出版 (1986)

乳用牛におけるBVD-MD持続感染牛の摘発

日高 英子¹⁾ 廻野 智典²⁾

(受付：平成17年6月15日)

Expose of Persistent Infection Cattle of Bovine Viral Diarrhea-Mucosal Disease in Dairy

HIDEKO HIDAKA¹⁾ and TOMONORI KAINO²⁾

1) Bihoku Livestock Hygiene Service Center, Hiroshima Prefecture
1-4-1, Higashi-honmachi, Shoubara, Hiroshima, 727-0011

2) Fukuyama Livestock Hygiene Service Center, Hiroshima Prefecture
396-1, Fukae, Jyouge-cho, Fuchuu, Hiroshima, 729-3421

SUMMARY

We performed the detection of the BVD-MD virus gene by RT-PCR in bulk milk in 23 dairy farmers under jurisdiction (1,076 milking cows), and found a farmer (72 milking cows) positive for this gene. In addition, virus isolation and neutral antibody tests were performed in individual milk, and 1 cow with BVD-MD persistent infection (PI cow) was detected. In addition, antibody examination for the BVD-MD virus performed in 20 cows living with the PI cow revealed an antibody titer of less than 1:2 in the PI cow but 1:256 or more in all the other cows. These results confirmed high level BVD-MD virus contamination in this dairy farm. The PI cow showed no clinical symptoms but exhibited poor reproduction results and milk discharge results. Since this cow was suspected to be the source of infection in the cattle group, preventive measures such as the early selection of PI cows were instructed to the farm.

要 約

管内の酪農家23戸(搾乳牛1,076頭)のバルク乳について、RT-PCR法によりBVD-MDウイルス遺伝子の検出を行い、1戸(搾乳牛72頭)の陽性農家を特定した。更に、個体乳についてウイルス分離と中和抗体検査を実施し、BVD-MD持続感染牛(PI牛)1頭を摘発した。またPI牛の同居牛20頭についてBVD-MDウイルスに対する抗体検査を実施したところ、PI牛は2倍以下であったが他の牛は全て256倍以上の高値が認められた。このことから、この酪農家のBVD-MDウイルスの高度の汚染が確認された。摘発されたPI牛は臨床症状は認められなかったが、繁殖成績及び泌乳成績は不良であった。牛群の感染源であることが推察されたことから、農家に対しPI牛の早期淘汰等予防対策について指導した。

序 文

牛ウイルス性下痢・粘膜病ウイルス(BVD-MDV)の感染は、様々な程度の呼吸器症状・消化器症状等を示

し、抗体陰性の妊娠牛では、BVD-MDVが感染する時期により流産及び持続感染牛(PI牛)あるいは奇形子牛の発生を引き起こすなど、多様な病態を持つ疾病として知られている¹⁾。特に、PI牛は、生涯にわたり大量のウ

1) 広島県備北家畜保健衛生所(〒727-0011 広島県庄原市東本町1-4-1)

2) 広島県福山家畜保健衛生所(〒729-3421 広島県府中市上下町深江396-1)

ウイルスを排出するため、牛群内の感染源として重要であり、BVD・MD清浄化のためには、PI牛の摘発及び淘汰、あるいはワクチン接種による対策が急務となっている²⁾。

今回、管内酪農家のバルク乳を用い、RT-PCRによるBVD-MDV 遺伝子の検出を試みるとともに、遺伝子陽性農家においてPI牛を特定し、対策を講じたので概要を報告する。

材料と方法

1. 調査・検査指導体制

調査に当たり、生産者団体との事前協議により、調査の目的、意義及び方法について確認した。材料としてバルク乳を提供してもらうこととし、広報及び対象農家の選定を生産者団体が、また検査および農家指導を当所が実施することを確認し、取り組んだ(図1)。

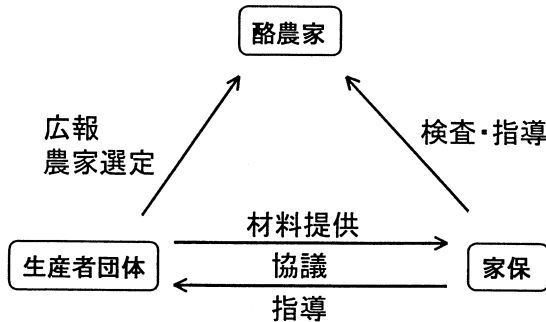


図1 調査・検査・指導体制

2. 調査期間

平成15年 4月～11月

3. 広報と農家選定

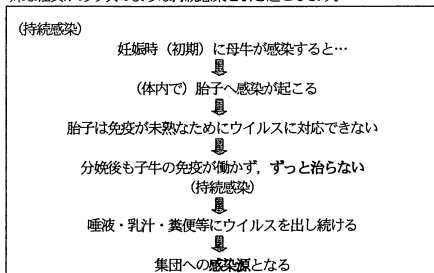
当所で作成したリーフレット(図2)を生産者団体を

牛ウイルス性下痢粘膜炎ウイルスの浸潤調査について

広島県備北家畜保健衛生所

牛ウイルス性下痢粘膜炎は、成牛では泌乳低下、繁殖成績の低下および、長期にわたる下痢などの症状を示し、幼牛では死亡することもあります。さらに妊娠牛が感染した場合には異常産を引き起こすこともあります。

この原因ウイルスは妊娠時に、母体から胎子に感染しやすいという特殊な性質があり次のような持続感染を引き起こします。



なお、この病気に対する効果的な治療法はなく、ワクチン接種による予防が重要となってきます。

(牛の5種混合ワクチン等に含まれています)

他県の調査では、この持続感染牛が牛群の中に1%程度いることが報告されており、この持続感染牛を発見・淘汰することで生産性の向上が図られると考えられています。

当所では、バルク乳を用いて管内の浸潤状況を調査したいと考えていますのでご協力ください。

図2 リーフレット

通じて各農家に配布し、本病及び調査について広報を実施した。その結果、調査の承諾が得られた23戸(搾乳牛1,076頭)を調査対象として選定した。

4. ウィルス学的検査

(1) BVD-MDV遺伝子の検出

23戸のバルク乳と個体乳を用い、RT-PCR法(Vilcekらの方法)³⁾によりBVD-MDV遺伝子陽性農家と個体を特定した。

個体乳検査にあたっては、より効率的に検査を実施するため、72検体を図3のように各列・各行を1グループとしてプールし、A列～I列の9検体、1行から8行の8検体の合計17検体とした。結果が図のように列Dのグループと行3のグループで陽性となった場合、交差した斜線部分を陽性個体とした。

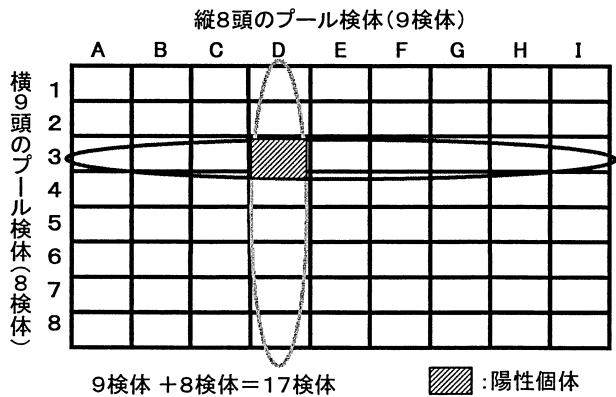


図3 個体乳検査(検体プール方法)

(2) ウィルス分離及び中和抗体検査

特定した個体について、牛胎児筋肉細胞を用いたウイルス分離とBVD-MDVのNose株を用いた中和抗体検査を実施し、PI牛であるか否か確認した。ウイルスが分離され、かつ抗体陰性である場合をPI牛とした。

また、牛群の汚染状況を確認するため、PI牛の同居牛についても抗体検査を実施した。

5. 対策

確認されたPI牛について、臨床症状、繁殖成績及び泌乳成績等を、聞き取り及び検定成績をもとに調査し、対策を講じた。

成績

1. ウィルス学的検査

バルク乳のBVD-MDVのRT-PCR法による検査では23戸中1戸がBVD-MDV遺伝子陽性となった。この陽性農家で飼養されている72頭の個体乳検査で1頭が陽性であった。

更に、陽性であった1頭について、ウイルス分離を実施したところ、血漿からBVD-MDV非細胞病原性株(NCP株)が分離された。一方、この牛が保有していたBVD-MDVに対する抗体価は2倍以下であったことか

ら、この牛をPI牛であると確定した。

陽性農家牛20頭のBVD-MDVに対する抗体価は全て256倍以上の高い抗体価を保有していた。

2. PI牛及び同居牛の調査・対応

当該牛は平成10年2月10日生まれの北海道導入牛で、臨床症状は認めず、過肥気味であった。調査時までには3産し、いずれも正常分娩であったが、3産目の子牛は原因は明らかではなかったが、生後3日で死亡していた。2産目までの子牛の状況は不明であった。授精回数は3産及び4産目では3回と多く、空胎日数は3産の平均で205日と長い状況であり、繁殖成績は不良であった。泌乳成績は2産目の305日補正乳量が4,638kgであり、当該農家の平均補正乳量7,763kgと比較すると、泌乳能力は非常に低い牛であった。また、同居牛の異常産の発生状況、発育不良牛等について調査したが、14年度には2頭の流産(約8ヶ月齢)が認められていた。

今回PI牛が摘発された農家に対してPI牛の問題点を説明し、対策として感染源であるPI牛の早期淘汰及び新規に導入する牛については、ワクチンによる感染予防を指導した。また、PI牛をすぐに淘汰できない場合でも、その産子はPI牛であることを説明し、保留しないことも併せて指導した。

考 察

今回の調査にあたっては、生産者団体との事前協議により、あらかじめそれぞれの役割を確認し、共通の認識をもって取り組むことができた。また、生産者団体と連携することにより、個々の農家ごとではなく地域的に取り組むことができた。

バルク乳からのBVD-MDV 遺伝子検出を試みた結果、1戸1頭のPI牛をプール検体を用いた方法で効率的に摘発することができた。しかし、摘発されたPI牛は多くの

PI牛で認められるような発育不良あるいは削瘦した牛⁴⁾ではなく、外見上は健康牛そのものであり、正常に妊娠、分娩し搾乳をしていた。そのため、これまで淘汰されることなく牛群の高度の汚染につながったと考えられた。

PI牛はBVD-MDウイルスNCP株が、免疫機能が未成熟である胎齢約100日齢未満の胎子に感染した場合に、免疫寛容の状態になることで発生する。出生後は、鼻汁、糞便、尿中等に、生涯大量のウイルスを排出し続けるため、牛群内の感染源となる。その結果、同居する免疫のない妊娠牛に感染した場合には、流産や奇形、新たなPI牛が発生し、生産性の阻害・牛群の汚染拡大につながる。今回の農家でも2頭の流産が認められており、BVD-MDによる被害があったものと推察された。

今後、更に管内の実態を把握し、BVD-MDによる被害を予防するため、未調査の酪農家についても本調査を実施する必要があると思われる。また、陰性であった22戸についても、乾乳期であったために採材していない牛が存在することや、新たなPI牛の導入の可能性があるため、今後も定期的な検査が必要であると考えられた。

参 考 文 献

- 1) 山下秀之他：牛ウイルス性下痢-粘膜病の集団発生例，日獣会誌45, 919-923 (1992)
- 2) 長井誠他：バルク乳からの牛ウイルス性下痢ウイルス遺伝子の検出とそれによる清浄化へのアプローチ，JVM Vol.54 12, 2001
- 3) Vilcek S, Herring AJ, Herring JA, et al: Arch Virology, 136, 309-323 (1994)
- 4) 小佐々隆志他：牛ウイルス性下痢ウイルス持続感染牛の摘発による牛群清浄化の試み，第136回日本獣医学会学術集会 (2003)

頸部の疼痛を呈して来院した犬44例の鑑別診断と 予後についての検討

田村 慎司 田村由美子

(受付：平成17年3月10日)

Differential Diagnosis and Outcomes in 44 Dogs with Cervical Pain

SHINJI TAMURA, and YUMIKO TAMURA

Tamura Animal Clinic

7-16, Yoshimien, Saeiki-ku, Hiroshima 731-5132

SUMMARY

Dogs with severe cervical pain are often encountered in daily clinical practice, but its underlying disease vary. and the treatment method and prognosis also vary among the diseases. In 44 dogs with cervical pain (29 with intervertebral disc disease, 9 with inflammatory disease of the central nervous system, 3 with syringomyelia, and 1 each with atlantoaxial subluxation, vertebral fracture, and brain tumor), we evaluated parameters useful for differential diagnosis among the chief complaint, signalment, clinical signs, and findings of various examinations, and also compared outcome among the diseases.

As result many owners did not notice cervical pain in their dogs, and therefore, it is necessary for veterinarians to indicate cervical pain at the time of inquiry or physical examinations. Since the prognosis of cervical pain markedly differs among underlying diseases, early differential diagnosis is important. However, the condition often improves if early steroid therapy is performed, which results in delay in further examinations.

The results of this study suggest that careful inquiry and physical/neurological examinations are useful to some extent for differential diagnosis, and particularly the age at onset, the presence or absence of fever, and brain signs are important. However, these findings are not adequate to obtain informed consent and determine treatment principles. More detailed diagnostic methods such as MRI and CSF are necessary, and these methods should be performed, if possible before the initiation of treatment in the future.

要 約

頸部の激しい疼痛を主訴とする症例は日常診療でしばしば遭遇するが、その原因疾患は多岐にわたりそれぞれ治療法、予後が異なる。今回、頸部痛を呈する犬44例（頸部椎間板疾患29例、炎症性中枢神経系疾患9例、脊髓空洞症3例、環軸椎亜脱臼1例、脊椎骨折1例、脳腫瘍1例）について、主訴、シグナルメント、臨床症状、各種検査所見の中から鑑別診断に有用な指標の検討、各疾患の予後の比較検討を試みた。

その結果、飼い主は頸部痛に気が付き難く、獣医師が稟告の聴取時あるいは、身体検査時に頸部痛を指摘する事が必要であると考えられた。頸部痛を引き起こす様々な疾患の予後は、比較的良好な症例から不良な症例までそれぞれの疾患で異なるため、早期の鑑別診断が重要であると考えられる。しかしながら、早期にステロイドによる治療が実施されると症状の改善が認められることが多く、更なる検査を遅らせる事が多く見られる。

今回の検討結果から、注意深い稟告聴取、身体・神経学的検査が鑑別診断にある程度有用と思われる。特に発症年齢、発熱や脳症状の有無がポイントとなる可能性が示唆されたが、それだけではインフォームドコンセント、治療方針の決定に充分ではないと考えられた。MRI、CSF 検査によってさらに詳細な診断が可能であると考えられ、今後は、これらの検査を、可能ならば治療開始前に実施する必要があると考えられた。

序 文

犬において、頸部の激しい疼痛を主訴とする疾患は日常診療でしばしば遭遇する。頸部の疼痛を引き起こす疾患は多岐にわたり、椎間板疾患、椎間板脊椎炎、骨髄炎、髄膜炎、脊椎骨折、環軸椎亜脱臼、脊椎腫瘍、神経根あるいは脊髄腫瘍、頭蓋内腫瘍等があげられる¹⁾。また、頸部椎間板疾患、脊髄空洞症、炎症性および感染性疾患など、これらの疾患については個々の懐古的調査は散見される²⁻⁵⁾。しかし、頸部痛という症状に着目して集積し、各疾患の臨床像を系統的に比較し、疾患特異的臨床症状等の検索を検討した報告は我々の知る限りなされていない。

今回、我々は頸部痛を呈して来院した犬について鑑別診断に有用な指標の検討、並びに各疾患の予後の比較検討を試みたので報告する。

材料と方法

2001年8月から2004年12月までの約3年間に激しい頸部痛を呈して来院した犬44例(表1)を用いた。この44例は特に頸部の疼痛の有無を慎重に確認し、本研究に用いる症例を選択した。頸部の疼痛は、下方を向いたまま上目使いに見上げる姿勢、触診による頸部背側の筋の硬直、症例によっては頸部を操作することで誘発される疼痛を基準に診断した。

上記の症例について、シグナルメント、稟告、一般身体検査、神経学的、血液・生化学、単純レントゲン、MRI、脳脊髄液(CSF)の各検査所見および予後について比較検討した。シグナルメントは、犬種、発症年齢、性別について検討した。稟告は、主に主訴について検討した。一般身体検査は、視診、触診、聴診、体温測定、を実施した。神経学的検査は、意識状態、姿勢、歩様、脳神経機能、姿勢反応、脊髄反射の各項目について検討し、病変部位を推定した。血液・生化学検査は、CBC、急性期反応性蛋白(CRP)、BUN、Cre、GPT、ALP、Alb、Tcho、Glu、Ca、Na、K、Cl、NH₃の各項目について検討した。単純X線検査は、頸部ラテラル像、およ

び背腹像について検討した。MRI検査は、頸部脊髄の矢状断、横断像のそれぞれT1、T2強調像について検討した。一部の症例では、頭部の矢状断、横断、水平断のそれぞれT1、T2強調像について検討した。また、必要と判断されればガドリニウム製剤による造影T1強調像も検討した。CSF検査は、全て大槽穿刺でCSFを0.3から4.0ml採取し、肉眼的色調、細胞数、細胞分類、蛋白定量、パンディテスト、ノンネ・アペルトテスト、犬ジステンパー抗体価など、検体量的に可能である限り検討した。予後については、選択された治療法と治療に対する反応について検討した。

結 果

神経学的、血液・生化学、単純レントゲン、MRI、脳脊髄液(CSF)検査を実施したところそれぞれ、頸部椎間板疾患29例、炎症性中枢神経(CNS)疾患9例、脊髄空洞症3例、環軸椎亜脱臼1例、脊椎骨折1例、脳腫瘍(第三脳室脈絡叢乳頭腫)1例と診断された(表2)。炎症性CNS疾患には、肉芽腫性髄膜炎と組織診断された1例(症例17)および、確定診断がなされていない、いわゆるステロイド反応性髄膜炎の症例8例が含まれていた。脳腫瘍と分類された症例8は、安楽死後に脈絡叢乳頭腫と病理検査で確定診断された。各検討内容の要約を以下に示す。症例数が少ないため、一部でしか統計学的処理は行わなかった。

1. シグナルメント

犬種では、ビーグル(7例:15.2%)、ミニダックス(7例:15.2%)が多く含まれていた。

また、トイ種と分類される犬種である、ヨークシャテリア(4例)、トイプードル(3例)、チワワ(2例)、ポメラニアン(2例)、マルチーズ(1例)、ペキニーズ(1例)、ミニチュアピンシェル(1例)、シーズー×ヨーキー(1例)も多く含まれていた(計15例:33.3%)。その他、シーズー3例、ゴールデンレトリバー2例、アメリカンコッカースパニエル2例、柴1例、キャバリアキングチャールズスパニエル1例、ラブラドルレトリバー1例、雑種5例が含まれていた(表3)。疾患別で

表1 症例の一覧

症例	品 種	年 齢	性 別	その他の臨床症状	診 断 名
1	ミニダックス	5歳	♀	失明, 発作	眼型 GME
2	柴	11歳	♂	四肢麻痺, 呼吸不全	C 2-3 IVDP
3	シーズー	13歳	♂	後肢不全麻痺	C 2-3 IVDP
4	ビーグル	8歳	♂	なし	C 4-5 IVDP
5	ミニダックス	3歳	♂	運動失調, せん妄	脊髓空洞症, 水頭症
6	雑	6歳	♀	なし	C 3-4 IVDP
7	ビーグル	7歳	♀	なし	C 3-4 IVDP
8	ラブラドール	3歳	♀	四肢ふらつき, 旋回運動, 沈鬱	第3脳室脈絡叢乳頭腫
9	雑	7歳	♂	四肢麻痺	頸椎骨折
10	ミニダックス	4ヶ月	♀	失明, 四肢不全麻痺	脊髓空洞症, 水頭症
11	ペキニーズ	4歳	♂	後肢不全麻痺	C 6-7 IVDP
12	Amコッカー	11歳	♂	四肢麻痺	C 4-5 IVDP
13	マルチーズ	6歳	♂	なし	C 5-6, 6-7 IVDP
14	ヨーキー	7歳	♂	なし	C 5-6 IVDP
15	トイプードル	5歳	♂	沈鬱	髄膜炎
16	ビーグル	6歳	♂	なし	C 2-3, 6-7 IVDP
17	ヨーキー	4歳	♀ S	沈鬱	散在型 GME
18	ヨーキー	1歳	♂	食欲低下, 四肢不全麻痺	脊髓空洞症, 水頭症
19	トイプードル	9歳	♂	四肢不全麻痺	C 5-6, C 6-7 IVDP
20	ミニピン	3歳	♀ S	沈鬱, 慢性的な全身の搔痒	水頭症, 髄膜炎
21	ビーグル	10歳	♀ S	四肢不全麻痺	C 3-4 IVDP
22	ゴールデン	2歳	♂	四肢不全麻痺, 発熱	脊髄炎
23	チワワ	10ヶ月	♂	四肢不全麻痺	環軸椎亜脱臼
24	ミニダックス	8歳	♂ C	なし	C 3-4 IVDP
25	シーズー×ヨーキー	7歳	♀	四肢不全麻痺, 振戦, 姿勢性眼振	小脳, 脊髄炎
26	ミニダックス	5歳	♀	四肢不全麻痺, 頭部の振戦	C 2-3 IVDP
27	ビーグル	3歳	♂	なし	C 4-5 IVDP
28	日本犬雑	11歳	♂	四肢不全麻痺	C 2-3, C 3-4 IVDP
29	日本犬雑	7歳	♂	なし	C 2-3, C 3-4 IVDP
30	シーズー	11歳	♀	頸部筋肉のれん縮	C 2-3 IVDP
31	ボメラニアン	6歳	♀	四肢不全麻痺	C 2-3 IVDP
32	トイプードル	1歳	♀	右前後肢不全麻痺	髄膜脊髄炎
33	Amコッカー	5歳	♂	四肢不全麻痺	C 5-6 IVDP
34	ビーグル	11歳	♂	四肢不全麻痺	C 5-6 IVDP
35	チワワ	2歳	♂	捻転斜頸, 体幹湾曲	髄膜炎
36	ビーグル	6歳	♀	なし	C 4-5 IVDP
37	ミニダックス	7歳	♀ S	四肢不全麻痺	C 2-3 IVDP
38	ミニダックス	11歳	♂	四肢不全麻痺	C 2-3 から C 6-7 IVDP
39	シーズー	12歳	♀	四肢麻痺	C 2-3, C 5-6, C 6-7 IVDP
40	ヨーキー	8歳	♂	右後肢不全麻痺	C 2-3 から C 6-7 IVDP
41	ゴールデン	7歳	♂	四肢麻痺, 斜視, 姿勢性眼振	脳幹の髄膜炎
42	雑	15歳	♂	四肢不全麻痺	C 2-3 IVDP
43	ボメラニアン	9歳	♂	後肢不全麻痺	C 2-3 から C 6-7 IVDP
44	キャバリア	3歳	♂	四肢不全麻痺	C 2-3 IVDP

♀ S : 避妊済
♂ C : 去勢済

表2 疾患別症例数

疾 患	症例数
頸部椎間板疾患	29
炎症性 CNS 疾患	9
脊髓空洞症	3
環軸椎亜脱臼	1
脊椎骨折	1
脳腫瘍	1
計	44

は、ビーグルでは椎間板疾患が多い傾向があった(7例中7例)。ミニダックスでは椎間板疾患(7例中4例)、脊髓空洞症(2例)、炎症性 CNS 疾患(1例)が認められた。炎症性中枢神経疾患は、トイ種(炎症性 CNS 疾患9例中6例:66.7%)で多く、そのなかでも雌(4例:66.7%)で多い傾向があった。

発症年齢を、1歳未満, 中年齢(1~6歳), 高年齢(7歳以上)の3段階に分類すると、椎間板疾患は1歳未満ではみられず、中年齢で29例中9例(31.0%), 高年齢で20例(69.0%)と、年齢が高くなるほど例数が多

表3 犬種別症例数

犬種	症例数
ビーグル	7
ミニダックス	7
ヨークシャーテリア	4
シーズー	3
トイプードル	3
ゴールデンレトリバー	2
アメリカンコッカースパニエル	2
チワワ	2
ポメラニアン	2
柴	1
マルチーズ	1
ペキニーズ	1
ミニチュアピンシェル	1
キャバリア	1
ラブラドル	1
雑種	6
計	44

くなる傾向があった(表4)。炎症性中枢神経疾患は、中年齢で多く発症する傾向があった(9例中7例:77.7%)。

表4 発症年齢

発症年齢	<1歳	1-6歳	6歳<
頸部椎間板疾患	0	8	21
炎症性 CNS 疾患	0	7	2
脊髄空洞症	1	2	0
環軸椎亜脱臼	1	0	0
脊椎骨折	0	0	1
脳腫瘍	0	1	0
計	2	18	24

2. 稟告

主訴では、目つきがいつもと違う、元気がない、頭部を下げて歩く、変な声でなく、身体に触ると怒る、といった言葉で表現されており、頸部を痛がると飼い主に認識されて来院した症例は1例もなかった。

食欲低下は、椎間板疾患では29例中7例(24.1%)で、炎症性 CNS 疾患では、9例中5例(55.5%)で認めら

れた(表5)。

3. 一般身体検査

発熱は、椎間板疾患では、体温測定した22例中3例(13.6%)で、炎症性 CNS 疾患では8例中4例(50.0%)で認められた(表5)。

4. 神経学的検査

神経学的検査の各項目から推定した病変部のうち、意識レベルの変化や発作等的大脑症状、振戦等の小脳症状、眼振等の脳幹症状をまとめて脳症状と定義した。すると、脳症状は椎間板疾患では29例中1例(3.4%)、炎症性 CNS 疾患では9例中7例(77.7%)で認められた(表5)。

5. 血液・生化学検査

白血球、好中球、血中CRP値共に、上昇が見られない症状が多かった。CRP値の検査を実施した炎症性 CNS 疾患6例中、小脳、脊髄炎と診断された症例25例が1.95ml/dl(軽度)、髄膜脊髄炎と診断された症例32が12.0ml/dl(重度)と、2例のみで上昇が認められた。また、全体でCRP検査を実施した29例中でも、上昇が認められたのはその2例のみであった。その他の項目にも、ステロイド誘発性と考えられた肝酵素の上昇以外に、特に大きな異常所見はみられなかった(表5)。

6. 単純X線検査

頸部椎間板疾患の29例中28例で、脊柱管内の不透過陰影、虚脱した椎間板腔の存在によって頸部椎間板疾患であることが疑われた。しかし、別部位に病変が無いことの確認は出来なかった。水頭症を併発した脊髄空洞症の症例5では、神経頭蓋に水頭症を示唆する辺縁明瞭なX線透過性の亢進した部位がみられた。脊椎骨折の症例9では、脊椎の骨折が認められた。環軸椎亜脱臼の症例23は、単純レントゲンで環椎と軸椎の背側面が離断しており、診断可能であった。その他の脊髄空洞症、炎症性 CNS 疾患、脳腫瘍では単純X線検査で病変部は指摘できなかった(表5)。

7. MRI 検査

MRI 検査では、今回検討した全例で特徴的な異常所見が描出された(表5)。椎間板疾患では、椎間板レベルで硬膜外からの脊髄の圧迫が認められた。脊髄空洞症

表5 疾患別の臨床症状、検査所見

疾患	食欲低下	発熱	脳症状	血液検査	単純X線	MRI 異常所見	CSF 異常所見
頸部椎間板疾患	8 (29)	3 (28)	1 (29)	0 (29)	28 (29)	29 (29)	0 (3)
炎症性 CNS 疾患	5 (9)	5 (8)	7 (9)	2 (9)	0 (9)	9 (9)	8 (9)
脊髄空洞症	2 (3)	1 (2)	2 (3)	0 (3)	1 (3)	3 (3)	0 (0)
環軸椎亜脱臼	1 (1)	0 (1)	0 (1)	0 (1)	1 (1)	1 (1)	0 (0)
脊椎骨折	0 (1)	0 (1)	0 (1)	0 (1)	1 (1)	1 (1)	0 (0)
脳腫瘍	1 (1)	0 (0)	1 (1)	0 (1)	0 (1)	1 (1)	0 (0)
計	17 (44)	9 (40)	11 (44)	2 (44)	31 (44)	44 (44)	9 (12)

異常が認められた頭数(評価した頭数)

の症例では、拡張した中心管が認められた。炎症性 CNS 疾患では、炎症を示唆する、びまん性の T 2 強調像の高信号や、一部の症例で造影剤による増強効果が認められた。環軸椎亜脱臼症では、環軸関節のレベルで腹側から圧迫された脊髄が描出された。脊椎骨折の症例では、骨折部位で脊髄の変形、圧迫が認められた。脳腫瘍の症例では、第三脳室内に均一に強い増強効果を伴い、乳頭状増殖を呈した腫瘍が認められ、発生部位、発育様式、信号強度から脈絡叢乳頭腫が疑われた。

8. CSF 検査

CSF 検査では、髄液細胞増多症、あるいは蛋白増多症などの異常所見が、炎症性 CNS 疾患 9 例中 8 例で見られた (表 5)。また、犬ジステンパー抗体価は一部の症例で検索したが、いずれも陰性であった。

表 6 疾患別の予後

発症年齢	治癒	維持可能	不良
頸部椎間板疾患	27	1	1
炎症性 CNS 疾患	0	8	1
脊髄空洞症	0	1	2
環軸椎亜脱臼	1	0	0
脊椎骨折	0	0	1
脳腫瘍	0	0	1
計	28	10	6

9. 予後

今回検討した各疾患の予後は表 6 に示した通りである。頸部椎間板疾患の 7 例 (24.1%) が内科療法で寛解し、21 例 (72.4%) に外科手術を実施し、治癒した。また、重度の C 2 - 3 椎間板疾患に脊髄の浮腫を併発していた症例 2 例は、MRI 検査中に呼吸停止し死亡した。炎症性 CNS 疾患の 8 例 (88.9%) はステロイドで寛解、維持が可能で、うち症例 15 は休薬できている。散在性肉芽腫性髄膜脳炎と診断された症例 17 は、コントロール不能でてんかん重責状態となり死亡した。脊髄空洞症の症例は、症例 18 がグリセリン、ステロイドの内服で維持されているが、症例 5 が内科療法に反応せず死亡し、症例 10 は検査後に飼い主の希望で安楽死となった。環軸椎亜脱臼症の症例 23 は AASL (Atranto-Axial Subluxation) 鈎による環椎一軸椎の固定手術で治癒した。脊椎骨折の症例 9 は、後頭骨と環椎の脱臼骨折であり、部位的に外科手術が困難と判断し、外固定と安静で 1 ヶ月後に起立、歩行となったが、その 2 ヶ月後に同居犬とけんかをした際に突然死した。安定化していた骨折部位の再破綻による呼吸停止と考えられた。脳腫瘍と診断された症例 8 は、飼い主の希望で検査後に安楽死となった。

考 察

重度の頸部痛が主要な臨床症状でも、多くの飼い主

が頸部の疼痛に気付いていない事が示唆され、稟告聴取、身体検査で頸部痛があることを指摘する事がまず必要であると考えられた。

ビーグルでは、今回検討した 7 例全てが頸部椎間板疾患であり、その発生が多いことが示唆された。しかし、品種特異的な疾患として、Beagle Pain Syndrome と呼ばれる、原因不明の炎症性疾患も存在するため^{5, 6)} 注意が必要と考えられる。Beagle Pain Syndrome は、比較的若齢での発生が多いとされ、また発熱がみられる事が多いとされることから、今回の検討で比較的発症年齢が高く、発熱のみみられることの少なかった椎間板疾患との鑑別診断には発症年齢、発熱の有無が有用と考えられた。

脊髄空洞症は、以前は犬では発生頻度は不明で臨床症状を呈することは少ないと考えられていたが⁷⁾、MRI が獣医学領域に導入されてから生前診断が可能となり急速に診断例が増加し、発症のメカニズムには依然として諸説あるものの、その臨床像も次第に明らかになりつつある⁴⁾。ミニチュアダックスに多いとされる水頭症に併発するパターン⁴⁾、キャバリアキングチャールズスパニエルに多いとされる後頭骨の形態異常に起因する Chiari-1 型様奇形に併発するパターン^{8, 9)}等が報告されている。今回検討された症例中にもミニチュアダックスの水頭症と併発した症例が 2 例あった。発症年齢は、今回検討した 3 症例で、それぞれ 4 ヶ月齢、1 歳、3 歳であった。発症年齢が平均 4.6 歳との報告⁴⁾もあり、先天性疾患と考えられるものにも関わらず、中年齢で発症する例が多いと考えられている。ミニチュアダックスの先天性水頭症に併発する脊髄空洞症は、脳室-腹腔シャント術に反応する可能性があると考えられたが、今回の症例 5 と症例 10 はいずれも飼い主の同意が得られず、外科手術を実施できなかった。また、キャバリアキングチャールズスパニエルの Chiari-1 型様奇形に対して、ヒトの治療法を参考に後頭骨下減圧術が試みられているが、その予後は必ずしも良好とは言えない¹⁰⁾事が報告されており、今後の治療法の集積が待たれる。

炎症性 CNS 疾患は、様々な原因による中枢神経系の炎症性疾患群と考えられている。現在のところ、これらの症例に対して確定診断するには病理組織学的検索が必要不可欠であり、生前診断は生検に頼らざるを得ないが、脳や脊髄の生検は部位的に困難な場合が多い。そのため、死亡した症例以外で確定診断が下される例は少なく、分類が混乱しており、診断名不明とされる症例も多いと考えられる^{1, 5)}。今回炎症性 CNS 疾患と診断された 9 例のうち 1 例は死後に剖検によって散在性肉芽腫性髄膜脳炎と診断されたが、その他の 8 例はいずれも生存中であり、炎症像を疑わせる MR 画像所見と、CSF の炎症像、感染性因子の否定などから暫定的にいわゆるステロイド反応性髄膜炎と分類、診断されたものである。今回の検

討で、炎症性 CNS 疾患はトイ種 (66.7%) の雌 (そのうち 66.7%) で多く、また中年齢での発症が多い (77.7%) 傾向があった。食欲の低下は炎症性 CNS 疾患の 55.5% でみられ、椎間板疾患の 24.1% と比べ多かった。炎症性 CNS 疾患では発熱が認められた症例 50.0% であった。椎間板疾患では、発熱が認められた症例は 13.6% であり、炎症性 CNS 疾患の方が発熱が認められやすいと考えられた。白血球数、血中 CRP 値共に、炎症性 CNS 疾患においても上昇がみられない症例が多く、血液、生化学検査においては炎症性 CNS 疾患と非炎症性 CNS 疾患との鑑別は困難と考えられた。また、その他の血液、生化学検査の項目でもステロイド誘発性と考えられた肝酵素の上昇以外に特に目立った異常値がみられた症例は無く、血液・生化学検査が頸部痛を呈した症例の鑑別診断に有用とは考え難かった。炎症性や感染性 CNS 疾患では、神経学的検査から限局性ではなく多病巣性を疑わせる臨床症状がみられる事が多いとされ⁵⁾、今回の検討でも炎症性 CNS 疾患では脳症状が 77.7% で認められ、多病巣性疾患であることが疑われた。このことは、鑑別診断に有用であると考えられた。CSF 検査では中枢神経系の炎症を示唆する異常所見が 9 例中 8 例で認められ、CSF 検査が炎症性 CNS 疾患の診断に有用であると考えられた。予後として、ステロイド反応性髄膜炎と診断された 8 例はいずれも生存中で、プレドニゾロン、シトシンアラビノシド、プロカルバジン等による免疫抑制療法で最長 2 年間コントロール出来ており、今後の長期追跡が重要と考えられた。また、肉芽腫性髄膜脳炎は予後不良と考えられており、今回の症例 17 も死亡した。原因不明とされる肉芽腫性髄膜脳炎や壊死性髄膜脳炎において、最近、病理組織学的^{11, 12)}、あるいは CSF 中、血中の自己抗体の検索¹³⁾ などによる、炎症性 CNS 疾患の病態に関する報告がみられ、今後、原因、病態の解明と生前診断の精度の上昇、さらに新規の治療法の開発等が期待される。

脳腫瘍と診断された症例は、第三脳室の脈絡叢乳頭腫と病理組織学的に診断され、また MR 画像上で第四脳室の拡張がみられた。そのため、中心管内圧が上昇し、二次性の脊髓空洞症に近い病態になっていたため、頸部の疼痛の原因となっていた可能性があると考えられた。

今回は、心拍数に関してカルテに記載の無い症例が多かったため、比較検討を行なわなかったが、水頭症、脳腫瘍など、頭蓋内圧の上昇を引き起こす疾患でクッシング反射と呼ばれる迷走神経性の徐脈がみられると言われている¹⁴⁾。心拍数の評価は、意識レベルの低下と合わせて頭蓋内圧の上昇がみられるこれらの疾患の鑑別診断に有用であるかもしれない。今後の検討が必要と考えられた。

また、今回診断された各疾患で、全ての症例が臨床症状として頸部痛を呈するとは限らず²⁻⁵⁾、頸部痛のみ

られない頸部椎間板疾患、環軸椎亜脱臼や炎症性 CNS 疾患なども来院する可能性があることには注意すべきであると考えられる。

今回の結果から、注意深い稟告聴取、身体・神経学的検査が鑑別にある程度有用と思われ、特に犬種、発症年齢および、発熱や、脳症状の有無が鑑別診断のポイントとなる可能性が示唆された。しかし、これらの各項目にも疾患特異的と考えられる鑑別診断のための信頼性の極めて高いものは無かった。そのため、それらに加えて MRI や CSF 検査によってさらに精度の高い診断が可能となると考えられた。MRI 検査では、軽度の異常の場合、当然異常が指摘できないこともあると考えられるが、今回の 44 例ではいずれも病変が描出された。また、CSF 検査でも全ての炎症性 CNS 疾患で異常がみられるとは限らないが⁵⁾、今回炎症性 CNS 疾患と診断した 9 例では、細胞数の増加、蛋白量の上昇のいずれかが認められた。例数が少ないため、現段階では断定ができないが、炎症性 CNS 疾患のうち、頸部痛という臨床症状を呈する症例では高頻度に CSF に異常所見が出現する可能性があると考えられた。当院が二次診療主体のため、極軽度の臨床症状しか呈していない症例の診療の機会が少ない可能性もあり、MRI、CSF 検査による病変の検出率に関しては、軽症例も含めた今後の大規模な検討が必要と考えられる。

今回検討した症例群の予後は、治癒する症例から数日で死亡する症例まで様々だった。椎間板疾患で良好な例が多く、炎症性 CNS 疾患、脊髓空洞症では治癒しにくい傾向があった。また、外科手術や長期の内科療法などが必要となったり、短期間で死亡するなどの重篤と考えられる症例が、頸部痛を呈した症例 44 例中 37 例 (84.7%) を占めていた。これらの症例に対しては、鎮痛効果を期待しての一時的なステロイドの投与では解決しないと考えられた。頸部痛を呈する疾患は、ステロイドに初期では反応するものが多く、診断に至るのを妨げている原因の一つと考えられる。前述の病変の検出率と同様の理由で、予後に関しても今回の調査の母集団に偏りがある可能性は否定できない。しかし、我々が以前報告した胸腰部椎間板疾患についての懐古的調査¹⁵⁾では 40.0% が外科手術が必要であったのに対して、今回の調査中の頸部の椎間板疾患では 72.4% と明らかに治療法として外科手術が必要な割合が高かった。その報告では、当院における紹介症例中心の母集団を用いているため、母集団の傾向が今回の調査と比較的類似しているものと思われる。また、椎間板疾患や環軸椎亜脱臼のように単純レントゲンや脊髓造影で診断可能な疾患以外に、炎症性 CNS 疾患や脊髓空洞症など、MRI、CSF 検査以外の検査では診断不可能で、かつその治療には長期にわたる免疫抑制療法や外科手術などが必要な疾患も少なからず含まれていた。その上、それらの中には初期には頸部痛が唯一の

臨床症状であったにも関わらず短時間で死亡した肉芽腫性髄膜脳炎のように予後の極めて悪い症例すら含まれていた。これら、頸部痛を呈した44症例の予後を総合して考えると、頸部の疼痛を呈した症例に対してのステロイド投与による経過観察には、獣医師側の症例に対する細心の注意と、鑑別診断の重要性を伝えた上での飼い主へのリスクの説明が必要であると考えられた。そして、鑑別診断に重要なMRI, CSF検査を可能ならば治療開始前に実施し、より正確な診断に基づく治療計画をたてることが望ましいと考えられた。

最後に貴重な症例をご紹介下さった先生方、ご協力頂いた先生方に深謝いたします。

参 考 文 献

- 1) Chirman C, Mariani C, et al.: 頸部または背部の痛み, In 犬と猫の臨床神経病学, 諸角元二監訳, 193-219, インターズー, 東京 (2003)
- 2) Cherrone KL, Dewey CW et al.: A retrospective comparison of cervical intervertebral disk disease in nonchondrolytic large dogs versus small dogs. J Am Anim Hosp Assoc. 40, 316-20 (2004)
- 3) Gill PJ, Lippincott CL, Anderson SM.: Dorsal laminectomy in the treatment of cervical intervertebral disk disease in small dogs: a retrospective study of 30 cases. J Am Anim Hosp Assoc. 32, 77-80 (1996)
- 4) 枝村一弥, 加藤久美子ほか: MRI検査で脊髓空洞症と診断したイヌの21例, 獣医神経病, 8, 21-30 (2001)
- 5) Tipold A.: Diagnosis of inflammatory and infectious diseases of the central nervous system in dogs: a retrospective study. J Vet Intern Med. 9, 304-14 (1995)
- 6) DeLahunta A; 獣医神経解剖学と臨床神経病学, 青木芳秀訳, 34-59, LLLセミナー姫路 (1989)
- 7) Snyder PW, Kazacos EA et al.: Pathologic features of naturally occurring juvenile polyarteritis in beagle dogs. Vet Pathol. 32, 337-345 (1995)
- 8) Rusbridge C, Knowler SP.: Hereditary aspects of occipital bone hypoplasia and syringomyelia (Chiari type I malformation) in cavalier King Charles spaniels. Vet Rec. 153, 107-112 (2003)
- 9) Lu D, Lamb CR, et al.: Neurological signs and results of magnetic resonance imaging in 40 cavalier King Charles spaniels with Chiari type 1-like malformations. Vet Rec. 153, 260-263 (2003)
- 10) Vermeersch K, Van Ham L: Suboccipital craniectomy, dorsal laminectomy of C1, durotomy and dural graft placement as a treatment for syringomyelia with cerebellar tonsil herniation in Cavalier King Charles spaniels. Vet Surg. 33, 355-360 (2004)
- 11) Suzuki M, Uchida K et al.: A comparative pathological study on granulomatous meningoencephalomyelitis and central malignant histiocytosis in dogs. J Vet Med Sci. 65, 1319-1324 (2003)
- 12) Suzuki M, Uchida K et al.: A comparative pathological study on canine necrotizing meningoencephalitis and granulomatous meningoencephalomyelitis. J Vet Med. 65, 1233-1239 (2003)
- 13) Matsuki N, Fujiwara K, et al.: Prevalence of autoantibody in cerebrospinal fluids from dogs with various CNS diseases. J Vet Med Sci. 66, 295-297 (2004)
- 14) Gupton AC: Arterial pressure regulation. 1: Rapid pressure control. In Textbook of Medical Physiology, ed 7. 250-251, WB Saunders, Philadelphia (1986)
- 15) 田村慎司, 田村由美子; 犬の胸腰部椎間板ヘルニアの40例の治療成績, 広島県獣医学雑誌, 18, 32-34 (2003)

犬の脛骨遠位成長板早期閉鎖に 対する矯正骨切りの1例

櫻田 晃¹⁾ 板本 和宏²⁾ 和田 安弘³⁾

(受付：平成17年3月31日)

Surgery for Premature Closure of the Distal Tibia Growth Plate in a Dog

AKIRA SAKURADA¹⁾, KAZUHIRO ITAMOTO²⁾, and YASUHIRO WADA³⁾

- 1) Sakurada Animal Hospital
1-6-17-1, Senzoku, Hesaka, Higashi-ku, Hiroshima 732-0009
- 2) Itamoto Animal Hospital
2-2613-2, Fukuda, Higashi-ku, Hiroshima 732-0029
- 3) Wada Animal Hospital
3-1-19, Doyomaru, Saijiyou, Higashi-Hiroshima, Hiroshima 739-0007

SUMMARY

2.5months old male Golden Retriever had abscess at the right distal tibia and that made premature closure of the tibia growth plate.

With growth, deformation of the distal tibia made ankle and knee joint unconformity and limping

We suggested that dogs should be treated before had be grave deutogenic arthritis.

要 約

ゴールデン・レトリバー、2.5ヶ月齢、雄が右側脛骨遠位に形成した皮下腫瘍が原因で成長板早期閉鎖を起こした。

成長に伴い脛骨遠位に変形が生じ、足根関節・膝関節の適合性の悪化から跛行を呈したため、受傷後約3.5ヶ月の時点で脛骨遠位での矯正骨切りを実施した。

その結果重度な二次性関節炎を起こす前に関節の適合性を外科的に矯正することが重要であると考えられた。

序 文

犬の脛骨遠位成長板早期閉鎖は、脛骨内顆・外顆・腓骨の成長の不一致により脛骨遠位骨幹端形成不全を引き起こし、さらに足根関節・膝関節の適合性を悪化させ二次性に関節炎等の障害を招く¹⁾。

今回我々は、脛骨遠位成長板早期閉鎖から脛骨遠位骨幹端形成不全を引き起こし、歩行異常を呈した犬に対

し矯正骨切り術を実施したところ良好な経過を得られたので報告する。

症 例

ゴールデン・レトリバー、雄、2.5ヶ月齢、右側下腿遠位に皮下腫瘍を形成。受傷後約2週間で感染はコントロールされたが、脛骨遠位の成長板の境界が正常側(写真1-1)に比べ不明瞭で骨膜のラインも不整であった(写真

1) さくらだ動物病院 (〒732-0009 広島市東区戸坂千足 1-6-17-1)
2) いたもと動物病院 (〒732-0029 広島市東区福田 2-2613-2)
3) わだ動物病院 (〒739-0002 東広島市西条土与丸 3-1-19)

1-2, 3, 矢印). 受傷後約3ヶ月から顕著な跛行と右側後足を前に出して起立位を保つようになった. レントゲンの前後像で脛骨遠位外顆の成長板の消失と足根関節の外反(写真2-2), 側面像で後屈が確認された(写真2-4). 正常側(写真2-1, 2-3)のレントゲンをもとに骨切り計画図を作成し, 矯正骨切りを実施した.



写真1 受傷後約2週間(感染コントロール時)のX線写真

写真1-1 正常側の側面像
写真1-2 患側の前後像
写真1-3 患側の側面像



写真2 受傷後3ヶ月のX線写真

写真2-1 正常側の前後像
写真2-2 患側の前後像
写真2-3 正常側の側面像
写真2-4 患側の側面像

方法および結果

受傷後3ヶ月で跛行が著しいため矯正骨切りを実施することにした. 手術に先立ちレントゲンでは変形・関節面の変位の度合いが評価しにくいいため, 正常側と患側のレントゲンをそれぞれ前後像, 側面像ともにトレーシング・ペーパーを用いて輪郭を写し取り評価した. 膝関節面と足根関節面にラインを引き評価したところ, 前後像において正常側ではほぼ平行(図1-1)であるのに対し患側では約20度外反していた(図1-2). 側面側において正常側では骨軸に対して約8度前屈しているのに対し(図2-1), 患側では脛骨遠位で急激に約20度後

屈しており, 差し引き約28度後屈していた(図2-2).

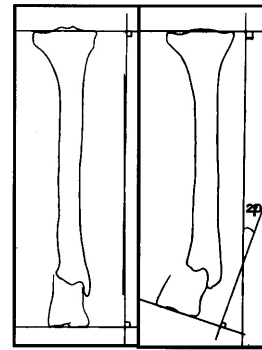


図1 前後像トレース

図1-1 正常側
図1-2 患側

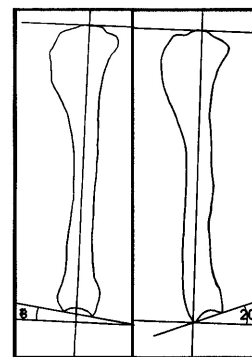


図2 側面像トレース

図2-1 正常側
図2-2 患側

これらのデータをもとに骨切り計画図を作成した¹⁾. 前後像で約15度内反, 側面像で約20度前屈させ骨切りを実施することにした(図3-1, -2). 成長期の個体であるので一度に大幅な矯正はさげ, 経過によっては再度矯正を行なうことにした. また, この計画では脛骨自体の長さも約2cm短縮するが大型犬の場合2cm程度の短縮は他の3肢がその不足分を充分補ってくれ, 傷害になるケースが少ないことから無処置とした.

犬の性格, 体重, またプレートが当たる対側(ここでは外側)を動的圧迫側に出来ないことを考慮し, プレートは3.5mmブロード・プレート, スクリューは遠位・近位に各3穴使用した(写真3-1, -2).

術後約1ヶ月のレントゲンではプレートの破綻もなく順調に仮骨が進んでいる. 術後約2ヶ月のプレートの除去直前のレントゲンでは仮骨の吸収が進み骨膜ラインが整い, 骨切りした部分が安定してきたことがわかる(写真4-1, -2).

プレート除去後約3ヶ月レントゲンの前後像で距骨の捻れは残っているが, 膝関節と足骨関節の関節面は平行

に近い位置に戻っている (写真5-1)。側面像では脛骨と距骨の関節面の後屈は矯正され正常に近い位置に戻っている (写真5-2)。

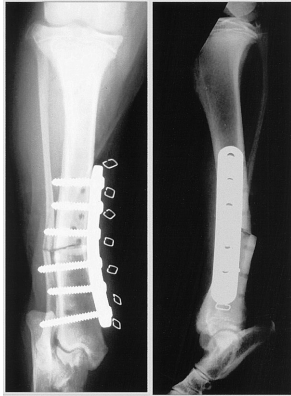


写真3 骨切り術直後のX線写真

写真3-1
前後像

写真3-2
側面像

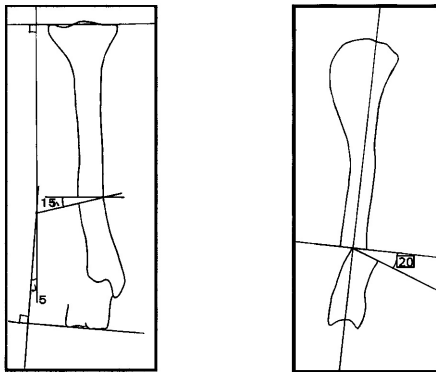


図3 骨切り計画図

図3-1
前後像

図3-2
側面像



写真4 術後2ヶ月のX線写真

写真4-1
前後像

写真4-2
側面像



写真5 プレート除去後3ヶ月のX線写真

写真5-1
前後像

写真5-2
側面像

プレート除去後約2ヶ月の検診では、起立姿勢・歩行状態ともに良好で力強く走ることも可能であった。また、生活の質を落とすことなく満足のいく経過が得られた。

考 察

先ず本症例の外科手術を実施する前に骨切り計画図を作成し、十分なイメージトレーニングを行った。また、関節の変位が著しい場合、一度に大幅な矯正は避け、関節可動域の回復を見ながら再度骨切り術を行うことも同時に考慮すべき点である。幹骨の変形が著しい場合、2箇所での骨切りも考慮すべきである。

今回は遠位・近位に各3穴のスクリューを使用した。脛骨遠位で急激に変形していたため、脛骨遠位骨折など骨幹端骨折で使用されるダブル・フックプレート^{2,3)}を応用し、より変形部位に近い位置で骨切りを行ったが、さらに正常に近い脛骨のラインを作り出せたと考えられた (写真6-1, -2 資料提供 動物整形外科病院)

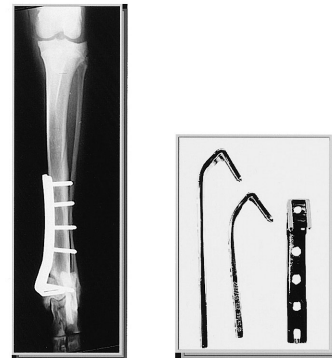


写真6-1

ダブル・フックプレート
によるプレートニング

写真6-2

ダブル・フックプレート

樋口雅仁先生)。

一般に、成長板早期閉鎖は弱齢犬で傷害されるほど重症度が高い¹⁾。仔犬では四肢の些細なトラブルでも、2・3ヶ月に顕著になってくるのでこの傷害の可能性を飼い主に告げておくべきである。

本症は早期に診断し適切な治療を行うことで二次性の障害を最小限に抑えることが可能と考えられた。

謝 辞

最後に、ご指導および資料の提供を頂いた大分県開業の樋口雅仁先生に感謝いたします。

参 考 文 献

- 1) Charles D. Newton/David M. Nunamaker : 小動物整形外科全書 第3巻, (是枝 哲世とそのグループ訳), LLLセミナー, 40:611-616, 41:618 (1994)
- 2) M. JOSEPH BOJRAB : CURRENT TECHNIQUES IN SMALL ANIMAL SURGERY III, 興仁舎, 699 (1990)
- 3) 新・小動物骨折内固定マニュアル～ AO/ASIFテクニック～インターズー, 189-199 (2001)

尿酸アンモニウム結石を伴った肝血管肉腫の フェレットの一例

角田 睦子 勝矢 朗代 佐野 博子
伊藤 雄悟 角田 利一 平野 健

(受付：平成17年4月8日)

A ferret with liver hemangiosarcoma accompanied by an ammonium urate calculus

CHIKAKO KAKUDA, TOKIYO KATUYA, HIROKO SANO, YUUGO ITOU,
TOSHIKAZU KAKUDA, and TAKESHI HIRANO

Hirano Animal Hospital
2-8-29, Aosaki, Minami-ku, Hiroshima 734-0053

SUMMARY

Ferrets with liver hemangiosarcoma have been reported but include only a few in which antemortem diagnosis was made, and treatment was performed. We report a ferret that showed increases in liver enzyme levels in an early stage, underwent treatment for urethra obstruction by an ammonium urate calculus, and was diagnosed as having liver hemangiosarcoma by post-mortem autopsy.

要 約

フェレットの血管肉腫は肝臓での発生が知られているが生前に診断され、治療された報告は少ない。今回我々は初期に肝酵素値の上昇を認め、尿酸アンモニウム結石による尿道閉塞を生じたフェレットの治療を行い、死後の剖検により肝血管肉腫と診断した症例について報告する。

はじめに

フェレットの血管腫と血管肉腫の発生は肝臓と皮膚に多くみられ、まれに脾臓と直腸にも認められる¹⁻³⁾。血管腫あるいは血管肉腫に侵されたフェレットの生前の診断は困難でしばしば腹腔内出血による突然死が認められるとされている¹⁾。今回我々は肝酵素値の上昇と尿酸アンモニウム結石の排出を認めたフェレットの治療と経過観察を行い、死後剖検にて肝血管肉腫と診断された症例に遭遇したのでその概要について報告する。

症 例

フェレット、去勢済み雄、初診時4歳5ヶ月齢、体重

0.76kg、以前よりよく下痢をしていたがここ数ヶ月で急激にやせてきた（以前は1.5kg）、食欲はあるが元気がなく、下痢で脱腸のように感じているとの稟告であった。一般身体検査にて軽度の脱水と脱肛を認めたが、腹部触診では特に異常は認められなかった。消化管内異物の除外を目的として消化管バリウム造影、およびCBC、血液化学検査を実施した。X線検査にて通過障害はなく低アルブミン、肝酵素値（AST/ALT/ALP）、CPK、NH8の上昇が認められた（図1）。脱水の補正およびステロイド、強肝剤の投与を行ったところ徐々に一般状態の改善が認められ（図1）、第16病日には体重も1.0kgとなった。しかし、第22病日、頻回の嘔吐、血尿を訴え来院、翌第23病日、尿中に灰白色の結石の排泄が認められ、超音波

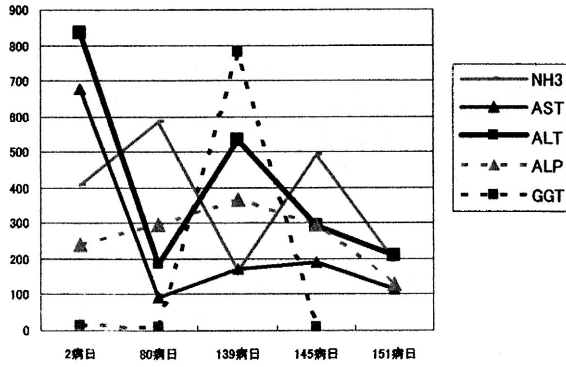


図1 血液化学検査値の推移

査にて膀胱内にシャドーを引く高エコー源性の結石 (写真1, 2), 尿沈渣中に尿酸アンモニウム結晶が確認された。肝障害により血中のアンモニア濃度が上昇し結石の形成が生じたと考えられたため, 外科的摘出は行わず肝機能の改善を中心とした治療を行うこととし経過観察とした。第139病日肝酵素値の上昇が認められたが一般

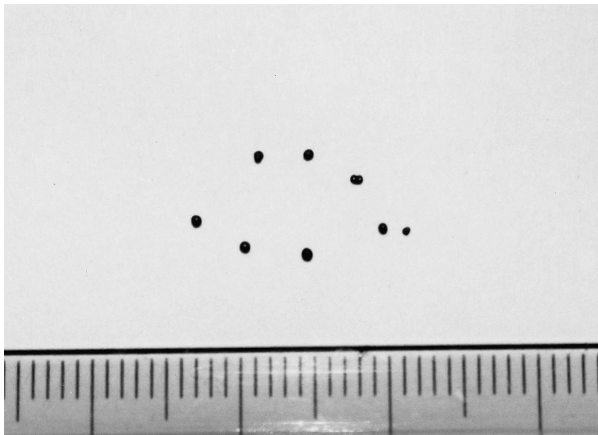


写真1 第23病日, 尿中に排泄された尿酸アンモニウム結晶



写真2 膀胱内に高エコーを示す結石が認められる

状態は著変がなく, ときおり軟便, 結石の排出, 血尿が生じたもののおおむね良好に経過し, 体重も1.2kg前後で推移していた。しかし第145病日, 朝より尿が出ず何度もいきむとのことで来院。X線検査にて膨満した膀胱と多数の結石が認められた。緊急に鎮静下で導尿を行い, 翌第146病日再び排尿困難を呈したため, 膀胱尿道内結石摘出術および尿道造瘻術を実施した。開腹時, 膀胱の臓側漿膜面は暗赤色に変色し, 腹腔内にごく少量の出血が認められた。定法に従い膀胱切開を行い結石の摘出を行い, 引き続き尿道口よりトムキャットカテーテルを挿入して会陰部に尿道造瘻を行った (写真3~6)。術前の触診, 超音波検査 (写真7) にて前腹部に腫瘤が確認されていたが術中切開部からは腫瘤を直視確認することができなかったためそのまま閉腹した。術後の排尿状態は良好に維持されたが, 第151病日より嘔吐, 第154病日より下痢, 可視粘膜の蒼白, 後肢の衰弱が認められ徐々に状態が悪化, 第161病日死亡した。

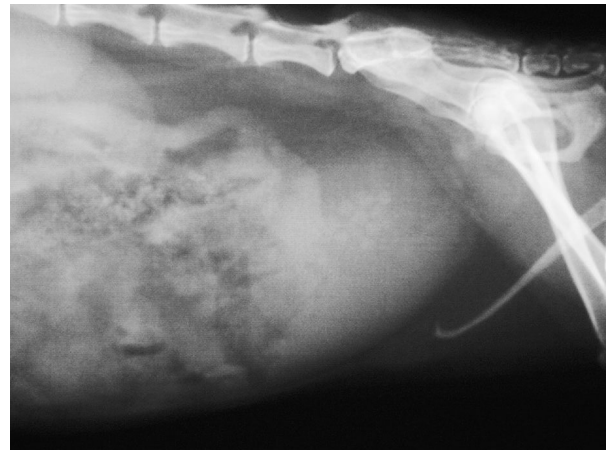


写真3 膨脹した膀胱および膀胱内に多数の結石が認められる



写真4 術中の膀胱の外観

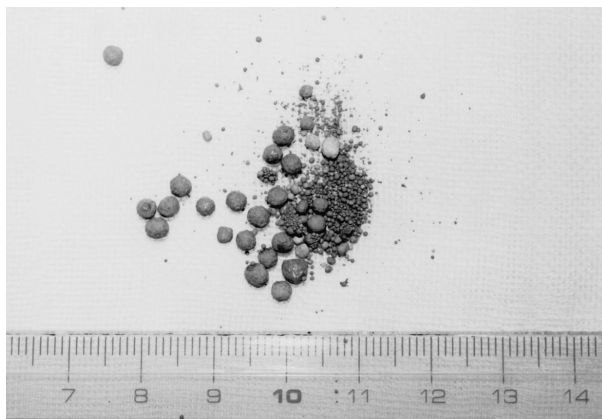


写真5 膀胱内から摘出した結石



写真6 会陰部の達ろう部の様子
(カテーテルが挿入してある)

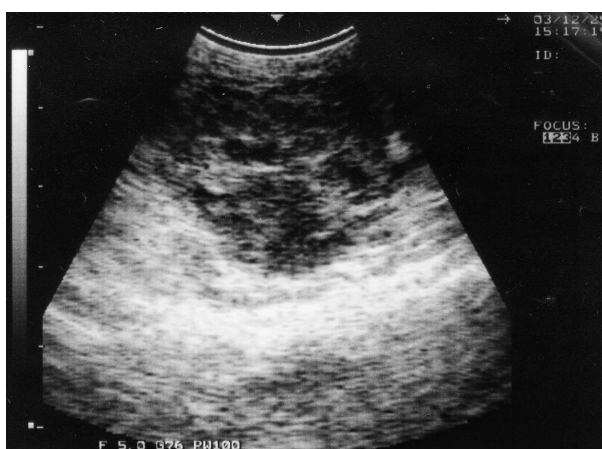


写真7 術中の膀胱の外観

剖検時所見

開腹時、腹腔内に血様の液体の貯留が認められた。心、肺、脾臓、腎臓、膀胱には著変はなかった。肝臓は橙黄色に腫大し、肝葉の先端に巨大な腫瘤が認められた(写真8)。膀胱切開部は治癒していた。

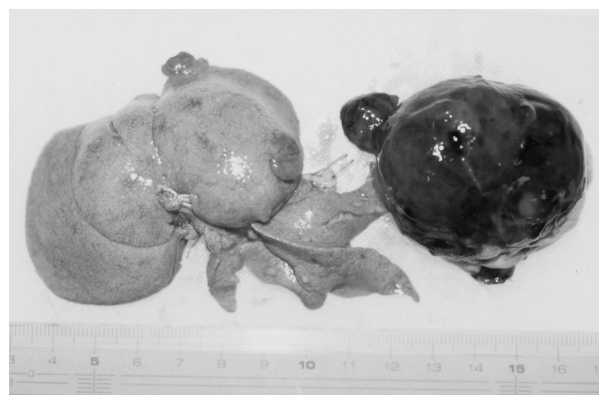


写真8 検時肝臓に巨大な腫瘤が認められた

病理組織学的所見

肝臓に認められた腫瘤は血管肉腫であった。また腫瘤以外の肝葉ではリンパ球の肝小葉周囲への散発的浸潤と肝細胞のび慢性の脂肪化が認められた。膀胱は粘膜上皮の軽度の過形成、脾臓は髓外造血、腎臓は軽度の硝子化、肺に重度の化膿性肺炎、副腎皮質に多発性のう胞が認められた。肝臓の血管肉腫と肺の化膿性炎症が死因として関与したものと推察された。

考 察

本症例の場合、初診時に認められた肝障害の原因は不明であるが、当初は投薬によってコントロールされていたと思われる。第139病日の時点で急激な肝酵素値の上昇が生じていることから、この時点で肝臓に何らかの破綻が生じたものと思われる。初診時の触診、及びX線検査では腹腔内に異常は認められなかったこと、第139病日まで良好な経過をとっていることから、経過観察期間中、何らかの原因によって、肝葉先端に血腫が生じそこから血管肉腫となったものと思われる。フェレットの血管肉腫は肝臓と皮膚に最も多く生じ、まれに脾臓と直腸に認められることが報告されている¹⁻³⁾。血管腫あるいは血管肉腫に浸されたフェレットはしばしば突然死亡し、生前の診断は困難であることが指摘されている³⁾。血管腫あるいは血管肉腫が認められたフェレット13匹のうち9匹に腹腔内出血が認められていることが報告されている¹⁾。

本症例は5ヶ月間にわたる経過観察と治療を行いなが

ら肝臓の異常の原因を確定できなかったことは大きな反省点であると同時に、緊急の処置を優先し、腹腔内の腫瘍を腸間膜リンパの腫大であると判断し、そのまま閉腹したことが症例を最終的に死に至らしめたと思われた。術後の経過から失血が生じていることは十分に推察されたが、判断の遅れから再開腹の時期を失した。開腹時のためらわずに上腹部まで切開をとり腫瘍の確認と切除を行ってれば、あるいは術後のPCV低下の原因をすぐに確認していれば救命できたかもしれない症例であったと思われた。最後に、当院では輸血用の供血フェレットを確保していないため、このような出血が疑われる症例に対する緊急の輸血用血液をどのように確保するかが今後の課題の一つであると思われた。

考 察

- 1) Fox JG, Marini RP. (1998) : Neoplastic disease. In Fox JG, ed. *Biology and disease of the ferret*. 2nded. 405-447. Baltimore : Williams & Wilkins.
- 2) Hofer HL. (1997) : Ferrets, Rabbits, and Rodents. *clinical medicine and surgery*. (Hillyer EV, Quesenberry KE., ed), 32-33, WB Saundere Co.
- 3) Brown SA. (1997) : Ferrets, Rabbits, and Rodents. *clinical medicine and surgery*. (Hillyer EV, Quesenberry KE., ed), 99-114, WB Saunders Co.

SDCTおよびMDCTによる形態診断について

谷浦 督規^{1, 2)} 谷浦 直美¹⁾ 谷浦 倉之¹⁾

(受付：平成17年9月26日)

Morphological diagnosis by SDCT and MDCT

TOKUNORI TANIURA^{1, 2)}, NAOMI TANIURA¹⁾, and KURAYUKI TANIURA¹⁾

1) Taniura Animal Hospital

1-3-30, K airouen, Saeki-ku, Hiroshima 731-5135

2) Department of Radiology, School of Medicine, Hiroshima University

1-2-3, Kasumi, Minami-ku, Hiroshima 734-8551

SUMMARY

The morphological diagnosis based on 3-dimensional images obtained by reconstruction using a workstation based on SDCT and MDCT data is useful for diagnosis/treatment and informed consent.

要 約

SDCTおよびMDCTで得られたデータを元に、ワークステーションを用いて構築を行った3次元画像による形態診断法は、診断・治療・インフォームドコンセントに役立つ診断法である。

はじめに

我が国で始めてSingle-Detector CT（以下SDCT）においてワークステーションを用いた形態診断法が行われるようになって、2年半を経過し、これまでの単純SDCTとは異なる臨床価値の高いデータが十分に蓄積されてきている。

これまで「検者の技術に左右されない、客観性の高い診断装置」として報告、発表してきたCT装置もその精度の向上に伴って、造影方法に関連して難しい問題が提起されるようになってきた。それはCT画像はもともと横断面として取り扱われていたが、装置の進歩にともない、面から立体としていわゆるボリュームとしての診断が可能になったからである。基本的に血流動体に関わらないものに関しては、データを取得するための時間的制約が無いため、ある比較的単純な機器でもデータの収集が可能である。ただし、血流動体での質的診断を実施するに当たっては、造影剤の投与方法（時間、量、速度、濃度）

が重要になってくる。しかし、撮影法を十分に理解することで、より高精度な画像が得られ、診断・治療、そして依頼者にとっても判りやすい診断装置であることに間違いはない。

そこで、今回SDCTおよびMulti-Detector（以下MDCT）の形態診断の症例について紹介する。

症 例

症例1. ベキニーズ、5歳、5.3、メス。突然の前肢麻痺、歯突起骨折を認め、C2-3の圧迫骨折の疑いで検査を依頼された。MDCT適応症例とした。

症例2. ゴールデン・レトリバー、10歳、避妊メス、35。3日前から急に腹囲膨満、食欲不振、呼吸速迫を認め、MDCT症例とした。造影剤350mg/mlを80ml注入した。撮像条件は単純CT撮像後造影剤を20秒注入し、スマートプレップにて造影剤の流入状況およびモニタリングを実施し、造影剤が閾値に達したことを確認後撮像を開始した。動脈相は息止めをして20秒間撮像し、15秒間

1) 谷浦動物病院（〒731-5135 広島市佐伯区海老園1-3-30）

2) 広島大学医学部放射線医学教室（〒734-8551 広島市南区霞1-2-3）

の呼吸を再開し門脈相を撮像した。

症例3. ゴールデン・レトリバー, 14歳, 避妊メス, 45. 1週間前から徐々に腹囲膨満, 食欲不振, 呼吸速迫, 下痢等を認める. MDCT適応症例とした. 造影剤350mg/mlを100ml注入した. 撮像条件は, 単純CT撮像後造影剤を20秒注入し, スマートプレップにて造影剤の流入およびモニタリングを実施し, 閾値であることを確認後撮像を開始した. 動脈相は呼吸停止下で20秒撮像した後15秒間の呼吸を再開し, 門脈相を撮像した.

症例4. 柴犬, 1歳, オス. 10日前から徐々に元気消失, 食欲不振, 3日前から呼吸速迫, 食欲廃絶. 他院にて再生不良性貧血及び重度の肺炎のため予後不良と診断された. SDCT適応の症例とした.

症例5. グレート・デン, 4ヶ月, オス. 30. 1週間前から食後に数回の嘔吐が見られる. 元気消失, 3日前から左側脇腹, 肋骨周囲の腫脹が見られた. MDCT適応とした.

検査結果

症例1. CT所見 CT及びCTMにおいて, C6-7に椎間板ヘルニアが確認された(写真1, 2). しかしそれは, 脊柱管内に存在する歯突起の横断像だけでは判断しにくく, またサジタル及び कोरोナ ルでの確認でも同様であった. それに対し, 形態診断として3D像を作成することによって, C2-3の骨の状態が明瞭になり,



写真1 頰椎のCT画像



写真2 頰椎のCTM画像

その結果圧迫骨折も否定することができた(写真3).

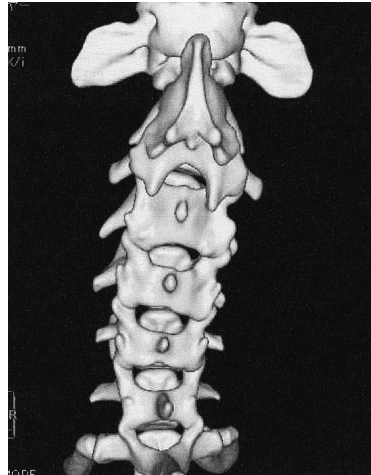


写真3 マルチボリューム像

また歯突起に関しては, ワークステーションによりC1とC2を分離することが可能となり, 実際に隠れていたもの(歯突起およびC2-3の骨形成不全)を確認することができた(写真4). これは肉眼や単純映像での確認は不可能であり, パーチャルの領域でのみはじめて可能になることである.

また仮想内視鏡像を利用することで, 実際に環椎内がどのような状態にあるのかを判断することができた.

診断 C6-7の椎間板ヘルニア、歯突起およびC2-3の骨形成不全

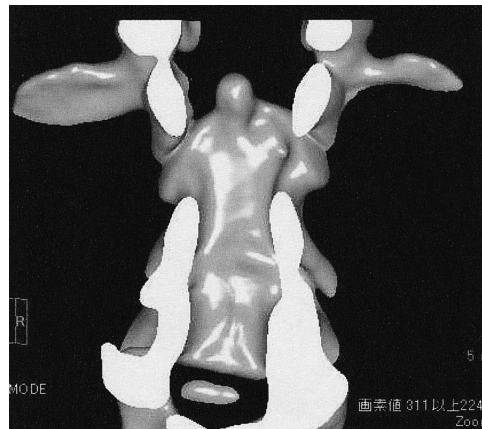


写真4 歯突起及びC2-3の形成不全

症例2. CT所見 門脈相および平行相で, 肝内に低吸収の円形性腫瘍が確認された(写真5, 6).



写真5 肝臓内に腫瘍が確認された.

また後腹腹腔には腹水が認められ、腹部中央には脾臓周囲に広がる中心部が低吸収で被膜が造影増強された円形腫瘍が確認された(写真7, 8, 9).

診断 肝臓内の腫瘍, ならびに脾臓腫瘍の自壊と腹水の貯留.

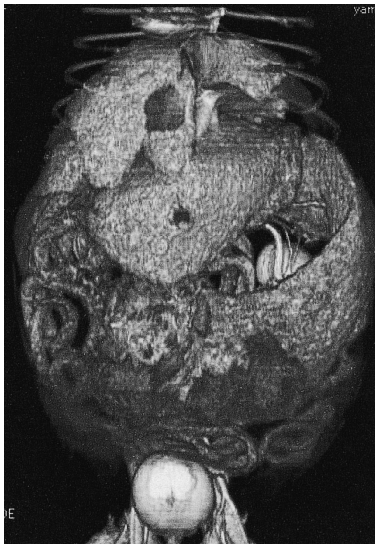


写真6 3DCT像

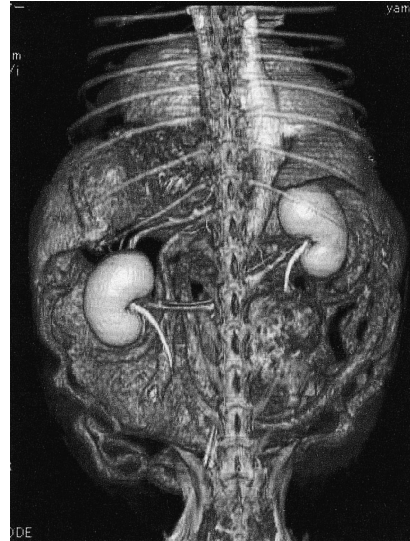


写真9 DV像

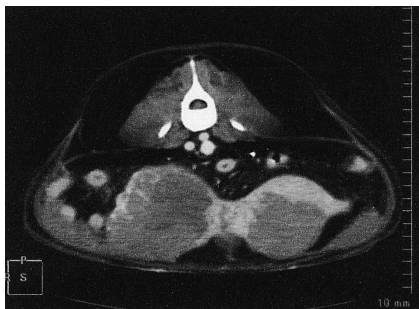


写真7 骨盤腔周囲に中心造影効果の極端に低い腫瘍塊一部被膜の欠損像及び若干の腹水貯留

症例3.

CT所見 脾臓の周囲の側面からの隆起性腫瘍が確認された(写真10). これは中心部まで血流に富んだ造影効果の低い腫瘍であった(写真11). 動脈相では肝右葉に高吸収の腫瘍が認められた(写真12). また、腹部中央

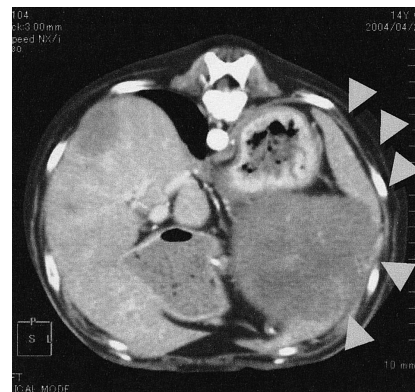


写真10 脾臓の周囲からの側面からの隆起性腫瘍

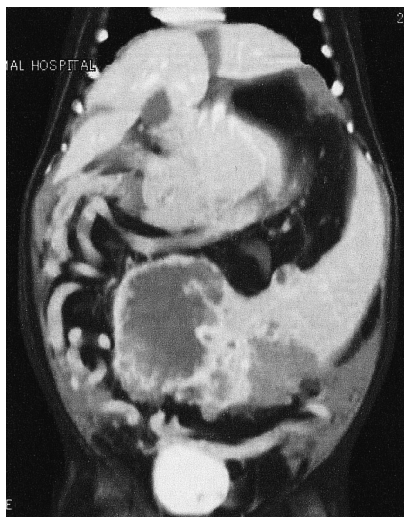


写真8 3D影なしボリュームレンダリングカットティング像

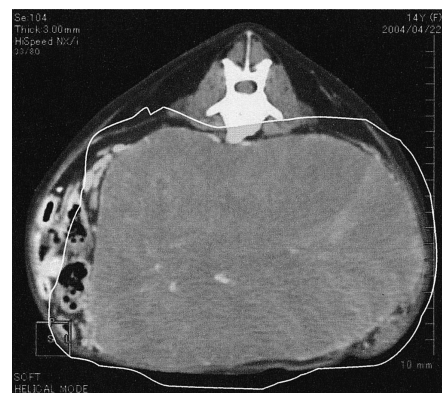


写真11 中心部まで血流富んだ造影効果の低い腫瘍

に巨大な腫瘤塊が認められた(写真13, 14, 15). さらに左腎臓は骨盤腔内に押しやられていた(写真12, 13, 14, 15).



写真12 骨盤腔内の左腎臓

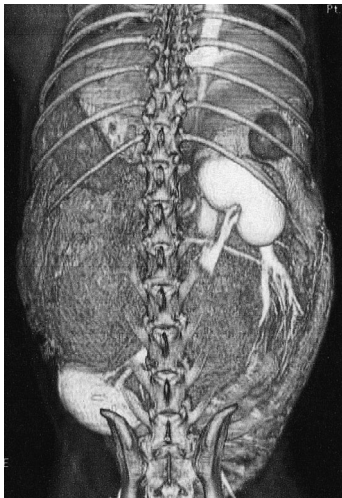


写真13 DV像 肝右葉にも腫瘍が確認された。左腎が巨大な腫瘤によって骨盤腔内に押しやられていた。



写真14 腹腔内に巨大なマスが存在していた。

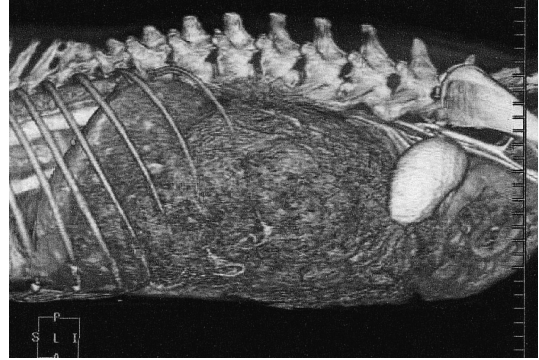


写真15 R L 像

症例 4.

CT所見 造影CTでは肝臓周囲及び横隔膜から心膜の周囲にかけて炎症性変化である造影増強効果, 及び若干の液体貯留が確認された. 単純CTにおいて肺の条件では判断が困難であったが, 縦隔条件で左胸骨腹側に直線的に連続性のある若干高吸収な物体が認められた単純CTでの3次元像を作成すると, 胸骨背側に先端が鋭い棒状物を確認することができた(写真16, 17, 18).

診断 誤飲した竹串が胃から頭側へ向かって胸腔下部を穿孔していた.

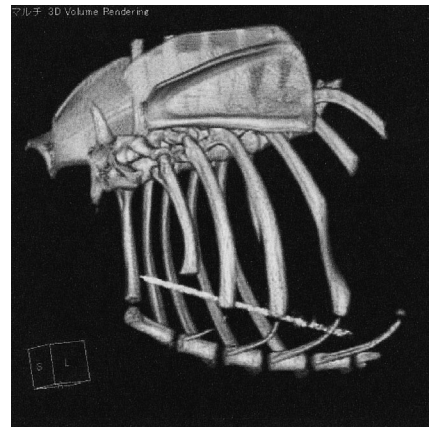


写真16 胸骨背面に先端が鋭の棒状のものが存在した。

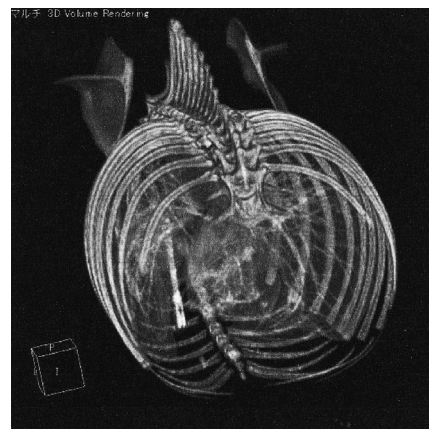


写真17 尾側からの胸腔内の状態

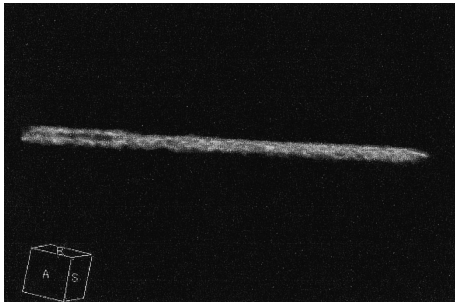


写真18 抽出された竹串

症例 5.

C T所見 胃周囲にいわゆるけばたち像が見られ、左胸壁の腫張が明瞭であった。また連続横断面での確認では、連続性のある軟部組織よりも高吸収域の物体を確認することができた(写真19)。

造影C Tではけばたち像はより明瞭となり、異物による炎症と考えられた(写真20)。

3次元像では肋間を棒状異物が貫通していることが明瞭であった(写真21,22)。ただし造影C Tでの3次元像では、その周囲に血管が増殖していることが認められたため、外部から引き抜くことで大量出血を起こす可能性があること、また胃からの穿孔であるため、胃液の漏出などを考え、開腹手術の選択を決定した。

診断 誤飲した木製の棒が胃から肋間皮下に向かって穿孔し、周囲に炎症を起こした。飼主に確認したところ、耳矯正のために使用していた木製の棒であった。

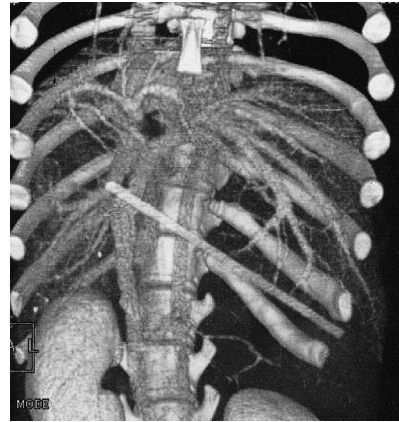


写真21 棒状異物の周囲に血管が増殖していた。

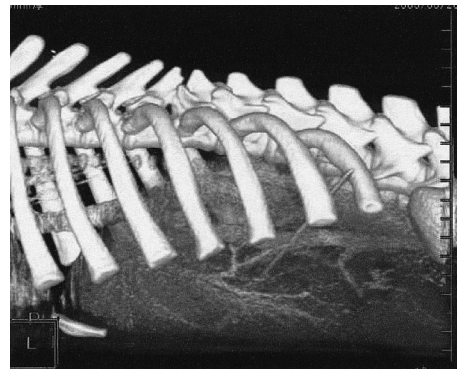


写真22 穿孔した棒状異物は肋骨を超えて皮下にまで達していた。



写真19 胃周囲にけばたち像が見られ、胸壁の腫張が見られた。

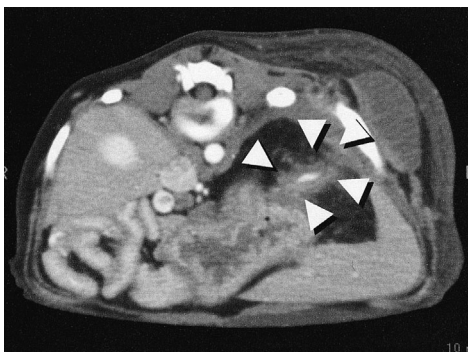


写真20 胃周囲のけばたち像が、造影後明瞭になった。

考 察

症例1において、このタイプの椎間板ヘルニアは、C T Mを実施しなくても単純C Tのみでの診断も可能であった。骨格系の形態診断について、空間分解能が向上しているもので、C T Mを行わなくても、また対象が小さい上、椎間板ヘルニアのタイプによっては描出のむつかしい小型犬においても再現性が高く描出された。

症例2において、肝臓内の腫瘍は、動脈相では造影剤の流入が見られ、高吸収として散見されたため、血流動体による肝内の腫瘍性病変の判断法¹⁾によって画像診断上転移または原発性の肝癌のタイプであることを示唆するものである。門脈から平行相撮像を3次元像を用いて形態診断することによって、実際には脾臓に発生した腫瘍であり、さらに腫瘍は破裂を起こしていることが明瞭に描出された。

症例3において、肝臓内に確認された腫瘍のは、門脈相・平衡相では低吸収として確認されたことから、血流の豊富な腫瘍(転移を含む)であることが示唆された。横断像だけでみれば脾臓の側面から発生しているので、脾臓の表面に隆起した巨大な腫瘍塊が示唆されるが、しかし内部は巨大な腫瘍であるのに中心部まで血流が十分

に保たれているのが不思議であった。また骨盤腔に左腎臓が移動していたことについては、通常脾臓の腫瘍では腎臓周囲に播種した場合を除き、腎臓が大きく移動することは考えられない。形態診断では門脈から平衡相にかけての3D像を作成した。脾臓は頭側に移動し胃の周囲に小さく存在していたため腹部の腫瘍は脾臓からの発生でないことが明らかであった。また左の腎臓はアキシャル横断像で確認したように、腫瘍によって骨盤腔まで移動していることがわかった。腹腔内に巨大なマスが存在すると、造影剤の再還流が遅くなり、通常より遅い時相での撮影が必要になってくると思われた。

症例4において、アキシャル像で「面」の画像において「点」を探すということは判断が難しいため、「点」を「線」に変える形態診断が有利になってくる。SDCTであればスキャン枚数と範囲が少ないため、異常箇所が判断できれば、その部位だけを薄く再撮影する必要がある。

症例5において、異物誤飲の症例の場合、動脈相は不要であり、画像は単純CTが判断しやすい。スライス厚が薄いので、再撮影が不要であると思われた。

症例2, 3などは超音波診断で腫瘍の存在診断は可能ではあるが、質的診断が大変困難である。症例3では、脾臓の腫瘍であると診断されてもおかしくない症例である。特にこのような巨大な腫瘍が存在する場合、血流状態が通常と異なり門脈からの血流の流入が著しく遅くなるため、造影剤注入量が一定では残念ながら造影効果の高い画像を得ることができない。

症例4は、アキシャルだけでの診断は困難であったが、3次元画像による形態診断を行うことによって直観的に判断することができた例である。

また、通常の撮像業務では異物を検索するために行っているわけではないため、仮に単純CTを省略してしまうと、簡単に判断ができる異物の3次元像も、周囲の組織の反応による造影増強効果によって逆に困難になるた

め、単純CTは撮像するべきと思われる。

また、症例1のように対象が小さい場合、より厚さを薄く撮像することで椎間などを分離することができるが、逆に線量を出す必要があり管球の負荷問題も考える必要があり、その装置に合わせた撮像方法が必要である。いずれにせよどの症例にしても、造影剤の投与は必須と考えられ、その投与方法はその症例ごとに変わるため一定にはなかなかしにくい、絶対に避けておれない問題である。また、形態診断においてはSDCTでもMDCTでも元画像が綺麗に撮れていないと、形態診断はその重ねあわせであるため、そこから発生する像は虚像になったり、十分に装置の機能を出せないまま汚い画になってしまうため、現実にはすべての症例が形態診断できるわけではない。したがってアキシャルを確実に撮像でき、尚且つその画像が最良の画像であるかを判断することができる読影能力が必要となる。

3次元画像による形態診断は見たまま直感できる診断法である。形態診断には、3以下のデータの収集が必要である。撮像範囲が広ければSDCTでは、関心領域をできるだけ薄いスライス厚で撮像する必要があるMDCTでは、より薄く短時間で撮像するために、また撮像でデータが豊富にあるため、複数相の質的診断のための、立体構築が可能である。ワークステーションを用いた形態診断法は予見することもなかった疾患が偶然に発見されるケースもあり、診断・治療・インフォームドコンセントに役立つ診断方法である。アキシャルデータの重ね合わせなので、撮像されていない像は、いくら操作しても出現することはない。診断精度の向上には、造影方法と装置の特性を十分に理解して実施することが重要であると思われた。

文 献

- 1) 市川智章編集：CT造影理論，医学書院：117-183，東京，(2004)

学校等における動物飼育の現状と問題点

石田 学 大原佳世子 土井 章三
居神 憲男 高橋 峰雄 松田 政明

(受付：平成17年1月20日)

Present status and problems of maintenance of animals at school

MANABU ISHIDA, KAYOKO OHARA, SHOSO DOI,
NORIO IGAMI, MINEO TAKAHASHI, and MASAAKI MATSUDA

Hiroshima Prefectural Animal Management and Welfare Center
8915-2, Minamigata, Hongo-cho, Toyota-gun, Hiroshima 729-0413

SUMMARY

For the appropriate maintenance of animals at school, we performed a questionnaire survey in a total of 209 institutions consisting of primary schools, kindergartens, and nursery schools.

Of the 209 institutions, 149 (76.4%) maintained certain types of animals. Rabbits were most frequently maintained (64.4%), followed in order by little birds (24.8%), and bantams (24.2%) (Multiple answers were allowed.) However, the total percentage of bantams, skillies, and chickens was 55.8%, and that of the entire fowl was 92.6%. Thus, the representative animals maintained at schools were rabbits and fowl, mainly chickens. None of the institutions maintained dogs or cats.

Concerning the management status of animals, only 36.5% of public institutions budgeted for fuel and treatment costs, and many institutions worried about the transmission of infection from animals to humans. Therefore, the Animal Management Center intends to take measures such as advice to the educational board and the production of a risk management manual for animal-derived infections.

要 約

学校飼育動物の適正飼育徹底を図ることを目的として、小学校、幼稚園、保育園計209施設に対してアンケート調査を実施した。

何らかの動物を飼っている施設の比率は調査対象の76.4% (149施設) であり、最も多く飼われていた動物 (複数回答) は、ウサギの64.4%、続いて小鳥 (24.8%)、チャボ (24.2%) の順であった。しかし、チャボ、ウコッケイ、ニワトリを合計した数値は55.8%、鳥類全体では92.6% となり、学校飼育動物の代表は、ウサギと、ニワトリを中心とした鳥類であった。イヌ、ネコを飼っている施設はなかった。

動物の管理状況では、飼育管理費や治療費を予算措置している公立の施設が36.5%と少ないこと、動物から人への病気の感染を心配する施設が多いことなどから、動物愛護センターとしては、教育委員会等への助言、動物由来感染症危機管理マニュアルの作成等の対策を実施したい。

序 文

平成16年1月、我が国で79年ぶりに高病原性鳥インフルエンザ（以下、鳥インフルエンザ）の発生が山口県内の養鶏場で確認され、その後、大分県では愛玩用として飼育されていたチャボの感染が確認された。このことをマスコミが大きく取り上げたせいも、鳥を飼育している人たちから行政機関に問い合わせがあり、なかでも、学校等からの問い合わせの中には、鳥の引取り依頼や感染予防に関するものが多くみられた。

文部科学省では、子どもたちの人格形成の一環として動植物の飼育を推奨しており、平成11年に発行した「小学校学習指導要領解説（生活編）」¹⁾の中では、“小動物の飼育に当たっては、管理や繁殖、施設や環境などについて配慮する必要がある”と明記されている。それにもかかわらず、今回の鳥インフルエンザの事例においては動物を飼育している教育現場（以下、学校等）から問い合わせが多く、学校飼育動物の管理に戸惑いのあることが伺われた。

そこで今回、学校等に対して動物の適正飼育の徹底を図るため、日頃からどのように動物を管理しているのか、その実態を調査するとともに問題点について検討したので報告する。

調査方法

- 1 調査対象：管内4市の209施設（図1）内訳：小学校（公立85）幼稚園（公立17、私立22）保育所（園）（公立67、私立18）
- 2 調査方法：アンケート用紙（無記名）の配布
- 3 実施時期：平成16年5月～7月
- 4 回収状況：195施設（回収率93.3%）

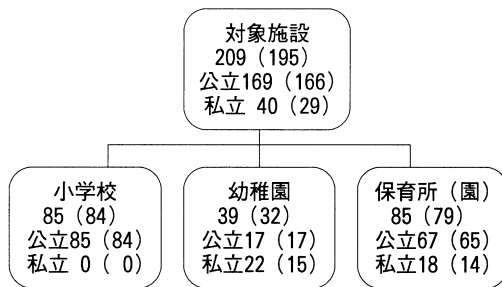


図1 アンケート配布（回収）状況

結 果

1. 飼育状況

全体の飼育率は76.4%（149施設）であり、施設別では、「小学校」86.9%、「幼稚園」84.4%、「保育所」62.0%であった（図2）。

2. 飼育していない理由（複数回答可）

「病気が心配」47.8%、「飼育場所が無い」37.0%という内容が多かった（図3）。

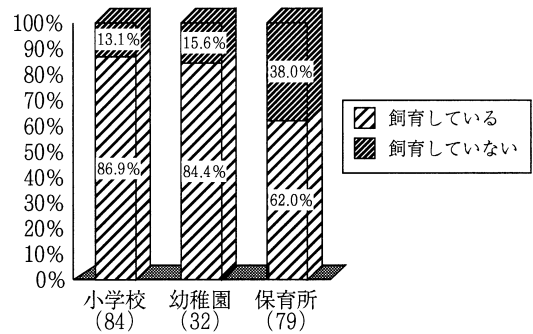


図2 施設別の飼育状況

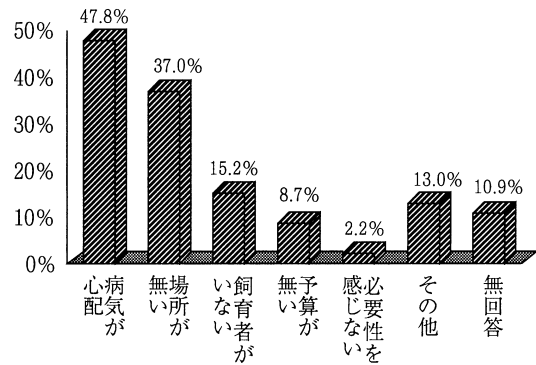


図3 飼育していない理由（複数回答可）

3. 飼育している動物の種類（複数回答可）

「兎」64.4%が最も多く、次いで「小鳥」24.8%、「チャボ」24.2%、「ウコッケイ」16.8%、「その他のいわゆるにわとり」14.8%の順であったが、これらの鶏種に小鳥を合わせた鳥類は92.6%となり、「兎」よりも多かった。また、「魚」は20.1%であった。一方「イヌ」、「ネコ」を飼育している施設は1件もなかった（図4）。

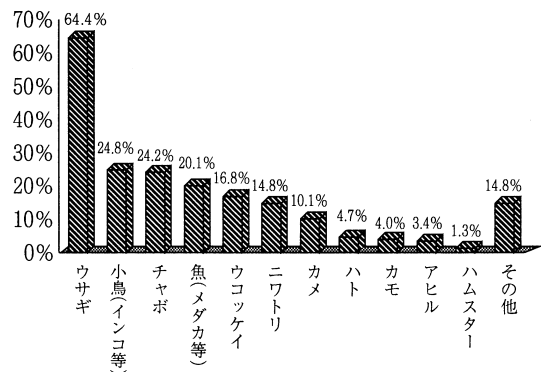


図4 飼育している動物種（複数回答可）

4. 動物の管理責任者

責任者を定めている施設は95施設（63.8%）で、そのうち、98.9%が「先生（職員）」であった。また、施設別では、「小学校」69.9%、「幼稚園」63.0%、「保育所」55.1%の割合で責任者を定めていた（図5）。

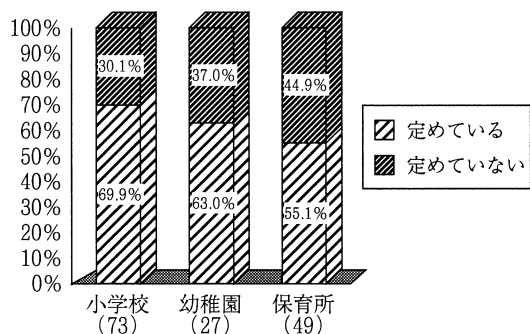


図5 動物の飼育管理責任者

5. 病気やケガをした時の対応（有効回答数138）

飼育動物が病気やけがをした場合は、「動物病院へ連れていく」46.4%が最も多く、次いで「自分で治療・処置する」18.8%、「特にしていない」14.5%、「獣医師に来てもらう」3.6%の順であった（図6）。

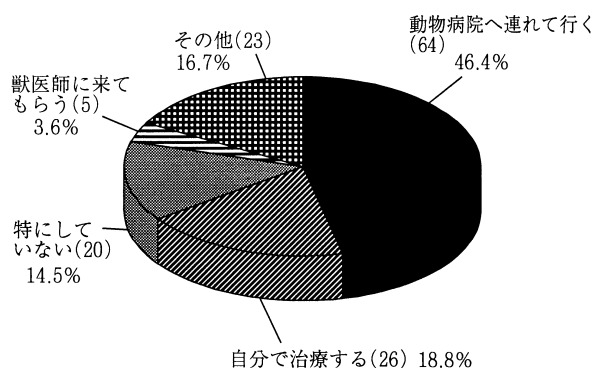


図6 病気やケガをした時の対応（有効回答数138）

そのうち、「特にしていない」と答えた施設の理由は、「予算が無い」30.0%が最も多く、次いで「自然の力で治すもの」25.0%、「人手が足りない」5.0%という順であった（図7）。

6. 飼育管理費や治療費等の予算（有効回答数144）

あらかじめ予算を組んでいる施設は、全体で58施設（40.3%）であり、準備していない施設の方が86施設（59.7%）と多かった。公立・私立別では、公立の施設が46施設（36.5%）しか治療費等を準備していないのに対し、私立の施設では12施設（66.7%）が準備していた（図8）。

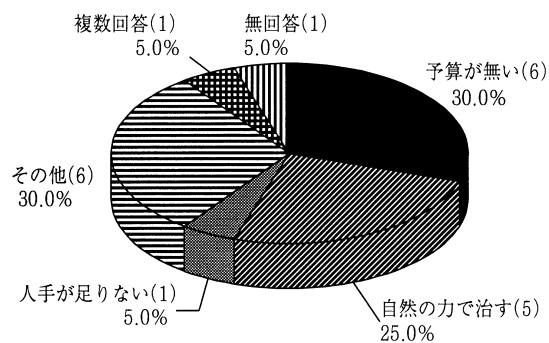


図7 病気やケガをした時に「特にしていない」理由（回答数20）

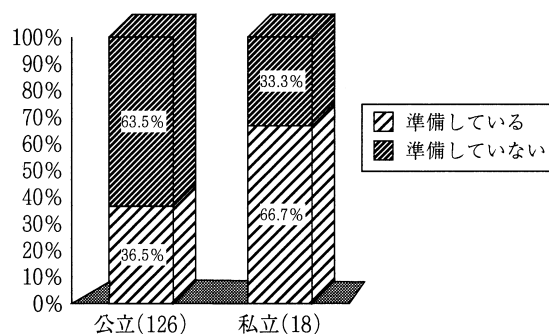


図8 飼育管理費・治療費等の予算（有効回答数=144）

7. 鳥インフルエンザ発生後の状況（鳥を飼育している施設のみ回答）

1) 問い合わせ内容（複数回答可）

鳥インフルエンザが発生して以降、保護者から問い合わせがあった施設は25施設（22.3%）で、その内容は、「子どもたちへ感染する恐れはないのか」64.0%、「施設内の他の鳥が感染する恐れはないのか」48.0%、「鳥を飼育しているのは誰なのか」36.0%、「鳥の飼育を廃止する予定はないのか」8.0%であった（図9）。

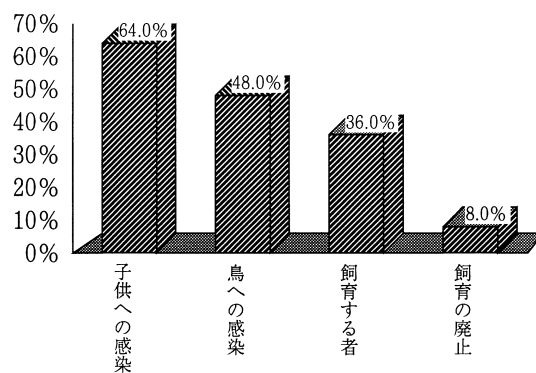


図9 鳥インフルエンザに関する問合せの内容（複数回答可）

2) 相談先 (複数回答可)

相談先については、「市担当課」60.0%、「行政機関」36.0%、「動物病院」12.0%、「その他」4.0%という順で多く、「どこへもしていない」施設が24.0%あった(図10).

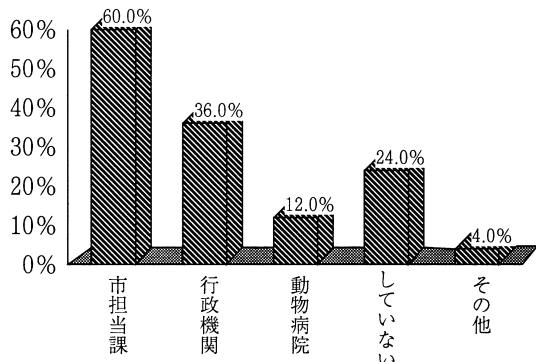


図10 鳥インフルエンザに関する相談先 (複数回答可)

3) 飼育方法の変更 (複数回答可)

鳥インフルエンザが発生して以降、飼育方法を変更した施設は96施設 (85.7%) あり、その半数以上の施設が「手洗いの励行」77.1%、「飼育者の変更」68.8%、「手袋の着用」55.2%、「施設の消毒」52.1%を行うようになった(図11).

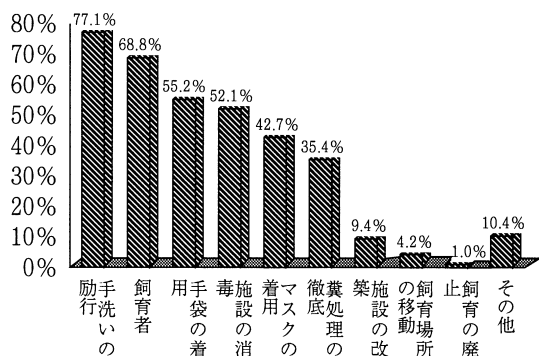


図11 飼育方法の変更内容 (複数回答可)

8. 学校飼育動物の意義

教育施設で動物を飼う必要があると考えている施設は164施設 (91.6%) で、必要性がないと考えている施設15施設 (8.4%) を大きく上回っていた。そのうち、「必要がある」と考えている施設の理由は、「命の尊さを教える」75.6%が最も多く、次いで「情操教育に役立つ」53.7%、「動物愛護精神を養う」45.7%という順であった(図12)。逆に、「必要性がない」と考えている施設の主な理由は、「飼育が大変」46.7%及び「予算が無い」26.7%であった(図13).

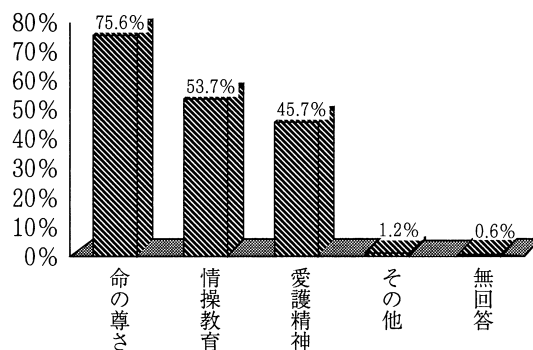


図12 動物を飼う必要性がある理由 (複数回答可)

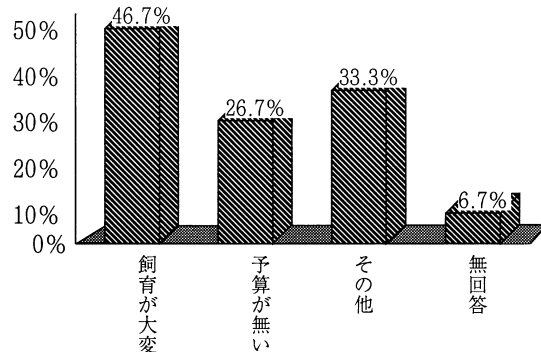


図13 動物を飼う必要性がない理由 (複数回答可)

9. 飼育に関する不安等 (複数回答可)

学校等で動物を飼育するにあたり、施設が抱えている主な不安や問題は、「動物の病気が人へ感染する心配」65.6%を筆頭に、「休日の飼育」60.5%、「飼育管理予算」32.3%、「動物の習性・飼い方」16.9%であった(図14).

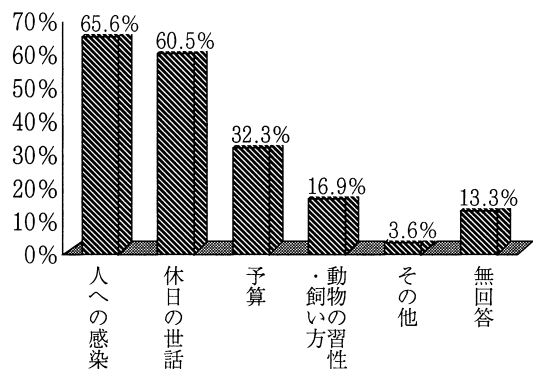


図14 動物の飼育で困っていること・不安に思うこと (複数回答可)

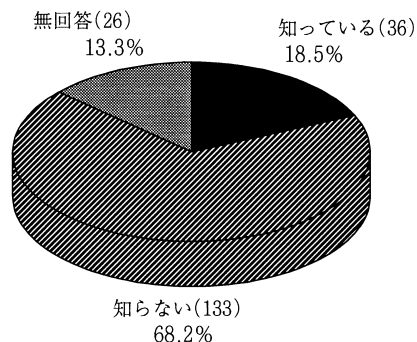


図15 「動物由来感染症」という言葉の認知度

10. 動物由来感染症²⁾

「動物由来感染症」という言葉を知っていると答えた施設は36施設 (18.5%)であった (図15)。

考 察

1. 調査結果から

学校等で動物を飼育することについては、子供たちに「命の尊さを教える」ことを一番の理由として、ほとんどの施設が肯定的に捉えている。しかしながら、飼育管理費や治療費等の予算を準備している施設は半数にも満たず、動物が病気やケガをした時の対応が考慮されていないというのが現実である。仮に、十分な「治療費等の予算が無い」ことを理由として、動物が病気やケガをしても適切な処置を行わず、「何もしない」ということになれば、本来の「命の尊さを教える」という目的から大きく外れてしまうばかりでなく、逆に、子供たちに「命を軽んじる」ような悪影響を与えてしまう恐れがある。

また、「動物由来感染症」という言葉を知っている施設は少ないが、「動物の病気が人へと感染する」ことに対して、警戒心を抱く施設は多かった。今回の鳥インフルエンザ発生事例をみても分かるように、マスコミによって「動物の病気が」大きく報道された途端、子供たちが

ら動物を遠ざけてしまおうという風潮が生まれたことは、「動物は危険なものである」という意識を植え付けてしまうことが憂慮される。

さらに、飼育管理費や治療費を準備していない、あるいは、動物の管理責任者を定めていない施設が予想以上に多く、動物の飼育管理に対する意識の低さが感じられた。

以上のことから、学校等で動物を飼育する本来の教育的意義を再認識するとともに、教育関係者並びに地域の獣医師会と連携して、学校飼育動物の適正な飼育を推進していく必要があると思われる。

2. 愛護センターとしての今後の対策

- (1) 教育委員会及び担当課等に対して助言・指導を行う。
 - 1) 動物由来感染症に対する危機管理マニュアルの作成。
 - 2) 動物を飼育している施設に対して、飼育管理責任者を定める。
 - 3) 飼育者の役割、休日等の飼育、動物が病気やけがをした場合等の対応マニュアルの作成。
- (2) 獣医師との連携強化を図る。
 - 1) 教育現場と地域の獣医師会との連携を図り、動物の適正飼育、治療及び相談体制の構築。
- (3) 各種講習会等を実施する。
 - 1) 適正飼育や動物由来感染症に関する講習会の実施。
 - 2) 動物愛護教室の一層の拡張と内容の充実。

参 考 文 献

- 1) 小学校学習指導要領解説 (生活編) : 文部省 平成11年5月31日
- 2) 福本幸夫 : 「人と動物の共通感染症対策」動物園獣医師の立場から、人と動物のより良い関係を考える、バイオサイエンスとダストリー, 63 (5) : 342~344 (2005)

マイクロプレートを用いた牛胆汁中の *Campylobacter* の定量と保菌状況について

栗原 健 岡田 麻由 児玉 実
佐伯 幸三 山岡 弘二

(受付：平成17年3月31日)

Research of *Campylobacter* in Cattle's Bile Using Microplates

TAKESHI KURIHARA, MAYU OKADA, MINORU KODAMA,
KOUZOU SAIKI, and KOJI YAMAOKA

Hiroshima City Meat Inspection Office,
1-11-1, Kusatsuko, Nishi-ku, Hiroshima 733-0832

SUMMARY

Using microplates, we studied the number and existence rate of *Campylobacter* in cattle's biles. This method saved us a lot of time, labor, and quantity of the broth, so that it helped us examine many more samples.

Castrated Holstein showed the highest existence rate of *Campylobacter*. And, younger cattle showed higher existence rate in general. And the cattle that have healthy livers showed higher existence rates. As for the number of *Campylobacter*, 10^5 or more per ml were isolated from more than half of the positive samples. And the numbers were larger in relatively younger cattle.

要 約

マイクロプレートを用いて、牛胆汁中のカンピロバクターの保菌状況ならびに定量法の検討をおこなった。本法により作業の手間や培地量を削減することができ、多数の検体の検査が可能であった。

カンピロバクターの分離率は、去勢ホルスタインで最も高く、年齢別では若い牛で高かった。また、肝臓に病変のみられる牛よりもむしろ、病変のみられない牛から多く分離された。菌数については、菌の分離された牛の半数以上が胆汁 1 mlあたり 10^5 個以上であり、比較的若い牛で菌数、分離率ともに高かった。

序 文

近年、カンピロバクターによる食中毒の発生件数は増加傾向にある。本菌はサルモネラや腸管出血性大腸菌とならんで発症菌量が少ない食中毒起因菌であり¹⁾、鶏肉や牛の肝臓から高率に分離されている。わが国では、牛

の肝臓を生で食する習慣があり、本菌による食中毒の危険性が懸念される。牛の肝臓の汚染源は胆汁であると考えられており²⁾、定性試験については多くの報告がなされているものの、定量試験については詳細な報告は少ない。その理由として、一般的な定量試験である MPN 法は、多くの試験管を必要とし検査が煩雑で手間がかかる

ことがあげられている³⁾。そこで今回、マイクロプレートを用いてMPN法の簡便化を試みるとともに、牛胆汁中の保菌状況についてとりまとめたので報告する。

材料と方法

平成14年11月から平成16年6月までに広島市と畜場に搬入された牛から無作為に採取した胆汁175検体を検査した。検体はと畜検査時に、胆のうから滅菌注射器で胆汁を採取し、カンピロバクターの保菌状況と胆汁1mlあたりの菌数を定量し、さらに肝臓病変との関連の有無を調べた。

はじめに、マイクロプレートを用いるにあたり、その有効性を検証するため、サルモネラ、大腸菌、黄色ブドウ球菌を用いて試験管法とマイクロプレート法によるMPN法の比較を行った。その後、牛胆汁中のカンピロバクターについて両法による比較検査を行った。カンピロバクターの比較に用いたのは採取175検体中35検体であり、それ以外の検体についてはマイクロプレート法のみで実施した。

試験管法では、胆汁を生理食塩水で、10倍段階希釈を行い、プレストン液体培地で胆汁1mlからの3管5系列で実施した。この試験管をガスパック用嫌気ジャーにいれ、キャンピパック (AnaeroPack Campylo 三菱ガス化学株式会社) で微好気状態にし、42℃、24時間増菌培養した。その後、スキロー寒天培地で、42℃、48時間分離培養し、各検体につき希釈倍率の高いものから2コロニーを同定した上で、発育の有無によりMPN値を求めた。

マイクロプレート法では、容量が2mlのディープウェルプレート (ディープウェルプレート カタログ No.278743 ナルジェヌンクインターナショナル株式会社) を用い、検体をプレストン液体培地で、10倍段階希釈を行い、胆汁の接種量が1ウェル中に1mlから10⁻⁵mlまでになるように調整し、3ウェル6系列で実施した (写真1)。ただし、検体量1mlについては、2倍濃度のプ

レストン液体培地1mlで調整した。このマイクロプレートを市販の密閉容器に入れ、キャンピパックで微好気状態にし、42℃、24時間培養した。さらに作業の簡便化をはかるため、マイクロプレートからスキロー寒天培地への塗布時に、短冊状に切った滅菌ろ紙を使って塗布した。こちらも各検体につき2コロニーについて同定を行った上で、発育の有無によりMPN値を求めた。

成績および考察

事前に行った試験管法とマイクロプレート法の比較では、各菌について両法の分離結果およびMPN値に差は認められなかった。このことより、マイクロプレートを用いたMPN法は有効な検査法であると考えられた。この結果を受け、牛胆汁中のカンピロバクターについて比較検討を行ったところ、両法とも35検体のうち16検体が陽性を示し両法の分離結果に差はみられなかった。全体では胆汁175検体のうち66検体が陽性を示し、分離率は37.7%であった。その内訳はホルスタインの去勢牛が最も高く、61検体中34検体、55.7%がカンピロバクター陽性であった (表1)。

表1 牛胆汁からの *Campylobacter* の分離率

		検体数	陽性数	分離率 (%)
合計		175	66	37.7
ホルスタイン	去勢	61	34	55.7
	メス	28	8	28.6
黒毛和種	去勢	6	3	50.0
	メス	27	3	11.1
交雑種	去勢	8	3	37.5
	メス	44	15	34.1
ジャージー	去勢	1	0	0

また、月齢別による保菌状況の比較では、25ヶ月齢以下の牛で50%以上の割合でカンピロバクターが分離され、中でも20~25ヶ月齢の牛は、40検体中23検体57.5%が陽性であった。一方、30ヶ月齢を超える牛の保菌率は低く、若い牛の保菌率の半分程度であった (図1)。

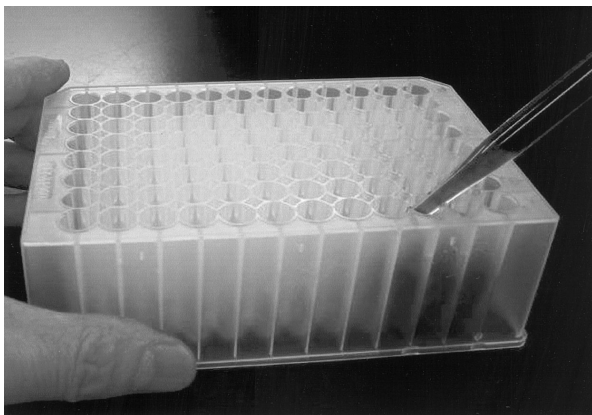


写真1 マイクロプレート法

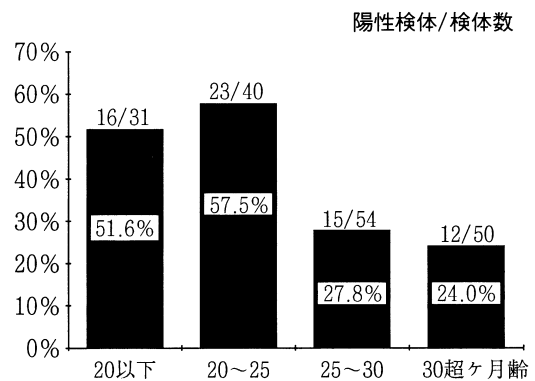


図1 月齢別による保菌状況

次に、定量値についての両法の比較では、全体的にマイクロプレート法のMPN値の方が少し高い傾向がみられた。マイクロプレート法によりMPN値の測定ができた60検体の菌数は予想以上に高く、全体の半数以上の31検体が胆汁1mlあたり 10^5 以上の菌数を示した(図2)。なかでも、 10^5 以上の菌数をもつ割合が高かった牛は、性別では去勢牛、品種別ではホルスタインであった。

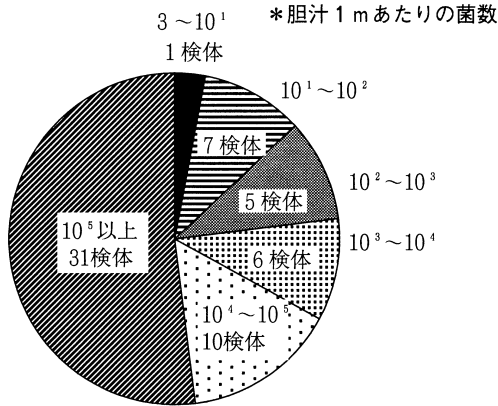


図2 陽性60検体中の菌数の割合

胆汁1mlあたり 10^5 以上の菌数を持つ割合を月齢別に比べると、最も高い割合で保菌していたのは、20~25ヶ月齢の牛で23検体中15検体、65%が 10^5 以上の菌数を保有し、比較的若い牛により高い菌数の保有が認められることが判明した(図3)。

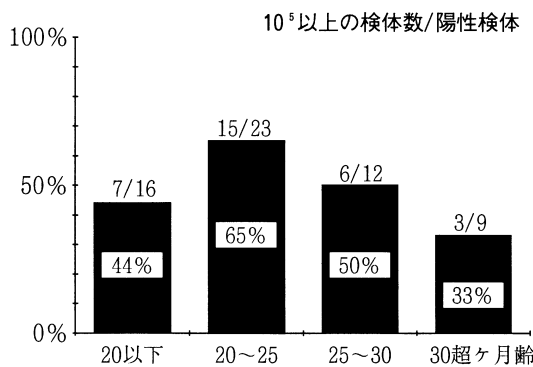


図3 10^5 以上の菌数をもつ月齢別による割合

菌が分離された牛の肝臓と病変との関係を調査した結果、肝臓に病変のみられないものに高い保菌率がみられ(表2)、マイクロプレート法による全検体のデータ(表3)とあわせて検討した結果、月齢が若く、病変のみられない、一般的に商品価値の高い肝臓の胆汁に保菌率および菌数がかえって高いという現象がみられた。

表2 *Campylobacter* の分離と病変との関係

病変	陽性検体数	陽性検体中の割合(%)
無し	24	36.5
肝出血	14	21.2
肝炎	9	13.6
肝膿瘍	7	10.6
鋸屑肝	7	10.6
その他	5	7.5
計	66	100

表3 胆汁175検体の内訳

		<3	$3 \sim 10^1$	$10^1 \sim 10^3$	$10^3 \sim 10^5$	10^5 以上
ホルスタイン	去勢 20ヶ月以下	14	1	4	4	7
	20~25ヶ月	10	0	0	3	11
	25~30ヶ月	3	0	1	1	2
メス	20~25ヶ月	1	0	1	0	0
	25~30ヶ月	2	0	0	0	1
	30ヶ月超	17	0	3 ^{注1)}	1	2
黒毛和種	去勢 25~30ヶ月齢	2	0	0	2	1
	30ヶ月超	1	0	0	0	0
	メス 20~25ヶ月	1	0	0	0	0
メス	25~30ヶ月	17	0	1	2 ^{注2)}	0
	30ヶ月超	6	0	0	0	0
	去勢 20~25ヶ月	2	0	0	1	2
交雑種	25~30ヶ月	3	0	0	0	0
	メス 20ヶ月以下	1	0	0	0	0
	20~25ヶ月	3	0	1	2	2
メス	25~30ヶ月	11	0	0	2 ^{注1)}	2
	30ヶ月超	14	0	3	2 ^{注1)}	1
	去勢 20~25ヶ月	1	0	0	0	0

注1) 10^3 以上のものを含む
注2) 10^4 以上のものを含む

今回、カンピロバクターの検査で用いたマイクロプレート法は試験管法と比較してMPN値が高く出るという結果がみられたが、これは事前の検査結果からも、手技によるものではなく、微好気条件に原因があると考えた。その理由として、当所では真空ガス置換装置ではなく、キャンピパックで微好気状態にしているため、試験管法の場合、試験管の内部までガスの置換が十分におこなえず、希釈の高いところでは発育がよくなかったのではないかと考えられた。また、42℃の培養温度に短時間で到達し、コントロールされやすかったのも、試験管法より、マイクロプレート法であったと思われる。

MPN法は従来から統計的に最も信頼のおける定量法として用いられているが、検査に手間がかかり、煩雑であることから多数の検体を処理するのは大変である。しかし、今回実施したマイクロプレート法は試験管を用いた場合と比較して、培地の量、培養スペースなどが大幅に少なくすむため、一度に多くの検体の検査が可能であり、有効な検査方法であると考えられる。また、ろ紙を用いて分離培地へ菌液塗布を行うことで、分離の手間と時間が節約できた。今後は、さらにカンピロバクターの迅速な検出法を検討するとともに、年齢による分離率の差の原因を追求したい。

文 献

- 1) 石井當次 : Bokin Bobai Vol.29, No.10, pp.667-673 (2001)
- 2) 杓木力晴ほか : 牛の肝臓等における *Campylobacter* 属汚染状況に関する研究, 平成15年度厚生科学研究費補助金 (厚生科学研究事業) 分担研究報告書 (2005)
- 3) 小野一晃ほか : MPN 法および直接平板塗抹法による市販鶏レバーのカンピロバクターの定量検査, 日獣会誌, 55, 447-449 (2002)

検食保存中におけるカンピロバクター の消長について

— 原因施設不明となったカンピロバクター食中毒事例再考 —

長澤 元¹⁾ 恩田かおる¹⁾ 田川 陽子¹⁾ 柳本 慎治¹⁾
久保 滋¹⁾ 石川 憲司¹⁾ 田組 善雄²⁾ 立脇 邦雄²⁾
瀬川 和幸²⁾ 中富美津江²⁾ 佐々木実己子²⁾

(受付：平成17年4月1日)

Changes in *Campylobacter* during storage of test food samples

— Re-evaluation of the case of *Campylobacter* food poisoning
showing an unclear causative institution —

HAJIME NAGASAWA¹⁾, KAORU ONDA¹⁾, YOUKO TAGAWA¹⁾, SHINJI YANAGIMOTO¹⁾,
SHIGERU KUBO¹⁾, KENSHI ISHIKAWA¹⁾, YOSHIO TAGUMI²⁾, KUNIO TATEWAKI²⁾,
KAZUYUKI SEGAWA²⁾, MITSUE NAKATOMI²⁾, and MIKIKO SASAKI²⁾

- 1) Higashi-hiroshima Regional Health Center, Hiroshima Prefectural
13-10, Saijo-syowamachi, Higashi-hiroshima, Hiroshima 739-0014
- 2) Hiroshima Regional Health Center, Hiroshima Prefecture
2-2-68, Sakurao, Hatsukaichi, Hiroshima 738-0004

SUMMARY

Though the incidence of *Campylobacter* food poisoning is high among food poisoning cases, the causative institution and food are often unidentifiable because most cases are sporadic, and the latency period is long. Concerning a reason for this, we speculated that the storage conditions (for ≥ 2 weeks at a temperature of $\leq -20^{\circ}\text{C}$) make *Campylobacter* survival difficult, and observed changes in *Campylobacter* under 4-stage storage conditions. *Campylobacter* was detected in all samples immediately after its addition, but its detection was difficult in samples after 3 days or 14 days.

要 約

カンピロバクター食中毒は食中毒事件の中で発生件数が最も多いにもかかわらず、ほとんどが散発性でありまた潜伏期間が長いこともあって、原因施設や原因食品を特定できない場合が多い。その理由の一つとして、我々は -20°C 以下で2週間以上保存という検食の保存条件が、検食中のカンピロバクターの生存を困難にしているのではないかと考え、4段階の保存条件を設定し各条件下におけるカンピロバクターの消長を観察した。結果は、カンピロバクターを添加した直後は全ての検体で検出されたが、3日及び14日間経過したものは検出が困難であった。

1) 広島県東広島地域保健所 (〒739-0014 東広島市西条昭和町 13-10)

2) 広島県広島地域保健所 (〒738-0004 廿日市市桜尾 2-2-68)

序 文

平成16年5月当保健所管内の小学校で修学旅行に参加した児童、教諭を患者とするカンピロバクター食中毒事件が発生した。患者の検便から高率にカンピロバクター・ジェジュニ（以下、「*C.jejuni*」）が検出されたが、利用した旅館を管轄とする自治体が行った検食の検査では本菌は検出されず、原因施設は特定できなかった。

我々は現行の検食の保存条件では *C.jejuni* を検出することは困難と考え、検食から菌が検出されなかったことを主な根拠として、この事件が原因施設不明とされたことに疑問を抱いた。

そこで、今回、副食にカンピロバクター等を添加し、これを検食として、保存温度、保存期間を変えた保存試験を実施し、検食保存中における *C.jejuni* の消長を観察し、若干の知見を得たので報告する。

実験方法

1 調査期間：平成16年6月～7月

2 検食の作成方法（表1）

検食の材料は、3種類の副食を使用した。各食材は検食の保存条件である50gに小分けし、それぞれに *C.jejuni* とベロ毒素非生産性大腸菌血清型O157（以下、「O157」）を添加し、表1のとおり、6種類の検食を作成した。なお、O157は対照とするため添加したものである。

3 検食の保存方法と保存期間

表1に示した①～⑥の6種類の検食をそれぞれ、以下の条件で保存した。

ア 添加直後

イ 4℃で3日間（72時間）

ウ -21℃で3日間（72時間）

エ -21℃で14日間（2週間）

なお、検食はア～エそれぞれ個別に作成、供試した。

4 検食の検査方法

6種類の検食を、上記3のア～エの4条件で保存後、次の検査を行った。

(1) *C.jejuni* の検査（定量法）

各検体をリン酸緩衝食塩液（PBS）で10倍、100倍、1000倍の3段階で10倍希釈し、各希釈ごとに0.1mlの希釈液をCCDA培地（ニッスイ）3枚にコンラージ株で塗布し、42℃で48時間微好気培養後典型的集落を計測し、検体1g当たりの菌数の最大値・中央値・最小値を算定した。

(2) *C.jejuni* の検査（定性法）

各検体をPBSで3倍希釈し、希釈液3ml（検体1g相当）をプレストン培地に添加し、42℃で24時間増菌後、CCDA培地に画線し、42℃で48時間培養後、典型的集落について位相差顕微鏡により、特徴的形態と運動性を確認し判定した。培養は増菌培養・分離培養のいずれも(1)と同様微好気条件で行った。

(3) O157の検査（定量法）

各検体を10倍希釈し、希釈液0.1mlをクロモアガーO157培地（関東化学）3枚に添加し、35℃で24時間培養後、藤色集落を計測し、検体1g当たりの菌数の最大値・中央値・最小値を算定した。

調査結果

1 ポテトサラダにおける *C.jejuni* 及びO157の検出状況（表2）

C.jejuni は 10^4 、 10^6 添加例ともに添加直後の場合のみ定量、定性の両検査法において検出されたが、それ以外では検出されなかった。添加直後の検体の定量検査では 10^4 の添加の場合、最大値が検出限界値の130/gであり、 10^6 の添加の場合、最大値が添加量の4分の1以下の4800/gであった。

O157は 10^4 の添加で定量のみ行なったが、-21℃14日間では検出されなかった。

表1 菌の添加量ごとに作成した6種類の検食

副食材料	滅菌袋への調整	検食の作成方法
ポテトサラダ	50g/袋	① <i>C.jejuni</i> (10^4 個)とO157 (10^4) 個を添加 ② <i>C.jejuni</i> (10^6 個)とO157 (10^4) 個を添加
鶏の唐揚げ	50g/袋	③ <i>C.jejuni</i> (10^4 個)とO157 (10^4) 個を添加 ④ <i>C.jejuni</i> (10^6 個)とO157 (10^4) 個を添加
野菜煮物	50g/袋	⑤ <i>C.jejuni</i> (10^4 個)とO157 (10^4) 個を添加 ⑥ <i>C.jejuni</i> (10^6 個)とO157 (10^4) 個を添加

表2 ポテトサラダの検査結果

保存条件	<i>C.jejuni</i> 定量（菌数/g）		<i>C.jejuni</i> 定性		O157定量（菌数/g）	
	10^4 添加	10^6 添加	10^4 添加	10^6 添加	10^4 添加	10^6 添加
添加直後	130・0・0	4800・3300・3300	+	+	750・630・500	380・380・250
4℃3日間	0・0・0	0・0・0	-	-	380・250・130	250・130・0
-21℃3日間	0・0・0	0・0・0	-	-	130・0・0	130・130・0
-21℃14日間	0・0・0	0・0・0	-	-	0・0・0	0・0・0

注1）定量法の検出限界値は130/g

注2）菌数は最適希釈倍率で測定した3枚の培地のコロニー数から算出した最大値・中央値・最小値を示す

表3 鶏の唐揚げの検査結果

保存条件	C.jejuni 定量 (菌数/g)		C.jejuni 定性		O157定量 (菌数/g)	
	10 ⁴ 添加	10 ⁶ 添加	10 ⁴ 添加	10 ⁶ 添加	10 ⁴ 添加	10 ⁶ 添加
添加直後	130・130・0	3300・2800・1600	+	+	380・250・0	380・250・130
4℃3日間	0・0・0	0・0・0	-	-	0・0・0	130・0・0
-21℃3日間	0・0・0	0・0・0	-	-	130・130・0	250・130・0
-21℃14日間	0・0・0	0・0・0	-	-	250・130・0	250・0・0

表4 野菜煮物の検査結果

保存条件	C.jejuni 定量 (菌数/g)		C.jejuni 定性		O157定量 (菌数/g)	
	10 ⁴ 添加	10 ⁶ 添加	10 ⁴ 添加	10 ⁶ 添加	10 ⁴ 添加	10 ⁶ 添加
添加直後	130・130・0	2900・2500・2500	+	+	250・130・0	130・130・130
4℃3日間	0・0・0	0・0・0	-	-	250・130・0	250・130・130
-21℃3日間	0・0・0	0・0・0	-	+	130・0・0	130・130・0
-21℃14日間	0・0・0	0・0・0	-	-	0・0・0	1300・0・0

2 鶏の唐揚げにおける C.jejuni 及び O157 の検出状況 (表3)

C.jejuni は 1 の場合と同様定量、定性試験とも添加直後のみ検出されたが、それ以外の検体では検出されなかった。

O157 は、C.jejuni を 10⁴ 添加した検体の 4℃3 日間では検出されなかった。

3 野菜煮物における C.jejuni 及び O157 の検出状況 (表4)

C.jejuni は添加直後のみ検出された。また、10⁶ 添加した -21℃3 日間保存の定性試験で検出された。

O157 は、C.jejuni を 10⁴ 添加した検体の -21℃14 日間では検出されなかった。

考 察

1 C.jejuni の検出状況結果について

(1) 今回の修学旅行の食中毒事件では、参加者74名中24名が発症しており、発症率は約32%であった。また、平成11年当所管内の小学校で発生した給食施設を原因施設とするカンピロバクターによる食中毒事件¹⁾では、330名中149名が発症し、発症率は約45%であった。両事件とも、発症率の高いことから、一部の食材の加熱不足によるものではなく、食材の二次汚染により、集団全体が菌の暴露を受けたものと考えられ、また両事件とも患者の検便から効率的に C.jejuni が検出されたにもかかわらず、検食からは検出されなかった。

(2) そのため、今回の実験は、上記(1)の事案の結果を踏まえ、C.jejuni の二次汚染のあった食材を作成し、C.jejuni の検出状況が保存条件によって、どのように変化するかを調査したものである。

また、食材によって検出状況が変化する可能性を考慮して、あえ物、揚物、煮物の3種類の食材を用いた。

(3) C.jejuni 添加直後は全ての検体で、定量法、定性法のどちらでも検出された。しかし、4℃3日間、-21℃3日間、-21℃14日間の保存条件では、ポテトサラダ、鶏の唐揚げの両検体とも、定量法、定性法のいずれからも検出されなかった。野菜煮物では、10⁴添加分については、各保存条件経過後、定量法、定性法のどちらとも検出されなかったが、10⁶添加分については、-21℃3日間の保存条件で定性法のみ検出された。これは当検体だけ、野菜煮物表面の微細な空洞に菌が入り込み、微好気状態となり生存したのではないかと推察された。

(4) 今回の結果では本菌の最小発症菌量²⁾から考えると、かなりの汚染菌量となる10⁶/50gの添加であっても、添加直後以降は検出が難しいことがわかった。

(5) 平成8年に厚生省が集団給食、仕出し屋等の施設において、検食の保存期間を「-20℃以下で2週間以上保存」とする通知³⁾を出している。その条件設定の妥当性を確認した研究として、カンピロバクターを接種した検体を-20℃で14日間冷凍保存した場合、1から2オーダー菌数が減少するものの、検食からの菌検出は可能との報告⁴⁾がある。しかし、この研究では菌接種直後に10⁶/g検出されていることから、かなりの量を接種したと考えられる。とすれば二次汚染の場合、この菌量は非現実的であり、この結果だけで、検食からカンピロバクターを検出できると判断するのは問題があると思われる。

(6) 今回の結果は、二次汚染を想定して検体を作成し

たため、食材の表面だけに菌を添加しており、冷凍による菌へのダメージだけでなく、保存期間中に袋内の空気に暴露され、菌が死滅したことも影響していると考えられた。

2 O157の検出状況結果について

添加直後、 -21°C 3日間の保存条件で全て検出された。 4°C 3日間の保存では、鶏の唐揚げの *C.jejuni* 10^4 添加分で検出されなかった。 -21°C 14日間の保存では、ポテトサラダと野菜煮物の *C.jejuni* 10^4 添加分で検出されなかった。

今回のO157の添加量は定量法での検出限界値にほぼ近く、 -21°C 14日間の保存で検出できなかった食材も一部に見られたが、大部分の検体からの検出状況は良好であり、添加菌量を増やすか、培養条件を変更すれば検出可能と推定され、これらの結果から「 -20°C 以下で2週間以上保存」という検食の保存条件は妥当と思われた。

3 修学旅行で発生したカンピロバクター集団食中毒について

今回の事件では、参加者は他府県の2市3施設で食事をしていたが、そのうちA市の2施設は、他に多くの利用者がいたにもかかわらず同様の苦情がなく、原因施設である可能性は低いと考えられた。

一方のB市の1施設は旅館であり、修学旅行参加者の利用日には他に利用者がおらず、この施設が原因施設の可能性が高かったが、B市の担当部局は検食の検査で食中毒菌が検出されなかったことを理由に、この施設が原因施設の疑いがあるものの、断定するには至らなかったと報告している。しかし、今回の実験から、検食からのカンピロバクターの検出は容易でないことが示唆されることから、原因追求には疫学調査が最重要となるものと考えられる。

ま と め

1 今回の調査では、3種類の副食に *C.jejuni* 菌を添加

し検食を調整した。これらの保存試験を行い、同菌の検出を試みたが、副食の種類による検出状況に差は認められなかった。

2 この保存試験では、 10^6 添加した野菜煮物を除き、添加直後にのみ検出された。カンピロバクター食中毒の潜伏期間は2～7日であることから、食中毒の発生時点で、検食を検査しても本菌を検出することは非常に困難であると考えられる。

3 カンピロバクター食中毒については、発症可能な菌量と、検査で検出可能な菌量に差があることから、今後は、脱酸素剤等を用いた検食の保存、検査に用いる検体量の増量、検体からの回収率を高める増菌方法の検討など、検食の保存方法や検査法の見直しも必要と思われる。

4 今回の食中毒事件のように、検食から食中毒起因菌の検出が困難であり、かつ調査対象施設が複数の他都道府県に存在する場合、疫学調査が最重要であるため、事件の概要と、調査自治体からの疫学調査結果を各自治体が共有し、それらから総合的に原因施設を判断する必要があると考える。

参 考 文 献

- 1) 広島県福祉保健部環境衛生課：主な食中毒事件（有症者30人以上及び死者が発生したもの）、環境衛生業務概況平成11年度、43（2000）
- 2) 厚生省生活衛生局食品保健課ほか監修：食中毒予防必携、初版、54、社団法人日本食品衛生協会、東京（1998）
- 3) 厚生省：食中毒事件の原因究明のための徹底事項について（平成8年7月25日（1996）生活衛生局長通知）
- 4) 小沼博隆：食材の条件と病原菌数の変動等に関する研究、食品衛生研究Vol.47（10）：67～77（1997）

リアルタイムPCRおよびSSCP法を用いた志賀毒素 STX 1 , STX 2 の毒素型別・遺伝子型別に関する研究

古田 喜美 下村 佳 石村 勝之
吉野谷 進 谷口 正昭 萱島 隆之
河本 秀一 松本 勝 荻野 武雄

(受付：平成17年4月1日)

Development of the Toxin-Typing and Genotyping of Shiga Toxins (Stx1, Stx2) by Real-Time PCR and Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP) Analysis

KIMI FURUTA, KEI SHIMOMURA, KATSUYUKI ISHIMURA,
SUSUMU YOSHINOTANI, MASAOKI TANIGUCHI, TAKAYUKI KAYASHIMA,
HIDEKAZU KAWAMOTO, MASARU MATSUMOTO, and TAKEO OGINO

Hiroshima City Institute of Public Health
4-1-2, Shoko-center, Nishi-ku, Hiroshima 733-8650

SUMMARY

We evaluated melting point temperature (T_m) curve analysis following by real-time PCR with a Light Cycler (Roche) and single-strand conformation polymorphism (SSCP) electrophoresis analysis for toxin-typing and genotyping of Shiga toxin (STX) in *Escherichia coli* clinical isolates. DNAs extracted from 28 STX-producing *Escherichia coli* (STEC) strains were amplified by real-time PCR with a MK primer-pair, which targeted common nucleotide sequences between *stx1* and *stx2* genes. By T_m curve analysis, all STX1-producing strains tested showed the similar peak at about T_m value 82°C. All STX2-producing strains except STX2e-producing strains showed the similar peak at about T_m value 83.5°C. STX2e-producing strains showed the peak at T_m value 81.0°C. STX1 and STX2-producing strains showed the two peaks corresponded with those of STX1 of STX2-producing strains. DNA amplified from the plasmids that were inserted each of PCR amplicons of the five different STX genes showed the similar peaks with those from parent STEC strains. By SSCP analysis of the real-time PCR amplicons, electrophoretic patterns of *stx1* and *stx2* genes were clearly different. All SSCP patterns of *stx1* PCR amplicons tested were identical. The patterns of *stx2* were divided into four different patterns. Differentiation by the SSCP patterns consisted with the nucleotide sequence results. These results indicate that the T_m curve analysis following real-time PCR with a MK primer-pair and SSCP analysis of the PCR amplicons are useful for toxin-typing of genotyping of STEC clinical isolates, respectively.

要 約

腸管出血性大腸菌感染事例から分離された志賀毒素 (STX) 産生菌28株の *stx* 遺伝子について Light Cycler™ (Roche) を用いたリアルタイムPCR の Tm 値解析により毒素型別と Single-strand conformation polymorphism (SSCP) 電気泳動解析による遺伝子型別の検討を行った。MKプライマーを用いてPCR増幅した *stx 1* および *stx 2* の共通領域の Tm 値解析の結果、STX 1 産生株は82.0℃付近に1峰性のピークを示し、STX 2 産生株は、STX2e 産生の OUT:H-1 株の81.0℃を除き83.5℃付近に1峰性のピークを示した。一方、STX 1 および STX 2 産生株は、2峰性のピークを確認できた。リアルタイムPCR増幅産物を用いたSSCP電気泳動解析の結果、STX 1 および STX 2 産生株の間に泳動像の明瞭な差が認められ、STX 2 産生株には4種類のパターンがみられた。泳動バンドの遺伝子配列を調べた結果、*stx 1* の配列は1種類のみ、*stx 2* は4種類の塩基配列を示し、SSCP電気泳動パターンの違いは塩基配列の違いと一致した。塩基配列の異なった5種類の *stx* 断片を組み込んだプラスミドを作製し、リアルタイムPCRの Tm 値の比較を行った結果、DNAのGC含量が高い順に Tm 値も高値を示した。以上の結果から、MKプライマーを使用したリアルタイムPCR-Tm 値解析は、STX産生性株における *stx 1* および *stx 2* 遺伝子の毒素型別において、SSCP法は遺伝子型別において有用な検査法と考えられた。

序 文

腸管出血性大腸菌感染事例では、分離菌株の志賀毒素 (STX) 産生性の確認が必要である。また、迅速性も求められることから、当所ではPCR法による志賀毒素遺伝子 (*stx*) 検出とイミュノクロマトグラフィーキットを使用したSTX毒素検出を多用してきた。STXには大別してSTX 1、STX 2の2種類の毒素があり¹⁻³⁾、その遺伝子 *stx 1*、*stx 2* の塩基配列は、*stx 2* においては、*stx 2 c*、*stx 2 d*、*stx 2 e*、*stx 2 f*、*stx 2 g* に分類され⁴⁻⁹⁾、部分的配列の異なったバリエーションが存在していることが知られている。山本らは、Light Cycler™ (Roche) を用いた迅速検出と *stx 1* および *stx 2* 遺伝子型別の検討を行い、リアルタイムPCR法の有用性を示唆した¹⁰⁾。そこで、今回の研究では、リアルタイムPCR法による Tm 値解析および Single-strand conformation polymorphism (SSCP) 法の *stx* 解析の有用性を、臨床分離株から得られたPCR産物およびそれらを導入したプラスミドの塩基配列の解析を行い、検討した。その結果、これらの方法論の有効性を示す結果が得られたので報告する。

材料と方法

1. 使用機器

リアルタイムPCRにはLight Cycler™ (Roche) を、SSCP電気泳動法には、Gene Amp PCR System 2400-R (Perkin Elmer) と電気泳動装置SEA-2000 (Elechrom) を、塩基配列解析にはABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) を用いた。

2. 材料

1) 供試菌株

他都市から分与された10株および当衛生研究所で分離された18株の計28株の腸管出血性大腸菌 (STX 1 産生 2 株、STX 2 c、STX 2 e 産生の 4 株を含んだ STX 2 産生株 9 株、STX 1、2 産生株 17 株) を用いた。なお、血清群は、O157 19 株、O26 3 株、O111 2 株、OUT 4 株である。

2) プライマー

プライマーは通常検査に使用している STX 1 および STX 2 遺伝子の共通領域を増幅させるMKプライマー¹¹⁾ (MK-1: TTTACGATAGACTTCTCGAC, MK-2: CATATAAATTATTTTCGCTC) を用いた。

3. リアルタイム PCR 法

供試菌を蒸留水にけん濁させ、10分間煮沸し、遠心分離した上清を鋳型 DNA テンプレートとした。Light Cycler FastStart DNA Master SYBR Green I (Roche) と MK プライマーを用いて、1 検体あたりの反応液を、25mM MgCl₂ 2.4 μl (最終濃度 4 mM)、25 μM MK-1 プライマー 0.1 μl、25 μM MK-2 プライマー 0.1 μl、LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I Mix 2.0 μl、精製水 10.2 μl、およびテンプレート 2.0 μl として調製した。

反応条件は、初期変性を 95℃、10 分行った後、変性 95℃、15 秒、アニーリング 51℃、5 秒、伸張反応 72℃、16 秒とし、この 3 ステップを 35 サイクル行った。蛍光の測定は伸張反応後に行った。融解曲線分析は上昇開始温度を 60℃とし、15 秒ごとに 1℃上昇するように設定した。PCR 反応時には、対照として、O157:H7 堺株^{12,13)} の *stx 1* および *stx 2* 遺伝子断片を組み込んだプラスミドを同時に反応させた。

4. SSCP 電気泳動分析¹⁴⁻¹⁶⁾

リアルタイムPCRで増幅した遺伝子産物を使用し、

変性緩衝液 (0.25% bromophenol blue 加 formamide 990 μ l) に使用直前に 1 M NaOH を 10 μ l 加えたものをチューブに 10 μ l 入れ、さらに等量の PCR 産物を加え、混合した。混合液を Gene Amp PCR System 2400-R で 95 $^{\circ}$ C 5 分間加熱後、氷上で急冷させ 10 分以上放置した。その後、50% glycerol 5 μ l を加えて混合した後、9 $^{\circ}$ C に設定した 0.75 \times TAE 電気泳動槽を使用し、ポリアクリルアミドゲル (150-300bp 用, エムエス テクノシステムズ) で泳動した。電圧を 60 V (5 V/cm) に設定し約 5 時間電気泳動を行った。DNA 染色液は SYBR Gold 10 μ l を 0.75 \times TAE 100ml に加え 1 万倍希釈したものを用いた。ゲルを染色液に浸し、37 $^{\circ}$ C の暗所で 40 分間染色した。染色後、SYBR フィルターを使用し、254nm の紫外線照射下で写真撮影を行った。

5. 塩基配列の決定

SSCP 電気泳動で得られた DNA バンドをゲルから切り出し、DNA 抽出キットを用いて DNA を回収した。抽出 DNA を、MK プライマーを用いて PCR 増幅し、BigDyeTM Terminator Cycle Sequencing ready Reaction Kit (Applied Biosystems) を用いてシーケンス反応を行った。反応後、Auto SeqTM G-50 (Amersham Biosciences) で DNA 精製を行った後、ABI PRISMTM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) により塩基配列の解析を行った。

6. 5 種類の STX 遺伝子を組み込んだプラスミドの作製

(1) 増幅産物のプラスミドへの組み込み

シーケンス解析で異なる配列を示した *stx1*, *stx2* の増幅産物をプラスミドベクターである pGEM-T vector System I (promega) に 16 $^{\circ}$ C, 24 時間反応

させ、組み込んだ。

(2) 大腸菌への導入

JM109 Z-competent cell (フナコシ) 100 μ l に *stx* 増幅 DNA 組み込みプラスミド 4 μ l を加え、氷上で 1 時間静置した。その後、SOC medium 1 ml を加えて、37 $^{\circ}$ C, 1 時間振盪培養した。培養後の菌液 100 μ l に IPTG (Promega) 5 μ l と X-gal (フナコシ) 10 μ l を加え、LB 寒天培地 (ダイゴ) 100ml に 20mg/ml アンピシリン溶液 200 μ l を加えた平板に菌液を広げ、37 $^{\circ}$ C, 24 時間培養した。生えてきた白色コロニーを釣菌し、内部プライマーチェックで確認後、プラスミドの抽出を行った。

(3) リアルタイム PCR 反応による Tm 値の測定

抽出したプラスミド (*stx1*, *stx2* (4 種)) の 5 検体をリアルタイム PCR 反応にかけ、Tm 値の測定を行った。

成 績

1. リアルタイム PCR の *stx1* および *stx2* の Tm 値の測定結果

Tm 値解析で得られた融解曲線を図 1 に示した。Tm 値は、*stx1* および *stx2* で異なっており、*stx1* は、平均 82 $^{\circ}$ C で 1 峰性のピークを示し、*stx2* は、OUT:H-株を除くと平均 83.5 $^{\circ}$ C で 1 峰性のピークを示した。また、*stx1* および *stx2* 両毒素産生株においては、それぞれの陽性コントロールの温度付近に 2 峰性のピークを示した。

また、分与された STX2e 産生株と OUT:H-株は、STX 2 産生性を示すものの、その Tm 値は 81.1 $^{\circ}$ C と他の STX 2 産生株よりも低い温度であった。

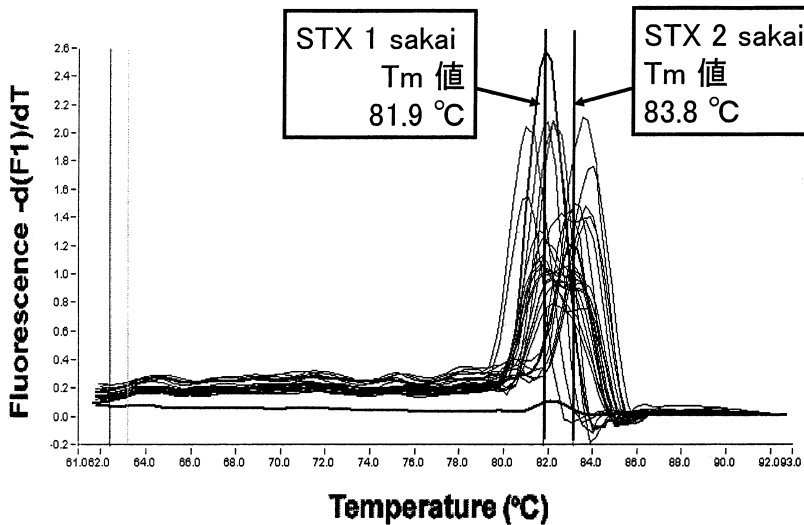


図 1 リアルタイム PCR による志賀毒素型別結果

2. PCR 産物の SSCP 解析

PCR 増幅産物の遺伝子多型分析を行うために SSCP 電気泳動を行った (写真 1)。STX 1 単独産生株 (写真 1, レーン 6) 株は見かけ上約 100~200bp 付近に, STX 2 単独産生株 (写真 1, レーン 2, 8, 10) は約 200~600bp 付近にバンドがみられた。一方, STX 1, STX 2 産生株は (写真 1, レーン 1, 3, 4, 5, 7, 9, 11) は, STX 1 単独産生株のバンドの位置および 300~500 bp 付近にバンドがみられた。すなわち, STX 1 産生株はすべて約 100~200bp 付近の同一位置にバンドがみられ, STX 2 産生株はそれより高分子量側にバンドがみられたことから, 約 100~200 bp 付近のバンドが *stx 1* 増幅産物であり, それより高分子側の約 200~600bp の位置にみられたバンドが *stx 2* 増幅産物であると考えられた (後述の塩基配列解析により確定)。

stx 2 増幅産物についてみると, 泳動パターンは約 300~450bp (写真 1, レーン 2, 4, 8), 約 250bp 前後 (写真 1, レーン 3, 7, 9), 約 350~500bp (写真 1, レーン 3, 7, 10, 11), 約 350~550bp (写真 1, レーン 1, 5) の異なる位置にバンドがみられ, 4 種類に分類された。また, 写真 1 のレーン 3 とレーン 7 に示す株は, レーン 9 の株のバンドとレーン 11 の株のバンドの両方のバンドがみられた。

以上より, *stx 1* 増幅産物は 1 種類, *stx 2* 増幅産物は 4 種類の SSCP 泳動パターンに分類され, STX 2 産生株の中には, 2 種類の異なる *stx 2* 増幅産物の SSCP パターンを持つ株が認められた。

3. SSCP の泳動バンドのシーケンス解析結果

SSCP 解析によって得られた泳動パターンの違いが増幅産物の塩基配列の違い

を反映しているかを確かめるために, ゲルから DNA を抽出し, 各バンドの塩基配列を決定した (図 2)。STX 1 産生株の約 100~200bp のバンドの塩基配列は, すべて堺株 *stx 1* の配列と一致した。

STX 2 産生株では, 写真 2 の 2-1 のバンドは堺株 *stx 2* と同じ塩基配列, 2-2 のバンドは堺株と 1 塩基異なる配列, 2-3 のバンドは 2 塩基異なる配列, 2-4 のバンドは 20 塩基異なる配列を示した (写真 2)。すなわち, 異なる泳動パターンから得られたバンドの塩基配列は異なり, 同じ泳動パターンから得られたバンドの塩基配列は同じであった。また, 泳動パターンを 2 種類

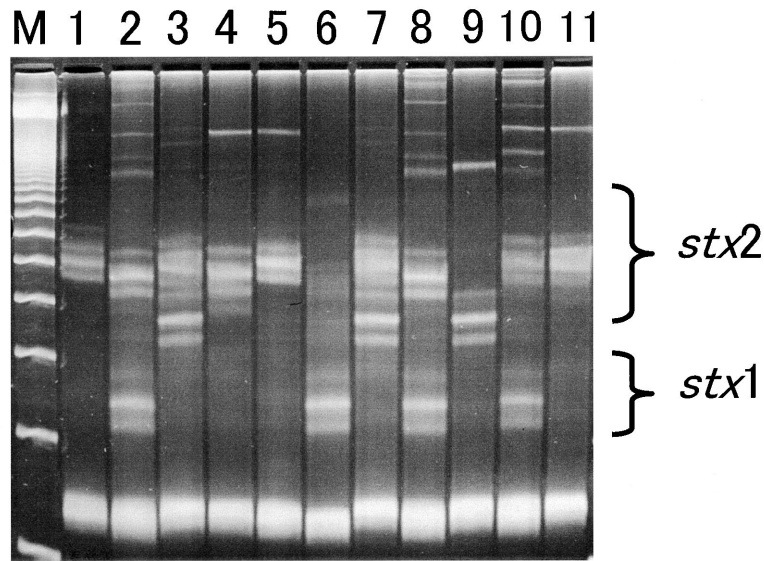


写真 1 増幅 *stx 1*, 2 の SSCP 電気泳動パターン

堺株 <i>stx 2</i>	ccaacaaagt t at gt ct ct t cgt t aaat agt at acggacagagat at cga
<i>stx 2</i> -dif 1a.....
<i>stx 2</i> -dif 2	t.....a.....
<i>stx 2</i> -dif20	t.....a.....c.....
堺株 <i>stx 1</i>	tgc.a.g.cg.....aga....c.g...gtc...ct.t.ca...ggt.
堺株 <i>stx 2</i>	cccctcttgaacat at at ct caggggaccacat cggtgtctgtt attaac
<i>stx 2</i> -dif 1
<i>stx 2</i> -dif 2
<i>stx 2</i> -dif20ag.t.....a..c.....t
堺株 <i>stx 1</i>	.t..at.ac.gac...t..atca..aggt..g..tt.actga.g...g.t
堺株 <i>stx 2</i>	cacaccccaccgggcagt t at t t t gct gt ggat at acgagggt gat gt
<i>stx 2</i> -dif 1
<i>stx 2</i> -dif 2
<i>stx 2</i> -dif20	.t..a....a..a....a..t.c..a.g.....
堺株 <i>stx 1</i>	agtgg.a.gg..at.a..tg....a..t...g.ca....a.a...cc
堺株 <i>stx 2</i>	ct at caggcgcgt t t t gaccat ct t cgt ct gatt att
<i>stx 2</i> -dif 1
<i>stx 2</i> -dif 2
<i>stx 2</i> -dif20	t.....a.....
堺株 <i>stx 1</i>	ag.gg.a.g...g...a.ta....a..g..t...g..

図 2 SSCP 泳動バンドの塩基配列解析結果

持つ株(写真2, レーン3, 7)からはそれぞれの泳動パターンに対応する2種類の異なる塩基配列が得られた。以上の結果から, SSCP電気泳動による分類と塩基配列の違いは完全に一致した。

得られた塩基配列をすでに報告されている *stx* 遺伝子の配列と比較した結果, 増幅遺伝子領域において, 堺株と2塩基異なる配列は *stx 2 c* の配列と, 20塩基異なる配列は *stx2e* の配列と一致した。

4. *stx* 遺伝子を組み込んだ5種類のプラスミドの Tm 値解析

遺伝子配列解析で得られた配列の異なる遺伝子産物を組み込んだ5種類のプラスミドの Tm 値解析の結果を図3に示した。堺株 *stx 1* 配列遺伝子組み込みプラスミドの Tm 値は, 81.9℃であったのに対し, 堺株 *stx 2* は, 83.8℃, 堺株 *stx 2* と1塩基異なる Tm 値は83.9℃, 堺株 *stx 2* と2塩基異なる Tm 値は84.2℃であった。

一方, *stx 2* 堺株と20塩基異なる Tm 値は, 他の *stx 2* より低い81.0℃であった。これらの結果は, プラスミドに組み込んだDNAを持つ親株から直接DNAを抽出し, PCR増幅-Tm値解析を行った結果と, ほぼ一致した。

5. 供試STX産生性腸管出血性大腸菌の血清群, 毒素型, SSCP遺伝子型, および *stx* 増幅部位の塩基配列

供試したSTX産生性腸管出血性大腸菌28株の血清型, リアルタイムPCR-Tm値解析による毒素型別, SSCP遺伝子

型, および *stx* 増幅部位の塩基配列の解析結果を表1に示した。O157分離株17株のうち, 12株(70.6%)はSTX1, STX2産生性で, *stx 2* のSSCP遺伝子型は2-1, 増幅部位の塩基配列は堺株と同じ配列であった。

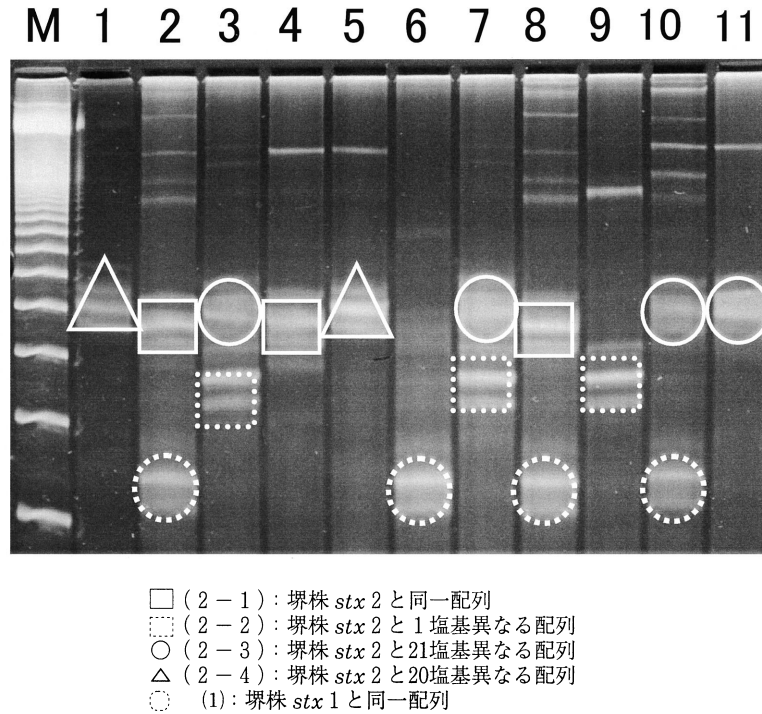


写真2 泳動像と塩基配列の関係

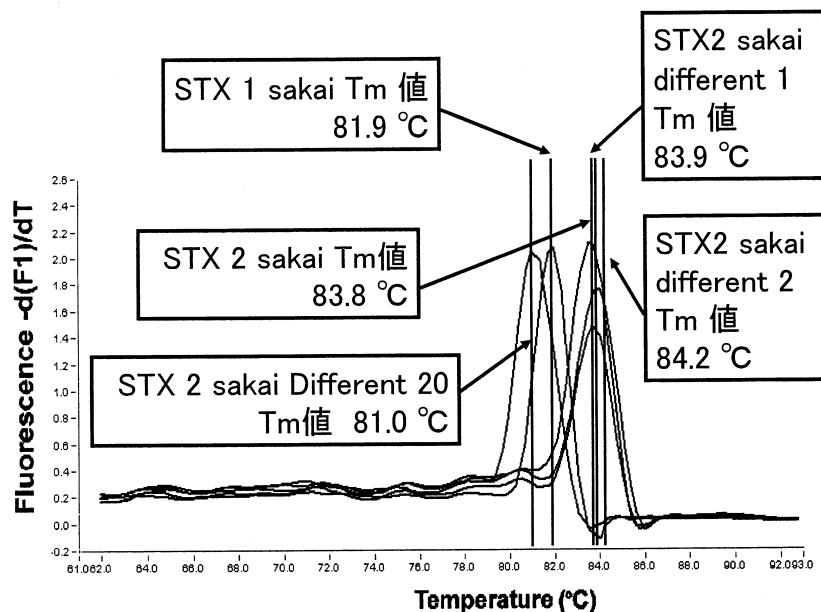


図3 *stx* 遺伝子導入プラスミドの Tm 値の比較

表 1 供試菌株の *stx1*, *stx2* 毒素型別と遺伝子型別

血清群 (株数)	リアルタイム PCR 毒素型別	SSCP 遺伝子型	堺 <i>stx1</i>	堺 <i>stx2</i>	<i>stx2</i> 1bp	<i>stx2</i> 2bp	<i>stx</i> Out
O26 (2)	1	1	○				
O26 (1)	1, 2	1 2-1	○	○			
O111 (2)	1, 2	1 2-1	○	○			
O157 (12)	1, 2	1 2-1	○	○			○
O157 (1)	1, 2	1 2-3	○				
O157 (1)	2	2-2		○	○		
O157 (1)	2	2-1 2-2			○	○	
O157 (2)	2	2-2 2-3			○		
Out (2)	2 (Out)	2-4					○
STX 2c産生O157 (1)			○			○	
STX 2c産生O157 (1)						○	
STX 2c産生Out (2)							○

考 察

リアルタイムPCR法を用いた腸管出血性大腸菌の *stx1* および *stx2* 遺伝子型別は、バリエーションを含めた *stx1* および *stx2* のそれぞれの遺伝子に特異的なプライマーを使用して行った報告が多い¹⁷⁻¹⁹⁾。一方、山本ら¹⁰⁾は、当衛生研究所で通常検査に使用している *stx1* および *stx2* 共通プライマーである MK プライマーを使用したリアルタイムPCR法により、*stx1* および *stx2* 遺伝子の毒素型別の基礎的検討を行った。今回、MK プライマーを使用して得られたリアルタイムPCR法による *stx1* および *stx2* の遺伝子型別結果は、山本らが行った結果と同様で、*stx1* および *stx2* の Tm 値の異なるピークを再確認することができた。その Tm 値は、*stx1* は、平均82.0℃であったが、*stx2* は、Tm 値が81.0℃の OUT:H-の株を除くと、平均83.5℃であった。さらに、堺株の *stx* を組み込んだプラスミドの Tm 値は81.9℃、*stx2* プラスミドは83.8℃であり、供試菌株の煮沸テンプレートと同様の Tm 値を示した。これらのことから、この堺株の MK プライマー増幅遺伝子領域を組み込んだプラスミドは陽性コントロールとして使用できると考えられた。一方、OUT:H-株に関しては、*stx2* プラスミドの示す Tm 値と比較して、2.4℃低い温度を示し、*stx1* プラスミドの Tm 値に近い。Tm 値判定のみでは、*stx1* との区別において判定を誤る可能性があると考えられた。しかし、STX 2 産生 OUT:H-株は、*stx2e* 遺伝子を保有しており、豚の浮腫病における大腸菌感染症から多く検出されるものの、ヒトからの検出は稀であることが報告されている⁷⁾。従って、このような場合は、分離株の血清型別に注意し、免疫クロマトグラフィーなどの毒素タンパク検出を併用することで、STX 2 産生性を確認できると考えられる。

SSCP 電気泳動解析では、STX 1 産生性、STX 2 産生株、STX 1 および STX 2 産生株間において、STX 1 産

生株の泳動像は、低分子側に位置しているのに対し、STX 2 産生株は STX 1 産生株より高分子側に位置し、STX 1 および STX 2 産生株間において明瞭な泳動像の差が認められた。また泳動バンドの位置の違いが、増幅遺伝子の塩基配列の違いと一致することを塩基配列解析により確認することができた。

今回使用した菌株は、*stx1* においては、増幅 DNA の塩基配列が1種類しか認められなかったが、*stx2* では4種類の異なる塩基配列が認められた(表1)。O111、O26株では、堺株と同じ配列の *stx1* および (あるいは) *stx2* を持つ株のみしか認められなかったが、O157株では、堺株と同じ配列の *stx1* および *stx2* を持つ株が主流であるものの、堺株と1塩基異なる配列を保有する株および2塩基異なる配列を保有する株が認められた。一方、OUT:H-株は、堺株と比較して20塩基異なる遺伝子配列を持つものであった。MK プライマーで増幅させる領域は、*stx* 遺伝子 A サブユニット領域 (全879bp) のうちの5'側の一部の領域 (227bp) であり、全体の塩基配列を比較してはいないので、バリエーションを明確に確認することはできない。しかし、今回の解析から、2塩基配列の異なるものは、増幅 DNA 領域において *stx2c* と同じ配列であり、20塩基配列が異なるものは、増幅 DNA 領域において *stx2e* の配列と同じであった。さらに、増幅 DNA 領域が堺株と全く同じ配列の株と、1塩基配列の異なるものは、塩基配列では、*stx2c* とは完全に一致していないが、解析した塩基配列をアミノ酸レベルで見ると、両方とも *stx2c* のアミノ酸配列と同じ配列を示した (データ示さず)。従って、今回使用した菌株が保有するバリエーション *stx2* は、MK プライマーでの増幅領域でみた限り *stx2c* 群と *stx2e* の2種類に大別されるものと推測された。ヨーロッパでの疫学的研究では、ヒトから最も多く検出されるバリエーションは *stx2c* 株であり、次いで MK プライマーで増幅可能な *stx2d* 株が検出

されることが報告されている⁴⁻⁶⁾。一方、わが国でも *stx2c* が主流との報告があり、*stx2d* や *stx2e* の事例も少数ながら報告されている。また、*stx2f* および *stx2g* は MK プライマーでは増幅されない^{8, 9)} が、*stx2f* は主にハトから、*stx2g* はウシから分離されており、ヒト由来株でこれらのバリエーションに遭遇する機会は低いと考えられる。

一方、菌体内に異なる 2 種類の *stx 2* 遺伝子を保有する菌が知られている⁴⁾。今回、堺株と同じ塩基配列と 1 塩基異なるものの組み合わせ、1 塩基異なるものと 2 塩基異なるものの組み合わせの 2 種類が存在した。このような 2 種類の *stx 2* 遺伝子を保有する株は、融解曲線解析においてその Tm 値への影響が示唆される。

SSCP およびシーケンスの結果から得られた塩基配列をもとに、単一の *stx* 遺伝子産物を組み込んだ 5 種類のプラスミドを作製し、それらの Tm 値を調べた。その結果、*stx 1* と 4 種類の *stx 2* 配列 (堺株 *stx 2*、1 塩基配列が異なる *stx 2* (*stx2c*)、2 塩基配列が異なる *stx 2* (*stx2e*)、20 塩基配列が異なる *stx 2* (*stx2e*)) の Tm 値に違いが認められた。しかし、81.0℃ の 20 塩基配列が異なる *stx2e* 以外は、堺株 *stx 2* プラスミドが 83.8℃、1 塩基異なる *stx2c* プラスミドが 83.9℃、2 塩基異なる *stx2c* プラスミドが 84.2℃ で、*stx 2* 間ではほとんど違いが認められなかった。

Tm 値は増幅 DNA の GC 含量と相関し、GC 含量が低いほど、Tm 値も低くなる。今回検討した増幅 DNA の塩基配列から、GC 含量の算出を行った結果、堺 *stx 2* は、42.3% と最も高く、次いで、堺 *stx 2* と 1 塩基配列の異なる配列が 41.9%、堺 *stx 2* と 2 塩基配列の異なる配列は 41.4%、堺 *stx 1* が 40.1%、そして堺 *stx 2* と 20 塩基配列が異なる株が 37.9% であった。これと、Tm 値を比較してみると、GC 含量 41.4~42.3% の DNA は 83.5℃ 付近を示していた。Light Cycler の測定誤差は、1℃ 未満とされているので、これらの差は、誤差の範囲内であり、この 3 種類を本器の Tm 値解析により区別することは難しいと考えられた。一方、GC 含量 40.1% の堺株 *stx 1* は 81.9℃ で、それらと比較して 1℃ 以上の温度差を示しており、異なる *stx* であると判定することが妥当であると考えられる。

今回の検討結果から、PCR 解析および SSCP 解析の有効性が示された。これらは、一連の作業工程を迅速簡便に実施することができ、本市における食中毒も含めた腸管出血性大腸菌感染症の菌同定および疫学的解析に寄与できると考えられた。

謝 辞

STX2c および STX2e 産生株を分与していただいた東京都健康安全研究センターの甲斐明美先生に深謝いたします。

文 献

- 1) Konowalchuk, J. et al. : Vero response to cytotoxin of *Escherichia coli*, *Infect Immun*, 18, 775-779 (1977)
- 2) O'Brien, A. D. and Laveck, G. D. : Purification and characterization of a *Shigella dysenteriae* 1-like toxin produced by *Escherichia coli*, *Infect Immun*, 40, 675-683 (1983)
- 3) Scotland, S. M. et al. : Two distinct toxins active on Vero cells from *Escherichia coli*, *Lancet*, ii, 885-886 (1986)
- 4) Schmitt, K. C. et al. : Two copies of shiga-like toxin II-related genes common in enterohemorrhagic *Escherichia coli*, strains are responsible for the antigenic heterogeneity of the O157:H-strain E32511, *Infect Immun*, 59, 1065-1073 (1991)
- 5) Pierard, D. et al. : Identification of new verocytotoxin type 2 variant B-subunit genes in human and animal *Escherichia coli* isolates, *J Clin Microbiol*, 36, 3317-3322 (1998)
- 6) Adrienne, W. P. et al. : Comparative toxicity and virulence of *Escherichia coli* clones expressing variant and chimeric Shiga-like toxin type II operons, *Infect Immun*, 63, 2450-2458 (1995)
- 7) Weinstein, D. L. et al. : Cloning and sequencing of a Shiga-like toxin type II variant from an *Escherichia coli* strain responsible for edema disease of ewine, *J Bacteriol*, 170, 4223-4230 (1988)
- 8) Schmidt, H. et al. : A new Shiga toxin variant (Stx2f) from *Escherichia coli* isolated from pigeons, *Appl Environ Microbiol*, 66, 1205-1208 (2000)
- 9) Leung, P. H. M. et al. : A newly discovered verocytotoxin variant, VT2g, produced by bovine verocytotoxigenic *Escherichia coli*, *Appl Environ Microbiol*, 69, 7549-7553 (2003)
- 10) 山本美和子他 : リアルタイム PCR を用いた腸管出血性大腸菌志賀毒素遺伝子迅速検出・型別法の検討, *広島市衛研年報*, 22, 109-110 (2003)
- 11) Karch, H. et al. : Single primer pair for amplifying segments of distinct Shiga-like toxin genes by polymerase chain reaction, *J Clin Microbiol*, 27, 2751-2757 (1989)
- 12) Yokoyama, K. et al. : Complete nucleotide sequence of the prophage VT1-Sakai carrying the Shiga toxin 1 genes of the enterohemorrhagic *Escherichia*

- coli* O157 : H7 strain derived from the Sakai outbreak, *Gene*, 258, 127–139 (2000)
- 13) Makino, K. et al. : Complete nucleotide sequence of the prophage VT2-Sakai carrying the verotoxin 2 genes of the enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 : H7 derived from the Sakai outbreak, *Genes Genet Syst*, 74, 227–239 (1999)
- 14) Orita, M. et al. : Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction, *Genomics*, 5, 874–879 (1989)
- 15) Hayashi, K. et al. : PCR-SSCP : a simple and sensitive method for detections of mutations in the genomic DNA, *PCR Methods Appl*, 1, 34–38 (1991)
- 16) Pitcher, D. et al. : Simple method for determining biovar and serover types of *Ureaplasma urealyticum* clinical isolates using PCR-single-strand conformation polymorphism analysis, *J Clin Microbiol*, 39, 1840–1844 (2001)
- 17) Bellin, T. et al. : Rapid Detection of enterohemorrhagic *Escherichia coli* by real-time PCR with fluorescent hybridization probes, 39, 370–374 (2001)
- 18) Jinneman, C. K. et al. : Multiplex real-time PCR method to identify shiga toxin genes *stx1* and *stx2* and *Escherichia coli* O157 : H7/H serotype, *Appl Environ Microbiol*, 69, 6327–6333 (2003)
- 19) Fitzmaurice, J. et al. : Application of real-time PCR and RT-PCR assays for the detection and quantitation of VT1 and VT2 toxin genes in *E. coli* O157 : H7, 18, 123–132 (2004)

国内 9 頭目の牛海綿状脳症陽性事例

山根 伸久 赤木 雅彦 寺地 靖子 仲宗根智彦
辻 正康 田口 和史 瀬尾 豊記

(受付：平成17年 4 月25日)

A 9th Case of Bovine Spongiform Encephalopathy (BSE) in a Cow in Japan

NOBUHISA YAMANE, MASAHIKO AKAGI, YASUKO TERACHI,
TOMOHIKO NAKASONE, MASAYASU TSUJI, KAZUFUMI TAGUCHI,
and TOYOKI SEO

Fukuyama City, Meat Sanitation Inspection Station
1685-1, Nakatsuhara, Miyuki-cho, Fukuyama, Hiroshima 720-0004

SUMMARY

We encountered the 9th case of bovine spongiform encephalopathy (BSE) in a cow in Japan. The steer was a 21-month-old castrated Holstein produced in Hyogo Prefecture, maintained in Hiroshima Prefecture, and slaughtered and processed as health livestock at a meat processing and storage center in Fukuyama City on October 29, 2003. Physiological function tests of the steer showed no neurological signs suggesting BSE. Since both BSE screening and re-screening showed a value more than 10% of the cut-off value, the result was regarded as positive. Confirmation tests were performed in the National Institute of Infectious Diseases. The Western blot method was positive, but histopathological and immunohistochemical examinations were negative. The specialist meeting engaged in BSE examination in the Ministry of Health, Labour, and Welfare made a definite diagnosis of BSE.

After positive results of the screening test, the persons concerned discussed about coping according to the BSE Coping Manual of Fukuyama City Meat Inspection Station, and the dressed carcass and organs of this bullock were kept in quarantine, and the facilities, equipments/instruments, and the examination room in the slaughter house were disinfected. After the definite diagnosis, we confirmed that disinfection in the slaughter house was performed again, and all dressed carcass and organs of this steer were incinerated.

要 約

国内 9 頭目となる牛海綿状脳症 (以下 BSE) 陽性事例に遭遇した。当該牛は、兵庫県産で広島県内において飼育された 21 ヶ月齢の牛 (去勢, ホルスタイン種) で、2003 年 10 月 29 日に福山市食肉センターで健康畜としてとさつ解体処理された。生体検査では、BSE を疑う神経症状等の所見は認められなかった。BSE スクリーニング検査では、1 回目および再検査ともカットオフ

値の-10%以上となったためスクリーニング検査陽性と判定した。国立感染症研究所において実施された確認検査では、ウエスタンブロット（以下 WB）法陽性、病理組織学および免疫組織化学検査が陰性となり、厚生労働省の牛海綿状脳症の検査に係る専門家会議において BSE と確定診断された。

スクリーニング検査陽性判明後、福山市食肉衛生検査所における BSE 対応マニュアルに基づき、関係者間で対応を協議し、当該牛に係る枝肉および内臓等の隔離保管、と畜場内の施設、器具等および検査室の消毒等を実施した。確定診断後は、再度と畜場内の消毒を実施し、当該牛に係る枝肉等はすべて焼却処分されたことを確認した。

はじめに

わが国で初めての牛海綿状脳症（以下 BSE）感染牛が2001年9月に確認されたことから、食肉の安全を確保するとともに、国民の不安を解消するために、2001年10月18日から厚生労働省の「牛海綿状脳症検査実施要領」に基づき、食用となるすべての牛を対象とした BSE 検査が開始された。検査開始から約2年が経過した2003年10月に、国内9頭目となる BSE 陽性事例に遭遇したのでその概要を報告する。

1. 当該牛

当該牛は、兵庫県産で広島県内において飼育された21ヶ月齢の牛（去勢、ホルスタイン種）で、2003年10月29日に福山市食肉センターで健康畜としてとさつ解体処理された。生体検査では、体重が約700kg、やや削瘦していたが BSE を疑う神経症状等の所見は認められなかった。解体後の検査では、小腸および大腸に炎症が認められた（表1）。

表1 当該牛の概要

とさつ解体状況	2003年10月29日に健康畜としてとさつ解体処理
品 種	ホルスタイン種
性 別	去勢
月 齢	21ヶ月齢（2002年1月13日生）
生産地	兵庫県
飼育地	広島県
生体検査所見	体重約700kg、やや削瘦 神経症状等は認めず
解体後検査所見	小腸炎、大腸炎

2. BSE スクリーニング検査結果

BSE スクリーニング検査は、Bio-Rad 社製「プラテリア BSE キット」を使用した（Lot.No.3E0017）。検査結果は表2のとおりである。1回目の OD 値（吸光度）は0.241（カットオフ値0.242、-10%が0.217）、再検査の OD 値は0.291および0.293（カットオフ値0.237、-10%が0.213）であった。当該ウェルは肉眼的には周囲のウェルよりわずかに濃く発色している程度であった（写真1）。1回目および再検査とも当該牛の OD 値が

カットオフ値の-10%以上となったため、「牛海綿状脳症検査実施要領」別添1-1「プラテリア BSE」操作法に従い、スクリーニング検査陽性と判定した。

表2 BSE スクリーニング検査結果

	1回目	再検査
検体の OD 値	0.241	0.291* 0.293*
陰性コントロール値 （4つのウェルの平均）	0.032	0.027
陽性コントロール値 （2つのウェルの平均）	3.275	3.497
カットオフ値	0.242	0.237
カットオフ値の-10%	0.217	0.213

*再検査の場合は2つのウェルで実施

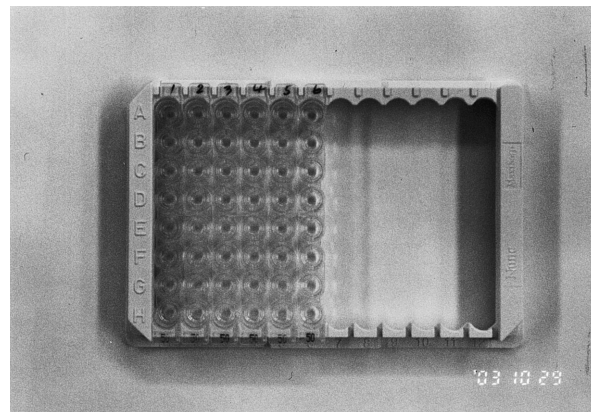


写真1 1回目 ELISA 検査結果（当該ウェルは4A）

3. 確定診断までの対応

今回の BSE 陽性事例における時系列の対応経過を表3に示した。スクリーニング検査陽性判明後、「福山市食肉衛生検査所における BSE 対応マニュアル」に基づき以下の対応を実施した。判明当日21時より、福山市農政課、福山市食肉センター、福山市生活衛生課、当所および食肉センター使用者協議会による BSE 現地対策会議を開催し、今後の対応を協議した。翌30日からと畜場を休場し、場内施設および BSE 検査室の消毒を実施した。当該牛に係る枝肉および内臓は、緊急用冷蔵庫に隔

離保管した。当該牛に係る不可食部位は産業廃棄物として焼却処分された。確認検査中に当該牛の枝肉等をと畜場内に隔離保管したままで、と畜場を再開させることによる消費者への影響等を考慮し、確認検査結果が出るまでと畜場は休場される方針となった。広島県福山家畜保健衛生所には、家畜伝染病予防法に基づく届出を行った。また、検体を厚生労働省から指示された国立感染症研究所へ翌日11時に搬入した。

と畜場内の施設および器具等については、2%以上の次亜塩素酸ナトリウム溶液の噴霧および浸漬による消毒と洗浄を実施した(写真2)。と畜場内の施設については、消毒重点区域(とさつ場所、頭部作業場所、内臓検査および処理場所、せき髄除去作業場所、背割り場所)は1時間に6回の噴霧および浸漬消毒を実施した(写真3)。汚染器具類(刀を収める鞘、ヘルメット、エプロン、刀類、ピッシングワイヤーについては、2%次亜塩素酸ナトリウム溶液の浸漬による消毒を実施した。消毒作業に従事する作業員等は防護服にゴーグルおよびマスクを装着し、健康危害の防止に努めた。検査室の設備器具等については、2%次亜塩素酸ナトリウム溶液による浸漬および134℃60分間の高圧蒸気滅菌による消毒を実施した。消毒作業については、「福山市 BSE 発生時の緊急対応マニュアル」どおり実施され、大きな混乱もなく進めることができた。



写真2 と畜場内施設の消毒

畜場内の衛生を確保する観点から万全を期し、1回目と同様の2回目のと畜場内施設および器具類の消毒と洗浄を実施した。当該と畜場は敷地内に焼却施設を保有していないため、外部の産業廃棄物処理業者に収集運搬および処理を委託している。当該牛に係る枝肉および内臓等は、産業廃棄物運搬車に積み込んだ後(写真4)、翌6日に搬出され、産業廃棄物処理場においてすべて焼却処分されたことを、と畜検査員が立会し確認した。搬出後、隔離保管庫を含むと畜場の消毒完了を確認し、6日から

4. BSE 確認検査

国立感染症研究所において実施された確認検査では、ウエスタンプロット(以下WB)法陽性、病理組織学および免疫組織化学検査が陰性となった。11月4日(火)19時より開催された、厚生労働省の牛海綿状脳症の検査に係る専門家会議において、当該牛が国内9頭目となるBSE感染牛と確定診断された。

5. 確定診断後の対応

厚生労働省の専門家会議による確定診断がなされた後、同日にBSE現地対策会議を開催し今後の対応を協議した。と

表3 BSE 陽性事例における時系列の対応経過

月 日	項 目	と畜場
10/29 (水)	<ul style="list-style-type: none"> 解体処理された牛40頭中1頭がBSEスクリーニング検査で陽性と判明(19:30) 「福山市食肉衛生検査所におけるBSE対応マニュアル」に基づき関係者へ連絡 現地対策会議開催(21:00) 広島県福山家畜保健衛生所に届出 	開場
10/30 (木)	<ul style="list-style-type: none"> 国立感染症研究所へ検体搬入(11:00) 当該牛に由来する枝肉、内臓等を緊急用冷蔵庫へ隔離保管 と畜場内および刀等の器具機材の消毒 検査室内設備器具の消毒 当該牛の不可食部位のすべてを産業廃棄物処理業者が焼却処分 	休場
10/31 (金)	<ul style="list-style-type: none"> と畜場内および刀等の器具機材の消毒 検査室内設備器具等の消毒 	休場
11/01 (土)	<ul style="list-style-type: none"> 現地対策会議開催 	休日
11/02 (日)		休日
11/03 (月)		休日
11/04 (火)	<ul style="list-style-type: none"> 国の専門家会議開催決定(AM) 専門家会議で陽性判定(19:00) 現地対策会議開催 	休場
11/05 (水)	<ul style="list-style-type: none"> 2回目のと畜場内、器具機材の消毒 検査室内消毒 隔離保管された保留枝肉等の産業廃棄物運搬車への積み込み 	休場
11/06 (木)	<ul style="list-style-type: none"> 保留枝肉の搬出および焼却確認 と畜場再開 	開場



写真3 脊髄吸引装置の浸漬消毒



写真4 保留枝肉等の産業廃棄物運搬車への積み込み

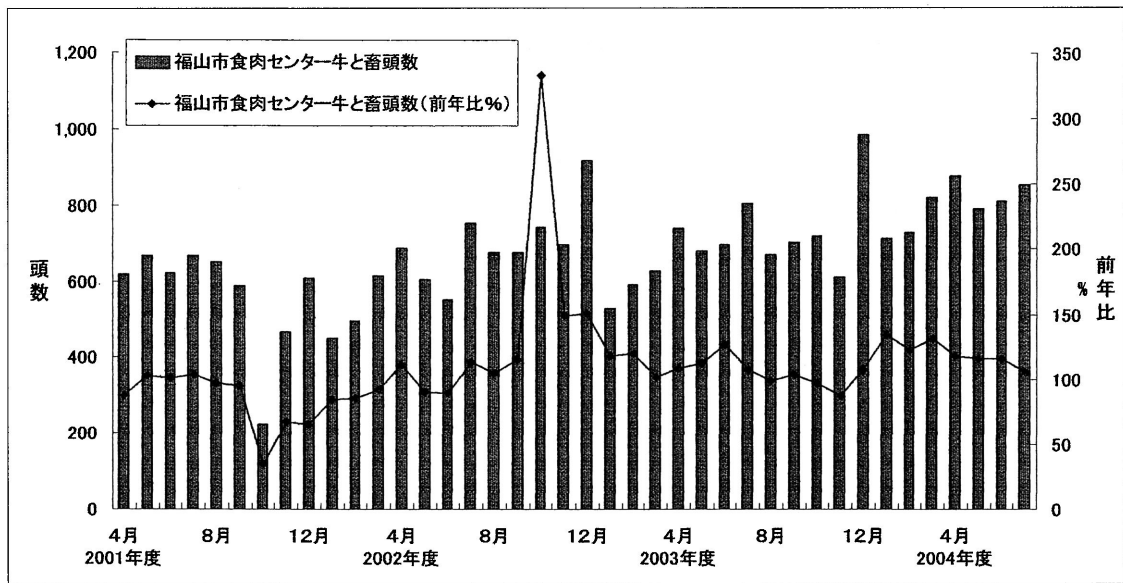


図1 福山市食肉センターにおける月別と畜頭数と前年比の推移

と畜場は再開された。

6. BSE 発生の影響

福山市食肉センターにおける月別と畜頭数と前年比の推移を図1に示した。2003年11月に国内9頭目のBSEが確認されて、当月はと畜場が休場した関係でと畜頭数は減少したが、12月以降は前年を上回って漸増している状況である。

ま と め

今回の症例は、西日本産で初の陽性事例であり、ホルスタイン種去勢肥育牛で月齢が21ヶ月と若齢であったこ

と、国内で飼料および肥料用の肉骨粉の製造および出荷が停止された後に産まれた牛であったことから注目された。本症例は8例目の茨城で確認された症例と同様にWB法のみで陽性と確定診断されたが、WB法で7例目までのBSE感染牛と同じ特徴を示した¹⁾。また、延髄門部に含まれる異常プリオンタンパク質の量が、他の症例と比較して500分の1から1000分の1と推定されている²⁾。異常プリオンタンパク質の量としては微量であり、蓄積し始めて間もない感染初期の状態と考えられている。BSEスクリーニング検査に使用しているBio-Rad社製「プラテリア BSE」は、1999年に欧州共同体科学

運営委員会で実施された評価成績から、検出感度が $10^{-2.5}$ と高いことを示している³⁾。このため、異常プリオンタンパク質が微量に蓄積した検体から検出できた可能性がある。若齢牛のBSE発症例としては、英国において20ヶ月齢の牛が報告されている⁴⁾が、同国の1986から1997年までのBSE発症牛のうち、31ヶ月齢未満の占める割合は0.05%と非常に低い⁴⁾。世界的にみてもあまり例のない月齢でのBSE感染牛を摘発できたことは、食肉衛生検査所におけるBSE全頭検査が十分に機能していることが裏づけられたものと考えられる。

日本でこれまでに行われてきたBSEリスク管理措置は、と畜場におけるBSE全頭検査、特定部位の除去および解体時における食肉への交差汚染の防止、飼料の管理および規制、農場段階のサーベイランスおよびトレーサビリティ等である¹⁾。この中でと畜場における食肉衛生検査所の果たす役割は大きいものと考えられ、引き続き、適正な特定部位の除去、交差汚染防止に重点を置いた指導を行っていきたい。

BSE発生後も福山市食肉センターにおける牛のと畜頭数は漸増している。これはBSE感染牛の市場への流通が阻止されたことが、市民および消費者に理解され、大きな混乱も無く受け入れられた結果であると考えている。今後もBSEやO157等に対する衛生対策の充実強化を図り、食肉の安全確保に努めていきたい。

謝 辞

今回の事例にあたっては、広島県保健福祉部被爆者総室食品衛生室および広島県食肉衛生検査所のご指導はもとより、関係者の方々のご協力によって混乱もなく対応できましたことに深謝します。

参 考 文 献

- 1) 日本における牛海綿状脳症 (BSE) 対策について、中間とりまとめ、食品安全委員会プリン専門調査会、2004年9月
- 2) Yamakawa Y. et al.: Atypical Proteinase K-Resistant Prion Protein (PrP^{res}) Observed in an Apparently Healthy 23-Month-Old Holstein Steer, *Jpn J. Infec. Dis.*, 56, 221-222 (2003)
- 3) Scientific Steering Committee. The Evaluation of Tests for The Diagnosis of Transmissible Spongiform Encephalopathy in Bovines, 8 July 1999
- 4) Scientific Steering Committee. Listing of Specified Risk Materials: a scheme for assessing relative risks to man, Opinion of the SCC adopted on 9 December 1997

広島市における動物取扱業及び動物美容業 の実態調査

城仙 哲宣¹⁾ 坂本 綾¹⁾ 平野 政敏¹⁾ 久保 盛恵²⁾

(受付：平成17年5月10日)

Entrance Survey of Appropriate Breeding in Animal Agencies and Pet Grooming Trade in Hiroshima City

TETSUNOBU JOSEN¹⁾, AYA SAKAMOTO¹⁾, MASATOSHI HIRANO¹⁾,
and MORIYOSI KUBO²⁾

- 1) Hiroshima City Animal Control Center
11-27, Fujimi-cho, Naka-ku, Hiroshima City 730-0043
- 2) Hiroshima City Healty Center
11-27, Fujimi-cho, Naka-ku, Hiroshima City 730-0043

SUMMARY

An entrance survey on appropriate breeding of animals was performed in notified animal agencies in our city, and the following 3 points were clarified.

1. Explanation of appropriate breeding to purchasers at the time of selling animals is not sufficient.
2. Dog cages of notified animal agencies in our city is used wider than the average of the whole country.¹⁾
3. It is necessary to oblige the notification and to promote the sanitary working environment for the pet grooming trade.

要 約

本市の動物取扱業者の立入調査を実施したところ、次の3点が判明した。

1. 動物の販売時に、購入者への適正な飼養などに関する説明が十分に実施されていない。
2. 本市の動物取扱業者は、全国平均¹⁾よりも広めの犬の飼育ケージを使用していた。
3. 動物美容業は、届出制の義務化を行い、衛生的な作業環境の推進を図る必要がある。

序 文

「動物の愛護及び管理に関する法律」の改正後、動物取扱業の届出件数が増えるに従い、犬猫を販売・保管する業者への苦情も増加している。このたび、広島市は市内業者への立入調査を実施して、その飼養管理等の実態を把握し、適正指導等を実施したので報告する。

調 査 方 法

1. 動物取扱業者への市民からの苦情調査
 - (1) 調査期間：平成13年4月～16年3月
 - (2) 調査内容：市民から広島市動物管理センター及び広島市保健所に寄せられた動物取扱業者に関する苦情電話、投書等を記録、分析した。

1) 広島市動物管理センター（〒730-0043 広島市中区富士見町11-27）

2) 広島市保健所（〒730-0043 広島市中区富士見町11-27）

2. 動物取扱業者への立入調査

- (1) 調査期間：平成16年2月～7月
- (2) 調査施設：犬猫を専門に販売・保管する動物取扱業の届出のある95施設の中から、無作為に抽出した63施設（表1）

表1 業種別調査施設

業種	販売	保管	販売・保管	訓練・保管	計
施設件数	2	5	55	1	63

- (3) 調査内容：
 - 1) 施設規模
 - 2) 従事者数
 - 3) 営業時間
 - 4) 衛生管理
 - 5) 施設環境
 - 6) 購入者への説明内容
 - 7) 売れ残った犬の登録状況等
 - 8) インターネット販売
 - 9) 動物美容業の環境衛生等

結 果

1. 動物取扱業者への苦情

- (1) 苦情件数は平成13年度の2件、14年度の1件から15年度には11件に急増した。
- (2) 業種別苦情件数は、犬猫の販売と保管を兼ねている業者に関するものが9割を超えていた（表2）。
- (3) 苦情の内容は、「ケージが狭い」37%、「毛の飛散による迷惑」25%であった（図1）。

表2 業種別苦情件数

業種	販売・保管	展示
件数	13	1

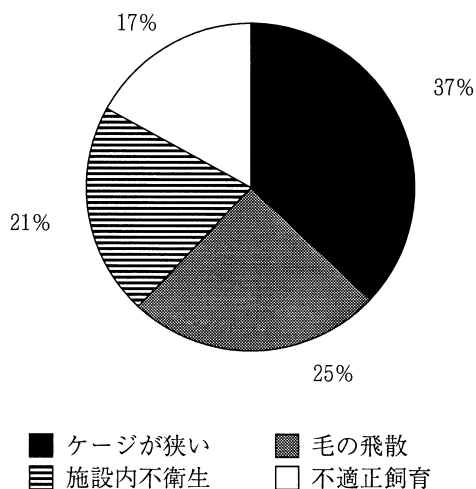


図1 苦情内容（複数回答）

2. 立入検査結果

- (1) 施設面積は、平均130㎡、その内100㎡が76.9%で、全国平均¹⁾に比べ面積の狭い店がやや多い結果となった（表3）。

表3 施設面積

区 分	広島市	全国平均
施設の平均面積	約130㎡	—
施設面積100㎡未満の割合	76.9%	72.5%

- (2) 1施設あたりの従業員数は、平均3.8人で、その内3人以下の店が59%を占め、全国平均¹⁾57%とほぼ同様の結果であった（図2）。

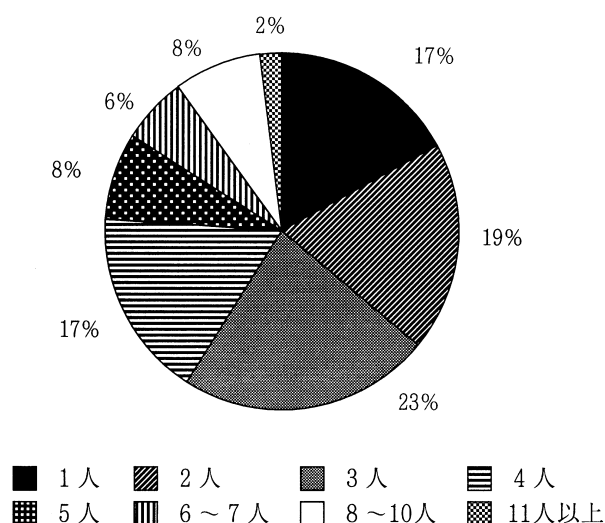


図2 従業員数

- (3) 営業時間は、11時間未満の店が97%を占め、全国平均¹⁾87%より時間の短い店が多く（図3）、また、夜間展示の最終時刻も97%の店が午後8時には閉店しており、全国平均の21%と比べ動物にストレスのかからない店の多いことが判明した（図4）

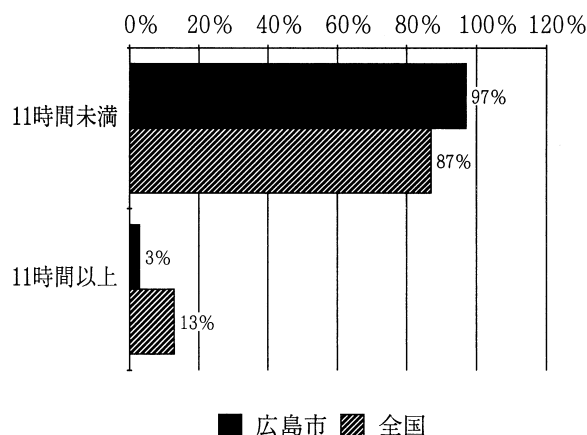


図3 営業時間

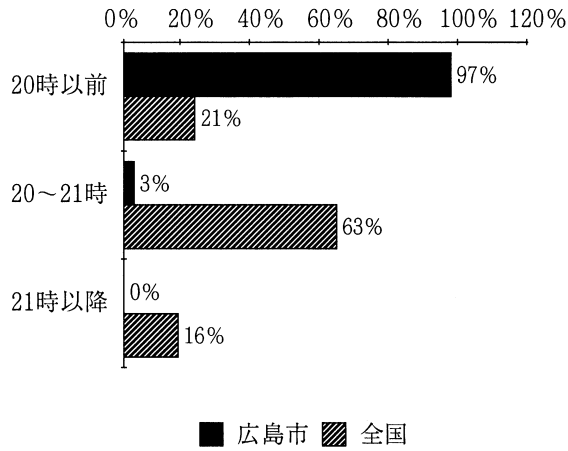


図4 夜間展示の最終時刻

(4) 施設の臭気及び清掃状態は、16%の店が糞尿処理の不適正による悪臭を放っており、清掃状態も不良なため、衛生面での改善指導を行った(図5)。

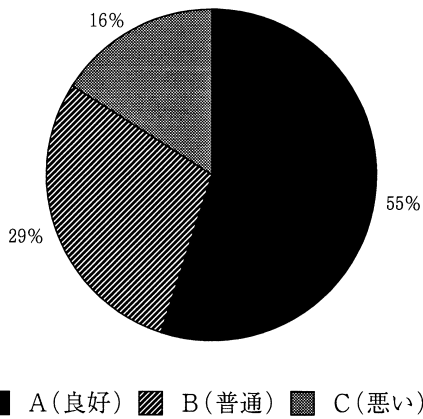


図5 施設の臭気及び清掃状態

(5) 店内及び飼育ケージの洗浄・清掃は、1日1～3回行っている店が95%以上を占めていた(図6)。
 (6) ケージについては、87%の店が、薬剤消毒を実施していたが、水洗いや洗剤のみの店も6%見られ、消毒の励行等衛生指導の必要性を感じた(図7)。
 (7) 子犬ケージの面積については、飼養施設の構造が「動物取扱業者に係る飼養施設の構造及び動物の管理の方法等に関する基準」に示されているが、その内容は定性的・抽象的なことから、各店で使用しているケージの面積を測定した結果、0.3㎡以上のケージを使用している店が、8割(81%)を超え、全国平均¹⁾の4割弱(38%)と比べ、本市のペット店は、広めのケージを使用していることが判明した(図8)。

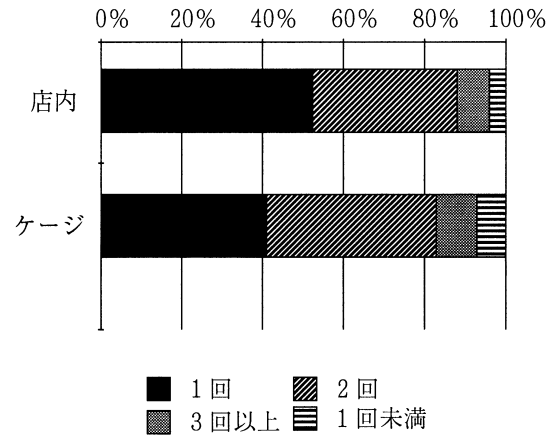


図6 店内及びケージの洗浄・消毒回数

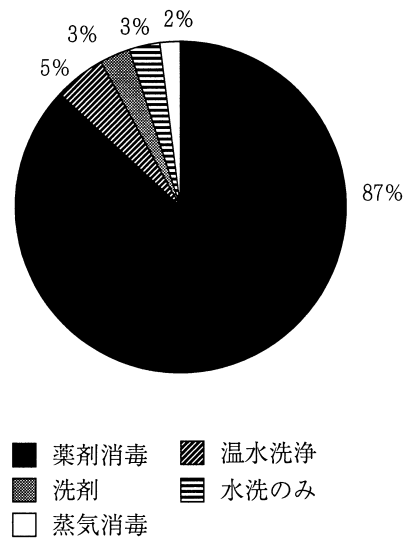


図7 洗浄消毒の方法

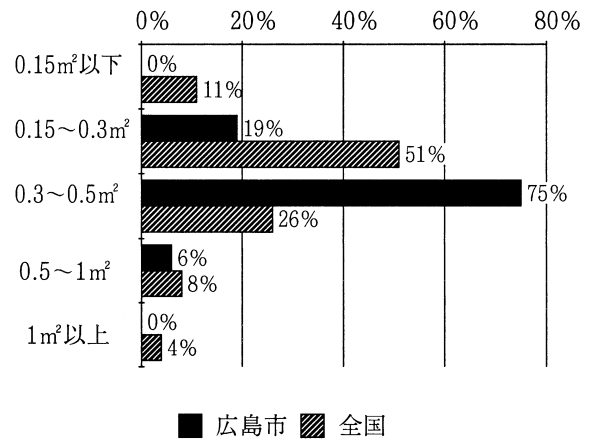


図8 子犬の飼育ケージ面積

(8) 購入者への適正な飼養方法等の説明は全店で行っていたが、口頭説明が71%と多く、文書による説明は約3割に留まり、今後業者が購入者への説明責任を十分果たすためには、文書説明が適切ではないかと思われた(図9)。

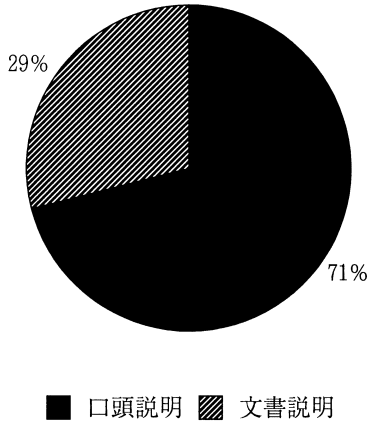


図9 購入者への説明方法

(9) 購入者への説明内容については、適正飼養や終生飼養は、9割以上の店が熱心に説明していたものの、繁殖制限については6割が、また、人と動物の共通感染症や逸走防止、犬の係留義務、更に犬の登録・狂犬病予防注射については5割に留まり、咬傷事故の届出義務に至っては皆無であった。

このため、犬猫の飼養に関する啓発用チラシを各店に、約60部ずつ合計約4,000部配布し、購入者に適正な飼養説明をするよう強く指導した(図10)。

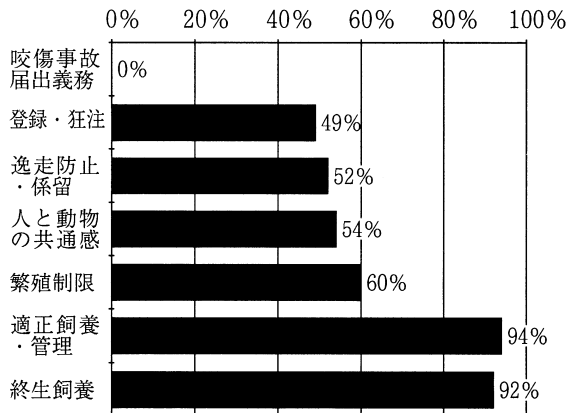


図10 購入者への説明実施状況

(10) 店で売れ残った犬の登録・狂犬病予防注射実施率は、3割しか実施しておらず、登録等に対する業者の意識が希薄なことを裏付ける結果となった(図11)。
 (11) ワクチン接種済みの動物の販売については、全店が実施し、接種証明書も添付されていた。

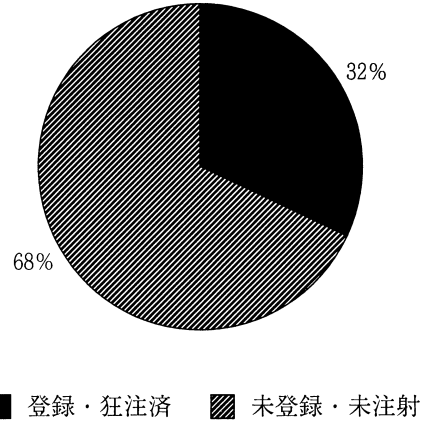


図11 販売残の犬の登録・狂注実施状況

(12) インターネット販売をしている店はみられなかった。

3. 動物美容業の環境衛生調査

(1) 犬猫を販売・保管する業者のうち、美容業も兼業している店は90%を超え、全国平均¹⁾ 46.6%よりかなり高い割合を示していた。

また、1店舗あたりの月平均取扱頭数は、犬：123頭、猫：6頭であった。

(2) 人と動物の共通感染症の感染防止や、体毛を誤って吸引することを防ぐマスク着用については、常時着用は22%に留まっていた(図12)。

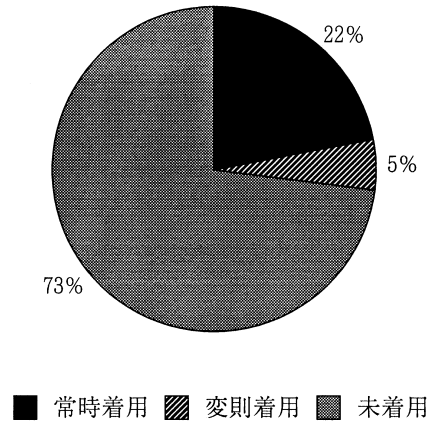
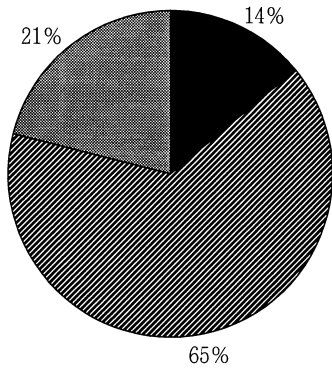


図12 作業中のマスク着用状況

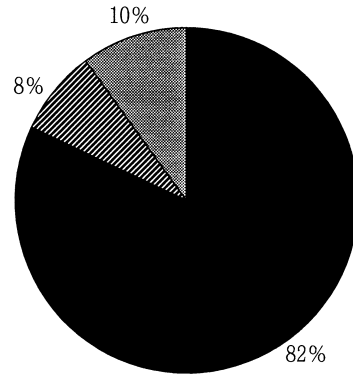
(3) 換気扇への毛の付着については、21%の店で毛が多く付着し(図13)、また、18%の店が換気扇を毎日清掃していないなど(図14)、毛の付着と清掃との間に、何らかの関係が存在するように思われた。

(4) 浮遊した毛の落下本数を14店舗で調査した結果、1シャーレ(58cm²)あたり平均272本、最小12本、最大1,012本で、処理頭数の多いほど、本数も多い傾向にあった。



■ A: 「少ない」 ▨ B: 「普通」 ■ C: 「多い」

図13 換気扇への体毛の付着度



■ 1回以上/日 ▨ 1～3回以上/週
■ 1～3回以上/年

図14 換気扇の清掃

(5) 美容室内の浮遊粉じん量について「建築物における衛生的環境の確保に関する法律」²⁾の基準に従い測定した結果、平均0.003mg/m³、美容室以外の店内は0.002mg/m³で、いずれも正常範囲内であった。

考 察

今回調査した動物取扱業者は、飼育ケージ等の洗浄消毒を約9割が適正に実施しており、ケージも、全国平均より広いものが使用されていた。しかし、購入者への説明については、その内容が飼養方法や終生飼養に偏り、人と動物の共通感染症、逸走防止さらに咬傷事故届出義務等の説明が不十分であった。

これらについては、動物取扱業者の責任と役割の認識不足が主な原因と考えられるが、動物行政に携わる我々の、業者への指導不足もあるものと改めて痛感された。

今後、ペット店利用者の増加が十分予想されることから、一人でも多くの適正な飼養者が増えるよう、ペット店への原則年1回以上の巡回指導を実施し、実態把握に

努めるとともに、業者の説明責任が十分果たせるよう指導していきたい。

また、動物美容業は現在届出の対象外であるが、業者件数は年々増加し社会的影響も増大していることや、従事者は密室環境の中での作業が多く、人と動物の共通感染症の感染への危険性が危惧されることなどから、美容室内の衛生的な作業環境等を推進するためにも、届出制の義務化など法的規制を行い、業者の社会的責任を自覚させる必要があるのではないかと考えている。

文 献

- 1) 環境省：「動物愛護管理のあり方検討会」配布資料（第1回～第6回分）
- 2) 厚生労働省：「建築物における衛生的環境の確保に関する法律」法律第20号，昭和45年4月14日配布，昭和45年10月13日施行

食中毒発生時における給食確保対策について

— 危機管理マニュアル（食中毒編）作成のためのチェックリスト —

勝部由起子 海嶋 照美 渡邊 昭廣 野島 誠治
武田由美子 塚本ツヤ子 渡邊 傳枝

（受付：平成17年5月26日）

The Measure of Meal Reservation at the Time of the
Outbreak of Food Poisoning-The checklist for Crisis
Management Manual (food poisoning section) Creation

YUKIKO KATSUBE, TERUMI KAISHIMA, AKIHIRO WATANABE,
SEIJI NOJIMA, YUMIKO TAKEDA, TSUYAKO TSUKAMOTO,
and TSUTAE WATANABE

Bisan Regional Health Center, Hiroshima Prefecture
2-4-1, En'ichi-cho, Mihara, Hiroshima 723-0015

SUMMARY

In facility of mass feedings meal reservation is an important issue as correspondence when food poisoning breaks out. However, especially in a hospital, welfare institution for elderly people, and facility for social welfare for the aged, reservation of alternative meals is difficult. Although the maintenance such as the crisis-management manuals is desirable, the manual preparation is not easy. So after investigating maintenance situations of such institutions beforehand, we created the checklist which might become the indicator of creation and aimed at spreading education.

要 約

集団給食施設において、食中毒が発生した時の対応として給食確保が重要な問題となってくる。しかし、特に病院等においては代替食の確保が困難である。危機管理マニュアル等の整備が望ましいが、何もない状態から個々の実情に応じたマニュアル作成は簡単ではない。そこで予め病院・老人福祉施設・老人保健施設等の整備状況を調査した上で、作成の指針となるチェックリストを作成し普及啓発を図った。

序 文

病院等集団給食施設で食中毒が発生した場合、被害の拡大・再発防止対策とともに患者等への給食確保も重要な問題となってくる。特に病院給食は治療の一環で栄養管理も必要なことから代替食の確保は容易ではなく、厚

生労働省医薬局長及び医政局長からも「医療法25条第1項の規定に基づく立入調査の実施について」¹⁾により、食中毒発生時における患者への給食確保等について検討を行うよう指導する旨の通知がなされているところである。

そこで今回管内の病院や老人保健施設・老人福祉施設

を対象に食中毒発生時における給食確保マニュアル整備状況について調査し、その結果をもとに、マニュアル作成指針として、最低限必要な項目を整理した「危機管理マニュアル（食中毒編）作成のためのチェックリスト」を作成し、普及啓発を図ったので概要を報告する。

実施方法

1. 調査期間 平成14年12月～平成16年7月
2. 実施事項

- (1) 病院等へのアンケート調査
 - 1) 第1回調査
 - 調査時期：平成15年2月～3月
 - 対象施設：管内の病院25施設
 - 調査内容：マニュアルの整備状況について
 - 調査方法：郵送による
 - 回収率：100%
 - 2) 第2回調査
 - 調査時期：平成15年9月～平成16年2月
 - 対象施設：管内の病院25施設
 - 調査内容：マニュアル作成にあたっての問題点等について
 - 調査方法：郵送及び現場での聞き取り（聞き取りの相手先は、施設管理者及び給食担当者とする）
 - 回収率：100%
 - 3) 第3回調査
 - 調査時期：平成16年6月
 - 対象施設：管内の老人保健施設および老人福祉施設計28施設
 - 調査内容：マニュアルの整備状況及びマニュアル作成にあたっての問題点等について
 - 調査方法：郵送による
 - 回収率：100%

- (2) チェックリストの作成
 - 1) 所内会議の開催
 - 構成員：平成13年（保健所長、医務及び介護保険担当課、食品衛生担当課、栄養管理担当課）
 - 開催回数：3回（平成14年12月3日、平成15年6月30日、平成16年3月26日）
 - 検討事項：チェックリストの作成及びその普及について
 - 2) ワーキングの開催
 - 構成員：8名（食品衛生担当課：5名、栄養管理担当課：3名）
 - 開催回数：3回（平成15年7月17日、平成16年2月24日、平成16年3月19日）
 - 検討事項：チェックリストの作成及びその普及

及について

- (3) 病院等集団給食施設での食中毒発生時の応援体制に関するアンケート調査
 - 1) 調査時期：平成16年5月～6月
 - 2) 対象施設：402施設（弁当・仕出し業：341施設、パン製造業者：61施設）
 - 3) 内容：食中毒発生時の代替食（常食、常食以外）提供の可否及び提供できる食数とそれに要する時間
 - 4) 調査方法：郵送による
 - 5) 回数率：47.8%
- (4) チェックリストの普及
 - 1) 研修会での説明
 - 2) 三原市での説明
 - 3) 立ち入り調査時の啓発
 - 4) 指定通所介護事業所（デイサービス施設）^(注1, 1)等介護保険関係施設への啓発

成績

1. 病院等へのアンケート調査

- (1) マニュアルの整備状況

老人保健施設・老人介護施設（以下「老健等」という）及び病院での整備状況は図1のとおりである。病院は64.0%が作成済みであるが、老健等は39.3%しか作成していなかった。

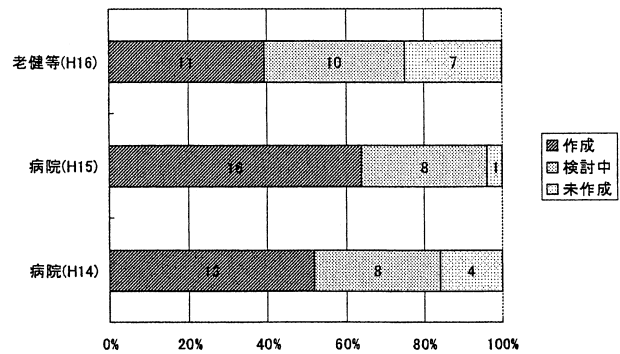


図1 マニュアルの整備状況

- (2) マニュアル作成にあたっての問題点等

作成済み及び検討中の施設でマニュアル作成にあたり苦慮した（している）項目は図2のとおりで、病院及び老健とも「代行従事者の確保」、「常食以外の確保」、「盛り付け場所の確保」、「委託先との役割分担」、「設備（冷蔵庫の増設等）の整備」、を多くあげていた。また、現在のマニュアルについては74.0%が不足している項目があると回答しており、その項目は図3で、「設備（冷蔵庫の増設等）の整備」、「使用水の確保」が多かった。
- (3) 行政への要望

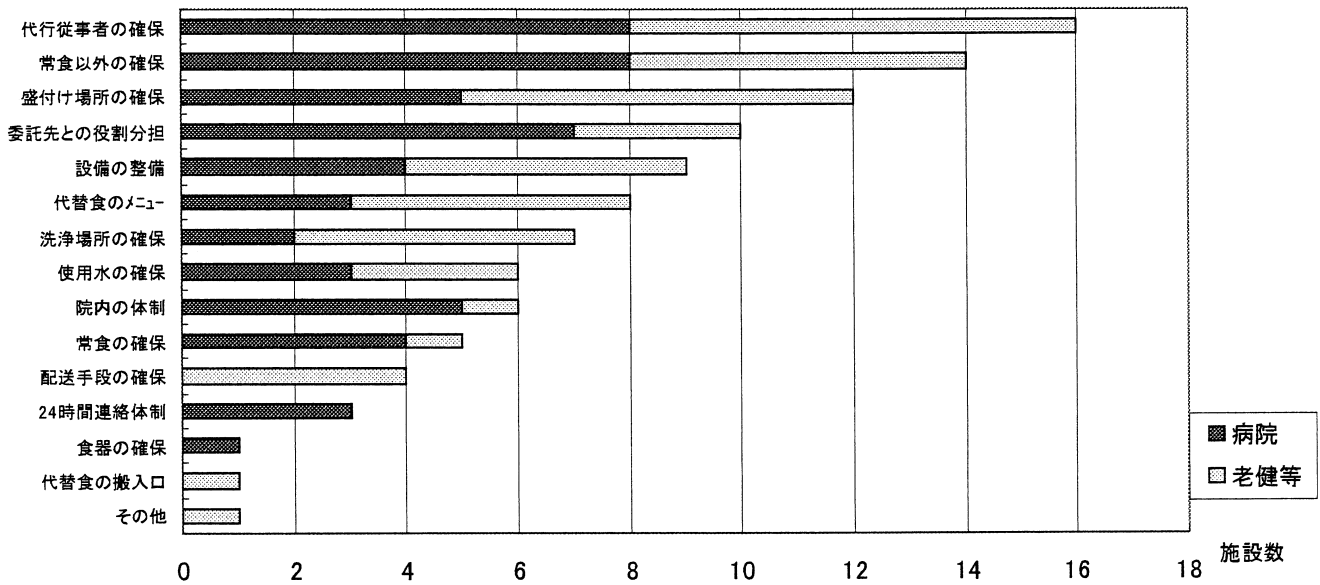


図2 作成にあたって苦慮した(している)項目(複数回答)

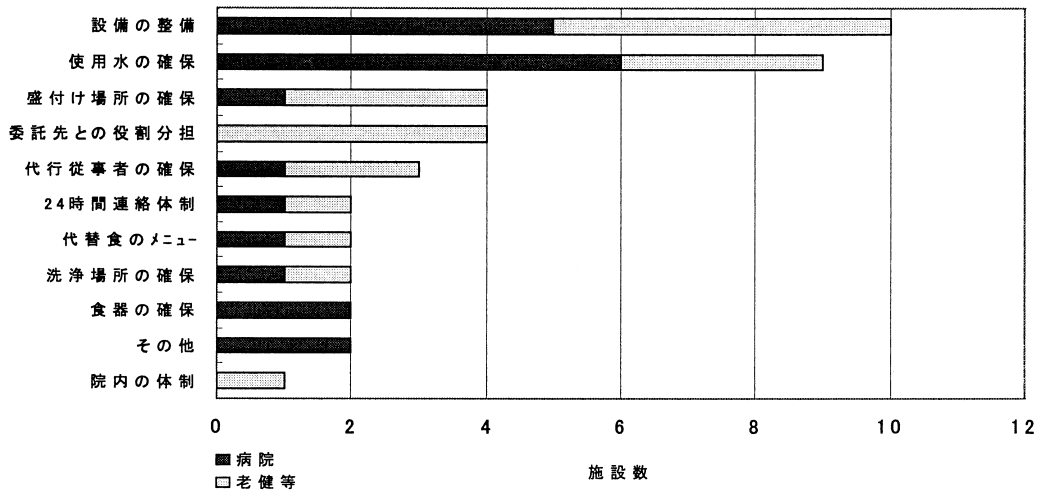


図3 不足項目(複数回答)

行政への要望は図4のとおりで、48.9%がマニュアル作成指針の作成を、29.8%が模擬訓練の実施を、21.3%が代替食や代行従事者等について地域での応援体制を構築するための協議会の設置を望んでいた。

2. チェックリストの作成

行政への要望が多かった。マニュアル作成指針(チェックリスト)の作成について、所内で取組むこととし、ワーキンググループをたちあげた。

(1) チェックリストの位置づけ

○骨格部分を確認できるよう最低限網羅すべき項目を整理する。

○“どのように考え、作成したらよいか?”を示した参考資料を掲載する。

○マニュアル作成にあたって苦慮した点や不足項目であげられた事項について、できるだけ具体的な対応方法を示す。

(2) チェックリスト

1) 第1章 チェックリスト

表1に示したように最低限網羅すべき項目を掲載し、評価欄で各施設の状況をチェックできる様式とした。

2) 第2章 資料編

チェックリストの1~13の項目順に、基本的モデルとして資料を作成した。また、必要に応じて“《チェック》”として、留意して欲しい事項を、“*参考”として、実際の事例等を掲載した。

マニュアル作成にあたっての問題点として回答が多かった項目4および5代替食（常食・常食以外）の確保、8の盛付け場所の確保及び9の代行従事者の確保については次のとおりである。

○代替食（常食・常食以外）の確保

代替食の提供先として、①病院間の支援、②仕出し・弁当業者、③パン製造業者、④給食委託業者からの支援が考えられる。

そのうち、②、③について、常食及び常食以外を提供できる業者について、保健所で実態を調査し業者名簿を作成することとした。

○盛付け場所の確保

事件発生後は原則として調理場が使用できなくなるため、代替食を提供するための臨時的盛付け場所が必要となる。ここでは、最低限どのような設備が必要かを提示した。

○代行従事者の確保

事件発生時は原則として調理従事者は調理業務に従事できないため、予め代行の盛付け及び下膳・配膳担当者を決めておく必要がある旨示した。

3) 集団給食施設等の食中毒発生時の応援体制に関するアンケート調査

管内の弁当・仕出し業者及びパン製造業者に対して、食中毒発生時に代替食を提供できるか否かアンケートを行った結果は表2のとおりで、常食は、弁当・仕出し業者の13.8%、パン製造業者では18.0%から提供可能との回答があったが、常食以外では弁当・仕出し業者の4施設しかなく、1施設は“軟菜^(注2, 3)及び腎臓病食、すい臓病食、肝臓病食は可能”と回答しているが、2施設は“献立表があれば”、残り1施設は“高齢者用の食事なら”との回答で、常食以外の食事確保は困難な状況であった。

この調査結果は、営業者の同

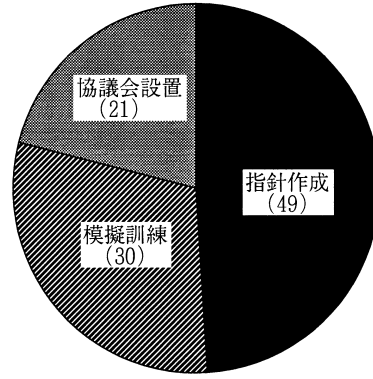


図4 行政への要望 ()内は%

表1 チェックリスト

チェック項目		評価 (○×)	備考
1 緊急時に備えた体制整備			
①	食中毒対策委員会（仮称）の設置（責任者・構成員の決定）		
②	役割分担の明確化 ・連絡調整班 ・情報収集班 ・給食班 等		
③	責任者と指揮命令系統の整備		
④	連絡体制（初動対応マニュアル）の整備		
⑤	責任者不在時の体制整備		
2 24時間の連絡体制への整備			
①	管理者への連絡方法		
②	担当者への連絡方法		
3 代替食（常食・常食以外）のメニューの決定			
①	常食のメニュー（概ね6日分）		
②	常食以外のメニュー（概ね6日分）		
4 代替食（常食）の提供先の確保			
5 代替食（常食以外）の提供先の確保			
6 代替食の配送手段			
①	配送車の確保		
②	配送時間（原則として、2時間以内の喫食）		
③	配送方法（食缶方式又は弁当方式等）		
7 代替食の搬入及び検収の実施			
8 盛付け場所の確保			
9 代行従事者の確保			
①	盛付け担当者		
②	配膳担当者		
10 食器（ワンウェイ容器）の確保			
11 使用水の確保			
12 給食業務委託先との役割分担の検討			
①	代替食の提供先		
②	代行従事者		
③	配送方法		
④	盛付け・配膳場所 等		
13 マニュアルの整備と実行性の確保			
①	職員全員に配布		
②	職員の理解		
③	瞬時の活用（実行性）		
④	定期的な見直し		

表2 食中毒発生時の応援体制

営業の種類	回答施設	提供可能施設	
		常食	常食以外
弁当・仕出し業	163 (47.8)	47 (13.8)	4 (1.2)
パン製造業	29 (47.5)	11 (18.0)	—
合計	192 (47.8)	58 (14.4)	4 (1.0)

() : %

意を得て、住所、氏名、常食の提供可能食数、提供までに必要な時間、常食以外の提供の可否、電話番号及び担当者名を記載した名簿を作成し、希望する施設に配布した。

4) チェックリストの普及

○ 関係団体等への通知

チェックリストを三原市医師会、尾道市医師会、因島市医師会、世羅郡医師会に通知し、会員への周知を依頼した(行政区分は平成16年8月現在のもの)。

○ 研修会での説明

特定給食施設関係者の研修会でマニュアル整備の必要性と併せて、チェックリストについて説明した。

○ 三原市病院協会での説明

チェックリストを活用してのマニュアルの作成済みの施設についてはマニュアルの検証を依頼した。

○ 立入調査時の啓発

医療法第25条第1項の規定に基づく立入調査時はもちろんのこと、集団給食施設への立入調査時にマニュアルの整備及びチェックリストの活用について指導した。

表3 研修会での説明

月 日	対象者	参加人数
16.6.14	病院・診療所	64
16.6.15	学校・幼稚園	43
16.6.16	児童福祉施設 老人福祉施設	48
16.6.18	社会福祉施設等	72
合計		227

○ 指定通所介護事業所等介護保険関係施設への普及
介護保険担当者から関係施設へマニュアル整備を指導する際にチェックリストについても説明した。

考 察

病院では、平成14年度から取組んでいることもあり、

マニュアル整備はかなり進んでいた。今後はこのチェックリストを参考に、自らのマニュアルを検証して行って欲しいと考える。そして、マニュアルが本当に実効性があるものかどうか、委託先との役割分担も含めての検証が必要と思われる。また、老健等や保育所などの社会福祉施設及び指定通所介護事業所等介護保険関係の給食施設についても、当該チェックリストを参考に、各施設の実情に応じたマニュアルを整備するよう指導していく必要がある。

その際、多くの施設が苦慮していた“代替食(常食以外)”の提供先については、弁当・仕出し業者では十分対応できないため、各地域の病院・老健等による給食応援体制の構築が必要不可欠だと考える。今後、保健所として応援体制構築のための地域連絡協議会の設置等について、どのように係わっていくのか検討する必要がある。

各施設は、作成したマニュアルの周知徹底を図るとともに、必要に応じて模擬訓練を行う等、より実効性のあるものにしていくことが必要である。以上のこともあわせ今後もチェックリストの普及を図っていききたいと思う。

謝 辞

チェックリストを作成するにあたり、資料提供等御協力いただいた三原市病院協会及び三原栄養士会医療部会の皆様に深謝します。

(注1) 要介護者または要支援者が老人デイサービスセンター等に通い、入浴・食事の提供とその介護、生活等についての相談・助言、健康状態確認等の日常生活の世話と機能訓練を行うサービス。

(注2) 卵、切麩、豆腐、はんぺん等をあしらったもの、あるいは柔らかく煮た根菜、葉菜など、消化器系統に機械的刺激が少なく、かつ消化吸収が容易な副菜。これにつく主食は粥の形態になる。

文 献

- 1) 厚生労働省：平成16年度の医療法第25条第1項の規定に基づく立ち入り調査の実施について、平成16年5月27日厚生労働省医政局長通知
- 2) 広島県福祉保健部：平成17年度ひろしま高齢者ガイドブック～保健福祉・介護サービスを利用するために～、32-33、広島県(2005)
- 3) 社会保険研究所：看護関連施設基準・食事療養等の実際、社会保険事業所編、平成14年10月版、545-550、社会保険研究所、東京(2002)

地域に対応した食品衛生教育 (リスクコミュニケーション)の試み

矢野美奈子 常田 展代 徳永 克志
山本 和則 石井 清士 石原 長造

(受付：平成17年5月26日)

An attempt of food sanitation education (risk communication) in community

MINAKO YANO, NOBUYO TSUNETA, KATSUSHI TOKUNAGA,
KAZUNORI YAMAMOTO, KIYOSHI ISHII, and CHOUZOU ISHIHARA

Bihoku Regional Health Center
4-6-1, Toukaichi-higashi, Miyoshi, Hiroshima 728-0013

SUMMARY

After the revision of the Food Sanitation Law and the establishment of the Food Safety Basic Law, Hiroshima Prefecture established the “Plan for the Promotion of Food Safety” and has advanced risk communication. However, in areas under this jurisdiction, the depopulation and aging of the community are problems, and only a few people attend opinion exchange meetings held in urban areas. Therefore, as “a step for small risk communication”, we performed a survey of the storage temperature and changes in the bacteria count after purchase of ready-to-eat side dishes, and based on its results, produced date, held a special course for dealers and consumers, and performed a questionnaire survey. The special course was favorably accepted; the participants considered its contents to be concrete and intelligible. In particular, in the consumers, the course was useful for improving microbiological knowledge.

要 約

食品衛生法の改正，食品安全基本法の制定を受け，広島県では「食品の安全に関する推進プラン」を定め，リスクコミュニケーションを進めている。しかし，過疎化・高齢化に悩む当所管内では都市部で開催される意見交換会などに参加するものは少ないのが実情である。そこで「小さなリスクコミュニケーションの一步」として，「そうざいの購入後の保存温度と細菌数の変化」について事前調査し，その結果を資料作成して管内業者，消費者に対して講習会を催し，終了後アンケート調査を行った。講習会は具体的内容で分かりやすかったと概ね好評であり，特に消費者に対しては微生物学的知識の向上に役立ったものと思われた。

序 文

食品にまつわる不祥事が相次ぐ中，平成15年度に食品

衛生法の大幅な改正¹⁾がなされ，新たに食品安全基本法²⁾が制定された。これを受け，広島県では「食品の安全に関する推進プラン」³⁾を定め，リスクコミュニケー

ションの一環としてシンポジウムや意見交換会等の開催を進めている。

しかし、当所管内は過疎と高齢化の波に押されており、消費者も営業者の大半も高齢化している状況で、都市部で開催されるシンポジウム等への参加は少ないと思われる。

そこで、当所管内で実現可能な「小さなりスクコミュニケーションの一步」として、身近な話題である「そうざいの購入後の細菌数の変化」について事前調査を行い、これを基に管内各地で営業者、消費者に対して講習会を開催し、併せてアンケート調査も行ったので報告する。

材料と方法

1. そうざいの保存温度と細菌数の変化について

販売店でそうざいを購入し自動車を持ち帰る場面を設定し、表1に示す4条件で自動車の後部座席に2時間放置した後、温度測定を行った。

また、除去したそうざいを図1に示す様に5分割し、そのうち三つをそれぞれ除去直後、25℃3時間及び35℃3時間それぞれふらん器内に放置後、さらにそれぞれを24時間冷蔵(5℃)保存したものの一般細菌数を測定した。培地は栄研器材(株)標準寒天培地を用い、方法は食品衛生検査指針(微生物編)1990年版にしたがって行った。

表1 供試食品の保存条件

レジ袋のみ	保冷バッグのみ
レジ袋に冷媒を入れる	保冷バッグに冷媒を入れる

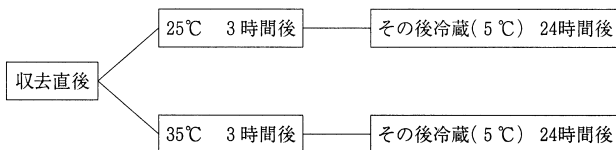


図1 検体の保存条件

2. 営業者及び消費者に対する衛生講習会

管内の食品衛生協会主催の講習会参加者のべ593名に対し、検査結果の説明と食中毒予防について、特に食品の常温放置の危険性の啓発を行った後、アンケート調査を行った。

消費者については、管内M市主催の食生活改善推進員研修会等の参加者のべ157名に対し、同様に車内など常温放置の危険性について講習を行い、アンケート調査を行った。

結果

1. そうざいの保存温度と細菌数の変化について

温度測定の結果は表2のとおりであった。実験当日の

天候は晴れ、最高気温27℃であった。車内でのレジ袋内は32℃まで上昇し、冷媒入り保冷バッグでは24.3℃であった。

一般細菌数の測定結果は表3のとおりであった。全体的には25℃保存、35℃保存のいずれも、3時間で $10^1 \sim 10^2$ 程度の増加のみられる例が多く、その後冷蔵24時間で、さらに 10^1 程度の増加がみられた。保存温度別にみれば若干35℃保存で増加が早い傾向が認められ、また白和え、卵の花等蛋白質含有量の多いそうざいでは増加が早いようであった。

表2 レジ袋内の温度

レジ袋のみ	32.0℃
保冷バッグのみ	30.0℃
レジ袋+冷媒	25.2℃
保冷バッグ+冷媒	24.3℃

表3 そうざい中の一般細菌数の推移 (cfu/g)

品名	除去直後	3時間		5℃24時間
		25℃	35℃	25℃
ポテトサラダの具	5.2×10^2	25℃	5.4×10^2	5.3×10^3
		35℃	1.5×10^3	4.3×10^3
きざみオクラ	9.7×10^2	25℃	2.1×10^3	1.2×10^4
		35℃	5.5×10^3	1.6×10^4
白菜・ホーレン草の磯香和え	3.5×10^2	25℃	3.6×10^3	2.7×10^4
		35℃	1.8×10^4	6.9×10^4
ツナサラダ	1.5×10^6	25℃	3.3×10^6	2.8×10^7
		35℃	1.1×10^7	3.3×10^7
春雨・錦糸・野菜の中華炒め	6.1×10^4	25℃	2.2×10^6	3.5×10^7
		35℃	2.1×10^6	4.8×10^7
ポテトサラダ	1.2×10^5	25℃	1.7×10^6	1.1×10^5
		35℃	1.4×10^5	1.2×10^5
白和え	1.2×10^5	25℃	1.7×10^6	2.0×10^7
		35℃	4.8×10^6	5.5×10^7
卵の花	2.9×10^4	25℃	1.2×10^6	2.1×10^6
		35℃	2.6×10^6	1.3×10^7

2. アンケート結果

営業者に対するアンケート結果を図2に示した。客の持帰りのために冷媒等を置いているのは約4割の施設であった。調理・製造過程では9割以上の施設が温度管理を行っているという回答に対し、原材料の仕入れ時や製品の搬出時に保冷等の温度管理を行っている施設は6割未満に留まり、指導の必要性を感じた。製品の消費・賞味期限限定のために保存試験等を行ったという施設は半数もなかった。また、試験内容についても「施設内で常温放置しておいたが、見た目は大丈夫だった」というものも多く、科学的根拠を持って期限設定を行うよう指導する必要性を感じた。その他自由意見として「具体的

内容で、これまでの講習会よりわかりやすかった」「身近で現実性があった」など概ね好評であった。

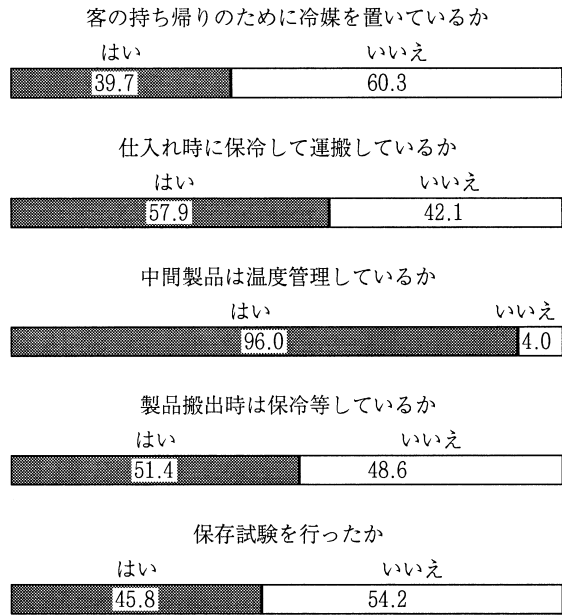


図2 業者アンケート結果 (%)

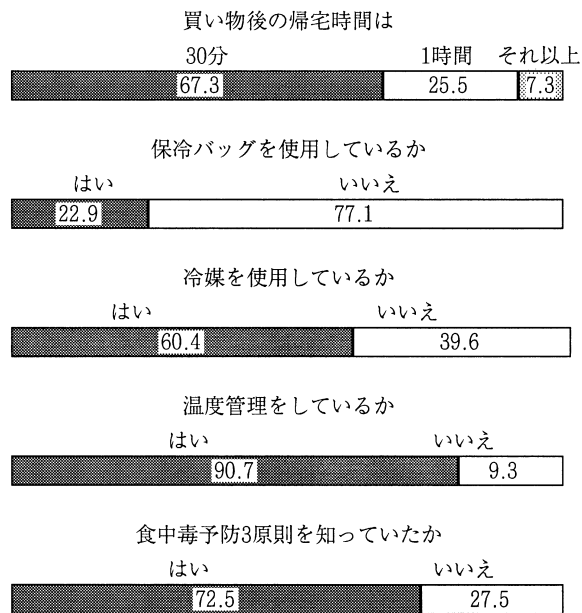


図3 消費者アンケート結果 (%)

消費者に対するアンケート結果を図3に示した。最もよく利用する販売店からの帰宅時間は、30分以内が7割近くを占め、最寄り店の利用が目立った。しかし、週末などは遠くても市街地へ買い物に出かけているようで、最長で2時間という回答もあった。温度管理については、ほとんどの回答者が家庭内では注意していると答えたが、食品を購入して持帰る際については、保冷バッグの使用

状況、冷媒を使用しているか等の回答からみて、問題意識はかなり低い傾向がみられた。

一方自由意見として「具体的な菌の数を聞いて驚いた」「なにげなく調理していたが、温度管理や手洗いの大切さがよくわかった」などと好評であった。特にそうざいの中の菌数などを知る機会は今まではなかったため、「菌の数にびっくりした」「冷蔵庫に入れても増えるのか」等の声が多く、「そうざいの中に菌が入っていること自体知らなかった」「野菜にも菌が付いているとは知らなかった」等の感想もあり、消費者の微生物というものについての知識の向上を図る上で今回の講習会は非常に効果的であったと考える。

考 察

今回、講習会を企画する上で、地域や業種に偏りなく参加してもらうため回数を17回と多くしたので、1回あたりの参加者は最小で10名であった。しかし、くつろいだ雰囲気でも業者にも消費者にも身近な話題を取り上げ、表やグラフ、図などを多用した資料で説明したため、わかりやすいとの好評を得ることができた。従って目的とした啓発の効果は高かったものと考えている。

特に消費者については「食中毒に気をつけよう」というスローガンばかりではなく、食中毒を起こす細菌についての情報をわかりやすく伝えることで、冷蔵保管や手洗いの重要性が理解でき、自ら注意しようという意識を持たせることができたのではないかと考えている。「こういう話が聞きたかった」とアンケートの意見にあったが、基本的な知識、情報を正確にわかりやすく伝えていくことの重要性を再認識した。

今回の試みは、当所管内の実情に合わせ実現可能な形でのリスクコミュニケーションの一歩として取組んだものである。しかし、これまで消費者に対して直接語りかける機会が少なく、今後このような取組みを成功させるためには、どのようにして消費者の参加を高めるかが課題となった。今回の講習会参加者の紹介で地域の集会でも話をしてほしいとの依頼が1件あり、食品衛生に対する知識や情報を得たいという潜在的な需要があることを確認できたので今後の指導に活かしていきたい。また、ここで得られたアンケート調査の結果を再び還元していくことによって、地域でのコミュニケーションを進めて行き、業者、消費者、行政等が一堂に会して意見交換する場を設ける基礎としていきたいと考えている。

文 献

- 1) 平成15年5月30日法律第55号「食品衛生法等の一部を改正する法律」
- 2) 平成15年5月23日法律第48号「食品安全基本法」
- 3) 広島県平成16年3月策定「食の安全に関する推進プラン」

小児髄膜炎患者からの日本脳炎ウイルス遺伝子の検出

桑山 勝¹⁾ 伊藤美佳子²⁾ 高尾 信一¹⁾ 島津 幸枝¹⁾
福田 伸治¹⁾ 宮崎佳都夫¹⁾ 倉根 一郎²⁾ 高崎 智彦²⁾

(受付：平成17年6月8日)

Japanese Encephalitis Virus in Meningitis Patients, Japan

MASARU KUWAYAMA¹⁾, MIKAKO ITO²⁾, SHINICHI TAKAO¹⁾,
YUKIE SHIMAZU¹⁾, SHINJI FUKUDA¹⁾, KAZUO MIYAZAKI¹⁾,
ICHIRO KURANE²⁾, and TOMOHIKO TAKASAKI²⁾

1) Hiroshima Prefectural Institute of Health and Environment,
Hiroshima, Japan

2) National Institute of Infectious Diseases, Tokyo, Japan

abstract

Cerebrospinal fluid specimens from 57 patients diagnosed with meningitis were tested for Japanese encephalitis virus. Total RNA was extracted from the specimens and amplified. Two products had highest homology with Nakayama strain and 2 with Ishikawa strain. Results suggest that Japanese encephalitis virus causes some aseptic meningitis in Japan.

概 要

髄膜炎と診断された患者57名由来の髄液について、日本脳炎ウイルスに対する遺伝子検査を実施した。髄液から全RNAを抽出し、RT-PCRにより増幅を行ったところ、4検体が陽性となった。そのうち、2検体は中山株に対する相同性が最も高く、残る2検体は石川株に対する相同性が最も高かった。これらの結果から、日本脳炎ウイルスは日本における急性髄膜炎の原因になることが示唆された。

発行元：Emerging Infectious Diseases Journal, Vol. 11, No.3, March 2005, p471-473
Center for Diseases control and Prevention (米国CDC)

1) 広島県保健環境センター (〒734-0007 広島市南区皆実町1-6-29)

2) 国立感染症研究所 (〒162-8640 東京都新宿区戸山1-23-1)