

目 次

総 説

食品の安全・安心

務中 昌己 1

産業動物

下痢予防用大腸菌不活化ワクチンの接種による乳房炎死産事故低減効果

森本 和秀, 清水 和, 黒瀬 智泰, 中谷 啓二, 秋田 真司, 篠塚 康典,
磯部 直樹 5

受精胚移植を目的とした発情同期化処置時の卵巢所見について

尾形 康弘, 日高 健雅, 松重 忠美, 磯部 直樹, 前田 照夫 11

牛体外受精胚の移植適期について

日高 健雅, 尾形 康弘, 永井 武史, 栗原 順三, 松重 忠美 17

第一胃蠕動運動を指標とした大腸菌性乳房炎の鑑別診断法の検討

大下 克史, 中谷 啓二, 前田 陽平 21

血便を呈した急性コクシジウム症に対するデキサメサゾン投与効果の検討

黒瀬 智泰 25

地方病性牛白血病リンパ腫による, 幽門部狭窄を認めた一症例

沖田 美紀, 森下 政憲, 秋田 真司 31

フリーバーン農場におけるサルモネラ症対策

部屋 智子, 日高 英子 35

オナモミ中毒が疑われた肉用繁殖牛の死亡事例

玉野 光博, 保本 朋宏, 平井 潤思, 萬城 守郎, 久保 盛恵 41

和牛受精卵移植産子における初乳給与状況の簡易な判定法の検討

岡峰 友恵, 玉野 光博, 宮本 徳子, 保本 朋宏, 萬城 守郎 47

下痢予防用牛大腸菌不活化ワクチンと *Escherichia coli* J5 株の血清学的交差性の解析

森本 和秀, 吉村 知子, 大坂 隆志, 長尾かおり, 新出 昭吾, 磯部 直樹 51

小 動 物

腸管断裂による入院治療後に群への復帰が果たせたアヌビスヒヒの1症例

渡辺 仁, 野田亜矢子, 南 心司 55

左側前肢断脚手術後に胃拡張一胃捻転症候群を発症したイヌの2例

黒瀬 紀子, 伊藤 大, 池本 麻弥, 小田まゆみ 59

大腿骨粉碎骨折を2枚重ねプレートにて整復した猫の1例

櫻田 晃, 長谷川孝寿, 板本 和宏, 大村 齊, 大村 琴枝, 和田 安弘 …………… 63

重度肺高血圧症を伴う三尖弁閉鎖不全症にPimobendan併用療法を実施した犬の1例

有田 申二, 有田 昇 …………… 67

保冷剤に含まれるエチレングリコールにより起立不能を呈したチワワの1例

田内 利樹, 大杉真由子, 久保田 誠, 麻生 摂子, 麻生 暁秀 …………… 71

肺動脈狭窄症に対し経心室肺動脈拡張術を行ったチワワの1例

園田 康広, 長澤 裕, 長澤 晶子, 上岡 尚民 …………… 75

公衆衛生

広島市と畜場における牛盲腸便中のカンピロバクター保菌状況と検査方法

兼重 泰弘, 古田 喜美, 中尾 芳浩, 児玉 実, 佐伯 幸三, 迫田 望 …………… 79

認定小規模食鳥処理場の衛生対策

井上 佳織, 松下 香織, 長澤 元, 山下 和子, 東久保 靖, 久保田早苗 …………… 83

小児の急性呼吸器感染症に関与するヒト・メタニューモウイルスの実態について

高尾 信一, 原 三千丸, 島津 幸枝, 桑山 勝, 佐々木由枝, 福田 伸治,
妹尾 正登 …………… 87

ヒトアデノウイルス3型分離株の制限酵素切断解析結果

池田 義文, 島本 啄士, 国井 悦子, 山本美和子, 阿部 勝彦, 野田 衛 …………… 93

他誌投稿

急性大腸菌性乳房炎と診断された乳牛に対する乳房内洗浄療法の治療効果

篠塚 康典, 平田 晴美, 石橋 一郎, 大川 雄三, 春日 朝子, 高木 光博,
田浦 保穂 …………… 99

会 報

関連学会案内

投稿規程

食品の安全・安心

務 中 昌 己

(受付：平成 21 年 3 月 17 日)

Safety and security of food

MASAKI MUNAKA

The Official Organ of the Hiroshima Prefectural Association of Veterinary Medicine.

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

はじめに

ここ数年来、冷凍餃子への農薬混入、乳製品へのメラミン添加、食品の表示偽装、不正輸入食品の問題など食品に対する信頼が大きく揺らいでいる。平成 15 年 7 月、「食品の安全性の確保に必要な措置は、国民の健康の保護が最も重要である」という基本的認識の下に講じられるべきである」という基本理念を定めた食品安全基本法の施行と共に、食品安全委員会が内閣府に設置された。それを受けて本県では「広島県食品安全推進協議会」を発足させ、今日まで種々な対策を実施してきた。

筆者は、この協議会の座長を務めているので、その概要を中心に解説してみたい。

1. 食品の安全に関する推進プランの実行体制とその概要

消費者、生産者、事業者、市町村代表、学識経験者を中心とした「食品安全推進協議会」を設置した。一方、県の行政を主体とした「食品安全対策行政連絡会議」を発足させ、関係部局の相互協力を図った。この二者が協働しながら、食品の安全に関する基本方針を設定し、行政の施策、生産者・事業者の役割、消費者の取り組みを具体化した「食品の安全に関する推進プラン」を策定した。このプランは第 3 期目（平成 21～23 年度）となっている。

2. 行政施策の概要

1) 安全・安心な農林水産物の生産・流通として次の項目に重点を置いている。

(1) 地産地消

広島ブランド認証制度、トレーサビリティ認証

制度、特別栽培農産物認証制度を設け、消費者ニーズに即した多様な生産・流通体制を構築しつつある。

(2) 生産資材の安全性の確保

農薬などの適正な流通や啓発・監視、環境保全型農業を推進する。

(3) 牛海綿状脳症（BSE）、鳥インフルエンザ対策の推進

安全な牛肉を安定的に供給する体制を確立するとともに、BSE や鳥インフルエンザ等の発生とまん延を防止する。

(4) 生産段階での衛生管理

動物用医薬品の品質確保と適正な使用、飼料の品質確保と生産者への正しい知識の普及、啓発を実施する。

(5) 水産物の生産段階における衛生管理

生産管理及び衛生管理体制等の指導、特にかき出荷衛生対策の強化が重要である。

(6) 生産環境保全対策の推進

ダイオキシン、有害化学物質の対策が重要で、環境モニタリング、自主的な排出削減と取り組むべきである。

2) 安全・安心な食品等の製造、販売と消費者については次の項目が重要となる。

(1) 食品等に関する情報の提供

パンフレット、ホームページ等を利用して正確で速やかな情報提供を実施する。

(2) 食品の表示、品質表示に対する正しい知識の普及啓発

消費者に分かりやすい表示を推進するとともに、

正しい知識の普及啓発を実施する。

(3) 監視指導体制（チェック機能）の強化

製造段階における衛生管理と監視指導の充実強化を計るとともに、特に表示に関する指導を十分にすることが重要である。

(4) と畜場及び食鳥処理場の監視指導

牛のと畜検査、BSEスクリーニング検査、豚のと畜検査、食鳥検査（大規模処理施設）を厳正に実施するとともに、HACCPの考え方に基づく自主衛生管理の推進が望まれる。

(5) 輸入食品の監視指導の充実化

輸入食品、輸入原料を用いて製造・加工された食品の監視指導、試験検査を強化することが重要である。

(6) 自主管理推進のための技術的支援と助言

情報提供、自主衛生管理認定制度およびHACCP承認制度の推進と、それに対する技術的援助や助言が大きな力となる。

(7) 給食施設等の衛生管理

自主的な衛生管理を推進するための技術援助、従業員の健康管理を行うための研修会、検診制度等が重要である。

3) 食品等の安全に関する試験検査、調査研究の推進とその信頼性の確保は食品衛生対策の基本である。

(1) 食品等の試験検査の強化

科学的根拠に基づく信頼性のある試験法の開発は、監視指導や調査を実施する際にも重要な支援となる。

(2) 安全な食品の製造・加工に関する研究

新しい殺菌技術の開発と食品製造現場での微生物制御に関する技術指導は製造業者にとって最大の利益となる。

4) 食品等の安全・安心のための連携は関係者にとって重要な意味を持つものである。

(1) 消費者ニーズの的確な把握と行政への反映（リスクコミュニケーション）

食品安全推進協議会、講演会、シンポジウム等はリスクコミュニケーションの重要な手段である。

(2) 関係部局、関係自治体及び国との連携

情報の交換・収集および共有化こそ必要不可欠な連携である。

(3) 危機管理体制の整備と食品事故発生時における安全確保

最も重要な課題であって、行政、生産者、事業者の緊急連絡体制およびマニュアルの整備が必須である。また、的確な対応と速やかな情報提供が望まれる。

(4) 食育に関する取り組みの推進

学校教育の一環として今日的な意義のある問題である。食品の安全や農業の重要性の啓発、農業体験学習等は食農教育の推進につながる。また、

望ましい食習慣の定着と自己健康管理を促進するものである。

3. 生産者の役割の概要

1) トレーサビリティシステムの導入および生産履歴記帳の推進

農林水産物では、牛肉、米、野菜、果実、かき等を対象としてトレーサビリティの導入を推進するとともに、消費者等に対する正しい情報提供を行っている。

2) 地産地消、食農教育の推進

「地産地消」運動を展開するとともに、学校における食べ物、食生活、農村に対する正しい理解を深める取り組みを推進している。

3) 農薬の適正使用に関する指導

農薬の適正管理、正しい使用法を指導するとともに、残留農薬の自主検査、不用農薬の回収促進を行っている。

4) 流通飼料の履歴追跡システムの運営

流通飼料供給データベースの運営を中心として、製造ロットによる履歴追跡システムの構築を行っている。

5) 安全安心な生乳の生産と供給、信頼の確保

生乳の生産、供給段階における安全性を確保するための総合的な品質管理体制の構築を実施している。HACCP的手法を用いた「生乳生産の飼養・衛生に関する管理基準」に沿った生乳生産の実施、「重要管理基準」を設定した「生乳生産チェックシート」への記帳・記録・保管、迅速残留抗生物質検査キットの乳業者への供給等、安全性の確保に努めている。

6) 安全安心で高品質なかきの提供

貝毒自主検査等による安全で衛生的な出荷体制を確立するとともに、消費者への安全性をPRする。

4. 事業者の役割の概要

1) 自主衛生管理の推進

食品衛生にかかわる人材の養成および資質の向上、HACCPの考え方に基づく衛生管理システムの推進、製造・加工した食品等の自主検査の実施等が主要事項である

2) 記録の作成及び保存

仕入れ、製造・加工および食品表示に関する情報を入手、記録、保存することが重要である。製造・加工業者にあつては、原材料の安全性の確保、仕入れ先等に係る記録の作成・保存、食品表示の根拠書類の整備・保存が義務づけられている。

また、流通・販売業者・飲食店営業者にあつても同様の記録を保存しておかなければならない。

3) 情報の提供

消費者からの問い合わせに対する適正な情報は最も重要な事項である。その対応の仕方としては、「お客様相談窓口」の設置、ホームページや広報誌を活用した食品の安全・安心に関する情報提供、食品衛

生講演会等の開催等が挙げられる。

4) 危機管理体制の整備

食品事故等の発生時に、当該品の出荷停止、出荷済み製品の回収、再発防止等、必要な措置が速やかに出来る体制を整備しておかなければならない。

5) 消費者、生産者等の交流

消費者、生産者、事業者との交流は食品の安全・安心を推進する重要な取り組みとなる。特にリスクコミュニケーションという立場から必要不可欠な対応である。

6) 適正な食品表示、品質表示

食品衛生法、JAS法等に基づく適正な食品表示、品質表示を徹底しなければならない。表示偽装による「偽装食品」事件は、食品の安全・安心を根底から覆すものである。

5. 消費者の取り組みの概要

食品の安全・安心に関する正しい知識の習得に努め、表示の確認を行うとともに、生産者等との交流の場に積極的に参加すること。また、行政が実施する食品安全推進リーダーの養成に積極的に参加すること等が挙げられる。

以上が広島県食品安全推進協議会が取り組んできた施策の概要である。食品の安全・安心に関する広い分野にわたる個々の問題は、従来の「食品衛生」の範疇をはるかに越えた極めて複雑多岐なものとなってきている。このような現状を踏まえ、認識を新たにしておかなければならない事項について以下に記す。

1. 食品安全委員会の役割

国の食品安全委員会は、食に対して3つの大きな役割を担っている。すなわち、1) 食品健康影響評価、2) リスクコミュニケーション、3) 食に起因する緊急時への対応である。その組織は企画を始め、リスクコミュニケーション、緊急時対応（評価チーム）、化学物質系評価グループ（農薬、添加物、動物用医薬品、器具・容器包装、化学物質、汚染物）、生物系評価グループ（微生物、ウイルス、プリオン、カビ毒、自然毒等）、新食品等評価グループ（遺伝子組換え食品等、新開発食品、肥料・飼料等）となっている。これまで、食品衛生といえば、食中毒の予防が主目的となっていたが、今日的な食品の安全安心対策には従来とは比較にならないほど多くの専門家を必要としているのである。

2. 獣医師の役割とその活躍

食品安全委員会の見上委員長は獣医師、そして、委員会におかれている14の専門調査会の247名のうち、62名が獣医師である。これからも、食品の安全・安心のための科学分野では、獣医師の活躍が期待されている。

3. リスク分析の基本

次いで食品の安全・安心を決定づけるリスク分析について考えてみよう。リスクとは単に危険や恐れ

を意味するものではない。不都合が発生する確率（頻度）や、その被害の深刻さの程度も含めての概念である。食品のリスクと言われると「そんなに怖い食べ物はいらない」と思う人も多いただろう。だが、どんな食品もリスクを併せ持っているのも事実である。リスクの科学的評価から行政的な管理や施策、さらには社会的な情報の共有をも含めたものを「リスク分析」と呼んでいる。従って、単にリスクを調べることだけではないのである。たとえば、栄養豊かな食品でも、摂り方や量が適切でなければ健康に悪い場合がある。また、時には食品に有害な病原菌や化学物質等が含まれる可能性もある。これらが健康に及ぼす悪影響の確率とその深刻さの程度を「リスク」と呼んでいる。

リスク分析は、3つの要素からなる科学的手法である。第一番目の要素は、その食品を食べることでどんな危害が生じるかを明らかにする「リスク評価」、第二番目はリスク評価の結果を基にリスクを極力少なくするための行政的対策を講じる「リスク管理」、そして第三番目の要素が「リスクコミュニケーション」の実施である。つまり、リスク評価の結果やリスク管理の手法について情報を共有しつつ、行政機関、事業者、消費者等が、それぞれの立場から意見を交換するのである。

上記のリスク分析の手法は、事故を未然に防ぎ、リスクを最小限にとどめるために役立つことからコーデックス委員会（FAO/WHO 合同食品規格委員会）が世界各国にその導入を勧め、世界共通の考え方になってきている。我が国でも、平成15年7月に食品安全基本法が施行されたのを機に、リスク分析手法が導入された。

おわりに

以上、食品の安全・安心を推進するための方策として、行政、生産者、事業者、消費者等の役割とその連携の在り方を中心に解説してきた。しかし、最後に強調しておきたいことは、食品を供給する立場にあるすべての人たちの責任感と倫理についてである。昨今、連日の如くマスコミに取り上げられる偽装食品を始めとした種々の不正行為は、安全対策以前の問題である。利益のみを最優先した商習慣を改めなければ、国民の食品に対する「安心」は得られない。

参考文献

1) 広島県食品安全推進協議会編：食品の安全に関する推進プラン（2009）
 2) 食品安全委員会特別番号（食品安全）：リスク分析の基本（2008）

下痢予防用大腸菌不活化ワクチンの接種による 乳房炎死産事故低減効果

森本 和秀¹⁾ 清水 和²⁾ 黒瀬 智泰³⁾ 中谷 啓二⁴⁾
秋田 真司⁵⁾ 篠塚 康典⁶⁾ 磯部 直樹⁷⁾
(受付：平成 20 年 11 月 25 日)

Effects of *Escherichia coli*-inactivated vaccine inoculation for the prevention of diarrhea to reduce animal destruction and mortality due to mastitis

KAZUhide MORIMOTO¹⁾, MADOKA SHIMIZU²⁾, TOMOYASU KUROSE³⁾, KEIJI NAKATANI⁴⁾,
SHINJI AKITA⁵⁾, YASUNORI SHINOZUKA⁶⁾, and NAOKI ISOBE⁷⁾

- 1) Hiroshima Prefectural Technology Research Institute, Livestock Technology Research Center 584 Nanatsuka-cho, Shobara, Hiroshima 727-0023
- 2) Hiroshima Prefectural Higashihiroshima Livestock Health & Hygiene Service Center 1-15, Saijogojo-cho, Higashihiroshima, Hiroshima 739-0013
- 3) Shobara Veterinary Clinical Center, Hiroshima P.F.A.M.A.A 21-20 Nishihonmachi, Shobara, Hiroshima 727-0013
- 4) Hatsukaichi Veterinary Clinical Center, Hiroshima P.F.A.M.A.A 10-14, Honmachi, Hatsukaichi, Hiroshima, 738-0015
- 5) Higashihiroshima Veterinary Clinical Center, Hiroshima P.F.A.M.A.A 284-1, Inaki, Takaya-cho, Higashihiroshima, Hiroshima, 739-2106
- 6) Yamagata Veterinary Clinical Center, Hiroshima P.F.A.M.A.A 461-1, Haruki, Kitahiroshima-cho, Yamagata-gun, Hiroshima, 731-1531
- 7) Hiroshima University Graduate School of Biosphere Science 1-4-4, Kagamiyama, Higashihiroshima, Hiroshima, 739-8528

SUMMARY

In 4 dairy farms, an *Escherichia coli*-inactivated vaccine for the prevention of diarrhea (*Escherichia coli* vaccine) was used to inoculate half of the cow population to investigate the occurrence of mastitis in 133 inoculated and 140 control cows. The *Escherichia coli*-inactivated vaccine was administered twice with a 1-month interval. Based on the

1) 広島県立総合技術研究所畜産技術センター (〒727-0023 広島県庄原市七塚町 584)
2) 広島県東広島家畜保健衛生所 (〒739-0013 広島県東広島市西条御条町 1-15)
3) 広島県農業共済組合連合会庄原家畜診療所 (〒727-0013 広島県庄原市西本町 2 丁目 21-20)
4) 広島県農業共済組合連合会廿日市家畜診療所 (〒738-0015 広島県廿日市市本町 10-14)
5) 広島県農業共済組合連合会東広島家畜診療所 (〒739-2106 広島県東広島市高屋町稲木 284-1)
6) 広島県農業共済組合連合会山県家畜診療所 (〒731-1531 広島県山県郡北広島町春木 461-1)
7) 広島大学大学院生物圏科学研究科 (〒739-8528 広島県東広島市鏡山 1-4-4)

medical records of a domestic animal clinic, the numbers of cows with mastitis or peracute mastitis and outcomes were investigated. The results of least squares analysis of variance demonstrated no difference in the incidence of mastitis depending on the presence or absence of vaccination. The least square mean values of the destruction and mortality rates due to mastitis were 8.5% for the inoculated and 33.8% for the control cows; there was a significant difference ($p<0.05$). No difference was noted in the incidences of peracute mastitis. However, there was a significant difference in the destruction and mortality rates: 27.3% for the inoculated cows and 75.6% for the control cows ($p<0.05$). On one farm, a bacterial test was conducted on the milk, obtained from cows with mastitis, for 5 months after vaccination. There was no difference in the isolation rates of gram-negative bacteria between the inoculated and control cows. *Escherichia coli* vaccine inoculation was demonstrated to reduce destruction and mortality due to mastitis. However, no preventive effect on the development of mastitis was observed. The annual break-even point for the vaccination, estimated from these results, was 0.6%, representing the number of destruction and mortality cases as percentage of the number of those fed.

要 約

4戸の酪農家において、それぞれ半数の牛に下痢予防用大腸菌不活化ワクチン（大腸菌ワクチン）を接種し、接種牛 133 頭、対照牛 140 頭について乳房炎発生状況を調査した。接種牛には約 1 か月間隔で大腸菌不活化ワクチンを 2 回接種した。家畜診療所のカルテをもとに、乳房炎件数、甚急性乳房炎件数および乳房炎の転帰を調べた。最小二乗分散分析の結果、ワクチン接種の有無による乳房炎発生率の差はなかったが、乳房炎死廃率の最小二乗平均値は、接種牛 8.5%、対照牛 33.8%であり、有意差が認められた ($p<0.05$)。甚急性乳房炎の発生率にも差はなかったが、死廃率は接種牛 27.3%、対照牛 75.6%であり、有意差が認められた ($p<0.05$)。また、1 戸について、ワクチン接種後 5 ヶ月間乳房炎乳を採取して細菌検査を行ったが、グラム陰性菌の分離率は接種牛と対照牛の間に差がなかった。大腸菌ワクチンの接種は乳房炎死廃事故を低減させることが示唆されたが、乳房炎発症予防効果は認められなかった。また、今回の成績から試算したワクチンの接種に伴う損益分岐点は、飼養頭数に対する年間死廃頭数割合 0.6%であった。

序 文

新生子牛の大腸菌性下痢症予防を目的に、一部の妊娠牛へ大腸菌不活化ワクチン（以下、大腸菌ワクチン）の接種が行われている。本ワクチンは、分娩前の牛に接種し、初乳中に分泌される特異抗体によって子牛に抗体を付与し、子牛の大腸菌性下痢症を予防するものである。一方、海外では乳房炎予防を目的とした大腸菌ワクチンが用いられていることから、下痢予防用ワクチンの接種と乳房炎との関連性について、これまでも検討されてきた。平田ら¹⁾は、大腸菌ワクチンを接種しても乳房炎発症率に差がなかったと報告した。

これに対し溝渕ら²⁾は、大腸菌ワクチン接種前と接種後とを比較し、乳房炎死廃事故が減少したと報告した。また、乳房炎発生率には差がなかったとしながらも、同時期のワクチン未接種農家と比較して発生率が低かったと報告した。しかし、溝渕らの報告では、接種区と対照区にそれぞれ異なる酪農家が割り当てられているため、飼養条件の違いが成績に影響を及ぼしている可能性がある。

今回われわれは、年度間差や農家間の飼養環境などの差の影響を排除するため、4戸の酪農家において、それぞれにワクチン接種区と対照区を設け、同一時期の乳房炎発生状況を調査した。

また、死亡・廃用の転帰をとることの多い甚急性乳房炎は6～9月に多発するとされることから³⁾、ワクチンの接種はこの時期に実施した。

材料と方法

調査はワクチン接種日(平成19年5月～7月)から平成20年3月まで行った。県内の酪農家4戸を選定し、飼養牛の約半数に対して一斉に大腸菌ワクチン(牛用大腸菌ワクチン「ゼンノウ」[imocolibov])を接種し、約1ヶ月後に追加接種を行った。対照牛は無処置とした。分娩予定のない育成牛や、乳房炎で治療中の牛は調査対象から除外した。調査対象牛は4戸合計で273頭、そのうち接種牛は133頭であった(表1)。

表1 試験対象農家

酪農家	飼養形態	乳房炎* 死廃率	頭数		合計	接種日
			接種	対照		
A	繋ぎ	21%	20	21	41	7/4,8/7
B	繋ぎ	16%	30	26	56	7/4,8/7
C	フリーバーン	9%	70	82	152	7/3,8/1
D	フリーバーン	15%	13	11	24	5/31,6/29
合計			133	140	273	

*乳房炎死廃率は試験開始前平成14年度～平成18年度の平均値

乳房炎には、潜在性のものから全身症状を伴う急性のものまでさまざまな病態があり、自然治癒する可能性もある。したがって全ての乳房炎を獣医師が診療しているとは限らないが、今回は、家畜診療所に診療依頼のあった臨床型乳房炎を調査対象とした。

乳房炎発生状況の調査は家畜診療所のカルテをもとに乳房炎発生件数、甚急性乳房炎発生件数、乳房炎が原因で起きた死亡・廃用件数を調べた。また、発生率、死廃率を以下のように定義した。

発生率: 調査対象頭数に対する発生件数の割合(%)

死廃率: 発生件数に対する死亡・廃用件数の割合(%)

酪農家Cにおいては、平成19年7月から12月の期間、乳房炎罹患牛の乳汁26検体を採取して細菌検査を行い、原因菌種別に発生率を調査した。細菌検査は、乳汁の原液と10倍希釈液をそれぞれ50μlずつABCМ寒天(栄研化学)、卵黄加マンニット食塩寒天(日水製薬)およびDHL寒天(日水製薬)に塗抹した。培養条件は、ABCМ寒天とDHL寒天は37℃24時間、卵黄加マンニット食塩寒天が37℃36時間で、いずれも好気培養した。分離された細菌等は、腸内細菌、コアグラールゼ陰性ブドウ球菌(CNS)、レンサ球菌、その他に分類した。腸内細菌の同定にはアピ20Eまたはラピッド20E(シスメックス・バイオメリユール)を使用した。

統計処理は、各農家の飼養頭数がそれぞれ異なるため、酪農家とワクチン接種の有無を要因として、乳房

炎発生率、乳房炎死廃率、甚急性乳房炎発生率および甚急性乳房炎死廃率について最小二乗分散分析を行った。

成 績

最小二乗分散分析の結果、酪農家とワクチン接種の有無との間には交互作用は認められなかった。

乳房炎発生率の最小二乗平均値は、接種牛13.6%、対照牛14.6%であり、有意差は認められなかった。これに対し乳房炎死廃率は、接種牛8.5%、対照牛33.8%であり、有意差が認められた(p<0.05, 表2)。

表2 乳房炎発生率及び死廃率の最小二乗平均値

乳房炎	農家				乳房炎		農家×乳房炎
	A	B	C	D	接種	対照	
発生率	14.6%	21.5%	11.8%	8.4%	13.5%	14.6%	n.s.
死廃率	33.3%	41.7%	9.7%	0.0%	8.5%*	33.8%	n.s.

*: 接種・対照間に有意差あり(p<0.05) n.s.: not significant

発生率: 調査対象頭数に対する発生件数の割合(%)

死廃率: 発生件数に対する死亡・廃用件数の割合(%)

甚急性乳房炎発生率の最小二乗平均値は、接種牛3.9%、対照牛4.6%であり、有意差は認められなかった。甚急性乳房炎死廃率は、発生の無かった酪農家Dを除いて分析したところ、接種牛27.3%、対照牛75.6%であり、接種牛が有意に低かった(p<0.05, 表3)。

表3 甚急性乳房炎発生率及び死廃率の最小二乗平均値

甚急性 乳房炎	農家				甚急性乳房炎		農家× 甚急性乳房炎
	A	B	C	D	接種	対照	
発生率	7.3%	7.2%	2.6%	0.0%	3.9%	4.6%	n.s.
死廃率	41.4%	87.9%	25.0%	-	27.3%*	75.6%	n.s.

*: 接種・対照間に有意差あり(p<0.05) n.s.: not significant

発生率: 調査対象頭数に対する発生件数の割合(%)

死廃率: 発生件数に対する死亡・廃用件数の割合(%)

乳房炎原因菌の分類では、腸内細菌の分離率は接種牛と対照牛の間に差がなかったが、レンサ球菌は接種牛に多く、有意菌なしと判定されたものは対照牛に多い傾向が認められた(表4)。

表4 酪農家Cの原因菌種別乳房炎発生率

	接種	対照
グラム陰性桿菌	4.3%	3.7%
CNS	2.9%	2.4%
レンサ球菌	4.3%	1.2%
その他の微生物	0.0%	1.2%
有意菌なし	5.7%	8.5%
合計	17.1%	17.1%

考 察

今回の試験で、大腸菌ワクチンの接種により乳房炎罹患牛の死廃率を大幅に低減できることが示唆され、これは溝渕ら²⁾の報告と一致した。

溝渕らは乳房炎発生率にも言及し、接種農家と未接種農家との比較で接種農家の発生率が低かったとしている。しかし本試験では、乳房炎、甚急性乳房炎のいずれにおいても発生率には差が認められなかった。

また、乳房炎発生件数に対する甚急性乳房炎死廃件数割合の最小二乗平均値は、接種牛が対照牛の13.8%、その他の乳房炎では接種牛は対照牛の52.4%であった(図1)。このことから、ワクチン接種牛において甚急性乳房炎の死廃率が低かったため、乳房炎死廃率が顕著に低くなったと考えられた。

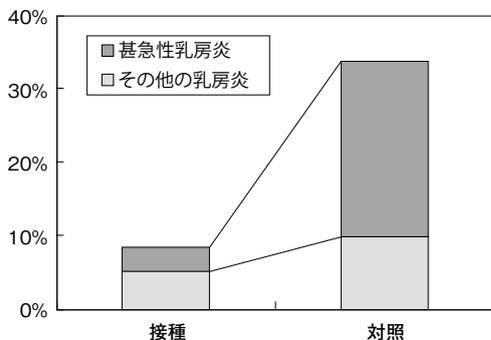


図1 乳房炎死廃率の最小二乗平均値の内訳

溝渕らは、ワクチン接種によって毒血症のみられる急性～甚急性乳房炎が激減したと述べている。甚急性乳房炎の多くがグラム陰性桿菌によって起こり、エンドトキシンショックにより重篤な症状を示すと考えられる³⁾ため、エンドトキシンショックに対する大腸菌ワクチンの関与について、今後の調査が必要である。

今回の成績をもとに、大腸菌ワクチン接種の損益分岐点を、乳牛1頭が分娩直後に死亡した場合の損失額から試算した。乳価は平成20年度の広島県の飲用乳引き取り価格(乳脂率3.5%基本乳価)95円、乳量は平成19年度乳用牛群能力検定成績の広島県の平均値(全体平均乳量9,639kg、乳脂肪率3.87%、初産牛平均乳量9,012kg、乳脂肪率3.82%)を3.5%脂肪補正乳量に換算した値を用いた。また、ワクチンの接種代金は1頭2回接種で3,140円とした。試算では、乳代は95円×10,217kg=970,615円、その間の飼料代1,300円×305日=396,500円を差し引き、さらに死亡した牛の代替初妊牛の導入費用500,000円を加えた。導入した牛が2ヶ月後に分娩したと仮定すると、得られる乳代が95円×9,480kg×(305-60)日÷305日=723,433円、飼料代は600円×60日+1,300円×(305-60)=354,500円となる。したがって、損失額は970,615-396,500+500,000-723,433+354,500=705,182円と算出された。飼養頭数をa、乳房炎の発

生率をb、乳房炎罹患牛の死廃率をcとすると、ワクチンを接種しない場合の死廃頭数はa×b×cとなる。接種牛の死廃率の最小二乗平均値が対照牛の約0.25倍であることから、ワクチンを接種した場合の死廃頭数はa×b×c×0.25となる。

$$a \times b \times c \times 705,182 > a \times b \times c \times 0.25 \times 705,182 + 3,140 \times a$$

$$b \times c \times (1 - 0.25) \times 705,182 > 3,140$$

$$b \times c > 0.0059$$

したがって、飼養頭数に対する乳房炎死廃頭数の割合が0.6%以上であれば、ワクチンの接種費用よりも損失低減効果が高くなる計算になった。しかし実際には、乳房炎発生率や乳房炎罹患牛の死廃率は酪農家ごとに異なることから、過去の発生状況も考慮してワクチン接種の妥当性を判断する必要があると考えられた。

今回用いた下痢予防用の大腸菌ワクチンでは症状軽減効果が認められたが、予防効果は示されなかった。海外で乳房炎用として用いられている大腸菌ワクチンの場合も、乳房炎予防効果^{4) 5)}や大腸菌性乳房炎の症状を軽減する効果^{6) 7)}を示すとする報告がある一方で、発生率には差がなかったとする報告⁸⁾がある。したがって、国内外のワクチンは製造株が互いに異なるが、その効果には類似点があると考えられた。

本ワクチンが乳房炎死廃事故を低減させた作用機序については、未だ十分に解明できていないが、海外で乳房炎用として用いられている大腸菌ワクチンの機序には仮説がたてられている。従来から血清中の特異抗体が関与するという仮説があるが⁹⁾、Dosogneら¹⁰⁾は総説の中で、乳腺局所の免疫記憶細胞が介在して乳腺の過剰反応を導くという仮説を支持した。今後、これらの仮説について検証をすすめ、より効果的なワクチンプログラムを構築する必要がある。

謝 辞

今回の試験を実施するにあたりご協力いただいた、広島県農業共済組合連合会家畜診療所の諸先生方ならびに酪農家の方々に深謝する。

文 献

- 1) 平田 昇ほか：乾乳期に牛毒素原性大腸菌不活化ワクチンを投与した乳牛の分娩後における体細胞数の変化と臨床型乳房炎の発症率，紫葉，36,85～87 (1991)
- 2) 溝渕俊二ほか：牛毒素原性大腸菌不活化ワクチン接種による乳房炎死廃事故低減の試み，家畜診療，408,13～16 (1997)
- 3) 野村 武：グラム陰性菌による牛の甚急性乳房炎の実態とその治療，家畜診療，282,21～40 (1986)
- 4) González, R. N., et al.: Prevention of Clinical

- Coliform Mastitis in Dairy Cows by Mutant *Escherichia coli* Vaccine, *Can. J. Vet. Res.*, 53, 301 ~ 305(1989)
- 5) Hogan, J. S., et al.: Field Trial to Determine Efficacy of an *Escherichia coli* J5 Mastitis Vaccine, *J. Dairy Sci.*, 75, 78 ~ 84(1992)
- 6) Hogan, J. S., et al.: Coliform mastitis, *Vet. Res.*, 34, 507 ~ 519(2003)
- 7) Wilson, D. J., et al.: Milk and Serum J5-Specific Antibody Responses, Milk Production Change, and Clinical Effects following Intramammary *Escherichia coli* Challenge for J5 Vaccinate and Control Cows, *Clin. Vaccine Immunol.*, 14, 693 ~ 699(2007)
- 8) Wilson, D. J., et al.: Comparison of J5 Vaccinates and Controls for Incidence, Etiologic Agent, Clinical Severity, and Survival in the Herd Following Naturally Occurring Cases of Clinical Mastitis, *J. Dairy Sci.*, 90, 4282 ~ 4288(2007)
- 9) Tyler, J. W., et al.: Relationship between serologic recognition of *Escherichia coli* O111:B4 (J5) and clinical coliform mastitis in cattle, *J. Vet. Res.*, 49, 1950 ~ 1954(1988)
- 10) Dosogne, H., et al.: Potential mechanism of action of J5 vaccine in protection against severe bovine coliform mastitis, *Vet. Res.*, 33, 1 ~ 12(2002)

受精胚移植を目的とした発情同期化処置時の卵巢所見について

尾形 康弘¹⁾ 日高 健雅¹⁾ 松重 忠美¹⁾ 磯部 直樹²⁾ 前田 照夫²⁾

(受付：平成 20 年 12 月 1 日)

Ovarian findings after estrus synchronization treatment for implantation of a fertilized embryo

YASUHIRO OGATA¹⁾, TAKEMASA HIDAKA¹⁾, TADAMI MATZUSHIGE¹⁾,
NAOKI ISOBE²⁾, and TERUO MAEDA²⁾

1) Hiroshima Prefectural Technology Research Institute Livestock Technology
Research Center 584, Nanatuka-cho, Shobara, Hiroshima 727-0023

2) Hiroshima University 1-4-4, Kagamiyama, Higashi-hiroshima, Hiroshima
739-8528

SUMMARY

To improve the conception rate after the implantation of fertilized embryos, the characteristics of estrus synchronization treatment in cows that received embryos were examined.

An experiment was conducted involving three kinds of conventional treatments: PG, Ovsynch, and CIDR synch.

The preovulatory follicle size, period of ovulation, size of the corpus luteum formed, and plasma progesterone level were measured.

As for the preovulatory follicle size, the two zones where the follicular wave was controlled were numerically slightly larger; however, no significant difference was noted.

Regarding the period of ovulation, ovulation was mainly observed at 30 hours after GnRH administration in the PG zone, and at 24 hours in the Ovsynch zone. For the CIDR synch zone, ovulation was frequently seen at the midpoint, i.e., at 24-30 hours.

The corpus luteum area tended to be larger for the Ovsynch zone, where ovulation occurs earlier. The plasma progesterone level was significantly higher in the 2 zones where the follicular wave was controlled, and functional corpus lutea were formed.

要 約

受精胚移植時の受胎率向上を目的として受胎牛の発情同期化処置とその特性について検討した。

1) 広島県立総合技術研究所 畜産技術センター (〒 727-0023 広島県庄原市七塚町 584)

2) 広島大学大学院生物圏科学研究科 (〒 739-8528 広島県東広島市鏡山 1-4-4)

通常利用されている、PG 処置、オブシンク処置及び CIDR シンク処置の 3 種類で実験を行った。

排卵前の卵胞の大きさ、排卵時期、形成された黄体の大きさ及び血漿中プロゲステロン濃度について測定した。

排卵前の卵胞の大きさについては、卵胞波を制御した 2 区が数値的にはやや大きくなっていたが有意差は無かった。

排卵時間については、PG 区は、GnRH 投与後 30 時間を中心として排卵が観察されたのに対し、オブシンク区は、GnRH 投与後 24 時間を中心として排卵が観察された。CIDR シンク区は、その中間の 24 ~ 30 時間後に排卵が集中していた。

黄体面積については、排卵時間の早いオブシンク区が最も大きい傾向にあった。

血漿中プロゲステロン濃度は、卵胞波制御の 2 区が PG 区よりも有意に高い値になっており、機能的な黄体形成がなされていた。

序 文

超音波画像診断装置の畜産分野への導入によって、卵巣内の卵胞動態がリアルタイムに解析できるようになった¹⁾。

この技術により、牛では卵胞波と呼ばれる特異な卵胞の消長があることが確認されるようになった^{2) 3) 4) 5)}。

これらの卵胞波を利用することで、発情だけでなく、排卵時期も同期化できる処置法が考案され、人工授精時の作業の効率化や受胎性の改善に役立っている⁶⁾。

牛の卵胞波を利用した排卵同期化法はオブシンク法⁷⁾がその代表的なものであり、世界中で広く利用されており、この原理を利用する薬剤や膈内への留置型プロゲステロン製剤を加えたもの、黄体退行物質の連続投与を行い同期化するものなど、様々な方法が考案されている^{8) 9) 10) 11) 12) 13)}。

従来行われていた、プロスタグランジン F2 α (PG) 投与による黄体退行では¹⁴⁾、排卵に至る卵胞の発育状態を制御することが不可能なため、PG 投与から発情発現までの期間にバラツキが大きかった¹⁵⁾。

卵胞波の解明により、主席卵胞を人為的制御することで、排卵時間を一定の時期に集中させることが可能となり、これを受精胚移植に応用する例が増加している¹⁶⁾。

しかしながら、定時人工授精のように画期的な受胎率の改善まで至っていない。

これらの原因として、同期化法によっては、受精胚の発育ステージと排卵後の黄体形成時期にずれを生じている事が考えられる。

これまで、発情同期化法の効果判定には、発情発現の有無、形成された黄体の形状や血中ホルモンの動態測定に主眼が置かれ^{17) 18)}、排卵時期や卵巣内卵胞の動態についてあまり観察されていない。

今回我々は、3 種類の代表的な発情同期化処置を行い、排卵時期や受精胚移植時の黄体形成との関連を調査することで、受精胚同期化法の改善点を見出すために実験を行った。

材料と方法

当センターに繋養している、ホルスタイン種未経産牛 (13 ~ 17 ヶ月齢) を延べ 36 頭を用いた。

超音波画像診断装置は、HS-1500 (本多電子) を用いた。

超音波画像診断は、PG (プロナルゴン F 6ml/頭: ファイザー製薬もしくはダルマジン 2ml/頭: 川崎三鷹製薬) 投与 7 日前の 1 回目の GnRH (ボンサーク注 1ml/頭: 第一製薬) 投与時と PG 投与時及び 48 時間後の 2 回目の GnRH 投与してから 6 時間後、24 時間後、30 時間後に行った。

また、黄体形成について、大きさの測定は排卵日を 0 日として 7 及び 8 日後に行った。

血漿中のプロゲステロン濃度測定用サンプルは、超音波画像診断と同時期に頸静脈から採血した。

採血した血液は、氷で冷蔵保管し、0°C にした冷却遠心器で 3,400rpm, 30 分間分離を行い、血漿のみを分離した。分離血漿は、測定まで -30°C で保管した。

血漿中のプロゲステロン濃度の測定は、酵素免疫測定法 (競合法) で 450nm の吸光度測定により行った。

受精胚移植は、ガラス化保存した体外受精胚を用い、排卵日を 0 日として、8 日目に頸管経由法で移植した。

妊娠鑑定は、超音波画像診断装置を用い、移植後 20 日以降で胎仔心拍の確認されたものを受胎とした。

成績

3種類の発情同期化処置法ごとの排卵時間は、PG区では、6時間以内0% (0/14頭)、24時間以内21.4% (3/14頭)、30時間以内64.3% (9/14頭)及び48時間以内14.3% (2/14頭)であった。オブシンク区では、6時間以内11.1% (1/9頭)、24時間以内55.6% (5/9頭)、30時間以内22.2% (2/9頭)及び48時間以内11.1% (1/9頭)であった。CIDRシンク区では、6時間以内0% (0/12頭)、24時間以内41.7% (5/12頭)、30時間以内50.0% (6/12頭)及び48時間以内8.3% (1/12頭)であった(表1)。

表1 発情同期化法と排卵時間の関係

試験区	供試頭数	排卵頭数	排卵時間			
			~6hrs	~24hrs	~30hrs	~48hrs
PG	14	14	0 (0.0%)	3 (21.4%)	9 (64.3%)	2 (14.3%)
オブシンク	10	9	1 (11.1%)	5 (55.6%)	2 (22.2%)	1 (11.1%)
CIDRシンク	12	12	0 (0.0%)	5 (41.7%)	6 (50.0%)	1 (8.3%)

排卵前の卵胞の面積は、PG区 (14頭) では、 $1.71 \text{ cm}^2 \pm 0.63$ 、オブシンク区 (10頭) では、 $1.86 \text{ cm}^2 \pm 0.63$ 、CIDRシンク区 (12頭) では、 $1.84 \text{ cm}^2 \pm 0.64$ であり、各実験区に有意差は認められなかった(表2)。

表2 発情同期化法ごとの排卵前の卵胞面積

試験区	供試頭数	平均卵胞面積 ± S.D.
PG	14	$1.71 \text{ cm}^2 \pm 0.63$
オブシンク	10	$1.86 \text{ cm}^2 \pm 0.63$
CIDRシンク	12	$1.84 \text{ cm}^2 \pm 0.64$

排卵後7日目及び8日目の黄体面積は、PG区 (13頭) では、7日目 $3.97 \text{ cm}^2 \pm 1.45$ 、8日目 $4.54 \text{ cm}^2 \pm 1.93$ 、オブシンク区 (9頭) では、7日目 $5.83 \text{ cm}^2 \pm 1.71$ 、8日目 $5.97 \text{ cm}^2 \pm 1.55$ 、CIDRシンク区 (12頭) では、7日目 $4.40 \text{ cm}^2 \pm 0.83$ 、8日目 $4.50 \text{ cm}^2 \pm 1.33$ であり、オブシンク区が7、8日ともに他の2区より有意に大きくなっていた(表3)。

表3 発情同期化法ごとの黄体面積の推移

試験区	供試頭数	排卵後日数	平均黄体面積 ± S.D.
PG	13	Day7	$3.97 \text{ cm}^2 \pm 1.45^b$
		Day8	$4.54 \text{ cm}^2 \pm 1.93^b$
オブシンク	9	Day7	$5.83 \text{ cm}^2 \pm 1.71^a$
		Day8	$5.97 \text{ cm}^2 \pm 1.55^a$
CIDRシンク	12	Day7	$4.40 \text{ cm}^2 \pm 0.83^b$
		Day8	$4.50 \text{ cm}^2 \pm 1.33^b$

※異符号間で有意差あり (P<0.05)

排卵後7及び8日目の血漿中プロゲステロン値は、

PG区 (13頭) では、7日目 $1.11 \text{ ng/ml} \pm 0.39$ 、8日目 $1.27 \text{ ng/ml} \pm 0.59$ 、オブシンク区 (9頭) では、7日目 $1.71 \text{ ng/ml} \pm 0.61$ 、8日目 $1.84 \text{ ng/ml} \pm 0.64$ 、CIDRシンク区 (12頭) では、7日目 $1.59 \text{ ng/ml} \pm 0.37$ 、8日目 $1.82 \text{ ng/ml} \pm 0.54$ でオブシンク区とCIDRシンク区がPG区に比べ有意に高い値を示していた(表4)。

表4 発情同期化法ごとの血漿中P値の推移

試験区	供試頭数	排卵後日数	平均P値 ± S.D.
PG	13	Day7	$1.11 \text{ ng/ml} \pm 0.39^b$
		Day8	$1.27 \text{ ng/ml} \pm 0.59^b$
オブシンク	9	Day7	$1.71 \text{ ng/ml} \pm 0.61^a$
		Day8	$1.84 \text{ ng/ml} \pm 0.64^a$
CIDRシンク	12	Day7	$1.59 \text{ ng/ml} \pm 0.37^a$
		Day8	$1.82 \text{ ng/ml} \pm 0.54^a$

※異符号間で有意差あり (P<0.05)

黄体形成率は、PG区 92.9% (13/14頭)、オブシンク区 90.0% (9/10頭) 及びCIDRシンク区 100% (12/12頭)で各区間に有意差は見られなかった(表5)。

表5 発情同期化法と黄体形成率の関係

試験区	供試頭数	形成頭数	黄体形成率
PG	14	13	92.9%
オブシンク	10	9	90.0%
CIDRシンク	12	12	100.0%

受胎率は、PG区 63.6% (7/11頭)、オブシンク区 66.7% (6/9頭) 及びCIDRシンク区 70.0% (7/10頭)で各区間に有意差は見られなかった(表6)。

表6 発情同期化法と受胎率の関係

試験区	供試頭数	受胎頭数	受胎率
PG	11	7	63.6%
オブシンク	9	6	66.7%
CIDRシンク	10	7	70.0%

考察

今回我々が行った実験では、卵胞波を調節しないPG投与区は、Savioが報告しているように¹⁵⁾卵胞が発育するまでに多少の時間的遅れを生じるため、排卵時間のピークが3つの中で最も遅いものとなっていた。

オブシンク法による卵胞波の制御では、排卵時間がGnRH投与後6時間以内に起きるものが11.1% (1/9頭)存在し、最も早い排卵時間のピークを示していた。この原因として、1回目のGnRH投与時に10mm

以上の GnRH に反応する卵胞が存在せず、黄体形成がなされなかったため、PG 投与時には、すでに黄体退行期に入っており、そのため発情及び排卵が早まると考えられている^{19) 20)}。

実際、山田もオブシンク法で同期化をかけた 1,538 頭のうち 64 頭 (4.2%) が途中で発情が発現したと報告²¹⁾ しており、今回の実験でもそれと同様の結果が示されていた。

オブシンク区に CIDR を加えた CIDR シンク区では、血漿中のプロゲステロン濃度を黄体期の半分量の 2ng/ml 程度で 9～12 日間保つことが可能であり²²⁾、今回我々もこの日数の範囲内で 7 日間留置をしており、PG 投与時まで黄体が存在しているのと同じ状態を作り出すことで、その後の LH サージの適正化によって、排卵時間が同期化されたと考えられる。

Hasler らは、供胚牛と受胚牛の発情同期化が 24 時間以上ずれると受胎率が低下すると報告²³⁾ しており、48 時間以内に排卵した PG 投与区の 14.3% (2/14 頭) とオブシンク区の 22.2% (2/9 頭) は、受胎率を低下させる原因となる可能性がある。

排卵直前の卵胞径については、有意差はなかったものの卵胞波を新生させた GnRH 投与の 2 区が PG 区と比較して 0.1cm² 以上大きくなっていった。

GnRH を投与してから 32 時間程度で主席卵胞が排卵することが報告されており⁶⁾、その後 4 日程度で出現した次の主席卵胞が PG 投与と 2 回目の GnRH 投与によってある程度の大きさになったと考えられる。

このことは、GnRH を投与された後、新たに選択された主席卵胞は、日増しに卵胞径が大きくなる²⁴⁾、また卵胞の大きさが大きくなると卵胞の LH レセプターが相対的に多くなる²⁵⁾ ことで形成された黄体の大きさは、卵胞内壁の顆粒層細胞の量によってその大きさが変化し、大きな卵胞で多くの顆粒層細胞を含むと大きな黄体になりやすいといわれており²⁶⁾、この実験結果でもこのような理由で、大きくなったと考えられる。

GnRH 投与によって卵胞波を新生し、排卵卵胞を大きくすることはその後の黄体形成に効果的に働く可能性がある。今回の試験でも、オブシンク区は卵胞及び形成された黄体面積が PG 区より大きくなっていった。

黄体の大きさについては、オブシンク区では有意に大きな黄体を形成し、血漿中プロゲステロン値も有意に高くなっていった。

CIDR シンク区については、血漿中プロゲステロン値は有意に高くなっていったが、排卵後 8 日目の黄体の大きさについては差がなく、今後例数を増やして関連を調べる必要がある。

これらの排卵同期化法を受精胚移植に利用する場合、大きな黄体を形成し、黄体機能も充実したオブシンク区が最も効果的に見えるが、排卵時間が他の 2 区より早く起きるため、その後の黄体発育が進み、結果として血漿中プロゲステロン値が高くなっている可能性

も否定できない。

この場合、供胚牛と受胚牛の移植のタイミングからすると胚盤胞期以降の進んだステージなどを移植しないと受胎率の向上につながらない可能性もある。

今回用いた移植胚は体外受精胚であり、体内受精胚と比較すると発育ステージが胚盤胞期より進んでおり、そのことが受胎率を低下させなかったのかもしれない。

実際、日高らは、移植に用いる受精胚のステージを体内と体外で変える必要があると報告している²⁷⁾。

排卵後の黄体日齢を基準に受胚牛を選定する場合、CIDR シンク区が最も排卵時間が同期化されており、かつ形成された黄体機能も高いことから、この方法を選択することで受胎率の改善ができるのではないかと考えられる。

文 献

- 1) Pierson, R. A. and Ginther, O. J.: Ultrasonography of the bovine ovary. *Theriogenology*. 21. 485-494 (1984)
- 2) Sirois, J and Fortune, JE: Ovarian follicular dynamics during the estrus cycle in heifers monitored by real-time ultrasonography. *Biol. Reprod.* 39. 308-317(1988)
- 3) Savio, J. D. et al: Pattern of growth of dominant follicles during the oestrus cycle in heifers. *J. Reprod. Fertil.* 83. 663-671(1988)
- 4) Ginther, O. J. et al: Composition and characteristics of follicular waves during the bovine estrus cycle. *Anim. Repr. Sci.* 20. 187-200(1989)
- 5) Ginther, O. J. et al: Selection of the dominant follicle in cattle. *Biol. Repr.* 55. 1187-1194(1996)
- 6) Pursley JR. et al.: Synchronization of ovulation in dairy cows using PGF2 α and GnRH. *Theriogenology*, 44, 915-923(1995)
- 7) Pursley, J. R. et al: Reproductive management of lactating dairy cows using synchronization of ovulation. *J. Dairy. Sci.* 80. 30-301-306(1997)
- 8) Moreira, F. et al: Effects of presynchronization and bovine somatotropin on pregnancy rates to a timed artificial insemination protocol in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 84. 1646-1659 (2001)
- 9) Geary, T. W. et al: Calf removal improves conception rates to the Ovsynch and CO-Synch protocols. *J. Anim. Sci.* 79. 1-4(2001)
- 10) Lamb, G. C. et al: Inclusion of intravaginal progesterone insert plus GnRH and prostaglandinF2 α for ovulation control in postpartum suckled beef cows. *J. Anim. Sci.* 79.

- 2253-2259(2001)
- 11) Stevenson, J. S. et al: Synchronizing estrus and(or) ovulation in beef cows after combinations of GnRH, norgestomet, and prostaglandinF2 α with or without timed insemination. *J. Anim. Sci.* 78. 1747-1758(2000).
 - 12) Kuroiwa, T. et al: Estrus synchronization and conception rate after progesterone releasing intervaginal device(PRID) treatment from the early luteal phase in heifers. *J. Repr. Dev.* 51. 669-673(2005)
 - 13) Ryan, D. P. et al: Comparison of oestrus synchronization regimens for lacting dairy cows. *Anim. Reprod. Sci.* 56. 153-168(1999)
 - 15) Savio, J. D. et al: Will the first dominant follicle of the estrus cycle of heifers ovulate following luteolysis on day? *Theriogenology.* 33. 677-687 (1990)
 - 16) 牛島仁ら：乳用種未経産牛を用いた受卵牛の効率的な発情同期化. *日畜会報.* 77 (1), 23-28 (2006)
 - 17) 久利生正邦ら：受胎牛の黄体形状と血中プロジェステロン値. *繁殖技術会誌.* 14. 181-184 (1992)
 - 18) Niemann, H. B. et al: Pregnancy rates relative to recipient plasma progesterone levels on the day of nonsurgical transfer of frozen/thawed bovine embryos. *Theriogenology*23. 631-639
 - 19) Thacher, W. W. et al: Practical manipulation of the estrus cycle in dairy animals. *Proc 31st American Association of bovine practitioners Annual Convention.* 34-50(1998)
 - 20) Moreira, F. et al: Effect of the estrus cycle at the initiation of a timed artificial insemination protocol on reproductive responses in dairy heifers. *J. Anim. Sci.* 78. 1568-1576(2000)
 - 21) 山田恭嗣：乳牛の繁殖成績向上のための新技術の応用. *J. Reord. Dev.* 47. 39-45(2001)
 - 22) Macmillan, K. L. and Peterson, A. J: A new intravaginal progesterone releasing device for cattle(CIDR-B)for oestrus synchronization, increasing pregnancy rates and the treatment of postpartum anoestrus. *Anim. Repr. Sci.* 33. 1-25(1993)
 - 23) Hasler, J. F. et al: Effect of donor embryo recipient interactions on pregnancy rate in a large scale bovine program. *Theriogenology.* 27. 139-168 (1987)
 - 24) Roberto Sartori et al: Follicular deviation and acquisition of ovulatory capacity in bovine follicles. *Biol. Reprod.* 65. 1403-1409(2001)
 - 25) H. A. Garverick et al: Regulation of expression of ovarian mRNA encoding steroidogenic enzymes and gonadotrophin receptors by FSH and GH in hypogonadotrophic cattle. *Reproduction.* 123. 651-661(2002)
 - 26) Milvae, R. A. et al: Bovine corpus luteum function after removal of granulosa cells from the preovulation follicle. *Domest. Anim. Endocrinol.* 8. 439-443(1991)
 - 27) 日高健雅ら：体外受精胚の移植適期について. 平成 20 年度日本産業動物獣医学会講演要旨 p31. (2008)

牛体外受精胚の移植適期について

日高 健雅¹⁾ 尾形 康弘¹⁾ 永井 武史¹⁾ 栗原 順三²⁾ 松重 忠美¹⁾

(受付：平成 20 年 12 月 1 日)

Optimum implantation time of an *in vitro*-fertilized bovine embryo

TAKEMASA HIDAKA¹⁾, YASUHIRO OGATA¹⁾,
TAKESHI NAGAI¹⁾, JUNZOU KURIHARA²⁾, and TADAMI MATSUSHIGE¹⁾

1) Hiroshima Prefectural Technology Research Institute Livestock Technology
Research Center 584, Nanatuka-cho, Shobara, Hiroshima 727-0023

2) Fukuyama Livestock Health & Hygiene Service Center, Hiroshima 396-1
Fukae, jyouge-cho, Fuchu, Hiroshima 729-3421

SUMMARY

The conception rate was examined while paying attention to the developmental stage of an *in vitro*-fertilized bovine embryo and synchronization of the age in days of the corpus lutea of cows that received embryos. *In vitro*- and *in vivo*-fertilized embryos were tested. Blastocyst-stage embryos on day 7 after fertilization were used as *in vitro*-fertilized embryos. A fresh or vitrified embryo was implanted. A slow-frozen embryo was implanted as an *in vivo*-fertilized embryo. The conception rate when an *in vitro*-fertilized fresh embryo was implanted showed no variation due to the different implantation days after estrus, while that when the vitrified embryo was implanted was higher on day 8 than on day 7: 81.1 and 50.0%, respectively. The conception rate of *in vivo*-fertilized embryos showed no variation due to the different implantation days: 60.7% on day 7 and 56.2% on day 8. These results indicate that the optimum implantation time varies with differences in the derivation of fertilized embryos and treatment. A cow that received a fertilized embryo on day 8 after estrus is considered to be suitable for implantation of an *in vitro*-fertilized embryo.

要 約

体外受精胚の発生ステージと受胎牛の黄体日齢の同期化に着目して受胎率を調査した。供試胚は、体外受精胚及び体内受精胚を用いた。体外受精胚は、媒精後7日目の胚盤胞期胚を用い、新鮮胚及びガラス化保存胚を移植した。体内受精胚は、緩慢凍結保存胚を移植した。体外受精胚では、新鮮胚を移植した場合の受胎率は、発情後の移植日の違いによる差はなかったが、ガラス化保存した胚を移植した場合、8日目81.1%に対し7日目50.0%と8日目の受

1) 広島県立総合技術研究所 畜産技術センター (〒727-0023 広島県庄原市七塚町 584)

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)

胎率が有意に高かった。体内受精胚の受胎率は、7日目 60.7%、8日目 56.2%と移植日の違いによる差は認められなかった。これらの結果から、受精胚の由来や処理の違いにより移植適期が異なると考えられた。また、体外受精胚移植には、発情後8日目の受胎牛が適していると考えられる。

序 文

体外受精胚移植は、和牛受精胚の低コスト生産技術としての位置づけから多くの研究機関において取り組まれてきた。その結果、技術の進展により高品質な体外受精胚が生産されるようになり、近年急速に現場普及が進んでいる。また、飼料価格の高騰などにより畜産経営が苦しい中、副産物収入の増加を図るため体外受精胚移植は急速に普及し始めている。しかし、受胎率を見てみると、体内受精胚の新鮮胚は50%程度、体内受精胚の凍結胚は45%程度で推移している。一方で体外受精胚の新鮮胚は約40%、凍結胚は35%程度で推移しており、新鮮胚移植の受胎率は、体外受精胚が10ポイント低くなっている(図1)。畜産経営において繁殖性の改善は生産コストを低減させる上で大きな課題であり、体外受精胚の受胎率向上に向けた技術的課題の解決が望まれている。

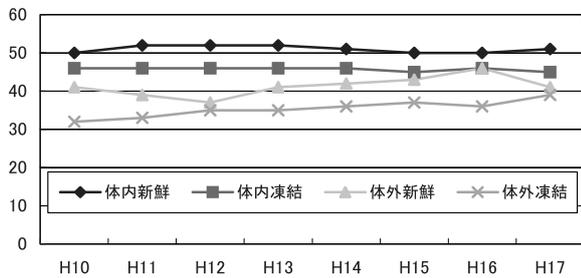


図1 受精卵移植の状態別受胎率の推移
資料：(社)中央畜産会調べ

今回、我々は課題解決法の一つとして発情同期化に着目した。発情同期化は、供胚牛と受胎牛の発情周期を揃えることをいい、発情周期が同期化されると受胎率が高いと報告されている^{1) 2)}。

一般的な同期化法(図2)は、体内受精胚の場合、供胚牛の発情日を0日目とカウントし、その日に人工授精、7日後に採胚を行い移植に供する。そのため、受胎牛も発情日を0日とカウントし、7日後に移植する。また、体外受精胚の場合、体外受精の実施日を0日とカウントし7日後に移植に供する。これらの同期化法では、一見受精胚と受胎牛の同期化されているように見える。

しかし、体内受精胚の場合、発情開始後約35時間後に排卵することから発情翌日に受精するが、体外受

精胚の場合は、体外受精の実施日に受精する。受精日を中心と考えてみると、体内受精胚の場合、受精日は発情周期1日目に相当する。そのため、同様に体外受精胚も受精日を1日とカウントすると、移植日には8日目となり受胎牛の7日目とずれが生じる(図2)。そこで今回、体外受精後7日目胚の移植適期を調査した。

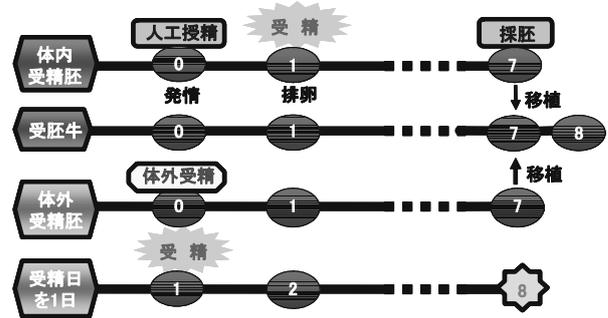


図2 受精卵移植における同期化法

材料と方法

1 体外受精胚の作出

未成熟卵子の採取は、当センターに繋養している黒毛和種及びホルスタイン種からの経膈採卵により行った。

経膈採卵は、超音波画像診断装置(アロカ社 SSD-1200)、経膈穿刺用7.5Mhzコンベックス探触子(アロカ社 UHT-9106-7.5)及び穿刺針(ミサワ社, COVA)を用いて行った。回収液は乳酸加リンゲル1000mlに3%牛胎仔血清(FCS)と1.8ユニット/mlのヘパリンNaを添加したものをを用い、吸引圧100mgHgにより未成熟卵子の回収を行った。と体卵巢からの吸引は、と体卵巢に存在する直径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。採取した牛未成熟卵子は、卵丘細胞の付着度及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%FCS、50ng/ml上皮成長因子(EGF)、0.12au/ml卵胞刺激ホルモン(FSH(川崎三鷹製薬:アントリン10))添加TCM199培地にて5%O₂・95%air条件下で22~24時間行った。

体外受精は、成熟培養後、当センターの常法³⁾に従

行った。凍結精液を用い、精子濃度は $6 \sim 12 \times 10^6/ml$ に調整して媒精を6時間行った。

体外培養は、媒精後72時間目までは3mg/ml BSA (Sigma A-4378) 及び0.25mg/ml リノール酸アルブミン (Sigma L8384) 添加 mSOF 培地にて、5% O₂・5% CO₂・90% N₂・38.5℃の条件下で培養し、72時間目以降は10% FCS 及び10μg/ml インスリン及び0.25mg/ml リノール酸アルブミン (Sigma L8384) 添加 mSOF 培地にて Vero 細胞との共培養⁵⁾を行った。

2 体内受精胚の作出

体内受精胚は、当センターに繋養している黒毛和種から採取した。過剰排卵処置は、供試牛の膈内に CIDR を7～9日間留置し、挿入後5～7日後から FSH (川崎三鷹製薬：アントリン R) 総量20AUを、一日目5AU/回、二日目3AU/回、三日目2AU/回で朝夕2回ずつ漸減投与して行った。過剰排卵処置3日目に PGF_{2a} (ファイザー：プロナルゴン F) を併行投与し更に二日後の朝に GnRH (明治製薬：ボンサーク) を投与、その日の夕及び翌朝に人工授精し、その7日後に採胚し移植に供した。

3 胚の凍結保存

体内受精胚は、緩慢凍結法を用いた。緩慢凍結液は、ダルベッコ PBS 溶液に10%エチレングリコール (和光純薬 054-00983)、0.1モルサッカロース (和光純薬 196-00015)、牛血清アルブミン (SigmaA-9647)、20% FCS を添加したものをを用いた。凍結液に受精胚を浸漬し、5分間平衡した後、-7℃のアルコールバス式プログラムフリーザーにセットし、2分後植氷し8分維持したのち、-0.3℃/min の冷却速度で-30℃まで緩慢冷却した。-30℃で10分間維持した後、液体窒素にストローを浸漬し凍結保存した。

体外受精胚は、マイクロドロップレット法によりガラス化保存した。ガラス化保存は、10%エチレングリコールと20% FCS 添加 TCM-199 (GIBCO) の前平衡液に受精胚を2分間浸漬した後、30%エチレングリコールと1.0モルサッカロースを添加した M2 液に30秒間浸漬したのち、液体窒素内に胚と共に滴下し、約5μlのドロップにして凍結保存した。融解は、0.3モルサッカロース添加 M2 液に90秒静置した後、20% FCS 添加 M2 液で3回以上洗浄し、mSOF 培地+10% FCS+0.25mg/ml リノール酸アルブミンで38.5℃、5% CO₂、95% air の条件下で Vero 細胞との共培養を行った。

4 受精胚移植

供試胚は、体外受精胚は体外受精後7日目の新鮮胚及びガラス化保存胚を用い、体内受精胚は緩慢凍結保存胚を用いた。

受胎牛は、発情後7日目及び8日目の未経産及び経産ホルスタイン種を用い、黄体側子宮角に頸管経由法により移植した。

妊娠診断は、発情後30日目前後に超音波診断装置を

用いて、胎仔心拍の確認により実施した。

5 調査内容

調査期間は2006年4月～2008年2月までの約2年間で、本県農林水産部が受胎率向上対策事業にて実施した成績も含む。調査内容は、移植供試胚の移植もしくは凍結直前の発育ステージの調査と、受胎牛の発情周期7日目と8日目の移植区の受胎率を比較調査した。

成 績

胚の発育ステージ調査では、人工授精から7日後の体内受精胚は、桑実期～早期胚盤胞期胚89.0%、胚盤胞期胚11.0%と桑実期～早期胚盤胞期胚が大半を占めた。体外受精から7日後の体外受精胚は、桑実期～早期胚盤胞期胚17.0%、胚盤胞期胚47.0%、拡張胚盤胞期胚36.0%と、胚盤胞期胚と拡張胚盤胞期胚が大半であり、体外受精胚の方が体内受精胚より発育ステージが進んでいた。(表1)

表1 胚発育ステージ調査

	後期桑実期～ 初期胚盤胞 (%)	胚盤胞期胚 (%)	拡張胚盤胞期胚 (%)
体内受精胚	234 (89)	28 (11)	0 (0)
体外受精胚	21 (17)	58 (47)	45 (36)

体内受精胚移植の受胎率は、7日目60.7% (82/135)、8日目56.2% (50/89)と有意差は認められなかったが、7日目が高い傾向を示した。(表2)

表2 体内受精胚の移植受胎率 (未経産牛へ移植)

胚の種類	黄体日齢	移植頭数	受胎頭数	受胎率 (%)
緩慢凍結胚	7	135	82	60.7
	8	89	50	56.2

未経産牛の体外受精胚移植の受胎率は、新鮮胚では7日目75.0% (6/8)、8日目74.1% (20/27)と差は無かったが、ガラス化胚では、7日目50.0% (13/26)、8日目81.1% (30/37)と8日目が有意に高い受胎率を示した(表3)。経産牛の場合、新鮮胚では7日目36.4% (4/11)、8日目87.5% (7/8)と8日目が有意に高い受胎率を示しており、ガラス化胚でも7日目33.3% (1/3)、8日目50.0% (7/14)と8日目が高い傾向を示した。(表4)

表3 体外受精胚の移植受胎率 (未經産牛へ移植)

胚の種類	黄体日齢	移植頭数	受胎頭数	受胎率 (%)
新鮮胚	7	8	6	75.0
	8	27	20	74.1
ガラス化胚	7	26	13	50.0 ^b
	8	37	30	81.1 ^a

異符号間に有意差有 (p<0.01)

表4 体外受精胚の移植受胎率 (経産牛へ移植)

胚の種類	黄体日齢	移植頭数	受胎頭数	受胎率 (%)
新鮮胚	7	11	4	36.4 ^b
	8	8	7	87.5 ^a
ガラス化胚	7	3	1	33.3
	8	14	7	50.0

異符号間に有意差有 (p<0.05)

考 察

発育ステージ調査では、発情後7日目の体内受精胚は、桑実期～初期胚盤胞期胚が89.0%、胚盤胞期胚が11.0%と桑実期胚～初期胚盤胞期胚が大半を占めていた。Lindnerら⁴⁾は、発情後7日目の体内受精胚の発育ステージは、桑実期～初期胚盤胞期胚70%、胚盤胞期胚23%、拡張胚盤胞期胚以降7%と報告しており、今回の我々の結果を支持するものであった。一方、体外受精から7日後の体外受精胚は、桑実～初期胚盤胞期胚が17.0%、胚盤胞期胚47.0%、拡張胚盤胞期胚36.0%と、胚盤胞期から拡張胚盤胞期胚が大半を占めており、体外受精胚の発育ステージが体内受精胚より進んでいた。

牛島ら⁵⁾は、体内受精胚と体外受精胚の日齢をそろえた(体内受精胚の排卵日を0日目とカウント)場合、排卵から7日目の体内受精胚(従来の8日目)と体外受精後7日目の体外受精胚の細胞数はほぼ同等であると報告している。これらのことから、体外受精後7日目の胚は、発情後8日目の体内受精胚と発育ステージがほぼ同様であると考えられた。

受胎率調査では、体外受精胚移植ではガラス化保存胚を移植した場合及び経産牛に移植した場合に、発情後8日目移植が7日目移植より高い受胎率を示した。ガラス化胚の経産牛への移植は例数が少ないことから有意な差は認められなかった。

牛の発情においては、発情開始数時間後から血中のLH濃度は急激に上昇し、5～10時間前後にピーク(LHサージ)に達し、LHサージ後約25時間後に排卵し、排卵後は数時間で受精することが知られている。

発情開始から約35時間後に排卵するため、発情日を0日と設定する現在の一般的な同期化方法では、排卵日つまり受精日は1日目とカウントされる。このように体内受精胚は受精日を1日とカウントするのに対し、体外受精胚は受精日を0日とカウントするため、受精日に体内受精胚と体外受精胚の間で1日ズレが生じている。体外受精胚も体内受精胚と同様に受精日を1日目とカウントすると、移植に供する日は8日目とカウントされ、発情後8日目の受胎牛と同期化していることになる。これらのことから7日目の体外受精胚は発情後8日目の受胎牛の子宮内環境と同調しているため、8日目移植の受胎率が高かったと考えられた。

以上の発育ステージ調査及び受胎率調査から、体外受精胚を移植する場合、受胎牛の発情周期は「体内受精胚の移植日+1日」が良いと考えられた。

今回、体内受精胚では7日目が高い受胎率を示したものの、8日目と有意差は無かった。これは、体内受精胚そのものの受胎性が高いことに加え、未經産牛の受胎性も高いため、発情周期のズレによる受胎率の低下を補ったためと考えられた。一方で、体外受精胚では、ガラス化保存した胚や経産牛へ移植した場合、受胎率が大きく低下しており、ガラス化保存胚や経産牛の受胎性が新鮮胚や未經産牛より劣っていることが示唆された。今後、ガラス化保存方法の更なる改善や、経産牛を受胎牛として用いる場合の栄養管理や選定方法の検討が必要と考えられた。

文 献

- 1) D. A. Coleman., et al.: Estrous Synchronization and Establishment of Pregnancy in Bovine Embryo Transfer Recipients., J Dairy Sci, 70, 858-866 (1987)
- 2) Hasler, J. F., et al.: Effect of Donor-embryo-recipient Interactions of Pregnancy rate in a Large-scale bovine embryo transfer program. Theriogenology 27:139 (1987)
- 3) 岩水正ら: ウシ体外受精胚の凍結保存, 広島県獣医学雑誌, 13, 59-62, (1998)
- 4) Lindner GM, Wright RW Jr.: Bovine embryo morphology and evaluation. Theriogenology, Oct; 20(4): 407-416 (1983).
- 5) Ushijima H., et al.: Transition of Cell Numbers in Bovine Preimplantation Embryos: In Vivo Collected and In Vitro Produced Embryos., J Reprod. Dev. 54: 239-243, (2008)

第一胃蠕動運動を指標とした大腸菌性乳房炎の鑑別診断法の検討

大下 克史 中谷 啓二 前田 陽平

(受付：平成 20 年 12 月 1 日)

Differential diagnostic study of coliform mastitis using peristaltic movement of the rumen as an indicator

KATSUFUMI OOSHITA, KEIJI NAKATANI, and YOUHEI MAEDA

Hatsukaichi Veterinary Clinic, Hiroshima P. F. A. M. A. A.

10-14 Honmachi, Hatsukaichi, Hiroshima 738-0015

SUMMARY

Thirty-eight cases of G (-) *bacilli* and 23 cases of other bacterial infection were detected on tests for causative organisms in 61 cases of peracute mastitis, which occurred on dairy farms within the same jurisdiction. The causative bacteria detected were classified into G (-) *bacilli* and other bacteria to conduct a correlation analysis for various items. The results suggested a strong correlation only with "peristaltic movement of the rumen." LV1, with arrested peristaltic movement of the rumen, strongly suggests mastitis caused by G (-) *bacillus*. Therefore, the treatment strategy of choice is primarily based on non-antibiotic treatment. LV2 or above, where persistent peristaltic movement can be heard for 5 seconds or longer, represents a mixture of mastitis caused by G (-) *bacillus* and one caused by other bacteria. Therapy primarily based on non-antibiotic treatment was considered to be feasible.

要 約

管内の酪農家で発生した甚急性乳房炎 61 例の原因菌の検索を行ったところ、G (-) 桿菌 38 例とその他の菌 23 例が検出された。検出された原因菌によって G (-) 桿菌群とその他の菌群に分類し各種項目について相関分析を行った結果、強い相関がみられた項目は「第一胃蠕動運動」のみであった。第一胃蠕動運動が停止している LV1 であれば G (-) 桿菌による乳房炎である可能性が極めて高いため、選択される治療方針は非抗生物質療法を中心としたものになる。5 秒以上の持続的な蠕動運動を聴取できる LV2 以上では G (-) 桿菌による乳房炎とその他の菌による乳房炎が混在するが、抗生物質療法を中心とした治療を展開することが可能であると考えられた。

はじめに

大腸菌性乳房炎は増殖したグラム陰性桿菌 (G (-) 桿菌) が崩壊する際に放出されたエンドトキシンが全身性炎症性反応症候群 (SIRS) を誘発することにより、症状が重篤化すると言われている。本症においては、症状が劇的に変化し死亡する例も少なくなく、回復しても罹患乳房の泌乳停止あるいは全乳房の泌乳停止となり、飼養価値を失うことが多い。治療方法は、抗生物質投与による医原性 SIRS の誘発が懸念されるため、原因菌やエンドトキシンの排除を目的とする非抗生物質治療が選択される。²⁾ 一方、症状が甚急性であっても G (-) 桿菌以外の原因菌による乳房炎が含まれていることがわかっており、これらに対しては適切な抗生物質の投与が必要である。

しかしながら実際の臨床現場では原因菌の同定を行うことは不可能で、病態ステージも様々であることから、治療方法の選択で混乱が生じているのが現状である。そこで今回、甚急性乳房炎に陥った牛の多くに第一胃蠕動運動の減退が認められることに着目し、これと原因菌との関連について調査、G (-) 桿菌による乳房炎を判断できる材料となりうるかどうか検討したので概要を報告する。

材料と方法

平成 19 年 3 月から平成 20 年 9 月までの間に当家畜診療所管内の酪農家 14 戸で発生し、診療獣医師により甚急性乳房炎と診断されたホルスタイン種乳用牛のうち、原因菌の検索を行った 61 頭。

初診時、罹患乳房の乳汁を採材して細菌学的検査を行うとともに、44 頭については頸静脈より採血し血液生化学的検査を行った。臨床検査として体温、乳房・乳汁の状態、第一胃蠕動運動の程度を記録した。

細菌学的検査は血液寒天培地、DHL 培地、110 培地で 37°C 24 ~ 48 時間好気培養を行った。

血液生化学的検査は自動血球計数器、血液自動生化学分析装置を用いて測定した。

臨床検査において乳房は硬結があるかないか、乳汁は透明か白色かで分類した。

第一胃蠕動運動は 60 秒間聴診し、次のように分類した。

LV1: 第一胃蠕動運動が停止、あるいは 5 秒未満の断片的な蠕動運動しか聴取できない。

LV2: 収縮力は弱い、5 秒以上の持続的な蠕動運動を聴取できる。

LV3: 収縮力は中程度で持続的な蠕動運動を聴取。

LV4: 力強い収縮と連続した蠕動運動を聴取。

検出された原因菌によって G (-) 桿菌群とその他の菌群に分類し、各種項目についてカテゴリーデータ同士は独立係数により、カテゴリーデータと数量デー

タについては相関比によって相関分析を行った。

成績

細菌学的検査の結果、G (-) 桿菌群 38 例 (Klebsiella pneumoniae 22 例, Enterobacter cloacae 5 例, Escherichia coli 2 例, Pseudomonas cepacia 1 例, G (-) 桿菌 (未同定) 8 例) とその他の菌群 23 例 (Staphylococcus aureus 8 例, レンサ球菌 6 例, 表皮ブドウ球菌 4 例, 酵母様真菌 3 例, Bacillus mycoides 1 例, G (+) 桿菌 (未同定) 1 例) に分類された。牛用大腸菌不活化ワクチンの接種率は G (-) 桿菌群が 47.4%, その他の菌群が 52.2% で統計学的有意差を認めなかった。

血液生化学的検査の結果 (図 1, 2), 白血球数 (WBC) は G (-) 桿菌群 29.4 ± 32.9 (平均値 \pm 標準偏差, 以下同じ) $\times 10^2/\mu\text{L}$, その他の菌群 $41.7 \pm 21.1 \times 10^2/\mu\text{L}$ で相関比は 0.040 だった。赤血球数 (RBC) は G (-) 桿菌群 $710.0 \pm 95.3 \times 10^4/\mu\text{L}$, その他の菌群 $679.1 \pm 87.1 \times 10^4/\mu\text{L}$ で相関比は 0.026 だった。血球容積 (HCT) は G (-) 桿菌群 $36.2 \pm 5.5\%$, その他の菌群 $34.4 \pm 5.3\%$ で相関比は 0.026 だった。血小板数 (PLT) は G (-) 桿菌群 $26.9 \pm 11.1 \times 10^4/\mu\text{L}$, その他の菌群 $32.9 \pm 11.6 \times 10^4/\mu\text{L}$ で相関比は 0.062 だった。血液尿素窒素 (BUN) は G (-) 桿菌群 $18.9 \pm 5.6\text{mg/dL}$, その他の菌群 $15.1 \pm 3.0\text{mg/dL}$ で相関比は 0.126 だった。総ビリルビン量 (T-Bil) は G (-) 桿菌群 $0.6 \pm 0.5\text{mg/dL}$, その他の菌群 $0.6 \pm 0.6\text{mg/dL}$ で相関比は 0.0003 だった。リン (P) は G (-) 桿菌群 $4.4 \pm 2.0\text{mg/dL}$, その他の菌群 $4.2 \pm 1.9\text{mg/dL}$ で相関比は 0.004 だった。カルシウム (Ca) は G (-) 桿菌群 $7.9 \pm 1.3\text{mg/dL}$, その他の菌群 $8.5 \pm 0.8\text{mg/dL}$ で相関比は 0.059 だった。トランスアミナーゼ (GOT) は G (-) 桿菌群 $94.3 \pm 38.1\text{U/L}$, その他の菌群 $139 \pm 153\text{U/L}$ で相関比は 0.050 だった。γ-グルタミルトランスフェラーゼ (γ-GTP) は G (-) 桿菌群 $29.3 \pm 14.3\text{U/L}$, その他の菌群 $33.7 \pm 21.2\text{U/L}$ で相関比は 0.016 だった。

臨床検査の結果、初診時体温は G (-) 桿菌群 $40.2 \pm 0.9^\circ\text{C}$, その他の菌群 $40.5 \pm 1.0^\circ\text{C}$ で相関比は 0.031 だった (図 3)。乳房は「硬結あり」が 41 頭中 G (-) 桿菌群 26 頭 (63%), その他の菌群 15 頭 (37%), 「硬結なし」が 20 頭中 G (-) 桿菌群 12 頭 (60%), その他の菌群 8 頭 (40%) で独立係数は 0.033 だった。乳汁は「透明」が 27 頭中 G (-) 桿菌群 19 頭 (70%), その他の菌群 8 頭 (30%), 「白色」が 34 頭中 G (-) 桿菌群 19 頭 (56%), その他の菌群 15 頭 (44%) で独立係数は 0.148 だった。

第一胃蠕動運動は LV1 が 18 頭中 G (-) 桿菌群 18 頭 (100%), その他の菌群 0 頭 (0%), LV2 が 26 頭中 G (-) 桿菌群 13 頭 (50%), その他の菌群 13 頭

(50%), LV3 が 17 頭中 G (-) 桿菌群 7 頭 (41%), その他の菌群 10 頭 (59%), LV4 が 0 頭で独立係数は 0.509 だった. LV1 と LV2 以上の 2 つのカテゴリーに分類した場合は 0.503 だったが, LV2 以下と LV3 以上に分類した場合は 0.271 だった.

G (-) 桿菌群で LV1 の死産率は 13/18 頭 (72.2%) で, LV2 は 2/13 頭 (15.4%), LV3 は 0/7 頭 (0%) だった. LV1 に対し抗生物質療法, 非抗生物質療法, 前 2 者の併用療法を施したものの死産率は, それぞれ 2/3 頭 (67%), 8/9 頭 (89%), 3/6 頭 (50%) だった. LV2 以上の場合は 0/10 頭 (0%), 2/3 頭 (67%), 0/7 頭 (0%) だった.

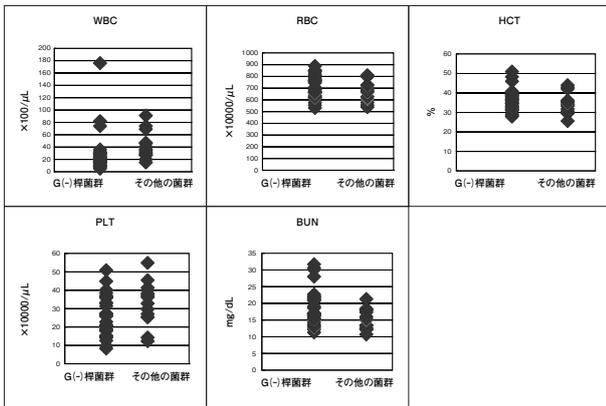


図1 血液生化学的検査結果 1

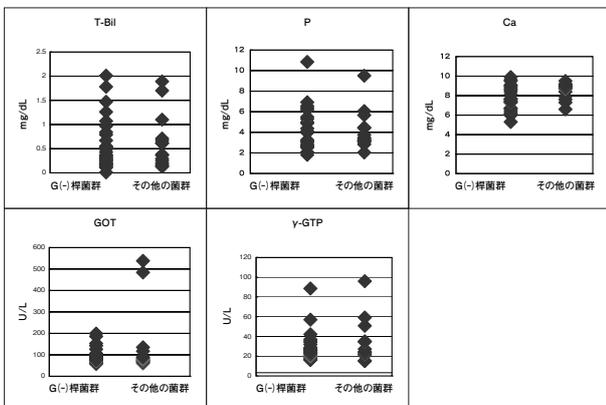


図2 血液生化学的検査結果 2

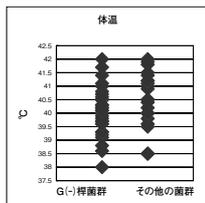


図3 臨床検査結果 (体温)

考 察

臨床型乳房炎を発症した牛が確認された場合, その重症度を判定するためにいくつかの方法と基準が確立されている. 使用される基準は, 客観的で迅速で実施が容易で誰にでも反復可能でなければならない. Wenzらは大腸菌性乳房炎に対する分類方法のうち, 全身症状を基準とする方法が最も識別力があり, 管理と治療の決定において役立つと考えている. このうち第一胃の収縮力の評価は臨床型乳房炎の重症度を示す重要な指標であり, 重度の大腸菌性乳房炎症例の大部分は, 第一胃収縮力の減弱あるいは第一胃弛緩症を呈している.¹⁾

今回臨床症状から甚急性乳房炎と診断された牛のうち G (-) 桿菌によるものは 62.3%, その他の菌によるものが 37.7% で, 治療方針を決定する上でこれらを識別する必要があると考えられた.

各種検査項目について G (-) 桿菌群とその他の菌群で相関分析を行った結果, 強い相関がみられた項目は「第一胃蠕動運動」のみであった.

第一胃蠕動運動は相関分析結果から LV1 と LV2 以上に分類される. LV2 以上を客観性の低い収縮力によって細かく分類することは再現性に乏しく, 必要ないと思われた.

LV1 であれば G (-) 桿菌による乳房炎である可能性が極めて高い. このため選択される治療方法は非抗生物質療法を中心としたものになる.

LV2 以上では G (-) 桿菌による乳房炎とその他の菌による乳房炎が混在し, これらを鑑別する方法は今のところわからない. しかし LV2 以上の症例については, G (-) 桿菌による乳房炎に抗生物質を使用しても病態の悪化が認められたものは少なく, 死産事故に結びつく症例は認められなかったため, 抗生物質療法を中心とした治療を展開することが可能であると考えられた.

今回の第一胃蠕動運動の評価方法は, 誰でも判断可能な客観的な方法で, LV1 を判断することで, 抗生物質を投与することによる病態の悪化を防止することができる. 第一胃蠕動運動の聴診は日常診療で行われていることであり簡単に実施でき, 治療方法を選択する上での確かな判断を現場で行うことが可能である. さらに慣れれば畜主でも識別可能であり, 大腸菌性乳房炎の初期対応の改善が期待され死産事故低減の一助となるものと思われる.

謝 辞

細菌学的検査を行っていただきました広島県芸北家畜保健衛生所, 広島県畜産技術センターの諸先生方に深謝いたします.

文 献

- 1) Jerry R. Roberson: Mastitis, Sears PM, Wilson DJ ed., Vet Cli North Am Food Anim Pract. ウシの乳房炎, 田口 清 鈴木一由 佐藤 薫 訳, 202-204, 獣医輸液研究会・大動物臨床研究会, 北海道 (2004)
- 2) 村西俊明 吉川三男 沼山尚哉ら: 家畜診療, 53 巻 6 号, 333-340 (2006)

血便を呈した急性コクシジウム症に対する デキサメサゾン投与効果の検討

黒 瀬 智 泰

(受付：平成 20 年 12 月 1 日)

Study on the effects of dexamethasone administration in acute coccidiosis accompanied by bloody stools

TOMOYASU KUROSE

Shoubara Veterinary Clinical Center, P. F. A. M. A. A
2-21-20, Nishihonmachi, Shoubara, Hiroshima 727-0013

SUMMARY

Acute coccidiosis is accompanied by marked hemorrhage. Its symptoms often progress to pseudomembranous enteritis, which results in death or maldevelopment and complicates treatment. We recognized the importance of the anti-inflammatory and immunosuppressive effects of adrenocortical hormone and examined the effects of dexamethasone in acute coccidiosis accompanied by bloody stools. Treatment outcomes were examined employing medical records and compared among patients who received 0.02 mg/kg dexamethasone (Dex) or nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) along with the conventional treatment, or the conventional treatment alone at the initial visit. Blood tests were conducted for the Dex group; acute-phase proteins, i.e., haptoglobin (Hp), α_1 acid glycoprotein (α_1 AG), and ceruloplasmin (Cp), were measured as inflammatory markers. The treatment results for the Dex group were better than those for the other two groups. Inhibiting immune overreaction by Dex administration could markedly suppress tissue damage and pseudomembrane formation, facilitating stronger therapeutic effects than the conventional methods and NSAIDs administration exhibiting strong anti-inflammatory effects. Symptoms at the initial visit included a decrease in the WBC count and increases in Hp and cortisol. However, cases detected earlier showed no marked increase in Hp, whose symptoms did not progress so markedly in spite of severe hemorrhage. Therefore, early Dex administration was considered to be effective for cases showing no increase in acute-phase proteins.

要 約

急性コクシジウム症は出血が顕著で、偽膜性腸炎へ病態が進行し死亡あるいは発育不良となり、治療に大変苦勞する例が多い。そこで、副腎皮質ホルモンの抗炎症作用、免疫抑制作用に着目し、血便を呈したコクシジウム症に対して急性期におけるデキサメサゾン投与効果を検討した。初診時に従来の治療に加えて、デキサメサゾン (Dex) 0.02mg/kg を投与した症例と非ステロイド系抗炎症薬 (NSAIDs) を使用した症例、従来の治療をした症例について診療カルテから治療成績を調査し比較した。また、Dex 群では血液検査を実施し、炎症マーカーとして急性期蛋白であるハプトグロビン (Hp), α_1 酸性糖蛋白 (α_1 AG), セルロプラスミン (Cp) を測定した。Dex 群は他の2群と比べて治療成績は良好であった。Dex 投与により免疫過剰反応を抑制することで、組織の損傷や偽膜形成を顕著に抑えることができ、従来法や抗炎症作用の強い NSAIDs 投与よりも治療効果を認めた。初診時の病態は白血球数の減少、Hp およびコルチゾールの上昇が見られたが、早期発見された症例では Hp は顕著に上昇しておらず、重度の出血にもかかわらず病態がそれほど進行していないため、急性期蛋白が増加していない早期の Dex 投与が効果的であると考えられた。

序 文

急性コクシジウム症は出血が顕著で粘血便として見られる場合が多く、重篤な場合、偽膜性腸炎へと病態が進行し、出血や怒責が長期間続き便秘様となり死亡する症例や回復しても下痢が慢性化し発育不良となる症例が多い¹⁾。そのため、治療に時間を要し苦勞してきた経験は少なくはない。コクシジウム症の急性期には腸粘膜の炎症により重度の組織破壊、出血が起こっており²⁾、現在、一般に行われている抗菌剤のみの治療では炎症の組織反応を抑制できず、偽膜を形成させてしまうと考えられる。そこで、今回、副腎皮質ホルモンの抗炎症作用と、さらに免疫抑制作用に着目し、血便を呈したコクシジウム下痢症子牛に対して急性期にデキサメサゾン (以下 Dex) を投与し、その効果を検討した。また急性期蛋白濃度の測定により病態の進行を推定し、より効果のある投与時期を調査した。

材料と方法

1. 供試牛

2007年2月から2008年2月までに広島県内において初診時から重篤な血液水様便を呈し、糞便検査によりコクシジウム陽性であった日齢90日以内の子牛28頭 (平均 37.5 ± 15.6 日齢) を調査対象とした (写真1, 2)。なお、全症例は治癒した。

2. 試験方法

初診時の治療法と治療成績との関係を検討するため、初診時に従来通りのサルファ剤によるコクシジウム治療に加えて Dex 0.02mg/kg を静脈内あるいは皮下に投



写真1 血便を呈した黒毛和種子牛



写真2 重度の血便

与した症例（以下 Dex 群）と、初診時に従来のコクシジウム治療に加えてフルニキシン製剤（以下 NSAIDs）2mg/kg を静脈内に投与した症例（以下 NSAIDs 群）、従来通りの治療をした症例（以下対照群）の3群に分類し、それぞれについて診療カルテから出血経過日数、治療経過日数、診療回数を調査し比較した。試験区分と供試牛を表1に示した。

表1 試験区分と供試牛

	Dex 群	NSAIDs 群	対照群
例数	6	9	13
発病日齢	37.7 ± 7.4	37.2 ± 18.4	37.5 ± 17.4
	平均値 ± S.D.		

3. 血液検査

Dex 群は病態把握のため初診時と Dex 投与翌日に血液検査を実施した。検査内容としてヘマトクリット値 (Ht)、血漿総蛋白濃度 (TP)、白血球数 (WBC) および百分比、血糖値 (Glu)、また一元放射免疫拡散法 (各種ウシプレート;メタボリックエコシステム研究所) によりハプトグロビン (Hp)、 α_1 酸性糖蛋白 (α_1 AG)、セルロプラスミン (Cp)、コルチゾールの測定を行った (表2)。

表2 検査項目および方法

臨床検査	一般臨床所見	
血液生化学検査	Ht	毛細管法
	TP	屈折計法
	WBC	自動血球計算機
	百分比	血液塗抹標本鏡検
	Glu	臨床化学自動分析装置
	Hp α_1 AG Cp	一元放射免疫拡散法
ホルモン測定	コルチゾール	自動蛍光酵素免疫測定装置 SPOTCHEM VIDAS

また、Dex 投与時期（第1, 2および3病日）と治療成績を検討するため急性期蛋白濃度との関係を検討した。

成 績

1. 初診時の治療法と治療成績の関係

出血経過日数は Dex 群が 1.7 ± 0.8 日で NSAIDs 群 2.7 ± 1.5 日、対照群 3.1 ± 3.8 日に比べ短い傾向にあったが有意な差は認められなかった。治療経過日数は Dex 群が 4.2 ± 3.1 日で NSAIDs 群 13.1 ± 7.5 日、対照群 9.5 ± 11.3 日に比べて有意 (それぞれ p<0.05) に短かった。治療回数は Dex 群が 2.5 ± 0.8 回で NSAIDs 群 4.8 ± 1.8 回、対照群 4.5 ± 4.0 回に比べて有意 (それぞれ p<0.05) に少なかった (図1)。なお、Dex 群の初診時の血液水様便と Dex 投与翌日の劇的に

改善した糞便を写真3に示した。

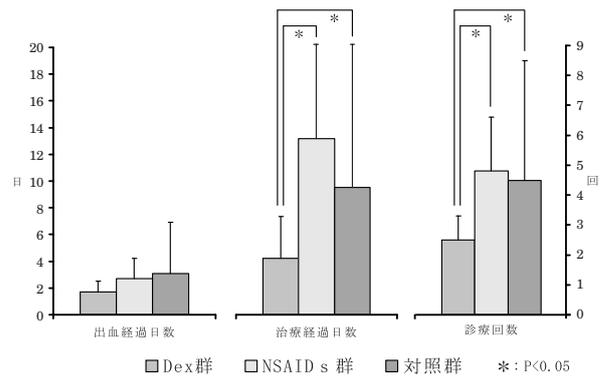


図1 試験区分別治療成績



写真3 Dex 投与前 (初診時) と Dex 投与翌日の糞便 (症例3)

2. 血液検査成績

出血性腸炎における初診時の病態は白血球数の減少、とくに好中球割合の減少、Ht およびコルチゾールの上昇が認められたが、Dex 投与の翌日は投与前に比べて好中球割合の増加に伴う白血球数の増加、Glu の上昇、コルチゾールの低下が認められた。しかし、これらの項目で有意な差は認められなかった。リンパ球割合で有意な減少がみられた。急性期蛋白濃度については、同症状の出血を呈している初診時においても、顕著に増加している症例と全く出現していない症例が混在していた。Hp は Dex 投与前 (初診時) 535.6 ± 396.8 μg/ml とすでに増加しており、投与後も 514.8 ± 723.9 μg/ml と変化は認められなかった。 α_1 AG は投与前 151.2 ± 68.6 μg/ml、投与後 193.6 ± 79.7 μg/ml、Cp は投与前 11.0 ± 24.6 μg/ml、投与後 308.4 ± 401.9 μg/ml であり、投与後に有意な増加が認められたが、い

ずれも正常範囲内での変化であった (表 3)。

表 3 初診時および Dex 投与後における血液検査

検査項目	初診時 (Dex 投与前) n=5	第 2 病日 (Dex 投与後) n=5	有意差 P < 0.01	
Ht	%	44.8 ± 6.8	40.0 ± 3.2	
WBC	/μl	6600.0 ± 1953.2	11720.0 ± 7040.4	
Neut	%	25.6 ± 29.8	41.4 ± 21.8	
Lym	%	73.6 ± 29.1	55.2 ± 22.7	*
Mon	%	0.8 ± 1.1	3.2 ± 4.1	*
TP	g/100ml	7.3 ± 0.6	7.3 ± 0.4	*
Glu	mg/100ml	107.8 ± 14.5	154.2 ± 42.5	
Hp	μg/ml	535.6 ± 396.8	514.8 ± 723.9	
α ₁ AG	μg/ml	151.2 ± 68.6	193.6 ± 79.7	*
Cp	μg/ml	11.0 ± 24.6	308.4 ± 401.9	*
Cortisol	μg/100ml	30.9 ± 10.9	< 20 (注)	

平均値 ± S.D. 注) 5 例全てで測定下限値 20 μg/100ml 以下

3. Dex 投与時期別治療成績と急性期蛋白濃度の関係

急性期蛋白濃度は第 1 病日で Hp のみ上昇しており、第 2 病日に Hp がさらに顕著な上昇が認められたが、α₁AG、Cp は明らかな変動が見られなかった。また、Dex 投与時期は第 1 病日での投与が最も良好な治療成績を示しており、第 2、3 病日と Dex 投与時期が遅れると治療成績が悪化する傾向が認められた。(図 2)

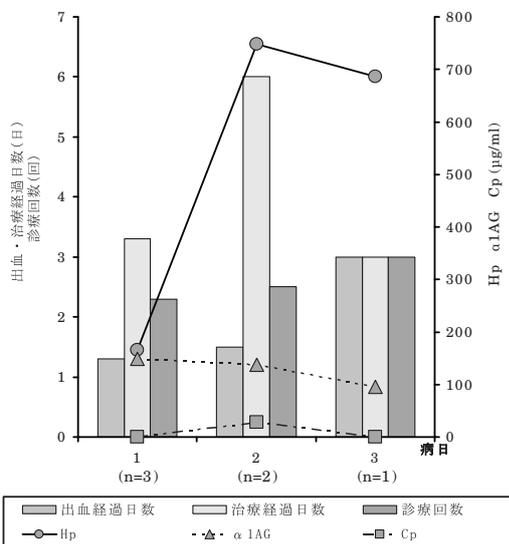


図 2 Dex 投与時期別治療成績と急性期蛋白濃度の変化

考 察

感染症などで見られる組織反応は種々の免疫担当細胞や炎症性サイトカインが出現・活動し、炎症、組織の損傷が起こり、その修復過程で組織の繊維化が進行する³⁾。コクシジウム症でも同様な反応が起こっている

と思われる。感染自体を抑えても偽膜形成が進行していると考えられる。NSAIDs はシクロオキシゲナーゼを抑制してプロスタグランジンの産生を抑制する⁴⁾ 抗炎症作用の強い治療薬である。しかし、デキサメサゾン はホスホリパーゼ A2 を抑制しアラキドン酸合成を抑制するだけでなく、さらに白血球の炎症性サイトカイン産生と遊離、白血球の炎症部位への移動、線維芽細胞の増殖やコラーゲン沈着などを抑制する⁴⁾ 抗炎症作用に加えて免疫抑制作用を有する治療薬である。今回、重篤な血液水様便を呈した急性コクシジウム症に対して、従来のサルファ剤による治療法や抗炎症作用の強い NSAIDs 投与よりもステロイド剤である Dex を投与することで良好な治療成績が得られた。これは Dex の抗炎症作用と免疫抑制作用が強力に総合的に働き、炎症部位における免疫過剰反応を抑制する³⁾ ことで、コクシジウム症による組織の損傷や偽膜形成を顕著に抑えることができたためと考えられ、偽膜性腸炎への伸展、慢性化を予防できると推察した。

また、同症状の出血性腸炎における初診時の血液検査値に大きく個体差が見られた。これは、同じ血液水様便でも病態の進行具合は異なっており、症状のみではより具体的な病態把握は困難であることが示唆された。

生体が侵襲を受けたとき 1～2 時間で血清中に出現する初期反応物質として内因性発熱物質、白血球内因性メディエーターあるいはリンパ球活性化因子などとされる IL-1 や TNFα があり、その後炎症刺激後数時間から 24 時間以降に、肝臓で合成され、血清中に増加する後期反応物質が Hp や α₁AG、Cp などの急性期蛋白である^{5) 6)}。発病初期には重度の出血にもかかわらず急性期蛋白濃度は上昇しておらず、病態は前者の初期反応物質が活動している時期と考えられ、炎症性サイトカインを抑制できる Dex 投与が効果的であり、急性期蛋白が出現していない、より早い段階での投与が有効であると示唆された。

急性期蛋白は医学や小動物医療領域では病態の推定やその後の治療方針、予後判定などの指標に使用されており、病態の進行具合により種類や出現時期、ピーク値、消失時期が変動する。今回測定した急性期蛋白は初期に変動する Hp、中期の α₁AG、後期の Cp の変動する時期の異なる 3 種類であり、出現モデル図を図 3 に示した⁷⁾。これらを組み合わせて測定することにより病期の推定が可能であると思われたが、本研究において発病後、顕著に変化したのは Hp のみであり、今後検討の余地があると思われた。しかし、Hp の上昇する前に Dex による早期治療ができた症例では治療成績が良好であったことから、Hp の測定は意義があるものと考えられた。

ステロイドの適応は広く、非常に効果があり、安価であることから、優れた薬剤であるが、易感染など副作用がある^{3) 8)}。これらを考慮し原因治療は並行して

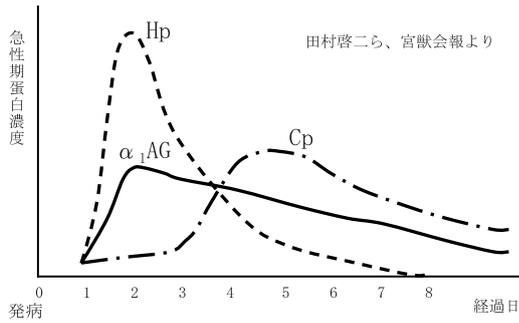


図3 急性期蛋白 (acute phase proteins ; APP)

実施する必要があると思われる。

文 献

- 1) 福本真一郎：新版主要症状を基礎にした牛の臨床，前出吉光，小岩政照監修，初版，326～330，デーリイマン社，札幌（2002）
- 2) 志村亀夫：コクシジウム症－今，現場で何が起きているのか－，家畜診療，15（4），13～17（1997）
- 3) 市川陽一，大島久二：感染症における副腎皮質ステロイド薬適正使用指針，市川陽一編，初版，12～64，医薬ジャーナル社，大阪（2001）
- 4) Cynthia R. L. Webster, DVM, DACVIM：図解動物臨床薬理学，小久江栄一監訳，第1版，62～65，118～119，メディカルサイエンス社，東京（2003）
- 5) 藤瀬浩：家畜の急性期蛋白の臨床診断指標としての有用性，日獣雑誌，45，731～737（1992）
- 6) 全国農業共済協会：臨床検査要領，66～71，東京（2007）
- 7) 小峰健：牛の炎症性疾患における急性期蛋白測定 of 解釈，家畜診療，49（1），31～35（2001）
- 8) 入江充洋：ステロイド剤マスター講座 臨床でステロイドを使いこなすために，CAP，22（8），15～21（2007）

地方病性牛白血病リンパ腫による，幽門部狭窄を認めた一症例

沖田 美紀¹⁾ 森下 政憲²⁾ 秋田 真司²⁾

(受付：平成 20 年 12 月 5 日)

A case of pyloric stenosis caused by enzootic bovine leukosis

MIKI OKITA¹⁾, MASANORI MORISHITA²⁾, and MASASHI AKITA²⁾

1) Sera Veterinary Center, Hiroshima P. F. M. A. A 837-5, Hongou, Sera-cho, Sera-gun, Hiroshima722-1112

2) Higashihiroshima Veterinary Center, Hiroshima P. F. M. A. A 284-1, Inaki, Takaya-cho, Higashihiroshima-shi, Hiroshima 728-0013

SUMMARY

A cow presenting vomiting as a predominant symptom was encountered. It was diagnosed with pyloric stenosis of the abomasum due to lymphoma caused by infection with leukemia virus based on anatomicopathological and histopathological findings and an antibody test. The abomasum, besides the heart and liver, is a common site of leukemic lymphoma. It seemed necessary to note the presence of obstruction caused by a mass formed in the abomasum as an important leukemic finding.

要 約

嘔吐を主症状とする牛に遭遇，病理解剖所見，病理組織所見および抗体検査により，白血病ウイルスの感染・発症のため形成されたリンパ腫による第四胃幽門部狭窄と診断された。第四胃は心臓および肝臓とともに白血病性リンパ腫の好発部位である。白血病の重要所見として，第四胃に形成された腫瘤による通過障害を考える必要があると思われた。

はじめに

牛白血病は大きく地方病性白血病と散発型白血病とに分けられる。地方病性牛白血病の場合，牛白血病ウイルスがリンパ球に感染し，異型細胞が全身各臓器に移動，腫瘤を形成する。しかし，ウイルス感染牛の多くは臨床的症状を示さない非白血性牛で，長期にわたる潜伏期を経てリンパ腫を形成するが，その割合は感

染した牛の1%以下といわれている^{1) 2) 3)}。今回，嘔吐と食欲不振，第一胃内のガス貯留を主症状とする牛に遭遇し，原因が，白血病ウイルスの感染・発症のため形成されたリンパ腫による第四胃幽門部狭窄と診断されたので，その概要を報告する。

1) NOSAI 広島世羅家畜診療所 (〒 722-1112 広島県世羅郡世羅町大字本郷 837-5)

2) NOSAI 広島東広島家畜診療所 (〒 739-2106 広島県東広島市高屋町稲木 284-1)

材料と方法

1. 発生農家の概要

飼養形態：フリーバーン

飼料給与方法：TMR + 乾草

飼養頭数：成乳牛 186 頭，育成乳牛 19 頭

飼養牛舎：搾乳牛と未経産牛を別棟飼育

授精方法：未経産牛は和牛雄 1 頭と混在飼育（現在は、人口授精実施），経産牛は人工授精実施

2. 発症牛

ホルスタイン種，雌，平成 11 年 8 月 15 日生れ，平成 19 年 3 月 11 日分娩，平成 19 年 12 月 23 日最終人工授精実施。

3. 稟告

平成 20 年 1 月 30 日，食欲なく嘔吐す。

4. 臨床経過

第 1 病日：体温 38.5℃，一胃運動微弱，一胃内にガス軽度貯留，直腸検査では異常を認めず，体表リンパ節は軽度腫脹していた。

第 2 病日：カウサッカー試みるも，嘔吐がひどく実施できず。

第 7 病日：左肋間部にてピング音を聴取したため，右臍部を切開したが，第四胃底～幽門部にかけて脂肪壊死様の塊を触知し，同塊による幽門部狭窄を認めた。

第 10 病日：屠殺

検査成績

1. 血液検査所見

発病の約 100 日前と，第 6 病日および開腹手術実施後の第 9 病日の血液検査所見を表 1 および 2 にまとめた。白血球数はすべての採血時において増加していた。また，幽門部狭窄が原因と考えられる GGT 値の上昇（第 6 病日 41.8IU/L），および LDH 値（第 6 病日 5,830IU/L）の上昇を認めた。

表 1 血液検査所見-1

	- 106 日	第 6 病日	第 9 病日
RBC (×104/ul)	694	747	905
ヘマトクリット	32.1	34.5	41.8
ヘモグロビン	10.3	11.8	
WBC (ul)	14300	29700	47300
TP (g/dl)	8.0	7.0	7.8
Glu (mg/dl)	NT	46	62
T-Bil (mg/dl)	NT		
NEFA	NT	1376.9	1781.4

表 2 血液検査所見-2

	- 106 日	第 6 病日	第 9 病日
T-cho (mg/dl)	192	160	172
BUN (mg/dl)	15.5	18.5	32.5
AST (U/L)	67	187	259
GGT (U/L)	18.5	41.8	70.5
ALP (U/L)	NT	37.8	69.4
CPK (U/L)	NT	307	599
LDH (U/L)	NT	5830	7560

2. 白血球検査所見

- 1) ゲル内沈降反応：平成 17 年 5 月 23 日採血，陽性
- 2) 間接赤血球凝集反応：平成 20 年 2 月 8 日採血，4,096 倍
- 3) PCR 法：平成 20 年 2 月 8 日採血，ウイルス遺伝子検出
- 4) 白血球分画：平成 20 年 2 月 7 日採血，リンパ球 93%，好中球 7%，異型リンパ球を認めた。

3. エコー所見

開腹時に触知した塊のエコー所見は，反射の強い高エコーの部分と黒く見える低エコーの部分の混在していた。（写真 1）



写真 1

4. 病性鑑定

1) 病理解剖所見

体表面および体腔内のリンパ節に著しい変化はなく，第四胃，心臓，小腸，結腸および横隔膜にさまざまな大きさの腫瘤を認めた。第三胃はバスケットボール大に腫大，第四胃内には第一胃内と同質の内容物が充満していた。

第四胃粘膜から筋層にかけて，厚さ 1～4cm の白色髄様を呈する腫瘤が浸潤していた。正常な四胃粘膜は認められず，潰瘍が散見された（写真 2）。

心房内および心室内の心膜下には小豆～母指頭大の腫瘤が散在していた。また，腸間膜の脂肪組織の中にくるみ大の腫瘤が数個認められたが直腸検査では触知できない位置であった。

2) 病理組織所見

写真 3 は第四胃の弱拡大の組織所見で，リンパ芽球様腫瘍細胞が，粘膜筋板から筋層にかけて浸潤増



写真2

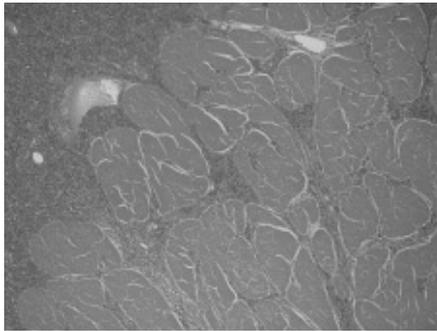


写真3 第四胃の弱拡大

殖していた。腫瘍細胞は大小不同で異型性に富んでいた。

5. 最終分娩後の乳量の推移

平成19年3月に分娩後、同年10月までは約30kg/日の泌乳量を認めたが、発症直前の乳量は3.5kg/日に減少していた。各産次の補正乳量は、全産次を通じ約1万kgであった。

まとめ及び考察

今回、1症例について発表したが、本農場で、同時期に同様の症状を呈す症例が他に2症例あった。これら3症例に共通していたのは、第一胃内のガス貯留、

捻粉様の糞便、ピングテスト陽性の所見であった。ただしピング音は、一胃内に貯留していた液体およびガスが原因となり聴取されたもので、実際開腹してみると第四胃の変位は認められなかった。これらの症例では清書でいわれている白血球数の著しい増加、体表および体腔内リンパ節の腫脹、発熱は認められなかった。特徴的な所見は、第四胃に形成された腫瘍による通過障害であった。白血病性リンパ腫の好発部位は、第四胃および心臓、あるいは肝臓で、第四胃にリンパ腫が形成された場合、幽門部狭窄による通過障害を生じる場合がある¹⁾。よって、通過障害の所見を考えに入れておく必要がある。また、過去の白血病抗体検査結果より本農場の白血病感染率は約40%である。そのうち今回3頭の発症は、3%を越えた発症率となる。2年間で感染・発症したと考えられる症例もあり、今後の対応として、毎年白血病の検査を実施し、感染の拡大を防止していく必要があると考えられた。

謝 辞

と殺解体所見を提供していただきました、広島市食肉衛生検査所の諸先生方に深謝いたします。

文 献

- 1) 岡田幸助：牛白血病の病理発生からみた拡大防止対策，家畜診療，55，2，101～107（2008）
- 2) 岡田幸助：牛白血病発生の仕組み－病態の進行に関与する因子－，臨床獣医，26，2，10～14（2008）
- 3) 小沼操：BLV感染と病態発現，臨床獣医，22，3，10～14（2004）

フリーバーン農場におけるサルモネラ症対策

部屋 智子 日高 英子

(受付：平成 20 年 12 月 5 日)

Measures against salmonellosis in a free stall barn

TOMOKO HEYA and HIDEKO HIDAKA

Bihoku Livestock Health & Hygiene Service Center Hiroshima Prefecture
1-4-1, Higashi-honnmachi, Shobara, Hiroshima 727-0011

SUMMARY

Salmonellosis caused by *Salmonella typhimurium* (ST) had occurred in adult cows and suckling calves in a dairy farm since the beginning of June 2005, where about 270 adult cows were fed in free stall barn. Measures for decontamination were taken. As a result, some effects, such as a decrease in diarrhea and negativity for ST isolation in all adult cows, were achieved. However, diarrhea caused by ST was still observed in the suckling calves. For this reason, inoculation with *Salmonella* vaccine and disinfection of the feeding facilities and cowhouses were improved as new measures. The mortality rate of the suckling calves was consequently lowered, and ST was no longer isolated on bacterial tests of diarrheal stools.

要 約

平成 17 年 6 月上旬から、成牛約 270 頭をフリーバーン牛舎で飼養する酪農家において *Salmonella Typhimurium* (ST) による成牛及び哺乳子牛のサルモネラ症が発生し、清浄化対策を実施してきた。その結果、成牛においては、下痢症の減少、ST 分離全頭陰性等、一定の効果を示したが、哺乳子牛においては ST による下痢症の発生を引き続き認めた。そのため、新たな対策として、サルモネラワクチンの接種と飼養施設及び牛舎消毒の改善を行ったところ、哺乳子牛の死亡率は減少し、下痢便の細菌検査からも ST は分離されなくなった。

序 文

近年、牛のサルモネラ症は、発生件数、発生規模ともに多発傾向にある。その要因として、牛の広範囲かつ複雑な流通、飼養頭数の増加、飼養管理状況の変化などが挙げられる。特に、重症例では死に至ることもあり、経済的損耗は大きい。また、汚染農場においては常在化する傾向が強く、清浄化が困難であるといわれている^{1) 2) 3)}。

当所管内の成牛約 270 頭を飼養する酪農家において、平成 17 年 6 月上旬から、*Salmonella* Typhimurium (ST) による成牛及び哺乳子牛のサルモネラ症が発生し、清浄化対策を実施してきた。その結果、成牛においては、下痢症の減少、ST 分離全頭陰性等一定の効果を示したが、哺乳子牛においては ST による下痢症の発生を引き続き認めた。そのため、母牛に対するサルモネラワクチンの接種等、新たな対策を実施したところ、一定の成果を得たのでその概要を報告する。

農家概要

発生農家はフリーバーン方式で、成牛約 270 頭を 7 群に分けて飼養している。哺乳・育成牛は約 50 頭飼養しており、月齢に応じて単飼又は群飼を行っている。導入は県外が主体で、年平均約 50 頭を導入している。

発生状況

平成 17 年 6 月、成牛 13 頭に水様性下痢及び水様性鼻汁が認められ、1 週間以内に全牛群にまん延し、平均乳量が 15% 減少した。その 1 週間後には別牛舎で飼養している哺乳子牛 9 頭にも同様の症状を認めたため、病性鑑定を 4 回実施した。

サルモネラの分離は、糞便材料に対し 10 倍量のハーナテトラチオン酸塩培地を加え、37℃、24 時間増菌培養後、1 白金耳量を Novobiocin (20 µg/mL) 添加 DHL 寒天培地で 37℃、24 時間分離培養した。分離し

た菌について、サルモネラを疑うものは、純培養後、Api20E (シスメックス・ビオメリュー株) で生化学的性状を検査するとともに、サルモネラ診断用免疫血清により O 及び H 抗原を決定した後、相誘導用免疫血清により H 抗原の 2 相を行い、血清型別を行った。

その結果、成牛 14 頭中 7 頭、哺乳子牛 4 頭中 3 頭から ST を分離した。また、成牛 1 頭中 1 頭から、*Clostridium perfringens*(C.p) を、8 頭中 2 頭から *Pasteurella multocida*(P.m) を、5 頭中 1 頭から *Pasteurella trehalosi*(P.t) を分離し、5 頭中 2 頭で RS ウイルス (RS) 抗体価の上昇を認めた。コロナウイルスの関与は認められなかった。(表 1)。

農場内の ST 浸潤状況を確認するため成牛 222 頭全ての糞便検査を実施したところ、搾乳牛 205 頭中 13 頭 (6%) から ST を分離した。中でも、分娩直後 (30 日以内) の牛は、24 頭中 6 頭 (25%) と高率であった。乾乳牛 17 頭からの分離は認めなかった。飲水からは、5 箇所中 1 箇所から ST を分離した (表 2)。

表 2 S.T 浸潤状況

対象	分離状況
搾乳牛	13/205 : 6%
(分娩直後の牛)	6/24 : 25%
乾乳牛	0/17 : 0%
飲水	1/5
分離数 / 検体数	

これらの結果から、農場内に ST が高度に浸潤していると考え、サルモネラ対策として、1. 当農場で過去に ST が発生した時に効果のあった混合飼料 (乾燥酵母細胞壁) を成牛・哺乳子牛へ給与、2. 清掃・消毒の徹底、3. 哺乳牛舎の新設、併せて呼吸器病対策として成牛へ呼吸器病ワクチンの接種を行った。

対策実施後、平成 17 年 11 月に成牛全頭の、平成 19 年 2 月に各群から抽出した成牛の糞便検査を実施したところ、全頭 ST 分離陰性だったため、サルモネラ症は沈静化したと考えられた。しかし平成 17 年 9 月及

表 1 病性鑑定結果

1 成牛

実施日	P.m	P.t	RS	S.T	C.p	コロナ	症 状
H17.6.9	1/5	1/5	2/5	—	—	0/5	分娩直後の搾乳牛群 13 頭が発熱、水様性鼻汁、水様性下痢を発症
H17.6.13	1/3	0/1	—	—	—	—	高泌乳牛群において、発熱、水様性鼻汁、水様性下痢がまん延
H18.6.16	—	—	—	1/1	1/1	—	全牛群にまん延、乾乳牛 3 頭死亡
H18.6.22	—	—	—	6/13	—	—	症状の改善無し

分離頭数 / 検査頭数

2 哺乳子牛

実施日	S.T	ロタ	E.Coli	症 状
H18.6.22	3/4	1/4	0/4	別牛舎で飼養中の哺乳子牛 9 頭が水様性下痢を発症

分離頭数 / 検査頭数

び10月、哺乳子牛で下痢症が継続的に発生し病性鑑定を実施したところ、7頭中2頭からSTを分離した。また、平成18年3月、新しい哺乳牛舎が完成し哺乳子牛を導入したが、7ヵ月後にはSTによる下痢症を認めた。

新たな対策

このことから、平成17年に行った対策の問題点について検討し、新たな対策を実施した。

1. サルモネラ感染予防の強化

問題点として、平成17年11月の検査では成牛全頭の排菌は認められなかったものの、哺乳子牛ではサルモネラ症が続発することから、成牛の間欠的排菌、特に、分娩前後の母牛において排菌していることが考えられた。また、農場に分娩房が無く、成牛舎で分娩していることから、哺乳子牛へのサルモネラの感染が容易におきていたと考えられた。しかし、農場の構造上、分娩房の新設は困難であったため、対策として、哺乳子牛の免疫付与と母牛の排菌量減少を目的に、成牛へサルモネラワクチンを接種した。ワクチンの接種は、平成19年3月から開始し、乾乳に入った分娩2ヶ月前の牛に1ヶ月間隔で2回接種した。

また、免疫付与をより確実にするため、初乳給与方法を改善した。初乳はワクチン接種済みの母牛由来、初乳計で比重1.050以上を確認したものを給与した。給与方法は、生後6時間以内に1回目を給与することを徹底した。

2. 飼養施設及び牛舎の消毒について改善

平成18年3月、新しい哺乳牛舎が完成し使用を開始した。哺乳子牛は、分娩後すぐに哺乳牛舎に移動したが、新設哺乳牛舎使用直後から子牛の下痢による死亡が発生した。平成18年10月、病性鑑定より5頭中5頭からSTを分離した事より、哺乳牛舎内でSTがまん延していると考えられた(表3)。STがまん延した原因として、当時、哺乳牛舎内で金属性高床式単房を使用していたが、これが保温性に欠けていた事、また床に固定されていたため十分に消毒できていなかった事が考えられた。また、哺乳子牛は早期に群飼へ移行していたため、子牛間でのまん延防止も不十分であった。このことから、哺乳牛舎内でのサルモネラ症のまん延を確実に防止するため、飼養施設及び牛舎の消毒について改善した。

(1) 飼養施設の改善

対策前：哺乳牛舎で単飼し、その後、育成牛舎へ移動して群飼した。移動日齢は14日齢が目標だったが、下痢を発症した個体は移動日齢を遅らせていたため、実際は平均21日齢で移動していた(図1)。

対策後：別の哺乳牛舎を新設し、14日齢以降も引き続き単飼することとした。育成牛舎への移動は、離乳後の50日齢とした(図1、写真2)。これによ

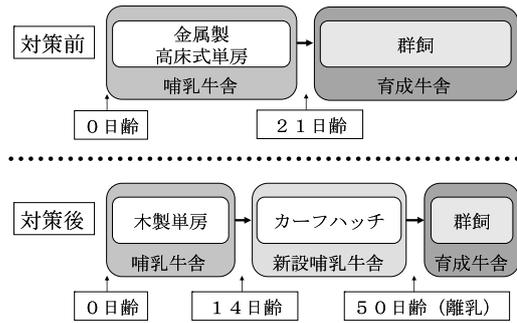


図1 飼養施設の改善

て、離乳までの間、個体管理をするようにした。

哺乳牛舎で使用する単房は、対策前に使用していた金属性高床式単房を木製単房に変更した(写真1)。高床式は水はけが良い反面、床下の風通しがよいため牛床の保温性に欠けていた。また、牛舎内に固定されていたため移動することが不可能で、洗浄消毒が不十分であった。対策後の木製単房は床下の通気が無く、移動可能なものとした。

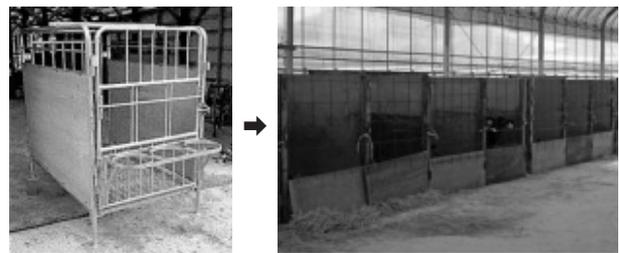


写真1 飼養施設(14日齢まで)

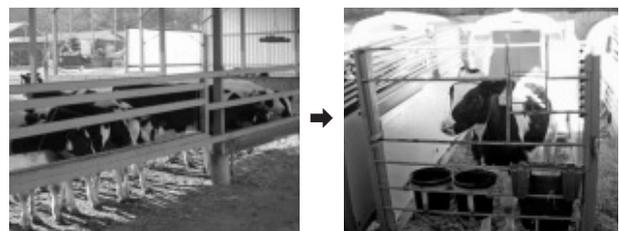


写真2 飼養施設(14日齢以降)

(2) 牛舎の消毒

平成19年3月、哺乳牛舎を1ヶ月間空舎にし、牛舎内の物品を全て外に出し、壁、床等を洗浄し乾燥させた後、石灰乳を塗布した。単房の定期的消毒については、対策前後とも哺乳子牛が移動した後、逆性石鹼を用いて行っていた。消毒間隔については、対策前は、状態の悪い哺乳牛を14日齢以上になっても群飼に移動することが出来なかったため、平均で21日間、長いものは70日間と不定期であった。しかし、対策後は、14日齢以上の子牛は全て新設哺乳牛舎に移動させるため、14日毎に必ず分解、洗浄及び消毒し、床へ石灰乳を塗布する事とした。

成 績

今回行った対策の効果検証として、子牛の死亡状況の調査及び下痢症の病性鑑定を実施した。子牛の死亡状況の調査は、農場の飼養管理リスト及び家畜共済死産事故記録を調査した。下痢症の病性鑑定は、サルモネラ属菌、大腸菌 (K88, K99)、ロタウイルス抗原、クリプトスポリジウムについて検査を実施した。

1. 子牛の死亡状況

平成 18 年 1 月から平成 19 年 9 月までの、14 日齢以内での哺乳子牛の死亡率は、多いときで 60% を越えたが、対策後の平成 19 年 3 月以降は、死亡率が 0% で推移している。なお、平成 18 年 4 月の死亡率の増加は、出生頭数の急激な増加による飼養環境の悪化のため、9、11 月の増加は暑熱や寒冷感作等のストレスのためと考えられた (図 2)。

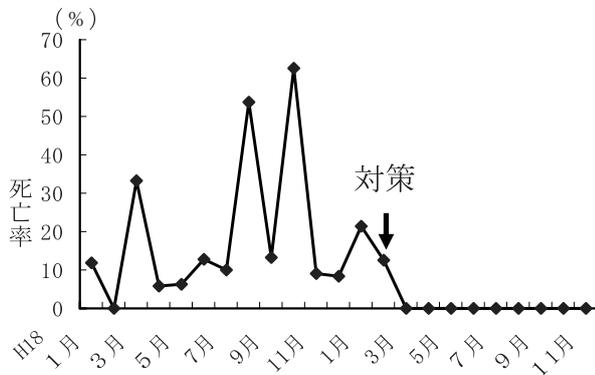


図 2 死亡状況 (14 日齢以内)

2. 哺乳子牛の下痢症の病性鑑定結果

下痢症の病性鑑定は、平成 17 年 9 月～平成 20 年 4 月の間に 11 回実施した。主な症状は、水様性下痢又は血便で、衰弱が激しく起立不能を呈す牛も認められた。

E.coli は、階段希釈した糞便材料を DHL 寒天培地で 37℃、24 時間培養した。

病性鑑定結果は、対策前の 6 回では、23 頭中 10 頭から ST を、15 頭中 2 頭から *E.coli* を分離した。分離した *E.coli* は、定着因子について、コロニーをミンカ培地で培養し市販の K88, K99, 987P の各抗血清 (デンカ生研) を用い凝集反応で確認した。その結果、1 頭は K99, 他の 1 頭は K88 陽性であった。対策後の 5 回は、ST, *E.coli*, ロタウイルス共に 17 頭全頭分離陰性であった。なお、平成 20 年 4 月 11 日に実施した 3 頭については、クリプトスポリジウムの寄生についても検査したが、オーシストは確認されなかった (表 3)。

まとめ及び考察

子牛のサルモネラ症は、6 ヶ月齢以下の子牛で流行的に発生し、急性～慢性の経過を取る。特に 1 ヶ月齢以下の子牛が ST に感染した場合、症状も激しく死亡率も高い。また、完全に回復するのに 2 週から 1 ヶ月を要し、その間、発育が阻害される⁴⁾。今回対策を行った酪農家は、年間を通じて、導入牛によって常に外部からサルモネラ属菌を持ち込む危険性を抱えている。成牛の排菌については、フリーバーンという飼養形態からモニタリングが困難なため、常時確認することは難しかった。更に牛舎内に分娩房が無く牛群内で出産するため、常に新生子牛への感染の危険性があった。実際、当農場で、哺乳子牛が下痢を発症する日齢は非常に早く、生後数日で発症する例が殆どであり、衰弱死する個体も多く見られた。

しかし、母牛へのワクチン接種後は、哺乳子牛に軽度の下痢症の発生はあるものの、14 日齢以内で死亡する哺乳子牛は認められず、下痢便からも ST は分離されなくなった。

また今回、初乳を初乳計で確認したことにより、比

表 3 下痢症の病性鑑定結果

実施日	S.T	<i>E.coli</i>	ロタウイルス	クリプトスポリジウム	日齢および症状
H17.9.20	1/1	0/1	0/1	—	4 日齢, 水様性血便
H17.10.20	1/1	0/1	0/1	—	16 日齢, 血便
H18.4.10	0/5	1/5 ^{*1}	0/5	—	2～13 日齢, 水様性下痢
H18.10.6	4/4	1/4 ^{*2}	0/4	—	1～9 日齢, 水様性下痢, 泥状便
H18.10.16	1/1	—	—	—	10 日齢, 死亡
H19.3.13	3/11	0/4	0/4	—	4～50 日齢, 泥状便, 軟便
H19.5.21	0/4	0/4	0/4	—	2～10 日齢, 黄色水様性下痢, 軟便
H19.8.22	0/2	0/2	0/2	—	7, 8 日齢, 黄色水様性下痢, 軟便
H19.9.19	0/3	0/3	0/3	—	47～50 日齢, 黄色水様性下痢, 軟便
H19.11.30	0/5	0/5	0/5	—	3～113 日齢, 黄色水様性下痢, 軟便
H20.4.11	0/3	0/3	0/3	0/3	3～44 日齢, 黄色水様性下痢, 軟便

*1 K99 陽性

*2 K88 陽性

分離頭数/検査頭数

重の高い初乳だけを給与することが出来た。これにより、ワクチンにより付与された移行抗体をより多く含む初乳を哺乳子牛へ給与出来たため、サルモネラ症の予防が可能となったと考えられた。

併せて、単飼する期間を延長して離乳まで個体管理を可能にしたことで、サルモネラ症のまん延を防止できたと考えられた。

また、哺乳牛舎に空舎期間を設け、徹底した洗浄・消毒を行ったことで、牛舎内に高度に蓄積していたSTを減少させ、牛舎を清浄にすることが出来たと考えられた。さらに、使用する単房も、21日間隔から14日間隔で定期的に、かつ牛舎外へ出して、十分に洗浄消毒したことにより、サルモネラ汚染のレベルを常に低く保てるようになったと思われる。

以上の事から、感染予防の強化だけでなく、飼養環境の改善もサルモネラ症対策に不可欠であると考えられた。

これらの対策によって哺乳子牛の死亡率は減少した

ものの、現在でも軽度の下痢の発症を認めている。これらの下痢症については、病性鑑定の結果、サルモネラ属菌、大腸菌、ロタウイルス、クリプトスポリジウムは分離陰性のため、暑熱・寒冷対策等の飼養管理失宜が原因と思われる。このため、今後は、飼養管理について更なる対策の継続・改善等が必要と考えている。

参 考 文 献

- 1) 中村政幸：成牛のサルモネラ症，家畜診療，45，139-151 (1998)
- 2) 矢田谷 健：牛サルモネラ症の発生状況と対策について，動薬研究，60，28～42 (2000)
- 3) 菊池 実：サルモネラ症の衛生管理対策，臨床獣医，18 (4)，46-49 (2000)
- 4) 橋本 和典：サルモネラ症，牛病学 (第2版)，294-299，近代出版，東京 (1980)

オナモミ中毒が疑われた肉用繁殖牛の死亡事例

玉野 光博¹⁾ 保本 朋宏²⁾ 平井 潤思¹⁾ 萬城 守郎³⁾ 久保 盛恵⁴⁾

(受付：平成 20 年 12 月 5 日)

Death cases of breeding beef cows, for which cocklebur poisoning was suspected

MITSUHIRO TAMANO¹⁾, TOMOHIRO YASUMOTO²⁾, JUNJI HIRAI¹⁾, MORIO BANJOU³⁾, and MORIYOSHI KUBO⁴⁾

- 1) Geihoku Livestock Health & Hygiene Service Center, Hiroshima Prefecture 4-12-1, Kabe, Asakitaku, Hiroshima 731-0221
- 2) Bihoku Livestock Health & Hygiene Service Center, Hiroshima Prefecture 1-4-1, Higashihonmachi, syoubara, Hiroshima 727-0011
- 3) Fukuyama Livestock Health & Hygiene Service Center, Hiroshima Prefecture 396-1, Fukae, Jyouge-cho, Fuchu, Hiroshima 729-3421
- 4) Hiroshima city Agriculture Forestry and Fishery Livestock Center 8-30-12, Fukawa, Asakita-ku, Hiroshima 739-1751

SUMMARY

In October, 2007, in a Japanese Black Cattle breeding farmhouse, 4 breeding cows suddenly developed astasia and neurological symptoms, and died after several hours. Weeds growing on abandoned cropland, mixed with a large amount of cocklebur seeds (150 g/kg), was fed to the breeding cows 3 days before the symptoms developed. On examination, 21-55 g/kg of cocklebur seeds was found in the ruminal contents of the 3 dead cows. Blood biochemical tests demonstrated an impaired liver function and a marked decrease in the blood sugar level (GOT \geq 1,000 IU/L or above; Glu <20 mg/dL) in the 3 dead cows. Histopathological tests demonstrated liver fragility and diffuse centrilobular necrosis accompanied by severe congestion. The results strongly suggested poisoning due to the intake of cocklebur seeds. However, no definite diagnosis could be made since no reference standard of the poisonous component of seeds (carboxyatractyloside) was available. To adsorb the toxic component, about 500 g of active carbon was orally administered for 2 days to the cows. Subsequently, no cow presented symptoms of poisoning. Thus, the oral administration of active carbon was considered to be an effective measure.

1) 広島県芸北家畜保健衛生所 (〒 731-0221 広島県広島市安佐北区可部 4-12-1)

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) 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)

4) 財団法人広島市農林水産振興センター (〒 739-1751 広島県広島市安佐北区深川 8-30-12)

要 約

平成 19 年 10 月、黒毛和種繁殖経営農家において、繁殖牛 4 頭が突然、起立不能、神経症状を呈し、数時間後に死亡する事例が発生した。飼養牛には、発症前の 3 日間に多量 (150g/kg) のオナモミ種子が混入した耕作放棄地の雑草が給与され、死亡牛 3 頭の第 1 胃内容物に 21 ~ 55g/kg のオナモミ種子が確認された。血液生化学検査により、死亡牛 3 頭に肝機能障害及び血糖値の著しい低下 (GOT 1000IU/L 以上, Glu 20mg/dl 未満) が認められた。病理組織検査において、肝臓の脆弱化、重度のうっ血を伴う慢性小葉中心性壊死が認められた。病性鑑定の結果から、オナモミ種子摂取による中毒を強く疑ったが、種子の有毒成分 (カルボキシアトラクティロシド) の標準品がないため、確定診断には至らなかった。有毒成分の吸着を目的に、1 頭あたり約 500g の活性炭を 2 日間経口投与したところ、中毒症状を示す牛は認められなくなり、活性炭の経口投与が有効な対処法と考えられた。

はじめに

メキシコ原産の帰化植物であるオオオナモミ (以下オナモミ) は、日本各地に自生している 1 年草で、その種子には有毒成分であるカルボキシアトラクティロシドが含まれている¹⁾。家畜がオナモミ種子を摂取すると、沈うつ、歩様蹠踉、痙攣、重症例では死亡等の中毒症状を起こすことが知られているが^{1) 2)}、県内の発生報告はない。今回、管内の黒毛和種繁殖経営農家において、オナモミ種子の多数摂取による中毒が疑われる事例に遭遇したので、その概要を報告する。

材料および方法

1. 疫学調査

飼料給与状況、粗飼料の肉眼的分類及び粗飼料を刈り取りした耕作放棄地の現地調査を実施した。

2. 病性鑑定

1) 血液生化学的検査

1 頭目の死亡牛 (以下牛 No.1) 及び 2 頭目の死亡牛 (以下牛 No.2) については死亡直前に、4 頭目の死亡牛 (以下牛 No.4) については、死亡前日及び死亡数時間後の血清を用いて、総たん白 (以下 TP)、総コレステロール (以下 T-Chol)、尿素態窒素 (以下 BUN)、血糖値 (以下 Glu)、GOT、GGT、カルシウム (以下 Ca)、マグネシウム (以下 Mg) について検査を行った。3 頭目の死亡牛 (以下牛 No.3) については、血液の採取はできなかった。

また同居繁殖雌牛 9 頭について、初発日の翌日 (10 月 18 日) 及び翌々日 (10 月 19 日) と計 2 回の採血を行い、Glu、GOT、GGT の検査を行った。

2) 病理組織学的検査

死亡牛は BSE 検査材料の採材及び化製場における

化製処理を考慮し、病理解剖を実施した。その際に採材した第 1 胃内容物 2kg を、ビニールシート上に広げ肉眼的に検索した。採材した脳、肝臓、脾臓は 10% 中性緩衝ホルマリン液で固定し、HE 染色を行い鏡検した。

3) 細菌学的検査

死亡牛の血液を用いてアスコリー反応を実施し、肝臓、脾臓、脳脊髄液、延髄を材料とし、5% 羊血液寒天培地、DHL 寒天培地に接種し、37℃、24 ~ 48 時間、好気・嫌気培養を行った。

3. 対処法の検討

オナモミ中毒は、治療法が確立されていないため、診療獣医師と対処法を検討した。

4. 広報の作成、配布

発生状況

黒毛和種繁殖牛を 15 頭飼養する農家 (つなぎ牛舎) において、10 月 17 日 9 時頃に、図 1 の①で繋養されていた牛 No.1 が突然起立不能となり、四肢をバタつかせる等の神経症状を呈し、約 1 時間後に死亡したため病性鑑定を実施した。その時の材料の採材は、隣 (図 1 の②) に繋養していた牛 No.4 を③に移動し、死亡した場所 (①) において必要部位を切開して実施した。

この病性鑑定時に、牛舎内の粗飼料貯蔵場所に保管してあった粗飼料に、オナモミ種子の混入を確認し、また、牛 No.1 は死亡する直前に診療獣医師が血液を採材しており、血液生化学検査を実施した結果、GOT 1000IU/L 以上、Glu 20mg/dl 未満を示したことから、オナモミ中毒を疑い、オナモミを含む粗飼料の給与中止を指導した。

同日夜、④に繋養していた牛 No.2 が牛 No.1 と同様の症状を呈し、急死したため、2 回目の病性鑑定を实

施した。死亡した2頭は、図1のとおり近くに繋養されていたことから、これらの牛に給与された粗飼料には多数の種子が混入していたと推察し、③に移動した牛No.4も、死亡牛と同程度量のオナモミ種子を摂取した可能性が高いと判断し、畜主に注意を指導したが、この時点では、他の同居牛も含めて全く異常は認められなかった。10月18日未明、これら死亡牛から離れた場所でマス飼いでいた牛No.3が死亡し、10月19日未明には、経過観察していた牛No.4が死亡し、それぞれ3回目、4回目の病性鑑定を実施した。

死亡した牛No.1, 2は、起立不能に至るまで臨床症状を認めなかったが、牛No.3, 4は、起立不能に至る数時間前から沈うつ、元気消失、食欲低下等の症状を認めた。死亡牛4頭は、いずれも起立不能、神経症状を認めてから数時間という早い経過で死亡した。

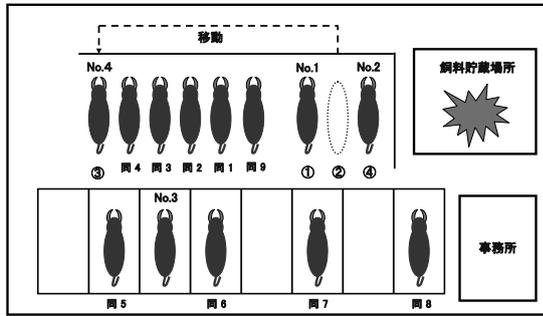


図1 牛の繋養状況

成 績

1. 疫学調査

1) 飼料給与状況

粗飼料は、主に牛舎近くの耕作放棄地の雑草を刈り取り、1日程度乾燥させて給与していた。粗飼料の給与量は、畜主のりん告から推定すると、1頭あたり1日4kg以上は給与されていた。

特に、初発前の10月15日から17日の3日間に給与した粗飼料には、多数のオナモミ種子が混入していたことを畜主が確認しており、また、病性鑑定開始時に牛舎内に保管されていた粗飼料には、同様に多数の種子が認められ、その中でも一部にまとまって混在している箇所も多く認められた。

2) 粗飼料の肉眼的分類

牛舎内に保管されていた雑草の種類を肉眼的に分類した結果、粗飼料1kg中にオナモミ草本が450g(内オナモミ種子150g)認められ、その他にヨモギ、ホオズキ等を認めた(写真1)。

3) 耕作放棄地の現地調査

雑草刈り取り後の耕作放棄地を調査した結果、多数のオナモミ種子を確認した(写真2)。



写真1 粗飼料の肉眼的分類



写真2 耕作放棄地のオナモミ種子

2. 病性鑑定

1) 血液生化学的検査

死亡牛の主要な検査結果は、表1のとおり死亡直前の牛No.1及びNo.2に、GOT 1000IU/L以上、GGT 250 IU/L以上、Gluが20mg/dl未満と、肝機能の著しい低下及び血糖値の低下が認められた。その他の検査項目(TP, T-Cho, BUN, Ca, Mg)に、著変は認められなかった。

表1 血液生化学検査

採材時期	GOT (IU/L)	GGT (IU/L)	Glu (mg/dl)	
No.1 死亡直前	1000 <	261	20 >	
No.2 死亡直前	1000 <	402	20 >	
No.4 死亡前日	55	25	58	同居牛検査
死亡後	1000 <	242	42	

牛No.4は、同居牛全頭を検査した際に異常値は認められなかったが、死亡数時間後の血清で、GOTが1000IU/L以上、GGTが242IU/Lと高値を示した。

同居牛(図1の同1~9)の検査結果は、表2のとおり同居牛No.7の2回目の検査において、GOT値及びGGT値の上昇を認めただけで、その他の牛に異常は認められなかった。その後1週間、経過観察を続けたが、いずれの牛にも臨床症状は認められなかった。

表2 同居牛の血液生化学検査

	10/18 (1回目)			10/19 (2回目)		
	GOT (IU/L)	GGT (IU/L)	Glu (mg/dl)	GOT (IU/L)	GGT (IU/L)	Glu (mg/dl)
同居1	47	25	56	63	34	57
同居2	45	33	57	82	31	67
同居3	51	38	59	74	36	57
同居4	44	24	56	74	32	59
同居5	56	25	46	83	31	55
同居6	50	24	52	58	34	57
同居7	82	37	48	97	119	67
同居8	34	26	40	37	33	59
同居9	50	19	51	48	21	64

2) 病理組織学的検査

牛 No.2 ~ No.4 の第 1 胃内容物を肉眼的に調査した結果 (図 2), 胃内容 1kg あたりオナモミの種子は, No.2 で 44 個 21g, No.3 で 43 個 35g, No.4 で 105 個 55g と多数の種子を確認した。

○オナモミ種子 (胃内容 1kg あたり)

	個数 (個)	重量 (g)	推定重量 (kg) *
No.2	44	21	1.1
No.3	43	35	1.8
No.4	105	55	2.8

※第 1 胃内容量を 50kg とした推定重量

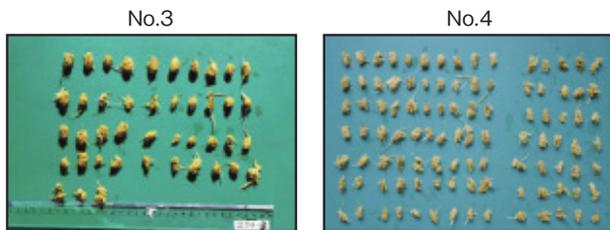


図 2 胃内容の肉眼的検査

また, 肝臓は脆弱化し, 重度のうっ血を伴うび慢性小葉中心性壊死が著明に認められ (写真 3), 脾臓に, 血液のうっ滞及び一部出血と褐色色素の重度の沈着が認められた。脳に病変は認められなかった。

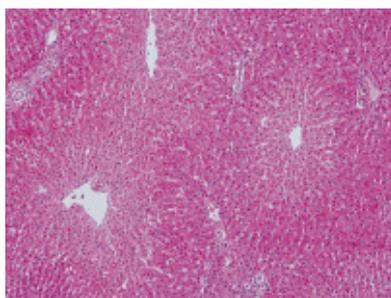


写真 3 肝臓の小葉中心性壊死 (HE 染色× 10)

3) 細菌学的検査

アスコリー反応は全頭陰性であり, 細菌分離検査においても有意菌は分離されなかった。

3. 対処法の検討

対症療法と合わせオナモミ中毒の治療法について, 診療獣医師と対処法を検討した。種子の有毒成分の吸着を目的に, 1 頭あたり約 500g の活性炭を 2 日間, 計 1kg 経口投与した結果, その後, 中毒症状を示す牛は認められなかった。

4. 広報の作成, 配布

本事例を確認後直ちに, オナモミ中毒の広報を作成し, 管内の全ての牛飼養農家に配布するとともに, 研修会等において, 中毒の発生予防を啓発した。

考察及びまとめ

今回の事例では, 疫学調査により粗飼料中に多量のオナモミの混入を認め, 胃内容の肉眼検査において第 1 胃内容物中に多量のオナモミ種子が確認された。また血液生化学検査及び病理組織検査から, 血糖値の著しい低下, 肝臓に重度の小葉中心性壊死が認められた。オナモミ種子の有毒成分であるカルボキシアトラクティロシドの同定・定量法としては, 薄層クロマトグラフィによる方法が報告されている⁴⁾が, 標準品は市販されていないため, 今回は確定診断に至らなかったが, 疫学調査及び病性鑑定の検査結果から, 多数のオナモミ種子摂取による中毒が強く疑われた。

オナモミ中毒における種子摂取の致死量は, 体重の 0.75% の種子量と報告³⁾されており, 体重 450kg の牛の場合で, 約 3.3kg と推定される。今回の事例において, 第 1 胃内容量を 50kg と仮定し, 死亡牛 3 頭の摂取種子量を推測すると, No.2 では種子 1.1kg, No.3 では 1.8kg, No.4 では 2.8kg を摂取していたと考えられた。原型をとどめていた種子に加え, すでに消化吸収されたものを含めると, 致死量相当の種子を摂取していたと推察された。

また, 一般にオナモミの中毒症状は, 摂取後数時間で現れる¹⁾といわれているが, 今回の事例では最初にオナモミを含む粗飼料を給与してから 3 日後に初発を認めた。特に 4 頭目の死亡牛については, 疫学調査及び胃内容検査から, 多量のオナモミ種子を摂取していたことを確認したが, 最後に種子を摂取してから死亡するまで 24 時間以上経過していたことから, 種子を摂取後, 反芻を繰り返す内に徐々に消化吸収されたために, 種子内の毒素が緩慢に体内へ吸収されていったものと推察された。

今回, 神経症状, 急死といった発生状況から, 当初は細菌感染や中毒等を視野に, 病性鑑定と併行して抗生剤, 利胆剤及び糖類剤等による対症療法を行ってきた。しかし, いずれも効果が認められず死亡牛が続発したため, 診療獣医師と対処法を検討し, 本中毒への

対処法として有効との報告²⁾のある活性炭を経口投与したところ、中毒症状を示す牛が認められなかったことから、対症療法に加え活性炭の経口投与が、本中毒の対策として有効と考えられた。

昨今、肉用牛の耕作放棄地等への放牧が推進されている。しかし、ワラビ等の植物中毒は、様々な関係機関・団体が発生予防について啓発を続けているにも関わらず、未だに発生を認めている。また本事例のように、通常、牛が積極的に摂取しないと考えられている植物についても、粗飼料の枯渇や混入によって摂取する危険性が十分にあるため、今後も植物中毒の発生予防について啓発に努める必要がある。

参 考 文 献

- 1) 写真で見る家畜の有毒植物と中毒, 13～14, 社団法人 畜産技術協会, (2000)
- 2) 小林貞仁ほか: オナモミ種子の摂取によると思われる牛の中毒, 全国家畜保健衛生業績抄録, 76 (2001)
- 3) Riet-Correa, F. et al : Recentry encountered poisonous plants of Rio Grande do Sul and Uruguay. In Toxic plants and other natural toxicants, 1-5(1998)
- 4) Witte, S. T.: Cocklebur toxicosis in cattle associated with the consumption of mature *Xanthium strumarium*, J. Vet. Diagn. Invest, 2: 263-267(1990)

和牛受精卵移殖産子における初乳給与状況の簡易な判定法の検討

岡峰 友恵¹⁾ 玉野 光博¹⁾ 宮本 徳子¹⁾ 保本 朋宏²⁾ 萬城 守郎³⁾

(受付：平成 20 年 12 月 2 日)

Study of a simple diagnostic method for colostrum feeding in ET calves

TOMOE OKAMINE¹⁾, MITSUHIRO TAMANO¹⁾, YOSHIKO MIYAMOTO¹⁾,

TOMOHIRO YASUMOTO²⁾, and MORIO BANJO³⁾

1) Geihoku Livestock Health & Hygiene Service Center, Hiroshima Prefecture
4-12-1, Kabe, Asakitaku, Hiroshima, Hiroshima 731-0221

2) Bihoku Livestock Health & Hygiene Service Center, Hiroshima Prefecture 1-4-
1, Higashihonmachi Shobara, Hiroshima 727-0011

3) Fukuyama Livestock Health & Hygiene Service Center, Hiroshima Prefecture
396-1, Fukae, Joge-cho Fuchu, Hiroshima 729-3421

SUMMARY

Death and maldevelopment were seen in calves of two ET-implementing dairy farms. Therefore, criteria devised employing a simple measurement method for high-quality colostrum and colostrum intake were set to provide instructions on colostrum feeding. In the ET-implementing dairy farms, sera from around 2-3-day-old ET calves (calf sera), immunoglobulin G1 (IgG1) values of frozen colostrum and colostrum formulation, the TP value of calf sera, and Brix value of colostrum were measured. The results revealed that, among the 3 calves with a less than 10 mg/mL serum IgG1 value, colostrum intake was lacking in 2 dead calves, and feeding of the colostrum formulation was insufficient in one calf with maldevelopment. About one-third of the colostrum samples tested showed a less than 60 mg/mL IgG1 value and, therefore, were considered to be unsuitable for feeding to ET calves. The IgG1 value of calf sera and IgG1 value of colostrum were strongly correlated with the TP and Brix values, respectively ($r=0.95$, 0.9). The TP value of sera and the Brix value can be used to estimate the IgG1 value of sera and that of colostrum, respectively. A 5.0 g/dL or higher TP value and 20% or higher Brix value were used as criteria indicating a favorable colostrum feeding state and high-quality colostrum, respectively.

1) 広島県芸北家畜保健衛生所 (〒 731-0221 広島県広島市安佐北区可部 4-12-1)

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) 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)

要 約

和牛受精卵移植実施酪農家 2 戸で、移殖産子が死亡又は発育不良を呈する事例が発生したので、今回、高品質初乳及び初乳摂取状況の簡易な測定法による判断基準を作成し、初乳給与指導に取り組んだ。移殖実施酪農家を対象に、約 2～3 日齢の移殖産子血清（産子血清）、凍結初乳及び初乳製剤の免疫グロブリン G1 (IgG1) 値、産子血清 TP 値及び初乳 Brix 値を測定した。その結果、血清 IgG1 値 10mg/ml 未満の産子 3 頭の内、死亡の 2 頭は初乳摂取量不足、発育不良の 1 頭は初乳製剤の給与量不足、調査した初乳検体の約 1/3 は IgG1 値が 60mg/ml 未満で移殖産子給与には不適と考えられた。産子血清 IgG1 値と TP 値及び初乳 IgG1 値と Brix 値は $r=0.95$, 0.9 と高い相関を認め、血清 TP 値は血清 IgG1 値、Brix 値は初乳 IgG1 値の推定方法として活用可能であり、TP 値 5.0g/dl 以上を初乳摂取状況良好、Brix 値 20% 以上を高品質初乳の基準とした。

序 文

本県では、乳用牛における和牛受精卵移植 (ET) に取り組んでおり、産子を保留、育成する酪農家が増加している。このため、ET 実施酪農家に対し、和牛産子の哺育育成指導を実施していたが、2 戸で ET 産子 3 頭が、死亡又は発育不良を呈する事例が発生した。今回、高品質初乳及び初乳摂取状況の簡易な測定法による判断基準を作成し、初乳給与指導に取り組んだ。

材料と方法

- 1 実施期間：平成 19 年 6 月～平成 19 年 12 月
- 2 対象農家：ET 実施酪農家 8 戸
- 3 供試血清
平成 19 年 6 月から平成 19 年 11 月に、乳用牛から娩出された生後約 2～3 日齢の ET 産子の血清（産子血清）18 検体。
- 4 供試初乳
酪農家で凍結保存されている、乳用牛の分娩後 1 回目（分娩後 30 分から 22 時間後までの間に搾乳した初乳）、2 回目、3 回目の初乳及び分娩後 1 回目から 3 回目までの合乳（凍結初乳）それぞれ、21 検体、各 3 検体の計 30 検体。
- 5 供試市販初乳製剤
市販の初乳製剤 1 検体。
- 6 測定項目
 - 1) IgG1 値
産子血清 18 検体、凍結初乳 30 検体及び初乳製剤 1 検体をエコスチェックウシ G1 プレートを用いて一元放射免疫拡散法により測定した。
 - 2) 血清総タンパク質 (TP) 値
産子血清 18 検体を用いて、蛋白屈折計により測定した。

- 3) 初乳 Brix（水溶液中の可溶性固形成分濃度の指標）値
凍結初乳 30 検体及び初乳製剤 1 検体を用いて、ATAGO 社製デジタル糖度計 PR - 101 により測定した。

7 ET 産子の哺育育成指導

ET 実施酪農家に対し、農家個別の哺育育成指導を実施した。初乳給与方法に関するリーフレットを作成し、全酪農家へ配布した。また、管内 3 箇所において、酪農家 18 戸 20 人を参集し、地域研修会を開催した。

成 績

1 IgG1 値測定

1) 産子血清

死亡又は発育不良を呈した 2 戸 3 頭の産子の血清 IgG1 値は 10mg/ml 未満であった（表 1-1、表 1-2）。

IgG1(mg/ml)	頭数
< 10	3
10～20	3
20～30	7
30 ≤	5
合計	18

表 1-2 血清 IgG1 10mg/ml 未満の ET 産子の内訳

No.	IgG1(mg/ml)	経過
1	1.1	鑑定殺 全身性化膿性炎症
2	1.4	死亡
3	5.0	発育不良

このうち、死亡した2頭は、初乳摂取時間及び摂取量は不明であり、IgG1値が1.1mg/ml及び1.4mg/mlと低値であった。また、発育不良を呈した1頭は生後直後と生後6～12時間以内に初乳製剤を給与されていたが、血清IgG1値は5mg/mlであった。

初乳の品質及び給与方法について、農家個別の指導を行った7戸15頭については、血清IgG1値20mg/ml以上が15頭中12頭であり、良好な結果であった。また、血清IgG1値が10～20mg/mlの産子を3頭認めたが、その後の発育に問題は特にみられなかった。

2) 凍結初乳及び初乳製剤

凍結初乳IgG1値の平均は分娩後1回目の初乳82.6 ± 33.3mg/ml, 2回目56.7 ± 14.2mg/ml, 3回目29.3 ± 9.0mg/ml, 1回目から3回目までの合算24.7 ± 17.2mg/mlであり、全体の平均は68.9 ± 35.7mg/mlであった。(表2-1)凍結初乳IgG1値については、60mg/ml未満のものが30検体中11検体と、1/3を占めた(表2-2)。そのほか、初産牛の初乳については、60mg/ml未満が2検体認められた。また、初乳製剤のIgG1値は71mg/mlであった。

表2-1 分娩回数別凍結初乳のIgG1値

IgG1(mg/ml)	IgG1(mg/ml)
分娩後1回目	82.6 ± 33.3
分娩後2回目	56.7 ± 14.2
分娩後3回目	29.3 ± 9.0
分娩後1～3回目	24.7 ± 17.2

表2-2 凍結初乳及び初乳製剤のIgG1値

IgG1(mg/ml)	検体数
< 20	1
20～40	6
40～60	4
60 ≤	20
合計	31

平均：68.9 ± 35.7mg/ml

2 TP値及びBrix値

産子血清TP値、凍結初乳及び初乳製剤のBrix値の成績は表3のとおり。TP値の平均は5.3 ± 1.0g/dl, Brix値の平均は、21.7 ± 4.5%であった。(表3)

表3 産子血清TP値と初乳Brix値

TP(g/dl)	頭数	Brix(%)	検体数
3.0～4.0	2	10～20	10
4.0～5.0	2	20～30	20
5.0 ≤	14	30～40	1
合計	18	合計	31

3 産子血清IgG1値とTP値の関係

産子血清IgG1値とTP値の関係を分析したところ、相関係数r = 0.95と高い相関が認められた(図1)。

つまり、血清IgG1値が20mg/ml以上のとき、TP値は5.0g/dl以上を示す。

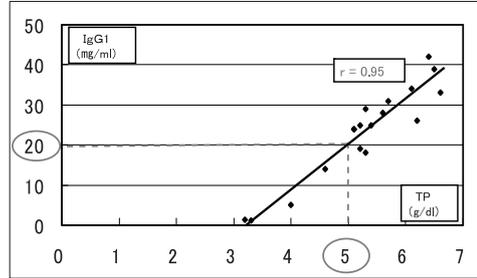


図1 ET産子血清IgG1値とTP値の関係

4 凍結初乳及び初乳製剤のIgG1値とBrix値の関係

初乳中IgG1値とBrix値の関係を分析したところ、相関係数r = 0.9と高い相関が認められた(図2)。

つまり、初乳IgG1値が60mg/ml以上のとき、Brix値は20%以上を示す。

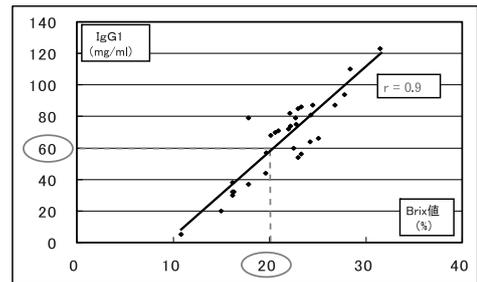


図2 初乳中IgG1値とBrix値の関係

5 酪農家への初乳給与指導

まず、産子に十分な免疫移行がない状態(Failure of passive transfer: FPT)の指標について検討した。FPTは乳用牛において、生後48時間における産子の血清IgG1値が10mg/ml以下とされている¹⁾。また、黒毛和種では、血清IgG1値が20mg/ml以下の場合、FPTであることが示唆されている²⁾。これを基にET産子に必要な血清IgG1値の基準を20mg/ml以上とした。

上記2, 3及び4の結果から、簡易診断方法による初乳給与状況の判断基準としてET産子の良好な初乳摂取状況判断基準値をTP値5.0g/dl以上、高品質初乳の基準値を、Brix値20%以上とした。

これらの結果を基にET実施酪農家に対し、高品質初乳の作製方法、初乳給与までの時間及び給与量等初乳給与方法について、個別指導を実施した。なお、ヨーネ病対策として、カテゴリーⅡの農家に対しては、初乳製剤を給与する様に指導した。

また、全酪農家に対し、初乳給与方法に関するリー

フレットを作成，配布した。さらに，管内3箇所において，研修会を開催した。

考 察

本県では，乳用牛を活用した和牛 ET により，ET 実施酪農家における ET 産子の保留・育成が増加しており，ET 実施酪農家に対して，和牛産子の哺育育成指導を実施していたが，今回，ET 産子が死亡する等の事例が発生した。このことから，酪農家が，乳用牛と和牛の子牛では必要とする免疫量 (IgG1 値) に違いがあること，及び初乳の重要性を再認識することが必要と考え，簡易測定法による初乳摂取状況の判断基準を策定し，迅速に指導するための一助とした。

血清 IgG1 値が 10mg/ml 未満の産子のうち，死亡した 2 頭は，IgG1 値が 1mg/ml 程度と低値であり，これは初乳給与管理失宜による初乳摂取量不足が原因と推察された。また，発育不良を呈した 1 頭は初乳製剤を給与されていたが，血清 IgG1 値は 5mg/ml であり，給与量不足が原因と推察された。これらの事例は畜主が乳用産子と和牛産子との品種特性の違いを認識せず，乳用産子と同様に初乳給与管理を行ったことが原因と考えられた。

次に初乳中に必要な IgG1 含有量は，計算式，〔子牛血清量 (体重 × 6.5%) × 20mg/ml (和牛子牛に必要な IgG1 量) = 初乳中 IgG1 値 × 初乳摂取量 × IgG1 吸収率 30%〕から求めた。子牛の体重を 40kg，初乳摂取量を 3ℓ，生後 6 時間以内の IgG1 吸収率を 30% と仮定し，高品質初乳の IgG1 含有量基準値を 60mg/ml 以上とした。

凍結初乳の搾乳回数による IgG1 含有量を調査した結果，経産牛の搾乳 1 回目は，いずれの検体においても IgG1 含有量が 60mg/ml 以上の高品質初乳であった。

60mg/ml 未満の凍結初乳は，分娩後，搾乳までの時間が 24 時間前後と長時間経過していたことや，分娩後の搾乳 1 回目から 3 回目までの合乳であったこと等が原因と推察された。調査した市販の初乳製剤の IgG1 値は 71mg/ml であり，必要とする IgG1 含有量を満たしていた。

IgG1 値の測定については，特別な手技が必要であり，かつ測定までに時間を要する等の欠点がある。そこで，既報の産子血清 IgG1 値の推定方法として，蛋白屈折計による方法を検証した³⁾。

産子血清 IgG1 値と TP 値の関係は，相関係数 $r = 0.95$ と高い相関が認められたことから，TP 値は産子血清 IgG1 値の推定方法として活用可能であると考えた。

初乳品質の評価については，比重計による測定方法が一般的⁴⁾であるが，乳温を 20℃ に保たねばならない，メスシリンダーを必要とする，初乳の必要量が多いなど，手法が煩雑である。また，初乳中 IgG1 値の

測定については，先に述べたような欠点がある。これらのほかに，初乳中 IgG1 値の簡易推定方法として，糖度計 (Brix 値：水溶液中の蛋白質，糖，塩類等可溶性固形成分濃度の指標) を用いた方法が報告されている^{3) 5)}。今回，この方法についても検証を行った。

初乳中 IgG1 値と Brix 値の関係は，相関係数 $r = 0.9$ と高い相関が認められたことから，Brix 値は初乳中 IgG1 値の推定方法として活用可能であると考えた。

以上のことから，産子の初乳摂取状況判断基準として，TP 値 5.0g/dl 以上を初乳摂取状況良好，Brix 値 20% 以上を高品質初乳基準とした。

ET 実施酪農家に対し，初乳給与方法，高品質初乳の確保及び分娩前後の飼養管理について個別指導するとともに，生後 ET 産子の哺乳の能力や意欲が低い場合は，初乳の強制給与や補助的に牛初乳血清の活用等を指導した。これにより，ET 実施酪農家が乳用子牛と和牛子牛に必要な免疫量の違いを知り，また，初乳の重要性を再認識することで，初乳給与管理を注意して行なうようになった。また，簡易・迅速に初乳摂取状況を診断できることにより，TP 値 5.0g/dl 未満であった場合，家畜診療所との連携がスムーズになり，輸液や輸血等の応急措置を行うことができた。その結果，酪農家で生産される ET 産子の死亡等の事故率低減が図られた。

謝 辞

今回，本調査並びに治療対応にご協力いただいた，広島県農業共済組合連合会安芸高田家畜診療所，廿日市家畜診療所及び山県家畜診療所の諸先生方に深謝します。

参 考 文 献

- 1) QUIGLEY JD, MARTIN KR et al : Effects of Housing and Colostrum Feeding on Serum Immunoglobulins, Growth, and Fecal Scores of Jersey Calves. J Dairy Sci, 78, 893-901(1995)
- 2) 小原潤子：黒毛和種産子への初乳給与，家畜診療，54, 643 ~ 647 (2007 年)
- 3) 鳥取県西部家畜保健衛生所 栗原昭広，長谷川理恵ほか：携帯用屈折計 (糖度計) を用いた牛初乳と産子血清中 Ig 濃度の推定
- 4) FLEENOR W A and STOTT G T : Hydrometer Test for Estimation of Immunoglobul in Concentration in Bovine Colostrum. J Dairy Sci. 63, 973-977(1980)
- 5) 岩手県南家畜保健衛生所 齊藤清美，奥友正範ほか：乳用牛における初乳 IgG 濃度調査と給与技術指導，平成 17 年度岩手県業績発表

下痢予防用牛大腸菌不活化ワクチンと *Escherichia coli* J5 株の血清学的交差性の解析

森本 和秀¹⁾ 吉村 知子¹⁾ 大坂 隆志¹⁾
長尾かおり²⁾ 新出 昭吾¹⁾ 磯部 直樹³⁾
(受付：平成 20 年 11 月 25 日)

Analysis of serological crossing between a bovine *Escherichia coli* inactivated vaccine
for the prevention of diarrhea and an *Escherichia coli* J5 strain

KAZUhide MORIMOTO¹⁾, TOMOKO YOSHIMURA¹⁾, TAKASHI OSAKA¹⁾,
KAORI NAGAO²⁾, SHOGO SHINDE¹⁾, and NAOKI ISOBE³⁾

- 1) Hiroshima Prefectural Technology Research Institute, Livestock Technology Research Center 584 Nanatsuka-cho, Shobara, Hiroshima, 727-0023
- 2) Hiroshima Prefectural Technology Research Institute, Food Technology Research Center 12-70, Hijiyamahonmachi, Minami-ku, Hiroshima, 732-0816
- 3) Hiroshima University Graduate School of Biosphere Science 1-4-4, Kagamiyama, Higashihiroshima, Hiroshima, 739-8528

SUMMARY

In foreign countries, a vaccine of an *Escherichia coli* mutant (O111:B4, J5 strain) is used to prevent mastitis. We herein report a comparison of the antigenicity between a bovine *Escherichia coli* vaccine for the prevention of diarrhea (*Escherichia coli* vaccine) and the J5 strain.

As a result of dot blotting and ELISA of sera collected from two 6-month-old calves immunized with the *Escherichia coli* vaccine or the J5 strain, cross-reaction was observed for both. Twenty cows were tested. The *Escherichia coli* vaccine was used to inoculate 10 cows at one and two months before delivery. Sera were collected at 0.5, 1.0, 1.5, and 2.0 months before the estimated date of delivery, immediately after delivery, and 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, and 3.0 months after delivery. Both vaccine-specific antibody (K99, FY, 31A) and anti-J5 antibody titers were increased significantly after vaccination. They were positively correlated. These results suggest that the *Escherichia coli* vaccine and J5 strain show serological cross-reaction.

1) 広島県立総合技術研究所畜産技術センター (〒 727-0023 広島県庄原市七塚町 584)
2) 広島県立総合技術研究所食品工業技術センター (〒 732-0816 広島県広島市南区比治山本町 12-70)
3) 広島大学大学院生物圏科学研究科 (〒 739-8528 広島県東広島市鏡山 1 丁目 4 番 4 号)

要 約

海外では大腸菌の変異株 (O111 : B4, J5 株) を使用したワクチンが乳房炎予防に用いられている。今回われわれは、下痢予防用牛大腸菌ワクチン (大腸菌ワクチン) と J5 株について抗原性を比較したので報告する。

6 か月齢の子牛 2 頭を大腸菌ワクチンと J5 株でそれぞれ免疫し、採取したこれらの血清をドットプロット法, ELISA 法により検査した結果, 両者に交差反応が認められた。また, 乳用牛 20 頭を供試し, うち 10 頭に対し分娩 2 か月前と 1 か月前に大腸菌ワクチンを接種した。分娩予定日の 2, 1.5, 1, 0.5 ヶ月前, 分娩直後, 分娩後 0.5, 1, 1.5, 2, 3 ヶ月目に血清を採取した。ワクチン特異抗体価 (K99, FY, 31A), 抗 J5 抗体価は, ともにワクチン接種後に有意に上昇し, 両者は正の相関を示した。これらのことから, 大腸菌ワクチンと J5 株とが血清学的に交差反応を示すことが示唆された。

序 文

子牛の大腸菌性下痢症の予防を目的に, 一部の妊娠牛へ大腸菌不活化ワクチン (以下, 大腸菌ワクチン) の接種が行われている。本ワクチンは分娩前の乳牛に接種され, 初乳を介して子牛に抗体を付与して大腸菌性下痢症を予防するものである。これに対し海外では, 大腸菌やサルモネラ菌の変異株を用いた乳房炎予防ワクチンが市販され, 有効性についても報告されている^{1) 2) 3) 4)}。そのため, 日本で用いられる下痢用ワクチンと乳房炎との関連について, これまでも検討されてきた。平田ら⁵⁾は, 大腸菌ワクチンを接種しても分娩後 1 ヶ月, 2 ヶ月の個体乳の体細胞数に有意差が認められなかったと述べた。溝渕ら⁶⁾は接種前に比べて乳房炎死産事故が減少したことを示した。溝渕らはその機序としてワクチン抗体の影響であるとしたが, これまでに下痢用ワクチンと海外の乳房炎用ワクチンとを比較した報告は無い。

今回われわれは, 下痢予防用ワクチンと海外製ワクチン製造株とが交差反応を示すことを見出したので, 概要を報告する。

材料と方法

1 免疫血清の作製

J5 株のホルマリン不活化全菌体をリン酸緩衝食塩水 (PBS) で OD₆₁₀=0.14 の濃度に調製し, 菌液 5ml とアジュバント (Freund's Adjuvant Incomplete, SIGMA-ALDRICH) 2ml を混合して 6 ヶ月齢の雌子牛に 2 週間間隔で 4 回皮下接種し, 最後の接種から 2 週間後に採血した。

大腸菌ワクチン (牛用大腸菌ワクチン「ゼンノウ」[imocolibov]) の免疫血清は, 同様に 2 週間間隔で 3 回接種して作製した。

2 菌体の可溶性抗原を用いたドットプロット法

海外で乳房炎用ワクチンとして用いられる株のひとつ *Escherichia coli* O111 : B4, Rc 変異株 J5 (ATCC43745, 以下 J5 株) 及び乳房炎の症例から分離した *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae* (以下, *K.p.*) 1 株をそれぞれ純培養し, リン酸緩衝食塩水 (PBS) に浮遊して 3 回遠心分離・洗浄後, SDS-PAGE 用サンプルバッファー⁷⁾ を添加, 1 分間超音波処理後, 室温に 20 分間放置, 2 分間煮沸, 遠心分離して上清をサンプルとした。大腸菌ワクチンも同様に洗浄後, 処理した。各サンプルをメンブレンフィルターに 1 μ l ずつ滴下, 乾燥させた後, 免疫染色を実施した。1 次抗体には前述の子牛血清を, 2 次抗体には HRP 標識抗ウシ IgG ヤギ血清をそれぞれ用いた。発色基質は 4-クロロ-1-ナフトールを用いた。

3 乳用牛の血清採取

当センターで飼養するホルスタイン種乳牛 20 頭を用い, 産歴や分娩時期が偏らないように接種牛 10 頭 (1 産 2 頭, 2 産 5 頭, 3 産以上 3 頭), 対照牛 10 頭 (1 産 3 頭, 2 産 4 頭, 3 産以上 3 頭) に配置した。接種牛には, 大腸菌ワクチンを分娩予定日の 2 ヶ月前と 1 ヶ月前にそれぞれ 5ml 皮下接種した。対照牛は無処置とした。

分娩予定日の 2, 1.5, 1, 0.5 ヶ月前, 分娩直後, 分娩後 0.5, 1, 1.5, 2, 3 ヶ月目に頸静脈から採血し, 血清を分離した。

4 抗体検査

接種牛・対照牛のワクチン特異抗体価 (K99, FY, 31A) を測定した。測定は(株)科学飼料研究所に依頼した。

J5 株の抗体価は, ホルマリンで不活化した J5 株を抗原として, Tyler ら⁸⁾の方法に従い ELISA により測定した。子牛の接種前血清を陰性血清, 免疫後の血清を陽性血清として検査に用い, 得られた OD 値は次式により Index 値に変換した。

真の OD 値 = (抗原固相化ウエルの OD 値) - (非固相化ウエルの OD 値)

Index = (被検血清の真の OD 値 - 陰性血清の真の OD 値) ÷ (陽性血清の真の OD 値 - 陰性血清の真の OD 値)

大腸菌ワクチンを PBS (pH7.4) で洗浄, 遠心分離後, 上記抗 J5 株抗体価測定と同様に ELISA 用抗原として使用し, 子牛血清の抗体価を測定した。

5 統計処理

ワクチン特異抗体価は, 2 を底とする対数値に変換し, 各抗体価の接種・対照間の有意差検定及び接種前と接種後の有意差検定にスチューデントの t 検定を用いた。ワクチン特異抗体価と抗 J5 株抗体価 Index 値との相関を調べ, 相関係数の有意性検定を行った。

成 績

1 ドットプロット法

免疫前の子牛血清は, ワクチン, J5 株, *K.p.* のいずれの抗原に対しても反応は全く認められなかった。大腸菌ワクチン免疫血清は, ワクチン抗原に対して強い陽性反応を示し, J5 株, *K.p.* に対して弱い陽性反応を示した。一方, J5 株免疫血清は, J5 株に対して強い陽性反応を示し, *K.p.* に対して弱い陽性反応を示したが, ワクチン抗原との反応は認められなかった。

2 子牛免疫血清の ELISA 検査

大腸菌ワクチン免疫血清は, 免疫前血清に比べて J5 株に対する抗体価の上昇が認められた。また, J5 株免疫血清においても, 免疫前に比べて大腸菌ワクチン抗原に対する抗体価の上昇がわずかに認められた (表 1)。

表 1 子牛免疫血清の ELISA Index 値

免疫抗原	ELISA 抗原	前血清	後血清
大腸菌ワクチン	J5 株	0.230	0.811
J5 株	大腸菌ワクチン	-0.031	0.098

3 乳牛の血清中抗体価

ワクチン特異抗体は, ワクチン接種後有意に上昇しており (p<0.01), 3 種類すべてにおいて, 分娩 3 か月後まで接種前に比べて有意差が認められた (K99; p<0.05, FY,31A; p<0.01)。また, 1 回目の接種から分娩 3 ヶ月後まで接種・対照間に有意差が認められた。

抗 J5 株抗体価は, ワクチン接種後有意に上昇し (p<0.01), 分娩直後を除いて分娩 1 ヶ月後まで有意差が認められた (p<0.05)。接種・対照間の比較では, 分娩の 1.5 及び 0.5 ヶ月前と 0.5 ヶ月後に有意差が認められた (p<0.05) (図 1)。

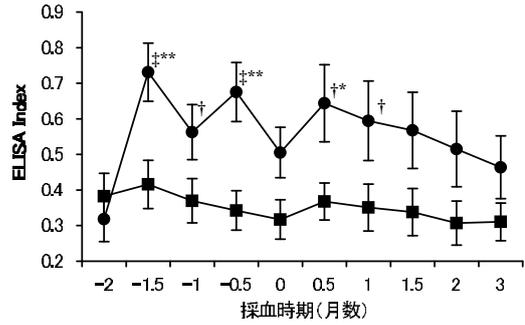


図 1 抗大腸菌 J5 抗体価 平均値, 標準誤差
●: 接種 (n=10) ■: 対照 (n=10)
接種前に比べて有意差 †: p<0.05 ‡: p<0.01
接種・対照間に有意差 *: p<0.05 **: p<0.01

接種牛の抗 J5 株抗体価とワクチン抗体価との間には正の相関が認められ, 相関係数は K99 が 0.39, FY が 0.61, 31A が 0.55 であった (図 2)。また, 相関係数の有意性検定は, すべて有意 (p<0.01) と判定された。

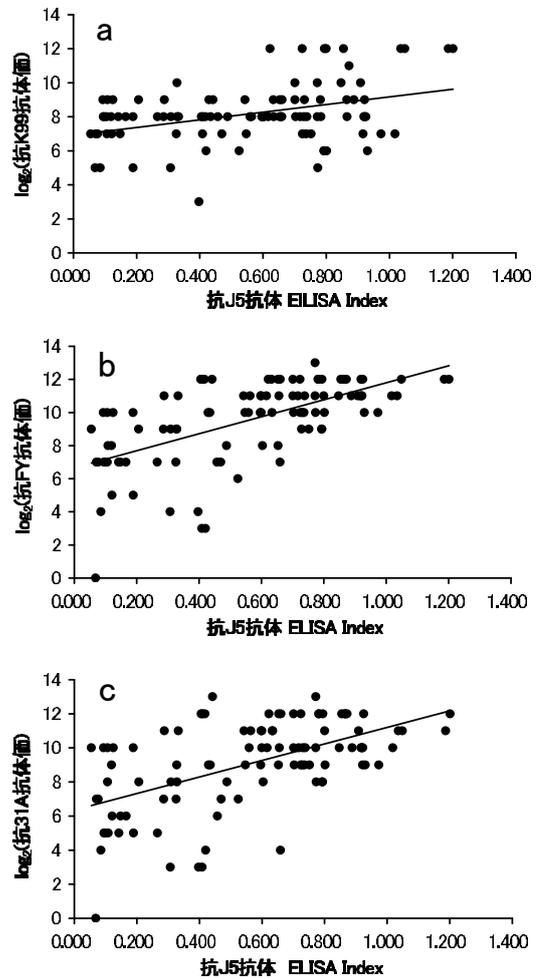


図 2 抗 J5 抗体とワクチン特異抗体との相関関係
a: K99 b: FY c: 31A

考 察

今回、ドットプロット法において、大腸菌ワクチン免疫血清と J5 株抗原との反応が認められた。また、ELISA においては、J5 株免疫血清と大腸菌ワクチン抗原との弱い反応が認められた。これらのことから、大腸菌ワクチンと J5 株とが交差反応を示すことが示唆された。K.p. は、大腸菌性乳房炎の主要な原因菌の一つだが、今回、ドットプロット法において、大腸菌ワクチン免疫血清及び J5 株免疫血清が K.p. 抗原とも反応することが示された。

大腸菌ワクチン免疫血清と J5 株抗原との反応に比較して、J5 株免疫血清とワクチン抗原との反応が弱くなる傾向が認められた。この理由は不明だが、アジュバントの違い（大腸菌ワクチンには水酸化アルミニウム及びサポニンが使用されている）、もしくは接種した菌量の違いにより生じた可能性が考えられた。

大腸菌ワクチンと J5 株抗原とが交差反応を示すことが示唆されたことから、ワクチン特異抗体との相関について調べたところ、両者に正の相関が認められた。

大腸菌の抗原性は主に O 抗原多糖が担っている⁹⁾が、今回用いた大腸菌ワクチンには J5 株と同じ O111 株が用いられていない上、J5 株は O 抗原を欠いている。したがって、J5 株を抗原とする ELISA で検出された抗体は、O 抗原以外の菌体成分を認識していると考えられた。J5 株は LPS を構成する O 抗原多糖、R コア、リピド A の 3 つの要素のうち O 抗原を欠く。R コアは菌種によって一定であることから、O 抗原の異なる菌株間でも共通抗原になりうると考えられた。

これまでに、高い抗 J5 株抗体を保有する牛は臨床型大腸菌性乳房炎の発生リスクが低いという報告や¹⁰⁾、抗 J5 株抗体が内毒素血症による死亡率を低減させるという報告がある¹¹⁾。今後、これらの可能性について検証していく必要がある。

文 献

- 1) González R. N., et al.: Prevention of Clinical Coliform Mastitis in Dairy Cows by Mutant *Escherichia coli* Vaccine, *Can. J. Vet. Res.*, 53, 301 ~ 305(1989)
- 2) Hogan J. S., et al.: Field Trial to Determine Efficacy of an *Escherichia coli* J5 Mastitis Vaccine, *J. Dairy Sci.* 75, 78 ~ 84(1992)
- 3) Hogan, J. and Smith, K.L.: Coliform mastitis, *Vet. Res.*, 34, 507 ~ 519(2003)
- 4) Wilson, D. J., et al.: Comparison of J5 Vaccinates and Controls for incidence, Etiologic Agent, Clinical Severity, and Survival in the Herd Following Naturally Occurring Cases of Clinical Mastitis, *J. Dairy Sci.*, 90, 4282 ~ 4288(2007)
- 5) 平田 昇ほか：乾乳期に牛毒素原性大腸菌不活化ワクチンを投与した乳牛の分娩後における体細胞数の変化と臨床型乳房炎の発症率, *紫葉*, 36, 85-87 (1991)
- 6) 溝渕俊二ほか：牛毒素原性大腸菌不活化ワクチン接種による乳房炎死廃事故低減の試み, *家畜診療*, 408, 13-16 (1997)
- 7) 西方敬人：バイオ実験イラストレイテッド⑤タンパクなんてこわくない, 第 1 版, 18, 秀潤社, 東京 (1997)
- 8) Tyler, J. et al.: Antigenic Homology Among Gram-Negative Organisms Isolated from Cattle with Clinical Mastitis, *J Dairy Sci*, 74, 1235 ~ 1242(1991)
- 9) 平田陸正：細菌毒素ハンドブック, 櫻井 純ほか編, 第 1 版, 481, サイエンスフォーラム, 東京 (2002)
- 10) Tyler, J. W. et al.: Relationship between serologic recognition of *Escherichia coli* O111: B4(J5) and clinical coliform mastitis in cattle, *Am. J. Vet. Res.*, 49, 1950 ~ 1954(1988)
- 11) Braude, A. I. et al.: Antibody to Cell Wall Glycolipid of Gram-Negative Bacteria: Induction of Immunity to Bacteremia and Endotoxemia, *J. Infect. Dis.*, 136, S167 ~ 173(1977)

腸管断裂による入院治療後に群への 復帰が果たせたアヌビスヒヒの1症例

渡辺 仁 野田亜矢子 南 心司

(平成20年12月1日)

One Anubis baboon that could return to its troop after treatment for plasmotomy of the intestinal tract

HITOSHI WATANABE, AYAKO NODA, and SHINJI MINAMI

Hiroshima City ASA Zoological Park
Doubutsuen, Asa-cho, Asakita-ku, Hiroshima 731-3355

SUMMARY

An Anubis baboon reared and housed in our zoo was injured due to fighting. Prolapse and plasmotomy of the intestinal tract as a result of abdominal laceration was noted. Since the baboon could not be captured without anesthesia, it was anesthetized with a tranquilizer gun to perform anastomosis of the intestinal tract. The baboon was successfully reintroduced to the herd without incident.

要 約

本園で飼育及び展示をおこなっているアヌビスヒヒが闘争により負傷し、腹部裂傷による腸管の脱出および断裂を認めた。無麻酔での捕獲が不可能であったため麻酔銃により麻酔を施し腸管の吻合術をおこなった。外傷の治癒後は群への馴化をおこなった後に再導入することにより事故なく群に復帰させることができた。

はじめに

動物園では、社会性を持つ動物は群で飼育することにより、動物そのものだけでなく生態や行動も含め入園者に展示する機会が多い¹⁾。これにより動物そのものだけでなく、多様な行動をも展示することが可能となる。その反面、個別の投薬や群から隔離しての治療等は困難となり、個体の管理レベルは低下する場合は

ある。本園ではアヌビスヒヒ (*Papio anubis*) 約50頭の群を生息場所である東アフリカのコピと呼ばれる岩丘を再現した460m²の放飼場にて展示をしている。今回我々は群で飼育展示中のアヌビスヒヒの1頭が闘争により腸管の断裂をおこしたが、これを治療し群に復帰させることができたのでその概要を報告する。

症 例

症例は2000年3月20日、本園生まれの雌で、2004年5月30日に群の頭数管理のため卵巣摘出手術をおこなっており、出産歴はない(写真1)。



写真1 症例の個体 (写真中央)

経 過

2008年4月26日午後1時頃に放飼場で腹部臓器が脱出している状態を認めた。直ちに治療のため無麻酔で、群からの隔離および捕獲を試みたが失敗したため、閉園後に麻酔銃による捕獲をおこなった。麻酔は塩酸ケタミン100mgを圧縮ガス式ライフル型麻酔銃LR CAP-CHUR (PALMER CHEMICAL & EQUIPMENT社)にて投薬した。

麻酔銃は、園路から放飼場岩山最上部にいる症例に発射した。症例までの距離は約15m、高低差約7mであった。症例はダートの命中後約7分で不動化し、園内動物病院に収容した。捕獲時の体重は16kgであったため塩酸ケタミンの投薬量は6.3mg/kgとなった²⁾。

外傷は左腹部の裂傷と、同部位からの腸管の脱出および断裂を認めた。また腸管内容物の腹腔内への漏出も認めた。手術は正中切開にておこない断裂した腸管は3-0吸収糸で全層単結紮縫合の後、クッシング縫合にて端々吻合をおこなった(写真2)。最後に腹腔内をアンピシリン加生理的食塩水にて繰り返し洗浄した後裂傷部および切開部を術式に従って縫合した³⁾。

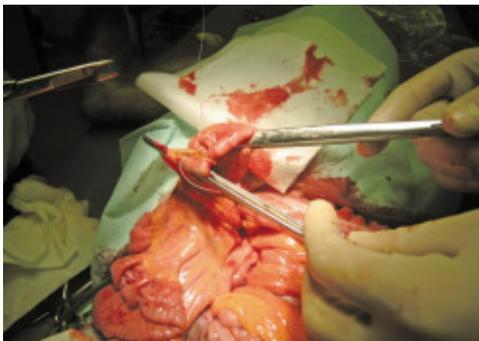


写真2 手術時の状況 (断裂した消化管と端々吻合による吻合)

麻酔銃の命中から手術終了までは約90分で、この間麻酔薬の追加投与や吸入麻酔は必要なく、酸素吸入をおこなったのみであった。また、手術中に血液検査および補液のために血管確保と採血を試みたが、血圧が低下していたために切皮をおこなっても不可能であった。そのため補液としてリンゲル液800mlを皮下注射した。

手術の翌日には起立可能となった。手術後24時間は絶食、絶水とした。無麻酔での注射による補液が不可能なため経口用ソリタT2の投与を試みたが飲もうとしなかった。そこで基準濃度から3倍に薄めたスポーツドリンクを少量与えたところ飲みはじめたので、少しずつ量と濃度を増やした。固形物の給餌は手術後4日目から少量のパナナから開始し、少しずつ量と種類を増やした。

感染防止のため抗菌剤はエンロフロキサシン160mg/日(10mg/kg)を筋肉内注射で術後25日目まで投与した。そして手術後35日目の5月31日に再び同様の麻酔をおこない抜糸し退院とした。

退院後は動物舎内の寝室に移し、群に戻すための馴化を4日間おこなった。群への馴化は、格子越しに群に個体を認識させることによりおこなった(写真3)。群への再導入後は他個体からの攻撃を受けることもなく、順調に復帰することができた。



写真3 群れへの馴化に利用する格子状の仕切り (格子越しにお互いを認識しコミュニケーションを図ることが可能となっている。)

考 察

今回の負傷の原因は不明であるが、アヌビスヒヒはその習性上群内での闘争は日常的に認められている。雄のアヌビスヒヒは十分な殺傷力のある鋭い犬歯を持っているため、今回の負傷は他個体の攻撃によるものと推測している。

本症例では事故の発生から治療まで約6時間と、捕獲の困難な放飼状態のサル類としては比較的短時間で対処ができたため、感染を抑えることが可能であった。

長期間群から隔離した場合、再導入時に群から拒絶され、攻撃を受ける可能性も高い。本症例においても

1か月以上隔離していたため、格子越しの馴化を4日間おこない、群が症例個体を受け入れる雰囲気ができあがるまで待った。これには格子越しにお互いを認識することが可能な飼育施設の構造が群への馴化に大きく寄与したと思われる。

群で暮らす動物が野生下で負傷や疾病により群生活から脱落した場合、再び復帰することは容易ではない。群へ復帰させた後に他の個体から攻撃を受ける等の危険があり、治療にあたってはできる限り隔離飼育を避ける方法を用いるよう配慮しているが、今回は入院治療が避けられない状況であるため隔離した。しかし、馴化することが可能な環境を整えることにより無事群に再導入できた。これは今後のアヌビスヒビにおける治療の幅を広げたものと思われる。

参 考 文 献

- 1) 大津晴男：生態，新飼育ハンドブック動物園編3，105～130，(社)日本動物園水族館協会，東京(1999)
- 2) Andrew A. McKenzie: The Capture and Care Manual. 1st ed., Wildlife Decision Support Services, Lynnwood Ridge South Africa(1993)
- 3) 多川政弘：獣医外科手術，竹内啓ほか編，第1版，201～204，講談社(1994)

左側前肢断脚手術後に胃拡張 —胃捻転症候群を発症したイヌの2例

黒瀬 紀子 伊藤 大 池本 麻弥 小田まゆみ

(受付：平成20年12月1日)

Two dogs that developed gastric dilatation and volvulus syndrome after amputation of the left forelimb

NORIKO KUROSE, MASARU ITO, MAYA IKEMOTO, MAYUMI ODA

Oda Animal Hospital 3107-6, Kamura-cho, Fukuyama 729-0112

SUMMARY

Two middle-aged retrievers that underwent amputation of the left forelimb developed gastric dilatation and volvulus syndrome (GDV) after the operation. There is no previous report on the association between amputation of a limb and GDV. However, the association between amputation of the left forelimb and GDV has been suggested. Causes of aerophagia and gastric dilatation, such as those showing difficulty in walking and eating, pain, and vomiting, were occasionally noted after the operation. A left-leaning prone position at rest after the operation is considered to be a cause of gastric volvulus.

要 約

断脚手術を行った中年齢のレトリバー系のイヌ2症例が、手術後に胃拡張—胃捻転症候群 (GDV) を発症した。これまでに、断脚手術とGDVの関連性について報告されていないが、左前肢の断脚手術については関連性があるものと推察している。断脚手術後の歩様、食餌のしにくさ、疼痛、嘔吐等吞気を促し胃拡張を引き起こす原因が散見され、術後の休息姿勢が左側へ傾いた伏臥位になることが胃捻転の一因と考えられる。

序 文

胃拡張—胃捻転症候群 (Gastric Dilatation-Volvulus: GDV) は中年齢もしくは老齢の大型深胸犬種に多く認められる疾患であるが、その原因や病態は極めて複雑である¹⁾。

遺伝的な品種の特徴、例えば形態や気質は、GDVの発生率に関与している可能性がある。胸腔が狭く深いイヌはGDVの発生率が高い。胸部X線写真を用いると、胸の深さの計測は、第8胸椎の腹側境界部から、剣状突起の頭側背部までの距離とされる。胸の幅は、左側第9肋骨の横側面から、右側第9肋骨の横側面ま

でを計測する。深さ／幅の比率を算出すると、その比率の低いイヌにおいて、GDVの危険性がより高いと報告されている。最近の研究によると深さ／幅の比率、腹部の深さ、そして雌犬においては身長も、すべてGDVの発生率と関係がある²⁾。

高度に加工された大量の食物や水を摂取した後の運動、1日1回の食事回数、早食い、荒い気性はGDVの危険性を優位に増大させる素因である²⁾。

GDVにおける病因のメカニズムには、ガストリン機能、筋電性機能不全、食道機能不全そして食事の要素が挙げられる。ガストリンは胃粘膜に栄養を与え、胃が空になると胃食道括約筋圧が上昇する。そして痙攣が誘発されて、空気嚥下が生じ、胃の膨満感による嘔吐の可能性を減少させる。GDVの急性期および手術後の期間は、GDVのイヌでは、正常な犬よりもガストリン濃度が非常に高い³⁾。

液体または気体の根源および胃膨満感の除去を妨げる排出障害が、GDVの発生に関与している。若齢のイヌ (<6か月) では、通常、胃には気体または液体の異常な蓄積はない。その代わり、通常は過食が見られる。成熟動物において、GDVの場合、胃はほとんど気体で満たされる。この気体の根源は、空気嚥下と一致する⁴⁾。これが胃拡張のメカニズムである。

胃が拡張すると、食道遠位部と胃食道移行部で捻転が生じる。この回転は、胃の大弯から洞の方へと続く。拡張が進むと、幽門は正常な位置から背側前方そして左方へ変位する。実験的にこれは胃肝靭帯のゆるみに起因する。拡張が続くと胃が腹側に変異し、一方向弁が存在する胃食道移行部が鋭角になる。さらなる空気嚥下で、空気が排出できなくなる。胃が拡張すると、脾臓は受動的に右方に引っ張られる。最終的には、脾臓の血管は、食道と交差する腹側に位置し、部分的に閉塞して静脈のうっ血が生じ、脾腫となる。また、胃が拡張すると後大静脈圧が上昇する。大静脈の血液は、腹側椎骨静脈洞を通り、奇静脈へ流入し、前大静脈へ還流する。さらに、胃の回転により、門脈が閉塞すると、腹腔内臓器の静脈のうっ血が生じる。この閉塞は重篤なショックへと進行する。

生理的な反応として、胃の機械的な拡大により内腔圧が上昇すると、胃への動脈圧は維持されるが、静脈からの血液の排出が障害され内腔血管のうっ血が生じる。その結果、虚血性低酸素症の発現により、蠕動運動が減少し、アウエルバッハ神経叢のガングリオン細胞が重篤な障害を受ける。低酸素症が3.5～4時間以内で改善されれば、神経損傷は可逆的である。また、胃内腔圧の上昇のため、胃粘膜の損傷が発現する。局所低酸素症は、上皮出血および浮腫の発現を引き起こす。潰瘍も発現する可能性があり、広範囲な粘膜壊死が生じる。

胃の拡張により、脾臓は受動的に引っ張られる。胃拡張による血管拡張と閉塞によって、脾臓の血管が拡張

した結果、静脈がうっ血する。回転した胃による門脈の閉塞によって、脾臓や他の腹腔内臓器からの静脈環流が遅れる。胃大網の短血管や左胃静脈の閉塞により、胃潰瘍が増大する。脾臓が虚血すると第Ⅷと第Ⅸ凝固因子の生産が減少する。これは播種性血管内凝固の発生において重要である。

呼吸器系もまた胃拡張によって影響を受ける。GDV罹患患者は呼吸数が増加する。拡大した胃は胸腔のスペースを圧迫し、呼吸数の増加と換気量の減少を引き起こす。この呼吸数の増加は分時換気量を維持するように働く。胃の拡大により横隔膜への圧迫がさらに強くなると、吸気時と呼気時の抵抗が増加し、肺のコンプライアンスが低下する。

後大静脈と門脈循環からの心臓への静脈環流の減少により、右心室は酸素化のための血液供給能を妨げられ、そのため肺胞換気不足、および、換気血流比不均衡が生じる。

うっ血もまた、心拍出量の低下を進行させる。この心拍出量の低下の主な原因は、静脈還流量の減少である。神経性因子もまた心拍出量の低下において重要である。胃の膨満は内臓交感神経を刺激し、低血圧を生じさせる。低血圧の結果、血流速度が低下する。血流速度が低いと、血液の粘稠度が増加する傾向にある。

門脈系が閉塞すると、エンドトキシン血症に陥りやすい。急性の門脈閉塞は、イヌにおいて高い致死率をもたらす。この高い致死率のメカニズムは、循環血液量の減少やショックによる神経系の亢進、あるいはエンドトキシンを中和する細網内皮系の機能不全である。腸のグラム陰性細菌からのエンドトキシンの放出が、門脈の閉塞に関連したショックの一因となる。

一般にGDVの胃は外科医からみた場合時計回りの方向に回転している(犬は仰臥位で臨床医はイヌの頭側に向くように尾側に立っている状態で判断する。)胃の回転は90～360度であるが、220～270度であることが多い。十二指腸と幽門は腹側かつ正中線の左側に移動し、食道と胃の間に変異する。脾臓は通常、腹部の右側の腹側に変位する。

この疾患に陥った場合、治療を施しても死亡率がかなり高く15～68%ともいわれている¹⁾。

今回、左側前肢の断脚を行ったレトリバー系のイヌ2頭が、術後にそろってGDVを発症したため、その報告および断脚とGDVの関連性について考察する。

材料および方法

材料

症例1はラブラドルレトリバー未避妊雌9歳で、皮膚炎や組織球腫の既往歴があった。症例は散歩中の跛行を主訴に来院したが、可動域の痛みを伴わず、跛行も軽度であったため、鎮痛剤の処方により一週間観察した。しかし、跛行はおさまらず、第8病日に触診

にて左前肢上腕部尾側の筋間に腫瘤を触知した。レントゲン検査では腫瘤部付近の骨格や肩関節、肘関節部ともに異常はなかった。第9病日に腫瘤の摘出と生検を行った。病理組織学的検査にて腫瘤は骨肉腫と診断されたため、断脚手術を提案した。

症例2はゴールデンレトリバー去勢雄11歳。左前肢に3か月前から存在した腫瘤が急速増大し自潰して来院した。針生検にて悪性腫瘍が強く疑われ、レントゲン検査にて周辺の骨格にも異常が認められたため断脚を提案した。

方法

症例1は骨肉腫と診断されたため、第22病日に左側前肢肩甲骨を含む断脚手術を行った。断脚手術前にケトプロフェンの全身投与とリドカインによる局所麻酔を行い、断脚手術後にはブトルファノールの全身投与とフェンタニルパッチの使用による疼痛管理を行った。断脚手術から6日後に初回のシスプラチンを投与した。シスプラチン投与の当日と翌日は激しい嘔吐が認められた。

症例2悪性腫瘍と判断し、第7病日に左側前肢断脚手術を行った。断脚手術前にフェンタニルパッチを使用し、ケトプロフェンの全身投与とリドカインによる局所麻酔を行った。断脚手術後はブトルファノール全身投与により疼痛を管理した。病理組織学的検査の結果、腫瘤は扁平上皮癌と判明した。

経過および結果

症例1は断脚後しばらくの間は、体重を右へ傾けているため、左後足が浮いた状態で歩行していた。断脚手術から15日後にGDVを発症した(写真1)。食後2時間で胃捻転の初期症状が現れた。胃捻転はほぼ180度、時計回りであり、胃の内容物は泡沫状であった。胃捻転整復後、チューブ胃造瘻術を施し、術後経過は良好であった。



写真1 症例1のGDV発症時の腹背X線画像
幽門は正中より右側にガスが充満した構造物としてみられる。

症例2は退院後も歩行はふらつき、飼い主は排尿排便時の移動には、ベストタイプの歩行補助用ハーネスを使用して歩行を補助していた。しかし、断脚手術から8日後にGDVを発症した(写真2)。食後5時間後に様子がおかしいということで来院した。胃の捻転はほぼ180度、時計回りであった。胃の内容物は泡沫状であった。胃捻転の整復と同時に、捻転により虚血状態にあった脾臓も同時に摘出し、チューブ胃造瘻術を施した。術後経過は良好であった。

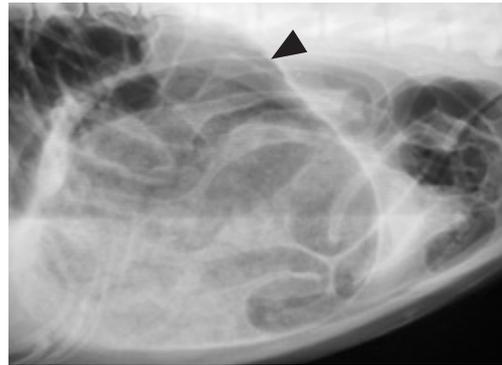


写真2 症例2のGDV発症時の右側面X線画像。
ガスが充満し、拡張した胃がみとれる。

考 察

左側前肢の断脚手術を行った中年齢のレトリバー系の症例が2例とも術後にGDVを発症した。2歳齢で左前肢の断脚手術を行ったラブラドルレトリバーはGDVを発症していないことから、断脚後のGDVの発症についてはその年齢も大きく関係していると思われる。今回の2症例は現在までに当院にて経験した他のGDV患者や、現在報告されているGDV患者の症状や胃の状態となんら相違がない。左側前肢の断脚により、片足であるがゆえのぎこちない歩き方や食事のしにくさなどが吞気を促し、GDVの危険性を高めたのではないだろうか。今回の症例のように大型犬で断脚を実施する目的は腫瘍によるものである可能性が高く、術後に実施したシスプラチンによる抗がん剤治療がもたらした激しい嘔吐がGDVの誘発原因となった可能性も否定できない。また断脚時に神経叢を切断することによる痛みやストレスおよび自律神経への影響も吞気を促した原因の一つかもしれない。今回の症例は2例ともに左側前肢の断脚であり、術後の休息姿勢が左側へ傾いた伏臥位になることも否めず、それも胃捻転の一因と考えられる。今後GDV好発犬種に断脚手術を施す際は、術後の生活や治療の説明と同時にGDVの危険性についてもよく説明する必要があると考えられる。まず断脚手術に際しては十分な疼痛管理を行うこと。手術後には断脚を施した側に姿勢が傾いてしまいがちなので、犬舎内や帰宅後の休息時の体位に十分気をつけ、平行な姿勢を保てるようにすること。体をサポー

トし、体が揺さぶられないような歩き方ができるように、歩行補助用ハーネスの使用など、オーナーのサポートが必要であると考えられること。シスプラチンなどの催吐作用の強い抗がん剤の使用においては投与時の嘔吐予防として有用な制吐剤の投与が必要であること。そしてGDV発症の危険性が高い犬には予防的に胃腹壁固定術を考慮するなど、病院スタッフ、獣医師、飼い主それぞれが十分に注意をする必要があると推察された。

参 考 文 献

- 1) 南毅生：胃捻転の病態生理, *Tech. Mag. Vet. Surg.*, 5(2): 10-12. (2001)
- 2) Glickman LT *et al.*: Multiple risk factors for the gastric dilatation-volvulus syndrome in dogs: a practitioner/owner case-control study, *J Am Vet Med Assoc* 33: 197, 1997.
- 3) Glickman LT, Glickman NW, Schellenberg DB, *et al.*, : Incidence of and breedrelated risk factors for gastric dilatation-volvulus in dogs. *J Am Vet Med Assoc* 216: 40, 2000.
- 4) Leib MS, Wingfield WE, Twedt DC, *et al.*: Plasma gastrin immunoreactivity in dogs with gastric dilatation-volvulus. *J Am Vet Med Assoc* 185: 205, 1984.
- 5) Caywood D, Teague HD, Jackson DA, *et al.*: Gastric gas analysis in the canine gastric dilatation-volvulus syndrome. *J Am Anim HospAssoc* 13: 459, 1977.

大腿骨粉碎骨折を2枚重ねプレートにて整復した猫の1例

櫻田 晃¹⁾ 長谷川孝寿²⁾ 板本 和宏³⁾
大村 斉⁴⁾ 大村 琴枝⁴⁾ 和田 安弘⁵⁾

(受付：平成20年12月1日)

Repair of femoral shaft comminuted fractures with stacked cuttable plate in a cat

AKIRA SAKURADA¹⁾, TAKAHISA HASEGAWA²⁾, KAZUHIRO ITAMOTO³⁾,
HITOSHI OMURA⁴⁾, KOTOE OMURA⁴⁾, and YASUHIRO WADA⁵⁾

- 1) Sakurada Animal Hospital 1-6-17-1, Senzoku, Hesaka, Higashi-ku, Hiroshima 732-0009
- 2) Misasa Animal Hospital 8-11, Misasakitamachi, nisi-ku, Hiroshima 733-0006
- 3) Itamoto Animal Hospital 2-2613-2, Fukuda, Higashi-ku, Hiroshima 732-0029
- 4) Pal Animal Hospital 4-13-1F, Hjiyama-cyou, Minami-ku, Hiroshima 732-0817
- 5) Wada Animal Hospital 3-1-19, Doyomaru, Saijyou, Higashi-Hiroshima, Hiroshima 739-0007

SUMMARY

After uncertainty over plate selection, double 2.0mm cuttable mini-plates were used for comminuted fracture of the cat femur to achieve sufficient plate strength and the securing of a screw hole. Robust internal fixation could be maintained throughout the treatment period.

要 約

プレートの選択に悩んだ猫の大腿骨粉碎骨折に対して2.0mm カッタブルミニ・プレートを2枚重ねで使用したところ、十分なプレートの強度とスクリュー・ホールの確保が可能となり治療期間を通して強固な内固定が維持できた。

1) さくらだ動物病院 (〒732-0009 広島県広島市東区戸坂千足1丁目6-17-1)
2) 三篠動物病院 (〒733-0006 広島県広島市西区三篠北町8-11)
3) いたもと動物病院 (〒732-0029 広島県広島市東区福田2丁目2613-2)
4) パル動物病院 (〒732-0817 広島県広島市南区比治山町4-13)
5) わだ動物病院 (〒739-0007 広島県東広島市西条土与丸3-1-19)

序 文

大腿骨骨折をプレート法にて整復する場合、AO法の強度表を基に骨折の状態、動物の性格や飼育環境などを考慮してプレートの選択をする。一般に猫の大腿骨骨折に対しては2.0mm カッターブルミニ・プレートまたは2.7mmD.C.P.のいずれかが用いられる。しかし、2.7mmD.C.P.では強度は十分であるが穴間ピッチが広すぎて骨折線を避けて支持に十分なスクリューの使用ができず、2.0mm ミニ・プレートではスクリュー・ホールは確保できるがプレートが薄く強度不足と感じられる場合がある。

今回、このような不具合からプレートの選択に悩んだ猫の大腿骨粉碎骨折に対して2.0mm カッターブルミニ・プレートを2枚重ねで使用したところ十分なプレートの強度とスクリュー・ホールの確保により強固な内固定が可能となり良好な結果が得られたので報告する。

症 例

日本猫、4ヶ月齢、オス、体重2.0kgが左側後肢挙上にて来院した。初診時の一般状態は良好であったが、左側大腿部の腫脹が認められた。レントゲン検査にて左側大腿骨粉碎骨折を認めた(写真1・2)。

術前検査として胸部レントゲン検査(正面像、側面像)と血液検査(CBC, GLU, BUN, GPT, 電解質)を実施したが異常は認められなかった。

治療および経過

100%室内飼育であるが多頭飼育のため骨折時の状況は不明であった。術式について飼主から受傷時の状況が不明であることへの不安や多頭飼育であること、この猫が治療に協力的ではないことから術後管理を必要とせず、強度が十分な固定方法を選択して欲しいとの要望があった。骨折後2日目に内固定法による整復を実施した。その術式としては、骨折の状態と術後管理の面からプレート法による整復を選択した。

まず、静脈確保後、塩酸メデトミジン $50 \mu/\text{kg}<\text{SC}>$ 及び塩酸ケタミン $5\text{mg}/\text{kg}<\text{IV}>$ にて麻酔導入し、気管チューブ挿管後、イソフルレンにて麻酔維持を行った。大腿骨へのアプローチは定法に従い大腿部外側の大腿骨のライン上を切皮し、続いて大腿筋膜張筋を切開して外側広筋と二頭筋を鈍性分離し、大腿骨を露出した。まず、近位の大腿骨頸にまで及ぶ骨折は1.5mmの皮質骨スクリューをラグ・スクリューとして使用し、1つの大きな斜骨の状態にしてから遠位と近位の骨折を同じくラグ・スクリューにて整復した。ラグ・スクリュー法により1本の骨に整復した後、大腿骨外側に合わせて2.0mm カッターブルミニ・プレートをベンデイン

グし、大腿骨のライン取りしてプレートの装着具合を確認したが、骨折の状態から強度面での不安が残った。そのため、2.7mmD.C.P.の使用を試みたが、穴間ピッチが広く固定に十分な数のスクリューが使用できなかったため適応ではないと判断した。そこで、固定に十分なプレートの強度と使用スクリュー数を確保できる方法として2.0mm カッターブルミニ・プレートを2枚重ねて使用(今回は大腿骨側には厚さ1.0mm カッターブルミニ・プレート、外側には厚さ1.5mmR.C.P.を使用)する方法を用いた(写真3)。近位は6皮質を捕らえたスクリュー固定ができなかったため第三転子から大腿骨頸を經由して大腿骨頭に及ぶスクリュー固定を行った(写真4)。結果的には、プレート上の遠位から6本目のスクリューはラグ・スクリューとして使用し、プレート反対側の内側皮質との固定ができたためさらに固定強度を上げることができた(写真5・6)。若齢猫であり1.5ヶ月後には十分な骨癒合が認められたのでプレート除去を行った(写真7・8)。治療期間中にケージレストや外固定は実施しなかったがインプラントの破綻は無く固定強度とQOLともに良好な維持ができた。



写真1 術前のX線写真 前後像



写真2 術前のX線写真 側面像

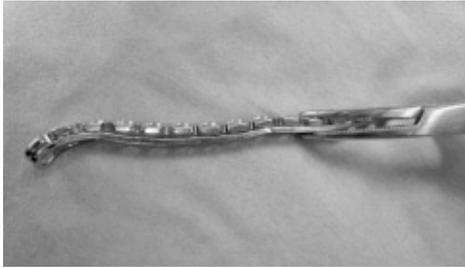


写真3 2枚重ねした2.0mmカッターブルミニ・プレート
下側：厚さ1.0mmカッターブルミニ・プレート
上側：厚さ1.5mm R.C.P.



写真4 術中写真 近位のスクリウ固定



写真5 術直後のX線写真 前後像



写真6 術直後のX線写真 前後像



写真7 術後1.5カ月(プレート除去時)のX線写真 前後像



写真8 術後1.5カ月(プレート除去時)のX線写真 側面像

考 察

今回の症例は猫の月齢と骨折の状態から本来は内転筋を温存したままピンとワイヤーによる整復固定が望ましいと思われるが、飼育環境、猫の性質、飼い主の要望(十分な強度のあり術後管理が不要な術式)から術式の選択に悩んだ。結果的にプレート法を選択したが、より安定した強度を得るため動物整形外科病院の樋口雅仁先生の手法であるプレートを2枚重ね(今回は2.0mmカッターブルミニ・プレートを使用)で使用方法により、固定に十分なプレートの強度とスクリウ・ホール確保が可能となった。しかしながら解剖学的整復と固定強度を優先したため内転筋を骨膜

から分離したため生物学的整復を妨げてしまったことはデメリットであった。

治療期間を通してケージレストや外固定は実施しなかったが、プレートの破綻等のトラブル無く骨癒合に導くことができたことから大変有効な手術方法であると考えられた。

この方法はプレートのバリエーションを広げ、より多くの骨折への対応を可能にすると考えられた。また、ミニチュア・ダックスフントなど骨幹の短い(特殊な形態の骨)犬種や肥満のため体重の割に骨幹の細い動物の骨折への対応も期待できると考えられ、さらに症例を蓄積したいと考えている。

参 考 文 献

- 1) Technical Magazine for Veterinary Surgeons 17
Inter Zoo(1999)
- 2) 新・小動物骨折内固定マニュアル～AO/ASIF テクニク～ (2001)

重度肺高血圧症を伴う三尖弁閉鎖不全症に Pimobendan 併用療法を実施した犬の 1 例

有田 申二 有田 昇

A dog in which Pimobendan combined therapy was implemented for tricuspid insufficiency accompanied by severe pulmonary hypertension

SHINJI ARITA, NOBORU ARITA

Arita Animal Hospital, Iida83-1 Hachihonmatu-cho Higashi-Hiroshima city
Hiroshima Prefecture, zip 739-0141, Japan

SUMMARY

A male 6-year-old Pekinese with astasia, dyspnea, and shock visited the hospital. The dog was diagnosed with tricuspid insufficiency accompanied by severe pulmonary hypertension based on echocardiography. In addition, verruca was suspected on echo of the tricuspid valve leaflet. The concomitant use of Pimobendan (product name: Acardi) could reduce the maximum systolic tricuspid valve regurgitation and improve right ventricular and pulmonary arterial pressures. However, the dog died on day 38 after the initial visit.

要 約

6才のオスのペキニーズが起立不能、呼吸困難、ショック状態で来院した。心エコー図検査にて重度肺高血圧症を伴う三尖弁閉鎖不全症と診断した。また、三尖弁尖には疣贅を疑うエコー像がみられた。Pimobendan（販売名アカルディ）を併用することにより、早期に収縮期三尖弁最高逆流速度は低下し、右室圧と肺動脈圧を改善することができたが、初診時から38日目に突然死した。

はじめに

Pimobendan (以下 Pim) は心筋収縮タンパクの Ca^{2+} 感受性増強による強心作用に加えて、ホスホジエステラーゼⅢ (以下 PDE Ⅲ) 阻害作用による血管拡張作用を有する強心剤として位置づけられている。そこで Pim の前負荷と後負荷の軽減および心拍出量の増加効果を期待し、今回肺高血圧症 (以下 PH) を呈した三尖弁閉鎖不全症 (以下 TR) の犬に対し治療を実施し、知見が得られたのでその概要を報告する。

症 例

6才のオスのペキニーズ。犬の美容室から帰宅後調子が悪いと来院され、起立不能、低体温、チアノーゼ、努力性呼吸、股動脈の低下がみられ、ショック状態を呈していた。症例は1才時から毎年フィラリア予防を行っており、2才時にはケンカ外傷にて、左眼球摘出手術をうけている病歴がある。

検査成績

1) 初診時血液検査所見 (表 1) :

軽度貧血, CPK 上昇, 軽度黄疸所見, ALP 上昇がみられ, mf (-) であった。

表 1 血液検査所見 (初診時)

HCT (%)	36	GPT (U/l)	47
HGB (g/dl)	10	TBIL (mg/dl)	0.6
WBC (μ L)	9800	ALP (U/l)	817
PLT ($\times 10^3/\mu$ L)	280	ALB (g/dl)	3.1
BUN (mg/dl)	27	Na (mEq/L)	141
CRE (mg/dl)	0.3	K (mEq/L)	4.7
CPK (U/l)	739	Cl (mEq/L)	106
GOT (U/l)	43		

2) 初診時胸部レントゲン所見 :

間質パターンと肺胞パターンと思われる肺野不透過性亢進像がみられた。また、左右後葉肺動脈拡張がみられ、右心系拡大もみられた (写真 1)

3) 初診時心エコー図検査所見 :

右側からの四腔断面カラードプラ法では、TR のため収縮期に右房においてモザイクパターンを呈していた (写真 2)。左側からの四腔断面では右房右室の拡大と、三尖弁尖には疣贅を疑うエコー像がみられた (写真 3)。連続波ドプラ法における収縮期 TR は 5.23m/秒で、右房右室の圧較差は 109mmHg であった (写真 4)。これより推定される収縮期右室圧と肺動脈圧は 119mmHg であった。また、右室流出路障害や先天性の心疾患は確認されず、僧帽弁逆流



写真 1

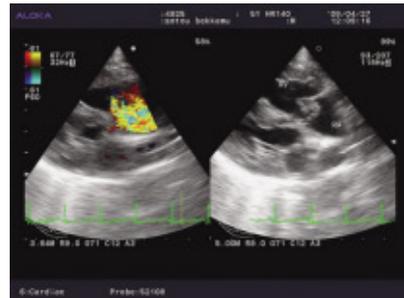


写真 2



写真 3

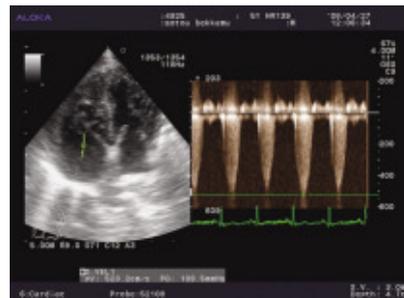


写真 4

やフィラリア虫体も認められなかった。以上の検査結果から、重度 PH による右心不全と診断した。

治療と経過

初診時体温 36.8℃，心拍数 140bpm，チアノーゼ，呼吸困難，起立不能であり，ショック状態とうっ血性右心不全の改善を目的に入院とし，ICU 装置内で酸素吸入を行った。また同時にネブライザー（ゲンタマイシン、プロムヘキシン）も実施した。静脈確保し少量の 5%ブドウ糖の持続点滴 1ml/kg/hr を行うとともに，塩酸ドパミン 3 μg/kg/分にて実施，フロセミド 2mg/kg，アンピシリン 30mg/kg，デキサメタゾン 0.1mg/kg 静脈投与し，アミノフィリン 5mg/kg 皮下投与した。

第 2 病日では体温 38.5℃，心拍数 150bpm，舌の色も赤味を帯び，起立し，尻尾を振るようになる。しかし血液凝固亢進状態（表 2）と PH からおこる肺血栓塞栓症や DIC を危惧して，メシル酸ガベキサート 2mg/kg/hr 持続点滴を行った。また食欲出現したため Pim 0.25mg/kgBID，抗血小板作用のあるジピリダモール 1.4mg/kgBID，プロムヘキシン 0.4mg/kgBID，塩化リゾチーム 5mg/kgBID の経口投与も開始した。エコー所見では右側からの左室短軸像にて，FS は 43% で維持されていた。しかし拡張期に心室中隔は左室側に圧迫されており（右室容量負荷所見），収縮期においても心室中隔は左室側に圧迫されていた（右室圧負荷所見）（写真 5）。また，TR 流速は 5.65m/秒（圧較差 128mmHg）であり，これより推定される収縮期右室圧と肺動脈圧は 138mmHg であった。初診時より逆流速度が速くなっているのは，血圧が改善したためと思われる。

表 2 血液凝固系検査

フィブリノーゲン	515mg/dl	(基準値 175 ~ 255 マルピー)
APTT	15 秒	(基準値 18.0 ~ 26.0 マルピー)

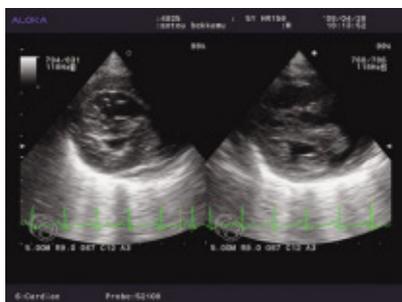


写真 5

第 3 病日は血圧正常（表 3），心拍数 144bpm，呼吸状態も良好で第 2 病日と同様の治療を行った。

第 4 病日の心エコー図検査では，TR 流速 4.42m/秒（圧較差 78.3mmHg）で，推定される収縮期右室圧と肺動脈圧は 88.3mmHg と，第 2 病日よりかなり改

善した（表 4）。胸部レントゲン検査でも，肺野硬化像は改善し，心臓の輪郭がはっきり認められるようになった（写真 6）。そして呼吸正常，活動良好，食欲旺盛のため退院とした。退院時は 1 日 1 回投与で血漿中濃度曲線下面積が大きく，低価格である理由から，抗生物質をマルボフロキサシン 5mg/kgSID に変更し，Pim，ジピリダモール，プロムヘキシン，塩化リゾチームは継続した。

表 3 オシロメトリック法による血圧測定

収縮期圧	125mmHg
拡張期圧	79mmHg
平均血圧	87mmHg

表 4 心エコー図検査の推移

	初診日	第 2 病日	第 3 病日	第 4 病日	第 14 病日
TRmax (m/s)	5.23	5.65	4.59	4.42	4.85
推定される右室圧と肺動脈圧 (mmHg)	119	138	94	88.3	104



写真 6

第 14 病日には一般状態良好であるが，心エコー図検査にて退院時よりも TR 流速の悪化と，三尖弁尖の疣贅の腫大化（写真 7）がみられたため，心肥大の改善と心筋の線維化抑制を期待して，アンジオテンシン II 受容体拮抗剤（以下 ARB）であるカンデサルタン 0.2mg/kgSID を追加した。しかししばらくして食欲旺盛だがやや活動不耐性との報告をうけた。そこでカンデサルタンを中止し，プロスタサイクリン製剤であるベラプロストナトリウムを低用量（0.5 μg/kgSID）で

併用すると良好に維持できていた。しかし、初診から38日目に突然死したとの報告をうけた。

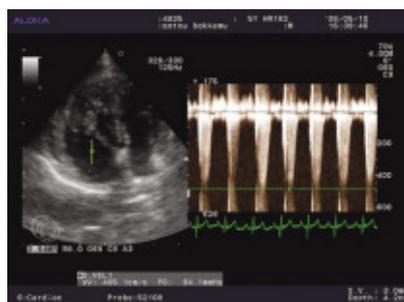


写真7

考 察

PHとは、収縮期肺動脈圧が35mmHg以上となった病態¹⁾であり、人医領域では原因の明らかな二次性PHと、原因不明の原発性PHに大別され、いずれの原因でも予後不良で早期に右心不全が進行し、突然死を招くことも多いとされている。また人では収縮期肺動脈圧が60mmHgで息切れ、呼吸困難、むくみなどの右心不全症状がみられ在宅酸素が必要になる。本症例はチアノーゼ、呼吸困難、起立不能がみられ、まさにこの右心不全状態であった。

初診時の血液検査所見としてTBILの軽度上昇、ALPの上昇がみられたが、これは腹部エコー検査にて肝静脈の軽度拡張が確認されたため、胆汁のうっ滞によるものと思われた。CPKの上昇については、心エコー検査にて三尖弁尖の疣贅が疑えたため、細菌性心内膜炎によるものではないかと思われた。しかし血液好気性・嫌気性培養検査は陰性であった。これは高熱時では細菌が検出されやすいが、本症例では低体温時に採血を行った事が、細菌を検出できなかった要因のひとつではないかと考えられた。また、非細菌性の疣贅性心内膜炎²⁾が報告されており、本例もこれに当たる可能性がある。

人医領域においては、PHでは血栓塞栓症が発生するリスクが高いため、ワルファリンを投与する。本症例の死亡原因も重度PHのため、肺血栓塞栓症が十分考えられた。また、三尖弁尖の疣贅が腫大化してきたことから、ジピリダモールではなくワルファリンを投与すべきだったかもしれない。もう1つ突然死の原因として考えられるのは、低用量ではあるが血管拡張薬であるベラプロストナトリウムをジピリダモールと併用したことである。これらは抗血小板作用があるため、脳出血を起こした可能性も否定できない。いずれにしても飼主の同意を得られず病理解剖を行えなかったため、直接の死亡原因を確定することは難しい。また、免疫介在性疾患を疑って抗核抗体検査も実施したが陰性であった。

本症例の病態として、ここまで重度のPHが心内膜

炎によるTR単独で起こることは考えにくい。推測の域を出ないが、PHから二次性にTRが起こり、同時に2才時に受けたケンカ外傷から感染し、三尖弁尖に疣贅を形成したのではないかと考えられた。

PHの治療として酸素吸入が大事であることは言うまでもないが、肺動脈圧を低下させ、なおかつ心拍出量や体血圧は低下させないことが理想である³⁾。そのため本症例にPDEⅢ阻害作用による血管拡張と同時に、強心作用のあるPimを他剤と併用することにより、早期に重度右心不全を改善することができた。また、Pimに血管拡張作用があるため、静脈系を拡張させる硝酸剤は前負荷を軽減させすぎによる低血圧を危惧し、今回は使用しなかった。そして利尿剤使用においても前負荷軽減と、血液濃縮による肺血栓症を誘発するおそれがあるため、第2病日までの投与で終了した。また本症例では使用していないが、原発性PHに対するクエン酸シルデナフィルに対する効果も報告されており⁴⁾、使用してみる価値はあると思われた。今後は、獣医学領域では原因別のPHの治療基準が明確に示されているわけではないので、治療効果や予後に関する多くの報告がなされることを期待する。

文 献

- 1) Rich S: Pulmonary hypertension, Heart Disease: A Textbook of Cardiovascular Medicine, Braunwald E ed, 5th ed, 1908-1931, WBSaunders, Philadelphia(1997)
- 2) 柴崎文男: 犬の疣贅性心内膜炎の1症例, 第6回小動物臨床研究会年次大会, 38 (1985)
- 3) 山崎泰宏ほか: 肺高血圧を伴う肺気腫患者の循環動態および血液ガスに及ぼすPimobendanの急性効果, 日本呼吸器学会誌, 35, 847-853 (1997)
- 4) 豊島弓子, 新谷ゆう子, 豊島博昭: 原発性肺高血圧症と思われたパピヨンに内科治療で改善を見た1例. MVM 86;38-4,2005.

保冷剤に含まれるエチレングリコールにより 起立不能を呈したチワワの1例

田内 利樹 大杉真由子 久保田 誠 麻生 摂子 麻生 暁秀

(受付：平成 21 年 月 日)

A Chihuahua with astasia caused by ethylene glycol included in a refrigerant on accidental ingestion

TOSHIKI TANAI, MAYUKO OOSUGI, MAKOTO KUBOTA,
SETUKO ASOU, and TOSHIHIDE ASOU

Asou Animal Hospital 330-3, Imazu-chou, Fukuyama-si 729-0111

SUMMARY

Ethylene glycol poisoning was caused by the accidental ingestion of a refrigerant. Symptoms of mild depression and astasia developed in a short period after ingestion. The symptoms were immediately improved on emetic treatment, auxiliary infusion, and diuretic treatment. No sign of renal insufficiency was noted. The treatments were stopped on the 6th treatment day.

要 約

保冷剤誤飲によるエチレングリコール中毒の症例。誤飲により短時間で軽度沈鬱、起立不能の症状が発現。催吐処置、補助輸液および利尿処置により、急速に症状は改善。腎不全徴候も見られず、第6病日に治療終了となった。

はじめに

エチレングリコール（以下 EG）は、甘みのある液体で、不凍液や保冷剤などに使用されている。摂取された EG は腸管から急速に吸収される。この際、胃内に食物があればその吸収が遅れる。吸収された EG は、肝臓にてアルコール脱水素酵素により代謝されるか、未代謝のまま尿中に排泄される。EG の代謝産物によ

る代謝性アシドーシス、および腎尿細管への障害などから、中枢神経抑制作用、急性腎不全、低 Ca 血症などの症状が見られ、障害が重度だった場合は死亡、そこに至らなかった場合でも慢性腎不全に移行するケースもある。

近年では、保冷剤でも高分子凝集剤や樹脂分が使われているものがほとんどで、このようなものでは毒性も低く、大量に誤飲しなければ問題にならない。しか

し、EGを使用した保冷剤では少量の誤飲でも重篤な状況を引き起こすことがある。今回、EG誤飲により起立不能を呈した症例に遭遇したので報告する。

症 例

チワワ、避妊メス、体重2.8kg、8歳。保冷剤を食べてしまったと連絡があり、急いで来院を指示。連絡時の症状は、それほど顕著ではなく、多少ふらついているという程度だったが、移動中の30分程度で症状が進行し、軽度の沈鬱および起立不能の状態となった。

治療および経過

オキシドール経口投与、およびトラネキサム酸静脈投与による催吐処置を行った。これにより、直前に食べていた食事、および誤飲していた大量の保冷剤を回収した。同時に、脱水の補正や利尿の促進のため、補助輸液と利尿処置を行った。

血液検査所見では、GluおよびCholの上昇、正常範囲ではあるがCaの低下が見られた(表1)。静脈血液ガス測定では、pH7.417、HCO₃ 22.8mmol/L、BE0.4mmol/Lであり問題は見られなかった。治療開始1時間程度で歩行可能な状態にまで改善した。その後も、腎不全の発現を考慮して輸液治療を続行した。

表1 症状発現時の血液検査所見

BUN	13mg/dL	Na	156mmol/L
Cre	1.2mg/dL	K	3.8mmol/L
Ca	8.7mg/dL	Cl	118mmol/L
TP	6.3g/dL	HCT	39%
Alb	3.3g/dL	HGB	16.3g/dL
Glob	3.0g/dL	WBC	9770/μL
ALT	55U/L	NEU	6100/μL
AST	19U/L	LYM	2820/μL
ALKP	97U/L	MONO	660/μL
Chol	417mg/dL	EOS	170/μL
Glu	167mg/dL	BASO	10/μL
		PLT	352K/μL

第2病日には沈鬱状態、ふらつきは完全に解消し、飲食ともに良好だった。血液検査所見でもBUN11mg/dL、Cre0.7mg/dLと正常範囲であり、尿量の低下もなかったことから、輸液を終了し、自宅にて経過観察とした。

第6病日での血液検査でも高窒素血症は認められず、尿量も正常、尿比重の低下もなく、尿へのシュウ酸カルシウム結晶の出現も確認されなかったことから治療終了とした。

考 察

EG中毒では、摂取した量・時間経過によって臨床症状が多様に変化する。EGのLD50は犬で6mg/kgとされている。今回摂取した保冷剤のEG含有量は30%だったため、致死量には保冷剤の重量として、60g以上の摂取が必要となる。今回の症例では摂取量は40gと比較的多かった。EGに限らず異物の摂取によりショック状態を呈する場合もあるが、オーナー目前での摂取だったことからEG摂取が明白だったこと、催吐によりほとんどの保冷剤を回収できたこと、治療までの時間が短時間だったこと、直前に食事をとっていたためEGの吸収が遅れたことなどの要因により、比較的軽い症状のみで改善したのではないかと考えられる。

保冷剤での急性期の症状は、未代謝のEGの影響によるもので、吸収後30分～12時間で症状が現れる。沈鬱、運動失調などの中枢神経抑制作用および代謝性アシドーシス、嘔吐、多飲多尿が認められる。これらの症状は、EGが代謝、排泄されるにつれて減退していく。

その後、24～48時間で腎不全徴候が認められる。これはEG代謝産物の細胞毒性による、腎尿細管上皮の損傷による。

初期の治療では、EGの代謝産物生成を抑制し、その排泄機能を高めることが目的となる。摂取後2時間以内であれば、催吐や吸着剤を用いた胃洗浄などを行い、吸収前のEGを回収する。また、輸液や利尿剤の投与により尿量の確保、脱水の補正を行う。また、アルコール脱水素酵素と競合させEGの代謝を抑制、未代謝のまま排泄させるため、エタノールや4メチルピラゾールも使用される。早期治療の機会を逃してしまった場合、ほとんどの場合で腎不全に対する治療が必要となるが、予後不良である。その点においても、早期発見・治療が重要である。

本症例では、誤飲して治療開始までが短時間だったため、その後の経過も良好であった。理想的には自宅で催吐処置を行えばより万全だったかもしれない。

保冷剤自体には成分表記が行われていないものも多く、内容確認が困難なこともある。保冷剤の種類にもよるが、高分子凝集剤や樹脂分からなる保冷剤は冷却時に硬化するが、EGを含むタイプのものは完全には凍結せずゲル状のままである。これらの性状の違いから簡易での判別が行える。近年では、メーカーの企業努力によりEGの使用自体も少なくなり、万が一の場合でもより毒性の出にくい成分に変更されている。(写真1)

文 献



写真1 EG含有タイプの保冷剤 冷凍保存してもゲル状のまま

動物への安価な暑さ対策として、保冷剤が使用されていることもあるため、われわれ獣医師はオーナーに誤飲の危険性を呼びかけるとともに、誤飲してしまった場合に、迅速かつ適切な対応をとることが必要だと思われる。

- 1) 鶴飼卓：急性中毒処置の手引き，日本中毒情報センター編，第三版，232～233，株式会社じほう，東京（1999）
- 2) Mathews K. A.：小動物の緊急療法マニュアル，安川明男訳，初版，268～271，メディカルサイエンス社，東京（1999）
- 3) 喜多浩二 et. al.：犬のエチレングリコール中毒の2症例，第19回動物臨床医学会年次大会（1998）
- 4) 柴崎祐也 et. al.：猫のエチレングリコール中毒の1例，第22回動物臨床医学会年次大会（2001）

肺動脈狭窄症に対し経心室肺動脈拡張術を行ったチワワの1例

園田 康広¹⁾ 長澤 裕²⁾ 長澤 晶子²⁾ 上岡 尚民³⁾

(受付：平成20年10月27日)

A Chihuahua that underwent transventricular pulmonary artery dilation for pulmonary artery stenosis

YASUHIRO SONODA¹⁾, HIROSI NAGASAWA²⁾, MASAKO NAGASAWA²⁾, and NAOTAMI UEOKA³⁾

1) Sonoda Animal Hospital 2-19-50, Yagi, Asaminami-ku, Hiroshima 731-0101

2) Aki Pet Clinic 1-21-29, Yahata, Saeki-ku, Hiroshima 731-5116

3) Ueoka Animal Hospital 2-18-11, Yoshijimahigasi, Naka-ku, Hiroshima 730-0822

SUMMARY

A 3-month-old Chihuahua had a heart murmur, and was examined at the request of its owner. The dog was diagnosed with moderate pulmonic stenosis (PS). Only follow-up was conducted. At the age of 8 months, the dog presented syncope and atrophy. Therefore, the beating heart block modified method was employed for transventricular pulmonary artery dilation. Five years have passed since the operation. The dog has followed a favorable course without attacks.

要 約

3ヶ月齢のチワワに心雑音があったため、飼い主の要望により精査を実施したところ、中等度の肺動脈狭窄(PS)と診断した。経過観察のみとしていたが、8ヶ月齢時になり失神・虚脱が認められるようになったため、心拍動下にて経心室肺動脈拡張術の一つである、ブロック変法を試みた。術後、5年経過しているが、発作を起こすこともなく良好に推移している。

序 文

肺動脈狭窄症(PS)は、右室流出路から主肺動脈にかけてのいずれかに狭窄が認められる疾患で、固定した線維性病変または肥厚した心筋が狭窄の原因となる先天性心疾患で、症状が進行するにつれ、右室収縮期

圧上昇により不整脈や突然死を起こすことがある¹⁾。外科治療は、頸静脈からの経皮的バルーンカテーテルによる弁口拡張術や体外循環下における開心術も数多く報告されている^{2) 3)}。しかしながら、これらの方法では症例の体格がある程度大きくなければ実施できず、若齢のチワワ、マルチーズ等の小型犬種には実施がか

1) そのだ動物病院(〒731-0101 広島県広島市安佐南区八木2丁目19-50)

2) 安芸ペットクリニック(〒731-5116 広島県広島市佐伯区八幡1丁目21-29)

3) うえおか動物病院(〒730-0822 広島県広島市中区吉島東2丁目18-11)

なり困難なのが現状である。このような症例に対しては、心臓拍動下において右室流出路より拡張器等を刺入して狭窄を拡張する心内手術が選択されるが、小型犬に応用した報告はあまりない⁴⁾。今回、失神・虚脱を呈した小型犬の肺動脈狭窄症に遭遇し、心拍動下にて外科的狭窄拡張を試み、良好な結果を得ることが出来たので報告する。

症 例

チワワ、雄、8ヶ月齢、体重2.3kgで、他院にて心雑音の指摘を受け当院に紹介された。3ヶ月齢時に飼い主の要望により精査を実施ところ、中等度の肺動脈狭窄(PS)と診断。その後、臨床症状は特に認められず、経過観察のみとしていたが、3ヶ月齢になり失神・虚脱が認められるようになったため、再度検査を実施した。

検 査

1. 血液検査

血液検査ではTP、肝パネル、BUN等の異常はなく、特に問題は認められなかった。(表1)

表1 血液検査

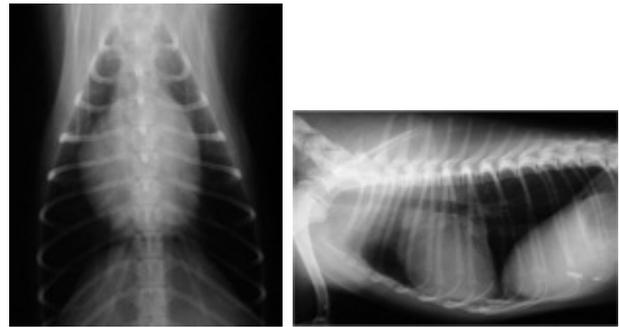
PCV	54%	AST	22IU/l
RBC	686×10 ⁴ /dl	ALT	52IU/l
Hb	10.5g/dl	BUN	19.7mg/dl
TP	7.0g/dl	Cre	0.8mg/dl
II	2	Ca	10.5mg/dl
WBC	15400/μl	Glu	109mg/dl
Band	0/μl	CPK	131IU/l
Seg	10780/μl	Cho	260IU/l
Lym	3850/μl	Na	146mmol/l
Eo	770/μl	K	3.9mmol/l
Mon	0/μl	Cl	111mmol/l
Bas	0/μl		
PLT	30.2×10 ⁴ /dl		

2. 胸部X線検査

胸部X線検査ではラテラル像において胸骨面と接地面の拡大、VD像において6時から9時方向においての心拡大が認められ、右心系の拡大が観察された。VHSは13.6、CTR60%であった。(写真1)。

3. 心エコー検査

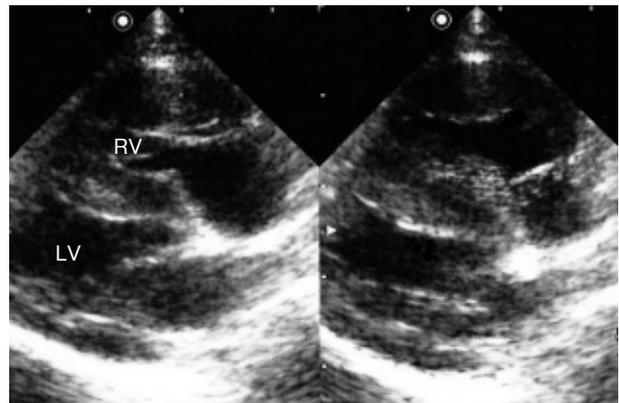
Bモード検査；右心内圧の上昇に伴い右心自由壁の肥厚、また心室中隔の左心室側への変位が認められた。(写真2)。



VD像

ラテラル像

写真1 胸部X線検査
右心系の拡大が観察される。VHS13.6, CTR60%



収縮期

拡張期

写真2 心エコー検査 Bモード左室長軸像検査
RV：右心室 LV：左心室
右心自由壁の肥厚、また心室中隔の左心室側への変位が観察される

カラー Doppler 検査；肺動脈狭窄部以降より、主肺動脈の拡張が観察され、収縮期にモザイクパターンが認められた。(写真3)。

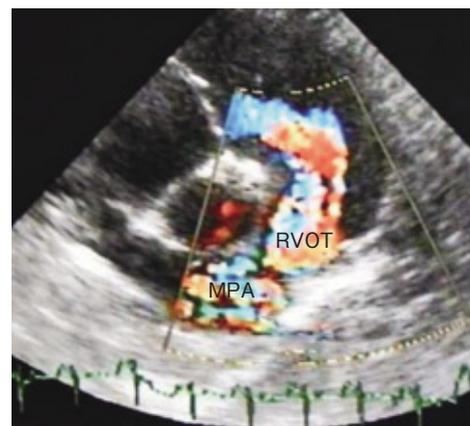


写真3 心エコー検査 カラー Doppler 検査
RVOT：右室流出路 MPA：主肺動脈
MPA内にモザイク状の乱流が認められる

心エコー連続波 Doppler 検査；主肺動脈にサンプルボリュームを置き狭窄部流速を測定した。その結果肺動脈流速は4.3m/sで、圧較差は74mmHgと推測された(写真4)。

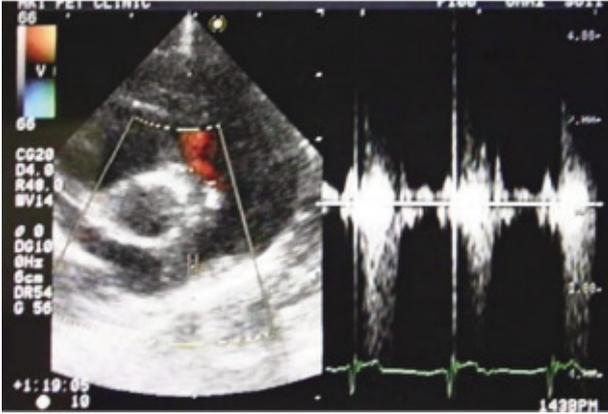


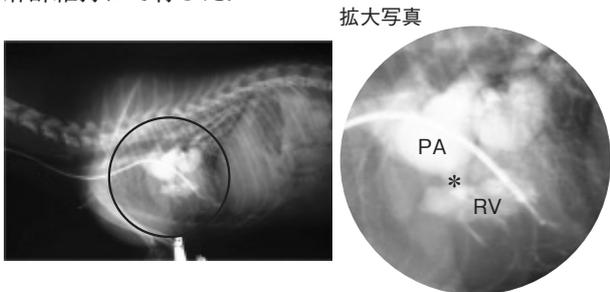
写真4 心エコー検査 連続波ドップラー検査
肺動脈流速は4.3m/sで、圧較差は74mmHgと推測される

以上、3ヶ月齢時には、圧較差55mmHgと測定され無症状肺動脈狭窄症であった症例が、時間の経過と共に、圧較差も74mmHgと若干の上昇が認められるようになり、また症状として失神・虚脱が認められるようになったため飼い主と相談の上、手術に踏み切ることとなった。

4. 心臓カテーテル検査および手術術式

手術を実施する前に、心カテーテル検査を行った。右頸静脈から右心室内へ造影用ピッグカテーテルを挿入しイオパミオドール（イオパミロン370）を5ml注入した。右心室からの選択的肺動脈造影像では、弁性の肺動脈狭窄と狭窄部後拡張が認められた（写真5）。

麻酔は硫酸アトロピン、マレイン酸アセプロマジン投与後、プロポフォールにて導入しイソフルレン吸入麻酔維持にて行った。



PA：主肺動脈 RV：右心室
*：狭窄部

写真5 選択的肺動脈造影検査

術式は、左側第4-5肋間を開胸して胸腔内へアプローチした。心膜を横隔神経の腹側縁で切開し、心膜テントを作成して術野を確保した。狭窄部は肉眼また触診で確認できたため、その部位に導入するモスキート鉗子をあてがい、右室流出路から刺入する部位を決定した。その部位に4-0ポリプロピレン縫合糸にてタバコ縫合をかけターニケット装着を施した。続いて11番の尖刃にて同部位を刺入した。この部位からターニケットを緩め、止血コントロールしながらモスキート鉗子を刺入し、軽く開きながら狭窄部を探り、肺動

脈内へ鉗子先を進めた。鉗子を開くことで肺動脈破裂をきたさないよう慎重に立開裂・横開裂を行った。この操作を、鉗子を引き抜き、肺動脈の状態を確認しながら数回繰り返した（写真6）。また、狭窄解除の程度を知るために、右心内圧を測定した。

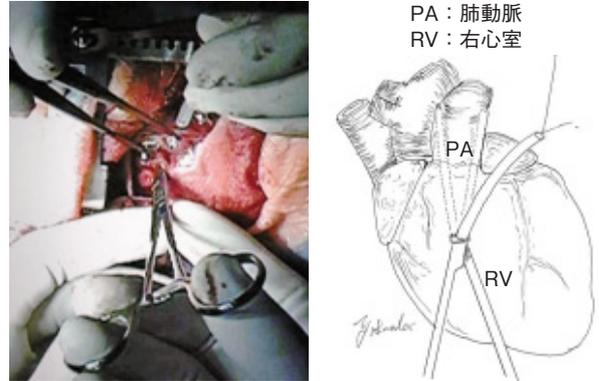
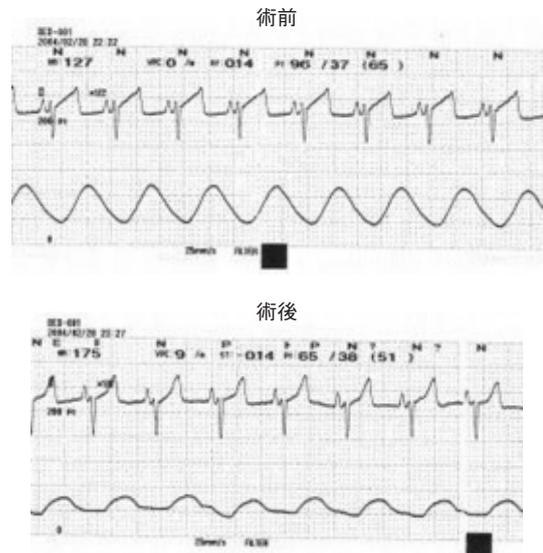


写真6 術中所見と模式図

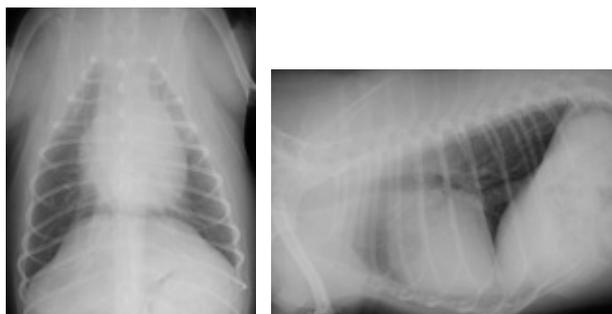
左頸静脈よりカテーテルを挿入し、右室内圧測定を行った。右心内圧は術前は、収縮期96mmHgであったものが術後65mmHgと低下が確認されたので終了とした。手術終了後、麻酔からの覚醒もよく、術後虚脱も認められなくなった（図1）。



●右心内圧は収縮期96mmHgから65mmHgと低下した

図1 術中の右心内圧検査

術後5年経過しているが、発作等も認められず、順調に経過している（写真7）。



VHS・CTRともに上昇認められず



肺動脈流速 3.5m/s 圧交差 49mmHg
写真7 術後5年レントゲン・エコー所見

考 察

肺動脈弁狭窄症は、固定した線維性病変または肥厚した心筋が弁下部狭窄の原因となり、心収縮期における流出路の機能的な狭窄を引き起こす疾患である。そのため右室内圧が上昇し右室心筋壁の肥厚が顕著になり、重度な場合、肺高血圧とともに三尖弁閉鎖不全等を起こし、死に至る場合がある。¹⁾ そのため狭窄の程度や重症度を判定した上で、薬物療法などの内科療法または低体温法や体外循環法などによる外科的治療を選択することが望ましい。外科的療法の手技には経皮的バルーンカテーテル法、開胸下における心内手術法がある。今回は犬か小さくカテーテルを用いた場合、操作が非常に困難を極めることが予想されたので、心内手術法を選択した。

ブロック法に代表される心臓拍動下に於ける心内手術法は特殊な設備を必要とせず、目的とする患部に効果的な処置を施すことができる優れた方法である。⁴⁾ しかしながら経皮的バルーンカテーテル法に比べ組織への侵襲性は高く、術者の経験に頼らざるを得ない欠点がある。本症例では実施しなかったが、止血のコントロールを最小限にするため、タバコ縫合部を二重に施こしたり、術中に超音波検査を行うなど、手術の安全性、確実性を増す対策が必要であると考えられた。狭窄の解除の程度は術前術後の右心室圧を測定することで改善の有無を判断したが、より確実性を増す為に肺動脈内圧を測定し肺動脈-右室間の圧較差を測定すべきであると思われた。今回の症例では、術後の発作もなく順調に経過しているが、合併症として手術直後

の肺水腫が少なからず報告されており⁵⁾、拡張後の観察も含め、慎重な対応が望ましいと考えられた。

今回の症例のように、バルーンカテーテル法のような拡張術や開心術に適さない非常に小型な症例に対しては、有効であると考えられる。今後、さらなる経験を重ね、手術適期・適応症などを検討する必要があると思われた。

参 考 文 献

- 1) 若尾義人, 局 博一: 小動物の心臓病学 基礎と臨床 P300 ~ 314 インターズー (2003)
- 2) 柴崎 哲, 高島一昭, 田中 綾, 永島由紀子, 星克一郎, 山根義久: 体外循環下開心術において右室流出路拡大形成術を実施した犬の肺動脈狭窄症の1治験例: 52 P707 ~ 710 日獣会誌 (1999)
- 3) 柴崎 哲, 高島一昭, 田中 綾, 永島由紀子, 星克一郎, 山根義久: 中心冷却体外循環下開心術により流出路拡大形成術を実施した小型犬の肺動脈狭窄症の2実験例: 9 P105 ~ 109 動物臨床医学 (2000)
- 4) Custer M. A., Kantor A. F., Gilman R. A., DeRlemer R. H.: Correction of pulmonic stenosis. J Am Med Assoc, 139. P565 ~ 566(1961)
- 5) Walker C. P., Bateman C. J., Rigby M. L., Brookers C. I.: Acute pulmonary edema after percutaneous balloon valvuloplasty for pulmonary valve stenosis. J Cardiothorac Vasc Anesth. 15. P480 ~ 482(2001)

広島市と畜場における牛盲腸便中の カンピロバクター保菌状況と検査方法

兼重 泰弘 古田 喜美 中尾 芳浩
児玉 実 佐伯 幸三 迫田 望
(受付：平成 20 年 12 月 5 日)

Campylobacter contamination in bovine cecal feces from slaughterhouses in Hiroshima City and a test method

YASUHIRO KANESHIGE, KIMI FURUTA, YOSHIHIRO NAKAO,
MINORU KODAMA, KOUZOU SAIKI, and NOZOMU SAKODA

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

SUMMARY

Campylobacter contamination was studied in bovine cecal feces. This study showed a higher *Campylobacter* detection rate in cecal feces (45%) than that in bile (37.7%). The *Campylobacter* detection rate tended to be higher in younger cows. The PCR method used herein is based on the rapid Multiplex method, which is considered to be useful for species identification of *Campylobacter*.

要 約

牛盲腸便を用い、カンピロバクターの保菌状況を確認した。今回の調査では、盲腸便中のカンピロバクターの検出率（45%）は胆汁を用いた調査結果（37.7%）よりも高い値を示した。また、年齢の低いものほどカンピロバクターの検出率が高い傾向がみられた。今回使用したPCR法は、迅速マルチプレックス法によるもので、カンピロバクターの種別同定に有用なものであると思われた。

序 文

カンピロバクター属菌は2005年現在、17種類が知られているが、このうち *Campylobacter jejuni* (以下、*C. jejuni*) と *Campylobacter coli* (以下、*C. coli*) の2菌種が食中毒菌に指定されている。また、厚生労働省の平成18年食中毒発生状況によれば、因物質別の事件数、患者数とも、カンピロバクターはノロウイルスについて2番目に多く、肉類及びその加工品での食中毒に限れば、カンピロバクターは事件数、患者数とも最も多いとされている¹⁾。

当検査所では、平成16年に牛胆汁中のカンピロバクターの調査を実施し、37.7%の保菌率を確認したが、今回は牛の盲腸便を検体としたカンピロバクターの保菌状況を取りまとめたのでその概要を報告する。

材料と方法

1. 材料

平成18年1月から平成20年6月までに、広島市と畜場に搬入された牛の盲腸便587検体を用い検査した。

2. 方法

増菌培養にはプレストン液体培地10mlを用い、これに採取した盲腸便1gを接種し、微好気状態で42℃24時間増菌培養後、スキロー寒天培地を用い同じく微好気状態で42℃24時間分離培養を行った。その後、スキロー培地上から直径1～3ミリの灰褐色の扁平コロニーを釣菌し、純培養後標本を作成し、顕微鏡下でS字状又はらせん状の形態を確認し、コークスクリュー様運動を示したコロニーをカンピロバクター陽性とした。その後、馬尿酸分解試験を行うとともに、PCR法によりカンピロバクター属菌及び *C. jejuni* と *C. coli* の鑑別を行った。PCR法は平成12年衛生微生物協議会で紹介されたLindonら^{2) 3) 4)}による迅速マルチプレックス法により、カンピロバクター属菌の判別と *C. jejuni* と *C. coli* の鑑別を同時に行った。

成 績

1. 盲腸便からの菌検出状況 (表1)

盲腸便587検体中、267検体(45%)からカンピロバクターを検出した。また、検出されたカンピロバクター267検体の内訳は、218検体が *C. jejuni*、49検体が *C. coli* であった。

2. 品種別菌検出状況 (表2)

カンピロバクターは、交雑種59%、乳用種41%、黒毛和種33%が陽性を示し、交雑種、乳用種、黒毛和種の順に高い検出率を示した。

表1 盲腸便からのカンピロバクター属菌検出状況

	検査頭数	陽性数		陽性数計 (%)
		<i>C.jejuni</i>	<i>C.coli</i>	
H18	287	114	24	138 (48%)
H19	240	79	20	99 (41%)
H20	60	25	5	30 (50%)
合計	587	218	49	267 (45%)

表2 品種別のカンピロバクター属菌検出状況

	検査頭数	陽性数		陽性数計 (%)
		<i>C.jejuni</i>	<i>C.coli</i>	
交雑種	177	88	18	106 (59%)
乳用種	312	102	27	129 (41%)
黒毛和種	98	28	4	32 (33%)

3. 年齢別菌検出状況及び比率 (図1)

年齢別の検出状況では、20ヶ月未満が陽性率61%であるのに対し、5歳以上は陽性率が19%と、年齢の低いものほど検出率が高く、年齢が上がるほど検出率が下がる傾向を示した。特に、*C. coli* の検出率は *C. jejuni* と比べ、顕著に年齢による変化が見られ、3歳以上のものでは検出されなかったが、*C. jejuni* は、5歳以上でも20%近い検出率が認められた。

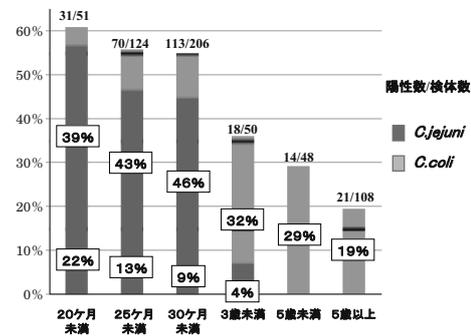


図1 年齢別のカンピロバクター属菌検出状況及び比率

考 察

これまでの報告⁵⁾にもあるようにカンピロバクターは、消化管内容物、胆汁の順に高い検出率を示しているが、今回の調査でも同様に、盲腸便中のカンピロバクターの検出率(45%)は当検査所で平成16年に胆汁を用いた調査結果(37.7%)⁶⁾より高い値を示した。また、年齢別のカンピロバクターの検出率は、年齢の低いものほど検出率が高く、年齢が上がるほど検出率が下がる傾向を示し、前回の胆汁の調査⁶⁾と同様の傾向がみられた。

なお、今回カンピロバクターの種別同定に使用したPCR法は、2種類のプライマーを混合した迅速マルチプレックス法によるもので、属・種の2系のPCR反

応を同一条件で処理できるため、その反応時間は、通常行われる PCR 反応時間の約 1/3 に短縮されている。検査の簡便性と時間を考慮すると、今回使用した PCR 法は、大変有用なものであると思われた。

今回の調査から 4 割以上の牛が便中にカンピロバクターを保菌していることが確認され、と畜解体時及び内臓検査時の消化管の慎重な取り扱いの必要性が改めて示された。今後は、ふき取り調査等によりカンピロバクターの枝肉への汚染状況を調べ、今回の結果とともに衛生指導の一助にしていきたい。

参 考 文 献

- 1) 厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課：平成 18 年食中毒発生状況，食品衛生研究，57 (9)，66-70 (2007)
- 2) Linton. D. et al.: Rapid identification by PCR of genus *Campylobacter* and of five *Campylobacter* species enteropathogenic for man and animals. *Research in Microbiology*, 147(9), 707-18 (1996)
- 3) Linton. D. et al.: PCR Detection, Identification to Species Level, and Fingerprinting of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*, *Journal of Clinical Microbiology*, 35(10), 2568-72 (1997)
- 4) Winters DK, Slavik MF. : Evaluation of a PCR based assay for specific detection of *Campylobacter jejuni* in chicken washes, *Molecular and Cellular Probes*, 9(5), 307-10 (1995)
- 5) 宮野桂子ほか：牛の胆汁および消化管内容物における *Campylobacter* 属菌保有状況，H20 秋田市事業概要，47～49 (2008)
- 6) 栗原健ほか：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，広島県獣医師会雑誌，20，66-69 (2005)

認定小規模食鳥処理場の衛生対策

井上 佳織 松下 香織 長澤 元
山下 和子 東久保 靖 久保田早苗

(受付：平成 20 年 12 月 5 日)

Hygienic measures in an authorized small-scale poultry slaughterhouse

KAORI INOUE, KAORI MATUSHITA, HAJIME NAGASAWA,
KAZUKO YAMASHITA, YASUSHI TOUKUBO, and SANAE KUBOTA

Hiroshima Prefectural Meat Sanitation Inspection Station 1911-1,
Awaya-cho, Miyoshi, Hiroshima 728-0025

SUMMARY

To investigate the sanitary state of one facility that slaughters a larger number of birds compared to other authorized small-scale slaughterhouses within the same jurisdiction, a bacterial contamination survey of the facility's equipment, instruments used for slaughter, slaughtered chickens, etc., a hygienic survey involving each treatment process, and a consciousness survey on employees' knowledge of hygiene were conducted. As a result, the inadequate handling of slaughtered chickens, such as insufficient washing and disinfection, was confirmed on slaughtering. Therefore, the washing and disinfection methods and the process for packing slaughtered chickens were reexamined. Then, an "operation procedure sheet" was created to give instructions on processing.

要 約

管内の認定小規模食鳥処理場の中で処理羽数が多い 1 施設について衛生実態を把握するため、施設の設備、解体作業で使用する器具及び食鳥とたい等の細菌汚染調査、各処理工程の衛生管理状況調査及び従事者の衛生知識に関する意識調査を実施した。その結果、設備等の洗浄消毒不足、解体作業において食鳥とたいの不適切な取扱い等が確認されたため、洗浄消毒方法及び食鳥とたいの処理方法の見直しを行い、処理方法については「作業手順書」を作成し、これに従い処理するよう指導した。

序 文

近年、カンピロバクターを原因菌とする食中毒が多く発生している¹⁾。本食中毒は鶏肉を原因とする事例が多いので、その発生を防止するために、食鳥処理場においてはより一層の衛生対策が求められている。

認定小規模食鳥処理場における衛生管理は経験的に行われていることが多く、定期的に自主検査を実施している施設も少ないため、年間1～2回程度の監視では衛生実態を把握しにくい現状にある。そこで、管内14施設の認定小規模食鳥処理場の中で処理羽数が多い1施設について衛生実態調査を実施し、衛生対策を検討した。

材料と方法

- 1 調査期間：平成20年5月から7月
- 2 調査施設：A 認定小規模食鳥処理場（外剥ぎ処理、成鶏処理羽数約87,000羽/年、従事者6名）
- 3 細菌汚染調査：施設の設備等15検体、解体作業時に使用する器具等43検体、食鳥とたい及び食鳥肉等（胸部）33検体、計91検体の拭取り及び採材を行い（図1）、生菌数、黄色ブドウ球菌数、サルモネラ属菌、カンピロバクターについて「食鳥処理場におけるHACCP方式による衛生管理指針」（以下「管理指針」）²⁾及び「食品衛生検査指針」³⁾に準じて検査を実施した。

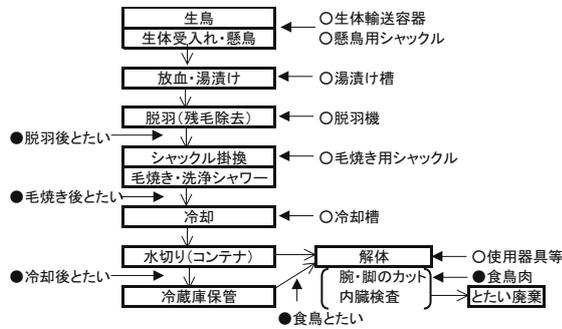


図1 食鳥処理工程及び採材箇所

- 4 衛生管理状況調査：「管理指針」及び厚生労働省通知等⁴⁾を参考に処理工程別の衛生管理状況について施設調査を行った。
- 5 従事者の意識調査：食中毒等衛生知識に関する意識調査を実施後、衛生対策を検討した。

成 績

1 「管理指針」を基にした細菌汚染調査及び衛生管理状況調査結果（表1）

生菌数は、懸鳥用シャックル、湯漬槽、脱羽機、毛焼き用シャックル、冷却槽において「管理指針」によ

る基準（洗浄消毒後の値）を超えた。これらの設備は目視でも羽毛等の付着が確認され、特に懸鳥用シャックルでの汚れが顕著であった。これら設備の洗浄はホースによる水洗浄だけで消毒は実施されていなかった。

脱羽後の食鳥とたい、冷却後の食鳥とたい及び食鳥肉等では、生菌数が「管理指針」による基準を超えた検体はなかった。

サルモネラ属菌、カンピロバクターは検出されなかった。黄色ブドウ球菌は、湯漬水（処理中）、脱羽後及び冷却後食鳥とたいから各1検体検出された。

2 解体作業における細菌汚染調査及び衛生管理状況調査結果

(1) 使用器具等の取扱い

解体作業に使用する器具類（包丁、まな板、軍手、タオル）（以下「器具類」）は、作業中バケツに汲置きした湯（以下「バケツの湯」）で洗浄され消毒工程はなかった。

器具類及びバケツの湯の生菌数を経時的に調査したところ、バケツの湯の生菌数が最も多かった（図2）。

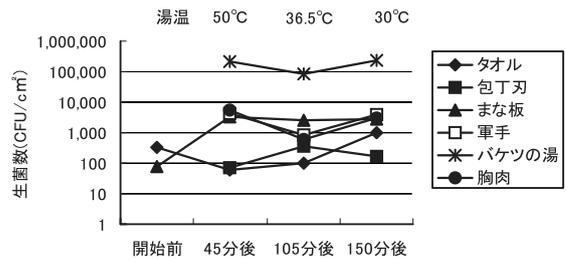


図2 使用器具等の生菌数の推移

* 開始前の生菌数：包丁刃 0CFU/cm²
軍手及びバケツの湯は未検査
* バケツの湯は作業開始60分後に湯を交換

実験的にゴム手袋を装着し塩素消毒槽を設置して作業を行った場合と、通常の作業を行った場合（軍手装着、消毒槽なし）の生菌数を比較したところ、軍手の方が1オーダー高かった（軍手 $8.3 \times 10^2 \sim 4.1 \times 10^3$ CFU/cm²、ゴム手袋 $7.4 \times 10^1 \sim 2.5 \times 10^2$ CFU/cm²）。

(2) 食鳥とたいの取扱い

冷却後コンテナ内で1時間以上水切りした食鳥とたいをコンテナから解体作業台に移す時、糞便が付着した食鳥とたいは、床に放置され糞便付着部位はタワシ（黄色ブドウ球菌 4CFU/cm²検出）で洗浄されていた。

3 従事者の意識調査

衛生管理状況調査で不適切な取扱いが確認されたことから、従事者に食中毒等衛生知識に関する意識調査を行ったところ、カンピロバクター等食中毒菌についての知識はあったが、糞便中に食中毒菌が存在するという認識がなかったり、「菌が肉に付着しても加熱して

表1 「管理指針」を基にした細菌汚染調査及び衛生管理状況調査の結果

工程	検体 基準 (生菌数)	細菌汚染調査 (CFU/cm ²)		衛生管理状況調査		
		生菌数	黄色ブドウ球菌	温度	汚染の度合	消毒の有無
生体受入	生体輸送容器 1.0×10 ³ /cm ²	4.2×10 ²	(-)		+	無
懸鳥	シャックル 1.0×10 ³ /cm ²	5.0×10 ⁶	(-)		+++	無
湯漬	湯漬水 (処理中) 1.0×10 ⁶ /ml	2.5×10 ⁴ /ml	10/ml	60℃	++	無
	湯漬槽 5.0×10 ⁴ /cm ²	2.3×10 ⁵	(-)		+	無
脱羽	食鳥とたい体表面 1.0×10 ⁵ /cm ²	4.5～8.8×10 ²	4		+	
	脱羽機 (接触面) 5.0×10 ⁴ /cm ²	2.7×10 ⁵	(-)		++	無
掛換	シャックル 1.0×10 ³ /cm ²	3.2×10 ⁴	(-)		++	無
冷却	本冷却水 1.0×10 ⁴ /ml	3.0×10 ⁰ /ml	(-)	1℃	+	有 (次亜塩素酸 Na) (300ppm → 25ppm)
	本冷却槽 1.0×10 ³ /cm ²	7.7×10 ³	(-)		+++	無
	食鳥とたい・食鳥肉等体表面 1.0×10 ⁴ /cm ²	1.0×10 ² ～7.8×10 ³	4		+	
一時保管	冷蔵庫	(床) 9.3×10 ³	(-)	4℃	++	
	冷凍庫	(床) 5.8×10 ¹	(-)	-15℃	++	

注) 黄色ブドウ球菌 (-): 陰性を示す

表2 問題点及び改善策

工程	設備・機械・器具	問題点	改善策
懸鳥	シャックル	シャックルの汚染	洗浄消毒の徹底 (高圧洗浄機・塩素噴霧)
湯漬	湯漬槽	湯漬槽の汚染	洗浄消毒の徹底 (高圧洗浄機・塩素噴霧)
脱羽	脱羽機・フィンガー	脱羽機・フィンガーの汚染	洗浄消毒の徹底 (高圧洗浄機・塩素噴霧)
掛換	シャックル	シャックルの汚染	洗浄消毒の徹底 (高圧洗浄機・塩素噴霧)
冷却	冷却槽	冷却槽の汚染	洗浄消毒の徹底 (高圧洗浄機・塩素噴霧)
水切り	コンテナ	糞便が付着したとたい	糞便付着部位をトリミング (作業手順書)
内臓検査 (解体作業)	まな板・包丁	使用器具の汚染	消毒槽設置・ゴム手袋装着等

食べるので問題ない」, 「器具に付いた菌はバケツの湯で洗えば死ぬ」等食中毒予防に関する基礎的な知識の不足が明らかになった。

4 細菌汚染調査等の結果を基にした衛生対策 (表2)

細菌汚染調査等の結果から判明した問題点の改善策として, シャックル等の設備の汚染では高圧洗浄機及び次亜塩素酸 Na (25～50ppm) による洗浄消毒, 冷却槽では洗浄器具により汚れを除去した後洗浄消毒を行った。その結果, 生菌数は湯漬槽及び脱羽機では基準以下となったが, シャックル及び冷却槽では基準以下にならなかった。また, 冷却槽では改善前より菌数

が多くなった (懸鳥用シャックル 1.6×10⁴CFU/cm², 毛焼き用シャックル 1.3×10⁴CFU/cm², 冷却槽 2.4×10⁴CFU/cm²)。そこで, 衛生対策として洗浄に重点を置くこととし, さらに, 洗浄消毒の実施確認及び記録管理のために「チェック表」を作成した。

使用器具類の汚染に対しては, 塩素消毒槽の設置及びゴム手袋の装着を指導した。

糞便が付着した水きり後の食鳥とたいの取扱いについては, 糞便付着部位をトリミングすること等その処理方法を見直した。さらに, 衛生管理のため「作業手順書」を作成し (表3), これに従い処理するよう指導

した。

従事者については衛生的取扱いに関する認識不足が確認されたため、全員が衛生講習会等へ出席するよう指導するとともに監視時の衛生指導を徹底することとした。

表3 作業手順書

水切り後の食鳥とたいの取扱い	
作業手順	1 コンテナから食鳥とたいを1羽ずつ取出す。 2 取出した時、体表に糞便が付着していないことを確認する。 3 食鳥とたいを作業台に移す。
衛生管理	食鳥とたいの体表に汚染がないことを確認する。
逸脱	体表汚染(食鳥とたいに糞便の付着)がある。
改善措置	糞便付着部位を包丁でトリミングする。
点検の方法	目視にて糞便が残っていないことを確認する。
点検の頻度	1羽ごと

考 察

管内14施設の認定小規模食鳥処理場の中で処理羽数が多い1施設について衛生実態調査を実施した結果、設備等の汚染、解体作業に使用する器具類の汚染及び糞便が付着した水切り後の食鳥とたいの不適切な取扱い等の問題点が確認されたため改善策を検討した。

シャックル等の設備の汚染は、洗浄消毒不足が原因と考えられたので、高圧洗浄及び塩素消毒の徹底を検討したが、設備等への影響を考慮すると塩素消毒には限界があるため洗浄に重点を置くこととした。シャックル及び冷却槽で生菌数が基準以下にならなかった原因として、材質自体が劣化していること、さらに、冷却槽では洗浄器具による新たなこすり傷で汚染が拡大したため改善前より菌数が多くなったと考えられた。したがって、洗浄器具は設備等の材質を傷つけないものを使用することを指導した。

食鳥とたい及び食鳥肉からカンピロバクター、サルモネラ属菌が検出されなかったのは、食鳥自体これらの菌を保有していなかったこと、食鳥とたいに糞便の付着がほとんど確認されなかったこと、チラー水の塩素濃度及び冷却温度等が適切であったことが推察された。

湯漬け水、脱羽後及び冷却後とたいから検出された黄色ブドウ球菌は、処理状況から人の手等による汚染がほとんど疑われなかったため鶏由来と推察された。

バケツの湯の生菌数が多かった理由として、作業中器具類をバケツの湯で洗浄することにより、バケツの湯に菌が蓄積し、さらに、作業の間に30～50℃の湯の中で菌が増殖したことが推察された。このことから、バケツの湯及び器具類の間で菌が循環し、これらから

食鳥肉に移行する可能性も考えられたため、洗浄と消毒を区別して行うことの必要性を指導し消毒槽を設置した。

食品を扱う上で軍手の装着は衛生的ではないが、認定小規模食鳥処理場では軍手による処理が大半を占める。今回軍手とゴム手袋の細菌汚染状況を比較したことで従事者にゴム手袋装着の必要性が認識された。

糞便が付着した水切り後の食鳥とたいの取扱いについては、従来の取扱い方法では、新たな汚染の付着及び汚染を拡大する結果になるため、付着した糞便を衛生的に取除く処理方法を検討し、さらに、衛生管理のため「作業手順書」を作成し、これに従い処理するよう指導した。

今回確認された問題点は、従事者の衛生意識調査から、誤った衛生知識に基づいて行われた結果と考えられた。したがって、今後も衛生講習会等への出席及び監視時の指導による正しい衛生知識の習得が必要である。

食鳥処理場の衛生対策は、特に、糞便による汚染防止対策に重点を置いて取り組むよう示されているが⁴⁾、チラー水等を介した交差汚染がその衛生対策を困難なものにしている。チラーの衛生管理は交差汚染防止のために重要であるが⁵⁾、実際には食鳥処理後のチラーの洗浄消毒だけでなく、処理中のチラー水の適切な換水量及び塩素濃度の維持管理は容易ではない。しかし、A食鳥処理場のように処理羽数の少ない処理場においては一羽ずつ丁寧に処理されているため、チラー水の衛生管理は比較的容易に実施できると考えられた。

今回の衛生対策が食中毒等の危害防止に活かされるには、今後、食鳥処理業者が自主衛生管理に取り組むことが必要である。そのためには啓発指導を継続するとともに、他の処理場においても自主衛生管理に向けた調査及び指導を実施していきたい。

文 献

- 1) 厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課：平成19年食中毒発生状況、食品衛生研究, 58, 77～164 (2008)。
- 2) 厚生省生活衛生局乳肉衛生課編：食鳥処理場におけるHACCP方式による衛生管理指針(1992)
- 3) 厚生労働省監修：食品衛生検査指針(微生物編)、社団法人日本食品衛生協会、東京(2004)
- 4) 厚生労働省：平成18年3月24日付け食安監発第0324001号厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課長通知「食鳥処理場におけるHACCP方式による衛生管理について」
- 5) 松田花子ら：食鳥処理場におけるカンピロバクター汚染実態とその制御への試み、広島県獣医師会雑誌, 17, 52～55 (2002)。

小児の急性呼吸器感染症に關与する ヒト・メタニューモウイルスの実態について

高尾 信一¹⁾ 原 三千丸²⁾ 島津 幸枝¹⁾ 桑山 勝¹⁾
佐々木由枝¹⁾ 福田 伸治¹⁾ 妹尾 正登¹⁾
(受付：平成 21 年 12 月 6 日)

Actual state of human metapneumovirus involved in acute respiratory infection of children

SHINICHI TAKAO¹⁾, MICHIMARU HARA²⁾, YUKIE SHIMAZU¹⁾, MASARU KUWAYAMA¹⁾,
YUKIE SASAKI¹⁾, SHINJI FUKUDA¹⁾, and MASATO SENO¹⁾

- 1) Center for Health and Environment, Hiroshima Prefectural Technology Research Institute 1-6-29, Minami-machi, Minami-ku, Hiroshima 734-0007
- 2) Hara Pediatric Clinic 6-6-202, Hinode-machi, Kaita-chou, Aki-gun, Hiroshima 736-0035

SUMMARY

To clarify the epidemiological state of hMPV infection in children, hMPV was screened in 3,095 patients who visited 12 pediatric departments in Hiroshima City between 2001 and 2008 and were diagnosed with unknown-origin acute respiratory infection using a conventional virus test. As a result, hMPV was detected in 13.9% of the patients, demonstrating that this virus was one of the important causative agents of acute respiratory infection in children. hMPV patients were identified every year, especially between February and June. A total of 55.0% of the patients in whom hMPV was detected had lower respiratory tract disease, and 40.4% upper respiratory tract disease. Analysis of homology was conducted based on the viral F gene sequence, using the 72 hMPV(s) strains detected between 2003 and 2008. As a result, hMPV(s) strains could be classified into the subgroups A1, A2, B1, and B2. Different hMPV subgroups were demonstrated to have prevailed in the same epidemic period.

1) 広島県立総合技術研究所保健環境センター (〒 734-0007 広島市南区皆実町 1-6-29)
2) 原小児科 (〒 736-0035 広島県安芸郡海田町日の出町 6-6-202)

要 約

小児における hMPV 感染症の疫学的な実態を明らかにする目的で、2001 年～2008 年までの間に広島県内 12 ヶ所の小児科を受診し、従来のウイルス検査では原因を特定することが出来なかった急性呼吸器感染症の患者 3,095 名を対象として、hMPV の検索を行った。その結果、対象患者の 13.9% から hMPV が検出され、このウイルスが小児の急性呼吸器感染症の重要な起因ウイルスの一つであることが確認された。hMPV 患者は毎年認められ、2 月～6 月に患者の発生が集中していた。hMPV が検出された患者の 55.0% が下部気道疾患、40.4% が上部気道疾患の患者であった。2003 年～2008 年までの間に検出された 72 株の hMPV について、ウイルスの F 遺伝子の塩基配列を基にして分子系統樹解析を行った。その結果、それらの hMPV は、それぞれ A1, A2, B1, B2 のサブグループのいずれかに分類することが出来、また異なるサブグループの hMPV が、同じ流行時期に混在して流行していたことが明らかとなった。

序 文

小児の急性呼吸器感染症の原因ウイルスとしては、インフルエンザウイルス、アデノウイルス、パラインフルエンザウイルス、RS ウイルス (RSV) 等が知られている。しかし、患者から採取された検体についてウイルス学的な検索を試みても、それらのウイルスが検出されず、起因ウイルスが特定出来ない症例も少なくない。しかし、2001 年にオランダの van den Hoogen らが、急性呼吸器感染症を呈する小児の鼻咽腔吸引液から *Paramyxoviridae* に属する human metapneumovirus (hMPV) を発見し¹⁾、このウイルスが急性呼吸器感染症の新たな原因ウイルスの一つである可能性を示唆した。その後、このウイルスは、オーストラリア²⁾ やカナダ³⁾、英国⁴⁾、フランス⁵⁾、香港⁶⁾ 等、世界各地の急性呼吸器感染症の患者から検出されており、日本国内においても 2003 年に後藤⁷⁾ や鈴木⁸⁾ が急性呼吸器症状の小児散発例から本ウイルスの検出を報告している。加えて 2004 年には我々が、日本国内においても hMPV が地域流行を起こしていることを初めて報告し⁹⁾、我が国においても hMPV が小児の呼吸器感染症の原因ウイルスの一つである可能性を指摘したが、hMPV 感染症の疫学的な実態については未だ不明な点が多い。そこで、今回我々は、小児における hMPV 感染症の疫学的な実態を明らかにする目的で、小児の急性呼吸器感染症患者から本ウイルスの検出を試み、その流行実態を明らかにしたので概要を報告する。

対象および方法

1. 対象

広島県感染症発生動向調査事業における病原体サー

ベイランスの目的で、広島県内の 12 ヶ所の医療機関 (小児科) において、2003 年 1 月～2008 年 5 月までの間に急性呼吸器感染症と診断され、ウイルス検査のために検体が採取された 0 歳 1 ヶ月～42 歳 3 ヶ月齢 (平均: 3 歳 7 ヶ月齢) までの患者のうちで、当センターで従来から行っているウイルス検査において、何らかの起因ウイルスが検出できなかった 3,095 名 (男: 1,505 名, 女: 1,590 名) からの咽頭拭い液と鼻腔吸引液、合計 3,107 検体を対象として hMPV の検索を行った。

2. 培養細胞を用いた hMPV の分離

対象とした患者から採取された咽頭拭い液や鼻腔吸引液を、5ml の保存培地 (ペニシリン、ストレプトマイシン加 veal infusion broth) 内に採取したものをウイルス分離用の検体とし、LLC-MK₂ 細胞を用いて hMPV のウイルス分離を試みた。LLC-MK₂ 細胞は 24 穴マイクロプレートに単層培養し、1 検体に 4 穴を用いて、1 穴あたり検体を 0.1ml 接種した。LLC-MK₂ 細胞の維持培地には、最終濃度 5 μg/ml になるように trypsin を添加した Eagle's MEM 培地を用いた。検体接種後の LLC-MK₂ 細胞は 34℃ の炭酸ガスふ卵器中で静置培養し、hMPV に特徴的な、細胞融合を伴う細胞変性効果 (CPE) を指標として 21 日間観察し、同様の過程を 3 代継代した後においても CPE が出現しなかった検体をウイルス分離陰性と判定した。分離ウイルスの同定は、培養上清について、以下に記した hMPV 特異的 RT-PCR 法で確認した。

3. RT-PCR 法による hMPV 遺伝子の検出

ウイルス分離に用いた同じ検体について、それらの 0.2ml から RNA を抽出した。ウイルス RNA の抽出は、QIAamp MinElute Virus Spin Kit (QIAGEN 社) を

用いた。抽出 RNA は、Peret ら¹⁰⁾ が報告した hMPV の F タンパクをコードする領域の 450bp を増幅するプライマーのうち、センス側プライマー (MPVF1f: 5'-CTTTGGACTTAATGACAGATG-3') を用いて 42°C 60 分間の逆転写反応により cDNA を合成した。その後、アンチセンス側プライマー (MPVF1r: 5'-GTCTTCCTGTGCTAACTTTG-3') を含む PCR 反応液を加えて、94°C 1 分、55°C 1 分、72°C 1 分を 40cycle で PCR 反応を行った (1st-PCR)。さらに、MPVF1f と MPVF1r で増幅した遺伝子領域の内側 357bp を増幅するように、我々が独自に設計したプライマー・ペア (MPVF2f: 5'-CATGCCGACCTCTGCAGGAC-3', MPVF2r: 5'-ATGTTGCAYTCYTTGATTG-3') を用いて nested-PCR を行った¹¹⁾。増幅は 1st-PCR の場合と同じ条件で行った。PCR 産物は 2% アガロースゲルで電気泳動し、エチジウムブロマイド染色の後、目的とする遺伝子増幅の有無を確認した。

4. 塩基配列の決定および分子系統樹の作成

hMPV の nested-PCR 産物について、ABI PRISM3100 Genetic Analyzer を用いたダイレクトシークエンシング法で塩基配列を決定した。解読した塩基配列のうち 334bp について、GenBank に登録されている既知の hMPV 株の塩基配列との相同性について BLAST を用いて比較した。さらに、コンピュータソフトウェアとして Clastal X を用いて塩基配列の解析を行ない、MEGA3 で分子系統樹を作成した。なお、これまでに論文として報告され、hMPV 株の遺伝子塩基配列が GenBank に登録されている以下の 9 株 (括弧内は GeneBank accession No.)、NDL00-1 (AF113371)、NL/17/00 (AY304360)、NL/1/94 (AY304362)、CAN97-82 (AY145295)、CAN97-83 (AY145296)、CAN98-71 (AY145285)、CAN98-75 (AY145289)、CAN98-76 (AY145290)、CAN99-81 (AY145294) を標準参照株として用いた。

結 果

1. RT-PCR 法を用いた hMPV 遺伝子の検出と陽性患者の週別発生状況

3,095 名からの咽頭拭い液と鼻腔吸引液、合計 3,107 検体を対象に、RT-PCR 法を用いて hMPV 特異的な遺伝子検出を実施した。その結果、対象とした患者のうち 431 名 (陽性検体数としても 431 検体) (13.9%) が陽性であった。それらの陽性患者の週別発生状況を図 1 に示した。hMPV 陽性患者の発生は、2003 年～2008 年まで毎年認められ、その発生時期は 3 月～6 月の春期に多く、7 月～11 月の夏から秋期には少ないか、あるいは全く認められなかった。

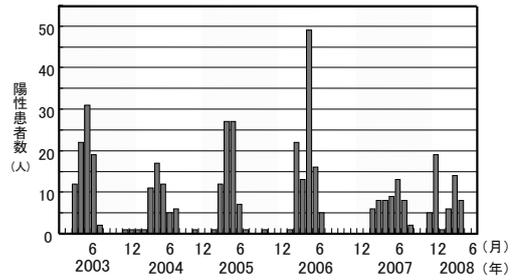


図 1 急性呼吸器感染症を呈した小児患者からの hMPV 月別陽性数 (2003 年～2008 年)

2. hMPV 陽性患者の臨床的・疫学的特徴

hMPV が検出された 431 名の年齢は、0 歳 3 ヶ月齢～6 歳 4 ヶ月齢 (平均 3 歳 2 ヶ月齢) までの乳幼児であり、性別は男児が 201 名、女児が 231 名であった。

hMPV 陽性患者の臨床診断名を、疾患名別に表 1 に示した。それらを見ると、急性気管支炎や急性肺炎等の下部気道疾患と診断された患者が 237 名 (55.0%) であり、急性上気道炎等の上部気道疾患と診断された患者は 174 名 (40.4%) であった。

表 1 hMPV 陽性患者の臨床診断名

疾患区分	臨床診断名	患者数	合計 (%)
上気道疾患	急性上気道炎	130	174 (40.4)
	インフルエンザ	25	
	咽頭炎・扁桃炎	19	
下部気道疾患	急性気管支炎	101	237 (55.0)
	喘息様気管支炎	37	
	細気管支炎	19	
	急性肺炎	80	
その他の疾患	不明熱・その他	20	20 (4.6)

3. LLC-MK₂ 細胞を用いた hMPV の分離

hMPV の分離は、LLC-MK₂ 細胞では細胞融合を伴った特徴的な CPE で確認された (図 2)。ウイルス分離と RT-PCR 検査との関係については、RT-PCR 法で hMPV 遺伝子が陽性となった 431 検体中、307 検体 (71.2%) から LLC-MK₂ 細胞でウイルスが分離された。逆に、hMPV 遺伝子が検出されなかった検体からは 1 例も hMPV は分離されなかった。

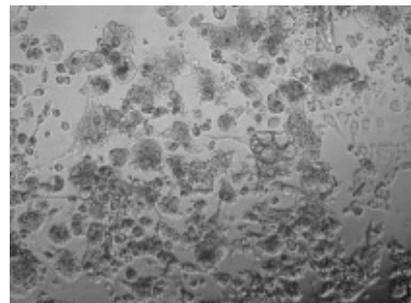


図 2 LLC-MK₂ 細胞で認められた hMPV の細胞変性効果

4. hMPV 感染患者の分子疫学的解析

2003年～2008年までの間に、RT-PCR法で検出したhMPV株のうちで、それらを代表する72株と、参照標準株9株、合計81株について、ウイルスのF蛋白をコードする遺伝子塩基配列を基に作成した分子系統樹を図3に示した。なお、我々が検出したhMPV株については、株名の後に検体が採取された年を記した[例えばSE-10032(2003)は、2003年に検体採取された株であることを示している]。

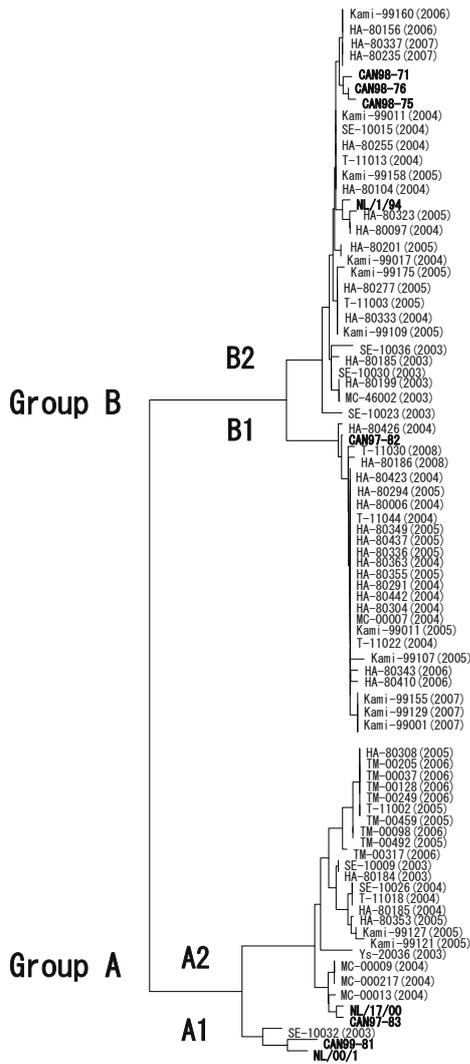


図3 hMPVのF遺伝子を基にした分子系統樹
太線で示した株は参照標準株。分離株名の後の括弧は、検体が採取された年を示す。

作成した分子系統樹をみると、我々が検出した72株については、遺伝子学的にグループAとグループBに大別され、各グループは、さらに、2つのサブグループ(A1, A2とB1, B2)に分類された。各株が属しているサブグループについて解析してみると、A1に属した株はSE-10032(2003)の1株のみであったが、残り3つのサブグループには、異なる年に検出された株が混在して存在していることが明らかとなった。

考 察

今回我々は、2001年～2008年までの間に広島県内の小児科を受診し、インフルエンザやアデノウイルス等、従来のウイルス検査では原因を特定することが出来なかった急性呼吸器感染症の患者3,095名を対象として、hMPVの感染状況について検討した。その結果、対象患者の14%からhMPVが検出され、本ウイルスが小児の急性呼吸器感染症の重要な起因ウイルスの一つであることが確認された。

hMPV陽性患者の発生を週別に集計した結果を見ると、年によって若干の違いはあるものの、毎年2月～6月に患者が集中していることが明らかとなった。国外では、1年を通じて患者発生が認められるとの報告もあるが¹²⁾、日本国内では春期を中心に流行するものと考えられた。このことは菊田^{13) 14)}によって報告された結果と一致する結果である。

これまでの報告では、小児におけるhMPV感染症の臨床像はRSV感染症に極めて類似しており、細気管支炎や喘息様気管支炎などの、乳幼児の喘鳴を来す疾患と関係していると説明されている^{15) 16)}。今回の我々がhMPV感染を確認した症例でも、その6割が急性気管支炎や、急性肺炎あるいは喘息様気管支炎といったRSV感染症類似の下気道炎を呈する患者であった。しかし、その一方で、残りの4割は急性上気道炎の患者であった。このことから、hMPVが重篤な下気道疾患を引き起こす起因ウイルスであることに加え、比較的軽度の上気道炎の起因ウイルスでもあると考えられた。

RSV感染症の場合は、特に1歳未満の乳児に患者が多発し^{17) 18)}、一方でhMPV感染症の場合は、それよりも年齢が上の3歳までが好発年齢であると言われている¹³⁻¹⁶⁾。今回の我々の調査結果でも、hMPV陽性患者は0歳3ヶ月齢～6歳4ヶ月齢(平均3歳2ヶ月齢)までの乳幼児であり、それ以上の年齢の者には認められなかった。

パラミクソウイルス科のメタニューモウイルス属に分類されるhMPVの遺伝子は、他のメタニューモウイルス(例えばトリ・ニューモウイルス等)と同様に、N-P-M-F-M2-SH-G-Lの8種類の遺伝子を持っている¹⁹⁾。今回我々は、ウイルスの表面蛋白の1つであり、感染細胞に対しては細胞融合活性を示すF蛋白をコードする遺伝子をターゲットとして、ウイルス遺伝子の検出と、その後の分子系統樹解析を行った。hMPVに関するこれまでの研究成果から、hMPVにはグループAとグループBの2種類に分類することが出来、それらのグループは、さらに2つのサブグループ(A1, A2とB1, B2)の4種類に分類できることが知られている^{3) 10) 20) 21)}。今回我々がhMPVの検出に用いたRT-PCR法では、1st RT-PCRにはPeretら¹⁰⁾が報告したプライマーを用い、さらにnested-PCRには、グループAとグループBの、どちらのグループに属するウイ

ルスでも検出可能なように、我々が独自に設計したプライマーを用いた。その結果、A1, A2, B1, B2の各サブグループに属する株を少なくとも1株以上確認することが出来た。このことから、今回我々が示したRT-PCR法を用いれば、hMPVのグループやサブグループに関係なく、hMPV遺伝子の有無を確認出来ると考えられた。

今回我々が実施したhMPVのF遺伝子の分子系統樹解析から、このウイルスの流行状況に関して興味深い点が明らかになった。即ち、本ウイルスの流行に際しては、同じ流行シーズンにおいて、遺伝子学的に類似したウイルス（例えばサブグループB1に属するウイルス）のみが流行しているのではなく、遺伝子学的に違いのある複数のウイルス（例えばA2, B1, B2の3種類のhMPV）が同じ時期に混在して流行する場合があることが明らかとなった。事実、我々は2003年に広島県内で発生したhMPVの流行の際に、同じ時期、同じ地域の異なる患者からA, B両方のグループのhMPVが、混合して地域流行を起こしていたことを確認している⁹⁾。異なるグループに属するウイルスが、同時期に混合して流行した場合には、hMPVに感染した児が、時期をおかず再度別のグループのhMPVに再感染する可能性も考えられるが、今回我々が調べた限りでは、同一シーズン中に同じ児で、2回以上のhMPV感染が確認された例は認められなかった。この点については、将来的にhMPVのワクチン開発を考える場合には重要な点になると思われるので、今後も注目して検討して行きたい。

今回我々はhMPVの検出に際して、RT-PCR法とLLC-MK₂細胞を用いたウイルス分離を全検体を実施し、hMPV遺伝子陽性検体のうちの71%でウイルスを分離することが出来た。これまでの報告では、hMPVを培養細胞で分離することは、必ずしも容易ではないと言われており^{13) 14)}、実際に患者検体からのhMPV遺伝子は検出可能だったが、ウイルス分離は成功していない報告²²⁾もある。我々が高率良くウイルスを分離出来た原因としては、通常のウイルス分離、特にインフルエンザやパラインフルエンザのウイルス分離を目的としてLLC-MK₂細胞を用いる場合に比較して、trypsin量を数倍多い濃度になるように維持培地中に添加してウイルス分離を実施したこと、培養期間を3週間ごとに3代の継代で、1検体につき最長で9週間と、長期に分離培養を続けたこと（通常のウイルス分離の場合は1週間ごとに3代の継代で、最長21日間）が考えられる。

hMPVについては、その存在が知られて日が浅いこともあり、臨床的にも疫学的にも明らかとなっていない点も多い。今後さらに症例を積み重ねてhMPV感染症の実態を明らかにするとともに、hMPVの検索を加えても、なお原因不明となっている小児の急性呼吸器感染症の起病病原体についても、今後検討して行きた

いと考えている。

文 献

- 1) van den Hoogen B. G., et al.: A newly discovered human pneumovirus isolated from young children with respiratory tract disease. *Nat Med.*, 7, 719-724 (2001)
- 2) Mackay I. M., et al.: Molecular assays for detection of human metapneumovirus. *J Clin Microbiol.*, 41, 100-105 (2003)
- 3) Boivin G., et al.: Virological features and clinical manifestations associated with human metapneumovirus: A new Paramyxovirus responsible for acute respiratory-tract infections in all age groups. *J Infect Dis.*, 186, 1330-1334 (2002)
- 4) Stockton J., et al.: Human metapneumovirus as a cause of community-acquired respiratory illness. *Emerg Infect Dis.*, 8, 897-901 (2002)
- 5) Freymuth F., et al.: Presence of the new human metapneumovirus in French children with bronchiolitis. *Pediatr Infect Dis.*, 22, 92-94 (2003)
- 6) Peiris J. S. M., et al.: Children with respiratory disease associated with metapneumovirus in Hong Kong. *Emerg Infect Dis.*, 9, 628-633 (2003)
- 7) 後藤郁男 ほか: インフルエンザ様患者からの Human metapneumovirus の分離 - 宮城県. 病原微生物検出情報, 24, 64-65 (2003)
- 8) 鈴木 陽 ほか: 喘鳴をきたした小児からの human metapneumovirus の検出. 感染症誌, 77, 467-468 (2003)
- 9) 高尾信一 ほか: 本邦において初めて流行が確認された小児の human metapneumovirus 感染症の臨床的, 疫学的解析. 感染症誌, 78, 129-137 (2004)
- 10) Peret T. C. T., et al.: Characterization of human metapneumoviruses isolated from patients in North America. *J Infect Dis.*, 185, 1660-1663 (2002)
- 11) Takao S., et al.: Clinical study of pediatric cases of acute respiratory diseases associated with human metapneumovirus in Japan. *Jpn J Infect Dis.*, 56, 127-129 (2003)
- 12) Louie J. K., et al.: A summer outbreak of human metapeumovirus infection in a long-term-care facility. *J Infect Dis.*, 196, 705-708 (2007)
- 13) 菊田英明: ヒト・メタニューモウイルス感染症. モダンメディア, 51, 7-12 (2005)
- 14) 菊田英明: ヒト・メタニューモウイルス. ウイルス, 56, 173-182 (2006)

- 15) van den Hoogen B. G., et al.: Prevalence and clinical symptoms of human metapneumovirus infection in hospitalized patients. *J Infect Dis.*, 188, 1571-1577 (2003)
- 16) van den Hoogen B. G., et al.: Clinical impact and diagnosis of human metapneumovirus infection. *Pediatr Infect Dis J.*, 23, S25-S32 (2004)
- 17) 浅村信二：RS ウイルス感染症. *小児科臨床*, 49, 1017-1024 (1996)
- 18) 原 三千丸：小児の有熱性気道感染症の原因ウイルス検索. *日児誌*, 105, 1227-1231 (2001)
- 19) van den Hoogen B. G., et al.: Analysis of the genomic sequence of a human metapneumovirus. *Virology*, 295, 119-132 (2002)
- 20) Viazov S., et al.: High prevalence of human metapneumovirus infection in young children and genetic heterogeneity of the viral isolates. *J Clin Microbiol.*, 41, 3043-3045 (2003)
- 21) Boivin G., et al.: Global genetic diversity of human metapneumovirus fusion gene. *Emerg Infect Dis.*, 10, 1154-1157 (2004)
- 22) 渡邊寿美, 齊藤隆行：呼吸器感染症からのヒトメタニューモウイルスの検出. *神奈川衛研所報*, 38, 12-14 (2008)

ヒトアデノウイルス 3 型分離株の制限酵素切断解析結果

池田 義文¹⁾ 島本 啄士²⁾ 国井 悦子¹⁾
山本美和子¹⁾ 阿部 勝彦¹⁾ 野田 衛³⁾

(受付日：平成 21 年 1 月 31 日)

Results of restriction endonuclease cleavage analysis of human adenovirus type 3 isolates

YOSHIFUMI IKEDA¹⁾, TAKUJI SHIMAMOTO²⁾, ETSUKO KUNII¹⁾,
MIWAKO YAMAMOTO¹⁾, KATSUHIKO ABE¹⁾, and MAMORU NODA³⁾

- 1) Hiroshima City Institute of Public Health (4-1-2, Shoko-Center, Nishi-ku, Hiroshima 733-8650)
- 2) Water Quality Control Division, Plant Facility Department, Waterworks Bureau, Hiroshima City (6-1-1, Ochiaiminami, Asakita-ku, Hiroshima 739-1732)
- 3) National Institute of Health Sciences (1-18-1, Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501)

SUMMARY

For 22 years and 9 months from April 1982 to December 2004, 15 types of human adenovirus (Ad) strain (2,115 strains) were isolated and identified. Of these, the Ad3 type was the most common (763 strains; 36.1%). The numbers of Ad3 type isolates by diagnoses were as follows: pharyngoconjunctival fever (230 strains) and epidemic keratoconjunctivitis (89 strains). The electrophoretic patterns employing restriction endonucleases were as follows: one pattern for *Bam* HI, *Bcl* I, *Bgl* II, and *Hind* III and two patterns for *Sal* I, *Sma* I, and *Xho* I. All strains showed the same pattern as that of the reference strain for *Hind* III, and 3 of 56 strains for *Sal* I. All of the other strains showed different patterns from that of the reference strain. One strain showed a new pattern for *Xho* I. According to the electrophoretic patterns for 7 restriction endonucleases, 47 of the 56 strains were classified into the Ad3a type, 5 strains into the Ad3a2 type, and 3 strains into the Ad3a3 type. One strain that showed a new pattern for *Xho* I was classified into a new genotype belonging to the Ad3a type.

A small number of genotypes, mainly the Ad3a types isolated in Hiroshima City during

1) 広島市衛生研究所 (〒 733-8650 広島市西区商工センター 4 丁目 1-2)
2) 広島市水道局施設部水質管理課 (〒 739-1732 広島市安佐北区落合南 6 丁目 1-1)
3) 国立医薬品食品衛生研究所 (〒 158-8501 東京都世田谷区上用賀 1 丁目 18-1)

the survey period, prevailed simultaneously and caused various diseases. However, there was no correlation between the genotypes and diseases.

要 約

1982年4月から2004年12月までの22年9ヶ月間に、15種類、2,115株のヒトアデノウイルス (Ad) が分離・同定された。このうちAd3型は763株 (36.1%) で最も多かった。Ad3型の臨床診断名別分離株数は咽頭結膜熱230株、流行性角結膜炎89株の順に多かった。制限酵素別の泳動パターンは、*Bam*H I, *Bcl* I, *Bgl* IIおよび*Hind* IIIで1種類、*Sal* I, *Sma* Iおよび*Xho* Iで2種類に分けられた。標準株と同じパターンを示したのは*Hind* IIIが全株、*Sal* Iが56株中3株で、その他の株は全て標準株とは異なり、*Xho* Iでは1株が新しいパターンであった。7種類の制限酵素の泳動パターンから56株中47株はAd3a型に、5株はAd3a2型に、3株はAd3a3型に、*Xho* Iで新しいパターンを示した1株はAd3a型に属する新しい遺伝子型に分類された。

調査期間中に広島市で分離されたAd3型はAd3a型を主流に少数の遺伝子型が混在して流行し、種々の疾患を引き起こしており、遺伝子型と疾患に偏りは認められなかった。

序 文

ヒトアデノウイルス (Ad) は50種類以上の血清型が知られており、ウイルス遺伝子のホモロジー、その他の性状からAからFの6種に分類されている。一方、Adはウイルス遺伝子DNAの制限酵素切断パターン解析に基づき、多くの遺伝子型が報告されている。1983年から1997年に広島市で分離されたAd8型は、その制限酵素切断解析の結果から、7種類の遺伝子型に分けられ、さらに、1995年に流行株の遺伝子型が入れ替わっていることも確認された¹⁾。1983年から2001年に分離されたAd19型は2種類、1986年から2000年に分離されたAd22型は4種類、1983年から2001年に分離されたAd37型は5種類の遺伝子型にそれぞれ分けられた²⁾。また、1989年から1998年に分離されたAd11型は9種類の遺伝子型にそれぞれ分けられた³⁾。そこで今回は、1982年から2004年までの期間に分離されたAd3型56株の遺伝子型について検討したので、その結果について報告する。

材料と方法

1 供試ウイルス

1982年4月から2004年12月までに、広島市感染症発生動向調査事業の検査定点医療機関を受診した患者から分離され、中和試験により同定されたAd3型のうち、各年から数株を無作為抽出した計56株を対象にした。対照には標準株として国立感染症研究所から分与されたG.B.株を用いた。

2 ウイルス DNA

ウイルスDNAは既報^{1) 2)}に従い抽出した。すなわち、25cm²培養フラスコ中のウイルス感染HEp-2細胞が完全に剥がれた時点で細胞を回収し、PBS (-) で2回遠心洗浄後、2mlのTE緩衝液 (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH8.0) に浮遊し、凍結保存した。DNA抽出は1% SDSで可溶化後、プロテナーゼK (0.5mg/ml) で37℃1夜処理した。フェノール・クロロフォルムで2回処理し、リボヌクレアーゼ (0.5mg/ml) で37℃15分処理した。エタノール沈殿は-40℃1夜行い、自然乾燥後再蒸留水200μlに溶解し、ウイルスDNA試料とした。

3 制限酵素による切断

制限酵素 (東洋紡) は、*Bam*H I, *Bcl* I, *Bgl* II, *Hind* III, *Sal* I, *Sma* I, *Xho* Iの7種類を使用し、添付の説明書に従い反応用緩衝液を加えて1unit/μlに調製した。消化は酵素液10μlとDNA試料10μlを混合し、*Sma* Iは30℃、*Bcl* Iは50℃、その他の制限酵素は37℃の恒温水槽中で1夜行った。

4 電気泳動

サブマリン泳動槽 (タカラ) のTPE緩衝液 (90mM Tris-Phosphate, 2mM EDTA, pH8.3, フナコシ) 中で1%アガロースゲル (タカラ SeaKem GTG) を用いて、35mA, 14時間、または130mA, 3時間室温にて泳動し、エチジウムブロマイド染色後、DNA切断パターンを紫外線照射下で写真撮影した。分子量マーカーはλファージDNAの*Hind* III消化物 (東洋紡) を用いた。

5 遺伝子型の分類と表記

得られたDNA切断パターン (以下パターンという。)

は制限酵素別に比較し、標準株と同じパターンはアルファベットの p で、標準株と異なるパターンは Li and Wadell⁴⁾ の報告を参考に、アラビア数字の 1 または 2 で表記した。また、遺伝子型の分類は Li and Wadell⁵⁾ の方法に準じて行った。

結果および考察

1 Ad 検出状況

1982 年 4 月から 2004 年 12 月までに、広島市感染症発生動向調査事業の検査定点医療機関を受診した患者から 15 種類、計 2,115 株の Ad が分離同定された (表 1)。このうち Ad3 型が 763 株と最も多く、35.9% を占めていた。臨床診断名別の Ad3 型検出数は、初診時の診断では咽頭結膜熱が 230 例と最も多く、次いで流行性角結膜炎 89 例、インフルエンザ 37 例の順に多かった (表 2)。また、明瞭な診断はなされていないが、咽頭炎、扁桃炎、気管支炎など症状を示すその他の呼吸器系疾患からも Ad3 型は 234 例検出された。

表 1 血清型別 Ad 検出数

血清型	検出数
Ad1 型	196
Ad2 型	330
Ad3 型	763
Ad4 型	182
Ad5 型	89
Ad6 型	25
Ad7 型	133
Ad8 型	135
Ad11 型	34
Ad19 型	51
Ad22 型	23
Ad31 型	7
Ad34/35 型	6
Ad37 型	116
Ad40/41 型	25
計	2,115

表 2 臨床診断名別 Ad3 型検出数

臨床診断名	検出数
咽頭結膜熱	230
流行性角結膜炎	89
インフルエンザ	37
感染性胃腸炎	34
感染性髄膜炎	21
ヘルパンギーナ	11
その他の呼吸器疾患	258
その他の眼疾患	18
その他の疾患	65
計	763

2 制限酵素切断パターン

7 種類の制限酵素 *BamH* I, *Bcl* I, *Bgl* II, *Hind* III, *Sal* I, *Sma* I, および *Xho* I の切断パターンを図 1 に示した。酵素別のパターンは、*BamH* I, *Bcl* I, *Bgl* II, および *Hind* III では 56 株全てが同じパターンで、*BamH* I と *Bgl* II はパターン 1 を、*Bcl* I はパターン 2 を、*Hind* III は標準株と同じパターン p を示した。*Sal* I, *Sma* I, および *Xho* I では 2 種類のパターンがみられ、*Sal* I は 56 株中 3 株が標準株と同じパターン p, 53 株がパターン 1 を、*Sma* I は 50 株がパターン 1, 6 株がパターン 2 を、*Xho* I は 55 株がパターン 1, 1 株が新しいパターン new であった。

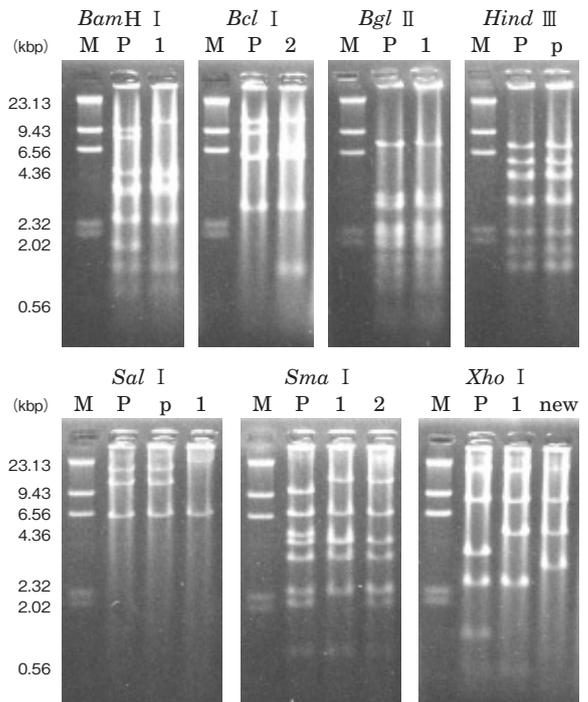


図 1 *BamH* I, *Bcl* I, *Bgl* II, *Hind* III, *Sal* I, *Sma* I, および *Xho* I の切断パターン

M は分子量マーカー, P は標準株 (G.B.) のパターンを、p は分離株が示した標準株と同じパターンを、1, 2, および new は標準株とは異なるパターンを示す。

3 遺伝子型別検出数

遺伝子型別検出数を表 3 に示した。Li and Wadell⁴⁾, Li et. al.⁵⁾ は日本を含む 6 か国の Ad3 型 61 株を 12 種類の制限酵素で解析し、17 種類の遺伝子型について報告している。まず *BamH* I のパターンから 6 種類 (Ad3p 型, Ad3a 型, Ad3b 型, Ad3c 型, Ad3d 型, および Ad3e 型) に分類し、次に他の酵素のパターンに基づき Ad3p 型を Ad3p 型, Ad3p1 型, および Ad3p2 型の 3 種類に、Ad3a 型を Ad3a 型, Ad3a1 型 ~ Ad3a8 型, および Ad3-7 型の 10 種類に分類した。彼らの遺伝子型別法⁴⁾ に従えば、広島市の分離株は 56 株中 47 株 (83.9%) が Ad3a 型に、9 株は *Sal* I,

Sma I, または *Xho* I でそれぞれ Ad3a 型とは異なるパターンを示したことから, 別の遺伝子型とした. すなわち, *Sal* I でパターン p を示した 3 株は Ad3a3 型に, *Sma* I でパターン 2 を示した 6 株中 5 株は Ad3a2 型に, *Xho* I でパターン new を示した残りの 1 株 (Ad3a2' 型) は, Ad3a2 型に近縁の新しい遺伝子型と考えられた.

4 年次別遺伝子型別検出数

年次別遺伝子型別検出数を表 4 に示した. 最も多く検出された Ad3a 型は 1983 年, 1990 年, および 2001 年を除き期間中を通して毎年検出され, Ad3a3 型は 1983 年と 1990 年に, Ad3a2 型は 2001 年, 2002 年, および 2004 年に, 新しい遺伝子型の Ad3a2' 型は

2000 年に検出された. 期間中に広島市で分離された Ad3 型は Ad3a 型を主流に少数の遺伝子型が混在して流行していた.

5 遺伝子型別臨床診断名別検出状況

遺伝子型別臨床診断名別 Ad3 型検出状況は Ad3a 型が約 84% を占めていたことから, Ad3a 型が種々の疾患から検出され, 遺伝子型と疾患とに大きな偏りは認められなかった (表 5).

Ad3 型の遺伝子型に関する報告は少ないが, 野田ら⁶⁾ は 1982 年から 1987 年までの広島市の分離株 79 株について *Bam*H I, *Bgl* II, *Hind* III, *Pst* I, *Sac* I および *Sma* I の 6 種類の制限酵素を用いた解析で, Ad3a 型, Ad3b 型, Ad3c 型および Ad3d 型の 4 種類

表 3 酵素別パターンに基づく遺伝子型別 Ad3 型検出数

遺伝子型	<i>Bam</i> H I	<i>Bcl</i> I	<i>Bgl</i> II	<i>Hind</i> III	<i>Sal</i> I	<i>Sma</i> I	<i>Xho</i> I	株数
Ad3p 型	P	P	P	P	P	P	P	0
Ad3a 型	1	2	1	p	1	1	1	47
Ad3a2 型	1	2	1	p	1	2	1	5
Ad3a3 型	1	2	1	p	p	1	1	3
Ad3a2' 型*	1	2	1	p	1	2	new	1

* : 新しい遺伝子型

表 4 年次別, 遺伝子型別 Ad3 型検出数

遺伝子型	1982	1983	1984	1985	1986	1987	1988	1989	1990	1991	1992	1993
Ad3a 型	2		3	3	3	2	1	2		2	2	2
Ad3a2 型												
Ad3a3 型		1							2			
Ad3a' 型*												
計	2	1	3	3	3	2	1	2	2	2	2	2

遺伝子型	1994	1995	1996	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	計
Ad3a 型	2	2	2	3	2	3	1		1	1	8	47
Ad3a2 型								2	1		2	5
Ad3a3 型												3
Ad3a2' 型*							1					1
計	2	2	2	3	2	3	1	2	2	1	10	56

* : 新しい遺伝子型

表 5 臨床診断名別, 遺伝子型別 Ad3 型検出数

臨床診断名	遺伝子型別 Ad3 型検出数				計
	Ad3a 型	Ad3a2 型	Ad3a3 型	Ad3a2' 型*	
咽頭結膜熱	17	1			18
流行性角結膜炎	7	1	2		10
インフルエンザ	5		1		6
感染性胃腸炎	4	1			5
感染性髄膜炎	1	1			2
ヘルパンギーナ	2				2
その他の呼吸器疾患	7	1		1	9
その他の眼疾患	1				1
その他の疾患	3				3
計	47	5	3	1	56

* : 新しい遺伝子型

の遺伝子型を報告している。野田らの報告した Ad3a 型は、用いた制限酵素は多少異なるもの、今回報告した Ad3a 型と同じ遺伝子型と思われた。水田⁷⁾は 1986 年から 1991 年までの山形市の分離株 356 株について *Bam*H I, *Hind* III, *Sma* I および *Bgl* II の 4 種類の制限酵素を用いた解析で 7 種類の遺伝子型を報告している。そのうち 1 つの遺伝子型が期間中優位の株を占めていた。篠原⁸⁾は千葉県の小中学校で 1991 年に発生した咽頭結膜熱集団発生事例の 30 株を、*Bam*H I, *Hind* III, *Sma* I, *Kpn* I および *Xho* I の 5 種類の制限酵素で解析し、分離株は全て同じパターンを示し、Li and Wadell⁴⁾の報告した Ad3a 型と同じ遺伝子型の株であった。

Ad の遺伝子型別について標準的な方法は示されておらず、また、報告者により用いた酵素が異なることから、文献上の比較は困難である。しかし、野田ら⁶⁾、篠原⁸⁾も報告しているように、わが国の Ad3 型は Ad3a 型を主流に存在し、その他の遺伝子型が短期間混在して流行していたものと思われた。

文 献

- 1) 池田義文ほか：結膜炎由来アデノウイルス 8 型分離株の疫学解析. 広島市衛研年報 21, 47-51 (2002)
- 2) 池田義文ほか：結膜炎由来アデノウイルスの制限酵素切断解析. 広島県獣会誌 17, 60-65 (2002)
- 3) 池田義文ほか：ヒトアデノウイルス 11 型分離株の分子疫学解析. 広島県獣会誌 14, 76-79 (1999)
- 4) Li, Q. G. and Wadell, G.: Comparison of 17 genome types of Adenovirus type 3 identified among strains recovered from six continents. J. Clin. Microbiol. 26, 1009-1015 (1988)
- 5) Li, Q. G., et.al.: Molecular Epidemiology of Adenovirus Types 3 and 7 Isolated From Children With Pneumonia in Beijing. J. Med. Virol. 49, 170-177 (1996)
- 6) 野田 衛ほか：広島市で分離されたアデノウイルス 3 型および 11 型の DNA 切断解析. 臨床とウイルス 19, 56-61 (1991)
- 7) 水田 克 巳：<http://ir.library.tohoku.ac.jp/re/bitstream/10097/21317/1/M2H082832.pdf>
- 8) 篠崎邦子ほか：千葉県における咽頭結膜熱の集団発生. 千葉衛研究報告 第 16 号, 33-37 (1992)

急性大腸菌性乳房炎と診断された乳牛に対する 乳房内洗浄療法の治療効果

篠塚 康典^{1) 2) *} 平田 晴美²⁾ 石橋 一郎²⁾ 大川 雄三²⁾
春日 朝子²⁾ 高木 光博³⁾ 田浦 保穂¹⁾

Therapeutic Efficacy of Mammary Irrigation Regimen in Dairy Cattle Diagnosed with Acute Coliform Mastitis

YASUNORI SHINOZUKA^{1,2)*}, HARUMI HIRATA²⁾, ICHIRO ISHIBASHI²⁾, YUZO OKAWA²⁾,
ASAKO KASUGA²⁾, MITSUHIRO TAKAGI³⁾, and YASUHO TAURA¹⁾

- 1) Laboratory of Veterinary Surgery, United Graduate School of Veterinary Medicine, Yamaguchi University, Yoshida 1677-1, Yamaguchi 753-8515,
- 2) Yamagata Veterinary Clinical Center, 461-1 Haruki, Kitahiroshima, Hiroshima 731-1531
- 3) Laboratory of Farm Animal Production Medicine, Faculty of Agriculture, Kagoshima University, 1-21-24 Korimoto, Kagoshima 890-0065, Japan

SUMMARY

ABSTRACT. The objective of this field study was to determine the therapeutic efficacy of mammary irrigation for the treatment of dairy cattle diagnosed with acute coliform mastitis caused by gram-negative bacteria. Additionally, the effects of different mammary irrigation regimen fluids such as ozone water and normal saline were compared. Dairy cattle clinically diagnosed with acute coliform mastitis (n=57) were enrolled in the study, randomly assigned to 1 of 3 groups, and received the following treatments: systemic antibiotic administration (SAA group; n=40), mammary irrigation regimen (MIR group; n=10), and both treatments (MIX group; n=7). Significant antipyretic effects, as assessed by rectal temperature measurement, were observed in the MIX and MIR groups. Although 2 irrigating fluids were used, namely, ozone water and normal saline, no significant difference was observed between the 2 groups. Fourteen days after the onset of the treatments, the milk yield recovery rate in MIR group tended to be higher ($p=0.06$) than that in the SAA group. Additionally, after 30 days of treatment, the MIR group cows demonstrated significantly higher successful recovery rates ($p<0.05$) than the SAA group cows. These results indicate that mammary irrigation with normal saline is an effective treatment for acute coliform mastitis in dairy cattle.

1) 山口大学大学院連合獣医学研究科家畜外科学講座 (山口市吉田 1677-1)

2) NOSAI 広島山県家畜診療所 (山県郡北広島町春木 461-1)

3) 鹿児島大学農学部獣医学科臨床獣医学講座産業動物獣医学分野 (鹿児島市郡元 1-21-24)

* 連絡先 篠塚康典 E-mail: shino@urban.ne.jp

投稿先: 日本獣医学会誌 J. Vet. Med. Sci. 71(3) : 269-273, 2009

要 約

本臨床研究の目的は、グラム陰性桿菌による乳牛の急性大腸菌性乳房炎の治療として乳房内洗浄療法の治療効果をあきらかにすることである。さらに、乳房内洗浄に用いる洗浄液としてオゾン水と生理的食塩水の効果を比較した。急性大腸菌性乳房炎と診断された乳牛(57頭)を次の3つの治療群に分け、ランダムに割り当てた。全身抗生物質投与群(SAAグループ40頭)、乳房内洗浄療法群(MIRグループ10頭)、そしてこれらの併用群(MIXグループ7頭)である。

MIXグループとMIRグループにおいて、治療翌日の有意な直腸温の低下を認めた。オゾン水と生理的食塩水を用いて乳房内洗浄療法を行ったがいずれも差は認められなかった。治療14日後において、SAAグループに対してMIRグループは乳量を回復させる傾向があった($p=0.06$)。さらに、30日後の治療率はMIRグループはSAAグループに対して有意に高かった($p<0.05$)。これらのことから、生理的食塩水による乳房内洗浄療法は急性大腸菌性乳房炎に対して有効であるといえる。