



日本獣医師会学会関係情報



日本産業動物獣医学会・日本小動物獣医学会・日本獣医公衆衛生学会

----- 日本獣医師会学会からのお知らせ -----

平成24年度 日本獣医師会獣医学術学会年次大会（大阪市）
地区学会長賞受賞講演（東北地区選出演題）

[日本産業動物獣医学会]

産地区—15

移植前牛胚の複数項目遺伝子診断及びバイオプシー胚の受胎性改善

西宮 弘¹⁾，高橋利清¹⁾，伊藤 隆²⁾，平野 貴³⁾

1) 秋田県畜産試験場，2) 秋田県北部家畜保健衛生所，3) 東京農業大学

はじめに

移植前の胚段階で性別及び遺伝性疾患の保因状況を知ることは、産子の種牛利用を図る上で有意義である。しかし、胚から直接採取できる細胞は少なく、診断項目数に制約が生じている。遺伝子診断を効率的に実施するため、DNA抽出を行う細胞数の増加と検出感度の向上が望まれる。我々は、採取細胞数増加のためヘルニア法をサンプリングに応用し、遺伝子診断の検出感度向上のためホットスタートPCRを取り入れたPCR反応系の改良を試みた。

一方、移植前にバイオプシー（Bx）を行った胚は、保存後の受胎性向上が課題となっている。我々はBx胚の保存に、受胎性の改善が報告されている超急速ガラス化法を応用した。さらに、現場での応用を念頭に、超急速ガラス化保存・ダイレクト移植のための凍結保存法の改良を行った。

材料及び方法

(1) 遺伝子診断の検出感度改善：クローディン16タイプ1欠損症（CL16）、メラニン細胞刺激ホルモン受容体遺伝子型（MSHR）、牛第13因子欠損症（F13）、チェディアックヒガシ症候群（CHS）の4種類の遺伝性疾患検査について、ホットスタートPCRを応用して反応系の改良を試みた。用いたキットは、CL16及びMSHRについてはMultiplex PCRKit（Quiagen）、F13及びCHSはHotStarTaq PlusKit（Quiagen）である。遺伝子増幅は、各キットに定められるDNA重合酵素活性化の後、4項目の遺伝子診断を同一のPCRサイクルで行った。熱変性97℃30秒、アニール56℃1分30秒、伸長反応72℃30秒の反応を45回実施し、最終伸長反応を72℃10分行った。プライマー

の濃度はCL16、MSHR、F13、CHSそれぞれ1μM、0.6μM、0.8μM、0.6μMとし、全量10μMの系で反応を行った。サンプルは遺伝性疾患保因牛の血液を用いた。

(2) 移植前胚の遺伝子診断：ホットスタートPCR反応系を用い、6ロット56胚について、性別、CL16及びMSHRの3種類の移植前胚の遺伝子検査を行った。サンプリングはヘルニア法を用い、供試胚の透明帯にスリットを形成後培養し、スリットから突出した細胞塊を切断回収してDNA材料とした。DNAは、0.03M NaOH処理によって抽出した。性別はLoopamp牛胚性別判別試薬キット（栄研化学㈱）、遺伝性疾患は（1）に示した方法によって遺伝子診断を行った。

(3) Bx胚の超急速ガラス化保存・ダイレクト移植：Bx後の胚をガラス化法により保存し（ガラス化保存胚）、ダイレクト移植して受胎性を調査した。ガラス化液の組成は15%エチレングリコール+15%DMSO+0.5Mスクロース+0.4%BSA加TCM199である。ガラス化液を0.4%BSA加TCM199で等量希釈した平衡液に5分浸漬させた後、ガラス化液に投入後30秒以内に、胚をガラス化液ごと予め液体窒素で冷却したアルミ板上に滴下して瞬間的に固化させ（固相表面ガラス化法）、板上で凍結済み希釈液とともにストロー内に封入し作成した。対照は、1.5Mエチレングリコールを用いた緩慢凍結保存胚（緩慢凍結保存胚）とした。

成 績

(1) 遺伝子診断の検出感度改善：ホットスタートPCRを応用した反応系の改良により、検出感度を10pg以下に高めることに成功した。検出感度の上昇は、400

～1,000倍であった。

- (2) 移植前胚の遺伝子診断：56胚すべてにおいて、3項目の遺伝子検査が可能であった。性判別では雄vs雌が24 vs 32 (42.9% vs 57.1%)、CL16では正常vs原因が28 vs 28 (50% vs 50%)、MSHRではE/E vs E/eが20 vs 36 (35.7% vs 64.3%)の判定結果であった。
- (3) Bx胚の超急速ガラス化保存・ダイレクト移植：胚の移植成績は、ガラス化保存胚vs緩凍結保存胚の受胎率は50.0% (11/22) vs 18.8% (3/16)で、ガ

ラス化保存胚で有意に高い受胎率が得られた。

考 察

PCR反応系の改良により、ヘルニア法による採取細胞のDNA抽出のみで、移植前牛胚において少なくとも6項目の遺伝子型検査が可能と考えられた。

また、我々の改良した超急速ガラス化保存・ダイレクト移植法は、DNA材料採取後のBx胚への応用において、無処置の体内受精胚と同等以上の高い受胎率を示し、その有用性が顕著に示された。

産地区—17

子牛の白筋症診断における臓器中ビタミンE及びセレン測定の有用性の検討

高野泰司¹⁾、日野正浩²⁾、竹田百合子¹⁾、高橋幸治³⁾

1) 宮城県仙台家畜保健衛生所、2) 宮城県北部家畜保健衛生所、3) 宮城県環境生活部食と暮らしの安全推進課

はじめに

子牛の白筋症はビタミンE (以下VE) 及びセレン (以下Se) 欠乏による栄養性筋症である。突然死や循環障害を主徴とする心筋型と、運動障害を主徴とする骨格筋型に分類され、いずれの型もへい死例での発見が多くみられる。診断は、疫学調査、臨床症状、病理学的検査及び生化学的検査等で総合的に行う。現在、子牛の白筋症におけるVE及びSeの評価は、血清中濃度を指標としているため、へい死例においては採血不能により診断に苦慮する。当所においても、平成22、23年度に、病理学的検査等により白筋症を疑った4頭中3頭がVE欠乏による白筋症と診断されたが、1頭はへい死による採血不能のため確定診断には至らなかった。そこで、今回、へい死例においても採材可能な臓器に注目し、VE及びSeの血清濃度と臓器濃度の関係について調査し、白筋症診断の指標としての臓器VE及びSe濃度の有用性について検討するとともに、白筋症を疑うも採血不能であった死亡子牛への応用を試みた。

材料及び方法

供試牛は、平成23年1月から6月に病性鑑定でVE欠乏による白筋症と診断された13～92日齢の子牛3頭 (白筋症群) と、平成22年11月から平成23年6月に病性鑑定に供試した10～79日齢の病理組織学的に白筋症が否定された子牛11頭 (対照群) である。材料は、血清、肝臓、脾臓、腎臓、心臓、肺で、VEは α トコフェロールとして高速液体クロマトグラフィー法で、Seは蛍光検出フローインジェクション法で測定した。また、採血不能であった白筋症を疑う25日齢の死亡子牛 (以下子牛A) の臓器VE及びSe濃度を同様にして測定した。血清濃度と臓器濃度の関係について、単相関及び単回帰分析により統計処理を行った。血清濃度との間に有意な相関がみられた臓器については、得られた回帰直線

に血清中の欠乏値を内挿し、臓器濃度を指標とした欠乏の基準値を設定した。同様に、各臓器間の単相関分析を行った。

成 績

血清VEは、白筋症群は $35.3 \pm 11.1 \mu\text{g/dl}$ (22.5～42.4 $\mu\text{g/dl}$) で全頭が欠乏値 (<100 $\mu\text{g/dl}$)、対照群は $182.9 \pm 179.5 \mu\text{g/dl}$ (27.3～583.4 $\mu\text{g/dl}$) で4頭が欠乏値であった。臓器中VE濃度は、白筋症群は肝臓、脾臓、腎臓、心臓、肺の順に (以下対照群及びSeも同様)、 0.88 ± 0.20 , 0.51 ± 0.80 , 0.72 ± 0.25 , 0.25 ± 0.34 , $0.43 \pm 0.66 \mu\text{g/g}$ 、対照群は 3.92 ± 5.67 , 3.70 ± 3.73 , 4.29 ± 3.66 , 2.90 ± 3.43 , $3.57 \pm 3.41 \mu\text{g/g}$ であった。全ての臓器VE濃度 (Y) において、血清VE濃度 (X) との間に有意な正の相関がみられた ($n = 14$, 肝臓; $r = 0.87$, $Y = 0.026X - 0.712$, 脾臓; $r = 0.87$, $Y = 0.018X + 0.258$, 腎臓; $r = 0.90$, $Y = 0.019X + 0.667$, 心臓; $r = 0.91$, $Y = 0.017X - 0.277$, 肺; $r = 0.80$, $Y = 0.016X + 0.542$)。回帰直線に血清VE濃度100 $\mu\text{g/dl}$ を内挿し、臓器中濃度を指標としたVE欠乏の基準値を設定した。基準値は、肝臓1.92、脾臓2.08、腎臓2.56、心臓1.45、肺2.10 $\mu\text{g/g}$ となった。各臓器間の相関については、いずれの臓器間においても中等度以上の相関がみられ、特に肝臓、脾臓、腎臓の3臓器間において高い相関がみられた。

血清Seは白筋症群が $71.1 \pm 38.6 \text{ng/ml}$ (31.1～108.2 ng/ml)、対照群が $72.0 \pm 21.5 \text{ng/ml}$ (44.0～100.4 ng/ml)を示し、両群ともに欠乏値 (<30 ng/ml) はみられなかった。臓器中Se濃度は、白筋症群は、 198.6 ± 34.9 , 363.3 ± 103.8 , 946.5 ± 301.0 , 192.6 ± 13.8 , $272.2 \pm 129.1 \text{ng/g}$ 、対照群は 421.3 ± 196.0 , 401.4 ± 142.8 , 828.2 ± 190.3 , 248.3 ± 52.4 , $278.6 \pm 78.5 \text{ng/g}$ であった。Seについては、臓器濃度と血清濃度の間に有意な相関はみられなかった。

子牛AのVE濃度は、肝臓0.11、脾臓<0.10、腎臓0.88、心臓1.17、肺<0.10 $\mu\text{g/g}$ 、Se濃度は、肝臓278.3、脾臓271.7、腎臓1711.4、心臓174.9、肺149.2ng/gであった。

まとめ及び考察

VEはいずれの臓器においても血清濃度と高い相関を示し、臓器濃度から血清濃度を推定することが可能であることが示唆され、臓器濃度を指標としたVE欠乏の基準値を設定した。これにより、採血不能な場合においても、臓器中VE濃度を定量することで診断可能となった。各臓器間においても中等度以上の相関がみられた。また、白筋症群は臓器中VEも顕著に低値を示した。以

上のことから、子牛の白筋症診断において、臓器中VEの測定は有用と思われた。VEは特定の貯蔵臓器がなく、組織全体に分布していることから複数臓器を測定することが必要と思われたが、本調査において示唆された肝臓、脾臓、腎臓を用いることで、より精度の高い診断が可能と推察された。子牛Aは、全ての臓器VE濃度が設定した基準値を大幅に下回り、病理学的検査等と併せて白筋症と診断した。

Seについては、血清濃度と臓器濃度の間に相関はみられなかった。本調査においては、血清Seが欠乏値を呈する個体はみられなかったことから、今後、欠乏値を呈する個体を含めた検討が必要と思われた。

〔参考〕平成24年度 日本産業動物獣医学会（東北地区）発表演題一覧

- | | |
|---|--|
| <p>1 異物刺入痕を認めなかった心膜炎の一症例について
横山哲郎（福島県農共連いわせ石川家畜診療センター）</p> <p>2 先天性な球節の沈下を呈した黒毛和種子牛に対するギプス固定による治療の試み
福田達也（宮城県農共連県北家畜診），他</p> <p>3 肩部に滑膜肉腫がみられた黒毛和種繁殖雌牛の1例
富岡美千子（北里大・大動物外科学研究室），他</p> <p>4 乳牛におけるヘモプラズマ感染の実態及び垂直感染の可能性
粟谷川俊之（盛岡地域農済葛巻家畜診），他</p> <p>5 雌雄外部生殖器が認められない牛生殖器奇形の1例
菊池元宏（北里大・獣医臨床繁殖学研究室），他</p> <p>6 黒毛和種発育不良子牛に見られた常染色体トリソミー
辻 暁美（秋田県農共連県南家畜診），他</p> <p>7 牛の単眼症の一例
森 大輝（山形県置賜家保），他</p> <p>8 畜産現場におけるマイコトキシンの汚染状況について
原田俊之（日本全業工業㈱），他</p> <p>9 子牛の白筋症診断における臓器中ビタミンE及びセレン測定の有用性の検討
高野泰司（宮城県仙台家保），他</p> <p>10 黒毛和種とホルスタイン種子牛におけるワクチン接種による免疫応答性の比較
杉田良介（北里大），他</p> <p>11 病変程度の異なるヨーネ病患者牛における病理組織学的ヨーネ菌体及び遺伝子検出の検討
曾地雄一郎（宮城県仙台家保），他</p> <p>12 若齢牛に発生した下顎腫脹を呈した牛白血病の一症例
高野儀之（山形県中央家保）</p> <p>13 死亡牛における牛ウイルス性下痢ウイルスの感染状況
福成和博（岩手県中央家保），他</p> <p>14 牛ウイルス性下痢ウイルス持続感染牛摘発における課題と対応
児玉能法（青森県八戸家保），他</p> | <p>15 ヒストフィルス・ソムニ感染症にて死亡したと考えられた黒毛和種子牛の3症例
海老名千尋（山形県農共連最上家畜診），他</p> <p>16 黒毛和種牛におけるModified Fast BackSM Programの有用性と外陰部所見からの血中ホルモン濃度の推測
内海博文（宮城県農共連県北家畜診），他</p> <p>17 移植前牛胚の複数項目遺伝子診断及びバイオペシー胚の受胎性改善
西宮 弘（秋田県畜試），他</p> <p>18 2010年に岩手県で流行した牛のアカバナ病
中原秀之（岩手県県南家保），他</p> <p>19 ビタミンA欠乏による黒毛和種繁殖牛の流産・異常産子の発生
阿部憲章（岩手県県南家保），他</p> <p>20 生菌剤の飼料添加による乳房炎予防効果の検討
加藤真姫子（秋田県畜試），他</p> <p>21 未経産乳牛における分娩前乳汁検査成績と分娩後乳房炎との関係
平間拓栄（山形県農共連置賜家畜診），他</p> <p>22 肉用牛における筋肉中放射性セシウム濃度の血液からの推定
内田守譜（福島県農業総合センター畜産研究所），他</p> <p>23 豚由来大腸菌の薬剤耐性状況からみた抗菌剤慎重使用誘導の効果
真鍋 智（宮城県北部家保），他</p> <p>24 豚皮膚炎腎症症候群の発生要因に関する検討
佐藤遼太（山形県庄内家保），他</p> <p>25 伝染性ファブリキウス嚢病ウイルス免疫抑制下における混合感染による出血性症候群の再現
平島一輝（岩大・獣医病理学研究室），他</p> <p>26 頸曲り発症成鶏の脊髄病変
江幡麻代（岩大・獣医病理学研究室），他</p> <p>27 比内地鶏に発生したニワトリオオハジラミに対する薬浴の一例
山口恭代（秋田県中央家保），他</p> |
|---|--|

小地区—11

ゴニオインプラント挿入術を実施した犬8症例の治療成績

藤井裕介, 戸谷亜希子, 山口五月, 牛尾祥彦, 丹野貴備, 中尾 淳

アセنز動物病院・仙台市

はじめに

ゴニオインプラント挿入術は緑内障に対する効果的な外科的治療の一つとして注目されている手術手技である。手術手技の習得, 国内でインプラントを購入できないことなどの問題はあるがその治療効果は高いと思われる。今回はゴニオインプラント挿入術を実施した犬8症例についての治療成績を報告する。

方 法

対象は原発閉塞隅角緑内障と診断した犬8頭(柴3頭, 雑種2頭, マルチーズ1頭, アメリカンコッカー1頭, トイプードル1頭)で, 手術時年齢は 9.6 ± 3.57 歳(中央値11.3歳), 性別は雄1頭(去勢済), 雌7頭(避妊済6頭)であった。いずれの犬もプロスタグランジン製剤の点眼を使用中であった。

結 果

術後の経過観察期間は22~274日であるが全症例において眼圧はコントロールされており眼圧が20mmHgを超える症例は1頭もない。ただ高眼圧のまま手術を実施した1症例が手術翌日に前房内にフィブリンが形成され高眼圧となった。早急に前房内へ線維素溶解剤を注

入しフィブリンが大幅に消失した。それ以降眼圧は安定している。

考 察

手術翌日に前房内フィブリン形成がみられた症例は高眼圧のまま手術を実施したという点が他の症例とは異なっていた。原発緑内障症例では房水中, 房水流出経路などでmyocilin, CD44, matrix metalloproteinase濃度が上昇しているとの報告があり, 術前から高眼圧であった症例での術後のフィブリン形成や房水流出障害に影響していたと考えられる。よってゴニオインプラント挿入術は正常眼圧時に実施した方が術後の合併症が少ないと考えられた。術後長期間高眼圧を避けるためには術後のフィブリン・瘢痕形成を抑えることが大切になり, そのためには術前の眼圧の正常化, 眼疾患(ぶどう膜炎, 水晶体脱臼, 硝子体変性など)の把握, 術式の確立, 術中・術後の化学療法を検討, 他手術との併用, 手術症例の房水組成の評価などが必要になってくるとと思われる。原発閉塞隅角緑内障を発症した犬ではプロスタグランジン製剤の効果が徐々に乏しくなることが多い。ゴニオインプラント挿入術は犬緑内障に効果的な外科的治療として今後治療機会が増えていくものと思われる。

小地区—19

コルチゾール-ACTH比及びアルドステロン-レニン活性比の測定により

原発性副腎皮質機能低下症と診断した犬の1例

布川 寧, 氏家千晴, 内田裕子

北の杜動物病院・仙台市

はじめに

犬の副腎皮質機能低下症(アジソン病)は, 治療は単純で予後も良いことが多い反面, 臨床症状は非特異的であり, 的確な診断を下すのに苦労することがある。今回, この疾病を診断するのに一般的に用いられているACTH刺激試験にて確定診断を得ることができなかった原発性副腎皮質機能低下症の症例にて, その血中コルチゾール-ACTH比(cortisol-to-ACTH ratio: CAR)及び血中アルドステロン-血漿レニン活性比(aldo-

sterone-to-renin ratio: ARR)を測定することにより確定診断に至ることができたので, その概要を報告する。

症 例

4歳齢, 雌, マルチーズ。2カ月前よりやや食べが悪く体重が徐々に減少傾向, 一昨日からややゆるい便と1日1回の嘔吐を呈す。診断後, 現在は旅行後やシャンプー後などのストレス負荷時にプレドニゾロンを必要とすることがあるが, 酢酸フルドコロチゾンの経口投薬により, 経過は良好である。

考 察

副腎皮質機能低下症は日々の臨床の中で多くはないが確実に遭遇する疾患の一つである。この病気は食欲低下、元気低下、消化器症状、虚脱などの非特異的症状、検査所見としては徐脈、小心症、高K血症、高BUN血症、低血糖などがみられるとされるが必ずしも全てにみられるわけではない。診察当初にNa/K比の低下が認め

られれば比較的診断しやすいが、電解質異常を認めない場合、鑑別診断すべき疾患は多岐にわたるため、診断が難しくなる場合がある。その上、ACTH刺激試験の結果が灰色であった場合、治療的診断や病気の進行による検査数値の変化などに診断の根拠を求めなくてはならなくなる。そういった場合にCARやARRを求めておくことは確定診断を行う上でより有効な手段になると思われる。

〔参考〕平成24年度 日本小動物獣医学会（東北地区）発表演題一覧

- 1 神経症状を伴う非滲出型猫伝染性腹膜炎が疑われた1例 川村祐介（加賀野どうぶつ病院・岩手県），他
- 2 犬の細菌性心内膜炎の6例 田口大介（グリーン動物病院・青森県）
- 3 犬の網膜電位図検査における暗順応，明順応時間と各反応間隔時間，それに基づく基準値の検討 橋田達勇（北里大），他
- 4 ウェルシュコーギー・ペンブロークに見られた両側性異所性尿管の一例 安藤 太（那智が丘アン・ペットクリニック・宮城県）
- 5 短期間に進行がみられた両眼性後部円錐水晶体の一例 山下洋平（エビス動物病院・仙台市）
- 6 ゴニオインプラント挿入術を実施した犬8症例の治療成績 藤井裕介（アセズ動物病院 眼科・仙台市），他
- 7 環椎一軸椎不安定症の犬に頸部コルセットを用いた犬の一例 船橋 薫（たけくま動物病院・秋田県），他
- 8 背側脊髄圧迫が認められた癒合脊椎を伴う環椎不安定症の犬の一例 牛尾 拓（岩大小動物外科），他
- 9 変性性脊髄症が疑われたウェルシュ・コーギー・ペンブロークの一例 伊藤博康（いとう動物病院・宮城県），他
- 10 犬末梢血単核球の組織因子発現に与えるHMGB-1の影響 小関清人（北里大・小動物第2外科学），他
- 11 腸閉塞を呈した先天性メトヘモグロビン血症と思われる犬の1例 佐藤龍也（エステー動物病院・福島県）
- 12 IBDと診断された犬25例に関する疫学的及び臨床的検討 鈴木一哉（松野動物病院・秋田県），他
- 13 硬化性リンパ球性胆管肝炎と診断された雑種猫の1例 岩根英明（いわね動物病院・岩手県），他
- 14 門脈圧亢進症を呈した猫の一例 奥山尚明（天童動物病院・山形県），他
- 15 犬の原発性上皮小体機能亢進症の1例 寺村太一（てらむら動物病院・山形県），他
- 16 巨大食道症を併発したクッシング症候群の犬の一例 旗野 剛（ハタノ犬猫病院・福島県）
- 17 コルチゾール-ACTH比及びアルドステロン-レニン活性比の測定により原発性副腎皮質機能低下症と診断した犬の1例 布川 寧（北の杜動物病院・仙台市），他
- 18 コルチゾールが低値を示した犬の検討～非定型アジソン病について 小島信子（オノデラ動物病院・宮城県），他
- 19 フィブラストスプレーを猫の皮膚創傷治療に使用した3症例 梶 太郎（ウィル動物病院・宮城県）
- 20 ポリプロピレンメッシュを用いて整復した犬の会陰ヘルニアの3例 小松 亮（あきたこまつ動物病院・秋田県），他
- 21 再発した線維肉腫にレーザー治療を行ったイヌの一例 竹原律郎（ふれあい動物病院・青森県），他
- 22 後大静脈結紮にて副腎皮質腺瘤を完全切除したフェレットの1例 小松 亮（あきたこまつ動物病院・秋田県），他
- 23 セキセイインコにみられた胃腺癌の2例 松田祐二（原町動物病院・仙台市）
- 24 精巣腫瘍が認められた6カ月齢の猫の1例 蘆立太宏（あしだて動物病院・仙台市）
- 25 多血症を伴う犬の腎臓腫瘍の一例 川村理沙（岩大・小動物内科学研究室），他
- 26 腎臓腺癌による多血症を呈した猫の一例 山下彩友子（岩大・小動物外科学研究室），他
- 27 犬の低悪性度リンパ腫（Low Grade Lymphoma）の1例 大志田淳一（大志田動物医院・岩手県）
- 28 リンパ管肉腫が疑われた犬の一例 山口和彦（天童動物病院・山形県），他
- 29 腹腔内悪性中皮腫の犬の一例 土赤 忍（岩大・小動物外科学研究室），他
- 30 老齢猫の下顎骨扁平上皮癌（T3bNOMO）の1例 高平篤志（たかひら動物病院・宮城県），他

Multilocus variable-number tandem-repeats analysis (MLVA) による 腸管出血性大腸菌 O26 遺伝子型別法とその応用

高橋雅輝, 岩渕香織, 佐藤直人, 森田晴美, 齋藤幸一

岩手県環境保健研究センター

はじめに

腸管出血性大腸菌 (EHEC) はベロ毒素産生性大腸菌に属し, 産生するベロ毒素により出血性大腸炎を起こすほか, 合併症として溶血性尿毒症症候群 (HUS) や脳症を引き起こす重要な食中毒・感染症起因菌である。EHEC には多様な血清群が存在し, 人からの検出は全国的には O157 が最も多く, 次いで O26 となっている。一方, 岩手県では両者の検出率が逆転しており, O26 が最も多く, 次いで O157 となっている。EHEC 感染は時に集団発生し, 大規模な集団事例が国内外から多数報告されている。集団事例の発生時には感染源や感染経路の究明のため, 分離菌の分子疫学指標の解析が実施される。その解析方法としては, 現在, パルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) による遺伝子型別法が多用されている。我々は, PFGE より簡便・迅速な方法である MLVA 法に着目し, これまでに O157 の MLVA について検討し, 確立した検査法をルーチン検査に採用した。今回, O26 の MLVA による遺伝子型別法について検討し, 疫学調査等への応用と広域散在発生の探知を試みたので報告する。

材料及び方法

2004 年から 2012 年 3 月の期間に岩手県内で人及び牛から分離された O26, 270 株を用いて, テンプレート DNA を加熱法により作成した。MLVA システム構築には, Lindstedt らの 7 ローカス (CVN001, 002, 003, 004, 007, 014, 015 : J Microbiol Meth, 2007) と, Izumiya らのローカスのうち 7 ローカス (EHC-1, EHC-2, EHC-5, EHC-6, O157-9, O157-37, EH26-7 : Microbiol Immunol, 2010) を比較検討した。それぞれのプライマーに蛍光 (FAM, VIC, TET, NED) を標識し, Type-it Microsatellite PCR Kit (QIAGEN) を用いてマルチプレックス PCR を行った後, 増幅産物を 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) で 60 °C, 45 分間泳動した。サイズスタンダードには GeneScan1200LIZ を, 分離剤には POP-7 ポリマーを用いた。得られた蛍光ピークサイズから各ローカスの繰り返し数 (VNTR) を算出し, MLVA プロファイルテーブルを作成した後, プロファイルの多型度指標 (Polymorphism Index) により型別能を検証した。

MLVA システム構築後, 広域散在発生が疑われた食中毒事例へ応用し実効性を検討した。さらに広域散在発

生を早期探知するため, 2011 年度の分離株について 1 カ月に 3 回の頻度で MLVA を行い, 同一遺伝子型の検索を行った。株間比較及び系統解析には R (オープンソース) を用い, 解析アルゴリズムはワードとした。なお, 型別能評価及び株間比較では, MLVA と並行して PFGE を実施した。

結果及び考察

Izumiya らのプライマーセットは one tube でのマルチプレックス PCR が可能であることに加え, 各ローカスを効率よく増幅した。PCR 産物を 40 倍希釈し電気泳動することにより短時間で明瞭な検出ピークが得られた。各ローカスの VNTR は 6 ~ 24 種類認められ, MLVA プロファイル数は 88 パターン, 多型度指標は 0.3081 ~ 0.9225 であった。クラスター解析では, PFGE と同等の型別能を示したほかクラスター形成も類似していた。Lindstedt らのプライマーセットは, ローカスごとに PCR 産物量のばらつきが大きく one tube での PCR は困難であった。各ローカスの VNTR は 1 または 7 種類で, MLVA プロファイル数は 7 パターンにとどまった。多型度指標は 1 ローカスのみ 0.7824 を示し, 他は 0.000 であった。Izumiya らは過去 3 年間に国内で分離された株を, Lindstedt らは過去 50 年間に世界各地で分離された株を解析し O26 の MLVA システムを構築したが, 両者の MLVA 型別能に大きな差がみられたことは, リソースがいかに重要であることを示唆している。

次に, MLVA システムの実効性を検証するため食中毒疑い事例に応用した。この事例は, (1) 関連のない 2 グループの 8 名から O26 が分離された, (2) 発症日が近く食肉の喫食歴がある, (3) 食肉の購入先がグループで異なるが同じ系列店舗である, との疫学調査結果から, 同一ロットの食肉が感染源と疑われた事例であった。保健所の依頼により分離株の解析を行ったところ, グループごとに遺伝子型は異なっており, 同一の感染源による食中毒は否定された。PFGE による型別においても同様の結果が得られた。MLVA の所要時間は 8 時間であり, 保健所へのフィードバックが迅速に行われた。さらに広域散在発生の早期探知のため, 2011 年度の分離株について同一遺伝子型の検索を行った。保育園での集団発生 1 事例, 家族内発生 17 事例, その他散発例から検出された 76 株をクラスター解析したところ, 同一の遺伝子型は認められなかった。PFGE によるクラスター解析でも同様の結果であった。

以上の結果から、短期間に県内で分離される菌株の遺伝子型別やクラスター解析にはIzumiyaらのローカスが適当であると思われた。今回構築したMLVAシステム

は食中毒・感染症発生時に利用可能で、広域散在発生探知のための迅速スクリーニング法としても有用であると考えられた。

公地区—3

牛の心内膜炎から分離された*Streptococcus suis* type 33

佐藤友美¹⁾、須藤亜寿佳²⁾、大貫典子¹⁾、大倉正稔³⁾、高松大輔³⁾

1) 山形県内陸食肉衛生検査所, 2) 山形県庄内食肉衛生検査所, 3) 獣動物衛生研究所

はじめに

Streptococcus suis (*S. suis*) は、豚だけでなく人にも敗血症、髄膜炎など様々な病態を引き起こす人獣共通病原細菌である。*S. suis* は、現在までに35種類の血清型(1-34型及び1/2型)が知られているが、病豚からは2型の分離頻度が最も高い。*S. suis* による豚レンサ球菌症は、世界中の主要な養豚国で発生しているが、牛からは日本、アメリカ、カナダ、オーストラリアで27例の分離報告があり、このうち日本での1例で、心内膜炎から血清型18型株が分離されている。今回、当所所管と畜場に搬入された廃用牛において、*S. suis* 血清型33型が原因と思われる疣贅性心内膜炎の1症例に遭遇したので、その概要を報告する。

材料及び方法

症例は、黒毛和種、雌、27カ月齢で、症例の心臓の右房室弁に脆弱、カリフラワー状の疣贅性心内膜炎(ゴルフボール大)、肺血栓などが認められ、心疣贅部、肺血栓部及び主要臓器を分離材料とした。

細菌学的検査: 材料をスライドガラスに直接スタンプ後、グラム染色し、鏡検した。また、5%馬血液加コロンビア寒天培地を用い、材料を直接スタンプ後、37℃48時間ローソク培養し、心疣贅部、肺血栓部から分離された各1株(それぞれ、心由来株、肺由来株)について、一般性状検査及びAPI20Strepによる生化学性状検査を実施した。

遺伝学的検査: 心由来株及び肺由来株から、熱抽出でDNAを抽出し、16S rRNA 遺伝子及び*gdh* 遺伝子を標的とした*S. suis* 特異的PCR、莢膜合成遺伝子を標的とした血清型特異的PCR法を実施した。さらに、16S rRNA 遺伝子及び*cpn60* 遺伝子のシーケンスを行った。

血清型別検査: 血清型特異的抗血清を用いた共凝集試験を実施した。

結 果

細菌学的検査: 心疣贅部の直接スタンプのグラム染色標本の鏡検で、グラム陽性レンサ球菌が確認された。ローソク培養により心疣贅部、肺血栓部からグラム陽性レ

ンサ球菌が分離された。純培養した心由来株及び肺由来株は、同一の生化学性状を示し、*S. suis* に類似しており、API20strepでも、両株とも*S. suis* と同定された(%ID; 99.2%)。

遺伝学的検査: 16S rRNA 遺伝子を標的としたPCR法及び血清型特異的PCR法は、陰性となったが、*gdh* 遺伝子を標的としたPCR法では、標的とした位置にバンドが認められた。16S rRNA 遺伝子及び*cpn60* 遺伝子のシーケンスを行ったところ、心由来株及び肺由来株の塩基配列は、どちらも互いに100%一致し、*S. suis* 血清型33型参照株(参照株)との相同性が最も高く、それぞれ99.0%、99.3%であった。一方、他の34種類の血清型との相同性は、それぞれ97%以下、84%以下と低かった。

血清型別検査: 心由来株、肺由来株どちらも、抗33型血清に最も強く凝集した。

以上の結果から、当該症例の分離菌株を、血清型33型の*S. suis* と同定した。

考 察

牛の細菌性心内膜炎からは、*Streptococcus* 属菌や *Arcanobacterium pyogenes* などが分離されることが多い。牛の心内膜炎から*S. suis* が分離された事例としては、国内での血清型18型株の1症例のみ報告されており、血清型33型株が分離されたのは、海外を含め、本事例が初めてと考えられる。

病豚からの血清型33型の分離例は少ないが、日本、韓国、カナダで7例の報告がある。一方、参照株は、子羊の関節炎からの分離株であり、本症例が牛の心内膜炎、肺血栓からの分離株であることを考慮すると、血清型33型株は、豚だけでなく牛や羊など反芻獣に対しても病原性を有している可能性が示唆される。

本症例分離株は、16S rRNA 遺伝子を標的としたPCR法で*S. suis* と同定されなかった。また、参照株と本分離株は、*S. suis* の分類学的基準株や他の血清型参照株との16S rRNA 遺伝子の相同性が97%以下と低いことから、本症例分離株と*S. suis* は、他菌種である可能性も考えられる。

S. suis は人にも感染し、様々な病態を引き起こすことがある。国内では2007年に、牛からの感染が示唆さ

れた血清型2型による人の症例も報告されており、豚のみならず牛も *S. suis* の感染源として注意する必要がある。これまで、血清型33型による人の感染例は報告されていないが、牛から人への *S. suis* の感染リスクが否

定できないことから、今後、血清型33型を含めた *S. suis* の牛における保菌状況を明らかにしていく必要があると思われる。

〔参考〕平成24年度 日本獣医公衆衛生学会（東北地区）発表演題一覧

- | | |
|---|---|
| <p>1 地鶏にみられたマレック病の一症例
布留川せい子（福島県食肉衛検），他</p> <p>2 比内地鶏における胸骨滑液包炎の発生要因について
須田朋洋（秋田県食肉衛検），他</p> <p>3 散発的に認められた豚の両後肢の筋変性
依藤大輔（宮城県食肉衛検），他</p> <p>4 全身性に腫瘤を認めた馬の症例について
平戸祐司（青森県十和田食肉衛検），他</p> <p>5 青森県A食肉センターに搬入された馬の内臓に見られた寄生虫と内臓病変について
木村政明（青森県田舎館食肉衛検），他</p> <p>6 豚腎臓及び肝臓のテトラサイクリン系抗生物質残留検査法の検討
小原暁子（秋田市食肉衛検），他</p> <p>7 ポリマー系逆相カートリッジを用いた食肉中抗生物質の簡易分別法
佐藤直人（岩手県環境研センター），他</p> <p>8 牛内臓肉から検出された腸管出血性大腸菌の分子疫学的解析
齊藤伸明（岩手県食肉衛検），他</p> <p>9 Multilocus variable-number tandem-repeats analysis (MLVA) による腸管出血性大腸菌 O26 遺伝子型別法とその応用
高橋雅輝（岩手県環境研センター），他</p> <p>10 牛の心内膜炎から分離された <i>Streptococcus suis</i> type 33
佐藤友美（山形県内陸食検），他</p> <p>11 線毛関連遺伝子プロファイリングによる <i>Strepto-</i></p> | <p><i>coccus suis</i> の強毒株調査
遠藤貴之（山形県庄内食肉衛検），他</p> <p>12 仙台市ミートプラントにおける豚丹毒菌の遺伝子型別と薬剤感受性
遠藤 徹（仙台市食肉衛検），他</p> <p>13 牛白血病ウイルス（BLV）の感染状況及び遺伝子型別調査
佐藤郷子（青森県十和田食肉衛検），他</p> <p>14 山形県における犬の <i>Babesia gibsoni</i> 抗体保有状況
瀬戸順次（山形県衛研），他</p> <p>15 消費者を対象とした食肉の安全に関する知識の普及啓発事業
高橋完奈（福島県食肉衛検），他</p> <p>16 ATP ふき取り検査を用いた傷病鳥類診察時の手指汚染
進藤順治（北里大）</p> <p>17 犬の学習（条件付け・順化）
菅沼久高（秋田県動物管理センター）</p> <p>18 市に寄せられた猫に関する苦情の傾向分析と追跡調査
佐藤美樹子（盛岡市保），他</p> <p>19 東日本大震災被災動物の保護及び返還について
岡野 純（宮城県食肉衛検），他</p> <p>20 宮城県被災動物保護センターの概要
中川正裕（社宮城県獣医師会中央支部），他</p> <p>21 東日本大震災に対応した石巻地区動物救護センターの概略
谷津壽郎（社宮城県獣医師会），他</p> <p>22 被災地における剥製パンダ活用ふれあい活動と野生動物保護活動
菅原康雄（菅原動物病院・仙台市）</p> |
|---|---|