



# 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26年度 日本獣医師会獣医学術学会年次大会（岡山） 地区学会長賞受賞講演（北海道地区選出演題）

[日本産業動物獣医学会]

産地区—8

### 北海道十勝における過去15年間の牛のヨーネ病防疫対策の 検証と今後の展望

藤吉 聡<sup>1)</sup>, 菅野 宏<sup>1)</sup>, 宮根和弘<sup>1)</sup>, 榊原伸一<sup>1)</sup>, 相内花子<sup>1)</sup>, 磯田典和<sup>2)</sup>, 他

1) 北海道十勝家畜保健衛生所, 2) 北海道大学人獣共通感染症リサーチセンター

#### はじめに

牛のヨーネ病は、家畜伝染病予防法に基づく撲滅対象疾病とされ、北海道では平成10年度から同法第5条に基づき、5年間を1クールとしたサーベイランス（以下「サーベイ」）を実施し、発生農場では、同法第51条に基づく清浄化対策を実施してきた。

サーベイの3クール目となる平成20年からは、生乳の流通に関する食品衛生法の関係上、搾乳牛での培養検査が実施不可能となり、血液抗体検査にスクリーニング法が新たに導入された。また、平成25年4月には同法施行規則の一部が改正され、診断法にリアルタイムPCR法（以下「rPCR」）が導入された。

今回我々は、サーベイが開始された平成10年度から24年度まで15年間の十勝のヨーネ病防疫対策について、これまで得られた成績を検証するとともに、その検査成績から数理疫学的手法を用いた確率論的シミュレーションを行い、今後のヨーネ病防疫対策の展望を推察した。また、今年度から新たな診断法として導入されたrPCRの活用法についても検討を行ったので報告する。

#### サーベイの検証

北海道では平成10～24年度の15年間に、24カ月齢以上の繁殖雌牛を対象としたサーベイを実施。その結果、十勝では、乳用牛127戸203頭、肉用牛78戸122頭、計205戸325頭の患畜を摘発。発生農場では、継続した対策を実施し、乳用牛1,136頭、肉用牛1,060頭、計2,196頭の患畜を摘発。診断内訳は、鏡検13頭（0.6%）、培養1,557頭（70.9%）、血液検査626頭（28.5%）。発生農場での患畜の診断割合では、培養検査での患畜診断割合は年々増加傾向。一方、ヨーネ病の進行とともに抗

体が上昇して摘発される血液抗体検査での患畜診断割合は減少傾向。また、15年間検査方法に変更のなかった肉用牛について、発生農場での検査陽性率を検証したところ、血液抗体検査陽性率は0.62%から0.07%に減少し、培養検査陽性率も0.74%から0.59%へと減少傾向。患畜の月齢は、24カ月齢以上が、乳用牛及び肉用牛でそれぞれ86.2%、88.1%と大半を占め、24カ月齢以下の血液検査による摘発率は、乳用牛及び肉用牛でそれぞれわずか1.1%、2.0%。

#### 血液検査の患畜転帰率

スクリーニング検査陽性牛の患畜転帰率は、平成24年度までのELISA2回による転帰率が9.6%に対し、25年度から開始されたrPCRによる転帰率が22.6%と高い傾向。

#### 確率論的シミュレーションによる今後の展望

従来の血液抗体検査法（スクリーニング法、ELISA法）と平成25年度から新たに導入されたrPCRを用いた検査法で、それぞれ数理疫学的手法を用いた確率論的シミュレーションを実施し、十勝の現在及び5年後のヨーネ病浸潤状況を推察。その結果、平成24年度末の発生農場を除く十勝の潜在汚染農場数は、乳用牛で、1,343戸中14.6戸（1.1%）、肉用牛で、506戸中52.6戸（9.9%）と推計。この乳用牛と肉用牛での汚染状況の違いは、それぞれの飼養形態の違いによるものと考察。5年後の潜在汚染農場数は、従来法によるサーベイでは乳用牛で3.8戸、肉用牛で34.7戸残存するが、rPCRを活用した検査法では乳用牛で0.0戸、肉用牛では30.9戸の残存と算出。

## rPCR の活用

rPCRは、感度が同程度である培養検査に比べ結果判定までの期間が短いため排菌している牛を早期に摘発することが可能。そこで、十勝独自の運用方針を定め発生農場において乾乳牛等を対象にrPCRを積極的に活用。その結果、20戸2,709頭中8戸36頭(1.3%)で患畜(ヨーネ菌遺伝子0.001pg/well以上)を摘発、8戸29頭(1.1%)で定性陽性(ヨーネ菌遺伝子0.001pg/well未満)を確認。定性陽性牛のリスクを分析するため、過去に定性陽性と判断された148頭について調査したところ、26頭(18%)が後に、患畜あるいはrPCR陽性となっており、定性陽性牛は後に患畜となるリスクが高いことが判明。そのため、定性陽性牛については、早期とうたを指導。

一方、農場内での感染経路を特定するための環境検査では、24戸中20戸(83.3%)で陽性。この結果は、農

場での消毒などの衛生指導に活用の他、農家や関係機関の農場消毒や農場衛生に対する意識の向上に貢献。

## ま と め

これまでのサーベイ結果から確率論的シミュレーションを実施したところ、管内の潜在浸潤率は未だ高い状態にあると推察。今後の展望では、rPCRによって、より多くの農場を摘発できるが、肉用牛飼養農場では依然多くの汚染農場が残存すると算出。このため、今後の検査結果を踏まえ、再度シミュレーションを実施し、第5クールでの検査体制について検討することが必要。サーベイの対象としては、血液検査によるサーベイを前提とすると、24カ月齢以上は妥当と判断。rPCRは感度が高く、新たな診断法となったことで清浄化はさらに進展するものと期待。今後はrPCRを積極的に活用し、十勝のヨーネ病の清浄化に結びつけたい。

## 産地区—16

# サラブレッド種の不妊症例に対する選択的卵管通水法による治療

井上裕士, 関口美那

イノウエ・ホース・クリニック

## はじめに

馬の卵管膨大部から狭部への移行部位において、高い確率でコラーゲン性細胞塊が存在することが報告されているが、ほとんどの場合、この細胞塊は精子や受精卵の通過を障害するほど大きくはない。しかし、まれに卵管腔を完全に栓塞している例があり、それが潜在的な不妊の原因となることが示唆されている。したがって、一般的な診断方法では判明しない不妊症の原因の一つとして卵管の異常が疑われ、とくにその疎通性が問題視されることがあるが、現時点では卵管閉塞に対する臨床的に有用な診断法や治療法の報告は少ない。これは馬の卵管子宮口が、人や牛と異なり、乳頭状に突出した形状となっていて、発達した平滑筋によりその開口部は非常に狭いという解剖学的な構造により、卵管への診断的あるいは治療的なアプローチは限定されているためである。演者は、過去に内視鏡下で実施した選択的卵管通水法による、卵管の疎通性に対する診断的あるいは治療的なアプローチの可能性について報告したが、今回は臨床現場で遭遇した原因不明の不妊症例に対し、実際にこの方法を適用し、その治療法としての有用性について検討した。

## 材料及び方法

今回の研究では、2001～2014年に正常な生殖能を有する種牡馬を複数回交配しても受胎しない、4～6歳の未経産馬4頭及び8～16歳の経産馬9頭を対象とした。これらの繁殖牝馬は交配した際に両側での排卵の経歴があり、いずれも1)発情周期の間隔がおおむね正常であ

る、2)生殖器に形態的及び機能的な異常が認められない、3)子宮内粘液の細胞診及び細菌検査で有意な感染が疑われない、4)経時的に実施した超音波診断により、子宮内に有意な量及び性状の貯留液を認めない、など一般の検査方法では異常所見を認めない不妊症例であった。卵管通水は、13頭中2頭を除いて交配前5日以内の発情期に実施した。方法として、まず患馬を枡場保定し、外陰部を外科的に消毒した後、鎮静下で人用大腸スコープを経膣的に子宮内に挿入した。ろ過した空気で子宮を若干膨張させることにより視界を保ちながら、はじめに左子宮角先端に内視鏡を誘導し、卵管子宮口の開口部を注意深く観察した。その後、内視鏡のワーキングチャンネルを通じて、ポリエチレン管、22G留置針の外筒及び人血管造影用ガイドワイヤーを用いて作成したカテーテルの挿入を試み、挿入に成功した場合にはガイドワイヤーを抜去した後、直ちに生理食塩水10mlを卵管内に注入した。次に内視鏡を子宮体部まで戻した後、新たなカテーテルを用いて右卵管に対しても同様の処置を施した。

## 結 果

両側の卵管子宮口にカテーテルが挿入できた例は、13頭中10頭であり、残りの3頭では左側のみ挿入が可能であった。したがって、カテーテル挿入の成功率は全26卵管中23卵管(88.5%)であり、成功例では全てにおいて生理食塩水の通水を完了することができた。処置を実施した13頭中12頭(92.3%)が翌シーズンまでに受胎したが、このうち9頭は同じシーズン中に、残り

の3頭は翌シーズン中に受胎した。処置後1回及び2回の交配で受胎が確認されたものは、それぞれ6頭(46.2%)及び4頭(30.8%)であり、残り3頭中2頭では、処置後それぞれ4回及び5回の交配で受胎した。受胎しなかった1頭(7.7%)では、シーズン終了直前に1回のみ交配し、翌年は交配されなかった。左卵管のみの通水に成功した3頭では、全て左卵巢での排卵の際に受胎した。両側の卵管の通水に成功した10頭中3頭で左右の卵巢で一つずつ排卵が観察され、うち2頭で胎令15日に双胎が確認された。また、3つの排卵が観察された1頭では三胎が確認された。これらの多胎例は、用手破砕法により単胎として妊娠を継続させた。受胎した12頭は、全て翌年に正常分娩した。

## 考 察

原因不明の不妊症例に対し卵管通水法を実施したのち

に比較的高い受胎率がみられたことから、今回の不妊症例はその原因が卵管閉塞に起因していた可能性があり、卵管通水法はそのような症例に対し有用であると推察された。しかし、今回の研究では臨床例を適用し、コントロール群を持っていないことや、卵管采から排出されたコラーゲン塊を確認していないことから、断定的であるとは言えない。仮に、今回の不妊症例が卵管を閉塞するコラーゲン塊に起因していたとすると、受胎までに複数回の交配を要する例や翌シーズンに受胎する例がみられたことから、卵管の通水によってコラーゲン塊が取り除かれた後に、絨毛上皮等の機能が回復するなど、受胎能の回復までに時間がかかる場合があることが示唆された。また、2つ以上の排卵が観察された後に高い確率で双胎や三胎が観察されたことから、卵管通水法を実施した後は多胎が誘発されやすい可能性があるかと推察された。

## 産地区—17

### 競走馬の細菌性角膜炎に対するファージセラピーの検討

岩野英知<sup>1)</sup>、冷清水雄太郎<sup>1)</sup>、古澤貴章<sup>1)</sup>、樋口豪紀<sup>2)</sup>、  
丹羽秀和<sup>3)</sup>、田村 豊<sup>4)</sup>、他

1) 酪農学園大学 獣医生化学、2) 酪農学園大学 獣医衛生学、  
3) JRA 総合研究所、4) 酪農学園大学 食品衛生学

#### はじめに

競走馬の細菌性角膜炎の原因はそのほとんどが緑膿菌、黄色ブドウ球菌、連鎖球菌であり、一般的にレース後や調教後に予防的な抗生物質の投与が行われている。抗生剤の多用は、薬剤耐性菌の増加を引き起こすことが懸念される。また、薬剤耐性菌による角膜炎の場合、既存の抗生物質が効かず症状が進行し角膜穿孔、失明となる恐れがある。薬剤耐性菌の問題は世界的な問題となっており、米国でも人や動物への抗生剤の利用が増える一方で耐性菌による死者が年間2万人を超えており、抗生剤利用について再考が促されている。抗生物質の以上のような現状から、抗生剤のみに頼らない新しい対処法が必要とされている。そこで我々は、細菌特異的に感染し溶菌するバクテリオファージウイルス(ファージ)を用い、細菌性角膜炎に対するファージセラピーの検討を行った。

#### 材料及び方法

以下の実験を行った。

- 1) 緑膿菌溶菌ファージの分離と宿主域の判定：下水処理場より採取した汚水から馬角膜炎由来菌に溶菌作用を持つファージを分離し、スポットテストにより宿主域及び溶菌活性を判定した。
- 2) ファージ吸着効率：得られたファージを用いて、試験管内で緑膿菌に対する吸着効率(吸着速度と吸着率)を求めた。

- 3) 角膜炎モデルマウスによるファージ投与の効果：細菌性角膜炎モデルマウスを作成し、菌液とファージ液を滴下した群、菌液のみを滴下した群とで角膜炎発症の有無、菌数を比較するとともに、菌とファージのMOIを変え、溶菌効果における影響を精査した。
- 4) 角膜炎モデルマウスにおけるファージ滴下時間の影響：菌液滴下後、ファージ液を滴下するまでの時間により菌数の抑制にどのような影響を与えるのかを検証した。
- 5) 角膜炎モデルマウスにおけるファージカクテル化の効果：溶菌効果の異なる2つのファージをカクテル化したときの菌数への影響を検証した。

#### 成績と考察

- 1) スポットテストより、馬角膜炎由来の緑膿菌を溶菌できるファージを数種類分離でき、馬角膜炎由来菌株の80%以上に明らかな溶菌活性があることが確認できた。
- 2) 試験管内の吸着試験により30秒で90%以上のファージが菌に吸着した。
- 3) 角膜炎モデルマウス実験では、ファージ液を滴下した群は菌液のみを滴下した群と比べ、角膜炎の炎症像、菌数ともに大幅に下回った。菌液の100倍以上のファージにより角膜炎を効果的に抑制できた。
- 4) ファージ液の滴下は菌液滴下3時間後までであれば、角膜炎発症(菌数)の抑制に有効であった。
- 5) ファージのカクテル化により、単独使用に比べて相

乗的に角膜炎発症（菌数）の抑制効果があることが明らかとなった。

以上の結果から、ファージセラピーは緑膿菌による角膜炎予防への臨床応用に有効であることが示唆された。特に、角膜炎モデルマウスでは、現在行われているレース後の抗生剤点眼方法と同様なタイムスケジュールで大量の菌を接種しても、角膜炎をほぼ完全に抑制できた。これはファージの菌への吸着率が早いこと、患部に直接ファージを添加するため菌への効果的な感染が成立しやすいことによるものと考えられる。さらにファージのカクテル化により角膜炎発症に対して相乗的な抑制効果が

みられたことから、効果的なファージのカクテル化により優れたファージ製剤の開発が可能であると考えられた。

ファージは、溶菌機序が抗生剤と異なるため薬剤耐性菌にも有効である。ファージ製剤を応用していくことは、抗生剤の使用低減にもつながり、細菌の薬剤耐性化のリスクを下げる事にもなる。抗生剤開発が事実上ストップしている現在、自然界で細菌と相対して進化してきたファージの仕組みを応用していく事は、様々な細菌感染症に対して革新的な対抗手段となる可能性がある。ウマの細菌性角膜炎へのファージセラピーの応用を進めることで、細菌感染症治療への一助となるよう開発を進めていきたい。

## 産地区—18

# 黒毛和種のプログラム授精における CIDR 抜去時の主席卵胞サイズが受胎率に及ぼす影響とそれを考慮した受胎率向上新プログラムの考案

上野 大作

日高地区農業共済組合 中部支所家畜診療所

## はじめに

近年、CIDR（膈内留置型プロジェステロン製剤）を用いたプログラムは繁殖障害治療には欠かせないツールの一つである。そのため、そのプログラムに関する方法や受胎率を調査した論文が多数ある。しかし、CIDRを用いたプログラム授精は、まだ高い受胎率が得られる方法とは言い難い。その原因の一つとして、授精時の卵胞が十分に発育し成熟した状態まで達していない時点で授精が行われていることが、多くの論文で指摘されている。ここに受胎率低下の要因が潜んでいると推測され、それを解決することが受胎率向上につながると考えられる。よって本研究は、既存のプログラムの問題点を解決する新たな受胎率向上プログラムを構築することを目的とし、そのために CIDR 抜去時の主席卵胞（以下「DF; Dominant Follicle」）サイズの大きさと受胎率との関連性を調査した。そして、その結果をもとに、既存の CIDR プログラムに一部変更を加えることによって受胎率を高めることができたので、その内容を報告する。

## 材料と方法

2011年3月から2014年4月までに、分娩後無発情または妊娠診断で陰性であった黒毛和種経産牛214頭（試験1:133頭、試験2:81頭）を対象とした。対象牛の平均年齢は6.1歳で、CIDRプログラム開始時の分娩後日数の中央値は88日（34～685日）であった。本研究で用いた CIDR プログラムの方法は、試験1, 2ともに、まず CIDR 挿入時に安息香酸エストラジオール (EB) 2mg を筋肉内投与し、8日後に CIDR 抜去と同時にジノプロスト (PGF 2 $\alpha$ ) 20mg を筋肉内投与した。CIDR

抜去時の DF の大きさの測定には、超音波画像診断装置を用い、CIDR の挿入時と抜去時の2点における卵巣所見を確認することにより、CIDR 抜去時の新規卵胞波の DF の大きさを測定した。試験1では、CIDR 抜去時の DF の大きさに関係なく翌日 EB 1mg を筋肉内投与し、発情を認めた牛は通常の方法で授精を行い、発情を認めなかった牛は42時間までに授精を実施した。その結果、CIDR 抜去時の DF の大きさを、DF < 9mm, 9mm  $\leq$  DF < 12mm, 12mm  $\leq$  DF の3群に分け、受胎率の比較を行った。試験2では、CIDR 抜去時に DF < 9mm の牛を対象に、CIDR 抜去後連日 DF の大きさを測定して、10mm  $\leq$  DF に達した時点で EB 1mg を筋肉内投与し、試験1と同様の方法で授精を実施した (second EB 変法)。統計解析は  $\chi^2$  検定を用いた。

## 結果

全調査牛214頭における CIDR 抜去時の DF の大きさによる頭数内訳は、DF < 9mm が106頭、9mm  $\leq$  DF < 12mm が86頭、12mm  $\leq$  DF が22頭であり、DF < 9mm の頭数が最も多かった。試験1において、CIDR 抜去時の DF の大きさと受胎率の関係は、DF < 9mm が52%、9mm  $\leq$  DF < 12mm が78%、12mm  $\leq$  DF が55%であり、9mm  $\leq$  DF < 12mm が他の2群に比べて有意に高かった ( $P < 0.01$ ,  $P < 0.05$ )。試験2において、second EB 変法の受胎率は74%であり、試験1の DF < 9mm (52%) に比べ有意に高かった ( $P < 0.05$ )。EB 投与時の DF の大きさが10mmと11mmでは受胎率に有意な差を認めなかった (72% (43/60), 81% (17/21))。CIDR 抜去後 EB 投与までの平均日数  $\pm$  SE は、CIDR 抜去時の DF の大きさが、< 5mm, 5mm, 6mm, 7mm, 8mm でそ

れぞれ、 $4.3 \pm 0.3$ ,  $3.1 \pm 0.2$ ,  $2.7 \pm 0.3$ ,  $2.5 \pm 0.2$ ,  $2.1 \pm 0.1$ であった。

### 考 察

今回の調査で、プログラム授精におけるCIDR抜去時のDFが受胎率に有意な影響を及ぼすことが示された。またCIDR抜去時にDF<9mmの牛が実に半数も存在したが、second EB変法を用いることで受胎率の著明な向上が可能であると判明した。また、今回得られた

CIDR抜去後EB投与までの平均日数を用いることにより、連日の卵胞サイズ検査の手間を省略でき、EB投与時期を予測することが可能である。そのため、従来のCIDRプログラム授精にCIDR抜去時のDFの大きさの測定という1項目を加えるだけで、受胎率の改善を期待できることは臨床現場において有用な方法であると思われる。受胎率向上に貢献できるツールの一つに、今回新しく考案した、second EB変法を併用したCIDRプログラムが少しでも役に立つことを期待する。

### [参考] 平成26年度 日本産業動物獣医学会（北海道地区）発表演題一覧

- |    |  |                          |                   |   |                    |
|----|--|--------------------------|-------------------|---|--------------------|
| 1  | 2005～2012年における北海道根室地方の牛サルモネラ症発生状況                          | 中田悟史（根室地区NOSAI），他        | 橋谷好美（酪農大生産動物医療），他 |   |                    |
| 2  | 根室管内における牛サルモネラ症防疫の取り組み                                     | 内藤友子（根室家保），他             | 19                | 下垂体周囲膿瘍により盲目を呈したホルスタイン雄育成牛の1症例                    | 中島永成（帯畜大臨床獣医），他    |
| 3  | 乳牛の <i>Salmonella</i> aberdeen 感染と清浄化対策                    | 茅先秀司（釧路地区NOSAI），他        | 20                | 中脳水道閉塞による側脳室拡張症を示した子牛の一例                          | 西村 瞳（酪農大生産動物医療），他  |
| 4  | 分子疫学的解析による <i>Salmonella</i> Typhimurium 及び O4:i:- の浸潤要因考察 | 藤井誠一（胆振家保），他             | 21                | 乳牛における腎臓癌を疑う1症例                                   | 平塚太志（NOSAIオホーツク），他 |
| 5  | <i>Salmonella</i> O4群:i:- による子牛サルモネラ症の集団発生事例と疫学的検討         | 高橋英二（十勝NOSAI）            | 22                | ホルスタイン種乳牛にみられた鼻出血10症例の臨床および検査所見の比較                | 猪熊 壽（帯畜大臨床獣医），他    |
| 6  | 牛の <i>Salmonella enterica</i> 血清型 O4:i:- の発生事例             | 竹田祥子（NOSAI日高），他          | 23                | 粒子励起X線分析（PIXE）法による牛の大腸菌性乳房炎の多元素同時定性定量解析           | 佐藤 渉（酪農大獣医），他      |
| 7  | LPS中和剤を含む牛サルモネラ不活化ワクチン接種牛の臨床病理学的所見                         | 加藤 肇（根室地区NOSAI），他        | 24                | 血清中Fe濃度を指標とした牛の大腸菌性乳房炎の予後診断                       | 嶋守俊雄（酪農大生産動物医療），他  |
| 8  | 子牛中耳炎270例の臨床および疫学的解析                                       | 小堤晃博（酪農大生産動物医療），他        | 25                | 血清アミロイドA濃度を指標とした牛の大腸菌性乳房炎の予後診断                    | 草場綾乃（酪農大獣医），他      |
| 9  | 子牛中耳炎の死産27例における臨床病理学的病態                                    | 山中俊嗣（酪農大生産動物医療），他        | 26                | 地域レベルでの乳熱予防のための疫学調査                               | 中村聡志（NOSAIオホーツク），他 |
| 10 | 乳用牛哺育預託施設で発生した子牛の喉頭炎2症例                                    | 伊藤史恵（網走家保），他             | 27                | 乳牛におけるカルシウム製剤の輸液経路による血中ミネラル濃度の推移比較                | 岡 由子（酪農大生産動物医療），他  |
| 11 | <i>Mycoplasma</i> 性乾酪性肺炎子牛における血清中アミノ酸動態                    | 塚野健志（道南NOSAI），他          | 28                | 携帯型心電計による乳牛の心電図と血清カリウム値との関連                       | 太田 明（酪農大生産動物医療），他  |
| 12 | 乳汁中マイコプラズマと分娩牛の生殖器におけるマイコプラズマ感染との関連                        | 伊藤めぐみ（道総研畜試（現帯畜大臨床獣医）），他 | 29                | 乳牛の臍部血管音に関する調査                                    | 池満康介（NOSAIオホーツク）   |
| 13 | 酪農場の牛床および糞便中における環境性連鎖球菌の検出状況                               | 及川 学（道総研畜試），他            | 30                | 黒毛和種子牛の左脛骨複骨折に対するダブル・ロッキング・コンプレッション・プレート固定を用いた1症例 | 今村 唯（帯畜大臨床獣医），他    |
| 14 | 初乳製剤が黒毛和種子牛の受動免疫と血清中ウイルス抗体価に及ぼす効果                          | 小原潤子（道総研畜試），他            | 31                | Velpeauスリング法により整復が奏功した子牛の肩甲骨背側脱臼の一例               | 平塚可弥乃（酪農大獣医看護），他   |
| 15 | 乳牛の哺育育成預託農場におけるFPTと疾病発生状況                                  | 沼田真生子（釧路地区NOSAI），他       | 32                | 外科的治療を行った先天性白内障の黒毛和種の1例                           | 前原誠也（酪農大伴働動物医療），他  |
| 16 | 乳牛の預託哺育農場における下痢症の発生要因と予防対策                                 | 森山友恵（十勝NOSAI），他          | 33                | 乳牛における国内初バッテリー搭載型自走式大動物手術台の検討                     | 奥原秋津（帯畜大臨床獣医），他    |
| 17 | 子牛の腸炎が多発した大規模酪農場における対策と検証                                  | 竹内未来（釧路地区NOSAI），他        | 34                | 北海道における牛トロウイルスの分子疫学的解析及び浸潤状況調査                    | 秦葉奈子（釧路家保），他       |
| 18 | 高蛋白代用乳の給与による黒毛和種子牛の体重推移と血液学的動態                             |                          | 35                | 口蹄疫疑い9事例からの考察                                     | 宮根和弘（十勝家保），他       |
|    |  |                          | 36                | 生前に牛白血病を疑った唾液腺未分化癌のホルスタ                           |                    |

- イン種成牛の1症例  
嘉陽静香(帯畜大臨床獣医), 他
- 37 牛白血病ウイルス遺伝子検出法の簡易化の検討  
川原雄太(酪農大生産動物医療), 他
- 38 十勝における過去15年間の牛のヨーネ病防疫対策の検証と今後の展望について  
藤吉 聡(十勝家保), 他
- 39 牛ヨーネ病患者における病性鑑定成績の比較検討  
宮澤国男(網走家保), 他
- 40 空知管内の公共牧場における牛の小型ピロプラズマ病再興 ~ブアオン剤投与プログラムの検討~  
松頭力蔵(中空知NOSAI), 他
- 41 空知管内の公共牧場における牛の小型ピロプラズマ病再興 ~本病再興原因究明のための調査~  
岸 昌生(空知家保), 他
- 42 非定型BSE感染牛の歩様と行動量の変化  
福田茂夫(道総研畜試), 他
- 43 牛壊死性腸炎発症牛の前胃にみられた*Clostridium perfringens* A型菌感染による病変形成とその発生機序に関する考察  
谷口有紀子(宗谷家保), 他
- 44 牛の腸炎診療への手がかりとしての糞便ダイレクトスメア  
広沢悠子(NOSAI日高), 他
- 45 子牛の誤嚥性肺炎の病態と画像診断  
岩澤沙希(酪農大生産動物医療), 他
- 46 非ステロイド系抗炎症剤を長期投与した子牛の第四胃潰瘍の発生について  
石村 真(酪農大生産動物医療), 他
- 47 草地型酪農専業地帯において酪農生産システムの15年間の変化がもたらしたもの  
久保田 学(釧路地区NOSAI)
- 48 乳用経産牛における第一卵胞波主席卵胞と黄体の位置関係が受胎率および産子の性別に及ぼす影響  
古山敬祐(道総研根釧農試), 他
- 49 乳牛の臨床的無発情に対するダブルシンク法の治療成績  
西川晃豊(釧路地区NOSAI)
- 50 黒毛和種のプログラム授精におけるCIDR抜去時の主席卵胞サイズが受胎率に及ぼす影響とそれを考慮した受胎率向上新プログラムの考案  
上野大作(NOSAI日高)
- 51 泌乳期の乳用牛へのCIDR二次利用に向けた血中プロゲステロン濃度と受胎率の調査  
羽上田陽子(NOSAIオホーツク)
- 52 牛の発情周期把握のためのスマートフォンアプリの開発  
大脇茂雄(NOSAIオホーツク)
- 53 黒毛和種の雌牛での卵子による選択的受精の可能性  
七尾祐樹(NOSAI日高)
- 54 乳牛における分娩後早期からの子宮の超音波検査所見とその後の繁殖成績  
石井三都夫(石井獣医サポートサービス), 他
- 55 リピートブリーダー牛に対する子宮洗浄による受胎効果の検証  
山川和宏(ゆうべつ牛群管理サービス), 他
- 56 乳牛繁殖検診農場での胎盤停滞発生原因の分析  
山本展司(NOSAIオホーツク)
- 57 道東地方の1農協の酪農家における牛胎子死の飼養頭数規模別の実態について  
高橋俊彦(酪農大畜産衛生), 他
- 58 ホルスタイン胎子死・新生子死78例における形態および臨床病理学的解析  
坂本啓二(酪農大生産動物医療), 他
- 59 バルク乳中のレプトスピラ血清型ハージョ抗体と牛群の繁殖成績との関連性  
安富一郎(ゆうべつ牛群管理サービス), 他
- 60 大規模乳用牛群における妊娠維持と流産に関する疫学調査  
佐藤麻子(ゆうべつ牛群管理サービス), 他
- 61 馬の胸囲・体長からの体重算出法の検証  
後藤忠広(NOSAI日高), 他
- 62 スリングを用いた馬の麻酔回復の検討  
長島剛史(帯畜大臨床獣医), 他
- 63 幼若サラブレッドの膀胱あるいは尿管損傷に対する外科手術における全身麻酔についての検討  
山家崇史(社台コーポレーション), 他
- 64 膀胱あるいは尿管損傷を発症した幼若サラブレッド25頭に対する回顧的調査報告  
田上正明(社台コーポレーション), 他
- 65 馬の慢性蹄葉炎に対する深指屈腱切断術  
樋口 徹(NOSAI日高家畜診療センター), 他
- 66 馬の先天性鼻涙管閉塞症における鼻涙管開放術  
佐々木春香(酪農大生産動物医療), 他
- 67 馬の細菌性外眼部疾患に対するロメフロキサシンの有効性および安全性  
日高修平(軽種馬育成調教センター), 他
- 68 競走馬の細菌性角膜炎に対するファージセラピーの検討  
岩野英知(酪農大生体機能), 他
- 69 角結膜の扁平上皮癌に対して外科的切除とマイトマイシンCの浸漬により治療した馬の1例  
林 美里(酪農大伴侶動物), 他
- 70 サラブレッドの急性腹症の診断における腹部超音波検査の有用性  
加藤史樹(社台コーポレーション), 他
- 71 サラブレッドの後肢跛行検査における超音波検査の有用性についての検討  
鈴木 吏(社台コーポレーション), 他
- 72 北海道市場に提出される1歳馬X線検査画像の画質改善状況に関する調査  
前田昌也(日高軽種馬農協)
- 73 Computed tomography (CT) 検査による馬の口蓋破裂診断  
齋藤由美子(酪農大伴侶動物医療), 他
- 74 新生子馬における伸筋腱断裂の7症例  
大塚智啓(日高軽種馬農協), 他
- 75 サラブレッド種新生子馬における両側性びまん性嚢胞性腎異形成の1例  
郡 久恵(酪農大感染・病理), 他
- 76 リソソーム蓄積病の疑われたサラブレッド種馬の1例  
坂本円花(酪農大感染・病理), 他
- 77 サラブレッド種馬に認められた食道頸部筋肥大症の1例  
大塚洋平(酪農大感染・病理), 他
- 78 サラブレッド種仔馬における抗酸菌感染による肉芽

- 腫性肺炎の1例  
柳 充紘 (酪農大感染・病理), 他
- 79 ローソニア感染症が疑われた1歳馬の2例  
山下紀幸 (NOSAI日高)
- 80 馬増殖性腸炎に対する豚増殖性腸炎乾燥生ワクチン接種の安全性と効果の検討  
川崎洋史 (ノーザンファーム), 他
- 81 サラブレッド種の胎盤水腫の6例  
福田真奈 (酪農大感染・病理), 他
- 82 馬胎盤で認める多核栄養膜細胞形成に関する組織学的検討と胎盤疾患との関連性  
片山亨輔 (酪農大感染・病理), 他
- 83 重挽馬における分娩後初回排卵にいたる卵胞の發育動態—卵胞成長率と受胎性との関連—  
高橋啓人 (岐阜大連合大学院), 他
- 84 サラブレッド種における超音波画像診断法を用いた子宮頸管の評価と有用性について  
関口美那 (イノウエ・ホース・クリニック), 他
- 85 サラブレッド種の不妊症例に対する選択的卵管通水法による治療的な試み  
井上裕士 (イノウエ・ホース・クリニック), 他
- 86 日高地区の乳牛における子宮捻転の捻転方向とその予後  
伊比太佑 (NOSAI日高), 他
- 87 立位押し込み保持による乳牛の子宮捻転整復法の考案  
向井周平 (根室地区NOSAI), 他
- 88 ATP拭き取り検査法を用いた搾乳衛生改善による泌乳牛の乳房炎予防効果  
榎谷雅文 (デーリイマネージメントサービス)
- 89 道内のアルパカ飼育群に発生したヒゼンダニ症とその対策  
岩岡覚起 (びえい動物病院), 他
- 90 十勝管内の豚丹毒発生事例と対策について  
荻野倫子 (十勝家保), 他
- 91 豚の *Salmonella* sp. O4:i- 感染症例における病理組織学的検討  
山本雅也 (胆振家保), 他
- 92 哺乳豚に発生した豚サイトメガロウイルス病と発生要因調査  
松田きく (上川家保), 他
- 93 新規就農の一養豚場に対する技術支援—家畜衛生向上への取り組み—  
清水倫奈 (上川家保), 他

## [日本小動物獣医学会]

### 小地区—1

#### 家族性発症を認めた犬の肥満細胞腫症例における遺伝学的検討

富張瑞樹<sup>1)</sup>, 石川雄大<sup>2)</sup>, 宮本佳奈<sup>3)</sup>, 谷川千里<sup>1)</sup>, 三好雅史<sup>1)</sup>, 宮原和郎<sup>1)</sup>, 他

1) 帯広畜産大学 動物医療センター, 2) さくら動物病院・愛知県, 3) アーク動物病院

#### 背景及び目的

肥満細胞腫 (Mast Cell Tumor: MCT) は犬でよくみられる皮膚腫瘍の一つである。なかでもブルドッグ種に関連した短頭種での発生が多く、好発犬種の一つとして報告されている。この腫瘍発生の機序に関しては不明な点が多いが、近年では、c-kit 遺伝子に変異を認めた MCT 症例が多数報告されている。一方、これまでに我々は、本学動物医療センターに来院した家族性発症の MCT のフレンチブルドッグ症例を経験し、7頭の家族のうち、父母を含む4頭が MCT を発症していた。そこで今回、これらの症例に共通した遺伝的素因の存在性を疑って、腫瘍組織における c-kit 遺伝子配列の解析、ならびに DNA マイクロアレイによる遺伝子発現解析といった遺伝学的検討を行った。

#### 材料及び方法

症例群として父と子の2頭 (F群)、またコントロール群としてF群とは全く遺伝学的に関連のない犬の MCT 症例の3頭 (C群)、計5頭を検討対象とした。これらの腫瘍組織から cDNA を調整し、既報の配列より primer を適宜設定して、c-kit 遺伝子に対する DNA シークエンス解析を行った。また同組織より total RNA を調

整し、44,000種類の遺伝子発現解析が可能な Canine オリゴDNAアレイ Ver2.0 (アジレント・テクノロジー(株), 東京, 日本) を用いて、F群ならびにC群に対する DNA マイクロアレイ解析を行った。

#### 結 果

対象とした両群5頭に対し、犬の c-kit 遺伝子のコーディング領域 2928bp のうち 5' 末端の 30塩基を除くほぼ全長の遺伝子配列を解析した。この結果、C群の2症例において c.1275 A → G、また F群の1症例において c.2355 G → A の点変異 (1塩基置換) を認めたものの、いずれもアミノ酸配列に影響を与えないサイレント変異であった。また、MCT罹患犬において既に変異が報告されていた領域 (計7箇所) に関しても、すべての症例において遺伝子変異を認めなかった。

一方で、DNA マイクロアレイによる解析に際しては、以下のような方法で候補遺伝子を検索した。

まず、F群の発現量がC群の発現量の8倍以上で、かつF群間の差が1/2～2倍の間にあるものをポジティブ候補としたところ、93種類の遺伝子がこれに該当した。このうち、既に腫瘍との関連が報告されている遺伝子が7種類認められた。次に、F群の発現量がC群の発現量の1/8以下で、かつF群間の差が1/2～2倍の間にある

ものをネガティブ候補としたところ、7種類の遺伝子がこれに該当した。このうち、既に腫瘍との関連が報告されている遺伝子が2種類認められた。

## 考 察

本実験におけるc-kit遺伝子配列に対する解析では、両群5頭すべてにおいて明らかな変異が認められなかった。未解析である5'末端の10アミノ酸における変異の可能性は否定できないものの、本実験に供した5頭に關しては、MCT発生に対しc-kit遺伝子の変異が関与している可能性は低いものと考えられた。

一方、DNAマイクロアレイ解析では、7種類のポジ

ティブ候補遺伝子と、2種類のネガティブ候補遺伝子が認められた。とくにポジティブ候補の一つとなったprotein kinase C epsilonは細胞の増殖維持に寄与し、またネガティブ候補の一つとなったcomplement component 6 (C6)は補体依存性細胞傷害作用を示すことが分かっている。こうした「腫瘍の発生や抑制に関わる遺伝子」以外にも、肥満細胞腫に特異性の高い蛋白質などに注目することにより、これまで知られていなかった新たな候補遺伝子を想定できるものと考えられた。今後、さらなる候補遺伝子の検索や解析、及び検討を行うことで、家族性のMCT発症に関連する新たな原因遺伝子の解明につながっていくものと考えられた。

## 小地区—2

# 犬移行上皮癌の早期診断を目的とした超音波検査及び免疫染色の有用性

福本真也<sup>1)</sup>、華園 究<sup>1)</sup>、藤崎雄介<sup>2)</sup>、河村芳朗<sup>3)</sup>、玉本隆司<sup>1)</sup>、打出 毅<sup>1)</sup>

1) 酪農学園大学 伴侶動物内科Ⅱ, 2) 酪農学園大学 附属動物病院,  
3) 酪農学園大学 病理

## 背 景

犬の移行上皮癌 (TCC) は膀胱に発生する最も頻度の高い悪性腫瘍である。犬の全悪性腫瘍の2%、膀胱に発生する悪性腫瘍の90%以上を占め、その浸潤性は強く、転移率も高い。好発犬種はスコティッシュテリア、シェットランドシープドック、ビーグルなどで、解剖学的には膀胱三角部に好発する。犬のTCCに対する治療法として、腫瘍病巣が膀胱三角部や尿道から離れた位置に発生した場合は外科的切除が選択されるが、術後新たに膀胱内の別の領域で病巣が出現する場合が多い (field effect)。一方、外科的治療法が困難と判断された場合はNSAIDsであるピロキシカムや化学療法剤であるミトキサントロンによる内科的治療法が選択されるが、その際の生存期間の中央値はピロキシカム単剤で195日、ピロキシカムとミトキサントロンの併用で291日と報告されており長期生存は望めない。これらの治療成績の向上には早期発見・診断が最も重要となる。TCCの診断法として、これまでに尿検査、細胞診、膀胱造影X線検査、超音波検査、CT検査が用いられてきた。なかでも超音波検査は、非侵襲的検査であることに加え、膀胱内の腫瘍性病変を早期 (小さい) 段階から高感度で検出できる利点を有する。しかしながら、TCCの早期病変に關する一致した超音波所見は今までに報告されていない。また、TCCの確定診断は膀胱灌流液から得られた細胞や膀胱内腫瘍から吸引バイオプシーで得られた組織の病理学的検査によって行われているが、二次的に発生する膀胱炎が重度の場合、TCCと膀胱炎の鑑別が困難となることがある。

## 目 的

そこで本研究では、1) TCCの早期診断に有用となる超音波所見、2) TCCの病理診断を補助するTCC特異的発現蛋白 (本研究ではEpidermal Growth Factor Receptor: EGFRとKi-67に注目) を検討するとともに、免疫染色によるこれらの蛋白解析の臨床応用性について検討した。

## 材 料 と 方 法

- 2004年4月から2014年11月まで膀胱腫瘍を主訴に酪農学園大学附属動物病院に来院し、膀胱腫瘍摘出術を行い、術後の病理組織学検査でTCC (22例) またはポリープ状膀胱炎 (5例) と診断された27例を対象とした。TCCはポリープ状膀胱炎などの良性病変に比べ強い浸潤性を示すことから、超音波検査によって浸潤性病巣 (膀胱壁筋層浸潤または非筋層浸潤) の有無について調査した。超音波検査で得られた結果と病理組織検査で得られた浸潤度の結果を比較し、超音波検査による浸潤性評価の正当性について評価した。
- 2013年4月から2014年11月までに酪農学園大学附属動物病院に来院し、病理組織学的にTCCあるいは膀胱炎と診断された症例のセルバックサンプル (パラフィン包埋サンプル) を対象にEGFR及びKi-67の発現解析を免疫組織化学にて行った。また、同様の検討を膀胱灌流液から作成された塗抹標本を対象に行い、臨床現場での応用性を検討した。免疫組織化学染色では一次抗体として、抗マウスEGFR (Zymed Laboratories) 及びKi-67 (Abcam) モノクローナ



ル抗体を用い、発色処理はABC法によって行った。

### 結果及び考察

1) 超音波検査による膀胱壁浸潤は検討した27頭中14例で認められ、全頭がTCCであった。非浸潤は13例で、うち8例がTCC、5例がポリープ状膀胱炎であった。超音波検査で膀胱壁浸潤が認められた14例のうち13例(93%)が病理組織学的検査において筋層浸潤がみられた。一方超音波検査で膀胱壁浸潤が認められた14例のうち1例(7%)で病理組織学的検査にて筋層浸潤が認められなかった。また超音波検査で膀胱壁浸潤が認められなかった13例のうち1例(8%)で病理組織学的検査にて筋層浸潤がみられた。超音波検査による膀胱壁浸潤は有意に病理組織学的筋層浸潤に関連しており( $P=0.00005$ )、その感度は93%、特異度92%、正診率93%であった。また超音波検査にて膀胱壁浸潤が認められた全14例(100%)と膀胱壁浸潤が認められなかった13例のうち8例(62%)が病理組織学的にTCCと診断された。一方膀胱壁浸潤が認められなかった5例(38%)が病理組織学的にポ

リープ状膀胱炎と診断された。以上の結果より超音波検査における筋層浸潤の有無に基づくTCCの診断は感度、特異度に優れた検査であると考えられた。しかしながら、全てのTCCの診断を下すことはできないことから更なる診断の補助にある検査が必要であると考えられた。

2) 病理組織学的に膀胱炎と診断されたセルパックサンプルにおいてEGFR及びKi-67の有意な発現は確認されなかったが、TCCと診断されたセルパックサンプルでは高発現が確認された。同様の結果は膀胱灌流液から作成された塗抹標本においても得られ、本免疫染色法は臨床現場で応用可能なTCCの補助診断法の1つと考えられた。このことよりEGFR及びKi-67発現は犬TCCの有用な診断補助マーカーになりえると考えられた。

### 結 論

超音波検査による膀胱壁浸潤度の評価と塗抹本によるEGFR及びKi-67の発現の評価を組み合わせることでTCCの早期診断精度が向上するものと考えられた。

## 小地区—4

# 多分割照射法による根治的放射線治療に関する有効性と有害事象発生率の回顧的調査

武内 亮<sup>1)</sup>、細谷謙次<sup>2)</sup>、金 尚昊<sup>2)</sup>、星野有希<sup>1)</sup>、高木 哲<sup>1)</sup>、奥村正裕<sup>2)</sup>

- 1) 北海道大学 大学院獣医学研究科 附属動物病院
- 2) 北海道大学 大学院獣医学研究科 獣医外科学教室

### はじめに

放射線治療において、一般的に腫瘍組織と正常組織の放射線感受性の差を利用した多分割照射法の方が腫瘍選択性は高いとされる。そのような理論のもと、海外の動物の放射線治療施設では根治的治療を行う際、多分割照射法が行われることが多い。実際に犬の鼻腔内肉腫に対する放射線治療を行った海外の施設による報告を例にとると、分割回数が多いほど生存期間が有意に延長することが示されている(Sones E, Vet. Radiol. Ultrasound. 2013)。しかし、本邦においては様々な理由から多分割照射法を行っている動物診療施設は少ないのが現状である。今回、当院で多分割照射法による根治的治療を行った症例について回顧的調査を実施した。

### 方 法

2012年10月から2014年5月の間に当院でオルソボルテージX線を用いて放射線治療を行った143例のうち、多分割照射法による根治的治療を行った51例について動物種、年齢、治療部位、診断名、照射方法、治療の完遂率、短期的な治療への反応性、全身麻酔による影響、治療前後での体重減少率、放射線障害の重症度につ

いて調査した。照射線量は腫瘍中心部を処方部位とし、皮膚線量とリスク臓器の被曝線量を実測した深部線量百分率から算出した上で適宜決定した。放射線障害のグレード分類はVeterinary Radiation Therapy Oncology Group (VRTOG)が定めた基準に則り評価した。

### 結 果

51例中犬が80%、猫が20%であった。年齢は5~16歳で、中央値は10歳であった。治療部位は鼻腔40%、頭部24%、腹腔20%が上位を占めた。腫瘍の診断名は鼻腔腫瘍(癌腫、肉腫、リンパ腫)39%、中枢神経系腫瘍14%、肥満細胞腫10%の順で見られた。照射方法は16~57Gy/10~20分割/2~4週間でいった。治療完遂率は86%で、腫瘍の進行や死亡(8%)、口内炎(4%)、皮膚障害(2%)により中止した症例が計14%であった。腫瘍の進行により治療を中止したのはリンパ腫、肥満細胞腫、神経膠腫、リンパ管肉腫の症例であった。治療後にCTやMRIなどで客観的に反応を評価できた症例は犬の41例中26例で、病変の縮小または消失が認められたものが81%、維持または進行病変と判断されたものが19%であった。固形癌の犬40例の1年生存率は56%で、その内最も症例数の多かった鼻腔腫瘍の犬13例の

1年生存率は75%であった。全身麻酔による重度の合併症を認めたのは1例のみで、治療後に腎機能低下が認められた。治療前後での体重の減少率は35例で評価され、減少率の中央値は3%（範囲0～14%）であった。犬でグレード3以上の重度の放射線急性障害が認められた割合は、皮膚では31例中3%、口腔粘膜では24例中4%、眼では24例中4%であった。猫で重度の急性障害が認められた割合は皮膚では7例中0%、口腔粘膜では7例中14%、眼では7例中0%であった。また、急性障害による衰弱が原因で死亡したと思われる鼻腔腫瘍の症例が1例認められた。治療を行う上で不可避と判断された白内障などを除く、計画外の晩発障害は認められなかった。

## 考 察

当院で治療した症例の多くが反応を示し、急性障害により治療を中止した例はわずかであった。多分割照射法

の治療期間は2～4週間にわたったため頻回の全身麻酔を必要としたが、治療期間中の体重減少率の中央値は3%であり、ほとんどの症例で体重維持が可能であった。皮膚をはじめ重度の急性障害は、ほとんどの症例で認められなかった。急性障害が原因で死亡したと思われる1例に関しては、治療前に外科処置を受けていたことにより鼻腔内が空洞化し、実際の吸収線量を過少に評価していたことで組織への処方線量が不正確になったことが原因であると考えられた。以上のことから、多分割照射法を用いた根治的放射線治療は、動物のQOLを下げることなく一定の治療成績を残すことができると考えられた。特に今回症例数が多かった鼻腔腫瘍に関しては、少分割照射を行った報告と比較して1年生存率で上回る（75% vs 25～62.4%）という結果が得られたことから、今後国内の施設でも多分割照射法を用いることで治療成績が改善する可能性が示唆された。

## 小地区—5

### 肝静脈造影超音波検査による肝疾患罹患犬の肝内血行動態の評価

森下啓太郎<sup>1)</sup>、平本 彰<sup>2)</sup>、大菅辰幸<sup>2)</sup>、中村健介<sup>1)</sup>、大田 寛<sup>2)</sup>、滝口満喜<sup>2)</sup>、他

1) 北海道大学 獣医学研究科 附属動物病院, 2) 北海道大学 獣医学研究科 獣医内科学教室

## はじめに

犬の肝疾患は、慢性肝炎などの炎症性疾患、原発性門脈低形成などの先天的な血管異常、変性性疾患である空胞性肝障害など多岐にわたり、疾患ごとに治療法や予後が異なることからその鑑別が重要となる。確定診断には肝生検が必要であるが、侵襲的な検査であるため臨床症状のない段階では実施に至らない例も多い。従って非侵襲的に早期に検出する方法が必要である。そこで我々は肝静脈造影超音波検査に着目した。肝臓は門脈と肝動脈の二重血液供給を受けており、通常門脈優位であるが重篤な肝疾患では門脈血流量が減少し動脈優位へと変化する。肝静脈造影超音波検査は、肝炎や肝硬変に起因する肝臓内の血行動態の変化（動脈化）を非侵襲的に検出することが可能であり、医学領域では肝生検や観血的門脈圧測定に代替法として近年注目されている。本研究では肝疾患罹患犬を対象に肝静脈造影超音波検査を行い、その臨床的有用性について評価することを目的とした。

## 材料及び方法

2012年10月から2013年10月の間に本学附属動物病院に来院し、肝生検を実施した犬、または先天性門脈体循環シャント（PSS）の精査のためCT検査を実施した犬を対象に研究を行った。肝臓の病理組織学的検査において門脈低形成や炎症、線維化といった門脈高血圧を生じる可能性のある病変を認めた症例を肝実質群、CT検査でPSSと診断した症例をPSS群に分類し研究に組み入れた。また本学附属動物施設で飼育している臨床的に

健康なビーグル犬6頭を正常群とした。超音波検査装置はTOSHIBA Aplio TMXGを用い、リニア式電子スキャンプローブ（PVT-704SBT）を使用した。対象犬を左横臥位で保定し右肋間より右肝静脈を描出後、超音波造影剤ソナゾイド® 0.01ml/kgを機側皮静脈より投与し、投与直後から120秒までの動画をハードディスクに保存した。画像解析ソフトImage Jを用いて肝静脈内に関心領域（ROI）を設定し、ROIの経時的なエコー輝度の変化を時間輝度曲線（TIC）に表した。TIC上に肝静脈造影開始時間（HVAT：TICが最大エコー輝度の20%に到達するまでの時間）、最高点到達時間（TTP：最大エコー輝度の20%～最高点までの時間）、最高相到達時間（TTPP：最大エコー輝度の20～90%までの時間）、減衰率（WR：検査終了時点における最高点からの減衰率）の4つの計測項目を設定し、各群間における差異を統計学的に解析した（Wilcoxon検定）。

## 成 績

肝実質群16頭、PSS群6頭が対象となった。肝実質群には、胆管肝炎（n=6）、慢性肝炎（n=5）、原発性門脈低形成（n=4）、胆管の発生異常（n=1）が含まれた。両群間の年齢、体重に有意差はなく、血液検査では肝実質群の総ビリルビン値のみがPSS群に比べ優位に高値を示した。TTPPは肝実質群（4.6±1.7秒）、PSS群（3.2±1.2秒）において正常群（9.8±1.9秒）よりも有意な短縮を認め、WRは肝実質群（27.2±19.1%）のみで正常群（80.3±10.3%）よりも有意な低値を認めた（P<0.05）。

## 考 察

肝実質群, PSS群で認められたTTPPの短縮は, TICの上昇勾配の増加を表している。これは門脈血流量の減少によって代償性に肝動脈血流量が増加し, 造影剤が急速に肝静脈内に流入したためと考えられた。我々が実験的に作出した門脈高血圧モデル犬においても同様の所見を認めており, TTPPは肝臓の動脈化を検出可能であり肝疾患の非侵襲的な早期診断法として有用である可能性が示唆された。一方, 肝実質群で認められたWRの低下は, 肝静脈からの造影剤の消失遅延を示している。ソ

ナゾイド®は肝臓の類洞に存在するクッパー細胞によって貪食し取り除かれる性質を有するため, クッパー細胞機能低下によるソナゾイド取り込み能の低下が肝実質群におけるWRの低下に寄与している可能性が示唆された。ただし, 本研究では症例数が少なく肝実質群に様々なびまん性肝疾患を持つ症例を同一群としてまとめて評価しており, 疾患毎の違いを特徴化できていないことが制限事項に挙げられる。今後は症例数を蓄積し, 疾患毎に区別して検討を重ねることで本検査の臨床的有用性をより明確にしていきたい。

### 〔参考〕平成26年度 日本小動物獣医学会（北海道地区）発表演題一覧

- |   |  |
|---|--|
| 1 家族性発症を認めた犬の肥満細胞腫症例における遺伝学的検討<br>富張瑞樹（帯畜大動物医療センター），他   | レート・ピレニーズの2例<br>伊藤洋輔（酪農大大学院），他   |
| 2 T細胞性リンパ腫寛解後，B細胞性リンパ腫が発生し治療した犬の多中心性リンパ腫の1例<br>高良広之（アース動物病院），他                                  | 17 犬の白内障手術後の続発緑内障にAhmed Glaucoma Valve移植術を実施した5症例の手術成績<br>久保 明（どうぶつ眼科VECS）     |
| 3 十勝における飼育犬のレプトスピラ抗体保有状況<br>鈴木裕弥（中川動物病院），他  | 18 プロカルバジンが奏功した肉芽腫性髄膜脳脊髄炎を疑う犬の1例<br>山口朋生（北大動物病院），他                             |
| 4 下痢を主徴とした猫の糞便中オーシストから <i>Toxoplasma gondii</i> Type II Genotype #5を検出した1症例<br>大橋英二（あかしや動物病院），他 | 19 MRIによる孔脳症と海馬萎縮との関連<br>堀 あい（酪農大動物病院），他                                       |
| 5 足根関節内側側副靭帯損傷に対して関節安定化術を行った犬の1例<br>多田健一郎（北大獣医外科），他   | 20 猫の多発性髄膜腫の1例<br>浅井雄飛（えのもと動物病院），他   |
| 6 大腿骨近位粉碎骨折（大腿骨頸部・転子部・転子下骨折）に対して異なる術式を用いた4治験例<br>樋口雅仁（動物整形外科病院・大分県），他                           | 21 後頭蓋窩に浸潤したC1 脊髄髄膜腫に対して外科摘出を行った犬の1例<br>立石耕右（えのもと動物病院），他                       |
| 7 腱鞘の悪性巨細胞腫の猫の1例<br>和泉雄介（北大獣医先端獣医療），他   | 22 帯広畜産大学動物医療センターにおける犬の椎間板ヘルニア手術症例の回顧的検討<br>菊池将平（帯畜大動物医療センター），他                |
| 8 犬猫の臨床例の麻酔導入におけるアルファキサロンの要求量<br>安田知世（酪農大動物病院），他  | 23 類皮腫洞の柴犬の1例<br>高橋歩土（山本動物病院），他  |
| 9 原発性肺腺癌の肺転移病巣に対してリン酸トセラニブが奏功した犬の1例<br>田村 悠（酪農大伴侶動物医療），他  | 24 <i>Streptococcus canis</i> による感染性心内膜炎の犬の1症例<br>田川道人（北大先端獣医療学），他             |
| 10 多中心型リンパ腫の犬26例における高用量サイクロフォスファミドを用いた地固め療法の検討<br>細谷謙次（北大獣医外科），他                                | 25 猫の閉塞性肥大型心筋症における僧帽弁収縮期前方運動の発生機序についての考察<br>大池三千男（おおいけ動物病院），他                  |
| 11 小型犬におけるドキシソルビシンの最大耐容量に関する検討<br>金 尚昊（北大獣医外科），他  | 26 肺高血圧症の犬に対するDual pulsed-wave Doppler法を用いた右室Tei-index測定の有用性<br>森田智也（北大獣医内科），他 |
| 12 犬における全腹部照射（Whole Abdominal Irradiation：WAI）プロトコルの検討<br>出口辰弥（北大動物病院），他                        | 27 僧帽弁形成術を行った犬9例の僧帽弁逆流率と左心房容積の経時的変化<br>沢田 保（北の森どうぶつ病院），他                       |
| 13 多分割照射法による根治的放射線治療に関する有害事象発生率と有効性の回顧的調査<br>武内 亮（北大動物病院），他                                     | 28 肝静脈造影超音波検査による肝疾患罹患犬の肝内血行動態の評価<br>森下啓太郎（北大動物病院），他                            |
| 14 犬の乾性角結膜炎（KCS）におけるマイボグラフィ所見<br>北村康也（八雲動物病院），他   | 29 ネコ肝内動脈門脈瘻の1例<br>服部花奈子（酪農大動物病院），他  |
| 15 経結膜アプローチにより眼窩腫瘍を視認し生検した犬の1例<br>菅見友洋（酪農大動物病院），他   | 30 胸骨肋軟骨部分切除および横隔膜前進術にて治療した漏斗胸の猫の1例<br>三谷浩気（北大獣医外科），他                          |
| 16 重度のぶどう膜炎を伴う原発緑内障が疑われたグ   | 31 胸腺腫の犬の1例<br>主濱宏美（紋別家畜診療センター），他  |

- 32 小細胞肺癌の犬の1例  
山下時明 (真駒内どうぶつ病院), 他
- 33 猫の下顎扁平上皮癌において下顎4分の3切除を行った6症例  
岩木芳美 (北大動物病院), 他
- 34 4歳齢の毛球の食道内塞栓により発見された右大動脈弓遺残の猫の1例  
村上翔輝 (北大獣医外科), 他
- 35 食道拡張症による吸引性肺炎予防のための喉頭閉鎖ならびに永久気管開口を行った犬の1例  
勝 亜矢子 (酪農大伴侶動物医療), 他
- 36 二次的な巨大食道を伴った鼻咽頭ポリープの猫の1例  
那須香菜子 (北大動物病院), 他
- 37 糖尿病コントロール中に低カリウムによる運動失調を認めた慢性腎臓病のネコの一例  
稲垣 忍 (東神楽どうぶつ病院)
- 38 犬人工透析におけるメシル酸ナファモスタットの有用性  
福本真也 (酪農大生産動物医療), 他
- 39 尿管結石による水腎症から膿腎症に至った犬の1例  
早川小百合 (北大動物病院), 他
- 40 破裂した腎細胞癌の犬の1例  
松山好希 (北愛動物病院), 他
- 41 犬移行上皮癌における診断補助としての免疫組織学染色の有用性  
藤崎雄介 (酪農大動物病院), 他
- 42 卵巣乳頭状腺癌の犬の5例  
溝奥尋子 (酪農大伴侶動物医療), 他
- 43 続発性中枢性尿崩症が疑われた犬の1例  
熊澤りえ (酪農大動物病院), 他
- 44 クッシング症候群および糖尿病に続発した肝膿瘍の犬の1例  
玉本隆司 (酪農大伴侶動物医療), 他
- 45 活性型ビタミンD3外用薬の慢性摂取により高カルシウム血症が認められた犬の2例  
下出亜里咲 (北大動物病院), 他
- 46 副腎摘出術を実施した犬19例の手術成績に関する回顧的検討  
星 清貴 (北大動物病院), 他

## [日本獣医公衆衛生学会]

### 公地区—7

## Multiplex real-time PCR を用いた敗血症等診断における迅速検査法の検討

松本斉子<sup>1)</sup>, 通山佳之<sup>1)</sup>, 池田徹也<sup>2)</sup>

1) 北海道帯広食肉衛生検査所, 2) 北海道立衛生研究所

### はじめに

と畜検査において処分保留し精密検査を行う事例は、敗血症を疑う場合が最も多い。精密検査により複数の臓器等から同一の菌を分離した場合は敗血症と診断されるが、菌種を同定するまでには発生から5日程度を要する。そのため保留時の判定は必要最小限の生化学性状試験で決定されることが多い。更に、豚においては豚丹毒を疑う保留も多く、処分決定時に豚丹毒か否かを判定するため、また家畜伝染病予防法での届出のためにもより迅速な検査が求められる。

本法では増幅産物をその融解温度 (以下「Tm 値」) により特定するインターカレーター法による multiplex realtime PCR を用い、偽陰性を防ぐために内部標準 (IAC) を採用することで、複数の敗血症等起因菌の判定を迅速かつ、効率的に行う検査法を検討したので報告する。

### 材料及び方法

#### (1) 保存菌株

北海道内で敗血症等から分離された *Streptococcus suis* (8株), *S. dysgalactiae* (4株), *S. alactolyticus* (1株), *S. gallinaceus* (1株), *Streptococcus* 属菌 (2株), *Erisipelothrix rhusiopathiae* (5株), *Arcanobacterium*

*pyogenes* (1株), *Staphylococcus aureus* (1株), *S. warneri* (1株), *Rothia* 属菌 (1株) の10菌種25株を使用した。それぞれの株については、市販簡易同定キット (ラピッドID32 ストレップアピ) 及び16S rRNA 遺伝子解析などにより同定を行った。

#### (2) 内部標準 (以下「IAC」)

IACとして既報の *Yersinia ruckeri* (ニジマスの赤口病の病原体) のDNAを用いた。

#### (3) DNA抽出

血液寒天培地のコロニーを白金線等で掻き取り、IAC添加TEを用いて煮沸法で行った。

#### (4) プライマー

当所の過去の精密検査で分離された菌より選定した *S. suis*, *E. rhusiopathiae*, *A. pyogenes*, *Streptococcus* 属菌, *Staphylococcus* 属菌, 及びIACを検出できるプライマーセット (Aセット・Bセット) の検討を行った。*A. pyogenes* については今回新たに選定したものの、*E. rhusiopathiae*, IACについてはreal-time PCRを用いた方法で報告されているもの、それ以外は従来のPCRで報告されているものを使用し、融解曲線分析でTm値を確認した。

#### (5) multiplex real-time PCR

THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix (東洋紡) を使用し、反応液は1検体あたり、2×THUNDERBIRD 10 $\mu$ l,

プライマー・ミックス (各 10pmol/ $\mu$ l) 0.4 $\mu$ l, 滅菌蒸留水 9.6 $\mu$ l, 鋳型 DNA 1 $\mu$ l を混和し調製した。TaKaRa Thermal Cycler Dice Real Time System2 を用いて, 95 $^{\circ}$ C 1 分の加熱を行った後, 95 $^{\circ}$ C 15 秒, 55 $^{\circ}$ C 15 秒, 72 $^{\circ}$ C 1 分を 30 サイクル繰り返し, 95 $^{\circ}$ C 15 秒, 60 $^{\circ}$ C 30 秒, 95 $^{\circ}$ C 15 秒で融解曲線分析を行った。

#### (6) 事例検証

実際に精密検査を行った牛 4 頭及び豚 6 頭の検体からの分離菌を用いて本法と同定キットとの比較を行った。

### 結果と考察

#### (1) 保存菌株による検証

保存株 25 株について multiplex real-time PCR を行い, Tm 値を計測したところ, A セット・B セットともに菌種・属ごとの Tm 値及び IAC の Tm 値が 2.5 $^{\circ}$ C 以上離れており, 区別することが可能であった。

また, 今回使用した *Rothia* 属菌株は 16S rRNA 遺伝子解析で同定された菌株であるが, グラム陽性の卵形, カタラーゼ陽性であり, 簡易同定キットアピスタッフでは *Staphylococcus capitis* と判定される。しかし, 本法を実施することにより, *Staphylococcus* 属を含む設定菌種以外であると簡単に判定できた。

#### (2) 実際の検体での検証

実際の検体について検証を行い生化学性状試験と比較したところ, 結果は全て一致し, 保留時の検体の分離菌からの判定は十分可能と考えられた。

### まとめ

当所において敗血症等を疑い精密検査を行い分離同定された菌は, *S. suis* が最も多く, ついで *A. pyogenes*, *Streptococcus* 属, *E. rhusiopathiae*, *Staphylococcus* 属であった。それら分離菌を同定する際に, 生化学性状試験に同定キットを使用しているが, その判定に迷う例も少なくない。

今回, 本法では主要な 3 菌種, 2 属を網羅できるようにプライマーを選択した multiplex real-time PCR により, 分離菌を容易に判定することが出来た。

特に, IAC を加えた TE を DNA 抽出に用いることで, 従来から PCR 検査において問題であった, 鋳型 DNA の入れ忘れ等のミスや PCR 阻害物質による疑陰性を防ぐことが可能であった。

また, 今回使用した *Rothia* 属菌株のような, 同定キット等で本法の対象菌と誤判定しやすい菌についても判定は容易であった。

real-time PCR は, 従来行われている PCR と異なり, 反応後の電気泳動を必要とせず, 特に複雑な作業も要らないため, 本法では前処理を含めても 3 時間以内で判定することが可能であった。

本法は, 敗血症等診断の迅速化, 効率化, 同定精度の向上が期待でき, また道内の食肉衛生検査所にすでに導入されている real-time PCR 機器を十分に活用することができるため, 非常に有用と考えられた。

### 公地区—8

## 分子生物学的手法を用いた飼育展示下動物におけるハトリコモナス原虫の感染実態解明とその意義

富川創平<sup>1)</sup>, 岩澤裕介<sup>2)</sup>, 入交利都<sup>1)</sup>, 杉本美紀<sup>1)</sup>, 古林与志安<sup>2)</sup>, 堀内雅之<sup>2)</sup>

1) おびひろ動物園, 2) 帯広畜産大学基礎獣医学研究部門

### はじめに

ハトリコモナス (*Trichomonas gallinae*: 以下「TG」) は, ハトやアトリ科鳥類, 猛禽類等の多様な鳥類の上部消化管に感染する原虫で, TG 感染症を引き起こす。TG 感染症は上部消化管における潰瘍やチーズ様結節の形成が特徴的な疾患で, 食欲不振や摂食困難などの臨床症状を呈する。TG 感染症は幼鳥での発症が多く, 成鳥に TG 感染が生じて多くは不顕性キャリアとなるが, 宿主の免疫低下時には発症し, 重篤化すれば死に至る。TG 感染は親鳥からヒナへの給餌, 機械的伝播, TG 感染鳥の捕食などにより TG を経口的に摂食することで成立する。国内では愛玩鳥類などで TG 感染症の存在が知られているが, 学術的な調査報告はドバトからの TG 分離例が 2 例存在するのみで, 分子疫学的報告は存在しない。また, 世界的に見ても動物園飼育下鳥類での TG 感染に関する報告は我々の知る限り存在しない。一方,

海外では野生下のハトや猛禽類で TG 感染症が報告されており, 近年では本症を主因とする野鳥の大量死の報告がある。しかし, TG 感染がなぜ爆発的に拡大し, 死に至るほどの重篤な症状を起こしたのかなどは明らかになっておらず, 本症の病態については今も未解明な部分が多い。

我々は, 嘔吐, 沈鬱などの症状を呈して急死した動物園飼育下クジャクバト 1 例について病理組織学的検査を実施し, そ嚢及び腺胃にびらん～潰瘍形成と原虫感染を確認した。TG 感染に特徴的なチーズ様結節は確認されなかったものの病理所見より TG 感染症を疑い, PCR により TG に特異的な遺伝子断片を検出したため, 同症であると確定診断した。本死亡例は他に 75 羽のクジャクバトと同居飼育 (A 鳥類舎) していた他, 当園では飼育舎は異なるものの TG に感受性を示す多様な鳥類, 特に TG 感受性と言われているオジロワシやオオワシ等の国内希少野生動物種を飼育していたため, 当園における

TG 感染の実態解明を行い、対策に資することを目的に調査を行った。

### 材料及び方法

A 鳥類舎のクジャクバト (75羽)、クジャクバト以外の飼育鳥類 (B, C, D, E の4鳥類舎11種41羽)、斃死したオジロワシ1羽 (E 鳥類舎) の食道~そ嚢スワブ (合計5鳥類舎13種117検体)、環境材料 (飲水、餌場スワブ、池の水) (B, C, F, G の4鳥類舎17検体) を採取した。採取材料より DNA を抽出し、トリコモナス類の ITS-1/5.8S/ITS-2 ribosomal 領域を検出するプライマーセットを用いて PCR を実施し、遺伝子断片の検出を試みた。加えて、生体から採取したスワブについては直接塗抹標本検査により TG 検出を行った。PCR により遺伝子断片が検出されたものは、増幅産物からのダイレクトシーケンスを実施し、得られたデータを解析して系統解析を行った。

### 結 果

食道~そ嚢スワブでは、78 検体 (A 鳥類舎のクジャクバト全75羽、B 鳥類舎のアオバト1羽とキジバト1羽、E 鳥類舎のオジロワシ1羽) よりトリコモナス属に特異的な遺伝子断片を検出し、生体由来材料からは直接塗抹標本検査により活発に運動する TG を検出した。他の採取材料から遺伝子断片は検出されなかった。シーケンス解析の結果、同一飼育舎内から得られた遺伝子断片は複数の個体から検出された場合でも 100% の同一性を示したが、異なる飼育舎間では配列が異なるという結果が得られた。系統解析により、A 鳥類舎と B 鳥類舎から検

出された遺伝子断片は、TG に分類されるクラスターに位置していたが、オジロワシから検出された遺伝子断片は既知の TG とは異なり、*Trichomonas vaginalis* に近いクラスターに位置していた。

### 考 察

園内飼育ハト類では TG 感染が蔓延していることが確認された。現在まで TG 感染を原因とする死亡例は新たに発生していないものの、動物園飼育時においてもハト類にとって TG 感染は潜在的なリスクであることを認識し、感染が認められた時には治療対象とすべきであると考えられた。また、1 例の斃死した園内飼育オジロワシからは、従来報告されてきた TG とは遺伝子配列の異なる遺伝子断片が検出された。今回供試したオジロワシの死因は TG 感染とは関係ない死因 (卵管閉塞、卵管炎、周囲炎) であったが、国内希少猛禽類において TG 感染が初めて示唆された。当該個体は北海道内で保護された野生動物由来であったため、国内野生下の猛禽類にも TG 感染が広がっている可能性が考えられた。海外の報告では、TG 感染症が猛禽類の雛の死亡率を増加させることが指摘されている。また、TG 感染は時として野鳥の大量死を招きかねないリスク要因である。本研究で明らかにしたように動物園飼育下鳥類でも TG 感染が蔓延しうることや、野生下のオジロワシのような希少猛禽類においても TG 感染が広がっている可能性が考えられたことから、動物園飼育下鳥類において TG 感染に注意すると共に、保全医学的な観点から、国内野生鳥類、特に TG 感受性があると考えられる希少猛禽類について、その感染実態を明らかにしていく必要がある。

### 〔参考〕平成 26 年度 日本獣医公衆衛生学会 (北海道地区) 発表演題一覧

- |   |   |
|---|---|
| 1 と畜データ時系列分析システムの開発と評価<br>足立泰基 (釧路保健所), 他                             | 10 動物園飼育下クジャクバトに発生したハトトリコモナス感染症<br>岩澤裕介 (帯畜大基礎獣医), 他            |
| 2 と畜場に搬入される牛のレプトスピラ保有状況について<br>内野倫成 (八雲食肉衛検), 他                       | 11 飼育展示下クジャクバトに発生したハトトリコモナス症への対応<br>富川創平 (おびひろ動物園), 他           |
| 3 北海道の敗血症豚由来 <i>Streptococcus suis</i> に関する分子疫学調査<br>大野祐太 (早来食肉衛検), 他 | 12 十勝地域のアライグマにおける A 群ロタウイルス感染<br>山口英美 (岩手大学院連合農学), 他            |
| 4 所管と畜場における豚丹毒の継続的発生と対応について<br>秋山貴洋 (帯広食肉衛検), 他                       | 13 鉛弾規制後も生じているワシ類における鉛汚染の実態<br>渡辺有希子 (猛禽類医学研究所), 他              |
| 5 管内と畜場における牛白血病の発生状況について<br>館江弘明 (帯広食肉衛検), 他                          | 14 2014 年における酪農学園大学野生動物医学センター WAMC の教育研究活動報告<br>浅川満彦 (酪農大感染・病理) |
| 6 残留抗生物質検査法における増殖用液体培地の検討<br>中野由佳子 (八雲食肉衛検), 他                        | 15 沖縄八重山諸島に棲息するアオウミガメの血漿中エンドトキシン活性値<br>西 康暢 (酪農大獣医), 他          |
| 7 Multiplex real-time PCR を用いた敗血症等診断における迅速検査法の検討<br>松本斉子 (帯広食肉衛検), 他  | 16 チャップマンシマウマ精巣における性ステロイドホルモン合成<br>三好亮輔 (帯畜大), 他                |
| 8 と畜場の汚染指標菌として腸内細菌科菌群を用いる方法の検討<br>古崎洋司 (早来食肉衛検), 他                    | 17 ミンクジラ, ニタリクジラおよびイワシクジラ胎盤におけるアロマトーゼの発現と分布<br>北山知代 (帯畜大), 他    |
| 9 生食用食肉のブドウ糖発酵性試験の検討<br>平井佑治 (北大獣医衛生), 他                              |   |