

平成 29 年度 日本獣医師会獣医学術学会年次大会 (大分)  
地区学会長賞受賞講演 (四国地区選出演題)

[日本産業動物獣医学会]

産地区—18

繁殖豚下痢症例からの豚デルタコロナウイルス検出と  
遺伝子検査法の検討

坂下奈津美, 高橋茂隆

香川県東部家畜保健衛生所

はじめに

豚デルタコロナウイルス (Porcine Delta Corona Virus: PDCoV) は 2012 年に香港の研究グループが豚のコロナウイルスの遺伝子型として報告した新しいウイルスである。2014 年にアメリカで初の豚の下痢症例からの検出報告があり、2015 年に感染実験でも下痢を起こすことが報告され、PDCoV 感染症として認識された。日本では 2014、2015 年に東北と関東で下痢症例から遺伝子検出の報告と 1 例分離報告があった。今回、繁殖母豚を主とする下痢症例から PDCoV 遺伝子が検出され、ウイルス分離を試みたのでその詳細と、リアルタイム検査系による遺伝子検出法を検討したので報告する。

臨床症状

2016 年 2～3 月、県内繁殖肥育一貫養豚場の分娩舎及び繁殖舎で繁殖母豚、その産子 (新生豚) の一部及び繁殖育成豚が下痢を示した。繁殖母豚及び育成豚は、軟便を示した後、約半日後に黄色～緑黄色泥状便を排泄した。食欲は下痢最盛期に減少や廃絶を示し、発咳を示す個体も確認された。発熱は無く、2～3 日で回復した。新生豚は黄白色の下痢便を示した。死亡個体はみられなかった。

材料及び方法

材料は、繁殖母豚 8 頭、新生豚 1 頭、繁殖育成豚 1 頭の糞便計 10 検体とした。PDCoV 遺伝子検査は Wang ら (Emerg. Infect. Dis. 20 (7), 1227-1230, 2014) のプライマーを用い、M 領域と N 領域について RT-PCR を実施し、検出された遺伝子のうち 1 検体をシーケンス解析した。また、ウイルスの増殖を評価するた

め、Wang らの M 領域 PCR の変法として、M67F と対になるプライマーを設計 (M253R: GGCCAGGATATGAAGGTCAG) し、リアルタイム 1step RT-PCR (SYBR) 法の検査系を作成した。ウイルス分離は、生後約 1 週間の豚より初代豚精巢細胞を作成し、糞便検体を 10 $\mu$ g/ml 濃度でトリプシン感作させたものを、細胞に 1 時間感染させて上清を洗い、1 $\mu$ g/ml 濃度トリプシン添加 DMEM 培養液を追注し、37 $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> で静置培養を 3 日間実施した。この細胞の凍結融解液を検体として 2 回継代した。分離結果は、CPE の観察と、培養 0 日目と 3 日目の培養液を作成したリアルタイム検査系で評価した。また、他の病原体の探索としてサルモネラ菌培養と、豚流行性下痢ウイルス、豚伝染性胃腸炎ウイルス、A 群 B 群 C 群ロタウイルスの遺伝子検査を実施した。

結果及び考察

すべての検体から PDCoV の M 領域と N 領域を標的とする PCR で目的のサイズの遺伝子が検出され、シーケンス解析の結果、2016 年 4 月の韓国例 (アクセッション番号: KY354363) と M 領域 454 塩基が 100% 一致した。ウイルス分離は、3 代目までに明瞭な CPE は確認できず、リアルタイム検査系でウイルスの増殖が確認できなかった。他の病原体の探索の結果、1 検体から *Salmonella enterica* O4:i:- が分離され、別の 1 検体から C 群ロタウイルス遺伝子が検出された。本症例は、共通して検出されたのは PDCoV のみなので、新たな病原体である PDCoV 感染による下痢疑い例と考えられた。今回、リアルタイム検査系を設計したことでウイルス分離の評価が容易になったので、今後、他の消化酵素を使用するなどの分離条件の検討を行いたい。

[参考] 平成 29 年度 日本産業動物獣医学会 (四国地区) 発表演題一覧

- |   |                                       |
|---|---------------------------------------|
| 1 管内で発生した牛白血病と診断の課題<br>土佐 進 (香川県東部家畜保健衛生所), 他 | 東山雅人 (徳島県立農林水産総合技術<br>支援センター畜産研究課), 他 |
| 2 牛の頭部奇形 3 症例の病理学的考察<br>小菊洋行 (愛媛県家畜病性鑑定所)     | 4 牛白血病の診断におけるパンチ生検と穿刺吸引法と<br>の比較検討    |
| 3 和牛供卵牛の栄養水準の違いが採胎成績に与える影響                    | 片山進亮 (香川県東部家畜保健衛生所), 他                |

- 5 羊の銅中毒を疑う一例  
藤原理央 (高知県中央家畜保健衛生所), 他
- 6 繁殖豚下痢症例からの豚デルタコロナウイルス検出と検出方法の検討  
坂下奈津美 (香川県東部家畜保健衛生所)
- 7 管内養豚場の農場 HACCP 導入に向けた取組み  
久保紀恵 (高知県西部家畜保健衛生所)
- 8 野生イノシシの豚丹毒・サルモネラ抗体検査および野外スタ場材料の細菌培養検査  
東條秀徳 (徳島県徳島家畜保健衛生所), 他
- 9 暑熱期の「阿波尾鶏」種卵生産性向上に向けた抗酸化力の活用  
丸谷永一 (徳島県立農林水産総合技術支援センター畜産研究課), 他
- 10 *Nosema ceranae* の関与を疑うイチゴ農家における花粉交配用蜂群の崩壊とその対策についての検討  
森西恵子 (香川県東部家畜保健衛生所), 他

## [日本小動物獣医学会]

### 小地区—9

### マダニ媒介性重症熱性血小板減少症候群を発症した犬の症例

大島寛彰<sup>1)</sup>, 来田千晶<sup>2)</sup>, 前田 健<sup>3)</sup>

1) おおしま動物病院・徳島県, 2) (株)四国細胞病理センター, 3) 山口大学共同獣医学部

#### はじめに

重症熱性血小板減少症候群 (以下, SFTS) は, 2011 年に中国の研究者らによって発表されたブニヤウイルス科フレボウイルス属に分類されるマダニ媒介性ウイルスによる新興感染症である。日本では 2012 年末に初めて SFTS ウイルスによる発症が発見され, 2017 年 9 月 27 日現在, 患者 303 名, 死者 59 名, 致死率 19.5% が報告されている。感染経路はマダニを介したものが中心だが, 下痢便等の患者体液との接触により人から人への感染も報告されている。動物における SFTS ウイルスの感染状況は, 家畜を含め多くの野生動物, 伴侶動物である犬においても抗体の保有が認められているが, 発症を示す報告はなく, 動物では不顕性感染のみで臨床症状はないと考えられていた。今回, SFTS ウイルスに感染し臨床症状が認められた飼育犬に遭遇したためその概要を報告する。

#### 症 例

雑種犬, 4 歳, 避妊雌, 体重 16kg, 室内飼い (毎日散歩), 狂犬病及び 6 種混合ワクチンは毎年接種, 経口タイプのフィラリア・ノミ・マダニ予防の合剤を 5 月より毎月投与。2017 年 6 月 1 日 (第 1 病日とする) より元気消失, 食欲廃絶を主訴として 6 月 3 日に来院。嘔吐や下痢の症状はなく, 右側下眼瞼にマダニ刺咬痕を疑う病変を確認し, 発熱 (40.7°C), 白血球減少 ( $17 \times 10^2 / \mu l$ ), 血小板減少 ( $14.8 \times 10^4 / \mu l$ ), 肝酵素の軽度の上昇, CRP の上昇 ( $>7.0 \text{mg/dl}$ ) を認めた。感染症や自己免疫性疾患, 腫瘍などを考慮したが, 病態が一致せず確定診断できなかった。意識レベルや歩行も正常であったことから, アンピシリンとプレドニゾロン (0.5mg/kg) を皮下投与し, 経口剤でキノロン系抗生物質とプレドニゾロン (1mg/kg, s.i.d.) を 6 日間処方した。ま

た通院とし, 病態の経時的変化を記録した。第 6 病日に右側の下顎リンパ節の腫脹と右側頸部の皮膚の下垂を認めた。発熱は第 6 病日まで継続を確認し, 第 8 病日には正常まで低下した。第 9 病日から元気や食欲が改善し始めると, 軟便から血便, 水様便が 10 日間続いた。白血球の減少は初回の検査のみで認められ, 血小板の減少は第 11 病日まで継続を確認した。ALT と ALP の上昇は第 26 病日まで継続を確認した。リバーゼは, 第 8 病日に急上昇し, 数日で低下, CRP も 10 日間かけて下降した。また, 第 8 病日の採血では, 原因不明の溶血が認められた。末梢血での血液塗抹では, 血球内に寄生体や封入体を認めず, 第 11 病日をピークに異型リンパ球の出現を認めた。第 45 病日に追加で血液検査を行い, この時点ですべての項目が正常値であることを確認した。第 3 病日の保存血液より SFTS ウイルス遺伝子が検出され, SFTS ウイルスに対する IgM 抗体が検出された。回復期である第 26 病日の血液からは IgM 抗体は消失し, IgG 抗体が高値を示した。追加検査を行い, バベシアの PCR 検査は陰性, パルボ, コロナウイルスの IgG 抗体はともに低値 (陰性) を示した。

人での SFTS と類似した病態を示し, 血液中に SFTS ウイルスの遺伝子が検出された。また, 急性期を示す IgM 抗体の存在とペア血清での抗体上昇が認められ, その他の類似した感染症が陰性であることから, 今回の症例は SFTS ウイルス感染と診断した。その後の調査から, 同居犬 2 頭中 1 頭からも高い抗体価が検出された。

#### 考 察

ステロイド (1mg/kg, s.i.d.) の 1 週間の投与が検査に少なからず影響があったと考えられる。当初より, 既存の感染症とは異なることから, SFTS を疑うも前例がなく確信がもてなかった。また, 伴侶動物の SFTS の検査が可能な研究機関は限られており, 山口大学に依頼で

きるまでに時間を要した。すべての検査を終え、確定診断に至ったのは約1カ月後であった。また、同居犬1頭が感染していたことは、動物間での感染の可能性、あるいは散歩などでマダニに刺咬された可能性が考えられた。以前より、ペットとして飼育されている犬から何例も、SFTSウイルスに対する抗体あるいはウイルス遺伝子が検出されながら、発症が認められてこなかった事実があり、今回の症例が特別な治療をせず自然回復をしたことから、犬のSFTSは稀に発症しても軽症で済むの

ではないかと考えた。そして、軽症ゆえに飼い主も異常に気づかず、動物病院を受診しないケースも多くあると考えた。また、症状だけでは類似した疾患も多く、これまで獣医師がSFTSを見落としてきた可能性もある。今回の犬のSFTS発症例の発見により、ペットと濃厚に接触する機会が多いと考えられる飼い主や、獣医師、動物看護師等のリスクなどを再検討し、SFTSについては医師、獣医師、研究者、行政等が連携し、更なる研究や対策が急務と考えられた。

### [参考] 平成29年度 日本小動物獣医学会 (四国地区) 発表演題一覧

- |  |  |
|--|--|
| <p>1 不完全型心内膜症欠損症の犬に対して循環停止法で心内修復を実施した一例<br/>須崎信茂 (すぎき動物病院・香川県), 他</p> <p>2 右大動脈弓遺残症の犬の2症例<br/>船橋めぐみ (すぎき動物病院・香川県), 他</p> <p>3 外科治療により良好な経過を認めた両側尿管断裂の2症例<br/>樋笠正晃 (セントラルシティ), 他<br/>動物病院・愛媛県</p> <p>4 加圧式定量噴霧吸入療法を行った猫気管支疾患の1例<br/>麻野良太郎 (麻野獣医科病院・香川県)</p> <p>5 ネコのイソフルラン麻酔下の外科手術におけるメデトミジン, ミタゾラム及びアルファキサロン前処置が麻酔と覚醒へ及ぼす影響<br/>蒲原裕和 (かもはら動物病院・高知県), 他</p> <p>6 若齢時に生活歯髄切断を受けた犬の1症例<br/>大林杏子 (KOKO どうぶつ病院・香川県), 他</p> <p>7 インターロッキングネイルを使用した猫の大腿骨骨折10症例11肢<br/>東条吉晃 (東条動物病院・香川県)</p> <p>8 橈尺骨癒合不全症例に腸骨翼を用いた自家皮質骨移植を試みたトイプードルの2例<br/>井野寛之 (にいほま動物病院・愛媛県), 他</p> | <p>9 猫のDICやSIRSの診断におけるSAAの有効性に関する研究<br/>久保 剛 (久保動物病院・香川県)</p> <p>10 子宮蓄膿症を発症した猫におけるアグレプリストンの治療効果の検討<br/>山崎裕之 (やまさきペットクリニック・香川県)</p> <p>11 トラネキサム酸を用いた催吐処置による血液凝固亢進有害事象とヘパリン同時投与による凝固亢進回避法の検討 (続報)<br/>藤原万里子 (四国動物医療センター・香川県)</p> <p>12 マダニ媒介性重症熱性血小板減少症候群を発症した犬の症例<br/>大島寛彰 (おおしま動物病院・徳島県), 他</p> <p>13 胃内に腺腫が認められたジャックラッセルテリアの1例<br/>橋田好廉 (佐野獣医科病院・高知県), 他</p> <p>14 子宮原発リンパ腫の猫の1例<br/>合田直樹 (セントラルシティ), 他<br/>動物病院・愛媛県</p> <p>15 繊維性異物誘発が疑われた腹腔内肉芽腫および骨肉腫の犬5例<br/>来田千晶 (株四国細胞病理センター・香川県), 他</p> <p>16 結膜メラノーマと診断した猫の1例<br/>林 雅人 (林獣医科病院・徳島県), 他</p> |
|--|--|

## [日本獣医公衆衛生学会]

### 公地区-7

### 愛媛県で分離されたメチシリン耐性黄色ブドウ球菌臨床株の POT法による解析

園部祥代, 仙波敬子, 阿部祐樹, 青野 学, 井上 智, 四宮博人

愛媛県立衛生環境研究所

#### はじめに

薬剤耐性 (AMR) は世界的に大きな問題となっており, 2015年にWHO総会でグローバルアクションプランが採択され, 2016年には日本でもアクションプラン

が制定されるなど, その対策についての動きが活発化している。

メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) は, ヒト医療現場で最も高頻度に検出される薬剤耐性菌であり, 院内感染原因菌としての対応が必要である (院内感染型

MRSA : HAMRSA). 一方, 近年, 医療行為との関連性が見いだされず, 病原性の高い MRSA (市中感染型 MRSA : CA-MRSA) の存在が問題になっている.

獣医学領域では, MRSA の動物病院内での人を介した院内感染が示唆される事例も報告されている. また, 欧州では, 家畜関連型 MRSA (LA-MRSA) の人への伝播が問題となっており, MRSA 対策には, 医学・獣医学等の包括的な One Health アプローチが必要であると考えられている. このような状況の中, 今回, われわれは愛媛県内のヒト医療機関における MRSA の検出状況を POT (Phage Open Reading Frame Typing) 法を用いて調査したので報告する.

### 材料及び方法

2014年4月から2015年3月に県内の医療機関から MRSA として収集した菌株のうち, PCR法により *mecA* (メチシリン耐性遺伝子) 保有を確認した196株を用いた. 菌株から DNA を抽出後, Cica Genus Staph POT KIT (関東化学) を用いて解析を行った. POT法は分子疫学用遺伝子型別キットであり, その結果は POT1, POT2, POT3 の3つの数値で表される. MRSA の分類には, 臨床情報に基づく臨床的分類と SCC*mec* の型に基づく細菌学的分類があるが, POT1 には5つの SCC*mec* 関連遺伝子を含むため, その値により, 細菌学的 HA-MRSA であるか, 細菌学的 CA-MRSA であるかの推測が可能であり, POT1~3 の値 (POT 型) により菌株の識別が可能である.

### 結果及び考察

POT1 の値は12種類に分類され, その値により各菌株が細菌学的 HA-MRSA または細菌学的 CA-MRSA であると推定できた. POT1 が93を示す細菌学的 HA-MRSA が全体の52%を占め, これは日本の HA-MRSA の大部分を占めるとの報告がある NY/JAPAN クローンである可能性が高い. また, 次に多く検出された POT1

の値は106であり, 近年増加が懸念されている細菌学的 CA-MRSA である可能性が高い. 細菌学的 CA-MRSA と推定された MRSA の割合は全体の37%であり, 国内の他の報告と同様, 増加傾向にあると考えられた.

さらに, POT1~3 の値について, 90種類に分類された. そのうち, 30種類については同一 POT 型が2株以上検出され, 医療機関別, 診療科別に集計しても複数の株が同一の POT 型を示したことから, 院内での伝播の可能性が示唆された. ただし, 2医療機関で同一 POT 型が検出されたものもあり, そのような POT 型を示す株は, 地域流行株である可能性も考えられた. 地域流行株を把握するという意味でも, 今回のような広域の解析が重要である.

また, POT 型 70-18-81 が6株検出された. この POT 型を示す黄色ブドウ球菌は, 黄色ブドウ球菌熱傷様皮膚症候群 (SSSS) を引き起こすことが知られている表皮剥離毒素 (ETX-A) を産生する CA-MRSA であるとの報告があり, PCR法により, 6株全て ETX-A 遺伝子を保有していることを確認した. さらに, 米国で高病原性 CA-MRSA として問題となっている USA-300 の多くが示すとされている POT 型, 106-77-113 が1株検出され, PCR法により, 白血球破壊毒素 (PVL) 遺伝子の保有を確認した. ETX-A を産生するクローンについては同一診療科での集積もあり, 院内での伝播の可能性が示唆され, 注意が必要であると考えられた.

これまで愛媛県内での広域における MRSA 分子疫学解析はほとんど実施されておらず, 今回の結果は感染対策を講じる上で重要な知見を提供するものと考えられる. また, 今回はヒト医療機関で検出された MRSA についての解析のみであったが, 前述の動物病院内での院内感染についての報告では, その原因 MRSA クローンは今回の解析結果で最多数を占めた NY/Japan クローンと遺伝子型が一致しており, MRSA の院内感染対策には, ヒト医療と獣医療双方での対策が重要であると考えられた.

## 〔参考〕平成29年度 日本獣医公衆衛生学会 (四国地区) 発表演題一覧

- |   |  |
|---|--|
| 1 管内新設と畜場における HACCP 導入の取り組みについて<br>石丸 歩 (徳島県食肉衛生検査所西部支所), 他 | 4 徳島県内食鳥処理場で確認された鶏マラリアについて<br>須見康代 (徳島県食肉衛生検査所), 他 |
| 2 牛由来検体からのリステリア属菌の検出状況<br>山中祐子 (香川県食肉衛生検査所), 他              | 5 敗血症と診断された豚の心筋病変<br>大西栄二 (香川県食肉衛生検査所), 他          |
| 3 愛媛県で分離されたメチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) 臨床株の POT 法による解析            | 6 牛の全身性腫瘍の一症例<br>廣瀬綾子 (香川県食肉衛生検査所), 他              |