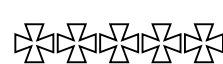


# 日本獣医師会学会関係情報



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並びに獣医学術地区学会の開催計画

【平成24年度 日本獣医師会獣医学術学会年次大会（大阪市）】

開催月日	開催地・会場
平成25年2月9日(土)～ 11日(月・祝)	大阪府大阪市 大阪国際交流センター シェラトン都ホテル大阪

【平成24年度 獣医学術地区学会（参考：地区獣医師大会）】

地区	開催担当 獣医師会	獣医学術地区学会		（参考：地区獣医師大会）	
		開催月日	開催地・会場	開催月日	開催地・会場
北海道	北海道獣医師会	9月6日(木) 7日(金)	江別市 酪農学園大学	9月6日(木)	札幌市 シェラトンホテル札幌
東北	山形県獣医師会	10月11日(木)	山形市 山形国際ホテル	10月10日(水)	同 左
関東・ 東京	埼玉県獣医師会	9月2日(日)	さいたま市 ラフォーレ清水園	同 左	同 左
中部	石川県獣医師会	9月2日(日)	金沢市 ホテル金沢	9月1日(土)	金沢市 石川県立音楽堂
近畿	京都市獣医師会	10月14日(日)	泉佐野市 大阪府立大学	9月2日(日)	京都市 ホテルグランヴィア京都
中国	山口県獣医師会	9月29日(土) 30日(日)	山口市 山口グランドホテル	9月29日(土)	同 左
四国	愛媛県獣医師会	9月9日(日)	松山市 にぎたつ会館	同 左	同 左
九州	宮崎県獣医師会	10月14日(日)	宮崎市 ワールドコンベンション センターサミット	同 左	同 左

※関東地区と東京地区の獣医学術地区学会及び地区獣医師大会は合同開催

※獣医学術地区学会及び地区獣医師大会は全て平成24年に開催

平成23年度 日本獣医師会獣医学術学会年次大会（北海道）  
優秀講演要旨（東北地区）

[日本産業動物獣医学会]

産地区—10

無細胞系タンパク質合成システムにより作製した抗原を用いる抗体検出法

富樫克博<sup>1)</sup>, 佐藤 亘<sup>2)</sup>

1) 山形県農業総合研究センター養豚試験場, 2) 山形県庄内家畜保健衛生所

はじめに

産業動物の感染症をコントロールするうえで、抗体検査の実施は不可欠である。しかし、市販検査キットの種類は少なく、一部の感染症にしか対応できていない。独自に抗体検査法を構築する場合、特異性の高い抗原タンパク質を作製することが課題となる。抗原タンパク質を遺伝子組み換え技術により作製する方法は優れた方法で、多くの報告がなされている。しかし、遺伝子組み換え生物拡散防止の観点から、一般的な検査機関で実施することは困難である。ここ数年、遺伝子組み換え技術に依存しない無細胞系のタンパク質合成技術が確立され、複数のシステムが市販されている。これらのシステムは、タンパク質の構造解析やタンパク質間相互作用の研究などに用いられており、感染症の抗体を検出するための抗原タンパク質の作製に用いられた報告は見当たらない。

今回、無細胞系タンパク質合成システムにより作製したタンパク質を抗原に用いた、3つの豚感染症の抗体検出ELISA法（PCV2感染症：PCV2-ELISA、豚増殖性腸炎：PPE-ELISA、豚浮腫病：Stx2e-ELISA）の開発を試み、同システムにより作製した抗原タンパク質の有効性を検証した。

材料及び方法

PCV2感染症の抗原はカプシドタンパク質（ORF2）、豚増殖性腸炎はローソニア・イントラセラーリス外膜タンパク質（LasA）、豚浮腫病はShiga toxin type2eのBサブユニット（Stx2eB）とした。抗原タンパク質の合成に用いるDNA（テンプレート）は、2段階のPCRにより合成した。1段階目のPCRは、目的とする抗原タンパク質の遺伝子配列を増幅させるプライマーを設計し実施した。2段階目のPCRは、6×His-Tag及びT7プロモーターを付加する市販プライマーセットを用いて実施した。抗原タンパク質は、市販の無細胞系タンパク質合成システムを用いて合成後、精製した。抗原は炭酸緩衝液でマイクロプレートに固相化した。二次抗体には、HRP標識抗豚IgGポリクローナル抗体を用いた。発色基質にTMBを用いてマイクロプレートリーダーでOD値を測定した。

結 果

1 抗原タンパク質の作製

合成タンパク質は一部不溶化したため、変性条件下で精製した。また、コバルト磁気レジンを用いることで、微量な合成タンパク質を効率的に高い純度で精製することができた。

2 ELISA法の検証

野外血清59検体を用いてPCV2-ELISA法とIFA法による結果を比較したところ、一致率93.2%、特異度100%、感度91.3%で、統計学的に有意な差は認められなかった（Fisherの直接確立法： $P < 0.01$ ）。

(2) 野外血清30検体を用いてPPE-ELISA法と海外市販ELISAキットによる結果を比較したところ、一致率80.0%、特異度66.7%、感度93.3%で、統計学的に有意な差は認められなかった（Fisherの直接確立法： $P < 0.01$ ）。

(3) 豚浮腫病発生農場と未発生農場各2農場のStx2e-ELISA値を比較したところ、いずれの発生農場も未発生農場と比較し、統計学的に有意に高い値を示した（t-検定： $P < 0.01$ ）。

考 察

今回開発を試みた3つの抗体検出ELISA法は、それぞれの疾病の抗体を検出する方法として有効であることが示唆された。このことから、無細胞系タンパク質合成システムで作製した抗原タンパク質は、抗体検出に応用することが可能であると考えられた。また、一連の検証を行う中で、同システムを用いた抗体検出ELISA法の開発方法を構築することができた。その方法は、6段階の主要な手順からなる。(1) 抗原として有効なタンパク質をコードする遺伝子配列の検索、(2) タンパク質合成のためのテンプレートの作製（PCRによる2ステップでの遺伝子増幅：約4時間）、(3) 市販キットによるタンパク質の合成（6時間）、(4) コバルト磁気レジンによるタンパク質の精製（約40分）、(5) 炭酸緩衝液を用いた抗原タンパク質の固相化（1時間）、(6) ブロッキング（1時間）。構築した方法はテンプレートを変更するだけで、様々な感染症の抗体検出ELISA法を開発することを可能とする。また、遺伝子組み換えに伴うリスクが無いいため、一般的な検査機関で実施することが可能であ

る。抗体検査に必要な試薬費は、通常の市販抗体検出ELISAキットと同等以下であった。

今回、無細胞系タンパク質合成システムにより作製したタンパク質が抗体検査に有効であることを明らかにした。また、同システムを用いた抗体検出ELISA法の開

発方法を構築することができた。この方法は汎用性が高く、様々な疾病の抗体検出ELISA法の開発に応用することが可能なため、産業動物の感染症をコントロールするうえで大きな役割を果たすことが期待される。

## [日本獣医公衆衛生学会]

### 公地区—9

## 集団発生した結腸腸間膜病変を主徴とする豚の大腸炎

中田 聡, 坂上亜希恵, 西村 肇, 平塚雅之, 中村由香里, 佐藤俊郎, 他

宮城県食肉衛生検査所

### はじめに

所管すると畜場において、同一農場から搬入の豚に、結腸の水腫様病変を主徴とする症例が継続的に発生した。このため、症例を病理組織、細菌学的に検索し、原因及び病態を追究すると共に、検査結果を基に、生産者と改善に向けて情報交換を実施したところ、成果が得られたので概要を報告する。

### 材 料

当該農場の豚で結腸腸間膜の水腫様病変を認めた検体について病理検査、細菌検査、遺伝子検査を実施した。また、情報交換による効果の検証として、改善後の検体について遺伝子検査を実施し、大腸疾患の発生数について統計解析した。

### 方 法

**病理組織検査：**肉眼的に水腫様病変を認めた症例の病変部を定法に従い固定、包埋、薄切し、ヘマトキシリン・エオジン（HE）染色、グラム染色、ワーチンスターリー染色を実施後、鏡検した。

**細菌検査：**各症例の結腸粘膜をかき取りPBSで懸濁し鏡検した。スピロヘータを確認した検体をBJ培地で42℃48時間嫌気培養し、β溶血を示したコロニーを純培養し、生化学性状検査を実施した。

**遺伝子検査：**分離株に対し、特異的配列を標的とした2種のプライマーを用いPCRを実施した。

**統計解析：**変動性図を用いた経時的解析と共に、発生数を分散分析及びTukey-KramerのHSD検定により統計解析した。

### 結 果

**病理組織検査：**肉眼で水腫様病変を認めた結腸漿膜では、循環障害及び炎症細胞浸潤が認められ、発赤や肥厚を認めた粘膜では、杯細胞増加等の粘液分泌亢進、上皮細胞の変性壊死、脱落を主体としたカタル性腸炎像を認

めた。粘膜の障害が強い部位では陰窩や杯細胞内に多数のスピロヘータを認めた。また、一部の検体で粘膜上皮欠損部よりバランチジウムの侵入を認めたが組織反応は軽微であった。

**細菌検査：**直接鏡検でスピロヘータを認めた検体より*Brachyspira hyodysenteriae*（以下Bh）が分離された。

**遺伝子検査：**PCRでBhに特異的バンドを検出した。一方、農場による対策後の検体では検出しなかった。

**統計解析：**大腸の疾病発生率は有意（ $P < 0.05$ ）に減少した。

### 考 察

結腸の水腫様病変は、組織学的に結腸粘膜のカタル性腸炎及び漿膜の水腫変化であった。粘膜上皮の障害とスピロヘータの分布が一致し、更に分離同定、遺伝子検査結果よりBhが証明されたことから、原因としてBhの強い関与が示唆された。

Bhは豚赤痢の原因菌として知られるが、一連の症例では豚赤痢の典型的所見である壊死性出血性腸炎[1]を認めなかった。加えて明らかな臨床症状も示さず、増体効率の低下も認められていない。しかし、継続的な保菌豚の発生は、一部の豚舎でのBhの常在を示唆する。

Bhが関与しながらも典型的な赤痢様病変や臨床症状が発生していない理由として、まず豚赤痢は成長期に特に感受性が高いこと[2]が知られていることから、生体が抵抗性を示す時期にのみBhの暴露があったことが推測できる。一方、Bhの粘膜固有層への侵入が壊死性出血性腸炎を発現すること[3]が知られるが、症例では、陰窩と杯細胞内に限りBhが分布した。また、病変発現に一部の嫌気性菌の関与が指摘される[4]ことから、腸内細菌叢に条件を欠いた場合に典型的な症状を示さないことも考えられる。しかし、典型症状に至らずとも、Bh自体が溶血素とエンドトキシンを持つことから、上皮細胞の破壊や炎症の惹起[5]が可能であり、Bhに起因して今回の症例にみられたカタル性病変の発現が可能である。加えて、大腸バランチジウムの存在がBhに

よる病態を増悪し、壊死性病変の発現を指摘する報告[6]があるが、今回の検体ではバランチジウムの組織内侵入への生体反応は微弱であった。

農場における保菌豚の存在と、潜在的な豚舎汚染の可能性が示唆されたため、これらの検査結果を農場に還元し、詳細な調査と情報交換を実施した。農場では対策として、1. 豚舎の洗浄消毒、2. 抗生物質飼料添加剤の変更、3. 豚舎間移動の廃止を行った。これらの対策実施後、当該農場の豚に大腸疾病の発生が有意に減少し、Bhが検出されなくなったことが確認された。今回の事例により、症例の詳細な検討及び検査結果の還元と情報交換は、典型的な臨床症状を示していない感染症対策として有効であることが実証された。

## 引用文献

- [1] 全国食肉衛生検査所協議会編：食肉食鳥検査マクロ病理学カラーアトラス，136（1997）
- [2] 柏崎 守他：豚病学第4版，367-372（1999）
- [3] 見上彪也：獣医感染症カラーアトラス第1版，276-278（1999）
- [4] 板倉智敏他：獣医病理組織カラーアトラス，80（1990）
- [5] 日本獣医病理学会編，動物病理学各論第1版，217-218（1999）
- [6] 庄山剛史：過去5年間の病理組織学的検査から見た豚下痢症18事例，平成20年度三重県家畜保健衛生業績発表会資料（2008）

# 日本獣医師会学会学術誌投稿の手引き

(平成23年4月1日 日本獣医師会)

## 1 目的

本手引きは、日本獣医師会学会学術誌投稿規程（以下「投稿規程」）に則り投稿原稿の審査や編集が円滑に行われることを目的に、投稿規程に記載のない、一般的な事項、編集において必要な事項、著者が見落としやすい事項等を示したものである。

## 2 投稿資格及び条件関連

- (1) 筆頭著者は、日本獣医師会構成獣医師もしくは賛助会員（個人に限る）でなければならない。それ以外の者が筆頭著者の場合は、投稿料を徴収する（投稿時審査料10,000円、採用時掲載料50,000円を納入する）。ただし、編集委員会が認めた者については、この限りでない。
- (2) 発表者は、原則として8名以内とし、研究材料提供等については、謝辞で記載する。
- (3) 投稿原稿は、獣医学が扱う臨床、動物衛生、食品衛生、環境衛生、人と動物の関係、獣医学教育、動物用医薬品・機器等を内容とする獣医学術の振興・普及及び調査研究の推進に関する学術論文等を範囲とし、委員会において、掲載に相応しい学術分野を指定する。
- (4) 他の学会誌等に投稿中、もしくは発表した論文等は受け付けない。なお、口頭による発表はこの限りでない。

## 3 投稿要領関連

- (1) 投稿（初回）の際は、所要事項を記載し、著者全員の署名した投稿票を必ず添付する。
- (2) 投稿原稿は、4部を提出する。
- (3) 原稿は、A4判用紙を使用し、1頁（片面）を25字×24行の横書きで、明朝体を用いページを付す。
- (4) 原稿の枚数は、表題、和文要約、英文要約（SUMMARY）、本文、図（写真を含む）・表等すべてを含めた枚数で、投稿区分の規定枚数は、別表のとおりとする。
- (5) 特に図、表は、本文との兼合い（枚数、印刷時の大きさ）を十分考慮し、規定枚数内に納める。
- (6) 以上の事項を逸脱した原稿については、審査以前に再提出を依頼する。

## 【別表】掲載区分と投稿原稿の制限枚数及び刷り上り頁枚数

掲載区分	投稿原稿制限枚数 A4判ワープロ等 (25字×24行)	刷り上り頁数
総説	24枚	6頁以内
原著	20枚	5頁以内
短報	16枚	4頁以内
技術講座	16枚	4頁以内
資料	8枚	2頁以内

## 4 執筆要領関連（原著及び短報）

### (1) 用語：

- ア 動植物名は、原則として漢字を使用する。ただし、一般的に使用されているものに限り（例：人、犬、猫、牛、豚、鶏、馬、羊等）、それ以外のはカタカナで表示する。
- イ 薬品名は、原則として一般名もしくは局方名を使用し、カタカナで記載する。また、機器名は原則として一般に使用される名称を和文で表示する。
- ウ 本文中に一般名等で記載した薬品、機器等の商品（製品）名及び社名等は、一般名称の直後に括弧内で記載することができる（商品（製品）名、社名、都道府県名の順／例：ニチジュウワクチン、日獣製薬株、東京）。

### (2) 表紙（第1頁）：

- ア 最上段左側に部門名、希望投稿区分及び「新規」（新規投稿原稿の場合）あるいは「継続」（継続審査原稿の場合）の表示を赤字で明記する。
- イ 次いで、表題、著者名、所属機関名（大学は学部名、都道府県勤務は支所名（本所は部名）、までとし、「〇〇動物病院」⇒「〇〇県 開業」（県名は所属獣医師会または所在地名）、「株式会社」⇒「株」、「社団法人」⇒「社」、「財団法人」⇒「財」、「独立行政法人」⇒「独」とする。）及び所在地住所（郵便番号を含む。併せて、実際の動物病院名も記す。）を和文で記載する。
- ウ 表題は原則として副題、括弧、略号、「～について」、「～に関して」等は付けない。
- エ 最下段には連絡責任者の所属（大学は教室名、都道府県勤務は係名まで、動物病院等は、実際の名称

を記載), 住所, 電話番号 (ファックス番号), メールアドレスを記入し, 別刷を希望する場合には必要部数を赤字で明記する.

オ 表題が28字を超える場合には, 28字以内の柱(ランニングヘッド)を記入する.

### (3) 和文要約 (第2頁):

字数は360字以内とし, 要約の最下段には, 原著では5語以内, 短報では3語以内の日本語のキーワードを英文のKey wordsに対応する順で記載する.

### (4) 英文SUMMARY (第3頁):

ア 英文の表題, 著者名, 第1著者の所属機関名, 所在地住所(郵便番号を含む), SUMMARY及びKey wordsを記載する.

イ SUMMARYは, 250ワード以内とし, 行間を広く空けてタイプする.

ウ SUMMARYはなるべく和文要約に対応した記載にする.

エ Key wordsは, SUMMARYの最下段にABC順で記載する.

### (5) 本文 (第4頁以降):

ア 原則として, ①緒言(見出しは付けない), ②材料及び方法, ③成績, ④考察, ⑤引用文献の項目に区分して記述し, 数字を用いて項目分けしない.(ただし, 短報では必ずしも, この区分で記述する必要はない).

イ 実験動物等の取り扱いについては, 所属研究機関の動物実験ガイドライン(指針)に沿って動物に苦痛を与えないように実験を行った(または動物実験委員会の許可を得て実験を行った)旨を明記した上で, 動物の苦痛を和らげる方法について具体的に記述し, 当該動物を使用して実験を行う必要性と意義を説明し, 併せて動物の入手方法及び飼育状況を具体的に記載する.

ウ 図(写真)・表

(ア) 図(イラストレーションを含む)は, 黒インクでA4版の白紙または青色方眼紙を用いて, 表題を付け, 原図から直接製版できるものとする.

(イ) 表は, 縦罫線を入れない.

(ウ) 写真は, 白黒でコントラストの明瞭なもの(カラーの際はモノクロ印刷でも明瞭なもの)とし, 表題と簡単な説明を付け, 原寸印刷が可能ないように必要部分を横7.8cm, 縦6.0cmまたは横

15.5cm, 縦10.0cmに整形して台紙に貼付する(全体を糊付けするのではなく, コーナーのみを糊付けする). なお, デジタル画像を用いる際は, 明瞭な印刷ができるように光沢紙等の専用紙を用いる.

(エ) 写真には図と同様に一連の番号を付け, 初回投稿時には4部すべての原稿にオリジナルを添付する.

(オ) 図及び表は, 1点を1枚の台紙に貼付し(デジタル画像で光沢紙等を用いる際も同様), 写真とともに原稿の最後にまとめて添付する. さらに, それらの挿入位置を本文の右欄外に赤字で明記する.

エ 引用文献

(ア) 引用できる文献は, 学会誌, 専門的学術誌あるいは専門書とし, 学会抄録, 講演会テキスト, レフリー制度のない商業雑誌の他, 大学, 研究機関, 団体の年報・報告書・会報, 関係省庁の法令・事業報告, 辞書・辞典等, また, ホームページは原則として引用できない.

(イ) 本文中では, 著者名の直後等, 引用箇所に[1, 2-5]のように記載する.

(ウ) 文末に, 本文中最初に引用された順に配列した引用文献リストをおく. ①雑誌の場合は, 著者名(全員列記), 論文のタイトル名, 誌名, 巻, 頁(1箇所のみ), 年次(カッコ書き)とする. ②単行本の場合は, 著者(著者が複数の場合は, 引用した著者のみ), 記事のタイトル名, 書籍名, 訳者名(1名のみ記載し, その他は和文では「他」, 英文では「et al」とする), 編者名, 版, 頁, 発行者, 発行地, 年次(カッコ書き)とする. ただし, 著者名がない際は, 編者がいる際は編者名を, その他は, 学会, 研究会等の名称を記載する.

(エ) 和文誌名は原則として省略しない. ただし, 慣例的に使用されているものはこの限りではない(例: 日獣会誌, 日獣誌など).

(オ) 欧文誌名の省略は, Journal Title Abbreviationsによる. 指定のないものは省略しない.

#### 【雑誌の場合】

- [1] 青山太郎, 青山花子, 赤坂次郎: 子牛の開放性骨折の1例, 日獣会誌, 45, 115-120 (1992)
- [2] 青山太郎, 青山花子, 江戸三郎, 東京 愛: 犬のレプトスピラ症の抗原検出法, 日獣誌, 30, 135-138 (1992)

- 【単行本の場合】
- [3] Aoyama T, Aoyama H : The welfare of animals, Jpn J Vet Sci,54, 120h124 (1989)
- [4] Aoyama T, Aoyama H, Kanda J : A survey of heavy-metal contamination in imported seafood, J Vet Med Sci,54, 126h130 (1992)
- [5] Aoyama T, Aoyama H, Suzuki K, Tanaka S, Takahashi Y : Pathogenicity of the aino virus in Japan, Am J Vet Res,53, 155h160 (1992)
- [1] 神田一郎 : マイコプラズマ, 獣医微生物学, 江戸三郎編, 第1版, 100h103, 青山堂出版, 東京 (1992)
- [2] Smith J: マイコトキシン中毒, 選択毒性, 赤坂次郎訳, 250, 学会出版センター, 東京 (1989)
- [3] Roitt IM : Immunophoresis, Immunology, Fred OG, et al ed 2nd ed, 150h160, Grower Med Publ, London (1989)