



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 25 年度 日本獣医師会獣医学術学会年次大会 (千葉)
地区学会長賞受賞講演 (関東・東京地区選出演題)

[日本産業動物獣医学会]

産地区—1

遺伝子検査によるオーエスキー病ウイルスの野外株と ワクチン株の識別

高梨資子, 吉田真琴, 小淵裕子

群馬県家畜衛生研究所

はじめに

群馬県では群馬県オーエスキー病防疫対策要領に則り、生ワクチンの接種と定期的な抗体検査によるオーエスキー病 (AD) 清浄化を進めているが、ワクチン接種地域 (浸潤地域) と接種中止地域 (清浄地域) が混在している状況である。そのため、AD の発生が疑われた場合、迅速な診断とともに検出された豚ヘルペスウイルス 1 (ADV) が野外株かワクチン株かの識別が求められる。ADV の DNA には中和抗体の主体となる糖タンパク質 gB を発現する遺伝子領域 (gB) や、病原性に係わる糖タンパク質 gE を発現する遺伝子領域 (gE) が知られている。現在、国内で販売されているワクチンはすべて gE を欠損させた生ワクチンであり、抗体検査によりワクチン株と野外株の感染が識別可能となっている。2012 年 5 月に AD の OIE マニュアルが改定され、Nested PCR 法 (nPCR) とリアルタイム PCR 法 (rPCR) を用いた gB と gE の検出法が示された。今回、この 2 つの方法を用いた gB と gE の検出による ADV の野外株とワクチン株との識別法について病性鑑定時の迅速診断として有用かを検討した。

材料及び方法

ADV 野外標準株として YS-81 株、ワクチン株として現在市販されているベゴニア株及びバーサ・KS 株の 2 株を用い、nPCR (Yoon et al., J Vet Med Sci, 68, 143-148, 2006) 及び rPCR (Ma et al., J Vet Diagn Invest, 20, 440-447, 2008) による gB、gE の検出を実施した。DNA ポリメラーゼは、nPCR は GoTaq Hot Start Green Master Mix (Promega 社)、rPCR は GoTaq probe qPCR Master Mix (Promega 社) を使用した。

Ma らの方法では 40 サイクルで rPCR を実施しているが、今回は野外で発生した場合に確実に摘発できるよう想定して、50 サイクルで実施した。次に検出感度を検討するため、 2.7×10^6 PFU/ml の YS-81 株を 10 倍段階希釈後、DNA 抽出し、同様に遺伝子検査を実施した。あわせて 10 倍段階希釈したウイルス液を用いてウイルス分離を実施した。さらに、平成 14 年度以降に病性鑑定を実施した 8 症例の野外 ADV 分離臓器乳剤 12 検体を用い、同様に遺伝子検査を実施した。8 症例の内訳は、ワクチン接種していたものが 1 症例 1 検体、ワクチン接種をしていないものが 1 症例 1 検体、母豚にワクチン接種していた肥育豚が 4 症例 5 検体、母豚にワクチンを接種していたが流産した胎子が 2 症例 5 検体であった。

結 果

野外株とワクチン株を用いた試験では、すべての ADV 株から両方法により gB が検出された。gE は YS-81 株のみ両方法で検出され、両ワクチン株では検出されなかった。DNA 抽出からの検査所要時間は nPCR が約 7 時間、rPCR が約 2.5 時間であった。検出感度の検討では nPCR は gB、gE とともに 2.7×10^2 PFU/ml まで、rPCR は gB が 2.7×10^1 PFU/ml、gE は 2.7×10^2 PFU/ml まで検出できた。ウイルスは 2.7×10^1 PFU/ml まで分離された。ADV 分離臓器乳剤を用いた検査では、両方法で 12 検体すべてが野外株であることが確認された。

考 察

nPCR、rPCR とともに野外株とワクチン株の識別に有用と考えられた。検出感度は rPCR が nPCR より高く、検出時間も短かったため、rPCR の方がより迅速診断が可能と考えられた。ウイルス分離に比べて nPCR は約

10倍感度が低く、rPCRではほぼ同程度の感度であったが、野外発生事例12検体すべて野外株と識別できたこと、ウイルス分離よりも迅速にウイルスの識別ができることから遺伝子検査は有用と考えられた。nPCR、rPCRの両方法ともgBはgEより検出感度が良かったことから、ウイルス量が少ない場合はgB陽性gE陰性となり、野外株をワクチン株と判定する可能性がある。rPCRではウイルス量の推定ができるため、ウイルス量が少ない場合は、ウイルス分離実施後改めて、遺伝子検査による野外株とワクチン株の判定を実施する必要があると考えられた。

群馬県ではワクチン接種地域と接種中止地域が混在しており、ADの発生が疑われた場合、迅速に診断し、ADであった場合には早期にワクチン接種による防疫対策を実施する必要がある。今回の試験により、nPCR、rPCRともにADVの識別が可能であり、野外発生例すべての検体でも識別が可能であった。また、検査時間がウイルス分離検査よりもはるかに短時間で済むため、遺伝子検査によるADVの識別はADV清浄化のための迅速診断の一助となると考えられた。

産地区—2

豚の反芻獣ペスチウイルス感染事例におけるウイルス検査について

大谷芳子¹⁾、川西菜穂子²⁾

1) 茨城県県北家畜保健衛生所、2) 茨城県県西家畜保健衛生所

はじめに

平成24年2月、繁殖豚100頭、肥育豚1,000頭を飼養する県内の一貫経営の養豚場において、豚コレラ清浄性維持確認のため、豚コレラELISA (ELISA) を実施したところ、臨床症状や血液検査で異常が認められない豚群で48.3%と高い陽性率を示した。ウイルス検査等の結果、国内で初めて、豚からポーター病ウイルス (BDV) に近縁のペスチウイルス、いわゆる反芻獣ペスチウイルスが分離されたので、その概要を報告する。

材料及び方法

病理解剖は抗体陽転が確認された繁殖母豚1頭、発育遅延の肥育豚5頭について実施した。

RT-PCR検査は飼養豚363頭の血清、白血球、鼻腔スワブを材料として、豚コレラに関する特定家畜伝染病防疫指針の「豚コレラ診断マニュアル」(診断マニュアル) に記載されている324及び326のプライマーを用いて実施した。RT-PCR陽性検体については、制限酵素 *Bgl*I 及び *Pst*I で切断し、豚コレラウイルス (CSFV) と牛ウイルス性下痢ウイルス (BVDV) を識別する方法を実施した。また、PCR産物のダイレクトシーケンスを実施して塩基配列の解析を行い、NCBIサイトでBLASTによる相同性検索を実施した。さらにMEGA4を用いて分子系統樹を作製した。

分離培養はCPK細胞を用い、RT-PCR陽性検体及び病理解剖豚の主要臓器を材料として4日間2代継代して実施し、ウイルス抗原の確認は培養上清のRT-PCR、遺伝子解析及びFAにより行った。また、一部の検体については、MDBK-SY細胞、BFM細胞にも接種した。FAは市販の豚コレラ-FA、BVDV-FA (VMRD社)、抗CSFVモノクローナル抗体及び抗汎ペスチウイルスモノクローナル抗体 (独動物衛生所 (動衛研) から分与)

を用いた。

抗体検査は、ELISA及び指示ウイルスとしてCSFV GPE-株、BVDV Nose株 (1型) (BVDV1) 及びBVDV KZ91株 (2型) (BVDV2) を用いた交差中和試験 (中和試験) を実施した。

成 績

RT-PCR検査の結果、4頭の豚からペスチウイルスに特異的な遺伝子 (約280bp) が検出された。このPCR産物を制限酵素 *Bgl*I 及び *Pst*I で切断したところ、220bp付近に切断され、豚コレラとの識別が可能であった。また、RT-PCR産物の遺伝子解析の結果、BDVに近縁のペスチウイルスと判明した。

ウイルス分離検査では、4頭から反芻獣ペスチウイルスが分離された。分離ウイルスは使用した3種類全ての細胞で増殖したが、いずれもCPEは示さなかった。また、抗CSFVモノクローナル抗体を用いたFAは陰性だったが、その他のFAは全て陽性であった。

ELISA陽性の50検体で実施した中和試験ではCSFVでは22頭 (44%) で2~4倍、BVDV1では44頭 (88%) で2~64倍、BVDV2では全て2倍以下であった。

ま と め

今回のELISA陽性事例では、臨床症状や疫学状況などからは豚コレラを疑うものではなく、診断マニュアルに則した適切な採材と迅速な検査により、早い段階でCSFVの関与を否定し、豚の反芻獣ペスチウイルス感染事例として対策を取ることができた。

診断マニュアルに則した検査を実施する中で、PCR産物の制限酵素処理やFA、中和試験でCSFVと反芻獣ペスチウイルスの識別が可能であることが判明したものの、正確な診断をするためにはウイルスを分離又は検出してシーケンス解析することが必須である。

また、防疫指針ではELISA陽性が確認された場合、中和試験を行うとともに、農場への緊急立入を行い、臨床検査と抗原検査を行うこととされており、いずれかの検査で陽性だった場合は、遺伝子検査等の結果を踏まえ、総合的に診断される。県で実施する検査ではCSFVとその他のペスチウイルスを正確には識別できず、総合的な診断を待つ間、農場において慎重な対応が求められる。また、抗原が検出されなかった場合、中和試験によ

る抗体の識別が重要となる。しかし、CSFVに対する抗体との識別は可能であるが、反芻獣ペスチウイルスが国内に侵入していることが判明したことから、BVDVで検出された抗体がBVDVに対するものか、反芻獣ペスチウイルスに対するものかを判断することはできない。この状況を踏まえ、CSFVとそれ以外のペスチウイルスを識別する診断法の開発と現場への普及が急務であると考える。

〔参考〕平成25年度 日本産業動物獣医学会（関東・東京地区）発表演題一覧

- | | |
|---|--|
| <p>1 放牧育成牛における性選別精液の受胎率向上への検討
神岡哲生（群馬県浅間家畜育成牧場）</p> <p>2 乳牛の子宮内感染を伴う卵胞嚢腫に対する子宮洗浄の治療効果
小林永大（永大獣医療サービス・群馬県）</p> <p>3 内視鏡を用いた牛子宮内の異物摘出
大島藤太（栃木県畜産酪農研究センター），他</p> <p>4 触媒燃焼方式による牛舎発酵槽脱臭について
黒松 久（㈱IHI），他</p> <p>5 宮崎県で発生した口蹄疫における防疫経験者の口述記録に関する質的研究法を用いた分析
堀北哲也（千葉県農業共済組合連合会），他
中央家畜診療所</p> <p>6 農場 HACCP 認証を目指す銘柄豚生産農場における飼養衛生管理向上の取り組み
柴田淑子（神奈川県湘南家畜保健衛生所），他</p> <p>7 乳牛の白帯病における病変部の広がりについて
吉谷一紀（千葉県農業共済組合連合会 北部家畜診療所）</p> <p>8 馬の皮膚と上部気道のアミロイドーシス
萩原妙子（千葉県中央家畜保健衛生所），他</p> <p>9 黒毛和種子牛にみられた上衣芽腫の1症例
水野剛志（群馬県家畜衛生研究所），他</p> <p>10 密飼いによるストレスが豚の生産性および免疫機能に与える影響
藤田慶一郎（栃木県中央家畜保健衛生所），他</p> | <p>11 過去10年間に管内で確認された搾乳牛下痢症の疫学調査
福田昌治（埼玉県熊谷家畜保健衛生所）</p> <p>12 牛の呼吸器病5種混合ワクチン接種プログラムの検討
二宮歌子（山梨県東部家畜保健衛生所），他</p> <p>13 銅金属から溶出した銅イオン濃度と殺ウイルス効果の検討
長井 誠（東京農工大学），他</p> <p>14 豚の反芻獣ペスチウイルス感染事例におけるウイルス検査について
川西菜穂子（茨城県西家畜保健衛生所），他</p> <p>15 BLV 遺伝子量によるリスク評価と吸血昆虫に対するBLV 遺伝子検索を用いた牛白血病清浄化対策
田中秀和（千葉県農業共済組合連合会），他
西部家畜診療所</p> <p>16 ホルスタイン種搾乳牛に認められた急性好中性白血病
豊 玲子（栃木県南家畜保健衛生所），他</p> <p>17 遺伝子検査によるオーエスキー病ウイルスの野外株とワクチン株の識別
高梨資子（群馬県家畜衛生研究所），他</p> <p>18 一酪農場における牛サルモネラ症発生事例
南波ともみ（東京都家畜保健衛生所），他</p> <p>19 <i>Mycoplasma hyorhinis</i> の関与が疑われた豚のマイコプラズマ肺炎事例
田邊ひとみ（茨城県北家畜保健衛生所），他</p> |
|---|--|

胸腺腫の猫に見られた剥脱性皮膚炎の1例

佐藤 祐¹⁾，市川美佳¹⁾，長谷部奈美²⁾，二瓶和美^{1),3)}，小野憲一郎¹⁾，小川博之¹⁾

1) 日本動物高度医療センター，2) ロイヤルペットクリニック西馬込・東京都，
3) サンリツセルコバ検査センター

はじめに

胸腺腫に罹患した猫ではまれに全身性に皮膚の特徴的な症状を呈することがあり，胸腺腫関連剥脱性皮膚炎（紅皮症）と呼ばれる。本症は胸腺腫の腫瘍随伴症候群の一つであり，進行性で，掻痒を伴わない紅斑と角質の剥脱に特徴付けられる。今回，胸腔内腫瘍と全身性皮膚炎の精査及び治療を目的として来院した猫に上記所見を認めたので報告する。

症 例

症例は雑種猫，去勢雄，8歳齢，体重5.2kg，BCS 3.0で，約4週間前に背部の被毛が薄くなり，ついで皮膚の肥厚及び鱗屑が見られるようになった。皮膚病変は徐々に全身皮膚へと広がった。食欲の低下は認められなかったが，活動性に低下傾向がうかがわれた。

検 査 及 び 治 療

被毛検査及び皮膚皮膚掻爬試験では病原体の感染は認められなかった。血液検査では好中球数の減少及びASTの軽度上昇が認められた。内分泌検査ではT4及びfT4は下限境界もしくは軽度低値を示した。胸部X線検査において心臓右頭側に約45mmの軟部組織腫瘍陰影が観察された。腹部の画像検査において特異所見は認められなかった。胸腔内腫瘍は肋間からのエコープローブ操作により描出することができ，エコーガイド下で腫瘍の細胞診を行ったところ胸腺腫を疑う所見が得られた。皮膚生検の病理組織学的所見は表皮から真皮移行部に主座して炎症細胞の浸潤が認められ，リンパ球を主体とする炎症細胞は表皮内への浸潤も認められた。免疫染色を

行ったところ，上皮行性を示すリンパ球はCD3陽性のTリンパ球だった。

上記所見から胸腺腫及び胸腺腫関連剥脱性皮膚炎が疑われたため手術による前胸部腫瘍の摘出が検討されたが皮膚の状態が不良であったことから，まず皮膚症状の改善のためにプレドニゾロン（1mg/kg/day SID），感染対策にセフォペンナトリウム（4.5mg/kg）の投与を開始したが，皮膚症状の改善が認められず，開始4日後からはプレドニゾロンを2mg/kg/dayへと増量した。その後皮膚症状の改善が認められたため，ステロイドを漸減後に中止し，第21日病日にCT検査及び胸腺摘出手術を行った。手術は胸骨正中切開により術野を確保し，腫瘍を摘出した。腫瘍と周囲結合組織の境界は明瞭であり肉眼上全摘出された。病理組織学検査の結果，腫瘍は胸腺腫と診断され，また同時に摘出した胸骨リンパ節は反応性リンパ節と診断された。

術後の経過は順調で，術後13日目に抜糸した。第44病日（術後24日）では全身にわずかながら発毛が観察され始め，その後も順調に皮膚症状は改善した。術後1年が経過した時点では皮膚症状は完治しており，また胸部X線検査にて腫瘍の再発及び転移を疑う所見は認められていない。

考 察

剥脱性皮膚炎は悪性腫瘍が原因となることが多く，広範囲な皮膚に紅斑や鱗屑を生じる。猫では胸腺腫に伴う本症，膀胱がんや胆管がんに伴う脱毛症などが報告されている。難治性の剥脱性皮膚炎に遭遇した場合には基礎疾患として悪性腫瘍を考慮する必要があるものと思われる。

ビスコエクストラクション法による水晶体嚢内摘出術を 実施した水晶体脱臼のイヌの7例

小林義崇, 稲垣真央, 吉池正喜

DVMs どうぶつ医療センター横浜

はじめに

イヌの水晶体脱臼は、急性の眼圧上昇やぶどう膜炎を引き起こし、視覚喪失や重度の疼痛を生じる疾患である。水晶体脱臼の治療には、脱臼した水晶体を摘出する外科的治療法が一般的であり、水晶体の娩出には輪匙やクライオプローブが用いられている。しかしそれらの方法では娩出時に眼球の虚脱が生じやすく、しばしば眼内出血や網膜剥離を引き起こす。ビスコエクストラクション法（VE法）は、高分子の粘弾性物質を水晶体核の後方に注入して核を創口方向へ押し出すことにより娩出する方法であるが、水晶体嚢内摘出術に本法を応用することで、眼球の虚脱を生じることなく脱臼水晶体を摘出することが可能であったので報告する。

目的

イヌの水晶体脱臼の治療における、VE法を用いた水晶体嚢内摘出術の有用性を検討する。

方法

DVMs どうぶつ医療センター横浜 二次診療センター眼科において、2012年5月～2013年4月に水晶体摘出術を実施した水晶体脱臼のイヌ7頭7眼（パピヨン2眼、柴、マルチーズ、ミニチュア・シュナウザー、ミニチュア・ダックスフンド、ミニチュア・ピンシャーそれぞれ1眼）を対象とした。水晶体摘出術では、角膜輪部を約160°切開し、1%ヒアルロン酸Naを水晶体と硝子体の間、かつ水晶体をはさんで創口と反対側に注入するVE

法により水晶体を娩出し、その後前部硝子体切除及び角膜縫合を実施した。術中及び術後合併症、視覚の有無について回顧的に評価した。

結果

全例において眼内出血などの術中合併症を伴うことなく容易に脱臼水晶体の娩出が可能であった。観察期間中、術前に視覚があったもしくは回復の可能性があった5眼のうち、4眼で視覚が維持（1眼は網膜剥離で失明）された。7眼中2眼で一時的な眼圧上昇（30mmHg以上）が認められたが、最終来院時の眼圧は全眼で正常であり、明らかな疼痛を伴うことなく眼球形態が維持されていた。

考察

VE法は、硝子体を後方に下げ、前房圧を静的に保ち、眼球に外から力を与えることなく水晶体を前房外へ押し出すことができるという特性をもっており、これまでの水晶体を牽引して摘出する方法では不可能であった。眼球形態を維持しながら脱臼水晶体を娩出することが可能であった。眼内組織に低侵襲な手術であることが、術中・術後合併症の発症が低く、高い視覚維持率を得られたことに寄与していると考えられる。ただしVE法では多量の粘弾性物質が必要なためコストが高くなり、また粘弾性物質の残存は術後高眼圧や網膜剥離を生じる可能性がある。術中に粘弾性物質の除去を十分に実施することが重要と考えられた。

〔参考〕平成25年度 日本小動物獣医学会（関東・東京地区）発表演題一覧

〔A 会場〕

- イヌの皮膚過伸展との疾患に関する考察
小山田尚（エル動物病院・群馬県），他
- イヌの関節可動域亢進症治療における循環TGFの測定意義
朝岡秀行（エル動物病院・群馬県），他
- イヌの関節可動域亢進症の診断と新規薬物治療の奏効性
桑原正人（日本大学），他
- 非皮膚科的身体因による痒み行動を呈した犬の3例
馬場智成（どうぶつの総合病院），他
- 胸腺腫の猫に見られた剥脱性皮膚炎の1例
佐藤 祐（日本動物高度医療センター・川崎市），他
- ビデオオトスコープを用いた犬の外耳道炎の13例

- 柴田久美子（DVMs どうぶつ医療センター横浜）
- 猫の不整脈源性右室心筋症の一例
小野原望（すとう動物病院・千葉県），他
- 外科的整復を実施した心室中隔欠損症を伴う右室二腔症の犬の1例
湯沢 綾（麻布大学附属動物病院），他
- 犬の食道内異物閉塞51例における閉塞解除後の内視鏡下食道粘膜損傷度分類と閉塞時間・臨床症状・合併症との相関についての回顧的研究
宮本修治（DVMs どうぶつ医療センター横浜），他
- 自律神経失調症（Dysautonomia）と診断した猫の1例
早川 武（日本大学動物病院），他
- 経皮経肝胆囊吸引法により早期診断が可能であった

- 胆嚢炎の犬の1例
山崎寛文 (日本動物高度医療センター・川崎市), 他
- 12 犬の難治性口内炎に対して抜歯を余儀なくされた3症例について
片野浩二 (かたの動物病院・群馬県), 他
- 13 飼鳥における鳥クラミジア症の疫学調査
眞田靖幸 (小鳥の病院 BIRD HOUSE・千葉県), 他
- 14 千葉県における犬のレプトスピラ症
村田佳輝 (千葉県獣医師会感染症委員会), 他
- 15 保冷剤の誤食によりエチレングリコール中毒を起こした犬の1例
灰井康佑 (とがさき動物病院・埼玉県), 他
- 16 群馬夜間救急動物病院の1年間の傾向と必要性
金谷興一 (群馬夜間救急動物病院), 他
- 17 認知症状を有する犬および猫へのフェルガード® 100M 投与に関して
小菅弘章 (小菅獣医科病院・横浜市), 他
- 18 難治性疾患に対するパンフェノンS (ピクノジェノール含有) の効果
狩野友秀 (中居動物病院・群馬県), 他

[B 会場]

- 1 ビスコエクストラクション法による水晶体嚢内摘出術を実施した水晶体脱臼のイヌの7例
小林義崇 (DVMs どうぶつ医療センター横浜 二次診療センター眼科), 他
- 2 イヌの裂孔原性網膜剥離整復術の術後成績
齋藤陽彦 (トライアングル動物眼科診療室・東京都), 他
- 3 ミニチュア・ダックスフンドとウェルシュ・コーギー・ペンブロークの椎間板ヘルニアについて
小林 聡 (ONE for Animals・横浜市), 他
- 4 猫の椎間板ヘルニアの1例
稲村真治 (稲村動物病院・群馬県), 他
- 5 トイ・プードルの前腕骨折に関する回顧的検討
森 淳和 (ONE for Animals・横浜市), 他
- 6 先天性肩関節脱臼に対し各種観血的整復を行った一

例

- 上野弘道 (麻布十番犬猫クリニック 日本動物医療センター・東京都), 他
- 7 脛骨骨折にロッキングコンプレッションプレート (LCP) を用い最小侵襲プレート骨接合術 (MIPO) を実施した8症例の回顧的検討
種子島貢司 (日本大学獣医学科), 他
- 8 尿管結石による尿管破裂に対して外科手術を実施して罹患腎を温存できた犬の1例
長谷往明 (はせ動物病院・千葉県), 他
- 9 両側尿管閉塞に対し腎瘻造設術を実施した猫の1症例
青木 大 (あおき動物病院・神奈川県)
- 10 遠位尿道に発生した移行上皮癌に対し尿道陰吻合を行った犬の1例
望月俊輔 (DVMs どうぶつ医療センター横浜), 他
- 11 全膀胱尿道切除・尿管陰吻合術を行なった移行上皮癌の犬の1例
寺内幸夫 (寺内動物病院・栃木県), 他
- 12 犬の副腎腫瘍の鑑別診断における Triple-phase CT 法の有用性
吉田織江 (日本大学獣医学科), 他
- 13 後大静脈ごと一括切除した巨大副腎褐色細胞腫の犬の1例
青木ひろみ (日本大学動物病院), 他
- 14 犬の体表腫瘤に対するドライアイスを用いた新しい凍結療法の検討
中山 功 (中山動物病院・神奈川県), 他
- 15 イマチニブ耐性が発現した犬の肥満細胞腫の1例
山下傑夫 (日本動物高度医療センター・川崎市), 他
- 16 心臓に浸潤したB細胞型リンパ腫の犬の1例
坂入 旭 (麻布大学附属動物病院), 他
- 17 胆石による肝外胆管閉塞を呈した猫の8例
山内晶子 (日本動物高度医療センター・川崎市), 他
- 18 神経症状を契機として診断された真珠腫を合併した先天性外耳道狭窄の犬の1例
北宮絵里 (あさか台動物病院・埼玉県), 他
- 19 ガス麻酔時における呼吸の簡易確認法について
新井茂雄 (新井ペットクリニック・茨城県)

[日本獣医公衆衛生学会]

公地区—4

カンピロバクター汚染対策に凍結処理は有効か

水谷昌代, 高山真津香, 遠藤健太郎, 藤田雅弘, 松田錦弥, 小畑 敏

群馬県食肉衛生検査所

はじめに

全国の食中毒事件数は, カンピロバクターによるものが上位を占めている. その発生原因は, カンピロバクターに汚染された鶏肉の摂食, 調理器具や非加熱食品へ

の交差汚染によることが指摘されており, 欧州では衛生対策として, 汚染鶏肉の凍結処理を行うことが義務づけられている. しかしながら一方で, 低温等のストレスにより, カンピロバクターが生きているにも関わらず培養できない状態 (VBNC) になることが報告されている.

このことから、カンピロバクター汚染対策に凍結処理が有効なのか、遺伝子的手法等で定量的に評価する必要がある。

そこで今回、Ethidium Monoazide (EMA) 処理により死菌由来核酸を排除し、生菌のみを SYBR Green を用いたリアルタイム PCR (qPCR) で検出する方法 (EMA-qPCR) を検討した。また、凍結処理後のカンピロバクターのリスクを評価する目的で、リアルタイム RT-PCR (qRT-PCR) により、カンピロバクターの低温ストレスに対する応答について、病原因子の発現レベルを比較した。

方 法

供試菌株として *Campylobacter jejuni* (ATCC43430) を用いて試験菌液を調整した。凍結処理の効果を検討するため、鶏肉 1g あたり 8.0×10^7 CFU/ml の試験菌液を 1ml 接種し、10 倍量の Preston ブイヨンを加え、4℃、-20℃ 及び -80℃ で静置した。その後、経時的にサンプル 1ml を採取して、羊血液寒天培地を用いた寒天平板希釈法により生菌数を測定した。同量のサンプルを遠心濃縮し、EMA-qPCR を実施した。死菌由来の DNA を排除するため、Viable Bacteria Selection Kit for PCR (TaKaRa) を用いて EMA 処理を行った。サンプル液からの DNA の抽出には QIA DNA mini Kit (QIAGEN) を用いた。qPCR は Wilson らの *gyrA* を検出するプライマーを使用し、反応液は Fast SYBR Green Master Mix (ABI) を使用した。増幅条件は Fukushima らの方法に従った。

病原遺伝子の RNA 発現量の測定は、Bui らの方法に従った。*ciaB*、*dnaJ* 及び *htrA* 遺伝子領域の RNA を検出するプライマーを用いて、ワンステップリアルタイム RT-PCR を実施した。内在性コントロール遺伝子として 16S rRNA を用いた。検体からの RNA 抽出は、EMA 処理を行った後、RNeasy Mini Kit (QIAGEN) を使用し、反応液は One Step SYBR Prime Script Plus RT-

PCR Kit (TaKaRa) を用いた。得られた結果から Comparative C_t 法により、各温度処理における相対発現量の比較を行った。

結 果

試験菌液の生菌数と EMA-qPCR の C_t 値に高い相関がみられ、検出限界は 10^3 CFU/ml であった。加熱死菌液では、EMA-qPCR による増幅信号は得られず、死菌の DNA が完全に排除されたことがわかった。試験菌液をスパイクした鶏肉を 4℃ で保持した場合の生菌数は、48 時間後まで変化が無かったが、-20℃ 及び -80℃ で保持した場合には 1/100 に減少した。EMA-qPCR を行ったところ、4℃、-20℃ 及び -80℃ のすべての温度条件における C_t 値はほぼ同値であり、EMA 処理の有無による ΔC_t の値に違いはみられなかった。また、EMA-qRT-PCR により各病原遺伝子の発現量を比較したところ、冷蔵条件及び冷凍条件によって、病原遺伝子の発現は抑制されなかった。

考 察

試験菌を接種した鶏肉を凍結処理することにより、平板培養で得られた生菌数は減少した。しかしながら、凍結処理による ΔC_t 値に違いがみられなかったことから、接種したカンピロバクターは凍結処理により VBNC 状態となったことが示唆された。

カンピロバクターの病原遺伝子については、4℃ よりも菌数が減少した -20℃ 及び -80℃ の凍結処理においても、*ciaB*、*dnaJ* 及び *htrA* の発現はいずれも減少していないことがわかった。

凍結による生菌の減少効果は、二次汚染のリスク低減に一定の効果が期待できるが、VBNC 状態に陥ったカンピロバクターにおいても病原遺伝子は発現していると考えられ、鶏肉に付着した場合、人の健康を害する可能性は否定できない。凍結鶏肉についても、取扱いには留意し鶏肉の生食は避けるべきである。

公地区—11

新しい病原因子を標的とした結核ワクチンの開発 (16S rRNA decoding 領域の変異は結核菌を弱毒化する)

船渡川圭次¹⁾、渡部真弥²⁾、祝 弘樹²⁾、加藤雅子²⁾、切替富美子²⁾、切替照雄²⁾、他

1) 栃木県保健環境センター、2) 国立国際医療研究センター

目 的

結核は世界的にみると依然として最も重要な感染症の一つである。世界人口の 1/3 にあたる 20 億人が結核菌に感染しており、年間約 880 万人が結核を発症し、約 150 万人が死亡している。現在使用されているワクチンは、医師カルメットと獣医師ゲランがウシ型結核菌から作成した BCG のみで、乳児の 85% がこれを接種してい

る。BCG の結核予防効果は、1977 年イギリスの大規模調査では 77%、1980 年インド・チンゲルプットの大規模調査では 0% と一定の評価が得られていない。このような背景から BCG に代わる新世代ワクチンの開発が急務となっている。

スメグマ菌に於いて、16S リボゾーム RNA (16S rRNA) の突然変異は、致命的障害をもたらすことが報告されている。また、臨床分離株からカナマイシン

ring1に接合する部位(16S rRNA)の変異は報告されていない。これは当該変異株が生体内淘汰圧に易感受性となった可能性を示唆している。そこで、臨床分離株で報告されていないrRNA decoding領域が変異している変異株であるErdman由来 NCGM2242株を分離し、当該変異株の弱毒化とワクチン効果について評価したので報告する。

材料及び方法

1. 供試菌株：*M. tuberculosis* ATCC35801 (Erdman), Erdman由来変異株 (NCGM2242)
2. 供試マウス：BALB/cマウス6～8週齢，雄
3. ErdmanとNCGM2242の全ゲノム比較解析を実施し，NCGM2242の変異部位を特定した。
4. NCGM2242, Erdmanに発現する蛋白質の種類と量を網羅解析し，発現が低下又は向上した蛋白質を特定した。
5. NCGM2242とErdmanの細胞性免疫誘導能を比較するため，感染細胞のサイトカイン網羅解析を実施した。
6. NCGM2242, Erdmanのマウス致死活性を評価した。また，マウスへNCGM2242をVaccinationし，4週後Erdmanを抗原接種して，マウスの生存性を評価した。

結果及び考察

1. NCGM2242の変異部位は，結核菌ゲノム内に一つしか存在しない16S rRNAをコードするrrs遺伝子1399番目のチミンがアデニンに置換したU1406A点変異であった。
2. リボゾームは蛋白質合成の場であることから，U1406A点変異が蛋白質合成に及ぼす影響について，蛋白質網羅解析を実施した。NCGM2242溶解物中の蛋白質は，Erdman溶解物中の蛋白質に比べ，71種(3.9%)の蛋白質が2倍以上に増加し，361種(19.9%)の蛋白質が1/2以下に減少した。特に蛋白質合成に重要な役割を果たすシグマ因子，転写因子の場合，NCGM2242はErdmanに比べ，23種の蛋白質が発現低下，3種の蛋白質が過剰発現した。
3. 過剰発現した蛋白質に3種のリボゾーム結合蛋白質(RbfA, KsgA, IF-3)があった。RbfAは，5'末端16S rRNAのヘリックス44, 45に結合してプロセシ

ングに関与し，IF-3は，70Sリボゾームの解離とtRNA選択を向上させ翻訳開始に関与することから，U1406A点変異がリボゾーム成熟と翻訳に及ぼす影響について検証した。NCGM2242はErdmanに比べ，5'末端16S rRNAと3'末端16S rRNAの発現量が高く，NCGM2242に於けるRNase消化過程の障害が示唆された。また，NCGM2242はErdmanに比べ，30S, 50S rRNAの発現量が高く，70S rRNAの発現量が低かったことから，IF-3の30Sサブユニットへの優先的結合と，70Sリボゾームの解離亢進が示唆された。これらが要因となり，未熟なりボゾームの過剰発現と翻訳攪乱が誘導されたと思慮された。

4. 発現低下した蛋白質にミコール酸合成酵素があった。当該蛋白質の低減により細胞壁成分であるミコール酸組成が変化し，NCGM2242は一酸化窒素暴露及び酸性環境(pH4.6)に対して顕著な抵抗性低下を呈し，細胞内寄生が障害された。
 5. Erdman (2.0×10^6 CFU/mouse)をBALBマウスに接種(静脈接種)すると，108日後に全てのマウスが死亡したが，NCGM2241 (2.0×10^7 CFU/mouse)の場合，640日後でも全てのマウスが生残した。この致死活性をLD50で評価すると，Erdmanは $< 2.0 \times 10^3$ CFU/mouseであったのに対し，NCGM2242は $> 2.0 \times 10^7$ CFU/mouseと著しい差が明らかとなった。
 6. 細胞性免疫誘導能を検証するため，NCGM2242, Erdmanで初回感染させたマウスから脾臓細胞を摘出しこれを単一層に処理後，Erdmanで再刺激して，22種の炎症性サイトカインの網羅解析を実施した。Erdman由来，NCGM2242由来脾臓細胞のサイトカイン分泌量に有意差は無く，NCGM2242の細胞性免疫誘導能は，Erdmanと比べ同等であることが示された。
 7. NCGM2242生菌，BCG生菌でBALBマウスをVaccination(静脈接種)し，4週後Erdmanを抗原接種(静脈接種)した場合，Non-Vaccination群は139日後，BCG-Vaccination群は258日後までに全てのマウスが死亡した。一方，NCGM2242-Vaccination群は，300日を超えても38%のマウスが生残し，高度なワクチン効果を呈した。
- 以上のことから，NCGM2242は，野生株の細胞性免疫誘導能はそのままに，Virulenceを激減させており，弱毒生ワクチン株として機能することが示された。

〔参考〕平成25年度 日本獣医公衆衛生学会(関東・東京地区) 発表演題一覧

- | | |
|--|--|
| 1 群馬県内の豚におけるインフルエンザウイルス保有状況について
塩野雅孝(群馬県衛生環境研究所)，他 | 迅速診断法の検討
佐藤真紀子(栃木県宇都宮市食肉衛生検査所)，他 |
| 2 茨城県において検出されたA群ロタウイルスの遺伝子型別結果
本谷 匠(茨城県衛生研究所)，他 | 5 ヒト及び鶏関係検体から分離された <i>Salmonella</i> Infantisの次世代シーケンサーを使用した系統解析
安藤直史(千葉県衛生研究所)，他 |
| 3 スタンプ標本を用いた免疫組織化学染色の畜検査への応用について
古野 学(千葉県東総食肉衛生検査所)，他 | 6 サルモネラ検査における培地及び免疫磁気ビーズ(IMS)法による効率の検査法の検討
土井りえ(埼玉県食肉衛生検査センター)，他 |
| 4 血液塗抹およびスタンプ免疫組織化学的染色による | 7 特定農場の集団発生例から分離された <i>Salmonella</i> |

- Choleraesuis
- 藤戸幸一（群馬県食肉衛生検査所），他
- 8 豚のサルモネラ症の一例
- 岩田智明（神奈川県食肉衛生検査所），他
- 9 新しい病原因子を標的とした結核ワクチンの開発
- 船渡川圭次（栃木県保健環境センター），他
- 10 管内と畜場搬入豚におけるメチシリン耐性黄色ブドウ球菌の保菌実態調査
- 佐藤友美（茨城県北食肉衛生検査所），他
- 11 鶏から分離された基質特異性拡張型 β -ラクタマーゼ産生大腸菌
- 須藤真登（高崎市食肉衛生検査所），他
- 12 牛の解体処理工程における頬肉の衛生対策について
- 渡邊久美子（高崎市食肉衛生検査所），他
- 13 馬の保菌および枝肉汚染調査について
- 池永由梨子（山梨県食肉衛生検査所），他
- 14 食鳥処理場内でのカンピロバクター汚染の実態
- 遠藤健太郎（群馬県食肉衛生検査所），他
- 15 カンピロバクター汚染対策に凍結処理は有効か
- 水谷昌代（群馬県食肉衛生検査所），他
- 16 *Sarcocystis fayeri* 病原性タンパク質の遺伝子及びアミノ酸配列，及び組換えタンパク質の作製とその性状
- 齊藤守弘（埼玉県食肉衛生検査センター），他
- 17 夏休み親子見学会について
- 佐藤要介（茨城県動物指導センター），他
- 18 殺鼠剤中毒が疑われた豚の LC/MS/MS を用いた検出事例
- 會田雄治（茨城県西食肉衛生検査所），他
- 19 牛肉の放射性物質汚染検査における環境ラドンの影響と対策
- 村田純哉（群馬県食肉衛生検査所），他
-