

Leptospira interrogans serovar Hebdomadis による

豚異常産事例

中尾聡子^{1)†} 荒木美穂¹⁾ 池宮城一文²⁾ 津波 修³⁾
高木和香子⁴⁾ 貝賀眞俊³⁾

- 1) 沖縄県家畜衛生試験場 (〒900-0024 那覇市古波蔵1-24-29)
2) 沖縄県八重山家畜保健衛生所 (〒907-0243 石垣市宮良1-2)
3) 沖縄県北部家畜保健衛生所 (〒905-0012 名護市名護4606-4)
4) 沖縄県畜産課 (〒900-8570 那覇市泉崎1-2-2)

(2014年4月14日受付・2014年9月8日受理)

要 約

2013年3月に母豚572頭を飼養する一貫経営養豚場で5頭の流産があり、通常よりも増加傾向にあったため病性鑑定を実施した。剖検所見では胎子の1頭(No. 3)は体表全体に点状出血がみられ、皮下と肺に出血、肝臓に不定形白色斑がみられた。一般細菌検査は有意菌分離陰性だった。レプトスピラ検査の結果 *flaB* 遺伝子が胎子の主要臓器で検出された。血清学的検査の結果、母豚血清は血清型 Hebdomadis に対して5,120倍と高い抗体価を示し、胎子体液は80倍の抗体を示した。病理組織学的検査の結果、胎子No. 3で肝臓の巣状壊死、間質性腎炎、化膿性真皮炎がみられ、Warthin-Starry染色の結果主要臓器、胸腺、消化管、皮膚の血管周囲にレプトスピラ様菌が多数確認され、抗 *L. Hebdomadis* 兔免疫血清を用いた免疫組織化学的染色でも同部位で陽性所見が得られた。以上の結果から本症例は *L. Hebdomadis* によるレプトスピラ症と診断された。

——キーワード：間質性腎炎、レプトスピラ症、*Leptospira interrogans* serovar Hebdomadis, 異常産, 豚。

-----日獣会誌 67, 908~913 (2014)

レプトスピラ症は病原性レプトスピラの感染によって引き起こされる人獣共通感染症であり、血清学的に30種あまりの血清群と250種以上の血清型に分類されている [1]。日本においては牛、豚、犬などを対象として、Pomona, Canicola, Hardjo, Icterohaemorrhagiae, Grippotyphosa, Autumnalis, Australis の7血清型による疾病が監視伝染病(届出伝染病)に指定されている [2]。レプトスピラは人、牛、馬、豚、犬、げっ歯類など多くの生物に感染し、豚では妊娠豚の早死産や虚弱子豚が起こるとされている [3]。国内では1978年に愛知県で血清型 Canicola による早死産と、1982年には血清型 Hebdomadis の感染例が報告されており [4]、1996~1997年にかけての群馬県と千葉県の流れ産例では血清型 Copenhageni, Icterohaemorrhagiae に対して高い抗体価が確認された [5]。また2002年には岡山県において血清型 Australis による異常産が報告されている

[4]。沖縄県では1993~1995年にかけて貝賀 [6] がレプトスピラの関与した異常産について調査をしており、レプトスピラの分離もされている。近年レプトスピラ症による豚異常産の発生報告がみられない中、*Leptospira interrogans* serovar Hebdomadis (*L. Hebdomadis*) によるレプトスピラ症に遭遇し、流産胎子や母豚について詳細な検索を行ったため、その概要を報告する。

材料及び方法

発生概要：沖縄県本島北部で母豚572頭を飼育する一貫経営養豚場において、2012年8月8日に2頭の異常産が認められたため、胎子2頭(No. 1, 2)について病性鑑定を実施した。胎子の母豚は3産目で、胎齢106日齢だった。また同一農場で2013年3月初旬~中旬にかけて5頭の異常産が認められた。このうち2013年3月19日に異常産を起こした胎子2頭(No. 3, 4)につ

† 連絡責任者：中尾聡子(沖縄県家畜衛生試験場)

〒900-0024 那覇市古波蔵1-24-29

☎ 098-832-1515 FAX 098-853-7376

E-mail: oohashsa@pref.okinawa.lg.jp

いて病性鑑定を実施した。胎子の母豚は2産目で、胎齢77日齢だった。いずれの母豚も豚死産3種混合生ワクチン(株微生物化学研究所, 京都), 豚サーコウイルス(2型)感染症不活化ワクチン(メリアル・ジャパン(株), 東京)を接種していた。また2012年の発生以降, 豚パルボウイルス感染症, 豚丹毒, 豚レプトスピラ病3種混合不活化ワクチン(ファイザー(株), 東京)を接種していた。

病理組織学的検査: 剖検後, 胎子No. 3, 4の中樞神経及び各臓器を10%中性緩衝ホルマリン液で固定した後, 常法に従いパラフィン切片を作製し, ヘマトキシリン・エオジン(HE)染色を行い鏡検した。胎子No. 3の心臓, 肺, 肝臓, 脾臓, 腎臓, 胸腺, 消化管, 皮膚については, Warthin-Starry染色と抗*L. Hebdomadis* 免疫血清を用いた免疫組織化学的染色を行った。胎子No. 1, 2については病理材料の採材は行われなかった。

ウイルス学的検査: 胎子No. 1, 2の肺プールの乳剤及び胎子No. 3, 4の肺乳剤を材料とし, 核酸自動抽出機(Magratration System 12GC Plus, プレジョン・システム・サイエンス(株), 千葉)を用いてRNA抽出した後, Porcine reproduct and respiratory syndrome(PRRS)ウイルスRT-PCRを実施した。

細菌学的検査: 胎子No. 1, 2, 3, 4の主要臓器を5%羊血液寒天培地(日本ベクトン・ディッキンソン(株), 東京)と変法GAM寒天培地(日水製薬(株), 東京)に接種し, 37℃で48時間, それぞれ好気及び嫌気条件下で培養した。レプトスピラ分離培養は胎子No. 1, 2については腎臓の乳剤を血清加コルトフ培地(デンカ生研(株), 東京)に接種し, 30℃で1カ月間培養した。培養を開始した翌日とそれ以降は3~7日間隔で観察し, 雑菌が多い場合は培養液を0.2µlのフィルターでろ過して継代した。胎子No. 3, 4については採材後時間が経過していたため行わなかった。レプトスピラ*flaB*遺伝子Nested PCRには胎子No. 1, 2の肺及び腎臓と胎子No. 3, 4の主要臓器の乳剤を用いて, 核酸自動抽出機によりDNAを抽出した。プライマーは(L-*flaB*-F1: 5'-TCTCACAGTTCTCTAAAGTTCAAC-3'), (L-*flaB*-R1: 5'-CTGAATTCGGTTTCATATTTGCC-3')[7]及び(L-*flaB*-IN-F1: 5'-TTGCTGTGGACAAGACGATG-3'), (L-*flaB*-IN-R1: 5'-CCCATATCCGCTCTCTGC-3')を用いてNested PCRを実施した。

血清学的検査: トキソプラズマ抗体検査は2013年3月に異常産を起こした胎子No. 3, 4の母豚と同居母豚についてトキソプラズマ抗体キット(トキソテスト-MT, 栄研化学(株), 東京)を用い, ラテックス凝集反応によって実施した。レプトスピラの抗体検査は2012年8月に異常産を起こした胎子No. 1, 2の母豚と同居母豚, 2013年3月に異常産を起こした胎子No. 3, 4の母豚と同居母豚のペア血清及び胎子No. 3, 4の体液につ

いて顕微鏡凝集試験(Microscopic Agglutination Test: 以下MAT)を常法に基づき実施した[7]。抗原として*L. interrogans* serovar Australis, Autumnalis, Canicola, Hebdomadis, Bataviae, Pyogenes, Pomona, Icterohaemorrhagiae, Rachmati, Castellonis, Bratislava及び*L. borgpetersenii* serovar Javanicaと*L. kirschneri* serovar Grippotyphosaの計13血清型の菌株を使用した。それぞれの菌株についてEMJH培地(BD Difco, U.S.A.)を用いて30℃で6~9日培養後, 菌数を1~2×10⁸cell/mlに調整したものを抗原として使用した。96穴のマイクロプレートで被検血清を2倍段階希釈後, それぞれ等量の培養菌液を加えた。ミキサーでよく混和後30℃で2時間反応させ, 暗視野顕微鏡で鏡検した。対照培養液と比較し50%以上の凝集を示した場合を陽性とした。凝集を示した最終希釈倍数を抗体価とし, 凝集価160倍以上を示したものをレプトスピラ抗体陽性とした。

疫学調査: 農場内の保菌動物としてマングースが疑われたため, 捕獲したマングース2匹の腎臓と肝臓の乳剤を用いてレプトスピラ*flaB*遺伝子Nested PCRを実施し, かつEMJH培地で1カ月間培養した。

レプトスピラ浸潤状況調査: 2012年4月~2014年5月にかけて異常産の確認された当該農場を含む南部10農場, 北部5農場の15農場について, 上記の13血清型を用いてMATを実施した[8]。材料には流産を起こした母豚血清の85検体(南部57検体, 北部28検体)と流産を起こしていない母豚血清の62検体(南部39検体, 北部23検体)を用いて行った。

成 績

病理解剖検査: 胎子No. 1は心臓にうっ血がみられ, 胎子No. 2は脳実質の融解が認められた。胎子No. 3は体表全体に点状出血(図1)と皮下に斑状出血がみられ, 肺の出血と肝臓の不定形白斑が認められた。胎子No. 4



図1 表皮の点状出血(胎子No. 3)

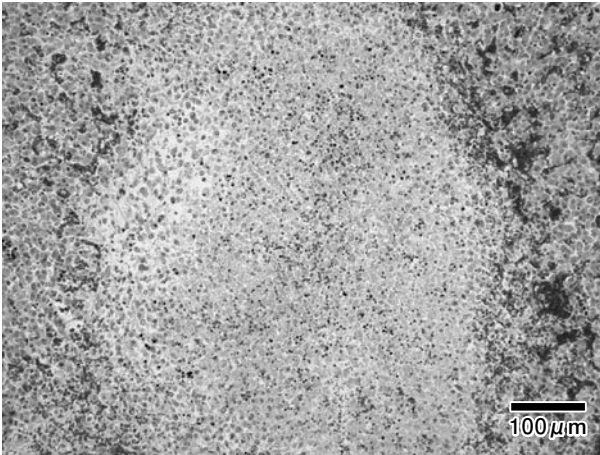


図2 肝臓の巣状壊死 (HE 染色 ×40)

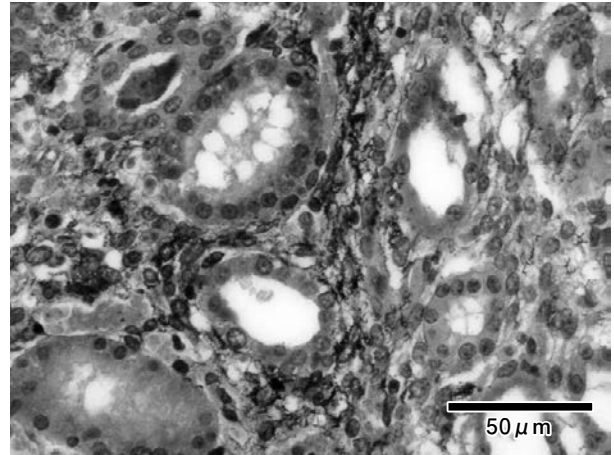


図4 腎臓の Warthin-Starry 染色像 (×40)

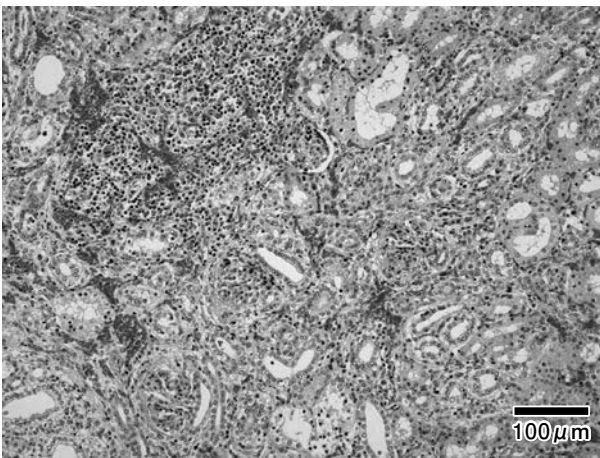


図3 間質への単核細胞浸潤が見られる間質性腎炎 (HE 染色 ×40)

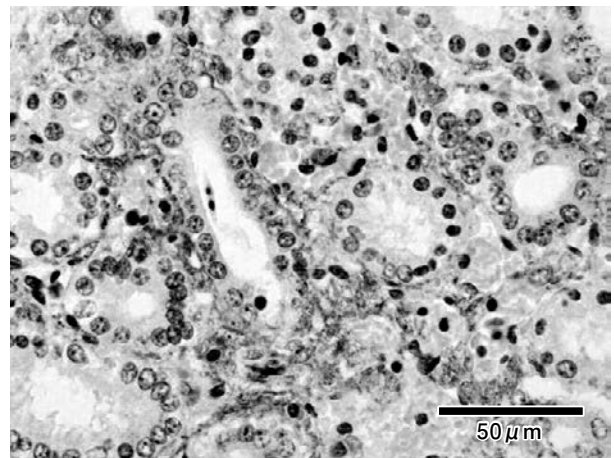


図5 抗 *L. Hebdomadis* 兔免疫血清を用いた免疫組織化学的染色像 (×40)

は胸部全体に出血斑と腎臓の暗赤色化がみられた。

病理組織学的検査：胎子 No. 3, 4 に共通して全身性の出血と血管周囲への細胞浸潤が認められたほか、胎子 No. 3 は肝臓の巣状壊死 (図2)、間質性腎炎 (図3)、化膿性真皮炎が認められた。胎子 No. 3 の Warthin-Starry 染色では肝臓、腎臓、脾臓、心臓、肺、胸腺、消化管、皮膚病変部の血管周囲等でレプトスピラ様菌体が確認され (図4)、抗 *L. Hebdomadis* 兔免疫血清を用いた免疫組織化学的染色でも同部位で陽性だった (図5)。

ウイルス学的検査：胎子 No. 1, 2, 3, 4 の肺を用いた PRRS ウイルス RT-PCR の結果、胎子 No. 3 のみに特異バンドが確認された。

細菌学的検査：いずれの胎子からも一般細菌は分離されなかった。レプトスピラ分離培養においては雑菌の混入が認められ、フィルター濾過したが分離は陰性だった。レプトスピラ *flaB* 遺伝子 Nested PCR の結果、胎子 No. 3 は全臓器において 1st PCR で特異バンドが確認された。胎子 No. 2 の肺、腎臓と胎子 No. 4 の脳、肝

臓、脾臓においても 2nd PCR で特異バンドが確認された。胎子 No. 1 では特異バンドは確認されなかった。

血清学的検査：トキソプラズマの抗体価はいずれも 16 倍以下で陰性だった。レプトスピラの抗体価は胎子 No. 1, 2 の母豚が血清型 *Hebdomadis* に対し、流産時に 10,240 倍、4 週間後には 5,120 倍の高い抗体価を示し、胎子 No. 3, 4 の母豚も同血清型に対し、流産時に 5,120 倍、2 週間後には 2,560 倍の高い抗体価を示した。同居母豚については 2013 年 3 月の流産発生時の 1 頭で同血清型に対して陽性が確認されたが、抗体価は 160 倍と低かった。胎子 No. 3, 4 の体液については全身に病変が確認された胎子 No. 3 が同血清型に対して 80 倍の抗体価を示した (表 1)。

疫学調査：レプトスピラ *flaB* 遺伝子 Nested PCR の結果 マングース 1 匹の腎臓に特異バンドが確認され、分離培養の結果腎臓乳剤からレプトスピラが分離された。

レプトスピラ浸潤状況調査：農場別にみると北部地域は南部地域に比べて血清型 *Hebdomadis* と *Bratislava* に対する陽性率が高く、それぞれ 60% と 80% だった。

表1 流産母豚のレプトスピラに対する抗体価

検 体 材 料	No. 1, 2の母豚		同居豚1		No. 3, 4の母豚		同居豚2		No. 3	No. 4
	血 清		血 清		血 清		血 清		腹 水	胸 水
流産月日	2012/8/8		2012/8/8		2013/3/19		2013/3/13		2013/3/19	
採材月日	8/8	9/5	8/8	9/5	3/19	4/3	3/19	4/3	3/19	3/19
Australis	20>	20>	20>	20>	20>	20>	20>	20>	20>	20>
Autumnalis	20>	20>	20>	20>	20>	20>	20>	20>	20>	20>
Canicola	20>	20>	20>	20>	80	160	20>	20>	20>	20>
Hebdomadis	10240	5120	80	160	5120	2560	20	20>	80	20
Bataviae	20>	20>	20>	20>	20	20>	20>	20>	20>	20>
Javanica	20>	20>	20>	20>	20	20>	20>	20>	20>	20>
Pyrogenes	20>	20>	20>	20>	80	160	20>	20>	20>	20>
Pomona	20>	20>	20>	20>	20>	20>	20>	20>	20>	20>
Icterohaemorrhagia	20>	20>	20>	20>	40	80	20>	20>	40	20>
Grippotyphosa	20>	20>	20>	20>	20>	20>	20>	20>	20>	20>
Rachmati	20>	20>	20>	20>	80	80	20>	20>	20>	20>
Castellonis	20>	20>	20>	20>	20>	20>	20>	20>	20>	20>
Bratislava	20>	20>	40	20	20>	20>	20>	20>	20>	20>

表2 異常産発生農場におけるレプトスピラ抗体の保有状況

血清型	抗 体 価					
	陽性農場(%)		抗体陽性母豚(%)			
	南 部	北 部	南 部		北 部	
	160<	160<	160<	1280<	160<	1280<
Australis	0	0	0	0	0	0
Autumnalis	10	0	1	0	0	0
Canicola	40	20	5.2	0	2	0
Hebdomadis	10	60	1	0	25.5	15.7
Bataviae	0	0	0	0	0	0
Javanica	20	20	2.1	0	2	0
Pyrogenes	0	40	0	0	3.9	0
Pomona	0	0	0	0	0	0
Icterohaemorrhagia	20	0	2.1	0	0	0
Grippotyphosa	0	0	0	0	0	0
Rachmati	0	20	0	0	2	2
Castellonis	0	0	0	0	0	0
Bratislava	30	80	4.2	0	21.6	0

母豚の陽性率は南部地域では血清型 Canicola が最も高く 5.2% であり、1,280 倍以上の高い抗体価を保有する母豚はみられなかった。北部地域では血清型 Hebdomadis が 25.5% と最も高く、15.7% の母豚が 1,280 倍以上の高い抗体価を保有していた。同様に血清型 Bratislava に対する陽性率も 21.6% と高かったが、1,280 倍以上の高い抗体価を保有する母豚はみられなかった (表 2)。

考 察

本症例は *L. Hebdomadis* による豚異常産と診断された。レプトスピラ陽性豚と産歴の関連性においては、産歴の低い母豚ほど陽性率が高くなる傾向にあるといわれ

ており [9]。今回異常産を起こした母豚の産歴もそれぞれ 3 産と 2 産で、比較的産歴の低い母豚だった。またレプトスピラ症による異常産は妊娠期間の最終 1/3 期に起こりやすいとされているが [3]、今回異常産を起こした胎子の胎齢は 106 日齢と 77 日齢であり、同時期にあてはまっていた。胎子 No. 3 の特記所見として体表や皮下に出血斑がみられ、貝賀 [6] の報告したレプトスピラ病に關与した異常産胎子の解剖学的所見と一致していた。レプトスピラ *flaB* 遺伝子 Nested PCR の結果から、菌量は胎子によってさまざまであり、母豚からの胎盤感染と推察された。また肺で PRRS ウイルスの抗原遺伝子が検出された胎子 No. 3 については全臓器でレプトスピラの抗原遺伝子が確認された。胎子 No. 3 は病理組織学的所見でレプトスピラによると思われる病変を形成しており、Warthin-Starry 染色や免疫組織化学的染色でも全臓器で菌体が多数確認されているが、胎子が敗血症となった原因として PRRS ウイルス感染の関与が疑われた。PRRS ウイルスの感染によりレプトスピラが発症しやすくなるという報告もあるが [10]、その発症メカニズムに関しては不明であり、詳細な研究が必要である。

血清学的検査の結果から、母豚の抗体価は異常産時に 5,120 倍から 10,240 倍まで上昇しており、2~4 週間後にはそれぞれ 2,560 倍と 5,120 倍に減少していた。一般的に MAT の検査法では、感染早期はおもに IgM 抗体を検出し、IgM 消失後には数百倍の IgG 抗体を検出することが可能である [11]。診断にはペア血清による抗体価の上昇を確認する必要があるが、流産では母豚に症状が認められないため急性期の血清を採取するのが困難であるとされている。今回採取された血清はすでに回復期の血清であり、1,000 倍以上の高い抗体価が確認された

ことから、今後レプトスピラ症を診断するにあたっては異常産時に1,000倍以上の高い抗体価がみられた場合はレプトスピラ症が疑われると考えられた。

レプトスピラ浸潤状況調査の結果、*L. Hebdomadis* と *L. Bratislava* の農場陽性率が本島北部地域に局限して高かった。特に *L. Hebdomadis* は抗体陽性となった母豚の大半が1,280倍以上の高い抗体価を保有しており、異常産発生への関与が示唆された。また現在全国的に最も浸潤しているとされている血清型 Bratislava [12] は今回の調査においては多くが160~320倍での陽性だったが、本島南部地域の1農場においては640倍の高い抗体価が確認された。

レプトスピラの保菌動物として重要な役割を果たしているのがネズミ等のげっ歯類であるが [3]、2002年に石橋ら [13] によって行われたジャワマングース及びクマネズミのレプトスピラ保菌調査によると、*L. Hebdomadis* はクマネズミからは分離されず、おもにマングースが保菌しており、家畜や人への感染に関与していると報告されている。また2002年に中村ら [14] によって行われた沖縄県におけるレプトスピラ保菌動物調査によると、イノシシは豚と同様に *L. Hebdomadis* の抗体陽性率が最も高く、640倍以上の高い抗体価も確認されている。今回異常産が発生した農場内においてもマングースは確認されており、レプトスピラを保菌していた。またこれら野生動物の分布状況と豚の抗体保有状況が一致することから、農場内における野生動物の対策が必要であると考えられた。当該農場ではレプトスピラ対策として一部の母豚にワクチンを接種していたが、血清型が異なるためワクチンの効果は期待されなかった。*L. Hebdomadis* は届出伝染病に指定されていないものの、今回の調査結果から本島北部地域においては広く蔓延していることが分かった。また同地域では人への感染も確認されており、公衆衛生において重要な血清型である [13]。豚のレプトスピラ症は特徴的な臨床症状がなく、散発的に異常産を起こす疾病である。国内においては1995年以降レプトスピラの分離報告はされておらず、MATも血清型が多種あることから特定の研究機関で実施されているにすぎないため、確定診断に至ることが少ない。本症例がレプトスピラ感染症のさらなる知見となれば幸いである。

引用文献

- [1] 増澤俊幸：レプトスピラ病。新世紀の感染症学（上）、日本臨牀社、557-563（2003）
- [2] 足立吉敷：豚のレプトスピラ症、JASV会報、No. 2、2-4（2005）
- [3] 菊池直哉：日本における豚レプトスピラ症の現状と対策、豚病会報、No. 50、1-6（2007）
- [4] 伊藤裕和、小林章二、杉浦洋一、渡辺広美、足立吉敷：早産豚の血清レプトスピラ抗体価、日獣会誌、39、331-314（1986）
- [5] Kazami A, Watanabe H, Hayashi T, Kobayashi K, Ogawa Y, Yamamoto K, Adachi Y: Serological survey of leptospirosis in sows with premature birth and stillbirth in Chiba and Gunma prefectures of Japan, J Vet Med Sci, 64, 735-737（2002）
- [6] 貝賀眞俊：沖縄本島北部地域における豚のレプトスピラ病の疫学調査、Proc Jpn Pig Vet Soc, 33, 15-18（1998）
- [7] Kawabata H, Dancel LA, Villanueva SYAM, Yanagi-hara Y, Koizumi N, Watanabe H: *flaB*-polymerase chain reaction (*flaB*-PCR) and its restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis are an efficient tool for detection and identification of *leptospira* spp., Microbiol Immunol, 45, 491-496（2001）
- [8] 有光佳子：レプトスピラ病の検査室診断、化学療法の領域、8、653-658（1992）
- [9] 古谷徳次郎、藤井 武、森 研一、長井 新、菊池直哉：豚の早産胎子におけるPCRおよび抗体検査におけるレプトスピラ浸潤状況、J Jpn Vet Med Assoc, 59, 459-463（2006）
- [10] 辻 厚史：PRRSとレプトスピラの関与が疑われる豚死流産の病態と対策、家畜診療、55, 117-122（2008）
- [11] Faine S: 部門A、部門B、レプトスピラ症防疫指針、小西久典、富田正章、吉井善作訳、第1版、38-39、内田老鶴圃、東京（1987）
- [12] Kikuchi N, Shikano M, Hatanaka M, Takahashi T, Mori K, Fujii T, Furuya T: Prevalence of leptospiral antibody in sows in Japan, Journal of Veterinary Epidemiology, 13, 95-99（2009）
- [13] 石橋 治、阿波根綾子、中村正治、盛根信也、平良勝也、小倉 剛、仲地 学、川島由次、仲田 正：沖縄県北部のジャワマングース (*Herpestes javanicus*) およびクマネズミ (*Rattus rattus*) におけるレプトスピラ (*Leptospira* spp.) の保有調査、Jpn J Zoo Wldi Med, 11, 35-41（2006）
- [14] 中村正治、平良勝也、大野 惇、増澤俊幸、角坂照貴、川端寛樹、小泉信夫、藤田博巳：沖縄県におけるレプトスピラの保菌動物調査、Journal of the Japan Veterinary Medical Association, 57, 321-325（2004）

Miscarriage of Swine Due to *Leptospira interrogans* serovar Hebdomadis

Satoko NAKAO^{1)†}, Miho ARAKI¹⁾, Kazuhumi IKEMIYAGI²⁾, Osamu TSUHA³⁾,
Wakako TAKAGI⁴⁾ and Masatoshi KAIGA³⁾

1) *Okinawa Prefectural Institute of Animal Health, 1-24-29 Kohagura, Naha, 900-0024, Japan*

2) *Yaeyama Livestock Hygiene Service Center of Okinawa Prefecture, 1-2 Miyara, Ishigaki, 907-0243, Japan*

3) *Hokubu Livestock Hygiene Service Center of Okinawa Prefecture, 4606-4 Nago, Nago, 905-0012, Japan*

4) *Livestock Division, 1-2-2 Izumizaki, Naha, 900-8570, Japan*

SUMMARY

Five fetuses of sows in the consistent management hoggery, which will breed 572 sows in Okinawa Prefecture, Japan, were miscarried in March 2013, and pathological appraisals were carried out since the frequency of occurrence was higher than usual. Petechial hemorrhage of the entire skin, hemorrhage of subcutaneous parts of the skin and lungs and white macules on the liver of aborted fetus No. 3 were observed at necropsy. No bacteria were isolated. The leptospira *flaB* gene was detected in the main internal organs of the miscarried pigs. The sow had 5,120 times the antibodies and the humors of the fetuses of the sow had 80 times the antibodies for *Leptospira interrogans* serovar Hebdomadis. Focal necrosis of the liver, interstitial nephritis and purulent dermatitis were observed histologically in fetus No. 3. Numerous leptospira-like spirochaetes were observed around the blood vessels of the main organs, thymus, digestive organs, and skin through Warthin-Starry staining. Immunohistochemically, *L. Hebdomadis* antigens were detected in the same part. According to the above results, the present cases were diagnosed as miscarriage due to *L. Hebdomadis* infection.

— Key words : Interstitial nephritis, *Leptospira* infection, *Leptospira interrogans* serovar Hebdomadis, miscarriage, swine.

† Correspondence to : Satoko NAKAO (*Okinawa Prefectural Institute of Animal Health*)

1-24-29 Kohagura, Naha, 900-0024, Japan

TEL 098-832-1515 FAX 098-853-7376 E-mail : oohasha@pref.okinawa.lg.jp

J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 67, 908 ~ 913 (2014)