



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賞 産業動物部門「獣医学術学会賞」

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倍量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ことにもなる。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ことは、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。馬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。

## 平成 26 年度 日本獣医師会獣医学術賞 小動物部門「獣医学術学会賞」

小地区—17

### 猫の $\beta$ -ウレイドプロピオナーゼ欠損症：その臨床、分子基盤及び分子疫学

清武典子<sup>1)</sup>、飛田泰男<sup>2)</sup>、松田広一<sup>3)</sup>、張春花<sup>4)</sup>、新井賢<sup>5)</sup>、大和修<sup>1)</sup>、他

1) 鹿児島大学共同獣医学部臨床病理学分野, 2) 黒川動物病院・名古屋市, 3) 神戸学院大学,  
4) ミルスインターナショナル, 5) 新井獣医科病院・愛知県

#### 背景と目的

高アンモニア血症及びその関連徴候（嘔吐や肝酵素上昇等）は、猫で比較的良好にみられる所見である。その原因には、肝疾患、門脈体循環シャント、腎不全の他、先天代謝異常症が挙げられる。人と同様に多様な先天代謝異常症が潜在すると考えられるが、動物においてはほとんど未解明である。今回、原因不明の不定期の高アンモニア血症を呈した発端症例の猫において、長期にわたり各種検査を実施した結果、先天性ピリミジン代謝異常症のうち、これまで動物では報告のなかった  $\beta$ -ウレイドプロピオナーゼ ( $\beta$ UP) 欠損症を確定診断し、その分子基盤を解明した。また、猫集団の分子疫学調査によって、この変異を有する猫を多数見出し、集団遺伝学的解析を実施した。さらに、新たに見出された変異ホモ個体群の一部について、その臨床症状及び生化学的所見を調査し、本疾患の特徴を集約した。加えて、本症に有効と考えられる食餌療法についても検討した。それらの概要について報告する。

#### 発端症例

アメリカンショートヘア（2004年生）、去勢雄、体重4.6kg（7歳齢時）。若齢時から、食後嘔吐及び発作ならびに不定期の活動性低下等の軽度～中等度の臨床症状が認められ、対症療法と低カロリー食で比較的良好に維持していたが、最終的に7歳10カ月齢時に予兆なく突然死（原因不明）した。

#### 各種検査

臨床症状の発現にあわせて、血中アンモニア濃度の軽度～高度の上昇とそれに伴う肝酵素活性、総胆汁酸、総ビリルビン、総コレステロール濃度の軽度～中等度上昇が認められたが、それ以外の一般血液・尿検査値は正常範囲内であった。CTを含む画像検査所見にも異常はなく、門脈体循環シャントも否定された。死亡後の肝臓の

病理組織学的検査では、肝細胞の脂肪変性及び一部組織の線維化など非特異的変化は認められたが、特定疾患の診断に結びつく所見ではなかった。ガスクロマトグラフィー/マススペクトロメトリー (GC/MS) 装置による尿中代謝物分析において、ピリミジン塩基ならびにその代謝物のうち、ジヒドロウラシル及びジヒドロチミンの上昇、ならびにウラシル及びチミンの軽度上昇が認められたため、ピリミジン代謝経路の異常が強く疑われた。死後の凍結肝臓組織を用いて各種生化学的分析を実施した結果、 $\beta$ UPの活性及び蛋白発現が欠損していたため、 $\beta$ UP欠損症と生化学的に確定診断された。

#### 変異解析

$\beta$ UP蛋白をコードする *UPBI* 遺伝子をシーケンス解析した結果、スプライス部位にホモ接合の1塩基置換があり、mRNAを用いたRT-PCRにより関連エクソンのスキップが確認されたため、本変異が  $\beta$ UP欠損症の原因であると強く示唆された。

#### 分子疫学

簡易迅速な遺伝子型検査法 (PCR-RFLP法及びリアルタイムPCR法)を開発し、3,000頭余の猫集団を調査した。その結果、アメリカンショートヘアでは、本変異のアレル頻度は約0.1と高かった。また、アビシニアン及びソマリにおいては、0.5～0.6と極めて高い変異アレル頻度であった。その他の純血種猫及び雑種猫においても、一定の頻度で本変異を保有していた。ただし、変異ホモ、ヘテロ及び野生型ホモの集団間で統計学的な年齢差はなかった。

#### 追跡調査

疫学調査で見出された変異ホモ個体群から数頭を抽出して追跡調査を実施した。その結果、無症状から不定期の高アンモニア血症、肝酵素上昇、嘔吐、下痢、発作等の症状まで個体差が存在し、その重症度は高年齢と関連

しているようであった。一方、尿 GC/MS 検査を実施できた個体においては、その全頭にピリミジン代謝物の上昇が認められた。さらに、慢性下痢等を示す比較的重症の高年齢の症例には、蛋白調整された処方食による食餌療法を開始し、現在、その効果を調査しているところである。その結果は口頭発表時に報告する。

## 考 察

猫の $\beta$ UP欠損症を世界で初めて同定し、その分子基盤を解明することに成功した。また、本変異アレルが猫

集団に広く、かつ品種により高頻度に存在することが明らかとなった。この遺伝的異常形質は、猫の高アンモニア血症や嘔吐、下痢、発作、元気消失等の多様な症状に関連しているため、今後、高アンモニア血症や嘔吐等の鑑別診断に本疾患を含むべきであると考えられた。さらに、本研究で開発された遺伝子型検査法によって、早期の診断とその後の適切な処置（食餌療法等）が可能となった。一方、人の $\beta$ UP欠損症においては未解明な部分が多いため、猫疾患の研究結果が動物モデルとして医学領域に貴重な情報をもたらすと期待される。

## 平成 26 年度 日本獣医師会獣医学術賞 公衆衛生部門「獣医学術学会賞」

公地区—10

### ジビエにおける人獣共通寄生虫感染実態調査

上津ひろな<sup>1)</sup>、松尾加代子<sup>1)2)</sup>、後藤判友<sup>1)</sup>、吉田彩子<sup>3)</sup>

1) 岐阜県食肉衛生検査所、2) 岐阜大学応用生物科学部、3) 宮崎大学医学部

## はじめに

近年、シカ及びイノシシの生息数増加による農業被害が問題となっており、狩猟あるいは有害捕獲された野生鳥獣をジビエとして有効利用しようとする活動が全国的に増えてきている。岐阜県でも平成 25 年に「ぎふジビエ衛生ガイドライン」が作成されるなどの取り組みが始まっているが、食肉衛生の観点からの健康リスク調査は、ほとんど行われていない。近年、シカ肉の生食に起因する住肉胞子虫による有症苦情や肺吸虫感染例なども報告されている。そこで、人獣共通寄生虫である住肉胞子虫、槍形吸虫、トキソプラズマ、肺吸虫、肝蛭、豚回虫、トキソカラについて調査を行った。

## 方 法

2013 年 5 月から 2014 年 3 月までに県内で捕獲されたシカ 39 頭とイノシシ 22 頭の体幹筋（背ロース、モモ）、心筋及び肝臓を採取した。住肉胞子虫については、2×2.5cm の組織切片を作成し、そこに含まれるシストの有無と数について観察した。シストが認められた組織切片には、馬肉の生食による寄生虫性食中毒の原因である *Sarcocystis fayeri* から抽出された 15kDa の毒性タンパク質に対する免疫染色を行った。シカの槍形吸虫は、肝臓を細切し、流水中に遊出した虫体を数えた。また、血液が採取できたシカ 21 検体について、トキソプラズマについては、ラテックス凝集反応（トキソチェック-MT）を用い、64 倍以上を陽性と判定した。肺吸虫、肝蛭については、通常の ELISA でスクリーニングを行った後、吸虫相互の交差反応を排除するために槍形吸虫を含めた競合 ELISA を用いた。さらに、豚回虫及びトキソカラに対しては、それぞれの ES（幼虫分泌・排泄）抗原を用いた ELISA による抗体検査を行った。

## 結 果

シカの筋肉からは住肉胞子虫 2 種 *Sarcocystis sybillensis*、*Sarcocystis wapiti* が、イノシシからは 1 種 *Sarcocystis miescheriana* が検出された。シカでの住肉胞子虫の感染率は体幹筋で 97.3% であり、部位による差は認められなかった。心筋では 61.9% と、体幹筋に比べ低かった。イノシシでは背ロースで 36.8%、モモで 7.7% であり、有意な差がみられた。一方、心筋からは検出されなかった。一切片あたりのシスト数の平均値は、シカの体幹筋では 17.1 個（最高 129 個）、心筋では 1 個（最高 9 個）であった。イノシシの体幹筋では平均 1 個（最高 12 個）であった。*S. fayeri* の毒性タンパク質に対する免疫染色では、シカ及びイノシシから得られた 3 種類の住肉胞子虫のシストがすべて陽性反応を呈した。シカの肝臓における槍形吸虫の感染率は 87.5%（14/16 検体）と高く、回収された虫体数の平均値は 147.1 隻（最高 519 隻）であった。検出された槍形吸虫は、精巢の配置などから、形態学的に *Dicrocoelium chinensis* と同定された。シカの抗体検査では、21 検体中 6 検体（28.6%）がトキソプラズマに対する抗体陽性を示した。また、ELISA によって、肺吸虫感染疑い 1 検体（4.8%）、肝蛭感染疑い 7 検体（33.3%）、豚回虫感染疑い 5 検体（23.8%）、トキソカラ感染疑い 6 検体（28.6%）が検出された。

## 考 察

住肉胞子虫は、馬肉の生食による寄生虫性食中毒の原因として特定されており、シカやイノシシの住肉胞子虫も同じ毒性タンパク質を持つ。今回、住肉胞子虫がシカ肉から高率に検出されたことから、同様に食中毒の原因となり得ることが示唆された。また、槍形吸虫に関して

も、肝臓から多数の虫体が回収されており、ジビエの生食は人獣共通寄生虫感染の可能性があることが示された。血液が採取できたシカ21個体中6個体がトキソプラズマの抗体を保有していたことから、シカ肉の生食も人のトキソプラズマ感染の原因となる可能性が示唆された。また、シカは肺吸虫の中間宿主であるサワガニを摂食しないと思われるが、シカ肉が原因と推察される人の肺吸虫感染例も報告されている。限られた結果ではあるが、今回肺吸虫に対する抗体を保有するシカの存在が示されたことは、シカ肉も肺吸虫感染の原因食として考慮する必要性を示唆している。虫体は検出されていないが、抗体検査で肝蛭や豚回虫、トキソカラの感染が疑わ

れる個体も見つかった。そもそも野生鳥獣は家畜と生息環境が異なるため、保有している病原体も隔離されていると考えられる。有害鳥獣として人里に近づけば、家畜やペットとの接触機会が増え、人獣共通寄生虫による感染リスクも増加していく可能性がある。これらの結果より、ジビエの摂食による人の健康被害を防ぐために、生食を避け、十分な加熱調理の徹底を周知していく必要性が考えられた。管理された家畜や家禽における食肉処理過程での検査を野生鳥獣にそのまま適用することは難しいが、食肉衛生検査所が日々と畜・食鳥検査で培ってきたノウハウをジビエの衛生管理に活かしていくことは可能だと思われる。