



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 27 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— 8

大腸菌群による甚急性乳房炎に対する乳房内冷却ならびに 抗菌性物質・消炎鎮痛剤の乳房内局所投与療法の検討

佐々木恒弥¹⁾，伊藤 遙¹⁾，佐藤祐紀子¹⁾，佐々木一弥¹⁾，大塚浩通²⁾

1) いわて総合動物病院，2) 酪農学園大学生産動物医療学分野生産動物内科学1ユニット

はじめに

乳牛の大腸菌群による甚急性乳房炎 (Acute Coliform Mastitis; ACM) は重篤な臨床症状を呈しての死亡や廃用の他，全身状態が改善しても罹患乳房の泌乳停止や乳質が改善しない場合があり，経済的損失も大きい。これらの病態にはエンドトキシンに誘発されたサイトカインによる乳房内の過剰な炎症反応が関連すると考えられている。乳房炎治療の目標は罹患乳房の正常な泌乳能力の回復であり，その為には乳房内の過剰な炎症反応を早期に収束させる必要がある。今回我々は，ACM 症例における乳房内の炎症反応を早期に収束させることを目的として，乳房内冷却ならびに抗菌性物質，消炎鎮痛剤の乳房内局所投与 (乳房内冷却群) を実施した。本治療法の治療効果を抗菌性物質全身投与 (全身投与群) ならびに抗菌性物質全身投与・乳房炎軟膏併用 (軟膏併用群) と比較，検討した。

材料及び方法

2007 年 2 月～2015 年 7 月の期間で，初診時の臨床症状から ACM を疑い，乳汁より大腸菌群 (*E. coli* または *K. pneumoniae*) を検出した 205 頭を解析に供した。乳房内冷却群は 58 頭，全身投与群は 107 頭，軟膏併用群は 40 頭であった。全ての症例は各臨床症状に応じた対症療法を行った。乳房内冷却群は罹患乳房の搾乳により細菌ならびにエンドトキシンの物理的排除を行った後，5℃に冷却した生理食塩水 1l にセファゾリン Na 2g と水性デキサメサゾン 5mg またはフルニキシメグルミン

500mg を溶解し，乳頭口より乳房内に注入した。薬剤の注入は初診時以降，酪農家によって搾乳後に 1 日 2 回 3 日間行った。治療成績は転帰別に，A 群：初診より 30 日以内に罹患乳房乳汁の出荷が可能，B 群：初診より 30 日時点での罹患乳房の泌乳停止あるいは体細胞数高値での乳汁出荷不可能 (他分房は出荷)，C 群：治療中に死亡，または全分房の泌乳停止あるいは体細胞数高値による廃用の 3 群に分類した。

成 績

全身投与群の治療成績は A 群 26 頭 (24.3%)，B 群 40 頭 (37.4%)，C 群 41 頭 (38.3%)，軟膏併用群で A 群 16 頭 (40.0%)，B 群 15 頭 (37.5%)，C 群 9 頭 (22.5%) であり，両群間の治療成績に有意差は認められなかった。一方，乳房内冷却群の治療成績は A 群 39 頭 (67.2%)，B 群 15 頭 (25.9%)，C 群 4 頭 (6.9%) であり，全身投与群ならびに軟膏併用群と比較し，有意に高い治療効果が得られた (カイ 2 乗検定 $P < 0.05$)。

考 察

乳房内冷却ならびに抗菌性物質，消炎鎮痛剤の乳房内局所投与は ACM に対する治癒率の向上，特に正常な泌乳能力回復に有効であると考えられた。すなわち，乳腺組織での過剰な炎症反応を早期に収束させることで，乳腺細胞の組織損傷による泌乳能力の低下・喪失を抑えることが可能であると推察された。本治療法は特殊な技術，機器，薬剤を必要としない点からも，産業動物臨床現場において有用な治療法であると考えられる。

臨床現場における犬のTAT測定の有用性の検討

福岡 玲, 中田美央, 梅下雄介, 築澤寿栄, 舩方祐子, 安田和雄

安田動物病院・兵庫県

はじめに

播種性血管内凝固症候群 (DIC) は, 様々な原因によって全身の細小血管内に汎発性の血栓形成を生じることで臓器不全をきたし, 死に至る可能性の高い非常に危険な病態である. そのため, 一刻も早く検出する事が望ましい. 獣医学領域におけるDICのベッドサイド診断基準は, 基礎疾患の存在に加えて, 血小板数の減少をはじめFDPの上昇やPTまたはAPTTの延長を指標としているのが現状である. トロンビン-アンチトロンビン複合体 (TAT) は, 凝固活性化に伴い最終的に産生されるトロンビンとその代表的な阻止因子であるアンチトロンビンとが1対1で結合した複合体である. 半減期が極めて短く測定不能なトロンビンに比べてTATの半減期は3~15分と長く, 比較的安定した物質であり, トロンビンを測定する代わりにTATを測定することによりトロンビンの産生量を間接的に把握することが可能である. そのため, TATは近年人医学領域においてDICや血栓塞栓症の早期診断のために血液凝固亢進状態をとらえる感度の高いマーカーとして用いられている. 今回我々は, ヒトのTATをリアルタイムで測定可能な機器を用いて, 犬のTAT測定の基礎的な検討を行うとともに, 血液凝固亢進傾向を示すと考えられる症例のTATを測定し, 臨床現場における犬のTAT測定の有用性について検討を行った.

目的

ヒトのTAT測定系により, 犬のTATが測定可能であるかを明らかにし, さらに血液凝固亢進傾向を示す基礎疾患を持つ犬の症例において, 血液凝固亢進マーカーとしてのTATの有用性を検討することを目的とした.

方法

測定原理は化学発光酵素免疫測定法 (CLEIA法) であり, 測定はLSIメディエンス社製のパスファーストを用いて行った. まず本測定系で用いられている抗ヒトトロンビン抗体及び抗ヒトアンチトロンビン抗体が犬のTATと交叉性を示すか検討するためにTATが高値を示した犬の検体を著しく低値の健常犬の血漿 (≒ゼロ血漿) を用いて段階希釈し, TATを測定する希釈試験を行った. その結果からTAT測定が可能な濃度範囲についても検討した. また, TAT高値を示した犬の血漿と低値の健常犬血漿について, それぞれ複数回測定を行い, 再現性を評価した. さらに血液凝固を亢進させる基

礎疾患を持つ犬3例について経時的にTATを測定し, 一般状態やその他の臨床検査結果との関連性について検討を加えた.

結果

希釈試験で得られた, TAT濃度と希釈倍率とを2変数とした回帰直線では, TAT濃度0.036~15ng/mlの範囲において $r^2=0.9992$ というきわめて高い決定係数が得られた. TATが高値を示す犬及び健常犬の血漿を複数回測定した結果, それぞれ 15.075 ± 0.593 (平均±標準偏差, $n=8$), 0.0196 ± 0.0054 ($n=5$) という値が得られ, 変動係数はそれぞれ3.93%, 27.3%であった. 原疾患の治療に良好に反応した2症例では, 当初高値を示していたTATは急速に低下し, これに伴いFDP及びDダイマーも同様に改善が認められ, 一般状態が改善した. 原疾患の治療に対する反応が乏しかった1症例では, TAT, FDP, Dダイマーともに高値を示していたものの, 当初は血小板数の減少は認められなかった. しかしそれ以降もTATの高値は持続し, FDP及びDダイマーは更に上昇傾向を示し, 血小板数の減少とPTの延長が認められ, DICに陥り死亡した.

考察

希釈試験の結果から, 本測定系で用いられている抗体は, 0.01ng/mlレベルの低濃度から10ng/mlレベルの高濃度の範囲まで犬のTATと一定の交叉反応を示すことが明らかになった. これより本測定系を用いて, 広域な濃度範囲で犬の血中TAT濃度の変動を比較検討が可能であるということが示された. 再現性については, TATが高値の検体において得られた変動係数は5%未満であり, 高濃度検体における測定値の良好な再現性が認められたが, 低濃度検体において得られた変動係数は10%を大きく超えていたため, 極めて低濃度における測定値の再現性は低いと考えられた. TATを経時的に測定した症例の結果から, TATの上昇によってDIC準備状態 (Pre DIC) のみならず, DICのベッドサイド診断基準ではpre DICにも該当しない血液凝固亢進傾向が早期に検出可能であることが示唆された. また, TATが高値を示した場合であっても原疾患に対する治療に良好に反応した場合は, TATの正常値化する様子が観察されたことから, TATの変動を観察することによって原疾患の治療に対する反応を評価することが可能であると考えられた.

公地区—7

リケッチア感染症(つづが虫病, 紅斑熱)の迅速検査法体系の構築

川森文彦¹⁾, 池ヶ谷朝香¹⁾, 荒畑沙織¹⁾, 佐原啓二¹⁾, 安藤秀二²⁾, 大橋典男³⁾

1) 静岡県環境衛生科学研究所, 2) 国立感染症研究所, 3) 静岡県立大学

はじめに

我が国では, つづが虫病(病原体: *Orientia tsutsugamushi*)と日本紅斑熱(病原体: *Rickettsia japonica*)の2種類のリケッチア感染症が毎年発生しており, 2014年には全国で, それぞれ320症例及び241症例が四類感染症として報告されている。これらの疾患は, 感染初期であればテトラサイクリン系の抗生物質が著効を示すので, 早期迅速診断は非常に重要である。迅速診断法としてはPCRが有効であり, つづが虫病についてはnested PCRが, 紅斑熱についてはsingle PCR(陰性の場合, 同一プライマーを用いたdouble PCR)が国立感染症研究所編集/発行の「リケッチア感染症診断マニュアル」に掲載されている。しかし, 前者については検査方法が煩雑で長時間を要すること, 後者については検出感度が低いことが欠点としてあげられる。今回は, これらの欠点を補うことができる Multiplex real-time PCRと one-tube nested PCR(1つのチューブに2回分の primer を入れ, 1st PCRと2nd PCRを連続して行う方法)を用いたリケッチア感染症の迅速検査法体系の構築を試みたので報告する。

材料及び方法

つづが虫病と紅斑熱を短時間で同時に診断できる検査法として, *O. tsutsugamushi*と紅斑熱群リケッチアの16S rRNA 遺伝子を標的とした Multiplex real-time PCR (*O. tsutsugamushi*用 probe: Ot-FAM, 紅斑熱群リケッチア用 probe: Rj-VIC)を開発した。また, 通常の nested PCR に比べ, 検査時間が短くコンタミネーションの危険性も低い One-tube nested PCR について, *O. tsutsugamushi*検出用(標的遺伝子: 56kDa 外膜蛋白遺伝子)と紅斑熱群リケッチア検出用(*ompB* 遺伝子)の2種類の PCR を構築した。それぞれの PCR 系について *O. tsutsugamushi* の8血清型株(Karp, Gilliam, Kato, Kawasaki, Kuroki, Shimokoshi, JG: Kaisei, JP-2: Sato), 紅斑熱群リケッチアの7菌種 (*R. japonica*, *R. asiatica*, *R. conorii*, *R. helvetica*, *R. honei*, *R. sibirica*, *R. tamurae*)及び *R. typhi*(発疹チフス群リケッチア)の抽出DNAを用いて特異性を解析した。さらに, One-tube nested PCR の増幅産物については, 制限酵素処理後の切断パターンから血清型や菌種を推測する方法(PCR-RFLP)を検討した。また, 抗体検査で確定したつづが虫病14症例と日本紅斑熱11症例の32検体(血液22, 刺し口痂皮10)を供試し, 診断マニュアルの方法も含め, 各PCR系での検出を試みた。なお, 各検体のDNA抽出には, QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN)を用いた。

結 果

Multiplex real-time PCR では, *O. tsutsugamushi* 8血清型株が Ot-FAM probe に, 紅斑熱群リケッチア7菌種が Rj-VIC probe に特異的に反応した。また, *O. tsutsugamushi* 検出用 one-tube nested PCR では *O. tsutsugamushi* 8血清型株が, 紅斑熱群リケッチア検出用 one-tube nested PCR では紅斑熱群リケッチア7菌種と *R. typhi* が陽性となった。

患者検体からの検出を試みたところ, つづが虫病患者血液14検体すべてが *O. tsutsugamushi* 検出用 one-tube nested PCR で, 11検体が multiplex real-time PCR (Ot-FAM probe) で, 9検体が nested PCR で陽性となった。一方, 日本紅斑熱患者血液8検体中7検体が multiplex real-time PCR (Rj-VIC probe) で, 6検体が紅斑熱群リケッチア検出用 one-tube nested PCR で, 1検体が double PCR で遺伝子増幅が確認された。刺し口痂皮10検体(つづが虫病4検体, 日本紅斑熱6検体)については, 日本紅斑熱患者の1検体が double PCR で陰性となったが, それ以外はいずれの方法においても標的遺伝子の増幅が確認された。

One-tube nested PCR の *O. tsutsugamushi* 増幅産物は *Hha* I あるいは *Rsa* I 処理後の切断パターンで感染株の血清型別が可能であることが解明された。また, 紅斑熱群リケッチア増幅産物は *Fnu* 4HI 処理で *R. japonica* が識別できることが示唆された。つづが虫病14症例の検体について, PCR-RFLP による血清型別法を実施したところ, 11検体が Irie/Kawasaki 型, 2検体が Hirano/Kroki 型, 1検体が Karp 型に分類された。一方, 日本紅斑熱10症例の検体は, PCR-RFLP により, 全て *R. japonica* であることが確認された。

考 察

今回開発した PCR 法はいずれも検出感度が高く, 一般の nested PCR に比べ検査時間が短いので迅速診断法として有用であると思われる。特に multiplex real-time PCR は, 反応時間が約1時間と短く, 両リケッチア感染症を識別できるので, 早期迅速診断法としての有効利用が期待できる。一方, one-tube nested PCR は, multiplex real-time PCR に比べ検査時間が2時間程度増加するが, リアルタイム PCR 機器が配備されていない医療機関等でも検査が可能である点と PCR-RFLP により *O. tsutsugamushi* の血清型別や *R. japonica* の確認ができる点で優れており, 利用価値は高いと考えられる。