



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 28 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— 13

黒毛和種牛で発生した胎膜水腫の原因変異の特定

長谷川清寿¹⁾，佐々木慎二²⁾，東 智子³⁾，杉本喜憲²⁾

1) 鳥根県畜産技術センター，2) (公社)畜産技術協会附属動物遺伝研究所

3) 鳥根県農林水産部畜産課家畜病性鑑定室

はじめに

ウシの胎膜水腫は、胎水の過度な貯留による腹囲膨満を主徴とする妊娠期の疾患で、その発生頻度は 0.013% と報告されており、稀な疾患である (Sloss V & Dufty JH: 1980)。鳥根県内において、2014 年 7 月に黒毛和種の受胎牛 2 頭が相次いで妊娠中に胎膜水腫で死亡し、8 月にもホルスタイン種の受胎牛が同症状を呈して死亡した。いずれも、特定の種雄牛と供胎牛を交配した同一ロット胚を移植した受胎牛で、妊娠 5 から 6 カ月であった。直後の県内での疫学的調査で、2009 年から 2014 年までの 5 年間に、黒毛和種で 38 例の発生があり、母牛も死亡した例は 17 例であった。発生頻度は 0.095% で、既報と比べ約 7 倍高いことが分かった。また、過去の症例のうち 35 症例で胎子の両親の血統に「種雄牛 X」が存在し、劣性遺伝病が疑われたため、2014 年 9 月 25 日、鳥根県は、胎膜水腫の発生した種雄牛の凍結精液の販売を停止し、交配を控えるように発表した。そして我々は、原因となる劣性変異の特定を試みた。

材料及び方法

2014 年 10 月から 2015 年 4 月までに、臨床獣医師が胎膜水腫と診断した黒毛和種 9 例について病性鑑定を行い、同時並行的にゲノム解析を行った。解析は、まず胎膜水腫発症牛由来胎子 6 頭と正常子牛 17 頭を用いて SNP チップ (GGP_LD_V2 26K) で型判定後、染色体領域の特定のための自己接合断片マッピングを行った。そして、生存摘出された胎膜水腫発症牛由来胎子 2 頭の DNA 材料から次世代シーケンサーを用いて原因となる劣性変異を探索した。さらに、種雄牛 X からリスクアレルの伝達経路を特定するため、種雄牛 X の父牛の凍結精液及び母牛の子宮内膜上皮細胞を用いて型判定を行った。

成 績

発症牛由来胎子の病理検査の結果、腎以外に異常を認めず、腎について腎杯の拡張、皮質及び髓質の菲薄化と尿細管腔の軽度拡張を確認したほか、1 例で顕著な水腎症の所見がみられた。本統発症例は、胎子腎に異常を伴う病態と判定した。ゲノム解析の結果、ウシ 10 番染色体上の 61.7 ~ 65.2 Mb (3.52 Mb) に本症の原因となる染色体領域が存在し、原因となる劣性変異として *SLC12A1* (solute carrier family 12, member 1) の p.Pro372Leu を同定した。種雄牛 X の両親のリスクアレルの判定結果は共に正常型で、胎膜水腫発症牛由来胎子の父牛は全て種雄牛 X からリスクアレルを伝達しており、本劣性変異の始祖牛は種雄牛 X であることが判明した。

考 察

SLC12A1 は腎で働く Na⁺、K⁺、Cl⁻ のトランスポーターで、機能欠損型変異はヒトで胎児期に羊膜水腫を発症する劣性遺伝病のバーター症候群 1 型の原因と確認されていること (Simon DB, et al.: 1996)。発症牛の臨床症状と酷似していることから、*SLC12A1* の機能欠損型変異が胎膜水腫の原因であることが示唆された。この変異は、(1) 発症胎子でホモ接合であること、(2) 発症胎子の両親は全てヘテロ接合で保因すること、(3) 種雄牛 X から伝達していること、さらに (4) 健全な成牛約 2,300 頭の中にホモ接合体が存在しないことが確認されたことから、本症の原因となる劣性変異と結論づけられた。そして、本症を“ウシのバーター症候群 1 型”と呼ぶこととした。最新のゲノム解析技術を駆使することで、迅速に胎膜水腫の原因変異を特定し、遺伝子診断法を開発することに成功した。原因変異の始祖牛が種雄牛 X であることから、発生予防対策は種雄牛 X の後代牛のみに絞り行えば良く、遺伝子検査に基づく交配で確実に胎膜水腫の発症を防ぐことができる。

頭蓋内腫瘍性病変の犬75例における放射線治療成績と 予後因子の解析

細谷謙次¹⁾, 金 尚昊¹⁾, 出口辰弥¹⁾, 星 清貴²⁾, 武内 亮²⁾, 坂本英一²⁾, 他

1) 北海道大学獣医学研究科獣医外科学教室, 2) 北海道大学獣医学研究科附属動物医療センター

はじめに

高度画像診断の普及により, 近年獣医療においても頭蓋内腫瘍性病変を診断・治療する機会は増加傾向にある。しかしながら, その予後に関するエビデンスは欧米で実施された回顧的研究があるのみであり, 国内における治療成績に関する情報は乏しい。また, 画像診断のみでは腫瘍の特定が困難な場合があることや, 予後因子に関する情報が不足していることも, 診療現場において飼い主に対する十分なインフォームを妨げる一因となっている。本研究では, 本邦における放射線治療成績の評価及び予後因子の探索を目的とした。

方 法

2013年9月から2016年10月の期間内に北大動物医療センターにて頭蓋内腫瘍性病変と診断し, 放射線治療を実施した犬75例に対して, 観察期間を最長2年とする前向き調査を実施した。腫瘍の種類は主に画像上の特徴または組織学的評価から分類した。また, 全身状態の程度により各症例のPerformance status (PS) を0(無兆候)から4(起立不能/傾眠)に分類した。観察期間中は1.5, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24カ月時点でのMRI画像にて治療反応及び周囲脳実質の放射線障害の有無を判定し, 観察期間中に原因不明で死亡した症例では剖検を実施した。生存期間解析にはKaplan-Meier法を用い, エンドポイントは腫瘍/治療関連死とした。予後因子解析では, 単変量解析としてLog-rank検定にて $P<.10$ となったものを交絡因子としてCox比例ハザードモデルを作成して多変量解析を実施し, 独立して生存期間に影響を与える因子($P<.05$)を有意な予後因子とした。

結 果

神経膠腫24例, 髄膜腫22例, 下垂体腫瘍12例, 神経鞘腫7例, 組織球形肉腫及び転移性癌腫各3例, 頭蓋咽頭腫2例, 脈絡叢頭頭腫及び不明各1例が調査対象に含まれた。PSは, 0~1が45例, 2~3が21例, 4が9例であった。7例では照射前に外科療法が実施された。4例は過去に他施設で放射線治療の実施歴があった。治療装置は250~320kVpのオルソボルテージ機(10例)または4~10MVの直線加速器(65例)を用いた。照射法は臨床医による適切な説明の後に最終的に飼い主により選択され, 通常分割法(主に2.5Gy×20回/4週間)

が34例(オルソボルテージ機10例, 直線加速器24例), 定位照射法(7~12Gy×3回/3日間)が32例, 少分割法(6.5Gy×4回/4週間)が9例で実施された。全症例における生存期間中央値(MST)は359日であった。単変量解析では, 外科併用の有無は予後に影響せず($P=.769$), 腫瘍の種類($P=.007$), PS($P<.001$)及び照射法($P<.001$)が有意な交絡因子と判断された。これらを組み入れた多変量解析の結果, 腫瘍の種類はモデルから除外され, PSと照射法のみが独立した予後因子と判定された。それぞれのハザード比は, PS0~1に対しPS2~3で2.56($P=.038$), PS4で7.98($P<.001$), 直線加速器を用いた通常分割法に対し少分割法では5.03($P=.003$)と有意に高値を示した。通常分割法と定位照射法($P=.635$), 通常照射法における直線加速器とオルソボルテージ機($P=.648$)の間に有意差は認められなかった。MSTは, PSが0~1の症例では>789日, 2~3で313日, 4で38日であった。同様に, 定位照射法で>777日, 通常分割法(直線加速器)で>789日, 通常分割法(オルソボルテージ機)で266日, 少分割法(直線加速器)で48日であった。1年生存率は, PSが0~1の症例で73%, 2~3で32%, 4で20%であった。同様に定位照射法で67%, 通常分割法(直線加速器)で54%, 通常分割法(オルソボルテージ機)で40%, 少分割法で11%であった。

考 察

本研究において, 全症例のMSTは約1年であるものの, 症例のPS及び照射法により予後が大きく異なることが明らかとなった。症例のPSは, 腫瘍の大きさのみならず, その発生部位や増大速度などの複合的な影響を反映していることから予後と相関するものと思われ, 臨床現場において簡易的に予後を推測する指標として有用である可能性が示唆された。PSが0~1の症例においては, 腫瘍の種類によらず良好な予後が期待され, 通常分割照射または定位照射法による積極的な治療が推奨されると考えられた。また, 本研究において定位照射法は通常照射法と同等の治療成績であったが, 適応症例が比較的限局性の小さな腫瘍に限定されていることを考慮すると, 通常照射法と同等の治療効果であると単純比較することはできない。同手法は, 麻酔回数や治療期間の点で臨床的に有用性が高いと考えられ, 今後適応範囲について更なる検討をする価値があると思われた。

湯煮処理されたツキヨタケの簡易な理化学的推定鑑別法の検討

原 智之

新潟県上越地域振興局健康福祉環境部

はじめに

ツキヨタケは、ムキタケ、ヒラタケ、シイタケなどの食用キノコと形状が類似し、当県においては毒キノコを原因とする食中毒事例において最も発生件数の多い毒キノコである。ツキヨタケの鑑別は、通常、柄の付け根の環状隆起帯や断面の黒いシミから形態学的に行われるが、食中毒事例ではツキヨタケを特徴付ける柄部が廃棄され、加熱処理された傘部しか残っておらず、鑑別困難な場合がある。

加熱処理されたツキヨタケの鑑別法としては、中毒成分をLC-MS/MSで分析する理化学的鑑別法、DNA鑑別法などが報告されているが、これらの方法の多くは、高価な機器や複雑な手技を必要とし、鑑別まで長時間を要すことから、汎用的とは言いがたい。

そこで、比較的短時間で簡易に行える呈色試験法を利用し、湯煮処理されたツキヨタケの理化学的推定鑑別法を検討したので、報告する。

方 法

1. 傘部表面での呈色反応

形態学的に同定された毒キノコ4種類（ツキヨタケ、ドクササコ、ニガクリタケ及びクサウラベニタケ）並びに食用キノコ6種類（ムキタケ、シイタケ、ヒラタケ・ウスヒラタケ、ナラタケ、クリタケ及びナメコ）の傘部表面に5%水酸化カリウム試液（以下、「5% KOH 試液」という。）を約0.1ml滴下して呈色反応を確認した。

2. エタノール抽出液での呈色反応

未処理のツキヨタケ、並びに水、10%味噌水溶液又は10%醤油水溶液を用いて5分間湯煮処理後、水洗（味噌及び醤油水溶液を用いた場合）及び水分除去したツキヨタケの傘部表皮を材料として、エタノール抽出液（ツキヨタケ傘部表皮1gにエタノール2mlを加え、10分間超音波処理後、濾紙（5A）で濾過したもの）を作成し、各抽出液1mlに5% KOH 試液0.1mlを加え、呈色反応を確認した。

さらに、日本薬局方「シコン」の確認試験（エタノールで抽出した溶液にアルカリ試液を加え反応させた後、その溶液に過量の希塩酸を加えて溶液の色が元に戻ることを規定している。）を参考として、上記反応後の溶液に希塩酸0.2mlを加え、反応を確認した。

結 果

1. 傘部表面での呈色反応

ツキヨタケは速やかに緑色に呈色した。

その他のキノコについては、ニガクリタケが橙色に呈色した以外、いずれも変化が見られなかった。

2. エタノール抽出液での呈色反応

未処理及び各種湯煮処理ツキヨタケの抽出液は、いずれも同様に反応した。すなわち、薄褐色の抽出液は、5% KOH 試液を加えると速やかに緑変し、希塩酸を加えると、やや白濁しつつも薄褐色に戻った。

考 察

ツキヨタケの呈色反応として、グアヤクチンキや硫酸バニリン試液を用いた方法が報告されているが、これらの方法は、ムキタケが青緑色又は赤紫色に変色するのに対しツキヨタケが変色しないことにより鑑別するため、ムキタケとの鑑別には有効であるが、ツキヨタケ自体は変色しないため、他のキノコとの鑑別には有用性が低い。一方、ツキヨタケの傘部表面にアルカリ試液を滴下すると速やかに鮮やかな青緑色に変色することが従来知られており、ツキヨタケに特異的な反応である可能性が推定されたことから、この呈色反応を用いた方法について検討した。

今回、毒キノコ4種類及び食用キノコ6種類について、傘部表面で5% KOH 試液による呈色反応を確認したところ、ツキヨタケのみが緑色に変色したことから、ツキヨタケと他のキノコの鑑別に有効であると考えられた。なお、5% KOH 試液の代わりに、弱アルカリ試液（5%炭酸水素ナトリウム試液）を用いて同様の試験を行ったところ、いずれのキノコにおいても呈色反応は確認できなかった。

しかし、ツキヨタケの傘部表面は、幼若時は黄褐色を呈すものの成熟につれて紫褐色から暗紫褐色へと暗色化するため、相当に成熟したツキヨタケでは5% KOH 試液を滴下した傘部表面が暗黒色を帯びてしまい、緑色変化を確認することが困難な場合があった。そこで、ツキヨタケ傘部のエタノール抽出液で呈色反応を行ったところ、未処理及び各種湯煮処理した場合ともに、薄褐色の抽出液は5% KOH 試液滴下により速やかに緑色に変色し、希塩酸滴下により元の薄褐色に戻ることが確認できた。なお、ツキヨタケ傘部を水で抽出した場合には、抽出液に5% KOH 試液を加えても緑色に変色しなかったことから、5% KOH 試液による緑色反応は、水に難溶

性でエタノールに可溶性の褐色系色素が関与しているものと考えられる。湯煮処理したツキヨタケでも呈色反応が得られたことはこれを裏付けている。

今回実施した理化学的推定鑑別法は、特殊な試薬を用いず、湯煮処理したツキヨタケでも30分程度で呈色反応を確認できる簡易な方法であることから、ツキヨタケ

による食中毒を疑う事例で鍋物や汁物の残品しか入手できない場合であっても、原因物質の推定に寄与できるものとする。今後は、焼キノコや油炒めなど煮物以外の状態での呈色反応を確認し、理化学的推定鑑別法の適用範囲を広げていきたい。

日本獣医師会学会学術誌投稿原稿の募集について

日本獣医師会学会においては、構成獣医師をはじめ多くの獣医療関係者からの学会学術誌掲載の研究論文を随時募集しておりますので、奮ってご投稿願います。

学会では、獣医師専門職をはじめ、獣医学系大学の学生、獣医学関係分野の研究者等が学術研究の発表をされる場として、学会学術誌への投稿原稿を広く募集しています。

日本獣医師会が毎年度開催する獣医学術学会年次大会で一般口演された研究発表等も、是非ともご投稿いただき、誌面での発表をお願いします。

なお、投稿を希望される方は、新たに一部改正された「日本獣医師会学会学術誌投稿規程（第70巻3号181頁）」及び投稿原稿の審査や編集が円滑に行われることを目的に策定された「日本獣医師会学会学術誌投稿の手引き（第70巻3号187頁）」を熟読の上、原稿を作成、投稿されるようお願いします。