



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29年度 日本獣医師会獣医学術学会年次大会（大分） 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—8

細菌性血色素尿症と慢性銅中毒の複合的要因により 発症した血色素尿牛3症例

藤井勇紀, 矢口裕司, 赤上正貴, 大谷芳子

茨城県北家畜保健衛生所

はじめに

牛の細菌性血色素尿症 (Bacillary Hemoglobinuria : 以下, BHU) は偏性嫌気性菌 *Clostridium haemolyticum* (以下, Ch) の経口摂取後, 肝実質損傷による嫌気条件下での菌増殖により, 大量の溶血毒素が放出されることで発熱・黄疸・血色素尿を呈し, 1~2日で死亡する疾病である。一方, 慢性銅中毒は, 銅の少量長期摂取で肝臓に銅が蓄積し, 銅が急激に血中放出されると, 銅の触媒作用 (Fenton反応) で産生される活性酸素種の細胞傷害により, BHUとよく似た症状及び経過を示す。今回, これら2疾病の複合的な関与により発症した血色素尿牛3症例について, 病性鑑定を行ったのでその概要を報告する。

発生状況

管内の乳肉複合の一貫経営農場 (肉用種: 400頭, 乳用種: 120頭) において, 2016年1月~4月, 約10カ月齢の肉用肥育牛で可視粘膜黄疸・血色素尿を呈する事例が3頭 (P1~P3) 発生したため, 病性鑑定を実施した。なお2頭 (P1, P2) は急性経過で死亡し, 1頭 (P3) は予後不良のため鑑定殺とした。

材料・方法

発症牛3頭 (P1~P3) と, 他疾病で鑑定殺をした同農場の非発症牛1頭 (N1) の主要臓器, 血液, また同居牛 (乳用牛26頭, 肉用肥育牛54頭) 及び他農場牛 (乳用牛30頭, 肉用肥育牛29頭) の血液, 発生農場の環境材料を検査に供した。

1 細菌学的検査: P1~P3, N1の主要臓器・血液について, 定法に従い好気培養及び嫌気培養を実施した。

なお, 肝臓, 腎臓, 血液については, Ch等の偏性嫌気性菌をターゲットに, 増菌後, ガス噴射法による嫌気培養に加え, 乳剤から直接DNA抽出を行い, Chを含む主要クロストリジウム属菌のPCRを実施した。環境材料については増菌・DNA抽出後, ChのNested PCRを実施した。

2 生化学的検査: P1~P3, N1の肝臓, 血清, また同居牛及び他農場牛の血清について銅濃度測定を実施した。またP2, P3, N1の血液について, 定法に基づき血液生化学検査を実施した。

3 病理組織学的検査: P1~P3, N1の主要臓器について定法に基づき薄切切片を作成後, HE染色を実施した。また, 肝臓についてはロダニン染色を実施した。

結果

1 細菌学的検査: P2の血液, P3の肝臓由来の遊走性菌塊からCh特異遺伝子を検出した (相同性99%)。またP1, P2の肝臓乳剤, 血液, P2区画の飼槽からCh特異遺伝子を検出した (相同性99%)。

2 生化学的検査: 銅濃度測定ではP1~P3, N1の肝臓及びP2, P3の血清は正常値を上回り, N1の血清は正常値であった。血清銅濃度は, 同居の肉用肥育牛で有意に高い分布となった。P2, P3は発症後にT-Bil, GGTの急激な上昇を示したが, N1では上昇はみられなかった。

3 病理組織学的検査: P3の肝臓ではび慢性小葉中心性の肝細胞壊死, P1~P3, N1でロダニン陽性を示す顆粒が認められた。

考察

発症牛であるP1, P2の血液, P3の肝臓においてCh

の特異遺伝子が検出されている事から、発症牛3頭はBHUを発症していたものと考えられた。しかし一般にChは肝蛭、肝生検など、何らかのストレスによる機械的傷害で条件が整うと増殖する偏性嫌気性菌であるため、本事例でもCh増殖を起こす何らかのストレスの関与があると考えられた。発症牛3頭では肝臓の銅濃度が高値であり、ロダニン染色での銅の沈着も確認がされたことから、銅による肝傷害が起きていたことが推察され、これがCh増殖のストレスとなり、BHUの発症に至ったものと推察された。一方、発症牛のP2、P3は発症時に血中銅濃度・肝機能数値が急激に上昇し、これは肝臓から銅が急激に血中放出される慢性銅中毒の

病態と一致していたため、その併発も示唆された。また非発症牛のN1は銅濃度が肝臓で高く、血中では低いことから、単純な銅摂取のみではなく、BHUが銅の血中放出に関与した可能性も考えられた。同居の肉用肥育牛の血清では銅濃度が有意に高く、N1の肝臓でも正常値を上回っており、銅を長期的に摂取し、蓄積していた可能性が考えられた。これらのことから、今回の発症牛3頭の事例においては、BHUと慢性銅中毒の複合的要因で発症した黄疸・血色素尿症であると診断した。しかし慢性銅中毒の発生機序、またBHUとの関連性については未だ不明な点が多いため、今後さらに知見を積み重ね、詳細の解明につなげたい。

産地区—22

牛ウイルス性下痢ウイルス持続感染牛診断における 抗原エライザ法と簡易キットの応用

矢口裕司¹⁾、赤上正貴¹⁾、山下 薫²⁾、大谷芳子¹⁾

1) 茨城県北家畜保健衛生所、2) 茨城県畜産センター

はじめに

牛ウイルス性下痢ウイルス (BVDV) の持続感染 (PI) 牛の摘発は、一般的には血液を用いた2回の抗原検査及び抗体検査により行われている。BVDVの清浄化を達成するためには、PI牛を積極的に摘発することが重要である。農林水産省の「牛ウイルス性下痢・粘膜病対策ガイドライン」では、PI牛を隔離指導したうえで、3週間間隔の2回検査で確実な診断を行うことを推奨している。しかし、PI牛は、その間に大量のウイルスを排泄し、同居牛の感染源となることから、畜主や臨床獣医師からより早期の診断が望まれている。そこで、本県で診断されたPI牛及び急性感染牛の材料を用いて、抗原エライザ法と簡易キットによるBVDV検査を行ったところ、PI牛の摘発に有用な結果が得られたので、その概要を報告する。

PI牛と急性感染牛の抗原エライザ値の比較

平成26年4月から平成28年10月までに採材した牛の血清8,209検体について、抗原エライザを実施した結果、陽性頭数は38頭で、その内訳はPI牛32頭(0.39%)、急性感染牛6頭(0.07%)であった。PI牛の抗原エライザ値は、2.532～3.920の範囲で中央値は3.240であった。また、急性感染牛の抗原エライザ値は0.370～0.960の範囲で中央値は0.611であり、PI牛の抗原エライザ値は、急性感染牛よりも明らかに高い値を示し、中央値でU検定を行ったところ、有意差が認められた($P < 0.01$)。

簡易キットとRT-PCRの比較

簡易キットは、特殊な機材を必要としないため、野外

でも実施することができ、短時間で結果が得られる非常に簡便な検査手法である。今回、BVDVの簡易キットの有用性について、RT-PCRの結果と比較した。RT-PCRでは、PI牛4頭、急性感染牛4頭及び陰性対照牛5頭の皮膚及び毛根を材料とした。皮膚は約0.5cm四方に切り出し、毛根は尾根部及び耳介皮膚から約30本程度を用いて乳剤を作製した。それらの材料について、抽出キットを用いてRNAを抽出し、RT-PCRを実施した。その結果、PI牛4頭の皮膚及び毛根は、全て陽性であった。一方、急性感染牛4頭と陰性対照牛5頭の皮膚及び毛根は、全て陰性であった。簡易キットは、PI牛6頭、急性感染牛4頭及び陰性対照牛5頭の皮膚及び毛根を材料とした。皮膚は約1cm四方に切り出し、毛根は尾根部の皮膚からひと摘み(約30本)したものを検査に供した。材料はそれぞれキット付属のコンジュゲート液1.5mlに10分間浸し、得られた抽出液を簡易キットに移して、10分後に判定した。その結果、PI牛6頭の皮膚及び毛根は、全て陽性であった。一方、急性感染牛4頭と陰性対照牛5頭の皮膚及び毛根では、全て陰性であった。皮膚・毛根のRT-PCRでは、PI牛の抗原は検出できたが、急性感染牛の抗原は検出できなかった。また、簡易キットの結果は、RT-PCRの結果と一致したため、検出感度もRT-PCRと同等であった。

考 察

当所で摘発したPI牛の抗原エライザの値は、急性感染牛より明らかに高く有意差が認められたことから、抗原エライザ値が2.5以上であれば高い確率でPI牛を特定できることが示唆された。皮膚・毛根を用いたRT-PCRは、PI牛のみが陽性になった。過去の報告でも急性感染牛の皮膚ではBVDV抗原は検出されていない。

そのため、皮膚・毛根を材料とした抗原検査はPI牛の特定に有効であることが分かった。また、簡易キットでも、PI牛のみが陽性を示したことから、簡易キットはPI牛のBVDV抗原を検出するのに十分な感度を有していた。PI牛が摘発された農場は、清浄化をするために出生子牛や導入牛のBVDV検査が継続的に必要となる。簡易検査は非常に簡便であり、採材後、約20分で判定

できるため、PI牛を検査当日に特定し、隔離飼育などのウイルス拡散防止対策を迅速に取ることが出来る。また、同時に血液を採取し、抗原エライザ値が2.5以上の高値であれば、より確実にPI牛を特定することができ、早期に隔離飼養を行うことでBVDVの拡散を防ぐことができる。

[参考] 平成29年度 日本産業動物獣医学会（関東・東京地区）発表演題一覧

- | | | | |
|----|---|----|---|
| 1 | 千葉県における牛ウイルス性下痢ウイルス持続感染牛摘発状況と浸潤状況調査について
畑中ちひろ（千葉県中央家保），他 | 11 | 牛コロナウイルス病の発生状況調査
高山 環（神奈川県畜産課） |
| 2 | 管内育成牧場における地域一体となった牛ウイルス性下痢・粘膜病対策
中村みどり（千葉県南部家保），他 | 12 | C群ロタウイルスが関与した子牛の集団下痢症
大竹祥紘（栃木県県央家保），他 |
| 3 | 牛ウイルス性下痢ウイルス持続感染牛摘発農場の清浄化への取り組みと課題
小野祥平（群馬県吾妻家保） | 13 | C群ロタウイルスの関与が疑われた哺乳豚における下痢の集団発生
新楽和孝（栃木県県南家保），他 |
| 4 | BVDV持続感染牛診断における抗原エライザ法とイムノクロマト法の応用
矢口裕司（茨城県県北家保），他 | 14 | 子牛の <i>Fusobacterium necrophorum</i> 感染症発生事例
高橋優花（山梨県東部家保），他 |
| 5 | 管内一酪農場における牛ウイルス性下痢ウイルスの清浄化事例
田邊ひとみ（茨城県鹿行家保），他 | 15 | 細菌性血色素尿症と慢性銅中毒の複合的要因により発症した血色素尿牛3症例
藤井勇紀（茨城県県北家保），他 |
| 6 | 施設による繁殖改善技術の検討
三山紗衣子（東京都農林総合研究センター），他 | 16 | 山羊のクロストリジウム・パーフリンゲンス感染症の発生事例
林 朋弘（東京都家保），他 |
| 7 | バルク乳検査を用いた地域酪農協の乳質改善への取り組み
関谷圭美（千葉県東部家保），他 | 17 | 茨城県県西地区の養鶏場周辺の野鳥センサス
福井祐子（こまち動物病院・茨城県），他 |
| 8 | 19カ月齢まで生存したファロー五徴症のホルスタイン種育成牛の1症例
中村芳弘（ちばNOSAI連），他 | 18 | 牛白血病ウイルス高度汚染農場における清浄化の試み
山中梨沙（埼玉県熊谷家保），他 |
| 9 | ちばNOSAI連ハードヘルスシステムを利用した酪農版ベンチマーキングについて
清水秀茂（ちばNOSAI連），他 | 19 | 乳牛における牛白血病ウイルス感染と繁殖障害および下垂体機能との関連の一考察
田中秀和（ちばNOSAI連），他 |
| 10 | 乳牛の尾根部血流測定による発情発見の試み | 20 | ヨーネ病高度汚染農場におけるリアルタイムPCRを活用した患畜摘発事例
石原径佳（埼玉県中央家保），他 |

犬の副腎腫瘍の鑑別診断における造影超音波検査の有用性

南雲隆弘, 石垣久美子, 吉田織江, 掘切園 裕, 飯塚恵悟, 浅野和之, 他

日本大学生物資源科学部獣医学科獣医外科学研究室

はじめに

医学領域において、造影超音波検査は肝臓腫瘍の鑑別診断に臨床応用されており、肝臓腫瘍以外にもさまざまな部位や疾患においてその有用性が検討されている。また、小動物医療においても造影超音波検査を用いた肝臓腫瘍の鑑別診断の研究などが行われている。

原発性副腎腫瘍は皮質由来と髄質由来に分類されるが、犬では皮質由来として腺腫及び腺癌、髄質由来として褐色細胞腫が一般的である。発生由来によって腫瘍の性質が異なり、治療成績や周術期管理も異なることから、皮質由来か髄質由来かを術前に鑑別しておくことは臨床的に重要であるものの、現状では十分に確立されていない。そこで、本研究の目的は犬の副腎腫瘍の鑑別診断として超音波診断用造影剤ソナゾイド（第一三共）を用いた造影超音波検査の有用性を検討することである。

方 法

2016年2月から2017年9月にかけて日本大学動物病院外科に来院し、副腎腫瘍摘出術を行った犬29症例を対象とした。手術前日にソナゾイド0.015ml/kg静注し、Aplio400（東芝メディカル）を用いて造影超音波検査を行った。6MHzコンベックス型プローブにて副腎腫瘍の矢状断面像を描出し、Contrast harmonic imagingの条件下で5分間観察を行った。集積した画像データから直径8mmの関心領域を置き、Time intensity curve(TIC)を描出してGraphPad Prism6（エムデーエフ）を用いて近似曲線を作成した。この曲線からPeak signal intensity (PI), Time to peak signal intensity(TPI), Mean transit time(MTT), Up slope, Down slopeを腫瘍ごとに算出した。PIを最高輝度、TPIを立ち上がりからPIまでの時間、MTTをPIの50%輝度に達した時間から50%輝度にまで減弱する時間、Up slopeはPIの10%輝度から85%輝度の傾き、Down slopeはPIの85%から40%輝度の傾きと定義した。摘出腫瘍は病理組織学的検査に供し、造影超音波所見と比較検討した。統計学的分析において腫瘍群間における各パラメータの比較にはKruskal-Wallis検定を行い、*P*値が0.05未満のものを有意差ありと判断した。

結 果

29症例から摘出された腫瘍は合わせて30結節であり、副腎皮質腺腫5結節、副腎皮質腺癌7結節、褐色細胞腫18結節と診断された。褐色細胞腫1結節では検査中における体動が激しく、副腎皮質腺癌1結節では腫瘍の破裂

があり、それら2症例ではTICが描出できなかったため、解析に用いることができなかった。TICが描出できた残りの28結節のうち、2結節（副腎皮質腺腫及び腺癌が各1結節）では肉眼的に染影が認められなかった。染影された26結節を解析したところ、特徴的な造影超音波所見として褐色細胞腫では急速に増強され、急速に減少していったのに対し、副腎皮質腺腫及び腺癌では造影の減少速度が緩徐であった。PIでは統計学的有意差は認めなかったが、褐色細胞腫において高い傾向が認められた。TPIでは褐色細胞腫と副腎皮質腺癌で有意差を認め、MTT及びDown slopeでは褐色細胞腫と副腎皮質腺腫、及び褐色細胞腫と副腎皮質腺癌の間でそれぞれ有意差を認めた。Up slopeにおいて統計学的有意差は認められなかったが、褐色細胞腫で大きい傾向が認められた。

考 察

今回、犬の副腎腫瘍における特徴的な造影超音波所見が明らかとなり、特に褐色細胞腫では急速に染影され、急速に減少していく傾向が認められたことから、褐色細胞腫の術前鑑別診断として造影超音波検査は有用であることが示唆された。術中において、褐色細胞腫ではカテコラミン分泌が促され、高血圧、頻脈、不整脈などが生じ、心停止に陥ることもあるため、 α 遮断薬や β 遮断薬による周術期管理が重要である。一方、副腎皮質腫瘍ではコルチゾール分泌が多いと感染や治療遷延だけでなく、血栓が塞栓して多臓器不全に陥る危険性があるため、ヘパリンなどの周術期管理が考慮される。したがって、周術期の投薬管理を計画する上において、術前に無麻酔で実施できる造影超音波検査の臨床的意義は高いものと考えられた。しかし、今回の研究から造影超音波検査単独では副腎皮質由来の腺腫と腺癌を鑑別することは困難であった。また、症例の体動が激しい場合には鎮静や麻酔が必要であると考えられた。また、腫瘍の破裂から出血を生じてTIC描出が困難であった2結節及び十分な染影が得られずにTIC解析ができなかった2結節では、病理組織学的検査で広範囲に壊死が認められたことから、出血や壊死領域が大きい場合には造影超音波検査による診断には限界があると考えられた。以上のことから、犬の副腎腫瘍に対する造影超音波検査は、褐色細胞腫の術前鑑別診断には有用であり、臨床的意義は大きいことが示された。造影超音波検査による術前鑑別診断を精度良く実施するためには、造影剤の投与量や染影パターン、観察時間、鎮静や麻酔の影響などさらなる検討が必要であると考えられた。

仙腸関節脱臼13症例に対する最小侵襲手術と通常手術の比較

小林 聡^{1),2)}, 森 淳和^{1),2)}, 安川慎二^{1),2)}, 小寺祥平^{1),2)},
伊澤幸甫^{1),2)}, 岸 陽子^{1),2)}

1) ONE for Animals・横浜市, 2) DVMs どうぶつ医療センター横浜

はじめに

仙腸関節脱臼は小動物整形外科で一般的な疾患で観血的に脱臼した仙腸関節の整復固定を行うことが多い。しかし仙腸関節周囲は筋肉が多く、関節周囲の筋肉を切断し脱臼整復する従来の方法は、広範囲の筋損傷が予測される。そのためX線透視装置で仙腸関節の脱臼整復を行い最小限の部分のみを切開する最小侵襲手術(Minimally Invasive Surgery: MIS)で治療する方法が近年発表されている。しかし、実際にMISによりどの程度の筋肉への影響が避けられるかを明確に示す報告はない。そこで今回、仙腸関節周囲の筋群の中で、X線画像上で評価可能な中臀筋を用い手術法の違いによる筋肉量の比較を行った。

材料及び方法

2008年から2017年までDVMs どうぶつ医療センター整形外科を受診し、仙腸関節脱臼と診断し手術を行った55症例で仙腸関節脱臼の整復固定のみを行った13症例を用いた。X線透視下で脱臼を整復し、必要部分のみを切開し、中臀筋の筋間よりインプラントを挿入した症例をMIS群とした。定法通り腸骨翼の筋肉附着部を剝離し仙腸関節を目視で確認し固定を行った症例を通常

群とした。両群に対して月齢・体重・種別・治療期間・自力歩行が可能となるまでの日数・術後と最終診察時のX線画像での中臀筋の変化量を測定した。

結 果

MIS群と通常群の月齢は78.0カ月 \pm 60.6と55.5カ月 \pm 31.3で体重は6.7kg \pm 6.5と5.0kg \pm 2.9、種別はネコ4頭イヌ2頭とネコ2頭イヌ5頭であった。治療期間はMIS群64.0日 \pm 18.5、通常群79.3日 \pm 21.5でMIS群が短い傾向が認められた。自力歩行可能となるまでの日数はMIS群1.6日 \pm 0.9、通常群4.0日 \pm 2.2でありMIS群で有意に短く($P<0.05$)。中臀筋の変化量はMIS群3.9% \pm 2.9、通常群13.7% \pm 6.8でMIS群では術後の中臀筋の筋量低下は有意に少なかった($P<0.05$)。

考 察

今回、MISにて仙腸関節脱臼の整復固定を行うことで、通常群と比較し、早期の機能回復と中臀筋の筋量減少が抑えられたことから、X線透視下で整復が可能な場合にはMISの適応を行うことが好ましいと考えられた。しかし本検討では単純X線画像のみの比較であることと症例数や種別にばらつきあることが制限として挙げられるため今後、症例数を増やした検討が必要である。

〔参考〕平成29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〕

- 1 里犬の心疾患55例におけるDダイマーを用いた血栓危険因子の検討
松本花穂 (ACプラザ荏谷動物病院), 他
明治通り病院・東京都
- 2 去勢手術後の自宅療養中に心原性肺水腫を呈した若齢猫に対し挿管管理が有効であった1例
塗木貴臣 (TRVA夜間救急動物医療), 他
センター・東京都
- 3 体外循環下で修復を行った不完全型房室中隔欠損症の猫の1例
篠田麻子 (JASMINE どうぶつ循環器病), 他
センター・横浜市
- 4 外科手術を実施した右心耳由来血管肉腫の犬の1例
長谷往明 (はせ動物病院・千葉県), 他
- 5 犬の開心術後に認められる横隔神経麻痺に関する回顧的調査

- 6 鼻咽頭節外病変を生じた節性濾胞辺縁帯リンパ腫の犬の1例
関戸あずさ (麻布大附属動物病院), 他
- 7 多種免疫抑制薬不応性の骨髄線維症がオクラシニブ治療により寛解した犬の一例
菊田麗衣 (浦安中央動物病院・千葉県), 他
- 8 犬の皮膚形質細胞腫におけるクローナリティ検査の感度調査
鷹栖雅峰 (那須野ヶ原アニマル), 他
クリニック・栃木県
- 9 東洋眼虫の群馬県内における発生状況の調査
田村 誠 (たむら動物病院・群馬県)
- 10 犬の角膜ジストロフィーに対する低脂肪食の治療効果についての回顧的検討
細尾 碧 (つだ動物病院・神奈川県), 他
- 11 犬の副腎腫瘍の鑑別診断における造影超音波検査の有用性
南雲隆弘 (日大獣医外科), 他
- 12 脾臓線維組織球性結節の回顧的研究および予後に関

する検索

- 岡野久美子 (日本動物高度医療センター・川崎市), 他
- 13 犬の腫瘍性腹腔内出血手術症例における短期的予後指標について 93 症例を用いた回顧的研究
杉浦洋明 (DVMs どうぶつ医療センター横浜救急診療センター・横浜市)
- 14 上顎扁平上皮癌に対してカルボプラチン超選択的動注化学療法併用放射線療法を実施した猫の 1 例
金井詠一 (麻布大), 他
- 15 上皮小体腺腫の犬の 1 手術例
伊藤雄基 (とがさき動物病院・埼玉県), 他
- 16 *Anaplasma phagocytophilum* 感染症を発症した犬の 3 例
福井祐一 (こまち動物病院・茨城県), 他
- 17 猫における同居猫への攻撃行動に対して薬物療法が奏功した一例
野口ゆづる (さきがおか動物病院・千葉県), 他
- 18 手術見学可能な個室を利用した飼い主へのアンケート結果について
藤井聖久 (くすの木動物病院・東京都)
- [B 会場]**
- 1 献血時の鎮静下採血におけるアルファキサロンの検討
仙波恵張 (日本動物医療センター・東京都), 他
- 2 頭蓋内疾患を疑う犬の MRI 検査におけるセボフルラン麻酔法の検討
関 瀬利 (日大獣医麻酔・呼吸器学), 他
- 3 排尿困難を呈した三毛猫の性分化異常症, 38,XY SRY-negative の 1 例
保坂 敏 (ほさか動物病院・神奈川県), 他
- 4 ガイドワイヤーの使用により尿路確保が可能となった尿道異常 (尿道腫瘍, 尿道損傷, 尿道炎) の 4 例
山崎寛文 (日本動物高度医療センター・川崎市), 他
- 5 外科手術を実施した猫の尿管閉塞 22 例
青木 大 (あおき動物病院・神奈川県), 他
- 6 卵巣摘出術から 14 年後に子宮蓄膿症を発症した犬の 1 例
三國まどか (藤井動物病院・横浜市), 他
- 7 Feline Ceruminous Cystomatosis の 2 例
山下啓吾 (麻の葉動物病院・埼玉県), 他
- 8 耳科外科手術の関与しない Para-aural abscess の犬 2 例
今井昭宏 (どうぶつの総合病院・埼玉県), 他
- 9 食物アレルギーのネコの 3 例
高橋聡一郎 (麻布大学), 他
- 10 猫の Monteggia 骨折に関する検討
森 淳和 (ONE for Animals・横浜市), 他
- 11 チタンシステムにより骨接合術を実施した橈尺骨骨折の犬猫 103 肢の治療成績
池田人司 (オールハート動物リファーマルセンター・東京都), 他
- 12 歩行可能な椎体骨折の犬の 1 手術例
灰井康佑 (とがさき動物病院・埼玉県), 他
- 13 四肢麻痺に対し 4 輪車イスを用い理学療法を行った 2 症例
岸 陽子 (ONE for Animals・横浜市), 他
- 14 仙腸関節脱臼 13 症例に対する最小侵襲手術と通常手術の比較
小林 聡 (ONE for Animals・横浜市), 他
- 15 パワードブラ法血流増加シグナルで炎症性関節疾患を評価した犬の 2 例
安川慎二 (ONE for Animals・横浜市), 他
- 16 急性特発性多発性根神経炎の犬の 1 例
桑原孝幸 (桑原動物病院・群馬県), 他
- 17 誤食にて夜間救急に来院した犬に対してトラネキサム酸による催吐処置を実施した 541 例の回顧的研究
塗木貴臣 (TRVA 夜間救急動物医療センター・東京都), 他
- 18 猫におけるトラネキサム酸およびメドミジンを用いた嘔吐誘発の評価: 60 症例 (2013-2016)
伊藤和人 (TRVA 夜間救急動物医療センター・東京都), 他
- 19 胆嚢摘出術を行った猫 12 例の術後成績の検討
林 諒 (AC プラザ荻谷動物病院・東京都), 他
- 20 慢性偽性腸閉塞と診断し, 長期経過が得られている犬の一例
高橋洋介 (動物救急センター文京・東京都), 他

狂犬病ウイルスのリアルタイムPCRの精度向上に関する検討

水越文徳¹⁾, 井上 智²⁾, 野口 章²⁾, 畠山 薫³⁾, 船渡川圭次¹⁾, 桐谷礼子¹⁾

1) 栃木県保健環境センター 微生物部, 2) 国立感染症研究所 獣医科学部,
3) 東京都健康安全研究センター 微生物部病原細菌研究科

背 景

狂犬病は、世界で毎年5.5万人以上が犠牲になっている動物由来感染症であり、その多くがアジア及びアフリカに集中している。日本は清浄国だが、海外で感染して帰国後に発症する事例が数例報告されている。また、狂犬病発生国からのコンテナや貨物船を介して、感染した動物が侵入する危険性もある。したがって、清浄国の日本でも、狂犬病の対策と検査体制の確立・維持は今後の重要な課題である。

目 的

狂犬病ウイルス (Rabies Virus : RaV) の検出では、感度の高い遺伝子増幅検査が良く用いられる。その検査では、標的とするウイルス遺伝子をそのまま陽性コントロールとして使用することが多い。この方法では、検体に陽性コントロールがコンタミネーションした場合、感染例なのか実験室内汚染なのかを区別することは困難であり、偽陽性を導く危険性もある。また、組織からの核酸抽出やPCR反応系のテクニカルエラーにより偽陰性になることもある。そこで、このような偽陽性・偽陰性を避けるため、参照陽性コントロール (artificial positive control : APC) を用いた遺伝子検査系の構築を検討した。以前、われわれはConventional PCRのRaV検査において、標的遺伝子の分子量を大きくして偽陽性を除外するシステムを構築した [1]。一方、近年、より高感度のリアルタイムPCRが普及し、さまざまな病原体の遺伝子検出試験で応用されている。本研究では、リアルタイムPCRでも、付加的な塩基配列を陽性コントロールに挿入することによって、異なるシグナルが検出されるように改良した。その結果、リアルタイムPCRでも偽陽性の危険性を回避できるシステムを樹立したので報告する。

方 法

本研究では、*N* 遺伝子にイヌの内在性遺伝子のGlyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) などを挿入したConventional PCR用のAPC [1] を基に、リアルタイムPCRのprobe領域に隣接する部位に別のprobeを認識する塩基配列を挿入した。遺伝子の組み替え・挿入は、制限酵素を用いたクローニングやinverse PCR法による変異導入などの分子生物学的手法を用いた。RaVとGAPDHを標的としたリアルタイ

ムPCRは、それぞれHatakeyama K, et al [2], Jane E. Sykes, et al [3] の方法を用いた。蛍光シグナルは、RaVにFAM, GAPDHにNED, 付加的に挿入した配列にVICを割り当てた。それらのリアルタイムPCRは、標的のシグナルと付加したシグナルを同時に検出するduplex系で実施した。作成したAPCの有用性は、蛍光シグナルの反応性で検討した。

結 果 と 考 察

本研究で構築したシステムは、特異性や感度などの精度を保つために、RaVを検出する系とGAPDHを検出する系を独立して実施した。従来、リアルタイムPCRは、野生型の標的1つにつき、1つのシグナルが検出される。本研究で作成したAPCでは、RaV検出系において、2つのシグナルが検出されることが確認された。このように、野生型と陽性コントロールであるAPCとでは検出されるシグナルが異なる。よって、サンプル中へ陽性コントロール (APC) がコンタミネーションした場合、付加的なシグナルも検出されて、偽陽性が容易に判断できる。

また、GAPDH検出系でも同様の結果となった。RaV検査では脳組織が検体とするが、脂肪を多く含む脳組織は核酸抽出の効率がしばしば低下することもある。GAPDHのような、どの細胞にも普遍的に一定量のmRNAが存在する内在性遺伝子の検出は、検体から確実に核酸が抽出されていることの証明となる。したがって、GAPDHの検出も併せて実施すれば、偽陰性を除外することが出来る。

さらに、RaVとGAPDHに対するシグナルは、コピー数依存的に検出が可能であった。よって、検量線を作成すれば、検体中のRaV量も定量することが可能であり、病態などの研究にも応用が期待される。

また、このAPCは以前に報告したプラスミドを基に改良したので [1]、Conventional PCRでも、偽陽性を除外することが出来る (挿入した遺伝子により野外型に比べて増幅産物の分子量が大きくなる)。一方、リアルタイムPCRはより高感度である反面、微量のコンタミネーションでも偽陽性になる危険性がつきまとう。したがって、信頼度の高い結果を得るためには、これらのリスクを回避した事を保証するデータが必要になる。本研究で構築したAPCのシステムは、Conventional PCRだけでなく、リアルタイムPCRでも検査データを基に偽陽性と偽陰性を除外することが可能になり、RaVの

遺伝子検査の信頼性と妥当性を向上させる強力な検査ツールとなる。

参 考 文 献

[1] 平成27年度 日本獣医師会獣医学術学会年次大会「狂犬

病ウイルス遺伝子検査の精度向上に関する調査研究」

[2] Hatakeyama K et al : Ann. Rep. Tokyo Metr. Inst. Pub. Health, 60, 49-54 (2009)

[3] Jane E. Sykes et al : J. Vet. Intern. Med., 21, 685-693 (2007)

〔参考〕平成29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 豚の疣贅性心内膜炎と類似病変の鑑別について
森田由紀子（横浜市食肉衛検），他 | 7 狂犬病ウイルスのリアルタイムPCRの精度向上に関する検討
水越文徳（栃木県保健環境センター微生物部），他 |
| 2 豚の感染性心内膜炎におけるCC1, CC28に属する
<i>Streptococcus suis</i> の浸潤状況及び薬剤感受性
柳 雅之（神奈川県食肉衛検） | 8 鶏皮膚扁平上皮癌の形成過程における病理学的検索
佐藤孝志（埼玉県衛研），他 |
| 3 生体検査時における蕁麻疹型豚丹毒の検査方法
中村貴則（高崎市食肉衛検），他 | 9 牛の胸腺に発生したB細胞リンパ腫の一例
岡本 翼（茨城県西食肉衛検），他 |
| 4 犬猫の尿検体におけるESBL産生菌の検出状況と薬剤感受性
佐野匡謙（中川動物病院・東京都），他 | 10 ATPふき取り検査を活用した大規模食鳥処理場の衛生指導法の検討
松原翔吾（山梨県食肉衛検），他 |
| 5 県内で捕獲されたイノシシにおけるカンピロバクター属菌の保菌状況
仁和岳史（千葉県南総食肉衛検），他 | 11 レジオネラ属菌が検出された公衆浴場に対する衛生指導について
鈴木香世（茨城県古河保健所），他 |
| 6 茨城県内における日本脳炎ウイルス浸潤状況について
後藤慶子（茨城県衛研），他 | 12 動物病院における動物由来感染症モニタリング事業結果
鈴木 良（東京都環境保健衛生課），他 |