

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（九州地区選出演題）

[日本産業動物獣医学会]

産地区—1

黒毛和種子牛の尿閉における尿道フラップ開口術の検討

綿屋健太<sup>1)</sup>，綿屋福一<sup>2)</sup>，乙丸孝之介<sup>1)</sup>，安藤貴明<sup>3)</sup>，窪田 力<sup>3)</sup>

1) 鹿児島大学共同獣医学部附属動物病院，2) (有)綿屋家畜医院，3) 鹿児島大学共同獣医学部繁殖学教室

近年，濃厚飼料の多給に伴い黒毛和種子牛の尿石症が増加している。不完全尿閉の場合には尿石溶解剤の投与や尿のpH調整または利尿による加療が行われるが，完全尿閉の場合には子牛においても尿道造瘻術が実施される。尿道造瘻術にはさまざまな術式があるが，一般に実施されている会陰部に尿道を単純に開口する術式では飼育の継続により開口部の埋没や再閉塞が発生することから，肥育など長期間の飼育に堪える尿道造瘻術が求められている。われわれは，尿道造瘻術を施した肥育素牛を長期飼育するため，尿道造瘻に陰茎提鞴帯の切除につづいて尿道を広域に切開し会陰部にフラップ状に形成する尿道フラップ開口術（以下，フラップ法）を試み，良好な成績を得ていることから，最近，この術式を施した黒毛和種去勢牛の4例について報告する。

背 景

従来の尿道造瘻術は尿道を会陰または鼠経部に引き出し，尿道切開を行い単純に会陰または鼠経部に開口させるもので，成書では排尿障害を一時的に緩和させる廃用出荷のための対処療法とされている（以下，従来法）。近年，子牛の尿石症の発生が増え，完全尿閉により尿道造瘻術が施されることも少なくなく，肥育農場では尿道造瘻術を施された子牛を購入する例も増えている。肥育飼養により，臀部，大腿部の筋肉の発達に伴う尿道開口部の埋没や尿道露出面の皮膚の癒合による尿道開口部の閉塞が起り，飼育の継続が不可能となる場合も多く，長期の肥育飼育に対応する新たな術式の検討がもたれた。

症 例

尿石症により完全尿閉を呈した黒毛和種去勢牛4～8カ月齢の4症例においてフラップ法を実施した。症例1～3はそれぞれ4カ月齢，5カ月齢，3カ月齢時に従来法で手術されていたが，症例1と2は術後4カ月後に，症例3は1カ月後に再尿閉を呈したため，フラップ法で再手術を行った。症例4は4カ月齢で完全尿閉を呈したためフラップ法で手術を行った。

方 法

尾椎硬膜外麻酔（動物用塩プロ注「KS」5ml）後，肛門より約5cm下の会陰部正中を約15cm切開し陰茎を鈍性剥離により露出させた。続いて，切開部上部に指を挿入，座骨弓を触知し，座骨弓から尿道に伸びる陰茎提鞴帯を切除した。鞴帯切除後，尿道を約15cm遊離させ，遠位部を切断し尿道に約10cmの縦切開を加え，尿道粘膜面を広く開けるようにした（尿道フラップ）。尿道フラップを広く縫合できるように，会陰部皮膚を左右5cm程度の楕円に剪除し新鮮創面を作成し，尿道フラップの尿道粘膜面が楕円状に引っ張られるように皮膚と縫合した。手術後は排尿の確認を行い，術後7日間は抗生物質を投与し，術部はイソジンによる消毒を3日間行った。

結 果

症例1は手術後23カ月間肥育され31カ月齢で通常出荷された。症例2～4は，それぞれ17カ月，12カ月，17カ月経過し，2017年11月現在も排尿に異常はなく肥育されている。

ま と め

一般的に実施されていた尿道造瘻術は尿閉の緊急解除を目的とするもので，その後の飼育により開口部の埋没や再閉塞が発生することがあった。このことから，長期の肥育飼養に対応できる尿道造瘻術として，陰茎提鞴帯切除と尿道フラップ開口術を検討した。フラップ法には，従来法より陰茎を長く遊離する必要があり，陰茎提鞴帯切除により容易に十分な長さの陰茎の遊離が可能となった。つぎに尿道粘膜面を広く切開しフラップ状に会陰部に形成したことにより，尿道の開口部及び術部が傷の修復過程において皮膚により覆われることなく，臀部の筋量増加により埋没することもなかった。われわれはこれまで10年以上にわたり数十例に同様の尿道フラップ開口術を施し，長期飼育が行われていることから，陰茎提鞴帯切除につづく尿道フラップ開口術は長期の肥育飼育が可能な尿道造瘻術であると考えている。

牛の呼吸器粘膜免疫ダイナミズムにIFN- $\gamma$ が与える影響石川真悟<sup>1)</sup>, 溝口隆悟<sup>1)</sup>, 津曲圭太<sup>2)</sup>, 林 淳<sup>3)</sup>, 藏前哲郎<sup>4)</sup>, 帆保誠二<sup>1)</sup>, 他

1) 鹿児島大学, 2) 曾於農業共済組合, 3) NOSAIみやざき, 4) 藏前動物病院

## はじめに

牛の呼吸器病は死傷事故による直接的な被害だけでなく、発育不良、肉質の低下、繁殖率の低下、飼料効率の低下、一部廃棄などの間接的な被害を引き起こし、その経済的な損失は計り知れない。そのため、呼吸器病のコントロールは産業動物獣医療における大きな課題の一つであるが、呼吸器病はさまざまな要因が絡み合って発症する複合病であることから、未だ解決には至っていない。多種多様な病原体が関わることから、呼吸器病をコントロールするために最も重要な要因は呼吸器における免疫機構をコントロールすることであると考えられる。呼吸器はガス交換という生理的な機能を担うことから、体の内側に存在しながら外界と接している「内なる外」という特殊な粘膜環境にある。よって、常に病原性微生物のみならずディーゼルやアスベストなどの非生物系粒子状物質などの外来性異物に暴露されていることから、その処理のために特殊な粘膜免疫システムが存在することがヒトやマウスにおける研究で明らかとなってきた。しかし、牛の呼吸器における粘膜免疫システムはほとんど明らかとなっていなかった。そこでわれわれは気管支肺胞洗浄 (BAL) により回収した気管支肺胞洗浄液 (BALF) 中の免疫細胞を解析することで、牛の呼吸器粘膜免疫システムについて研究を行ってきた。これまでの研究で、牛の呼吸器粘膜では、健常時は肺胞マクロファージ (AM) がほぼ100%の割合で存在するが、感染時にはAMに加えて、まずリンパ球が浸潤し、感染が重度になるとほぼ好中球と置き換わるという免疫ダイナミズムを有していることが分かった。AMについて詳しく見てみると、健常時にはCD21を強発現しているが、感染時にはCD21の発現が減少しMHC Class IIの発現が増加していた。このAMの特性の変化が免疫ダイナミズムに強く影響を与えると考えられAMの特性の変化に関与する因子の解明が、牛の呼吸器粘膜免疫システムの解明につながると考えられる。そこで、AMの変化に関わる因子について検討するために、呼吸器粘膜における液性因子について検討したところ、感染時にIFN- $\gamma$ の濃度が増加していることが分かった。そこで本研究では*in vitro*においてAMにIFN- $\gamma$ が与える影響を解析することにより、牛の呼吸器粘膜免疫ダイナミズムに関わる因子を明らかにすることを目的とした。

## 材料及び方法

試験には、ホルスタイン種子牛4頭を供試し、BAL

により採取したBALFから密度勾配遠心法によりAMを分離した。分離したAMをRPMI1640培地またはRPMI1640+bovine recombinant IFN- $\gamma$  (rboIFN- $\gamma$ ; 5ng/ml)培地で72時間培養し、培養後のAMについて貪食能、表面抗原発現及びサイトカイン発現量を解析した。

## 結 果

IFN- $\gamma$ 刺激により、貪食能が低下した。表面抗原発現については、IFN- $\gamma$ 刺激によりCD21の発現が大きく低下する一方でMHC Class IIの発現が大きく増加した。遺伝子発現量については、IFN- $\gamma$ 刺激によりiNOS及びCCL5の発現が増加した。

## 考 察

IFN- $\gamma$ 刺激により牛AMの特性が大きく変化した。特に、CD21発現の減少及びMHC Class II発現の増加は、これまでに肺炎発症牛で認められてきた変化と同様であった。CD21はCR2と呼ばれる補体レセプターで、一般的にはB細胞や濾胞樹状細胞に発現しており未消化抗原の補足に関わっているとされる。健常時のAMはCD21を強発現し非常に高い貪食能を有していることから、エフォートを未消化抗原の貪食に割いていると考えられる。一方、IFN- $\gamma$ によりAMの貪食能及びCD21発現が減少し抗原提示に関わるMHC Class II発現が増加したことから、IFN- $\gamma$ によりAMのエフォートが未消化抗原の貪食から消化抗原の提示へと変化しているということが考えられた。さらに、リンパ球を炎症部位に呼び寄せるケモカインであるCCL5及び血管拡張作用を有する一酸化窒素を合成するiNOSの発現増加は、呼吸器粘膜へ組織や血液中のリンパ球を誘引する作用を増強しているということが考えられた。以上から、IFN- $\gamma$ は健常時にはAMにより未消化抗原を貪食・処理することを主体としていた呼吸器粘膜免疫ダイナミズムをリンパ球と協調した免疫動態へと変化させる作用を有していることが考察された。感染の初期や、近年使用が増えてきた呼吸器粘膜ワクチンを投与した際にも、実際に呼吸器粘膜においてIFN- $\gamma$ 濃度の上昇、CD21発現の減少、MHC Class II発現の上昇及びリンパ球の浸潤が認められることから、IFN- $\gamma$ による呼吸器粘膜ダイナミズムの調節は、呼吸器における感染防御において中心的な役割を果たしていると考えられる。

## 非化膿性脳脊髄炎症例における中枢神経からの 牛アストロウイルス検出と浸潤状況調査

平島宜昌<sup>1)</sup>, 岡田大輔<sup>1)</sup>, 柴田昭一<sup>2)</sup>, 吉田 周<sup>3)</sup>, 藤園昭一郎<sup>1)</sup>

1) 鹿児島中央家畜保健衛生所, 2) 南薩家畜保健衛生所, 3) 始良家畜保健衛生所

### はじめに

牛アストロウイルス (BoAstV) は下痢発症の有無を問わず, 国内外の牛糞便中から広く検出されるウイルスであり, 国内の検出株は大きく2系統に分類されることが報告されている。近年, 欧州や北米において, 散発性牛脳脊髄炎 (SBE) 症例で神経症状を呈した牛の中枢神経 (CNS) から新たな遺伝子型 (CH13/NeuroS1 型等) の BoAstV が検出され, その関与が示唆されている。2016年12月, 神経症状を呈した肥育牛の CNS において, 非化膿性脳脊髄炎が認められるとともに, BoAstV 遺伝子が検出された。今回, 発症牛の病性鑑定に加え, 発生農場及び鹿児島県内の飼養牛における BoAstV 浸潤状況調査を実施した。

### 発生状況

2016年12月, 黒毛和種肥育牛150頭を飼養する農場で, 16カ月齢の肥育牛1頭が神経症状, 発熱, 食欲低下及び下痢を呈し, その後起立不能となったため鑑定殺された。剖検では CNS に肉眼的な著変は認められず, また, 神経症状に関連するウイルス及び細菌等は検出されず, 大脳皮質への紫外線照射による自家蛍光は観察されなかったことから, 神経症状の原因は特定されなかった。

### 材料と方法

(1) **病性鑑定**: 発症牛の CNS, 主要臓器, 小腸内容, 血清及び脳脊髄液を採取し, 病理組織学的検査, BoAstV (ORF1b) の RT-PCR 及びウイルス分離を実施した。BoAstV 遺伝子が検出された場合には, 塩基配列決定後, 分子系統樹解析を実施した。

(2) **BoAstV 浸潤状況調査**: 発生約3カ月後の発生農場飼養牛の直腸便17頭分及び2012～2017年の病性鑑定材料延べ18戸166頭分について, RT-PCR

(BoAstV) を実施した。また, 発生農場飼養牛の材料の一部については次世代シーケンシング (NGS) 解析に供した。

### 成績

(1) **病性鑑定**: 病理組織学的検査で, CNS にリンパ球及びマクロファージ主体の囲管性細胞浸潤, グリア結節及び軸索膨化を認めた。RT-PCR で CNS から BoAstV 遺伝子 (KagoshimaSR28-462 株) が検出され, 遺伝子解析で CH13/NeuroS1 型に分類された。なお, 3代継代したがウイルスは分離されなかった。

(2) **BoAstV 浸潤状況調査**: 発生農場の17検体中3検体及び2012～2017年の病性鑑定材料166検体中22検体から BoAstV 遺伝子が検出された。このうち17検体を遺伝子解析したところ, 1検体を除き既報の BoAstV 国内株の系統1または2のいずれかに分類された。NGS 解析に供した11検体中2検体から BoAstV 遺伝子が検出され, その塩基配列は KagoshimaSR28-462 株に99～100%一致した。

### 考察

発症牛の病性鑑定成績から本症例における BoAstV の関与が疑われた。発生農場では, 農場内に常在していた或いは発症牛より排泄されたウイルスが, 糞便中への排泄と経口感染を繰り返しながら, 飼養牛間で長期に渡り循環していると推察された。鹿児島県内には多様な遺伝子型の BoAstV が浸潤していることが確認されたが, KagoshimaSR28-462 株は従来の国内株と遺伝学的に区別され, 国内新規の遺伝子型と考えられた。今後, 感染から脳脊髄炎発症に至る要因や体内分布, CH13/NeuroS1 型の BoAstV の浸潤状況について, さらなる広域な調査及び遡及的解析による実態解明が必要と思われる。

## 福岡県内で発熱を呈した牛からの流行性出血病ウイルス (EHDV) の分離と EHDV 検出用 RT-PCR 法の新規プライマーの開発

山本訓敬<sup>1)</sup>, 白藤浩明<sup>2)</sup>, 広松理希<sup>3)</sup>, 甲斐田美菜<sup>3)</sup>, 加藤友子<sup>4)</sup>, 梁瀬 徹<sup>2)</sup>

- 1) 福岡県両筑家畜保健衛生所,
- 2) 国研農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究部門九州研究拠点,
- 3) 福岡県中央家畜保健衛生所,
- 4) 国研農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究部門海外病研究拠点

### はじめに

流行性出血病ウイルス (Epizootic hemorrhagic disease virus: EHDV) は、レオウイルス科オルビウイルス属に分類され、ヌカカが媒介するアルボウイルスである。牛では不顕性感染が多いとされるが、発症牛では発熱、嚥下障害や流死産への関与が報告されている。EHDVは7つの血清型が知られており、イバラキ病を引き起こすイバラキウイルス (Ibaraki virus: IBAV) は EHDV 血清型 2 に分類される。また、過去に国内で発生したイバラキ病様疾病では、発症牛から EHDV 血清型 6 や EHDV 血清型 7 (EHDV-7) が検出あるいは分離されており、いくつかの血清型の間には血清学的な交差性も報告されている。

### 概要

2016年9月下旬、福岡県内の肉用繁殖牛農場において、繁殖牛と育成牛に発熱を主徴とする臨床症状を認めため、感染症を疑い病性鑑定を実施した。その結果、本症例を EHDV によるイバラキ病様疾病であると診断した。また、病性鑑定における遺伝子検査の過程で、一般的に利用されている既報の RT-PCR 法 (Ohashi *et al.*, 2004) におけるプライマー (現行プライマー) では、本症例のウイルス株に対する検出感度が顕著に低いことが判明した。この問題を解決するために、より感度と特異性の高い新規プライマーの開発を行った。

### 材料と方法

- (1) 発熱牛 13 頭の継続的な検温を実施した。また、発熱牛 11 頭の血液材料を用いて生化学的検査やウイルス分離、RT-PCR 法、シーケンス解析、中和試験などのウイルス学的検査を実施した。平成 28 年度牛流行熱等抗体調査 (発生予察) の牛血清を用いた中和試験も実施し、発生予察の結果と本症例で分離したウイルス株との関連について調べた。
- (2) シークエンスにより現行プライマーの分離ウイルス株に対するマッチングについて調べた。また既報の EHDV の塩基配列を参考にして、現行プライマーで検出される 533 塩基を含む、ゲノム分節 3 の 674 塩基を検出するプライマーセットを設計し、分離ウイ

ルス株、既報の EHDV 国内分離株 19 株及び国外分離株 2 株、EHDV を除くアルボウイルス 9 株、病性鑑定の牛血液材料 8 検体を用いて RT-PCR 法を実施し、検出感度及び特異性について検証した。

### 結果

- (1) 7 頭の牛においておよそ 1~3 週間にも及ぶ長期間の発熱を認めた。生化学的検査では発熱が継続した牛を中心に白血球の減少傾向を認め、後血清を採材した約 2 週間後の血液においても、白血球数が回復しない個体があった。また、急性炎症の指標であるハプトグロビン濃度や血清蛋白分画検査からも炎症性疾患を疑う結果は得られなかった。ウイルス学的検査では血球を用いたウイルス分離により EHDV が分離され (FO-1/E/16 株)、シーケンス解析により本分離ウイルス株は EHDV-7 であり、日本やオーストラリアのグループに分類されることが判明した。さらに、IBAV と EHDV-7 FO-1/E/16 株を使用して、発症牛の前後血清の中和試験を実施した結果、両ウイルスに対する抗体価の有意な上昇を認めたが、EHDV-7 FO-1/E/16 株に対する抗体価は IBAV に対する抗体価と同等あるいはそれ以上 (~16 倍) であった。発生予察の牛血清を用いた中和試験では、9 月に IBAV に対する抗体陽転が認められたが、EHDV-7 FO-1/E/16 株での中和試験を実施した結果、当初 IBAV に対する抗体陽転と考えられた抗体価の上昇は、EHDV-7 の感染によるものと判明した。
- (2) 現行プライマーと分離ウイルス株では、フォワードプライマーで 2 塩基、リバープライマーで 1 塩基の計 3 塩基にミスマッチが確認された。新規プライマーを使用した RT-PCR 法の結果、現行プライマーでは検出できなかった北米由来の株を含む EHDV 計 21 株すべてにおいて陽性反応が検出され、EHDV を除くアルボウイルス 9 株はすべて陰性であった。また、血液材料では 7 検体が陽性となり、良好な感度と特異性が認められた。さらに現行プライマーとの検出感度の比較を行ったところ、IBAV では約 10 倍、分離ウイルス株では約 100 倍も感度が高く、演者らの設計した新規プライマーは、分離ウイルス株及び既報の EHDV に対して非常に高感度であることが判明した。

## 考 察

これまで、EHDV感染により牛で長期間の発熱が認められた症例の報告はなく、このような症状を示した例は、本症例が初めてと思われる。本症例はアジアやオセアニアなどの熱帯や亜熱帯地域に常在するEHDVが9月頃に福岡県内に侵入して発生したものと推察される。

分離ウイルス株は過去に国内で分離されたEHDV-7と比較して、遺伝子的に近縁であったが、病原性には違いが認められた。このように今回の分離株の性状については、まだ不明な点も残されており、今後は全ゲノム解析などが必要と考えられる。また開発した新規プライマーは、感度及び特異性において非常に優れており、今後の病性鑑定におけるEHDVの検出に有用と考えられる。

### 〔参考〕平成29年度 日本産業動物獣医学会（九州地区）発表演題一覧

#### 【第I会場】

- 1 黒毛和種繁殖牛における腹腔内脂肪壊死症の1症例  
児嶋秀典（長崎県北部農共家畜診），他
- 2 黒毛和種子牛のビタミンA欠乏を主徴とした子牛の肝炎  
大城由美（沖縄県農共組家畜診），他
- 3 黒毛和種子牛重度下痢症の血液検査結果から得た緊急時の輸液療法  
中川 尚（佐世保市宇久家畜診・長崎県），他
- 4 肺炎発症黒毛和種牛の血液検査による予後判断の可能性  
津曲圭太（曾於農共組），他
- 5 牛の呼吸器粘膜免疫ダイナミズムにIFN- $\gamma$ が与える影響  
石川真悟（鹿大・共同獣医），他
- 6 鼻腔粘膜ワクチン（TSV<sup>®</sup>-2）が牛の呼吸器粘膜免疫に与える影響  
溝口隆悟（鹿大・共同獣医），他
- 7 重症肺炎罹患牛からの肺炎原因菌の分離と薬剤感受性  
藏前哲郎（藏前動物病院），他
- 8 輸送関連性牛呼吸器病候群のツラスロマイシン投与による予防効果  
林 淳（NOSAIみやざき），他
- 9 繁殖農場における子牛の皮膚真菌症治療試験  
秋山俊介（<sup>○</sup>九州ミタカクリニックサービス），他
- 10 亜急性ルーメンアシドーシス（SARA）に起因する低乳脂症候群を疑った農場改善事例  
藤倉篤史（ふくおか県酪協，福岡県），他
- 11 地方病性牛白血病に関する農家向けアンケートからわかる課題  
加治佐 誠（鹿児島県農共組），他
- 12 牛精子の液状保存に関する研究  
岡部浩一（鹿大・獣医繁殖），他
- 13 黒毛和種牛における卵巢嚢腫の発生状況とGnRH，E2，CIDR，吸引を併用した治療法  
佐藤知広（NOSAI西諸・宮崎県）
- 14 酪農生産基盤強化に向けた黒毛和種体外受精卵生産技術の確立  
久々宮萌果（大分県農林水産研指畜産），他
- 15 乳汁中P4測定を利用した搾乳牛の人工授精および胚移植タイミングの検討  
大竹諒平（鹿大・獣医繁殖），他
- 16 両側下顎骨開放骨折に対し吻側下顎骨切除術を行った黒毛和種子牛の1例  
西川豪重（宮崎大学・獣医外科），他
- 17 跛行を呈した黒毛和種子牛にみられた骨腫の1例  
本川裕介（鹿大・附属動物病院），他
- 18 尿道造瘻術における術式の検討  
綿屋健太（鹿大共同獣医学部），他

- 19 内分泌学および病理組織学的検査より単精巢症と診断された黒毛和種育成牛の1例  
橋本奏美（宮崎大・産業動物臨床繁殖），他
- 20 *Proteus mirabilis*が分離された黒毛和種繁殖牛における卵巢膿瘍の1例  
小泉源也（北薩農共組 出水家畜診），他
- 21 横隔膜の低形成が認められた子牛の1例  
藤川拓郎（山口大・連合獣医），他
- 22 活動量計を用いた搾乳牛の繁殖および疾病管理の検討  
岡寺涼太（鹿大・獣医繁殖），他
- 23 暑熱期におけるバイパスナイアシン給与下での受精卵移植の検討  
大坪利豪（佐賀県畜試・佐賀県），他
- 24 トカラ馬の種保存へ向けた遺伝学的解析  
瀬之口明音（鹿大・共同獣医），他

#### 【第II会場】

- 1 宮崎県内で確認された持続感染牛由来別BVDVの遺伝子解析  
瀬戸山博則（宮崎県宮崎家保），他
- 2 国内の牛呼吸器病発生におけるウシコロナウイルスの重要性の検討  
浜辺早織（宮崎大・獣医微生物研究室），他
- 3 肥育牛の非化膿性脳脊髄炎症例における中枢神経からの牛アストロウイルス検出と浸潤状況調査  
平島宜昌（鹿児島県中央家保），他
- 4 宮崎県における肉用牛生産者を対象とした牛白血病対策に関する意識調査  
森山楓葉（宮崎大学・農学部），他
- 5 外部導入牛における牛白血病ウイルス感染の定量的リスク分析  
野津昂亮（宮崎大・農学部），他
- 6 豚におけるアカバネウイルスの関与を疑う感染症の発生事例  
流谷博貴（熊本県城北家保），他
- 7 流行性出血病ウイルス7型による牛異常産の発生と疫学的考察  
井上大輔（長崎県中央家保），他
- 8 福岡県内で発熱を呈した牛からの流行性出血病ウイルス（EHDV）の分離とEHDV検出用RT-PCR法の新規プライマーの開発  
山本訓敬（福岡県両筑家保），他
- 9 シャモンダウイルスの関与を疑う牛異常産事例の病理学的検索  
丸田哲也（宮崎県都城家保），他
- 10 佐賀県における高病原性鳥インフルエンザ発生事例の病理学的検索  
平野慎二（佐賀県中部家保），他
- 11 黒毛和種繁殖牛の傷害サツマイモ中毒  
中村 誠（鹿児島県中央家保），他

- 12 県内野生イノシシの豚流行性下痢ウイルス抗体保有状況 人見 徹 (大分県大分家保)
- 13 天草諸島のイノシシにおける豚コブウイルスの分子疫学的調査 奈良崎孝一郎 (奈良崎動物医療センター・熊本県), 他
- 14 母豚への海藻粉末投与による子豚の免疫増強効果の検証 弓戸 猛 (宮崎大学・獣医解剖学), 他
- 15 牛RSウイルス感染呼吸器上皮細胞における *Pasteurella multocida* 付着性の増強 中村公香 (宮崎大農学部獣医学科), 他
- 16 沖縄県における *Mycoplasma bovis* の薬剤感受性および浸潤状況調査 茂野 悟 (沖縄県家畜試), 他
- 17 食品および食品添加物由来の環境衛生資材を活用したワクモ *Dermanyssus gallinae* 対策の検討 小高真紀子 (福岡県農林試), 他
- 18 大分県における過去11年間の牛の核内コクシジウム症 河上 友 (大分県大分家保), 他
- 19 ビークトリミング処置後の嘴異常が鶏の生産性あるいは飼料摂取に及ぼす影響 田端美希 (鹿児島大学・動物微生物学), 他
- 20 ベンチマーキングを活用した地域主体型子牛事故率低減への取り組み 中尾聡子 (沖縄県北部家保), 他

## [日本小動物獣医学会]

### 小地区—11

## 新規血液凝固能検査としての全血血栓形成観測システム (Total Thrombus-Formation System : T-TAS) の臨床使用例

岩永朋子<sup>1)</sup>, 市川華帆<sup>1)</sup>, 齋藤靖生<sup>1)</sup>, 高橋 雅<sup>1)</sup>, 福島隆治<sup>2)</sup>, 三浦直樹<sup>1)</sup>, 他

1) 鹿児島大学共同獣医学部, 2) 東京農工大学農学部獣医学科

### 背 景

血液凝固異常はさまざまな疾患で併発し、治療の選択に影響する。生体内での血液凝固と血栓形成には、血小板機能と凝固因子活性に加え血流などの要因が影響している。「全血血栓形成観測システム (Total Thrombus Formation System) (T-TAS)」は、血管を模したマイクロ流路に全血を流すことで血小板機能と凝固能を同時に評価できることが特徴である。今回、疾患を持つ犬における血液凝固能の評価に対するT-TASの可能性について検討した。

### 材料及び方法

2014～2017年7月に鹿児島大学附属動物病院に来院した犬127頭の静脈血を採取し、T-TASで評価した。T-TASでは2種類のマイクロチップ (PL: 血小板機能評価, AR: 血小板機能+凝固能評価) を用い、各チップのマイクロ流路に全血を流入させ、血栓形成による内圧の上昇を測定した。内圧が10kPaに達した時点を開塞開始時間 (OST), 80kPaに達した時点を開塞時間 (OT) とし、圧上昇曲線の下部領域面積 (AUC) を測定項目とした。測定結果はすでに発表されている健康犬のものと比較した。(参照基準範囲 PL-OST: 2.26±0.81分 OT: 4.73±1.21分 AUC: 406.77±54.36; AR-OST: 5.02±1.83分 OT: 6.04±2.14分 AUC: 1955.35±156.67)

### 結 果

127例中14例がPLとARの両チップ測定で全項目が基準参考範囲外であった。14例中2例はPT, APTTの検査で延長を示し、その他の症例では正常であった。PT, APTTが延長を示した2例はともに肝細胞癌で、1例は腫瘍切除術後に死亡した (PLとARチップでともに圧力の上昇なし)。また、PT, APTTが正常だった12例中、1例が術後に重度貧血で死亡し (PL-OST: 4.37分その後圧力上昇なし, AUC: 66.7; AR-圧力上昇なし), 尿道腫瘍の1例が死亡した (PL-圧力上昇なし; AR-OST: 20.34分 OT: 25.11分 AUC: 534.2)。さらに、腸管部分切除をした1例 (PL-OST: 7.07分その後圧力上昇なし; AR-OST: 2.40分 OT: 3.29分 AUC: 2168.7) と、子宮摘出術をした1例 (PLとARチップでともに圧力の上昇なし) が術後に血腹や重度貧血を呈した。

### 考 察

現時点でエビデンスを得るほどの症例数が得られていないが、T-TAS測定でPTやAPTTが基準値内の症例でも血液凝固異常を検出できることが示された。血液凝固マーカーの使用も広まってきているので、それらの測定とT-TASを組み合わせることでより迅速に的確な診断ができると考えられる。

## 犬の直腸腫瘍22例の治療成績

伊東輝夫<sup>1)</sup>, 柑本敦子<sup>1)</sup>, チェンバーズ ジェームズ<sup>2)</sup>, 内田和幸<sup>2)</sup>, 椎 宏樹<sup>3)</sup>

1) 青葉動物病院・宮崎県, 2) 東京大学・獣医病理, 3) 椎動物病院

## はじめに

犬の直腸腫瘍は下痢, 血便, しぶりなど悩ましい問題が続くため適切な医療介入が必要となる。海外で報告されている直腸腫瘍は単発腫瘍が多く, 経肛門腫瘍切除や直腸引き抜き術などが行われているが, 後者では合併症の発生率が高い。他方, 国内ではミニチュア・ダックスフンド(Mダックス)の多発性の炎症性ポリープが多く, より侵襲性の低い直腸粘膜引き抜き術や薬物療法の有効性が報告されている。

これらの外科療法, 薬物療法にはそれぞれに長所短所があるが, その選択の指針は明確にされていない。今回, 当院で遭遇した直腸腫瘍22例の治療成績を再評価し, 各種治療の価値を検討した。

## 材料及び方法

対象は病理組織診断を得た犬の直腸腫瘍22例で, シグナルメント, 経過, 臨床徴候, 診断前の治療歴, 腫瘍の特徴, 治療, 病理組織検査所見, 及び予後に関する情報を収集した。発生傾向と治療成績については, Mダックス(MD群)とそれ以外の犬種(NMD群)に分けて検討し, 群間の数値はMann-Whitney U検定で比較して有意水準5%未満で有意差ありと判定した。

## 成績

犬種はMD群13例, NMD群9例であり, 体重(4.2~30.2kg, 中央値6.9), 性別(雄9, 雌13), 年齢(2~14歳, 中央値9)に両群間の差はみられなかったが, MD群はすべて多発性で炎症性ポリープが85%を占めたのに対し, NMD群では単発腫瘍が89%, 腺腫・腺癌が67%であった。

**NMD群の臨床・病理所見と治療成績:** 臨床徴候としては出血が多く, 5例(腺腫3, 炎症性ポリープ2)は肛門からの腫瘍脱出, 1例(腺腫・筋層浸潤+)は直腸脱を理由に経肛門腫瘍切除を行い(2例でTAステイブラ使用), 再発を認めていない。排便困難が主徴であった形質細胞腫の1例は直腸引抜術で治癒し, 狭窄が重度であった腺癌の2例のうち1例は全層引抜術, 1例は開腹して切除・吻合を行い, 1~3年の追跡中に再発はみられていない。

**MD群の臨床・病理所見と治療成績:** 臨床徴候としては下血・粘液便やしぶりが全例でみられ, 炎症性ポリープの11例では病理組織学的に7例(64%)に骨化生, 9例(82%)に上皮細胞の腺腫様変化が認められた。13例中, 炎症性ポリープ2例はプレドニゾロン(PSL)中心の内科治療のみを行い, 徴候は改善したが1例は3年

経過した現在も時々下血がみられている。ほかの11例は内科治療後の徴候持続(6例), 内科治療中の直腸脱(4例), 重度の排便困難(1例)を理由に直腸引抜術(うち粘膜引抜術7例)を行い, PSLないし非ステロイド性消炎鎮痛剤(NSAIDs)を一定期間併用して, 1例を除き29~85カ月の追跡中に再発はみられていない。

**術後の合併症:** 経肛門腫瘍切除の8例では合併症はみられず当日に退院した。直腸引抜術の13例では頻回の軟便排出やしぶりが全例でみられ, 12例が2~14日間(中央値6.5日)入院し, 1例は肛門の難治性潰瘍・疼痛により58日間入院したが, 長期的な合併症の後遺はみられなかった。NMD群の開腹・吻合例では術後の吻合部の軽度狭窄が長期持続したが, 全層引抜術後に同様の再狭窄がみられた腺癌の1例は, 28日後からバルーン拡張, 用手拡張を頻回に行ったところ狭窄は消失した。

## 考察

本研究ではMD群が59%を占め, そのほとんどが多発性の炎症性ポリープであり, この傾向は過去の国内の報告と一致していた。他方, NMD群9例における単発腫瘍(89%), ポリープ・腺腫(56%), 腺癌(33%), 形質細胞腫(11%)の比率は, 米国3大学の64例の比率に類似していた(それぞれ93%, 64%, 27%, 5%, Adamovich-Rippe 2017)。よって本邦の犬の直腸腫瘍では, Mダックスと他犬種を区別して, 後者では海外の知見を参考にするのが望ましいと考えられた。

NMD群で経肛門腫瘍切除した6例はすべて治癒し, TAステイブラ利用を含めて現実的な治療選択肢になると考えられた。狭窄が重度であった腺癌2例のうち, 1例は吻合部の再狭窄が持続したが, 1例ではバルーン拡張・用手拡張の反復にて改善がみられ, 全層吻合後の治療過程での吻合部狭窄に対しては早期の拡張反復が有効な対処法になると考えられた。

Mダックスの直腸ポリープは内科治療の効果も報告されているが, 持続治療の要する症例が多いことが問題となる。また今回の対象例では, 徴候・腫瘍が消えない例や直腸脱が生じる例が含まれることも問題と思われた。他方, 直腸(粘膜)引抜術は治療を持続しなくても長期予後は良好であることが示されたが, 術後に短期的な合併症をともなうことに加え, まれに再発するリスクは事前に説明しておく必要があると思われた。

以上から, NMD群では腫瘍の比率が高く, 狭窄例では分節性切除・吻合を要するものの, 経肛門切除のような低侵襲手術でも予後がよい症例が多いことが示唆された。他方, MD群では多発性の炎症性ポリープが多く, 内科治療以外に直腸(粘膜)引抜術も選択肢になり, 術

小地区—15

## 獣医歯科領域におけるジルコニアセラミックスの犬への応用

樋口翔太<sup>1),2)</sup>, 増田浩育<sup>2)</sup>, 樋口飛鳥<sup>1)</sup>, 樋口雅仁<sup>1)</sup>

1) 動物整形外科病院・大分県, 2) おぎの歯科医院

### 要 約

犬の犬歯の咬耗は日常臨床において比較的高頻度に遭遇する歯牙疾患である。咬耗は急速に引き起こされた場合、露髄を引き起こし根尖病変などの急速に咬耗が起こった場合、歯髄への感染が惹起され、根尖病変や口腔鼻腔瘻などを引き起こす事が知られている。緩徐に進行した場合は感染は起こらないが、審美性や機能性の低下が引き起こされる。現在獣医領域では咬耗に対し、コンポジットレジン (CR) による修復や、金属製のクラウンなどを用い治療を行っている。しかし、飼い主の審美的欲求が高い場合これらの手法は十分とは言い難い。今回われわれはダックスフントの犬歯の咬耗に対しジルコニアセラミックスを使用したクラウンを作成し、審美性・機能性を回復することで、良好な術後経過を得、飼い主のQOL向上にも貢献することができたため報告する。

### 症 例 ・ 経 過

症例はミニチュア・ダックスフント、8歳、避妊雌

稟告：犬歯が4本とも平らになってしまっている。

臨床所見：食事量低下なし。上下顎犬歯及び前臼歯部の咬耗。X線検査、視診より露髄を疑う所見なし。全身状態良好

手術所見：全身麻酔下でスケーリングを行った後、下顎犬歯はCRにて咬耗面を被覆。上顎犬歯は5倍速コントラングルとダイヤモンドポイントを使用し、支台歯形成を行った。なお、マージン部は全周シャンファー形状とした。支台歯形成後パテタイプとインジェクションプのシリコン印象材を使用し、印象採得を行い石膏模

型を作成。後日、石膏模型上でワックスを用いてクラウンを作成した。作成時には本来の歯牙の形と比較し近遠心的に厚みを付与し強度を十分に持たせた。作成したワックス模型をSTARAWMANN社製のCAD/CAMシステムを用い光学印象を行い、3次元データ化。PC上で修正し、同社にジルコニアセラミックスでのクラウン作成を依頼。2週後、完成したジルコニアクラウンを鎮静下で患歯に装着。咬合も正常で摂食は初回より良好であった。

### 考 察

ジルコニアセラミックスとは白い金属とも呼ばれ、密度はチタン合金よりも高く、非常に生体適合性が高い事に加え、従来のセラミックスと比較し非常に強く割れにくい。このため、人医療では2005年の認可以降急速に使用率が上昇している。一方、同材料の欠点としては金属と比較し高額になること、割れてしまう可能性があること、臨床応用後年数が短く、長期予後が不明なことが挙げられる。本症例は、耐久性、クラウンの破折の可能性の観点から初診時に金属製のクラウンを推奨したが、審美的な要求が大きかったため、これらの欠点について飼い主に十分なインフォームを行ったのち同材料を選択した。現在術後6カ月を経過しているが、ボール遊びや食事は問題なく行えているとともに、飼い主の審美的な満足も得られている。これらの点から、犬歯の咬耗に対しジルコニアクラウンを使用することは機能性、審美性の両観点から非常に有用であると考えられる。一方耐久性や強度については今後長期的な経過観察が必要である。

## 両側橈骨尺骨骨折のプードル及びチワワに対して、新開発の極小 スクリュー・プレートを用いて内固定をおこなった2治験例

樋口雅仁<sup>1)</sup>、樋口飛鳥<sup>1)</sup>、樋口翔太<sup>1),2)</sup>

1) 動物整形外科病院・大分県, 2) おぎの歯科医院

### はじめに

橈骨尺骨骨折の中でも両側の骨折は、大変少ないが、いずれも骨癒合に導くことは大変難しい症例である。演者の施設に上診された骨折症例2,719症例（2016年12月まで）の内、橈骨尺骨症例は568症例である。この中で両側橈骨尺骨骨折は、37症例64肢であった。橈骨幅が4mm程度の小型犬に対して極小の認可されたスクリュー・プレートが国内に存在せず、整復固定に大変難儀していた。今回、ミズホ株式会社にて3年以上協力頂いて、製造でき承認された新開発の極小スクリュー・プレート（φ1.1mm・φ1.3mm）を用いて、プードルとチワワの両側橈骨尺骨骨折症例において背側ダブルプレート法を用い、良好な結果を得たので報告する。

### 症 例

- (1) プードル 4歳 1.8kg 雌
- (2) チワワ 2.5kg 3歳 雄

### 術 式

症例1へのアプローチは、橈側皮静脈の約5mm外側より行い、橈側手根伸筋と総指伸筋の筋間より橈骨の橈骨頭側面を露出。症例1へは、橈骨頭側面に7穴のT字プレートを橈骨の骨軸が解剖学的に正常となるように注

意しながら適応した。最遠位には、φ1.3mmスクリューを用いた。橈骨外側面へ7穴ストレートプレート・2本のφ1.1mmスクリュー2本を適応した。

症例2へは、左橈骨頭側面へ6穴T字プレート・外側には6穴ストレートプレートを適応。右橈骨へはφ1.0mmクロスピンと6穴ストレートプレートをφ1.1mmスクリュー3本にて固定した。

### 経 過

いずれの症例も経過良好にて、運動機能も術後早期に回復し、症例1は、29日、症例2は術後40日にて、一部抜釘を行った。症例1は、術後79日目に全抜釘を行った。

### 考 察

新開発の極小スクリュー・プレート（φ1.1mm・φ1.3mm）は、従来のスクリュー・プレートでは、対応できない極小の橈骨尺骨骨折でも確実に整復固定維持が可能となった。しかし、1枚だけのプレートにて整復固定では、強度不足に陥る可能性もあり、背側ダブルプレート固定法が必須である。新しくミズホ株式会社にて開発・製造したφ1.1mm・φ1.3mm極小スクリュー・プレートは、超小型犬の橈骨尺骨骨折整復固定術に大変有効な内固定システムであった。

## 〔参考〕平成29年度 日本小動物獣医学会（九州地区）発表演題一覧

### 【第I会場】

- |  |   |
|--|---|
| <ol style="list-style-type: none"> <li>1 多血小板血漿（PRP）療法を実施した猫の慢性副鼻腔炎6例 田中巧一（ホサナ動物病院・沖縄県）、他</li> <li>2 神経型FIP感染ネコの画像診断所見、組織学的検査所見の特徴 杉山慶樹（海の中道動物病院・福岡県）、他</li> <li>3 ネオスポラ症を疑う犬の1例 水谷祐子（宮崎大・附属動物病院）、他</li> <li>4 気管内に多数の炎症性肉芽腫の形成が見られた猫の肺吸虫症の1例 小嶋宗明（阿蘇動物病院・熊本県）、他</li> <li>5 ブデソニドによる治療が奏功した炎症性腸疾患（IBD）の犬の1例 澤 由貴（琉球動物医療センター・沖縄県）、他</li> <li>6 プレドニゾン、療法食による治療が困難であった腸リンパ管拡張症の犬に対する手作りフードの効果の検討 金子泰之（宮崎大・附属動物病院）、他</li> </ol> | <ol style="list-style-type: none"> <li>7 ペットへの愛着がペットの給餌傾向、BCS、疾病予防行動、疾病に及ぼす影響 矢野 淳（次郎丸動物病院・福岡県）、他</li> <li>8 舌に発生した扁平上皮癌の猫の2症例 橋本砂輝（砂輝動物病院・福岡県）、他</li> <li>9 犬の直腸腫瘍22例の治療成績 伊東輝夫（青葉動物病院・宮崎県）、他</li> <li>10 犬の胃腸管型リンパ腫14例の治療成績 柑本敦子（青葉動物病院・宮崎県）、他</li> <li>11 上顎尾側から頬骨に発生した腫瘍を摘出した犬の2症例 中谷圭佑（大津動物クリニック・熊本県）、他</li> <li>12 悪性乳腺腫瘍の肺転移巣に対し多剤併用化学療法を行った犬の2例 楠 志保（宮崎大・獣医外科）、他</li> <li>13 副腎摘出術を実施した犬の副腎腫瘍12例の回顧的検討 藤本晋輔（大津動物クリニック・熊本県）、他</li> <li>14 褐色細胞腫により後肢麻痺を起こした犬の1例</li> </ol> |
|--|---|

- 水谷真也 (宮崎大・附属動物病院), 他
- 15 副腎の原発性血管肉腫の犬1例  
石川周平 (とことろ動物病院・福岡県), 他
  - 16 外科療法および多剤併用化学療法を行った膀胱血管肉腫の犬の1例 日高勇一 (宮崎大・獣医外科), 他
  - 17 急性巨核芽球性白血病の猫の1例  
篠崎春香 (高橋ペットクリニック・福岡県), 他
  - 18 慢性骨髓単球性白血病の犬の2例  
酒井秀夫 (諫早ペットクリニック・長崎県), 他
  - 19 初期の再生不良性貧血の犬の1例  
酒井秀夫 (諫早ペットクリニック・長崎県), 他
  - 20 フローサイトメトリー法を用いた抗赤血球抗体の検出  
金城堇紫 (鹿大・臨床獣医学講座), 他
  - 21 新規血液凝固能検査としての全血血栓形成観測システム (Total Thrombus Formation System : T-TAS) の臨床使用例  
市川華帆 (鹿大・附属動物病院), 他
  - 22 抗猫 SAA 抗体を用いた SAA 測定系の臨床応用  
末野和瑚 (鹿大・臨床獣医学講座), 他
  - 23 猫の急性腎障害および慢性腎不全増悪期に於ける予後指標としてのアンモニアの評価  
入佐重正 (入佐ペットクリニック・福岡県)
  - 24 急性腎障害に対して血液透析を行ったレプトスピラ症の犬13例  
田畑智尉 (亀山動物医療センター・鹿児島県), 他
  - 25 犬猫の尿路感染症における尿培養検査と薬剤感受性検査についての分析  
古川彰宏 (古川動物病院・佐賀県), 他
  - 26 陰茎持続勃起症の犬の3例  
藤原昌雄 (長崎どうぶつ病院・長崎県), 他
  - 27 尾根部の無菌性化膿性肉芽腫性皮膚炎の猫の1例  
佐久間暢人 (城南さくま動物病院・熊本県), 他

## 【第II会場】

- 1 外傷性足根下腿関節脱臼を人工靭帯を用いた脛骨足根部内側締結法 (変法) により整復を行った猫の一症例  
新里 健 (赤瓦動物病院・沖縄県)
- 2 犬の骨萎縮を伴う橈骨尺骨再骨折に対する凍結保存骨とダブルプレートの併用について  
藤木 誠 (鹿大・獣医外科), 他
- 3 両側橈骨尺骨骨折のプードルおよびチワワに対して, 新開発の極小スクリュー・プレートを用いて内固定をおこなった2治験例  
樋口雅仁 (動物整形外科病院・大分県), 他
- 4 犬の長期経過した後肢の重度骨変形に対し, 3Dモデルを使用して, 術前計画・模擬手術をおこない, 矯正骨切り術をおこなった1治験例  
樋口雅仁 (動物整形外科病院・大分県), 他
- 5 獣医歯科領域におけるジルコニアセラミックスの犬への応用  
樋口翔太 (おぎの歯科医院・福岡県), 他
- 6 犬歯周病原細菌検出キットの有用性の評価  
高橋 香 (鹿大・附属動物病院), 他
- 7 広範囲な歯肉・歯槽粘膜剝離を伴った口腔外傷の猫

- の2例  
新井 恒 (ふくみつ動物病院・鹿児島県), 他
- 8 幽門側胃亜全摘手術後にダンピング症候群を呈した犬の1例  
山本集士 (宮崎大・附属動物病院), 他
  - 9 猫の発作性あるいは完全房室ブロックと診断された36例の治療と予後  
平川 篤 (ペットクリニックハレルヤ・福岡県), 他
  - 10 リバーロキサバンを使用した心筋症罹患猫の3例  
安藤崇則 (ハートウィル動物病院・北九州市)
  - 11 循環器疾患の猫における D-Dimer の測定  
岩永朋子 (鹿大・附属動物病院), 他
  - 12 犬の僧帽弁閉鎖不全症における心原性肺水腫の発症までの LVIDDN の変化  
上村利也 (かみむら動物病院・鹿児島県), 他
  - 13 犬非対称性ブドウ膜炎を疑った1例  
須賀 健 (かがみ動物病院・佐賀県)
  - 14 若齢で発症した糖尿病性白内障の犬の1例  
吉野信秀 (大分小動物病院・大分県), 他
  - 15 強膜ぶどう腫に対し角結膜転移術を行った犬の一例  
池田健一郎 (大分小動物病院・大分県), 他
  - 16 濁った角膜の眼で, 瞳孔や虹彩を簡単に観察する方法  
永延清和 (宮崎大・附属動物病院), 他
  - 17 腹側椎体固定術を行った環椎軸椎不安定症の犬の2例  
長井 新 (鳥城ペットクリニック・熊本県), 他
  - 18 犬の胸腰部椎間板ヘルニアの局在診断に関する検討—腰膨大部における齟齬—  
東田周三 (ベル動物病院・福岡県)
  - 19 犬の胸腰部椎間板ヘルニアの発生部位に関する研究  
東田周三 (ベル動物病院・福岡県)
  - 20 脳炎を発症した捕捉好中球症候群 (TNS) のボーダーコリーの一例  
宮本章太郎 (パル動物病院・福岡県), 他
  - 21 脳炎が疑われた犬の脳脊髄液中のアミノ酸組成と疾患関連性  
杉山伸樹 (海の中道動物病院・福岡県)
  - 22 ポリニューロパシーを疑った犬の1例  
田中克明 (アドックどうぶつクリニック・福岡県)
  - 23 脳梗塞と診断した犬の臨床症状, 画像検査 (CT, MRI) の特徴の評価  
陳田能央 (鹿大・附属動物病院), 他
  - 24 気管内腫瘤に対して気管内視鏡検査を試みた犬1例および猫2例  
高橋雅弘 (高橋ペットクリニック・福岡県), 他
  - 25 特発性乳び胸に対して自己血パッチ療法を試みた猫1例と犬2例  
鍛冶伸光 (かじ動物クリニック・福岡県), 他
  - 26 CT検査麻酔管理中に検出された猫の気胸3症例  
藁戸由樹 (高橋ペットクリニック・福岡県), 他
  - 27 気管低形成を伴い呼吸困難を呈した若齢犬に対して, 上部気道閉塞解除治療を実施した2症例  
末松正弘 (AMC末松どうぶつ病院・大分県), 他
  - 28 呼吸停止を引き起こした胸郭入口部気管虚脱に対して外科的処置によって救命できた犬の1例  
平尾大樹 (AMC末松どうぶつ病院・大分県), 他

## 蛍光 LAMP 法を用いた *Mycobacterium avium* 3 亜種の 迅速かつ正確な検出法の開発

屋敷奈津<sup>1)</sup>, 山崎 渉<sup>2)</sup>, 岡林環樹<sup>1)</sup>, 後藤義孝<sup>1)</sup>

1) 宮崎大学農学部獣医学科獣医微生物学研究室, 2) 宮崎大学農学部獣医学科獣医公衆衛生研究室

### はじめに

*Mycobacterium avium* (*M. avium*) は鳥類や哺乳類の非結核性抗酸菌症 (AM 症) の主要原因菌であり, *avium* (Maa), *hominissuis* (Mah), 及び *paratuberculosis* (Map) の 3 亜種で構成される. これら 3 亜種は対象となる宿主が広いことに加えて, いずれの宿主内においても増殖が緩慢である一方, 疾病に対する法的な取り扱いも異なっている. Maa は鳥類の結核症の原因菌であるが, 鳥類以外にも人を含む多くの哺乳動物に AM 症を起こす. 一方, Mah は人の AM 症ならびに豚 AM 症の主要原因菌であり, 特に人では薬剤耐性菌の増加と相俟って患者数が増加しており問題となっている. 加えて, Maa 及び Mah は牛や伴侶動物からの分離例もある. わが国では豚の AM 症はと畜場で発見されることが多いが, ヨーロッパでは繁殖障害豚から病原性の強い株が分離されているほか, 人と豚からそれぞれ共通の遺伝子型を有する株が分離されている. Map は近年増加傾向にある牛ヨーネ病の原因菌である. 本病は法定伝染病として扱われるため, 単発的にみられる牛の Maa や Mah 感染症とは区別される. これら 3 亜種を鑑別するためには, リンパ節等の病変部 (家畜と伴侶動物の AM 症) または喀痰 (人の AM 症), 糞便 (牛ヨーネ病) から菌を分離培養後, 16S rRNA 上の共通配列をプライマーとした PCR により属・種レベルの検出を行い, 次いで亜種を決定するという 2 段階の工程を必要とする. しかし, この培養菌を用いた PCR 法では, 菌 DNA を得るまでに 2~8 週間かかるうえ, 一般細菌に比べ PCR による検出や亜種決定が困難である. また, 病巣部に大量の原因菌が存在するヨーネ病を除き, 多くの AM 症例では, 生体材料からの PCR 法及びリアルタイム PCR 法による直接検出がきわめて困難であるという問題もある.

### 目 的

上記の問題を解決するために, われわれは *M. avium* を亜種レベルで鑑別可能であり, かつ直接生体材料からの検出が可能な蛍光 LAMP 法による迅速確定診断法の開発を試みた.

### 材料・方法

IS901 をターゲットとし, Maa を検出する MAA プライマー, IS1245 をターゲットとし, Maa 及び Mah を検出する MAAH プライマー, そして IS900 をターゲット

とし, Map を検出するプライマー, 合計 3 つのプライマーを設計した. 設計した各種プライマーの特異性を調べるため, 豚及び人から分離した Mah24 株, 鳥及び人, 牛から分離した Maa4 株, ヨーネ病の牛から分離した Map2 株, その他ヒト型結核菌, ウシ型結核菌を加えた 14 菌種 3 亜種, 計 45 株の *Mycobacterium* 属菌 (いずれも PCR 及びシーケンスにより同定) を使用した. 蛍光 LAMP 法は, 被検菌 1 株につき 3 本のマイクロチューブを準備し, それぞれ MAA, MAAH 及び MAP の各プライマーと反応試薬を加え, 65°C で 60 分間反応させた. また, 培養菌からはアルカリボイル法, 生体材料からはヨースピン ver.2 (FASMAC) にてそれぞれ DNA 抽出を行った. これらの抽出 DNA を用いて蛍光 LAMP 法での診断的特異性と感度及び検出限界を調べ, PCR 法と比較した. 次に, 肉眼的に結節病変もしくは石灰化病巣が見られるリンパ節材料からの直接亜種レベルの同定実験を行った. 病巣部を含む臓器片を乳剤化し, DNA 抽出を行った. これら病巣部からは, 1~10<sup>2</sup>CFU/mg の Mah が分離された. 最後に, 5×10<sup>6</sup>CFU を静脈内に接種したマウスの肝臓と脾臓を用い, 菌数測定による検出限界値の測定を行った.

### 結 果

Maa4 株は全て MAA 及び MAAH プライマーを用いた検出系で陽性を示し, Mah24 株は全て MAAH プライマーでのみ陽性, Map2 株はいずれも MAP プライマーでのみ陽性を示した. そのほかの *Mycobacterium* 属菌は全てのプライマーで陰性を示した. 従来の PCR 法では, 最小で 500~5,000pg/μl の DNA 量で検出が可能であったのに対し, 今回開発した蛍光 LAMP 法では 0.5~10pg/μl の DNA 量で検出が可能であった. また, 豚の生体材料からの検出は PCR 法ではほとんど検出できなかったのに対し, 蛍光 LAMP 法ではほぼ 100% 検出できた. 感染マウスを用いた生体材料での検出限界は PCR 法では 5.0×10<sup>2</sup>CFU/mg の生菌が存在していても検出が不可能であったのに対し, 蛍光 LAMP 法では 1.0×10<sup>2</sup>CFU/mg 以上の生菌がサンプル中に存在していれば検出が可能であった.

### 考察・まとめ

今回開発した MAA・MAAH・MAP を用いた蛍光 LAMP 法により, *M. avium* の 3 亜種を 60 分以内に鑑別・検出することができた. 蛍光 LAMP 法での検出感

度は従来のPCR法よりも高感度であり、生体材料からの直接検出にも成功した。蛍光LAMP法は生菌数が激減した長期保存サンプルや肉眼による病変の識別が難しいサンプルでも検出可能であった。以上、われわれは

*M. avium*を重種レベルで鑑別することが可能な蛍光LAMP法による迅速確定診断法の開発に成功した。

## 公地区—9

### ブロイラーの頭部背側筋炎の発生とその発生状況調査

坂本拓己<sup>1)</sup>、山口良二<sup>2)</sup>

1) 宮崎県都農食肉衛生検査所, 2) 宮崎大学獣医病理学研究室

#### はじめに

ブロイラーの頭部背側筋炎 (Dorsal Cranial Myopathy, 以下, DCM) は、両翼背側起始部付近の皮膚の黄色化、黄色化部位の皮下の浮腫と無臭なゼラチン状漿液の滲出、前広背筋の白色化、出血、肥厚等の筋炎を特徴的病変とする疾病で、2002年からブラジル南部の処理場で発生が報告されている。本疾病の発生率は冬期をピークとして6%まで上昇するが、その発症原因は明らかにされていない。これまで国内での発生報告はなかったが、昨年度より、本所が所管する処理場3カ所において、DCMの特徴的病変を呈すと体が確認されたため、DCMと同一の病理像を示すか検査するとともに、その発生状況を調査した。

#### 材料と方法

肉眼的にDCMの特徴を呈したと体を、A処理場(2農場)から5検体、B処理場(2農場)から4検体、C処理場(1農場)から1検体採取した。全検体の前広背筋の病理組織切片を作製し、常法に従ってHE染色した。細菌検査として、B処理場の内2検体の病変部位を血液寒天培地で36℃、24時間、好気培養した。さらに、2017年5月22日～6月2日に3処理場で肉眼的に本病変を呈すと体の発生数を調査した。

#### 結 果

全検体の病理組織学的検査で、広範囲の筋細胞の萎縮

と壊死、結合組織の著しい増生、正常構造の消失、筋断裂像、出血像、筋肉の再生像及びリンパ球の浸潤が認められた。培養により菌の発育は認められなかった。処理場毎の発生農場率はAで63.2% (12戸/19戸)、Bで35.7% (5/14)、Cで19.0% (4/21)で、Aに比べてCで有意に低く ( $P<0.005$ )、全体では38.9% (21/54)であった。調査期間中の総処理羽数における罹患率は約0.01% (150/152万)であった。

#### 考 察

病理検査に供した全10検体の肉眼所見及び病理組織所見が、ブラジルの報告にあるDCMの所見に一致しており、細菌の関与が低いことから、当該病変はDCMと同一であることが示唆された。このことから、国内のブロイラーにDCMが発症していることが明らかになった。発生状況調査から、本病変が管内処理場に搬出される農場の約4割で発生していること、発症には処理場単位の素因が関与している可能性があること及びブラジルの報告に比べて罹患率が低いことが明らかになった。本病変の行政措置は一部廃棄であるが、発生数が増加すれば経済的被害は大きくなる。今後、処理場単位の発生素因に加え、ブラジルの報告で発生素因とされている雌雄差、種差、体重差等についても情報収集し、本症の原因究明を進めていきたい。

### 〔参考〕平成29年度 日本獣医公衆衛生学会 (九州地区) 発表演題一覧

1 牛の肩部にみられた悪性線維性組織球腫の1例 池田 稔 (大分県食肉衛検)	調査 坂本拓己 (宮崎県都農食肉衛検), 他
2 牛の原発不明腺癌の1例 祝迫翔子 (鹿児島県鹿屋食肉衛検), 他	6 全身性の馬円虫症が疑われた1症例 木下広之 (福岡県食肉衛検), 他
3 胸腺型牛白血病の1例 久世恭平 (長崎県諫早食肉衛検), 他	7 猪から分離した多剤耐性サルモネラの薬剤耐性伝達試験結果 松本一俊 (熊本県保環研), 他
4 地方病性牛白血病の病態検討 兼田恵梨香 (宮崎県小林食肉衛検), 他	8 ブロイラー由来サルモネラの血清型の流行および薬剤耐性の動向 下地康大 (鹿大・獣医公衆衛生学), 他
5 ブロイラーの頭部背側筋炎の発生とその発生状況の	9 沖縄県内のと畜場に搬入された豚由来 <i>Salmonella</i>

- Choleraesuis* のフルオロキノロン耐性  
大山み乃り (沖縄県中央食肉衛検), 他
- 10 県内産豚由来非定型抗酸菌株の薬剤感受性の比較  
中島優佳 (宮崎県高崎食肉衛検), 他
- 11 豚がいない, 離島対馬で続発した日本脳炎患者とその疫学調査  
吉川 亮 (長崎県環保研・保健科), 他
- 12 沖縄県におけるつつが虫病の発生動向と *Orientia tsutsugamushi* の分子疫学的解析  
喜屋武向子 (沖縄県衛研), 他
- 13 長崎県における野生動物が保有する病原体調査  
吉川 亮 (長崎県環保研・保健科), 他
- 14 蛍光 LAMP 法を用いた *Mycobacterium avium* 3 亜種の迅速かつ正確な検出法の開発  
屋敷奈津 (宮崎大・獣医微生物), 他
- 15 大規模食鳥処理場を通じて加工される生食用鶏肉のカンピロバクター汚染菌数の評価  
阿井隆之介 (鹿大・獣医公衆衛生), 他
- 16 牛趾乳頭腫症病変より分離された細菌群のクオラムセンシング機構の検出  
谷口喬子 (宮崎大・産業動物防疫), 他  
リサーチセンター
- 17 *Stx2* の脱落が推測される大腸菌 O76:H7 (*eae* 陽性) が多数検出された EHEC O76:H7 (*stx2*, *eae* 陽性) による HUS 症例の細菌学的検討  
原田誠也 (熊本県保環研), 他
- 18 牛及び豚敗血症由来 *Trueperella pyogenes* の薬剤感受性と遺伝学的特徴  
藤元英樹 (鹿児島県志布志食肉衛検), 他
- 19 共振超音波による食鳥と体のカンピロバクター汚染制御技術の開発  
Torrung Vetchapitak (宮崎大・農・獣医), 他
- 20 大規模食鳥処理場における高病原性鳥インフルエンザ疑似患者搬入事例発生時のリスク管理  
竹内僚子 (宮崎県日向食肉衛検), 他
- 21 大規模食鳥処理場の処理ライン外施設におけるサルモネラ汚染実態調査と衛生対策  
奥平沙紀 (宮崎県日向食肉衛検), 他
- 22 人体用 (医薬品) 抗生物質の残留を確認した病畜牛 3 事例  
北野ゆかり (熊本県食肉衛検), 他
- 23 尿毒症に係る検査法の調査  
松ケ野 翔 (鹿児島県末吉食肉衛検), 他
- 24 離島の学校給食で提供された牛乳の風味異常事例  
水永夕葉 (宮崎県都城保), 他
- 25 カタラーゼ試験を用いた鶏肉に係る加熱条件の評価について  
山中恒星 (大分県豊肥保)
- 26 食鳥検査結果と農場生産成績との関連性  
平良和代 (鹿児島県末吉食肉衛検), 他
- 27 「ふれあい教室」を通じて生命の尊さを気づかせる取組  
郡山洋人 (宮崎県日南保), 他

複写される方へ: 本誌に掲載された著作物を複写したい方は, (社)日本複写権センターと包括複写許諾契約を締結されている企業の方でないかぎり, 著作権者から複写権等の行使の委託を受けている次の団体から許諾を受けて下さい。  
〒107-0052 東京都港区赤坂9-6-41 乃木坂ビル 一般社団法人学術著作権協会  
☎ 03-3475-5618 FAX 03-3475-5619 E-mail : jaacc@mtd.biglobe.ne.jp  
著作物の転載・翻訳のような, 複写以外の許諾は, 直接本会へご連絡下さい。アメリカ合衆国における複写については, 次に連絡して下さい。  
Copyright Clearance Center, Inc. 222 Rosewood Drive, Danvers, MA 01923 USA Phone 1-978-750-8400 FAX 1-978-646-8600

#### Notice about photocopying

In order to photocopy any work from this publication, you or your organization must obtain permission from the following organization which has been delegated for copyright clearance by the copyright owner of this publication.

(Except in the USA)

Japan Academic Association for Copyright Clearance, Inc. (JAACC)  
6-41 Akasaka 9-chome, Minato-ku, Tokyo 107-0052 Japan  
Phone 81-3-3475-5618 FAX 81-3-3475-5619 E-mail : jaacc@mtd.biglobe.ne.jp

(In the USA)

Copyright Clearance Center, Inc. 222 Rosewood Drive, Danvers, MA 01923 USA  
Phone 1-978-750-8400 FAX 1-978-646-8600

## 日本獣医師会雑誌

平成30年11月20日発行 (毎月1回20日発行)

第71巻第11号 [Vol. 71 No. 11 (2018)]

頒 価 1,100円 (送料・消費税込み)

[本誌の購読料は会費に含めて徴収しています]

発 行 所 日 本 獣 医 師 会

(〒107-0062 東京都港区南青山1-1-1 新青山ビル西館23階)  
電話 03-3475-1601 (代) FAX 03-3475-1604

URL : <http://nichiju.lin.gr.jp>

e-mail : [info@nichiju.lin.gr.jp](mailto:info@nichiju.lin.gr.jp)

編 集 発 行 者 境 政 人

印 刷 所 株 式 会 社 加 藤 文 明 社