



# 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 -----

## 令和元年度 日本獣医師会獣医学術学会年次大会 地区学会長賞受賞講演（東北地区選出演題）

[日本産業動物獣医学会]

産地区—9

### 統計学的解析を用いた品種差における地方病性牛白血病診断手法 の有用性の検討

佐久間晶子, 高橋幸治

宮城県仙台家畜保健衛生所

#### はじめに

地方病性牛白血病（EBL）を発症した牛の中には、白血球数、異型リンパ球比率が低値を示す牛や、体表リンパ節の腫脹がない牛があり、EBL生前診断に苦慮している。EBL生前診断には臨床症状を観察し、血液検査（定量的・定性的検査）を行って診断するが、各検査結果が診断にどの程度寄与しているか不明である。また、健康な黒毛和種（B種）のリンパ球数は、ホルスタイン種（H種）と比較して少なく、LDH総活性値は、H種より有意に高いことが報告されていることから（平成27年度日本獣医師会獣医学術学会年次大会）、精度が高い診断を行うためには、品種毎に定量的検査の診断基準値を推定する必要がある。そこで、統計学的手法を用いて黒毛和種（B）およびホルスタイン種（H）の定量的検査の診断基準値を推定し、各種検査結果における発症牛及び非発症牛検出効果を調査した。

#### 材料及び方法

牛白血病ウイルス（BLV）感染を確認した牛の内、「EBL発症牛」（発症牛）、「無症状キャリアー牛や持続性リンパ球増多症牛」（非発症牛）、全165頭（B種100頭〔発症牛44頭、非発症牛56頭〕、H種65頭〔発症牛39頭、非発症牛26頭〕）の下記検査結果を材料として用いた（〔定量的検査〕白血球数測定、リンパ球数測定、異型リンパ球比率測定、LDH総活性値測定、LDH2+3活性値測定、LDH2+3分画和測定、BLVプロウイルス量測定〔定性的検査〕一般症状の有無、体表・腹腔・眼球部腫瘍の有無、ECの鍵、JBの鍵（B種のみ）、BLV遺伝子検査）。〔1〕定量的検査各種の発症群—非発症群間比較。〔2〕定量的検査の診断基準値推定：ROC解析。

〔3〕検査結果の診断効果検証：〔2〕で算出した基準値よりも高値の個体を「陽性（+）」とし、所見が無い場合または、基準値より低値の個体を「陰性（-）」とし、2×2クロス集計を行い、その後、特異度90%以上、陽性尤度比10以上で発症牛検出効果が高い検査結果とし、感度90%以上、陰性尤度比0.1以下で非発症牛検出効果が高い検査結果と判定した。

#### 結 果

異型リンパ球比率において、H種では、発症牛群は非発症牛群より有意に低かった（ $P<0.05$ ）。また、発症牛検出効果について、特異度が100%であり、陽性尤度比が算出できなかった検査結果は、B種では、LDH総活性値（+）、LDH2+3分画和（+）、LDH2+3活性値（+）、一般症状（+）、腫瘍（+）であり、H種では、リンパ球数（+）、LDH総活性値（+）、LDH2+3分画和（+）、LDH2+3活性値（+）、一般症状（+）、腫瘍（+）であった。また、次に発症牛検出効果が高い検査結果は、B種では、リンパ球数（+）〔陽性尤度比：28.0〕、白血球数（+）〔26.7〕、異型リンパ球比率（+）〔20.4〕であったが、H種では、該当する検査結果はなかった。非発症牛検出効果が最も高いと判定された検査結果は、LDH2+3活性値（-）〔陰性尤度比：B種：0.07、H種：0.05〕であり、B種では続いて一般症状（-）〔0.09〕、H種では、LDH総活性値（-）〔0.08〕であった。

#### 考 察

全検査項目の中でも、両品種において、今回算出した、LDH2+3活性値測定（基準値〔B種：1,048U/l、H種：601U/l〕）が、発症牛および非発症牛検出に、最も効果が高い検査であることが分かった。続いてB種では、

一般症状の有無所見, LDH 総活性値測定, LDH2+3 分画和測定, 腫瘍の有無所見の順に, 発症牛および非発症牛検出効果が高く, H 種では, LDH 総活性値測定, 一般症状の有無所見, 腫瘍の有無所見の順に検出効果が高い検査であることが判明し, 品種毎に, 各検査結果の発症牛および非発症牛検出効果は異なっていることが確認された. これらのことから, 血液検体と臨床所見において EBL の生前診断を行う場合は, 発症牛検出効果が高い検査 (B 種: 白血球数測定, リンパ球数測定, 異型リンパ球比率測定, LDH 総活性値測定, LDH2+3 分画和測定, LDH2+3 活性値測定, 一般症状および腫瘍の有無所見, H 種: リンパ球数測定, LDH 総活性値測定,

LDH2+3 分画和測定, LDH2+3 活性値測定, 一般症状および腫瘍の有無所見) を主体として, 生前診断を行うことで, 診断精度の向上が期待された. さらに, 両品種において, リンパ球数 (-), 白血球数 (-), 異型リンパ球比率 (-) の非発症牛検出効果は低いいため, 白血球数, リンパ球数, 異型リンパ球比率が基準値よりも低く, EBL の特徴的な所見が伴わない事例において, B 種では, LDH2+3 活性値 (+) と一般症状 (+) が, H 種では, LDH2+3 活性値 (+) と LDH 総活性値 (+) が, EBL 生前診断に重要となる検査結果である可能性が示唆された.

## 産地区—13

### 牛の呼吸器病及び下痢に関連する病原体を検出する マルチプレックス rRT-PCR の野外症例への応用

五嶋祐介, 福成和博, 八重樫岳司

岩手県中央家畜保健衛生所

#### はじめに

牛の呼吸器病及び下痢に関連する病原体は多種に及ぶ. 通常, 原因究明を目的として行われる病性鑑定では, 検査結果が判明するまで数日から1週間程度 (抗体検査を含めた場合は1か月程度) を要するため, 初期の治療及び対策に活用され難い. また, 最近, 複数の迅速検査法 (コンベンショナル PCR, リアルタイム PCR, イムノクロマトキット等) を利用する事例もあるが, 検査費用・時間・労力の観点から限定的な実施に留まり, 得られる情報も限られている. 今回, 病性鑑定の迅速化を目的に多種の病原体遺伝子を多検体同時に検出可能な検査法であるマルチプレックス (m) リアルタイム (r) RT-PCR を構築し, 野外症例へ応用した成績を報告する.

#### 材料及び方法

(1) **mrRT-PCR の構築**: 対象病原体として, 呼吸器病及び下痢の両者に関連するウイルス4種, 呼吸器病に関連するウイルス4種, 呼吸器病に関連する細菌4種並びに下痢に関連するウイルス4種の計16種を選定した. 遺伝子の検出には, 1ユニット当たり4種の病原体を組み合わせた4つのユニットを次のAからDのとおり設計した. A呼吸器病・下痢共通ユニット: 牛ウイルス性下痢ウイルス (BVDV), 牛アデノウイルス (BAV), 牛コロナウイルス (BCV), 牛トロウイルス (BTov), B呼吸器病ユニット1: 牛伝染性鼻気管炎ウイルス (IBRV), 牛RSウイルス (BRV), 牛パラインフルエンザウイルス3型 (PI3V), D型インフルエンザウイルス (IDV), C呼吸器病ユニット2: *Mycoplasma bovis* (Mb), *Mannheimia haemo-*

*lytica* (Mh), *Pasteurella multocida* (Pm), *Histophilus somni* (Hs), D下痢ユニット: A, B及びC群ロタウイルス (GAR, GBR, GCR), 牛エンテロウイルス (BEV). プライマー及びプローブの配列は, 既報を参考に選定し, マルチプレックスに適した蛍光色素 (FAM, VIC, ABY, JUN 及び非蛍光クエンチャー) を組み合わせた. mrRT-PCR には, DNA 及び RNA を同時に検査可能なマルチプレックスキットである TaqPath 1-Step Multiplex Master Mix (ABI) を用いた. 感度等は, 陽性スタンダードとして10倍階段希釈した各病原体の標準株又は合成DNAを用い, 各病原体について単独で rRT-PCR した場合 (1plex) 及びユニット毎に4種混合した状態で mrRT-PCR した場合 (4plex) の Ct 値を比較して検証した.

(2) **野外症例への応用**: 2017年4月から2019年3月までに岩手県内において, 呼吸器病を発症した35戸172頭の牛の鼻腔スワブ (一部肺) 及び下痢を発症した50戸190頭の牛の糞便を用いた. 呼吸器病例に対しては上述のユニットのA~Cを, 下痢例に対してはA及びDを用いた mrRT-PCR を実施した.

#### 成績

(1) **mrRT-PCR の検証**: 各ユニットにおいて, 1plex と同様に良好な反応が確認された. 10倍階段希釈した陽性スタンダードの Ct 値は 1plex のそれらと同等であり, 4種を混合した場合に想定された反応成分の競合, 感度の低下等は認められなかった.

(2) **野外症例の検出状況**: 172頭の鼻腔スワブから, Pm (92頭, 以下カッコ内は頭数), BRV (71), BCV (69), Mh (67), Hs (36), Mb (34), PI3V (10), IBRV (3), BAV (3), BVDV (2), IDV (2), BTov

(1) の順に各遺伝子が検出された。113頭において複数の病原体が同時に検出され、うち90頭からはウイルス及び細菌が共に検出された。最多で7種の病原体遺伝子が検出された。190頭の糞便から、BCV (96)、BEV (58)、GAR (52)、BToV (5)、BVDV (4)、BAV (2) の順に各遺伝子が検出された。47頭において複数の病原体が同時に検出され、最多で4種の病原体遺伝子が検出された。GBR及びGCRは検出されなかった。材料の処理から結果判明までの所要時間は3時間だった。

## 考 察

今回構築したmrRT-PCRは、多種の病原体の検査成績を同時に得られること、多検体に対応できること、材料搬入から最短3時間で結果が得られること及び遺伝子量をCt値から推測できることが確認された。実際に野

外材料へ応用した結果、鼻腔スワブ及び糞便共に、多数の病原体遺伝子が同時に検出された。鼻腔スワブでは、複数種の病原体遺伝子が同時に検出される場合が多く、特にウイルスと細菌が関与したBRDCの病態を表しているように思われた。下痢ではBCV、BEV及びGARの単独又は2種までの検出が多く、これらが主体となり症状に関与した可能性があった。検査材料の採取時期、状態、抗生剤投与の影響等を考慮する必要性が残されるが、このmrRT-PCRで得られる多数の病原体の検出成績及び遺伝子量から、病態の程度を個体毎に推定し、罹患牛の初期治療に役立てられる可能性がある。このように、検索した牛が感染している可能性のある病原体を短時間内に特定し、その成績を速やかに臨床現場へ還元することにより、有効な対策を早期に実行するための大きな一助となることが期待される。

## 〔参考〕 令和元年度 日本産業動物獣医学会（東北地区）発表演題一覧

- |   |  |
|---|--|
| 1 宮城県内の酪農家におけるアンケート調査：子牛の哺乳管理について<br>小堤晃博（宮城県農共県北家畜診）   | 15 牛白血病ウイルスTax233番アミノ酸を型別するハイスループット解析法の開発<br>落合千尋（岩大・獣医微生物），他    |
| 2 A地域における11年間の子牛の下痢・肺炎予防対策と成果<br>清水典子（青森県青森家保），他  | 16 離乳を契機にカタプレキシーが軽減した黒毛和種牛の1例<br>加古翔悟（北里大・大動物臨床学），他              |
| 3 公共放牧場の乳用育成牛群における下痢の発生要因と予防対策<br>大森さくら（岩手県中央家保），他  | 17 偽Pelger-Huët核異常を認めた黒毛和種新生子牛の1例<br>三浦麻里（北里大），他                 |
| 4 牛の呼吸器病及び下痢に関連する病原体を検出するマルチプレックスrRT-PCRの野外症例への応用と検出状況<br>五嶋祐介（岩手県中央家保），他                     | 18 膀胱粘膜の乳頭状過形成を呈した黒毛和種繁殖牛の1症例<br>伊藤岳文（秋田県農共県南家畜診），他              |
| 5 離乳後子豚で発生した豚大腸菌症<br>高波 優（宮城県東部家保），他  | 19 ホルスタイン種育成牛にみられた低コレステロール血症の4症例<br>大久保 成（岩手県農共県南基幹家畜診），他        |
| 6 <i>Streptococcus gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i> による牛のレンサ球菌症<br>今井直人（福島県中央家保），他 | 20 左側横臥位による第四胃変位手術の利点及び再発率の検討<br>田川知嘉（福島県農共白河家畜診），他              |
| 7 サルモネラ症における新規の血清診断法（エライザ）の検討<br>高橋ちさと（秋田県中央家保），他   | 21 馬の鼻腔ポリープを立位鎮静・神経ブロックで切除した一例<br>樋口まり（岩大・小動物外科），他               |
| 8 鶏結核病発生事例と <i>Mycobacterium avium</i> の亜種鑑別<br>佐藤 龍（秋田県南部家保），他                               | 22 放牧時における放射性物質摂取リスク低減技術<br>松澤 保（福島県農業総合センター畜産研究所），他             |
| 9 ATPふき取り検査を用いた搾乳衛生の改善事例<br>磯崎絢平（山形県農共置賜家畜西置賜出張所），他   | 23 熊本地方の日本鶏と国内のプロイラーのALV発生状況<br>岩本 毅（岩大・獣医病理），他                  |
| 10 乳房炎牛から分離された黄色ブドウ球菌（SA）の分子疫学<br>谷地村結未（青森県八戸家保），他  | 24 PCR法によるミツバチの気管内寄生アカリダニの検出（第2報）<br>大庭 要（秋田県中央家保），他             |
| 11 乳汁検体のリアルタイムPCRによるマイコプラズマ検査の可能性<br>大橋さやか（山形県農共家畜診療研修所），他                                    | 25 黒毛和種子牛にみられた胸腰髄神経根の引き抜き損傷<br>西浦 颯（岩大・獣医病理），他                   |
| 12 交雑種子牛に発生したB細胞性リンパ腫<br>萩原 茜（福島県酪農協組），他  | 26 線維化マーカーを用いた虚弱子牛症候群の腎臓についての病理学的検討<br>古田信道（山形県中央家保）             |
| 13 黒毛和種における地方病性牛白血病（EBL）感染リスク評価の検討<br>岩永海空也（福島県中央家保），他  | 27 高血糖を呈したホルスタイン種子牛にみられた睪臓の発生異常<br>板橋知子（宮城県仙台家保），他               |
| 14 統計学的解析を用いた品種差における地方病性牛白血病診断手法の有用性の検討<br>佐久間晶子（宮城県仙台家保），他                                   | 28 ホルスタイン種成乳牛における分娩後の早期黄体形成とリポタンパク質分画との関連性<br>高橋知也（宮城県農共県北家畜診），他 |
|   | 29 豚の行動的、物理的および化学的保定が血液学的検査値におよぼす影響<br>蓮田安信（御家畜改良センター），他         |



## 犬の前立腺移行上皮癌の転移診断にMRI DWIBS法を用いた1例

小山英志, 浅田慎也, 牧野靖央

協同組合仙台獣医師会 総合どうぶつ病院

### はじめに

Diffusion weighted whole body imaging with background body signal suppression (DWIBS) は医学領域で開発されたがんの転移を検出する新たなMRIの撮像方法である。本検査の特徴は悪性腫瘍の検出に優れており俯瞰的に全身の病巣を観察できる事である。また、MRIを用いるため放射線被曝が無く造影剤も使用しない。PET-CT スキャンと同等の検出能を有するという報告もなされており、医学領域では前立腺癌、乳癌患者などで転移病変の検出に多く用いられるようになってきている。一方獣医学領域では本撮像方法を用いた報告は我々の調べた限り認められない。今回我々は、前立腺移行上皮癌の全身転移の1例でDWIBS法を用いて撮像したところ良好な画像が得られたのでその詳細を報告する。

### 材料および方法

去勢雄のM.ダックスフント13歳、後肢のふらつきが認められ主治医を受診。非ステロイド性消炎鎮痛剤を使用するも進行が認められ、第12病日に起立困難となった。ステロイド剤に変更しても改善が見られず第21病日に後肢完全麻痺となった。前肢に麻痺は認められなかった。第27病日に後肢完全麻痺の原因特定を目的として当院を紹介受診され、全身造影CT検査とDWIBS法でのMRI検査を実施した。

### 成績

CT検査で第13胸椎に骨溶解を伴った軟部組織性の腫瘤性病変と胸髄の重度圧排所見が認められた。その他にも下顎骨、大腿骨、腸骨翼などの骨溶解所見、肺野に径2から3mmの結節性病変が複数認められた。前立腺は径3.5cm程度に腫大化し内部に中等度の石灰化所見が

認められた。次に実施したMRI DWIBS撮像ではCT検査で見られた前立腺や骨病変に一致して高信号を呈する所見が認められた。その他、腹壁の径4.6mmの結節性病変や右仙腸関節がDWIBS撮像において顕著な高信号を呈して認められた。画像検査後に尿道カテーテル法にてセルパック標本を作成し、病理組織学検査とBRAF遺伝子変異検査を実施した。同時に第13胸椎の腫瘍性病変より針吸引にて塗抹標本を作成し、細胞診検査に提出した。以上の検査結果より前立腺移行上皮癌と骨、肺、腹壁転移の疑いと診断した。

### 考 察

本症例より犬でのDWIBS撮像が可能であることが示唆された。CT検査で検出された病変のほとんどはDWIBS法においても高信号病変として検出された。腹壁の結節性病変や右仙腸関節領域はDWIBS画像で高信号を呈しており転移病変として疑う事ができた。DWIBS法の利点は病変と正常組織とのコントラストが明瞭に見られるため病変を発見しやすい事があげられる。今回は確認できなかったがCT検査で検出できない骨溶解を伴わない転移病変をDWIBS法では検出できると報告されている。一方、CT検査で認められた肺結節性病変はDWIBS法では検出できなかった。これは呼吸による信号値の低下や画像のボクセルサイズによる検出能の限界が関連していると考えられる。DWIBS法単独での転移診断は危険であり、CT検査との併用が望ましいと考えられる。また、リンパ節は正常であっても高信号を呈する事が医学領域で報告されている。本症例においてはリンパ節毎に信号値の違いが認められた。腫大化を伴わずに高信号を呈するリンパ節の判断に対し今後はカットオフ値の検討が必要と考えられる。今後例数を重ね検討を続けたい。

## ウサギの粘液性腸症の治療法の検討

澤田 浩 気

ラビッツ動物病院

## はじめに

ウサギの粘液性腸症は消化管に粘液が蓄積・閉塞し、排便停止から死に至る疾患である。原因は不明であるが、不適切な食餌、感染症、自律神経障害などがリスクファクターとして考えられている。幼体での発症が多く、繁殖の現場や食用固体に打撃を与える疾患として古くから問題視されてきた。治療法は確立されておらず積極的な治療を施してもほとんどが死亡するとされる。剖検ではガスと粘液で膨張した消化管、細菌叢の攪乱、結腸の杯細胞の過形成が認められるが炎症や特定の病原体は認められず、特異的な所見に乏しい。粘液性腸症が疑われた41症例について仮説に基づいた治療を試み一定の成果を得たので報告する。

## 症 例

確定診断は剖検によるが、粘液性の下痢から排便停止に至り、レントゲン検査で盲腸にガス貯留を認める41症例を粘液性腸症と仮診断して治療を行った。

## 治 療

乳酸リンゲルによる皮下または静脈点滴、ラニチジン4mg/kg、エンロフロキサシン10mg/kg SC SIDを投与するとともに、閉塞している粘液の粘性抵抗の低下を目的として4時間毎の経口的な水2～10ml/kgの給与と盲腸マッサージ、隔日のグリセリン浣腸0.5ml/kgを繰り返し、粘液による消化管閉塞の解除を試みた。排便開始後、経口流動食、レボフロキサシン10mg/kg BID PO、メトロニダゾール20mg/kg BID PO、ラニチジン6mg/kg、オメプラゾール1mg/kg SC BIDを投与し3

日以上粘液性下痢の改善が認められなかった症例に対し、抗菌薬を中止して健康うさぎの盲腸便の経口投与を行った。

## 結 果 ・ 考 察

32例が回復し9例が死亡した。9例中5例が生後2か月未満であり、未熟な免疫機能、低いストレス耐性、早すぎる離乳、不完全な腸内細菌叢が発症の一因であるとともに回復を困難にしていると考えられる。成体の死亡例ではALTやBUNの上昇がみられ、多臓器不全に陥っていたと考えられる。33症例で経口的な給水、盲腸マッサージ、グリセリン浣腸によって閉塞していた粘液は排泄され、これらの治療が消化管内の粘性抵抗の減弱に有効であることが示唆された。閉塞解除前の段階で抗菌薬を使用しなかった症例が排便開始直後に死亡し、防御因子の粘液を排出する事で感染病態が顕在化した可能性がある。生存した32例では閉塞解除後の抗菌薬や制酸薬の投与によって22例が回復し、10例で粘液性下痢が持続したが健康ウサギの盲腸便給与によっていずれも回復した。盲腸便給与による常在細菌叢移植の可能性については胃酸による移植細菌の死滅や、既存の細菌の競合による無効化の懸念があるとされるため、予め胃酸分泌抑制薬や抗菌薬の投与によってこれらを緩和する事を試みた結果、臨床的には有効性が示された。これらの結果から粘液性腸症は腸内細菌叢を含む消化管内容物の異常であり、内容物の正常化が治療の主体である事が示唆された。今後、次世代シーケンサー等による腸内細菌叢解析の応用によってより強固なエビデンスとして確立されるとともに、より有効な治療法へ発展することが期待される。

## 〔参考〕令和元年度 日本小動物獣医学会（東北地区）発表演題一覧

- |  |  |
|--|--|
| 1 診断に苦慮した CNS-FIP の猫の一例<br>山口 喬 (みたぞの動物病院・宮城県)                                 | た1例<br>大高裕也 (北里大), 他   |
| 2 シトシンアラビノシドの持続注入を行った非感染性<br>脳炎の犬の8例<br>星野 涼 (岩大・共同獣医学科), 他                    | 6 UBM を用いた犬緑内障の隅角評価<br>山下洋平 (エビス動物病院・仙台市), 他   |
| 3 犬の前立腺移行上皮癌の転移診断に MRI DWIBS<br>法を用いた1例<br>小山英志 (協仙台獣医師会総合), 他<br>(どうぶつ病院・仙台市) | 7 犬の特発性慢性角膜上皮欠損症にたいし滅菌綿棒を<br>もちいた上皮デブリードメント処置を繰り返し実施<br>した際の治癒率に関する検討<br>喜多瑞樹 (北里大・小動物第2内科), 他 |
| 4 頸部に発生した巨大髄膜腫の犬の一例<br>齊田はるか (岩大・共同獣医学科), 他                                    | 8 毛包上皮腫に付随して異物肉芽腫が生じた犬の1例<br>寺島美穂 (そらいろ動物病院・福島県)   |
| 5 脈絡網膜炎が猫トキソプラズマ症診断の一助となっ  | 9 皮膚リンパ球症が疑われるネコの一例<br>佐藤 良 (岩大・小動物内科), 他  |
|  | 10 皮膚, 眼瞼腫瘍に対して半導体レーザー治療をした  |

- 11 例 竹原律郎 (ふれあい動物病院・青森県), 他
- 11 猫の皮膚肥満細胞腫におけるグレード分類の検討  
津島 文 (岩大・獣医病理), 他
- 12 犬におけるバソプレシンの骨髄内投与による薬理作用と穿刺部位の検討  
松井琢真 (北里大・小動物第2外科), 他
- 13 急性巨核芽球性白血病と診断されたシーズーの1例  
加藤寛也 (あきたこまつ動物病院・秋田県), 他
- 14 PT・APTTの短縮を伴った肺血栓塞栓症の犬2例  
志賀壮一郎 (しが動物病院・福島県)
- 15 犬の非再生性免疫介在性貧血 (NRIMA) の2症例  
佐藤巖紀 (千葉小動物クリニック・福島県), 他
- 16 犬の化学療法における腎障害を早期に検出する尿中バイオマーカーの検討  
浅野弘愛 (岩大・小動物内科), 他
- 17 腎移植を実施した慢性腎臓病の猫の1症例  
渡邊清正 (渡辺動物病院・宮城県), 他
- 18 尿路感染の管理に胃瘻用カテーテルを用いて膀胱腹壁造瘻術を行った猫の1例  
菊池将平 (オノデラ動物病院・宮城県), 他
- 19 避妊手術時に偶発的に認められた子宮外妊娠の猫の1例  
佐藤龍也 (エステー動物病院・福島県)
- 20 犬におけるロクロニウム投与が腹腔鏡気腹下の腹腔内体積と視認性に及ぼす影響  
中野正杜 (北里大・小動物第2外科), 他
- 21 猫における v-gel<sup>®</sup> の使用が腹腔鏡気腹下での呼吸動態に及ぼす影響  
佐瀬文恒 (北里大・小動物第2外科), 他
- 22 成猫の猫ヘルペスウイルス性肺炎の病理学的特徴  
若山映令彩 (岩大・獣医病理), 他
- 23 ウェルシュ・コーギーにおける間質性肺疾患の一例  
伊藤みのり (オノデラ動物病院・宮城県), 他
- 24 口腔内に発生したメラノサイト腫瘍を疑う犬の3症例  
中田朋孝 (パセリ動物病院・宮城県), 他
- 25 イヌの口腔内悪性黒色腫の予後予測指標としての c-kit の有用性  
竹内颯人 (岩大・獣医病理), 他
- 26 乳腺腫瘍の術前検査時に発見された副腎偶発腫の犬の1例  
高平篤志 (たかひら動物病院・宮城県), 他
- 27 高カルシウム血症を呈した甲状腺癌の犬の一例  
松田菜美 (岩大・小動物内科), 他
- 28 犬の肺動脈狭窄症に心室中隔欠損や動脈管開存が合併しやすい機序に関する考察  
信貴智子 (盛岡グリーン動物病院・岩手県), 他
- 29 犬の肺高血圧の臨床検査所見と病理検査所見  
田口大介 (盛岡グリーン動物病院・岩手県), 他
- 30 イヌの乳腺腫瘍片側全摘術におけるブトルファノール持続投与による鎮痛効果  
堀田大揮 (北里大・小動物第2外科), 他
- 31 ミシシippアカミミガメにおけるアルファキサロンとトラマドールの静脈内投与による麻酔・鎮痛効果  
石川 洋 (岩大・小動物外科 / エキゾチック動物診療科), 他
- 32 秋田県内においてレプトスピラ症を疑診した犬の2例  
小島貴文 (あきたこまつ動物病院・秋田県), 他
- 33 橈尺骨および脛腓骨骨折におけるフロートプレート固定法の有用性  
鈴木邦治 (希望ヶ丘ペットクリニック・福島県)
- 34 ウサギの粘液性腸症の治療法の検討  
澤田浩気 (ラビッツ動物病院・福島県)

## [日本獣医公衆衛生学会]

### 公地区—6

## 腸管出血性大腸菌の O 抗原遺伝子検出のための Multiplex PCR 法

三ヶ島壮士, 慶野昌明, 田中佳幸, 柳沼千春, 横田正則

郡山市保健福祉部保健所食肉衛生検査所

### はじめに

当所では, 食用に供するために行われる獣畜のとさつ解体処理について, と畜検査により食用として不適な肉や内臓等を排除するとともに, 処理が衛生的になされるよう監視指導を行っている。その一環として, 管内と畜場で処理された牛の枝肉を対象として, 腸管出血性大腸菌の汚染状況についてふき取り自主検査を実施し衛生指導に活用している。検査は, 食品を対象とする6血清群 (O26, O103, O111, O121, O145, O157) の通知法 (平成26年11月20日食安監発1120第1号) に準拠してい

る。しかし, 当所では同通知法に記載されている O 抗原遺伝子スクリーニング検査の Real-Time PCR 法及び LAMP 法に必要な機器を保有しておらず, 代替法の確立が懸案であった。今回, Conventional PCR 法を用いた検査法を検討したので, その成果について報告する。

### 材料及び方法

**菌株:** 腸管出血性大腸菌 O26, O103, O111, O121, O157 は当市保健所, O145 は福島県衛生研究所から分与されたものを使用した。 *Citrobacter freundii* と *Enterobacter cloacae* は, 以前のふき取り検査で分離さ



れ、凍結保存されていた株を使用した。

**Multiplex PCR キット**：QIAGEN Multiplex PCR Kit (QIAGEN) を用いた。サーマルサイクラーはタカラバイオ TP-600 を使用した。

**増菌培養液の調整**：腸管出血性大腸菌の6血清群は、普通寒天培地により純培養した後、Tryptic soy broth (BD) 10ml に接種し 36±1℃ で 18±1 時間培養した（予測濃度：約 5×10<sup>8</sup>cfu/ml）。この培養液を対象検体の mEC 培養液を用いて階段希釈し、大腸菌・大腸菌群用シート培地 MC-Media Pad (JNC) により菌濃度を決定した。濃度を決定した6血清群の増菌培養液は、それぞれ最終濃度が 1×10<sup>4</sup>cfu/ml となるように混合して調整し、混合試料液とした。

PCR 増幅は、2×Multiplex PCR Master Mix 25μl、プライマー Mix (各 2μM) 5μl、蒸留水 15μl にテンプレート DNA 5μl を加えた 50μl の反応液を用いて、Paddock らの報告する Protocol 及び Multiplex PCR キットに記載されている Universal Protocol に基づき Multiplex PCR を行った。

**Paddock らの Protocol**：95℃ で 15 分間加熱後、94℃ で 30 秒、67℃ で 80 秒を 1 サイクルとして、35 サイクルの PCR 増幅を行った。その後 67℃ で 7 分間維持した後 4℃ で保存した。

**Universal Protocol**：95℃ で 15 分間加熱後、94℃ で 30 秒、63℃ で 90 秒、及び 72℃ で 90 秒を 1 サイクルとして、35 サイクルの PCR 増幅を行った。

#### (1) 感度の検証

混合試料液からアルカリ熱抽出法により DNA を抽出し、Multiplex PCR に供して検出感度を検証した。

#### (2) 特異性の確認

ベロ毒素 (VT) を産生する株が報告されている 2 菌種 (*C. freundii*, *E. cloacae*) から抽出した DNA を Multiplex PCR に供し、特異性を確認した。

#### (3) 温度条件の決定

サーマルサイクラーの Gradient 機能を使用してアニーリング温度を段階的に比較し、より高感度で十分な特異性を示す条件を検討した。

#### (4) 再現性の確認

アニーリング温度の最適化後に日を変えて 3 回実

験を繰り返した。

## 結 果

- (1) Paddock らの Protocol では、4 血清群について、通知法の求める検出感度 (1×10<sup>4</sup>cfu/ml) を満たさなかった。一方、Universal Protocol では全 6 血清群について検出感度を満たした。
- (2) Universal Protocol では *C. freundii* 及び *E. cloacae* のバンドは検出されず、特異性を満たすことが確認された。
- (3) 他菌種を検出せず十分な特異性を示し、より高感度に検出できるアニーリング温度は 62℃ であった。
- (4) 3 回の実験結果に齟齬はなく、再現性が確認された。

## 考 察

本研究で検討した Conventional PCR 法 (Multiplex PCR 法) により、Real-time PCR 法や LAMP 法を用いなくても、通知法の求める感度と特異性を満たした O 抗原遺伝子スクリーニング検査が可能であることが確認された。

Paddock らの Protocol で検出感度を満たさなかった一因は、使用した Multiplex PCR キットの違いによると推察される。当時、Paddock らが使用したキットの入手が困難であったため、入手可能な他のキットを用いたが、このことは試薬の選択次第では検査をさらに低コスト化できる可能性を示唆する。

本法では、VT スクリーニング検査に使用したテンプレート DNA の残りをを用いることで、約 4 時間で分離培養工程に進むか否かの判断が可能となる。Multiplex PCR 反応中に VT 陽性枝肉の消毒実施を指示する等、逐次的に公衆衛生措置を講じながら並行して検査を進めることができ、実践的であると考えられる。

## 参 考 文 献

Z. Paddock et al., : Veterinary Microbiology, 156, 381-388 (2012)

### 〔参考〕令和元年度 日本獣医公衆衛生学会（東北地区）発表演題一覧

- |   |   |    |  |
|---|---|----|--|
| 1 | アクリルアミド投与マウスにおける DNA 損傷の雌雄差<br>堀田有沙 (北里大・獣医公衆衛生), 他           | 6  | GLP 再編と「HPLC による動物用医薬品等の一斉試験法 (畜産物)」に係る調査について<br>菅沼久高 (秋田県食肉衛検)                |
| 2 | アクリルアミド投与によるマウス精巣・精巣上体の DNA 損傷<br>斉藤直人 (北里大・獣医公衆衛生), 他        | 7  | 山形県内と畜場における牛及びめん山羊の <i>Escherichia albertii</i> 保菌状況調査<br>佐藤空見子 (山形県庄内食肉衛検), 他 |
| 3 | 壊死筋肉組織は NSTI 起因菌の生体内リザーバーとなる<br>柏本孝茂 (北里大・獣医公衆衛生), 他          | 8  | と畜場で認められた牛白血病の発生状況調査<br>立崎 元 (青森県十和田食肉衛検), 他                                   |
| 4 | 腸管出血性大腸菌の O 抗原遺伝子検出のための Multiplex PCR 法<br>三ヶ島壮士 (郡山市食肉衛検), 他 | 9  | 馬の脾臓に見られた腫瘍<br>野村静香 (福島県会津保), 他  |
| 5 | 仕出し料理によるウエルシュ菌食中毒<br>松館宏樹 (岩手県久慈保), 他                         | 10 | と畜場に搬入された豚からの E 肝炎ウイルス RNA   |

- の検出 慶野昌明（郡山市食肉衛検），他
- 11 ウマ寄生 *Sarcocystis fayeri* の腸管毒性解析 谷田奈津美（岩大），他
- 12 体腔内に小結節が密発した肉用鶏の一症例 菅野安彦（岩手県獣医師会食鳥検査センター），他
- 13 (公社)青森県獣医師会食鳥検査センターとの業務連携を活用した食鳥処理場に対する衛生指導について 林 健太郎（青森県十和田食肉衛検），他
- 14 飲水設備の改修による食鳥検査成績および生産成績の推移 川畑享子（岩手県獣医師会食鳥検査センター），他
- 15 第一種動物取扱業者の防災意識について 福間幹大（秋田県動物愛護センター），他
- 16 犬猫の譲渡の推進に向けた取り組みと課題について 小山真人（秋田県動物愛護センター），他