

# 日本獣医公衆衛生学会(北海道)

## 発表要旨

(発表時間7分、討論3分 計10分)

地区学会長 堀内基広  
(北海道大学)

### 【座長】

#### 第1日 9月11日(木)

会場：百年記念館大会議室

演題番号

1～3 通山 佳之(帯広食肉衛検)

4～5 高橋 克滋(中標津保健所)

6～9 白井 優(酪農大)

10～13 浅川 満彦(酪農大)

#### 第2日 9月12日(金)

会場：百年記念館大会議室

14～17 渡辺有希子(猛禽類医学研究所)

会場 北海道大学

## [審査員]

堀内基広 (北海道大学)  
門平睦代 (帯広畜産大学)  
清水俊一 (道立衛生研究所)  
坪田敏男 (北海道大学)  
田村豊 (酪農学園大学)  
渡辺健一 (道保健福祉部)

## 公-1

## と畜データ時系列分析システムの開発と評価

○足立泰基<sup>1)</sup> 蒔田浩平<sup>2)</sup>

1) 釧路保健所 2) 酪農大衛生・環境

【はじめに】食肉衛生検査所(食検)では、衛生的な食肉生産を推進するために、生産者に対してと畜データの還元(データ還元)を行っているが、と畜データの解析方法に関する研究報告は少ない。これまでに、演者らは、廃棄率の顕著な変化を時系列分析することによって疾病の蔓延や薬物治療の有効性を判定できることを示してきた。この手法をシステム化し、分析結果を生産者宛(豚22農場、牛7農場)に還元するサービスを東藻琴食肉衛生検査所では本年4月より開始した。本発表ではシステムの構成と、その性能の一部を報告する。

【材料および方法】道庁サーバーよりダウンロードした過去(11年分)の月次廃棄率(%)データを対数ロジット変換し、R(統計ソフト)のauto.arima関数を用いて季節自己回帰和分移動平均(SARIMA)モデルの推定を行い、さらにロジスティック変換することによって翌月の期待値と信頼限界の計算をVBA、R、RExcelおよびStatconn DCOMの連携によって自動処理するシステムを構築した。本システムの妥当性を、搬入数が100頭/月以上の10養豚場におけるモデルのパラメータの有意性および残差の無作為性を検定することにより検討した。さらに、簡便な時系列モデルとしてよく用いられる対照モデル(指数平滑法)との比較を尤度比検定および絶対平均比率誤差を指標に行った。

【結果】本システムは、食検からのデータ還元時に必要なモデリングを自動的にを行い、豚生産農場22農場×10臓器(疾病)×12ヶ月=2,640個のモデル式を連続して推定することが可能であった。10農場×4疾病を用いた妥当性の検討では、パラメータの64%が有意であり、残差の無作為性検定では98%(39/40)が無作為であった。尤度比検定の結果、40モデル中39モデルで対照モデルより逸脱度が小さく、27モデルで有意であった。絶対平均比率誤差は40モデル中38モデルで対照モデルより小さかった。

【考察】auto.arima関数は、赤池情報量規準をもとにモデルを選択し、パラメータの有意性や残差の無作為性の検定をしないが、選択されたモデルの殆どにおいて残差の無作為性が認められた。また3割程度のパラメータで有意差が認められなかったにもかかわらず、選択されたモデルの殆どが対照モデルよりあてはまりがよいことから、本システムは妥当性のあるモデルを推定可能であることが明らかとなった。すなわち、本システムは生産者に対して合理的な判断指標を提供することによって、衛生的な食肉生産を促進するツールとして利用可能である。

## 公-2

## と畜場に搬入される牛のレプトスピラ保有状況について

○内野倫成<sup>1)</sup> 久道 萌<sup>1)</sup> 中野由佳子<sup>1)</sup> 廣川和郎<sup>1)</sup> 木村香澄<sup>2)</sup> 齋藤 誠<sup>3)</sup> 菊池直哉<sup>3)</sup> 谷山弘行<sup>3)</sup>

1) 八雲食肉衛検 2) 北見保健所 3) 酪農大感染・病理

【はじめに】レプトスピラ症は人獣共通感染症で、保菌動物の尿や、尿に汚染された水・土壌などに直接接触することで、経皮的または経粘膜的に感染し、牛では乳量の低下や繁殖障害との関連が疑われている。国内の牛におけるレプトスピラ症の発生は、道内で昭和57年、道外でも平成19年に確認されているのみである。しかし、全国的な乳牛飼育農場におけるバルク乳の抗体調査では、3割以上の農場が陽性を示し、特に北海道では陽性率が高かったとの報告があり、本菌が広く浸潤しているとみられている。

ヒトにおいて家畜が原因となった事例はないが、平成15年以降毎年発生が確認されている。また、海外ではと畜場関係者など畜産従事者の抗体価の上昇が報告されていることから、今回、所轄と畜場に搬入される牛のレプトスピラ保有状況の調査を実施した。

【材料及び方法】平成24年5月から平成25年7月までに搬入された経産牛(ホルスタイン種)6,630頭のうち、無作為に抽出した238頭及び間質性腎炎がみられた24頭の計262頭から、血液(238検体)、尿(238検体)、腎臓(262検体)を採取した。血清を用いた顕微鏡下凝集反応(MAT)により8血清型について抗体価を測定し100倍以上を陽性とした。MAT陽性個体の腎臓については抗L.biflexaポリクロナール抗体を用い免疫染色を実施した。また、尿と腎臓からの菌分離を行うとともに、腎臓を用い、PCR法によりレプトスピラ遺伝子の検出を実施した。

【成績】MATにより6頭(陽性率2.5%)の牛で陽性が認められた(Autumnalis 1頭、Hebdomadis 1頭、Pomona 1頭、Hardjo 3頭)。この6頭について免疫染色を実施したが、全て陰性。また、菌培養、PCR検査の結果も全て陰性であった。

【考察】抗体陽性牛は、近い過去にレプトスピラの感染があったと推察できる。今回は菌の存在を示せなかったが、抗体陽性牛が搬入されていることが確認できた。と畜検査に当たり、黄疸や血色素尿を呈する牛については本症も念頭において検査するとともに、と畜場関係者にも感染予防を注意喚起する。今後、比較的腎臓に病変の多く認められる大とく(12ヶ月齢未満)を中心に調査を継続する。

## 公-3

北海道の敗血症豚由来 *Streptococcus suis* に関する分子疫学調査○大野祐太<sup>1)</sup> 大久保寅彦<sup>2)</sup> 池田徹也<sup>3)</sup> 清水俊一<sup>3)</sup> 横山光恵<sup>1)</sup> 古崎洋司<sup>1)</sup>

1) 早来食肉衛査 2) 酪農大感染・病理 3) 道衛研

【はじめに】早来食検では頻繁に豚の疣贅性心内膜炎から *Streptococcus suis* (以下、*S. suis*) を分離する。それらが孤発事例の集積であるのか、もしくは互いに関連のある敗血症であるのかを明らかにするため、昨年度からパルスフィールドゲル電気泳動 (以下、PFGE) を中心とした疫学調査を行い、報告してきた。

本年度は早来食検で分離された *S. suis* だけでなく、全道の食検に保管されていた分離株を加えて解析を行うと共に、ST complex の推定、病原性遺伝子の検出、薬剤感受性試験によって *S. suis* のプロフィールを調査した。

【材料および方法】早来食検で平成22年から分離保存されていた87株に加え、八雲食検、岩見沢食検、東藻琴食検、帯広食検、旭川市、函館市から分与された分離株を合わせて全127株の *S. suis* を用いた。

PFGE の前処理には制限酵素 Sma I を用いた。ST complex は3つの線毛関連遺伝子 *sbp2*、*sep1*、*sgp1* の有無で推定した。病原性遺伝子は *arcA*、*sly*、*mrp*、*epf* の4つをリアルタイム PCR で検出した。薬剤感受性試験は5つの抗菌薬 DOXY、OTC、LCM、KM、EM の MIC を測定し、レンサ球菌属の Break Point に従って耐性を判定した。

【結果】PFGE において90%以上の相同性を持つ分離株を同一クラスターと定義したところ、早来由来で7つ、その他の食検由来で5つのクラスターが形成され、更に3つの食検に由来するクラスターが1つ形成された。

線毛関連遺伝子から ST1 complex と推定されたものが12株、ST28 complex が108株、その他が7株あった。病原性遺伝子については *arcA* が127株全てから、*sly* が13株から、*mrp* が116株から、*epf* が11株から検出された。

薬剤耐性率は DOXY が46%、OTC が87%、LCM が75%、KM が8%、EM が61%であり、これら5薬剤全てに耐性があったのは2株 (1.6%)、全てに感受性があったのは5株 (3.9%) であった。

【考察】当初の疑問に対しては、PFGE において同一生産者の分離株がクラスターを構成していたこと、それらが同一の ST complex に属したこと、4つの病原性遺伝子の有無が一致したことから、孤発事例の集積ではなく同一系統の *S. suis* が継続的に汚染する敗血症であると示唆された。それは早来食検で頻繁に *S. suis* を分離する5つの農場だけではなく、八雲食検の4つの農場も同様であった。

また、複数の生産者によって構成されるクラスターがあり、農場間の交差汚染が示唆された。汚染が拡大する経路については不明であるが、遠方の農場で近縁な株が分離されていることから、人為的な要因も疑われた。

## 公-4

## 所管と畜場における豚丹毒の継続的発生と対応について

○秋山貴洋 深瀧弘幸 遠藤敏郎

帯広食肉衛査

【はじめに】豚丹毒は、豚丹毒菌の感染によって引き起こされる急性 (蕁麻疹型、敗血症型) または慢性 (心内膜炎型、関節炎型) の感染症で、と畜検査で発見された場合は、とさつ・解体禁止等の措置がとられる疾病である。今回、所管と畜場で、特定農場から出荷された豚における豚丹毒の継続的な発生事例に遭遇したので報告する。

【発生状況】平成25年5月末、A農場出荷豚の解体後検査時に、頭頸部から背部にかけて両側性に大小不同の菱形赤色発疹が多数認められたため、豚丹毒を疑い細菌検査を実施した結果、皮膚及び皮下織より豚丹毒菌が検出され、全部廃棄処分となった。以降、翌年3月末まで豚丹毒の継続的な発生が確認され、A農場出荷豚のうち合計45頭が全部廃棄処分となった。当所の豚丹毒による全部廃棄頭数は例年0~2頭であったのに対し、平成25年度は46頭となった。

【対応】本事例では表皮に病変が無く、皮下脂肪のみに菱形疹が認められた蕁麻疹型や、生体検査時に肉眼的、臨床的著変を示さず、とさつ解体後に内腸骨リンパ節の腫大や関節液の増量が認められた関節炎型など、生体検査では発見しにくい事例が多かった。このため当所では、と畜検査員に対して実際の症例の写真を用いた研修を実施するなど、と畜検査体制の強化を図り、特に剥皮後の枝肉の精査、異常リンパ節の確認に努めた。家畜保健衛生所とは、家畜伝染病予防法に基づく通報のみでなく、生産者も交えた会議を開催するなど、と畜検査における豚丹毒発生状況や生産現場の飼養状態、防疫状況などの情報交換や改善策の協議を積極的に行った。

【結果】平成25年5月の皮膚型豚丹毒の発生以降、当初は蕁麻疹型、心内膜炎型、関節炎型が混在し、その後関節炎型主体で豚丹毒の発生が約1年間続いたが、関係者間の協議結果を踏まえ、ワクチンプログラムの見直し、飼養環境の消毒など飼養衛生管理の徹底、適切な抗生物質の投与、と畜場に搬入する豚の健康チェックなどが徹底された。その結果、平成26年4月以降、所管と畜場において豚丹毒の発生は認められていない。安全・安心な食肉の生産を推進するためには、と畜検査の結果を分析の上、生産者に分かりやすく加工し生産段階にフィードバックするとともに、家畜保健衛生所や生産者と情報の共有化を図り、同じ認識の下に疾病等の排除に取り組むことが有効であると思われる。

## 公-5

## 管内と畜場における牛白血病の発生状況について

○館江弘明 横山雄市 秋山貴洋 宮内 健 根本卓弥 遠藤敏郎

## 1) 帯広食肉衛検

【はじめに】牛白血病は、全身性の悪性リンパ腫を主徴とする疾病であり、家畜伝染病予防法の届出件数は年々増加しているとの報告がある。一般的に典型的な臨床症状を示さないものは生前診断が困難なため、その発見はと畜検査段階であることが少なくない。そこで、食肉衛生検査現場からみた牛白血病の現状と最近の傾向を把握するために、所管すると畜場における平成22年度から平成25年度の4年間の牛白血病発生状況を調査した。

【調査結果】当所管内で過去4年間にと畜された牛387,552頭のうち、178頭(0.045%)が牛白血病と診断され全部廃棄処分となった。この期間に種々の原因で全部廃棄処分となった牛3,036頭のうち、牛白血病の占める割合は5.86%であり、高度の水腫、敗血症、膿毒症に次いで4番目に多い疾病であった。36カ月齢以上の牛が135頭と約4分の3を占める一方、36カ月齢未満の若牛も43頭(24.2%)認められた。牛白血病178頭のうち、一般と畜で発生した牛白血病133頭(74.8%)の生体検査所見は、「著変なし」が87頭(65.4%)であった。病畜と畜で発生した45頭(25.2%)の生体検査所見は、起立不能35頭(77.7%)、消瘦7頭(15.5%)、起立困難5頭(11.1%)などであった。内臓検査所見では、全身のリンパ節を中心に各臓器に広く腫瘍の形成が認められ、特に心臓、胃、腎臓、脾臓、子宮に顕著であり、過去の報告と一致するものが多くみられた。

【考察】4年間のデータ分析では、所管すると畜場での牛白血病の発生率に有意な上昇は認められなかったものの、広く病気が蔓延している状況がうかがわれた。今回の調査で、36カ月齢未満の牛の発生が全体の約4分の1を占めており、散発型が含まれている可能性も含め、疫学の解明には今後の研究の進展に期待したい。牛白血病と診断され全部廃棄処分となった牛の多くが、生体検査では特徴的な所見が認められなかったことから、今後も引き続き牛白血病を常に念頭に置いて検査を行い、食肉の安全確保を図っていきたい。今回の調査結果から、農場において臨床的な症状がみられないものが数多くいることが示唆されたことから、今後も調査を継続し、得られたデータを生産者等に情報提供することを考えていきたい。

## 公-6

## 残留抗生物質検査法における増殖用液体培地の検討

○中野由佳子<sup>1)</sup> 久道 萌<sup>1)</sup> 内野倫成<sup>1)</sup> 島垣孝史<sup>1)</sup> 清水俊一<sup>2)</sup>

## 1) 八雲食肉衛検 2) 道衛研

【はじめに】道内産食肉の安全性を確保するため、厚生省通知(平成6年7月1日付け衛乳第107号)に基づき、残留動物用医薬品モニタリング検査及び注射痕等の検査において、「畜水産食品中の残留抗生物質簡易検査法」を用いている。この検査法では、*Micrococcus luteus* ATCC9341 (*Kocuria rhizophila* ATCC9341)(以下MI)の継代培地として日水製薬製の感受性測定用ブイヨン(以下STB)を指定しているが、STBの販売が平成24年9月で終了するのに伴い代替培地の検討が必要になった。そこで今回、全国食肉衛生検査所協議会(以下全食協)加入機関に対応状況についてアンケート調査を実施し、更に代替培地と培養方法の検討を行ったので報告する。

【材料及び方法】1) アンケート調査：全食協加入機関(111ヶ所) 2) 代替培地の検討：ミュラーヒントンブイヨン(以下MHB)、ブレインハートインフュージョン(以下BHI)等の9種類(240検体)について阻止円の直径・明瞭さについて比較検討した。3) 2)によりMHBを候補とし更に培養時間を含め検討した(540検体)。

統計処理として阻止円の直径、菌数、培養時間の解析(母平均の区間推定・一元配置の分散分析・回帰式)、阻止円明瞭判定(順位和検定・一対比較法)を行った。

【成績及び考察】1) アンケート調査：回答数(97/111)。現在STBを使用している施設(78/97)。その内代替培地にMHBを考えている施設(14/78)があったが、検討中及び未定が(64/78)で決めかねている施設が多かった。2) 培地の検討：MHBを含め5種類の培地で阻止円の直径が $14 \pm 1$  mmを満たした。その内トッドヒューイット、トリプトソイブイヨン(以下TR)はバラツキが多く、培地にグルコース等添加しても阻止円に影響は無かった。明瞭さについてはBHI > TR > MHBの順であった。MIは基礎培地にSTBのようにグルコース等の含有がなくても、発育は落ちるが阻止円に影響は無く、MHBが統計的に有意であった( $p < 0.01$ )。3) 2)の結果、MHBに絞って培養時間について検討したところ、22~24時間培養で菌数と阻止円の直径に相関( $r = -0.898$ )があり、阻止円の明瞭さも確認できた。

以上のことから、継代培養時間はMHBで22~24時間培養が阻止円の直径についてもSTBと差が無く、再現性があり代替培地として使用可能である。

## 公-7

## Multiplex real-time PCR を用いた敗血症等診断における迅速検査法の検討

○松本斉子<sup>1)</sup> 通山佳之<sup>1)</sup> 池田徹也<sup>2)</sup>

1) 帯広食肉衛検 2) 道衛研

【はじめに】と畜検査において処分保留し精密検査を行う事例は、敗血症を疑う場合が最も多い。精密検査で複数の臓器等から同一の菌を分離した場合は敗血症と診断されるが、菌種を同定するまでには発生から5日程度要する。そのため保留時の判定は必要最小限の生化学性状試験で決定されることが多い。また、豚においては豚丹毒が疑われる保留も多く、迅速な判定が求められる。分離菌を同定する際、生化学性状試験に同定キットを使用しているが、その判定に迷う例も少なくない。今回、複数の敗血症等起因菌を迅速に判定することを目標に、multiplex real-time PCR を用いた検査法を検討した。本法では、Tm 値により増幅産物を特定できるインターカレーター法を採用し、偽陰性を防ぐために内部標準 (IAC) を導入した。本法により、敗血症等診断の迅速化、効率化、同定精度の向上が認められたため報告する。

【材料及び方法】当所の過去の敗血症等の検査結果から、分離された主要な3菌種、2属を対象菌に設定し、前者3菌種およびIACを検出可能なAセット、後者2属およびIACを検出可能なBセットの2組のmultiplex real-time PCRを構築した。保存株(10菌種、25株)および搬入された検体10頭(牛4頭・豚6頭)からの分離菌に対して、本法を実施した。なお、検体からの分離菌については、各種同定キットによる同定も行った。

【結果及び考察】保存株について本法を実施し、融解曲線分析を行ったところ、Aセット・Bセットともに菌種・属ごとのTm 値およびIACのTm 値が2.5℃以上離れており、区別することが可能であった。検体からの分離菌について本法と各種同定キットによる検査を実施したところ、同じ判定結果が得られた。また、Aセットで対象の3菌種以外、Bセットで対象の2属以外の菌株を検査した場合、それぞれIACの増幅だけが確認された。このことから、IACの導入により、その菌株が検査対象外の菌種・属であったのか、PCR阻害物質等による偽陰性であったのかを明確に区別できることが分かった。本法は、前処理を含めて2時間程度で判定でき、複雑な操作も必要としないが、主要な敗血症等起因菌を網羅しているため、多くの事例に対して活用できる。このように、検査の迅速化、効率化、同定精度の向上が期待できることから、敗血症診断において非常に有用と考えられる。

## 公-8

## と畜場の汚染指標菌として腸内細菌科菌群を用いる方法の検討

○古崎洋司 千葉一成 小林健一 横山光恵

早来食肉衛検

【はじめに】平成23年4月に焼肉チェーン店で起きた腸管出血性大腸菌による食中毒事件を受け、生食用食肉に関する成分規格が設定され、腸内細菌科菌群陰性となった。日本でのと畜場における微生物汚染の指標菌として大腸菌群を用いているのに対し、対EU輸出食肉での微生物検査には腸内細菌科菌群を用いている。今回、腸内細菌科菌群に対して、コロニー数の計測を実施し、大腸菌群と比較検討したところ若干の知見を得たので報告する。

【材料及び方法】①と殺解体した牛の直腸から採取した30頭の糞便を検体とし、腸内細菌科菌群にはVRBG寒天培地を、大腸菌群にはデソキシコレート寒天培地を使用し、段階希釈後、混釈法で、それぞれの典型コロニー数(cfu/g)を計測。このうち10検体の全コロニーについて腸内細菌科菌群の確定試験を実施した。②通常行う牛10頭及び豚15頭の胸部及び腹部の拭き取り検査で両菌群を計測し、比較した。

【成績】①糞便の検査で、腸内細菌科菌群は $2.0 \times 10^3 \sim 9.1 \times 10^8$ cfu/g、大腸菌群は $2.4 \times 10^3 \sim 9.4 \times 10^8$ cfu/gとほぼ同じで、検体毎の比較では25検体が同一オーダーであり、5検体で大腸菌群が1オーダー高かった。幾何平均の中央値の差の検定では双方に有意差はなく(ノンパラメトリック検定:腸内細菌科菌群6.04、大腸菌群6.34)、スピアマン順位相関係数検定では有意な正の相関があった( $P < 0.05$ )。10検体のVRBG寒天培地に形成した820コロニーの確定試験の結果、全てがオキシダーゼ陰性及びグルコース発酵性で、腸内細菌科菌群の定義を満たした。②枝肉拭き取り検査では胸部及び臀部いずれも両群とも全て有効コロニー数未満あるいは不検出であった。

【考察】両群の比較から腸内細菌科菌群は大腸菌群と同様の指標菌になると思われた。今回の確定試験の結果、VRBG寒天培地上のコロニー全てが定義を満たしたことから、検査における正確な糞便汚染の評価が可能と思われる。また、牛及び豚の枝肉の拭き取り検査から、指標菌としても大腸菌群と同様に使用できるとことが解った。腸内細菌科菌群は大腸菌群と違い、食肉の汚染で問題となるサルモネラ属菌等が含まれるメリットを考慮すると、糞便由来菌としては大腸菌群よりも有用であると思われ、今後、国内のと畜場及び他の食肉関連施設での糞便由来の指標菌として腸内細菌科菌群を使用すべきと考えられる。

## 公-9

## 生食用食肉のブドウ糖発酵性試験の検討

○平井佑治<sup>1)</sup> 原田哲也<sup>2)</sup> 堀内基広<sup>1)</sup>

1) 北大獣医衛生 2) 大阪府立公衆衛生研究所

【はじめに】腸内細菌科菌群は衛生指標菌の一つであり、日本では生食用食肉の成分規格として初めて採用された（平成23年9月26日食安発0926第1号）。腸内細菌科菌群は、バイオレットレッド胆汁ブドウ糖寒天培地上で特徴的な集落を形成し、ブドウ糖を発酵するオキシダーゼ反応陰性の微生物と定義される。公定法は、ISO法（ISO21528-1:2004）を基に作成されているが、ブドウ糖発酵性試験に用いる培地は市販品を含め、複数が記載されている。今回、ブドウ糖発酵性試験に使用できる3種類の培地の間で、ブドウ糖発酵性試験の感度を比較するために、生食用食肉を含む食品から分離した分類学上の腸内細菌科に属する菌株を用いて、ブドウ糖発酵性試験を実施した。

【材料と方法】食品から分離され、TSI培地及びLIM培地で腸内細菌と判定された29株を用いた。ブドウ糖発酵性試験には、1) ISO法で指定されたブドウ糖発酵性試験用培地（ISO処方）、2) 1%グルコースとなるように添加した炭水化物分解試験用OF基礎培地‘栄検’（OF培地）、3) 1%グルコース、0.3%寒天となるように添加し、半流動培地化したアンドレイドのペプトン水（アンドレイド）を、高層部が3cmになるように調整したものをを用いた。試験法の実施および判定は公定法に基づいて実施した。MALDI Biotyper、16s rRNAの塩基配列解析、api20Eにより菌種同定した。

【成績】ISO処方では、29株中11株が陽性、6株は陰性、12株は判定不能であった。OF培地では、29株中27株が陽性であったが、2株は判定不能であった。アンドレイドでは、全て陽性となった。同定した菌株は全て分類学上の腸内細菌科に属する細菌であった。

【考察】陽性とならなかった菌株は*Pantoea*属菌、*Proteus*属菌、*Serratia*属菌であった。要因として、高層培地での増殖速度や代謝速度、代謝産物が影響していると考えられる。菌種同定の結果と各試験法の感度を検討した結果、ブドウ糖発酵性試験にはアンドレイドが最も適していると考えられた。本結果が示すように、ブドウ糖発酵性試験に用いる培地の種類によって、規格検査の判定結果が変わる可能性がある。腸内細菌科菌群の検査法の画一性を担保するためには、ブドウ糖発酵性試験に用いる培地を限定する必要があると考えられた。

## 公-10

## 動物園飼育下クジャクバトに発生したハトリコモナス感染症

○岩澤裕介<sup>1)</sup> 富川創平<sup>2)</sup> 入交利都<sup>2)</sup> 柚原和敏<sup>2)</sup> 古林与志安<sup>1)</sup> 堀内雅之<sup>1)</sup>

1) 帯畜大基礎獣医 2) おびひろ動物園

【はじめに】ハトリコモナス (*Trichomonas gallinae*: TG) は鳥類の上部消化管に感染する原虫で、発症時には同部に潰瘍・チーズ様結節を形成し、食欲不振・嚥下困難などの症状を示す。ハトではしばしば観察される感染症であるが、動物園飼育下鳥類におけるTG感染症の調査報告はない。

【材料と方法】2013年、嘔吐、沈鬱などの症状を呈して斃死した動物園飼育下クジャクバト（症例1）を病理組織学的に検索したところ、TGの感染が疑われたためPCRによるトリコモナス属およびTGに特異的な遺伝子断片の検出を試みた。加えて、症例1と同居していたクジャクバトのトリコモナス属原虫の感染状況を調査するため、食道～そ嚢スワブを採取し、PCRによるトリコモナス属特異的な遺伝子断片の検出と塗抹標本の顕微鏡検査を試みた。

【結果】症例1では組織学的にそ嚢及び腺胃においてびらん・潰瘍形成、同部への偽好酸球を中心とする炎症性細胞の浸潤が観察された。また、同部では多数の細菌塊と共に、小型の類円形核を有する組織球様の原虫様構造物が観察された。その他臓器に著変は観察されなかった。そ嚢及び腺胃をPAS染色した結果、上記原虫様構造物が赤紫色に染色された。そ嚢及び腺胃のパラフィン切片からのPCRでは、TGに特異的な遺伝子断片の増幅が認められた。2014年の調査では、PCRにより、同居ハト全75羽のスワブからトリコモナス属の遺伝子断片が確認され、そ嚢スワブの直接鏡検により鞭毛、波動膜を有する原虫の遊走が確認された。一方、TG感染が関与していると考えられる臨床徴候は観察されなかった。

【考察】症例1は、TG感染に特徴的なチーズ様結節形成が確認されなかったものの、TG感染により上部消化器病変が生じ、斃死したものと考えられた。追加調査により、同居ハト全例でトリコモナス属原虫特異的な遺伝子断片が確認され、直接鏡検での形態学的特徴などからTGであると考えられた。本調査により、動物園飼育下クジャクバトにおいてTG感染が蔓延している事が明らかになったが、今日まで症例1以外に発症例やTG感染が直接関与したと考えられる死亡例は観察されていない。しかし、症例1のように典型的な臨床像を示さずに死に至る個体が存在したことなどから、TG感染の蔓延は動物園飼育下ハトにとって潜在的なリスクであり、対策が必要であると考えられた。

## 公-11

## 飼育展示下クジャクバトに発生したハトトリコモナス症への対応

○富川創平<sup>1)</sup> 入交利都<sup>1)</sup> 杉本美紀<sup>1)</sup> 岩澤裕介<sup>2)</sup> 堀内雅之<sup>2)</sup> 古林与志安<sup>2)</sup> 柚原和敏<sup>1)</sup>

1) おびひろ動物園 2) 帯畜大基礎獣医

【はじめに】ハトトリコモナス症は鞭毛虫類に分類される原虫の一種、ハトトリコモナス (*Trichomonas gallinae*) によっておこる鳥類の感染症である。*T.gallinae* は幅広い宿主域を持ち、飼育下ではブンチョウ、カナリア、ハトで検出率が高く、野生下ではハトや猛禽類の感染報告が多い。*T.gallinae* の生活環はトロフォゾイトのみであり、本症は感染親鳥から雛への給餌（吐き戻し）、飲水や餌場を介した機械的伝播、感染鳥の捕食などトロフォゾイトを経口的に摂取することによって水平感染する。海外では近年、本症と野鳥の大量死との関係が示唆され研究されているが、国内では詳細な報告がほとんどない。2014年4月、おびひろ動物園のクジャクバト舎で本症が確認された。動物園は、*T.gallinae* に対する感受性の異なる鳥類が長期間、同じ敷地内に混飼されている特殊な環境である。今回、本症の飼育鳥類への感染状況を明らかにし、発生後の対応に資することを目的に浸潤状況を調査した。

【材料及び方法】調査はおびひろ動物園で飼育している鳥類（9 獣舎35種192羽、）のうち、感染リスクが高い6 獣舎25種98羽を対象とした（クジャクバト舎は除く）。飼育鳥の捕獲及び採材が可能な4 獣舎（オンドリ舎、鳥類舎、フラミンゴ舎、ワシタカ舎）では、嗦嚢スワブ（8 種20羽20検体）、食道スワブ（3 種21羽21検体）及び環境材料（飲水4 検体、餌場スワブ5 検体）を採取した。飼育鳥の捕獲及び採材が困難な2 獣舎（ガンカモ池、どんぐりの家）では、環境材料（飲水2 検体、餌場スワブ5 検体、池の水1 検体）のみを採材した。全ての材料（嗦嚢スワブ20検体、食道スワブ21検体、環境材料17検体）より DNA を抽出し、トリコモナス属原虫に特異的な PCR を実施した。

【成績】嗦嚢スワブは2 検体（キジバト、アオバト）で PCR 陽性であった。他の嗦嚢スワブ、食道スワブ、環境材料は全て PCR 陰性であった。

【考察】PCR 陽性の2 羽は、PCR 陰性の3 羽を含む5 羽と鳥類舎の同一ケージで飼育展示されている。2 羽の感染のみで同居鳥への感染がないこと、環境材料は全て PCR 陰性であったことから、クジャクバト舎から鳥類舎への感染経路は特定できなかった。今後、未調査の獣舎についても調査して感染経路を明らかにしたい。さらに、クジャクバト舎及び鳥類舎は駆虫を実施し、鳥類を導入する際の検疫時、感染が疑われる場合には本症を検査する体制を整えたい。

## 公-12

## 十勝地域のアライグマにおける A 群ロタウイルス感染

○山口英美<sup>1)</sup> 藤井 啓<sup>2)</sup> 小林恒平<sup>3)</sup> 今井邦俊<sup>4)</sup> 門平睦代<sup>1)</sup>

1) 岩手大学院連合農学 2) OAT アグリテクノ 3) 千葉科学大 4) 帯畜大新興・再興感染症

【はじめに】アライグマは全国的に分布している外来種で、農作物被害や在来種の捕食等引き起こしている。畜産地帯の十勝地域では、アライグマの畜舎内営巣や家畜飼料摂食が確認されていることから、家畜との直接的・間接的接触によりアライグマが家畜病原体を伝播する可能性が考えられる。実際、十勝のアライグマからは牛由来株と遺伝的に近縁なサルモネラが分離されており、アライグマが牛由来のサルモネラに感染したことが指摘されている（藤井、未発表）。本研究では、アライグマに感染性を持ち、家畜を含め様々な哺乳類において幼齢期を中心に下痢を引き起こす病原体である A 群ロタウイルスについて十勝のアライグマにおける感染状況を調査することで、アライグマがサルモネラだけではなく、他の家畜の病原体の伝播に関与している可能性を検討した。

【材料および方法】2010~2013年に十勝地域で捕獲された73頭のアライグマから採取した血清を用いて補体結合試験による抗体検出を行った。

【結果】ロタウイルス抗体保有率は11%（8/73）であった。オス・メス、成獣・幼獣の間に抗体保有率の有意な差はなかった。

【考察】本研究の結果、十勝のアライグマがロタウイルスに感染していることが分かった。

アライグマがどのような経路でロタウイルスに感染したのかは不明であるが、アライグマは畜産環境などに侵入することからロタウイルスが畜舎へ伝播されるのを防ぐためにも畜舎周辺からアライグマを防除することが求められる。今後は、アライグマの畜舎利用が病原体伝播を引き起こしているのかを評価するために、感染したウイルスの遺伝的背景を調べるとともに、アライグマの生息地域の家畜やその他の野生動物におけるロタウイルス感染症の発生状況との関連を検討したい。

## 公-13

## 鉛弾規制後も生じているワシ類における鉛汚染の実態

○渡辺有希子<sup>1)</sup> 角田真穂<sup>1)</sup> 石井千尋<sup>2)</sup> 池中良徳<sup>2)</sup> 石塚真由美<sup>2)</sup> 齊藤慶輔<sup>1)</sup>

1) 猛禽類医学研究所 2) 北大獣医毒性

【はじめに】絶滅危惧種に指定されているオオワシ、オジロワシがエゾシカ猟に用いられる鉛弾を誤食し鉛中毒が多発した事象を受け、北海道は大型獣の狩猟における鉛弾の使用に関し、平成12年から段階的に規制を実施している。しかし依然として鉛中毒の被害は続いたため、平成26年4月から施行された北海道エゾシカ対策推進条例では狩猟時における鉛弾の所持禁止が盛り込まれた。鉛弾所持禁止は全国でも初の試みであり、称賛すべき北海道の英断である。規制による今後の評価、また更なる鉛中毒防止策への寄与とすべく、近況を含め鉛中毒の発生状況をまとめる。

【方法】環境省釧路湿原野生生物保護センターに救護及び死体収容されるワシ類の血液または臓器を用いて鉛濃度の測定を行った。一般的なエゾシカの狩猟期間は10月1日から翌年1月31日であること、またワシが越冬のため北海道に飛来するのは11月頃から翌年4月頃であることを鑑み、収容期間の区切りを10月1日～翌年6月30日とし、狩猟との関連を探るべく収容羽数と鉛汚染数の集計と解析を行った。

【結果】鉛弾の規制が始まる平成11年には、鉛汚染が確認されたのはオオワシ (HP) 11羽、オジロワシ (HA) 1羽であったが、平成12年：HP12、HA1、平成13年：HP8、HA4、平成14年：HP4、HA6、平成15年：HP7、HA1、平成16年：HP5、HA3、平成17年：HP2、HA2、平成18年：HP7、平成19年：HP9、HA1、平成20年：HP3、HA2、平成21年：HP2、HA2、平成22年：HP4、HA2、平成23年：HP1、HA1、平成24年：HP3、HA2、平成25年：HP4、HA4と規制後も鉛汚染が確認され続けている。特にオオワシにおいては、収容数のうち約30%に鉛汚染が確認され、死因の主要因となっている。オジロワシにおいても収容鳥の約10%に鉛汚染が確認されており、その影響は低くない。また所持禁止の施行以降に救護されたオオワシ1羽に中毒レベル、オジロワシ1羽に暴露レベルの鉛汚染が確認され死亡した。過去にも中毒レベルで収容されたワシは、重篤な神経症状を呈し、多くが救命できていない。

【まとめ】鉛による被害は致死的で、特に希少種に大きな影響を与えることが懸念される。これまでの使用禁止の条例では、遵守しないハンターが少なからず存在し、鉛汚染の撲滅とはならなかった。今回の所持規制が現場において強い抑止力となることを願いつつ、今後もモニタリングを継続し警鐘を鳴らし続けたい。

## 公-14

## 2014年における酪農学園大学野生動物医学センター WAMC の教育研究活動報告

○浅川満彦

酪農大感染・病理

2004年来、本学獣医学研究科が代表となる私立大学戦略的研究拠点形成支援事業（以下、戦略事業）において、野生動物医学センター（以下、WAMC）は、野生・動物園水族館（以下、園館）・特用家畜・エキゾチックペットなどの様々な動物を対象に研究・教育活動を展開している。開設されてから10年、その活動概要を本大会で口頭で紹介し、かつ北海道獣医師誌上でも報告をさせて頂いている。戦略事業は WAMC 設立の前年、2003年に始まり、今年まで3期にわたり連続的に助成をされている。今年は、この事業に加え、基礎医学分野でアプライしていた文科省科研費基盤研究「動物園水族館動物に密かに蔓延する多様な寄生虫病の現状把握とその保全医学的対応」が採択され、これまで以上に園館との共同研究が促進された。たとえば、道内の園館は言うに及ばず、新規の共同研究としては広島市安佐動物公園で繁殖されるオオサンショウウオの寄生虫病検査やシンガポール・ジュロンバードパークの吸虫症解析などが展開中である。また、本学大学院獣医学研究科では初めての事例であるが、今年博士課程に入学したフルタイムの院生が、神戸市にある野鳥専門の展示施設に勤務しながら研究を行っている。サイチョウやペンギンなどの個体情報と疾病の管理を中心としたテーマを模索している。これら研究の中間報告を含みつつ、WAMC を拠点に実施した、あるいは予定の教育および普及事業について概要を紹介したい。

## 公-15

## 沖縄八重山諸島に棲息するアオウミガメの血漿中エンドトキシン活性値

○西 康暢<sup>1)</sup> 鈴木一由<sup>1)</sup> 能田 淳<sup>1)</sup> 亀田和成<sup>2)</sup> 浅川満彦<sup>1)</sup> 土谷正和<sup>3)</sup> 横田 博<sup>1)</sup>

1) 酪農大獣医 2) 黒島研 3) Charles River Laboratories

【緒言】ウミガメは長寿であることから海洋環境汚染のバイオマーカーとして注目されている。我々はこれまでに野生ウミガメの血漿中 Hg と Cd 濃度において黒島海域に生息するアオウミガメにて有意に高い値がみられたことなどから、海洋生態系における汚染レベルを評価する良いバイオマーカーとしての可能性を調査している。しかし、生体内微量元素動態は炎症によって大きく影響を受けるためその個体の炎症状況を把握しなければならない。一方、血清および血漿中エンドトキシン活性値はエンドトキシンショックや全身性炎症の重症度評価、予後判定に有用である。しかし、これは実験室内機器で測定しなければならず、そして煩雑かつ時間を要するため必ずしも実用的ではない。近年、携帯用エンドトキシン測定システム (PTS™) が Charles River 社より市販されている。従って、本研究では、PTS™ を用いてウミガメの血清中エンドトキシン活性値の測定が可能か否かを正確度と精度評価、および標準法である *Limulus Amebocyte Lysate* (LAL) - カイネティック比色法 (KCA) およびカイネティック比濁法 (KTA) と比較した。

【材料および方法】沖縄八重山諸島で捕獲された野生アオウミガメ (n=18) と沖縄本島で飼育されているアオウミガメ (n=5) の背側頸静脈洞から採血し、得られた血漿を20倍希釈後に80℃、10分間熱処理し、*Limulus Amebocyte Lysate* (LAL) - カイネティック比色法 (KCA) およびカイネティック比濁法 (KTA) を標準法とし、PTS™ 法によりエンドトキシン活性値を測定した。得られたデータの比較は Friedman 検定を、相関性は Pearson product-moment correlation coefficient を用いて評価した。

【成績】KCA および KTA 法は正確度及び精度が高く、両測定間で有意な正の相関が認められた ( $r^2=0.971$ ,  $p<0.001$ )。PTS™ 法も同様に正確度および精度が高く、KCA ( $r^2=0.731$ ,  $p<0.001$ ) および KTA 法 ( $r^2=0.731$ ,  $p<0.001$ ) に対して有意な正の相関が認められた。特に KCA 法に対する PTS 法の回帰式は  $PTS \text{ (EU/ml)} = 0.98 * [KCA \text{ (EU/ml)}] + 0.06$  であった。

【考察】20倍希釈、80℃、10分の加熱処置をして測定に用いたとき、PTS™ は KCA および KTA 法と測定値間で差は認められず、有意な正の相関が認められた。また、PTS™ は携行可能であり、少量の血清サンプルでウミガメの血漿中エンドトキシン活性値を測定できることから、野外調査での炎症病態評価に有用と思われる。

## 公-16

## チャップマンシマウマ精巣における性ステロイドホルモン合成

○三好亮輔<sup>1)</sup> 佐々木基樹<sup>1)</sup> 柚原和敏<sup>2)</sup> 井上文男<sup>2)</sup> 富川創平<sup>2)</sup> 杉本美紀<sup>2)</sup> 近藤大輔<sup>1)</sup> 北村延夫<sup>1)</sup>

1) 帯畜大 2) おびひろ動物園

【緒論】シマウマには、サバンナシマウマ (*Equus quagga*)、グレービーシマウマ (*E.grevyi*)、そしてヤマシマウマ (*E. zebra*) の3種が知られており、チャップマンシマウマ (*E.q.chapmani*) はサバンナシマウマの一亜種である。これまでに、シマウマの精巣に関する繁殖生理学的研究は幾つか報告されている。サバンナシマウマでは左の精巣が右に比べて大きいと言われており、また春機発動は2歳から4.5歳の間に認められると報告されている。しかし、シマウマ精巣の細胞機能学的解析は、これまでほとんどなされていない。そこで今回、精巣の発達や精子形成に必要な不可欠である性ステロイドホルモンの合成部位を免疫組織化学的に解析した。

【材料と方法】2014年2月に、おびひろ動物園で死亡した雄成体のチャップマンシマウマ (18歳) から左右の精巣を採取し、ブアン液で固定した後、定法に従って4 μm 厚のパラフィン切片を作製した。組織学的検索のため HE 染色を施し、さらに、ABC 法を用いてステロイド合成酵素である P450scc および P450arom、さらにアンドロジェンレセプター (AR) の発現と分布を免疫組織化学的に検索した。また、比較のため同じウマ属のウマの精巣も同様に検索した。

【結果と考察】左の精巣重量 (77.0g) は右 (61.4g) よりも重かった。この結果は、過去の報告と一致していた。組織学的検索において、曲精細管では精子形成が認められ、さらに多数の精子が精巣上体にも存在していた。免疫組織化学的解析では、P450scc の陽性反応は、ライディッヒ細胞においてのみ確認された。さらに P450arom では、顕著な陽性反応がセルトリ細胞で認められた。しかし、生殖細胞やライディッヒ細胞には P450arom の陽性反応は確認できなかった。ウマでは、P450scc と P450arom はともにライディッヒ細胞にのみ認められた。また AR の陽性反応は、チャップマンシマウマとウマの両方において、セルトリ細胞、筋様細胞、そしてライディッヒ細胞の核に認められた。しかし、AR は生殖細胞には確認できなかった。これらの結果から、チャップマンシマウマでは、ライディッヒ細胞でテストステロンが、またセルトリ細胞でエストロジェンが産生されていることが示唆された。これは、成体のウマではエストロジェン産生がライディッヒ細胞に限局するという報告と大きく異なっていた。

公-17

### ミンククジラ、ニタリクジラおよびイワシクジラ胎盤におけるアロマトラーゼの発現と分布

○北山知代<sup>1)</sup> 佐々木基樹<sup>1)</sup> 石川 創<sup>2)</sup> 茂越敏弘<sup>3)</sup> 大隅清治<sup>3)</sup> 福井 豊<sup>1)</sup> 近藤大輔<sup>1)</sup> 北村延夫<sup>1)</sup>

1) 帯畜大 2) 下関海洋科学アカデミー 3) 日本鯨類研究所

【緒論】ミンククジラ、ニタリクジラそしてイワシクジラの胎盤を用いて、その形態学的特徴を組織学的に検索するとともに、ステロイド合成酵素である P450scc とアロマトラーゼ (P450arom) の発現と分布を免疫組織化学的に検索した。

【材料と方法】2009年および2010年に行われた第二期北西太平洋鯨類捕獲調査 (JALPN II) で得られたミンククジラ、ニタリクジラおよびイワシクジラの胎盤を、ブアン液またはリン酸緩衝10%ホルマリン液で固定し、定法に従い4 μm厚のパラフィン切片を作製した。組織学的検索のため、HE 染色、PAS 染色、MSB 染色、ベルリン青染色を施した。P450scc とアロマトラーゼの発現と分布は、ABC 法を用いた酵素抗体法により検索した。

【結果と考察】3種すべての鯨類の胎盤は、組織学的に上皮絨毛膜胎盤であった。絨毛膜と子宮内膜の嵌合は、胎子の成長に伴いより複雑になっていた。また、絨毛膜上皮は単層円柱の栄養膜細胞によって構成され、栄養膜巨細胞や栄養膜合体層細胞は認められなかった。妊娠子宮の子宮内膜では、非妊娠子宮と比べて豊富な子宮腺が観察された。腺腔内には PAS 陽性や MSB 染色性の物質が観察され、腺細胞にはベルリン青染色性の顆粒が認められた。胎子の成長に伴い毛細血管の密度は増加し、絨毛膜上皮に近接する毛細血管は多くなっていた。すべての鯨類の胎盤には明瞭なアレオラが観察され、アレオラ領域の栄養膜細胞は、他の領域の栄養膜細胞とは形態が異なっており、それらは背が高く長い微絨毛を有していた。また、アレオラ領域の栄養膜細胞では、PAS 陽性および MSB 染色性の物質を取り込んでいる像が確認された。アレオラ領域の栄養膜細胞の基部から絨毛膜間質にかけてベルリン青で染色される部位が確認された。これにより、ウマやブタと同様に、鉄イオンが子宮腺分泌物の一部として母体から胎子にアレオラを介して取り込まれ、輸送されている可能性が示唆された。免疫染色では、アレオラ領域以外の栄養膜細胞において P450scc とアロマトラーゼに対する陽性反応が認められた。この結果から、胎盤の栄養膜細胞ではエストロジェンが合成されていることが示唆された。