

山口獣医学雑誌

第 30 号

2003年12月

山口獣医学雑誌創刊 30 周年記念号

山口県獣医学会

THE YAMAGUCHI JOURNAL OF VETERINARY MEDICINE

No. 30

December 2003

A Special Number Issued in Commemoration of the 30th
Anniversary of Publication of the Official Journal

THE
YAMAGUCHI PREFECTURAL ASSOCIATION
OF
VETERINARY MEDICINE

山 口 県 獣 医 学 会

編 集 委 員 会

網本 昭輝 井上 愛子 片山 淳
中間 實徳 富永 潔 山縣 宏*

(A B C 順 : *編集委員長)

寄 稿 者 へ

山口獣医学雑誌は、山口県獣医学会の機関誌として、毎年1回発刊される。雑誌は、獣医学、人医学、生物学、公衆衛生学およびこれらの関連領域のすべての問題について、原著、総説、短報、記録および資料、等々を登載する。

原稿は、正確に書かれた日本文、英文、独文のいずれでも受理するが、この場合、英文と独文の原稿は、簡潔に要約した日本文抄録を添付すること。

原稿は、郵便番号 754-0002 山口県吉敷郡小郡町下郷東蔵敷1080-3, 山口県獣医師会館内, 山口県獣医学会事務局あてに送付すること。

THE YAMAGUCHI PREFECTURAL ASSOCIATION OF VETERINARY MEDICINE

EDITORIAL COMMITTEE

Akiteru AMMOTO Aiko INOWE Atsushi KATAYAMA
Sanenori NAKAMA Kiyoshi TOMINAGA Hiroshi YAMAGATA*

(in alphabetical order : *Editor in chief)

NOTICE TO AUTHORS

The Yamaguchi Journal of Veterinary Medicine is an official publication of the Yamaguchi Prefectural Association of Veterinary Medicine.

The Journal is published annually. The Journal publishes original articles, reviews, notes, reports and materials, dealing with all aspects of veterinary medicine, human medicine, biology, public health and related fields.

The Yamaguchi Journal of Veterinary Medicine assumes no responsibility for statements made by authors or other contributors.

Manuscripts written in correct Japanese, English or German are accepted; those in English or German should be accompanied by Japanese summaries.

Manuscripts should be sent to the Editorial Office, *The Yamaguchi Journal of Veterinary Medicine*, The Yamaguchi Prefectural Association of Veterinary Medicine, 1080-3, Higashikurashiki, Shimogo, Ogori Town, Yoshiki County, Yamaguchi Prefecture, 754-0002 Japan.

山口獣医学雑誌 第30号 2003年

山口獣医学雑誌創刊 30 周年記念号

The Yamaguchi Journal of Veterinary Medicine No.30 December 2003

A Special Number Issued in Commemoration of the 30th
Anniversary of Publication of the Official Journal

目 次

総 説

- 生産段階における細菌性食品媒介ズーノーシスに関する最近の知見
中澤宗生・鮫島俊哉・秋庭正人・吉井紀代…………… 1～20
- 獣医学領域におけるエールリッヒア症の診断
猪熊 壽…………… 21～40
- わが国の乳牛に多発する肢蹄疾患
大竹 修…………… 41～50
- 牛胚, 体外受精用器具の開発と実用化
鈴木達行…………… 51～58

原 著

- 糸状架橋構造; *Trypanosoma evansi* の形態形成に及ぼす役割
比留木 武雄…………… 59～68
- マイクロプレートを用いた *Salmonella* の H 抗原検査方法の検討
富永 潔…………… 69～74
- 動物介在ケア活動の必要性に関する調査研究 —— これからの動物介在活動や動物介在療法活動の意義 ——
成田琢郎・木山真大・川上智子・船津 格・崔 滢洛・早崎峯夫…………… 75～86

附 録

- 投稿規定…………… 87
- 山口県獣医師会学会規則…………… 88
- 山口獣医学雑誌編集内規…………… 88
- 会関係事業・刊行物…………… (奥付掲載ページ)

The table of contents in English may be found on the back cover.

総説

生産段階における細菌性食品媒介ズーノーシスに関する最近の知見

中澤宗生*・鮫島俊哉*・秋庭正人*・吉井紀代*

[受付 : 2003年10月10日]

REVIEW

CURRENT KNOWLEDGE ON FOODBORNE BACTERIAL ZOOSES ON FARM

Muneo NAKAZAWA, Toshiya SAMEISHIMA, Masato AKIBA and Noriyo YOSHII

National Institute of Animal Health, Tsukuba-shi Ibaraki-ken, 305-0856, Japan

[Received for publication : October 10, 2003]

Since the 1990s, the occurrence of emerging foodborne bacterial zoonoses, represented by enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) O157 and *Salmonella enterica* infections, has been on the rise. Today public concern about the safety of animal products is mounting. Stock farms are composed of many elements, including animals, feedstuff, drinking water for animals, the breeding environment and managing staff. It is no easy task to totally eliminate microbiological hazards. But consumer demand for safe livestock products is very strong and governments are working hard to establish a hygienic system at all stages from production to consumption, as well as to develop necessary technology. While it is important to develop measures for controlling carrier animals to eliminate the sources of foodborne pathogens, the fundamental step to be taken is to conduct proper hygienic management of livestock raising by taking account of the bacterial ecology on farms. EHEC O157 is an emerging pathogen, first identified in 1982 as a causative agent of massive foodborne outbreak. Since then the cases of EHEC O157 infection have been increasing mainly in industrial countries, raising a global issue. EHEC O157 infection is often associated with the consumption of contaminated beef, raw milk, and other bovine products. There are also reports of direct infection of humans from cattle. Controlling EHEC infection as a foodborne zoonosis is a major public and animal health concern. In particular, cattle, and possibly swine, are important in the containment of EHEC O157 within the farm environment. In order to reduce the risk of EHEC O157 contamination on farms, it is essential to know the ecology of this organism in carrier animals and in the breeding environment, and then to define management factors which influence fecal shedding.

Nontyphoidal Salmonellosis is one of the most commonly reported infections from all parts of the world. There are global pandemics of some serotypes of *Salmonella enterica*, such as Enteritidis phage type 4 and Typhimurium DT104. We have little knowledge as to the factors which have brought forth current pandemics. The recent emergence of the multidrug resistant *S. Typhimurium* DT104 has reopened the debate on the agricultural use of antibacterial drugs and the use of alternative methods of control. A consequence of outbreak of these salmonellosis turned to be a public concern. In many countries regulatory laws have been enacted to control the prevalence and distribution of *Salmonella* infections among farm animals in order to prevent

* 動物衛生研究所・安全性研究部・ズーノーシス研究室

foodborne infection.

Subclinical infections of farm livestock, however, may be associated with these organisms. As long as the organism is present on the farm, therefore, it is difficult to eliminate the infection, because transmission is sustained by environmental sources including manure and wild animals.

We review the literature about the incidence of emerging foodborne diseases including EHEC O157 and *S. Typhimurium* DT104 infections. We also discuss its ecology and preventive measures on the farm.

はじめに

細菌性食品媒介ズーノーシス (Foodborne bacterial zoonoses) は、“食中毒”のなかでヒトと動物に共通する病原細菌による感染症であり、病原体を経口的に摂取することから保菌動物やその飼育環境からの感染も含まれる。歴史的には、1世紀ほど前、ドイツのFrankenhausenで子牛肉を原因食品とする“食中毒”が発生した時、Gärtnerは死亡患者の脾臓からゲルトネル菌 (後の*Salmonella* Enteritidis) を分離し、それを“食中毒”の原因と指摘した¹⁰⁾。原因食は病気に罹った子牛をと畜処理して得たものであり、その子牛はパラチフスに罹患していたものと推測される。Gärtnerの報告は単に食中毒菌としてのサルモネラの最初の発見にとどまらず、食中毒が細菌によって起こることを初めて明らかにした医学史上不滅の業績であり、食品を介して動物の病原体がヒトに感染することを科学的に証明したことに大きな意義がある¹¹⁾。

一方、1982年、米国で初めて発生した腸管出血性大腸菌 (EHEC) O157:H7による集団感染例¹²⁾も、牛挽肉を原因食品とする“食中毒”であり、食品媒介性ズーノーシスの典型である。本菌はある頻度で食用動物が健康保菌しており、本菌感染症は今や北アメリカ、ヨーロッパはもとより南アメリカ、アフリカ、オセアニア、アジアなどほぼ全地球規模で発生し、患者数は年々増加傾向にある。なかでも、1996年のわが国における有症者総数9,500名にも及ぶ短期間での集団感染は世界的に類を見ないものであった¹³⁾。このような状況から米国、英国、日本などではサルモネラ症とともに本菌感染症を新興・再興感染症と位置づけ、緊急の対策が必要な疾病としてその予防・治療法の確立に努力が注がれている。

ここでは、細菌性食品媒介ズーノーシスを略説するとともに、生産段階でのEHEC O157、ネズミチフス菌DT 104の最近の知見について紹介し、この方面への積極的な取組みと参画を期待したい。

1. 新興・再興感染症とズーノーシス

新興感染症 (emerging infectious diseases) は現代社会が招き入れた新しい感染症であり、再興感染症 (reemerging infectious disease) はかつて抑え込んだ疾病が再び発生頻度や発生場所を増加させたものである。環境破壊とそれによる自然生態系の崩壊、温暖化、急激な人口増加と都市化、生活様式の変化、医療・医療技術の変化、経済・商業活動の変化 (輸出入の自由化: 国境を越えて大量のヒト、ペット用動物、農畜水産物などの大移動)、微生物の進化などこれまでにない大きなスケールでの変化が、病原体に対して新たなニッチを提供し感染症の発生を促進させている^{21, 65)}。歴史的検証からも、感染症が特定の社会的・文化的・環境的背景のもとで起こる人間行動の多様化に付随して発生することが知られている。最近になって新しく出現、または再出現した感染症は正にこのような現代社会の変貌を背景として生まれたものであり、10年ほど前に新興・再興感染症という新しい概念で整理された^{65, 102)}。過去30年余に30以上の新興・再興感染症が発生したが、代表的なものをTable 1に示す。当然、

Table 1 代表的な新興・再興感染症

新興感染症	再興感染症
ロタウイルス性腸炎	結核
クリプトスポリジウム症	サルモネラ症
エボラ出血熱	ジフテリア
レジオネラ症	ベスト
腎症候性出血熱	百日咳
カンピロバクター症	コレラ
薬剤耐性菌感染症	オウム病
成人T細胞白血病	Q熱
大腸菌O157:H7感染症	つつが虫病
ライム病	狂犬病
エイズ	デング熱/出血熱
ヘリコバクター感染症	ハンタウイルス肺症候群
牛海绵状脳症	黄熱病
サイクロスポーラ症	ラッサ熱
E型およびC型肝炎	リフトバレー熱
ベネズエラ出血熱	新型インフルエンザ
コレラ菌O139感染症	西ナイル熱/脳炎
猫ひっかき病	マラリア
ブラジル出血熱	エキノコックス症
ヘンドラウイルス感染症	トキソプラズマ症
M R S A / V R E 感染症	住血吸虫症
ニバウイルス感染症	回虫幼虫移行症
重症急性呼吸器症候群	(豚, アライグマ)

Table 2 注意すべき代表的なズノーシス

病原体	病名	病原体の保有動物	感染経路	対策
細菌	サルモネラ症	鶏, 豚, 牛, 犬, ネズミなど	経口感染	一般的な食品衛生対策 生肉, 生乳の飲食を避ける 動物との接触後は手を洗う 糞便処理を厳重にする
	腸管出血性大腸菌症	牛, 羊, 山羊, 鹿など		
	カンピロバクター症	鶏, 豚, 犬, 猫など		
	リステリア症	牛, 羊, 豚, 鶏など		
	エルシニア症	豚, 犬, 猫, 猿, 齧歯類など		
	炭疽	牛, 馬, 豚, 羊, 山羊, 鹿など		
	ブルセラ症	牛, 豚, 羊, 山羊, 鹿, 犬など		
	牛結核	牛, 山羊, 鹿など		
	猫ひっかき病	猫		
	野兔病	齧歯類, 節足動物など		
スピロヘータ	レプトスピラ症	ネズミ, 犬, 牛, 豚など	咬傷, 経皮, 経口, 吸入	猫による外傷に注意 ゴム手袋の着用, ダニの刺咬を避ける ネズミの駆除, 犬へのワクチン接種 マダニとの接触を避ける
	ライム病	鹿, 野ネズミ, 野鳥, 犬, 狐	マダニの刺咬	
	オウム病	インコ, オウム類, 羊など	経口, 吸入	小鳥との接触を避ける, 小鳥に抗菌剤投与 生肉, 生乳の飲食を避ける, 手を洗う
	Q熱	野生動物, 牛, 羊, 猫, ダニ	経口, 吸入	マダニとの接触を避ける
	日本紅斑熱	マダニ	マダニの刺咬	
	ツツガムシ病	ツツガムシ	ツツガムシの刺咬	ツツガムシとの接触を避ける
	クリプトコッカス症	鳩, 猫など	吸入	糞便処理を厳重にする
	皮膚糸状菌症	犬, 猫, 牛, 馬, 豚など	接触	患畜の治療, 手洗いの励行
	牛海綿状脳症	牛, 羊?	経口	特定危険部位の除去
	クリミア・コンゴ熱	鳥類, 牛, 羊, 齧歯類など	ダニの刺咬, 接触	ダニの駆除, ゴム手袋の着用
ウイルス	西ナイル熱脳炎	鳥類, 馬, 犬, 齧歯類など	カ, ダニの刺咬	カやダニの駆除
	狂犬病	犬, 猫, 狐, アライグマなど	咬傷	動物とヒトへのワクチン接種
	Bウイルス病	猿	咬傷	猿の扱いに注意
	ハンタウイルス感染症	野ネズミ, 実験用ラット	飛沫, 咬傷, 経口?	ネズミの駆除
	フィロウイルス感染症	野生齧歯類?, 猿?	飛沫, 咬傷, 経口	自然宿主の特定, 解剖時ゴム手袋の着用
	ニパウイルス感染症	コウモリ, 豚	接触, 飛沫	豚舎へのコウモリの侵入を阻止する
	インフルエンザ	ヒト, 豚, 鳥類, 馬	飛沫, 経口	ワクチン接種
	エキノコックス症	狐, 犬, 猫など	飛沫, 経口	汚染食品・飲水を摂取しない
	トリヒナ症	豚, 熊	経口感染	肉の生食を避ける
	アニサキス症	オキアミ, イカ, サバなど	"	生きのいい刺身に注意, 冷凍物は安心
寄生虫	回虫幼虫移行症	豚, アライグマ, 犬, 猫	"	幼獣の駆虫, 糞便汚染に注意, 手洗いの励行
	顎口虫症	豚, ドジョウ, 溪流魚, マムシ	"	ドジョウの"おどり喰い"や生食を避ける
	トキソプラズマ症	猫, 豚, 羊, ヒトなど	"	猫の健康管理に注意, 肉の生食を避ける
	クリプトスポリジウム症	牛, 豚, 鶏など	"	糞便処理を厳重に, 生水を飲まない
	原虫			

2003年2月頃から顕在化した非定型肺炎・重症急性呼吸器症候群 (SARS) は、ウイルスの起源は不明であるが、ヒトの高速大量交流を背景に拡大した新興感染症の典型といえる³⁰⁾。

これら新興・再興感染症のなかに数多くのズーノーシス (zoonoses) が含まれる。ズーノーシス (人獣共通感染症) は、脊椎動物とヒトとの間で自然に伝播するすべての疾病と感染であると定義され、最近では動物由来感染症とも称される。これは病原体の動き (感染の方向) としてとらえた場合、その大部分が動物からヒトに感染する疾病であるためと思われる。ズーノーシスは家畜、野生動物、伴侶動物などの病気として、あるいはそれらが病原巣 (保菌動物) として存在する場合は獣医学の研究対象となり、ヒトが感染した場合は医学の対象となる。よって、ズーノーシスは学際的な分野であり、双方からの積極的な研究交流と情報交換が必要である。このことから2000年10月に「人と動物の共通感染症研究会」が発足し、両者間の積極的な交流が始まっている。また、予防対策を講ずる上では行政の関与が重要であり、1999年4月に施行された感染症法では一部の輸入動物のズーノーシス監視強化等の動物対策が盛り込まれた。

ズーノーシスは200以上あるといわれており³¹⁾、Handbook of Zoonoses (第2版)¹⁰⁾には病原体の種類により、本症を細菌性 (ブルセラ病、結核、炭疽、豚丹毒、ペスト、野兎病、鼻疽、類鼻疽、レンサ球菌症、パスツレラ症、猫ひっかき病など)、スピロヘータ性 (レプトスピラ症、ライム病)、細菌性食品媒介/食中毒 (サルモネラ症、カンピロバクター症、リステリア症、大腸菌O157:H7感染症、エルシニア症など)、クラミジア性 (オウム病)、リケッチア性 (Q熱、ロッキーマウンテン熱など)、真菌性 (クリプトコッカス症、皮膚糸状菌症、マイコトキシン中毒など) およびウイルス性 (日本脳炎、狂犬病、Bウイルス病、ハンタウイルス感染症、フィロウイルス感染症、インフルエンザなど) ズーノーシスに分類している。なお、本書には寄生虫性・原虫性ズーノーシス (エキノコックス、トリヒナ、トキソプラズマ症、クリプトスポリジウム症など) は扱われていないが、これらも重要な疾病である。注意すべき代表的なズーノーシスの種類と特性をTable 2にまとめた。

わが国でのズーノーシスの発生は諸外国と比較してその種類や数は少ないと考えられているが、家畜伝染病予防法、狂犬病予防法および感染症法の対象となる指定動物についての統計は記録されているものの、指定外の動物におけるズーノーシスの種類、数とも十分には把握されていない。とくに、野生動物のズーノーシス対策を目的とする法律や検疫制度は十分ではない。現に、2002年8月に米国のプレーリードッグ輸出施設で野兎病の集団発生があり、そこで飼育されていたプ

レーリードッグがわが国にペット用として輸出されていたことが判明し関係機関は混乱した。現在、厚生労働省はズーノーシスの感染源となる可能性が大きい輸入ペット用動物 (コウモリ、鳥類、は虫類、齧歯類など) の規制と検疫強化、動物取り扱い業者の衛生管理の義務化、国内サーベイランスの充実、新たな動物由来感染症の指定・追加、ベクター対策などをワーキンググループで検討しており、感染症法の改正に盛り込まれることになっている。なお、平成15年4月の第26回日本医学会総会シンポジウム「獣医学と医学の接点」においてズーノーシスが取り上げられ¹¹⁾、活発な議論がなされた。

2. 細菌性食品媒介ズーノーシス

1996年3月、英国のドレル保健大臣の国会報告は牛海綿状脳症 (BSE) によるグローバル・パニックを引き起こし、現在のBSE問題の発端となった³²⁾。これに象徴されるように、動物だけで感染が起こっている間は関係者以外注目されなかった疾病が、ひとたびヒトに感染する可能性が指摘されるや否や、足下の地面が揺れる如き衝撃を与えた。この事実はプリオンという未知なる病原体への恐怖もさることながら、消費者がいかに食品の安全性に不安を抱いているかを如実に物語っており、畜産物の安全と安心を確保しないと畜産業の将来はないということを示した。まさに、家畜がFood animalであることを再認識し、肝に銘じる必要がある。

「食べ物」に起因する細菌性の動物由来感染症、すなわち、細菌性食品媒介ズーノーシスのうち、ブルセラ症、炭疽、結核、豚丹毒などは家畜衛生、食肉衛生、牛乳衛生の立場から厳重な防疫体制が整えられており、市販の畜産物がこれらの感染源となる可能性は少ない。しかし、家畜が健康保菌している食中毒菌 (サルモネラ、腸管出血性大腸菌、カンピロバクター、アーコバクター、リステリアなど) に汚染された畜産物に起因する腸管感染症 (食中毒) は世界的にも多発している。その大きな理由は、これら食中毒菌が家畜自体に何らの異常も引き起こさず (結果として発見が遅れる)、腸内に定着し一定期間生息するため、家畜および飼育環境の菌汚染濃度が上昇することと関連がある。この種の食中毒は原因物質が家畜由来細菌であることから動物由来感染症として捉える視点が大切である³³⁾。

わが国における食中毒の発生件数および患者数を旧厚生省および厚生労働省の食中毒統計³⁴⁾から引用しTable 3に示す。この数字は氷山の一角に過ぎないと思われるが、患者数は年により変動はあるものの、ほとんど減っていない。戦後、多くの細菌感染症は減少の一途をたどってきたが、食中毒の80%以上が細菌性であるにもかかわらず、患者数は半世紀の間ほとんど変化していないのである。これは食中毒が他の細菌

Table 3 わが国における食中毒発生数

年度	件数	患者数
1956	1,665	28,286
1964	2,037	41,638
1974	1,202	25,986
1984	1,047	33,084
1985	1,177	44,102
1986	899	35,556
1987	840	25,368
1988	724	41,439
1989	927	36,479
1990	926	37,561
1991	782	39,745
1992	557	29,790
1993	550	25,702
1994	830	35,735
1995	699	26,325
1996	1,217	46,327
1997	1,960	39,989
1998	3,010	46,179
1999	2,697	35,214
2000	2,247	43,307
2001	1,928	25,862
2002	1,850	27,629

(厚労省食中毒統計より)

感染症とは異なる性質を有することを意味する。すなわち、主要な食中毒菌の大部分はヒトの生活環境の至る所 (ubiquitous) に存在し、しかもその保菌動物がヒトの身近に存在するからである。例えば、EHEC O157を保菌する反芻動物、サルモネラを保菌する牛、豚、鶏、ネズミ、カンピロバクターを保菌する鶏、牛、リステリアを保菌する牛、豚、緬山羊、鶏などである。食用動物の保菌防止および飼育環境の清浄化がヒトの食中毒対策の原点であると言われる所以である⁵⁰⁾。現在の食品産業の大量生産、広域輸送システムのなかに上記病原菌に汚染された原材料が持ち込まれた場合、大規模で広域的な食中毒が発生しかねない⁵¹⁾。なお、食中毒の実数は届出数の25~100倍、あるいは300~350倍であるとされており⁵²⁾、少数の散发事例などはほとんど見逃されているものと推測される⁵³⁾。

一方、食品を介する感染とは別に、これらの保菌動物や汚染環境からヒトへの直接感染例が知られており^{22, 56, 95)}、とくに、免疫学的に未熟な幼児や高齢者、妊婦などの易感染集団は感染・発症しやすい。通常、動物とヒトとの間でお互いに腸内細菌の授受があり⁹⁾、動物の薬剤耐性大腸菌が飼育人から分離されるし、逆もある。これは両者間で様々な経路を介して菌のやり取りがあることを示しており、動物からの感染は日常的に起こりうるものと推測される。

下記に動物から感染を受けたと推定される症例を示す。

●1981年9月、T県において10カ月齢の乳児が自宅で飼育されていた子牛からネズミチフス菌の感染を受け下痢・発熱を伴うサルモネラ症に罹患した¹²³⁾。乳児と子牛分離株の生物型、薬剤耐性型、プラスミドプロファイル、RプラスミドDNAの制限酵素切断パターンが一致。

●2001年、8~10月、首都圏において、病気のペット(犬、猫)から感染したと推定される多剤耐性ネズミチフス菌感染症が3事例発生した⁵⁵⁾。発生は隣接地域であり、家族およびペットから同一遺伝子型の本菌型が分離されたことから、共通の感染源が疑われたが特定できなかった。

●1996年7月、A県において1~6歳の3兄弟が自宅で飼育されていた子牛からベロ毒素産生性大腸菌O103:H2(VT1, *eaeA+*)の感染を受け下痢をした⁵⁶⁾。兄弟と子牛分離株の毒素型、遺伝子型が一致。

●1997年6月、T県において2歳の女兒と男児が観光牧場で見学した畜舎あるいは子牛からEHEC O157:H7の感染を受け発症した⁴¹⁾。分離株の毒素型は全て一致。遺伝子型解析から幼児由来株と畜舎および子牛由来株は同一のクローンと考えられた。

なお、専門誌や関連学会には発表されていないが、動物に由来すると推定されるEHECやサルモネラの感染例が散見される。

●海外では、1992年10月、カナダで13カ月齢の男児が自宅の畜舎で子牛と戯れてO157:H7に感染⁵⁷⁾。また、1994年7月、英国で大人1名、2~4歳児3名が観光牧場(ふれあい牧場)を訪れてO157:H7に感染⁹⁹⁾。この例では、ヒト4名と牛4頭、山羊5頭由来株の毒素型、ファージ型、遺伝子型が一致。疫学調査成績および細菌学的成績とも家畜との接触による感染の可能性を支持した。類似の報告は、英国¹¹⁰⁾、米国³⁹⁾、オランダ³⁹⁾でも見られる。さらに、英国¹⁰⁰⁾ではネズミチフス菌に起因する下痢の馬の世話をした84歳の農夫が血便を排泄し、糞便からサルモネラではなくEHEC O157:H7が分離された。2週間後の糞便培養でこの馬からもEHEC O157が分離された。両分離株のファージ型、遺伝子型が一致することから、農夫と馬に共通する感染源の存在あるいは馬から農夫への感染が考えられている。

このような感染源の特定は詳細な疫学調査を基本とし、分子疫学的手法を併用することで科学的な根拠を付与することができるものであり、Field epidemiologyとMicrobiology (molecular epidemiology)の有機的なドッキングがズーノーシスの発生防止に重要である⁷¹⁾。最近、ヨーロッパ、米国などでは多剤耐性ネズミチフス菌ファージ型(DT)104(後述)、また米国では多剤耐性Salmonella Newportによるヒトの症例が増加し

ており¹²⁶⁾、保菌動物からの直接伝播も報告^{27, 29, 45, 95, 116)}されている。

以上のように動物からの直接伝播による症例が散見されることから、家畜の生産段階におけるズーノーシス感染防止の留意事項として、①飼養動物の保菌検査を行い実態を把握する、②糞便による身体の汚染に注意し、作業着・作業靴は適宜に替え、手洗い・消毒を励行する、③幼児や高齢者が家畜と濃厚な接触を持たないようにする、④畜舎の近くに位置する井戸水を飲用にする場合は十分煮沸するか塩素消毒をする、⑤自家産ミルクを家庭で飲用する場合は十分加熱してから飲む、⑥畜舎内およびその近辺での喫食を避ける、⑦飼い犬や猫が畜舎に自由に出入りしないようにし、生牛乳を給餌しない、⑧畜舎に防鳥ネットなどを設置し野生鳥獣の侵入を防ぐ、⑨畜舎内のハエから菌が分離されることから、ハエの駆除を行う、⑩農地へ施す堆肥は完熟したものをを用いる、⑪水源地付近に糞を野積みしない、⑫収穫期にスラリーの散布は避ける、などが挙げられる。

家畜衛生および公衆衛生技術者はこれらの諸点を生産者や消費者に啓発し、彼ら自身がズーノーシスから身を守るための知識ワクチンを普及（接種）させることが大切である。

3. 腸管出血性大腸菌O157

1) EHEC O157感染症の発生動向

ヒトの腸管出血性大腸菌感染症は1999年4月に施行された「感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律（感染症法）」の3類感染症に指定されており、全臨床医に患者および無症状保菌者を届け出る義務が課せられている。厚生労働省伝染病統計および感染症発生動向調査⁵¹⁾に基づいた本症届出患者数をみると、1997年1,941人、1998年2,077人、1999年3,222人、2000年3,647人、2001年4,336人、2002年3,185人であり、わが国で発生した動物由来感染症の首位にランクされている。米国¹⁸⁾では1999年のEHEC O157感染者は73,000人、死者60人と推定されている。国際獣疫事務局（OIE）の報告¹⁰⁹⁾では人口10万人あたりの推定患者数は日本1.7人、米国2.0人、欧州連合0.7人であった。ちなみに、サルモネラ症は日本7人、米国17人、欧州連合73人である。

一方、全国の地方衛生研究所から国立感染症研究所に報告されたEHEC 検出数をみると⁵⁴⁾、1991～1995年は525株で毎年100株前後であったが、1996年に3,022株と激増して以来、1997年2,020株、1998年2,053株、1999年1,840株、2000年1,623株、2001年2,229株、2002年1,601株で推移している。このうちEHEC O157:H7の占有率は1991～1995年83%、1996年76%、1997年67%、1998年64%、1999年55%、2000年56%、2001年65%、2002年53%であった。2002

年はO157の185株（12%）のH抗原が調べられていないが、本菌型は依然としてヒトから分離されるEHECの主要血清型であることに変わりはない。O157:H7以外の菌型としてはO26:H11, O111:H-, O103:HNT, O121:H19, O91:HNTなどの分離頻度が漸増傾向にある。

Table 4に1999年に米国で発生したEHEC O157集団感染の原因をまとめた¹⁸⁾。それによると原因の主体は食品であり、牛肉と生鮮野菜・果物の関与が目立つ。しかし、水を介した感染、保菌者からの感染あるいは保菌牛からの接触感染もあり、EHEC O157が食水媒介性病原体であると同時に動物由来病原体であることを裏付けている。

Table 4 米国で発生した腸管出血性大腸菌O157集団感染の原因

原因	件数 (%)
食品	19 (50)
牛肉	12 (31.6)
野菜・果物	6 (15.8)
タコス	1 (2.6)
水	5 (13.2)
水泳	3 (7.9)
飲料水	2 (5.3)
ヒトからの感染	6 (15.8)
牛との接触	1 (2.6)
不明	7 (18.4)
合計	38 (100)

注：上記集団感染では患者総数1,897名、入院201名、死者4名であった。(CDC, 2000)

一方、わが国での本菌による集団感染は、1996年に小学校を中心として多発したが、1997年以降は学校給食における衛生管理が強化されたことなどにより、そこではほとんど発生をみていない。しかし、保育園、老人ホームなど衛生指導や衛生管理が十分に行き届きにくい施設においては今も集団感染が散見される⁵³⁾。2002年7～8月、宇都宮市の老人保健施設において、「あえもの」を原因食とするEHEC O157感染症が発生し¹⁰⁵⁾、発症者123名（内64名は保菌者）、死者9名（58～98歳）に及ぶ大惨事になったことは記憶に新しい。

また、最近の特徴として特定の汚染食品の流通に関連する散発例の広域的な多発（diffuse outbreak：散発的集団発生）がみられることである¹¹⁸⁾。例えば、1997年3月に関東南部から東海地方にかけて発生した「カイワレ大根」を原因とする事例、1998年5～6月に富山県、首都圏を含む7都県で発生した「イクラ醤油漬」を原因とする事例、2001年3～4月に富山県、滋賀県、奈良県と千葉県、埼玉県等の関東6都県でそれぞれ発生した原材料の輸入牛肉から調製した加工製品

「ビーフ角切りステーキ」や「牛タタキ」を原因とする事例、最近では2002年8月に東京都と埼玉県を中心に発生した「和風キムチ」を原因とする事例などがある¹⁰⁶⁾。

2001年3～4月の事例では牛肉を柔らかくし深部まで味付けをするために、テンダライズ処理(肉の原形を保ったまま硬い筋や繊維を針状の刃を刺し通して短く切断する処理)、タンプリング処理(調味液を機械的に浸透する処理)あるいは肉のマッサージ作業を行っており、肉の表面に存在したEHEC O157が肉の内部にも押し込まれ侵入した結果、調理段階で中心部までの加熱が十分でなかったため生残していたものと考えられている。ちなみに、未開封の「牛タタキ」から1g当たり23個、原料肉から1g当たり最大43個のO157が分離されている。

一方、米国・カナダ¹⁰⁰⁾、EU諸国⁶¹⁾および日本¹¹⁸⁾では食品媒介性細菌によるdiffuse outbreakの早期発見と拡大を阻止するために、細菌のDNA解析に基づいた分子疫学的ネットワークシステムである「パルスネット」を構築し稼働させている。今後、ますます食材・食品およびヒトの国際的移動が増加することからすると、日米両国間に共通する「パルスネット」システムの構築が望まれる。なお、感染症法の改正に向けて、広域的対応を迅速かつ円滑に実施するために疫学調査の権限拡大が検討されている。

2) 動物の保菌実態

EHEC O157は米国においてヒトの集団感染例が報告⁸⁸⁾され、牛挽肉との関連性が指摘されるまで、獣医学分野では全く注目されなかった。事実、米国の調査¹²⁰⁾では1980年代初めまでに収集した家畜由来大腸菌のなかに本菌は存在しなかった。牛からの最初の分離はアルゼンチン⁸⁰⁾でなされ、下痢子牛13頭中1頭から本菌型3株が分離された。わが国では私ども⁷³⁾が1981年5月に下痢子牛から初めて分離している。

EHEC O157は外見上健康な牛が保菌するため、臨床症状から感染を推測することができず細菌学的な検査が必要である。牛の保菌率は農場の衛生状態、牛の年齢、季節、検査方法などによって大きく異なるが、1999年8月から12月にかけて新潟県、群馬県、神奈川県および大阪市の4食肉センターに搬入された牛548頭のEHEC O157保菌調査では35頭(6.4%)から本菌が分離された⁶¹⁾。その内訳は搾乳牛(ホルスタイン種)113頭中2頭(1.8%)、肥育牛(ホルスタイン種)13頭中0(0%)、肥育牛(F1)326頭中20頭(6.1%)、肥育牛(黒毛和種)96頭中13頭(13.5%)が陽性であった。肥育牛(F1と黒毛和種)の保菌率は搾乳牛に比べかなり高いが、飼育施設の衛生状態、給与飼料の違いなどが保菌率に関係しているものと考えられる。

一方、米国においてほぼ同時期に実施された食肉センター搬入牛のEHEC O157保菌調査²⁵⁾では、327頭中

91頭(27.8%)の糞便から本菌が分離された。また、内臓摘出前のと体表面の汚染率は341頭中148頭(43.4%)であり、剥皮過程等での糞便や体毛からの二次汚染が考えられた。しかし、内臓摘出後、除菌処理(有機酸による洗浄、温湯処理、蒸気による低温殺菌など)された枝肉の汚染は330頭中6頭(1.8%)に低下した。以上の成績は米国の肉牛の保菌率が予想以上に高いことを示しており、しかも、除菌処理後においても約2%の枝肉に本菌の汚染が認められたことになる。事実、毎年のように米国農務省食品安全検査局(USDA, FSIS)の検査により汚染ひき肉やステーキ肉が摘発され、製品のリコールが行われている。

当研究室ではグローバルな視点からの疫学的知見を得ることを目的として、わが国と米国の牛由来EHEC O157株の異同を検討した³⁾。国内の牛由来91株と米国の牛由来415株をDNA型、*stx*型およびファージ型で比較したところ、日本で1996年に分離された3株は米国で1994年に分離された6株と極めて近縁であることが明らかとなった。DNA型別とファージ型別の識別力が極めて高いことからすると、この成績は本菌が共通の媒体を介して大陸間を移動し、国内の牛群に拡がった可能性を示唆している。

牛以外の保菌動物として羊⁵⁹⁾、山羊⁷⁰⁾、鹿⁸⁷⁾などが報告されており、反芻動物が本菌の生態学的ニッチ(病原巣)であることが指摘されている。また、米国⁶⁰⁾においては同じ地域の牛と鹿から遺伝子型の区別がつかない本菌が分離されており、牛と放牧地を共有することで野生動物への保菌の拡大が懸念される。鹿肉はもみじ鍋として、また、ルイベとして人気がある。一方で農作物を荒らす害獣として狩猟の対象となり、多数のハンターが鹿を追い、その肉は正規の食肉検査なしに食用に供される。野生鹿の肉からのヒトの感染例が米国^{51,83)}、日本⁷⁹⁾で報告されている。これは、他のズーノーシスと同様に本菌が自然界において家畜とそれを取り巻く自然環境の間でサイクルを描いて維持されていることを意味し、ヒトがこのサイクルに侵入し病原体と接触することにより発症するズーノーシスの典型ともいえる。

一方、反芻獣以外では豚が本菌を保菌しており、南米チリ⁸⁹⁾ではヒトの感染源として豚肉が重要視されている。幸いなことにわが国では豚肉を原因とする本菌感染症は知られていないが、農場飼育豚でのEHEC O157:H7の保菌状況を調べみると、健康豚221頭中3頭(1.4%)から本菌が分離され⁷⁵⁾、そのファージ型は21、37および43であり、21型はわが国のヒトや牛から頻繁に分離されている。また、米国²⁵⁾、英国¹⁰⁰⁾およびノルウェー⁴⁸⁾のと畜場出荷豚の保菌率は2.0%、0.2%および0.1%とそれぞれ報告されている。Table 5にこれまで分離報告のある動物種を示したが、この成績は本菌が生態系に広く分布し、その一部を構成してい

ることを示唆している。

Table 5 腸管出血性大腸菌O157が分離された動物

反芻動物：牛，羊，山羊，鹿
単胃動物：馬，ポニー，豚，犬，猫，ネズミ， 野ウサギ，イノシシ，アライグマ， オランウータン，オポッサム
鳥類：ハト，カモメ，ガチョウ，七面鳥

3) 牛の消化管内でのEHEC O157の変異

牛のEHEC O157の遺伝子型がきわめて多様であることから^{1,2)}，本菌が牛の消化管内で容易に変異をおこす可能性が考えられる。遺伝子型別は本菌感染症の疫学解析に必須の検査項目であることから，本菌の変異頻度を知ることはきわめて重要である。そこで，本菌の遺伝子型変異が実験的に再現できるか否かを検討した¹⁾。

EHEC O157保菌陰性であることを確認した8週齢のホルスタイン種の雄3頭を個別に飼育し，うち2頭にEHEC O157 (*stx2+*, *eaeA+*) の 10^9 個 (CFU) を経口投与した。残り1頭は未投与対照とし，投与の翌日より計3頭の牛から毎日直腸便を採取し，EHEC O157の分離を行った。糞便1サンプルあたり10コロニーまでの本菌を選択分離培地から釣菌し，分離菌総計401株について制限酵素Xba I を用いたPFGEで解析した。

実験感染牛2頭において，排菌は投与後49日および50日後まで観察された。未投与対照牛から本菌は分離されなかった。また実験期間中，3頭の牛に臨床的な異常は認められなかった。EHEC O157は牛に対してほとんど病原性を示さず，一般大腸菌と同様の動態を示し，その排菌は再感染がなければ2カ月前後で終了するものと考えられた。

分離菌計401株のPFGE解析において，投与後1～2日目には両牛から変異菌が回収された (Fig. 1)。No. 1牛由来215株中109株 (50.7%)，No. 2牛由来186株中38株 (20.4%) は投与菌のPFGE像と1～6本のバンドが異なっていた。結局，No.1牛由来株に17種類，No. 2牛由来株に10種類のPFGE型を認めたが，両牛由来株に同じPFGE型を示すものはなかった。また，No. 1牛由来株に90kbプラスミドの脱落を伴う変異菌が認められた (Fig. 2)。プラスミド脱落による変化 (バンド数2本) を差し引くと，変異菌と投与菌のPFGE像の比較において，染色体DNAに由来する異なるバンド数は最大4本であった。

以上の成績から牛の消化管内におけるEHEC O157のランダムな変異と，適応クローンの増殖による優勢菌の交代現象が実験感染牛で再現できたものと考えられた。なお，投与菌の培地継代培養から再分離した20株について，PFGEおよびPCRで変異の有無を調べた

が確認することができなかった。EHEC O157は動物体内で容易に変異する性質を有しており，これが本菌の遺伝的多様性に関連しているものと思われる。同様に，EHEC O26:H11においても牛腸管内で高頻度におこる変異を観察している¹²⁾。

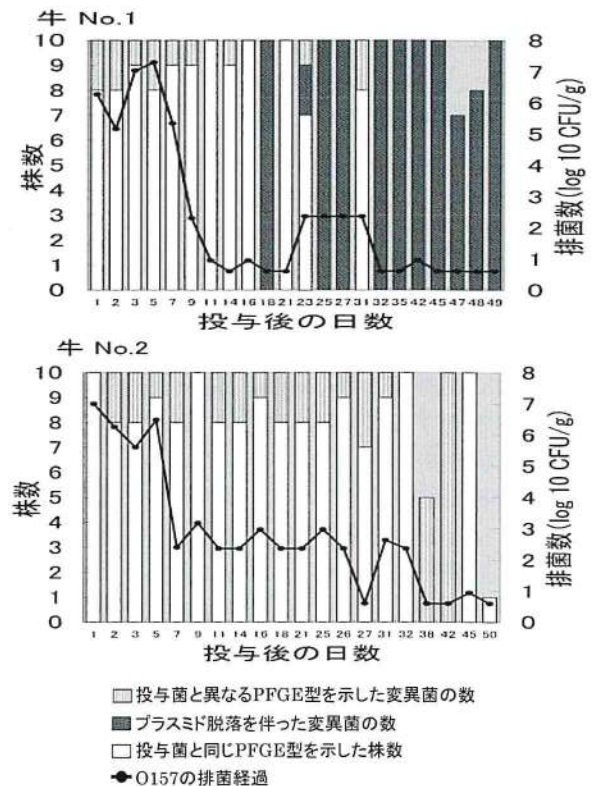


Fig. 1 実験感染牛におけるO157の排菌経過と分離菌のPFGE像の変化

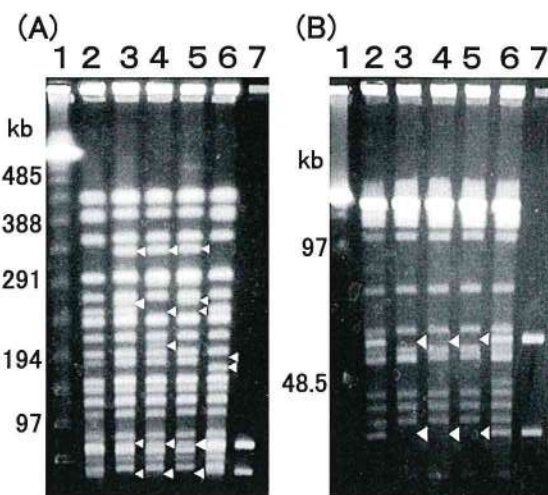


Fig. 2 O157とその90kbプラスミドのPFGE像

(A)全てのDNAフラグメントを観察するための条件で泳動。
(B)DNAサイズ100 kb以下のフラグメントを観察するための条件で泳動。
レーン1、DNAサイズマーカー；レーン2、投与菌；レーン3、PFGE7型；
レーン4、PFGE9型；レーン5、PFGE13型；レーン6、PFGE23型；
レーン7、投与菌由来90 kbプラスミド。白矢印は投与菌と異なるバンドを示す。

一方、米国疾病制圧予防センター (CDC) のPFGEの判定基準¹⁰⁷⁾では、異なるバンド数が4~6本のときは理論的に2つの遺伝的変異で説明できることから、そのような菌の感染は集団感染の一部である可能性が高いと考えられている。今回の成績はこれを支持するものであった。PFGE法を用いて牛およびヒトのEHEC O157の疫学的な関連性を検討する場合、少なくとも異なるバンド数が4本までは関連を疑うべきであると思われる。

また、最近EHEC O157:H7, O26:H11などを保菌する牛との接触によるヒトの感染症の発生が全国的に散見される^{11,90,91,124)}。この場合の原因調査 (trace back) においては、疫学情報の収集とともに患者および推定感染源から分離された菌株間の同一性を証明することが必要となる。しかし、患者が特定されてから調査を実施するまでに時間を要することから、その間に牛の消化管内で原因菌の遺伝子型が変化する可能性が危惧されていた。今回の成績は、牛消化管内におけるEHEC O157の遺伝子型変異を実験的に証明したものであり、trace backにおける有用な情報をも提供できたものと考えられる。

4) 牛のEHEC O157の制御

EHEC O157の検査精度が向上した結果、牛の保菌率が予想以上に高いことが明らかとなり^{25,41)}、生産段階における保菌抑制対策の必要性が強く訴えられてきている。牛が保菌するEHEC O157の菌数は比較的少なく、本菌だけを消化管から選択的に排除することはかなり難しいものと考えられる。したがって、現状での本菌の制御法は牛の保有する大腸菌全体のレベルを低下させ、牛自体と飼育環境中の菌数を減少させる方法が現実的であると思われるが、将来的には免疫学的手法による強力な排除技術の開発が必要である。

①食餌性ストレスの回避による排菌制御

牛は食餌性ストレス (例えば、絶食や不規則な給餌等) を受けると消化管内環境に変調を来し、糞便中の大腸菌数が変動する⁶⁰⁾。通常、牛はと畜場に出荷する際、絶食をすることから、絶食と大腸菌排菌との関連を明らかにすることで、枝肉の大腸菌汚染を減少させるための情報の提供や手法の提案ができるものと考えられる。そこで、牛の飼育環境を清浄に保つための衛生管理を厳重に行い、牛房内での大腸菌の再感染をできるだけ防止した状態で、牛の大腸菌排菌に及ぼす絶食の影響を検討した²⁰⁾。

実験牛は臨床的に健康で、EHEC O157およびサルモネラを保菌していないことをあらかじめ確認した4カ月齢のホルスタイン種の雄10頭を用いた。牛は洗浄・消毒後ホルマリン燻蒸を実施した閉鎖系隔離牛舎に導入し、各牛房毎に1頭ずつ個別飼育した。実験は牛を1カ月間、飼育環境および給与飼料に馴致させてから開始した。

牛舎の衛生管理として、朝夕2回の除糞と床面の水洗・洗浄および消毒を行った。飼槽と水槽は1日1回洗浄をした。飼料と飲用水の水道水は滅菌せずに与えた。

牛の絶食は糞便の大腸菌数が安定した導入後30日目に2日間実施した。その間、飼料は全く給与せず、水のみ与えた。2日間の絶食後は通常どおり給餌した。

実験牛10頭の導入直後の大腸菌数は糞便1gあたり $10^6 \sim 10^7$ 個のレベルであり、 10^8 個を越える個体はいなかった。閉鎖系隔離牛舎に導入し飼育開始後5~6日間は菌数に変動はみられなかったが、7日目には糞便1gあたり $10^5 \sim 10^6$ 個のレベルに、14日目には $10^3 \sim 10^5$ 個のレベルに低下し、以後30日目までこの菌数を維持した。

Table 6 牛の絶食期間と大腸菌排菌の関係

絶食期間	排菌増加頭数(%)	増加した大腸菌数(個/g)*
0日	0/10**	0
1日	7/10 (70)	1.74±1.09
2日	10/10 (100)	2.49±0.74

* 絶食翌日の糞便1g当たりの平均増加菌数
±標準偏差を常用対数で示す
**排菌増加頭数/絶食実施頭数

絶食期間と大腸菌の排菌数をみると (Table 6)、絶食期間が1日の場合、翌日の大腸菌数は10頭中7頭が絶食前日に比べ1gあたり平均1.7 log増加した。絶食の期間が2日の場合、翌日の大腸菌数は10頭中10頭に糞便1gあたり平均2.5 logの増加がみられた。さらに、牛10頭の絶食前5日間の平均大腸菌数は糞便1gあたり $10^{4.9}$ 個であり、2日間の絶食後5日間のそれは $10^{7.1}$ 個であった。絶食により大腸菌数は2.2 log (169.8倍)増加した (Fig. 3)。この場合、絶食による排菌は絶食後2日目ないし3日目にピークに達し、4日目から5日目にかけて徐々に低下し、6~7日目以降は絶食前の菌数レベルに戻った。また、EHEC O157実験感染牛 (Fig. 4) やEHEC O26実験感染牛¹²²⁾においても2日間の絶食で排菌数が2 log以上増加している。

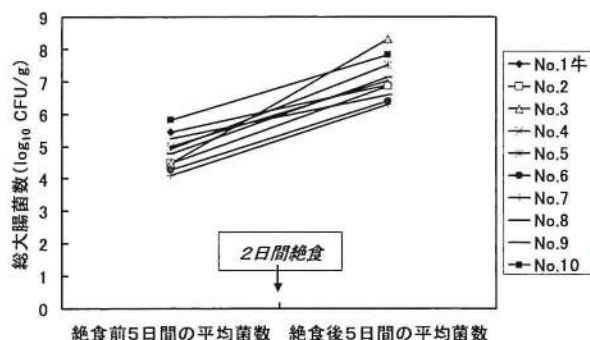


Fig. 3 牛10頭の絶食前後5日間の大腸菌数

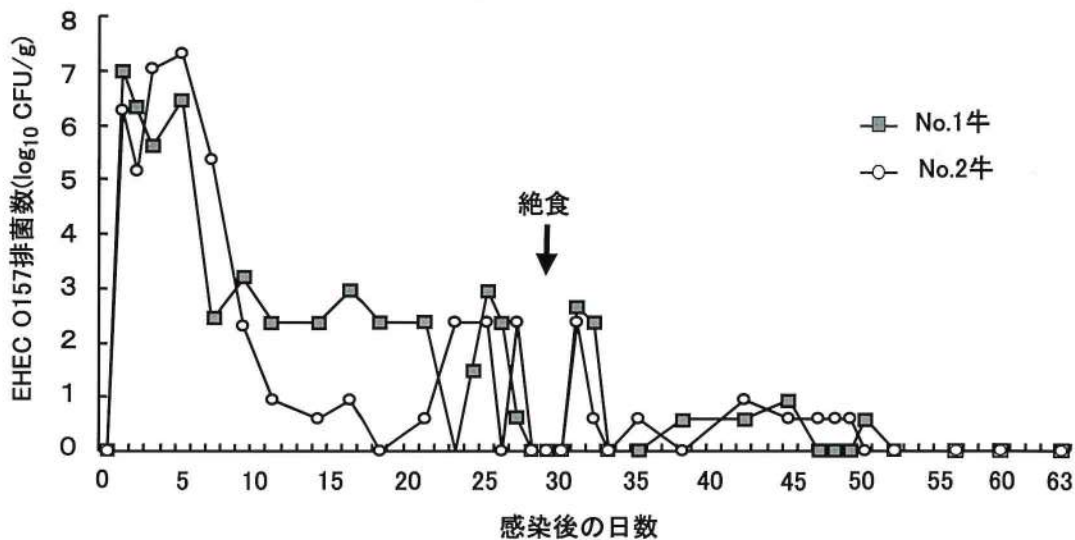


Fig. 4 腸管出血性大腸菌O157実験感染牛の絶食による排菌の増加

このように、絶食は牛の大腸菌増殖を促進することから家畜衛生および食肉衛生上の好ましくない行為であり、適正農業規範 (Good agricultural practice, GAP) における重要管理点のひとつと考えられた。動物福祉の観点からも家畜を人道的立場で取り扱うことが安全な食肉の生産につながるものと考えられる³¹⁾。今後は絶食による大腸菌異常増殖の機序の解明と牛の生産性に影響を与えないで大腸菌全体のレベルを低下させるための飼養技術の検討が必要である。

一方、牛は飼育環境や同居牛から常に大腸菌の感染を受けており、今回の実験のように糞便の大腸菌数を精査する場合は、牛を単飼し飼育環境を可能な限り清浄に保ち、再感染を抑制することが重要である。事実、実験牛は導入直後、糞便 1 g あたり $10^6 \sim 10^7$ 個の大腸菌を保有していたが、閉鎖系隔離牛舎で飼育を開始後 7 日目から本菌は減少しはじめ、14 日目以降は $10^3 \sim 10^5$ 個レベルで安定した。これは清浄環境下では大腸菌が野外環境下に比べ 2 ~ 3 桁 (1/100 ~ 1/1,000) 低下することを示しており、牛の大腸菌保菌の低減化が衛生管理を実行し飼育環境の清浄度を高めることにより可能であることを示すものである。

②粗飼料による排菌制御

最近、牛の糞便中に排出される大腸菌の数や性質は給与する飼料の影響を受けることが報告された²³⁾。この中で濃厚飼料の給与は大腸菌を増加させ、逆に粗飼料はそれを減少させることから、粗飼料の適正な給与による EHEC O157 の保菌制御の可能性が指摘された。これまでのところ、この報告は全面的な支持を受けておらず³⁵⁾、また相反する報告⁴³⁾もあり、給与飼料と EHEC O157 保菌の関連については一定の見解が得られていない。しかし、粗飼料の給与により本菌の保菌

抑制ができればより实际的であり、生産段階での普及が可能だと思われる。そこで、給与飼料の違いによる EHEC O157 の定着性の差を調べるために、濃厚飼料あるいは粗飼料を給与した牛に本菌を投与し経時的に排菌状況を検討した^{76, 77)}。

実験牛は臨床的に健康で、EHEC O157 を保菌していないことをあらかじめ確認した 5 か月齢のホルスタイン種の雄 4 頭を用いた。牛は洗浄・消毒後ホルマリン薫蒸を実施した隔離牛舎に導入し、各牛房毎に 1 頭ずつ個別飼育した。牛房は朝夕 2 回除糞、清掃および消毒を行った。

実験牛は導入後 3 週間、普通飼料である乾草 1 kg、濃厚飼料 3 kg、食塩 20 g およびカルシウム剤 20 g を朝夕 2 回に分けて給与した。その後 1 週間かけて徐々に目的の飼料に切り換え、最終的に 2 頭 (No. 2, No. 4) には濃厚飼料のみ 3 kg を、他の 2 頭 (No. 1, No. 3) には乾草のみ 4 kg を朝夕 2 回に分けて給与した。牛は当該飼料で飼育後 29 日目に子牛由来 EHEC O157 を 10^8 個経口投与された。糞便の揮発性脂肪酸 (VFA) は本菌投与直前のサンプルを用いてガスクロマトグラフで測定した。糞便の総大腸菌数と投与した EHEC O157 の菌数は 71 日間毎日調べた。また、粗飼料給与による EHEC O157 保菌抑制効果をみるために、No. 2 と No. 4 牛は菌投与後 35 日目に濃厚飼料から粗飼料に給与飼料を切り換え、その後の排菌状況を調べた。

普通飼料を給与した 4 頭の糞便 1 g あたりの平均総大腸菌数は $10^{3.7} \sim 10^{5.2}$ 個であったが、濃厚飼料に変更した 2 頭のそれは変更前より 1.1 および 2.4 log 増加した。粗飼料に変更した 2 頭のそれは 0.3 log の増加ないし 0.7 log の減少でありほとんど変動はなかった。これらの牛に EHEC O157 を投与した時、濃厚飼料給

与牛の排菌は投与後5日目に $10^{6.8}$ 個および $10^{7.3}$ 個に達し、その後漸減しつつ投与後32日および35日目まで間欠的に排菌した。しかし、粗飼料給餌牛では投与後1日目に $10^{2.5}$ 個および $10^{0.6}$ 個の排菌が認められたものの投与後7日目以降全く本菌は分離されなかった (Table 7)。

Table 7 給与飼料と腸管出血性大腸菌O157排菌の関係

牛番号	給与飼料	EHEC O157の排菌		
		期間(日)	最高排菌数(個/g)	VFA量(mM)*
No. 1	乾草	7	$10^{2.5}$	19.86
No. 2	濃厚飼料	32	$10^{6.8}$	63.32
No. 3	乾草	1	$10^{0.6}$	16.64
No. 4	濃厚飼料	35	$10^{7.3}$	40.66

* EHEC O157投与直前の糞便の揮発性脂肪酸量を示す。
粗飼料給与牛 (No. 1 と No. 3) の EHEC O157 の排菌は濃厚飼料給与牛 (No. 2 と No. 4) に比べ期間が短く、菌数も少なかった。

また、No. 2 と No. 4 牛の飼料を濃厚飼料から粗飼料に切り換えると、総大腸菌数は一時的な増加後2～3日目から3～4 log減少し、EHEC O157も分離されなくなった (Fig. 5)。急な飼料の変更に懸念はあるものの、これは興味ある知見であり、粗飼料の給与による本菌制御の可能性を示すものと考えられた。

そこで、実験保菌牛に対して乾草を給餌した場合の

抗菌抑制効果をさらに検討した⁷⁹⁾。結果は (Fig. 6) に示すように、EHEC O157投与5日目に50%の濃厚飼料を含む通常飼料から乾草100%に変更したNo. 5 と No. 6 牛の排菌数は変更2日目から顕著に減少し始め、変更5日目 (菌投与10日目) 以降投与菌は分離陰性となった。一方、対照の通常飼料給餌No. 7 牛は3日目 (菌投与8日目) 頃から、No. 8 は5日目 (菌投与10日目) 頃から排菌数が漸減したが、菌投与後15日目まで 10^1 個/gのレベルで排菌が続いた。このことから、乾草給餌は濃厚飼料を50%含む通常飼料給餌に比べ、より短期間で本菌の排菌数を減少させることが明らかとなった。

限られた頭数での成績ではあるが、濃厚飼料は牛の消化管内での大腸菌の増殖を促進し、逆に粗飼料はそれを抑制したことから、粗飼料の適切な給与によってEHEC O157の保菌を制御できる可能性が示唆された。

濃厚飼料給与による大腸菌増殖の機序として、牛では澱粉のアミラーゼ消化の割合が小さく、第1胃内発酵のほか結腸内発酵によっても分解されることから、過剰な澱粉が給与されると結腸内に大腸菌が利用可能な澱粉分解中間産物であるマルトースやマルトデキストリンが蓄積するため、増殖が助長されるものと考えられている^{28, 17)}。また、濃厚飼料給与牛では消化管内のVFA量が増加するため、pHの低下に伴い耐酸性大腸菌が出現する。この耐酸性大腸菌は第4胃の胃液による殺菌作用を免れて結腸に達し増殖するため排菌数が増加する可能性もある¹¹³⁾。また、粗飼料給与牛に

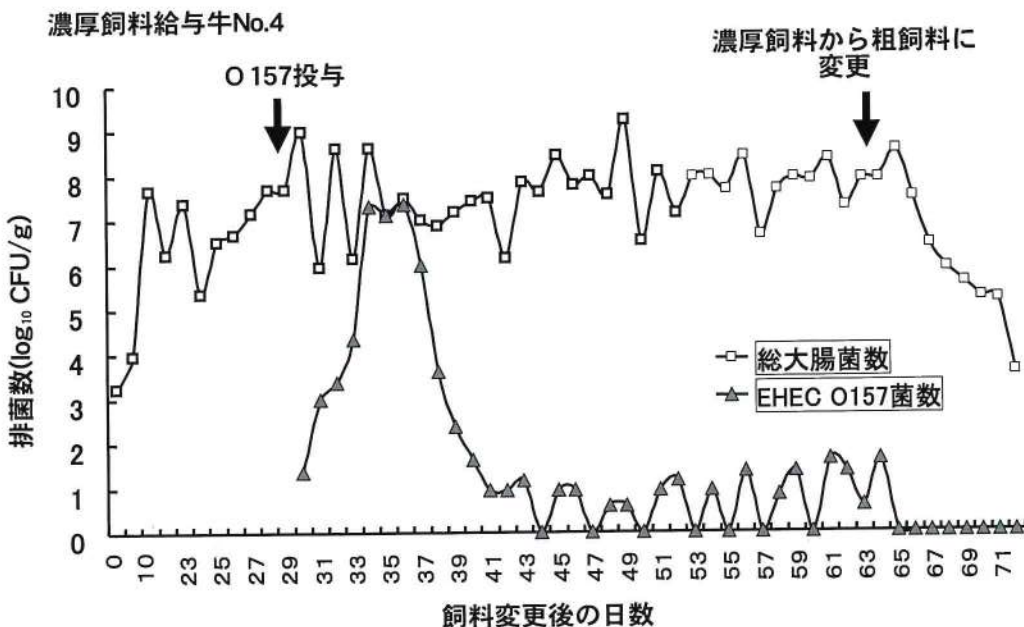


Fig. 5 濃厚飼料給与牛の大腸菌の排菌と乾草給与による排菌数の変動

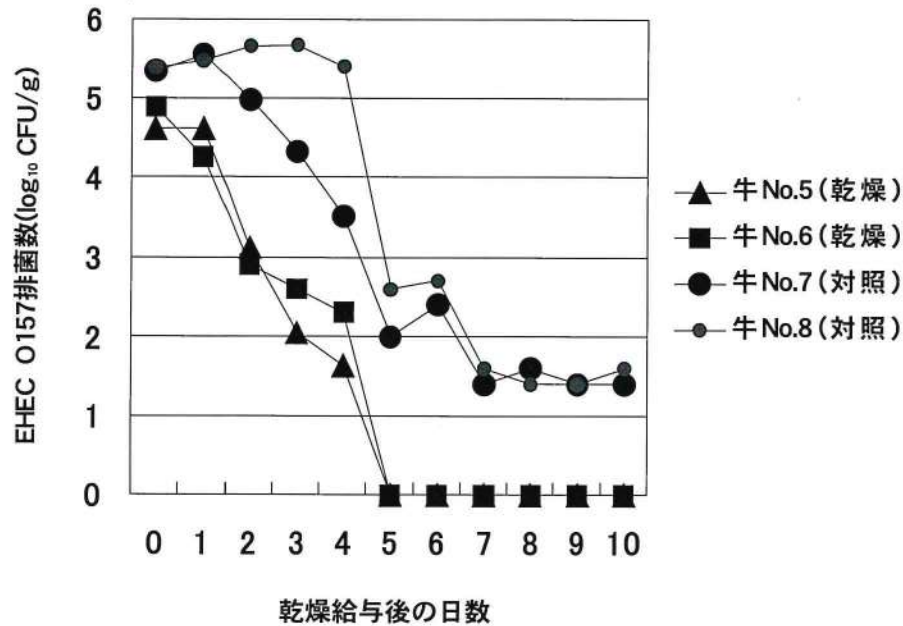


Fig. 6 乾草給与に変更後の腸管出血性大腸菌O157実験感染牛の排菌状況

においてEHEC O157を含む大腸菌が減少する理由として、消化管内で大腸菌の増殖に必要な栄養源の欠乏²³⁾や植物体由来グリコシドの代謝産物による大腸菌の増殖抑制²⁴⁾が考えられるが、現状では不明な部分が多い。

一方、牛への長期間の乾草のみの給餌は生産性の低下を招くことから、畜産経営上実施しにくい面があるが、と畜場への出荷予定牛に対して、今回実施したように短期間（出荷前の5～7日間）、乾草のみを給餌することは可能だと考えられる。最近、小谷ら⁵⁰⁾は野外の自然保菌牛に対して稲ワラを給与することで本菌の排菌抑制を観察している。

4. ネズミチフス菌 DT104

サルモネラ (*Salmonella*) は自然界に広く生息し、家畜・家禽に重篤な下痢、敗血症を引き起こすばかりでなく、ヒト食中毒の原因菌として公衆衛生上きわめて重要である¹⁰⁾。ここで取り上げるネズミチフス菌DT104は1990年代に急増したサルモネラのひとつで、家畜衛生、公衆衛生の双方から国際的に高い注目を集めている^{5, 15, 31, 36, 38, 72)}。

1) ネズミチフス菌DT104とは

ネズミチフス菌DT104とは、*S. Typhimurium* (ST) のファージ型DT104のことを指し、通常はST DT104あるいはDT104と略称される。現在STのファージ型は37種類のファージに対する溶菌パターンにより260以上に型別されており⁹⁾、国内では唯一、国立感染症研究所において実施されている。DT104の生物学的、生化学的特徴については世界各国で解析が進められて

いるが、まだ十分に明らかにされておらず、他のSTとの明確な相違点は見いだされていない。しかし、DT104の多くがアンピシリン (ABPC)、クロラムフェニコール (CP)、ストレプトマイシン (SM)、サルファ剤 (SU) およびテトラサイクリン (TC) の5種類の抗菌薬に対して多剤耐性を示すことが特徴として知られており、現在もDT104のスクリーニングの指標として用いられている^{46, 93)}。これらの薬剤耐性遺伝子は全て染色体上の約13kbの領域上に存在していることが既に明らかにされている^{6, 10)}。具体的にはストレプトマイシン耐性遺伝子、サルファ剤耐性遺伝子（一部）を含むインテグロン（外来性の挿入遺伝子領域）と、アンピシリン、サルファ剤の耐性遺伝子領域を含むインテグロンにクロラムフェニコール、テトラサイクリン耐性遺伝子領域が含まれる (SM・ΔSU-CP・TC-ABPC・SU) というカセット状の構造をとっている^{13, 14)}。さらにクロラムフェニコール耐性遺伝子領域部分についてはフロルフェニコールに対しても交差耐性を示す⁹⁾。しかし、このような多剤耐性構造をとらず多くの抗菌薬に対して感受性を示すDT104の存在や、U302のような他のファージ型が同様の多剤耐性構造を持つ⁹²⁾場合もある。

DT104は他のSTと同様に広い宿主域を持ち^{11, 84, 119)}、牛やヒトに限らず、豚、羊、山羊、鶏、七面鳥、馬、猫、犬、鹿、ネズミ、リス、アライグマ、野鳥などに広く分布している。ヒトの食中毒の原因血清型としては *S. Enteritidis* (SE) が重要視されているが、STは宿主域がより広範であるため、その疫学解析はSEよ

り複雑である。

2) 国内外におけるDT104の発生状況

DT104は1990年代に牛の下痢・敗血症、ヒトの食中毒からの分離事例が急増したことから、過去に遡って分離STについてのフェージ型の検索が進められた。その結果、1984年の英国での分離例に始まり1990年代初頭には既に世界各国^{8, 11, 17, 41, 46, 81, 93)}に広がっていることが確認された。

英国では1984年にヒトおよび輸入野鳥から、1988年には牛から分離されており、以後1990年代に入りST感染症に占めるフェージ型DT104の比率が急速に高まった^{10, 41, 110)}。ヒト由来のDT104は1990年の259株から1996年には4,006株まで急増しており、SEに次いで分離頻度の高い血清型となった。さらに1990年代中頃からは従来の多剤耐性ABPC・CP・SM・SU・TCに加えてトリメトプリム (TMP)、シプロフロキサシン (CPFX) に対する感受性の低下も指摘され大きな問題になっている。家畜では1988年に牛から分離されて以降、年々DT104の分離頻度は高くなってきており、1996年は牛、豚由来のサルモネラの中ではSTが最も分離頻度が高い血清型で、しかもDT104が最優勢であった。さらに家禽由来株を加えると1996年には分離STの66.8% (1513/2264) がDT104であった⁸¹⁾。

デンマークでは1995年に5カ所の養豚場でDT104が分離されたが、1997年までの成績ではとくに増加傾向はみられず、分離STについても多剤耐性型ABPC・CP・SM・SU・TCの占める割合が低いことが特徴であった⁸⁾。しかし、1998年の夏に豚肉を原因としたDT104による食中毒の集団発生⁷³⁾があり、現在では公衆衛生上の問題となっている。

その他のヨーロッパ諸国 (ドイツ、フランス、ベルギー、オーストリア、イタリア、スペイン、ギリシャ、イスラエル、チェコ、フィンランドなど) において家畜やヒトからのDT104の分離が報告^{8, 17, 41, 45, 63)}されており、英国とほぼ同時期に欧州全域にDT104が広がったことが窺われる。

米国では分離株のフェージ型別が十分ではないが、特徴的な5剤耐性ABPC・CP・SM・SU・TCを指標とすると、牛由来ST ABPC・CP・SM・SU・TC株は1986年以前には認められていないが、以後1991年までの分離株では分離STの13%、そして1994までのSTでは64%がこの多剤耐性型であった¹¹⁾。1995年にSTはSEに次いで分離頻度第2位の血清型になった。また、DT104と型別されたものの分布をみると、米国全土にわたっているがとくに北西部の酪農地帯に浸潤度が高い傾向にある¹²⁾。さらに牛からやや遅れてヒトでも増加傾向になり、1994年には分離STの42.5%がDT104と型別されている。遡り調査ではDT104によるヒトの最初の症例は1985年であるが、その分離株と90年代の株の遺伝子型が同一であることから、以前から国内に存在した本

菌が何らかの理由で全土に拡散したものと考えられている⁸⁶⁾。

カナダにおいても米国と同様に1990年代中頃からのDT104の浸潤状況が明らかにされ、ヒト由来株では1993～96年の分離ST 544株の41%、動物・食品・環境由来株では1996年の分離STの34.2% (69/202) がDT104であった⁸¹⁾。

日本では、東京都で過去に発生した食中毒由来の多剤耐性STについてフェージ型別を実施した結果⁶⁹⁾、1997年の1事例および1998年の3事例がDT104によるものであることが明らかにされ、その感染源として牛の生レバーが疑われている。さらに過去の国内散发事例および海外旅行者による輸入散发事例についての検討の結果⁶⁷⁾では、国内の多剤耐性ST52株中31株が、輸入事例株の46株中13株がDT104であった。なかでも国内事例最初の分離株は1987年に得られており、その耐性型はやはりABPC・CP・SM・SU・TCであった。また主な保菌動物とされる牛においても後述のように1990年代に入り高率にDT104が分離されている⁸³⁾。牛以外にも豚、鶏、カラス、ネズミなどからの分離報告が続いており、DT104は既に国内に広く浸潤しているものと推察される。

3) 国内の牛での分布

当研究室では、国内の牛由来STの薬剤耐性状況の把握とDT104の分布調査⁸³⁾を実施した。まず、わが国で分離された牛由来STについて薬剤感受性状況を調べた。供試菌株として1973年から1998年の間に全国各地で分離された牛由来ST125株を用いて、先に挙げたABPC・CP・SM・SU・TCにTMP、カナマイシン (KM)、ナリジクス酸 (NA)、ノルフロキサシン (NFLX) を加えた9種の抗菌薬について薬剤感受性を調べた。その結果、牛由来ST125株は全てNFLXには高い感受性を示したが、4剤耐性以上の多剤耐性を示す菌株が98株 (78.4%) あった (Table 8)。そのうち62株 (49.6%) がDT104に特徴的なABPC・CP・SM・SU・TCを含む5剤耐性以上 (ABPC・CP・SM・SU・TC+) を示す菌株であった。DT104が含まれる可能性が高いこのABPC・CP・SM・SU・TC+62株について、国立感染症研究所に依頼してフェージ型別を実施したところ、31株 (50.0%) がDT104に型別された (Table 9)。DT104と型別された31株は耐性型でみるとやはりABPC・CP・SM・SU・TCが30株と最優勢であったが、カナマイシン耐性が付加したABPC・CP・SM・SU・TC・KM型も1株みられた。さらに分離年次毎に比較すると牛由来DT104 31株は全て1991年以降に分離された菌株であり、欧米諸国とほぼ同時期に国内の牛にDT104が浸潤していることが明らかになった。事実、わが国で1991年頃から増加したSTによる成牛型サルモネラ症は、分子疫学的解析の結果¹⁰⁰⁾、DT104が大きく関与したものと考えられている。

Table 8 牛由来ネズミチフス菌の薬剤耐性型 (1973-1998)

薬剤耐性型	菌株数 (%)
ABPC・CP・SM・SU・TC・KM・TMP	1 (0.8)
ABPC・CP・SM・SU・TC・KM・NA	4 (3.2)
ABPC・CP・SM・SU・TC・TMP・NA	1 (0.8)
ABPC・CP・SM・SU・TC・KM	18 (14.4)
ABPC・CP・SM・SU・TC	38 (30.4)
ABPC・SM・SU・TC・KM・NA	2 (1.6)
ABPC・CP・SU・TC・KM	3 (2.4)
ABPC・SM・SU・TC・KM	7 (5.6)
ABPC・CP・SM・SU	9 (7.2)
ABPC・SM・SU・TC	14 (11.2)
CP・SM・SU・TC	1 (0.8)
その他	27 (21.6)
合計	125 (100)

Table 9 牛由来ネズミチフス菌の耐性型 (ABPC・CP・SM・SU・TC+) におけるDT104の年次別分布状況 (1983~1998)

分離年次	ファージ型別株数	DT104株数 (%)
1983~1986	5	0
1987~1990	8	0
1991~1994	24	13 (54.2)
1995~1998	25	18 (72.0)
合計	62	31 (50.0)

Table 10 牛由来ネズミチフス菌の耐性型 (ABPC・CP・SM・SU・TC+) のフロルフェニコールに対するMIC分布

ファージ型	florfenicol (μ g/ml)					MIC ₅₀ (μ g/ml)
	100	50	25	12.5	6.25	
DT104 (31株)	17	14				100
DT104以外 (31株)	4	4	6	17		6.25

DT104を同定するためにはファージ型別が必要であるが、専門機関に依頼する必要がある、多数の野外分離株についての検査には時間を要する。そこでDT104が染色体上の多剤耐性領域にフロルフェニコール (FFC) 耐性遺伝子^{7,52)}を持つことを利用して、このFFC耐性が国内のDT104にどの程度保有されているかを調べるためACSSuT+ 62株についてFFCのMICを測定⁹⁾した。その結果、DT104は全てFFCに耐性を示したことから、DT104のスクリーニングに有用であることが示唆された (Table 10)。DT104以外にも一部FFC耐性株がみられたが、このなかには同様の耐性構造を持つU302などのファージ型が含まれる可能性が考えられた。

一方、ABPC・CP・SM・SU・TC以外の薬剤耐性については、近年英国を中心にDT104のCPFX, TMPに対する感受性の低下が報告された^{81,115)}。なかでもCPFXはヒトのサルモネラ症に有効な抗菌薬であり、英国の本

低感受性菌は1993年11月に同じニューキノロン系抗菌薬であるエンロフロキサシン (ERFX) が動物薬として使用承認されて以降、増加傾向にあるといわれている¹¹⁾。

4) 分子疫学的性状

DT104の分子疫学的解析の試みとして既にプラスミドプロファイル、パルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) 像による比較研究が進められている。DT104は60MDaの病原性プラスミドを保有しており、国内の牛由来DT104 31株も全て保有していた。さらに国内株は2~4 kbの小プラスミドを1~2本保有しており、米国における報告¹¹⁾と同様の結果であった。これまでのPFGE解析では世界各国で分離されるDT104株が非常に高い遺伝的均一性を保っていることが示されている^{8,16,86)}。また、Fluorescent Amplified-Fragment Length Polymorphism (FAFLP) による牛由来ネズミチフス菌の遺伝子型別¹⁰³⁾では、1991年から北海道内に本菌が流行し始めたことを示す成績が得られている。これらのことは、DT104がここ10年間ほどの非常に短い期間に世界各国に広がった可能性を裏付けているものと考えられる。

5) 感染経路

牛の主な感染経路は、罹患牛や保菌牛の糞便汚染を受けた飼槽、水槽、飼養環境などからの経口感染であるが、保菌動物・衛生昆虫の媒介、サルモネラ汚染飼料からの感染もある。また、ヒトの場合は、サルモネラ汚染食品や未殺菌乳の摂取、保菌動物との接触による間接的な経口感染などである⁵⁾。英国の事例では口腔に保菌する不顕性感染の猫がグルーミングすることにより体表を汚染し、周囲のヒトへ感染を起こした例¹¹⁷⁾もある。とくにSTは他のサルモネラと比較して宿主域が広い血清型であることから、ヒトや家畜に限らず、野鳥、ペット、ヒト、衛生動物、環境などの広い範囲での伝播を考慮すべきである。その宿主域の広さのために、感染経路の特定などの疫学的解析にはしばしば困難をきたすが、早期に感染経路を特定するために幅広い調査を実施することが防疫上重要である。

6) 臨床症状

DT104によるサルモネラ症は、動物、ヒトいずれにおいても重篤化するといわれているが、通常はSTによるサルモネラ症とほぼ同じ病態をとる。牛では水様ないし水様の下痢、発熱、食欲低下、元気消失、乳量低下、脱水などが観察され、子牛は重篤化する傾向にある。まれに流産もある。死亡率は40%に達する事例と、5%以下の場合もある。ヒトは下痢、血便、発熱、腹痛、嘔吐などが主な症状であるが、重症例もあれば軽症例もあり事例により大きく異なる。また、サルモネラ症一般にみられることであるが、回復後も排菌が継続し不顕性保菌者となることが多い。牛の例では排菌が18カ月間継続した事例²⁹⁾もある。

7) 発病要因

牛のDT104によるサルモネラ症は他のST感染症と同様に夏季に多発するが、輸送、気候の急変、飼料の変更、ウイルス感染などのストレスにより年中発生する。なかでも分娩直後の牛と生後2カ月以内の子牛はサルモネラ感染に対する感受性がとくに高いため、適切な衛生管理の実施が感染・発症予防に重要である。

DT104が台頭した1990年代は同時に日本を含めた世界各国で成牛型のサルモネラ症が急増した時期と合致している。しかし、成牛型サルモネラ症の多発要因については、近年の生産性を重視した飼育方法に対する牛側の生理的変調が大きく影響していると考えられており¹²⁾、菌側の要因のみで説明し難い部分がある。DT104自体の病原性は、侵入性などの病原因子について他のサルモネラとの比較で検討されているが、明確に病原性の増強を示す成績は得られていない^{16,12)}。

8) 予防と対策

米国ではここ数年、STあるいはDT104の分離例が減少傾向にあり¹²⁾、わが国においてもSTによる食中毒は漸減している。幸い日本においてDT104感染症は問題化していないので、現状の食肉衛生管理体制を堅持することが重要だと思われる。また、家畜衛生では罹患牛の排菌抑制に死菌ワクチンが有効であるといわれ

ており¹¹⁾、わが国では2000年から牛用のSTとS. Dublinの2価不活化ワクチンが市販されていることから、DT104を含めた牛サルモネラ症の予防手法として期待が寄せられている。しかし現状ではDT104に対して特異的に効果のある対策はないので、当面は他のサルモネラ症と同様に定期的検査による保菌牛の摘発・隔離、畜舎内外の清掃・消毒、保菌牛の導入阻止、飼槽・飲水器などの消毒、ネズミ・野鳥・ハエなどの媒介動物の排除、各種ストレスの軽減など日常的な清浄化への努力が重要であると考えられる。

DT104の多剤耐性機構や病原性の解明が進められている反面、その疫学的な側面については今なお未解明の部分が多い。なかでも1990年代に入って、ごく短期間に遺伝的に近縁な菌株が世界各国に広まった理由を明らかにすることは、有効な予防と対策を実施するうえで大きな意義があると考えられる。特定のサルモネラによるパンデミーの背景には菌の薬剤耐性を含む病原因子の獲得と家畜、ヒト、野生動物、農畜産物、飼料原料、食品などの国際的移動・流通が関与していることが推察されるが、今後発生が予想される国際感染症の制御を考える上ではこのDT104の世界的流行は多くの教訓を与えてくれるものと思われる。

おわりに

最近の細菌性食品媒介ブーノースの動向をみると、今後もサルモネラとEHECの重要性は不変であると思われる。いずれも地球規模で保菌動物が存在し、環境の汚染までもが進行する現状からすると、完全に本菌を撲滅することは不可能であり、彼らと共存して行かなければならないと考えられる。したがって、農畜産物の安全性を確保するために、生産現場から食肉処理・加工・流通・消費に至るフード・チェーンのあらゆる段階における衛生管理システムを構築し確実に実行するとともに、生産者・消費者に衛生知識を啓発していくことが大切である。また、食品の安全性確保は「Farm to table」あるいは「Plow to plate」コンセプトに示されているように、農畜産食品の出発点（生産現場）である農場およびその生産環境におけるブーノース起因菌を可能な限り排除することが重要であり、抗菌剤に頼ることなく飼養管理の改善により保菌動物を減少させることができるのか、生物学的製剤や生菌製剤により保菌防止ができるのか、如何にして堆肥・スラリー中の菌濃度を低下させるのかなど生産段階で今後解決しなければならない多くの問題が残されている。

参 考 文 献

- 1) Akiba, M. et al.: Molecular typing of *Escherichia coli* O157 : H7 (H-) isolates from cattle in Japan. *Epidemiol. Infect.*, 122 : 337~341. 1999.
- 2) Akiba, M. et al.: The shift of genetic subtypes of *Escherichia coli* O157 : H7 isolates from cattle. *Epidemiol. Infect.*, 122 : 343~346. 1999.
- 3) Akiba, M. et al.: A comparison of *Escherichia coli* O157 isolates from cattle in Japan and the USA by molecular biological methods. *Epidemiol. Infect.*, 125 : 221~224. 2000.
- 4) Akiba, M. et al.: Clonal turnover of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 : H7 in experimentally infected cattle. *FEMS Microbiol. Lett.*, 184 : 79~83. 2000.
- 5) Akkina, J. E. et al.: Epidemiologic aspects, control, and importance of multiple-drug resistant *Salomonella* Typhimurium DT104 in the United States. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 214 : 790~798. 1999.
- 6) Arcangioli, M-A. et al.: A new chloramphenicol and florfenicol resistance gene flanked by two integron

- structures in *Salmonella* Typhimurium DT104. *FEMS Microbiol. Lett.*, 174 : 327~332. 1999.
- 7) Arcangioli, M-A. et al. : Evolution of chloramphenicol resistance, with emergence of cross-resistance to florfenicol, in bovine *Salmonella* Typhimurium strains implicates definitive phage type (DT) 104. *J. Med. Microbiol.*, 49 : 103~110. 2000.
 - 8) Baggesen, D. L. et al. : Characterization of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium DT104 isolated from Denmark and comparison with isolates from Europe and the United States. *J. Clin. Microbiol.*, 38 : 1581~1586. 2000.
 - 9) Barber, D. A. et al. : Models of antimicrobial resistance and foodborne illness: Examining assumptions and practical applications. *J. Food Microbiol.*, 66 : 700~709. 2003.
 - 10) Beran, G. W. and Steele, J. H. : *Handbook of zoonoses*. 2nd ed. CRC Press, Inc., London. 1994.
 - 11) Besser, T. E. et al. : Salmonellosis associated with *S. Typhimurium* DT104 in the USA. *Vet. Rec.*, 140 : 75. 1997.
 - 12) Besser, T. E. et al. : Multiresistant *Salmonella* Typhimurium DT104 infections of humans and domestic animals in the Pacific northwest of the United States. *Epidemiol. Infect.*, 124 : 193~200. 2000.
 - 13) Boyd, D. et al. : Complete nucleotide sequence of a 43-Kilobase genomic island associated with the multidrug resistance region of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium DT104 and its identification in phage type DT120 and serovar Agona. *J. Bacteriol.*, 183 : 5725~5732. 2001.
 - 14) Briggs, C. E. and Fratamico, P. M. : Molecular characterization of an antibiotic resistance gene cluster of *Salmonella* Typhimurium DT104. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 43 : 846~849. 1999.
 - 15) Calvert, N. et al. : *Salmonella* Typhimurium DT104 infection in people and animals in Scotland: a collaborative epidemiological study 1993~96. *Vet. Rec.*, 143 : 351~354. 1998.
 - 16) Carlson, S. A. et al. : Evaluation of invasion-conferring genotypes and antibiotic-induced hyperinvasive phenotypes in multiple antibiotic resistant *Salmonella* typhimurium DT104. *Microbial Pathog.*, 28 : 373~378. 2000.
 - 17) Casin, I. et al. : Multidrug-resistant human and animal *Salmonella* Typhimurium isolates in France belong predominantly to a DT104 clone with the chromosome-and integron-encoded β -lactamase PSE-1. *J. Infect. Dis.*, 179 : 1173~1182. 1999.
 - 18) Centers for Disease Control and Prevention (CDC). : FoodNet surveillance report for 2000, Appendix A.
 - 19) Chalmers, R. M. et al. : Vero-cytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 in a farmer handling horses. *Lancet*. 349 : 1816. 1997.
 - 20) 千葉 正ら : 牛の大腸菌の排菌に及ぼす絶食の影響. 畜産の研究, 55 : 763~766. 2001.
 - 21) Chomel, B. B. : New emerging zoonoses : a challenge and an opportunity for the veterinary profession. *Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis.*, 21 : 1~14. 1998.
 - 22) Dawson, A. et al. : Farm visits and zoonoses. *Commun. Dis. Rep.*, 5 : R81~R86. 1995.
 - 23) Diez-Gonzalez, F. et al. : Grain feeding and the dissemination of acid-resistant *Escherichia coli* from cattle. *Science*, 281 : 1666~1668. 1998.
 - 24) Duncan, S. H. et al. : Inhibitory activity of gut bacteria against *Escherichia coli* O157 mediated by dietary plant metabolites. *FEMS Microbiol. Lett.*, 164 : 283~288. 1998.
 - 25) Elder, R. O. et al. : Correlation of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 prevalence in feces, hides, and carcasses of beef cattle during processing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97 : 2999~3003. 2000.
 - 26) Evans, S. and Davies, R. : Case control study of multiple-resistant *Salmonella* Typhimurium DT104 infection of cattle in Great Britain. *Vet. Rec.*, 139 : 557~558. 1996.
 - 27) Ezell, H. and Tramontin, B. : Outbreaks of multidrug-resistant *Salmonella* Typhimurium associated with veterinary facilities, Idaho, Minnesota, and Washington, 1999. *Morb. Mortal. Wkly Rep.*, 50 : 701~704. 2001.
 - 28) Feder, I. et al. : Isolation of *Escherichia coli* O157 : H7 from intact colon fecal samples of swine. *Emerg. Infect. Dis.*, 9 : 380~383. 2003.
 - 29) Fey, P. D. et al. : Ceftriaxone-resistant *Salmonella* infection acquired by a child from cattle. *N. Engl. J. Med.*, 342 : 1242~1249. 2000.
 - 30) Fleischauer, A. T. : Outbreak of severe acute respiratory syndrome, worldwide, 2003. *Morb. Mortal. Wkly Rep.*, 52 : 226~228. 2003.

- 31) Fox, N.: *Spoiled* ; Emerging disease and the anatomy of outbreak. p.137~290. BasicBooks, New York. U. S. A. 1997.
- 32) Fox, N.: *Spoiled* ; The madness behind mad cows. p.291~331. BasicBooks, New York. U. S. A. 1997.
- 33) Gage, R. et al.: Outbreaks of *Escherichia coli* O157 : H7 infections among children associated with farm visits, Pennsylvania and Washington, 2000. *Morb. Mortal. Wkly Rep.*, 50 : 293~297. 2001.
- 34) Glynn, M. K. et al.: Emergence of multidrug-resistant *Salmonella enterica* Serotype Typhimurium DT104 infections in the United States. *N. Engl. J. Med.*, 338 : 1333~1338. 1998.
- 35) Hancock, D. D. et al.: Cattle, hay, and *E. coli*. *Science*, 284, 51~53. 1999.
- 36) Hancock, D. D. et al.: Emerging Diseases of Animals ; The global epidemiology of multiresistant *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium DT104. p.217~243. 2000. ASM Press, Washington, D. C. U. S. A. 2000.
- 37) Hart, C. A. et al.: Zoonoses. *J. Med. Microbiol.*, 46 : 4~33. 1997.
- 38) Herikstad, H. et al.: *Salmonella* surveillance : a global survey of public health serotyping. *Epidemiol. Infect.*, 129 : 1~8. 2002.
- 39) Heuvelink, A. E. et al.: *Escherichia coli* O157 infection associated with a petting zoo. *Epidemiol. Infect.*, 129 : 295~302. 2002.
- 40) Hollinger, K. et al.: *Salmonella* Typhimurium DT104 in cattle in Great Britain. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 213 : 1732~1733. 1998.
- 41) Hollingsworth, J.: Federal agencies collaborate to control dangerous new *Salmonella* strain. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 210 : 1712, 1716. 1997.
- 42) Holmberg, S. D. et al.: Drug-resistant *Salmonella* from animals fed antimicrobials. *N. Engl. J. Med.*, 311 : 617~622. 1984.
- 43) Hovde, C. J. et al.: Effect of cattle diet on *Escherichia coli* O157 : H7 acid resistance. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65 : 3233~3235. 1999.
- 44) 飯田恭子ら : 牧場由来と考えられる腸管出血性大腸菌感染症. 北陸公衛誌. 27 : 43~47. 2000.
- 45) Imberechts, H. et al.: *Salmonella* Typhimurium phage type DT104 in Belgian livestock. *Vet. Rec.*, 143 : 424~425. 1998.
- 46) Izumiya, H. et al.: Characterization of multidrug-resistant *Salmonella enterica* serovar Typhimurium isolated in Japan. *J. Clin. Microbiol.*, 39 : 2700~2703. 2001.
- 47) Jarvis, G. N. et al.: The genetic diversity of predominant *Escherichia coli* strains isolated from cattle fed various amounts of hay and grain. *FEMS Microbiol. Lett.*, 32 : 225~233. 2000.
- 48) Johnsen, G. et al.: *Escherichia coli* O157 : H7 in feces from cattle, sheep and pigs in the southwest part of Norway during 1998 and 1999. *Int. J. Food. Microbiol.*, 65 : 193~200. 2001.
- 49) Jones, Y. E. et al.: *Salmonella in domestic animals* ; Laboratory aspects of *Salmonella*. p.393~405. CABI Publishing, London. U. K. 2000.
- 50) 金子賢一、丸山 努 : 細菌性人畜共通感染症. 動生協会会報. 29 : 1~10. 1996.
- 51) Keene, W. E. et al.: An outbreak of *Escherichia coli* O157 : H7 infections traced to jerky made from deer meat. *J. Am. Med. Assoc.*, 277 : 1229~1231. 1997.
- 52) Khan, A. A. et al.: Detection of multidrug-resistant *Salmonella* Typhimurium DT104 by multiplex polymerase chain reaction. *FEMS Microbiol. Lett.*, 182 : 355~360. 2000.
- 53) 国立感染症研究所 : 腸管出血性大腸菌感染症2000年3月現在. 病原微生物検出情報, 21 : 92~93. 2000.
- 54) 国立感染症研究所 : 腸管出血性大腸菌感染症2003年5月現在. 病原微生物検出情報, 24 : 129~130. 2003.
- 55) 小西典子ら : ペットが関与したと推定されるサルモネラ血清型Typhimuriumによる散発下痢症3事例について. 感染症誌, 76 : 657~658. 2002.
- 56) Kopcha, M. and Bartlett, P. C.: Important zoonoses from direct contact with livestock. *Vet. Med.*, 92 : 370~374. 1997.
- 57) 厚生労働省医薬局食品保健部監視安全課 : 平成14年食中毒発生状況, 食品衛生研究. 53 : 66~148. 2002.
- 58) 小谷知子ら : 安全な牛肉の生産を目的とした腸管出血性大腸菌O157対策の試み. 家畜衛生の進歩No.36 ; 平成14年度全国家畜保健衛生業績抄録, p.62~63. 2003.
- 59) Kudva, I. T. et al.: Characterization of *Escherichia coli* O157 :H 7 and other shigatoxin-producing *E. coli* serotypes isolated from sheep. *J. Clin. Microbiol.*, 35 : 892~899. 1997.

- 60) Kudva, I. T. et al. : Evaluation of dietary influences on *Escherichia coli* O157 : H7 shedding by sheep. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63 : 3878~3886. 1997.
- 61) 久島昌平ら : 2種類の増菌培養法による牛の腸管出血性大腸菌O157保菌状況. 日獣会誌, 54 : 391~394. 2001.
- 62) 楠 淳ら : 食中毒由来サルモネラ血清型Typhimuriumの薬剤感受性の年次別推移. 第19回日本食品部生物学会学術総会講演要旨, p. 55. 1998.
- 63) Leegaard, T. M. et al. : Emerging antibiotic resistance in *Salmonella* Typhimurium in Norway. *Epidemiol. Infect.*, 125 : 473~480. 2000.
- 64) Lindsay, E. A. et al. : Role of electronic data exchange in an international outbreak caused by *Salmonella enterica* Serotype Typhimurium DT204b. *Emer. Infect. Dis.*, 8 : 732~734. 2002.
- 65) Louria, D. B. : *Emerging Infections 1* ; Emerging and reemerging infections: the critical societal determinants, their mitigation, and our responsibilities. p. 247~259. ASM Press, Washington, D. C. U. S. A. 1998.
- 66) 丸山 務, 高島郁夫 : ズーノーシス対策における獣医公衆衛生の役割. 獣畜新報, 51 : 739~740. 1998.
- 67) 松下 秀ら : 散発事例由来*Salmonella* Serovar Typhimuriumの薬剤耐性とdefinitive type 104の出現状況. 感染症誌, 73 : 1087~1094. 1999.
- 68) Michino, H. et al. : Massive outbreak of *Escherichia coli* O157 : H7 infection in schoolchildren in Sakai city, Japan, associated with consumption of white radish sprouts. *Am. J. Epidemiol.*, 150 : 787~796. 1999.
- 69) 道野英司 : 大規模・広域食中毒発生への行政対応. 日食微誌, 19 : 166~170. 2002.
- 70) Milne, L. M. et al. : *Escherichia coli* O157 incident associated with a farm open to members of the public. *Commun. Dis. Public Health*, 2 : 22~26.
- 71) 毛利資郎, 山内一也 : 獣医学と医学の接点 ; ヒトと動物の病気. 第26回日本医学会総会学術講演要旨, p. 341~342. 2003.
- 72) Molbak, K. et al. : An outbreak of multidrug-resistant, quinolone-resistant *Salmonella enterica* serotype Typhimurium DT104. *N. Engl. J. Med.*, 341 : 1420~1425. 1999.
- 73) 中澤宗生, 甲斐明美 : 日本のウシ由来ペロ毒素産生性大腸菌の性状. 感染症誌, 68 : 1437~1439. 1994.
- 74) 中澤宗生 : 腸管出血性大腸菌O157に対する研究の最前線. 研究ジャーナル, 20 : 45~51. 1997.
- 75) Nakazawa, M. et al. : Swine as a potential reservoir of Shigatoxin-producing *Escherichia coli* O157 : H7 in Japan. *Emer. Infect. Dis.*, 833~834. 1999.
- 76) 中澤宗生, 鮫島俊哉 : 牛の腸管出血性大腸菌O157 : H7の排菌と飼料の関連. 感染症誌, 76 : 76~77. 2002.
- 77) 中澤宗生ら : 粗飼料給与による牛の腸管出血性大腸菌O157 : H7の保菌抑制の可能性. 畜産の研究, 56 : 470~474. 2002.
- 78) 中澤宗生, 鮫島俊哉 : 乾草給餌による牛の腸管出血性大腸菌O157 : H7の排菌抑制. 感染症誌, 77 : 635~636. 2003.
- 79) 大谷勝実 : 鹿肉の生食による腸管出血性大腸菌 (O157 : H7) 感染事例について. 病原微生物検出情報, 18 : 84. 1997.
- 80) Orskov, F. et al. : Cattle as reservoir of Verotoxin-producing *Escherichia coli* O157 : H7. *Lancet*, 2 : 276. 1987.
- 81) Poppe, C. et al. : *Salmonella* Typhimurium DT104 : A virulent and drug-resistant pathogen. *Can. Vet. J.*, 39 : 559~565. 1998.
- 82) Pritchett, L. C. et al. : Identification of DT104 and U302 phage types among *Salmonella enterica* Serotype Typhimurium isolates by PCR. *J. Clin. Microbiol.*, 38 : 3484-3488. 2000.
- 83) Rabatsky-Ehr, T. et al. : Deer meat as the source for a sporadic case of *Escherichia coli* O157 : H7 infection, Connecticut. *Emer. Infect. Dis.*, 8 : 525~527. 2002.
- 84) Rajashekara, G. et al. : Multidrug-resistant *Salmonella* Typhimurium DT104 in poultry. *J. Food. Protect.*, 63 : 155~161. 2000.
- 85) Renwick, S. A. et al. : Evidence of direct transmission of *Escherichia coli* O157 : H7 infection between calves and a human. *J. Infect. Dis.*, 168 : 792~793. 1993.
- 86) Ribot, E. M. et al. : *Salmonella enterica* Serotype Typhimurium DT104 isolated from humans, United States, 1985, 1990, and 1995. *Emer. Infect. Dis.*, 8 : 387~391. 2002.
- 87) Rice, D. H. et al. : Fecal culture of wild animals for *Escherichia coli* O157 : H7. *Vet. Rec.*, 152 : 82~83.

- 2003.
- 88) Riley, L. W. et al. : Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. *N. Engl. J. Med.*, 308 : 681~685. 1983.
- 89) Rios, M. et al. : Clonal diversity of Chilean isolates of enterohemorrhagic *Escherichia coli* from patients with hemolytic-uremic syndrome, asymptomatic subjects, animal reservoirs, and food products. *J. Clin. Microbiol.*, 37 : 778~781. 1999.
- 90) 齋藤紀行ら : 飼育牛からの感染が疑われた腸管出血性大腸菌O26感染散発事例. 病原微生物検出情報, 21 : 35. 2000.
- 91) 齋藤志保子ら : 牛が感染源と考えられたVero毒素産生性大腸菌O103 : H2による家族内感染事例. 感染症誌, 72 : 707~713. 1998.
- 92) 坂崎利一 : *Salmonella* およびその感染症. けんさ, 27 : 3~15. 1997.
- 93) Sameshima, T. et al. : *Salmonella* Typhimurium DT104 from livestock in Japan. *Jpn. J. Infect. Dis.*, 53 : 15~16. 2000.
- 94) 鮫島俊哉ら : フロルフェニコール耐性を指標とした*Salmonella* Typhimurium DT104の簡易スクリーニング法. 動物衛生研究成果情報, 1 : 43~44. 2002.
- 95) Sanchez, S. et al. : Animal sources of salmonellosis in humans. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 221 : 492~497. 2002.
- 96) Sargeant, J. M. et al. : Prevalence of *Escherichia coli* O157 : H7 in white-tailed deer sharing rangeland with cattle. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 215 : 792~794. 1999.
- 97) 清水 潮 : 食中毒の社会的費用. 日食微誌, 19 : 87~94. 2002.
- 98) 品川邦汎・熊谷 進 : 大規模・広域食中毒はなぜ起こるか. 日食微誌, 19 : 149~150. 2002.
- 99) Shukla, R. et al. : *Escherichia coli* O157 infection associated with a farm visitor centre. *Commun. Dis. Rep.*, 5 : R86~R90. 1995.
- 100) Swaminathan, B. et al. : Pulse Net : The molecular subtyping network for foodborne bacterial disease surveillance, United states. *Emerg. Infect. Dis.*, 7 : 382~389. 2001.
- 101) Syngé, B. and Paiba, G. : Verocytotoxin-producing *E. coli* O157. *Vet. Rec.*, 147 : 27. 2000.
- 102) 竹田美文 : 新流行感染症・再流行感染症. 最新医学, 52 : 5~8. 1997.
- 103) Tamada, Y. et al. : Molecular typing and epidemiological study of *Salmonella enterica* Serotype Typhimurium isolates from cattle by fluorescent amplified-fragment length polymorphism fingerprinting and pulsed-field gel electrophoresis. *J. Clin. Microbiol.*, 39 : 1057~1066. 2001.
- 104) Taylor, J. and McCoy, J. H. : *Food-borne infections and intoxications; Salmonella and Arizona infections*. p. 3~72. Academic Press, London. U. K. 1969.
- 105) Tauxe, R. V. : *Emerging Infections 3 ; Salmonella Enteritidis and Salmonella Typhimurium DT104: successful subtypes in the modern world*. p. 37~52. ASM Press, Washington, D. C. U. S. A. 1999.
- 106) 田崎達明 : 和風キムチによるEHEC食中毒事例. 病原微生物検出情報, 23 : 139~141. 2002.
- 107) Tenover, F. C. et al. : Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis : criteria for bacterial strain typing. *J. Clin. Microbiol.*, 33 : 2233~2239. 1995.
- 108) 寺嶋 淳ら : 2002年におけるO157 : H7を中心としたEHECの動向について. 日細誌, 58 : 180. 2003.
- 109) Thorns, C. J. : Bacterial food-borne zoonoses. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.*, 19 : 226~239. 2000.
- 110) Threlfall, E. J. et al. : Epidemic in cattle and humans of *Salmonella* Typhimurium DT104 with chromosomally integrated multiple drug resistance. *Vet. Rec.*, 134 : 577. 1994.
- 111) Threlfall, E. J. et al. : Ciprofloxacin-resistant *Salmonella* Typhimurium DT104. *Vet. Rec.*, 142 : 255. 1998.
- 112) Threlfall, E. J. et al. : Multiresistant *Salmonella* Typhimurium DT104 and *Salmonella* bacteraemia. *Lancet*, 352 : 287~288. 1998.
- 113) Tkalcic, S. et al. : Effects of diet on rumen proliferation and fecal shedding of *Escherichia coli* O157 : H7 in calves. *J. Food Prot.*, 63 : 1630~1636. 2000.
- 114) Trevena, W. B. et al. : Transmission of Vero cytotoxin producing *Escherichia coli* O157 infection from farm animals to humans in Cornwall and West Devon. *Commun. Dis. Public Health*, 2 : 263~268. 1999.
- 115) Walker, R. A. et al. : Decreased susceptibility to ciprofloxacin in outbreak-associated multiresistant *Salmonella* Typhimurium DT104. *Vet. Rec.*, 147 : 395~396. 2000.

- 116) Wall, P. G. et al. : Transmission of multi-resistant strains of *Salmonella* Typhimurium from cattle to man. *Vet. Rec.*, 136 : 591~592. 1995.
- 117) Wall, P. G. et al. : Multiresistant *Salmonella* Typhimurium DT104 in cats: a public health risk. *Lancet*, 348 : 471. 1996.
- 118) 渡辺治雄ら : 分子疫学的手法に基づいた食中毒の監視体制 ; パルスネットの構築. *感染症誌*, 76 : 842~848. 2002.
- 119) Weese, J. S. et al. : Emergence of *Salmonella* Typhimurium definitive type 104 (DT104) as an important cause of salmonellosis in horses in Ontario. *Can. Vet. J.*, 42 : 788~792. 2001.
- 120) Wells, J. G. et al. : Laboratory investigation of hemorrhagic colitis outbreaks associated with a rare *Escherichia coli* serotype. *J. Clin. Microbiol.*, 18 : 512~520. 1983.
- 121) 山本孝史 : サルモネラ症. *研究ジャーナル*, 24 : 35~40. 2001.
- 122) 山崎順正ら : 腸管出血性大腸菌O26 : H11実験感染牛の排菌に及ぼす絶食の影響ならびに抗体応答. *畜産の研究*, 53 : 1198~1202. 1999.
- 123) 矢田谷 健ら : プラスミドDNAからみた*Salmonella* Typhimuriumによる幼児と子牛の疫学的観察. *日獣会誌*, 36 : 274~277. 1983.
- 124) 八柳 潤ら : 牛が感染源と考えられた志賀毒素産生性大腸菌O121によるHUS発症事例. *病原微生物検出情報*, 22 : 141~142. 2001.
- 125) 吉井紀代ら : 動物体内と環境中における腸管出血性大腸菌O26 : H11の遺伝子型変遷. *動物衛生研究成果情報*, 1 : 25~26. 2002.
- 126) Zansky, S. et al. : Outbreak of multidrug-resistant *Salmonella* Newport, United States, January to April, 2002. *Morb. Mortal. Wkly Rep.*, 51 : 545~548. 2002.

総説

獣医学領域におけるエールリッヒア症の診断

猪熊 壽*

〔受付：2003年10月20日〕

REVIEW

DIAGNOSIS OF EHRLICHIOSIS IN VETERINARY MEDICINE

Hisashi INOKUMA

Laboratory of Veterinary Internal Medicine, Faculty of Agriculture, Yamaguchi

University 1677-1 Yoshida, Yamaguchi 753-8515 Japan

〔Received for publication : October 20, 2003〕

Ehrlichiosis was previously known only as a serious disease in veterinary science. Since several new *Ehrlichia* species or strains were isolated in the 1990s, however, ehrlichiosis has been characterized as an emerging or reemerging infectious disease with increasing interest. Today *Ehrlichia* is known as a major vector-borne pathogen to both humans and animals. In order to understand ehrlichial infection, it is necessary to appreciate the roles of animals, animal habitats, and vectors. It is also very important for veterinarians to diagnose Ehrlichiosis of animals correctly and quickly.

Thanks to the recent development of molecular biology, the phylogenetic situation of ehrlichial pathogens has been reorganized, and more specific and sensitive methods are used for the diagnosis of ehrlichiosis. In this paper some important aspects of ehrlichiosis, which include epidemiological situation, clinical findings, and laboratory methods for diagnosis, are reviewed.

1. はじめに

エールリッヒア症は *Ehrlichia*, *Anaplasma* または *Neorickettsia* 属病原体の感染によりおこる全身性リケッチア病である。従来エールリッヒア症は主として獣医学領域で重要な感染症と考えられていたが、1990年代になって人に感染するものも含めて次々と新しいエールリッヒア病原体が分離されたことによって、人と動物の両者にとって重要な新興再興感染症のひとつとして注目されるようになった。エールリッヒア病原体の感染には通常ベクターとしてマダニまたは水棲動物、および保菌者として野生哺乳動物が関与しているため、人と動物のエールリッヒア症を正しく診断治療し、予防するためには、これら環境要因についてもよく理解する必要がある³⁹⁾。

わが国では、既に半世紀前に人に感染する世界で最初のエールリッヒアとして *Neorickettsia (Ehrlichia) sennetsu* が報告されていたが³⁹⁾、その後国内では牛に感染する *Anaplasma* のほかはエールリッヒア症の症例報告はなかった。このため現在でも、医学および獣医学領域両方であまり知られていない病気ではない、しかし世界的にみると欧米では多くのエールリッヒア症患者が報告されており、また獣医学領域でも牛のカウドリア症、犬のエールリッヒア症などは重要かつ普通に遭遇する重要な疾病として教科書等に記載されている。人と物の国際的な移動が盛んになった現在、海外で発生した伝染病が、いつ何時わが国に侵入するかもしれない状況がある。本稿では比較的なじみのうすいエールリッヒア症を我が国の獣医師に紹介し、正しい診断に至るために必要な疫学、臨床症状および診断法について概説することとした。

* 山口大学農学部獣医学科内科学教室・教授 〒753-8515 山口市吉田1677-1

2. 病原体の分類と生物学的性状

(1) 分類

従来、リケッチア性病原体の分類は主として生物学的性状、すなわち形態、宿主、ベクター、感染細胞、地理的分布などの違いに基づいて行われてきた。エールリッヒア症の多くの病原体はリケッチア科エールリッヒア族 (Family *Rickettsiaceae*, Tribe *Ehrlichia*) に属していた。しかし近年、他の細菌と同様、リケッチアの分類にも遺伝子解析が応用されるようになり、とくに16S rRNA遺伝子および熱ショックタンパク遺伝子 (*groEL*) の塩基配列に基づく系統学的分類が検討された³⁹⁾。これによると従来のエールリッヒア族病原体はリケッチア科から分離し、新たにアナプラズマ科 (Family *Anaplasmataceae*) に属することとなった。さらにアナプラズマ科の中に、*Anaplasma*, *Ehrlichia*, *Wolbachia*, *Neorickettsia*の4つの新しい属 (Genus) が構築されて病原体の再分類が行われた (Fig. 1)。エールリッヒア症病原体の分類学的位置づけに関する大きな変更点としては、① *Cowdria* 属が消滅し *Cowdria ruminantium* (牛心水病) は *Ehrlichia* 属に分類されたこと、② *Ehrlichia equi* (馬のエールリッヒア症)、

Ehrlichia phagocytophila (牛放牧熱), human granulocytic ehrlichia (HGE agent, 人類粒球形エールリッヒア症) はすべて同一種とされ、*Anaplasma phagocytophilum* に統一されたこと、③ *Ehrlichia risticii* (馬ポトマック熱), *Ehrlichia sennetsu* (人の腺熱) は、*Neorickettsia helmintoeca* (犬の鮭中毒) とともに *Neorickettsia* 属に分類されたことである。さらに従来アナプラズマ科に属していた *Haemobartonella* および *Eperythrozoon* は *Mycoplasma* と近縁であり、*Mollicutes* 科に移動した。さらに近年、分子生物学的手法を応用したエールリッヒア症の疫学的研究が盛んに実施されており、遺伝子解析により、新種と思われる病原体が次々と世界中から報告されている。わが国においても野生げっ歯類から *Ehrlichia muris*^{79, 143)}, ヤマトマダニからネズミに致死性病原性を示す新種の *Ehrlichia*¹²⁴⁾ が分離されてその生物学的性状が研究されている。なお、本稿では以下、歴史的経緯から *Anaplasma*, *Ehrlichia*, *Neorickettsia* により生じる疾病を総称して「エールリッヒア症」と呼ぶこととし、また病原体の学名は新属名を記載する。

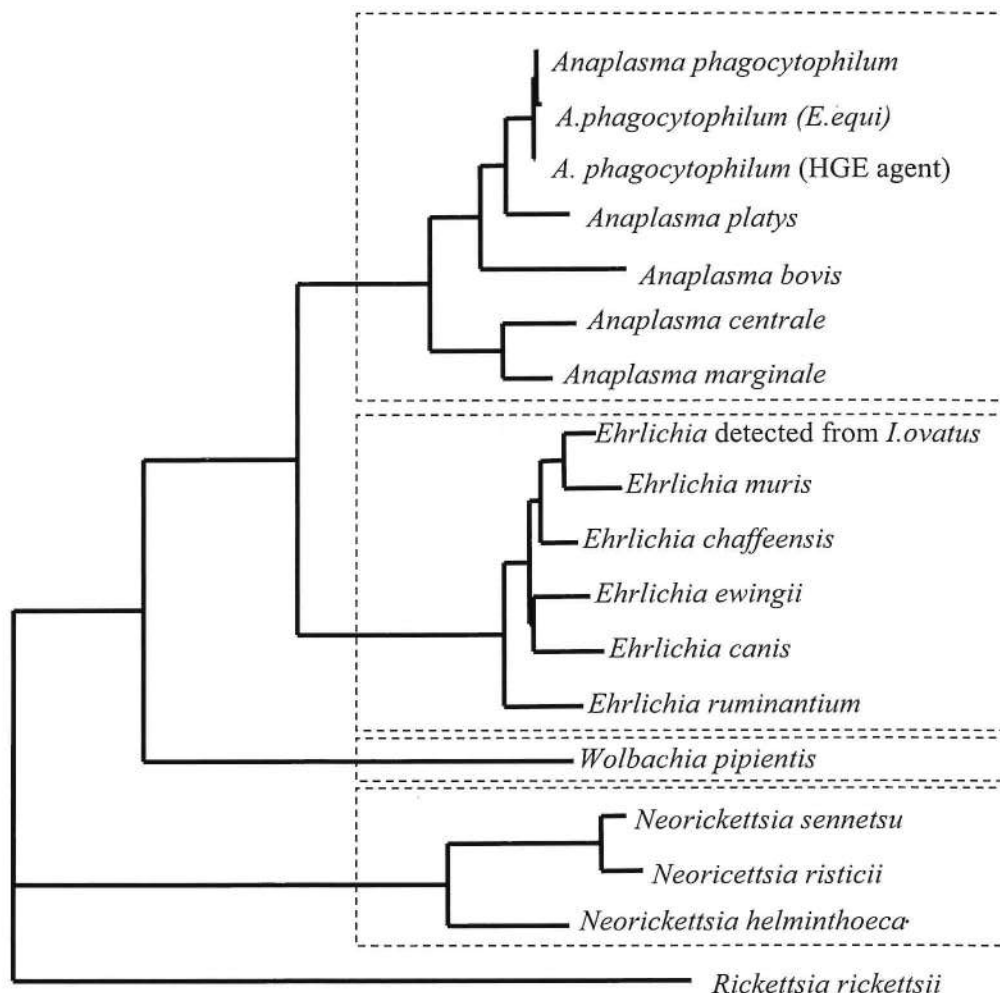


Fig. 1 16S rRNA遺伝子配列に基づくアナプラズマ科病原体の系統分類。Ehrlichia, Anaplasma, Wolbachia, Neorickettsiaの4属が含まれる。最下段の *Rickettsia rickettsii* は別の科に属するが比較のために系統樹に含めている。

(2) 生物学的性状

エールリッヒア症病原体は、0.2～2 μmの大きさの球状もしくは楕円状のグラム陰性細菌で、血液細胞の細胞質内に膜に包まれた空胞（封入体）を作り、その中で桑実胚（Morula）と呼ばれる桑の実状に増殖する。感染の標的となる細胞は病原体により異なり、単球（単球性エールリッヒア）、顆粒球（顆粒球性エールリッヒア）、赤血球または血小板内で増殖する¹¹⁰⁾。

哺乳動物へのエールリッヒア症病原体の感染にはベクターまたは保菌動物が関与する。Ehrlichia属およびAnaplasma属病原体はマダニによって、またNeorickettsia属では魚や貝類に寄生する吸虫によって媒介される。たとえばE. chaffeensisは米国において野生の鹿が保菌動物（reservoir）として病原体の増殖源となり、マダニAmblyomma americanumが媒介することで感染環を形成している¹¹⁾。人や他の動物はその感染環の中へ入り込むことによって、すなわちマダニ寄生によってE. chaffeensisに感染する。またN. helminthoecaは鮭に寄生する吸虫（Nanophyetus salmincola）に感染し、犬や熊などの食肉動物がこの

感染吸虫が寄生している鮭を食べることによって感染する¹¹⁾。通常ベクターや保菌動物の分布には地理的な特徴があるため、これらの分布にあわせてそれぞれのエールリッヒア症の分布も制限されている。しかし犬のエールリッヒア症病原体Ehrlichia canisのベクターであるクリイロコイタマダニ（Rhipicephalus sanguineus）は世界中の熱帯から亜熱帯、一部温帯にまで広く分布しているため、E. canis感染症の分布も世界的である⁵⁹⁾。Table 1に主なエールリッヒア症病原体の感染動物、ベクターなどを含めた概要を示す。

なお、アナプラズマ科の属するもうひとつのWolbachiaは、これまで哺乳動物への病原性は知られておらず、昆虫などの節足動物、またはフィラリアなどの線虫を宿主として共生している。全昆虫の20から75%がWolbachiaを保有しており、昆虫などの生殖を制御する細胞質不和合性などを引き起こすことで知られている^{12,13)}。犬糸状虫Dirofilaria immitisにもWolbachiaが共生しており、その生存に大きな影響を及ぼしているという報告もある¹³⁰⁾。

Table 1 Ehrlichia, Anaplasma, Neorickettsia属病原体の宿主、ベクター、保菌動物および地理的分布

病原体	宿主	ベクター	保菌動物	地理的分布
①Ehrlichia				
E. canis	Dogs (cats?)	R. sanguineus	Dog	World wide
E. chaffeensis	Human (dogs, goats)	A. americanum	White-tailed deer	USA
E. ewingii	Dogs	A. americanum		USA
E. ruminantium	Ruminants	Amblyomma spp.		Africa
E. muris	Mouse	H. flava		Japan
New monocytic Ehrlichia	unknown	Ixodes ovatus		Japan
②Anaplasma				
E. phagocytophilum	Ruminants Human, Horse	I. ricinus (Europe) I. scapularis (USA)	Mouse White-footed	Europe USA,
A. platys	Dogs	R. sanguineus ?	Dogs ?	USA, Greek, France, Italy, Spain, Taiwan, Japan
A. marginale	Ruminants	D. andersoni, B. microplus	Cattle Deer	Africa, USA, South Europe, Australia, Asia South America Soviet Union
A. centrale	Ruminants			
③Neorickettsia				
N. risticii	Horses Dogs	Trematode	Freshwater operculate Snails	USA, Europe
N. helminthoeca	Dogs (Canides)	Trematode (Nanophyetus salminoda)	Snails and salmon	USA
N. sennetsu	Human	Trematode	Fish	Japan
SF agents		Trematode (S. falcatius)		Japan

3. 主要病原体の特徴と臨床症状

(1) 犬のエールリッヒア症

小動物に対して病原性を有する病原体としては *E. canis*, *E. chaffeensis*, *E. ewingii*, *A. platys*, *A. phagocytophilum*, *N. helminthoeca*, *N. risticii*が知られている。*E. canis*は犬と猫, *E. ewingii*, *A. platys*, *N. helminthoeca*は犬, *A. phagocytophilum*は犬, 馬, 牛, 人, *E. chaffeensis*は人と犬で発生報告がある。いっぽう *N. risticii*は犬では実験感染でのみ感受性が認められている。もっとも世界中の犬に広く分布しているのは *E. canis*と *A. platys*である。

① *E. canis* 感染症

E. canis 感染症は1935年アルジェリアで最初の報告がされて以来³⁰⁾, 世界中の犬で発生報告がある。*E. canis*のベクターであるクリイロコイタマダニは, 熱帯から亜熱帯, さらに温帯の一部まで世界中に広く分布している。クリイロコイタマダニは日本でも沖縄県の犬に最も優勢に寄生する種であるが, 本州でも散見されている¹²⁵⁾。わが国では発症が確認されているのはインドネシアから帰国した犬1頭のみである¹²⁵⁾。*E. canis*抗体陽性犬の存在も報告されているが⁷¹⁾, 抗体陽性は *E. canis*近縁種との交差反応の可能性も考えられ, 感染の実態は明らかではない。

本マダニによる病原体媒介は経産感染であり, 感染マダニが宿主から吸血する際に病原体が宿主体内に侵入する。直接血液による伝播もおこる。*E. canis*は, 感染後リンパ節, 脾臓, 肝臓内の食細胞系および骨髄内の単核球細胞質内で増殖し, これらの臓器の腫大と骨髄抑制(血小板減少, 白血球減少, 貧血)などの臨床症状を生じる (Fig. 2)。急性期には発熱, 食欲不振, 体重減少, リンパ節腫脹, 脾腫, 肝腫大, 鼻汁, 呼吸困難, 肺炎, 髄膜炎, 出血傾向(点状出血)などを認める。数ヶ月から数年の無症状期を経て, 慢性期に移行し, 発熱, 体重減少, リンパ節腫脹, 脾腫, 肝腫大, 髄膜炎, 出血傾向(鼻出血, 網膜出血, 前眼房出血), 貧血, 前または後ブドウ膜炎, 四肢の間欠性浮腫が軽度から重度にみられることがある⁵³⁾。また臨床病理所見として, 急性期には血小板減少, 白血球減少, 非再生性貧血が, また慢性期には単球増加, 血小板減少, 高グロブリン血症, 低アルブミン血症, 骨髄低形成, 蛋白尿などがみられることが多い^{45, 51, 55, 56, 132, 138)}。血小板減少, 高グロブリン血症, 単球増加症は無症状期にみられることもある。高ガンマグロブリン血症は *E. canis*感染症の重要な生化学異常のひとつであり^{19, 36)}, 通常は多クローン性, まれに単クローンに認められる⁶⁰⁾。これらの臨床病理学的所見は多発性骨髄腫や慢性リンパ球性白血病に類似するため, 鑑別診断として病原体の検出または血清学的診断が必要となる。これらの疾病の流行地においてもしばしばこれらの疾病との誤診がおりうる^{14, 53)}。病理所見として点状ないし

斑状出血, 細網内皮細胞の過形成, 脾臓や肝臓などの主要臓器に形質細胞やリンパ球の浸潤が認められる。

② *A. platys* 感染症

*A. platys*もベクターと考えられているクリイロコイタマダニの分布に伴って世界中に分布している。わが国でも *A. platys*は沖縄県の犬とマダニに常在しており^{72, 73, 75)}, さらに最近では本州の犬から回収されたマダニからも検出されている⁶⁹⁾。

*A. platys*は宿主体内に侵入後, 血小板に感染し, 血小板内で増殖する。潜伏期は7~14日であり, 感染血小板は表面の抗原性が変化するため, 抗血小板抗体が産生され, これにより血小板減少症が生じると考えられている^{16, 57, 81)}。感染犬は通常無症状であるが, 重度の血小板減少と出血傾向を呈することがある⁶⁵⁾。血小板減少症は1から2週間間隔で繰り返し起こるため, *A. platys*感染症は別名犬周期性感染性血小板減少症とよばれる。血小板数は15,000/ μ l未滿の重度な減少を示す期間が2~3日続き, その後1週間程で正常値(200,000/ μ l)に復し, 再び下降する⁶⁰⁾。欧州の *A. platys* 感染症では強い病原性が報告されているが^{88, 81)}, 他の地域ではほとんど臨床症状を呈する症例が報告されおらず, 病原性に地理的変異があることが推測されている。確定診断には病原体の検出が必要である。末梢血塗抹ギムザ染色標本の観察により特徴的なinclusionが血小板内に検出される (Fig. 3)。とくに血小板に富んだパフィーコートを材料にした塗抹標本を観察すると効率よく検出できる。ただしinclusionは, 血小板数が極端に低値を示す時期には塗抹標本上で認められないこともある。

③ *E. ewingii* 感染症

*E. ewingii*は発見当初, 顆粒球に感染する病原性の弱い *E. canis*の新しい株と考えられていた。感染犬の臨床症状は非特異的であり, 発熱, 元気食欲不振, 嘔吐, 下痢, 貧血, 血小板減少症, リンパ節の腫脹, 多発性関節炎などを呈する^{23, 29, 48)}。また, 運動失調, 不全麻痺, 姿勢反射の異常, 瞳孔反射の異常, 震顫, 斜頸などの神経症状も認められる⁴⁹⁾。米国では人の *E. ewingii*感染症例が報告されている¹⁸⁾。

④ *N. helminthoeca* 感染症

*N. helminthoeca*は犬, 熊, およびその他の野生のイヌ科動物に鮭中毒を引き起こす病原体として知られ, 米国太平洋岸のオレゴン, ワシントン, カリフォルニア州に分布する。動物は *N. helminthoeca*に感染した吸虫 (*Nanophyetus salmonicola*) が寄生した鮭を生で摂食することにより感染する。通常, 摂食後5~9日で発病する。臨床症状は発熱, 元気食欲不振, 嘔吐, 水様性ないし血様下痢, 脱水, 鼻と眼からの分泌物が特徴的であり, 組織学的には小腸の出血と壊死性腸炎が主な病変である。適切な治療が行われないうちは, 感染犬の致死率は90%を超える^{28, 100)}。桑実胚が末梢血

に出現しないので診断は容易ではない。

⑤ *A. phagocytophilum*感染症

本病は本来、人、牛、馬の疾病であり、それぞれの項目で述べるように明らかな臨床症状を伴った自然感染例が多数報告されている。犬、猫などの動物に対しても実験感染が成立するが、一般的に病原性は弱いと考えられている^(14,70,87,88)。

(2) 反芻動物のエールリッヒア症

① *E. ruminantium*感染症

*E. ruminantium*は、最近まで*Cowdria ruminantium*の学名で知られており、アフリカ南部、マダガスカル、カリブ海に分布する。本病原体は牛の全身の血管内皮細胞および好中球に感染し、心水病 (heartwater) またはカウドリア症 (Cowdriosis) とよばれる重篤な疾病を引き起こす。心水病という病名は、本病の病理学的所見が心膜水腫、胸膜水腫、肺水腫、腹水などに特徴付けられることから由来している⁽¹⁰⁾。ベクターはキララマダニ属*Amblyomma*の複数のマダニであるが、*E. ruminantium*は唾液腺ではなく、マダニの腸内容物の吐き戻しによって宿主に侵入するため、マダニが宿主に吸着した後の比較的早い時期に感染がおこることになる⁽⁵²⁾。臨床症状としては発熱(42°C)、元気食欲消失、流涎のほか、歩様異常、旋回、痙攣、後弓反張などの神経症状がみられる⁽⁵³⁾。甚急性または急性感染症の場合、通常は症状の発現後1週間以内に死亡するが、病原性は株によって異なることが知られている⁽⁵⁴⁾。本病が分布する地域においては狂犬病、バベシア症、低マグネシウム血症、破傷風、ストリキニーネ中毒、炭疽などの疾病と鑑別診断する必要がある。

② *A. phagocytophilum*感染症

反芻動物の*A. phagocytophilum*感染症は最近まで、欧州における*E. phagocytophila*感染症として知られており、別名、放牧熱 (pasture fever) またはダニ熱 (tick-borne fever) とよばれる。ベクターは*I. ricinus*である。病原体は米国のヒト顆粒球性エールリッヒアおよび馬顆粒球性エールリッヒアと同一種であるとされた。牛のほか、めん羊、山羊、鹿などの野生反芻獣の顆粒球に感染する。臨床症状は発熱(40.2~41.7°C)、元気食欲など一般状態の低下、泌乳量の減少、成長率の低下、妊娠後期の流産などが主である^(30,111,114)。発咳および鼻汁排出などの呼吸器症状がみられることもある⁽¹¹⁾。死亡率は低い二次感染が起こりやすく、また重症化の原因となる。

③ *A. marginale*感染症

*A. marginale*は牛、水牛および野生の牛科動物の赤血球に感染する。感染した*A. marginale*の70%以上が赤血球の辺縁に観察されることからmarginaleの学名があり、*A. centrale*が赤血球の中央部に存在するのとは対照的である。カクマダニ属*Dermacentor*、オウシマ

ダニ属*Boophilus*のマダニのほか、アブ、サシバエ、力などの吸血節足動物が生物学的あるいは機械的に病原体を伝播することが知られている。北米、中南米、アフリカ、中近東、オーストラリア、日本を含むアジアに広く分布しており、わが国では法定伝染病に指定されている。宿主体内に侵入した*A. marginale*は成熟赤血球内で増殖と放出を繰り返し、次々に新しい赤血球が侵されていくため重篤な溶血性貧血に関連した臨床症状が生じる⁽¹⁰⁾。元気食欲不振、虚弱、発熱、要力呼吸、脱水、便秘、黄疸、流産などがみられ、死亡することもある。*A. marginale*に対する牛の感受性は年齢によって異なり、一般に年齢の進行とともに感受性が高くなり、1歳未満の牛では病原性は弱い、3歳以上の牛では通常甚急性で致死的な貧血が生じる⁽¹⁰⁾。赤血球に感染する*Anaplasma*として、他に*A. centrale*および*A. ovis*が知られているが*A. marginale*に比べると病原性は強くない。*A. centrale*はわが国の牛にも常在し、タイレリア感染症とともに放牧牛の貧血性疾患の因子と考えられている。

(3) 馬のエールリッヒア症

① *A. phagocytophilum*感染

馬の*A. phagocytophilum*感染症は以前は*Ehrlichia equi*感染症として知られていたもので、米国の馬で発生がみらる。病原体はヒト顆粒球性エールリッヒアと同一であり、馬でも末梢血中の好中球または好酸球に桑実胚が観察されるため、別名馬顆粒球性エールリッヒア症とよばれる。ベクターは*I. scapularis*および*I. pacificus*である。臨床症状は、発熱(38.4~41.6°C)、元気食欲不振、四肢の浮腫、黄疸、運動失調などであるが、死亡率は低い^(130,91)。臨床病理学的所見としては血小板減少症、白血球減少症、貧血、黄疸が特徴的である⁽⁹⁾。

② *N. risticii*感染症

本病は1979年米国東部ポトマック川流域で最初の馬の症例が認められたため、馬のポトマック熱 (Potomac Horse Fever (PHF)) とよばれている。また、*A. phagocytophilum*が顆粒球に感染するのに対し、本病は桑実胚が単核球に観察されるので、馬単核球性エールリッヒア症ともよばれる。*N. risticii*は他の*Neorickettsia*病原体と同様に、感染吸虫が寄生した淡水性巻貝 (*Juga yrekaensis*) を通じて馬に感染する^(92,113)。したがって本病の発生には、春から秋に川辺で放牧された馬に多発するという疫学的な特徴がある。臨床症状としては発熱 (38.9~41.7°C)、元気食欲の低下、下痢が特徴的である^(63,100)。発熱は通常二峰性であり、元気食欲不振のみみられる数日前に最初の発熱が短期間 (12~18 hr) だけ観察される。その後、再度の発熱、四肢から下腹の皮下浮腫、疝痛、下痢、蹄葉炎、流産などの症状が続く⁽¹⁶³⁾。臨床症状は短くて2~3日、

長ければ2～3週間継続し、抗生物質投与と輸液を中心にした適切な治療が行われなければ死に至ることもある(致死率は7%)⁶³⁾。臨床病理学的所見として初期には白血球減少症、後に白血球増多症が、また血小板減少、血液濃縮などが観察される⁶³⁾。*N. risiticii*は犬と猫に対して実験感染が成立¹¹⁷⁾、自然感染例も報告されている⁷⁷⁾。

(4) 人のエールリッヒア症

1986年米国で、マダニ刺咬後、発熱、頭痛、筋肉痛などを示す患者の白血球内にエールリッヒア様粒子が認められ、また血清中に*E. canis*抗体が検出されたため、*E. canis*の感染症が疑われた⁹³⁾。しかし本例はその後、*E. canis*によるものではなく、新種*E. chaffeensis*を病原とすることが明らかにされた⁹⁾。これを契機にエールリッヒア症は人の新興感染症として注目され、この後*A. phagocytophilum*や*E. ewingii*感染症が発見されるようになった。

① *E. chaffeensis*感染症

*E. chaffeensis*は人の単核球に感染する病原体であり、その人への感染症はヒト単核球性エールリッヒア症と呼ばれる。ベクターである*Amblyomma americanum*の分布にあわせて、主として米国内で患者が報告されている。マダニに刺咬から、5～10日の潜伏期を経て発症する。感染初期はインフルエンザ様の症状を示し、多くの患者は発熱、頭痛、筋肉痛を呈する¹⁰⁵⁾。約半数の患者に悪心、嘔吐、下痢などの消化器症状が、また25%の患者に咳などの呼吸器症状が報告されている。また関節痛や意識混濁などの症状をとまなうこともある。発疹は希だが(6%)、子供感染した場合にはほとんどの症例で観察される¹²²⁾。血液検査ではアミノトランスフェラーゼの増加、高グロブリン血症、血小板、白血球減少、貧血などが認められる。治療しない場合、発熱が長期間続き、腎不全、肝不全、髄膜脳炎、呼吸窮迫症候群、発作、昏睡状態に陥ることがあり、致死率は2～3%とされている¹⁰⁵⁾。血清学的には*E. ewingii*や*A. phagocytophilum*との交差反応が認められるため、米国内で血清学的に*E. chaffeensis*感染症と診断された多数の患者のうち実際は*E. ewingii*感染症または*A. phagocytophilum*感染症であるといわれている¹⁸⁾。

*E. chaffeensis*は人以外にも犬に対する病原性、および保菌動物としての犬および野生の鹿が重要な役割を果たしていることが推測されているが、なお不明な点も多い。犬を用いた実験感染では、臨床症状の発現がみられなかったという報告があるいっぽう³³⁾、犬の自然感染例も報告されている^{15,31)}。

最近、韓国では急性熱性疾患の患者の抗体調査と遺伝子検査の結果から*E. chaffeensis*感染患者の存在が報告されており、またシュルツエマダニ*Ixodes*

*persulcatus*から病原体遺伝子が検出されている^{59,80)}。中国でも*E. chaffeensis*遺伝子がタカサゴキララマダニ*Amblyomma testudinarium*およびイエンチマダニ*Haemaphysalis yeni*から検出された²⁰⁾。わが国では人と動物を含めて*E. chaffeensis*の存在は認められていないが、タカサゴキララマダニもイエンチマダニも常在しているため¹⁴⁵⁾、今後の調査および患者の発生には注意が必要である。

② *A. phagocytophilum*感染症

1993年に米国ミネソタ州およびウイソコンシン州で馬のエールリッヒア症病原体(*E. equi*)と同一因子による感染症が発見され、患者12名と2名の死亡者が報告された⁶⁾。症状はヒト単核球性エールリッヒア症と類似するものの、この病原体は顆粒球内で増殖することから、ヒト顆粒球性エールリッヒア(Human granulocytic ehrlichia (HGE) agent)と呼ばれるようになった。同様の顆粒球性エールリッヒア症は米国だけでなく、欧州からも報告され、こちらの病原体は*E. phagocytophila*とされていた。その後、既述したように*E. equi*、*E. phagocytophila*、HGE agentは遺伝子学的に同一種に再分類され、名称も*A. phagocytophilum*に変更された。

ベクターは米国では*I. scapularis*および*I. pacificus*、また欧州では*I. ricinus*である^{38,121)}。感染初期は単核球性エールリッヒア症と同じく、インフルエンザ様の症状を示すが、悪寒よりも発熱が主であり、頭痛および筋肉痛もみられ、また約3分の1から半分の患者に消化器症状(悪心、嘔吐、下痢)が、また30%の患者に呼吸器症状が報告されている^{1,3)}。17%の患者に意識混濁がみられるが、重度の中樞神経症状はまれである。発疹は希だが(10%未満)、同時にライム病*Borrelia burgdorferi*の感染を伴う場合には遊走性紅斑がみられる¹⁾。血液検査では白血球減少、血小板減少、アミノトランスフェラーゼの増加などが認められる。米国内西部にみられるヒト顆粒球性エールリッヒアは、東部や欧州のものに比べてより重篤な症状を呈することが知られている。米国では患者の半数は入院治療が必要であるが、致死率は1%未満である。真菌、ウイルス感染などの日和見感染症、腎不全、心筋症、髄膜脳炎、急性呼吸不全、ニューロパシー、出血傾向などが併発しやすい。

最近、*A. phagocytophilum*の遺伝子は、中国でシュルツエマダニ*I. persulcatus*から²¹⁾、また韓国でもフタトゲチマダニ*Haemaphysalis longicornis*とシュルツエマダニ*I. persulcatus*から検出された⁸⁰⁾。さらに韓国では*A. phagocytophilum*感染患者も報告されており³⁹⁾、アジアにも本病が分布することが明らかとなってきた。わが国では患者も遺伝子断片も検出されていない。

③ *N. sennetsu*感染症

*N. sennetsu*は宮崎県で最初に発見された腺疫の病原

体である。*N. sennetsu*感染症では、発熱、不快感、食欲不振、背痛、著明なリンパ腺の腫脹が見られ、発熱後半期より異型リンパ球の出現と白血球数の増加がみられる⁹⁹。疫学調査により*N. sennetsu*感染症と魚のボラの関連が推測されていたが、ボラに寄生する吸虫(*Stellantochasmus falcatus*)からは、*N. sennetsu*より*N. risticii*に近縁であるSF agentが分離された¹⁰¹。最近では*N. sennetsu*感染症の発生は報告されていない。

(5) その他のエールリッヒア

以上、紹介したエールリッヒア症のほかに、最近わが国で分離された新規の病原体がいくつかあり、人や家畜に対する病原性は不明である。

① *E. muris*

愛知県で捕獲された野鼠からマウスの脾臓を著しく肥大させる感染性因子が分離され、*E. muris*と命名された^{79,103}。*E. muris*は東京都の山中からも多数分離されたほか、淡路島、北海道からも分離され全国的に分布していると考えられている。また血清疫学調査から、人をはじめ、鹿、猪、熊、猿などの野生動物や犬からも抗体が検出されており、感染の可能性もあるものの、病原体の分離は行われていない⁷⁵。

② *Ehrlichia* detected from *Ixodes ovatus*

福島県で採取されたヤマトマダニ(*Ixodes ovatus*)から、マウスに致死性の感染性因子が分離された。これらの感染性因子は*E. chaffeensis*に近縁の*Ehrlichia*であることが明らかとなり、マウスに対する強い病原性を示す¹²⁰。このためヒト単球性エールリッヒア症(*E. chaffeensis*)の感染病理実験モデルとして用いられている¹²⁰。また、マウスに病原性が弱いか、もしくは症状を示さないが近縁の病原体の遺伝子が西日本から報告されている¹²⁰。

③ その他

近年、分子生物学的手法を応用した疫学調査により、新規のエールリッヒアがわが国にも存在する可能性が示唆されている。北海道のヤマトマダニ(*Ixodes ovatus*)や伊豆七島のドブネズミ(*Rattus norvegicus*)から、*Ehrlichia*と*Anaplasma*の中間に位置する新しい*Anaplasmataceae*遺伝子(IS58およびTK4456)が検出された(Kawahara *et al.* 未発表)。また、全国の犬に寄生したマダニを用いた疫学調査によって、埼玉、静岡、宮崎の各県のチマダニから*E. ewingii*に類似した*Ehrlichia*遺伝子が検出された⁷⁰。これに類似した*Ehrlichia*遺伝子はアフリカ、タイ、チベットの牛のマダニからも検出されている^{107,108,112}。

4. エールリッヒア症の診断法

エールリッヒア症の診断は、流行地においては疫学、病歴、臨床症状、臨床病理学的所見を通じてある程度絞り込みができるが、非流行地ではまず鑑別診断リス

トにエールリッヒア症を挙げられるかどうか正しい診断へのスタートとなる。しかしエールリッヒア症の臨床症状には非特異的なものが多いため、流行地、非流行地のいずれにおいても確定診断には検査室における検査が必要となる。エールリッヒア症の病原体は細胞内寄生であるため、一般細菌に用いられる通常の同定法が適用できない。アナプラズマ科の微生物については、形態学的、血清学的および分子生物学的同定方法が主体となる。以下に、それぞれの検査法の特徴を紹介する。

(1) 血液塗抹

エールリッヒア症の診断法の中で、臨床現場で応用可能なのは形態学的同定法であり、血液細胞中の病原体を検出するために、ギムザ染色、ライト染色またはDiff-Quick染色などのロマノフスキー染色が用いられる⁴⁰。末梢血液細胞内に桑実胚が認められた場合には、エールリッヒア感染の直接的な証明となる(Fig. 2, 3)。しかし各種病原体の実験感染によると、末梢血中に桑実胚が観察される期間は、一般的に急性期の非常に限られた短い時間であり、しかも末梢血に出現する桑実胚は非常に少数であることが明らかとなっている⁴⁰。顆粒球、単球、血小板などに感染する病原体を検出する場合には、全血よりバフィーコートを材料にした塗抹標本を観察することが望ましい。なお、*N. helminthoeca*および*E. ruminantium*感染では末梢血中に桑実胚は出現しない。

(2) 免疫組織化学

免疫組織化学の手法は、末梢血または組織標本中の桑実胚または桑実胚類似の構造物が、真にエールリッヒア病原体かどうかを証明するために適用されている^{5,10,100}。この方法は標的とする病原体の抗原を検出するために、特異抗体を用いる。とくにモノクローナル抗体の利用は免疫組織化学的診断法にとって極めて有利である^{81,100}。

(3) 血清診断

すべてのアナプラズマ科の微生物は脊椎動物に対して液性免疫を誘導するが、このことが血清学的診断法の基礎となっている。一般的な感染症と同様、初感染ではまずIgM抗体価が上昇し、その後IgG抗体価の大きな上昇がみとめられる。したがって初期のIgM抗体価上昇、またはペア血清による抗体価の上昇がエールリッヒア感染の証拠になる¹¹⁰。

エールリッヒア抗体検出のための方法としては免疫蛍光抗体法(Immunofluorescence assay:IFA)が最も一般的に用いられている(Fig. 4)。IFAの感度と特異性は、エールリッヒア症の診断を行うのに十分であり、たとえば*E. canis*は感染後7日でIFAにより検出する

ことができる¹⁴⁰。治療しない場合、*E. canis*感染犬の血清抗体価は、感染後80日でピークとなり、その後薬物療法により病原体が完全に消失しない限り持続する。*E. canis*感染の急性期には、感染後8週間以内に抗体価が5120~10240倍、あるいはそれ以上に急速に上昇する⁵³。低い抗体価が一回だけ認められた場合には、非特異反応の可能性があり、確定診断を下すことはできない⁶⁵。エールリッヒア症の病原体間には共通抗原があり、交差反応が生じることにも注意する必要がある。交差反応は同じ属の病原体同士で強く起こることが確認されている^{16,17,37,115}。エールリッヒア症の血清学的診断に交差反応が影響することはしばしばおこる。たとえば、山口県の犬の4.7%は*E. canis*に対する抗体が陽性であるが、これらは*E. canis*感染によるものではなく、我が国に固有の*Ehrlichia*属病原体である*E. muris*やヤマトマダニから分離された*Ehrlichia*に感染したことによる交差反応であると考えられている⁷¹。

主要なエールリッヒア症、*A. phagocytophilum*、*E. chaffeensis*、*E. canis*については、IFA診断用抗原が市販されているが、国内では輸入により抗原を取り寄せる必要がある。持続感染細胞を維持している研究室に抗体検査を依頼することも可能であるが、抗体価は抗原の調整の仕方により影響されるため、IFAの結果は研究室間でばらつきが起ころう。またIFAの結果の判定には、検査者の主観的な要素が大きく関与するため、同じ研究室内で同一サンプルを別の時期に検査した場合には結果が異なることがありうる点にも留意する必要がある。

ウエスタンブロット法は、共通抗原および種特異的抗原に対する抗体を検出できることがあるので、IFAに比べると特異性が高い検査法である。とくにIFA抗体価が低い場合には、それが交差反応によるものか、特異的なものなのか鑑別するためにウエスタンブロット法が有用となる⁷¹。IFAによりスクリーニングをかけ、次にウエスタンブロット法により確認することによって、エールリッヒア症の血清学的診断法は精度を増す。また、ウエスタンブロット法はエールリッヒア病原体の同一種間の系統差を認識するためにも利用される。これまで*E. chaffeensis*²⁷、*E. canis*⁵⁸、*N. risticii*²³、および*A. phagocytophilum* (HGE)¹⁵⁰の同一種内系統間における抗原変異がウエスタンブロット法によって解析されているが、血清学的な抗原性の解析だけでエールリッヒア症病原体を同定する方法は確立されていない。さらにウエスタンブロット法は特異性に優れているため、エールリッヒア感染症の疫学的研究にも利用されている⁷¹。ウエスタンブロット法の短所としては、SDS-PAGE、膜へのタンパク質の転写、および膜上での抗原抗体反応という複数のステップのため、IFAに比べて検査に時間と手間を要すること、および解析に必要な精製抗原を大量に必要とすることである¹²³。

遺伝子工学を利用して発現された各種主要外膜蛋白の組替え抗原は優れた特異性を示す。近年各種組み換え抗原が開発され、エールリッヒア症の血清診断に応用されているが、とくに*E. canis*に関しては最も研究が進んでおり、すでに製品化されて市販されている抗原がある。*E. canis*組替え30-kDa主要外膜蛋白 (rP30) を用いたドット・イムノブロット法により、犬の血清診断法は格段と進歩した¹⁰⁰。現在米国ではいくつかの*E. canis*診断キットが市販されているが、その中のひとつSanp3DX (IDEXX Laboratories, Inc.)は、rP30アナログを抗原として作成されたものであり、非常に特異性が高いと評価されている⁹¹。そのほかに*E. canis*の組替え主要外膜蛋白抗原としては、rP120¹⁴⁸、rP28⁹⁸、rp43⁹⁷が、また、組換えの桑実胚外膜蛋白抗原としてrMmpA (recombinant Morula membrane protein A)¹³¹などが犬単球性エールリッヒア症の血清診断に応用可能と考えられている。組換え蛋白質を抗原とするELISA法も開発されており、多検体のスクリーニングまたは疫学調査に用いられている^{83,137}。

人のエールリッヒア症病原体の組替え主要外膜蛋白については、*E. chaffeensis*のrP28¹⁰¹、rP30^{134,135}、rP120¹⁴⁷が、また*A. phagocytophilum*のrP44^{67,68,94,129,134}が有力候補として研究されている。さらに牛のエールリッヒア症病原体である*E. ruminantium*および*A. marginale*の組替え主要表面抗原はそれぞれMAP-1 (major antigenic proteins1) およびMSP-5 (major surface protein5) として血清学的診断法に応用されている^{83,137}。

(4) 遺伝子診断

分子生物学の進歩により、近年もっとも発展したのが遺伝子診断法である。エールリッヒア症病原体の遺伝子については、他の細菌と同様16S rRNAの解析が中心で進められてきたが、最近各種遺伝子が活発に解析され、それに伴って遺伝子診断法も増加しつつある。

① ゲノム解析

微生物の全ゲノムはrestriction fragment length polymorphism (RFLP) またはパルスフィールドゲル電気泳動法 (pulsed field gel electrophoresis: PFGE) によって解析される。どちらの方法もエールリッヒア病原体の性状分析には必須であるが、解析のためには手間と時間がかかり、大量の培養材料を必要とするため、これまであまり多くのデータは蓄積されていない。RFLPによる全ゲノムの解析により、*N. risticii*の異なる複数の株の鑑別が試みられたが、各株の制限酵素パターンは類似しており、相違を見つけることはできなかったと報告されている¹²¹。いっぽう、PFGEは微生物のゲノムサイズを決定する優れた解析方法であり、*E. chaffeensis*、*A. phagocytophilum* (HGE)、*N. sennetsu* および*N. risticii*のゲノムサイズが、それぞれ878.5 kb、880.3 kb、1225.8 kb、1262.3 kb and 1494 bpであること

がPFGEによって明らかとされた¹¹⁹⁾。

② Polymerase chain reaction (PCR)

抗体検査と合わせてエールリッヒア症の診断によく利用されるのがPCRである。一般にPCRは感度と特異性に優れており、血液塗抹標本上で観察されなかった材料からも病原体を検出することが可能である³⁹⁾。いっぽうPCRの欠点としては、コンタミンの可能性と偽陽性の出現があげられる。とくに16S rRNAを標的遺伝子とする場合、他のバクテリアの塩基配列との共通部位も多いため偽陽性がみられることがある。しかし現在ではオートシークエンサーの発達により、PCR産物の塩基配列を迅速に解析することが可能であり、これら偽陽性結果の判定が速やかに行われるようになった。PCRと塩基配列を組合わせた方法は診断のみならず、各種疫学的研究にも応用されている^{3,7,26,31,73,96)}。PCRの結果を確認する方法としては、他にハイブリダイゼーションおよびネステッドPCRが応用されている。ネステッドPCRでは1段階目のサンプルの希釈の際、コンタミンのリスクが非常に高くなるが、one tube nested PCRなど、リスクを減らす方法も開発されている^{15,53)}。また、最近ではReal-time PCRにより定量的PCRも可能である^{59,61,80,89,112,114)}。

標的となる遺伝子は16S rRNA遺伝子が中心であったが、近年次々と新しい遺伝子配列が決定されており、PCR診断に応用されている。ひとつの遺伝子だけでなく、複数の遺伝子配列に基づく複数のPCRを実施することで、診断の精度が高まり、またPCR産物の塩基配列を解析することで、検出された病原体の系統学的位置づけが明らかとなる。以下にエールリッヒア症のPCR診断に利用される遺伝子について簡単に紹介する。

a) 16S rRNA

16S rRNA遺伝子は最もよく解析されている遺伝子であり、ほとんどすべての分離株について塩基配列が決定されている。またエールリッヒア以外の微生物についてもデータの蓄積が最も多い。5'側に近いところに、divergent regionとよばれる変異の大きい部分があり、種による塩基配列の違いを最も大きく反映している。16S rRNA遺伝子に基づく種特異的、または属特異的PCRは診断あるいは疫学調査にもっとも広く利用されている^{26,73,75,107,108,142)}。

b) 熱ショック蛋白遺伝子

(Heat shock protein gene : *groEL*)

*GroEL*の塩基配列も、多くのエールリッヒア症病原体について決定されており、種特異的PCRが人の*E. chaffeensis*および*A. phagocytophilum*の診断に応用されている¹²⁷⁾。*GroEL*塩基配列は、16s rRNA遺伝子配列に比べて変異が大きいので、同一種間における株の相違の解析に用いることも可能である³⁹⁾。

c) クエン酸合成酵素 (Citrate synthase : *gltA*)

GltA はリケッチア属の診断と疫学調査には不可欠

の遺伝子であり、系統学的分類にも有用とされている¹¹⁸⁾。近年、大部分のエールリッヒア症病原体の*gltA*が決定され、種間の変異の大きさは16S rRNA遺伝子および*GroEL*よりも大きいことが明らかになった⁷¹⁾。*GltA*の塩基配列に基づいた種特異的PCRおよびその塩基配列の解析は、診断および新種の系統分類学的研究にも利用されている^{108,120)}。

d) *epank1*

epank1 遺伝子は*A. phagocytophilum*の分子量153-kDaの蛋白質をコードする遺伝子である。*epank1*プライマーは16S rRNA遺伝子に基づくものより高感度であると報告されている¹³⁹⁾。また*epank1* 遺伝子塩基配列は*A. phagocytophilum*の株間によっても変異している。*epank1*に基づいて設計されたPCRにより増幅されたカリフォルニアの*A. phagocytophilum*株の444bpのPCR産物の塩基配列 (*E. equi*およびHGE) は、米国東部のものとは異なる塩基配列を示した²¹⁾。

e) *NadA*

ニコチンアミドジヌクレオチド (Nicotinamide adenine dinucleotide : NAD) は、多くの酸化還元反応に関係する補助因子であり、細胞代謝の中心的役割を果たす。*nadA* 遺伝子はこのNAD合成に関わる遺伝子であり、これまで*E. chaffeensis*、*E. canis*および*E. muris*について塩基配列が決定された¹⁴⁹⁾。塩基配列の種間変異は比較的大きく、*E. chaffeensis*の診断に用いられている²³⁾。

f) *p120* : 120kDa 外膜蛋白遺伝子

*E. chaffeensis*の120-kDa外膜蛋白遺伝子がクローニングされ¹¹⁷⁾、*E. chaffeensis*の診断および同一種の株間の変異の解析に応用されている²²⁾。

g) *p28* : 28kDa外膜蛋白遺伝子

*Ehrlichia*属病原体の外膜蛋白P28の遺伝子はクロモゾーム上に22個の遺伝子群が直列に配列しており、各群の遺伝子配列は比較的保存されたファミリー遺伝子群を形成している¹²¹⁾。このため28kDa外膜蛋白遺伝子を標的にしたPCRは他の遺伝子を標的にしたPCRに比べて感度が高く、診断上有用であるとされている⁵³⁾。

h) *Msp2* (*p44*, *HGE44*)

*A. phagocytophilum*主要外膜蛋白をコードする遺伝子である。上述の*Ehrlichia*属P28と同様、ファミリー遺伝子群を形成している^{67,95)}。

(5) 病原体の分離

病原体の分離は最も確実な診断法であり、「gold standard」と呼ばれているが、時間と手間がかかり、技術的にも容易でなく、必ずしも成功するものではないので、実際的な検査としては用いられない。しかし、いったん病原体が分離されれば、抗体検出のための抗原供給、生物学的および分子生物学的性状の解析など応用範囲は非常に広いので、病原体の分離を試みる意

義は大きい¹¹⁰⁾。エールリッヒア病原体の分離には細胞培養等の設備と技術が必要となるため、国内ではごく限られた施設でしか実施されていない。このため臨床獣医師がエールリッヒア病原体の分離を試みる際には、材料を採取後できるだけ早期に分離施設に送付する必要がある。通常は、採取した組織または末梢血(EDTA またはヘパリン処理)を室温または冷蔵して輸送する³¹⁾。患者の組織または末梢血からエールリッヒア病原体を分離する方法には *in vivo*, *ex-vivo* および *in vitro* 培養法の3種類がある。

① *in vivo* 培養法: *in vivo* 培養法は、感受性の動物を用いて分離する方法である。感染材料を接種するための実験動物が必要となる。たとえば、最近日本のヤマトマダニから分離されたエールリッヒアの場合には、マダニすりつぶし材料をマウス腹腔内に接種することにより病原体が効率よく分離された¹²¹⁾。犬のエールリッヒア症病原体である *E. canis* および *A. platys* の分離を行う場合には、患者血液材料等を非感染犬に接種する(文献)。ヒトの単球性エールリッヒア症病原体 *E. chaffeensis* の場合は、犬および鹿に感受性がある^{33,35)}。

② *ex vivo* 培養法: 末梢血単核球、好中球、血管内皮細胞などの哺乳動物由来初代培養細胞を用いて分離する方法である。たとえば *E. canis*, *N. risticii*, *N. sennetsu* および *N. helminthoeca* の分離には犬末梢血単核球が用いられる^{31,61)}。検査対象材料が到着する数日前までには哺乳動物由来初代培養細胞を準備しておく必要がある。また初代培養細胞の増殖無制限ではないという短所があるものの、この方法の分離成績は次に述べる樹立細胞を用いる方法よりも安定している。

③ *in vitro* 培養法: 持続感染性培養細胞を樹立することにより、抗原およびDNAを安定して供給することが可能となる。エールリッヒア症の病原体は種毎に、それぞれ単核球、顆粒球、血小板、赤血球および血管内皮細胞に感染する。*E. canis* や *N. risticii* のような単球性エールリッヒアを分離するために、いくつかの持続感染細胞が用いられているが、もっともよく用いられるのは犬の単球由来細胞DH82である(Fig. 5)^{32,34,62)}。いっぽうヒト前骨髄芽球細胞HL60は、ヒト顆粒球性

エールリッヒア *A. phagocytophilum* (HGE) の分離に用いられた⁵⁰⁾。牛内皮細胞E5は *E. ruminantium* の培養に利用できる唯一の哺乳動物由来細胞である¹¹⁾。*A. marginale* を *in vitro* で培養するために過去にいろいろな細胞が用いられたが、安定して *A. marginale* を増殖させることはできなかった。近年、マダニ由来の樹立細胞、IDE8およびISE6がエールリッヒア病原体の分離に利用されはじめ、よい成績が報告されている。*E. canis* や *A. phagocytophilum* のほかにも、*E. ruminantium* および *A. marginale* がマダニ細胞を用いて分離されている^{10,101,102)}。Table 2に *in vitro* 培養法に用いられる細胞をまとめる。

Table 2 エールリッヒア症病原体の *in vitro* 分離法に用いられる細胞

(1) <i>Ehrlichia</i>	
<i>E. canis</i>	DH82, Human dog hybrid (MPC-SV 40), Mouse-dog hybrid (MDH-SP) CDC/EU.HMEC-1, IDE8, J774.A1
<i>E. chaffeensis</i>	DH82, CDC/EU.HMEC-1, Vero, HeLa 229, HEL299
<i>E. muris</i>	DH82
<i>E. ewingii</i>	None
<i>E. ruminantium</i>	E5 (bovine endothelial cells), IDE8
(2) <i>Anaplasma</i>	
<i>A. phagocytophilum</i>	HL60, DH82, ISE6, IDE8
<i>A. marginale</i>	IDE8
<i>A. platys</i>	None
(3) <i>Neorickettsia</i>	
<i>N. helminthoeca</i>	DH82
<i>N. risticii</i>	DH82, P388D1, T84, U-937, MDH
<i>N. sennetsu</i>	P388D1, L929, FL, HeLa, Raw264
SF agent	DH82, RK-13

5. おわりに

エールリッヒア症は、いったん診断さえつけば、その治療に用いられる薬物はテトラサイクリン系抗生物質の投与が主体であり、慢性化しなければ比較的予後は良好であることが多い。このため本病については、いかに迅速に正しい診断を行うかが臨床上的重要なポイントとなる。本稿で紹介した診断法の多くはわが国ではまだ広く普及しているものではなく、臨床症状や疫学的状況から獣医師がエールリッヒア症を疑った場合に、確定診断のための検査体制が整っているとは現時点では言いがたい。今後、他の感染症と併せて国内の診断体制を整備することは人と動物の新興、再興感染症対策の大きな課題と思われる。

謝辞: 本論文に掲載した研究の一部は学術振興会科学研究費(基盤研究B「小動物領域における新興マダニ媒介性リケッチアの疫学および病原性に関する研究」No. 14360190)により行われた。

文 献

- 1) Aguero-Rosenfeld, M. E., Horowitz, H. W., Wormser, G. P., McKenna, D. F., Nowakowski, J., Munoz, J. and Dumler, J. S. Human granulocytic ehrlichiosis : a case series from a medical center in New York State. *Ann. Intern. Med.*, 125 : 904~908, 1996.
- 2) Alleman, A. R., McSherry, L. J., Barbet, A. F., Breitschwerdt, E. B., Sorenson, H. L., Bowie, M. V. and Belanger, M. Recombinant major antigenic protein 2 of *Ehrlichia canis*: a potential diagnostic tool. *J. Clin. Microbiol.* 39 : 2494~2499, 2001.
- 3) Anderson, B. E., Dawson, J. E., Jones, D. C. and Wilson, K. H. *Ehrlichia chaffeensis*, a new species associated with human ehrlichiosis. *J. Clin. Microbiol.* 29 : 2838~2842, 1991.
- 4) Artursson, K., Gunnarsson, A., Wikstrom, U-B. and Engvall, E. O. A serological and clinical follow-up in horses with confirmed equine granulocytic ehrlichiosis. *Equine Vet. J.* 31 : 473~477, 1999.
- 5) Bakken, J. S. and Dumler, J. S. Human granulocytic ehrlichiosis. *Clin. Infect. Dis.* 31 : 554~560, 2000.
- 6) Bakken, J. S., Dumler, J. S., Chen, S. M., Eckman, M. R., Van Etta, L. L., Walker, D. H. Human granulocytic ehrlichiosis in the upper Midwest united States: a new species emerging ? *J. Am. Med. Assoc.* 272 : 212~218, 1994.
- 7) Barlough, J. E., Rikihisa, Y. and Madigan, J. E. Nested polymerase chain reaction for detection of *Ehrlichia risticii* genomic DNA in infected horse. *Vet. Parasitol.* 68 : 367~373, 1997.
- 8) Beauvils, J-P., Inokuma, H., Brouqui, P., Martin-Granel, J., Jumelle, Ph. and Barbault- Jumelle, M. *Anaplasma platys* (*Ehrlichia platys*) infection in a dog in France: Description of the case, and characterization of the agent. *Revue Med. Vet.* 153 : 85~90, 2002.
- 9) Belanger, M., Sorenson, H. L., France, M. K., Bowie, M. V., Barbet, A. F., Breitschwerdt, E. B. and Alleman, A. R. Comparison of serological detection methods for diagnosis of *Ehrlichia canis* infections in dogs. *J. Clin. Microbiol.* 40 : 3506~3508, 2002
- 10) Bell-Sakyi, L., Paxton, E. A., Munderloh, U. G. and Sumption, K. J. Growth of *Cowdria ruminantium*, the causative agent of heartwater, in a tick cell line. *J. Clin. Microbiol.* 38 : 1238~1240, 2000.
- 11) Bezuidenhout, J. D., Paterson, C. L. and Barbard, B. J. H. *In vitro* cultivation of *Cowdria ruminantium*. *Onderstepoort J. Vet. Res.* 51 : 113~120, 1985.
- 12) Bordenstein, S. R., O'Hara, F. P. and Werren, J. H. *Wolbachia*-induced incompatibility precedes other hybrid incompatibilities in *Nasonia*. *Nature* 409 : 707~710, 2001.
- 13) Bourtzis, K., Nirgianaki, A., Markakis, G. and Savakis, C. *Wolbachia* infection and cytoplasmic incompatibility in *Drosophila* species. *Genetics.* 144 : 1063~1073, 1996.
- 14) Breitschwerdt, E. B. The rickettsioses. *Small Animal Internal Medicine* 4thed. Saunders, Philadelphia, U. S. A. 376~383, 1994.
- 15) Breitschwerdt, E. B., Hegarty, B. C. and Hancock, S. I. Sequential evaluation of dogs naturally infected with *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia chaffeensis*, *Ehrlichia equi*, *Ehrlichia ewingii*, or *Bartonella vinsonii*. *J. Clin. Microbiol.* 36 : 2645~2651, 1998.
- 16) Brouqui, P., Dumler, J. S., Raoult, D. and Walker, D. H. Antigenic characterization of Ehrlichiae; protein immunoblotting of *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia sennetsu*, and *Ehrlichia risticii*. *J. Clin. Microbiol.* 30 : 1062~1066, 1992.
- 17) Brouqui, P., Lecam, C., Olson, J. and Raoult, D. Serological diagnosis of human monocytic ehrlichiosis by immunoblot analysis. *Clin. Diag. Lab. Immunol.* 1 : 645~649, 1994.
- 18) Buller, R. S., Arens, M., Hmiel, S. P., Paddock, C. D., Sumner, J. W., Rikihisa, Y., Unver, A., Gaudreault-Keener, M., Manian, F. A., Liddell, A. M., Schmulewitz, N. and Storch, G. A. *Ehrlichia ewingii*, a newly recognized agent of human ehrlichiosis. *N. Eng. J. Med.* 341 : 148~155, 1999.
- 19) Burghen, G. A., Beisel, W. R., Walker, J. S., Nims, R. M., Huxsoll, D. L. and Hildebrandt, P. K. Development of hypergammaglobulinemia in tropical canine pancytopenia. *Am. J. Vet. Res.* 32 : 749~756, 1971.
- 20) Cao, W. C., Gao, Y. M., Zhang, P. H., Zhang, X. T., Dai, Q. H., Dumler, J. S., Fang, L. Q. and Yang, H. Identification of *Ehrlichia chaffeensis* by nested PCR in ticks from Southern China. *J. Clin.*

- Microbiol.* 38 : 2778~2780, 2000.
- 21) Cao, W. C., Zhao, Q. M., Zhang, P. H., Yang, H., Wu, X. M., Wen, B. H., Zhang, X. T. and Habbema, J. D. Prevalence of *Anaplasma phagocytophila* and *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes persulcatus* ticks from northeastern China. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 68 : 547~550, 2003.
 - 22) Carpenter, C. F., Gandhi, T. K., Kong, L. K., Corey, G. R., Chen, S. M., Walker, D. H., Dumler, J. S., Breitschwerdt, E., Hegarty, B. and Sexton, D. J. The incidence of ehrlichial and rickettsial infection in patients with unexplained fever and recent history of tick bite in central North Carolina. *J. Infect Dis.* 180 : 900~903, 1999.
 - 23) Carrillo, J. M., and Green, R. A. A case report of canine ehrlichiosis : neutrophilic strain. *J. Am. Ani. Hosp. Assoc.* 14 : 100~104, 1978.
 - 24) Chae, J-S, Foley, J. E., Dumler, J. S. and Madigan, J. E. Comparison of the nucleotide sequence of 16S rRNA, 444 *Ep-ank*, and *groESL* heat shock operon genes in naturally occurring *Ehrlichia equi* and human granulocytic ehrlichiosis agent isolates from Northern California. *J. Clin. Microbiol.* 38 : 1364~1369, 2000.
 - 25) Chaichanasiriwithaya, W., Rikihisa, Y., Yamamoto, S., Reed, S., Crawford, T. B., Perryman, L. E. and Palmer, G. H. Antigenic, morphologic, and molecular characterization of new *Ehrlichia risticii* isolates. *J. Clin. Microbiol.* 32 : 3026~3033, 1994.
 - 26) Chen, S-M., Dumler, J. S., Bakken, J. S. and Walker, D. H. Identification of a granulocytotropic *Ehrlichia* species as the etiologic agent of human disease. *J. Clin. Microbiol.* 32 : 589~595, 1994.
 - 27) Chen, S-M., Yu, X-J., Popov, V. L., Westerman, E. L., Hamilton, F. G. and Walker, D. H. Genetic and antigenic diversity of *Ehrlichia chaffeensis* : comparative analysis of a novel human strain from Oklahoma and previously isolated strains. *J. Infect. Dis.* 175 : 856~863, 1997.
 - 28) Cordy, D. R. and Gorham, J. R. The pathology and etiology of salmon poisoning disease in dogs and fox. *Am. J. Pathol.* 26 : 617~637, 1950.
 - 29) Cowell, R. L., Tyler, R. D., Clinkenbeard, K. D. and Meinkoth, J. H. Ehrlichiosis and polyarthritis in three dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 192 : 1093~1095, 1988.
 - 30) Cranwell, M. P. and Gibbons, J. A. Tick-borne fever in a dairy herd. *Vet. Rec.* 119 : 531~532, 1986.
 - 31) Dawson, J. E., Biggie, K. L., Warner, C. K., Cookson, K., Jenkins, S., Levine, J. F. and Olson, J. G. Polymerase chain reaction evidence of *Ehrlichia chaffeensis*, an etiological agent of human ehrlichiosis, in dogs from southeast Virginia. *Am. J. Vet. Res.* 57 : 1175~1179, 1996.
 - 32) Dawson, J. E., Candal, F. J., George, V. G. and Ades, E. W. Human endothelial cells as an alternative to DH 82 cells for isolation of *Ehrlichia chaffeensis*, *E. canis*, and *Rickettsia rickettsii*. *Pathobiology.* 61 : 293~296, 1993.
 - 33) Dawson, J. E. and Ewing, S. A. Susceptibility of dogs to infection with *Ehrlichia chaffeensis*, causative agent of human ehrlichiosis. *Am. J. Vet. Res.* 53 : 1322~1327, 1992.
 - 34) Dawson, J. E., Rikihisa, Y., Ewing, S. and Fishbein, D. B. Serologic diagnosis of human ehrlichiosis using two *Ehrlichia canis* isolates. *J. Infect. Dis.* 163 : 564~567, 1991.
 - 35) Dawson, J. E., Stallknecht, D. E., Howerth, E. W., Warner, C., Biggie, K., Davidson, W. R., Lockhart, J. M., Nettles, V. F., Olson, J. G. and Childs, J. E. Susceptibility of white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) to infection with *Ehrlichia chaffeensis*, the etiologic agent of human ehrlichiosis. *J. Clin. Microbiol.* 32 : 2725~2728, 1994.
 - 36) Donatien, A. and Lestoquard, A. Existence en Algérie d'une rickettsia du chien. *Bull. Soc. Pathol. Exot.* 28 : 418~419, 1935.
 - 37) Dumler, J. S., Asanovich, K. M., Bakken, J. S., Richter, P., Kimsey, R. and Madigan, J. E. Serological cross-reactions among *Ehrlichia equi*, *Ehrlichia phagocytophila*, and human granulocytic ehrlichia. *J. Clin. Microbiol.* 33 : 1098~1103, 1995.
 - 38) Dumler, J. E. and Bakken, J. S. Ehrlichial diseases of humans : Emerging tick-borne infection. *Clin. Infect. Dis.* 20 : 1102~1110, 1995.
 - 39) Dumler, J. S., Barbet, A. F., Bekker, C. P., Dasch, G. A., Palmer, G. H., Ray, S. C., Rikihisa, Y. and Rurangirwa, F. R. Reorganization of genera in the families *Rickettsiaceae* and *Anaplasmataceae* in the order *Rickettsiales* : unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and

- Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and 'HGE agent' as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51 : 2145~2165, 2001
- 40) Dumler, J. S., Dawson, J. E. and Walker, D. H. Human ehrlichiosis : hematopathology and immunohistologic detection of *Ehrlichia chaffeensis*. *Hum. Pathol.* 24 : 391~396, 1993.
 - 41) Dutta, S. K., Myrup, A. C., Rice, R. M., Robi, M. G. and Hammond, R. C. Experimental reproduction of Potomac horse fever in horses with a newly isolated *Ehrlichia* organism. *J. Clin. Microbiol.* 22 : 256~269, 1985.
 - 42) Dutta, S. K., Shankarappa, B., Thaker, S. R. and Mattingly-Napier, B. L. DNA restriction endonuclease cleavage pattern and protein antigen profile of *Ehrlichia risticii*. *Vet. Microbiol.* 25 : 29~38, 1990.
 - 43) Ewing, S. A., Dawson, J. E., Kocan, A. A., Barker, R. W., Warner, C. K., Pancierra, R. J., Fox, J. C. Kocan, K. M. and Blouin, E. F. Experimental transmission of *Ehrlichia chaffeensis* (*Rickettsiales* : *Ehrlichiae*) among white-tailed deer by *Amblyomma americanum* (Acari : Ixodidae). *J. Med. Entomol.* 32 : 368~374, 1995.
 - 44) Ewing, S. A., Dawson, J. E., Panciera, R. J., Mathew, J. S., Pratt, K. W., Katavolos, P. and Telford, III S. R. Dogs infected with a human granulocytic *Ehrlichia* spp. *J. Med. Entomol.* 34 : 710~718, 1997.
 - 45) Frank, J. R., and Breitschwerdt, E. B. A retrospective study of ehrlichiosis in 62 dogs from North Carolina and Virginia. *J. Vet. Intern. Med.* 13 : 194~201, 1999.
 - 46) French, T. W., and Harvey, J. W. Canine infectious cyclic thrombocytopenia (*Ehrlichia platys* infection in dogs). *Rickettsia and Chlamydia Diseases of Domestic Animals*. Pergamon Press, Oxford, U. K. 195~208, 1993.
 - 47) Fukuda, T., Sasahara, T. and Kitao, T. Studies on the causative agent of "Hyuganetsu disease" XI. Characterization of rickettsia-like organism isolated from metacercaria of *Stellantchasmus falcatus* parasitic in gray mullet. *J. Jpn. Assoc. Infect. Dis.* 47 : 474~482, 1973.
 - 48) Goldman, E. E., Breitschwerdt, E. B., Grindem, C. B., Hrgarty, B. C., Walls, J. J. and Dumler, J. S. Granulocytic ehrlichiosis in dogs from North Carolina and Virginia. *J. Vet. Intern. Med.* 12 : 61~70, 1998.
 - 49) Goodman, R. A., Hawkins, E. C., Olby, N. J., Grindem, C. B., Hegarty, B. and Breitschwerdt, E. B. Molecular identification of *Ehrlichia ewingii* infection in dogs 15 cases (1997~2001). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 222 : 1102~1107, 2003.
 - 50) Goodman, J. L., Nelson, B., Vitale, B., Madigan, J. E., Dumler, J. S., Kurtti, T. J. and Munderloh, U. G. Direct cultivation of the causative agent of human granulocytic ehrlichiosis. *N. Engl. J. Med.* 334 : 209~215, 1996.
 - 51) Gorham, J. R. and Foreyt, W. J. Salmon poisoning diseases : *Clinical microbiology and infectious diseases of dog and cat*. W. B. Saunders Co., Philadelphia. U. S. A. 5, 1984.
 - 52) Gregson, J. D. Electrical observations of tick feeding in relation to disease transmission. Proceedings of the 2nd International Congress of Acarology. Akademiai Kiado, Budapest. 329~339, 1969.
 - 53) Gusa, A. A., Buller, R. S., Storch, G. A., Huycke, M. M., Machado, L. J., Slater, L. N., Stockham, S. L. and Massung, R. F. Identification of a p28 gene in *Ehrlichia ewingii* : evaluation of gene for use as a target for a species-specific PCR diagnostic assay. *J. Clin. Microbiol.* 39 : 3871~3876, 2001.
 - 54) Harrus, S., Kass, P. H., Klement, E. and Waner, T. Canine monocytic ehrlichiosis : a retrospective study of 100 cases, and an epidemiological investigation of prognostic indicators for the disease. *Vet. Rec.* 141 : 360~363, 1997.
 - 55) Harrus, S., Waner, T. and Bark, H. Canine monocytic ehrlichiosis-an update. *Comp. Cont. Ed. Prac. Vet.* 19 : 431~444, 1997.
 - 56) Harrus, S., Waner, T., Bark, H., Jongejan, F. and Cornelissen, A. W. C. A. Recent advances in determining the pathogenesis of canine monocytic ehrlichiosis. *J. Clin. Microbiol.* 37 : 2745~2749, 1999.
 - 57) Harvey, J. W., Simpson, C. F. and Gaskin, J. M. Cyclic thrombocytopenia induced by a *Rickettsia*-like agent in dogs. *J. Infect. Dis.* 137 : 182~188, 1978.

- 58) Hegarty, B. C., Levy, M. G., Gager, R. F. and Breitschwerdt, E. B. Immunoblot analysis of the immunoglobulin G response to *Ehrlichia canis* in dogs : an international survey. *J. Vet. Diagn. Invest.* 9 : 32~38, 1997.
- 59) Heo, E. J., Park, J. H., Koo, J. R., Park, M. S., Park, M. Y., Dumler, J. S and Chae, J-S. Serologic and molecular detection of *Ehrlichia chaffeensis* and *Anaplasma phagocytophila* (human granulocytic ehrlichiosis agent) in Korean patients. *J. Clin. Microbiol.* 40 : 3082~3085, 2002.
- 60) Hibler, S. C., Hoskins, J. D. and Greene, C. E. Rickettsial infection in dogs Part II. Ehrlichiosis and infectious cyclic thrombocytopenia. *Continuing Education* 8 : 106~114, 1986.
- 61) Hodzic, E., Feng, S., Fish, D., Leutenegger, C. M. Freet, K. J. and Barthold, S. W. Infection of mice with the agent of human granulocytic ehrlichiosis after different routes of inoculation. *J. Infect. Dis.* 183 : 1781~1786, 2001.
- 62) Holland, C. J. and Ristic, M. Development of a cell line for continuous in vitro propagation of *Ehrlichia canis*. Program and Abstracts of the IVth International Symposium on Rickettsiae and Rickettsial Diseases. Piestany Spa. Czech and Slovak federal Republics. 89, 1990.
- 63) Holland, C. J. and Ristic, M. Equine monocytic ehrlichiosis (Syn., Potomac horse fever) : *Rickettsia and Chlamydia Diseases of Domestic Animals*. Pergamon Press, Oxford, U. K. 215~232, 1993.
- 64) Holland, C. J., Ristic, M., Huxsoll, D. L., Cole, A. I. and Rapmund, G. Adaptation of *Ehrlichia sennetsu* to canine blood monocytes : preliminary structural and serological studies with cell culture-derived *Ehrlichia sennetsu*. *Infect. Immun.* 48 : 366~371, 1985.
- 65) Hoskins, J. D. Ehrlichial diseases of dogs : Diagnosis and treatment. *Canine Pract.* 16 : 13 21, 1991.
- 66) Hoskins, J. D., Barta, O. and Rothschild, J. Serum hyperviscosity syndrome associated with *Ehrlichia canis* infection in a dog. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 183 : 1011~1012, 1983.
- 67) Ijdo, J. W., Sun, W., Zhang, Y., Magnarelli, L. A. and Fikrig, E. Cloning of the gene encoding the 44-kilodalton antigen of the agent of human granulocytic ehrlichiosis and characterization of the humoral response. *Infect. Immun.* 66 : 3264~3269, 1998.
- 68) Ijdo, J. W., Wu, C., Magnarelli, L. A. and Fikrig, E. Serodiagnosis of human granulocytic ehrlichiosis by a recombinant HGE-44-based enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Clin. Microbiol.* 37 : 3540~3544, 1999.
- 69) Inokuma, H., Beppu, T., Okuda, M., Shimada, Y. and Sakata, Y. Epidemiological survey of *Anaplasma platys* and *Ehrlichia canis* using ticks collected from dogs in Japan. *Vet. Parasitol.* 115 : 343~348, 2003.
- 70) Inokuma, H., Beppu, T., Okuda, M., Shimada, Y. and Sakata, Y. Detection of ehrlichial DNA in *Haemaphysalis* ticks recovered from dogs in Japan that is closely related to a novel *Ehrlichia* sp. found in cattle ticks from Tibet, Thailand, and Africa. *J. Clin. Microbiol.* 42 : 1353~1355, 2004.
- 71) Inokuma, H., Brouqui, P., Drancourt, M. and Raoult, D. Citrate synthase gene sequence : a new tool for phylogenetic analysis and identification of ehrlichia. *J. Clin. Microbiol.* 39 : 3031~3039, 2001.
- 72) Inokuma, H., Fujii, K., Matsumoto, K., Okuda, M., Nakagome, K., Kosugi, R., Hirakawa, M. and Onishi, T. Demonstration of *Anaplasma (Ehrlichia) platys* inclusion in peripheral blood platelets of a dog in Japan. *Vet. Parasitol.* 110 : 145~152, 2002.
- 73) Inokuma H, Ohno K, Onishi T, Raoult D and Brouqui P. Detection of ehrlichial infection by PCR in dogs from Yamaguchi and Okinawa Prefectures, Japan. *J. Vet. Med. Sci.* 63 : 815~817, 2001.
- 74) Inokuma H, Ohno K and Yamamoto S. Serosurvey of *Ehrlichia canis* and *Hepatozoon canis* infection in dogs in Yamaguchi Prefecture, Japan. *J. Vet. Med. Sci.* 61 : 1153~1155, 1999.
- 75) Inokuma, H., Raoult, D. and Brouqui, P. Detection of *Ehrlichia platys* DNA in brown dog ticks (*Rhipicephalus sanguineus*) in Okinawa Island, Japan. *J. Clin. Microbiol.* 38 : 4219~4221, 2000.
- 76) Johansson, K. E., Pettersson, B., Uhlen, M., Gunnarsson, A, Malmqvist, M. and Olsson, E. Identification of the causative agent of granulocytic ehrlichiosis in Swedish dogs and horses by direct solid phase sequencing of PCR products from the 16S rRNA gene. *Res. Vet. Sci.* 58 : 109~112, 1995.
- 77) Kakoma, I., Hansen, R. D., Anderson, B. E., Hanley, T. A., Sims, K. G., Liu, L., Bellamy, C., Long, M. T. and Baek, B. K. Culture, molecular, and immunological characterization of the etiological agent for atypical canine ehrlichiosis. *J. Clin. Microbiol.* 32 : 170~175, 1994.

- 78) Kawahara, M., Ito, T., Suto, C., Shibata, S., Rikihisa, Y., Hata, K. and Hirai, K. Comparison of *Ehrlichia muris* strains isolated from wild mice and ticks and serologic survey of humans and animals with *E. muris* as antigen. *J. Clin. Microbiol.* 37: 1123~1129, 1999.
- 79) Kawahara M., Suto C., Rikihisa Y., Yamamoto S. and Tsuboi, Y., Characterization of ehrlichial organisms isolated from a wild mouse, *J. Clin. Microbiol.* 31: 89~96, 1993.
- 80) Kim, C. M., Kim, M. S., Park, M. S., Park, J. H and Chae, J-S. Identification of *Ehrlichia chaffeensis*, *Anaplasma phagocytophilum*, and *A. bovis* in *Haemaphysalis longicornis* and *Ixodes persulcatus* Ticks from Korea. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 3 : 17~26, 2003.
- 81) Kim H-Y and Rikihisa Y. Characterization of monoclonal antibodies to the 44-kilodalton major outer membrane protein of the human granulocytic ehrlichia agent. *J. Clin. Microbiol.* 36 : 3278~3284, 1998.
- 82) Knowles, T. T., Alleman, A. R., Sorenson, H. L., Marciano, D. C., Breitschwerdt, E. B., Harrus, S., Barbet, A. F. and Belanger, M. Characterization of the major antigenic protein 2 of *Ehrlichia canis* and *Ehrlichia chaffeensis* and its application for serodiagnosis of ehrlichiosis. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 10 : 520~524, 2003.
- 83) Knowles, D., Torioni de Echaide, S., Palmer, G., McGuire, T., Stiller, D. and McElwain, T. Antibody against *Anaplasma marginale* MSP5 epitope common to tick and erythrocyte stages identifies persistently infected cattle. *J. Clin. Microbiol.* 34 : 2225~2230, 1996.
- 84) Kontos, V. I., Papadopoulos, O. and French, T. W. Natural and experimental canine infections with a Greek strain of *Ehrlichia platys*. *Vet. Clin. Pathol.* 20 : 101~105, 1991.
- 85) Kordick S. K., Breitschwerdt, E. B., Hegarty, B. C., Southwick, K. L., Colitz, C. M., Hancock, S. I., Bradley, J. M., Rumbough, R., McPherson, J. T. and MacCormack, J. N. Coinfection with multiple tick-borne pathogens in a Walker Hound kennel in North Carolina. *J. Clin. Microbiol.* 37 : 2631~2638, 1999.
- 86) Kuehn, N. F., and Gaunt, S. D. Clinical and hematologic findings in canine ehrlichiosis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 186 : 355~358, 1985.
- 87) Lewis, G. E., Huxell, D. L., Ristic, M. and Johnson, A. J. Experimentally induced infection of dogs, cats, and nonhuman primates with *Ehrlichia equi*, etiological agent of equine ehrlichiosis. *Am. J. Vet. Res.* 36: 85~88, 1975.
- 88) Lilliehook, I., Egenvall, A. and Tvedten, H. W. Hematopathology in dogs experimentally infected with a swedish granulocytic ehrlichia species. *Vet. Clin. Pathol.* 27 : 116~122, 1998.
- 89) Loftis, A. D., Massung, R. F. and Levin, M. L. Quantitative real-time PCR assay for detection of *Ehrlichia chaffeensis*. *J. Clin. Microbiol.* 41 : 3870~3872, 2003.
- 90) Madigan, J. E.. Equine Ehrlichiosis. *Rickettsial and Chlamydial Diseases of Domestic Animals*. Pergamon Press, Oxford, U. K. 209~214, 1993
- 91) Madigan, J. E. and Gribble, D. Equine ehrlichiosis in northern California : 49 cases (1968-1981). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 190 : 445~448, 1987.
- 92) Madigan, J. E., Pusterla, N., Johnson, E., Chae, J-S., Pusterla, J. B., Derock, E. and Lawler, S. P. Transmission of *Ehrlichia risticii*, the agent of Potomac horse fever, using naturally infected aquatic insects and helminth vectors : preliminary report. *Equine Vet. J.* 32 : 275~279, 2000.
- 93) Maeda, K., Markowitz, N., Hawley, R. C., Ristic, M., Cox, D. and McDade, J. E. Human infection with *Ehrlichia canis*, a leukocytic rickettsia. *N. Engl. J. Med.* 316 : 853~856, 1987.
- 94) Magnarelli, L., Ijdo, J., Wu, C. and Fikrig, E. Recombinant protein-44-based class-specific enzyme-linked immunosorbent assays for serologic diagnosis of human granulocytic ehrlichiosis. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 20 : 482~485, 2001.
- 95) Massung, R. F. And Slater, K. G. Comparison of PCR assays for detection of the agent of human granulocytic ehrlichiosis, *Anaplasma phagocytophilum*. *J. Clin. Microbiol.* 41 : 717~722, 2003.
- 96) Massung, R. F., Slater, K., Owens, H., Nichilson, W. L., Mather, T. N., Solberg, V. B. and Olson, J. G.. Nested PCR assay for detection of granurocytic ehrlichiae. *J. Clin. Microbiol.* 36 : 1090~1095, 1998.
- 97) McBride, J. W., Corstvet, R. E., Breitschwerdt, E. B. and Walker, D. H. Immunodiagnosis of *Ehrlichia*

- canis* infection with recombinant proteins. *J. Clin. Microbiol.* 39 : 315~322, 2001.
- 98) McBride, J. W., Yu, X. and Walker, D. H. Molecular cloning of the gene for a conserved major immunoreactive 28-kilodalton protein of *Ehrlichia canis* : a potential serodiagnostic antigen. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 6 : 392~399, 1999.
- 99) Misao, T. and Kobayashi, Y. Studies on infectious mononucleosis (glandular fever). I. Isolation of etiologic agent from blood, bone marrow and lymph node of a patient with infectious mononucleosis by using mice. *Kyushu J. Med. Sci.* 6 : 145~152, 1955.
- 100) Mulville, P. Equine monocytic ehrlichiosis (Potomac horse fever) : a review. *Equine Vet. J.* 23 : 400~404, 1991.
- 101) Munderloh, U. G., Blouin, E. F., Kokan, K. M., Goodman, J. L., Hayes, S. F., Barlough, J. E., Nelson, C. M. and Kurtti, T. J. Establishment of the tick (Acari : *Ixodidae*)-borne cattle pathogen *Anaplasma marginale* (*Rickettsiales* : *Anaplasmataceae*) in tick cell culture. *J. Med. Entomol.* 33. 656~664, 1996.
- 102) Munderloh, U. G., Madigan, J. E., Dumler, J. S., Goodman, J. L., Hayes, S. F., Barlough, J. E., Nelson, C. M. and Kurtti, T. J. Isolation of the equine granulocytic ehrlichiosis agent, *Ehrlichia equi*, in tick cell culture. *J. Clin. Microbiol.* 34. 664~670, 1996.
- 103) Nutt, A. K. and Raufman, J. Gastrointestinal and hepatic manifestations of human ehrlichiosis : 8 cases and a review of the literature. *Dig. Dis.* 17 : 37~43, 1999.
- 104) Ohashi, N., Unver, A., Zhi, N. and Rikihisa, Y. Cloning and characterization of multigenes encoding the immunodominant 30-kilodalton major outer proteins of *Ehrlichia* and application of the recombinant protein for serodiagnosis. *J. Clin. Microbiol.* 36 : 2761~2680, 1998.
- 105) Olano, J. P. and Walker, D. H. Human ehrlichioses. *Med. Clin. North Am.* 86 : 375~392, 2002.
- 106) Paddock, C., Suchard, D. P. and Grumbach, K. L. Brief report : fatal seronegative ehrlichiosis in a patient with HIV infection. *N. Engl. J. Med.* 329 : 1164~1167, 1993
- 107) Parola, P., Cornet, J.-P., Sanogo, Y. O., Miller, R. S., Thien, H. V., Gonzalez, J.-P., Raoult, D., Telford III, S. R. and Wongsrichanalai, C. Detection of *Ehrlichia* spp., *Anaplasma* spp., *Rickettsia* spp., and other eubacteria in ticks from the Thai-Myanmar border and Vietnam. *J. Clin. Microbiol.* 41 : 1600~1608, 2003.
- 108) Parola, P., Inokuma, H., Camicas, J.-L., Brouqui, P. and Raoult, D. Detection and identification of spotted fever group *Rickettsiae* and *Ehrlichiae* in African ticks. *Em. Infect. Dis.* 7 : 1014~1017, 2001.
- 109) Philip, C. B., Hadlow, W. J. and Hughes, L. E. Studies on salmon poisoning disease in canines. I. The rickettsial relationships and pathogenesis of *Neorickettsia helminthoeca*. *Exp. Parasitol.* 3 : 336~350, 1954.
- 110) Prozesky, L. The pathology of heartwater. III. A review. *Onderstepoort J. Vet. Res.* 54 : 281~286, 1987.
- 111) Pusterla, N. and Braun, U. Clinical findings in cows after experimental infection with *Ehrlichia phagocytophila*. *Zentralbl Veterinarmed A.* 44 : 385~390, 1997.
- 112) Pusterla, N., Huder, J. B., Leutenegger, C. M., Braun, U., Madigan, J. E. and Lutz, H. Quantitative real-time PCR for detection of members of the *Ehrlichia phagocytophila* genogroup in host animals and *Ixodes ricinus* ticks. *J. Clin. Microbiol.* 37 : 1329~1331, 1999.
- 113) Pusterla, N., Johnson, E., Chae, J.-S., Pusterla, J. B., DeRock, E. and Madigan, J. E. Infection rate of *Ehrlichia risticii*, the agent of Potomac horse fever, in freshwater stream snails (*Juga yrekaensis*) from northern California. *Vet. Parasitol.* 92 : 151~156, 2000.
- 114) Pusterla, N., Leutenegger, C. M., Sigrist, B., Chae, J.-S., Lutz, H. and Madigan, J. E. Detection and quantitation of *Ehrlichia risticii* genomic DNA in infected horses and snails by real-time PCR. *Vet. Parasitol.* 90 : 129~135, 2000.
- 115) Rikihisa, Y. Cross-reacting antigens between *Neorickettsia helminthoeca* and *Ehrlichia* species, shows by immunofluorescence and Western immunoblotting. *J. Clin. Microbiol.* 29 : 2024~2029, 1991.
- 116) Rikihisa, Y. The tribe *Ehrlichiae* and ehrlichia diseases. *Clin. Microbiol. Rev.* 4 : 286~308, 1991.
- 117) Ristic, M., Dawson, J., Holland, C. J. and Jenny, A. Susceptibility of dogs to infection with *Ehrlichia risticii*, causative agent of equine monocytic ehrlichiosis (Potomac horse fever). *Am. J. Vet. Res.* 49 : 1497~1500, 1988.

- 118) Roux, V., Rydkina, E., Eremeeva, M. and Raoult, D. Citrate synthase gene comparison, a new tool for phylogenetic analysis, and its application for the rickettsiae. *Int. J. Syst. Bacteriol.*; 47 : 252~261, 1997.
- 119) Rydkina, E., Roux, V. and Raoult, D. Determination of the genome size of *Ehrlichia* spp., using pulsed field gel electrophoresis. *FEMS Microbiol. Lett.* 176. 73~78, 1999.
- 120) Sanogo, Y. O., Davoust, B., Inokuma, H., Camicas, J-L., Parola, P. and Brouqui, P. First Evidence of *Anaplasma platys* in *Rhipicephalus sanguineus* (Acari, Ixodida) collected in Africa. *Onderstepoort J. Vet. Res.* 70 : 205~212, 2003.
- 121) Schouls, L. M., Van de Polo, I., Rijpkema, S. G. T. and Schot, C. S. Detection and identification of *Ehrlichia*, *Borrelia burgdorferi* sensu lato, and *Bartonella* species in Dutch *Ixodes ricinus* ticks. *J. Clin. Microbiol.* 37 : 2215~2222, 1999.
- 122) Schutze, G. E. and Jacobs, R. F. Human monocytic ehrlichiosis in children. *Pediatrics.* 100 : E10, 1997.
- 123) Shankarappa, B., Dutta, S. K. and Mattingly-Napier, B. L. Antigenic and genomic relatedness among *Ehrlichia risticii*, *Ehrlichia sennetsu*, and *Ehrlichia canis*. *Int. J. System. Bacteriol.* 42 : 127~132, 1992.
- 124) Shibata, S. I., Kawahara, M., Rikihisa, Y., Fujita, H., Watanabe, Y., Suto, C. and Ito, T. New *Ehrlichia* species closely related to *E. chaffeensis* isolated from *Ixodes ovatus* ticks in Japan. *J. Clin. Microbiol.* 38. 1331~1338, 2000.
- 125) Shimada, Y., Beppu, T., Inokuma, H., Okuda, M. And Onishi, T. Ixodid tick species recovered from domestic dogs in Japan. *Med. Vet. Entomol.* 17 : 38~45, 2003.
- 126) Sotomayor, E. A., Popov, V. L., Feng, H. M. Walker, D. H. and Olano, J. P. Animal model of fatal human monocytotropic ehrlichiosis. *Am. J. Pathol.* 158 : 757~769, 2001.
- 127) Sumner, J. W., Nicholson, W. L. and Massung, R. E. PCR amplification and comparison of nucleotide sequences from the *groESL* heat shock protein of *Ehrlichia* species. *J. Clin. Microbiol.* 35 : 2087~2092, 1997.
- 128) Suto, Y., Suto, A., Inokuma, H., Obayashi, H. and Hayashi, T. First confirmed canine case of *Ehrlichia canis* infection in Japan. *Vet. Rec.* 148 : 809~811, 2001.
- 129) Tajima, T., Zhi, N., Lin, Q., Rikihisa, Y., Horowitz, H. W., Ralfalli, J., Wormser, G. P. and Hechemy, K. E. Comparison of two recombinant major outer membrane proteins of the human granulocytic ehrlichiosis agent for use in an enzyme-linked immunosorbent assay. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 7 : 652~657, 2000.
- 130) Taylor, M. J. and Hoerauf, A. *Wolbachia* bacteria of filarial nematodes. *Parasitol. Today.* 15 : 437~442, 1999.
- 131) Teng, C. H., Palaniappan, R. U. and Chang, Y. F. Cloning and characterization of an *Ehrlichia canis* gene encoding a protein localized to the morula membrane. *Infect. Immun.* 71 : 2218~2225, 2003.
- 132) Troy, G. C., Vulgamott, J. C. and Turnwald, G. H. Canine ehrlichiosis : A retrospective study of 30 naturally occurring cases. *J. Am. Ani. Hosp. Assoc.* 16 : 181~187, 1980.
- 133) Uilenberg, G. and Camus, E. Heartwater (Cowdriosis) : *Rickettsial and Chlamydial Diseases of Domestic Animals.* Pergamon Press, Oxford, U. K. 233~254, 1993.
- 134) Unver, A., Ohashi, N., Tajima, T., Stich, R. W., Grover, D. and Rikihisa, Y. Transcriptional analysis of p30 major outer membrane multigene family of *Ehrlichia canis* in dogs, ticks, and cell culture at different temperatures. *Infect. Immun.* 69 : 6172~6178, 2001.
- 135) Unver, A., Rikihisa, Y., Ohashi, N., Cullman, L. C., Buller, R. and Storch, G. A. Western and dot blotting analyses of *Ehrlichia chaffeensis* indirect fluorescent-antibody assay-positive and -negative human sera by using native and recombinant *E. chaffeensis* and *E. canis* antigens. *J. Clin. Microbiol.* 37 : 3888~3895, 1999.
- 136) Van De Pypekamp, H. E. and Prozesky, L. Heartwater. An overview of the clinical signs, susceptibility and differential diagnoses of the disease in domestic ruminants. *Onderstepoort J. Vet. Res.* 54 : 263~268, 1987.
- 137) van Vliet, A. H. M., Jongejan, F., van Kleef, M. and van der Zeijst, B. A. M. molecular cloning, sequence analysis, and expression of the gene encoding the immunodominant 32-kilodalton protein of *Cowdria ruminantium*. *Infect. Immune.* 62 : 1451~1456, 1994.

- 138) Waddle, J. R., and Littman, M. P. A retrospective study of 27 cases of naturally occurring canine ehrlichiosis. *J. Am. Ani. Hosp. Assoc.* 24 : 615~620, 1987.
- 139) Walls, J. J., Caturegli, P., Bakken, J. S., Asanovich, K. M. and Dumler, J. S. Improved sensitivity of PCR for diagnosis of human granulocytic ehrlichiosis using *epank1* genes of *Ehrlichia phagocytophila*-group *Ehrlichiae*. *J. Clin. Microbiol.* 38. 354~356, 2000.
- 140) Wanduragala, L. and Ristic, M. (Anaplasmosis.) : *Rickettsial and Chlamydial Diseases of Domestic Animals*. Pergamon Press, Oxford, 65~87, 1993.
- 141) Weisiger, R. M. Ristic, M. and Huxsoll, D. L. Kinetics of antibody response to *Ehrlichia canis* assayed by the indirect fluorescent antibody method. *Am. J. Vet. Res.* 36 : 689~694, 1975.
- 142) Wen, B., Jian, R., Zhang, Y. and Chen, R. Simultaneous detection of *Anaplasma marginale* and a new *Ehrlichia* species closely related to *Ehrlichia chaffeensis* by sequence analyses of 16S ribosomal DNA in *Boophilus microplus* ticks from Tibet. *J. Clin. Microbiol.* 40 : 3286~3290, 2002.
- 143) Wen, B., Rikihisa, Y., Mott, J., Fuerst, P. A., Kawahara, M. and Suto, C. *Ehrlichia muris* sp. nov., identified on the basis of 16S rRNA base sequences and serological, morphological and biological characteristics. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 45 : 250~254, 1995.
- 144) Woldeiwet, Z. and Scott, G. R. Tick-Borne (Pasture) Fever. : *Rickettsial and Chlamydial Diseases of Domestic Animals*. Pergamon Press, Oxford. 233~254, 1993.
- 145) Yamaguchi, N., Tipton, V. J., Keegan, H. L. and Toshioka, S. Ticks in Japan, Korea and Ryukyu-islands. *Brigham Young Univ. Sci. Bull. Biol. Ser.* 15 : 1~226, 1971.
- 146) Yu, X-J., Brouqui, P., Dumler, J. S., Raoult, D. Detection of *Ehrlichia chaffeensis* in human tissue by using a species-specific monoclonal antibody. *J. Clin. Microbiol.* 31 : 3284~3288, 1993.
- 147) Yu, X-J., Crocquet-Valdes, Culliman L C. and Walker D H. The recombinant 120-kilodalton protein of *Ehrlichia chaffeensis*, a potentia diagnostic tool. *J. Clin. Microbiol.* 34 : 2853~2855, 1996.
- 148) Yu, X-J., McBride, J. W., Diaz, C. M. and Walker, D. H. Molecular cloning and characterization of the 120-kilodalton protein gene of *Ehrlichia canis* and application of the recombinant 120-kilodalton protein for diagnosis of canine ehrlichiosis. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 6 : 392~393, 2000.
- 149) Yu, X. and Walker, D. H. Sequence and characterization of an *Ehrlichia chaffeensis* gene encoding 314 amino acids highly homologous to the NAD A enzyme. *FEMS Microbiol. Let.* 154 : 53~58, 1997.
- 150) Zhi, N., Rikihisa, Y., Kim, H. Y., Wormser, G. P. and Horowitz, H. W. Comparison of major antigenic proteins of six strains of the human granulocytic ehrlichiosis agent by western immunoblot analysis. *J. Clin. Microbiol.* 35 : 2606~2611, 1997.

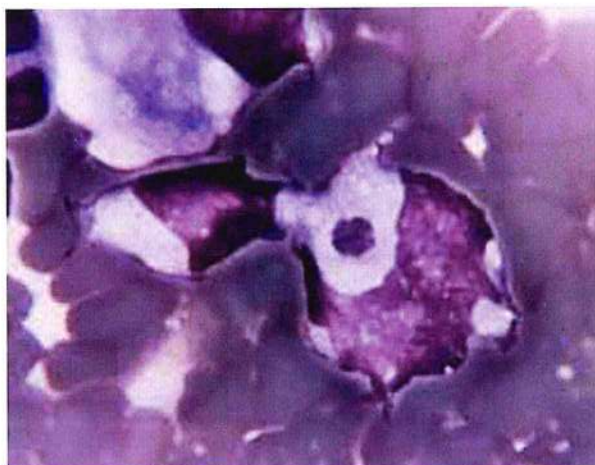


Fig. 2 犬末梢血単核球細胞内のEhrlichia canis桑実胚 (morula).



Fig. 3 犬末梢血血小板内にみられたAnaplasma platys inclusion.

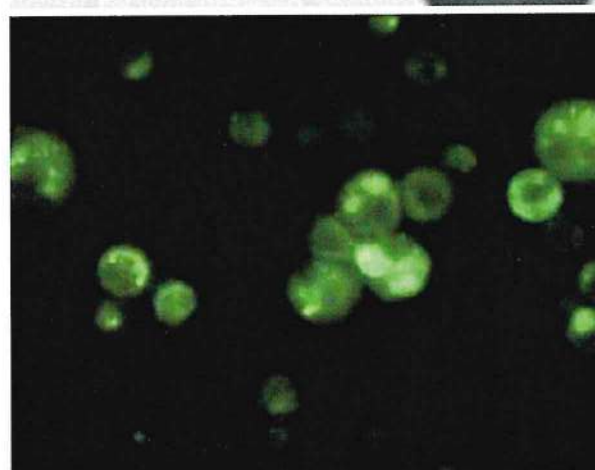


Fig. 4 Ehrlichia canis持続感染細胞DH82を用いた免疫蛍光抗体法. 陽性血清は細胞質内のMorulaと反応して蛍光を発する.

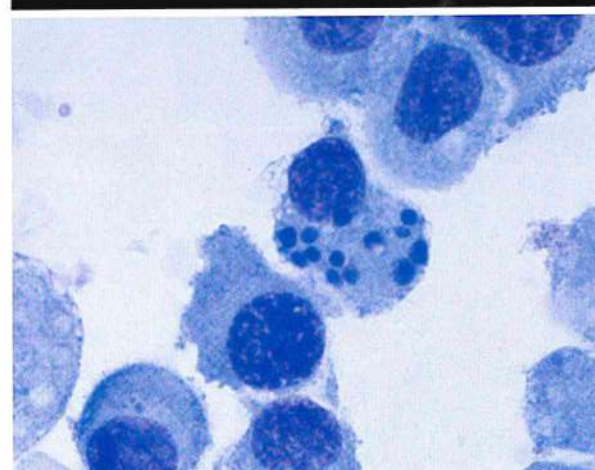


Fig. 5 Ehrlichia canis持続感染細胞DH82のギムザ染色所見. 細胞質内にE. canisが観察される.

総 説

わが国の乳牛に多発する肢蹄疾患

大 竹 修*

[受付 : 2003年6月25日]

REVIEW

PRESENT STATUS OF LEG AND HOOF DISEASES ARE FREQUENTLY REPORTED FROM VARIOUS PARTS IN JAPAN

Osamu OHOTAKE

Tsuyama Veterinary Clinical Center, Okayama P.F.A.M.A.A.,

Tsuyama-shi, Okayama-ken, 708-0843, Japan

[Received for publication : June 25, 2003]

Leg and hoof diseases frequently reported in Japan most of the dairy cattle fed in Japan are Holstein, though in some parts Jerseys are also fed. Statistically, mastitis is the highest cause of death and scrap in the past and present. A noteworthy disease may be arthritis, which comes close behind mastitis. The case reports of arthritis have greatly increased since the 1980s. This disease is generally reported as arthritis. But in the items details of most cases it is Periarthritis, a combination of arthritis and hoof disease.

In this paper I will deal with Periarthritis and sole ulcer, the cases of which are increasing and tend to result in scrap. I discuss epidemiological background, etiology, mechanism, therapy, prognosis, prophylaxis of the disease. I also report the present situation of Papillomatous digital dermatitis (PDD), which is widespread in Japan.

はじめに

現在、わが国で飼養されている乳牛の大部分はホルスタイン種であり、その他にジャージー種が一部の地域で飼養されている。これらの乳牛における死亡廃用事故の中では、乳房炎が毎年首位を占め続けているが、第2位に関節炎が羅列されるようになってからも既に年月が経過している。馬のように労働や競走に使われることのない乳牛では、運動性は度外視され、飼料を消化して乳に変える能力が十分あればよいという考えから、体長や乳器の改良には力が入られたが、反面、肢蹄については軽視されてきた。その間、肢蹄疾患の情報は少なく¹⁾、また断片的で対策を講じることは困難であったが、1980年代から、症例報告や体系的な報告がなされ始めた。関節炎とは関節を構成する骨、軟骨および関節包の炎症であるが、乳牛に多発する関節炎とはどのような病態を呈する疾患なのか、どのようなメカニズムで発生し、なぜ廃用を余儀なくされるまで重症化するものが多発するのか、などの実態を調査すると、四肢関節周辺の疾患を包括した関節周囲炎を関節炎として治療処置されているものが圧倒的に多く、また大半の症例に蹄疾患の併発がみられ、蹄疾患のほうが主病変である症例も多く、持続的な疼痛ストレスと跛行を呈し、関節疾患と蹄疾患の間には同要因が関わっていることが判明した^{38, 41, 43)}。肢蹄疾患は跛行および疼痛が出現した時点では、その症状が臨床的には比較的軽症であっても器質的な病変が形成されている場合が多く、治療によつ

* 岡山県農業共済組合連合会津山家畜診療所・所長

でも完治し難く、経過が長引き¹⁹⁾、細菌性心内膜炎を継発する原発疾患になることもある⁵⁰⁾。これらの肢蹄疾患が多発する第一の要因は多頭飼育に伴う飼養管理の省力化であり、第二の要因は濃厚飼料に依存するための障害であり、そのため肢蹄疾患は生産病の範疇で考えられるようになったのである。第三の要因としては定期的な削蹄がなされていないための蹄異常にみられるごとく、護蹄失宜があげられる^{19, 27, 71)}。

家畜共済事故病類別表の運動器病に分類されている関節疾患には、脱臼の他に関節炎（感染性、非感染性）、滑液囊炎（膝瘤及び飛端腫を含む）、そして平成7年度の改定で追加された関節周囲炎等が羅列されている。一方、蹄疾患としては趾間皮膚炎、趾間フレグモーネ（趾間腐爛、またぐされ）、疣状皮膚炎（趾皮膚炎）、趾間過形成（趾間結節、趾間肉芽）、蹄葉炎、裂蹄、蹄球糜爛（蹄球炎）そして挫踏（蹄血斑、蹄底出血、非化膿性蹄真皮炎）、化膿性蹄皮膚炎（創傷性蹄皮膚炎）、白帯病（白線病）、および蹄底潰瘍（限局性蹄皮膚炎、ルステルホルツ蹄底潰瘍）が羅列されている。

それぞれの疾患の詳述は成書に委ねるとして、ここでは多種類の肢蹄疾患の中から、近年増加傾向にあり、しかも廃用につながる症例が多い飛節周囲炎と蹄底潰瘍、および伝染性で既にわが国でも広く蔓延している疣状皮膚炎（PDD）の3疾患に焦点を絞り、病態、発生メカニズム、および治療、予防等について、これまでの報告を参考にしながら生産性や経済性との関係についても解説した。

飛節周囲炎

牛は四肢の正しい負重と安定姿勢によって健康が保たれているが、わが国の乳牛は運動量が極端に少ないタイストール牛舎に常時繋留されている飼養形態が主体で、不自由な姿勢での起立や伏臥により、硬いコンクリート牛床での打撲や擦過の影響による四肢関節部皮膚の汚染、脱毛が生じ易く、さらに進行して腫脹、硬結を伴うものが増加する傾向にある。

関節を構成する骨、軟骨、関節囊およびそれに付随した靭帯などに炎症が生じ³⁾、化膿、癒着をきたして機能障害、および器質障害を伴うものを関節炎と称しているが、乳牛に発生する関節疾患は飛節に発生するものが多く、真の関節炎の場合よりも、飛節外側皮膚に生じた炎症が高じて手拳大～人頭大にまで膨隆する滑液囊炎や膿瘍が形成されたり、挫創が化膿や潰瘍化し、持続する疼痛のために跛行を呈し、起立や伏臥に難渋するようになる。病巣の形態や部位から飛節軟腫、飛節膿瘍、飛節外腫などと呼ばれる場合もあり、これらをいわゆる関節炎として治療する機会は多いが、近年普及されつつあるフリーストール牛舎における発生はない。

全身症状を伴わず、緩慢に進行するため酪農家の対応は鈍く、いつの時点で病変として認知され、治療が開始されるのかは酪農家や乳牛個体によって定まっておらず、適当な診療の機会を逸し、生産性の低下をきたす。一般的には泌乳量が明瞭に減少した時点での求診が多いが、すでに回復が困難なまでに牛体の衰弱が進行しているので、廃用処分にされる機会が大きくなる。

原因

硬いコンクリート牛床上での敷料不足、繋留方式や牛床の長さ、縁石、尿溝、あるいは厩栓棒の高低差などの牛舎構造が障害となり、起立時に前後方への重心の移動が制限されるため、踏み変え、滑走、打撲が生

じ易い^{2, 42)}。このような環境では抗病性の低下したものは飛節外側の脱毛、腫脹、皮下織の肥厚、壊死、裂隙形成、滲出液の貯留、囊胞の拡充、感染、化膿という経過で緩慢に進行する⁴⁷⁾。特に夏季には体力消耗や細菌感染の機会が増し⁴²⁾、暑熱対策が不十分な牛舎では被害が拡大し易い。また牛床の湿潤、不潔は感染性飛節周囲炎に移行し易い⁶⁰⁾。さらに過長蹄、変形蹄、蹄疾患などの蹄異常があれば飛節周囲炎の発生を助長する⁴²⁾。これまで廃用にされてきたホルスタイン種では、大型牛、高泌乳、濃厚飼料多給の傾向があり、昭和時代の末期まではまだ肝蛭の寄生が影響していたが、粗飼料内容が変化し、肝蛭寄生の影響がなくなった現在、脂肪肝による肝機能低下がクローズアップされている⁴⁶⁾。

発生状況・症状

四肢関節の複数部位を受傷する機会が多く、腫脹と硬結が特徴であるが、関節炎との鑑別は困難な場合も多い。その中でも飛節（足根関節）の受傷がトップで84%⁴⁶⁾にも及び、特に右飛節の発生が多い。この点についてRumenが左に位置するために右を下にして伏臥する機会が多く、右の飛節外側は左側より牛床の圧迫を受け易いという、起臥行動との関係が報告されている^{24, 36, 40, 72)}。廃用例においても病変は関節腔内に炎症の存在すると思われる例は認められず、剖検例はすべて関節周囲の皮下に形成された囊胞、膿瘍（Fig 1）および皮膚炎（Fig. 2）を主徴としている。

コンクリート牛床上での繋留牛舎で多発し、フリーストール牛舎での発生はみられていない。またゴムマットを使用している牛舎ではコンクリート牛床よりも低い傾向にある²⁴⁾。経産牛に多発し病変の重度な例は軽症例や非発症例に比べて年齢、乳量ともに高い傾向にある²⁴⁾。長期治療例や再発例が廃用につながるケースが多く、泌乳とエサの間のアンバランスで抗病性が低下して重症化する生産病でもある。

診断

病理所見：病変部の表皮はパラケラトーシス，アカントーシス，潰瘍が形成され，真皮，皮下組織では水腫，膠原繊維，変性，壊死，膿瘍，フレグモーネなどの病変を呈し，裂隙の拡大，癒合によって囊胞が形成される²⁴⁾。

超音波検査所見：囊胞に水様性貯留液を容れる例では，内腔は低～高レベルなエコー像を呈する結合組織やフィブリン塊で満たされている⁷⁰⁾。

X線検査所見：X線は関節の病変を検出するために用いられる一般的な方法である。しかし微細な変化を見つけるには困難な場合がある。この点を解消するため，高解増X線写真や電子X線写真装置が臨床応用に有用であることが示唆されている⁷⁰⁾。

関節液：関節液の検査は関節疾患の評価に欠かせないもので，臨床所見やX線撮影検査所見とともに利用すれば価値ある情報が得られる。肉眼的には淡黄色，透明で粘稠性があり，95～97%が水分で，他に蛋白質，塩類，ムチンを含有し，潤滑作用や圧迫に対する緩衝作用を有し，色調，混濁の有無と程度，粘度，ムチン凝固などの物理的性状や関節液中の赤血球数，白血球数とその分画，さらに総蛋白量と分画，糖，アルカリフォスファターゼ，乳酸脱水素酵素，アルドラーゼなどの酵素活性が関節炎の診断と治療の効果判定に役立つとされている¹⁰⁾。膿汁の性状を示した例からは全例，菌が分離され¹⁴⁾，中間⁴⁰⁾も *Actinomyces pyogenes* が高率に分離されたと報告している。しかし膨隆した囊胞から透明で細菌分離のない貯留液が採取されることがあるが，非感染性に貯留したものであることが推察される。

治療・予防

慢性的に経過する例が多く，局所の洗浄，消毒，消炎剤の塗布，焼烙法，副腎皮質ステロイドや非ステロイド消炎剤の注射が行われるが，さらに感染性関節炎の場合は起因菌の感受性の高い抗生剤が使用されている。しかし副腎皮質ステロイド剤の使用は創傷治癒遅延をもたらすとの報告²⁵⁾もあるため，慎重に使用すべきである。その他ジメチルスルホキシド (DMSO)，インドメサシン軟膏，ヒルドメド軟膏も使用されてきた。藤井ら²¹⁾はモクタル製剤の塗布や囊胞内充填で効果をみている。また綿状キトサンの囊胞内挿入でも効果が報告されている⁶¹⁾。打撲による腫脹に対しては圧迫保護包帯⁴⁵⁾やプロテクターの装着も効果があるが，蹄疾患併発例には蹄の治療をしなければ回復は困難である。外科的処置としては，膿瘍の手術と同様に腫瘤の内容を包む囊状組織を完全に摘出することである⁶⁴⁾。囊状組織を鈍性に剥離すると出血も少ない。手術の時期は内容を穿刺して，血様なら透明な漿液性になるまで待ち，膿汁ならただちに実施するのがよい。Greenough¹⁴⁾は跛行発生12時間以内に治療した場合の

1年間の乳量減少は1%以内であるが，2～3日後に治療した場合には決して発生前の乳量には戻らず，その後1年間の乳量損失は最高20%にも達すると報告しているように，早期発見と早期治療が基本をなすにもかかわらず，特に肢蹄疾患に関しては早期に診療の対象とされるものは少なく，跛行や疼痛ストレスによる乳量および産肉量の減少，屠殺処分（廃用）や繁殖能力の低下，治療に要する経費と労働力などの経済的損失が予想以上に大きい事実は意外に知られていない。

このように，一旦発生すると回復困難な疾患ほど予防は大切であり，発生要因を可能な限り除去することである。飛節の挫傷や感染をみとめない挫創を発見した場合には，それ以上悪化しないように敷料の増量やプロテクターを装着するとともに，牛床の湿潤や滑走，打撲防止に力を入れ，四肢の安定と，起立および伏臥がスムーズに行われ，さらには蹄疾患の早期発見にもつながる年2回以上の定期的な削蹄が大切である。また乾乳期間中には体重増加による起臥時の飛節への物理的負荷が大きくなるので，この期間だけでも運動場へ出せば発生が低下する⁶⁰⁾。

蹄底潰瘍

限局性蹄皮炎⁷³⁾，ルステルホルツ蹄底潰瘍とも呼ばれ，病名の統一¹⁶⁾がなされていなかった時代には蹄底腐爛^{4,28)}として報告されていたこともあり，蹄底に限局した円形の角質欠損部が生じ，内部から肉芽組織が突出するものもあり (Fig. 3)，跛行や疼痛など角質の異常を主徴とする蹄底疾患である⁵³⁾。

わが国では多頭飼育と省力的管理が取り入れられた時期以降から増加傾向にあり¹⁷⁾，分娩後3～4ヵ月以内の泌乳最盛期の発生が多い。罹患牛は持続的な疼痛のために採食量は低下し，乳量ならびに体重も減少がみられ，起臥に不自由をきたして生じる断続的な打撲による関節周囲炎，骨折，筋挫傷によってダウン症候群へ移行する可能性があり，しばしば早期の廃用へとつながる。さらに抗生剤治療に伴う牛乳の廃棄，分娩後の授精遅延などの経済的損失を招く⁵⁹⁾。

発生要因・発生機序

蹄疾患には生産性の向上を目的とした飼養管理と関連した生産病の範疇に入るものが多いが，牛自体の肢勢あるいは蹄の形状等を含めた遺伝的形質，牛舎構造，乾燥状態等の環境要因，護蹄管理，および栄養学的要因などが複合した多因子疾患でもある^{17,33)}。最近蹄底角質が柔軟で劣化しているにもかかわらず，明瞭な臨床症状を欠く潜在性蹄葉炎^{23,75,76)}と，それに継発する蹄底潰瘍の増加が主体となっている。蹄葉炎の発生要因はすべて蹄底潰瘍の発生要因でもあり，湿潤不潔な足下環境が大きく関与し，後肢外側蹄に好発するが，タイストール牛舎の場合，前肢蹄は乾燥した牛床に着地しており，後肢蹄は糞尿で湿潤化し，蹄質の軟化や

劣化が生じ易く、また尿溝の構造や鉄棒のストールなどの材質や形状などにも影響される⁷⁴⁾。後肢では内向肢勢にX状肢勢を呈するものが多く、体重負荷は後肢では外側蹄に多くかかるものと推察される。蹄の軸側後方には蹄葉が少なく、蹄骨と蹄壁との結合が緩いため蹄骨軸側後縁の屈筋結節が強く蹄底真皮を圧迫する²¹⁾。また末節骨に圧迫されて蹄底真皮に出血、壊死、循環障害が生じると、その部位の角質生成が阻害されたり (Fig. 4)、不良な角質が形成され、蹄底潰瘍や白線病の原因ともなる。蹄底表面は正常な場合でも、削蹄により蹄底中心部に出血巣として潰瘍が発見されることがあり、進行すると角質の坑道形成や潰瘍から蹄骨に達する瘻管形成による蹄骨の変性がみられるようになる。また外側蹄は内側蹄よりも多くの体重を受けているので、蹄の小さいものや体重の重いものではリスクも大きく、過長蹄や変形蹄、あるいはコンクリートなどの硬い床では増悪する。潜在性蹄葉炎は分娩後に最も多く発生するが、蹄底潰瘍は分娩の3~4ヵ月後に多く、分娩前後の飼養形態の急激な変化に伴う第一胃環境の変化が蹄疾患発生に大きく関与している⁶⁷⁾。またフリーストール牛床の材質や広さとの関連も示唆されており、これらは蹄そのものにかかる負荷、運動や休息に伴う蹄真皮における正常な循環機能の維持が大きく関与していることを示している。乳牛の蹄底角質成分については黒崎ら³²⁾が30~40%の水分と70~60%の乾物で構成され、乾物中の98~99%は蛋白質(ケラチン)で占められ、Ca, Mg, Pなどのミネラル成分は微量であることを報告しており、高泌乳牛に蹄底疾患が多発するのは、乾乳期には硬い角質も分娩後、泌乳量の増加とともに乾物量が減少し、飼料中のCP充足率が100%を割れば蹄の硬度は低下するためであると推察されている。このことについては後藤ら¹³⁾も分娩前後の蹄壁角質アミノ酸組成の変化を測定して同様結果を報告している。このように多くの要因が考えられる乳牛に対し、黒毛和種に発生が少ないのは、それぞれ要因が異なるためである⁶²⁾。

症状

病態は比較的緩慢に進行し、跛行の程度や進行過程は様々である。病変部は片側または両側の後肢外側蹄の蹄底・蹄球接合部が多く、蹄冠の腫脹が顕著にみられるものもあり、疼痛と跛行を呈し、起立時には内側蹄で負重しようとする。両側後肢が罹患すると起立をきらい、伏臥時間が長くなる。疼痛の程度にもよるが、食欲は減退し、泌乳量の低下や消瘦が進行する。持続的疼痛が生産性に及ぼす影響としてMieth & Ritter³⁵⁾は高能力牛の蹄疾患による生産低下は、1ヵ月あたり乳量3kg減、また蹄疾患の経過中に体重が50kg減少すると報告し、Greenoughら¹⁴⁾は跛行が発生した乳牛が発生後12時間以内に治療を受けて治れば乳量の減少は1%以内にとどまるが、2~3日遅れると損失は

著しく増加し、生産能力は回復しないと報告している。湿潤不潔な牛床では角質欠損部からの感染が上部の関節や骨組織など蹄深部に波及し、感染性骨膜炎や化膿性骨髄炎を継発して運動機能を障害することがあり、全身療法を施しても治癒は困難である。蹄冠部にみる硬結性膨隆は増生した仮骨によって形成された趾骨瘤 (Fig. 7)⁵²⁾である。

診断

蹄底潰瘍はしばしば過長蹄や変形蹄を示し、白線部の亀裂、蹄球びらん、趾間皮膚炎なども同時に存在する。さら二重蹄底を示すことも多い。これらの病巣を正確に把握するために、削蹄棒¹²⁾に入れ、鎮静剤を用いて試験的削蹄を行う。削蹄を進めると、その程度は様々であるが、しばしば角質内に達する挫傷や出血斑がみとめられ、この部分を削切すると角質の分離、真皮の壊死と出血がみられ、慢性化した例では角質の欠損部に肉芽組織の突出がみられる。これは潜在性蹄葉炎の証拠と考えられる。蹄底の尾側1/3付近が好発部位のため、この部分の変色脆弱化がみられれば、さらに注意深く削蹄を進め、病変の進行程度を確認する。重症例ではそこから細菌感染が生じているものも少なくない。その場合は削蹄を進めると膿や滲出液の排出、あるいは肉芽形成がみとめられ、重度の跛行を呈する。露出した真皮には様々な程度に感染が起こり、蹄底角質は分離し、坑道が形成される。感染が存在し、蹄冠部などの熱感や腫脹を伴う場合、X線検査やMRI画像診断 (Fig. 5)⁵¹⁾が望ましい。しばしば趾骨の骨髄炎(深部感染症)^{52, 68)}が存在するが、その場合の予後は要注意である。松田ら³⁴⁾は蹄底疾患に罹患すれば血清蛋白質、 γ glob, ZTTが増加し、Caが低値を示し、高泌乳時におけるカロリー不足の結果、体力の低下や肝機能障害と共に生体内のCa減少による骨組織の負担過重および細菌感染が大きな原因であると報告している。また遠藤ら⁹⁾はNEFAおよびコルチゾールが高値を示すことに対して跛行牛の疼痛ストレスの度合いを測る客観的な評価となり得ることを報告している。

治療・予防

牛群の治療には早期発見、早期治療が最重要であるものの、汚染不潔、重労働、危険などを伴うために従来消極的であり、また中途半端な治療も多かった。使用される治療薬としては小久江ら⁸⁾が詳述しておりであるが、治療の第一は壊死巣の除去であり、真皮病変を十分露出するように周囲の遊離した角質を挿り鉢状に蹄刀で切除する。この時、保定棒や局所麻酔を施すことが蹄病処置を安全確実にさせる。蹄球以下を十分に洗浄消毒し、まず枯角や過長角質を削除して蹄の形を整え、次いで病巣部周辺を開大して肉底部分を露出させ、創内の貯留滲出液や壊死組織を排除し、その後、再び十分に消毒して、出血が重度な場合は駆血帯や焼烙による止血もよい。そして抗生剤軟膏や木

タール製剤を塗布し、包帯をほどこすが、排泄の障害になったり創の湿潤を招くため好ましくないとみられており、潰瘍が硬化、角質化するまで定期的な交換が必要である。軽症、重症を問わず、非罹患蹄底へのブロック装着 (Fig. 6)¹⁾は、患側蹄の負重を軽減させ、疼痛除去にも有用であり、運動の禁止で治癒を促進させる。また焼焙療法の効果も報告⁴⁾されている。比較的限局した蹄の深部感染症では、早期治療によって乳量減少を最少限に抑えることができるが、骨髄炎を生じている場合は断趾術や蹄関節切除術⁶⁾が必要となる。

牛群の蹄疾患を予防するためには正しい科学的方法が必要であり、要因を確定せず盲目的に削蹄や蹄浴を行っただけでは効果がない⁶⁾。多因子疾患であり、潜在性蹄葉炎を基礎疾患としている蹄底潰瘍の予防は、あらゆる発生要因を少しでも改善しなければ明確な効果は現れない。それには駐立姿勢と歩様や蹄形を観察し、過剰成長や変形を矯正するために削蹄を行い^{5, 20, 21)}、飼料の変質や粗飼料の切断長、粗濃比はもとより、発育期や経産牛、乾乳牛などの栄養管理、ルーメンアシドーシスの改善、牛床や分娩房の改善⁷⁾、フットバスの設置⁶⁾などが必要であるが、早期発見のポイントとしては乾物摂取量のばらつき、泡沫性断続的下痢、反芻の減少、蹄冠縁の腫脹と充血、足踏み、乳脂肪率の低下などの観察である。ビオチンは蹄の基底膜細胞層におけるケラチン合成に関する水溶性ビタミンB群 (ビタミンH) で、ルーメン内微生物により合成される。粗飼料と濃厚飼料の比がビオチン合成に影響し、ルーメン内pHが低下 (ルーメンアシドーシス) すると、ケラチン合成量も低下するため、蹄角質の硬度は低下する。それを予防するためにはビオチン10~20mg/dayが必要である¹⁸⁾。治療には日量100 μ g/kg以上が必要であるという報告²⁶⁾もある。

疣状皮膚炎

蹄冠縁より近位または趾間隙にいたる蹄皮膚表層の炎症性疾患¹⁵⁾で、牛群に跛行を招き経済的損失の大きさが問題視されている伝染性の強い蹄疾患である。1974年イタリアのCheliとMortellaro⁷⁾によって報告されたのをきっかけに、アメリカでは1980年Rebhunら⁶⁾によるニューヨーク州北部のフリーストール牛舎での爆発的な発生、同年オランダとイギリスでも発生報告⁹⁾があり、短期間のうちに世界各国へ蔓延した。

わが国においては1993年に木村ら²⁹⁾による群馬県での発生報告が最初である。従来の獣医学書にも紹介はされているものの、欧米の報告をミックスして記述されているものもあり、不明点も多く、家畜共済事故病類別表に平成7年度の改定で初めて掲載された疾患でもある。いまだに原因菌の確定はなされておらず、病変部から検出されるスピロヘータ様螺旋菌 (Fig. 10)^{6, 29, 37, 49, 55)}が病原体の一つとみなされ、その究明がいそ

がれている。

不顕性感染牛の長途輸送や新環境、さらには分娩や高泌乳などで免疫力が低下した結果、湿潤、汚染した牛舎環境において蹄に付着した病原菌が経皮的に侵入して発生すると考えられる。とくにフリーストール牛舎における発生報告が主体であるが、タイストール牛舎における報告もある。一度牛舎内に蔓延してしまうと清浄化は難しく、多大な経済的損失を伴う疾患である。病変部はステージの違いによりイチゴ状、カリフラワー状、イソギンチャク様 (Fig. 9) など、いろいろな形状を呈するため、疣状趾皮膚炎の他に趾乳頭腫症 (Papillomatous digital dermatitis)、趾皮膚炎、有毛イボなど多くの病名で表現されており、ここでは以下PDDで表現する。それぞれが別の疾患とも思われがちであったが、好発部位、症状、検出病原体、治療内容の効果あるいは病理組織学的所見などから、同疾患における症状やステージの相違によるものであると思われる。

病変・症状

蹄踵辺縁に好発するが (Fig. 8)、趾間過形成表面、蹄前面、副蹄間下方などに3~4cmの円形、類円形、あるいはU字形の病巣として発生する⁶⁾。病変は暗赤色で、丘疹状に膨隆し、境界は明瞭で、進行するとカリフラワー状の肉芽組織となり、さらに毛髪様の乳頭状組織 (通称イソギンチャク) で被われ、表面は滲出液で湿潤となり、一種独特の腐敗臭を放つ。周囲との接触で著しい疼痛を示し、出血しやすく、擦るとイチゴ状、赤色肥厚病変あるいは巣状びらん、潰瘍を伴う病変がみられ、病変周囲の皮毛は異常に伸長して立毛している。病変断面は中心部から過形成した真皮乳頭が放射状に発生し、表面に向かうほどヒゲ状を呈するようになる。フリーストール牛舎において蔓延するケースが多く、前後肢とも罹患するが、後肢のほうが多い³⁷⁾。最も初期の皮膚所見は平坦で灰白、あるいはピンク色の顆粒状びらんか菌垢状を呈する。早期治療をせず放置した場合、初期病変は乳頭腫状に発達、2~6cmに大きくなり膨隆し、やがて毛髪に似たイソギンチャク様の、ケラチンの長い絨毛形成をする。これまでの発生は乳牛で、わが国においても黒毛和種の発生報告はない。すべての年齢の成牛に発生するが、最も罹患が高いのは初産牛と3歳牛で、雄牛と1歳未満では罹患しにくい。また乾乳、泌乳ステージに関係なく罹患する。タイストール牛舎においては湿潤な後肢のみが罹患し、乾燥状態の前肢には発生をみない。しかしウォーターカップの漏水で湿潤状態の前肢に発生した症例も報告されている⁵⁰⁾。またPDDの全頭が蹄球びらんと併発していることから、蹄球びらんの発生要因である牛床の湿潤不潔がPDDの発生要因にもなっているとの報告もある⁷⁾。

罹患牛は削蹄遅延 (不履行) による過長蹄、変形蹄

を呈しているものが多い⁴⁹⁾が、病変が蹄踵部という牛体の最下部に位置し、糞尿で汚染されている場合が多いため、起立状態では病変部が不明で発見が遅れがちになる。牛床への接触で疼痛を呈するため、蹄尖着地や、たえず蹄踵部を浮かせた状態をとり、後肢の頻繁な移動などで異常に気付くが、その時点では食欲は不振で飼槽に残飼がみられ、BCSの低下および泌乳量や繁殖成績など生産性の低下がみられる⁴⁹⁾。

臨床検査所見：病変部のスタンプ標本で全症例にグラム陰性に濃染するスピロヘータ様螺旋菌が観察され、その形態はトレポネーマに類似している。この螺旋菌は種々な球菌や桿菌とともに、初診時のPDD牛全頭の病変部から検出されるが、次診以降あるいは回復時には消失している。また発生牛舎における非発生牛の蹄踵部から検出されることもあり、広範な感染を納得させられるが、非発生牛舎における牛群からは検出されない。しかし病変部生検材料を血液寒天培地でレプトスピラ分離用(HMJH)培地、トレポネーマ分離用(TYGV5)培地で好気的および嫌氣的に培養を試みても、これまでに螺旋菌が分離された報告はない⁴⁹⁾。

再現試験：ReadとWalker⁵⁷⁾は4ヵ月齢のホルスタイン種6頭の後肢に新鮮なPDD病変部乳剤を接種し、ラッピングにより常時湿潤と嫌気状態を保つことにより全頭PDDの再現に成功したが、乾燥状態では再現されなかった。

病理組織学的所見：病変部皮膚は著しく肥厚(2~10mm)角化亢進し、表皮は有棘細胞層から角質層にかけて著しく増殖、かつ真皮乳頭の不規則な肥大、延長がみとめられる。皮膚表面は顆粒層から角質層が著しく増殖し、乳頭状の進展を示す。また化膿巣や出血がみとめられ、壊死と潰瘍形成による真皮乳頭部の露出と出血角質層には有核でケラトヒアリンに乏しい豊富な好酸性細胞質を持つ上皮細胞からなる不全角化の像がみとめられた。乳頭層は高度に伸長し、充血、好中球、リンパ球、大食細胞の囲管性浸潤を伴う部位や、出血、壊死を伴う部位が混在する。Warthin-starry染色ならびにLevaditi染色で、病変部角質層深部から有棘層浅層にかけて上皮細胞間に侵入、増殖する無数の螺旋菌をみとめる。ヒゲ状の組織は表皮が過形成したものであり、不全角化層からなっている。

免疫組織化学的所見：高橋ら⁶⁵⁾は病巣から*Campyrobacter bubulus*を分離し、分離菌を用いて作製した抗*C. bubulus*と、抗*Treponema pallidum*、抗*Leptospira biflexa*、抗*Borrelia burgdorferi*ウサギポリ血清を用いSAB法により免疫組織学的染色を実施したところ、全症例が4種の抗体に反応したと報告している。

電子顕微鏡的所見：表皮細胞間に9螺旋を有する多数の細菌をみとめ、*Treponema*属菌の特徴である8本のendoflagella軸糸が確認される。

治療・予防

病巣が表在性のため、適切な治療と環境整備により短時に回復するものが多い。わが国では一般にゲンチアナバイオレット溶液による噴霧洗浄の後、オキシテトラサイクリンの病巣内注射や塗布がなされているが、これまでに報告されたものとして、5%硫酸銅溶液による蹄浴²⁹⁾、クレゾール石鹼液の塗布³⁹⁾、セファゾリン、クロラムフェニコール³⁷⁾、ベンジルペニシリンプロカイン、硫酸カナマイシン、プロメライン軟膏の塗布⁴⁰⁾、0.2%オキシテトラサイクリン溶液の70%アルコール噴霧³⁰⁾など、これらの溶解液濃度や量、投与回数などに多少の違いはあるが本菌は多種類の抗生剤に反応することが判明している。また5%ホルマリン液も用いられたが、かえって疼痛が激化して治癒を妨げることがあるため、現在は使用されていない²⁹⁾。病巣表面がはがれるほど擦りながら洗浄することが、薬剤の浸透効果を高めると思われる。ミルクングパーラーではホースからジェット水流を直接患部にあてると、素早く患肢を挙げる反応がみられる。このように個体の治療には保定の後に抗生剤の塗布や注射、包帯を施し、群治療には蹄浴や薬剤のスプレー治療を行う。処置後、患部の疼痛および跛行は24時間以内に消失するが、1~3ヵ月後に再発することがあるので、治療ならびに予防にあたっては長期にわたる予後観察と衛生管理の徹底が必要である。また再発現象が牛の抵抗力の減退による不完全治癒が再び悪化するのか、隣接部位に新しく発生(再感染)するのかの検討は今後の課題である。

一度汚染された牛舎を清浄化することは困難なため、病原菌の侵入を極力防止することが肝要である。そのためには導入牛は蹄の観察を入念に行い、四肢蹄の消毒(例えばゲンチアナバイオレット製剤溶液による洗浄、塗布、スプレーなど)の徹底とともに、罹患牛の発見時には隔離して徹底治療をする。また獣医師、削蹄師、入工授精師などの訪問者の衣類や履物、使用機器などの衛生管理も必要である。フットバスは大量の薬剤を使用するため経済的な面、薬液の汚染、廃液の処理などの問題があり、スプレー噴霧がより実際的であるとも思われる。カリフォルニアでは1997年にPDDワクチンが承認されている⁶⁾。*Sperpenns* sppを殺菌し水酸化アルミニウムでアジュバンドしたもので、2週間間隔で3回投与するが、わが国では普及の段階に至っていない。

おわりに

牛体を家屋にたとえるならば、肢蹄は柱と土台であり、定期点検やメンテナンスを怠れば徐々に蝕まれ傷つき、その結果、家屋は傾き崩壊するのと同様に、牛体も機能の低下が見られ始め、生産性に支障をきたすようになり、肢蹄疾患と認識された時点には既に治療の適期を過ぎている場合も多く、廃用という結末をたどりやすい。体型の大型化、高泌乳化が進んでいる乳牛にとって、育成期の飼育管理は重要で、新生子牛への十分な哺乳、育成牛への良質粗飼料の給与と運動に重点を置き下痢などの疾患を予防することが基本である。またフリーストールなどの集団飼育による多頭化、省力的管理が蹄疾患の発生に拍車をかける状況下にあると予想されるため、護蹄管理の重要性について酪農家の関心を高めるよう護蹄衛生の啓蒙を図るなど、多因子疾患の発生要因探索に努め、カウコンフォートの導入を積極的に契めることが肢蹄疾患の予防となり、健康維持にもつながるのである。

参考文献

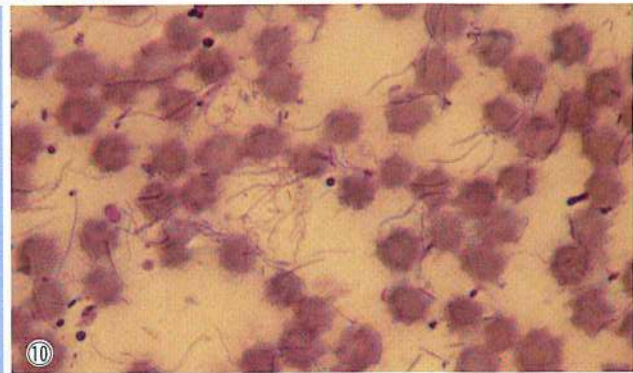
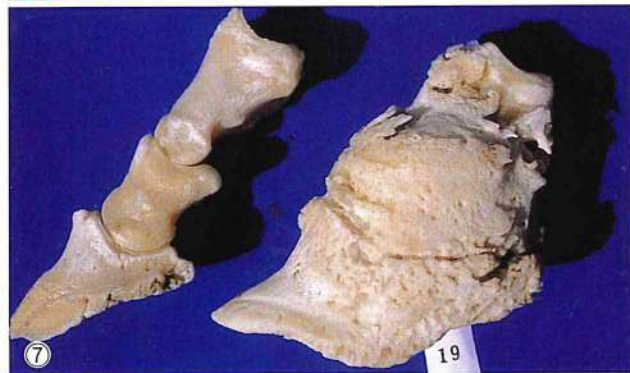
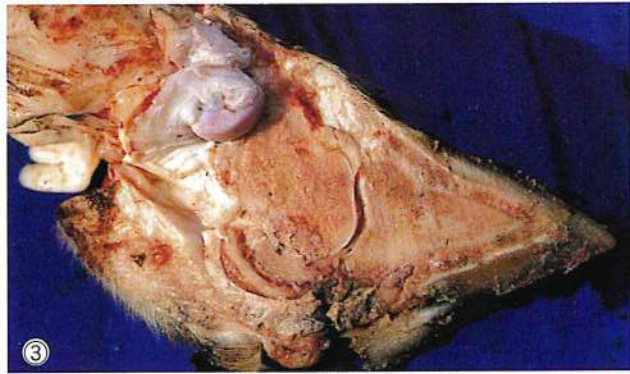
- 1) 阿部紀次：洗練された蹄病治療。臨床獣医17. 6：29～33. 1999.
- 2) 阿部栄・小屋正人・酒井淳一ら：乳牛の起立様式と関節疾患への影響。日獣会誌51：70～75. 1998.
- 3) Adams. O. R. : Rameness in Horses, Lea&Febiger Philadelphia. 1962.
- 4) 青木仁久, 米内山秀昭, 田口雅持ら：乳牛蹄病の発生実態とその原因調査。畜産の研究34. 3：27～32. 1980.
- 5) 青木修：削蹄とフットケア。臨床獣医8. 5：4044. 1990.
- 6) Blowey R W, Sharp M W : *Vet Rec*, 122, 505～508. 1988.
- 7) Cheli R, Mortellaro CM : Proceeding of 8th Intetnrafional Congress on Diseases of Cattle, Milan. Italy. 208, 1074.
- 8) David C. Van Metre : 「安全な分娩のさせ方と蹄病の予防」講演要旨, 2000
- 9) 遠藤洋, 小形芳美, 高橋浩吉ら：疼痛ストレス評価を用いたフリーストール農場の蹄病対策。家畜診療. 50 (4) : 241～248. 2003.
- 10) Fowler, G. R. et al. Disease of cattle, Am. Vel. Publ. Inc., Illinois 1956.
- 11) 後藤正雄, 加藤寿次, 岡田佳之ら：分娩前後における乳牛蹄壁角質アミノ酸組成の変化。日獣会誌48：250～253. 1995.
- 12) 後藤正雄, 岡田佳之, 川路利昭：横転棒による乳牛の横臥削蹄法。畜産の研究. 50. 1：62～64. 1996.
- 13) Greenough. P. R. et al : Rameness in Cattle. 5～6. 73～76. 1972.
- 14) Greenough. P. R. MacCallum, F. J. & Weaver, A. D : Rameness in Cattle 2nd ed. 1981.
- 15) Greenough, P. R., Weaver, A. D., : Lameness in Cattle. 3rd ed., 96～99, Saunders, Philadelphia. 1997.
- 16) 幡谷正明：牛の蹄病について。家畜診療268：3～18. 269：5～14.
- 17) 幡谷正明：わが国における牛の蹄病の実態。臨床獣医. 4. 10：19～22. 1986.
- 18) 樋口豪紀：栄養学的側面からの蹄病コントロール～ビオチンの可能性。臨床獣医24.5：36～38. 2003.
- 19) 広瀬恒夫：乳用牛の運動器疾患の予防に対する考え方。家畜診療. 353：5～13. 1992.
- 20) 本田学：蹄尖部の短削等による蹄病の予防効果。家畜診療. 45 (8) : 527～531. 1998.
- 21) 藤井多加治, 亀森泰之：飛節外腫に対する蹄病軟膏の応用。家畜診療346：39～42. 1992.
- 22) 井出良一：乳牛の蹄病における機能的削蹄。家畜診療. 46 (5) : 297～304. 1999.
- 23) 石井亮一：乳牛のルーメンアシドーシスと潜在性蹄葉炎。家畜診療. 46 (3) : 139～147. 1999.
- 24) 籠田勝基, 多賀伸夫, 村上光一ら：乳牛の関節周囲炎の臨床および病理学的所見。日獣会誌. 43 : 874～879. 1990.
- 25) 家畜共済の診療指針1：牛の運動器疾患の診療指針。農業共済協会. 2002.
- 26) 亀谷勉：角質の理化学的組成からみた蹄の管理。臨床獣医8. 5：30～38. 1990.
- 27) 川路利昭：削蹄による経済効果。臨床獣医. 12. 6：41～45. 1994.
- 28) 香月智弘, 吉谷一紀, 鈴木敏夫ら：管内乳牛の蹄病発生状況。家畜診療. 286：21～26. 1987.
- 29) 木村容子, 高橋正博, 松本尚武ら：搾乳牛の症状皮膚炎および趾乳頭腫症。獣畜新報. 46. 11 : 899～906. 1993.
- 30) 小岩政照：いま注目される疾患。臨床獣医. 16.9:12～15. 1998.
- 31) 小久江栄一, 中川巳津英, 井出良一：牛のフットケアに使う薬1, 2. 臨床獣医17. 13 : 84～87. 1999. 18. 1. 78～81. 2000.

- 32) 黒崎尚敏, 山下彰一, 田中健ら: 乳牛の蹄底腐爛における蹄底角質成分と飼養管理について. 家畜診療. 275 : 25~32. 1986.
- 33) 日下雅人: 管内における乳牛の蹄病の発生状況と飼養管理について. 家畜診療287 : 25~29. 1987.
- 34) 松田真二, 南部弘, 中館正吉ら: 乳牛蹄病の発生実態とその原因調査. 臨床獣医 4. 10 : 1986.
- 35) Mieth, K. & Ritter, K : Die wirtschaftliche Bedeutung der Klauenerkrankungen unter besonderer Berücksichtigung der Klauenamputation. *Mh : Vet, Med.* 23 : 617~621, 19.
- 36) 森田正治: 草地型酪農地帯での関節疾患について. 獣畜新報783 : 16~19. 1986.
- 37) 永井文紀: トレポネーマ様らせん菌による乳牛の疣状皮膚炎および趾乳頭腫症の集団発生. 日獣会誌53 : 577~581. 2000.
- 38) 永坂喜義: 蹄は酪農の基本. 臨床獣医. 12. 5 : 36~38. 1994.
- 39) 内藤克志, 佐貫吉孝, 滝尻新史ら: 大型酪農家において多発した蹄疾患の発生状況. 家畜診療45 (8) : 533~539. 1998.
- 40) 中間實徳, 松本治康, 蘭森竜雄: 乳牛の関節炎とその起炎菌について. 日獣会誌. 23 : 423~441. 1970.
- 41) 野矢秀馬, 大竹修: 乳牛に発生する飛節周囲炎と蹄異常との因果関係および予防対策. 家畜診療. 382 (4) : 9~13. 1995.
- 42) 小野宏男, 金内剛: 乳牛の関節炎廃用事故多発要因についての検討. 家畜診療. 362 : 38~42. 1993.
- 43) 大森雅彦, 長谷川隆: ホルスタイン種乳用牛の趾皮膚炎発生例. 紫葉. 42. 37~40. ちばNOSAI連. 1997.
- 44) 大西真美, 小林斎司, 橋本幸昌ら: 乳牛の蹄疾患に対する早期焼烙療法実施の効果について. 臨床獣医. 4. 10. 45~49. 1986.
- 45) 荻野好彦, 嵐泰弘, 佐野努ら: 乳用牛飛節周囲炎に対する圧迫包帯の治療効果. 家畜診療. 46 (1) : 21~25. 1999.
- 46) 大竹修: 岡山県における乳牛のいわゆる関節炎の実態と対策. 家畜診療. 287 (5) : 17~24. 1987.
- 47) 大竹修: 乳牛における飛節周囲炎の病態調査と対応策. 家畜診療. 359 (5) : 13~18 : 1993.
- 48) 大竹修: 肢蹄疾患との戦い. 臨床獣医. 12. 5 : 17~20. 1994.
- 49) 大竹修, 野矢秀馬, 奥山琢之: 最近多発傾向にある乳牛の疣状皮膚炎. 家畜診療. 46 (3) : 163~168. 1999.
- 50) 大竹修, 野矢秀馬, 奥田宏健: 乳牛に発生した疣状皮膚炎の病態調査と対応策. 家畜診療. 47 (5) : 337~343. 2000.
- 51) 大竹修, 野矢秀馬, 田浦保穂ら: 乳牛蹄疾患のMRI診断の可能性. 家畜診療. 413 : 37~41. 1997.
- 52) 大竹修: 肢蹄疾患牛の趾骨所見. 家畜診療48 (5) : 319~324. 2001.
- 53) 大竹修, 野矢秀馬: 飛節および蹄異常牛における蹄内部の病変. 45 (2) : 93~98. 1998.
- 54) 大竹修, 安井正広, 岡本一則: ウシ細菌性心内膜炎の実態調査と確定診断へのアプローチ. 家畜診療310 : 28~35. 1989.
- 55) ReadDH, WalkerRL, CastroAE, SundbergJP, ThurmondMC : *Vet Rec.*, 130, 59~60. 1992.
- 56) ReadDH : Footwarts (PDD) ; An emerging epidemic in dairy cattle? Proceeding, 33rd Annual Dairy Cattle day, University of California at Davis, 15~19. 1994.
- 57) ReadD, and WalkerR : Experimental transmission of papillomatous digital dermatitis in cattle. Proceeding of the 77th Annual Meeting of the CRWAD : 607. 1997.
- 58) RebhunWC PayneRM, KinKJM, et al : Interdigital papillomatosis, in dairy cattle. *J Am Vet Med Assoc.*, 177 : 437~440. 1980.
- 59) 佐々木伸夫, 望月学: 乳牛の蹄病の現状と将来. 家畜診療. 381 : 5~11. 1995.
- 60) 佐藤隆司, 加藤康宏, 島田泰孝ら: 乳牛の運動器病の研究 (第1報) 飛節疾患に関する実態調査. 家畜診療. 45 (4) : 239~243. 1998.
- 61) 杉山定, 植月義友, 亀森泰之ら: 乳牛の肢蹄疾患に対する綿状キトサンの応用効果. 家畜診療. 370 : 27~29. 1994.
- 62) 蘭中篤: 繁殖黒毛和種における蹄病の発生要因. 18. 2 : 28~34. 2000.
- 63) 杉本智, 吉谷一紀: 一繋ぎ牛舎に発生した乳用牛の趾皮膚炎. 紫葉. 44 : 54~58. NOSAI千葉. 1999.
- 64) 高桑一雄: 牛飛節外腫の手術法. 獣畜新報706 : 22~24. 1980.
- 65) 高橋孝志, 福田修, 大久保彰夫ら: 県内で発生したPapillomatous digital dermatitisとその病理学的検討. 栃木県衛生研究年報33 : 15~18. 1998.
- 66) 田口清, 阿部紀次, 大谷昌之ら: 乳牛における酸性イオン硫酸銅液による蹄浴の蹄性状に及ぼす効果. 家畜診

- 療. 394 : 3 ~ 8. 1996.
- 67) 田口清 : 牛蹄の蹄底潰瘍? . 臨床獣医. 17. 6 : 34~38. 1999.
- 68) 田口清 : 蹄の深部感染症治療時の乳量減少. 臨床獣医. 17. 8 : 92~95. 1999.
- 69) 田口清 : 「蹄病コントロールのためのアプローチ」の考え方と方法. 臨床獣医. 18. 12 : 18~22. 2000.
- 70) 竹内啓ら : 第93回日本獣医学会講演 : 244. 1982.
- 71) 田中智夫, 大橋恒雄, 谷田創ら : 乳牛における削蹄が搾乳量に及ぼす影響. 日本家畜管理研究会誌30 (2) : 45~51. 1994.
- 72) 上坂仁美 : 関節炎の調査について. 家畜診療. 164 : 27~29. 1977.
- 73) 内田佳子, 竹内造成, 安藤由章ら : 牛の蹄底真皮および表皮の走査電顕所見. 日獣会誌. 44 : 1010~1013. 1991.
- 74) 宇津田嘉弘 : 牛舎構造と蹄病. 臨床獣医 4. 10 : 24~29. 1986.
- 75) 安富一郎 : 蹄葉炎多発群に対するアプローチ. 臨床獣医17. 6 : 24~28. 1986.
- 76) 吉谷一紀 : 乳牛の蹄病について. 家畜診療412 (10) : 3~16. 1997.
- 77) 吉谷一紀 : カウ. カンフォートと蹄病. 臨床獣医18. 12 : 23~27. 2000.

附 図 説 明

- Fig. 1 飛節周囲炎 小児頭大に膨隆した嚢胞の下部が自潰排膿
- Fig. 2 擦過で壊死, 化膿, 潰瘍化し病巣 蹄疾患が併発
- Fig. 3 蹄底潰瘍の矢状断
- Fig. 4 蹄底角質の欠損と真皮層の化膿性肉芽
- Fig. 5 MRI所見
- Fig. 6 蹄ブロックの装着
- Fig. 7 感染性骨膜炎で仮骨化した趾骨瘤 (左は健康趾骨)
- Fig. 8 蹄球上部皮膚に発生した病変 接触により激痛を呈する
- Fig. 9 切除した病巣 イソギンチャク様のヒゲ
- Fig. 10 病巣部にみる螺旋菌



総 説

牛胚，体外受精用器具の開発と実用化

鈴木 達行*

〔受付：2003年10月20日〕

REVIEW

DEVELOPMENT AND PRACTICAL USE OF EQUIPMENT FOR EMBRYO TRANSFER AND *IN VITRO* PRODUCTION OF BOVINE EMBRYOS

Tatsuyuki SUZUKI

Formerly, Professor of Yamaguchi University, 1677-1

Yoshida, Yamaguchi City, 753-8515 Japan

〔Received for publication : October 20, 2003〕

For the purpose of flushing or transferring the bovine embryos, kinds of medical equipment such as the twelve-hole balloon catheter, the automatically flushing instrument, the cervical mucus remover, the ova collector dish, the transfer gun with plastic cover, were developed. More recently a portable dioxide incubator was developed to help *in vitro* production and reconstruction of cloning bovine embryos. Today all these types of equipment are put to practical use in the clinical field. The ultrasound scanner is used to collect ova from the bovine ovary. It is equipped with a probe with an 18G needle for ova collection and production of *in vitro* fertilized bovine embryos. These types of equipment are useful for production of *in vivo* and *in vitro* bovine embryos. But they are not perfect yet. Further improvement of these inventions are expected and needed.

要 約

12穴式バルーンカテーテル，自動灌流器具，粘液除去器，胚回収シャーレ，プラスチックカバー付き胚移植器などが牛の胚回収や移植器具として開発された。今日，これらの器具は臨床現場で実用的に用いられている。その後簡易炭酸ガス培養器が体外受精やクローン胚構築のため開発された。超音波画像診断装置に18G針付きプローブを用いて牛卵巣からの卵子回収により体外受精を試みる研究も進んでいる。これらの器具は体内や体外受精胚構築のため有効である。しかし，これらの器具は完成されたものではないので，今後更なる改善が必要である。

緒 言

1970年代の始め，カナダやアメリカ合衆国において企業ベースで始まった牛の胚移植技術は今日世界各地で実用的に取り組みられるようになった。牛胚移植技術の開発，実用化に伴い体外受精技術の研究が進むと，初期胚の培養や凍結保存，ガラス化保存技術の実用化が一段と進んだ。しかし，これらの技術上，今日，実用的に用いられている器具，器材は未だ完成されたものとは言い難く，多くの改善点が求められる。本報では特に牛の胚回収，移植と体外受精技術で実用化された器具器材の開発経緯，その特性と改善点について解説する。

* (株)フレンドセル研究所・所長(前山口大学教授)

牛の胚回収に用いられる器具器材

牛の胚移植技術は供胚牛への過剰排卵処置、胚回収、胚鑑別、胚保存、受胚牛の発情同期化と移植の各部門から成り立っている。この過程で用いられている胚回収と移植の関連器具器材の開発状況と実用化について以下に述べる。

* 牛の胚回収用カテーテル

牛の胚回収を目的とした器具開発の歴史は古く、1949年にRowsonとDowling、1950年にDracyとPetersenによって試みられたのが最初である。その後20年を超える長い年月を経てSugieら(1972)が独自の非手術的方法により牛胚の回収に成功すると、再び本研究実用化への意欲が呼び起こされた。こうしてTestartとGodard(1975)、Alexanderら(1976)、Elsdenら(1976)、Rowら(1976)、Ayalonら(1978)、Newcombら(1978)、SchneiderとHarn(1979)らによって開発が進み、今日にみられるような非手術的胚回収法が確立された。

初期の研究では金属製の円筒の先にフレキシブルなゴム製のチューブを付け、その繋ぎ目に風船を付けてストッパーとし、子宮頸管内で固定後両子宮角から胚を洗い出す方法が試みられた。この方法では胚回収のために多量の灌流液が用いられた。その後改善が進み、カテーテル全体がフレキシブルなシリコン製またはゴム製になった。主として人体用の16G、18G、20Gの風船付きカテーテルを改造したもので、先端部から10~15cmのところのところに風船があり、これを子宮内で膨らませてストッパーとし、左右子宮角を各々灌流する方法であった。カテーテルを子宮内へ挿入する際には拡張棒で子宮頸管を拡張したのち、カテーテル内部へスチール製内芯を入れて固定する方法が採られた。カテーテルの先端部には数箇所穴が開いていて、これを介して灌流液の流入、流出が出来る仕組みになっている。しかし、これらのバルーンカテーテルでは灌流の際に目詰まりが生じ、スムーズに回収できない事例があり、

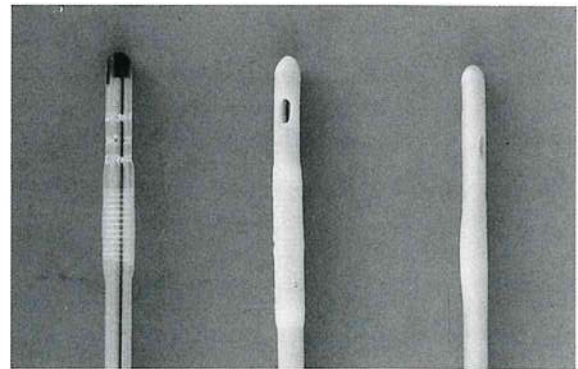


Fig. 2 2穴と12穴式バルーンカテーテルの先端部位

Table 1 2と12穴別バルーンカテーテルによる卵、胚回収成績(鈴木ら, 1986)

カテーテル	供胚牛数	黄体数	卵、胚回収数
12穴	21	16.33±8.75	14.90±8.26
2穴	21	16.95±6.66	10.00±5.94

構造上の改善が求められた。そこで鈴木ら(1986)は先端部に直径2mm大のスリバチ状の穴を12ヶ所開けたバルーンカテーテルを開発し、従来の2穴のものに比べて胚回収率の高いことを示した。

これまでの2穴式バルーンカテーテルの穴の大きさは長径6.5mm、短径3.5mmの楕円である。これに対して多孔式バルーンカテーテルの穴の大きさは表面が直径2.0mm、内面が直径1.5mmのスリバチ状の円形である。2穴式バルーンカテーテルでは2つの穴が灌流の際に粘膜に密着したり、粘液で閉ざされたりする事例が生じた。これに対して多孔式バルーンカテーテルでは幾つかの穴が粘膜に密着したり、粘液で塞がれたりしても、その他の穴は開いていて灌流がスムーズに行える利点があった。このようにして開発された多孔式バルーンカテーテルは今日、わが国のみならず、海外の多くの国で普及している。

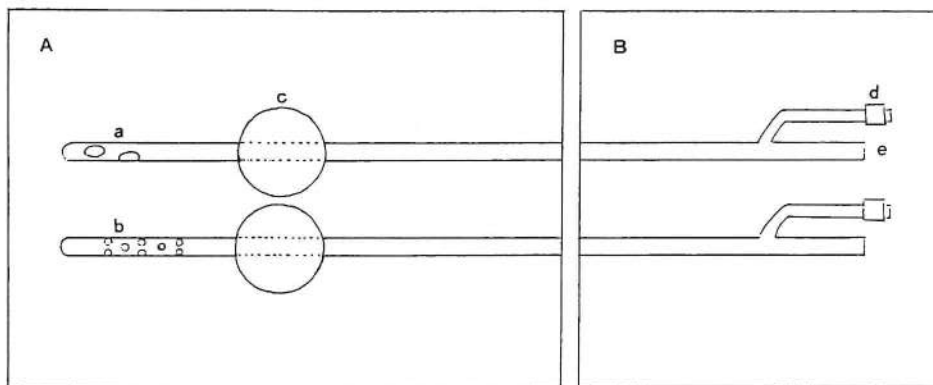


Fig. 1 多孔式バルーンカテーテル

Balloon catheter for non-surgical flushing of ova in cattle. A and B: The distal and proximal ends of the two types of balloon catheter. (a) 2 holes 5mm in diameter. (b) 12 holes 2mm in diameter. (c) balloon. (d) Airduct for balloon inflation. (e) Cannula for flushing.

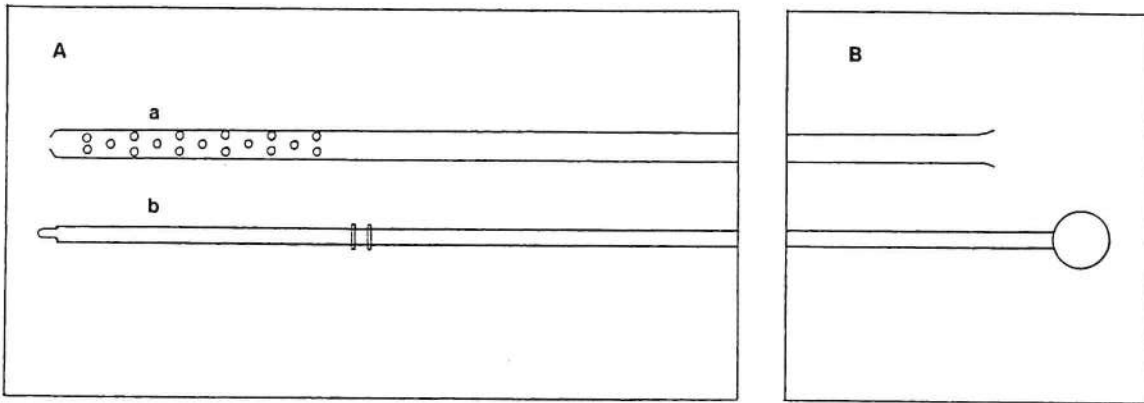


Fig. 3 粘液除去器

Cervical mucus remover for removing the mucus from the cervix before flushing the ova in cattle.

- A and B: The distal and proximal ends of cervical mucus remover.
 (a) 18 holes 2mm in diameter
 (b) steel bar
 (c) 2 rings for vacuum aspiration of the outer sheath

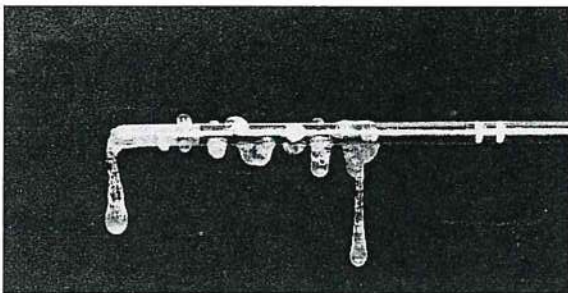


Fig. 4 粘液を除去した状態

A new cervical mucus remover after removing the mucus.

* 子宮頸管粘液除去器

一般に牛胚は受精後7~8日目に非手術的に子宮を灌流して回収される。この時期の子宮頸管は外界からの異物の侵入を防止するため固く閉ざされ、粘着性の強い粘液で充満している。鈴木ら(1987)は胚回収前にこれらの粘液を除去する器具を開発した。本器具は長さ40cm、直径6mmのシリコン製で先端から10cmの場所まで直径2mm大の穴を18ヶ所開けた外筒部と直径4mm、長さ43cmのスチール製内芯部とからなり、内芯部の先端から15cmのところを外筒と内腔に密着するようにリングがついている。使用時には器具の先端が子宮頸管経由で子宮体へ届いた時に内芯を約15cm程度陰外へ引きながら粘液を取り出す方法である。

Table 2 子宮頸管粘液除去と未除去による牛胚の回収率(鈴木ら, 1987)

粘液除去	供試牛数	黄体数	粘液による灌流支障頭数	卵, 胚回収数
無	43	13.64±6.40	5	8.52±6.82a
有	38	13.93±6.85	0	12.05±7.86b

a & b: p<0.05

その結果子宮頸管内から多量の粘液が除去され、灌流によるバルーンカテーテルの目詰まりが防止でき、胚の回収率が高まった。

* 胚回収シャーレ

灌流した胚を顕微鏡下で探し出すためには、灌流液をメスシリンダーや灌流瓶に集め、30分間静置したのち、30分間かけて上層からサイフォンにより徐々に液を抜き取り、容器の底に沈殿した100ml程度の液を4~5枚のシャーレに分注して鏡頭する静置法(Elsden et al., 1976, Sreenan, 1978)が用いられた。1980年代に入ると米国市場では底部に75μmのメッシュを貼り付けた円筒状容器が胚回収用に販売されるようになった。本器具の原理は胚の大きさが直径約150μmなの

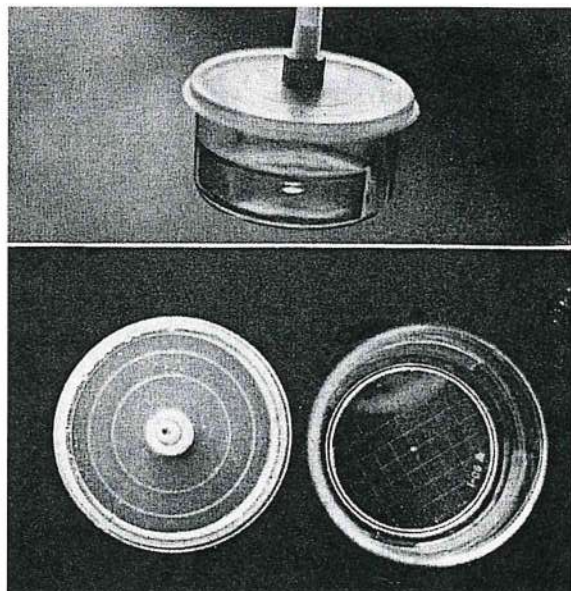


Fig. 5 胚回収シャーレ

A new collective dish for collecting the embryos.

で、それよりも小さい75 μ m大のメッシュ付き容器内に胚を集めることである。しかし、この方法では集めた胚を検索するために回収液を一旦シャーレに取り出さなければならず、手間がかかった。そこで鈴木ら(1987)は灌流後直ちに胚の検索が出来るように高さ4.5cm、直径8cmのプラスチック製円筒状で、底から1cmの所から高さ1.5cm、幅7.5cmの75 μ mのメッシュを2箇所貼り付け、取り外しの可能なシリコン製の蓋付き容器を開発した。本器具は以下に述べる自動灌流器具にセットできるため、胚回収から胚検索までの時間が短縮された。

* 自動灌流器具

これまで一般に用いられてきた牛胚の灌流方法は、灌流液の入った容器を牛の外陰部から1m程度の高さに吊るし、その落差によって液を子宮内に注入し、数回に分けて洗い出す方法や灌流液の入った50mlのシリンジをバルーンカテーテルの外口に連結し、必要量を子宮内へ送り込んだのち、吸引して洗い出す方法などである。しかし、これらの方法では灌流液が外気に晒されるため、特に冬季では回収された胚が寒冷感作を受けることになる。また、灌流した液をメスシリンダーや試験管などに集めるため補助者が必要であり、手技に手間がかかるなどの難点がある。そこで、これらの問題を解消するために電動式のポンプ圧で灌流液を子宮内へ送り、胚を回収する自動灌流装置が開発さ

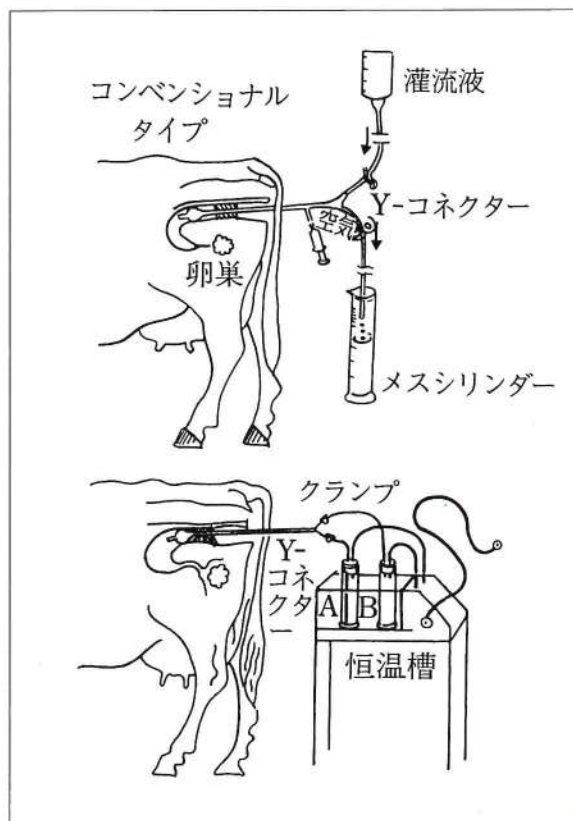


Fig. 6 胚回収シャーレ牛胚の自動灌流法と静置法

れた(鈴木ら, 1984)。その後、本器具は改善が進み挿入管を電動式リングで扱って灌流液を子宮内へ送りこむシステムが採用されている。本器具にセットされている1リッター容量のプラスチック製円筒容器内に灌流液が満たされる。この容器の蓋で固定された底部から立ち上がる吸引管と注入管が連結されている。注入管が電動式リングにより扱かれると灌流液が吸い上げられ、子宮内に固定したバルーンカテーテル内に注がれる。注入される液量は20, 30, 40, 50mlまたはマニュアルで設定される。一方、胚を洗い出した回収液はバルーンカテーテルと連結された流出管を経て1リッター容量の円筒状容器上層部に取り付けられた回収シャーレ内に戻される。これらの液の注入、回収は注入、流出管に取り付けたコックまたは自動的開閉で行う。このようにして灌流された胚は直接回収シャーレ内に集められる。本器具の操作には補助者は不要で、取り出された胚は生体内の環境下に近い状態で保持されるため生存性が高まる。また、操作が衛生的であり、かつ人件費の節約に繋がる。

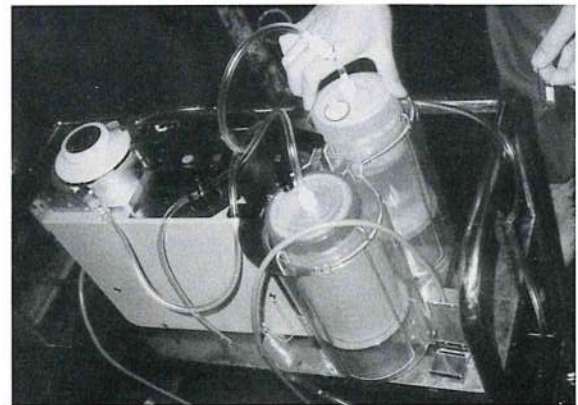


Fig. 7 自動灌流器具

* 胚移植器

受胎牛に胚を移植する黄体期には子宮頸管が固く閉ざされ、外界からの異物や細菌などの侵入を阻止している。このような環境下で非手術的に胚を移植する時、移植器が通過する膣前庭や子宮頸管内の細菌を子宮内へ持ち込む危険性が高い。膣前庭、膣深部と子宮頸管内の細菌を調べた実験では、深部に向かって細菌数が減少し、黄体期の子宮頸管では90.9%が陰性で、子宮体からは検出されていない(鈴木ら, 1982)。これらの細菌を移植器の挿入の際に子宮内へ持ち込まないように、移植器をセロファン紙で覆い、子宮頸管に達したところでこれを破り、子宮体へ挿入する方法(Rowson *et al.*, 1953)や膣内を薬液で洗浄した後に移植する方法、さらには2重に移植器を覆い、外側の覆いで膣内を、内側の覆いで子宮頸管を通過させる方法(Brand *et al.*, 1976)などが試みられた。高橋ら(1981, 1982)は金属製人工授精器を改造してノース

式移植器を作製し、これに紙の覆いをしたものと覆いをしない方法で移植し、受胎率を比較した。その結果、紙の覆いをしたものが覆いをしないものに比べて有意に高い受胎率を示した (63.6%対33.3%)。

Table 3 ノース型移植器へのシース有無別牛胚の移植成績 (高橋ら, 1981)

シース	移植子宮角		計
	左	右	
有	5/9	9/13	14/22 (63.6) a
無	3/9	5/15	8/24 (33.3) b

a & b: p<0.05

この報告以来、膣内を通過させる移植器にプラスチック製の外筒 (鈴木ら, 1982) やビニールカバーが取り付けられるようになった。更にSuzukiら (1990) はプラスチック製カバーを2重にし、外側の筒を膣内、内側の筒を子宮頸管通過まで覆い、膣内の細菌や子宮頸管内粘液、血液を子宮内へ持ちまなない器具を開発した。

フランス製人工授精器、カスーガンを用いた胚移植成績はSreenan (1975), BrandとDrost (1977), ShneiderとHahn (1979), 鈴木ら (1982) によって報告された。その後カスーガンは胚移植用に改善され、長さ54cm, 内径2mmのスチール製円筒内に長さ55cm, 直径1.5mmのスチール製内芯が挿入できる形になった。移植時には長さ10cm, 直径1.8mmのプラスチック製ストロー内に適量の移植液と共に胚を収めたのち、スチー

ル製内筒の先端部へストローを挿入し、長さ54cm, 内径2.5mmのプラスチック製外筒内に収める。この時スチール製内芯を10cm程度引き出して置く。次いで長さ30cm, 直径8mmのプラスチック外筒またはビニール製覆いでカバーして膣内へ挿入し、子宮頸管外口のところでカバーを破り、黄体側子宮角内へ移植する方法である。これに対してノース式移植器は世界各地で実用化された金属製人工授精器を改造したものである。最初の報告は1981年に高橋らが用いた改良型ノース式胚移植器である。その後、ドイツ、中国や米国などでも独自に実用化された。ノース式胚移植器は長さ7~8cm, 直径3.5~4mmの金属製チップにストローをセットし、胚を押し出すための内芯 (長さ54.5cm) の付いた長さ47cmの金属製円筒を連結して移植する方法である。ノース式移植器は金属製であるためオートクレーブによる消毒が可能で、移植前に拡張棒で子宮頸管を拡張したりするカスー式移植器に比べて有利性がある。

Roweら (1980) がげん部開腹法と非手術的移植法で牛胚を移植して受胎率を比較したところ、それぞれ75%と45%となった。同様にHaslerら (1987) の実験では、この割合が73%と50%であった。このように子宮角深部に移植する手術法では子宮角中央付近に移植する非手術的移植法に比べて受胎率が高い。ところが非手術的移植により子宮角の深部と中央部に牛胚を移植して比較した実験では両者の受胎率に差異がみられなかった (Sreenan JM., 1978., Newcomb *et al.*, 1977)。その後、多くの研究者が同様な実験を試みて



Fig. 8 開発した移植器
受精卵用シース管 NFA 490

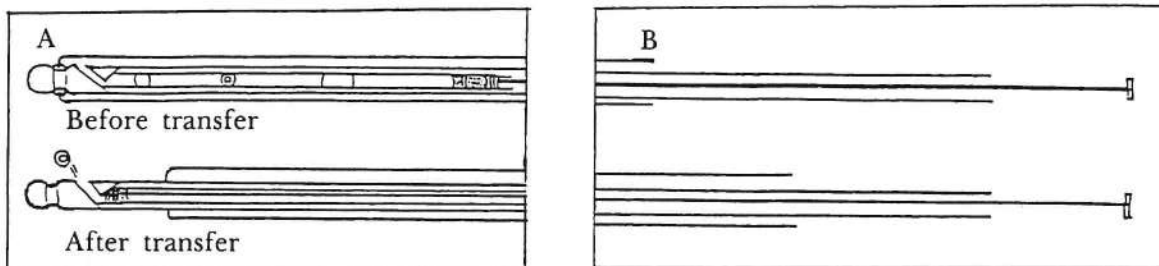


Fig. 9 開発した移植器具
An improved non-surgical embryo transfer instrument.

A and B: The distal and proximal ends of non-surgical embryo transfer instrument.

きたが、受胎率に差異がみられなかったという報告が多い。しかし、現行の非手術法では手術法と同様な子宮角深部への移植は困難であり、これらの研究での子宮角深部とは手術法での胚移植位置とは明らかに違いがある。このように非手術的法和手術法における受胎率の差が、胚の注入位置の違いで生じるという考えは否定できない。その解決のため移植器の先端をフレキシブルにして子宮角深部へ注入する器具の開発が幾度となく試みられたが、安定した高い受胎成績は得られず、今日なおも実用化に至っていない。手術法では開腹後子宮角卵管移行部から5~10cmの深い場所へ胚が移植される。これに対して非手術法（頸管経由法）では子宮角外側分岐部（External uterine bifurcation）から5cm程度奥へ移植される。子宮粘膜を傷つけることなくもっと深部へ挿入できれば受胎率の向上が期待できるかもしれない。また、非手術的移植で問題なのは子宮の最適な位置へ移植器先端を導入しても、移植器の内芯を押し込む際にステップが遠すぎることである。このため挿入操作で力が散漫して移植器先端への配慮が疎かになり、子宮粘膜に傷害を与えかねない。この解決のためには移植器内芯をボタン操作で自動的に胚が子宮内へ挿入できるような器具の開発が望まれる。

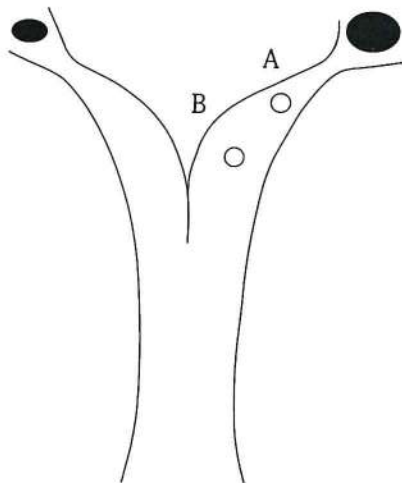


Fig. 10 胚の移植部位

- A. 手術的移植による胚の移植部位
B. 非手術的移植による胚の移植部位

* 超音波画像診断装置を用いた牛の生体内卵母細胞採取法

Brackettら（1982）が牛の体外受精で産子を得ると、本技術の研究に拍車がかかり、Hanadaら（1986）、Gotoら（1987）、Fukudaら（1990）によって完全体外培養技術が開発された。これらの研究で用いられた卵子は主に食肉処理場由来のものであったが、同時に生体内から採取する研究も進んだ。

牛を対象とした超音波画像診断装置を用いた生体内

卵母細胞採取法はGallsen（1987）、Pieterse（1988）らにより報告されたのが最初である。この方法では卵子の由来が明確であること、若齢牛からの卵子吸引が可能であること、同一牛から繰り返し卵子の回収ができる等の利点がある。しかし、使用機器が高価なことや、吸引操作に高い技術力を要することなど多くの課題が残されている。

一般に子牛ではeCG/FSHで処置後卵巣から卵子が吸引され、体外受精される。Rickら（1996）、Yangら（1997）は、それぞれ6ヶ月齢、5~11ヶ月齢の子牛から卵子を吸引し、体外受精により産子を得ている。

Table 4 若齢子牛からの生体内卵子の採取と体外受精成績 (Yang et al., 1997)

子牛月齢	5	7	9	11
移植可能胚数	8	19	13	3
産子数	1	5	7	1

妊娠牛からも卵母細胞が採取され、体外受精される技術が確立されている。これらの若齢や妊娠牛を対象とした生体内卵母細胞採取には高い技術と細心の注意が必要となる。

Table 5 妊娠牛からの経膈卵母細胞採取と体外受精 (Ooe M., et al., 1997)

処理回数	回収卵子数	胚盤胞数
5	4.6±1.5	1.4±0.8

吸引装置はモニターとしての超音波画像診断装置と探触子、吸引針と吸引ポンプとからなる。画像の解析度が良ければ、小さな卵胞の確認が容易で、卵子採取率が高まる。解析度はモニターの品質と探触子の超音波頻度に依存している。超音波頻度には5.0MHz、6.5MHz、7.5MHz力価のものが市販されているが、この数字が大きいものほど解析度が高く、5.0MHzでは小卵胞の識別が困難である。探触子は超音波走査線が平行なりニア型と放射状のコンベックス型とがある。前者は走査線の有効範囲は広いが扁平で立体像が得られず、卵胞への針の穿刺が難しい。これに対して後者では走査線の有効範囲は狭いが、立体的で卵胞への針の穿刺が容易である。

吸引針では針先の角度の鋭い方が鈍いものよりも卵子回収率が高く、吸引圧も低く設定できる。針先の角度が鈍いものでは吸引力を高めることになるが、これにより卵丘細胞が損失するとBolsら（1998）は述べている。Hasimotoら（1999）が生体内卵子吸引において、針のサイズを18と21G、吸引圧を40、80、120と160mmHgで比較検討したところ、針は細い18G、吸引

圧は低い例で採取された卵子の品質が良好であった。吸引圧を高めれば吸引卵胞数に対する採取卵子数の割合が増加するが、卵子の卵丘細胞を剥離し細胞質の低下を誘起する。卵子採取では出血を伴う場合が多いため、血餅による吸引針の閉塞が起こる。この予防のため、吸引針の内部をヘパリン添加灌流液で満たしておく必要がある。また、探触子は一旦腔内へ挿入するとずり落ちないように先端が固定できるものが望ましい。

* 陰圧式炭酸ガス培養器

初期胚の発生を促すために様々な培養液やガス培養器が開発され市販に至っている。一般に体外受精で用いられるガス培養器には酸素5%、炭酸ガス5%と窒素90%の気相、もしくは炭酸ガス5%と空気95%の気相である。これらのガス培養器は大型で且つ高価であり、発展途上国や現場での使用には制限がある。そこ

で開発されたのが陰圧式炭酸ガス培養器 (Suzuki *et al.*, 1999) である。本器具は小型 (縦4cm×横15cm×幅10cm; 0.67リッター容量のプラスチック製容器) で、この中に卵子の入った培地を入れ、直径3.3cm、高さ1cmの小型のシャーレ内に炭酸ガス発生用の粉末 (Tartaric acid: 420mg, Carbonated hydrogen sodium: 460mg, Silicon fiber: 10mg) を0.35g添加したのち、コンテナから空気を-300mmHgバキュームポンプで除去する。その後空気除去孔から5mlの純水を入れてガスを発生させる。本器具を用いたクローン胚の作出では市販の炭酸ガス培養器よりも高い成績が得られている (Varisanga MD., *et al.*, 2000, 2002)。また、本器具により作り出した核移植胚を中国へ輸送し、クローン牛の作出に成功した (Dong YJ., *et al.*, 2003)。これは陰圧による酸素量の減少が初期胚の発生に良好な環境を構築したためと思われる。

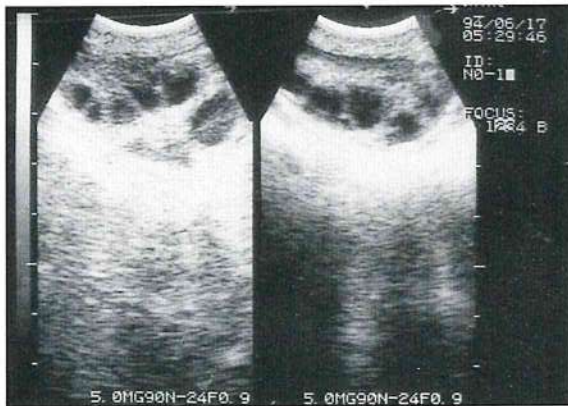


Fig. 11 卵巣の超音波画像

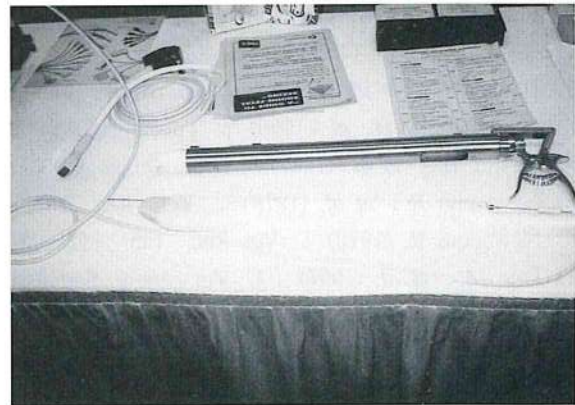


Fig. 12 生体内卵子吸引用プローブ

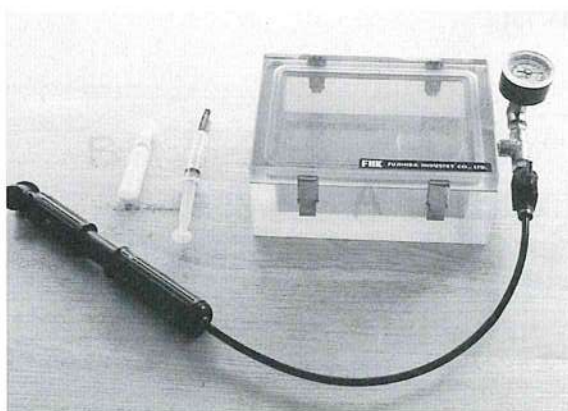


Fig. 13 陰圧式炭酸ガス培養器

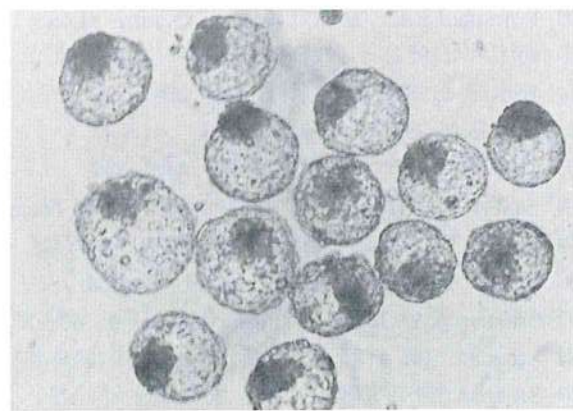


Fig. 14 脱出胚盤へ発育した牛胚

終りに

本報では主として胚移植と体外受精技術に関連した器具器材の開発経緯と課題について述べたが、これらの器具器材の開発は日進月歩である。より使いやすく、成果の高いものが期待される。胚回収用のバルーンカテーテルを子宮内へ挿入する際、先端から内芯を10cm程度抜いて更に深部へ挿入する方法が採られる。水牛では子宮角外側分岐部から20cm程度深部へカテーテルを挿入しないと胚の回収が難しい。このように動物種の違いによって用いる器具器材も異なってくる。胚を凍結するプログラムフリーザーでは-5°~7℃に達した時に人為的に植水をする

る。現存する市販器具で自動植氷の信頼できるものは無い。人為的植氷は胚へ温度変化を齎し、生存性への傷害になりかねない。今日超音波診断装置も小型化し、腕に固定して鮮明な画像解析が可能となった。妊娠胎子の発育状況や性別診断に高い効果が期待される。将来はもっと軽量でノートパソコンのような鮮明な画像装置が開発されるものと思われる。器具器材の良し悪しは自分達の研究成果へ直結している。そのため研究者自らも日頃から関連器具器材の開発に着目する必要がある。

参 考 文 献

- 1) Alexander AM., *et al.* (1976) : *Vet. Rec.* 99, 221 (Letter).
- 2) Ayalon NY., *et al.* (1978) : *J. Reprod. Fertil.* 54, 483~493.
- 3) Bols *et al.* (1998) : *Theriogenology* 49, 983~995.
- 4) Brackett BG., *et al.* (1982) : *Biol. Reprod.* 52, 319~324.
- 5) Brand A., Drost M. (1977) : E. T. in farm animal (K.J. Bettridge, ed.) Agriculture Canada, 31~34.
- 6) Gallsen *et al.* (1987) : *Theriogenology* 27, 217 (abstract).
- 7) Dong YJ., *et al.* (2003) : *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* (in printing).
- 8) Dracy AE, Petersen WE. (1950) : *J. Dairy Sci.* 33 : 797~782.
- 9) Elsdon RP., *et al.* (1976) : *Theriogenology* 6, 523~532.
- 10) Fukuda Y., *et al.* (1990) : *Biol. Reprod.* 42, 114~119.
- 11) Goto K., *et al.* (1988) : *J. Reprod. Fertil.* 83, 753~758.
- 12) Hanada A., *et al.* (1986) : *Ann. Meet. Jpn. Soc. Zootech. Sci.* p18.
- 13) Hasimoto S., *et al.* (1999) : *Theriogenology* 52, 131~138.
- 14) Hasler JF., *et al.* (1987) : *Theriogenology* 27, 139~168.
- 15) Newcomb R., *et al.* (1978) : *Vet. Rec.* 102, 414~417.
- 16) Newcomb R. (1979) : *Vet Rec.* 105, 432~434.
- 17) Ooe M., *et al.* (1997) : *J. Vet. Med. Sci.* 59, 371~376.
- 18) Pieterse *et al.* (1988) : *Theriogenology* 30, 751~762.
- 19) Rick *et al.* (1996) : *Theriogenology* 45, 356 (abstract).
- 20) Rowe RF., *et al.* (1976) *Theriogenology* 6, 471~483.
- 21) Rowe RF., *et al.* (1980) : *Am. J. Vet. Res.* 41, 1024~1026.
- 22) Rowson LEA, Dowling DF. (1949) : *Vet Rec.* 65 : 335~440.
- 23) Rowson LEA., *et al.* (1953) : *Nature (Lond.)*. 171, 749~751.
- 24) 鈴木ら (1984) : .家畜繁殖誌. 30, 194~196.
- 25) 鈴木ら (1982) : 日獣会誌. 35, 388~394.
- 26) 鈴木ら (1986) : 家畜繁殖誌. 32, 42~43.
- 27) 鈴木ら (1982) : 日獣会誌. 35, 440~443.
- 28) Suzuki T., *et al.* (1987) : *Jpn. J. Anim. Reprod.* 33 : 160~162.
- 29) Suzuki T., *et al.* (1990) : *Theriogenology* 34, 1051~1057.
- 30) Suzuki T., *et al.* (1999) : *Anim. Reprod. Sci.* 54, 149~157.
- 31) Sreenan JM. (1978) : *Theriogenology* 9, 69~83.
- 32) Sreenan, JM. (1975) : *Vet. Rec.* 96, 490~491.
- 33) Sreenan JM. (1978) : *Vet. Rec.* 102, 58~60.
- 34) Sugie T, *et al.* (1972) : *Natl. Inst. Anim. Ind. Bull.* 25, 27~34.
- 35) Schneider U, Harn J. (1979) : *Theriogenology* 11, 63~80.
- 36) 高橋ら (1981) : 家畜繁殖誌. 27, 54~57
- 37) 高橋ら (1982) : 日獣会誌. 34, 523~526.
- 38) Testart J, Godard-Siour C. (1975) : *Theriogenology* 4, 163~168.
- 39) Varisanga MD., *et al.* (2002) : *Theriogenology* 58, 77~86.
- 40) Varisanga MD., *et al.* (2002) : *Cloning* 4, 167~173.
- 41) Yang *et al.* (1997) : *Theriogenology* 47, 163 (abstract) .

原 著

糸状架橋構造 : *Trypanosoma evansi* の形態変化に及ぼす役割

比留木 武 雄*

[受付 : 2003年10月30日]

ORIGINAL ARTICLE

FILAMENTOUS BRIDGING STRUCTURE ; A ROLE PLAYING IN THE MORPHOGENESIS
OF *TRYPANOSOMA EVANSI*.

Takeo HIRUKI

Department of Microbiology and Immunology, School of Medicine, Shimane University.

89-1 Izumo-shi, Shimane-ken 693-8501 Japan

[Received for publication : October 30, 2003]

Even after 16 minutes of pronase incubation of 500 micrograms at final concentration per 1ml of 0.15M Na-K phosphate buffer (ph7.2), the rivet structures (*maculae adherence : m.a.*) of *Trypanosoma evansi* were confirmed to remain *in situ* with a transmission electron microscope, although Frevert, U. *et al*(1986) described in *T. congolense* that *m.a.* were completely removed after 2 minutes incubation of the pronase, at the same final concentration as this work. The flagellum exfoliated from the parasite body of *T.evansi* in this work, to my surprise, was proved to be accompanied by the architecture of *m.a.*

Hemphill *et al.*(1991) demonstrated clearly in *T. brucei* that there was a filamentous bridging structure (: **FBS**) joining the paraxial rods of the flagellum to the subpellicular microtubules of the parasite body. FBS appears to be an adhesive structure appendant to the *m.a.* as seen in the **transmembrane linker** of **mammalian desmosomes**. Therefore, the flagellar exfoliation from the parasite body in *T.evansi* would be responsible for not the digestion of *m.a.* but that of the **FBS**.

Moreover, the morphological alteration from the slender form to the stumpy form may be attributed not to the flagellar internalization and the subsequent accumulation of cell organelles at the former posterior end of the parasite body, but to the digestion of **FBS**. Because the **intermediate filaments** and the **FBS** (or **transmembrane linkers**) together with the *m.a.* (or **cytoplasmic plaques**) are considered to relate to the cell shape and the localization of cell organelles, including a kinetoplast, as well as the flagellum-to-cell joining, by the analogy with **mammalian desmosomes**.

緒 論

トリパノゾーアの細胞の形態的变化は、生活環 (life cycle) の中のmorphological transformation^{1,3&21)}と呼ばれる形態的変異と、消化酵素などの作用を受けた場合の退行的変化のひとつとしての形態変化 (morphological alteration or morphological change)^{6,9,10&11)}の二つの変化があることが知られている。

Frevert U. *et al.* (1986)⁶⁾は*Trypanosoma congolense* (*T. congolense*) を用いて、この後者の場合の形態変化について

電子顕微鏡を用いた研究を行い, pronase 500 micrograms/1mlの投与を受けた場合, 消化時間2分で細胞のデスマゾーム様の接着構造{これを原虫学領域では*macula adherens* (*m.a.*^{6, 10&13})またはrivet structure^{16, 17&19}と呼んでいる。}を完全に失い, その後, 細胞への鞭毛の内在化 (Flagellar Internalization: FI) する様々な過程を観察した⁶。彼女らは感染動物の血中trypomastigotesの形態が, 細長い螺旋状のslender form (sl-form) から使用したpronaseの作用でお玉杓子様の不格好な形態 (tad-pole-like form or stumpy-form (st-form)) に変化するのには, *m.a.*が完全融解することで, 細胞本体へのデスマゾームによる結合力を失った鞭毛が細胞内に陥入して, 細胞内の小器官を連累して, 元の細胞の後端部 (Former Posterior End: FPE) と呼ばれる部分に巻きあがるためであるとした⁶。著者は, 全く, 同様な実験を, *Trypanosoma evansi* (*T. evansi*) で行い, その結果を本学会雑誌など^{9, 10&11}に既に報告してきた。

然し乍ら, 何故, トリパノゾーマ細胞が消化酵素の作用を受けて形態変化を起こすかについては, Frevert, U. *et al.*とは極めて対比的な実験結果を得ていたにも関わらず, 十分に論議を尽くしていなかった。*T. congolense*を用いたFrevert U. *et al.*の実験⁶では500 micrograms pronase per 1ml of Na-K PBS, 室温で2分の消化時間で*m.a.*が完全消失したのに, 著者の*T. evansi*を用いた実験では細胞死の直前 (pronase処理16分後) まで*m.a.*が残存した^{9, 10&11}。この相違に着目して, 今回はFrevert U. *et al.*⁶とは異なるトリパノゾーマ細胞が形態変化を起こすメカニズムについて合理的な説明を与える。

材料と方法

材料と方法は前回の報告^{9, 10&11}に詳述してあるのでそちらを参照されたい。

実験結果

前回の報告の実験結果に若干の新しい知見を追加して簡略に記述する。Fig. 1に示したのは*T. evansi*細胞浮遊液を氷上で, 約一時間40 micrograms per 1ml 0.15 M Na-K PBS (pH7.2) で処理して出現したst-form (Fig. 中右側の写真) と消化酵素を受ける前のsl-form (Fig. 中左側の写真) の*T. evansi*である。このように, *T. evansi*でも適当な条件下でmorphological alterationを生じることが明白である。

そのような細胞の内側には, 細胞内鞭毛 (Fig. 2の左側の写真参照) と, 二組の軸糸 (Axoneme: A) と傍軸糸棒paraxial rod: PR) のセットを一枚の鞭毛膜に包んだもの, これは二本の鞭毛が合体したものであるという考えの下に鞭毛合胞体 (Flagellar Syncytium: FS) と呼ばれている構造物 (Fig. 2の右側の写真参照) がしばしば認められる。

*T. evansi*の細胞浮遊液に最終濃度として500 micrograms per 1ml PBSとなるように調整したpronase酵素液を添加液として作用させるとFig. 4に示すごとく, その細胞膜の上に細胞代謝の結果累積されるペプチドグリガンの層, 則ち表面外套 (Surface Coat: SC)^{4, 7, 14, 15, 17&19}と呼ばれる構造物に, 経時的変化を生じる。それは消化酵素の作用によるSCの粗造化と非薄化に集約される。Fig. 3の (a) には, 消化酵素投与前のSCが観察される。SCは厚くcompactでrigidな層として観察される。そのSCの表面は滑らかである。この層の直下にあるのが細胞膜 (cytoplasmic membrane: CM) であり, 更にその下に, 約直径24nmの土管のように並んだ構造物が膜下微小管 (Subpellicular Microtubules: SPM) である。同じ図の (b) に示すのが, 処理2

分後のSCの所見である。Frevert, U. *et al.*⁶は処理2分後にはCMの直下にある細胞相互の接着構造である*m.a.*の完全消失を*T. congolense*で観察しているが, 著者の実験した*T. evansi*では, 細胞のSCの表面が (a) と比べて更に毛羽立っている (fluffier) 程度である。Fig. 3の (c) には処理4分後の, そして (d) には処理8分後のSCの変化を示した。処理4分後にはCMの上にはなお, SCの遺残物remnantsを認める。処理8分後にはSCは完全に消失していた。だが, 8分ではなお, 細胞の形態に顕著な変化を認めなかった。Fig. 4はpronase処理16分後の鞭毛 (flagellum: F) と細胞体 (虫体) (parasite body: PB) の接着構造 (*macula adherens*: *m.a.*) の“並び”が観察される写真である。周辺二本組微小管 (peripheral doublet microtubules: PDM)²⁰と鞭毛の中心に位置する中心二本組微小管 (central doublet microtubules: CDM)²⁰がFig. 4上部に認められる。これらはFの構造の一部である。Fig. 4下部に位置しているのはPBの前端部 (anterior end: AE)¹⁸である。この上部の鞭毛膜 (flagellar membrane: FM) と下部のPBを繋ぐ構造物が, それぞれの膜の直下に位置している*m.a.*である。この写真では用いたpronaseの作用が*m.a.*の接着部位ではなく, PBとFとがそれぞれの膜同士で接合している場所が, まず融解され, 小胞 (vesicles: V) を形成したものと考えられる。一般に*m.a.*の並びは, 細胞側か鞭毛側の何れか一方でのみ観察される場合が圧倒的に多いが, この写真では, その両方の側で相補的に観察される。Fig. 5にはPBの側に*m.a.*の配列を認められる。*m.a.*を認めない側には, 明瞭にPDMが認められるので, この構造体はFである。この図では, PBとFの間で解離がみとめられるので, *m.a.*の完全融解がFをPBから遊離させるという考えは明らかに,*T. evansi*には当て嵌まらない。Fig. 6にはF側に*m.a.*の配列を認める例である。この*m.a.*の認められる側の構造体がFであることは傍軸糸棒 (paraxial rod: PAR)¹⁸の網の目構造が認められる

ので判断される。この図でも、*m.a.*は既に剥離したFの構造物として、尚、維持されていることが分かる。

論 議

Table 1にFrevert, U. *et al.*⁶⁾の*T.congolense*を用いた実験の結果と著者が*T.evansi*を用いてFrevert, U. *et al.*⁶⁾と同じ処理時間間隔で、pronaseを同じ濃度(500 micrograms at final concentration / 1ml 0.15M Na-K PBS)で細胞を融解処理した時の経時的形態変化を比較対照した。

Table 1 Comparison of the Results between Both Investigators

Time after pronase administration	Frevert U. <i>et al.</i> (<i>T.congolense</i>)	T.Hiruki (<i>T.evansi</i>)
10 seconds	Not recognized any morphological change.	Not recognized any morphological change.
30 seconds	Not described.	Not recognized any conspicuous change.
1 minute	Not described.	SC became fluffy.
2 minutes	<i>M.a.</i> was removed Completely.	SC became more fluffier.
4 minutes	Flagellar internalization began.	SC remnants still remained.
8 minutes	Flagellar internalization finished.	SC was removed completely.
16 minutes	Not described.	<i>M.a.</i> still remained. Flagellar exfoliation with <i>M.a.</i> . Flagellar syncytium.
20 minutes	Vesicular remnants around the reservoir disappeared.	Cell was no longer alive.

要約すると、Frevert, U. *et al.*は*T.congolense*を用いて、pronase処理2分後には全く*m.a.*を認めず、完全融解したと考え、このために、FがPBから剥離し、遊離しFがpronase処理4分後から8分までに細胞内に入り込み、入り込んだFは基底小体(basal body: BB)のある細胞の後端部(posterior end: PE)に細胞内小器官(organelles: O)を連累して、巻きあがるために、通常は血中でst-formであるトリパノゾーマが、お玉杓子のような形のst-formに形態変化すると考えた⁶⁾。

著者の実験では、*m.a.*はpronase処理16分後にFがPBから剥離したF側(Fig. 6参照)とPB側(Fig. 5参照)の双方に剥離後も*m.a.*は維持されているので、*m.a.*が完全消失することにより、FがPB体側への結合から解かれるという考え⁶⁾は、*T.evansi*では成立しない。著者の実験では、処理20分後には全部の細胞が死滅してい

たが、処理16分後で尚、*m.a.*は維持されていた。*m.a.*が、*T.congolense*と*T.evansi*のpronaseの消化作用に対する感受性において、このような差異がある理由としては、もともと、*T.congolense*が蛋白融解酵素に感受性が高くSCの構成成分であるペプチドグリカンの大量収量を可能とするので抗原変異現象の解明を志す欧米のトリパノゾーマ研究者の間で賞用されてきた^{14, 15 & 16)}という事実を考えると、これは、単純にこの二つの系統の間で、pronaseに対して顕著な感受性の差があるためとしか考えられない。著者は、*T.congolense*では、余りに、細胞表面の構造の融解スピードが速いために、もともと観察頻度の低い*m.a.*の構造を観察することが極めて困難であったのではないかと推測している。同じトリパノゾーマの仲間の中で、FがPBから剥離する現象の仕組みに、それほど顕著な相違があるとは思われない。

ともかくもFがPBから剥離する前(Fig. 4参照)後(Fig. 5 & 6参照)で、明らかに*m.a.*の構造は維持されているので、別の剥離の原因があると考えられる。

接着構造*m.a.*は動物細胞相互を連結する構造として知られている、“desmosome: D”^{2, 5, 12, 13, & 22)}類似の構造である。

Fig. 7に動物におけるDの模式図を示した。この複式図は山科の単行書²²⁾に描かれたものであり、著者によって一部改変して再描写したものである。その原図はStaehelein & Hull (1978)¹³⁾の手になるもので、それは多くの教科書³⁾に採用されている。DにはStaehelein & Hull¹³⁾によって、transmembrane-linkerと名付けられた、一方のDからCMを貫通して相手側のD (cytoplasmic plaque) とを結び付けている構造が存在する。著者は山科²²⁾の命名に従って、このtransmembrane-linkerのことを、ここではマイクロフィラメント(microfilament: MF)と呼ぶことにする。このMFより径の大きいフィラメントがそれぞれの細胞内にあり、中間フィラメントまたは10nmフィラメント或いはトノフィラメント(intermediate filament or 10nm filament or tonofilament)と呼ばれている^{2, 5, 12, 13, & 22)}。

この構造物は細胞内小器官(organelles: O)の位置決定に重要な役割を果たし、全体として細胞の形態形成(morphogenesis)に関与することが知られている^{2 & 5)}。

このようなMF (or transmembrane-linker) はトリパノゾーマでは、Hemphill, A. *et al.* (1991)⁹⁾が、動物細胞と同様にPBとFを相互に結合する架橋構造として既に報告している。Fig. 8には、Fig. 9, 10 & 11のトリパノゾーマ細胞でのMFの観察の位置を示す目的で、sl-formと蛋白融解酵素処理後の形態変化であるst-formの模式図を示した上で、Hemphill *et al.*の観察した写真を再描写して、MFの架橋構造が分かりやすいように彩色して、それらを部位別にsite (1), site (2), site (3)に分けて示した。それぞれに前から順にre-

reservoir (R) 部, PB体側部, 前端部 (anterior end : AE) である. Fig. 9にはsite (1) ; reservoir (R) 部を示している. R内にはPDMが認められ, その下にあるPARからMFがCMを貫入してPB側のSPMと結合している. Fig. 10にはsite (2) ; PB体側部を示した. ここでも同様にPALとSPMは多数のMFによって相互に結合されている. 同様にFig. 11にsite (3) ; AE部を示した. AE部でもPBとFとは, PARとSPMを連結するMFによって結合されている.

これらの構造がFとPBを結合しているのので, PARやSPMの近くの*m.a.* (MFに対する舫い杭 (mooring pole) の役割をしている部分と考えられる) がpronaseの作用で消化されずに遺残しても, MFの融解断裂でPBとFの結合が解かれ, Fが遊離すると考えられる. 他方, OはMF (transmembrane linker) によってD (cyto-plasmic plaque) に固定された10nm filamentsによって, それぞれの固有の位置へ付置される (Fig. 7参照^{2, 5&12)}).

10nm filamentsが一般の動物細胞と同じく, トリパノゾーマでも細胞内のOの位置決めをしていると考えられるが, これを*m.a.*に固定する構造はやはり, MFであると推定される. それ故, MFが酵素処理によっ

て融解, あるいは断裂されるなら, Oは舫い杭 (Mooring poles) への接続を失った舟のような状態となるに相違ない. 他方, 細胞に運動という目的を果たすように, 体側に合理的構造としてMFによってFとPBを結合, 固定し, それ故に螺旋状の形態を維持していたトリパノゾーマは, FとPBとの結合するMFをpronaseの作用の結果, 融解されるともはや, 螺旋状の形態 (sl-form) を保持できなくなるものと推測される. この結果, 細胞は鞭毛のBB部分を中心に丸くなる (球状化 : Conglobulation) 現象 (結果的にst-formとなる.) を起こすものと考えられる (遊離細胞として最も安定な形状は球体であることが知られている).

この球状化した細胞の形状がMFの融解の程度で, その形が一定せず, 不恰好であるところから, これを従来は“st-form”と呼んできたものと考えられる.

要約すると著者のトリパノゾーマの消化酵素を用いた形態変化の研究は, PBとFを結合する構造として, *m.a.*ではなくMFの関与をクローズアップすることとなった.

このことは, PBとFとを結合する架橋構造としてのMFがトリパノゾーマ固有の形態形成 (morphogenesis) に深く関与することを示唆している.

文 献

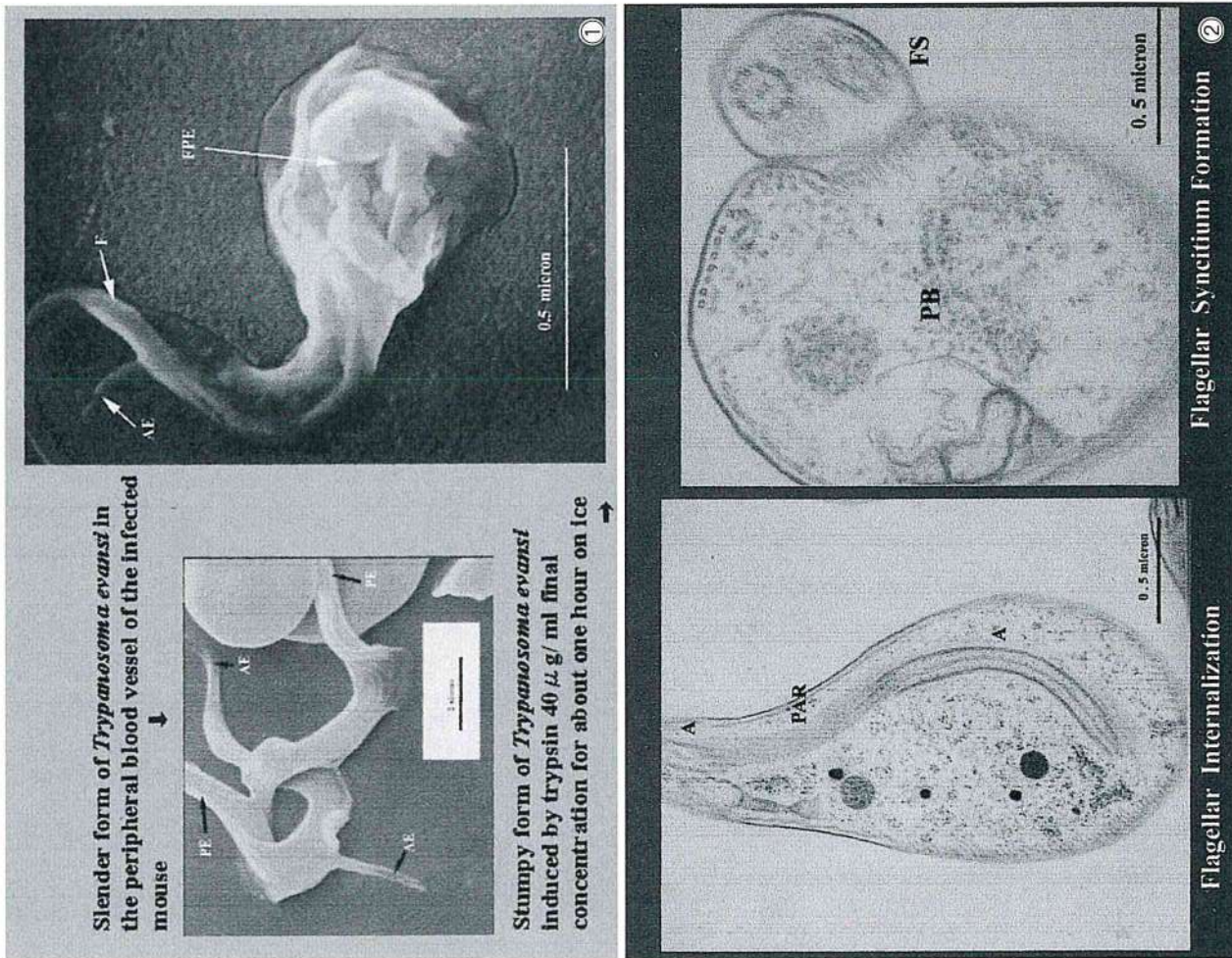
- 1) Böhringer, S. and Hecker H. : Quantative Ultrastructural Differences between Strains of *Trypanosoma brucei* Subgroup During Transformation in Blood. *J. Protozool.*, 21, 694~698, 1974.
- 2) Chidgey, M. A. : Desmosomes and Diseases. *Hist. Histopathol.*, 12 (4), 1159~1168, 1997.
- 3) Czichos, J. Nonnenengaesser, C. and Dverath, P. : *Trypanosoma brucei* : Cis-aconitate and Temperature Reduction as Triggers of Synchronous Transformation to Procyclic Trypomastigotes in Vitro. *Exp. Parasitol.*, 62, 283~291, 1986.
- 4) Duvillier, G., Aubert, J. P., Balts, T., Richet, C and Degand, P. : Variant Specific Surface Antigens from *Trypanosoma equiperdum* : Chemical and Physical Studies. *Biochem. Biophys. Res. Com.*, 110 (2), 491~498, 1983.
- 5) Fawcett, Don, W. (ed.) : Specializations of Epithelia In: Bloom and Fawcett, A Textbook of Histology, eleventh ed. pp64~71, W. B. Saunders Company, Tokyo, 1986.
- 6) Frevert, U., Ferzberg, F., Reinwald, E. and Risse, H. -J. : Morphological Changes in *Trypanosoma congolense* after preteolytic removal of the surface coat. *J. Ultrast. Mol. Res.*, 94, 140~148, 1986.
- 7) Gray, A. R. and Luckins, A. G. ; Antigenic Variation in Sarivarian Trypanosomes. In : Biology of the Kinetoplastida volume1, pp. 493~542, Lumsden, W. H. R. and Evans, D. A. (eds.), Academic Press, New York, 1976.
- 8) Hemphill, A., Lawson, D. and Seebeck, J : The Cytoskeletal Architecture of *Trypanosoma brucei*. *J. Parasitol.*, 77 (4), 603~612, 1991.
- 9) 比留木武雄 : *Trypanosoma evansi*の外被の蛋白融解酵素処理に伴う形態学的変化. 原生動物学雑誌, 33 (I), 68, 2000
- 10) 比留木武雄 : *Trypanosoma evansi*の外被の蛋白融解酵素処理に伴う超微細構造学的変化. 山口獣医学雑誌, 27, 19~32, 2000
- 11) T. Hiruki: A Role of *Macula adherens* Playing in Flagellar Syncytium Formation of *Trypanosoma evansi*. In : Mushi-no-shirase, first ed. pp. 243~260, edited by Yuzo Takahashi and Shiro Kasuya, Sankeisha (Nagoya), 2002

- 12) Kowalczyk, A. P., Bornslaeger, E. A., Norvell, S. M., Palka, H. L., and Green, K. J.: Desmosomes ; Intracellular Adhesive Junctions Specialized for Attachment of Intermediate Filaments. *Internat. Rev. Cytol.*, 185, 237~302, 1999.
- 13) Staehelin, L. A. and Hull, B. E.: Junctions between Living Cells. *Sci., Ame.*, 238, 140~147, 1978.
- 14) Reinwald, E., Rautenberg, P. and Risse, H.-J. : *Trypanosoma congolense* Mechanical Removal of the Surface Coat in Vitro. *Exp. Parasitol.*, 48, 384~397, 1979.
- 15) Reinwald, E., Heidrich, C. and Risse, H. J. : In Vitro Studies on the Biosynthesis of the Surface Glycoprotein of *Trypanosoma congolense*. *J. Parasitol.*, 31 (2), 300~306, 1984.
- 16) Vickerman, K.: The Fine Structure of *Trypanosoma congolense* in Its Blood Stream Phase. *J. Protozool.*, 16 (1), 54~69, 1969.
- 17) Vickerman K.: On the Surface Coat and Flagellar Adhesion in Trypanosomes. *J. Cell Set.*, 5, 163~193, 1969.
- 18) Vickerman, K. and Preston T. M.: Comparative Cell Biology of the Kinetoplastid Flagellates. In: *Biology of Kinetoplastida*, vol. 1, pp35~130, Lumsden, W. R. R. A. and Evans, D. A. (eds.), Academic Press, New York and London, 1976.
- 19) Vickerman, K.: Antigenic Variation in Trypanosomes. *Nature* 273 (5664) : 613~617, 1978.
- 20) Warner, F. D.: Macromolecular Organization of Eukaryotic Cilia and Flagella. *Adv. In Cell. Mol. Biol.*, 2, 193~235, 1972.
- 21) Yabu, Y. and Takayanagi, T.: Trypsin-stimulated Transformation of *Trypanosoma brucei gambiense* Blood-stream Forms to Procyclic Forms in Vitro. *Parasitol. Res.*, 74, 501~506, 1988.
- 22) 山科正平: 細胞を連結する釘——デスモゾーム——In: *細胞を読む* 講談社ブルーバックス, 89~99頁, 東京, 1993.

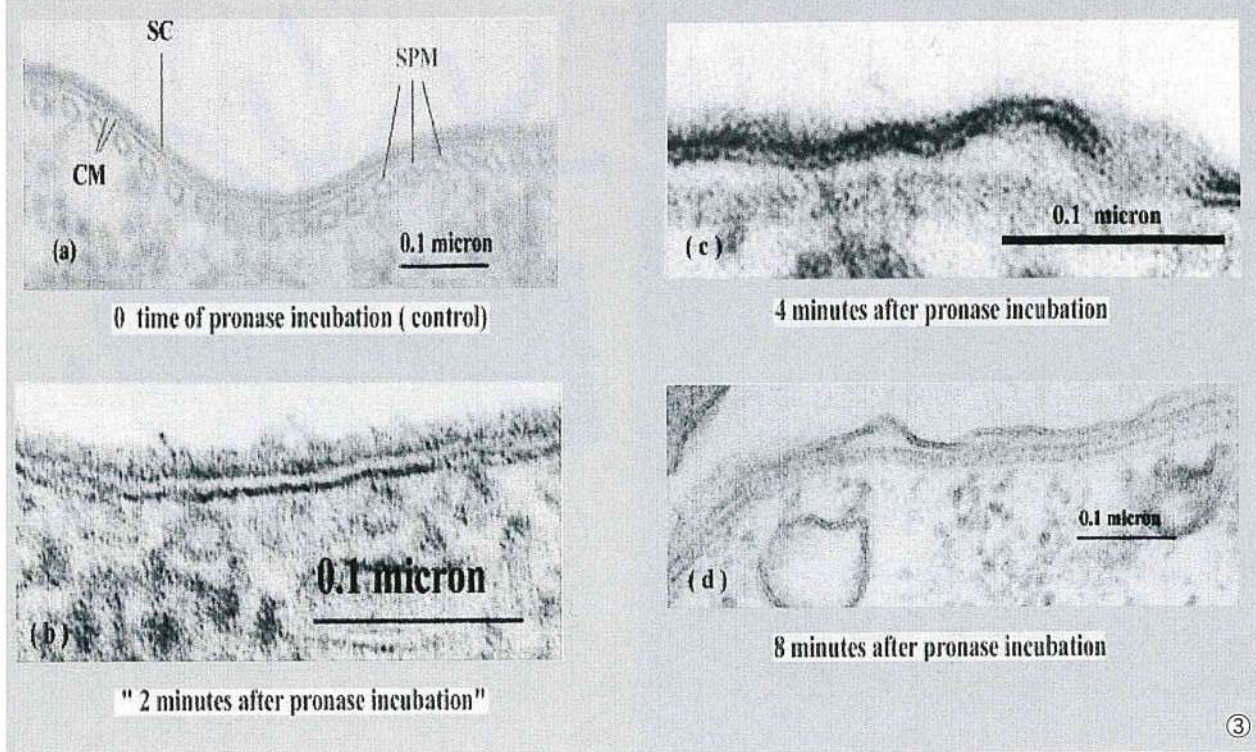
EXPLANATION OF THE FIGURES

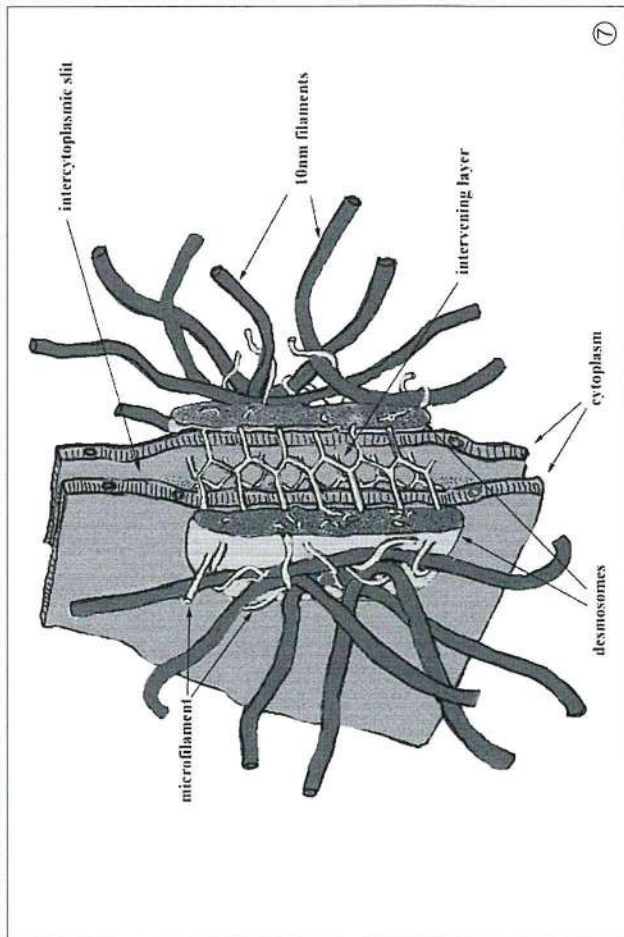
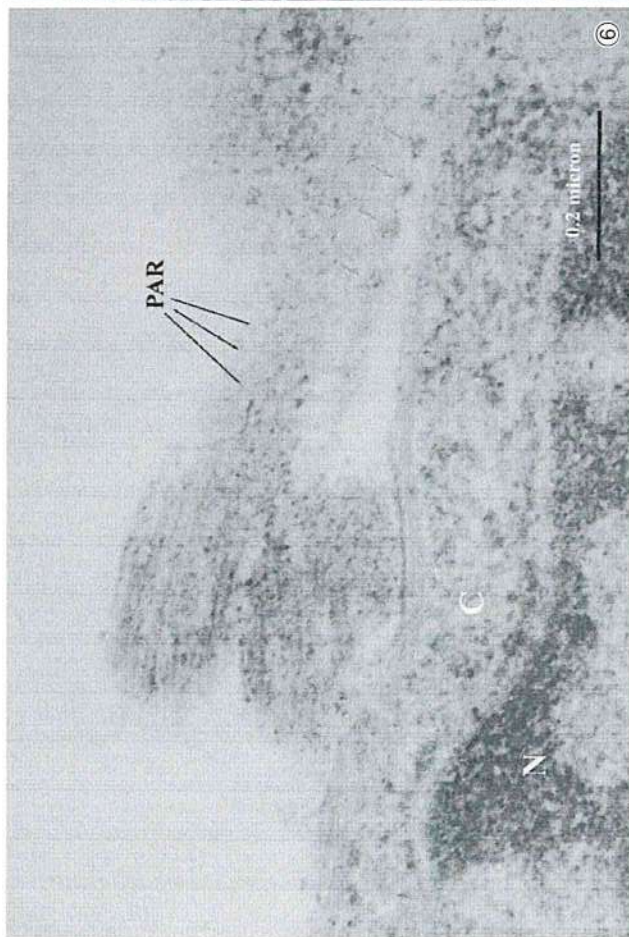
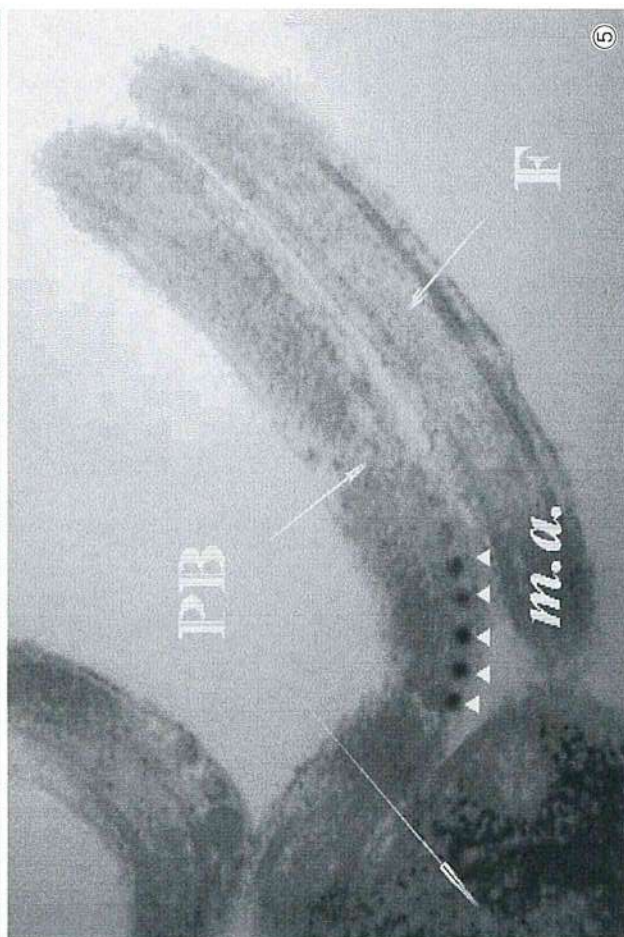
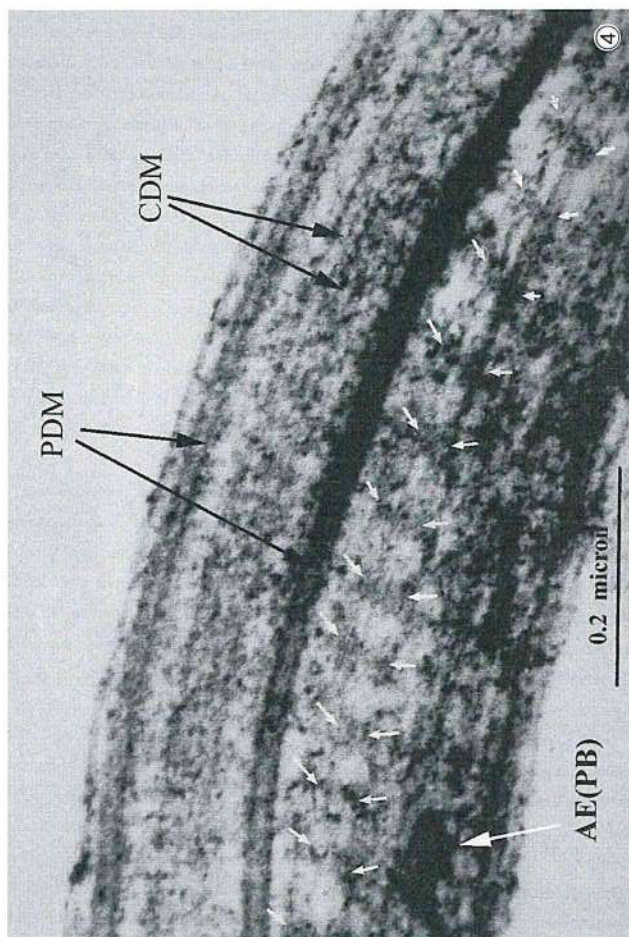
- Fig. 1 Left picture shows two trypanosome cells in slender form. PE : Posterior End, AE : Anterior End. Bar reveals 2 microns length. Right picture shows a trypanosome cell in stumpy form. F : Flagellum, FPE : Former Posterior End. Bar reveals 0.5 micron.
- Fig. 2 Left picture shows a trypanosome cell in which cytoplasm an axoneme (A) and a paraxial rod (PAR) are comprised without the flagellar membrane. Right picture shows a flagellar syncytium (FS) in which two sets of an axoneme and a paraxial rod exist. PB means a parasite body.
- Fig. 3 Chronometrical Changes of the Surface Coat Induced by Pronase Digestion.
Picture (a) shows the surface coat (SC) after 0 time of pronase incubation. SC was compact and rigid and had a smooth surface.
SPM : Subpellicular Microtubules, CM : Cytoplasmic Membrane. Picture (b) shows the surface coat after 2 minutes of pronase incubation.
SC became fluffier surface than picture (a). Picture (c) shows the SC after 4 minutes of pronase incubation. Most of the glycoprotein component was removed from the SC. The pellicle lying underneath of SC became to be exposed directly to the exterior environment. Picture (d) shows the SC after 8 minutes of pronase incubation. The glycoprotein component layer (SC) was removed completely at this time.
- Fig. 4 The early stage of vesicular formation observed between both membranes of F and PB. Between the vesicle and the next one, a pair of rivets (*m.a.*) joining two cell membranes together were observed (tiny arrows). Asterisks point out vesicles. A large arrow shows the anterior end (AE) of the parasite body (PB). PDM means peripheral doublet microtubules and CDM means central doublet microtubules. Bar represents 0.2 micron in length.
- Fig. 5 A trypanosome cell body showing an alignment of some rivets (*m.a.*)
Underneath of the cell membrane (CM) of the anterior end (AE), an alignment of rivets was observed after 16 minutes incubation of pronase. PB means parasite body, F means flagellum. A slit occurred between the F and the PB.

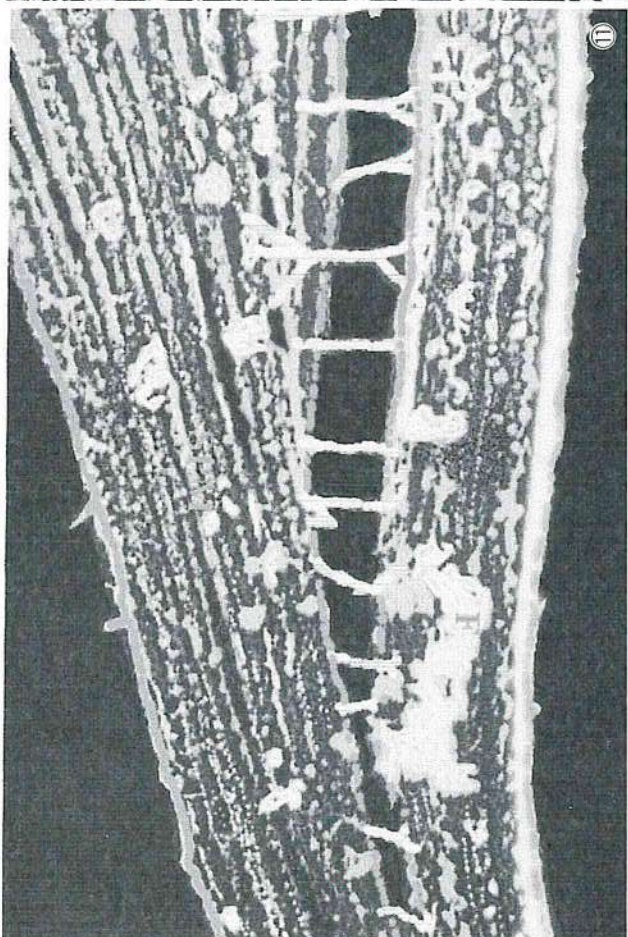
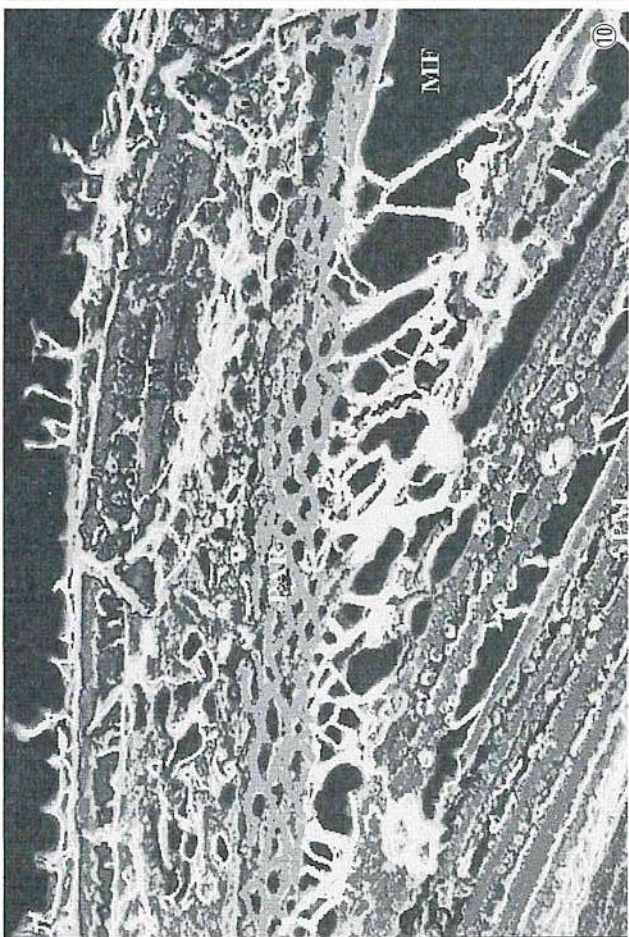
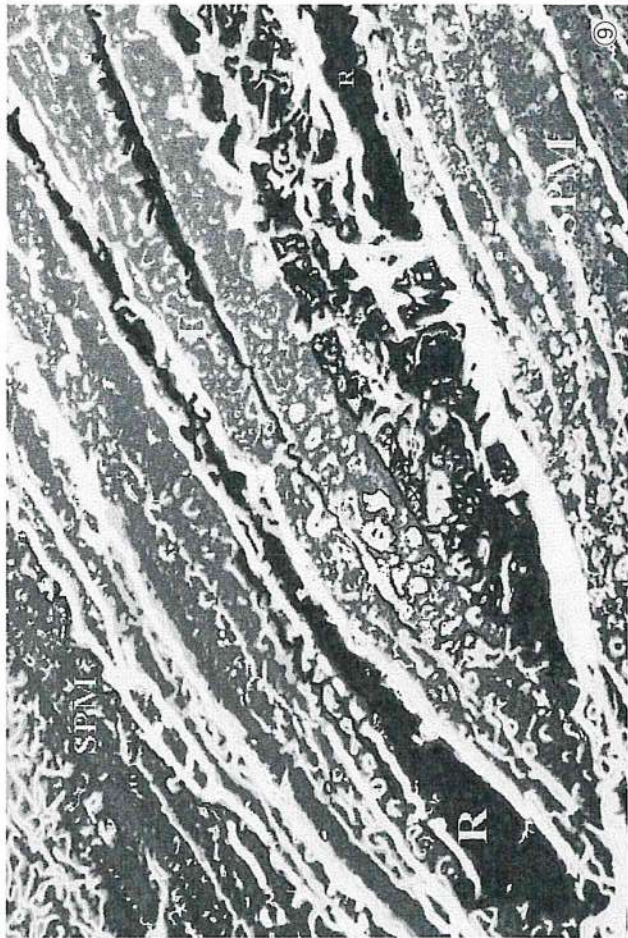
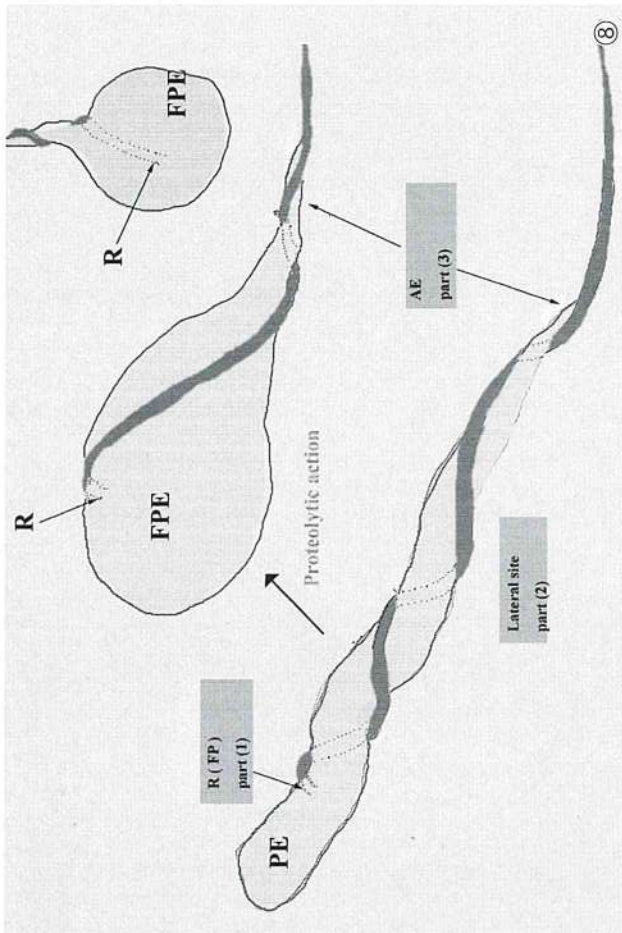
- Fig. 6 A trypanosome cell showing an alignment (short arrows) of some rivets (*m.a.*) on the FM after 16 minutes of pronase incubation.
A flagellum with obvious rivet structure (*m.a.*) began to be exfoliated from the PB at this incubation time. The meshwork architecture characteristic in the paraxial rods (PAR) was observed on the F. Bar reveals 0.2 micron.
- Fig. 7 A Schematic Diagram of a Set of Desmosomes.
One desmosome, in one-side cell of the partner cells, is combined with the cell membrane by tiny numerous microfilaments piercing the cell membrane, another desmosome in the counterpart cell is also combined with the cell membrane by the microfilaments.
Two neighboring cells is joined together by the consecutive microfilament piercing their own cell membrane and extending to the counterpart cell each other.
Moreover 10 nm filaments affording the peculiar locations to cell organelles are fixed on the surface of desmosomes by these microfilaments. Consequently these microfilaments can give the peculiar cell shape
- Fig. 8 This diagram represents the reservoir (R), the lateral (L) and the anterior end (AE) ; site (1), site (2) and site (3) respectively in the slender form of Trypanosome cell. The stumpy form of Trypanosome cell was also depicted.
- Fig. 9 Filamentous Bridging Structure of the Reservoir Portion in *T. brucei*
Microfilaments from paraxial-rods (PAR) of the flagellum (F), piercing both membranes of flagellum and cell, extend to the surface of SPM and join PAR to SPM.
This diagram was traced out and colored from the work of Hemphill, A. *et al*⁸⁾.
- Fig. 10 Filamentous Bridging Structure of the Lateral Portion of *T. brucei*
Numerous microfilaments join PAR to SPM likely as Fig. 9.
This diagram was also traced out and colored from the work of Hemphill, A. *et al*⁸⁾.
- Fig. 11 Filamentous Bridging Structure of the Anterior END (AE) Portion of *T. brucei*
Numerous microfilaments join PAR to SPM likely as Fig. 9 & 10. This diagram was also traced out and colored from the work of Hemphill, A. *et al*⁸⁾.



Chronometrical Changes of the Surface Coat Induced by Pronase Digestion







原 著

マイクロプレートを用いた *Salmonella* の H 抗原検査の方法の検討

富 永 潔*

[受付 : 2003年 9月 3日]

ORIGINAL ARTICLE

THE INVESTIGATION ON THE MICROPLATE METHOD
FOR IDENTIFYING H ANTIGENS OF *SALMONELLA*

Kiyoshi TOMINAGA

Yamaguchi Prefectural Institute of Public Health, 5-67 Aoi-2-chome

Yamaguchi-shi 753-0821 Japan

[Received for publication : September 3, 2003]

For the purpose of making a rapid examination and testing of many samples at the same time, as well as reducing financial cost for it, a study was conducted on the microplate method for identifying the flagellar antigens (H antigens) of *Salmonella*.

In a preliminary investigation the strength of agglutination was watched at 37°C for 60 minutes by changing the volume of antiserum and inactivated bacterial broth culture. The result showed that the reaction was the most obvious when 100 μ l of inactivated bacterial broth culture was added to 15 μ l of antiserum. Accordingly, the above condition was adopted for the following tests.

Using the reference strains, which belong to 3 serovars, and the field isolates from fowls and their environment, identification tests of H antigens were conducted both by the conventional method (tube agglutinations method, T-method for short) and microplate method (M-method). The results of both tests were identical, and, that is, the reliability of M-method was confirmed. The M-method needed only a quarter to one-fifth of the capacity for incubation, the volume of antiserum, and the inactivated bacterial broth culture which the T-method needed. The M-method was also able to examine many more samples rapidly at the same time. It can be said that the M-method is less expensive and more efficient.

要 約

検査の迅速化と多検体処理, ならびに経済的負担の軽減を目的として, マイクロプレートを用いた *Salmonella* の鞭毛抗原 (H抗原) 検査方法について検討した。

反応温度および時間を 37°C 60 分間とし, 抗血清と不活化菌液の量を変えて行った予備試験において, 抗血清 15 μ l に不活化菌液 100 μ l を添加して反応させた場合が最も明瞭な凝集が認められたため, これを検査方法とした。

3 種類の血清型に属する参照菌株ならびに野外における鶏や鶏舎環境からの分離株を用い, マイクロプレート法 (M法) と従来法 (試験管凝集反応法, T法) によりそれぞれ行った H 抗原検査成績は完全に一致したことから, M法の信頼性が確認された。また, Mにおける反応に要するスペース, 抗血清量, 不活化菌液量は Tの 4～5 分の 1 で, 非常に経済的のみならず, 一度に多数の検体を迅速に検査できる優れた方法であると考えられた。

* 山口県環境保健研究センター 〒753-0821 山口市葵 2 丁目 5-67

緒 言

Salmonella Enteritidisによる集団食中毒の発生増加^{1,6,9)}, また1999年1~4月における*Salmonella* Oranienburgによる全国的な食中毒の発生³⁾など, 現在*Salmonella*は食中毒の原因菌として極めて重要視されている^{1,2)}.

*Salmonella*には約2,400種類の血清型が知られており⁸⁾, *Salmonella*の同定にあたっては血清型別検査を行わなくてはならない^{5,7)}.

*Salmonella*の血清型は, 菌体抗原であるO群抗原および鞭毛抗原であるH抗原(1相, 2相)を検査しKauffmann-Whiteの抗原構造表により決定するが, H抗原検査は試験管凝集反応により行うこととされているため, 1株の検査に多量の不活化菌液(1相の検査に最少8.5ml), 抗血清(同, 最少1.02ml)および試験管(同, 最少17本)が必要で経費が高価となること, 培養菌液量が多量のため培養時間が長くなり迅速な検査に支障を来すこと, また反応温度が50~52℃とされており, その温度に設定したウォーターバスを別途用意して反応させなければならないため一度に検査できる株数が限られる, など現行の検査方法には多くの問題点がある。

そこで, 経費が安価で迅速かつ一度に多数の菌株の検査が可能と考えられる方法として, 96wellU底マイクロプレートを用いた検査方法について検討した。

材料および方法

1 材料

(1) 供試菌株: 血清型が判明している参照株として, 農林水産省家畜衛生試験場(現: 独立行政法人 農業・生物系特定産業技術研究機構 動物衛生研究所)から分与を受けた*Salmonella* sp.(1) serovar Enteritidis(SE), Typhimurium(ST), Choleraesuis(SC)の3株を用いた。また, 野外分離株として, 鶏や鶏舎環境から分離された*Salmonella*183株を用いた。その血清型は, Infantis(59株), Corvallis(31株), Bareilly(20株), Duesseldorf(12株), Mbandaka(11株), Havana(11株), Kiambu(7株), Oranienburg(6株), Enteritidis(5株), Agona(4株), Living-stone(3株), Brandenburg(2株), Schwarzenrund(2株), Virchow(2株) Emek(2株), Cerro(2株), Orion(2株), Kentucky(1株), Tompson(1株)であった。

(2) マイクロプレート: 96wellU底マイクロプレート(三光純薬, 東京)を用いた。

2 方法

(1) 被検用不活化菌液の作製: トリプチケースソイブロス(BBL, U. S. A.)を, マイクロプレート法(M法)

では3ml, 従来法(試験管凝集反応法 T法)では10ml用い, 被検菌をそれぞれ接種し, 37℃で6時間(M法)~18時間(T法)培養後, 等量の1%ホルマリン加生理食塩水を加えて被検用不活化菌液とした。

- (2) M法の反応条件の検討: Gを被検抗原(被検株は09:g, m:-血清型Enteritidis)とし, 不活化菌液量を10~100 μ lの間で10 μ l単位で変えて, 5, 10, 15 μ lのG抗血清(デンカ生研, 東京)に各々添加し, マイクロプレートミキサーで攪拌後, プレートシールで密閉し, 温度は孵卵器の通常の設定温度である37℃, 時間はT法と同様の60分間という条件で反応させ, その凝集像を観察した。
- (3) M法の信頼性の検討: 参照株3株および野外分離株183株について, M法とT法の検査結果を比較検討した。
- (4) 検査に必要な資材および環境条件の比較: M法とT法において, 1相のH抗原検査を10株実施するのに必要な抗血清量およびその費用, 不活化菌液量, 試験管本数, インキュベーション用スペースなどを試算し, 比較検討した。1回に検査する抗原数は, 基本の17種類に, 因子血清の内, 最も数の多いGの7種類を加えた24種類として試算した。T法における抗血清量は, 60 μ l(2滴の量を計測)とし, 費用は定価(税抜き)で算出した。インキュベーションスペースについては, マイクロプレート1枚の容積を, 約0.17リットル(8.5cm \times 13.0cm \times 1.5cm=165.75cm³), 100本用試験管立て1個の容積を, 約2.9リットル(18cm \times 17cm \times 9.5cm=2,907cm³)として試算した。

成 績

(1) M法の反応条件の検討

表1に示すように, 抗血清量が5 μ lでは不活化菌液の量が80 μ l以上で凝集が認められた。また抗血清量が10 μ lでは, 不活化菌液が80 μ l以上でやや強い凝集が認められた。

Table 1 抗血清量と不活化菌液量の検討 (M法)

抗血清(G) 量(μ l)	不活化菌液量(μ l)					
	5	10	15	20	30	40
5	-	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-	-
15	-	-	-	-	-	-
40	50	60	70	80	90	100
-	-	±	±	+	+	+
-	±	+	+	++	++	++
±	+	+	++	++	++	+++

* -: 凝集せず ±: わずかに凝集 +: 凝集
++: やや強く凝集 +++: 強く凝集

一方、抗血清量15 μ lでは、不活化菌液量100 μ lを添加した場合において、強く明瞭な凝集が観察されたため、M法の条件は、抗血清15 μ lに不活化菌液100 μ lを添加する方法とした。

(2) M法によるH抗原検査方法の作成

具体的な検査方法を作成するために必要なプレートの使い方について種々検討した結果、Fig. 1に示すように、マイクロプレート2枚を横方向に並べ、

17種類の抗血清 (a~l) を各々15 μ lずつ被検菌株の数に応じて (たとえば4株であれば上から4列まで) wellに添加し、横1列を1株分として、不活化菌液100 μ lずつを横方向17個のwellに添加する。以後同様に被検菌液すべてを1列ごとに添加し、マイクロプレートミキサーで30秒間攪拌後、プレートシールで密閉し37 $^{\circ}$ Cで60分間インキュベートする方法をM法によるH抗原検査方法とした。

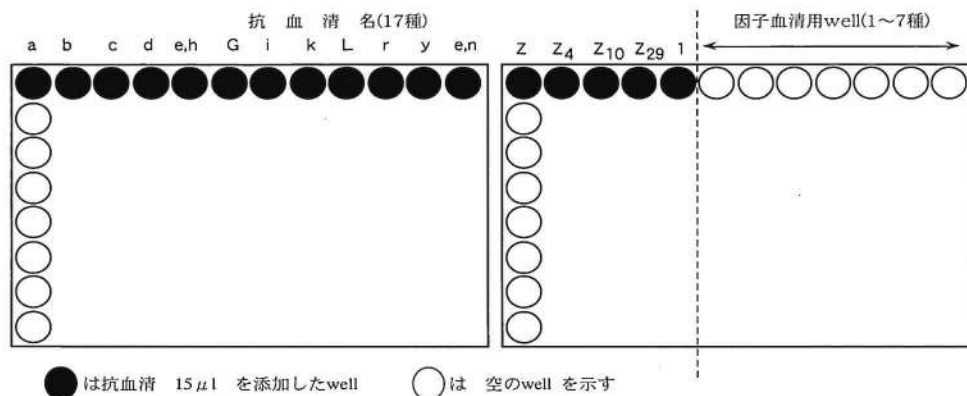


Fig. 1 M法におけるマイクロプレートの配置とwellの使用法 (1株分)

この方法の利点は、1株分の列に7個の空のwellがあるため、因子血清を用いる検査が必要になった場合に、7種類と最も因子血清の多いGにおいても同じ列の7個の空のwellを用いて検査でき、プレートを無駄なく使用できる点にあった。

Table 2 M法とT法におけるH抗原検査成績の比較-1 (参照株)

血清型	抗原	T法	M法	一致率(%)
Enteritidis	G	G	G	100
	m	m	m	100
Typhimurium	i	i	i	100
	1	1	1	100
	2	2	2	100
Choleraesuis	C	C	C	100
	1	1	1	100
	5	5	5	100

(3) M法とT法の検査成績の比較

Table 2に示すように、参照株3株のH抗原 (SEはg, m, STはiと1, 2, SCはCと1, 5) は、M法、T法ともに完全に一致した。

また、Table 3に示すように、野外分離株183株のH抗原についても、M法、T法ともにすべて一致した。

(4) 検査に必要な資材および環境条件の比較

Table 4に示すように、T法においては、1相のH抗原検査を10株実施するために必要な試験管の本数は、170(最低)~240本(最大)、試験管立て(100本用)は2~3個、5.8~8.7リットルの50 $^{\circ}$ Cインキュベーションスペース (ウオーターバスまたは50 $^{\circ}$ Cに設定されたインキュベータ) が必要と試算された。

これに対してM法では、マイクロプレート4枚で

Table 3 M法とT法におけるH抗原検査成績の比較-2 (野外分離株)

抗原*	T法	M法	一致率(%)	抗原	T法	M法	一致率(%)
d	5**	5	100	y	21	21	100
G	28	28	100	e, n	13	13	100
f	15	15	100	Z ₁₅	13	13	100
m	13	13	100	Z	7	7	100
s	6	6	100	Z ₁	45	45	100
t	6	6	100	Z ₂₃	32	32	100
i	1	1	100	Z ₂₁	12	12	100
k	1	1	100	Z ₁₀	10	10	100
L	5	5	100	1	92	92	100
v	2	2	100	2	2	2	100
w	3	3	100	5	87	87	100
r	61	61	100	7	2	2	100
				Z ₆	1	1	100

* : 凝集陽性となった抗原のみ記載 ** : 菌株数

Table 4 検査に必要な資材, 環境条件の比較(10株1相分)

項目	T 法	M 法
反応に必要な器具器材	試験管 170~240本 100本用試験管立て 2~3個	マイクロプレート 4枚
インキュベーションスペース	50°C~52°C 5.8~8.7リットル	37°C 0.68リットル
抗血清量 (費用)	10.2~14.4ml (11,830~20,150円)	2.55~3.6ml (2,960~5,040円)
不活化菌液量	85~120ml	17~24ml

16株まで検査可能であり、インキュベーションは37°Cのため通常のインキュベータが使用でき、そのインキュベーションスペースはわずか0.68リットル、T法の約10分の1で、非常にコンパクトであると試算された。

また抗血清量については、T法では、10.2~14.4mlが必要で、その費用は11,830~20,150円と非常に高価であったのに対して、M法では、2.55~3.6mlとT法の約4~5分の1で、費用も2,960~5,040円

で非常に安価であると試算された。

さらに不活化菌液量については、T法では85~120mlと試算されたのに対して、M法では、17~24mlと、T法の5分の1で検査可能と試算された。これを1株の培養菌液に換算すると、T法では4.25~6mlが必要であるのに対して、M法ではわずか0.85~1.2mlで検査可能であり、培地量の節約が図られるだけでなく、培養時間の短縮も可能であると考えられた。

考 察

*Salmonella*のH抗原検査を実施する上で、被検株数が数株と少数であれば、試験管凝集反応法による検査に問題はないが、一度に10株~20株の検査を数日おきに行わなければならないなど、非常に多数の菌株を検査する場合、現在の時点で、最大で24種類の抗血清により型別を実施しなければならないため、試験管凝集反応法では膨大な数の試験管および大量の培養菌液さらに大量の型別用抗血清が必要となるなど、検査に要する経済的負担は非常に大きいことが推察される。さらに小規模の検査室では、試験管が不足して検査できない場合や、一度は検査できても、次の検査までの間隔が短ければ、使用後の試験管を滅菌、洗浄し、検査までに元どおり使用可能な状態にできない事態となり、検査に支障を来す可能性も推察される。

また、50~52°Cという高い温度で反応させるため、通常はウォーターバスを用いるが、容積に限りがあり、多数の菌株の場合、数回に分けて反応させなければならないなど、検査の迅速化に支障を来すことも推察される。

このような理由から、筆者は、検査経費の節約のためにできるだけ少ない抗血清量および不活化菌液量で検査可能かつ検査の迅速化が図られ、さらに、一度に数十株という多数の菌株を検査できる方法として、96wellU底マイクロプレートを用いたH抗原検査方法を考案した。

この方法を用いて、参照株および野外分離株について行った検査成績は、すべて試験管凝集反応法による成績と一致したことから、この検査方法は試験管凝集反応法にかわる*Salmonella*のH抗原検査方法として実用可能と考えられた。

本検査法は、マイクロプレートを用いることで試験管凝集反応法では非常に困難であった、一度に多数の菌株の検査を可能にするだけでなく、1株1相の検査に必要な不活化菌液量は最少1.7ml(試験管凝集反応法の1/5)、また抗血清量は最少0.26ml(同1/4)と、極めて経済的であるばかりでなく、菌液量が少量のため培養時間が長くても6時間程度で検査可能であり、さらに反応時間も早いものでは数分~30分程度で判定可能であるため、検査の迅速化が図られるものと考えられた。

さらに、検査後の処理も次亜塩素酸ナトリウム液等の消毒薬に一昼夜浸漬後に水洗するだけで済むため極めて簡便で、使用後のマイクロプレートの再利用も可能であり、また通常の設定温度である37°Cの孵卵器を用いて検査が可能であることから50°Cのウォーターバスが不要となるなど、さまざまな点において極めて効率的な検査法であり、日常の検査における有用性が示唆された。

文 献

- 1 伊藤 武, 楠 淳: 動葉研究, 53 (5) : 1~11. 1996.
- 2 楠 博文: 獣医畜産新報, 49 : 836~839. 1996.
- 3 国立感染症研究所, 厚生省保健医療局結核感染症課: 病原微生物検出情報, 21 (8) : 1~2. 2000.
- 4 国立感染症研究所, 厚生労働省健康局結核感染症課: 病原微生物検出情報, 24 (8) : 1~6. 2003
- 5 中村明子: 動生協会会報, 27 (3) : 13~24. 1994.
- 6 中村政幸: 鶏病研報, 35 (3) : 127~137. 1999.
- 7 坂崎利一, 田村和満: メディアサークル, 30 : 198~205. 1985.
- 8 島田俊雄: 獣医畜産新報, 49 : 840~843. 1996.
- 9 滝本浩司: 鶏病研報, 36増刊号 : 1~3. 2000.

原 著

動物介在ケア活動の必要性に関する調査研究 —— これからの動物介在活動や動物介在療法活動の意義 ——

成田琢郎*・木山真大*・川上智子*・崔 滢洛*・早崎峯夫*

[受付 : 2000年10月30日]

ORIGINAL ARTICLE

A SURVEY OF PUBLIC OPINION ON THE ACTUAL CONDITION AND THE REQUIREMENT FOR ANIMAL ASSISTED RELAXATION ACTIVITY : THE SIGNIFICANCE OF FUTURE ANIMAL ASSISTED ACTIVITY (AAA) AND ANIMAL ASSISTED THERAPY (AAT)

Takuroh NARITA*, Masahiro KIYAMA, Tomoko KAWAKAMI,
Hyoung-Rak CHOI, and Mineo HAYASAKI

*Veterinary Clinical Center, School of Veterinary Medicine, Yamaguchi
University, 1677-1, Yoshida, Yamaguchi-shi 753-8515, Japan*

[Received for publication : October 30, 2000]

The questionnaires were sent out to 84 veterinary clinics, and 792 public homes and services for the aged and/or the handicapped and day-care centers for the elderly in Yamaguchi Prefecture. Their answers indicated that many veterinarians, as well as administrators, managers and instructors of the homes and services, have not been well exposed to the concept of Animal Assisted Activity (AAA) and Animal Assisted Therapy (AAT). They also indicated that many homes and services wish to include AAA as a part of their daily activities for their dwellers and clients if it is safe and inexpensive. In conclusion, it can be said that training veterinarians, medical doctors, and instructors is necessary, to lead such activities, as specialists of AAA and AAT.

はじめに

動物介在ケア活動とはいっさいの病気を持たず健康で性格のおとなしい犬や猫、あるいは兔やその他の小動物などを用いて、特別養護老人ホームや養護老人ホームあるいは知的障害者施設などを訪問して入居者の方々に、動物に触れ、話し掛け、楽しいひと時を持ってもらうことで心をリラックスしてもらう癒しのための活動を指す。施設管理者側と十分に準備のための打ち合わせをした上でこのような活動を行うことによって、たとえばボケが軽くなったとか、たとえば自閉症児童が喋るようになり心を開くようになった、などといった活動効果が多く報告されている。このような事実から、近年こういったボランティア活動が全国的に広く受け入れられるようになり、東京や大阪など大都市では欧米のそれに匹敵するほどの活発さとレベルの高さを持つほどであり、10年、20年と継続して活動しているボランティアグループも少なくない。

しかしながら、山口県での取り組みはいまだ不十分で、施設側の要望がどのくらいあるのかもまだよく分かっていない現状にある。

* 山口大学農学部家畜病院研究室 〒753-8515山口市吉田1677-1

今回の研究に先立って行ったわれわれの予備調査によると山口県ではこのようなボランティア活動は1団体を確認できた以外、どうやら皆無のようであった。しかし、獣医師の協力があれば訪問活動を望んでいる施設は少なくないものと考えられた。せっかく獣医学科を持つ山口大学が在りながら、県下の実状が把握されていないことから、この機会に広く意識調査をして将来における動物介在ケア活動の定着を図るため、県下における動物介在ケア活動への現状と要望の実状について調査・分析する。

材料と方法

1. 研究計画

この研究は平成14年度の1年間をかけて行われた。計画は、アンケート質問事項の作成、アンケート調査および聞き取り調査の実施、および蒐集データの分析から構成されている。

質問事項：獣医師に対しては、ボランティア活動への理解度・参加意欲度・活動修得度など奉仕活動をする側の意識の実状を明らかにし、いっぽう、各施設に対しては、動物介在ケア活動に対する理解度、訪問活動への要望度、継続訪問への期待度など活動の対象となる各施設側の意識の実状を明らかにすることを目的に質問事項を設計した。

調査方法：アンケート調査(表1)と聞き取り調査からなる。アンケート調査は、アンケート記入用紙に返信用封筒を同封して、山口県内の獣医師と施設に郵送した。聞き取り調査は、ボランティア活動家(獣医師、医師)と特別養護老人ホーム管理者を訪問して、インタビュー形式で直接意見を聴いた。

獣医師へのアンケート調査は、山口県獣医師会会員の獣医師で、小動物(犬や猫など)診療を専門とする獣医科病院の院長で、無作為に抽出した84名に調査用紙を送付した。

各施設へのアンケート調査は、山口県保健福祉施設の名簿に記載の養護老人ホーム83施設、経費老人ホーム26施設、有料老人ホーム4施設、老人福祉センター26施設、老人休養ホーム3施設、老人福祉施設付設作業所9施設、デイサービスセンター149施設、在宅介護支援センター139施設、痴呆老人グループホーム27施設、高齢者生活福祉センター8施設、愛護老人保健施設55施設、介護療養型医療施設82施設、訪問看護ステーション74施設、知的障害者グループホーム25施設、心身障害児デイケアハウス23施設、心身障害児作業施設41施設、地域交流ホーム18施設(「保健福祉施設等名簿」平成13年5月1日現在、山口県健康福祉部厚政課編集)の792施設を対象に調査用紙を送付した。

聞き取り調査は、この活動の獣医学領域における先駆者であり現在もボランティアグループの責任者として活発に動物介在活動を続けている柴内裕子獣医師(東京都港区赤坂動物病院院長、元(社)日本動物福祉協会会長)と山口県内にて動物介在療法の活用に積極的に取り組んでいる河村康明医師(山口県光市河村循

環器神経内科病院院長)、および動物介在活動ボランティアグループを受け入れて動物介在活動の効果を積極的に活用している浴風会第二南陽園(特別養護老人ホーム、東京都杉並区)とアイユウの苑(特別養護老人ホーム、山口県下関市)を訪問し、動物介在ケア活動の実施側と受け入れ側のこの活動に対する実状や要望について詳細にインタビュー調査を行った。

成績

アンケート調査：詳細は表2、3に示した。

獣医師に対するアンケートの回収率は45.2%(38件)であった。このうち、AAA(Animal Assisted Activity、動物介在活動)とAAT(Animal Assisted Therapy、動物介在療法)に関する認識は6割程度であった。また、この活動に興味を持つ方は7割であったが実際に行いたいと考えている方は4割程度であった。行ってみたいと思わない方の理由は時間がないからという回答が多く見られたが、時間があれば行いたいと答えた方も多く見られた。この活動を行った経験のある方は5%にとどまった。このことから、獣医師は活動に対する知識があり、衛生面や安全面での不安は少ないものの「実際に行いたいとは思わない」という理由の多くは「時間が取れない」というものであった。しかし、動物介在活動の推進者として獣医師は最も適した立場にあるということができ、したがって、獣医師には動物介在活動の重要性及び社会への認知を高める役割が求められるものと考えられた。そのためにも大学教育における意識改革が必要と考えられた(表2)。

施設に対するアンケート回収率は52.6%(417件)であった。施設の職員の方はいわゆるアニマルセラピーについての関心は高かったが、AAAとAATという言葉の正確な意味はあまり浸透していなかった。実際に行いたいと回答した施設は約半数にのぼり、犬、猫、兔を使いたいとする答えが多数みられた。また、不安点としては、病気の感染や活動後の動物の毛の処理をあげる施設が多かった。実際に行いたいとは思わないと回答した施設は、病気の感染への不安が半数を占め、逆にその不安が解決すれば行ってみたいという答えも多くみられた。行った経験がある施設(または方)からは動物と触れ合った効果として、共通の話題が増え精神的に安定した、と答えた方が半数を超えた。これらの施設では実際には犬が多く使われていた。そして、9割近くの施設では、今後もこの活動を続けていきたい、と考えていることが明らかとなった。要約すると

1. 動物介在活動を理解している人が少ない, 2. 知識不足による衛生面, 安全面に対する不安が多い, 3. そのいっぽうで実際の活動を見学することで不安の多くが払拭される, ということであった(表3).

柴内獣医師へのインタビューでは, この活動の問題点について重点的に質問した. その結果, 活動の賛同者を増やして活動の量的普及を図ることは無責任な活動実態を発生させることから, 活動に普及を考えるとときにはグループのリーダーの資格と資質が厳しく求められるため, 情熱さえあれば誰でもリーダーになれるものではないことが指摘された. しかし, リーダーには動物介在活動に十分な勉強と訓練あるいは経験を積んだ獣医師が適任なので, 将来この活動の専門家(リーダー)を養成する上で, 動物のしつけ訓練法の教育, 動物行動学や動物栄養学の教育が獣医大学の教育カリキュラムに取り込まれることが重要であるが, この点日本では欧米に比べて大変遅れていることが指摘された. この活動の実施には, 受け入れ施設の不安点である, 不潔, アレルギー, 病気の感染, 咬傷事故, 引っ掻き事故などへの不安解消にまず努める必要があり, 獣医学的に健康な動物を使用していることへの十分な説明と事前に既存の動物介在活動を実施している現場を見学してもらうことで, 不安をかなり払拭してもらえることが経験談と共に指摘された. さらに, 受け入れ施設側との間で, 活動に関連して発生する可能性のある問題点に関する双方の責任の所在を明確にした覚書を取り交わすことが不可欠であり, 逆に, 責任のとれない活動内容はしてはならないことが重要であることが指摘された.

河村医師は現在, AAAを取り入れた「痴呆対応型共同介護」の計画を進めているが, 問題点及び不安点として, 動物による怪我や感染症あるいはアレルギーの発生, 実施に適した場所の選定, 共同実施者(獣医師あるいは訓練士などの専門家, 理学療法士, 心理療法士など)の参加, 動物の嫌いな入居者(患者)への配慮と対応, 動物の死が入居者へ与える心理的影響, 活動に使用する動物の適性の問題(幼犬かしつけされた成犬が適当)などが指摘された.

いっぽう, 受け入れ側として, 浴風会第二南陽園とアイユウの苑はともに, この活動の受け入れ当初は, 動物からの病気の感染に対する不安や費用に対する不安を持ったが, 病気の感染に関しては既存に活動を見学することで, 不安が払拭されたこと, 費用も動物が床で足を滑らすのを防ぐために人工芝を購入したことを除けば, ほとんどかかっていないとのことであった. さらに, 活動効果として, 入居者の間での共通の話題が増えたこと, それに伴って精神的な安定度が向上したこと, などが指摘された.

考 察

経済的不安定を背景に, わが国は長いストレス社会のトンネルを抜けきらず, 年々ますますそのストレスが人心を荒廃させていることは, 自殺者の増加, 犯罪の凶悪化, 犯罪者の若齢化, 家庭内暴力の潜在的拡大化などから容易に推察されるところである.

このような社会不安を背景に, また人口の高齢化を背景に, 近年全国的に動物介在ケア・ボランティア活動が年々盛んになってきている. 動物介在ケア活動とは動物に触れ, 話し掛け, 楽しいひと時を持ってもらうことで心の癒しの活動を指す. 心の癒しの活動としては, これまでにも「敬老の日」や「動物愛護デー」に見るように, 長年の間にその情操的精神は人びとの心に広く定着している. しかし, それらの活動はややもすれば, 形式的で, その日限りのもので終わりがちであることも否めない.

ストレスの少ない社会を形成するために真に必要なことは, 日ごろより, 人をいたわり動物を命あるものとして愛しむ日常的な精神の醸成に他ならない. このことのために, 定期的にかつ頻繁に, 言い換えれば日常的で継続的な活動の実施こそが望まれている. しかしそれにもかかわらず, 動物介在ケア活動がなかなか人々に広く受け入れられていないのが現状である.

その原因には動物を介在させることに対する多くの誤解があることは否めない. その誤解は主に, 動物への不潔感や被毛によるアレルギーへの不安や咬傷あるいは引っ掻き事故への不安である. したがって, この動物介在ケア活動には, 衛生的見地から安心して触れたり抱いたりできる健康な動物で, かつ性格が温厚かつ従順で人に触れてもらいことをむしろ楽しいことと感じているようなやさしくかつ人を信頼する性格に育てられた動物を選ぶことが, この活動を主宰する側にとって, 最も重要な要因になっている. 実際, 大都市部(京浜, 京葉, 阪神, など)だけでなく, 長野県や福岡県でも, 動物介在ケア活動は活動の趣旨を深く理解しかつ賛同する獣医師と動物飼育経験の豊富な飼い主の双方によるボランティア精神によって支えられていて, この活動が広く人々の間に浸透していくために, 常に, 動物への誤解と偏見の解消に努力が注がれている.

「ヒューマン アニマル ボンド」という言葉をご存知だろうか. 「人と動物の絆」と訳される. このコンセプトは, 知っている人は知っているが知らない人は知らないというのが現状であろう.

「人と動物の絆」学会という有名な国際学会があり, 定期的に世界各地を開催地と定めて開催され, 毎回多くの参加者を集めている大変盛況で活発な学会である. すなわち, われわれの宇宙船地球号における人間と動物の共存のあり方が世界規模で研究されているということである. この学会が目指すものは, 人と動物がお

互いを必要な存在として、共に伴侶として助け合って生き生きと生涯を共にするための、より望ましい在り方を科学的に研究しかつ実現させていくことにある。わが国においても、医師、獣医師、動物愛護団体、ボランティア団体の関係者により、活発に研究もされ実行もされていて、かなりの成果をあげている。

このように「人と動物の絆」というコンセプトは、人と動物は「お互いさま」という考えのもとに成り立っていて、単なる動物好きの動物愛護とは似て非なるものである。しかし残念ながら、一般には、まだまだ誤解が多く、社会的には、奉仕活動精神の崇高性が過剰に強調されるあまり科学的な対応はなにか冷徹なものとなりに捉えられてしまい、つきつまるどころ動物好きと動物嫌いの2局面で判断が下されるところに帰結してしまうことが少なくない。共同住宅におけるペット排除論がその典型的な一つであり、この場合のように低いレベルの話に終始してしまう。

一般の人々に正しい認識がなかなか浸透しないのであるが、たとえば、動物を介在として施設を訪問して入居者を慰問する活動では「活動に関わるボランティア（人）と動物はその資質や性格が厳しく選別されなければならない」ことや、動物を介在させて心の治療を行う動物介在療法では「障害者乗馬と乗馬療法は全く別のものである」ことの認識、さらには訪問活動や動物介在医療を受ける側（患者さん、ご老人、あるいは幼児達）に対してもまた活用される動物にとっても「苦痛や強制を伴うやり方はいかなる方法であっても

マイナス効果となる」といった基本的原則の認識、そして重要なことは、活用される動物は心身ともに正常で健康な個体を提供するために獣医師の協力は不可欠であることと、活動内容が少しでも医療行為に触れるならば医師の指導のもとで行わなければならない、といった“常識”が医師、獣医師のなかでさえ浸透度は必ずしも高いとはいえず、ましてや一般にはなかなか広く認識されていないのが現状である。

とはいえ、都市部が中心であるが、動物愛護・動物福祉・動物虐待の定義と今後の課題への取り組み、あるいは盲導犬・聴導犬・介助犬などの社会参加の問題、伴侶動物と人獣共通感染症の問題、動物介在療法に適した動物（種類や個体の資質、多くは犬）の選別基準の問題などが精力的に研究され、ボランティアグループを組織して活発な実地活動が行われたり、頻繁に研究発表や講演会が開催されて、人々への啓蒙活動が行われている。

この方面の先進国である欧米では、家畜の中で伴侶動物になり得る動物（犬、猫、馬を中心に）の社会的権利というものは、動物愛護と動物福祉の観点から、すでに法律や規則の中に当然のこととして組み込まれている。このことに鑑みれば、日本でも法律が部分的に整いはじめたのではあるが、近い将来かならずや動物介在活動と動物介在療法が市民権を得て、動物行政や医療行政の不可欠な市民要望事項となるものと考えられる。

表1 アンケート項目の実際

1. 動物介在療法に関するアンケート調査
〈獣医師用アンケート用紙〉

記入にあたって

1. この調査票は無記名で、調査以外の目的に使用されることは絶対にありません。2. 回答は指示に従って、当てはまる番号に○をつけてください。※「その他」を選ばれた場合は、その内容を()内に記入してください。「自由記入欄」についてもできるだけお書きください。3. 記入して頂いた調査用紙は同封の封筒に入れて、10月6日までにご返送ください。

[全員にお聞きします]

- ① いわゆる『アニマルセラピー』をご存知ですか？
1. はい 2. いいえ
- ② AAA(Animal Assisted Activity)またはAAT(Animal Assisted Therapy)という言葉をご存知ですか？
1. はい 2. いいえ
- ③ 山口県内で『アニマルセラピー』を行っている所をご存知ですか？ 1. はい 2. いいえ
- ④ 『アニマルセラピー』に興味・関心はありますか？
1. はい 2. いいえ
- ⑤ 『アニマルセラピー』を行ってみたいと思いますか？
1. はい 2. いいえ 3. すでに行っている、行った経験がある。
- ⑥ 犬猫ロボットによるセラピーについてどう思いますか？
1. 効果があると思う 2. 効果はないと思う
3. わからない

※設問⑤で、1と答えた方は2ページ前半を、2と答えた方は2ページ後半を、3と答えた方は3ページをお答え下さい。

[『アニマルセラピー』を行ってみたいと答えた方にお聞きします]

- ① どのような動物で行ってみたいですか？
(複数回答可)
1. 犬 2. 猫 3. うさぎ 4. ハムスター
5. インコ 6. 金魚 7. モルモット 8. 牛
9. 馬 10. イルカ 11. その他()
- ② 『アニマルセラピー』にどんなことを期待されますか？(複数回答可)
1. 具体的な体調の改善 2. レクリエーションとしての楽しみ 3. 精神的な安らぎ 4. その他()
- ① 『アニマルセラピー』に対する不安点は何ですか？
(複数回答可)
1. 不潔 2. アレルギー 3. 病気の感染
4. 場所の確保 5. 費用 6. 動物の毛などの後処理 7. その他()
- ② どのくらいの頻度で行うのが理想ですか？
1. 毎日 2. 週一度くらい 3. 月一度くらい
4. その他()
- ③ どのような場所で行うのが理想ですか？
(複数回答可)
1. ホールのような広めの場所 2. 個別の部屋
3. 屋外 4. その他()
- ④ 活動時間の理想はありますか？
1. 30分以内 2. 30分～1時間 3. 1時間～2時間
4. 2時間以上

[『アニマルセラピー』をしたくないと答えた方にお聞きします]

- ① それはどうしてですか？(複数回答可)
1. 不潔感を感じるから 2. アレルギーがあるから
3. 病気の感染が不安だから 4. 興味が湧かないから
5. その他()

- ② 次の中で療法として興味があるものを選んでください。
(複数回答可)

1. アロマセラピー 2. 音楽療法 3. 園芸療法
4. 森林療法 5. その他()

- ③ 「ここを改善できれば『アニマルセラピー』をしてみたい」ということはありますか？

1. はい
a. 費用の問題がはつきりすれば b. 広い場所があれば
c. 十分な時間があれば d. 嫌いな動物でなければ
e. 安全だと分かれば f. その他
2. いいえ

[『アニマルセラピー』の経験がある方にお聞きします]

- ① どんな効果が見られましたか？(複数回答可)
1. 具体的な体調の改善(例えば)
2. 精神的に安定した 3. 共通の話題が増えた
4. 特に無かった 5. その他()
- ② デメリットは見られましたか？
1. デメリットは無かった 2. 動物が苦手な人が多かった
3. 体調が悪くなった 4. 精神的に不安定になった
5. その他()
- ③ 動物好きの人の割合はどのくらいでしたか？
全体の()%くらい
- ④ 頻度としてはどのくらいでしたか？
1. 毎日 2. 週1回 3. 月1回
4. その他()
- ⑤ 活動時間はどれくらいでしたか？
1. 30分以内 2. 30分～1時間 3. 1時間～2時間
4. 2時間以上
- ⑥ どんな場所で行いましたか？
1. 施設内の屋内 2. 施設内の屋外 3. 施設外の屋内
4. 施設外の屋外 5. その他()
- ⑤ どの場所で行うのが理想ですか？
1. 施設内の屋内 2. 施設内の屋外 3. 施設外の屋内
4. 施設外の屋外 5. その他()
- ⑥ どの動物を使いましたか？(複数回答可)
1. 犬 2. 猫 3. ハムスター 4. モルモット
5. 鳥 6. 亀 7. 金魚 8. その他()
- ⑦ どの動物を使うのが理想ですか？(複数回答可)
1. 犬 2. 猫 3. ハムスター 4. モルモット
5. 鳥 6. 亀 7. 金魚 8. 牛 9. 馬
10. イルカ 11. その他()
- ⑧ 実際に行ってみて改善したほうがよいところがありましたか？(複数回答可)
1. 動物の数を増やしたい 2. 動物種を増やしたい
3. 時間を延ばしたい 4. その他() 5. 特になし
- ⑨ これからこの活動を続けていきたいですか？あるいはまた行ってみたいですか？
1. はい 2. いいえ

質問は以上です。ご協力ありがとうございました。

2. 動物介在療法に関するアンケート調査
 <施設用アンケート用紙>

記入にあたって

1. この調査票は無記名で、調査以外の目的に使用されることは絶対にありません。2. 回答は指示に従って、当てはまる番号に○をつけてください。※「その他」を選ばれた場合は、その内容を()内に記入してください。「自由記入欄」についてもできるだけお書きください。3. 記入して頂いた調査用紙は同封の封筒に入れて、10月6日までにご返送ください。

[全員にお聞きします]

- ② いわゆる『アニマルセラピー』を知っていましたか？
 1. はい 2. いいえ
- ③ AAA(動物介在活動)またはAAT(動物介在療法)という言葉を知っていましたか？
 1. はい 2. いいえ
- ④ 山口県内で『アニマルセラピー』を行っている所をご存知ですか？
 1. はい 2. いいえ
- ⑤ 『アニマルセラピー』に興味・関心はありますか？
 1. はい 2. いいえ
- ⑥ 『アニマルセラピー』を行ってみたいと思いますか？
 1. はい 2. いいえ 3. すでに行っている、行った経験がある。
- ⑦ 施設に『アニマルセラピー』を行える場所がありますか？
 1. 大きなホールがある 2. 広い庭がある
 3. その他() 4. いいえ
- ⑧ 動物アレルギーを持っておられる方がいますか？
 1. はい(全体の %位) 2. いいえ
 3. わからない
- ⑨ 人畜共通感染症について知っていますか？
 1. はい 2. いいえ
- ⑩ 犬猫ロボットによるセラピーについてどう思いますか？
 1. 効果があると思う 2. 効果はないと思う
 3. わからない

※設問⑤で、1と答えた方は2ページ前半を、2と答えた方は2ページ後半を、3と答えた方は3ページをお答え下さい。

[『アニマルセラピー』を行ってみたいと答えた方にお聞きします]

- ② どのような動物で行ってみたいですか？(複数回答可)
 1. 犬 2. 猫 3. うさぎ 4. ハムスター
 5. インコ 6. 金魚 7. モルモット 8. 牛
 9. 馬 10. イルカ 11. その他()
- ③ 『アニマルセラピー』にどんなことを期待されますか？(複数回答可)
 1. 具体的な体調の改善 2. レクリエーションとしての楽しみ 3. 精神的な安らぎ
 4. その他()
- ④ 『アニマルセラピー』に対する不安点は何ですか？(複数回答可)
 1. 不潔 2. アレルギー 3. 病気の感染
 4. 場所の確保 5. 費用 6. 動物の毛などの後処理 7. その他()
- ⑤ どのくらいの頻度で行うのが理想ですか？
 1. 毎日 2. 週一度くらい 3. 月一度くらい
 4. その他()
- ⑥ どのような場所で行うのが理想ですか？(複数回答可)
 1. ホールのような広めの場所 2. 個別の部屋
 3. 屋外 4. その他()

- ⑦ 活動時間の理想はありますか？
 1. 30分以内 2. 30分～1時間
 3. 1時間～2時間 4. 2時間以上

[『アニマルセラピー』をしたくないとお答えした方にお聞きします]

- ⑩ それはどうしてですか？(複数回答可)
 1. 不潔だから 2. 動物が苦手だから
 3. アレルギーがあるから 4. 病気の感染が不安だから 5. その他()
- ⑪ 次の中で療法として興味があるものを選んでください。(複数回答可)
 1. アロマセラピー 2. 音楽療法 3. 園芸療法
 4. 森林療法 5. その他()
- ③ 「ここを改善できれば『アニマルセラピー』を試みたい」ということはありますか？
 1. はい
 a. 費用の問題がはっきりすれば b. 広い場所があれば
 c. 十分な時間があれば d. 嫌いな動物でなければ
 e. 安全だと分かれば f. その他()
 2. いいえ

[『アニマルセラピー』の経験がある方にお聞きします]

- ① どんな効果が見られましたか？(複数回答可)
 1. 具体的な体調の改善(例えば)
 2. 精神的に安定した 3. 共通の話題が増えた
 4. 特に無かった 5. その他()
- ② デメリットはありましたか？
 1. デメリットは無かった 2. 動物が苦手な人が多かった
 3. 体調が悪くなった 4. 精神的に不安定になった
 5. その他()
- ③ 動物好きの人の割合はどのくらいでしたか？
 全体の()%くらい
- ④ 頻度としてはどのくらいでしたか？
 1. 毎日 2. 週1回 3. 月1回
 4. その他()
- ⑤ 活動時間はどれくらいでしたか？
 1. 30分以内 2. 30分～1時間 3. 1時間～2時間
 4. 2時間以上
- ⑥ どのような場所で行いましたか？
 1. 施設内の屋内 2. 施設内の屋外 3. 施設外の屋内
 4. 施設外の屋外 5. その他()
- ⑦ どのような場所で行うのが理想ですか？
 1. 施設内の屋内 2. 施設内の屋外 3. 施設外の屋内
 4. 施設外の屋外 5. その他()
- ⑧ どのような動物を使用しましたか？(複数回答可)
 1. 犬 2. 猫 3. ハムスター 4. モルモット
 5. 鳥 6. 亀 7. 金魚 8. その他()
- ⑨ どのような動物を使うのが理想ですか？(複数回答可)
 1. 犬 2. 猫 3. ハムスター 4. モルモット
 5. 鳥 6. 亀 7. 金魚 8. 牛 9. 馬
 10. イルカ 11. その他()
- ⑩ 実際に試してみて改善したほうがよいところがありましたか？(複数回答可)
 1. 動物の数を増やしたい 2. 動物種を増やしたい
 3. 時間を延ばしたい 4. その他()
 5. 特にない
- ⑪ これからこの活動を続けていきたいですか？あるいはまた行いたいですか？
 1. はい 2. いいえ

質問は以上です。ご協力ありがとうございました。

表2 獣医師用アンケートの結果

[全員にお聞きします]

- ① いわゆる『アニマルセラピー』をご存知ですか?
はい 38 100% いいえ 0 0%
- ② AAA(Animal Assisted Activity)またはAAT(Animal Assisted Therapy)という言葉をご存知ですか?
はい 24 63.2% いいえ 14 36.8%
- ③ 山口県内で『アニマルセラピー』を行っている所をご存知ですか?
はい 8 21.1% いいえ 29 76.3%
- ④ 『アニマルセラピー』に興味・関心はありますか?
はい 26 68.4% いいえ 12 31.6%
- ⑤ 『アニマルセラピー』を行ってみたいと思いませんか?
はい 16 42.1% いいえ 20 52.6%
- ⑥ 犬猫ロボットによるセラピーについてどう思いますか?
効果があると思う 8 21.1% 効果はないと思う 11 28.9% 分からない 19 50%

[『アニマルセラピー』を行ってみたいと答えた方にお聞きします]

- ① どのような動物で行ってみたいですか?
(複数回答可)
犬 15 93.8% 猫 9 56.3% 兎 9 56.3%
ハムスター 2 12.5% インコ 1 6.3%
金魚 0 0% モルモット 2 12.5%
牛 1 6.3% 馬 4 25% イルカ 6 37.5%
その他 1 6.3%
- ② 『アニマルセラピー』にどんなことを期待されますか?
(複数回答可)
具体的な体調の改善 6 37.5% レクリエーションとしての楽しみ 6 37.5% 精神的な安らぎ 13 81.3% その他 0 0%
- ③ 『アニマルセラピー』に対する不安点は何ですか?
(複数回答可)
不潔 4 25% アレルギー 7 43.8% 病気の感染 7 43.8% 場所の確保 7 43.8%
費用 6 37.5% 動物の毛の処理 6 37.5%
その他 4 25%
- ④ どのくらいの頻度で行うのが理想ですか?
毎日 1 6.3% 週1度くらい 6 37.5%
月1度くらい 7 43.8% その他 1 6.3%
- ⑤ どのような場所で行うのが理想ですか?
(複数回答可)
ホールのような広めの場所 10 62.5%
個別の部屋 2 12.5% 屋外 8 50%
その他 1 6.25%
- ⑥ 活動時間の理想はありますか?
30分以内 0 0% 30分-1時間 12 75%
1-2時間 3 18.8% 2時間以上 0 0%

[『アニマルセラピー』をしたくないと思われた方にお聞きします]

- ① それはどうしてですか?
(複数回答可)
不潔を感じるから 1 5% アレルギーがあるから 1 5% 病気の感染が心配だから 2 10%
興味がわからないから 6 30% その他 13 65%
- ② 次の中で療法として興味があるものを選んでください。
(複数回答可)
アロマセラピー 6 30% 音楽療法 12 60%
園芸療法 6 30% 森林療法 8 40%
その他 0 0%
- ③ 「ここを改善できれば『アニマルセラピー』をしてみたい」ということはありますか?
はい
費用の問題がはっきりすれば 1 5% 広い

場所があれば 0 0% 十分な時間があれば 8 40%
嫌いな動物でなければ 0 0%
安全だと分かれば 5 25% その他 2 10%
いいえ 6 30%

[『アニマルセラピー』の経験がある方にお聞きします]

- ① どんな効果が見られましたか?
(複数回答可)
具体的な体調の改善 0 精神的に安定した 1
共通の話題が増えた 2 特に無かった 0
その他 0
- ② デメリットは見られましたか?
デメリットは無かった 1 動物の苦手な人が多かった 0
体調が悪くなった 0 精神的に不安定になった 0
その他 1
- ③ 動物好きの人の割合はどのくらいでしたか?
60-70% 2
- ④ 頻度としてはどのくらいでしたか?
毎日 0 週1回 0 月1回 1 その他 0
- ⑤ 活動時間はどれくらいでしたか?
30分以内 2 30分-1時間 0 1-2時間 0
2時間以上 0
- ⑥ どんな場所で行いましたか?
施設内の屋内 1 施設外の屋内 0 施設外の屋外 2
- ⑦ どんな場所で行うのが理想ですか?
施設内の屋内 1 施設内の屋外 1 施設外の屋内 0
施設外の屋外 1
- ⑧ どんな動物を使いましたか?
(複数回答可)
犬 2 猫 0 ハムスター 0 モルモット 0
鳥 1 亀 1 金魚 0 その他 1 (兎)
- ⑨ どんな動物を使うのが理想ですか?
(複数回答可)
犬 2 猫 1 ハムスター 0 モルモット 0
鳥 1 亀 0 金魚 1 牛 0 馬 1
イルカ 0 その他 0
- ⑩ 実際に行ってみて改善したほうがよいところがありましたか?
(複数回答可)
動物の数を増やしたい 0 動物種を増やしたい 0
時間を延ばしたい 0 その他 1
特になし 0
- ⑪ これからこの活動を続けていきたいですか?あるいはまた行ってみたいですか?
はい 2 いいえ 0

自由記述欄での回答

『アニマルセラピー』を行ってみたいと思われた方

- * どのような動物で行ってみたいですか?
・対象とする人間の年齢別による
イヌ、ウサギ、ウマ、イルカ・・・自閉症や登校拒否などの心身的に問題を抱えた青少年に適当
- * 『アニマルセラピー』に対する不安点は何ですか?
・体調不良になった時、全て動物の責任とされる。
・動物の確保
・動物の攻撃
・実施者の技量
・スタッフの確保
・活動を行うボランティア、医師、獣医師などの知識、技術不足による逆効果(人の患者だけでなく使用される動物への負担も含む)
- * どのような場所で行うのが理想ですか?
・牧場(若年または老年者であっても歩様のしかりしている場合は)
- * 活動時間の理想はありますか?
・対象とする人間による

『アニマルセラピー』をしたくないと思われた方

- * それはどうしてですか?
・自分が病気療養中のため
・好む方、好まれない方を把握してから考え直す必

要はないか

- ・時間的に無理だから
 - ・責任が重いから
 - ・忙しくて時間がない
 - ・万が一の事故の発生が心配
 - ・時間不足のため
 - ・対人関係に自信ないので
 - ・時間が取れない
 - ・人との接触が苦手だから
 - ・年齢（来年は傘寿を迎えるため）
 - ・咬傷事故の可能性が皆無とはいえない
 - ・動物が100%ケガをさせないとはいえないから
- *「ここを改善できれば『アニマルセラピー』を試みたい」ということはありますか？
- ・動物の世話のみですめば（他の人が人と接触してくれれば）
 - ・専門的な訓練と組織的な活動が必要
 - ・自分の病気が回復したら

『アニマルセラピー』の経験がある方

- *デメリットは見られましたか？
- ・具合が悪くなると責任にされる
- *動物好きの人の割合はどのくらいでしたか？
- ・全体の70%くらい
 - ・全体の60%くらい
（対象による。老人ホームでの場合ヒポセラピーでは100%）
- *どんな動物を使いましたか？
- ・ウサギ ・ウマ
- *実際に行ってみて改善したほうがよいところがありましたか？
- ・恐がる人のために、動物をネットに入れるなどの対策が必要

表3 施設へのアンケートの結果

[全員にお聞きします]

- ① いわゆる『アニマルセラピー』を知っていましたか？
はい 364 87.3% いいえ 49 11.8%
- ② AAA(動物介在活動)またはAAT(動物介在療法)という言葉を知っていましたか？
はい 121 29% いいえ 293 70.3%
- ③ 山口県内で『アニマルセラピー』を行っている所をご存知ですか？
はい 59 14.1% いいえ 353 84.7%
- ④ 『アニマルセラピー』に興味・関心はありますか？
はい 309 74.1% いいえ 96 23%
- ⑤ 『アニマルセラピー』を行ってみたいと思えますか？
はい 213 51.1% いいえ 172 41.2%
すでに行っている・行った経験がある 27 6.5%
- ⑥ 施設に『アニマルセラピー』を行える場所がありますか？
大きなホールがある 110 26.4% 広い庭がある 118 28.3%
その他 22 5.3% いいえ 191 45.8%
- ⑦ 動物アレルギーを持っておられる方がいますか？
はい 33 7.9% いいえ 28 6.7%
分からない 346 83%
- ⑧ 人畜共通感染症について知っていますか？
はい 223 53.5% いいえ 189 45.3%
- ⑨ 犬猫ロボットによるセラピーについてどう思いますか？
効果があると思う 108 25.9% 効果はないと思う 53 12.7%
分からない 252 60.4%

[『アニマルセラピー』を行ってみたいと答えた方にお聞きします]

- ① どのような動物で行ってみたいですか？(複数回答可)
犬 194 90.2% 猫 96 44.7% 兎 84 39.1%
ハムスター 36 16.7% インコ 25 11.6%
金魚 30 14% モルモット 18 8.4%
牛 2 0.9% 馬 17 7.9% イルカ 36 16.7% その他 8 3.7%
- ② 『アニマルセラピー』にどんなことを期待されますか？(複数回答可)
具体的な体調の改善 17 7.9% レクリエーションとしての楽しみ 121 56% 精神的な安らぎ 197 91.2% その他 62.8%
- ③ 『アニマルセラピー』に対する不安点は何ですか？(複数回答可)
不潔 59 27.4% アレルギー 123 57.2%
病気の感染 157 73% 場所の確保 60 27.9%
費用 83 38.6% 動物の毛などの処理 118 54.9% その他 18 8.4%
- ④ どのくらいの頻度で行うのが理想ですか？
毎日 17 8% 週1度くらい 68 31.9%
月1度くらい 103 48.4% その他 30 14.1%
- ⑤ どのような場所で行うのが理想ですか？(複数回答可)
ホールのような広めの場所 124 57.4%
個別の部屋 33 15.3% 屋外 119 55.1%
その他 11 5.1%
- ⑥ 活動時間の理想はありますか？
30分以内 22 10.5% 30分-1時間 169 80.5%
1時間-2時間 17 8.1% 2時間以上 5 2.4%

[『アニマルセラピー』をしたくないとお答えした方にお聞きします]

- ① それはどうしてですか？(複数回答可)
不潔を感じるから 20 12.3% 動物が苦手だから 27 16.7%
アレルギーがあるから 31

19.1% 病気の感染が心配だから 82 50.6%
その他 69 42.6%

- ② 次の中で療法として興味があるものを選んでください。(複数回答可)
アロマセラピー 26 16.9% 音楽療法 110 71.4%
園芸療法 90 58.4% 森林療法 30 19.5%
その他 7 4.5%
- ③ 「ここを改善できれば『アニマルセラピー』を試みたい」ということはありますか？
・はい
1. 費用の問題がはっきりすれば 25 15.9%
2. 広い場所があれば 37 23.6%
3. 十分な時間があれば 39 24.8%
4. 嫌いな動物でなければ 13 8.3%
5. 安全だと分かれば 63 40.1%
6. その他 8 5.1%
・いいえ 61 38.9%

[『アニマルセラピー』の経験がある方にお聞きします]

- ① どんな効果が見られましたか？(複数回答可)
具体的な体調の改善 5 16.7% 精神的に安定した 15 50%
共通の話題が増えた 15 50% 特になかった 0 0%
その他 8 26.7%
- ② デメリットはありましたか？
デメリットは無かった 18 64.3% 動物が苦手な人が多かった 1 3.6%
体調が悪くなった 0 0% 精神的に不安定になった 1 3.6%
- ③ 動物好きの人の割合はどのくらいでしたか？
<自由記述欄の結果>参照
- ④ 頻度としてはどのくらいでしたか？
毎日 5 17.9% 週1回 3 10.7% 月1回 7 25%
その他 13 48.1%
- ⑤ 活動時間はどれくらいでしたか？
30分以内 5 20% 30分-1時間 14 56%
1時間-2時間 4 16% 2時間以上 2 8%
- ⑥ どんな場所で行いましたか？
施設内の屋内 24 82.8% 施設内の屋外 8 27.6%
施設外の屋内 2 6.9% 施設外の屋外 1 3.4%
その他 1 3.4%
- ⑦ どの場所で行うのが理想ですか？
施設内の屋内 21 72.4% 施設内の屋外 11 37.9%
施設外の屋内 1 3.4% 施設外の屋外 1 3.4%
その他 1 3.4%
- ⑧ どのような動物を使いましたか？(複数回答可)
犬 26 86.7% 猫 6 20% ハムスター 1 3.3%
モルモット 1 3.3% 鳥 3 10% 亀 1 3.3%
金魚 6 20% その他 2 6.7%
- ⑨ どのような動物を使うのが理想ですか？(複数回答可)
犬 25 86.2% 猫 11 37.9% ハムスター 4 13.8%
モルモット 3 10.3% 鳥 7 24.1% 亀 2 6.9%
金魚 5 17.2% 牛 0 0% 馬 0 0%
イルカ 0 0% その他 3 10.3%
- ⑩ 実際に行ってみて改善したほうがよいところはありましたか？(複数回答可)
動物の数を増やしたい 3 10.7% 動物種を増やしたい 7 25%
時間を延ばしたい 1 3.6% その他 8 28.6%
特になし 12 42.9%
- ⑪ これからこの活動を続けていきたいですか？あるいはまた行いたいですか？
はい 24 85.7% いいえ 4 14.3%

自由記述欄での回答

『アニマルセラピー』を行ってみたいと思えますか？

- ・イヌ, ネコ, 小鳥類は思わしくない。メダカ, 熱帯魚, 金魚などがよい。

施設に『アニマルセラピー』を行える場所がありますか？

- ・作業所で犬と猫を飼っている

- ・ 娯楽室はあるが食堂と兼ねているので無理
- ・ 在宅に希望者があれば
- ・ どれくらいの広さが必要なのかがわからない
- ・ 広い駐車場がある
- ・ 場所があっても園長の了解が得られるかどうか?
- ・ デイサービスセンターまたはグループホーム内
- ・ 空き地 (2)
- ・ 広場
- ・ 狭い庭
- ・ 食堂
- * 動物アレルギーを持っておられる方がいますか?
 - ・ 全体の1%くらい 2
 - ・ 4% 1
 - ・ 5% 1
 - ・ 10% 3
 - ・ 20% 2
 - ・ その他 1-2人程度

『アニマルセラピー』を行ってみたいと答えた方

- * どのような動物で行ってみたいですか?
 - ・ 仔犬
 - ・ ミニホース
 - ・ リス
 - ・ ゴマフアザラシ
 - ・ メダカ
 - ・ 熱帯魚 (4)
- * 『アニマルセラピー』にどんなことを期待されますか?
 - ・ 「なですすりたい…」との思いで、例えば拘縮頭肘にある手を動かそうとするなど、ROH訓練が自然に行えるなど (?)
 - ・ 人間らしい情感の回復、特に痴呆症に対して
 - ・ 表情が豊かになる
 - ・ 感情を表現しようとする
 - ・ 気力の充実
 - ・ 動物とコミュニケーションをとってみたい
- * 『アニマルセラピー』に対する不安点は何ですか?
 - ・ 排泄物の処理
 - ・ 金魚程度でよい、動物はあまり感心しない
 - ・ イヌが咬む、ネコが引かく、ハムスターが咬む
 - ・ 動物嫌いの人はどうするか
 - ・ 咬んだり、つめを立てたり
 - ・ 保健所の許可
 - ・ 動物の性格が急変した場合
 - ・ イヌが嘔み付いた場合
 - ・ 職員の手間
 - ・ 事故
 - ・ 動物 (イヌ、ネコ) を恐がる利用者もいる (パニックになる)
 - ・ イヌであれば咬傷、転倒
 - ・ 動物の不意な行動による事故
 - ・ 咬まれたり、引つかかれたりした時の対応
 - ・ 動物が病気になったとき
- * どのくらいの頻度で行うのが理想ですか?
 - ・ 2日に1回
 - ・ 週に2回
 - ・ 月に2回 (3)
 - ・ 2ヶ月に1回 (2)
 - ・ 2~3ヶ月に1回
 - ・ 3ヶ月に1回
 - ・ 年に3回
 - ・ 年に2~3回
 - ・ 年に2回 (4)
 - ・ 年に1回
 - ・ 対象者に応じて
 - ・ 利用者が希望する時に
 - ・ 対象となる動物による
 - ・ 不定期
 - ・ わからない (4)

- * どのような場所で行うのが理想ですか?
 - ・ 施設内
 - ・ 在宅 (2)
 - ・ 海
 - ・ 一家族としてどこでも
 - ・ 病状、状態に合わせて
 - ・ 中庭
 - ・ 動物の種類による
 - ・ 工夫すれば
- * 活動時間の理想はありますか?
 - ・ 活動というよりは、見て、精神的な安らぎを求めること
 - ・ 個人の状況による

『アニマルセラピー』をしたくないと答えた方

- * それはどうしてですか?
 - 場所
 - ・ 場所がない (4)
 - ・ 保育所と同じ建物であり1つのフロアしかなく、嫌いな人たちの行く場所がない
 - ・ 場所的に向かない (市役所の中にあるため)
 - ・ 広い場所がないのに、嫌いな人がいる
 - ・ 入所施設がないため職員の手間がかかりすぎる
 - 時間
 - ・ 時間がない (6)
 - ・ 今現在行っていることで時間の制限超過にて
 - ・ 今まで行っていないので導入に伴う時間が取りにくい
 - 人手
 - ・ 面倒が見られるマンパワー
 - ・ 入所施設がないため職員の手間がかかりすぎる
 - ・ 運営体制等の関係上、人的にも行う余裕が现阶段ではないため
 - ・ 世話が大変そうだから
 - ・ 動物の最期まで責任をもてるかどうか判らないから
 - ・ ケア面での不安
 - 衛生・安全
 - ・ 病院だから
 - ・ 毛などが落ちる
 - ・ 事故が心配
 - ・ 授産施設であり、製品を作って販売しており、製品に動物の毛が混入することを考える
 - ・ 安全面 (2)
 - 知識不足
 - ・ アニマルセラピーの効果、内容がよくわからない (5)
 - ・ 費用の問題 (3)
 - 利用者
 - ・ 家で動物を飼っている人が多いため
 - ・ 利用者が望むかどうか不安である (2)
 - ・ 田舎なので動物にそれほど興味がある利用者が少ないようなので
 - ・ 動物の苦手な利用者があるから (3)
 - ・ 利用者の反応がわからないから
 - 施設内容
 - ・ 在宅の仕事として考えてないため
 - ・ そのような患者が今のところいない (3)
 - ・ 必要がないから (5)
 - ・ 公民館などを借りて実施すればできないことはない
 - ・ 行うことを現在考えていない
 - ・ 施設内容 (5)
 - ・ デイサービスより特養が向いているような気がする
 - ・ できればデイサービス、デイケア、特養等で行ってほしいと考える
 - その他
 - ・ 定期的にできないから

- ・動物を飼ってないので判らない
- ・施設では動物を飼えない
- ・現システム全体が想定していないので
- ・関心なし

*「ここを改善できれば『アニマルセラピー』を試してみたい」ということはありますか？

- ・県、保健所が何も言わないのだろうか？
- ・どのように活動し、どういう効果が得られているのかをまず知った上で考えたい
- ・動物の世話が難しいため
- ・そのような患者が今のところいないため当分考えられない
- ・グループホームを造設した場合
- ・当所は精神障害ではない
- ・本当に必要と思った人がいたら考える
- ・動物ではなく金魚で楽しんでもらっている
- ・職員の手間
- ・実行するにあたり、必要な知識等の習得システムが確立されていれば
- ・通所施設であり、家庭で好きな動物を飼っている
- ・製品を作るのに時間的な余裕がない
- ・かつてノラ猫を獣医さんに連れて行き、安心な状態にして飼ったことがあるが、夜の管理ができずいなくなった

『アニマルセラピー』の経験がある方

*どんな効果が見られましたか？

- ・痴呆症の方が、自分から犬を飼いたい、と家族にお願いしてかわいがっている
- ・寝っぱなしの人がずっと犬と遊ぶ（精神的に安定した）
- ・徘徊のある人が、膝に抱き、背をさすることにより落ち着いてきた（精神的に安定した）
- ・失語症の人がものが言えるようになった
- ・思いやりができた
- ・笑顔が多く見られるようになり、精神的にも安定
- ・平素ない笑顔と会話が出来た
- ・評価してないのでなんともいえない
- ・年1回しか行ってないためわからない

*デメリットはありましたか？

- ・苦手な人が数人いた
- ・衛生面が気になった
- ・犬のなき声に過敏になり「うるさい」と大声で言い続けた為、周囲に雰囲気が悪くなった
- ・わからない

*動物好きの人の割合はどのくらいでしたか？

全体の	10%	1
	20%	1
	30%	1
	40-50%	1
	50%	4
	70%	1
	80%	6
	90%	4

*頻度としてはどのくらいでしたか？

- ・月に2回
- ・年に1回（3）
- ・金魚、ニワトリを飼っている
- ・中庭で犬を2匹飼っているので、利用者の都合に合わせて中庭で触れ合ったり、室内から眺めたりしている

*どんな動物を使いましたか？

- ・アイガモ
- ・ウサギ
- ・ミニウサギ

*どんな動物を使うのが理想ですか？

- ・ウサギ
- ・わからない

*実際に行って見てみて改善したほうがよいところはありましたか？

- ・大型犬より中・小型犬がよい
- ・現状ではしないほうが良いと思っている

山口獣医学雑誌 投稿規定

1. 山口獣医学雑誌（以下、雑誌という）に関する原稿の取り扱い、この規定に拠る。
2. 原稿は2部〔正本1部、コピー1部（ゼロックス、リコピー等々）〕を学会事務局あて送付する。
3. 原稿は、編集委員において審査し、原則として、受付順に登載する。
4. 審査の結果、採用と認められた原稿は、雑誌の印刷発刊後においても、原則として著者へ返却しない。
5. 審査の結果、不採用と認められた原稿は、原則として、受付3か月以内に返却する。但しこの場合、不採用の理由を明らかにする義務を負わない。
6. 原稿は、原則として、刷り上がり6ページ（1ページ約2,400字）以内とし、当学会所定の原稿用紙（24字×25行）に記述する。ワープロ原稿は、1ページ24字×25行とする。原稿用紙は、申し出があれば、無償で分与する。
 なお、制限紙数には、論文表題、著者名、所属機関名、図表、文献、写真など一切を含む。抄録は和文・欧文のいずれにおいても、制限紙数に含まれる。制限紙数を超過した分およびカラー写真については、原則として、著者実費負担とする。
7. 和文原稿は、現代かなづかい、平仮名、横書き、楷書で記述し、欧文抄録は刷り上がり1ページ以内とする。欧文（英文または独文）原稿は、厚手のタイプライター用紙にダブルスペースでタイプライティングするとともに、別に簡潔に要約した日本文抄録（刷り上がり1ページ以内）を添付する。
8. 図表並びに写真は、まとめて原稿の最後につけ、論文中に、それらを置く位置を明確に指定する。写真は原則として「手札判」以上の大きさとし、番号をつける場合は直接写真に記入せず台紙に位置と番号を記入する。必要に応じて、天地左右を指定する。
9. カラー写真をトリミングする場合はコピー（ゼロックス等々、白黒で可）について記入指定する。
10. 凸版の原図（図版、体温表など）は、必ず、墨汁、黒インキなどで青色方眼紙または白紙に明記する。凸版原図および写真の送付にあたっては、折・汚損に留意し、台紙に仮付し、その表面を硫酸紙、セロファン紙などで覆う。
11. 引用文献は、直接、本文に引用したものに限り、著者名、論文表題、登載誌、巻（号）、始頁～終頁、西暦年を明記し、原則としてアルファベット順に配列し、番号をつけ、下記の様式で記載する。特に句読点に注意し、イタリック字体は赤線のアンダーラインで指定する。

例 雑誌

和文： 5) 松本正弘・中村一夫：人および動物血液中の日本脳炎ウイルス中和抗体の分布と推移について。熱帯医学, 15(6) : 272 ~ 285. 1975.

英文： 18) Lawrence J. E. and Clark, D. H. : The Lysis of Leptospire by Antiserum. Amer. J. Trop. Med. Hyg., 24(2) : 250 ~ 260. 1975.

単行本

和文： 7) 山村雄一・石坂公成：免疫化学概論, 2版 : 15 ~ 18. 朝倉書店, 東京. 1973.

英文： 15) Smith, H. A., Jones, T. C. and Hunt, R. D. : Veterinary Pathology. 4th ed. Lea & Febiger Pub., Philadelphia. U.S.A. 1972.

12. 外国人名、地名などは、原語のまま記述し、数字は算用数字、度量衡はメートル法に拠る。
13. 印刷の校正は編集委員が行う。但し、初校は著者も行うものとし、この場合、原則として、内容の訂正は認めない。
14. 別刷は、100部まで無償で贈呈する。それ以上の部数については、著者実費負担とする。必要部数については、初校（著者校正）のとき、原稿の右上端に朱書すること。

山口県獣医師会学会規則

- 第1条 学会は、山口県獣医師会定款第2条及び第3条の目的を達するため、学術研究業績発表事業を行い、山口県獣医学会と称する。
- 第2条 学会長は山口県獣医師会会長とする。
- 第3条 会の公正円滑な運営を図るために学会運営委員会を設置する。
- 第4条 運営委員は16名以内とし、理事会に諮り会長これを委嘱し、任期は2か年とする。
- 第5条 学会は年1回以上開催する。
- 第6条 学会は機関誌「山口獣医学雑誌」を年1回以上発刊し、会員及び関係機関に配布、寄贈及び交換を行うものとする。
- 第7条 機関誌の編集は、別に定める「山口獣医学雑誌編集内規」による。
- 第8条 規則に定めない事項は運営委員会においてこれを決定する。
- 第9条 規則の改廃については理事会の議決を要する。

付 則

この規則は昭和54年（1979年）10月13日から実施する。

山口獣医学雑誌編集内規

- 第1条 雑誌は、原則として毎年8月に定期刊行する。
- 第2条 編集は獣医学、医学、生物学、公衆衛生学及び関連領域の総説、原著、短報、資料等で、会員の寄稿原稿及び学会の依頼原稿について行う。
- 第3条 学会長は、編集委員若干名を委嘱し、委員会を設置する。
- 第4条 学会長は、学会事務局に、発刊、配布、寄贈、交換、広告取得等の事務を担当させる。
- 第5条 委員の任期は2年とする。ただし再任を妨げない。
- 第6条 編集委員会
- (1) 委員会は、会長が必要に応じて招集する。
 - (2) 委員長は、委員の互選による。
 - (3) 委員会は、寄稿原稿の採否について審査する。
 - (4) 委員会は、発行部数を決定する。
- 第7条 内規に定めない事項は、編集委員会において決定する。
- 第8条 内規の改廃については、編集委員会及び学会運営委員会において決定する。

付 則

この内規は、昭和54年（1979年）10月13日から実施する。

山口県獣医師会関係事業および刊行物

事業概要

獣医学術の発達普及と獣医業務の公正円滑な発展を図り、地域社会の畜産と公衆衛生の発達に寄与するとともに、獣医業医術倫理に基づく獣医師の学識、技術、教養、品性、等々の向上を図るための諸種の事業を行う。

学会・講習会・研修会

山口県獣医学会

1962年第1回開催，毎年1回開催，2003年現在第42回学会を終了。

講習会・研修会

臨床（大動物，小動物，鶏病），公衆衛生等々の講習，研修会を県獣医師会，中国地区連合獣医師会，日本獣医師会，山口県，農林水産省，厚生省，等々の単独開催，共催，後援によって年5～6回実施。

刊行物

山口県獣医師会会報

1961年6月創刊，毎月1回発行，現在（2003年12月）第511号を発刊。会報，公文，広報，雑報，随筆，消息，等々を登載，県内会員および全国都道府県獣医師会へ配布。

山口獣医学雑誌 The Yamaguchi Journal of Veterinary Medicine

1974年1月創刊，毎年1回発行，現在（2003年12月）第30号を発刊。邦文，英文，独文の総説，原著，等々，論文を登載，山口県獣医学会の機関誌として内外の学術誌と交換。

ACKNOWLEDGEMENT

The Yamaguchi Prefectural Association of Veterinary Medicine appreciates the services of Mr. & Mrs. Masaharu Ano for proofreading the manuscripts in English.

謝辞

山口獣医学雑誌に登載される英文論文は，阿野政晴並びに阿野メリアン両先生御夫妻の御校閲を賜りました。山口県獣医学会として深甚な謝意を呈上申し上げます。

山口獣医学雑誌

The Yamaguchi Journal of
Veterinary Medicine

第30号

No.30

2003年

2003

2003年12月25日印刷

2003年12月30日発行

山口県獣医学会

学会事務局

山口県獣医師会館内

山口県吉敷郡小郡町下郷東蔵敷1080-3

郵便番号 754-0002 電話 小郡 (083) 972-1174番

FAX (083) 972-1554番 e-mail: yama-vet@abeam.ocn.ne.jp

印刷所

コロニー印刷

山口県防府市台道長沢522番地

電話 防府 (0835) 33-0100番

FAX (0835) 32-2514番

(毎年1回発行)

THE YAMAGUCHI JOURNAL OF VETERINARY MEDICINE

No. 30 DECEMBER 2003

A Special Number Issued in Commemoration of the 30th
Anniversary of Publication of the Official Journal

CONTENTS

REVIEWS

- Current Knowledge on Foodborne Bacterial Zoonoses on Farm.
Muneo NAKAZAWA, Toshiya SAMESHIMA, Masato AKIBA and Noriyo YOSHII 1 ~ 20
- Diagnosis of Ehrlichiosis in Veterinary Medicine.
Hisashi INOKUMA 21 ~ 40
- Present Status of Leg and Hoof Diseases are Frequently Reported from Various Parts in Japan.
Osamu OHOTAKE 41 ~ 50
- Development and Practice of Equipment for Embryo Transfer and *in vitro* Production of Bovine Embryos.
Tatsuyuki SUZUKI 51 ~ 58

ORIGINAL ARTICLES

- Filamentous Bridging Structure ; A Role Playing in the Morphogenesis of *Trypanosoma evansi*.
Takeo HIRUKI 59 ~ 68
- The Investigation on the Microplate Method for Identifying H antigens of *Salmonella*.
Kiyoshi TOMINAGA 69 ~ 74
- A Survey of Public Opinion on an Actual Condition and a Requirement of Animal Assisted Relaxation
Activity : A Future Significance of Animal Assisted Activity (AAA) and Animal Assisted Therapy (AAT).
Takuro NARITA, Masahiro KIYAMA, Tomoko KAWAKAMI, Itaru FUNATSU,
Hyoung-Rak Choi and Mineo HAYASAKI 75 ~ 86

ADDENDA

- Rules of Contribution to the Official Journal. 87
- Rule of the Association 88
- Bylaw for the Arrangement of the Official Journal. 88
- Outline of the Enterprises and the Publications (*colophon page*)