

山口獣医学雑誌

第 32 号
2005年12月

山口県獣医学会

THE YAMAGUCHI JOURNAL OF VETERINARY MEDICINE

No. 32

December 2005

THE
YAMAGUCHI PREFECTURAL ASSOCIATION
OF
VETERINARY MEDICINE

山 口 県 獣 医 学 会

編 集 委 員 会

網本 昭輝 中尾 利器 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 山口県山口市小郡下郷東蔵敷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 AMIMOTO Toshiki NAKAO 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. This journal is an official publication not for public sale.

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, Yamaguchi City, Yamaguchi Prefecture, 754-0002 Japan.

山口獣医学雑誌 第32号 2005年

The Yamaguchi Journal of Veterinary Medicine No.32 December 2005

目 次

総 説

- ウエストナイルウイルスに関する最新の知見と対策
林 昌宏・倉根一郎…………… 1～12
- 近年における乳牛の受胎率低下の原因と対策
中尾敏彦…………… 13～20

原 著

- 近位端部における *Trypanosoma evansi* の鞭毛の空間的構築改訂
比留木武雄…………… 21～30

短 報

- 山口県で発生した高病原性鳥インフルエンザの現地防疫措置
山西富野・松本容二・国吉佐知子・松田普二…………… 31～36

症 例

- 犬の破折歯の治療を行った60症例
山岡佳代・八村寿恵・久山朋子・廣川美菜子・網本昭輝…………… 37～40

附 録

- 投稿規定…………… 41
- 山口県獣医師会学会規則…………… 42
- 山口獣医学雑誌編集内規…………… 42
- 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

ウエストナイルウイルスに関する最新の知見と対策

林 昌宏*・倉根一郎*

〔受付：2005年10月30日〕

REVIEW

THE SPREAD AND RESURGENCE OF WEST NILE VIRUS DISEASE : RECENT DEVELOPMENTS IN THE VIROLOGY, EPIDEMIOLOGY, AND CLINICAL CHARACTERISTICS

Chang-Kweng LIM and Ichiro KURANE

Department of Virology I, National Institute of Infectious Diseases, Tokyo, 162-8640, Japan

〔Received for publication : October 30, 2005〕

West Nile virus (WNV) is one of several members of the Japanese encephalitis serocomplex within family *Flaviviridae*, genus *Flavivirus*. WNV is maintained in a natural cycle between mosquitoes and birds. The virus causes febrile illness, meningitis, encephalitis, and flaccid paralysis in humans and horses.

An epidemic outbreak of WN fever brought a high mortality in Rumania in 1996. It was followed by outbreaks in Israel, Russia, and the United States. In the United States the reported number of human and equine cases has exceeded 19,000 and 20,000, respectively, since it was first detected in New York City in 1999. The virus spread to neighboring countries and areas, including Canada, Mexico, Caribbean islands, and Colombia in 2003 and 2004.

In Japan the first human case of WN fever, who developed illness soon after returning from the United States, was reported in 2005. Research on WNV has remarkably progressed during the past six years.

This article aims to review recent progress in virology, epidemiology, and pathology of WNV infection. It will also provide a new platform for future research and prevention of WN fever / encephalitis.

1. はじめに

ウエストナイルウイルスは日本脳炎ウイルスやデングウイルスなどと同じフラビウイルス科フラビウイルス属に分類される節足動物媒介性ウイルスであり、1937年にウガンダで初めて分離された。人獣共通感染症であるウエストナイル熱・脳炎はアフリカ、ヨーロッパ、西アジア、中東を中心にヒトの熱性脳炎疾患として散発して来たが、1990年代の後半から急速に流行地域を拡大した感染症である。1999年のニューヨークでの発生以来その流行地域は北アメリカ大陸およびカリブ海地域のほぼ全域にも拡大した。現在もその流行が終息する気配はない。2004年には南アメリカのコロンビアにおいてもその存在が確認された。我が国においても米国渡航者による輸入症例が2005年に報告され、いっそうの警戒が必要になっている。本感染症はトリを宿主とし蚊の吸血によってヒト、ウマ等に媒介されるウイルス性急性熱性疾患である。ウエストナイルウイルス感染者の約80%は症状を示さないが、特に高齢者において脳炎を発症することがある。現在ウマ用ウエストナイル不活化ワクチンおよびDNAワクチンが米国で認可されているがヒト用ワクチンはない。したがってウエストナイルウイルスの流行地域に渡航する場合は蚊に吸血されにくい服装や忌避剤の使用等の予防対策が必須である。本邦への侵入が引き続き懸念されているウエストナ

* 国立感染症研究所ウイルス第一部 〒162-8640 東京都新宿区戸山1丁目23番1号

イル熱は「感染症の予防および感染症の患者に対する医療に関する法律」で4類感染症に指定されており、当該患者を診断した医師あるいは鳥類に属する動物が当該感染症にかかり、又はかかっている疑いがあると診断した獣医師はただちに保健所を経由して都道府県知事に届け出ることが求められている。またウエストナイルウイルス感染症は「家畜伝染病予防法」に定める流行性脳炎であり、異常馬等を発見した獣医師、飼養者は家畜保健所を経由して都道府県知事にその旨を届け出なければならない。

2. ウエストナイルウイルスの性状

ウエストナイルウイルスはフラビウイルス科、フラビウイルス属のなかでも日本脳炎ウイルス、クンジンウイルス、セントルイス脳炎ウイルス、マレーバレー脳炎ウイルスとともに日本脳炎血清型群に分類される。これらのウイルスは脳炎を主症状とするウイルスであり、E蛋白質のアミノ酸配列の相同性が高いことが知られている^{21, 27)}。

ウエストナイルウイルスは直径40~50nmの一本鎖プラスRNAを有する球状ウイルスである (Fig. 1)。そのコアは塩基性蛋白質である約12kDaのコア蛋白質により構成され直径25~35nmである。さらにコアは約8kDaの膜蛋白質 (M蛋白質) と約53kDaの糖蛋白質 (E蛋白質) の2種類の蛋白質から構成されるエンベロープによって被われている。特にE蛋白質は宿主親和性、細胞吸着、毒性、赤血球凝集反応等に関ってお

り、ウエストナイルウイルスに対する防御免疫を誘導する主体となる蛋白質である。感染細胞内の未成熟のウエストナイルウイルス粒子はM蛋白質の代わりにその前駆体であるprM蛋白質 (約18~20kDa) を有しているが、ウイルス粒子が宿主細胞より放出される際にはprM蛋白質がフリリンにより切断されM蛋白質となることにより成熟粒子となる³⁾。

ウエストナイルウイルスの遺伝情報はウイルスのコア粒子内に存在する11,029塩基の一本鎖RNAにコードされている。一本鎖RNA上には96塩基の5'非コード領域に続いてC蛋白質、prM蛋白質、E蛋白質の3種類の構造蛋白質がコードされており、さらに非構造蛋白質であるNS 1, NS 2 A, NS 2 B, NS 3, NS 4 A, NS 4 B, NS 5の7種類の蛋白質と631塩基の3'非構造領域が存在する (Fig. 2)。ウイルスRNAはウイルスの感染により宿主の細胞内に放出されるとmRNAとして働くプラス鎖のRNAであり、その5'端にはキャップ

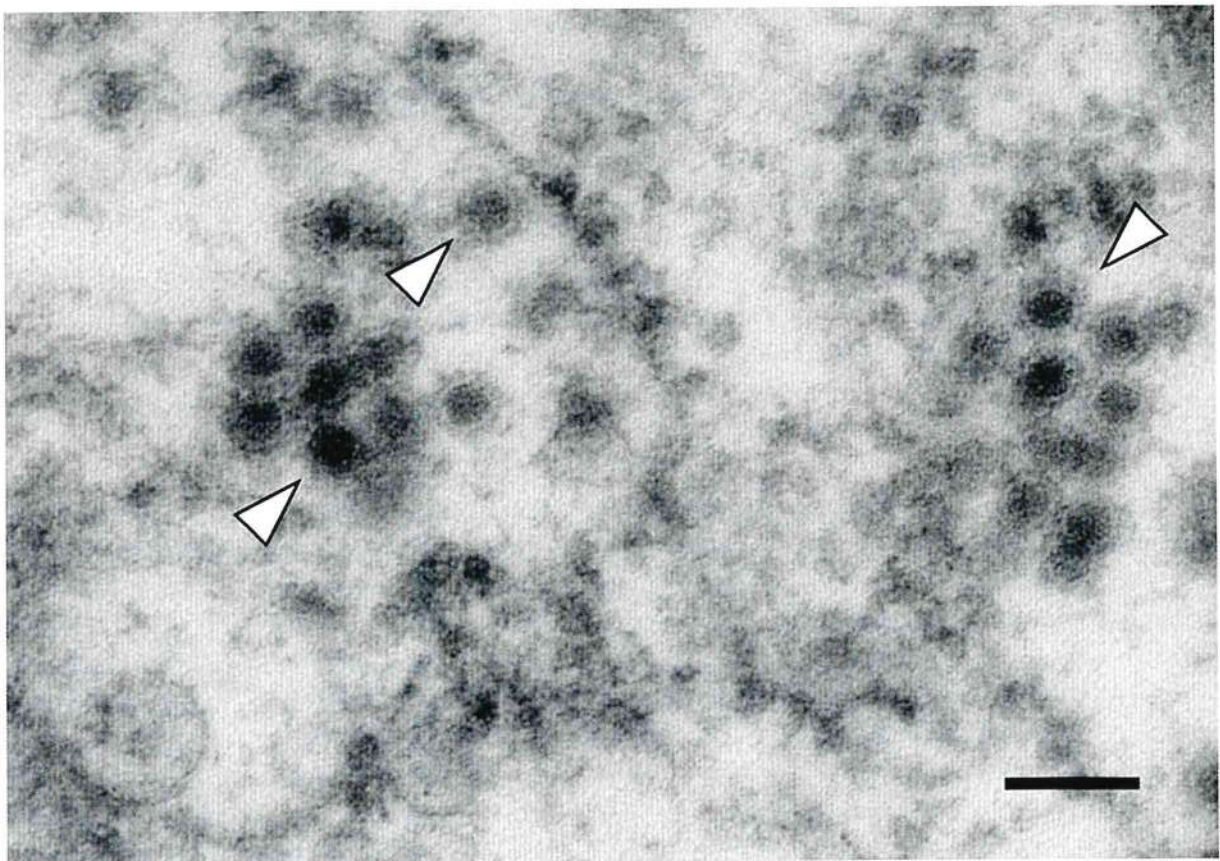


Fig. 1 ウエストナイルウイルスの電子顕微鏡像

ウエストナイルウイルスは直径約50nmのエンベロープを被った球状ウイルス (矢頭) である。(Barは100nm)
(国立感染症研究所ウイルス第一部 高崎智彦博士による)

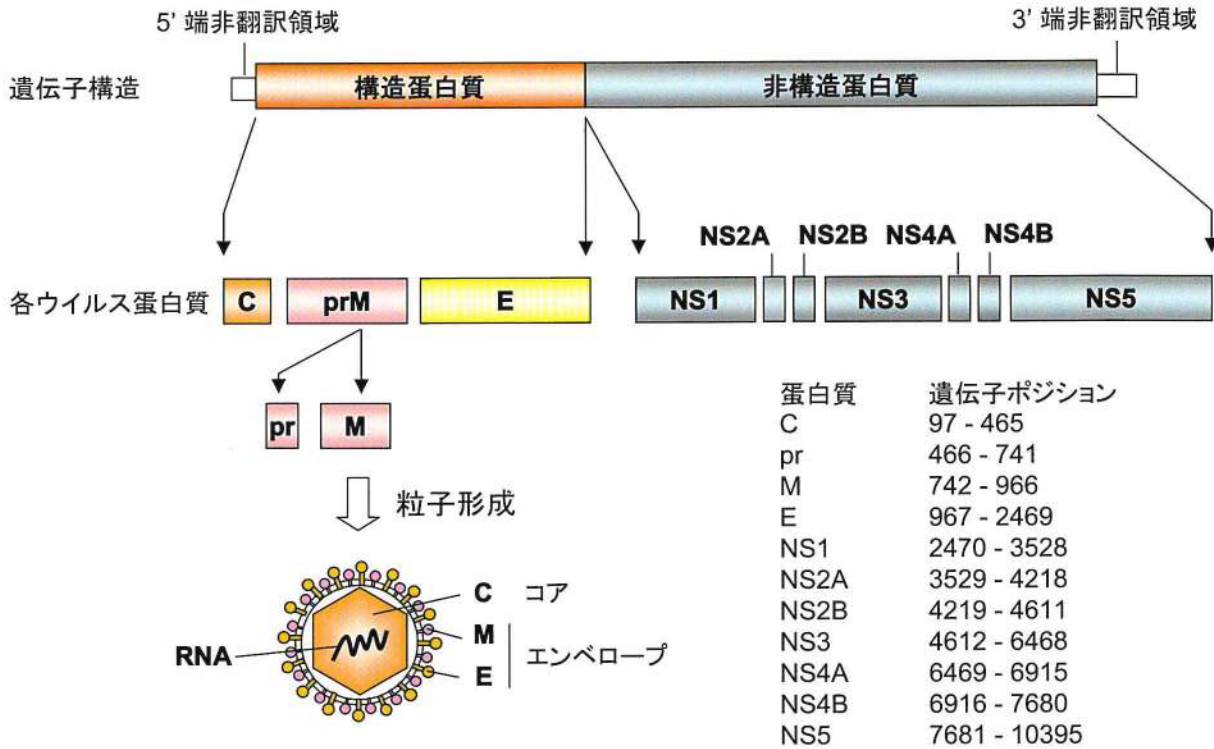


Fig. 2 ウエストナイルウイルスの遺伝子構造

ウエストナイルウイルスは一本鎖のRNAウイルスであり、その遺伝子は5'末端から3'末端にかけて、構造蛋白質であるC蛋白質、prM蛋白質、E蛋白質、さらに非構造蛋白質であるNS1蛋白質、NS2A蛋白質、NS2B蛋白質、NS3蛋白質、NS4A蛋白質、NS4B蛋白質、NS5蛋白質をコードしている。ウイルスRNAは大きなポリ蛋白質に翻訳され、このポリ蛋白質が宿主およびウイルス自体が有する酵素により切断され、各ウイルス蛋白質となる。ウイルス粒子はウイルスRNA、C蛋白質より形成されるカプシッドとprM蛋白質由来のM蛋白質およびE蛋白質より構成されるエンベロープにより形成される。ウエストナイルウイルス遺伝子のポジションはNY99 flamingo株による³⁰⁾。

構造が存在するが3'端にポリAテールは存在しない。ウイルスRNAは宿主細胞内で翻訳され、1本の大きなポリ蛋白質を形成する。その後ポリ蛋白質は宿主およびウイルスの酵素により切断され、各ウイルス蛋白質となる³⁾。

非構造蛋白質は宿主細胞内でウイルスRNAの複製、ウイルスの成熟などに関与している。NS1とNS4Aはウイルスの複製に関与し、NS2Aはウイルス粒子の構築と放出、NS2BとNS3はウイルス由来のセリンプロテアーゼとしてポリ蛋白質の切断を行う。NS5にはRNA依存性RNAポリメラーゼ及び5'キャップ構造のメチル化修飾に関するメチルトランスフェラーゼとしての働きがある³⁾。

ウエストナイルウイルスの発現する蛋白質のうち、prM、E、NS1、NS3、NS5蛋白質が液性免疫、細胞性免疫応答に関与している^{3,6)}。

3. ウエストナイルウイルスの流行状況

1) ウエストナイルの分布

ウエストナイルウイルスは1937年にウガンダのウエストナイル地区で発熱した女性から初めて分離された

ウイルスである³⁰⁾。その後ウエストナイル熱はアフリカ、中東、ヨーロッパ、中央アジア諸国で流行を繰り返してきたがいずれも小規模で散発的であったため世界的に認識されてこなかった。しかしながら1996年のルーマニアの首都ブカレストを中心とした地域における大流行では400人近くの患者が発生し約40人の死者を数え、その流行は1998年まで続いた^{8, 10)}。以来チェコ(1997)、コンゴ共和国(1998)、チェンジア(1997, 2003)、フランス(2000)イスラエル(1997~2000)、グルジア(1998)、ロシア(1999~2004)米国(1999~2005)、カナダ(2002~2005)、メキシコ(2003)で患者が報告された¹⁵⁾。モロッコ(1996)、イタリア(1998)、フランス(2000, 2003)、米国(1999~2005)、カナダ(2002~2005)、メキシコ(2002~2003)ではウマのウエストナイル感染症の発症が報告された。さらに、ウマの血清学的調査により南米のコロンビア(2004)で、またトリの血清学的調査でイギリス(2003)でもウエストナイルウイルスが活動していることが明らかとなった^{4, 7, 31)}(Table 1)。近年流行しているウエストナイルウイルスの特徴はトリに対する強毒性、ヒトに対する高い死亡率と流行の持続性であり、流行地域は拡大傾向にある^{16, 22, 27)}。

Table 1 これまでにウエストナイルウイルスの活動が確認された国と地域

国と地域	
アフリカ	ウガンダ, エジプト, アルジェリア, ボツワナ, 中央アフリカ, コートジボワール, キプロス, コンゴ, エチオピア, マダガスカル, ナイジェリア, セネガル, 南アフリカ, ウガンダ, モロッコ, モザンビーク, ケニア, スーダン, チュニジア
中近東	イスラエル, イラク, レバノン, シリア, トルコ
中央アジア	カザフスタン, タジキスタン, アゼルバイジャン, トルクメニスタン, ウズベキスタン
ヨーロッパ	ロシア (南ロシア, シベリア, 極東地域を含む), フランス, スペイン, イタリア, ポルトガル, ブルガリア, ルーマニア, ハンガリー, チェコ, スロバキア, オーストリア, ポーランド, ギリシャ, ベラルーシ, ウクライナ, モルドバ, グルジア, アルメニア, アルバニア, セルビア・モンテネグロ, クロアチア, ボスニア・ヘルツェゴビナ, イギリス
南北アメリカ	米国, カナダ, メキシコ, エルサルバドル, コロンビア, ドミニカ, ジャマイカ, グアドループ
その他の地域	インド, パキスタン, スリランカ, オーストラリア (クンジンウイルス), マレーシア (ボルネオ島: クンジンウイルス)

2) 近年のウエストナイルウイルスの動向

1999年夏に米国東海岸のニューヨーク市で西半球において初めてウエストナイル患者が報告された³⁹⁾。その前年の1998年9月には紅海に面したイスラエル南部のエイラト地方のガチョウ (*Anser anser domesticus*) 農場において3~12週齢の数百羽のガチョウが神経症状を示して死亡し、多いところではガチョウの約40%が死亡した。ニューヨーク市で分離されたウエストナイルウイルスは遺伝子解析の結果イスラエルにおいてガチョウの脳から分離された株との相同性が99.8%と非常に高いことが明らかにされた⁴⁰⁾。このことからニューヨーク市で分離したウエストナイルウイルス株はイスラエルから侵入したと考えられている。

ところでイスラエルのエイラト地方は渡り鳥の中継地であり、春と秋に多くの渡り鳥がヨーロッパや中央アジアの繁殖地とアフリカの越冬地を移動する際に羽を休める。1998年8月、ガチョウ農場でウエストナイル感染症の集団発生が起こる数週間前には、ヨーロッパから渡ってきた一歳未満のコウノトリ (*Ciconia ciconia*) がエイラト地方に渡って二日後に、ガチョウ農場付近で死亡していることが報告されている。その後の調査で死亡したコウノトリからウエストナイルウイルスが分離され、その遺伝子はガチョウから分離されたウエストナイルウイルスの遺伝子と高い相同性(99.8%)を示したことから、1998年にイスラエルで発生したウエストナイル感染症は1998年にコウノトリがヨーロッパからイスラエルに運んできたものによると考えられている³⁹⁾。

その後エイラト地方においても1999年の秋から冬にかけてヒトの感染者が確認され、2000年の8月1日から10月31日の間にはイスラエル全土において大流行が起こった。血清学的に感染が確認されたヒトは417例を数え、うち35人は死亡した。この流行はイスラエルでこれまでに報告されたウエストナイル熱に比較して

明らかに広範囲に発生し、高い死亡率を示した。このときの患者から、ニューヨーク市で1999年にフラミンゴから分離されたウイルス株と遺伝子配列の相同性の高いウイルス株(99.7%)およびルーマニアで1997年に分離されたウイルス株と相同性の高いウイルス(98.4%)株がそれぞれ分離されている^{41, 42)}。

ニューヨーク市で始まった北アメリカ大陸におけるウエストナイル熱・脳炎の流行は年々西方に拡大し、これまでに多数の患者と死者が報告されている。そしてその状況はカナダ、メキシコ、カリブ海諸国、南米コロンビアなどの周辺諸国に広がった。今後さらにウエストナイルウイルスの活動地域が南アメリカ大陸で拡大することも危惧されている。

オーストラリアにはウエストナイルウイルスに近縁のクンジンウイルスが存在し、近年も散発的な流行が続いている⁴³⁾。南ロシアから中央アジア地域には広大なアフリカからの渡り鳥の繁殖地が広がっており、以前からウエストナイル熱・脳炎が散発していた。近年のウエストナイル熱・脳炎の流行においても黒海とカスピ海の間位置するグルジアにおいて1998年に発熱と発疹を伴う624人の患者が報告され、カスピ海北西に位置するロシアのヴォルゴグラードにおいても1999年に約1000人の患者が発生し、少なくとも40人が死亡した。このウイルス株は1997年にルーマニアで分離された株と遺伝子の相同性が高いことが報告されている⁴⁵⁾。

また2004年には西シベリアのノボシビルスクで3名の脳炎患者が確認された。さらにシベリアからロシア極東地域では広範囲でウエストナイルウイルスが活動していることが、1999年から2003年の間のウラジオストック周辺のロシア極東地域での220羽のクロハゲワシ (*Aegypius monachus*) の死鳥調査によって確認された。2003年にはクロハゲワシの検体からウエストナイルウイルスが検出されており、今後の東アジア地域へのウエストナイルウイルスの流行地域の拡大が危惧

Table 2 1999年にニューヨーク市内の動物展示施設で確認されたウエストナイルウイルス感染鳥一覧*

目	和名	学名	感染鳥数
スズメ目	カラス	<i>Corvus brachyrhynchos</i>	5
	ウオガラス	<i>Corvus ossifragus</i>	1
	カササギ	<i>Pica pica</i>	2
コウノトリ目	チリーフラミンゴ	<i>Phoenicopterus chilensis</i>	5
	ゴイサギ	<i>Nycticorax nycticorax nycticorax</i>	1
ペリカン目	グアナイムナジロヒメウ	<i>Phalacrocorax bougainvillea</i>	3
チドリ目	ワライカモメ	<i>Larus atricilla</i>	2
カモ目	ノドジロガモ	<i>Anas specularis</i>	2
	マガモ	<i>Anas platyrhynchos</i>	1
キジ目	ニジキジ	<i>Lophophorus impeyanus</i>	2
	ミヤマジュケイ	<i>Tragopan blythi</i>	1
タカ目	ハクトウワシ	<i>Haliaeetus leucocephalus alascanus</i>	1
フクロウ目	シロフクロウ	<i>Nyctea scandiaca</i>	1

* 1999年8月10日から9月23日の間にニューヨークの2カ所の動物展示施設で確認されたウエストナイルウイルス感染鳥は8目13種におよぶ

されている²⁸⁾。

4. 米国におけるウエストナイルウイルスの動態

1999年にニューヨーク市で始めてウエストナイル熱・脳炎の患者が報告され、ニューヨーク州周辺で62人の患者が確認された。ヒトにおける死亡例が報告される数ヶ月前には数百羽のカラス (*Corvus brachyrhynchos*) が死にはじめた。その他にもイエスズメ (*Passer domesticus*)、展示動物であるチリーフラミンゴ (*Phoenicopterus chilensis*)、ハクトウワシ (*Haliaeetus leucocephalus*)、グアナイムナジロヒメウ (*Phalacrocorax bougainvillii*)、等の死亡も確認された (Table 2)。このように現在米国で流行しているウエストナイルウイルスの特徴はカラスやウオガラス (*Corvus ossifragus*) などの特にカラス科 (*Corvidae*) のトリに対する強毒性である。

1999年の発生以来、2000年には21人の患者がアメリカ東海岸諸州で、2001年には66人の患者がアメリカ東海岸から南部諸州、中西部で報告された。さらに2002年にはアメリカ大陸西部へ流行地域が拡大し、ウエストナイル患者4156人、死者284人が報告された。2003年には患者9862人、死者264人、2004年には患者2470人、死者88人が報告され、現在アメリカ合衆国においてウエストナイルウイルスの活動が報告されていないのはアラスカ州、ハワイ州のみとなった¹⁹⁾ (Fig. 3)。2005年においても鳥類、動物、蚊の疫学調査によりアラスカ州、ハワイ州を除くすべての州でウエストナイルウイルスの活動が報告されており、ヒトにおける患者数は2949人、その内死者は116人となっている。これらの疫学的調査は米国疾病対策予防センター (CDC) を中心に行われており、特に死鳥の調査はウエストナイルウイルスの活動を知る上で重要な情報である。

5. 日本におけるウエストナイル熱

これまでに日本においてウエストナイルウイルスが常在していることを示す報告はなく、2005年10月3日に初めて輸入症例が確認された¹⁹⁾。患者は9月5日に米国から帰国した30代の男性で、米国に8月28日から9月4日まで滞在し、帰国前夜から倦怠感を呈し、翌日から発熱、頭痛、発疹、腰痛症状を呈した。実験室診断としてIgM抗体検査を行ったところ9月10日に採取した血清で弱陽性、9月20日に採取した血清で陽性を示した。さらに両血清をペア血清とした中和試験では、4倍以上の上昇がみとめられ、10月3日に検査結果は陽性と確定した。なお、RT-PCR法による遺伝子検査では、陰性であった。

6. ウエストナイルウイルスの生態

1) 感染環

ウエストナイルウイルスはトリが自然宿主であり、トリと媒介昆虫である蚊の間で、感染環が形成・維持されている。トリはウエストナイルウイルスに感染した蚊に吸血されることによりウエストナイルウイルスに感染し、感染後1～4日の間に多量のウイルス血症を示す。そのトリを吸血した蚊は再びウエストナイルウイルスに感染し、感染環が成立する^{16, 22, 27)} (Fig. 4)。また実験的にはカラス、アオカケス (*Cyanocitta cristata*)、カササギ (*Pica pica*)、クロワカモメ (*Larus delawarensis*) 等において接触感染が、カラス、イエスズメ、アメリカワシミミズク (*Bubo virginianus*)、オオクロムドリモドキ (*Quiscalus quiscula*)、メキシコマシコ (*Carpodacus mexicanus*)、ネコ (*Felis silvestris catus*) 等において経口感染が報告されている^{1, 19)}。

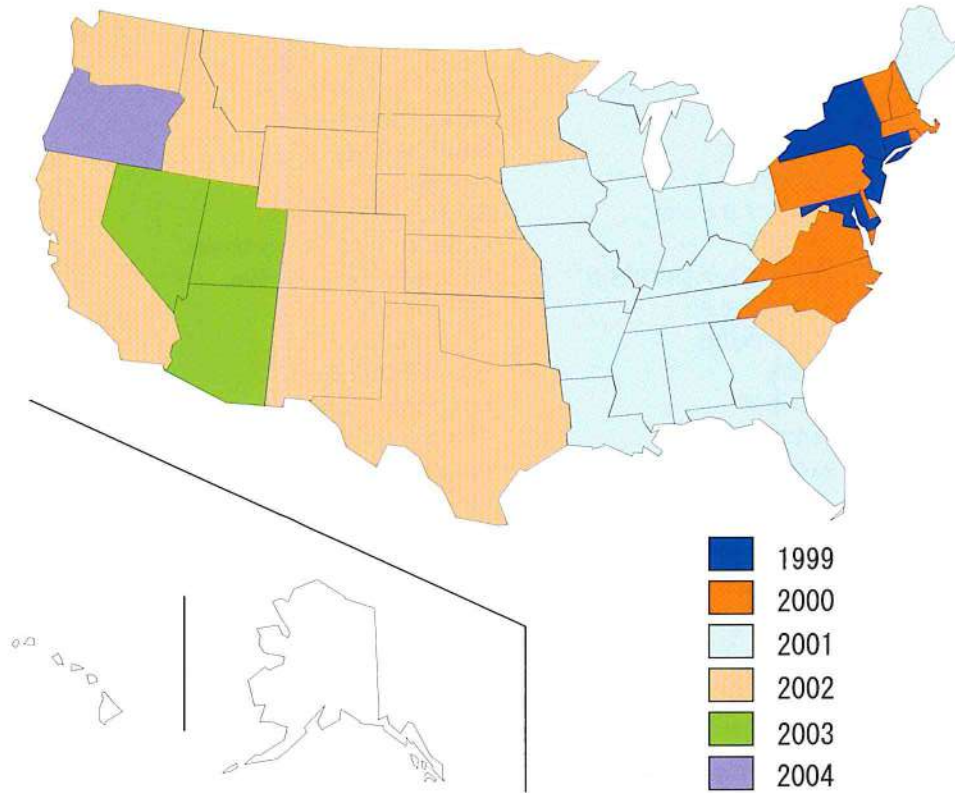


Fig. 3 1999-2004年間の米国におけるウエストナイルウイルス活動地域の拡大
[米国疾病対策予防センター (CDC) の発表より改変]

米国の各州において初めてウエストナイルウイルスの活動が確認された年を示す。1999年にニューヨーク市で分離されたウエストナイルウイルスはその分布域を年々北アメリカ大陸の西へ拡大し、2002年以来大流行を起こした。2005年現在ウエストナイルウイルスの活動が確認されていない州はアラスカ州とハワイ州のみである。

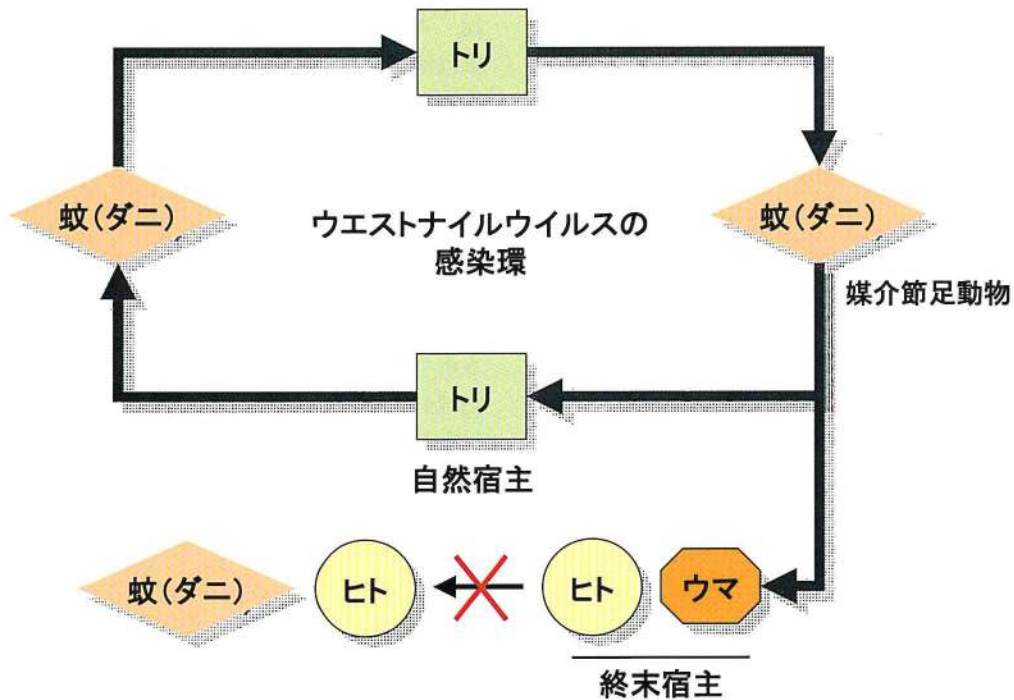


Fig. 4 ウエストナイルウイルスの感染環

ウエストナイルウイルスは自然宿主（増殖動物）である鳥類と媒介節足動物である蚊の間で感染環を形成・維持している。ヒトやウマなどの終末宿主は蚊によってウエストナイルウイルスを媒介されるが、感染した場合のウイルス血症は一般的に低く感染源となることはないと考えられている。また蚊のいない乾燥地域を中心にダニが重要な媒介節足動物となっている可能性も考えられている。

2) 媒介節足動物

主要なウエストナイルウイルスの媒介蚊はアカイエカ群 (*Culex spp.*) に属する蚊である。この群のうち、米国での主媒介蚊はトビロイエカ (*Cx. pipiens pipiens*) であり、アフリカや中東では *Cx. univittatus*, ヨーロッパでは *Cx. pipiens*, *Cx. modestus* などである。日本に生息するものではアカイエカ (*Cx. p. pallens*), チカイエカ (*Cx. p. molestus*), そして琉球諸島に生息するネッタイエカ (*Cx. p. quiquefasciatus*) などがウイルス媒介能をもつと考えられる。その他にもヤブカ属 (*Aedes spp.*) のヒトスジシマカなどこれまでに40種以上の蚊がウエストナイルウイルスを媒介することが明らかとなっている^{9, 15)}。

ウエストナイルウイルスは中央アジア、アフリカなどの乾燥地帯において軟体ダニであるカズキダニ属 (*Argas spp.*), ヒメダニ属 (*Ornithodoros spp.*), 硬体ダニであるコイタマダニ属 (*Rhipicephalus spp.*), カクマダニ属 (*Dermacentor spp.*) などの吸血ダニから分離されており、蚊のいない乾燥地域を中心にダニが重要な媒介節足動物となっている可能性も考えられている¹⁵⁾。

3) 宿主

これまでに感染が確認された鳥類の種類は220種以上におよぶ。特にカラス、イエズメ、アオカケス、クロワカモメ、メキシコマシコ等において血中のウイルス量が高いことが報告されている。近年のウエストナイルウイルス感染鳥の特徴の一つは感染鳥の発病と死亡である。死亡鳥の調査はウエストナイルウイルスの動態の把握に有効であるため死亡鳥を発見した際は速やかに最寄りの公衆衛生機関に届け出ることが望ましい。

ヒトやウマは脳炎を発症するが、ウエストナイルウイルスに感染しても高いウイルス血症を示さない。従って感染したヒトやウマを吸血した蚊がウエストナイルウイルスに感染する可能性は極めて低く、ヒトやウマからウエストナイルウイルスの感染が拡大することはないと考えられている。しかしながら近年特殊な感染経路として、妊娠中の母親が感染したことによる胎児への感染、母乳による感染、輸血による感染、臓器移植による感染も発生している。また針刺し事故による感染などが報告されており保健、医療、獣医療関係者は注意を要する¹⁹⁾。

ネコやイヌはウエストナイルウイルスに感染するがほとんど症状を示すことはない。これまでのイヌにおける血清学的調査によれば、1980年代の南アフリカでの調査では37%、1990年代のインドでの調査では24%、1999年の米国ニューヨーク市での調査では5%のイヌにウエストナイルウイルスに対する抗体が検出された²⁾。また2005年の米国での調査でも26%のイヌに抗

体陽性が認められ、特にその割合は屋外犬で有意に高かった¹⁷⁾。4匹のイヌを用いた実験感染ではいずれも症状は認められず1匹のイヌで低いウイルス血症が認められたのみであり、唾液中にもウエストナイルウイルスは検出されなかった¹⁾。したがってイヌがウエストナイルウイルスの感染源となることはないと考えられている。

その他にウエストナイルウイルスの感染が認められた動物としてコウモリ、シマリス、スカンク、家兎、ワニ、カエル等が報告されており、ウエストナイルウイルスが広く脊椎動物に感染することが明らかとなっている。また実験的にアカゲザル (*Macaca mulatta*), ポンネットモンキー (*Macaca radiata*), ヒツジ等で臨床症状が認められている^{15, 33)}。

7. ウエストナイル熱・脳炎の臨床症状

1) ヒト

ヒトにおける潜伏期間は2~15日で多くは不顕性感染(80%)に終わるが、ウエストナイル熱を発症すると発熱、頭痛、背部痛、筋肉痛、食欲不振などの症状が3~6日間続く。約半数で発疹が胸部、背部、上肢に認められ、リンパ節腫脹、発疹、ギランバレー症候群用症状を呈することもある。さらに重篤な症状として感染者の約150人に1人が激しい頭痛、高熱、筋力低下、弛緩性麻痺、方向感覚の欠如、意識低下、眼痛、昏睡、震顫および痙攣などの髄膜炎や脳炎症状を呈する。重症患者は高齢者に多く、髄膜炎を起した患者の致死率は3~15%とされる^{6, 10, 13)}。近年注目されることとしてポリオ様の弛緩性麻痺の症状を呈する患者も報告されている。検査所見は末梢血中の白血球数正常あるいは軽度の増加、リンパ球数低下、脳炎患者においては脳脊髄液中のリンパ球数増加、蛋白増加、糖正常である。脳炎症例のMRIでは大脳基底核、視床、橋、脳室辺縁部の病変が示唆されている^{13, 38)}。

2) ウマ

ウエストナイルウイルスに感染したウマのほとんどは不顕性感染であるが、近年のウエストナイルウイルスの流行においては神経症状を伴うケースが増加しており、約10%のウマに神経症状が認められる。このことはウマの感染実験によっても確かめられており、実験に供した12頭のウマのうち、1頭のウマに神経症状が発症している⁵⁾。ウマでの潜伏期は1~2週間、発熱を伴って発病し、脊髄障害によって運動失調、四肢の不全麻痺、麻痺、起立不能を示す。これらの症状は皮膚の繊維束性攣縮、筋の震顫、筋の硬直を伴うこともある。また延髄、橋、視床、網様体、小脳、大脳皮質の障害に伴い運動失調、距離測定障害、嗜眠、狂騒、攻撃性、知覚過敏などの症状を示す。また顔面神経、

舌下神経、舌咽神経の障害により顔面神経麻痺、舌の不全麻痺、嚥下障害を示すものもある。剖検所見は組織学的に血管周囲の細胞浸潤、グリア細胞の結節などの非化膿性脳炎像が主に灰白質において認められる⁷⁾。

3) トリ

トリにおける主な臨床症状は嗜眠、羽毛逆立ち、運動失調、震顫、異常頭部姿勢、旋回、痙攣、削瘦等である。さらに数羽のカラスにおいては口腔や総排泄口に出血が認められる。またカラス、アメリカチョウゲンボウ (*Falco sparverius*)、アメリカワシミズク、アオカケス、クロワカモメ、ウオガラス、オオクロムクドリモドキ等の口腔スワブあるいは総排泄口スワブからは高い力価のウイルスが検出されており、ウイルスがトリの糞便中に排出されていることが明らかとなっている。剖検所見は頭蓋冠の出血、心筋炎、胃腸の出血、脾腫、腎炎等が認められ、組織学的には小脳の点状出血、髄膜炎、血管周囲の細胞浸潤、グリア細胞の結節、心筋炎、心外膜炎、心内膜炎、全腸炎、脾の壊死、肝のうっ血、肝細胞の散在性壊死、間質性腎炎等が認められる。また死亡鳥の脳、腎、心、脾、肝、肺、小腸、食道、生殖腺、皮膚、眼球からはウイルスが検出される^{12, 19, 37)}。

4) イヌ

イヌもウエストナイルウイルスに感染するが、そのほとんどは不顕性感染である。これまでにわずかに数症例がイヌ属 (*Canis*) であるイヌとオオカミにおいて報告されている^{25, 31)}。その症状は嗜眠、沈うつ、狂騒、食欲不振に始まり、発熱、衰弱、運動失調、流涎、震顫、水溶性下痢、煩渴多飲、失明、腹部の疼痛、呼吸困難、黒色便、起立不能、肺における浮腫、不整脈等である。検査所見は貧血、血小板減少、核左方移動を伴う中等度の白血球増加、中等度のカリウム血症、中等度の低血糖と低蛋白血症である。また剖検所見は組織学的にウイルス性脳炎を示唆する血管周囲の細胞浸潤、灰白質の散在的なミクログリア細胞とリンパ球の軽度の壊死を伴う凝集、白質のグリア細胞の結節が認められる。心臓においてはトリでの所見と同様に心筋炎が認められる場合があり、心機能低下に伴う肺の浮腫、肝臓の鬱血、胆汁鬱帯を伴う脂肪肝等の併発も報告されている。

8. ウエストナイルウイルスの診断

ウエストナイル熱・脳炎の患者・患畜の多くは無症候を呈し、また脳炎を発症した場合は他のウイルス性脳炎との鑑別を必要とすることから、ウエストナイル熱・脳炎の確定診断には実験室診断が必須である¹³⁾。実験室内で行われるウエストナイルウイルスの検査法

には病原体検査法と血清学的検査法があり、前者は血清や脳脊髄液からのウイルス分離あるいはウイルス遺伝子の検出を目的とし、後者はIgM捕捉ELISA、中和抗体試験、HI試験、CF試験等による抗ウイルス抗体の検出を目的とする。ウイルス分離材料は急性期患者・患畜の血清、血漿、髄液あるいは死亡例の脳組織である。トリの場合総排泄腔拭い液、口腔拭い液、血液、脳、腎臓、心臓その他の臓器を用いる。各組織は、10% 乳剤を作製しその上清を0.45 μ m フィルターにて濾過することにより分離試料とする。抗体測定用血清は急性期 (発病後5日以内) および回復期 (発病後14日以上) に採血を行い、ベア血清として抗体測定に用いる。採取したウイルス分離材料は冷蔵4℃またはドライアイスで凍結して輸送し、凍結融解の反復を避けるため-80℃に分注して保存する^{26, 30)}。

1) 病原体検査法

病原体検査はウイルス分離やウイルス遺伝子の検出を目的とする。ウエストナイルウイルスの分離には乳のみマウス脳内接種法あるいは培養細胞による分離法を用いる。乳のみマウス脳内接種法は1検体あたり1腹の生後2~4日齢の乳のみマウス (10匹) の脳内にウイルス材料を一匹当たり20~30 μ l 接種し10日間観察する。発症したマウスから採脳しウエストナイルウイルス特異的モノクローナル抗体を用いた免疫蛍光抗体法、RT-PCR法等によるウイルスの同定を行う。培養細胞を用いたウイルス分離法にはアフリカミドリザル腎由来のVero細胞やヒトスジマカ由来のC6/36細胞を用いる。細胞変性 (CPE) が観察された時点あるいは8日後に培養液の一部を凍結保存し残りの培養液を用いて特異的抗体を用いた免疫蛍光抗体法あるいはRT-PCR法によるウイルスの同定を行う^{26, 30)}。

ウイルス遺伝子の検出にはRT-PCR法、リアルタイムPCR (TaqMan PCR) 法を用いる^{20, 23)}。ウイルス遺伝子は患者の髄液、血清、血漿、あるいは血液単核球より精製し、RT-PCR法、リアルタイムPCR法に供試して、陽性及び陰性コントロールを基準に目的領域の特異的増幅を確認する^{26, 30)}。

2) 血清学的検査法

血清学的検査のための抗体測定用血清は急性期 (発病後5日以内) および回復期 (発病後14日以上) に採血を行い、ベア血清として抗体測定に用いる。IgM捕捉ELISA法は抗ヒトIgM抗体コーティングプレートで捕捉した患者血清中のIgMとウエストナイルウイルス抗原を反応させ、次に酵素標識した抗ウエストナイルウイルス抗体 (IgG抗体) で検出する方法である³⁰⁾。プラーク法による中和試験はアフリカミドリザル腎細胞由来のVero細胞を用いて攻撃ウイルスと各被検血清の中和反応を行いプラーク低減法により患者・患畜

Table 3 感染症法における獣医師から都道府県知事等への届出のための基準

1. 対象となる動物
鳥類に属する動物

2. 届出基準

- (1) 獣医師は、次の表の左欄に掲げる検査方法により、鳥類に属する動物又はその死体についてウエストナイル熱の病原体診断又は血清学的診断をした場合には、保健所を経由して都道府県知事に届出を行わなければならない。この場合において、検査材料は、同欄に掲げる検査方法の区分ごとに、それぞれ同表の右欄に掲げるもののいずれかを用いること。

検査方法	検査材料
・ ウイルス分離による病原体の検出	総排泄腔拭い液若しくは口腔拭い液、血液又は脳、腎臓、心臓その他の臓器
・ PCR法による病原体遺伝子の検出	総排泄腔拭い液若しくは口腔拭い液、血液又は脳、腎臓、心臓その他の臓器
・ 中和試験等による病原体に対する抗体の検出	血清

- (2) 獣医師は、臨床的特徴若しくは疫学的状況から鳥類に属する動物又はその死体がウエストナイル熱にかかっている疑いがあると診断し、又はかかっていた疑いがあると検案した場合は、(1)にかかわらず、病原体診断又は血清学的診断を待たず保健所を経由して都道府県知事に届出を行わなければならない。

の血清中の中和抗体価を算出する方法である。本検査方法はウエストナイルウイルスを使用するためにP3施設で行う^{26, 39)}。

3) 関連検査項目

急性脳炎において複数のウエストナイルウイルス検査を実施しても原因が特定できない場合には他のウイルス性脳炎を考慮に入れる必要がある。ヒトにおける鑑別診断として同じフラビウイルス属のウイルスによって発症する日本脳炎、セントルイス脳炎、ダニ媒介性脳炎(ロシア春夏脳炎)、マレーバレー脳炎、またアルファウイルス属のウイルスによって発症する西部ウマ脳炎、東部ウマ脳炎、ベネズエラ脳炎、あるいはヘルペス脳炎等のウイルス性脳炎が挙げられる。

ウマにおける鑑別診断として日本脳炎、西部ウマ脳炎、東部ウマ脳炎、ベネズエラ脳炎、馬鼻肺炎(EHV1)、狂犬病等が挙げられる。イヌにおける鑑別診断としては狂犬病、犬ジステンパー等が挙げられる。

9. 法律における取り扱い

1) 感染症法

ウエストナイル熱・脳炎は「感染症の予防および感染症の患者に対する医療に関する法律」で4類感染症に指定されており、当該疾患を診断した医師はただちに保健所を経由して都道府県知事に届け出ることが求められている。

また当該感染症を人に感染させるおそれが高い鳥類に属する動物又はその死体においてウエストナイル熱を診断した獣医師はただちに保健所を経由して都道府県知事に届出ることが求められている。獣医師から都道府県知事等への届出基準は、症状や所見から当該感染症が疑われ、かつ、(Table 3)に示したいずれかの方法によって病原体診断や血清学的診断がなされた

ものとなっている。さらに獣医師は、臨床的特徴若しくは疫学的状況から鳥類に属する動物又はその死体がウエストナイル熱にかかっている疑いがあると診断し、又はかかっていた疑いがあると検案した場合は、病原体診断又は血清学的診断を待たず保健所を経由して都道府県知事に届出ることが求められている。

さらに鳥類に属する動物の所有者は、獣医師の診断を受けない場合において、当該動物がウエストナイル熱にかかり、又はかかっている疑いがあると認めたときは、保健所を経由して都道府県知事に届出を行わなければならない。

2) 家畜伝染病予防法

ウエストナイルウイルス感染症は「家畜伝染病予防法」に定める流行性脳炎であり、運動失調(つまずき、よろめき、歩様の不調)に加え、旋回、後肢の虚弱、起立不能、複数肢の麻痺、筋収縮、固有受容感覚不全、盲目、口唇の下垂または麻痺、歯ぎしり、急死のうち2つ以上の症状を示したウマ(異常馬)等を発見した獣医師、飼養者は家畜保健所を経由して都道府県知事に延滞なくその旨を届け出なければならない(ウエストナイルウイルス感染症防疫マニュアルによる)。

10. 治療と予防

1) ヒト

一般にウエストナイルウイルス感染に対する特異的治療法はなく、対症療法が中心である。脳炎を発症した場合は脳浮腫対策、抗痙攣薬の予防投与などを行う。意識障害が持続することが多く、長期化する症例では合併症が予後を大きく左右するので肺炎などの合併症の予防や早期発見が重要であり、呼吸循環状態を適切に把握することが重要である。

ヒト用ワクチンは現在実用化されておらず不活化ワ

クチン, DNAワクチン, 黄熱ウイルスのワクチン株である17D株にウエストナイルウイルスのprMとEの配列を組み込んだキメラワクチン, デングウイルスとウエストナイルウイルスのキメラワクチン等のワクチン開発が進められている^{10, 11)}.

したがって現在ヒトがウエストナイルウイルスに感染するリスクを減らす主な手段は蚊に吸血されることを避けることである。そのためには蚊の防除・駆除および蚊の繁殖を抑制することが必要である。ウエストナイルウイルスの浸潤地域においては蚊との接触を防ぐため肌の露出をさけること, N, N-diethyl-3-methylbenzamide (DEET: ディート) 等を含む忌避剤を適切に使用すること, 蚊の吸血時間帯である夕方から夜明けにかけては外での活動を避けやむを得ない場合は忌避剤を使用することなどが重要である。忌避剤は露出した肌や衣服の上から全身に行き渡るように使用し, 衣服の下には使用しない。また過剰に使用する必要もない。家屋においては蚊の侵入を防ぐスクリーン(網)の設置, 蚊の繁殖する溜まり水の除去等が重要である。地域社会においては蚊の繁殖可能な古タイヤ, 空き缶などの廃棄物の除去, 屋外イベントでの忌避剤使用の奨励などが必要となる。ニューヨークにおける流行時には脳炎患者の多くが高齢者であったことから, 特に高齢者や幼児は注意を要する。日本の様にまだ国内感染の認められない地域においても万が一ウイルスが侵入した場合に備え蚊との接触防止と駆除が重要である^{27, 28)}。2005年には米国から日本への輸入症例が発生したことから流行地域に渡航する場合は特に注意を

必要とすることが再確認されるべきである。

2) ウマ

ウマに対する治療も対症療法が中心となる。中枢神経の炎症の緩和, 過興奮による自己障害の防止, 補液, 栄養補給を行う。

ウマに対しては米国ですでに2種のワクチンが認可されている。一つは不活化ワクチンであり, すでにその効果が実証されている。不活化ワクチン接種は3~6週間隔で2回獣医師が行かない, 免疫が成立するには2度目の接種後約4週間が必要である。また仔馬には3回の接種が必要である。免疫持続期間は現在研究であるため毎年の追加接種が必要である。次にDNAワクチンが2005年7月に新たに認可された。DNAワクチンの利点は①温度変化に比較的耐性であり, ワクチンの輸送, 保存が容易であること②自然感染との区別が血清学的に可能であること③複数のDNAワクチンを同時に投与することができること④開発が迅速に出来ることなどである¹¹⁾。

ところでウマにおいても媒介蚊の制御は獣医予防衛生学上必要である。畜主は周辺の水溜りをなくし, 飼料葉桶の水も週に一度は入れ替える。また比較的哺乳類に対する毒性の低いBT製剤 (*Bacillus thuringiensis* 殺虫剤) の使用もボウフラに有効とされている。また蚊の活動が活発な期間はDEETの使用も有効である。その他の対策として, 池にボウフラを食べる小魚を放す, 馬小屋にファンを取り付け蚊の活動をおさえる, 夜間は消灯することなどが有効とされる。

11. おわりに

米国において1999年初めて確認されたアメリカ大陸でのウエストナイルウイルスの活動は北中米のほぼ全域から南米に至るまで拡大している。米国では2005年も2949人の患者が報告され, ウエストナイルウイルスは今後も北アメリカに常在すると米国CDCは予測している。さらに2005年には我が国において輸入症例も報告された。またロシアにおける患者の発生地域も東進しており, ウエストナイルウイルスの活動地域はウラジオストックに達している。ウエストナイルウイルスの動向には鳥, 蚊, 気候, 環境等の要因が複雑に関わり, その状況の予測は困難であるためウエストナイルウイルスの我が国への侵入は予断を許さない。ウエストナイル脳炎はひとたび発症するとその致死率が高く, 回復しても重度の後遺症を伴う場合が多いためワクチンの開発が急がれるとともに, 感染源である蚊の吸血を避けるための対策も重要である。

現在, 医師, 獣医師, 公衆衛生関係者や科学者等の努力によりウエストナイルウイルスに関する多くの知見が得られており, ホームページ等を通じて最新のウエストナイルウイルス情報も提供されている(例: 国立感染症研究所ホームページ <http://www.nih.go.jp/niid/index.html>)。今後もウエストナイルウイルスの動向には十分な注意が必要である。またウエストナイルウイルス対策には医療・獣医療機関, 地域住民, 行政, 研究機関の一層の協働体制確立も重要である。

文 献

- 1) Austgen, L. E., Bowen, R. A., Bunning, M. L., Davis, B. S., Mitchell, C. J. and Chang, G. J. : Experimental Infection of Cats and Dogs with West Nile Virus. *Emerg Infect Dis*, 10 (1) : 82~86. 2004.
- 2) Blackburn, N. K., Reyers, F., Berry, W. L. and Shepherd, A. J. : Susceptibility of Dogs to West Nile

- Virus: A Survey and Pathogenicity Trial. *J Comp Pathol*, 100 (1) : 59~66. 1989.
- 3) Brinton, M. A. : The Molecular Biology of West Nile Virus: A New Invader of the Western Hemisphere. *Annu Rev Microbiol*, 56: 371~402. 2002.
 - 4) Buckley, A., Dawson, A., Moss, S. R., Hinsley, S. A., Bellamy, P. E. and Gould, E. A. : Serological Evidence of West Nile Virus, Usutu Virus and Sindbis Virus Infection of Birds in the Uk. *J Gen Virol*, 84 (Pt 10) : 2807~2817. 2003.
 - 5) Bunning, M. L., Bowen, R. A., Cropp, C. B., Sullivan, K. G., Davis, B. S., Komar, N., Godsey, M. S., Baker, D., Hettler, D. L., Holmes, D. A., Biggerstaff, B. J. and Mitchell, C. J. : Experimental Infection of Horses with West Nile Virus. *Emerg Infect Dis*, 8 (4) : 380~386. 2002.
 - 6) Campbell, G. L., Marfin, A. A., Lanciotti, R. S. and Gubler, D. J. : West Nile Virus. *Lancet Infect Dis*, 2 (9) : 519~529. 2002.
 - 7) Castillo-Olivares, J. and Wood, J. : West Nile Virus Infection of Horses. *Vet Res*, 35 (4) : 467~483. 2004.
 - 8) Cernescu, C., Nedelcu, N. I., Tardei, G., Ruta, S. and Tsai, T. F. : Continued Transmission of West Nile Virus to Humans in Southeastern Romania, 1997-1998. *J Infect Dis*, 181 (2) : 710~712. 2000.
 - 9) 江下優樹, 高崎智彦, 井村俊郎, 内田幸憲, 高島郁夫, 倉根一郎: ウエストナイルウイルスとその媒介蚊. 九州実験動物雑誌, 20 : 31~39. 2004.
 - 10) Granwehr, B. P., Lillibridge, K. M., Higgs, S., Mason, P. W., Aronson, J. F., Campbell, G. A. and Barrett, A. D. : West Nile Virus: Where Are We Now? *Lancet Infect Dis*, 4 (9) : 547~556. 2004.
 - 11) Hall, R. A. and Khromykh, A. A. : West Nile Virus Vaccines. *Expert Opin Biol Ther*, 4 (8) : 1295~1305. 2004.
 - 12) Hayes, E. B., Komar, N., Nasci, R. S., Montgomery, S. P., O'Leary, D. R. and Campbell, G. L. : Epidemiology and Transmission Dynamics of West Nile Virus Disease. *Emerg Infect Dis*, 11 (8) : 1167~1173. 2005.
 - 13) Hayes, E. B., Sejvar, J. J., Zaki, S. R., Lanciotti, R. S., Bode, A. V. and Campbell, G. L. : Virology, Pathology, and Clinical Manifestations of West Nile Virus Disease. *Emerg Infect Dis*, 11 (8) : 1174~1179. 2005.
 - 14) Hindiyeh, M., Shulman, L. M., Mendelson, E., Weiss, L., Grossman, Z. and Bin, H. : Isolation and Characterization of West Nile Virus from the Blood of Viremic Patients During the 2000 Outbreak in Israel. *Emerg Infect Dis*, 7 (4) : 748~750. 2001.
 - 15) Hubalek, Z. and Halouzka, J. : West Nile Fever--a Reemerging Mosquito-Borne Viral Disease in Europe. *Emerg Infect Dis*, 5 (5) : 643~650. 1999.
 - 16) 伊藤美佳子, 倉根一郎: ウエストナイル熱と日本脳炎. 化学療法の領域, 20 (2) : 33~38. 2004.
 - 17) Kile, J. C., Panella, N. A., Komar, N., Chow, C. C., MacNeil, A., Robbins, B. and Bunning, M. L. : Serologic Survey of Cats and Dogs During an Epidemic of West Nile Virus Infection in Humans. *J Am Vet Med Assoc*, 226 (8) : 1349~1353. 2005.
 - 18) 小泉加奈子, 中島由紀子, 松崎真和, 小井戸則彦, 木曾根康夫, 林 昌宏, 高崎智彦, 倉根一郎, 秋月哲史: 本邦で初めて確認されたウエストナイル熱の輸入症例. 感染症学雑誌, 80 (1) : 56~57. 2006.
 - 19) Komar, N., Langevin, S., Hinten, S., Nemeth, N., Edwards, E., Hettler, D., Davis, B., Bowen, R. and Bunning, M. : Experimental Infection of North American Birds with the New York 1999 Strain of West Nile Virus. *Emerg Infect Dis*, 9 (3) : 311~322. 2003.
 - 20) Kuno, G. : Universal Diagnostic Rt-Pcr Protocol for Arboviruses. *J Virol Methods*, 72 (1) : 27~41. 1998.
 - 21) 倉根一郎: アルボウイルス感染症におけるウエストナイル熱・脳炎の位置付け. ウイルス, 55 (1) : 63~68. 2005.
 - 22) 倉根一郎: ウエストナイル熱. ウイルス, 53 (1) : 1~6. 2003.
 - 23) Lanciotti, R. S., Kerst, A. J., Nasci, R. S., Godsey, M. S., Mitchell, C. J., Savage, H. M., Komar, N., Panella, N. A., Allen, B. C., Volpe, K. E., Davis, B. S. and Roehrig, J. T. : Rapid Detection of West Nile Virus from Human Clinical Specimens, Field-Collected Mosquitoes, and Avian Samples by a Taqman Reverse Transcriptase-Pcr Assay. *J Clin Microbiol*, 38 (11) : 4066~4071. 2000.
 - 24) Lanciotti, R. S., Roehrig, J. T., Deubel, V., Smith, J., Parker, M., Steele, K., Crise, B., Volpe,

- K. E., Crabtree, M. B., Scherret, J. H., Hall, R. A., MacKenzie, J. S., Cropp, C. B., Panigrahy, B., Ostlund, E., Schmitt, B., Malkinson, M., Banet, C., Weissman, J., Komar, N., Savage, H. M., Stone, W., McNamara, T. and Gubler, D. J. : Origin of the West Nile Virus Responsible for an Outbreak of Encephalitis in the Northeastern United States. *Science*, 286 (5448) : 2333~2337. 1999.
- 25) Lichtensteiger, C. A., Heinz-Taheny, K., Osborne, T. S., Novak, R. J., Lewis, B. A. and Firth, M. L. : West Nile Virus Encephalitis and Myocarditis in Wolf and Dog. *Emerg Infect Dis*, 9 (10) : 1303~1306. 2003.
- 26) 林 昌宏, 倉根一郎: ウエストナイルウイルス. 日本臨床, 63増刊号7 : 321~323. 2005.
- 27) 林 昌宏, 高崎智彦: フラビウイルス脳炎——ウエストナイルウイルスを中心に——. 臨床病理, 53(8): 721~727. 2005.
- 28) 林 昌宏, 高崎智彦: ウエストナイル熱/脳炎. 遺伝, 59 (5) : 37~42. 2005.
- 29) Malkinson, M., Banet, C., Weisman, Y., Pokamunski, S., King, R., Drouet, M. T. and Deubel, V. : Introduction of West Nile Virus in the Middle East by Migrating White Storks. *Emerg Infect Dis*, 8 (4) : 392~397. 2002.
- 30) Martin, D. A., Muth, D. A., Brown, T., Johnson, A. J., Karabatsos, N. and Roehrig, J. T. : Standardization of Immunoglobulin M Capture Enzyme-Linked Immunosorbent Assays for Routine Diagnosis of Arboviral Infections. *J Clin Microbiol*, 38 (5) : 1823~1826. 2000.
- 31) Mattar, S., Edwards, E., Laguado, J., Gonzalez, M., Alvarez, J. and Komar, N. : West Nile Virus Antibodies in Colombian Horses. *Emerg Infect Dis*, 11 (9) : 1497~1498. 2005.
- 32) Nash, D., Mostashari, F., Fine, A., Miller, J., O'Leary, D., Murray, K., Huang, A., Rosenberg, A., Greenberg, A., Sherman, M., Wong, S. and Layton, M. : The Outbreak of West Nile Virus Infection in the New York City Area in 1999. *N Engl J Med*, 344 (24) : 1807~1814. 2001.
- 33) Pletnev, A. G., Claire, M. S., Elkins, R., Speicher, J., Murphy, B. R. and Chanock, R. M. : Molecularly Engineered Live-Attenuated Chimeric West Nile/Dengue Virus Vaccines Protect Rhesus Monkeys from West Nile Virus. *Virology*, 314 (1) : 190~195. 2003.
- 34) Read, R. W., Rodriguez, D. B. and Summers, B. A. : West Nile Virus Encephalitis in a Dog. *Vet Pathol*, 42 (2) : 219~222. 2005.
- 35) Scherret, J. H., Poidinger, M., Mackenzie, J. S., Broom, A. K., Deubel, V., Lipkin, W. I., Briese, T., Gould, E. A. and Hall, R. A. : The Relationships between West Nile and Kunjin Viruses. *Emerg Infect Dis*, 7 (4) : 697~705. 2001.
- 36) Smithburn, K. C., Hughes, T. P., Burke, A. W. and Paul, J. H. : A Neurotropic Virus Isolated from the Blood of a Native of Uganda. *Am J Trop Med*, 20: 471~492. 1940.
- 37) Steele, K. E., Linn, M. J., Schoepp, R. J., Komar, N., Geisbert, T. W., Manduca, R. M., Calle, P. P., Raphael, B. L., Clippinger, T. L., Larsen, T., Smith, J., Lanciotti, R. S., Panella, N. A. and McNamara, T. S. : Pathology of Fatal West Nile Virus Infections in Native and Exotic Birds During the 1999 Outbreak in New York City, New York. *Vet Pathol*, 37 (3) : 208~224. 2000.
- 38) 高崎智彦: ウエストナイル熱・脳炎. 検査と技術, 32 (6) : 488~492. 2004.
- 39) 高崎智彦, 倉根一郎: ウエストナイルウイルス病原体検査マニュアル. 週刊保健衛生ニュース, 1181 : 11~18. 2002.
- 40) Tsai, T. F., Popovici, F., Cernescu, C., Campbell, G. L. and Nedelcu, N. I. : West Nile Encephalitis Epidemic in Southeastern Romania. *Lancet*, 352 (9130) : 767~771. 1998.
- 41) Weinberger, M., Pitlik, S. D., Gandacu, D., Lang, R., Nassar, F., Ben David, D., Rubinstein, E., Izthaki, A., Mishal, J., Kitzes, R., Siegman-Igra, Y., Giladi, M., Pick, N., Mendelson, E., Bin, H., Shohat, T. and Chowers, M. Y. : West Nile Fever Outbreak, Israel, 2000: Epidemiologic Aspects. *Emerg Infect Dis*, 7 (4) : 686~691. 2001.

総説

近年における乳牛の受胎率低下の原因と対策

中尾敏彦*

[受付: 2005年12月5日]

REVIEW

DECLINING FERTILITY IN TODAY'S DAIRY COWS:
CAUSES AND POSSIBLE SOLUTIONS

Toshihiko NAKAO

*Laboratory of Theriogenology, Department of Veterinary Medicine,
Faculty of Agriculture, Yamaguchi University
Yoshida 1677-1, Yamaguchi-shi 753-8515, Japan*

[Received for publication : December 5, 2005]

Decrease of fertility in dairy cows has recently been reported worldwide. Underlying causes of the decreased fertility may include increased milk production per cow per lactation and resultant negative energy balance during early lactation period, which in turn cause delayed resumption of ovarian cycles postpartum and ovulation of unhealthy ovum leading to poor conception rate. Another abnormality in resumption of postpartum ovarian cycles recently identified is prolonged luteal phases after the first and the second postpartum ovulation. The first ovulation occurs and corpus luteum (CL) is formed without delay, but CL remains beyond a normal duration. After luteolysis, which occurs spontaneously, cows show clear signs of estrus. Conception rate at the estrus, however, is very poor.

On the other hand high milk production and increased dry matter intake may cause increased liver blood flow and enhanced metabolic clearance rate of estradiol-17 β and progesterone in the liver. Lower plasma concentrations of estradiol-17 β during estrous period are associated with shorter duration of estrus, which makes heat detection more difficult. Decreased plasma estradiol-17 β concentrations may also be responsible for the increased rate of twin pregnancy.

Strategies to improve fertility in dairy cows should be focused on nutritional management to maximize dry matter intake after calving to facilitate postpartum resumption of ovarian cycles, and also on reproductive management of cows for a higher heat detection rate. Further studies are needed to clinically control the prolonged luteal phase, since its pathophysiology has not been fully understood. New reproductive technology should also be developed to solve the problems caused by decreased plasma concentrations of estradiol-17 β as a consequence of high milk production and high DMI.

はじめに

近年、乳牛の受胎率が世界的に低下してきており、その原因の解明と対策が求められている¹⁾ (Table 1)。わが国もその例外ではなく、受胎率の低下に伴って、分娩間隔の延長が認められている。このような、乳牛の受胎率低下の主な原因として、①乳牛の泌乳能力向上に伴って牛そのものが受胎しづらくなってきている可能性があること、

* 山口大学農学部獣医学科臨床繁殖学教室・教授 〒753-8515 山口市大字吉田1677-1

②牛群規模の拡大に伴って飼育者自らが人工授精を行うことが多くなり、その結果として、人工授精技術上の問題が生じている可能性があること、③雄牛の生殖機能の低下などとの関連で人工授精に用いる凍結精液の精子の受精能が低下している可能性があること、などがあげられる。

まず、授精技術上の問題が原因であるとすれば、受胎率の低下は、経産牛だけでなく、未経産牛にも見られるはずである。しかしながら、カナダのケベック州での大規模な調査成績では、未経産牛の初回および2回目受胎率は、1993年に比べて、2002年で低下しておらず、むしろ、やや高くなっていることが分かる¹¹⁾ (Table 2)。一方、経産牛では、初産、2産目ともに、1993年の受胎率に比べ、2002年の方が低下している¹¹⁾。このように、乳牛の受胎率の低下は、主に、経産牛で認められ、未経産牛では認められていないと考えられる。次に、凍結精液の精子の受精能についても、ケベック州での調査では、現在使用されている凍結精液については、いずれも正常であり、種雄牛間で、明らかな差はなかったと報告されている¹¹⁾。したがって、受胎率低下の主な原因は、授精技術上の問題や、精液性状の問題ではなく、むしろ、牛の生殖機能の変化により、牛そのものが受胎しづらくなってきていることにあることが推察される。本稿では、特に経産牛でみられる受胎率低下の原因を、近年の経産牛で認められる生殖機能の変化との関係で解説するとともに、その対策にも言及してみたい。

Table 1 世界各地における乳牛の受胎率低下の現状

乳牛の受胎率低下	
U.S.A.	初回受胎率 0.45% per year (過去20年間)
U.K.	初回受胎率 1.0% per year (過去20年間)
オランダ	初回受胎率 from 55.5% to 45.5% (10年間)
スペイン	初回受胎率 1.0% per year (1991-2000)
U.S.A.	1 受胎平均授精回数 from 1.75 to 3< (20年間)
アイルランド	初回受胎率 from 65% to 57% (1990-2000)
フランス	初回受胎率 15% decrease 1988-1997
カナダ	初回受胎率 44% to 39% 1999-2002

(Bousquet et al., 2004)

Table 2 カナダケベック州の2000牛群における1993年から2002年までの受胎率の変化

	未経産		初産		2産以上	
	1993	2002	1993	2002	1993	2002
頭数	12,656	16,126	14,000	15,440	47,442	68,364
初回	60	63	49	43	46	39
2回目	50	55	50	45	47	41

(Bousquet, 2004)

1. 未経産牛と経産牛における主な生殖機能特性の比較

もともと、未経産牛では、経産牛よりも受胎率が高いことが知られているが、近年、経産牛の受胎率の低下が著しいことから、その差は、相当大きくなってきている¹⁰⁾。そこで、このような受胎率の差との関係で、両者に認められる生殖機能の特性を比較してみよう。

牛は、基本的に単排卵の動物であるが、数パーセント程度、複数排卵が見られることが従来知られている。しかしながら、近年、高泌乳化に伴い、経産牛で複数排卵の発生率が高くなっていることが示されている¹⁷⁾ (Table 3)。複数排卵例では、当然、双胎妊娠、双子分娩が増加する。双子分娩例では、妊娠期の異常も多く、難産や胎盤停滞などの発生率も高いことから、分娩後の生殖機能の回復が遅れ、受胎率も低下する。

高泌乳牛で特に多く見られる複数排卵の原因は、高泌乳に伴う乾物摂取量の増加が肝臓での性ステロイドの代謝速度を速めるため、血中のエストロゲン濃度が十分に上昇せず、卵胞ウェーブの初期に余分なFSHが分泌されることにあるとされており¹⁷⁾、高泌乳牛の宿命的な現象といえる。

次に、人工授精後6日目における胚の変性率が、経産牛では、未経産牛に比べて著しく高いことが認められている¹⁷⁾。変性した胚が受胎する可能性は低いので、このことも、経産牛における受胎率低下の直接的な原

因となる。未経産牛に比べて、経産牛で胚の変性率が高い原因については、不明な点も多いが、経産牛の方が、①排卵される卵子の受精能そのものが低いものが多いこと、②子宮内膜炎等の影響で子宮内環境が不良のものが多いことなどがあげられる。

発情持続時間も、経産牛では、未経産牛よりも著しく短く、このことが、発情発見と適期の授精を困難にしている。また、経産牛では、発情徴候自体も微弱で鈍性発情の発生率も高い¹⁸⁾。経産牛で発情が短く、弱いものが多い原因としては、泌乳との関係で、肝臓における性ステロイドの代謝が早くなり、発情時の血中エストロゲン濃度が、未経産牛に比べて明らかに低いことがあげられている^{5, 12)}。その他、飼育環境に起因するストレスも経産牛の方が大きく、蹄病などの発

Table 3 経産牛と未経産牛における生殖機能の比較

	Cow	Heifer
複数排卵率	25.0%	1.8%
胚変性率 (異常卵子)	47.2%	28.1%
発情持続時間	6.2h	10.9h
子宮内膜炎発生率	20-40%	2% >

(Wiltbank, 2004)

生も多いことも関与していると思われる。

子宮内膜炎の発生率は、未経産牛ではきわめて低いものに対して、経産牛では高く、牛群全体の20~40%と報告されている⁸⁾。しかも、その発生率が、近年、さらに上昇している。子宮内膜炎増加の原因については、不明の点も多いが、高泌乳牛では難産や胎盤停滞などの他、低カルシウム血症などの発生が多く、これらが、子宮の細菌汚染を増大させ、子宮の回復を遅らせることと、子宮の細菌に対する防御機構が低下しているものが増えていることなどがあげられる。分娩後に子宮内膜炎を発症すると、その後長期間にわたって、炎症が持続することが多く、受胎成績も低下する⁸⁾ (Table 4)。また、分娩後子宮内膜炎には効果の確実な治療法がなく、薬剤の子宮内投与も、薬剤によっては、むしろ悪影響を及ぼすことがある⁷⁾ (Table 5)。

この他に、経産牛の特に高泌乳牛では、乾物摂取量の増加に伴う肝臓でのプロゲステロン代謝速度が促進される結果、血中プロゲステロン濃度が未経産牛よりもやや低くなる傾向があることが知られており、このことと、受胎率低下との関連を指摘する研究者もいる³⁾が、未だ実証されていない。

以上のように、受胎率が比較的高い未経産牛と、受胎率が低下し続けている経産牛の生殖機能特性を比較すると、経産牛では、①複数排卵と双胎妊娠が多いこと、②卵胞内卵子の受精能低下が多いこと、③発情持続時間が短く、徴候が微弱化していること、④子宮内膜炎が多いこと、⑤黄体期の血中プロゲステロン濃

度がやや低いことなどがあげられる。これらの中で、発生頻度が多く、受胎率に対する直接的影響が大きいと考えられるものが、卵胞内卵子の受精能低下である。

2. 卵胞内卵子の受精能に影響する要因と分娩後卵巣機能回復異常の重要性

発情後に排卵される卵子の受精能に影響する要因としては、①分娩後のエネルギー充足率の低下、②高泌乳、③暑熱ストレス、④遅すぎるタイミングでの受精、⑤分娩後疾患の発症、などがあげられる。これらの中で、特に、重要性が高いのは、①と⑤である。

(1) 分娩後におけるエネルギーの不足

原始卵胞が発育して成熟卵胞になるのは60~80日間を要するとされている。したがって、例えば、分娩後60~80日頃に成熟して発情を発現させ、排卵する卵胞は、分娩直後頃から発育を開始したものと考えられる。分娩直後から泌乳最盛期までの間は、エネルギー不足の著しい期間であり、この時期に、発育する卵胞内の卵子は、エネルギー不足による影響を受け、やがて排卵する時の受精能の低下がみられることが明らかにされている。泌乳最盛期にホルモンにより過剰排卵処置を行い、受精を行ってから、胚の回収を行ったところ、胚の生存率が著しく低かったという報告もある¹⁷⁾。

(2) 分娩後疾患

起立不能、ケトーシス、第四胃変位などの発生は、乾物摂取量を著しく低下させ、エネルギー不足に拍車をかけることになる。その結果、(1)で述べたような、エネルギー不足による卵子受精能の低下を招く。

これら以外の分娩後疾患も、分娩後初回受精受胎率に悪影響を及ぼすことが知られている (Table 6)¹⁾。

(3) 産次数

分娩後の初回受胎率は、産次が高くなるほど低下し、特に、2、3産目以降の牛では、著しく低いことが報告されている^{1, 9)} (Fig. 1)。この原因についても、未だ十分には解明されていないが、卵子の受精低下や子宮内環境との関係が指摘されている。

Table 4 乳牛の分娩後1ヶ月前後の子宮内膜炎がその後の繁殖成績に及ぼす影響

	分娩後1ヶ月前後子宮所見			
	高泌乳牛群		標準泌乳牛群	
	正常	内膜炎	正常	内膜炎
頭数	70	55	66	31
初回排卵までの日数	38±17	44±22	32±17	45±23
初回AIまでの日数	68±18	72±21	80±17	78±25
初回AI受胎率	38.6	23.5	42.4	29.0
最終受胎率	88.6	81.8	90.9	77.4
空胎日数	101±44	114±55	103±39	110±59

Table 5 乳牛の分娩後1ヶ月目前後における2%ポピドンヨード液の子宮内注入がその後の繁殖成績に及ぼす影響

腔粘性性状	処置	頭数	初回受胎率	分娩後6ヶ月受胎率	
				空胎日数	受胎率
膿性粘液 多量	PVP-I	30	24.1	63.3	118±43
	No	22	31.8	59.1	85±33
膿性粘液 少量	PVP-I	29	27.6	79.3	117±42
	No	30	62.1	80.0	85±37
白濁粘液	PVP-I	36	42.9	57.9	89±31
	No	35	55.9	85.7	93±27
透明・無	PVP-I	427	51.5	76.3	93±35
	No	387	54.4	75.7	90±36
合計	PVP-I	524	47.9	74.4	95±36
	No	474	53.0	75.1	90±35

Table 6 乳牛の各種疾病の発生例における受胎率低下(非発症例との比較)の程度

病名	初回受胎率低下程度
難産	-6.0%
胎盤停滞	-2.5
子宮炎	-8.0
卵巣嚢腫	-0.8
乳房炎	-2.8
蹄病	-4.3

(Bousquet, 2004)

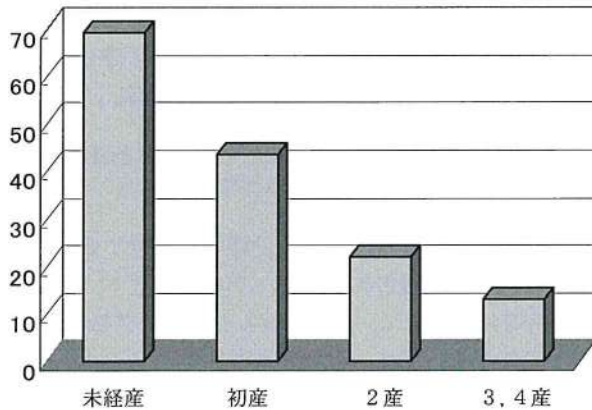


Fig. 1 カナダ・バンクーバーの1牛群における産歴と受胎率の関係 (Nimmo, J. et al, 2005)

以上のように、卵子の受精能低下の主な原因は分娩後におけるエネルギーの不足にあると考えられるが、エネルギーの不足の影響は、卵巢機能回復の遅延としても現れる。したがって、臨床的には、エネルギー不足の結果として現れる分娩後卵巢機能回復異常が卵子の受精能低下を起こさせるとともに、さまざまな繁殖障害の原因となっていると考えるのが適当と考えられる。

3. 受胎率低下の原因としての分娩後卵巢機能回復異常の重要性

卵巢機能回復異常は、直接的には、無発情期間の延長、子宮の回復遅延、卵子の受精能低下、発情微弱、黄体機能減退などを起こさせ、その結果として、発情発見率と受胎率および妊娠率の低下や分娩間隔の延長を招く。

近年、高泌乳牛において、卵巢機能回復異常の発生が増加していることが、欧米で報告されている^{6, 10, 11}が、その詳細についてはまだ不明の点が多い。また、国内では、今日の高泌乳牛の分娩後における卵巢機能回復状況に関する報告はこれまでほとんどみられない。どちらにしても、受胎率の低下が起きている牛群で、分娩後にどのような卵巢機能回復異常が、どの程度の割合で発生しているのか、そして、それらが、どの程度その後の繁殖成績に悪影響を及ぼすのかについては、詳細な研究は行われていなかった。そこで、先ず、広島県内の9つの牛群において、分娩後卵巢機能回復状況を調査した^{14, 15}。次いで、平成16年度と17年度の畜産新技術開発活用促進事業委託研究として、山口県、鳥取県および北海道の11の牛群について、分娩後卵巢機能回復異常の実態調査を実施中である。

(1) 分娩後卵巢機能回復の検査方法

乳牛の分娩後における卵巢機能回復状況は、分娩後一定の間隔での超音波断層検査によって、詳細に検査できるが、多数の牛群での日常的な応用には適さない。

最も実用的な方法は、週2~3回程度の間隔で、乳汁を採取し、1~2週間ごとに乳汁中プロゲステロン濃度を測定することである (Fig. 2)。プロゲステロン濃度の上昇は、排卵と黄体があったことを示し、濃度の低下は、黄体の退行と発情を示す。したがって、乳汁中プロゲステロンプロファイルから、その牛の卵巢機能の回復状況をほぼ正確に推定することができる。例えば、分娩後3~5週以内にプロゲステロン濃度の上昇が見られ、その後、周期的な濃度変動が見られれば、卵巢周期は正常に回復していることがわかる。このような牛では、発情徴候も明瞭で、高い受胎率が期待できる (Fig. 3 上段)。一方、プロゲステロン濃度の上昇が分娩後50日頃に見られる例では、卵巢静止などのために初回排卵が遅れており、分娩後無発情の期間が長びくだけでなく、その後の発情での受胎率も低い (Fig. 3 中段)。また、近年、分娩後早い時期に初回排卵が起こった後に形成された黄体の退行が遅れて、黄体期延長を示す牛が増加の傾向にある (Fig. 3 下段)。このような例でも、受胎率は低い。

乳汁は、防腐剤を入れた試験管に直接採取し、4℃ (夏期以外は室温でもよい) で保存する。数ヶ月間以上は安定である。プロゲステロン濃度は第一抗体または第二抗体固相化酵素免疫測定法で測定するのが一般的である。

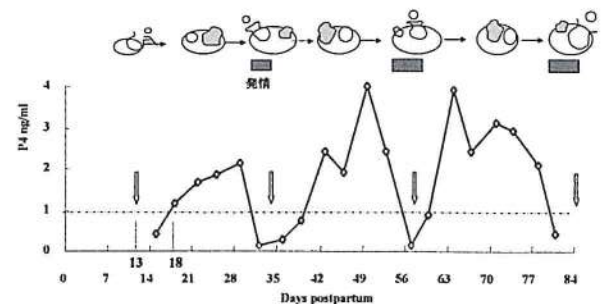


Fig. 2 分娩後卵巢機能回復正常例における乳汁中プロゲステロン濃度の推移。初回排卵は分娩後13日目と推定される。

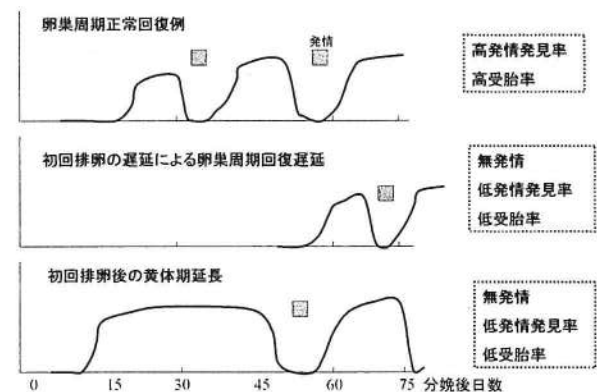


Fig. 3 牛乳中プロゲステロン濃度の変動からみた乳牛の分娩後における卵巢周期の回復状況と発情発見率及び受胎率

(2) 広島県内の9農場の牛群における卵巢機能回復異常発生状況とそれがその後の繁殖成績に及ぼす影響

広島県内の9農場における卵巢機能回復異常の発生率を、規模が最も大きいA群、異常が最も多かったB群とその他の7牛群に区分して、表7に示した。いずれの牛群でも、正常回復例は50%に満たず、回復異常の発生率が高いことがわかる。牛群によって差はあるものの、異常の中では、特に、初回排卵遅延と黄体期延長が多かった。このように、わが国においても、最近欧米の牛群で報告されていると同様に、乳牛の分娩後卵巢機能回復異常が増えていることが示唆された¹³⁾。

次に、このような、卵巢機能回復異常の発生が、その後の繁殖成績にどの程度悪影響を及ぼすかについて、調査を行った。まず、初回排卵遅延を示した群の繁殖成績を正常回復群と比較すると、分娩後100日以内の授精実施率(発情発見率)と初回授精受胎率が低く(P<0.05)、100日以内妊娠率も著しく低かった(P<0.01)(Table 8)。また、平均空胎期間も著しく長かった(P<0.01)。次いで、黄体期延長群でも、初回排卵遅延群と同様に、100日以内授精実施率が低く、初回受胎率も低かった(P<0.05)。したがって、100日以内妊娠率が低く、平均空胎期間も長かった(P<0.01)¹³⁾。このように、牛群としての繁殖成績は、

Table 7 高泌乳牛群における分娩後卵巢周期回復異常の発生状況

	Herd A	Herd B	Herds C to I
搾乳頭数	110	36	66
卵巢周期回復正常(%)	49 (44.5)	9 (25.0)	33 (50.0)
回復遅延(%)	61 (55.5)	27 (75.0)	33 (50.0)
黄体期延長(%)	37 (33.6)	4 (11.1)	17 (25.8)
初回排卵遅延(%)	14 (12.7)	21 (58.3)	16 (24.2)
黄体期短縮(%)	5 (4.6)	2 (5.6)	0 (0.0)
周期停止(%)	5 (4.6)	0 (0.0)	0 (0.0)

Table 8 乳牛の分娩後卵巢周期回復異常とその後の繁殖成績との関係

	正常回復	黄体期延長	初回排卵遅延
試験頭数	49	37	14
繁殖予定頭数	49	37	13
授精実施率(≤100 d) % (n)	83.7(41)	62.1(23)*	53.8(7)*
妊娠率(≤100 d) % (n)	42.9(21)	10.8(4)**	0.0(0)**
210日以内授精頭数	47	36	12
分娩後初回授精日数(mean±S.E.)	67±5	94±6**	93±11*
初回授精受胎率(n)	29.8(14)	8.3(3)*	0.0(0)*
210日以内受胎頭数% (n)	67.3(33)	37.8(14)	38.5(5)
空胎日数mean±S.E.	102±9	132±11**	166±5**
1受胎あたり授精回数	2.0	2.5	3.4*

*P<0.05 **P<0.01

卵巢機能回復異常の発生率によって影響を受けることが示唆された。

(3) 分娩後卵巢機能回復に影響する要因

分娩後の卵巢機能回復に影響する最も重要な要因は栄養であり、特に、分娩後泌乳最盛期までの間の、エネルギー充足率の低下が直接卵巢機能の回復を遅らせることが明らかにされている²⁾。分娩後数日で新しい卵胞ウェーブが発生し、その後優勢卵胞が形成されるが、この優勢卵胞が成熟して排卵するためには、下垂体からのLHパルスの頻度が増加する必要がある¹²⁾。このLHパルスは、分娩後エネルギーバランスが低下を続けている間は頻度が低いままであり、エネルギーバランスが底を付いた後上昇し始めると、その頻度が増加する²⁾。したがって、乾物摂取量が順調に増加せず、エネルギー充足率が低下し続けている限りは、卵巢機能の回復は見られない。

今回、分娩後卵巢機能回復状況の検査を行った広島県内の1牛群で、卵巢機能の正常回復群、初回排卵遅延群および黄体期延長群の分娩前後の栄養状態の比較を行った。初回排卵遅延群では、正常回復群に比べて、分娩後のBCSの低下が顕著で(P<0.05, P<0.01)、11週目までBCSの回復は認められなかった¹⁰⁾(Fig. 4)。また、初回排卵遅延群では、分娩後の体重減少が著しく、血漿中NEFA濃度が低い傾向が見られた。なお、血漿中total cholestrol, 尿素態窒素および総蛋白濃度には、明らかな差は認められなかった。

一方、黄体期延長例では、BCSおよび体重ともに、正常回復群との間に差が殆どなく、むしろ、正常群よりも高い傾向が見られ、血漿中NEFA濃度にも差は見られなかった¹⁰⁾(Fig. 4)。

このように、分娩後初回排卵遅延群では、従来から報告されているとおり、分娩後長期にわたってエネルギーバランスの低下が続いていることが確認された。

また、蹄病なども分娩後の卵巢機能の回復に悪影響を及ぼすことが指摘されている。今回の調査でも、蹄病の発生の多かった1牛群において、蹄病例では、全例が初回排卵遅延が発生したのに対し、正常例における発生率は二十数パーセントであった。

黄体期延長は、乳汁中プロジェステロン測定的应用によって、最近明らかになってきた異常であり、その原因についても不明な点が多い¹¹⁾。しかしながら、今回の試験結果から、黄体期延長群では、むしろ、栄養状態が正常あるいは過剰な傾向にあることが明らかにされ、その病態は、初回排卵遅延とは全く異なることが示唆された。黄体期延長の原因の一つには、子宮回復の遅延が挙げられる。分娩後の子宮回復が正常な例に比べ、子宮の回復遅延例では、黄体期延長の発生率が著しく高いことが認められており、これらの間に相互関係のあることが推察されるが、詳細は不明である。

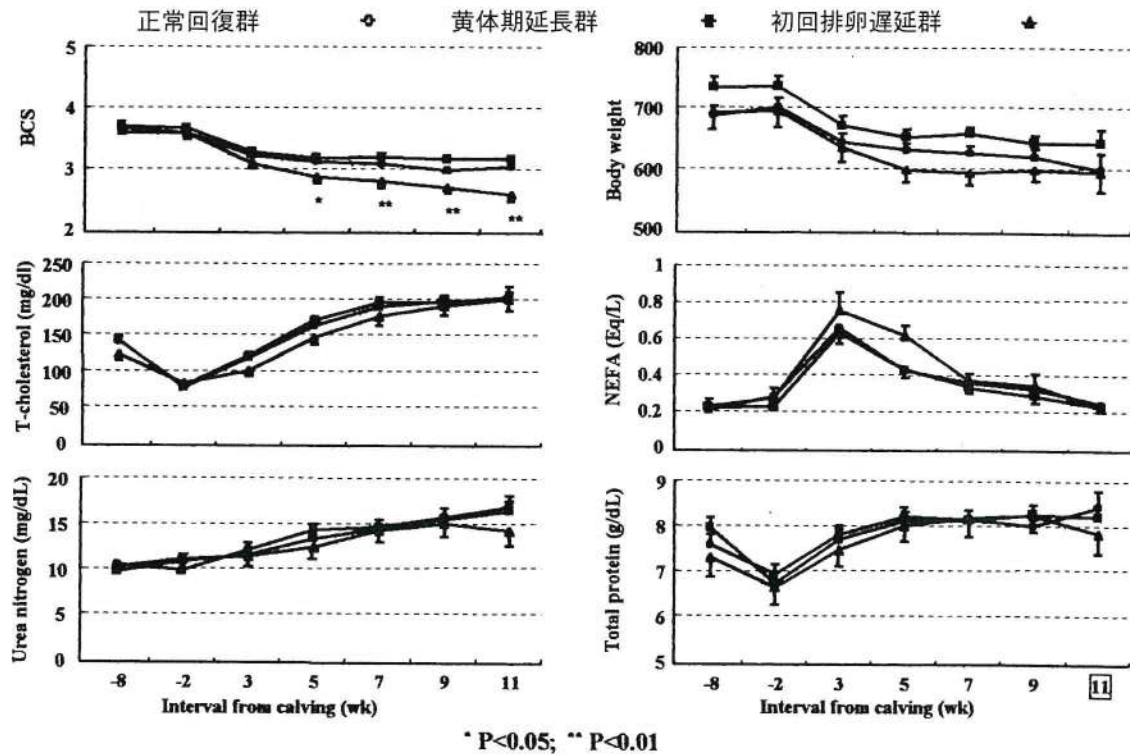


Fig. 4 乳牛の分娩前後の栄養状態と分娩後卵巣機能回復異常との関係

4. 分娩後排卵機能回復異常の対策

(1) 分娩後卵巣静止

卵巣静止に対する有効な治療法は確立されていないと言って過言ではない。また、仮に、ホルモン療法などで、発情が発現しても、十分な受胎率が得られないことが多い。現在のところ、次のような対応が推奨される。

1) 栄養状態の改善と蹄の管理

エネルギー不足などの低栄養が原因の場合は、まず、栄養状態の改善を図る。また、蹄病の発生が原因と思われる場合は、蹄病の治療と蹄の適切な管理を行う。

2) ホルモン療法

優勢卵胞の存在が確認できるような例には、GnRHの投与を行う。これによって、排卵が誘起され、黄体が形成されると、黄体退行後に正常な発情が発現する可能性がある。

しかし、卵巣に卵胞ウェーブの中期以降の優勢卵胞が存在しない時にGnRHが投与された場合は、排卵は誘起されないため、治療効果も期待できない。したがって、超音波断層検査などにより卵胞ウェーブを把握し、優勢卵胞を確認したうえで投与しないと安定した効果は得られない。

膣内留置型プロゲステロン (CIDRまたはPRID) を投与すると確実に人為的な黄体期を作り出すことが

できるので、GnRH、PGF2 α 、Estradiol Benzoate (EB) などと併用することにより、より確実に発情を誘起することができる。卵胞ウェーブの時期に関わらず、投与後に黄体期ができるので、GnRH単独投与に比べ、効果が高いと考えられる。

ウマ絨毛性性腺刺激ホルモン (eCG) の単独投与は、過剰排卵と多胎妊娠を起こさせる危険性が高いので、一般的には推奨できない。

以上のようなホルモン療法によって発情が誘起され、授精を行っても、受胎率が低いことが多い。卵巣静止の主な原因は乾物摂取量の不足によるエネルギーの不足にあり、エネルギー不足は、卵胞だけでなく、卵子の受精能にも悪影響を及ぼすからである。ホルモン処置により、卵胞が成熟して排卵しても、排卵される卵子に異常があれば、高い受胎率は期待できない。

(2) 分娩後黄体期延長

分娩後黄体期延長は新しい卵巣機能異常であり、その対策も確立されていない。分娩後黄体期延長が増加していることは、2000年にベルギーの研究者¹⁰⁾が始めて明らかにしたが、これがその後の繁殖成績にどの程度悪影響を及ぼすかについては不明であった。その後、著者らは、広島県内の牧場でその発生率が高いことを、わが国で初めて明らかにするとともに¹¹⁾ (Table 7)、これが、その後の繁殖成績に著しく悪影響を及ぼすことを、2004年に初めて報告した¹²⁾ (Table 8)。

続いて、広島大学附属農場の牛群において、分娩後

卵巣機能回復状況の検査を行い、黄体期延長の発生が多いこと、黄体期延長例では、受胎率が極めて低いことを明らかにした (Table 9)。ここでも、正常回復群、初回排卵遅延群および黄体期延長群の栄養状態の比較を行ったところ、前回と同様に、黄体期延長群では他の群に比べて、分娩時のBCSと体重が高く、1日平均乳量が高い (P<0.05) ことが示された⁴⁾。したがって、黄体期延長は、比較的栄養状態がよく、分娩後の初回排卵が早いもので、しかも、乳量の高い牛に起こりやすいことが推察されたが (Table 10)、詳細については、今後の研究に待つところが大きい。

Table 9 乳牛の分娩後初回排卵後における黄体期延長がその後の繁殖成績に及ぼす影響

	正常	黄体期延長	初回排卵遅延
頭数	9	5	7
黄体形成までの日数	33.4±9.0 ^a	30.0±12.4 ^a	64.7±9.3 ^b
初回AIまでの日数	63.1±22.0 ^a	77.6±21.6 ^b	93.0±22.3 ^c
初回AI受胎率	88.9% ^a	0.0% ^b	57.1% ^a

Table 10 乳牛の分娩後初回排卵後における黄体期延長と栄養状態および乳量との関係

	正常	黄体期延長	初回排卵遅延	合計
頭数	9	5	7	
BCS (分娩時)	3.42±0.12	3.50±0.18	3.46±0.19	3.45±0.15
BCS減少値	0.81±0.2 ^b	1.05±0.2 ^a	1.04±0.1 ^a	0.94±0.2
分娩時体重 (kg)	701.2±60.9	748.±48.1	714.1±105.9	717±73.4
体重減少値	15.8±4.2	14.8±3.5	19.8±4.7	16.8±4.4
産次数	3.2±1.8	4.0±1.9	2.3±1.6	3.1±1.8
100日以内平均乳量 (kg/day)	33.6±4.7 ^b	38.8±2.7 ^a	29.9±6.1 ^c	33.6±5.8

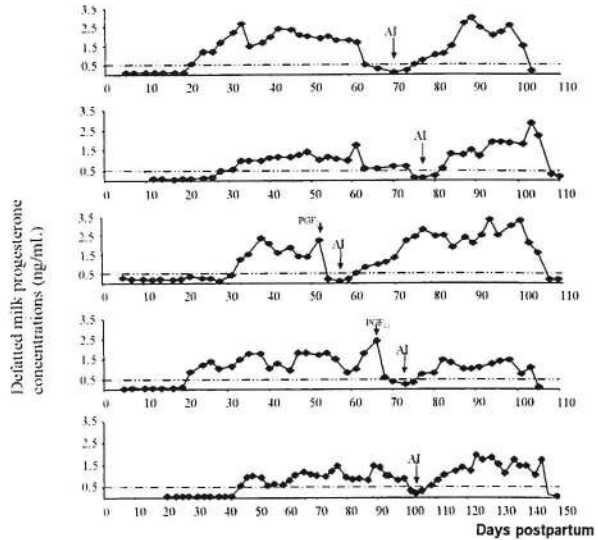


Fig. 5 乳牛の分娩後初回排卵後における黄体期延長に伴う乳汁中プロゲステロン濃度の推移

黄体期延長に対する治療法は未だ確立されていない。黄体遺残と同様に、PGF2αの投与を行い、黄体の退行を誘起することが考えられるが、黄体遺残とは原因が異なるので、同じような効果が得られる可能性は低いと考えられる。また、(Fig. 5) に示したように、黄体期延長例では、黄体が退行し、排卵した後、再び、黄体期の延長が起きる傾向があるので、有効なホルモン治療の方法を見出すことは容易ではない⁴⁾。

黄体期延長は子宮内膜炎を伴うことが多いが、子宮内膜炎が黄体期延長の原因となるのか、あるいは、黄体期延長が子宮内膜炎の発生の原因となるのかについては、不明である。おそらく、両方のケースがあり得ると考えられ、個々の症例によって異なるものと考えられる。ただ、黄体期延長の治療として、子宮内膜炎の治療を行うことは、その後の受胎率を向上させる意味でも有意義と思われる。しかし、子宮内膜炎の治療に関しても、安全で確実な方法がないのが実情である。

おわりに

今日の高泌乳牛における受胎率の低下は、飼養環境の変化と牛の生理機能の変化に伴って起きている、ある意味で現代の酪農の構造的な問題と考えられる。

これまででは、例えば、高泌乳牛の受胎成績低下の原因は分娩後のエネルギー不足にあり、乾物摂取量を最大にするような飼養管理の改善を行うことがその対策と考えられて来た。また、分娩後発情が不明の牛には、ホルモン剤を投与して発情を誘起したり、あるいは、排卵同期化・定時授精を応用することで、ある程度の受胎率を上げることができた。また、発情発見補助器具の応用も発情の見逃しを減らし、授精適期を推定する上で、有効な方法として用いられている。これらの方法は、依然として効果的ではあるが、高泌乳牛の生殖機能が変化している現在では、これだけでは対応できない場合があると考えられる。

特に、高泌乳に伴う乾物摂取量の増加から血中エストロゲン濃度が低下し、発情の微弱、双子分娩の増加、黄体期の延長などが起きている場合には、従来の繁殖管理だけでは、対応が困難と考えられる。

高泌乳牛に起きている生理的な変化を十分に理解し、それに基づいた、新しい繁殖技術を応用することが、今後ますます重要になるものと思われる。

本稿で紹介した研究の一部は、平成15年度森永奉仕会研究奨励金「高泌乳牛の受胎成績低下原因としての分娩後卵巣機能回復遅延および発情微弱の重要性とその診断、治療および予防法の開発」、平成16・17年度畜産新技術開発活用促進事業委託研究費「乳牛の分娩後卵巣機能回復異常の病態」並びに日本学術振興会17年度科学研究費（基盤研究C）「乳牛の分娩後初回排卵後における黄体期延長の病態と治療法の開発」によるものである。

文 献

1. Bousquet, D., Bouchard, E. and DuTremblay, D. D. 2004. Decreasing fertility in dairy cows: myth or reality? *Le Medecin Veterinaire du Quebec* 34: 59~60.
2. Butler, W. R. 2000. Nutritional interactions with reproductive performance in dairy cattle. *Anim. Reprod. Sci.* 60: 449~457.
3. Hommeida, A., Nakao, T. and Kubota H. 2004. Luteal function and conception in lactating cows and some factors influencing luteal function after first insemination. *Theriogenology* 62: 217~225.
4. Hommeida, A., Nakao, T. and Kubota H. 2005. Onset and duration of luteal activity postpartum and their effect on first insemination conception rate in lactating dairy cows. *J. Vet. med. Sci.* 67: 1031~1035.
5. Lopez, H., Satter, L. and Wiltbank, M. 2004. Relationship between level of milk production and duration of estrus in lactating dairy cows. *Anim. Reprod. Sci.* 81: 209~223.
6. Lucy, M. 2001. Reproductive loss in dairy cattle: where will it end? *J. Dairy. Sci.* 84: 1277~1293.
7. Nakao, T., Moriyoshi, M. and Kawata, K. 1989. Effect of postpartum intrauterine treatment with 2% polyvinyl pyrolidone iodine solution on reproductive efficiency in cows. *Theriogenology* 30: 1033~1043.
8. Nakao, T., Moriyoshi, M. and Kawata, K. 1992. The effect postpartum ovarian dysfunction and endometritis on subsequent reproductive performance in high and medium producing dairy cows. *Theriogenology* 37: 341~348.
9. Nimmo, J., Balendran A., Dinn, N. and Rajamahendran R. 2005. Comparison of ovarian function and pregnancy rate in Holstein heifers and lactating cows. *proc. 12th Int. Cong. Biotech. Anim. Reprod.* p58.
10. Opsomer, G, Coryn, M., Deluyker, H. and de Kruif, A. 1998. Analysis of ovarian dysfunction in high yielding dairy cows after calving based on progesterone profiles. *Reprod. Dom. Anim.* 33: 193~208.
11. Opsomer, G, Grohn, Y. T., Hertl, J., Coryn, M., Deluyker, H. and de Kruif, A. 2000. Risk factors for postpartum ovarian dysfunction in high producing dairy cows in Belgium: a field study. *Theriogenology* 53: 841~857.
12. Roche, J. F., Mackey, D. and Diskin, M. D. 2000. Reproductive management of postpartum cows. *Anim. Reprod. Sci.* 60~61: 703~712.
13. Sangsritavong, S., Combs, D. K., Sartori, R., Armentano, L. E. and Wiltbank, M. C. 2002. High feed intake increases live blood flow and metabolism of progesterone and estradio 1-17 beta in dairy cattle. *J. Dairy. Sci.* 85: 2831~2842.
14. Shrestha, H. K., Nakao, T., Higaki, T., Suzuki, T. and Akita, M. 2004. Resumption of postpartum ovarian cyclicity in high-producing Holstein cows. *Theriogenology* 61: 637~649.
15. Shrestha, H. K., Nakao, T., Suzuki, T., Higaki, T. and Akita, M. 2004. Effects of abnormal ovarian cycles during pre-service period postpartum on subsequent reproductive performance of high-producing Holstein cow. *Theriogenology* 61: 1559~1571.
16. Shrestha, H. K., Nakao, T., Suzuki, T., Higaki, T. and Akita, M. 2005. Relationship between body condition score, body weight, and some nutritional parameters in plasma and resumption of ovarian cyclicity postpartum during pre-service period in high producing dairy cows in a subtropical region in Japan. *Theriogenology* 64: 855~866.
17. Wiltbank, M. 2004. The underlying physiology changing reproduction in today's high-producing dairy cows. *J. Reprod. Develop.* 50 (Suppl.) :j39.
18. Yoshida, C. and Nakao, T. 2005. Some characteristics of primary and secondly oestrous signs in high producing dairy cows. *Reprod. Dom. Anim.* 40: 150~155.

原 著

近位端部における *Trypanosoma evansi* の鞭毛の空間的構築改訂

比留木 武 雄*

[受付 : 2005年10月30日]

ORIGINAL ARTICLE

REVISION OF SPATIAL ARCHITECTURE OF THE FLAGELLUM OF *TRYPANOSOMA EVANSI* AT THE PROXIMAL END PORTION

Takeo HIRUKI

*Department of Microbiology & Immunology, Faculty of Medicine, Shimane
University, 98-1 Enya-cho, Izumo-shi, Shimane-ken, 693-8501, Japan*

[Received for publication : October 30, 2005]

Improvement in the fixation and the staining of the specimen for the electron microscopy of *Trypanosoma evansi* enabled me to study in detail on the spatial architecture of the proximal end part of the flagellum.

As the result, many electron photomicrographs with distribution of the well-defined cytoplasmic filaments (CF) (3~5nm in diameter) were obtained. In this study the running patterns of CF around the axonemal doublet fibrils (ADF) and subpellicular microtubules (SM) were carefully observed. Although the abundant CF adhered to the organelles, owing to the difficulty to stain, would have inhibited the previous investigators from remarking the actual existence of the underlying SM in situ, these CF appear to join by themselves the ADF and SM to the intrinsic location in the cytoplasm of the cell body and the flagellum.

This work enabled me to remark the existence of the unknown routes of SM mounted by the abundant CF difficult to stain. Some SM at the basal body portion were found to enter into ADF and join themselves to the ADF with CF, and get out of the array. After winding themselves around a quartet of microtubules (QM) at the appositional location with the reservoir wall, they finally terminate into somewhere of the cytoplasm, which is unknown. This machinery, consisting of the SM and QM, seems to give the tight junction between the cell and the flagellum and to modulate the impulse from vigorous motility of the flagellum against the parasite body.

緒 言

著者は前に *Trypanosome evansi* の鞭毛が、この微生物にただ一個存在するミトコンドリア (Mitochondria: Mt) (従来、その satellite DNA はこの原虫に特有の kinetoplast (K) という名称で呼ばれている) と連結していることを示す模式図を示した¹⁾。その時、著者は、Mt が元々は外来性の微生物であり、それは細胞に侵入して共生状態になっているとの仮説を念頭においていた。1991年に、Robinson & Gull²⁾等が、見事なテクニックで、鞭毛の基底小体の複製と K の segregation の間に相関関係のあることを見出し、更には、近年、Ogbadoyi³⁾、Robinson & Gull (1991)²⁾等が基底小体 (Basal Body : BB) と K の間には、彼らが “tripartite attachment complex” と命名した filamentous linkages のあることを示した。

* 島根大学医学部医学科微生物・免疫学教室 〒693-8501 島根県出雲市塩冶町89-1

いまや、鞭毛は外来生物であり、細胞に寄生したMtが宿主である細胞に鞭毛を与えることによって、自己への十分な栄養補給可能にしていることは疑いのない事実であるようである。著者は、その後、trypsinやpronaseを用いた実験により、細胞と鞭毛が剥離して、その細胞が「形態変化」(Morphological Change)するのは、鞭毛が細胞体から剥離した後も、そのデスマゾーム様構造^{11, 30)} (Macula adherentis : Ma) が無傷で残っていることから、細胞と細胞を繋ぐ“microfilaments”⁹⁾がこれらの消化酵素で切断されるために細胞と鞭毛の間が分離すると推論した¹¹⁻¹³⁾。更に、この酵素の作用でTrypanosoma cellsが本来の螺旋形状を消失するので、microfilaments linkageこそが、螺旋構造を取らせる原因であると結論した^{13&14)}。

これらの研究は、必然的に、著者に対して、この原虫におけるmicrofilamentsの超微細構造学的な見地での観察に興味を湧き起こさせた。そこで、著者は、膜系成分の電子顕微鏡観察における解像度を上げるために「同時二重染色法」(Simultaneous Double Staining Method)¹⁵⁻¹⁷⁾を用いて、この原虫に固定と染色を施し、詳細に、細胞内のCFを含めた構造を観察することにした。

観察撮影した電子顕微鏡写真は最終的にDigital Imagesとして電子計算機で画像処理して、観察結果が理解しやすいように50%の光透過度を持つ色づけを施した。その結果、3-5nmの難染色性のfilamentsの付着故に隠されていて、その完全な構築が不明であったTrypanosoma evansiの鞭毛の立体構築が明らかになったので、ここに報告する。明らかになった構築の中には、これまで、その存在意義が謎であった4本組微小管 (A Quartet of Microtubules : QM)^{11, 28&30)} も含まれる。

材料と方法

材料と方法については、著者が既に発表している論文と概略同じであるので、そちらを参照されたい。この論文では、特別な細胞の固定と染色の方法を用いたので、それについて詳述する。

供試原虫株：Trypanosoma evansi (Taiwan strain)。

原虫の増殖：BALB /c CrSlc miceに腹腔内接種により感染増殖された。

原虫の分離と濃縮：この原虫はマウスの生体内でparasitemia極期になるまで増殖させられ、最終濃度で10 IU/mlとなるように調整したheparinized salineを等量になるように予め入れた注射器を用いて、その感染血液がheart pucture techniqueによって先尖試験管の中に集められ、直ちに卓上遠心器を用いて遠心 (3000r.p.m. for 10 minutes) 濃縮された。

原虫の洗浄：この原虫の凝塊は固定に用いる0.2 M Cacodylate Buffered Saline, Ph7.4で三回、同じ遠心条件で遠心洗浄する。

原虫の同時二重染色：続いて、串田&藤田の法 (Simultaneous Double Staining Method)¹⁵⁻¹⁷⁾ に従い、等量のアルコールとアセトンの中に酢酸鉛を飽和状態となるように溶解した **1液** とabsolute alcoholに0.5%の割合に硝酸ウラニルを溶解し、次に同量のabsolute acetoneに溶解して作った **2液** を7 : 3の割合で混合し、その細胞ペレットを添加し攪拌して再浮遊させ6時間、固定と染色を同時に行った。

原虫の再洗浄：固定され、染色もされた細胞のpelletは、この後、同じ緩衝液を用いて2回洗浄した。

アガロースペレット作成：洗浄の後、原虫のペレットは、60℃の1% agarose液を容れた先尖試験管の中に再溶解され、ゲル化するまで遠心 (3000 rpm for 10 minutes) してゲル化と同時に再度ペレットにした。

ペレットの細断：試験管から取り出した細胞のペレットは、約1 mm³の大きさにナイフで細断した。

脱水・置換・包埋操作：それらのブロックは普通の電顕資料の脱水・置換・樹包埋の過程を経させる。

グリッドの親水処理：グリッドはその上に超薄切々片をマウントする前に、Ion-coater Eiko IB3 (Eiko Engineering Co. Ltd. Japan) で支持膜無しに親水処理する。

薄切切片作成：樹脂に包埋され、硬化されたブロックはUltramicrotome M5000 or M6000 (Sorvall USA) を用いて超薄切々片として作製され、親水処理されたグリッドの上にマウントされる。

電子発色：グリッドの上に積載された超薄切々片は、従来の方法であるクエン酸鉛・酢酸ウラニウム染色を施された。

透過電顕観察：透過型電子顕微鏡, JEM-1200EX (80KV,a.v.) を使用して、観察し電子顕微鏡写真を撮影した。

画像解析：撮影した電子顕微鏡写真は印画紙に現像焼き付けの上、Digital Cameraで撮影し、Digital Image Dataとして、Adobe Photoshop CSをinstallしたApple社のPower Mac G4に取り込み、画像のcontrastやbrightness更にはsharpness等を変更して、computer display上で観察しやすい条件を整えて観察し、論文提示する場合には、その観察の結果を分かりやすくするために、又、元の画像の輪郭を損なわせないように原図の当該画像の上に50%の透過度での「色づけ」を施した。

結 果

所謂、細胞と細胞の接着にはDesmosome (D)^{4, 27)} が関与している。更に、細胞の中には細胞内小器官の固有の局在を保証する10 nm-filaments (or tonofilaments)^{9&27)} やそれより小さいcytoplasmic filaments (CF)²⁷⁾ があることが知られている。著者の観察した3-5nmのmicrofilamentsはその太さから、CFに相当すると考えられる。Fig. 1 は鞭毛の近位端distal portionの電子顕微鏡写真である。鞭毛はその長軸方向に平行、即ち縦切りされている。この写真は前述の如く、Simultaneous Double Staining Method¹⁵⁻¹⁷⁾によって固定と染色を施したものである。従来の方法では解像しなかった直径3-5nmの微細なCFが鞭毛のaxoneme fibrils (AF) 周辺 (yellow colored arrowhead 1) や細胞形質内に (yellow colored arrowhead 2) も明瞭に解像していた (Fig. 1 参照)。細胞内に存在する小器官やKより生じるAFの原基は、初めtendrill-like structure (TLS) (Fig. 1 でgreen colored arrowhead 3参照) としてKの中に認められ、CFを伴って、それらはbasal bodyを構築するAFに断続することなく移行していた (Fig. 1 参照)。同様に、その径 (20-26nm in thickness) とAFと同様の電子染色性を示すのでsubpellicular microtubules (SM) (Fig. 1 でblue colored arrowhead 4参照) と考えられるが、それらの構造が、KのTLSから連続性をもち、CFを伴ってAFに対して結合した後、再度、そのSMが進入した部位と、別の部位から、鞭毛膜とreservoir wall (RW) の細胞膜を通過して、再び細胞質の中に入るのが認められた (Fig. 1 & 2参照)。このような構造は鞭毛のproximal endからdistal endに向けて、ある一定間隔で認められた (Fig. 2 参照)。一般論として、細胞内の小器官は全て、それらの固有の位置をCFによる周辺の構造に対しての結合によって保証されている。この場合、中心にSMを包んだCFの分布パターンがSMの走行を追跡するのに役立つ。このような考えの下にSMと考えられる構造物を追跡してみると、鞭毛のproximal end付近で鞭毛膜の中まで進入して、CFによってAFに結合すると考えられるSMが入り込むことが分かった (Fig. 1 & 2 参照)。Fig. 2 はその追跡の結果得られた数本のSMがどの様に、この鞭毛の近位端で立体配置するかを示した電顕写真である。BB部分で認められCFに包まれた物質の直径は細く、約10nmである。それらは細胞質の中CFを伴って現れ、BB部分のAFにCFによって結合した後、反体側の細胞室内に入っている。

鞭毛のreservoir (R) の出口付近では、Rの内腔は狭くなっている。この部分でFig. 2 に示す如く、密にCFに包まれた4本のmicrotubules (M) が極めて接近して並んで鞭毛の長軸と平行の方向に走っているのが認められる。それらのMにFig. 2 中で1-4の数字を割り振った。1のMの突起はmicrotome knifeに切られて途中から切断されている。これらの構造はこれまで、細胞膜の直下ばかりではなく、細胞質の中に、その横断面ばかりが検出され、縦切りの像が検出されなかったため、その全体像が分からず、従って、その構造が何故、そんな場所にあるのかが、謎とされてきた構造物と考えられる^{11&28)}。この構造物はMの4本組の構造であり、それが記載されてきたin situの位置に観察されるので、著者はこの構造を四本組微小管 (A Quartet of Microtubule : QM) (Fig. 2 中、大きな赤色の矢印の頭はQMの存在場所を示している。) と考える。興味深いのは、この部でAFに連結するSMは必ずこの部で、この四本組の微小管の周りを一周して結合した後で、更にreservoir wall (RW) を超えて鞭毛膜の中のAF結合するために進入して、随伴するCFを介して結合した後に、それが入ってきたとは異なる部位から、再び細胞内に入っている。そのQMに結合する何本かのSMは、密に、この部で鞭毛膜の中のAFに連絡しているの、恰度、SMの束のような様相を呈し、そこで“糸玉”のような外観を呈している (Fig. 2 参照)。

この部で鞭毛の中に入るSMが鞭毛の中のAFに連結する前にQMの周囲に巻き付くのか、或いはそれが、鞭毛から出てきたときに、QMに巻き付くのかはどちらが先であるかは著者にも分からない (Fig. 2 の参照)。Fig. 3 は横切りした場合の所見を示す。細胞膜の直下の細胞骨格層にあるSMが細胞外の鞭毛の横断面でも、細胞膜と鞭毛膜を超え、CFを伴って、傍鞭毛軸糸桿Paraflagellar Rod (PFR) やAFに結合していると考えられる像である。赤色のarrowheadsをたどれば、SMが確かに鞭毛の中に入し、AFやPFRと連絡するのが確認される。

図中、鞭毛と細胞の接着面に示したred arrowはCFというより、恐らくSMのprotofilaments (PF) の“矢束像” (palisade image)^{7, 8, 31&32)} が解像された物と考えられる。

この部分ではSMの上にマウントしたCFはマイクロトームのナイフでたまたま、そぎ取られたのでその下にある、SMの進行方向と一致したきちんとしたprotofilament palisade (PP) の並列の並びが認められる。これがCFであるならば、それは、その走行の方向と関係ないし、このような並列した規則的な配列は取らないであろう。

この平行したPFの並びが細胞膜の直下から細胞膜と鞭毛膜を超え、鞭毛の内部に連絡を取っていることを示す。それは結局、PFRに連結している。注意して観察すれば、鞭毛膜の外から、鞭毛の内部に連絡を取る構造が鞭毛の輪切りの円周上の色々の場所で認められる。

Fig. 4 はFig. 3 の一部を拡大して示した。これはMacintosh computerとAdobe Photoshop CSを利用して*T. evansi*の透過電子顕微鏡写真を取り込み既に記述したように、“brightness”と“contrast”を変更して、この場合はSMの上のCFに50%の光の透過度で色づけた物である。拡大した方がよりCFの同定がしやすくなるので拡大して色づけた。これは色づけた写真 (Fig. 5) の原画である。ほぼ正確にCFによって、SMが横切りされた鞭毛内でど

のようにルートが追跡されているかをFig. 4 とFig. 5 を比較して参照されたい。

Fig. 5 は前述の如くSMの上に重層したCFによってSMの一本毎に色を変え追跡してみた結果を示したものである。その追跡が正確になされていることはFig. 4 と比較することで確認される。鞭毛の内部に入り込んだSMは一旦、CFでPeripheral Doublet Fibrils (PDF) に結合し、その後にCentral Double Fibrils (CDF) に結合して、再度、別のPDFに結合して、鞭毛膜の外に出る。この写真では、鞭毛膜の外に出たSMがどこに行くのかは言及できないが、Parasite Body Cytoplasmに戻るであろうという「推測」は為し得る。

これらの鞭毛のBasal Bodyを含めて鞭毛の近位端部の縦切りの切片と細胞外部にある鞭毛の横切りの切片から得られる情報を併せて考えると、鞭毛の内部に入り込むSMが確かに存在すると考えられる。

議 論

この研究は鞭毛の中に、虫体の特定の位置で*Trypaosoma evansi*の虫体の細胞質から細胞膜下の微小管が入り込むと言う結論を導かせた。それは、著者が、染色しがたい疎水性のCFを染色し得たことと、CFが細胞内小器官のin situの局在には不可欠のものであることに着目したことと無関係ではない。実際には存在する構造物でも、今回のSMのごとく、厚く、CFを被っていると、その為に、対象であるSMは染色されず、従って、染色されない物は、そのような構造はないものと信じられてきたのであろう。CFの下に、SMが隠れているであろうという着想は丹念な特有のパターンを示し一定のルートをとっているCFを追跡することで得られた。それらのあるものは、Kの蔓状構造物 (Tendril-like Structure : TLS) から、連続的に繋がって、やがて、BBにその形状を変化させていた。同じく鞭毛の開口部に近い場所で鞭毛膜の内部に入り込む構造の一端が、同じ、TLSから派生し、その一部が、BBに移行するMicrotubuleと同じ形状で、偶々、染まっているところの電子染色性もほぼ同一であった。鞭毛の構造に関与せず、一本の微細管として細胞室内を走る構造物として知られているものは膜下微小管 (Subpellicular Microtubules) の他には考えられない。そのような着想の下で追跡されたSMの一部がマイクロトームナイフで重層していたであろうCFが剥奪され、その下部にSMの構造的特徴であるprotofilament palisade^{7,8,32)} がたまたま露出していたのも著者の考えが妥当であることを証拠だてるであろう。ProtofilamentはAxoneme fibril Aでは13個⁶⁾、Axoneme fibril Bでは10~11個あり、SMでは12個あることが分かっている^{30, 32)}。それらは試験管のなかでは「矢来」のような縦縞の像として観察されることが知られている^{8,10)}。

著者がこの仕事で示したのと同じような細胞から鞭毛の内部SMが進入するような所見は青蝇の精子の鞭毛を観察したWarner, F.D.³¹⁾の論文にも認められる。しかしながら、著者が細胞内に鞭毛の外側から入っていく構造として、この仕事で記載した構造の一部を“radial spike”として記載して、それと同じ程度の解像度で見事に解像された、細胞の外から連続した構造として“radial spike”に繋がる“構造”を完全に彼は無視しており、彼の模式図には完全に細胞の外からの連絡の記載はない。

おそらく、彼は“radial spike”が何処から来たなどとは考えなかったのであろう。

Brooks, A. S. (1978)³⁾は*Crithidia faciculata*, *Trypanosoma equiperdum*と*Trypanosoma lewisi*を用いて、鞭毛の虫体への接着部位について、細胞化学的手法 (細胞外間隙を明白にする目的でLanthanum HydroxideとLanthanum nitrateを使用; 酸化した多糖体 (これらにはacid substituted aliphatic polymersやacid polypeptideが含まれる) をそめるためにRuthenium-redを用いた) と電子顕微鏡の技術 (Ultrathin Technique, Freeze-etch&Rotary Shadowing Technique for Carbon Replica) を適用して調べている。この結果、鞭毛と細胞の接着面に、様々な形状の「接着斑」をみているが、接着構造として三種の原虫の構造の比較に留まり、この仕事のように、それが積極的に鞭毛の内部に連結する構造としての認識を彼も示していない。だが、Ruthenium redに染まった*Crithidia faciculata*の鞭毛嚢 (R) に示されている接着構造を彼は「種」によって特異化した構造とした訳であるが、著者がこの論文で提示した、SMによる鞭毛と細胞の接着面における架橋であるという見解には至っていない。著者は接着斑のようなものではなく、それらもSMではないかと考えている。この仕事において、SMの鞭毛内部に架橋する構造が鞭毛と細胞の接着面で細胞膜直下に存在する位置と従来に呼称されてきているマキュラ (Maculae adherens)^{11~11, 29,30)}の存在する位置とが一致する可能性はあるが、その異同はまだ分かっていない。

さらにAngelopoulos, E. (1970)¹⁾は簡素化したLangmuir法と表面張力で細胞の表面を広げるテクニックを組み合わせ、その後、臨界点乾燥法を適応し、得られた試料をnegative染色して、緑藻類の*Chlamydomonas*や*Trypanosoma lewisi*の細胞の骨格 (SM) だけの構造を観察している。その写真を観察すると、SMは、鞭毛の鞭毛嚢 (Reservoir : R) 付近では複雑な走行を呈し、この部位では必ずしも、細胞膜直下の定位置を取らず深部に潜るとの推測が可能である。更に、SMの一部はRの開口部から出た後は一定の間は、朝顔の蔓のように、鞭毛の周囲に巻き付いているのが観察される。これらの所見は、著者がこの論文で観察した、SMが鞭毛膜の中に入り込むという結論を矛盾無からしめる。

更に、著者が、この仕事で偶々、見いだした4本揃って縦切りされた四本組微小管 (A Quartet of Microtubules : QM)^{11&28)} とこれらのSMの密接な関係も、これらの立体的な構築が実際に存在していないのなら、QMの役割というものも考える必要がないので、(このような鞭毛膜の中を通ってRの対側に渡るSM存在を) 否定することも出来るであろう (SM自身が、覆われている疎水性のCFのために、全体が染色された構造としては証明し難いけれども)、QMはこれまで、細胞の深部にあっては、Rと併置された位置にあって、4本の微小管が接近してひとまとまりとなって配置する構造として認められてきた。ところが、この構造物は、縦切りの、しかも、四本が組になったの切片が確率的に得難いために、これまでどのような目的のために、そこに存在するのか「謎」とされてきた構造物である。今回、はからずも、この構造物が四本揃って当該 (in situ) の位置に微小管の軸に平行な縦切りの像として認められ、それに、細胞の別の場所から、この部にやってきた数本のSMが、Rの開口部近くで、決まって、鞭毛に入り込む前か、入り込んだ後か、にこのQMの周りを一周している像が得られた (Fig. 1 & 2)。これらの特異な構造を鞭毛が運動する器官であるという認識のもとに考えると著者は、この部で、このようなSMの鞭毛の内部に入り込んでPDFやCDFに結合した後に (あるいは前に)、QMの周りを一周して、これらをCFによってQMに結びつけるのは、QMが鞭毛の運動にとって、力学的支点として、必要とされるからであるに違いないと推論する。おそらく、このような構造は鞭毛を細胞体に強く連結するのは、勿論、鞭毛の運動を合理的に細胞の運動として伝えるために不可欠の働きをしているに違いない。この報告がQMの最も現実味のある機能についての初めての報告であろう。

Rとその近傍の構造について超薄切片、ネガチブ染色、凍結切断法によってRotary Shadowingしたreplicaを研究することで、その構築を調べる研究も為されてきている^{16, 18&23)}が、特にLinder J. C. & Staehelin A. (1977) は、著者がこの論文で記載したような細胞質と鞭毛の内部への架橋構造をTrypanosomatid *Leptomonas collosoma*凍結切断のEF面とPF面で観察しており¹⁸⁾、彼らはその超薄切片で見られる構造を“champagne glass structure”と称している。その後、Yoshikawa et al. (1990)²⁰⁾も又、同様に*Trypanosoma brucei gambiense*のPDFと鞭毛膜を連結する“electron dense connections”を観察している。著者はこの論文でSMが鞭毛膜の外側からAのPDFやCDFに連結する構造を示したが、彼らは既にその構造の一部を観察していたのであろう。

Hemphill, A. 等⁹⁾はSMとPFRの間を連結するフィラメント構造のあることを*Trypanosoma brucei*でFreeze-Etching & Rotary Shadowing Methodを適用して証明したが、それら細胞体サイトから鞭毛膜内への“SM”の入り込みについてはなかった。

SMを構成するtubulinには α_1 と α_3 があり、 α_1 は可溶性抗原として不安定で細胞内のプールの中に広く認められる器官特異的ではないが、tubulin α_1 が遺伝子翻訳後にチロシン化によって修飾されるtubulin α_3 の方が、分子としてはより安定で、非常に分子的に安定なAFは専らtubulin α_3 で構成されるが、SMはtubulin α_1 とtubulin α_3 とで構成されている (Schneider A. et al. 1987)²¹⁾。著者はこのSMが細胞の内部から鞭毛の内部に、恐らく、QMが鞭毛と細胞の接着面において、細胞膜の直下のSMの並びの中で限界明瞭で一塊りの4本組として、走行する限りは、それがRの内側であれ、細胞の外側であれ、この論文で見えてきた「装置」の仕組みから推測すると、SMがQMの存在する部位で鞭毛の内部に進入してAFやPFRと結合した後、細胞の中に戻るのであろうと考えている。これまで言及されたことのない、このようなSMとQMの共同的な機能を推測させる仕組みを持つSMを構成するtubulin isomersの組成がどのようなものであるかは分からない。

微小管 (microtubules : M) の組み立て部位 (Assembly site : AS) はAFとSMにおいて別の部位であることが報告されている。AFの場合は、ASは鞭毛の中心性二本組微小管 (Central Doublet Fibrils : CDF) の遠位端Distal Pointに存在するCapping structureが分子シャペロン (HSP70) の存在部位でその部にAFの材料であるtubulinが高濃度に認められ、その部でAFの組み立てが為されることが緑藻類の*Chlamydomonas*を使って明らかにされている (Dentler, W.L. 1980⁶⁾; Block & Johnson, 1995²¹⁾)。この仕事は形態形成に分子shaperoneの役割を示す一つのモデルとして注目される。他方、SMの方は、新生されるTubulinが一時的にtyrosinationする現象のあることがSherwin et al. (1987)²⁷⁾によって報告され、同じ著者らによって、tyrosinated α -tubulinに対するモノクローナル抗体を使って、*T. brucei*の新しいSMの組み立ての過程が明らかとなった。それによれば、SMの組み立ての素材は隣にある長い微小管がMATs (Microtubule-associated-tubulins) を補給し、新生される娘細胞のSMは、親から受け継いだ隣の長いSMを鋳型とすることで半保存的に形態形成されるという。即ち、SMはその存在する細胞膜直下のcytoskeleton layerで再生されるということである (Sherwin, T. et al. 1987²⁷⁾; Sherwin, T. & Gull 1989²⁸⁾)。Wood et al. 1989²⁹⁾は*T. brucei*のcytoskeleton蛋白そのものか、その塩析した抽出物を接種したマウスから作られたhybridomaからmonoclonal antibodiesを選別して、Flagellar attachment zoneを認識する抗体を2個、flagellar rodを認識する抗体を1個、そしてBasal bodyを認識するものを1個得たと報告している。このことは、免疫学的には異なる部位にあるtubulinに明らかな相違があるということを示している。これらのmonoclonal antibodyの何れが、この論文で示したSMと反応するのか、興味を持たれる。

他方, Ono & Nakabayasi (1987)²³⁾ はVinblastin, ColchitinやConcanavalin Aと一緒に*T. gambiense*の培地に投与すると, 鞭毛膜が虫体の膜に融合し, 融合の結果, 細胞室内に取り込まれたaxonemeのPDFの番号5番位と6番目位が欠失して, それらがそのまま, SMに転化したと報告している. このことは, 条件次第で, PDFがSMに転化する可能性のあることを示唆している. だが, 現在のところ, 著者の観察したSMが特殊なものであるのか, 単にCFに覆われているだけで, 一般のSMと同じ組成で, その組み立ての場所は何処なのかなど何も分からない. *Trypanosoma brucei*において, *Trypanosoma cruzi*の鞭毛を細胞に接着する免疫優性の72-kDa GP72 (surface glycoproteinと高い類似性を持つ546 amino-acid protein(Fla 1) を遺伝支配する遺伝子であるflagellum-adhesion glycoprotein gene 1 (fla 1) が近年, 解明されている (Nozaki, T. et al. 1996)²⁰⁾.

文 献

- 1) Angelopoulos, E.: Pellicular microtubules in the Family Trypanosomatidae. *J. Protozool.*, 17: 39~51, 1970.
- 2) Block, M.A., Johnson, K.A.: Identification of a Molecular Chaperone in the Eukaryotic Flagellum and Its Localization on the site of Microtubule Assembly. *J. Cell Sci.*, 108: 3541~3545, 1995.
- 3) Brooks, A.S.: Ultrastructure of the Flagellar Attachment Site in Three Species of Trypanosomatids. *Trans. Amer. Micros.*, 97 (3): 287~296, 1978.
- 4) Chidgey, M. A. J.: Desmosome and Diseases. *Histol.&Histopathol.*, 12: 1159~1168, 1997.
- 5) Dentler, W.L.: Structure Linking the Tips of Ciliary and Flagellar Microtubules to the Membrane. *J. Cell Sci.*, 42: 207~220, 1980.
- 6) Erickson, H. P.: Microtubule Surface Lattice and Subunit Structure and Observation on Reassembly. *J. Cell Biol.*, 60: 153~167, 1974.
- 7) Fuji, H.: Electron Microscopic Studies on the Intraflagellar Structures of Trypanosomes. *J. Protozool.*, 16 (3): 460~466, 1969.
- 8) Grimstone, A.V. and Klug, A.: Observation on the Substructure of Flagellar Fibres. *J. Cell Sci.*, 1 (3): 351~362, 1966.
- 9) Hemphill, A., Lawson, D. and Seebeck, J.: The Cytoskeletal Architecture of *Trypanosoma brucei*. *J. Parasitol.*, 77 (4): 603~612, 1991.
- 10) Henley, G. L., Lee, C. M. and Takeuchi, M.: Electron Microscopy Observations on *Trypanosoma brucei*: Freeze-Cleaving and Thin Sectioning Study of the Apical Part of the Flagellar Pocket. *Z. Parasitenkd.*, 55: 181~187, 1978.
- 11) Hiruki, T.: Existence of a Connecting System in the Flagellar Apparatus and the Accessory Structures of *Trypanosoma evansi*. *Zbl. Bakt. Hyg., A.* 264: 392~398, 1987.
- 12) 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.
- 13) 比留木武雄: 糸状架橋構造: *Trypanosoma evansi*の形態変化に及ぼす役割 山口獣医学雑誌, 30: 59~68, 2003.
- 14) Hiruki, T.: A Role of *Macula adherens* Playing of Flagellar Syncytium Formation of *Trypanosoma evansi*. In: "Mushi-no-shirase (in Japanese)" pp243~260, edited by Yuzo Takahashi and Shiro Kasuya, Published by Sankeisha, Nagoya, 2002.
- 15) Kushida, H. and Fujita, K.: Simultaneous Double Staining Electron Microscopy, VIth International Congress for Electron Microscopy, II: 39~40, 1966. Maruzen, Tokyo.
- 16) Kushida, H. and Fujita, K.: Simultaneous Double Staining, *J. Electron Microscopy*, 16: 323~329, 1967.
- 17) 串田弘, 電子染色 In: 超薄切片法, pp193~226, 文光堂, 東京, 1976(18) Linder, J. E. and Staehelin L. A.: Plasma Membrane Specialization in a Trypanosomatid Flagellates. *J. Ultrastr. Res.*, 60: 246~262, 1977.
- 18) Murray, J.M.: Structure of Flagellar Microtubules. *Internat. Rev. Cytol.*, 125: 47~93, 1991.
- 19) Nozaki, T., Heynes, P.A. and Cross, A.M. Characterization of the *Trypanosoma brucei* Homologue of a *Trypanosoma cruzi* Flagellum-adhesion glycoprotein. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 82: 245~255, 1996.
- 20) Ogbadyi, E. O., Robinson, D.R. and Gull, K.: A High-order Trans-membrane Structure Linkage Is Responsible for Mitochondrial Genome Positioning and segregation by Flagellar Basal Bodies in Trypanosomes. *Mol. Biol. Cell*, 14 (5): 1779~1779, 2003.
- 21) Ono, T. and Nakabayashi, T.: Possible Conversion of Axonemal Microtubules to Flagellar Microtubules in *Trypanosoma gambiense* Treated with Vinblastin, Colchicine Plus Concanavalin A. *Biken J.*, 30: 25~28, 1987.

- 23) Robinson, D.R. and Gull, K: Basal Body Movement as a Mechanism for Mitochondrial Genome Segregation in Trypanosome Cell Cycle. *Nature*, 352 : 731~733, 1991.
- 24) Schneider, A., Sherwin, T., Rosemary, S., Russel. D.G., Gull, K. and Seebeck, T. Subpellicular and Flagellar Microtubules of *Trypanosoma brucei brucei* Contain the Same α -Tubulin Isoforms. *J. Cell Biol.*, 104 : 431~438, 1987.
- 25) Sherwin, T., Schneider, A., Rosemary, S., Seebeck, T. and Gull, K. Distinct Localization and Cell Cycle Dependence of COOH Terminally Tyrosinolated α -Tubulin in the Microtubules of *Trypanosoma brucei brucei*. *J. Cell Biol.*, 104 : 439~446, 1987.
- 26) Sherwin, T. and Gull, K.: Visualization of detyrosination along single microtubules reveals novel mechanisms of assembly during cytoskeletal duplication in trypanosomes. *Cell*, 57 (2) : 211~221, 1989.
- 27) Staehelin, A. and Hull, B., E. : Junction between Living Cells. *Sci. Amer.*, 238 : 141~147. 1978.
- 28) Taylor, A.E. and Godfrey, D.G. : A New Organelle of Bloodstream Salivarian Trypanosomes. *J. Protozool.*, 16 (3) : 446~470, 1969.
- 29) Vickerman, K. : On the Surface Coat and Flagellar Adhesion in Trypanosomes. *J. Cell Sci.*, 5: 163~193, 1969.
- 30) Vickerman, K. and Preston, T.M. : Comparative Cell Biology of the Kinetoplastid Flagellates. In : Biology of the Kinetoplastida, volume 1, pp90~130, 1976.
- 31) Warner, F.D. : New Observation on Flagellar Fine Structure. The Relationship between Matrix Structure and Microtubule Component of the Axoneme. *J. Cell Biol.*, 47 : 159~182, 1970.
- 32) Warner, F.D. : Macromolecular Organization of Eukaryotic Cilia and Flagella. *Adv. Cell and Mol. Biol.*, 2 : 193~235, 1972.
- 33) Wood, A, Sherwin, T., Sasse, R, MacRAE, T.H., Bains, A. J., and Gull, K. Definition of Individual Components within the Cytoskeleton of *Trypanosoma brucei* by Library of Monoclonal Antibodies. *J. Cell Sci.*, 93 : 491~500, 1989.
- 34) Yoshikawa, H., Furuki, J., Takahashi, Y., Morioka, H. and Yoshida, Y. : Freeze Fracture of the Bloodstream Form of *Trypanosoma brucei gambiense*. *J. Protozool.*, 37 (1) ; 27~32, 1990.

EXPLANATION OF FIGURES

Fig. 1 and Fig. 2

Thanks to the more resolving power of a transmissible electronmicroscopy and the improved method of stain and fixation in *Trypanosoma evansi*, more defined images of cytoplasmic filaments (CF) became evident. In the present picture, abundant CF (3-5nm in thickness) both in the parasite body cytoplasm (PBC) and the flagellar cytoplasm (FC) are visible. The green colored "arrowhead 3" shows that the tendril-like structure (TLS) arising from the kinetoplast converts serially to the proximal end of the basal body (BB) in the shape.

The TLS possesses electron-dense properties, likely as the axonemal fibrils (AF) .

In the portion close to the exit of the reservoir Lumen, the other microtubules (yellow arrowhead 2,1 and blue arrowhead 4 in Fig. 1) , which seem to arise from the similar TLS within the kinetoplast, run with CF toward the reservoir, and serially connect to an axonemal fibrils (AF) through the reservoir wall and the flagellar membrane (FM) and eventually back again to the cytoplasm (See yellow arrowheads 1 and 2 in Fig. 1) . These SM, thereafter, wind themselves around a quartet of microtubules (QM) in a coil at the appositional location with the flagellar wall (RW) .

The numbered "1", "2", "3" or "4" of QM in Fig. 2 indicates a microtubule as a part of QM arising close to the RW. Although "1" of 4 microtubules was cut obliquely on the way of protrusion, "2", "3" or "4" indicates its intact construction associated with CF respectively. Each microtubule of QM is winding CF around it. This is perhaps the first description of the spatial architecture of QM which enables us to estimate its functional role. Scale bar in Fig. 1 and 2 reveals 200nm in length.

Fig. 3

The photograph shows the image of a section cut transversally against the long axis of an extra-cellular flagellum.

The route of SM in the FC is visible in this section. If you follow the route of CF, you will confirm how it may take the pathway between the PBC and the FC. (See the red, blue, green, reddish-pink, yellow, and pink colored arrowheads that reveal the routes of SM). The red arrow drawn at the attachment site of the flagellum to the parasite body shows a "protofilament palisade" (See the red arrow in this figure) which is exposed after the covered hydrophobic CF was cut and removed with a microtome knife. A protofilament palisade is known to be a main constructive component of SM so far. In this site, SM getting out of the PBC is invading through the parasite body membrane (PBM) and the flagellar membrane (FM). It links to the paraflagellar-rod (PFR) (See the blue and green arrowheads at the lower part of this figure) or axonemal fibrils (AF) (pink arrowhead at the upper part of the figure). The direction of the reddish-pink cannot be confirmed because of the disappearance of CF on the way. From various points on the circumference of FM circle in this cross thin-section of the extra-cellular flagellum, SM originating from the PBC invades to the FC and links to a peripheral doublet fibrils (PDF) and to a central doublet fibrils (CDF) and again to the PDF, and then appears to get out of the FM and back to the PBC. Scale bar indicates 200nm in length.

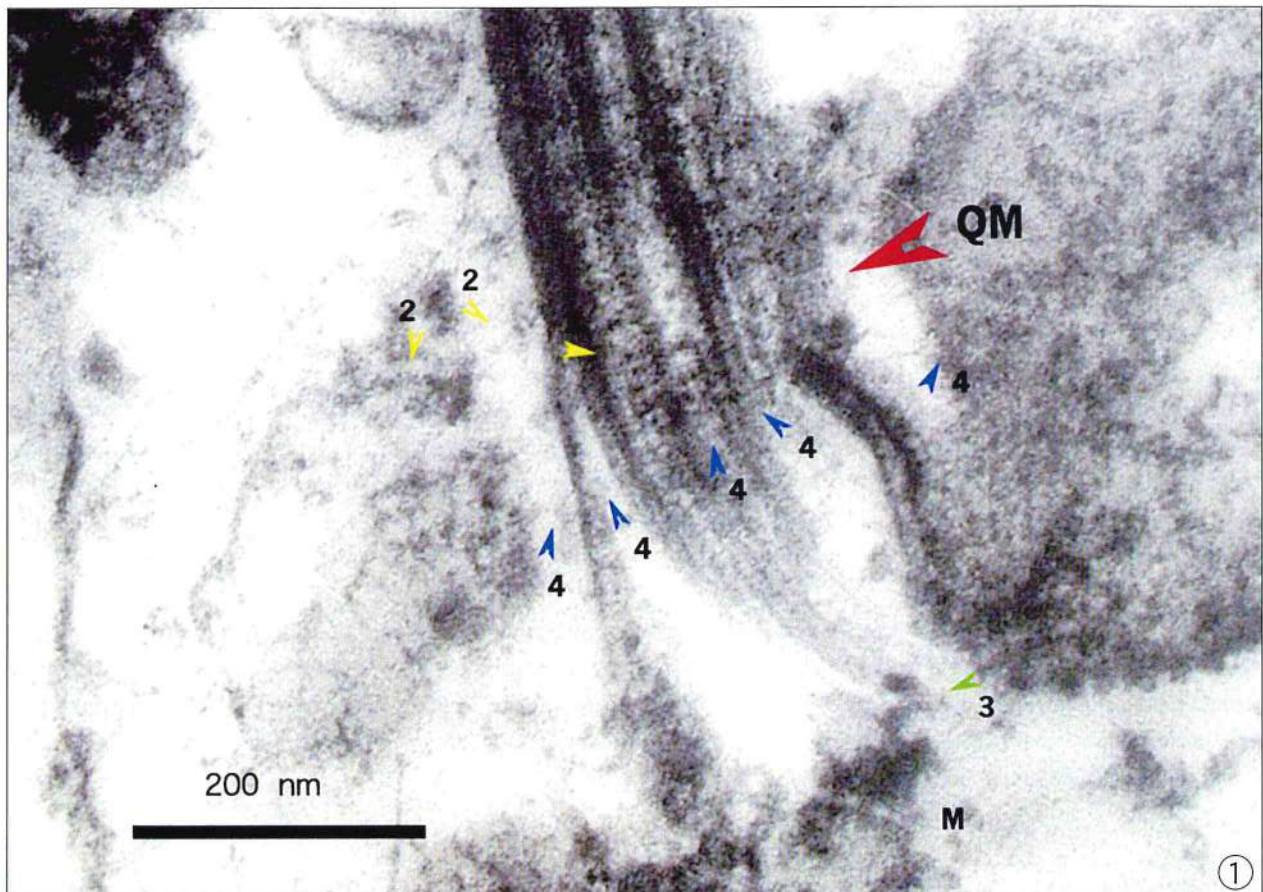
Fig. 4

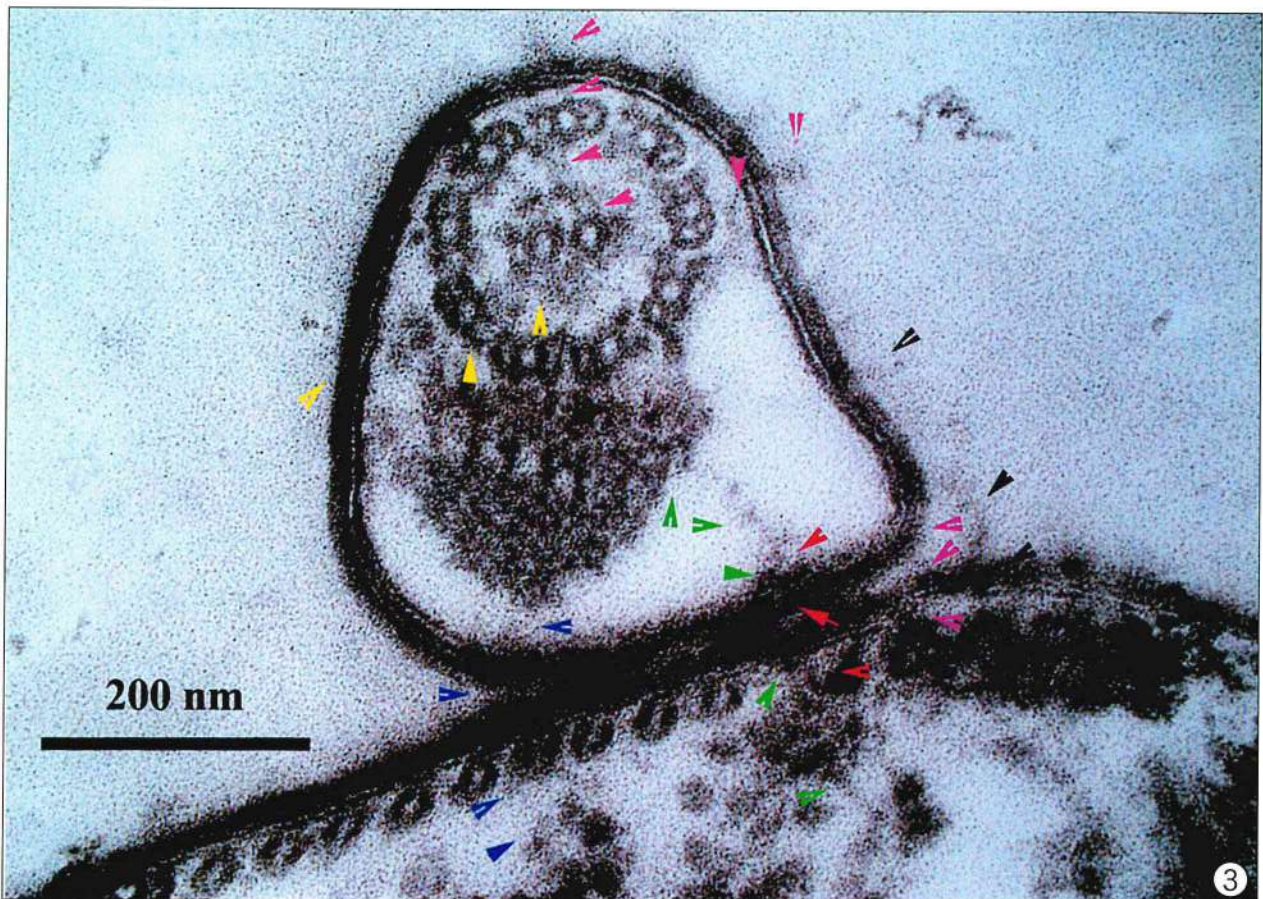
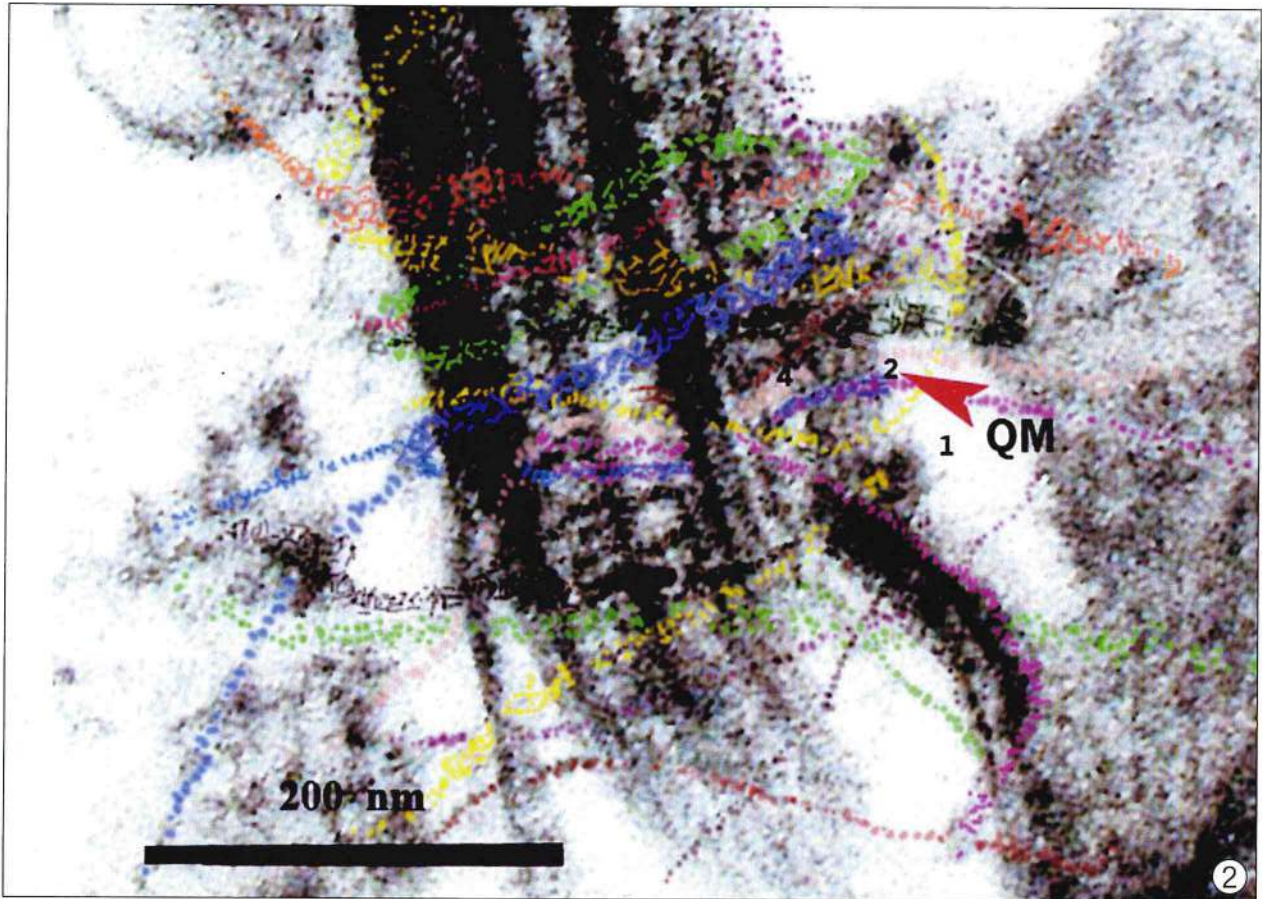
A part of Fig. 3 was enlarged in order to expose and define more clearly each route of SM covered by the CF with hydrophobic property. This photograph will be compared with Fig. 5. Scale bar indicates 200nm in length.

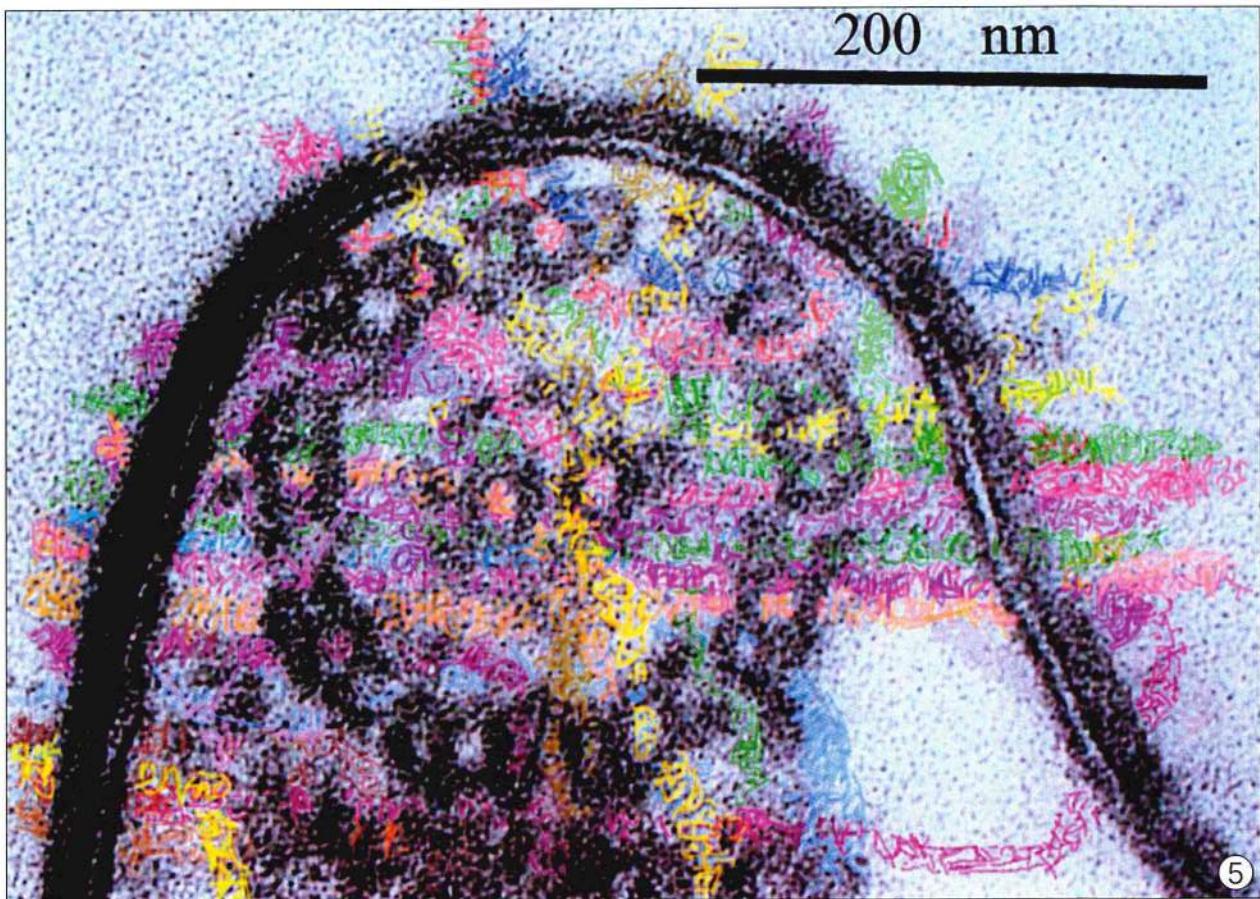
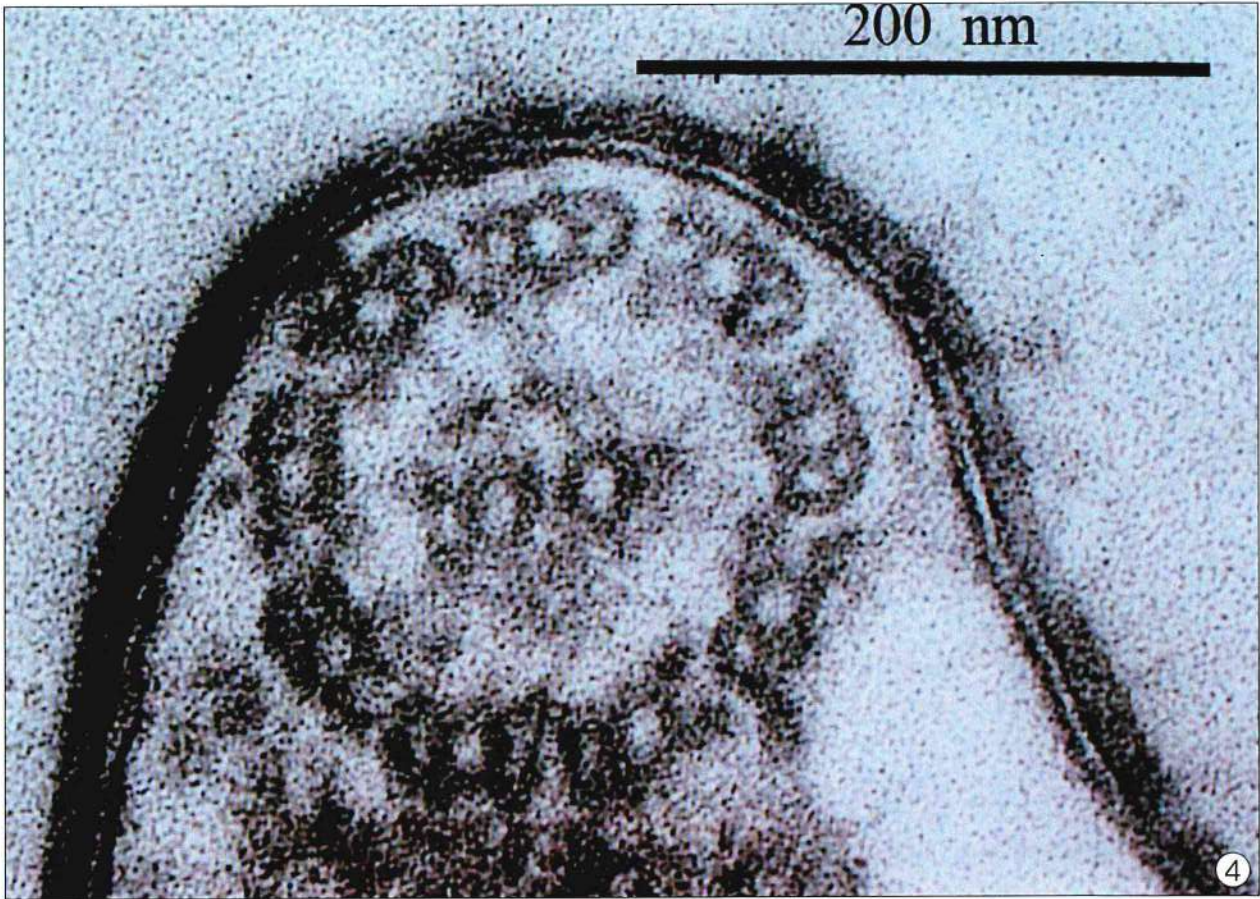
Fig. 5

Each route of SM is visible in the transverse section. All the routes are colored in different colors. You may see each path of SM in this transverse section of the flagellum, as well as in the longitudinal section of the flagellum shown in Fig. 1 and 2, although the flagellum in this section seems to be a "neck-collar flagellum" from the exit of the RW.

Compare this figure with Fig. 4 to confirm the accurate routes of SM in the FC. Scale bar indicates 200nm in length.







短 報

山口県で発生した高病原性鳥インフルエンザの現地防疫措置

山西富野¹⁾・松本容二²⁾・國吉佐知子²⁾・松田普二²⁾

[受付 : 2005年11月15日]

NOTE

PREVENTIVE MEASURES AGAINST HIGH-PATHOGENICITY AVIAN INFLUENZA VIRUS IN YAMAGUCHI PREFECTURE

Tomino YAMANISHI¹⁾, Youji MATSUMOTO²⁾, Sachiko KUNIYOSHI²⁾, Shinji MATSUDA²⁾

1) *Yamaguchi-ken Mine Agricultural and Forestry Office 3449-5 Higashibun,
Ohmine-cho, Mine-shi, Yamaguchi-ken, 759-2212 Japan*

2) *Yamaguchi-ken Chubu Livestock Hygiene Service Center 671-5 Kagawa,
Yamaguchi-shi, Yamaguchi-ken, 754-0997 Japan*

[Received for publication : November 15, 2005]

We were informed by a layer poultry farm in the central part of Yamaguchi Prefecture that they had discovered some dead chickens. In seven open poultry houses they raise about 35,000 chickens. The reported number of the dead chickens was small in the beginning, but soon it increased dramatically. As the result of development egg inoculation it was confirmed that they died of High Pathogen Avian Influenza (HPAI).

In order to prevent further infection, measures were taken immediately. We gave special attention to the issues, such as 'systematization and the establishment of a line of command,' 'higher efficiency of destroying chickens,' and 'improvement of dropping disposal.' The killed chickens were buried. Thanks to the early report, the correct diagnosis, and the timely measures, the epidemic was contained and the whole problem was solved in ten days.

In the future it will be necessary to strengthen preventive measures to protect humans and to define final and large-scale disposal methods.

山口県中部にある採卵養鶏場(開放7鶏舎・約3.5万羽飼養)から、死亡鶏の通報が入った。通報当初、死亡羽数は少なかったが、その後、急激に増加し、発育鶏卵接種により高病原性鳥インフルエンザ(HPAI)と確認された。そのため、現地防疫措置を開始し、「組織化と命令系統の確立」、「殺処分方法の効率化」、「糞処理の効率化」などの問題点を改善し、埋却作業を完了した。早期の通報や的確な診断と現地防疫措置により、感染拡大の防止をすることが出来、全行程を10日間で完了した。今後、さらなる人への感染防御強化と大規模な最終処理方法の明確化が必要となる。

諸 言

高病原性鳥インフルエンザ(HPAI)は、家きん類に高致死性の病原性を示すウイルス感染症であり、近年、東南アジアでも香港(1997年)を始め、各地でH

5N1によるHPAIの発生が確認されている。しかし、日本では1925年のH7N7による発生以来報告はなかった。今回、79年ぶりに日本でH5N1によるHPAIが山口県、大分県、京都府で発生し、初発例である本県の現地防疫措置について報告する。

1) 現 山口県美祢農林事務所畜産部

2) 山口県中部家畜保健衛生所

1 農場の概要

発生農場は、山口県阿東町の採卵養鶏場で、飼養羽数は34,640羽であった。農場は山に囲まれ周囲に養鶏場はなく、農場前には町道が通っていた (Fig. 1)。鶏舎は7鶏舎 (うち1鶏舎は空舎) あり、構造は、鉄骨、スレート屋根の開放1段ケージ (1号鶏舎のみ2段) であった。ワクチンは、ニューカッスル病 (ND)、伝染性気管支炎 (IB)、伝染性ファブリキウス嚢病 (IBD)、鶏脳脊髄炎 (AE)、伝染性コリーザ (IC) が接種されていた。

2 発生の概要

2003年12月29日に農場の管理獣医師より家畜保健衛生所 (家保) へ通報があり、翌日、家保が農場へ立ち入り病性鑑定を実施した。報告当初の発生鶏舎における死亡割合は、0.13%/日 (8羽) と低かったが、10日後には約10%/日 (573羽) にまで上昇し、防疫措置開始前日には14.5%/日 (859羽) となった (Fig. 2)。臨床症状は、主として嗜眠、沈鬱、翼下垂、元気消失を示し (Fig. 3)、卵殻異常の割合が増加した (Fig. 4)。その他、一部の鶏に眼球の充血、口腔内の粘液の貯留、眼瞼浮腫、下痢、脱肛が見られた。

発育鶏卵接種により赤血球凝集性を有するウイルスを分離したが、NDの抗血清で抑制されなかった。そのため、HPAIを疑い動物衛生研究所へ送付したところ、2004年1月12日にH5亜型、翌日にH5H1亜型のHPAIと確認された。

3 現地防疫措置の概要

HPAIと確認された1月12日より現地防疫措置を開始した。作業手順は、国が平成15年9月17日制定したHPAI防疫マニュアルに基づき、消毒、殺処分、埋却、最終消毒の順に行った。しかし、マニュアルにはそれぞれの手法についての詳細な記述が無く、防疫措置を行う中で、「組織化と命令系統の確立」、「殺処分作業の効率化」、「糞処理作業の効率化」に課題が生じたため、適宜、改善策を講じた。

1) 組織化と命令系統の確立

現地対策本部は、現地対策本部長を頭に総務班 (総括、資材調達)、現地作業班 (殺処分、消毒等)、検診・調査班 (周辺農場の立入調査)、移動規制班 (移動制限区域内における家きん、卵の等の移動を規制)、検査班 (清浄性の確認のための検査) の5つの組織に分けた。当初、現地作業班は、家保の獣医師による家畜防疫員が占めていたが、防疫措置の早期終了を図るため、途中から家保以外の県職員等による作業員を急激

に増員した (Fig. 5)。しかし、経験不足の作業員が命令系統の麻痺が生じ、作業効率は予想より向上しなかった。そこで、家畜防疫員を班長とし、5名程度の班員からなる班に再編成した (Fig. 6)。これにより組織化された作業が可能となり、作業効率が高まった。

2) 殺処分作業の効率化

開始当初は、4人一班で、2人が鶏をケージより取り出し、透明ビニル袋を内側に配したポリバケツに投入し、残り2人が炭酸ガスの注入作業を行った。ガスボンベは30kgのものにレギュレーターを装着したものをを用いた。鶏舎内の通路をポリバケツとガスボンベを台車に乗せ移動しながら殺処分を行った (Fig. 7)。しかし、この方式では通路が狭いため、人が重なり作業効率が悪く、また通路付近に置いた処理ビニル袋が、通路を遮断する結果となり、台車移動ができず、台車の機能を成さない状態が見られた。さらに、資材の面でも、ガスボンベを始めとする道具の在庫に限りがあり、増員による作業効率化のメリットが生かされず、非効率な作業が作業員の士気の低下を招き、悪循環により作業効率を低下させる結果となった。

そこで、班員の役割分担や作業動線を再考し、殺処分方法の改善を図った。まず、台車とポリバケツを廃し、通路は鶏を運ぶ作業員のみ限定し、ガスボンベと鶏殺処分用ビニルを鶏舎の入口付近に集中設置した。次に作業動線の終着点を壁際とし、狭い通路を上手に利用するため、循環を意識し、流れを止めない作業を心掛けた。鶏を運ぶ作業員は、各ケージから鶏を取り出し、手にしたまま鶏舎端のボンベまで移動し、設置した二重のビニル袋 (内側青色、外側黒色) に鶏を投入した。ビニル保定とガス注入の作業員は、ビニル袋に12羽程度入ったらガスを注入し、ビニル袋の口を結紮した。そして、ビニル保定作業をする作業員が、鶏投入の合間を見て、処理したビニル袋を入口周辺の壁側に積み重ねた。ビニル袋の内側は鶏の爪でも破れ難い青色ビニル袋を使用し、外側を黒色ビニル袋を使用する事で外光を遮り鶏の沈静化に成功した。

その結果、13・14日の処理羽数から計算すると、更に4～5日を要すると考えられていた処理作業が、14日の午後から作業様式を変更し、15日には4倍の作業量を消化し、殺処分を完了した (Fig. 8, 9)。

3) 糞処理作業の効率化

1号鶏舎は、頑丈な入口と柱があり、通路も狭いため、小型のスクレーパー1台による対応を余儀なくされた。しかし、作業機械のみに頼った搬出作業では、時間を要する上、糞の取り残しも多く、結果、人力に頼らざるを得なかった。そのような状況の中、殺処分や死鶏処理はほぼ終了し、人力的な余裕もあったことから、人力による作業により処理を強行した。1m辺

りを処理するのに2人かりで30分を要した (Fig. 10) が、手作業による処理は、半日程度で終わることができた。

その他の鶏舎はケージが針金で吊されているだけで、柱や入り口による障害はなかったが、1号鶏舎同様に通路が狭く、そのままでは作業機械が入らず糞の搬出が困難であったため、ケージ撤去が必要であった。ケージの撤去の問題点として、経営者が経営の早期再開を希望していた他、撤去後の放置場所と屋外に出すことによる感染拡大の危険性等の課題があった。しかし、経営者の説得により、ケージを撤去が可能となり、未使用であった堆肥舎へ運び込むと同時に (Fig. 11)、念入りに消毒し感染拡大の防止に努めた。ケージ撤去後、障害の無くなった長方形の鶏舎にある鶏糞をマルチローダーで運び出し、フレコンバックに詰めていった (Fig. 12)。

4) 埋却作業の実施状況

計画当初は、埋却場所・環境条件・作業方法に関して問題点が挙げられた。埋却場所については、地域住

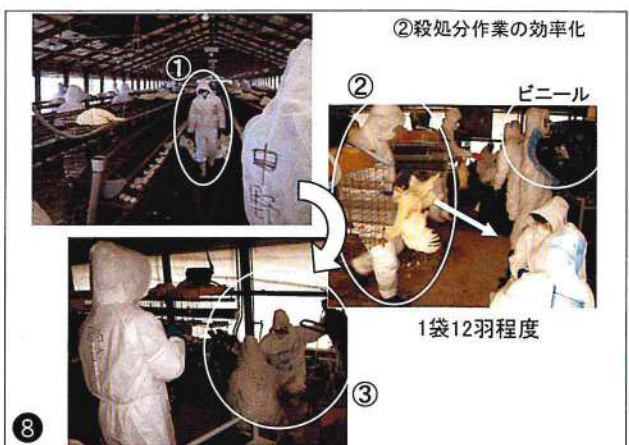
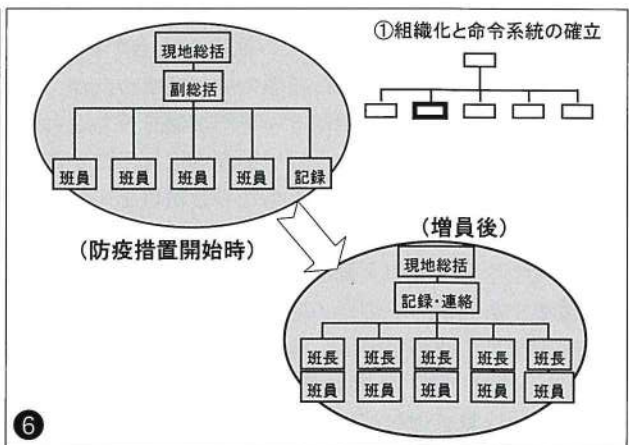
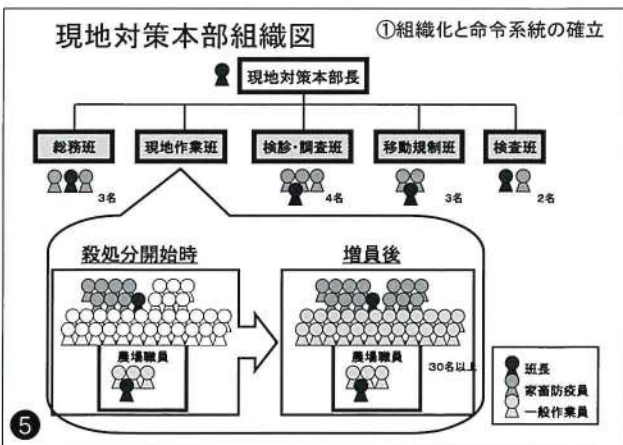
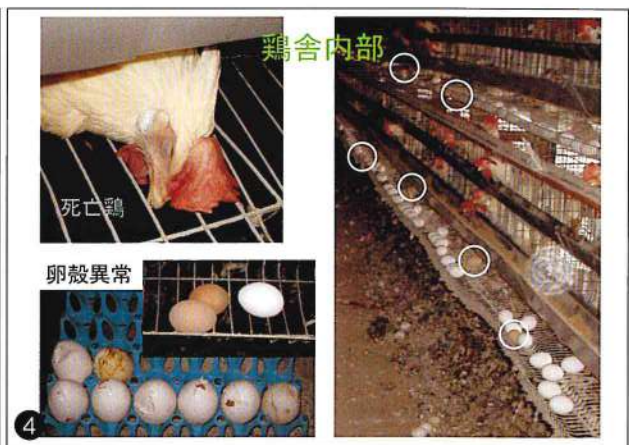
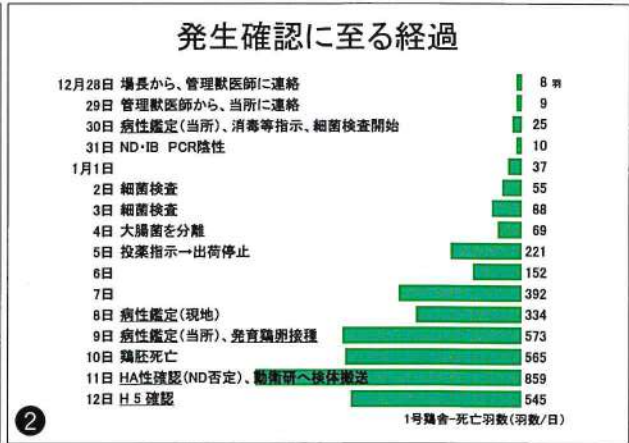
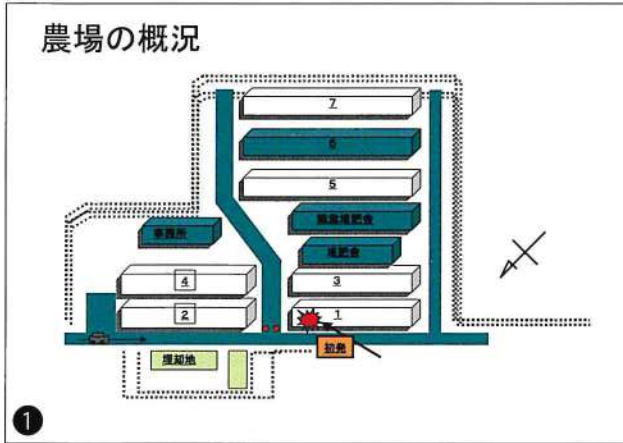
民への詳細な説明会を実施し、町の助力もあり、町有地の山林に決定した。地域住民への確約として、地下水汚染を可能な限り防ぐ対策を講じることで了解を得た。さらに土木工事の専門技術者の助言を取り入れ、土砂崩れ防止のために山水を側溝で逸らし、埋却穴の側壁に傾斜を付けることで、地盤が緩く角度のある危険で困難な作業であるにも関わらず、早期に埋却溝が完成した。

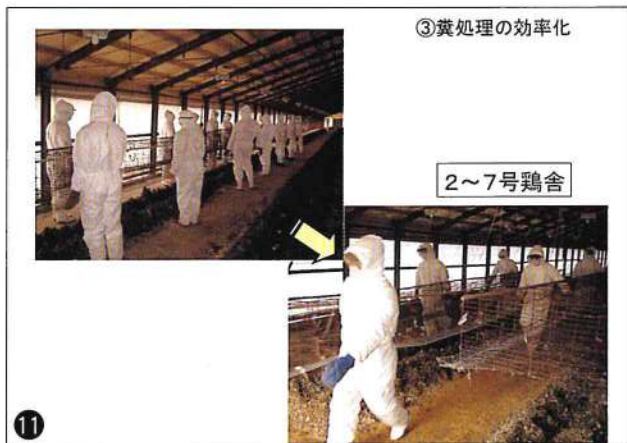
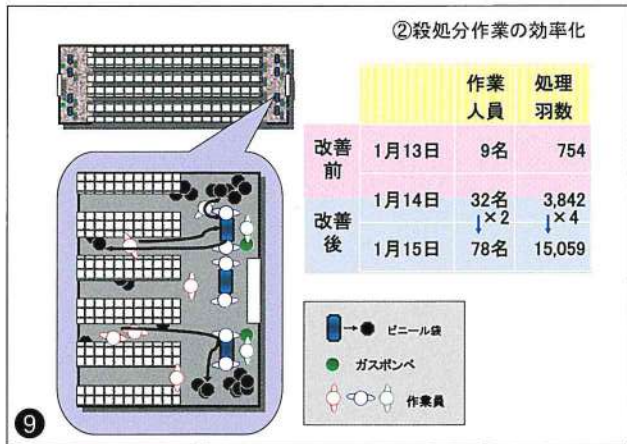
作業手順は、埋却溝の掘削、生石灰の散布、その上に土砂を被せ、数十人掛かりで一枚張りの不浸透性のビニルシートを張った (Fig. 13)。崩れる恐れのある埋却溝の側壁は、専門的に計算された角度で掘削され、生石灰の散布により底面を固い地盤にした。また地下水汚染を防止するため、ビニルシートの劣化には注意を払い、生石灰との接触を避けるように十分な土砂を被せた。鶏や卵、たい肥を入れたフレコンバックは、各鶏舎から埋却溝まで大型重機でパケツリレーの要領で運搬した (Fig. 14)。運搬後は、その上にシートを折り重ねるように被せ、消石灰を散布し覆土した。

4 まとめ

79年ぶりに日本で発生したHPAIであったが、早期の通報であったため、死亡率、臨床症状等から当初はHPAIを想定していなかった。現にマニュアルに定められている様な臨床症状 (呼吸器症状、出血斑やチアノーゼ、産卵率の低下) は認めず、死亡率が一定 (10%) 以上に達したのは、通報から10日後であった。しかし、的確に診断し現地防疫措置を講じたため、感染の拡大を防止することができた。HPAIの現地防疫措置は、日本では過去に例がなく、マニュアルに沿って試行錯誤の中に始まったが、全行程を10日間で完了した。現地作業班の組織化と命令系統の確立では、家畜防疫員ではない専門知識を持ち合わせない作業員であっても、家畜防疫員を班長とし、的確な指示を与えることで作業を安全且つ効率的に行うことが可能となった。さらに殺処分作業を一連の流れを重視した作業動線に再編することで、1人当たり2倍以上の作業効率を得られ、作業期間も当初予定の半分で終わることができた。また、鶏糞はウイルスを大量に含み、感染源となるため、早急な対処を求められたが、ケージの撤去と人海戦術、大型作業機械の大量導入により、予定の半分の作業日数で完了した。なお、埋却作業では、埋却地の早期確保が重要であるが、そのためには、埋却地周辺の住民の理解、必要面積の土地の確保等問題が表面化した。

初発で講じた防疫措置は、後発の大分県や京都府の参考となり、その後、国の防疫指針作成への一助となった。しかし、HPAIは鶏への致死性が高く、人への感染性も示唆されており、作業従事者に対し更なる感染リスクの低減、効率的な糞処理並びに殺処分方法の検討及び大規模養鶏場で発生した場合の最終処理方法を明確にしておく必要もあると思われた。





症 例

犬の破折歯の治療を行った60症例

山岡佳代*・八村寿恵*・久山朋子*・廣川美菜子*・綱本昭輝*

〔受付：2005年11月25日〕

CLINICAL CASE

A SURVEY OF THE FRACTURED TEETH OF SIXTY CANINES AND THEIR TREATMENT

Kayo YAMAOKA, Hisae HACHIMURA, Tomoko KUYAMA, Minako HIROKAWA and Akiteru AMIMOTO

Amica Pet Clinic, Ube City, Yamaguchi Prefecture, 755-0023, Japan

〔Received for publication : November 25, 2005〕

In this survey of 79 fractured permanent teeth of 60 dogs, we studied the breed, age, sex, incidence of fracture by tooth type, motive for finding out fracture, the cause(s) of fracture, the extent of injury, time between fracture and treatment, treatment procedure, and the post-treatment course.

The maxillary fourth premolar and the canine tooth had the highest and the second highest incidence of fracture, respectively. Pulp exposure was found in over half of the fractured teeth. Except traffic accidents, most causes of tooth fracture were not known. Half of the owners did not notice the fractures. The fact suggests that further education of home oral care and the performance of thorough in-clinic oral examination are necessary.

Some cases of restoration failure and refracture were found after the initial treatment, as well as the development of apical lesions several years after pulpotomy. These indicate the importance of owner education about living environment, regular checkups and radiographic follow-ups.

永久歯の破折がみられた犬60頭79歯で、犬種、年齢、性別、破折の部位と数、破折に気付いた理由、破折原因、受傷状態、破折から治療までの時間、処置方法、処置後の経過について調査した。破折部位は上顎第4前臼歯、犬歯の順で多く、露髄しているものが半数以上であった。原因は交通事故以外では不明なものが多く、飼い主が破折に気付いていない症例も約半数あったため、家庭での口腔ケアの指導や診察時の口腔内検査をより徹底する必要性があると思われた。また、処置後に修復材の脱落や再破折が見られた症例、生活歯髄切断法を実施してから数年後に根尖病巣の形成がみられた症例等があったため、処置後は定期的な診察および経時的なレントゲン検査を実施する重要性を再認識した。

はじめに

犬の歯の破折は、事故、硬いものを噛む習癖、硬いおやつや給餌などが原因で生じるとされており、日常診療でも時折遭遇する疾患である。受傷後、すぐに来院されるケースから、長い間経過し、根尖病巣や眼窩下膿瘍などを併発してはじめて気付いて来院されるケースなど様々であるため、処置方法も多岐にわたる。今

回我々は当院で犬の破折歯に対する治療を行った症例について調査を行った。

症例および方法

永久歯の破折を主訴に来院し治療を行ったもの、および診察中または何らかの歯科処置を実施した時に永久歯の破折が認められ当院で治療を行ったもの、合計

* アミカペットクリニック (〒755-0023 山口県宇部市恩田町3-2-3)

60頭79歯について(1)犬種,(2)年齢,(3)性別,(4)破折の部位と数,(5)破折に気付いた理由,(6)破折原因,(7)破折から治療までの期間,(8)受傷状態,(9)処置方法,(10)処置後の経過について調査した。

結 果

(1)犬種:ラブラドルレトリバー,ミニチュアダックスフンドが各7頭,ウェルシュコーギー,中~大型の雑種が各6頭,ゴールドンレトリバー,柴が各5頭の順に多く,全体では小型犬が20頭,中~大型犬が40頭であった。

(2)年齢:1歳齢が5頭,2歳齢が13頭,3歳齢が8頭,4歳齢が7頭,5歳齢が6頭,6歳齢が5頭,7歳齢が6頭,8歳齢が4頭,9歳齢が2頭,11歳齢が2頭,12歳齢が1頭,14歳齢が1頭であった(Fig.1)。

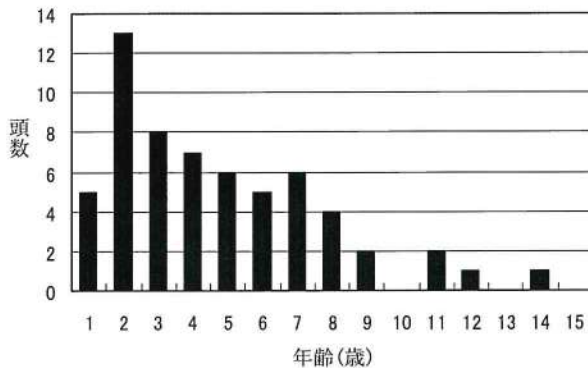


Fig.1 年齢

(3)性別:雄が26頭,去勢雄が5頭,雌が20頭,避妊雌が9頭であった。

(4)破折部位と数:上顎第4前臼歯が37歯(47%),犬歯が25歯(32%)下顎第1後臼歯が8歯(10%),切歯が7歯(9%),上顎第2前臼歯が1歯(1%),下顎第2前臼歯が1歯(1%)であった(Fig.2)。1頭あたりの破折数では1歯のみの破折が44頭,2歯が14頭,3歯が1頭,4歯が1頭であった。破折が1歯のみであった症例の破折部位は上顎第4前臼歯が19頭,犬歯が18頭,切歯が3頭,下顎第1後臼歯が2頭,上顎第2前臼歯が1頭,下顎第2前臼歯が1頭であった。2歯の破折は左右上顎第4前臼歯が8頭,左右犬歯が2頭,左右下顎第4前臼歯が2頭,上顎第4前臼歯と下顎第1後臼歯が2頭であった。3歯以上の破折は犬歯とその周辺の切歯であった(Fig.3)。

(5)破折に気付いた理由:飼主が折れるのを見た,あるいは外観で折れているのに気付いたものが23頭,出血や歯肉の異常に気付いたものが6頭,採食時の疼痛などの症状に気付いたものが3頭と,飼主が気付いたのは60頭中32頭(53%)であった。獣医師が気付い

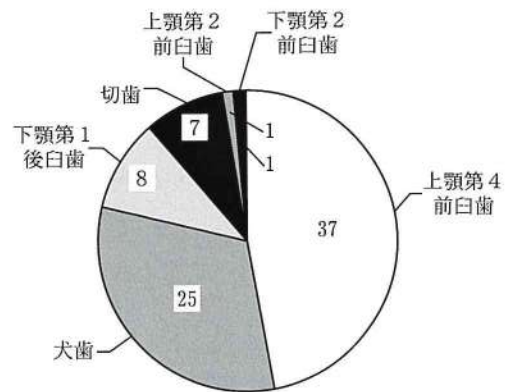


Fig.2 破折部位

たのは診察時が6頭,何らかの歯科処理中が17頭と,あわせて23頭(38%)であった。また紹介などのため不明なものが5頭あった。

(6)破折原因:交通事故が6頭で,その他に破折の原因がはっきりと分かっているものが4頭あり,鍵,ケージ,ガム,靴を咬んだことが原因であった。これら以外のものでは硬いガムやおやつ(給餌や,いろいろなものを咬む癖がある症例も多かったが原因の特定はできなかった。

(7)破折から治療までの期間:破折時期がはっきりしている10頭では1日後に処置したものが2頭,3日後が1頭,1週間以内が3頭,2週間以内が1頭,3週間以内が2頭,1カ月以内が1頭であった。

(8)受傷状態:露髄がなかったものが20歯(25%),露髄し探針検査で出血が見られるものが44歯(56%),歯髄壊死をおこしていたものが7歯(9%),根尖病巣の形成がみられたものが8歯(10%)であった(Fig.4)。

(9)処置方法:表面を平滑にし,フッ素を塗布したものが12歯(15%),歯冠を成形し修復材を使用したものが8歯(10%),歯髄を一部除去し直接覆髄を実施した生活歯髄切断法が31歯(39%),抜髄根幹充填法が11歯(14%),抜歯が17歯(22%)であった。受傷状態別に見ると,露髄がなかった20歯では破折端を平滑にし,フッ素を塗布したものが12歯,歯冠の成形修復が8歯であった。露髄の44歯では生活歯髄切断法が31歯,抜髄法が4歯,抜歯が9頭であった。歯髄壊死の7歯では抜髄法が3歯,抜歯が4歯であった。根尖病巣が見られた8歯では抜髄法が4歯,抜歯が4歯であった(Fig.5)。

(10)処置後の経過:修復剤の一部脱落が見られたものが9歯あり,部位は上顎第4前臼歯が5歯,犬歯が3歯,下顎第1後臼歯が1歯,初回の処置法は成形修復が3歯,生活歯髄切断法が4歯,抜髄法が2歯,処置から脱落までの期間は1カ月~2年であった。また,再破折をおこしたものが1歯あり,上顎第4前臼歯の抜髄処置後1年半でフリスビーにより再破折をおこし,

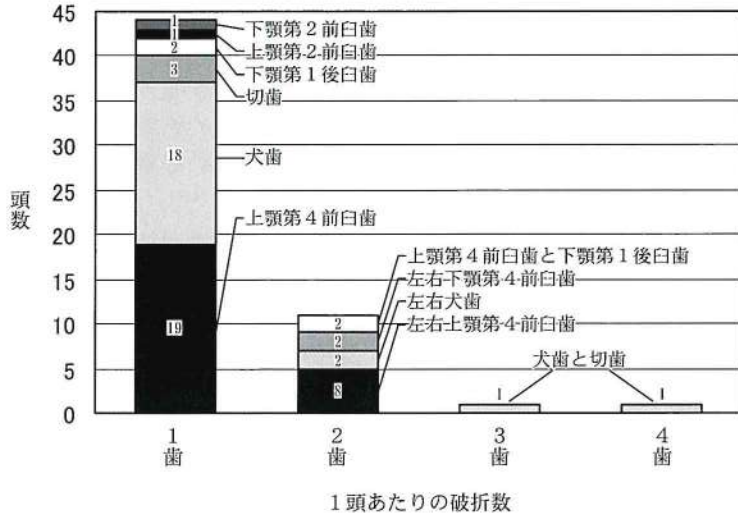


Fig. 3 1頭あたりの破折数と破折部位

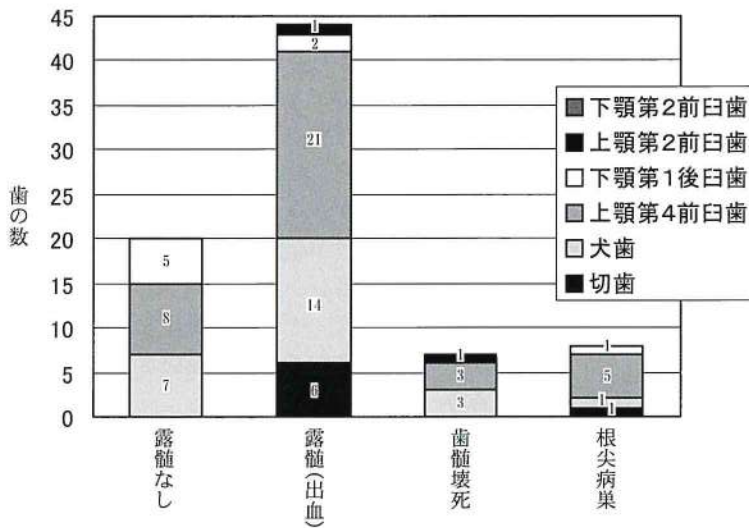


Fig. 4 破折部位と破折歯の受傷状態

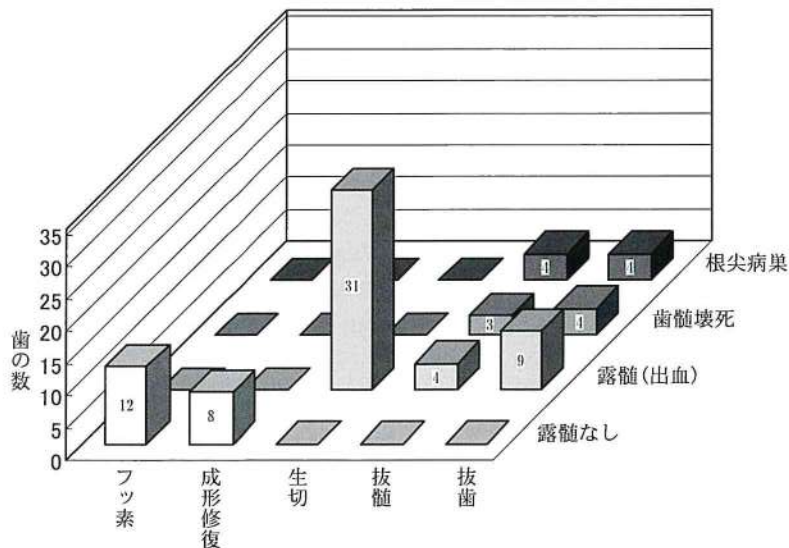


Fig. 5 受傷状態と治療法

破折端が歯根にかかっていたため抜歯を行った。

また、初回処置後に当院でレントゲン検査を実施できた18歯のうち根尖病巣の形成がみられたものが3歯あった。これらはいずれも上顎第4前臼歯の破折に生活歯髄切断法を実施した症例で、1例は3年7カ月後に眼窩下膿瘍をおこし抜歯を行った。2例は3年後、3年1カ月後にレントゲン検査で根尖病巣がみられたため抜歯を行い、抜歯処置後は根尖病巣は縮小しその後は良好に経過している。

考 察

今回の調査では犬種は多種多様にわたり、性別差はなかった。破折部位は佐久間らが犬の永久歯破折77例で調べているのと同様に上顎第4前臼歯、犬歯の順に多く見られた⁸⁾。犬の歯の破折は一般的に事故以外では、硬く厚みのあるものを裂肉歯（上顎第4前臼歯と下顎第1後臼歯）で咬むことにより上顎歯の咬合圧が外に、下顎歯は内に逃げ、歯冠がはがれるように割れる平板破折をおこしやすく、この破折は上顎第4前臼歯に頻発するとされている^{3,8)}。今回の調査では破折原因の特定ができなかった症例も多かったが、2歯の破折が見られた症例では左上上顎第4前臼歯の破折が多く見られたこと、硬いものを咬む習癖や硬いおやつなど給餌されている症例も多くみられたことから、このような生活習慣が関与しているのではないかと思われる。

また、飼い主が破折に気付かない症例が約半数あり、

気付いた症例でもいつ破折したのかは分からないものが大部分であった。破折歯に対する処置として歯髄を生活している状態で保存する生活歯髄切断法は受傷後できるだけ早く処置を行うことが必要であり、時間がたっているものや高齢のものでは成功率が低くなるとされている^{1,3,5,8)}。また露髄歯は歯髄の感染により歯髄壊死や根尖病巣に発展する可能性があるため⁴⁾、破折歯はできるだけ早く発見し、治療することが大切であり、そのためには家庭での口腔ケアの指導および診察時に歯の状態を観察する重要性がますます高まるものと思われる。

処置後、修復材の脱落や再破折が見られた症例では、硬いものを再度咬んだことが主な原因となったが、修復部位が力学的に取れやすい部位であったものもみられた。そのため、処置時における適切な技術と家庭での生活環境の改善が大切であると思われる。

治療法として生活歯髄切断法を適応した症例で処置から数年後に根尖病巣の形成が見られたものがあつた。これらはすべて上顎第4前臼歯に生じており、この部位でみられた理由としては歯冠部歯髄の形態の違いや3根歯であることなどが要因になると思われる。また根尖病巣の見られた3例中2例は外見上・臨床上是異常が見られずレントゲン検査ではじめて根尖病巣の形成が確認された。このため処置後は定期的な検診およびレントゲン検査^{2,7)}が必要であり術後1カ月、6カ月、その後も数年おきのレントゲン検査が特に重要であることを再認識させられた。

参 考 文 献

- 1) Crossley, D.A., Penman, S. (奥田綾子訳) : 小動物の歯科診療マニュアル ; 163~195, ファームプレス, 東京, 2003.
- 2) DeForge, D.H., Colmery B.H. (奥田綾子訳) : 獣医歯科X線アトラス : 35~58, 学窓社, 東京, 2003.
- 3) Dupont, G.: 獣医歯科保存——保存修復・歯内, 獣医歯科矯正学の基礎, 日本小動物歯科研究会5周年記念国際セミナー抄録 : 1998.
- 4) Gorrel, C., Hennet, P., Verhaert, L. (藤田桂一訳) : 犬と猫の臨床歯科ハンドブック : 71~73, ファームプレス, 東京, 2003.
- 5) Holmstrom, S.E (奥田綾子訳) : The Veterinary Clinics of North America 獣医臨床シリーズ2000年版 犬の歯科学, Vol.28~5 : 151~152, 学窓社, 東京, 2000.
- 6) Lopes, F.M., Gioso, M.A., Ferro, D.G., Leon-Roman, M.A., Venturini, M.A.F.A., Correa, H.L. : Oral Fractures in Dogs of Brazil-A Retrospective Study. *J. Vet. Dent.*, 22 (2) : 86~90. 2005.
- 7) Mulligan, T.W., Aller M.S., Williams C.A (林一彦監訳) : X線アトラス 犬と猫の歯科学 : 197~212, インターズー, 東京, 2000.
- 8) 佐久間文子 金山智子 奥田綾子 : 犬と猫の歯冠破折の発生と原因 獣医畜産新報, Vol.57 No.5 : 365~369, 2004.

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は、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、2005年現在第44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（2005年12月）第535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（2005年12月）第32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

2005年12月25日印刷

第32号

No.32

2005年12月30日発行

2005年

2005

山口県獣医学会

学会事務局 山口県獣医師会館内

山口県山口市小郡下郷東蔵敷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. 32

DECEMBER

2005

CONTENTS

REVIEWS

The Spread and Resurgence of West Nile Virus Disease : Recent Developments in the Virology, Epidemiology, and Clinical Characteristics.

Chang - Kweng LIM and Ichiro KURANE 1 ~ 12

Declining Fertility in Today's Dairy Cows : Causes and Possible Solutions.

Toshihiko NAKAO 13 ~ 20

ORIGINAL ARTICLE

Revision of Spatial Architecture of the Flagellum of *Trypanosoma evansi* at the Proximal End Portion.

Takeo HIRUKI 21 ~ 30

NOTE

Preventive Measures against High-Pathogenicity Avian Influenza Virus in Yamaguchi Prefecture.

Tomino YAMANISHI, Youji MATSUMOTO, Sachiko KUNYOSHI and Shinji MATSUDA 31 ~ 36

CLINICAL CASE

A Survey of the Fractured Teeth of Sixty Canines and Their Treatment.

Kayo YAMAOKA, Hisae HACHIMURA, Tomoko KUYAMA, Minako HIROKAWA

and Akiteru AMIMOTO 37 ~ 40

ADDENDA

Rules of Contribution to the Official Journal. 41

Rule of the Association 42

Bylaw for the Arrangement of the Official Journal. 42

Outline of the Enterprises and the Publications (*colophon page*)