

ISSN 0388-9335

山口獣医学雑誌

第 34 号

2007年12月

山口県獣医学会

THE YAMAGUCHI JOURNAL OF VETERINARY MEDICINE

No. 34

December 2007

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 富永 潔
柳澤 郁成 山縣 宏*

(ABC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、等々を掲載する。

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 Kiyoshi TOMINAGA
Fuminori YANAGISAWA 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34号 2007年

The Yamaguchi Journal of Veterinary Medicine No.34 December 2007

目 次

総 説

- 最近の日本脳炎ウイルス感染症と動物における血清疫学調査
前田 健..... 1~14
- エキゾチックアニマルとワイルドアニマルの動物由来感染症
宇根有美..... 15~22

原 著

- ヒドロキシエチル・スターチを用いた犬赤血球の-80℃凍結保存法に関する研究 [英文]
田浦保穂・石井 淳・中市統三・板本和仁・谷 健二
金 喜 廷・杉本洋太・アデル モハメド セヤド アーメド
アルアクラ・岡村泰彦・隅田幸男..... 23~34
- ヒドロキシエチル・スターチを用いた犬赤血球の-80℃凍結保存法の保存時間による影響 [英文]
田浦保穂・宇野堅太・中市統三・板本和仁・谷 健二
金 喜 廷・杉本洋太・アデル モハメド セヤド アーメド
アルアクラ・田中秀平・隅田幸男..... 35~48
- Bartonella clarridgeae* のパルスフィールドゲル電気泳動法による分子疫学的解析
富田正章..... 49~52
- プロイラー筋胃びらんからのトリアデノウイルスの分離と山口県内の浸潤状況
柳澤郁成・中谷英嗣・大石大樹・日高秀次..... 53~60

短 報

- めん類製造施設における改善指導について
亀山光博・大橋めぐみ・小林浩幸・水津隆市..... 61~64

症 例

- 右上顎埋伏犬歯の外科的歯牙移動を行ったイヌの1症例
白石加南・八村寿恵・山岡佳代・久山朋子・鳥越賢太郎
加藤吉男・網本昭輝..... 65~70

附 録

- 投稿規定..... 71
- 山口県獣医師会学会規則..... 72
- 山口獣医学雑誌編集内規..... 72
- 会関係事業・刊行物 (奥付登載ページ)

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

総 説

最近の日本脳炎ウイルス感染症と動物における血清疫学調査

前 田 健*

〔受付：2007年10月25日〕

REVIEW

RECENT JAPANESE ENCEPHALITIS VIRUS INFECTION AND THE SERO-EPIDEMIOLOGY IN ANIMALS

Ken MAEDA

Laboratory of Veterinary Microbiology, Faculty of Agriculture, Yamaguchi

University, 1677-1 Yoshida, Yamaguchi 753-8515

〔Received for publication : October 25, 2007〕

Japanese encephalitis virus (JEV) infects many animal species, including humans, horses, pigs, and birds. As JEV-infected pigs and birds become viremia that makes mosquitoes infected, they are considered to be amplifiers of JEV. JEV-infected mosquitoes infect horses, humans, and others with JEV. But JEV infection in them is generally inapparent, and occasionally causes encephalitis to humans and horses without viremia. In recent years annual JEV cases in humans are less than ten, and in horses very rare, because they are inoculated with JEV vaccine. This review focuses on recent JEV infection and sero-epidemiology of JEV infection in animals, including humans, livestock, companion animals, and wildlife.

1. はじめに

日本脳炎ウイルス (Japanese encephalitis virus: JEV) は1950年代に猛威をふるい、ヒトやウマに致死的な脳炎症状を引き起こしてきた。その後、ワクチンの普及、近代化などに伴い、発生数は激減した。最近10年では、ヒトで年間数名の患者、ウマにおいてはほとんど発生がみられなくなっている。しかし、毎年夏季に実施しているブタでの流行予測調査では、西日本を中心に日本脳炎感染が広がっていることが示されている。更に、東南アジアを中心に世界では50,000人近くの患者と10,000人以上の死者が出ており、依然としてJEVは脅威となっている。このような状況下で、2005年には、ワクチン接種による重度の副作用が認められたため、ヒトへのワクチンの積極的推奨が取り止められた。ワクチン接種は必要ないのであろうか？

更に、都市部と農村部の隔離、地球温暖化や外来生物の移入などでJEVを取り巻く環境も大きく変化している。これまでの教科書的なブタとコガタアカイエカ (*Culex tritaeniorhynchus*) を中心としたJEVの感染環 (Fig. 1) では説明できない事象も生じている。JEVの疫学をもう一度見つめなおす時期にきていると考えている。

2. JEVの分類

JEVはフラビウイルス科 (family *Flaviviridae*)、フラビウイルス属 (genus *Flavivirus*) に属している¹⁾。

フラビウイルス属に属するウイルスとして、近年北米を中心に流行しているウエストナイルウイルス

* 山口大学農学部獣医微生物学教室・准教授 〒753-8515 山口市吉田1677-1

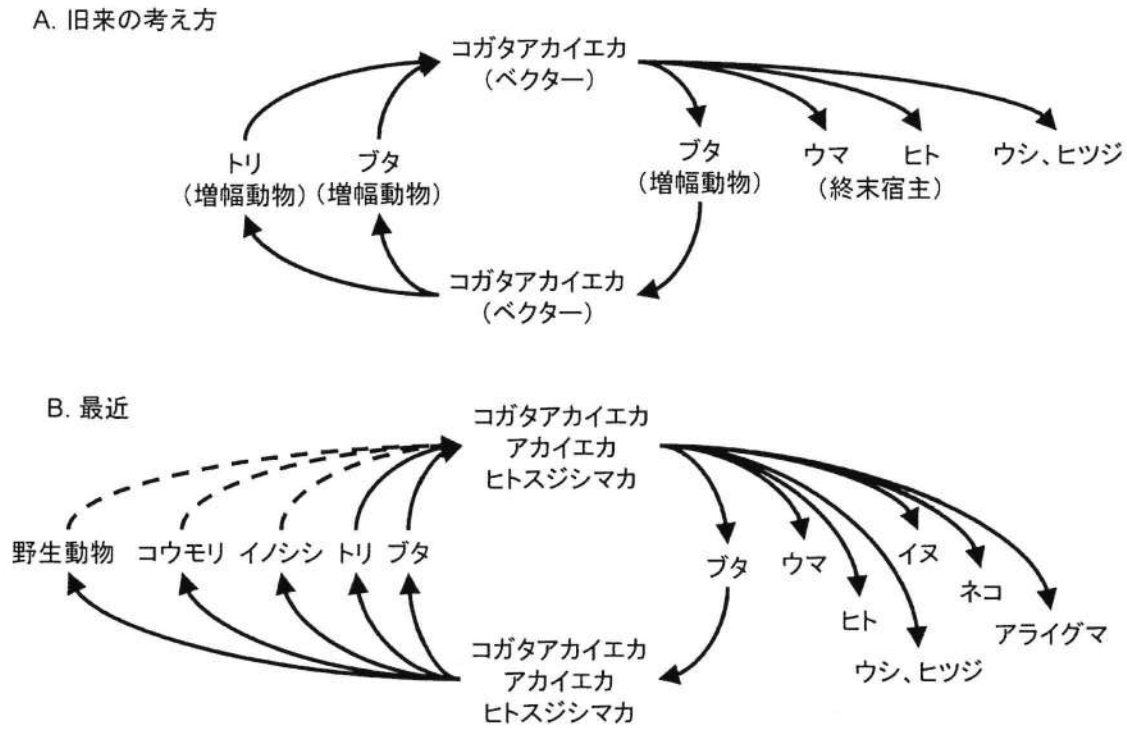


Fig. 1 日本脳炎ウイルス感染環の模式図

- A. 教科書的な感染環
 ブタが増幅動物、コガタアカイエカがベクター、ヒトやウマは終末宿主であるといわれている。トリも増幅動物として挙げられている。しかしそれ以外の動物についてはほとんど知られていなかった。
- B. 最近の見解による感染環
 調べられた限りでも多くの動物がJEVの感染環にかかわっていることがわかる。特にコガタアカイエカが中心と考えられていたが、それ以外の蚊属もベクターとなりうるようになってきた。このことは、ベクターの嗜好性も今後のJEVの感染環に影響を与えると考えられる。

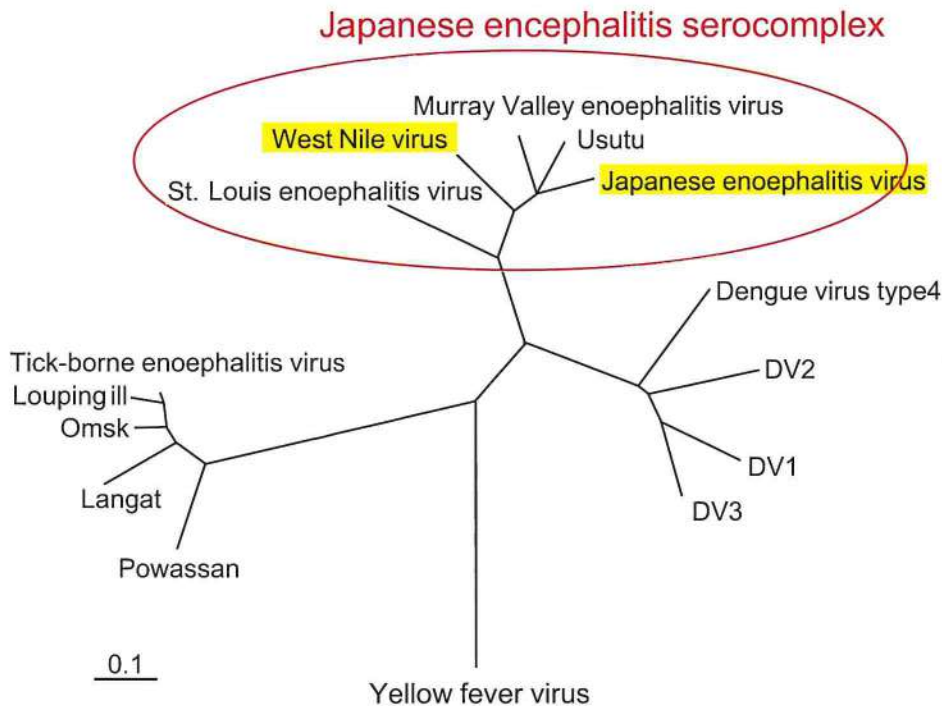


Fig. 2 日本脳炎ウイルスの系統樹

日本脳炎ウイルスは、ウエストナイルウイルスなどととも日本脳炎ウイルス血清群に属しており、これらの間では血清学的な交差反応が認められる。黄熱ウイルス (yellow fever virus) やデングウイルス (dengue virus), ダニ媒介性脳炎ウイルスなどが同じFlavivirus属に属しており、これらはすべて節足動物媒介ウイルスarbovirusである。

(West Nile virus: WNV), ヒトの病気としてアフリカや南米に蔓延している黄熱ウイルス (yellow fever virus), 東南アジアを中心に猛威をふるうデングウイルス (dengue virus), ダニにより媒介されるダニ脳炎ウイルス (tick-borne encephalitis virus) などが挙げられる (Fig. 2). フラビウイルス属のウイルスは節足動物媒介ウイルス (arthropod-borne virus) を略して arbovirus) である。JEVはWNVやセントルイス脳炎ウイルス (北米), Murray-Valley脳炎ウイルス (豪州), Kunjinウイルス (豪州) などとともに日本脳炎ウイルス血清群 (Japanese encephalitis virus

serocomplex) を形成しており, これらの間では抗原性や遺伝子などで交差反応が認められる。

JEVはその遺伝子型 I から V に分類されるが1990年以前には日本には遺伝子型 III のみが流行していた。1990年代に入り遺伝子型 I が侵入し, それ以降遺伝子型 I と III が流行しているといわれている。抗原性は株間において違いがあり, 同じ遺伝子型 III のウイルスでもワクチン株として用いられている中山一予研株と北京-1株では, 抗原性に違いがあるといわれている。しかし, 遺伝子型と抗原性については議論の余地があり, 今後の研究が待たれる。

3. JEVの構造

ウイルスはエンベロープを持つ直径40-50nmの球形粒子でその内部には一本鎖のプラス鎖RNAゲノムを有する。ゲノム遺伝子は約11kbであるが, その末端にはポリAを有さない。ゲノムRNAから蛋白は一つの巨大蛋白として翻訳されるが, 宿主由来あるいは自ら産生するタンパク分解酵素を利用して, 開裂するこ

とにより機能を有するようになる。主要な抗原性蛋白として, E (envelope) 蛋白が挙げられ, E蛋白に対する抗体はウイルスの感染を阻害できる。また, prM とE蛋白のみでウイルス様粒子 (virus-like particle) が形成されるため, 遺伝子を含まない安全なワクチンの候補として注目されている。

4. これまでの日本脳炎ウイルス感染症

(1) ヒト

JEVは蚊の刺咬部位より体内に侵入し, 侵入組織あるいは局所リンパ節で増殖後, 血流を介して脳に移行する。脳に達したウイルスは, 血液・脳関門を通過し, 神経細胞や周辺の細胞に感染する。大部分の感染者では血液・脳関門をウイルスが通過できずに, 脳に達することなく, 不顕性感染に終わると考えられている。

発症した場合, 発熱, 髄膜刺激症状, 脳炎症状を主症状とする。感染2週間前後の潜伏期間を経て発症し, 急激な発熱と頭痛を呈する。その後, 意識障害, 筋の強直などの脳炎症状を呈し, 発熱後一週間程度で死亡する場合もある。完全治癒率が1/3, 知能障害・運動異常等の後遺症が残る場合が1/3, 死亡率が1/3であるといわれていたが, 現在は, 死亡率はかなり低下している。しかし, 高齢者では依然として発症率が高い (Fig.4)。

日本脳炎に感染し発症するのは, 報告により異なっているが, 25~1,000人に1人といわれている。一般的には, 300人に1人であると考えられており, 残りは症状を呈しない不顕性感染に終わる。後述するが, 日本脳炎ウイルス感染症の典型的な症状である脳炎とは異なり, より軽症の無菌性髄膜炎からJEV遺伝子が検出されており, 実際の発症者はより多いものと考えられる。

(2) ウマ

潜伏期間は通常2~3週間であるといわれている。

39~40℃の発熱に続いて, 沈うつ, 興奮, 麻痺が生じる。その後, 食欲が回復して1~2週間程度で正常に復帰する場合や, 発汗や不安の状態を示すが10~14日程度で回復する場合まで発症後の経過は様々である。しかし, これらの症状の場合は一般的に予後が良好である。一方, 高熱が3~4日間繫留した場合は, 食欲廃絶, 排尿・排便の停止, 顔面神経麻痺を呈し, 昏睡状態になり, 犬坐姿勢並びに横臥して起立不能になる。この場合, 回復に1~2ヵ月かかる。更に重病例では, 興奮, 痙攣, 沈うつ, 狂騒状態を繰り返し, 起立不能になって泳遊運動を示し, 4~5日の経過で死亡する。

ウマの場合, 昭和22 (1947年) と23年 (1948年) の例を挙げると, 当時飼育されていたウマ10万頭あたり115頭と337頭が発症し, そのうち死亡率は51.3%と41.0%であった。昭和23年のヒトの罹患率が10万人あたり5.9人であったことと比べると, 罹患率, 死亡率ともに高く, ウマがJEVに高感受性であることを示している。

(3) ブタ

ブタの場合, JEVに感染しても臨床上的脳炎を呈することは稀であり, 基本的に不顕性感染に終わる。一方, 妊娠豚では, 血流中のウイルスが胎盤に到達し, 胎子に感染し, 死亡させる。しかし, 分娩予定日まで, 子宮内に残るため, 死産として認められることが多い。また, 例え同腹の胎子であっても, 感染時期が異なるため, ミイラ化胎子, 黒子, 白子などの死亡胎子と,

Table 1 ウマとヒトのJEV罹患率の比較(1947年-1956年) (家畜衛生統計・厚生統計年報より)

年	ウマ					ヒト	
	全国飼育 X1000	罹患	死亡	10万頭当たりの 罹患率	死亡率(%)	患者数	10万人当たりの 罹患率
1947	1,054	1,216	624	115.4	51.3		
1948	1,091	3,678	1511	337.1	41.0	4,757	5.9
1949	1,072	414	227	38.6	54.8	1,284	1.6
1950	1,076	668	364	62.1	54.5	5,196	6.2
1951	1,062	318	181	30.0	56.9	2,188	2.6
1952	1,112	126	69	11.3	54.8	3,545	4.1
1953	1,090	68	43	6.2	63.2	1,729	2.0
1954	1,020	263	159	25.8	60.5	1,758	2.0
1955	927	427	260	46.0	60.9	3,699	4.1
1956	888	124	63	14.0	50.8	4,538	5.0

痙攣、震せん、旋回、麻痺などの神経症状を伴う異常子豚、正常子豚と一緒に娩出されることが多い。また、種豚における造精機能障害や無精子症も報告されている。

(4) その他の家畜

これまでウシ、ヤギでJEV感染による脳炎が報告さ

れている⁹⁾。しかし、昭和12年の東京地区での調査¹⁰⁾では、ウシの抗体陽性率64%、メンヨウは57%、ヤギ80%、イヌ55%、ネコ10%であったことから、これらの動物での発症率は限りなく低く、その多くが不顕性感染であると考えていい。

Table 2 ウマ以外の動物における日本脳炎の発生報告 (1948-1958年)⁸⁾

年・月	発生県	動物	例数	診断
1948	茨城	ウシ	1	
1948.8-11	栃木	ウシ	1	急性鼓張 (組織学的に脳炎)
1948.7-8	茨城	ウシ	4	脳炎
1948.10-1949.4	青森	ブタ	7	脳炎
1949.7	青森	ヤギ	2	脳炎
1949.3-1950.1	青森	ブタ	7	脳炎
1950.7	神奈川	ウシ	1	脳炎
1951.9	茨城	ウシ	1	脳炎
1952.6-8	長野、茨城、栃木	ウシ	3	脳炎
1954.10	福井、愛媛	ブタ	6	脳炎
1951.8	山形	ウシ	1	脳炎
1958.7	宮崎	ヤギ	1	脳炎

Table 3 各種動物におけるJEV抗体陽性率 (竹内ら、1938より)

動物	検査頭数	JEV抗体陽性頭数	陽性率(%)
ウマ	53	52	98.1
ブタ	50	48	96.0
ウシ	50	32	64.0
メンヨウ	54	31	57.4
ヤギ	10	8	80.0
イヌ	53	29	54.7
ネコ	10	1	10.0

5. 最近の日本脳炎ウイルス感染症

(1) ヒト

1967年頃までは、脳炎の患者数が髄膜炎の患者より多くみられた。しかし、1999年から2002年の夏季（8～10月）に無菌性髄膜炎として診断され、既知のウイルスが分離されなかった小児の脊髄液を調べた結果、57検体中4検体よりJEV遺伝子が検出されている⁹⁾。このことは、JEVによる髄膜炎が存在し、その多くが見逃されていることを示しており、これまでの報告以上にJEV感染患者が多くいる可能性を示している。

(2) ウマ

2003年8月に鳥取県で1986年以降18年ぶりにウマで日本脳炎の発生がおこった。発熱と食欲の低下を伴う重度の運動失調がみられ、発症後3日目に死亡した。

このウマは1999年に北海道で生まれ、2003年3月に鳥取県へ移送された。北海道で育ったため日本脳炎ワクチンを接種されていなかった。同時に北海道から移送されたワクチン未接種馬2頭もペア血清を用いたウイルス中和試験により、抗体価の上昇が観察されており、同時期の感染が示唆されていた。このとき分離されたウイルス（JEV/eq/Tottori/2003）は遺伝子型Iに属していた²⁰⁾。

(3) ブタ

2001年に生後40日齢の子豚4匹が、神経症状を呈さない発育不良症候群（wasting syndrome）を示した。病理解剖の結果、これらの子豚は非化膿性脳炎を呈しており、扁桃からはJEVが分離されている²¹⁾。

6. 日本脳炎ウイルスの疫学 (Fig. 1)

(1) ベクター (vector)

我が国ではコガタアカイエカ (*Culex tritaeniorhynchus*) が主要なJEV媒介蚊である。コガタアカイエカの主な発生場所は水田であり、発生時期は6月から始まり8月を最盛期として9月まで続く。しかし、都市部からの水田の消滅、水田耕法の変化、稲作用害虫防除剤散布などにより、コガタアカイエカの個体数が減少したといわれている。最近の都市部より採取された蚊を対象に調査した結果、ヒトスジシマカ (*Culex pipiens*) やアカイエカ (*Aedes albopictus*) などでJEVが検出されている。これらの蚊は水溜まりや下水溝で幼虫が育つことができ、小動物に嗜好性が強い。水田で成長し、大動物を好むコガタアカイエカとは異なっている¹⁵⁾。コガタアカイエカが見られなくなった都市部ではこれらの蚊がベクターとして主要な役割を担っているのかもしれない。

(2) 増幅動物 (amplifier)

日本では、ブタが主要な増幅動物であるといわれており、現在もブタが増幅動物であることに変わりはない。しかし、シンガポールでは環境問題などから1980年代に養豚場が廃止されたにもかかわらず、今なお散発的にJEV感染による患者が発生し、動物のJEV抗体保有率も高い¹⁶⁾。ブタ以外の動物が増幅動物として考えられており、野鳥の関与が示唆されている。

さらに、1997年には台湾で発生した口蹄疫の侵入を水際で防止するために、沖縄県の与那国島からすべてのブタが殺処分された。2005年、新たに導入された1頭のブタにJEVに対する抗体価が検出された¹⁰⁾。導入されたブタからの感染は考えにくいことから渡り鳥の関与が強く示唆されている。

古い記録⁹⁾ではあるが、日本でも以前から野鳥はJEV抗体保有率が高く、血液からもウイルスが分離されている。さらに、実験感染によっても感染後1～6日の間、ウイルス血症が観察されている。これらのことは、トリが日本でもJEVの増幅動物となっている可能性は高いことを示している。

一方、コウモリの血液からJEVが分離されており、感染実験においてもウイルス血症が報告されていることから、増幅動物の一つとして注目すべきであろう。

さらに2004年11月から2005年2月にかけて広島県で捕獲されたイノシシを調査した結果、68%ものイノシシがJEV抗体陽性であった。イノシシはブタに遺伝的、生理的に非常に近縁であることから、ブタと同様に増幅動物となっている可能性が高い。しかし、イノシシが捕獲された時期が冬季であったことから、この研究では、JEV遺伝子は検出されていない。イノシシが増幅動物となっているかは、今後の研究が待たれるところである。

(3) 発生状況

a. ヒト (Fig. 3, Fig. 4)

ヒトでの発生は1966年までは1,000名以上の患者が認められ、1950年には5,000名以上の患者が発生していた。その後患者数は急速に減少した。これには、養豚場の都市部からの隔離、水田の減少などの理由も挙げられるが、1965年以降に高力価で安全性の高い改良型のワクチンが導入されたことが最大の理由である。そのおかげで1972年以降の患者発生は100名以下になった。更に1989年からはワクチンに使用しているウイルスを、中山一予研株から免疫原性が強く野外株に抗原性がより近い北京-1株に変更された。その成果とし

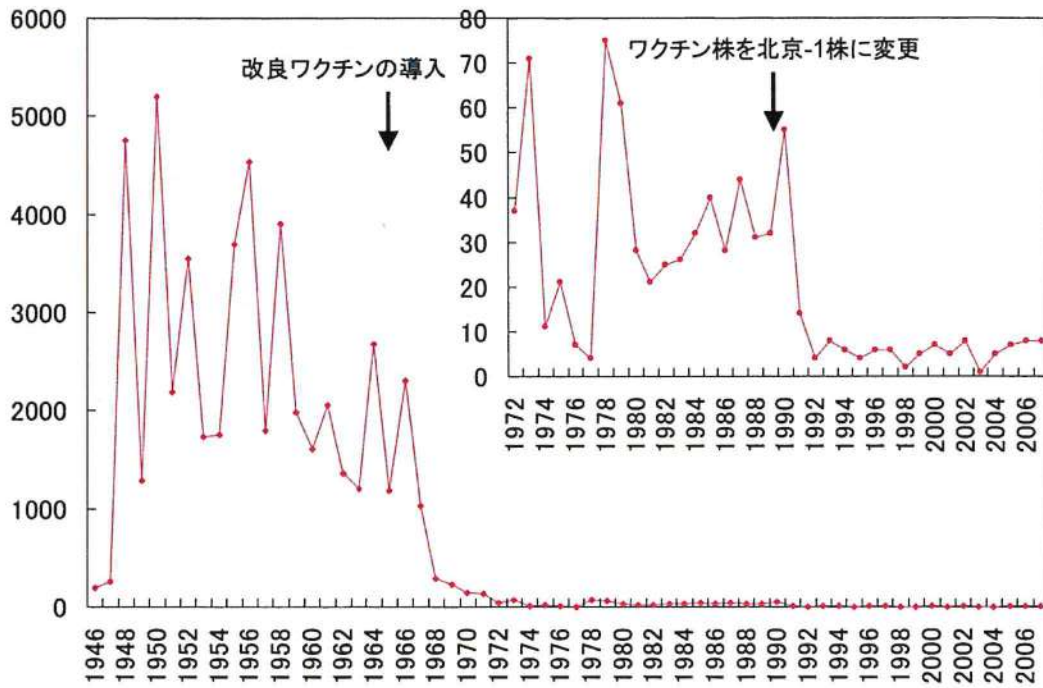
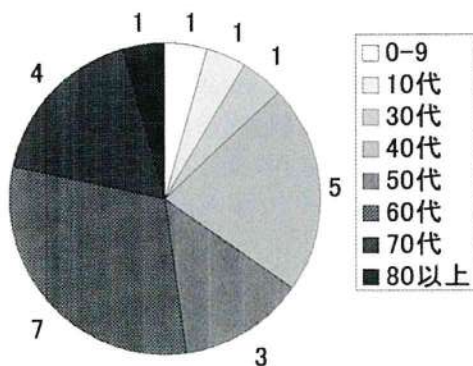


Fig. 3 日本脳炎患者数の推移

縦軸は年間の日本脳炎患者数、横軸は年代を示している。矢印で示すようにワクチンが改良されるのに伴い患者数も減少している。しかし、2005年には日本脳炎ワクチン接種の積極的推奨が取り止められた。

A 年代別



B 地域別

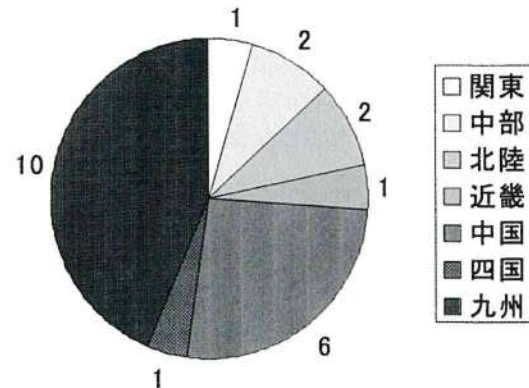


Fig. 4 2005年から2007年における年代別および地域別日本脳炎患者数の比較

2005年から2007年にかけて合計23名の日本脳炎患者が報告されている。Aは年代別の分類、Bは地域別の分類を示している。

て1992年以降の患者数は10名以下となっている。

2005年から2007年にかけて計23名発生しているが、地域別に比較すると、九州10名、中国6名と西日本に患者が集中している。これは、ブタでの抗体陽性率が高い地域と一致している。更に、年齢別に比較すると50歳以上の患者が15名であり、40歳以上で全体の87%を占めていることから、高齢者は日本脳炎に対して警戒を要することがわかる。しかし、2006年には3歳児での患者が認められており、5歳以下の幼児と高齢者が日本脳炎発症のリスク因子である。

更に小西らはNS1に対する抗体の保有状況を調べている。その結果は2001年1年間で年間0.2~3.4%のヒトがJEVに感染していることを示した¹⁾。これはワクチン接種したヒトにもJEVは自然感染しているが、ワクチン接種により発症が防がれていることを示している。

b. ウマ (Fig. 5)

ウマでの発生は1948年には3,678頭を超え、死亡または殺処分されたウマが1,511頭報告されている。しかし、1948年にはワクチン接種が開始されたことから、それ以降は急速に日本脳炎の発生数は減少した。1958年には改良型ワクチンも導入され、1962年以降には発生数は10頭以下となっている。1983年から1985年に

けて若干の発生が認められたが、1988年にはこれまでマウスの脳から精製・作成されていた中山一予研株由来のワクチンを、組織培養を用いて増殖させた北京-1株由来のワクチンに変更した。1986年以降は17年間ウマでのJEVによる発症は起こっていなかった。しかし、前述のように2003年鳥取県でワクチン未接種馬が18年ぶりに発症している。

日本ではほぼすべてのウマに毎年夏季前に不活化ワクチンが接種されている。このため、ウイルス中和試験や赤血球凝集抑制試験などでは、JEV感染により誘導された抗体とワクチン接種により誘導された抗体を識別することが困難であった。そのため、ウマでの正確なJEV感染状況を知ることができなかった。しかし、小西ら³⁾はワクチン接種では誘導されず、自然感染によってのみ誘導されるNS1蛋白に対する抗体を検出する血清学的な測定系 (ELISA) を開発し、日本のウマにおけるJEVの感染状況を調査した。1998年から2003年にかけて経時的に回収された血清では、日本中央競馬会的美浦トレセンで0~42%、栗東トレセンで4~27%の競走馬にJEV感染が証明された。このことは、依然として、ウマは毎年夏季にJEVに感染しているが、その発症はワクチンにより防がれていることが示唆された。

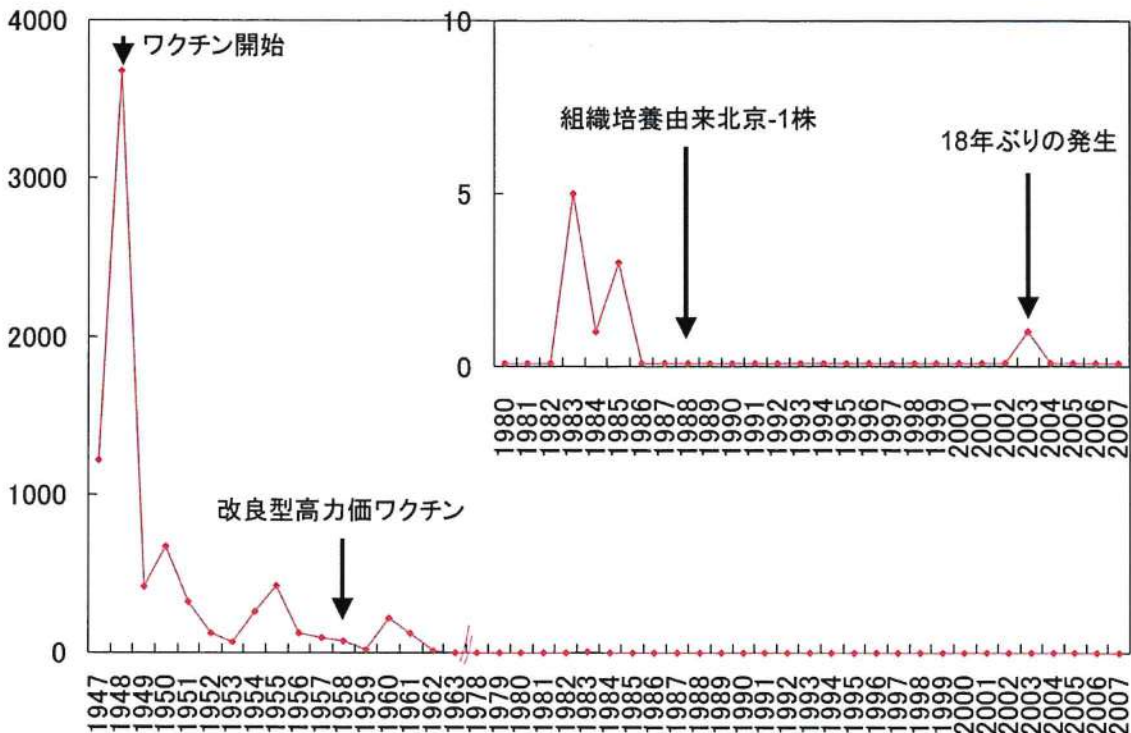


Fig. 5 馬の日本脳炎発生数の推移

1948年には4500件を超える発生数があったが、ワクチン接種の普及に伴い発生は激減している。1986年以降の17年間発生は認められなかったが、2003年に鳥取県で発生があった。

c. ブタ

Table 4で示すようにブタでのJEV感染症の発生は最近では年間最大11件、少ない年には1件とその発生は継続して起こっているが、発生は少ないものである。これはほとんどのブタが不顕性感染で終わり、基本的に未経産の妊娠豚にのみ、死産が観察されるからである。ブタの場合は、春季から秋季にかけて種付けを予定しているブタを対象に予防接種を行うことにより、死産の発生は抑えられている。

Table 4 ブタの日本脳炎発生状況

年	発生件数
1998	6
1999	6
2000	5
2001	4
2002	5
2003	1
2004	11
2005	11
2006	11

(ブタを用いた感染症流行予測事業) (Fig. 6)

ブタは病気にはならないが、JEVの増幅動物としての役割と多くのブタが1歳以下で食肉処理場に出荷されるため夏を1回しか経験しないという特徴から、食肉処理場に夏季に出荷されたブタの血清を調査することにより、日本脳炎の流行状況を把握することができる。そこで、ヒトへの感染の可能性を予測することを目的として、厚生労働省による感染症流行予測事業として、全国のブタにおける日本脳炎感染状況を調査し、データベース化している。ブタで50%以上の抗体保有率が出た場合は、ヒトでの感染の可能性も高いと注意を呼び掛けている。Fig. 6は2005年から2007年度のデータを地域ごとにまとめたものであるが、毎年7～9月にかけて抗体陽性率が上昇し、九州、四国、中国、近畿などの西日本で陽性率が高いことがわかる。

ここで興味深いのは、

- 1) 沖縄が4月時点で陽性になっている。
- 2) 北海道でも2006年7月には陽性が検出されている。
- 3) 2005年は関東地方にJEVがかなり蔓延したが、それ以外の年はそれほど大きな流行はなかった。

以上のように、年度、地方で差があるものの、ブタには西日本を中心として、全国でJEVの感染が起こっていることがわかる。

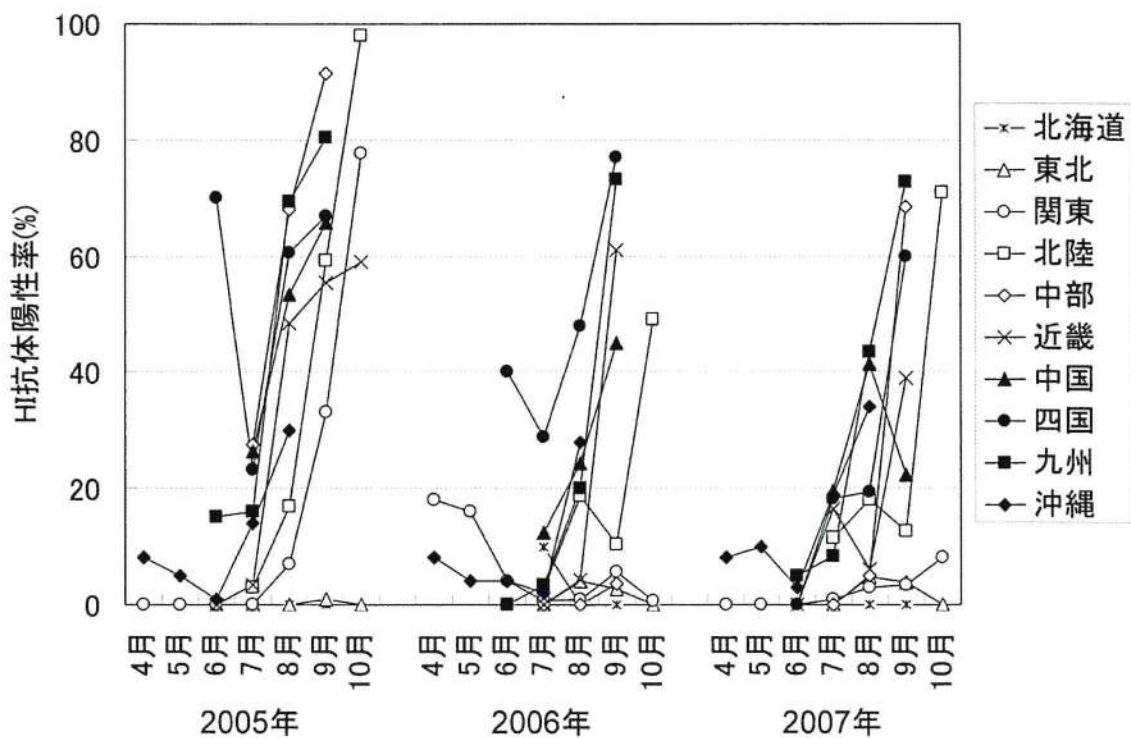


Fig. 6 2005年から2007年におけるブタの日本脳炎流行予測調査結果

毎年、7～9月にかけてブタの日本脳炎抗体陽性率が急増している。九州、中国、四国、近畿、北陸地方では毎年同様の発生が認められるのに対して、沖縄は4月以前からの発生があり、関東は2005年に陽性率が高く、北海道でも2006年には陽性が認められるなど、地域および年度で発生の違いが認められる。

d. 伴侶動物のJEV感染

我々は、伴侶動物のJEV感染状況について調査を行っている。その主な理由は、1) 伴侶動物（イヌ・ネコ）はヒトと生活空間を共有しており、伴侶動物がJEVに感染していることは、ヒトの生活場所とは隔離されてきたブタにおけるJEV感染状況の調査よりもより直接的にヒトへの感染の可能性を示唆することができる。2) ヒト、ウマ、ブタとは異なり、ワクチン接種歴がないため、正確な自然感染の状況を調べることができる。3) 北米では1999年にニューヨークにWNVが突然侵入して以降、全土へと感染は拡大していった。その際、ヒトやウマほどではないが、イヌのWN脳炎による死亡例も報告されている¹⁰⁾。JEVの感染環はWNVと非常によく似ていることからJEV感染によるイヌの発症の可能性を調査する、という3点が挙げられる。

Table 5 伴侶動物の日本脳炎ウイルス感染を調査する理由

1. 伴侶動物はヒトと生活空間を共有している。伴侶動物への感染⇔ヒトへの感染の可能性
2. ヒト・ウマ・ブタと異なりワクチン接種をしていない。抗体陽性=JEV感染歴
3. WNV感染でイヌに脳炎。イヌのJEV感染で発病は?

調査方法として、80%プラーク減少ウイルス中和試験で実施した。ヒトでの調査では世界保健機構(World Health Organization: WHO)の基準では50%プラーク減少ウイルス中和試験を推奨しているが、擬陽性を極力排除するためにより特異性が高い検査法を採用した。その結果、山口県下の動物病院に来院したイヌでは100頭中17頭(17%)がJEV抗体陽性であった。飼育方法および性別で陽性率を比較した結果、室外飼育犬では室内飼育犬よりも抗体陽性率が3.5倍以上であったが、性別による差は認められなかった。これは室外飼育犬のほうがJEV媒介蚊に吸血される確率が高いことと一致する。興味深いことは、ヒトよりも屋外に出る機会が少ない室内飼育犬でも10.3%の高い陽性率が認められたことである。このことは、JEV媒介蚊が室内にも侵入しており、室外に出ることの少ない高齢者や乳幼児も注意が必要であることを示唆している。

山口県の室外飼育犬のJEV陽性率が38.1%であることは、1954-1955年戸田ら¹⁰⁾が東京の野犬で実施した調査結果の49.1%とよく似ていると考えている。この年、日本全国では1,759名(1954年)と3,699名(1955年)の日本脳炎患者数がでており、山口県は当時の東京と同じ状況にあると理解してよいであろう。これらから判ることは、室内・室外関係なく依然としてヒトはJEVに感染する可能性が高いことである。

次に、ネコにおけるJEV感染状況を調査した。ネコにおいては1997~1999年に215頭、2004~2005年に77

頭の計292頭のJEVに対する中和抗体保有状況を調査した。その結果、わずか3頭(1.0%)が陽性になった。ネコにおける抗体保有状況は、イヌに比べて10倍以上低く、以前の日本での調査やWNVの疫学調査においてもネコはイヌに比べて感染率が低いことと一致している。蚊の嗜好性や動物の感受性が影響しているのかもしれない。

Table 6 イヌにおけるJEV中和抗体保有状況

	飼育方法別			性別		計
	室内飼育	室外飼育	両方不明	オス	メス	
検査頭数	21	58	21	51	49	100
陽性頭数	8	6	3	7	10	17
陽性率(%)	38.1	10.3	14.3	13.7	20.4	17.0

イヌ・ネコともに程度の差は認められるが、JEVに感染していることが再確認された。現在、イヌにおける発症の有無、イヌ・ネコにおけるウイルス血症の可能性などを調査中である。

Table 7 ネコにおけるJEV中和抗体保有状況

	調査年		計
	1997~1998	2004~2005	
検査頭数	215	77	292
陽性頭数	2	1	3
陽性率(%)	0.9	1.3	1.0

e. 野生動物のJEV感染症

野生動物のJEV感染症を調べる意義として、1) WNVでは野鳥が主たる増幅動物であるが、吸血した蚊に感染を成立させるのに十分なウイルス量を血液に出すウイルス血症を引き起こす動物として、ゴールデンハムスター(*Mesocricetus auratus*)²⁰⁾、キツネリス(*Sciurus niger*)¹⁹⁾、ワタオウサギ(*Sylvilagus floridanus*)¹⁷⁾、トウブシマリス(*Tamias striatus*)¹¹⁾などが報告されている。JEVの増幅動物は、前述のブタ、トリ、イノシシ、コウモリ以外はいないのであろうか? 2) 近年、外来種の移入、定着、増殖で在来種の生態も変わりつつある。日本におけるJEVの感染環は変化していないのであろうか? 3) アメリカではWNVの流行により野鳥の数が劇的に変化した⁷⁾。JEVによる野生動物への影響はないのであろうか?などが挙げられる。

Table 8 野生動物におけるJEV感染状況を調査する理由

1. WNVはトリ以外の野生動物が増幅動物としての可能性。JEVはブタ・トリ・コウモリ・イノシシ以外の他の野生動物が増幅動物となっている?
2. 野生動物の生態が変わりつつある。JEVの感染環に対する影響は?
3. 野生動物に対するJEV感染の影響は?

我々は、北海道、東京、大阪などの大都市で急速にその生息数が増加しているアライグマに注目した。アライグマは北米では狂犬病とイヌジステンパーの主要な感染源となり他の動物種に感染を拡大させる動物として警戒されている。2005年から2007年にかけて西日本の2地域で捕獲されたアライグマ116頭におけるJEV感染状況を調査した。その結果、全体では62頭の53.4%が陽性となった。特に地域Aでは62頭中40頭(64.5%)が陽性となっていた。本調査では、夏を一度も経験していない可能性もある子供のアライグマも含まれているため、実際の陽性率はより高くなると考えている。今回地域Aで認められた高い陽性率は、前述の広島県でのイノシシの陽性率68%に類似していた。更には、アライグマ血清中よりJEV遺伝子も検出され

ており(大野ら、投稿準備中)、アライグマのJEV感染環における重要性が示唆されている。今回の調査で、最も抗体価が高い個体は、生後間もない新生子であったことから、母親からの移行抗体か、妊娠中の感染の可能性が示唆された。現在これらをより詳細に解析中である。

Table 9 アライグマにおけるJEV中和抗体保有状況

	地域		計
	A	B	
検査頭数	62	54	116
陽性頭数	40	22	62
陽性率(%)	64.5	40.7	53.4

7. JEV感染によりWNVによる発症から回避できる可能性 (Fig. 7)

ニューヨークに1999年に侵入したWNVはカナダ、メキシコを含む北米やアルゼンチンなどの南米にまで広がっている。そのため、発生当時から日本への侵入が危惧されていた。WNVが日本に侵入したらどうなるのであろうか?日本は、北米とは異なりWNVの感受性動物であるヒトやウマの多くは、既にJEVに感染歴がある。そこで、我々は、JEV感染既往がある動物を実験的に作出して、その動物にWNVで攻撃してみた。具体的には、C57BL/6マウスに事前にJEVのワクチン株SA14-14-2株、あるいは同様にフラビウイルスである黄熱ウイルスのワクチン株YF17D株を接種しておき、接種後4週間で強毒株のWNVで攻撃試験を実施した。その結果、PBS投与コントロール群とYF17D株免疫群

はWNV感染によりほとんどが死亡したのに対して、JEVのSA14-14-2株免疫群はすべて生存した。このことは、WNVに非常によく似た構造をもつJEVに事前感染することにより、WNVに対する交差免疫が生じたためと考えられる。これはマウスの実験であるため、そのままヒトやウマに外挿することはできないが、JEV感染既往歴がある動物はWNVによる発症から免れる可能性が高いことを意味している。更に、最近の発表ではJEVに対する不活化ワクチン免疫馬もWNV攻撃から部分的に防御されている。毎年多くの日本人がアメリカに旅行しているにもかかわらず、これまでWNV感染発症者が1人である理由の一つとして説明できるかも知れない。

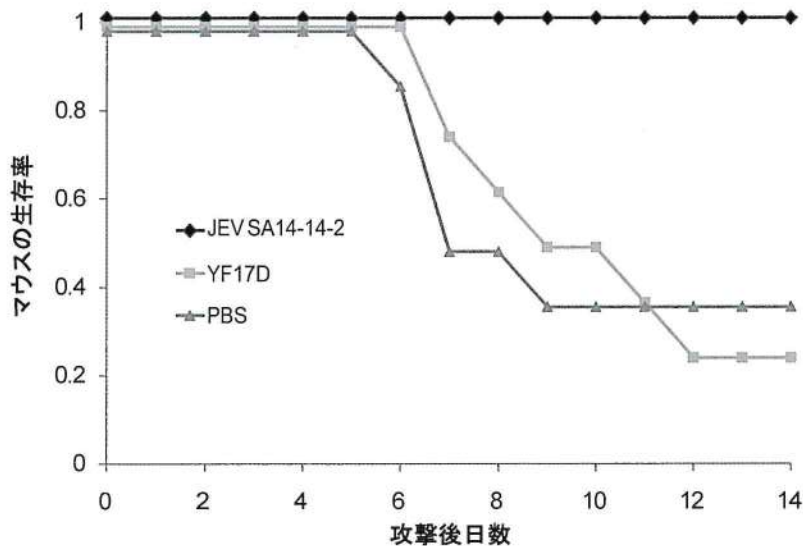


Fig. 7 日本脳炎感染による致死性のウエストナイルウイルス感染からの防御

C57BL/6マウスに日本脳炎SA14-14-2株、黄熱ウイルスYF17D株、およびコントロールとしてPBSを接種し、接種後4週で10⁸FFU/匹を腹腔内投与し、その後の生存率を調べた。JEV免疫群はすべて生存したのに対し、YFV免疫群とコントロール群は非常に高い致死率を示した。

8. WNVの冬季の発生

JEVでも常に疑問の一つに挙げられているのが、ウイルスの越冬機序である。WNVでの北米での越冬方法として蚊に感染して越冬することが挙げられている⁹⁾が、最近の報告は蚊の活動期ではない冬にカラスの死亡が報告されており、カラスの糞便中にWNVが検出されていることから、カラスのフンによる水平感染の可能性も示唆されている²⁾。アメリカでは、夏季

にWNVの発生が多いが、2005年に入ってはヒトでの発生も一年中みとめられている。そのため、蚊を介さない感染も示唆されている。また、地下鉄・地下街等の整備により、一年中気温が変化せず、蚊が生息し続けられる場所も増えてきた。これらもWNVの感染環に影響を与えていると考えられる。JEVは一体どのようにして越冬しているのでしょうか？

9. おわりに

1990年代よりJEV患者数が急激に減少して、年間数名の発生となっている。その理由として、ワクチンを北京-1株に変更したことが挙げられるが本当にそうであろうか？実はこのころから日本では遺伝子型Iのウイルスが侵入するようになってきている。この遺伝子型のウイルスをマウスに接種すると、致死率は遺伝子型IIIに比べて低くなっている。また、最近では脳炎よりも髄膜炎の病態が多くなっている。これらのことを考えると、1990年代からは病原性が弱い遺伝子型Iのウイルスが流行し、そのために患者数が少なくなっているとともに、病型も脳炎型からより軽症の髄膜炎型に推移した可能性はないだろうか？

また、ブタやイノシシ以外にいくつかの増幅動物があり、それらを利用して越冬していることはないだろうか？

WNVと同じようにJEVで死んでいる動物もいるに違いない。多くの成獣は一度夏を経験するためにJEVに陽性になっているが、はじめて夏を迎える新生動物は発病する危険性もあるのではないだろうか？野生動物の流産もあるに違いない。死亡した野生動物、病気の野生動物が認められないからといって、野生動物が病気になっていないわけではない。野生動物は、人目に付かないだけである。

今まで、家畜とヒトという観点でしかあまり感染症は論じられてこなかった。伴侶動物や野生動物、特に野生動物は数百倍の品種がいる。感染症の流行にこれらを見捨てることはできない(Fig. 8)。野生動物のウイルス感染症の情報収集は、今始まったばかりである。今後の研究の進展が期待される。

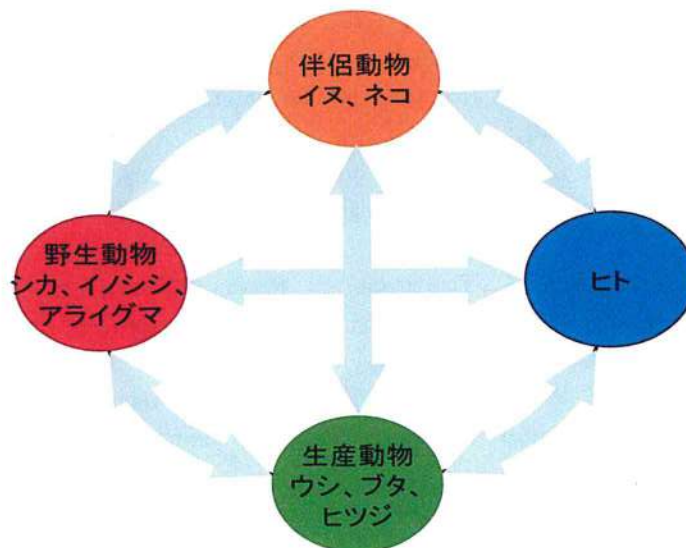


Fig. 8 ヒト、生産動物、伴侶動物、野生動物の関係

感染症においては、ヒト、生産動物、伴侶動物、野生動物の区別はない。しかし、ヒトは1種、生産動物は主に5種、伴侶動物は主に3種程度であるのに対して、野生動物は数百種存在する。野生動物の感染症を知らずに、感染症を語ることはできない。

JEVの感染環に関しては、以前より精力的に解析され、常識のように語られているが、ヒト、家畜、ペット、野生動物、昆虫までも巻き込んだ本感染症は分かっていないことが多い。WNVでの精力的な研究成果と比較しつつ、JEV感染の理解と予防へ向けた対策が必要である。

謝 辞

ここで述べられている研究は、山口大学の岩田祐之先生、奥田 優先生、佐藤 宏先生、山口大学獣医微生物学教室の大野 佳君、兵庫県立大学の横山真弓先生、田辺市ひき岩自然公園センターの鈴木和男先生、大阪市立大学の宇仁茂彦先生、大阪府動物愛護畜産課の柴崎高宏先生、マサチューセッツ州立大学医学部のEnnis博士、Green博士との共同研究で行われた、

ここで述べられている研究の一部は厚生労働科学特別研究事業「わが国における日本脳炎の現状と日本脳炎ワクチンの必要性の評価に関する緊急研究」(H17-特別-024)により実施された。

参考文献

- 1) Burke, D.S. and Monath, T.P.: Flavivirus. In: Field Virology 4th ed (edited by Knip, D.M. and Howley, P.M.). p1043~1125, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2001.
- 2) Dawson, H.R., Stone, W.B., Ebel, G.D., Young, D.S., Galinski, D.S., Pensabene, J.P., Franke, M.A., Eidson, M. and Kramer L. D.: Crow deaths caused by West Nile virus during winter. *Emerg. Infect. Dis.* 13: 1912~1914. 2007.
- 3) Konishi, E., Shoda, M. and Kondo, T.: Analysis of yearly changes in levels of antibodies to Japanese encephalitis virus non-structural 1 protein in racehorses in central Japan shows high levels of natural virus activity still exist. *Vaccine* 24: 516~524. 2006.
- 4) Konishi E., Shoda, M., Yamamoto, S., Arai, S., Tanaka-Taya, K. and Okabe, N.: Natural infection with Japanese encephalitis virus inhabitants of Japan: a nationwide survey of antibodies against non-structural 1 protein. *Vaccine.* 24:3054~3056. 2006.
- 5) 厚生労働省健康局結核感染症課, 国立感染症研究所感染症情報センター, 平成17~19年度感染症流行予測調査. 2005~2007.
- 6) Kuwayama, M., Ito, M., Takao, S., Shimazu, Y., Fukuda, S., Miyazaki, K., Kurane, I. and Takasaki, T.: Japanese encephalitis virus in meningitis patients, Japan. *Emerg. Infect. Dis.* 11: 471~473. 2005.
- 7) LaDeau, S.L., Kilpatrick, A.M. and Marra, P.P.: West Nile virus emergence and large-scale declines of North American Bird Populations. *Nature*, 447:710~713. 2007.
- 8) 中村稔治: 動物の日本脳炎. *神経進歩*. 11: 223~233. 1967.
- 9) Nasci, R.S., Savage, H.M., White, D.J., Miller, J.R., Cropp, B. C., Godsey, M.S., Kerst, A.J., Bennett, P., Gottfried, K. and Lanciotti, R.S.: West Nile virus in overwintering Culex mosquitoes, New York City, 2000. *Emerg. Infect. Dis.* 7:742~744, 2001.
- 10) Nidaira, M., Taira, K., Onodera, I., Morikawa, T., Itokazu, K., Kudaka, J. and Ohno, A.: Detection of Japanese encephalitis virus antibody in a pig on Yonaguni island, where all pigs were slaughtered in 1997. *Jpn. J. Infect. Dis.* 60: 70~71. 2007.
- 11) Platt, K.B., Tucker, B.J., Halbul; P. G., Tiawsirisup, S., Blitvicj, B.J., Fabiosa, F.G., Bartholomay, L.C. and Rowley, W.A.: West Nile virus viremia in eastern chipmunks (*Tamias striatus*) sufficient for infecting different mosquitoes. *Emerg. Infect. Dis.* 13: 831~837. 2007.
- 12) Root, J.J., Hall, J.S., Mclean, R.G., Marlenee, N.L., Beaty, B.J., Gansowski, J. and Clark, L.: Serological evidence of exposure of wild mammals to Flaviviruses in the central and eastern united sates. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 72: 662~630, 2005.
- 13) Root, J.J., Oesterle, P.T., Nemeth, N.M., Klenk, K., Gould, D.H., Mclean, R.G., Clark, L. and Hall, J.S. : Experimental infection of fox squirrels (*Sciurus niger*) with West Nile virus. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 75: 697~701. 2006.
- 14) Schwab, S., Herden, C., Seeliger, F., Papaioannou, N., Psalla, D., Polizopoulou, Z. and Baumgartner, W.: Non-suppurative meningoencephalitis of unknown origin in cats and dogs: an immunohistochemical study. *J. Comp. Path.* 136: 96~100. 2007
- 15) 高崎智彦: 蚊からの日本脳炎ウイルスの検出. 感染症媒介ベクターの実態, 生息防止対策に関する研究 (小林睦生編), p179~184. 2004.
- 16) 竹内松次郎, 佐藤次郎, 山本郁夫, 滝沢三智: 流行性脳炎病原の研究 (第6回報告). *東京医事新誌*, 62: 724~728. 1938.

- 17) Tiawsirisup, S., Platt, K.B., Tucker, B.J. and Rowley, W.A.: Eastern cottontail rabbits (*Sylvilagus floridanus*) develop West Nile virus viremia sufficient for infecting select mosquito species. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 5: 342~350. 2006.
- 18) Ting, S.H.L., Tan, H.C., Wong, W.K., Ng, M.L., Chan, S.H. and Ooi, E.E.: Seroepidemiology of neutralizing antibodies to Japanese encephalitis virus in Singapore: continued transmission despite abolishment of pig farming? *Acta Trop.* 92: 187~ 191. 2004.
- 19) 戸田、福田、齊藤:東京付近の野犬血清中にみた日本脳炎に対する補体結合抗体について. 日本獣医学雑誌.17: 38~39. 1955.
- 20) Xiao, S.Y., Guzman, H., Zhang, H., Travassos da Rosa, A.P. and Tesh, R.B.: West Nile virus infection in the golden hamster (*Mesocricetus auratus*): a model for West Nile encephalitis. *Emerg. Infect. Dis.* 7: 714~724. 2001.
- 21) Yamada, M., Nakamura, K., Yoshi, M. and Kaku, Y: Non~suppurative encephalitis in piglets after experimental inoculation of Japanese encephalitis virus isolated from pigs. *Vet. Pathol.* 41: 62~67. 2004.
- 22) Yamanaka, T., Tsujimura, K., Kondo, T., Yasuda, W., Okada, A., Noda, K., Okumura, T. and Matsumura, T.: Isolation and genetic analysis of Japanese encephalitis virus from a diseased horse in Japan. *J. Vet. Med. Sci.* 68: 293~295. 2006.

総説

エキゾチックアニマルとワイルドアニマルの動物由来感染症

宇根有美*

〔受付：2007年12月5日〕

REVIEW

ZOONOSIS IN EXOTIC ANIMALS AND WILD ANIMALS

Yumi UNE

Laboratory of Veterinary Pathology, School of Veterinary Medicine,

Azabu University, 1-17-71 Fuchinobe, Sagami-hara-shi,

Kanagawa-ken, 229-8501, Japan

〔Received for publication : December 5, 2007〕

Discussed are the current imports of animals, pathogen-bearing status of imported exotic animals (rodents and reptiles), and infectious diseases of captive and free-range wild animals.

1. はじめに

「エキゾチックアニマル」という言葉に明確な定義はなく、「exotic」が、外来の、外国産の、風変わりなと訳されることから、漠然と外国産の動物、変わった動物という意味で、日常的に犬や猫以外のペットに対して用いられている。昨今、愛玩動物に対する嗜好の変化、住宅事情や生活パターンの変化で、ペットとしてのこの種の動物を見聞きすることが多い。エキゾチックペットは、犬や猫を含む家畜に比較して、一般に人と関った期間が短いため、生態、生理、疾病に関する情報が乏しい。さらに、動物由来感染症対策では、潜在的に存在する病原体の危険性が問題となっている。

ペットは、人の居住空間とほぼ同一の空間を共有し、人と濃密な接触が日常的に繰り返されることがある。家畜としての歴史も浅く、極端な場合、新種登録後数年もたたずにペットとして売買されたり、野生動物として捕獲された動物が、1週間以内に子供や老人のいる家庭に持ち込まれることが実際に起きている。野生動物を輸入することは、その動物が生息していた自然の一部を切りとり、そこで営まれていた様々な動物の営み、生活環(宿主と病原体の生活環を含めて)をそのまま家庭に持ち込むということで、動物由来感染症のリスクが高い。

動物由来感染症は、自然状態でヒト-脊椎動物間で相互に移行しうる感染症、あるいは感染と定義され、人に感染する病原体1,709のうち49%が動物由来感染症である。2004年に改正された感染症法の疾病類別表にも多くの動物由来感染症が掲載されている。さらに昨今、世界的規模で問題となっている新興感染症156のうち75%が動物由来感染症である。すなわち、人の感染症のコントロールには、様々な面で動物のコントロールが欠かせない。

動物由来新興感染症の発生は、宿主と寄生体との関係(片利共生状態)を人為的に崩壊させたり、自然界に存在しない宿主と寄生体の組み合わせを作る(寄生体に新たな宿主を与える)ことが主因のようである。

本項は、動物の輸入状況、輸入動物の病原体保有状況(齧歯類と爬虫類)、飼育下野生動物の感染症、野生動物の感染症について、自験例を中心に紹介する。

2. 動物の輸入状況

日本には、家畜、ペット、実験動物および展示動物 など多種多様な、多くの動物が世界各国から輸入され

* 麻布大学獣医学部病理学教室・准教授 〒229-8501 神奈川県相模原市淵野辺1-17-71

ているが、これらの動物の輸入実態を、正確に、一目で把握できる統計資料はない。このため、動物の輸入状況を把握するためには、①農林水産省動物検疫年報

※1, ②人の感染症をコントロールするために施行された輸入動物届け出制度 ※2および③財務省貿易統計 ※3などを利用することになる。このうち、③は、関税法に基づいて申告される貨物に関するもので、20万円以下の少額貨物は貿易統計には計上されないため、輸入状況を正確に反映していないものと考えられるが、概要を捉えることはできる。

※1 農林水産省動物検疫年報

日本では家畜伝染病予防法に基づき、家畜の伝染病が日本に侵入するのを防止するため牛、豚、山羊、めん羊、馬、鶏、あひる、七面鳥、うずら、がちょう、犬、兎、みつばちなどの動物と、それらの動物から作られる肉製品などの畜産物を対象に輸出入検査を行っている。また、狂犬病予防法に基づき、狂犬病が日本に侵入することを防止するため、犬、猫、あらいぐま、きつね、スカンクについて、輸出入時に検査を行っている。加えて、感染症法に基づき、サルについても、エボラ出血熱やマールブルグ病のような国内ではまだ発生していないサルから人へ感染する病気が日本に侵入するのを防止するため、輸入時に検査を行っている。この動物検疫所の輸入検疫実績がこの年報に掲載されている。

※2 動物の輸入届出制度

厚生労働省が、輸入動物を原因とする人の感染症の発生を防ぐため、平成17年9月1日から導入した制度。<http://www.mhlw.go.jp/bunya/kenkou/kekkakukansenshou12/index.html>

※3 財務省貿易統計

日本では関税法に基づき、輸出入を行なう者はその貨物について税関に申告しなければならない。貿易統計は、日本から輸出されたまたは日本に輸入された貨物に関する統計である。全国の税関に提出された輸出入申告書等をもとに作成され、輸出入統計品目表に基づき、相手国、数量、金額のみが公表される。また、税関官署別の統計も入手可能。ただし、少額貨物(20万円以下の貨物)は、貿易統計に計上されない。

グラフ(Fig. 1)は、先に述べた財務省貿易統計に基づいて2002年から2006年の5年間の動物輸入数を表したものである。漸次、動物輸入数は減少している。これは、2003年にはSARS(重症急性呼吸器症候群)流行のため、動物の輸入自粛が行われ、特に中国からの輸入が止まったことや、2003~2004年には、アジア諸国で鳥インフルエンザH5N1亜型が流行し、動物、特に鳥の輸入が制限され、現在でも、鳥インフルエンザH5N1亜型の流行が確認されている国々からの輸入の制限が随時行われていること、さらに、2005年9月に輸入動物届け出制度が施行されたことなどによる。

しかしながら、このような状況下でも、輸入される動物の種類が変わったものの、動物の輸入数は劇的に減少していない。特に規制されにくい種類の動物の輸入数が急増するといった事態も起きている(例:有袋類)。

このように輸入される動物の内訳を、2004年の輸入統計でみると、グラフ(Fig. 2)のように、爬虫類が58%と一番多く、哺乳類は37%で二番目に多い、さらに、哺乳類の内訳をみると87.0%が齧歯類である。そして、最も注目すべきは、爬虫類のほとんどすべて、齧歯類の76.5%がペット用として輸入されている。

3. 輸入動物の病原体保有状況

前述のように、日本には多数の動物がペット用として、生きたまま輸入されているが、この種の動物が公衆衛生上、どの程度のリスクを持っているかを検討した調査はなかった。そこで、筆者は、厚生労働省新興・再興感染症吉川泰弘研究班の分担研究者として、これらの動物の病原体保有調査を以下のメンバーとともに実施した。丸山総一(日本大学生物資源科学部獣医公衆衛生学研究室)、増澤俊幸(千葉科学大学薬学部免疫微生物学研究室)、荻和宏明(北海道大学大学院獣医学研究科環境獣医学講座公衆衛生学教室)、藤田博己(大原総合病院附属大原研究所)、加藤行男、岡谷友三アレシヤンドレ(麻布大学獣医学部公衆衛生学第二研究室)、佐藤宏(山口大学農学部獣医寄生虫教室)、青木英雄、飯塚信二(横浜検疫所)、鈴木荘介(神戸検疫所)、高橋英之、森川茂(国立感染症研究

所)、黒木俊郎(神奈川県衛生研究所)、磯貝浩(札幌医科大学医学部動物実験施設部)、小菅旬子(宮崎大学農学部内人獣共通感染症教育部)、太田周司(東京検疫所川崎支所)(敬称略)

1) 齧歯類

現在、我が国には2006年1年間で475,000頭余りと多くの齧歯類が輸入されているが、この中には実質上、野生捕獲種は含まれていない。しかし、輸入届出制度施行以前2005年8月までには多種類の野生捕獲種が含まれていた。

齧歯類は、ハンタウイルス肺症候群、腎症候性出血熱、リンパ球性脈絡髄膜炎、アルゼンチン出血熱、ボリビア出血熱、ベネズエラ出血熱、ラッサ熱、サル痘、ライム病、ペスト、野兎病、エルシニア症、鼠咬症、

ツツガ虫病, レプトスピラ症など14種類以上の病原体を媒介し, 特に野生種の場合, 必然的にその危険度も高くなる。我々は, 平成15~17年の3年間に26種類512匹の齧歯類について病原体保有状況を調査し, 以下の各種病原体を検出した (Table. 1)。

ジアルジア: ヒトに病原性を示すジアルジアと酷似する形態を示すものが, 北南米産齧歯類から高率に検出され, 特にデグーでは93%の割合で検出された。

サルモネラ: 8種類34匹が保有していた。アジア産齧歯類で比較的多く検出され, 同一業者から同じ日に搬入された動物の陽性率が高く, 流通経路での汚染も考えられた。

皮膚では, 黄色ブドウ球菌: 26種類中19種類, 168匹 (33%) と非常に高率で, アフリカ産齧歯類の中には, 全頭から分離された齧歯類が4種あり, 菌量も多かった。水虫の原因菌である白癬菌や, アフラトキシンなどカビ毒を産生する真菌も分離された。

レプトスピラが25種類中12種類 (樹上性齧歯類7種類のうち5種類, アフリカ産14種類のうち7種類) 32匹から検出された。特に, アフリカヤマネとアメリカモモンガの腎臓に大量の菌が観察され, 相当数の排菌が予想された。実際, 本調査に用いたアメリカモモンガを輸入した貿易会社の従業員2名が発症し, 感染源としてアメリカモモンガが特定された。

ボレリア: 25種類中15種類54匹から検出された。多くの患者が発症している北米だけではなく, アフリカ産齧歯類にも各種のボレリアに対する抗体を保有する動物がみられた。

2) 爬虫類

爬虫類の輸入数は哺乳類より多く (Fig. 1, 2), 増加傾向にある。爬虫類の動物由来感染症としてサルモネラ症が良く知られている。2005年にはミシシippアカミミガメに関連する小児重症サルモネラ症が2例, イグアナに関連する乳児下痢症1例が報告されている

(Table. 2)。爬虫類のサルモネラ保菌率は他の動物に比べて非常に高く, 輸入直後のトカゲ類60.6% (43/71), カメ類40.0% (8/20) の割合で保菌しており, ペットショップで販売されているトカゲ類では74.6% (44/59), カメ類72.2% (13/18), ヘビ100%とする報告がある。また, 2006年に神奈川県衛生研究所黒木俊郎先生らによる長崎県, 沖縄県自治体とともに行ったミシシippアカミミガメ調査においても, 幼体70/94 (74.5%), 成体3/31 (9.7%) と高率に汚染されていることがわかった。

文献によると, 爬虫類の肉芽腫性病巣から抗酸菌や *Chlamydia pneumoniae* が検出されることから, 宮崎大学後藤義孝教授とともに, 前述のサルモネラ調査で用いたカメを対象に抗酸菌調査も行った。その結果, 114匹中87匹, 76.3% (ミシシippアカミミガメ: 83/107, カミツキガメ: 3/5, ワニガメ: 1/2) から合計230株の抗酸菌が分離された。検体別では, 皮膚で127株 (114匹中83匹, 72.8%), 肝臓で38株 (114匹中32匹, 28.1%), 肺で30株 (114匹中18匹, 15.8%), 腸で35株 (114匹中27匹, 23.8%) と皮膚からの分離率が最も高かった。遺伝子解析の結果, *M. terrae* (86株), *M. fortuitum* (19株), *M. senegalense* (2株), *M. arupense* (2株), *M. intracellulare* (1株), *M. chelonae* (1株), *M. szulgai* (1株) などが同定された。残る117株は, 大部分がRunyonの分類でⅢまたはⅣ群に属することが分かったものの菌種は同定できなかった。カメ等の爬虫類から免疫力の低い老人や子供に非定型抗酸菌 (Mycobacteria other than tubercule bacilli: MOTT) の一種 *M. chelonae* が感染した例も報告されている。また, 創傷感染した *M. terrae* による手指の慢性腱滑膜炎の発生もある。

さらに, 爬虫類のダニからは哺乳類にも感染する病原性リケッチャが分離されている。以上のように哺乳類と爬虫類とで種の障壁があるとはいえ, 充分注意する必要があった。

4. 飼育下野生動物の感染症

麻布大学病理学研究室では, 飼育下野生動物間で集団発生する感染症に注目して病性鑑定を行っている。以下に発生頻度の高い疾患と公衆衛生上重要と思われる代表的な疾患を紹介する。

1) エルシニア症

エルシニア属細菌, 特に *Y. pseudotuberculosis* による展示施設での集団発生事例が多い。

①エルシニア属細菌: 腸内細菌科に属する通性嫌気性グラム陰性桿菌で, 4℃以下でも発育可能な低温発育性を有する。11菌種に分類され, 病原性をもつエルシニア属菌としては, 3種類 1) *Y. pestis*, 2) *Y.*

enterocolitica, 3) *Y. pseudotuberculosis* がある。2) と3) は, 人と動物に急性腸管感染症を引き起こし, これらを一般的にエルシニア症という。両菌種は, 哺乳類, 鳥類および爬虫類など75種以上の動物から検出されているが, 国内では圧倒的に動物の *Y. pseudotuberculosis* 感染症が多い。人では食中毒菌として *Y. enterocolitica* がよく知られている。

Y. pseudotuberculosis の血清型は, O抗原によって血清群1~15型に分けられ, さらに, 血清群1, 2, 4および5には数亜群あるため, 21の血清群がある。うち, 病原性があるのは血清群1~6群および10群の7つである。なお, 血清型によって病原性に差はない。

エルシニア属細菌は、冷たくきれいな水の中（井戸水、清水）で生存する。しかし、自然環境中では、他の細菌と競合して長く生きられない（ドブ水などでは生息不可）。このため、土壌を長く汚染することはない、保菌動物により維持されると考えられている。

冬季、春季の流行は、このようなエルシニア属菌の性状と冬期に熱帯産動物の抵抗性が低下することに関係している。

②動物への病原性：サル類は、一般に *Y. pseudotuberculosis* に対して高感受性で、欧米および日本で、多くの集団発生報告があり、国内飼育下のサルにおける発生状況は、ロリス科ショウガラゴ、オナガザル科サバンナモンキー、マントヒヒ、スーテイマンガベ、ブラッサモンキー、パタスモンキー、マンドリル、クロザル、オマキザル科フサオマキザル、リスザル、テナガザル科シロテナガザル、フクロテナガザル、オラウータン科チンパンジー、オランウータンなど多くのサルの死亡例があり、自験例10施設のうち9施設が集団発生である。（Fig. 3, 4）

③流行パターン：周期的に流行が起きている施設が多く、飼育施設周囲に保菌動物が常時存在していることが伺える。リスザルの集団発生が一般的であるが、リスザル以外の動物にも発生する。

④血清型：4b型が最も多く7施設、1b型3施設、6と7型が各1施設であった。同じ施設でも、流行毎に血清型が異なることもあった。これは、飼育施設周囲に種々の血清型のエルシニアを保有する保菌動物が存在していることを示している。文献では3型、1b型、6型がリスザルから分離されている。

⑤エルシニア症とエルシニア属細菌の問題点：人獣共通感染症で、サル類のみならず、キャピバラ、マウラ、オオハシ、ニホンリス、ハイラックスなどにも流行し、広宿主域である。屋外・半屋外といった展示施設では、保菌動物の侵入を阻止することが困難であり、コントロールが難しい。このため、突発的あるいは反復流行する施設が多い。*Y. pseudotuberculosis* のみならず、*Y. enterocolitica* O8（強毒株）の集団発生も国内で起きている。

2) 結核

人型結核 (*Mycobacterium tuberculosis*) は、人への感染性が高く、人をレゼルボアとする。このため、動

物の人型結核症の感染には、何らかの形で人が関与している。結核が疑われる症例の剖検に際しては留意する必要がある。

ここでは、危険性の高い高病原性結核菌群について紹介する。

① *Mycobacterium tuberculosis* complex：結核菌群（高病原性）としては、*M. tuberculosis*（ヒト）、*M. bovis*（ウシ）、*M. africanum*（ヒト）、*M. microti*（ハタネズミ）、*M. canetti*（ヒト）がある。*M. tuberculosis* と *M. bovis* は特に高病原性で、遺伝子が99.5%一致する。*M. tuberculosis* がナイアシン strip 試験陽性で、硝酸塩還元能を持つなどの生物学的性状と遺伝子で同定する。非結核性抗酸菌としては、*M. avium*、*M. intracellulare*、*M. kansasii* などがある。

②診断法

a. ツベルクリン反応：発病者と接触後6週間以上経た時点で実施する（4週間で免疫反応が成立する）。

結核菌感染とBCG接種の反応と区別できない。さらに非定型（非結核性）抗酸菌症の感染と区別できない。特異性や感度は思ったほど高くない。特にオランウータンなどの類人猿に用いるときには、接種量の検討や非特異的な反応に注意する必要がある。

b. インターフェロン γ 全血測定法：現在、医学領域で注目されている方法。動物への応用が検討されている。

c. 胸部レントゲン検査（暴露後6ヶ月以上で陰影）

d. 喀痰検査（直接塗抹、培養、PCR法）

③結核菌の特徴

a. 消毒薬、乾燥や低温に抵抗性

b. 感染力が強い（10個程度の吸引で半数の人を発症させることができる）

c. 空気感染（飛沫感染ではない）

④人型結核菌が分離された動物：霊長類；ゴリラ、オランウータン、チンパンジー、ニホンザル、カニクイザル、アカゲザル、キツネザル、コロブス、フサオマキザル。草食獣；ゾウ（アメリカでは定期的に検査）、サイ、バク、ロッキーマウンテン山羊、鹿、オリックス、アダックス。その他；ハイラックス、イノシシ。肉食獣；犬、猫、海獣。オウム・インコ類など多種類に及ぶ。

5. 野生動物の感染症

—スズメ (*Passer montanus*) の *Salmonella enterica* serovar Typhimurium 感染症—

2005年12月から2006年5月までの間に、北海道札幌市、旭川市、登別市、苫小牧市、室蘭市などで、例年にはない数のスズメの斃死体が見つかった。当時、これらの地域ではスズメの個体数が少なくなったことや、餌台に来るスズメが弱って死亡することなどが報告さ

れていた。道庁によると回収された死体の数は、2006年7月末までに、1517羽に達したが（Fig. 5）、他の種類の野鳥の集団死はみられず、5月以降、スズメの死体はほとんど発見されなくなった。過去、国内でこのようなスズメの大量死の報告がなく、情報が不足し

ていたこともあって、当初、諸機関が調査を実施したが、大量死を説明できるような原因を見出すことはできなかった。

しかしながら、海外に目を向けると、1955年スイスで最初に *Salmonella enterica* serover Typhimurium (ネズミチフス菌) によるスズメの大量死が確認・報告されてから、欧米諸国では、この細菌によるスズメの大量死が数多く報告されている。そこで、筆者は、北海道スズメネットワークより、大量死の起きていた時期および地域で回収されたスズメの死体の提供を受け、精査したところ、かなりの確率で *Salmonella enterica* serover Typhimurium を検出し、かつ典型的な病理像を確認した (Fig. 6)。さらに、翌年の2007年極寒期に、前年に大量死が起きていた地域で、小規模の流行があり、このときに回収した死体すべてに典型的な病理像を認め、かつ *Salmonella enterica* serover Typhimurium を分離、培養した。このことから、北海道のスズメの大量死の主たる原因を *Salmonella enterica* serover Typhimurium と特定した。さらに、細菌の指紋といわれるファージ型 (DT) を型別したところ、今まで国内で、人を含めて家畜から分離されたことのない DT40 であることを明らかにした。この項では、スズメの *Salmonella enterica* serover Typhimurium 症について解説する。

1) 種類：サルモネラには2菌種あり、さらに、多くの血清型があるが、人への病原性が高く、食中毒菌として問題になっているのは、主として腸炎菌 (*Salmonella* Enteritidis：ゲルトネル菌ともいう) やネズミチフス菌 (*Salmonella enterica* serover Typhimurium) である。一般的に病原性はネズミチフス菌の方が強い。

2) フィンチの大量死の原因：フィンチ類、特にスズメの大量死の原因として、イギリス、北アメリカ、ノルウェー、カナダ、ニュージーランドなどで *Salmonella enterica* serover Typhimurium が注目されている。流行地域では、スズメの生息数が激減し、ロンドンでは、25年間にフィンチ類の95%が減少したとされている。フィンチ類はサルモネラに高感受性である。

3) 人獣共通感染症：サルモネラは食中毒菌として良く知られている。我が国では *Salmonella enterica* serover Enteritidis による食中毒が主体で、ニワトリに関連する食品が原因となることが多い。これに比較すると *Salmonella enterica* serover Typhimurium の感染症は少ないが、現在も患者は毎年発生している。いずれにしても感染源は食品であり、野鳥に関連する胃腸炎の報告は見当たらない。しかしながら、2001年にニュージーランドで、発生数の少ない *Salmonella enterica* serover Typhimurium 感染症患者が急増し、疫学調査により、サルモネラで死亡したスズメに関係

することが報告された。

4) 家畜への影響

Salmonella enterica serover Typhimurium 感染症：1991～2003年にかけて、国内各地で各種動物 (ダチョウ、水禽、牛、豚、山羊、アイガモ、鶏、ウズラ、カラス) 計55件の *Salmonella enterica* serover Typhimurium 感染症の報告がある。しかし、野鳥が感染源として証明されたものはない。

海外では、スズメの *Salmonella enterica* serover Typhimurium に起因するアヒルやウズラの致死例が発生し、産業動物への伝播が危惧されている。実際、今回の北海道の大量死に際して、スズメの大量死が起きていた登別の、黒毛和種繁殖農家で、斃死した牛や環境中から分離された *Salmonella enterica* serover Typhimurium の培養性状とパルスフィールド電気泳動法パターンがスズメのそれと一致した。スズメは、餌を求めて至る所に出没するため、スズメが *Salmonella enterica* serover Typhimurium で大量死している場合、そのエリアのスズメの保菌率が高い上、大量に排菌している可能性が高い。周囲の環境や動物が大量の菌に暴露されると、感染率・発症率・致死率とも上昇することから、「スズメは *Salmonella enterica* serover Typhimurium の増幅動物」と考えられ、十分な注意が必要である。

5) 宿主域とその特徴：広域、人を含む哺乳動物、鳥類、爬虫類、両生類など多くの動物の腸管内から検出され (野鳥の保菌率は低い※1)、人畜共通感染症を引き起こす。感受性が動物種によって異なり、感染しても全ての動物が発症せず、保菌動物として無症状の動物も多い。人はある程度の菌量が摂取されれば、健康な成人でも発症する。免疫システムが未熟あるいは低下した動物では重篤化しやすい。

※1：2004年宮城県の調査：カラス43、ハト11、キジ6、白鳥6、ツグミ4、ヒヨドリ3、ホオジロ3、スズメ2、セキレイ2、ムクドリ1、サギ2、カモ2、アヒル1、シギ1、フクロウ1、計15種88羽のうち *Salmonella enterica* serover Typhimurium が3検体 (カラス、キジ、サギ) (3.4%)。1998年愛知県の調査：ドバト114、キジバト38、ムクドリ3、カラス1計153羽のうちドバト11羽から *Salmonella enterica* serover Typhimurium を分離 (7.2%)。

6) 感染方法：経口感染。通常、糞中に排菌されたサルモネラに汚染された食品や水が感染源となる。

7) 症状：人の場合、潜伏期は通常5～72時間で、平均約15時間。発熱 (38～40℃)、腹痛、水様便が継続し、通常1週間程度で回復する。症状の程度は個体およびその他の各種の条件によって異なり、死亡率は0.1～0.2%で、死因は内毒素によるショックである。死亡例は高齢者および小児に多い。経過は通常1～4日である。ブンチョウを用いた感染実験では、接種後20日以内に死亡する。鳥の種類によって経過は多様と

考えられる。

8) 治療：サルモネラのみならず細菌性胃腸炎では、発熱、下痢による脱水の補正、腹痛など胃腸炎症状の緩和を中心に対症療法を行うのが原則である。強力な止瀉薬は除菌を遅らせたり、麻痺性イレウスを引き起こす危険があるので使用しない。解熱剤はニューキノロン薬と併用禁忌のものがある上、脱水を悪化させる可能性があり、できるだけ使用を避ける。抗菌薬は軽症例では原則使用しない。

9) 消毒・殺菌：熱に弱く、60℃、10～20分の加熱により死滅。一般の消毒薬で消毒可能。

10) 予防：鳥の捕獲などの際には、マスクを着用する。手袋装着が勧められるが、作業終了時の手洗い励行が重要。経口感染のため、水や食品の汚染が起きないようにする。

※以上、国立感染症研究所資料などを改変。

最後に、北海道で大量死したスズメ由来の*Salmonella enterica* serovar Typhimuriumのフェージ型は40であったが、この型は、イギリス、北米およびノルウェーのスズメ大量死事例で確認されている。どのようなルートで、国内に侵入したか定かではないが、海外から持ち込まれた病原体の可能性が高い。

6. おわりに

我が国には、様々な種類の動物が大量に輸入されており、専門家がこれらの動物の危険性について指摘していたが、実際の病原体保有率や、その危険性に対する科学的資料が乏しかった。しかし、各種輸入動物の病原体保有調査を継続することで、これらの動物の病原体保有率が明らかとなり、さらに、実際これらの動物を感染源とする人のレプトスピラ症の発生を経験し、輸入動物の危険性が科学的に実証された。このように感染源の特定にまで至る事例はきわめて稀で、輸入動物を介した病原体侵入のリスクを評価する目的で調査を実施していたことが、この事例の全容を解明できた主因であると思われる。

2005年9月から、我々の行なってきた調査結果を科学的資料として利用した輸入動物届出制度が施行された。この制度により、公衆衛生上リスクの高い野生動物の輸入が著しく制限され、全ての哺乳類と鳥類の輸入状況が把握できるようになった。このため、以前ほど容易かつ大量に生きた野生動物が輸入されることはなくなった。しかしながら、輸入される動物種は多少変わったものの、愛玩用動物（哺乳類と鳥類）の輸入は増加している。しかも、過去の輸入数が少なかった動物が注目され、多量に輸入されたりする事象が起きている。これらのことから、継続して輸入届出制度の目的の1つである「公衆衛生上のリスクが高いエキゾチックアニマルの輸入制限」が確実になされているかどうか検証する必要がある。また、爬虫類輸入に関しての法的規制はなく、現在、検疫・検査はされていない。

いずれにしても、現在も多数の動物が海外から輸入され続けている状況を鑑み、動物、特に愛玩用動物を介した動物由来感染症のコントロールのためには、今後もこのようなモニタリングを継続する必要がある。また、このような調査で得られた情報を迅速に、関係機関（輸入貿易商、ペットショップ、自治体など）に配信し、感染症拡大防止のための適切な動物の取り扱いを周知させる注意を喚起し、公衆衛生的、疫学的な対応を考えておく必要がある。

最後に、現在、飼育されている動物であっても、潜在的に保菌している病原体の顕化、あるいは、何らかのルートを介する病原体の侵入がいつでも起こりうることを想定して、情報を収集しておくと同時に、発見時の対処方法などを、予め検討しておくことが望まれる。



Fig. 1 輸入動物数の推移

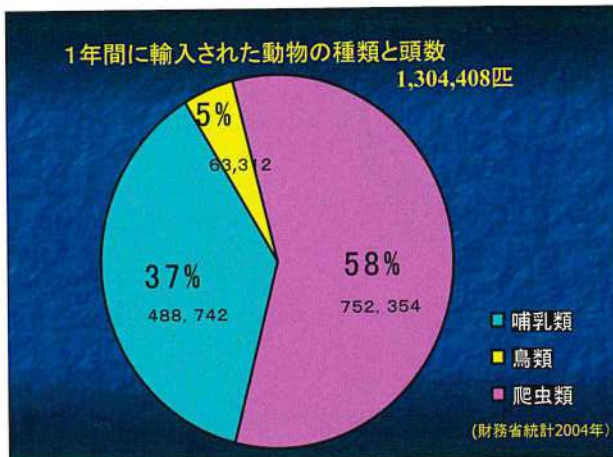


Fig. 2 1年間に輸入された動物の種類と頭数

Table 1 愛玩用齧歯類病原体保有状況

産地	種類	全頭数	皮膚						腸内容										血液					
			<i>S.aureus</i>		<i>A.aureus</i>		<i>Trichophyton mentagrophytes</i>		<i>Salmonella</i>		<i>Mycobacterium</i>		<i>Trichomonas wynnichi</i>		<i>Trichuris sp.</i>		coccidium		<i>Trypanosoma</i>		<i>Bartonella sp.</i>			
			陽性数	保有率	陽性数	保有率	陽性数	保有率	陽性数	保有率	陽性数	保有率	陽性数	保有率	陽性数	保有率	陽性数	保有率	陽性数	保有率	陽性数	保有率		
アフリカ・中近東	フトオアレチネズミ	15	5	33%	1	7%	1	7%	-	-	0/10	-	-	-	-	-	-	-	0/5	-	-	-		
	アレチネズミ	9	0	0%	1	11%	-	-	-	-	0/3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
	アフリカヤマキ	10	-	-	-	-	-	-	1	10%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
	アフリカチビネズミ	20	6	30%	2	10%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5	25%		
	ヒメミユビトビネズミ	8	-	-	8	100%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5	63%	
	オオミユビトビネズミ	16	-	-	9	56%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	13	81%	
	シナイネズミ	4	2	50%	4	100%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	カイロトゲマウス	29	25	86%	14	48%	1	3%	-	-	1/3	11%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0/20	-
	ハウスマウス	4	2	50%	-	-	-	-	-	-	0/3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	キンイロパイニーマウス	13	13	100%	2	15%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	ダブスタネズミ	11	10	91%	1	9%	-	-	-	-	-	-	-	-	7	64%	10	91%	-	-	-	-	-	-
	フサオジャール	10	5	50%	9	90%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ミミナガハリネズミ	10	10	100%	-	-	-	-	7	70%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
オオエジプトアレチネズミ	10	10	100%	9	90%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
ゼブラマウス	11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
アジア	ビグミージェルボア	69	21	30%	50	72%	4	6%	1	10%	-	-	-	-	-	-	1	1%	-	-	-	-	-	-
	バナリス	30	7	23%	1	3%	-	-	5	17%	0/10	-	-	-	-	-	-	-	0/20	-	-	19/20	95%	
	エリス	20	4	20%	2	10%	-	-	5	25%	0/10	-	-	-	-	-	-	-	0/10	-	-	-	-	
	タイリクモモンガ	26	7	27%	5	19%	-	-	6	23%	0/10	-	-	-	-	-	10	69%	3/16	19%	-	-	-	-
	シマリス	49	9	18%	1	2%	-	-	2	4%	1/10	10%	-	-	-	-	4	8%	-	-	-	10/19	53%	
	ダウリアハタリス	10	1	10%	-	-	-	-	3	30%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
北南米	リチャードソンリス	40	4	10%	-	-	-	-	4	10%	0/10	-	5	13%	-	-	13	33%	1/30	3%	8/10	80%		
	コロンビアリス	30	2	7%	-	-	10	33%	-	-	2/10	20%	-	-	-	-	19	63%	1/20	5%	-	-	-	
	ジュウサンセンリス	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	アメリカアカリス	19	4	21%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	17	89%	-	-	3/18	17%		
合計	522	187		117	17		34	4/94	5	10	102	5/101	58/132											

Table 2 国内における爬虫類に関連するサルモネラ症事例

血清型	原因爬虫類	患者の年齢、性別	症状	発生年	発生場所
S. Braenderup	ミドリガメ	1歳3ヶ月女児	胃腸炎	2005	千葉県
S. Paratyphi B	ミドリガメ	6歳2ヶ月女児	急性腸炎・敗血症	2005	千葉県
S. IV(45:g,zii:-)	イグアナ	生後27日男児	腸炎	2004	千葉県
S. Saintpaul	カメ	2ヶ月男児	胃腸炎	2004	秋田県
		3歳女児	胃腸炎		
S. Typhimurium	スッポン刺身	成人10人	胃腸炎	2004	秋田県
Salmonella (O7)	スッポン料理	0~75歳の男性5人、女性6人	胃腸炎	2004	愛媛県
Salmonella (O4)	ミドリガメ	62歳女性	敗血症性ショック	2003	宮城県
S. Urbana	ミドリガメ	5歳男児	中枢神経症状	2000	和歌山県
S. Typhimurium	スッポン刺身	13, 46, 47歳男性、43歳女性	胃腸炎	1993	広島県
S. Litchfield	ミドリガメ	生後10ヶ月男児	胃腸炎	1992	青森県
S. Litchfield	ミドリガメ	2歳男児	胃腸炎	1987	福岡県
S. Itami	ゼニガメ	小学生	胃腸炎	1986	石川県
S. Paratyphi B	ミドリガメ	70歳女性、7歳男児	胃腸炎	1985	福岡県
S. Muenchen	ミドリガメ	5歳女児	胃腸炎	1975	広島県
S. Typhimurium	ミドリガメ	5歳男児	胃腸炎	1975	広島県

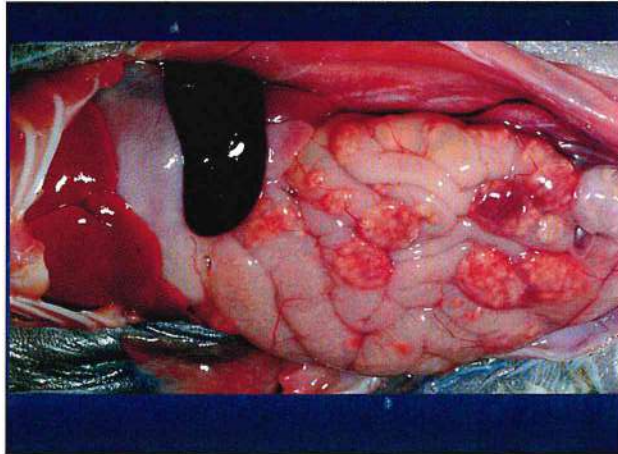


Fig. 3 リスザルのエルシニア症
小腸パイエル板に一致する偽膜性壊死性病変

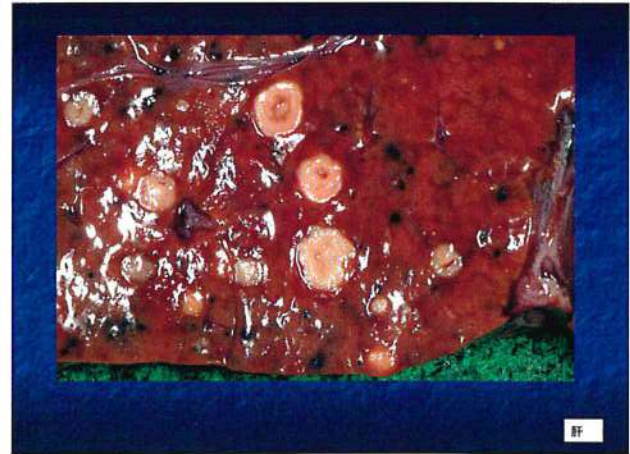


Fig. 4 オラウータンのエルシニア症
肝臓の多発性小膿瘍

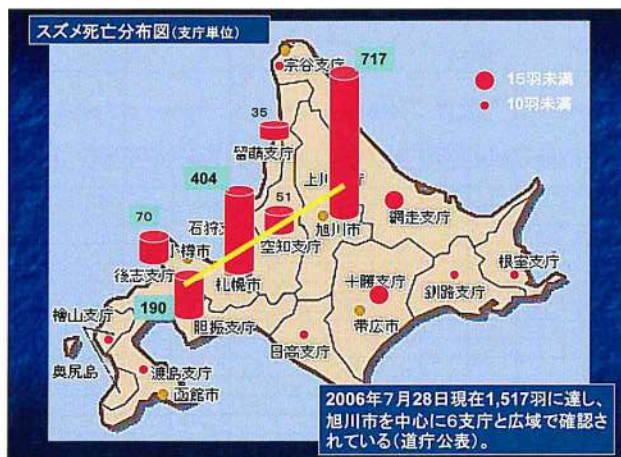


Fig. 5 北海道スズメ死亡分布図

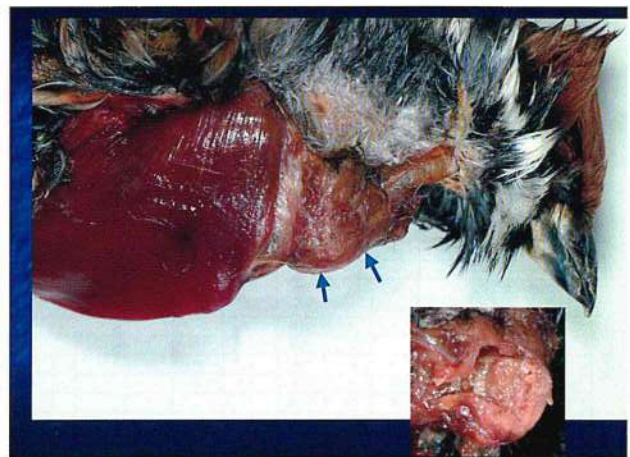


Fig. 6 スズメの*Salmonella enterica* serovar Typhimurium 症
壊死性そ嚢炎(矢印)。挿入はそ嚢剖面

ORIGINAL ARTICLE

A STUDY OF -80°C CRYOPRESERVATION OF CANINE ERYTHROCYTES BY
USING HYDROXYETHYL STARCH(HES)

Yasuho TAURA¹⁾, Jun ISHII¹⁾, Munekazu NAKAICHI¹⁾, Kazuhito ITAMOTO¹⁾, Kenji TANI¹⁾
Heejaung KIM¹⁾, Yota SUGIMOTO¹⁾, Adel Mohamed Sayed Ahmed AL AKRAA¹⁾
Yasuhiko OKAMURA¹⁾, and Sajio SUMIDA²⁾

1) *Department of Veterinary Surgery, Faculty of Agriculture, Yamaguchi University, 1677-1
Yoshida, Yamaguchi-shi 753-8515, Japan*

2) *Sumida Laboratory of cryomedicine and Blood Transfusion,
2-11-6 Ginza, Chuo-ku, Tokyo 104-0061, Japan*

[Received for publication : December 25, 2007]

ABSTRACT

In human medicine the freezing of erythrocytes at -196°C is already practiced. In this study the freezing of erythrocytes at -80°C was examined and the possible application of it in veterinary clinical medicine was pursued.

The washed and concentrated erythrocytes were mixed with the equal volume of cryoprotective solution, which contains 10%~40% (W/V) hydroxyethyl starch (HES) and 60 mmMol/liter-NaCl. The mixture was put into plastic bags of vinyl chloride, and quickly frozen to -196°C in liquid nitrogen. They were transferred to a -80°C deep freezer, and preserved for 24 hours. After thawing, HES groups were washed one time, while GL group was deglycerolized. The effect of storage temperature on the frozen erythrocytes was evaluated by measuring hemolysis and osmotic fragility. The recovery rates of HES groups, that is, 10%, 20%, 25%, 30%, and 40% HES, were 65%, 86.2%, 87%, 88.9%, and 85.6%, while the recovery rate of GL groups was 84.4%. The frost damage protective ability of HES was not different from that of GL. The increase of osmotic fragility was noticed. It was considered, however, that the damage of the erythrocytes, which was caused by the formation of ice crystals associated with temperature change, was small.

In case HES is used as a cryoprotective solution, a process such as deglycerolization is necessary. It was suggested that a large quantity of dog erythrocytes could be cryopreserved at -80°C .

INTRODUCTION

In veterinary medicine, just like in human medicine, blood transfusion is indispensable as a treatment of diseases, when a large amount of blood is lost, such as bleeding at the time of an operation, traffic accidents, declining of blood production, reduction of other blood components, and progressive blood destruction. In spite of such circumstances, veterinary medicine is far behind human medicine regarding blood preservation^{2, 3, 7, 8, 14, 17, 19, 21}. Therefore, it is important to investigate the cryopreserved dog red blood cells in veterinary medicine. The advantages of cryopreservation include the extended time and the condition of preservation. While the blood is preserved for about one month in liquefied preservation, it is possibly preserved for years in cryopreservation^{13, 23, 24}.

The deterioration of the blood preserved in liquid state is rapid and considerable. On the other hand the deterioration of the blood preserved at -80°C is slight²⁴. Furthermore, it is demonstrated that the erythrocytes may be cryopreserved for 20 to 30 years¹⁵. There are only a small number of reports on the cryopreservation of dog RBC by using a cryoprotectant, such as glycerol (GL).

Some major concerns of cryopreservation include the physical destruction of cell structure by growth of crystals, change of electrolyte solution and pH, precipitation of protein in the concentration solution by drying, and disappearance of structure water²⁴.

Acryoprotectant is used to avoid destruction of cell structure during freezing. Intracellular protectants can pass through erythrocytes cell membrane freely because of low molecular weight, while extracellular protectants cannot pass through the cell membrane because of the amount of high polymers. The former includes GL, Dimethylsulfoxide (DMSO), and Ethyleneglycol (EG), while the latter includes Hydroxyethyl starch (HES), Polyvinyl pyrrolidone (PVP), Polyglycol, and Dextran.

In GL, which is widely used as an intracellular protectant, hemolysis results from inadequate deglycerolization after thawing, because of the characteristic of the action and the toxic effect by GL itself¹⁾.

On the other hand, HES is degraded in the body by alpha-amylase and used as carbohydrate⁶⁾. Because of its character, the exposure of erythrocytes preserved by HES to physiological saline is harmless. When HES is used as a cryoprotectant, therefore, it is expectable to eliminate the complicated operation of washing after thawing.

We can find several reports on the cryopreservation of human erythrocytes^{14, 19, 20)}, including a clinical test¹⁸⁾. It is expected that HES can be used as a method of transfusing with no post-thaw washing. But we can find only a few reports^{17, 21)} about the possibility of the cryopreservation of canine erythrocytes. The possibility of the -196°C cryopreservation using HES is admitted by a research of autotransfusion. In order to be applied to veterinarian clinical medicine, however, safer cryopreservation and a larger volume of erythrocytes are needed. The purpose of this study is to examine the possibility of freezing a large quantity of dog erythrocytes at -80°C .

MATERIALS AND METHODS

Donor dogs :

Blood was collected from 10 healthy dogs, which were bred at Yamaguchi University, Faculty of Agriculture, Veterinary Medicine, Livestock Surgery Classroom. Prior to blood collection, physical and blood examinations of them were conducted, and they were in normal state. The weights of the dogs were from 7.4 to 17.2kg, and their ages were from 2 to 5 years. Blood was sterilely collected from a cervical vein. As anticoagulant, CPD was added at the rate of 12.2V/V%.

Washing of blood :

The collected blood samples were poured into 50ml plastic test tubes. The plasma was separated by centrifugation at 3,000 rpm at 4°C for 5 minutes. The same volume of physiological saline was added to the separated blood. They were subsequently mixed well, and the supernatant fluid was removed after centrifugation at 3,000 rpm at 4°C for 5 minutes. After the centrifugation was performed three times, the value of hematocrit (Hct) was adjusted to approximately 80%.

Cryopreservation at 10%, 20%, 25%, 30%, and 40% (W/V) HES :

Each HES solution consists of 10wt%, 20wt%, 25wt%, 30wt%, and 40wt% HES, and 60 mmol NaCl/liter. The washed RBC (Hct=80%) was mixed with the equal volume of HES solution. The mixtures were poured into freezing bags (CPL99 Plastic Charter Med Inc.) (each 5%, 10%, 12.5%, 15%, and 20% W/V of final HES concentration). They were kept for 15 minutes, and placed in an aluminum container. They were then submerged into the liquid nitrogen in which rapid freezing was carried out. They were kept in a -80°C deep-freezer for 24 hours.

Thawing :

In order to prevent blood from being destroyed by the recrystallization during warming, the mixtures were quickly transferred to the warm water of 43°C , well shaken, and thawed in less than 3 minutes. The thawed erythrocytes were mixed with the equal volume of physiological saline, and separated by centrifugation at 3,000 rpm at 4°C for 10 minutes. The remaining packed cells were used as HES erythrocyte solution.

Cryopreservation at 30W/V% GL :

The method introduced by Sumida et al.²⁵⁾ was applied to the composition and the freeze method of GL : 30% (W/V) glycerol solution (SF-30 (which consists of 30W/V% GL and 2.0 W/V% mannitol, 0.64 W/V% NaCl,

2.0W/V% sorbitol) was used. The washed RBC (Hct=80%) was mixed with the equal volume of GL solution. The mixture was poured into a freezing bag (CPL99 Plastic Charter Med Inc.) (15W/V% of final GL concentration). It was kept for 35 minutes, and placed in an aluminum container. It was then submerged into the liquid nitrogen where the rapid freezing was carried out. It was kept in a -80°C deep-freezer for 24 hours.

Thawing :

In order to prevent RBC from being destroyed by the recrystallization during warming, the bag was well shaken in the warm water of 43°C , and thawed in less than 3 minutes. As GL is an intracellular cryoprotectant, deglycerolization was performed after thawing.

Deglycerolization :

The 30 ml of GL was thawed, the blood was poured into a 50 ml plastic test tube, and the supernatant fluid was removed by centrifugation in 3,000 rpm at 4°C for 5 minutes. Then 1.5 times of 3.5% saline solution was added, and the supernatant fluid was removed by centrifugation in 3,000 rpm at 4°C for 5 minutes. After that, 1.5 times of 0.9% saline solution was added, and the supernatant fluid was removed by centrifugation in 3,000 rpm at 4°C for 5 minutes. The same operation was repeated one more time by using 0.9% saline solution. The packed cells were used as the deglycerolized GL erythrocytes solution.

Experiment groups :

The experiment groups were classified into 7 (seven) groups, that is, HES (10%, 20%, 25%, 30%, and 40%W/V), GL, and the control group. The sample number of each group was 5 dogs. The osmotic fragility test of the control group was conducted immediately after blood collection, and its recovery rate was measured after it was preserved at $+4^{\circ}\text{C}$ for 24 hours.

Measurement :

[1] Recovery rate : The ratio of the quantity of hemoglobin of the packed cells and the amount of hemoglobin lost in the supernatant fluid was calculated as the hemoglobin recovery rate. It was used as an index, which shows the damage on erythrocytes caused by the freezing and thawing. The recovery rate was calculated from the following formula using the hemoglobin value²⁵⁾.

$$\text{Recovery rate} = 100 \times \text{①} / (\text{①} + \text{②})$$

① : Hemoglobin concentration of the packed cells after centrifugation x Amount of the packed cells.

② : Hemoglobin concentration of supernatant fluid after centrifugation x Amount of supernatant fluid.

To measure hemoglobin, the hemoglobin measure indicator (hemoglobin B-test wako) was used.

[2] Osmotic fragility test : An osmotic fragility test was carried out on the basis of the basic research. Osmotic fragility was determined by adding 0.02 ml of blood solution to 5.0 ml of buffered NaCl solution in concentration ranging from 0.1 to 0.85%, and to 5.0 ml of distilled water. The contents were mixed, and allowed to stand at 37°C for 30 minutes. The tubes were centrifuged at 3,000 rpm for 5 minutes. The supernatant fluid was transferred into another set of tubes. The hemoglobin content of the supernatant fluid was determined spectrophotometrically at $546 \text{ m}\mu$. The percentage of hemolysis was calculated, assuming hemolysis in the biggest absorbance to be equal to 100%. Also, the normal value of the dog was decided by using the new fresh blood of the five healthy dogs.

Statistical analysis : The results present the mean value \pm standard deviation. Significant statistical difference was analyzed by t-test.

Difference by $p < 0.05$ was considered significant.

RESULTS

〔1〕 Recovery rate :

The recovery rates of the HES groups of 10%, 20%, 25%, 30%, and 40% were $65.01 \pm 2.09\%$, $86.15 \pm 3.60\%$, $86.99 \pm 2.93\%$, $88.93 \pm 1.90\%$, and $85.61 \pm 6.33\%$, respectively. The recovery rates of the control group and GL group were $100 \pm 0\%$ and $84.41 \pm 5.16\%$. Between 10% HES group and the other HES groups, a significant difference of recovery ($p < 0.05$) was observed.

〔2〕 Osmotic fragility test :

There are relations between the osmotic fragility of erythrocytes and the geometrical structure. Osmotic pressure causes expansion, hemolysis, the change of membrane permeability, and damage, which result in the termination of structure maintenance. In order to find out the damage of erythrocytes during cryopreservation, an osmotic fragility test was carried out. The results of the tests of the control group, every HES group, and GL group are shown in Fig. 1 to Fig. 3. Compared with the mean value measured by using the new fresh blood of the five healthy dogs clinically, in all the HES groups and GL group, the curve of the graph moved to the left. This shows that the osmotic fragility increased. In addition, the concentration of NaCl producing 50% hemolysis is one of evaluation methods which determine the degree of the damage of erythrocytes membrane. The concentration of NaCl producing 50% hemolysis was measured by using a regression line which was made from the NaCl density of the front and back 2 points of the concentration of NaCl producing 50% hemolysis. The results were as follows : the control group ; 0.37%, 10% HES group ; 0.46%, 20% HES group ; 0.43%, 25% HES group ; 0.42%, 30% HES group ; 0.43%, 40% HES group ; 0.49%, and GL group ; 0.50%. In comparison with the osmotic fragility value in the control group, the values in every HES group and GL group increased rather significantly. In comparison with GL group, 10%~30% HES showed fine results significantly.

DISCUSSION

The preservation of blood in the liquid state is useful, but it is generally limited up to 21 days. Many attempts have been made to extend the preservation period of blood in the liquid state. So far, a method of preserving blood in the liquid state for a prolonged time has not been established, though. At present cryopreservation is the sole method which enables preservation of the red blood cells for a prolonged period.

Blood transfusions are performed in the field of veterinary medicine. However, unlike those in human medicine, neither the blood donation system nor the blood bank is established. Accordingly, the needed amount of blood is not always available, and the less chance is to prepare the fresh blood of the matching type or the liquefied preservation blood. At the time when a transfusion is performed, some crucial issues must be considered, which include how to avoid infection or immunity antibody, and how to prevent side effects or the isoimmunization in case of a rare blood type. Unfortunately the present situation is far from being satisfactory to deal with the cases which need an autotransfusion.¹⁰⁾

Even when the blood transfusion to animals is necessary due to their chronic anemia or other long-term medical treatment, an autotransfusion cannot be applied clinically, because the period of the conventional refrigeration preservation of blood is no more than 21 days. It is supposed that cryopreservation has the advantage of the period of storage and the state of cells. It is reported that the preservation as long as 37 years is not impossible^{13, 23, 24, 25, 26)}. When red blood cells are kept under -80°C (especially at -196°C), the structure is retained in the normal range and the deterioration is minor²⁵⁾. They are suited to the prolonged preservation.

The protection mechanism of glycerol used in human medicine is as follows. Water, which participates in the formation of ice crystals by carrying out a hydrogen bond, is decreased, and the formation of ice crystals is restricted. The intra-extra-cellular liquid decreases, the hydration of the surface of cells is stabilized, and the cells are protected from the damage caused by saline water and mechanical destruction according to colligative effect²⁴⁾. In short, glycerol osmotically replaces the intracellular water, and allows the cells to freeze without dehydration. The cells prepared in such a manner are hyperosmolar with respect to the intravascular environment. They must be deglycerolized before transfusion.

Hydroxyethyl starch (HES) is classified into an extracellular (non-penetrating) cryoprotective additive. In contrast to glycerol, as a plasma substitute, HES offers the advantage of being a nontoxic, biodegradable compound. There are various opinions about the process of freeze protection. One opinion is that the holes on the surface of the cell membrane are closed by HES, so that the cells are protected from the ice crystals. Another opinion is that the dehydration of the cells prevents the growth of the ice crystals, which results in the prevention of frost damage²⁴⁾.

It is reported that quick freezing is effective for the cryopreservation of human erythrocytes, as well as the quality of the cryoprotectant of the blood platelet^{16, 21, 22, 24)}. It is necessary to freeze them quickly and control the molecular movement, because the extracellular (non-penetrating) cryoprotective effect of HES is weak.

HES, which is the polysaccharide of molecular weight 10^4 to 10^5 , is biodegraded by alpha-amylase in the body, and is used as carbohydrate⁶⁾. There is still less antigen⁹⁾, so clinical application is carried out with PVP or Dextran as a plasma expander^{9, 11)} at the time of bleeding. The frozen erythrocytes by HES may be transfused without washing after thawing²⁰⁾, because they are not hemolyzed by direct exposure to physiological salt solution. The licensed drug hydroxyethyl starch (HES) offers the advantage of being a nontoxic, biodegradable cryoprotectant, and plasma substitute.

When GL is used as a cryoprotectant, the cryopreserved blood cannot be transfused immediately after thawing. GL must be washed in sterile solution and removed first. If deglycerolization is inadequate, hemolysis will occur and GL toxicity will be suspected¹⁾. RBC frozen with HES can normalize oxygen transport and blood volume loss in case of extended hemorrhage. For this reason the cryopreserved erythrocytes with HES can be transfused after thawing without washing. And HES may be suitably used for cryopreservation of dog erythrocytes. Attempts have been made to use HES for a cryoprotectant as an alternative to glycerol. It is reported that a small quantity of canine erythrocytes was used with HES as a cryoprotectant and that the possibility of large units of RBC cryopreservation in -196°C was examined⁵⁾. However, the demerit of the cryopreservation in liquid nitrogen is to damage the freezing bag at the time of thawing. In this study, therefore, the cryopreservation in the -80°C deep-freezer was conducted in order to establish a safer cryopreservation. The recovery rate is an important Guideline which determines the usefulness of the cryopreservation of erythrocytes. When fresh blood is used for cryopreservation, the recovery rate after thawing is high²³⁾. In this experiment 10% HES group showed a significantly lower value ($P < 0.05$) than the other HES groups. It is conceivable that the density of HES was too low to defend erythrocytes from frost damage. The existence rate within a vital body is another important guideline that shows the usefulness of erythrocytes. The existence rate within the living body is measured with ⁵¹Cr method. With this ⁵¹Cr method the blood transfusion effect index is decided by the product of the collection rate and the erythrocytes existence rate of 24 hours after the blood transfusion²³⁾.

The cell membrane of erythrocytes is tender, but it lacks elasticity. It will explode, therefore, if the amount of water taken in erythrocytes exceeds the critical capacity. The osmotic fragility in cryopreservation of erythrocytes rises by ice crystals which are formed inside and outside the cells of the frozen erythrocytes. A hole on erythrocytes membrane bigger than the diameter of 64 Å of a hemoglobin molecule may bring about some sort of damage on erythrocyte membrane, such as the direct escape of hemoglobin after thawing. Moreover, damage may happen by the decrease of the membrane function brought by the reduction of ATP of erythrocytes after freezing-thawing.

The consequence is the possible increase of the osmotic fragility and hemolysis¹²⁾. A judgment standard is the concentration of NaCl producing 50% hemolysis. In this experiment the osmotic fragility increased in HES groups and GL group more than in the control group. The decline of the membrane function by the decrease of ATP in erythrocytes after freezing-thawing was conceivable as one factor. It was also conceived that the membrane of erythrocytes was simultaneously damaged by the formation of the ice crystals associated with freezing. However, the osmotic fragility is influenced by both exogenic factors (pH, temperature, oxygenation) and intrinsic factors (age of the animal, kind, lipemia, aging of erythrocytes)¹²⁾. According to Jain⁵⁾, the range and the mean values for the osmotic fragility of erythrocytes for the dog were 0.36 to 0.48, and 0.43. Judging from the concentration of NaCl producing 50% hemolysis of each HES group, it was conceivable that the degree of the damage to the membrane of the red blood cells was not so great. The osmotic fragility of 30%GL group increased more than that of HES groups. In human medicine usually cryopreservation at -80°C is carried out with the slow freezing method by using 60%GL. In our experiment it was carried out with the rapid freezing method using 30%GL. It is indicated,

however, that sufficient protection ability is not obtained by freezing at -80°C if 30%GL is used. It is said that there is some correlation among the osmotic pressure of erythrocytes, the physical fragility abnormalities, and the life shortening of erythrocytes¹²⁾. Therefore, in case that the red blood cells frozen with HES are applied to clinical medicine, the possibility of the life shortening of erythrocytes will remain, because the increase of the osmotic fragility of erythrocytes is admitted. In this experiment the possibility of freezing at -80°C using 20%HES~30%HES was examined. As a complicated process, such as deglycerolization washing after thawing, is unnecessary, the transfusion becomes less difficult. In addition, at the time of thawing, cryopreservation at -80°C is safer than that at -196°C . If the cryopreservation method of freezing at -80°C is completely established, various applications of it will be expected in veterinary medicine.

ACKNOWLEDGMENT

The authors sincerely appreciate the guidance and support extended by the staff of the Department of Veterinary Surgery, Faculty of Agriculture, Yamaguchi University.

REFERENCES

- 1) Cregan P., Donegan E., Gotelli G.: Hemolytic transfusion reaction following transfusion of frozen and washed autologous red cells. *Transfusion* 31 : 172~175, 1991
- 2) Chavey P.S., Andrews G.A., Smith J.E.: A Method for freezing canine erythrocytes for blood typing purposes. *Veterinary Clinical Pathology* 23 : 43~45, 1994
- 3) Contreras T.J., Lindberg J.R., Lowrie G.B., Pivacek L.E., Austin R.M., Vecchione J.J., Valeri C.R.: Liquid and freeze preservation of dog red blood cells. *Transfusion* 19 : 279~292, 1979
- 4) Inayoshi H., Taura Y., Sakonju I., Kanoe M., Nakaichi M., Nakama S.: Cryopreservation of dog red blood cells using hydroxyethyl starch (HES). *Journal of the Japan Veterinary Medical Association* 51,3 : 147~152, 1997 (in Japanese)
- 5) Jain N.C : Osmotic Fragility of erythrocytes of Dogs and cats in health and in certain hematofogic disorders. *Cornell Vet.* 63 : 411~423, 1973
- 6) Knorpp C.T., Merchant W.R., Gikas P.W., Spencer H.H., Thompson N.W. : Hydroxyethyl starch : Extracellular cryophyllactic agent for erythrocytes. *Science* 157 : 1312~1313, 1967
- 7) Langer R., Albrecht R., Hempel K., Krug S., Sputtek A., Steigerwald R., Trenkel K., Henrich H.A.: Characterization of 24 hour survival rate and duration of survival of hydroxyethyl starch cryopreserved erythrocytes after autologous transfusion in the dog. *Infusionstherapie und Transfusionsmedizin* 21(6) : 393~400, 1994
- 8) Longer R., Korn W., Schmid H., Sputtek A., Stegerwald R., Trenkel K., Rau G., Henrich H.A.: Studies on functional acceptability of autologous with hydroxyethyl starch (HES) cryopreserved erythrocytes in dogs. *Clin. Hemorheol* 12 : 476, 1992
- 9) Maurer P.H., Berardinelli B.: Immunologic studies with hydroxyethyl starch (HES) . *Transfusion* 8 : 265~268, 1968
- 10) Miwa S.: Guideline of transfusion therapeutics. *Clinical pathology* N0. 88, 1991
- 11) Rowe A.W., Eyster E., Keller A.: Liquid nitrogen preservation of red blood cells for transfusion. *Cryobiology* 5 : 119~128, 1968
- 12) Sonoda M., Ichijo S.: *Veterinary hematology II*. Ishiyaku Publication Co., Ltd.,: 403~443, 1979 (in Japanese)
- 13) Spieles G., Kresin M., Heschel, Rau G.: A phase diagram for erythrocytes cryopreserved in Hydroxyethyl starch solution. *Cryobiology* 32 : 545, 1995
- 14) Sputtek A., Bacher C., Langer R., Kron W., Henrich H.A., Rau G.: Cryopreservation of human erythrocytes with hydroxyethyl starch...Part 2 : Analysis of survival. *Infusionstherapie und Transfusionsmedizin* 19(6) : 276~282, 1992
- 15) Sputtek A., Barthel B., Rau G.: Cryopreservation of human platelets : An in vitro comparison of a 4% HES method with the standard 5% DMSO method. *Cryobiology* 30 : 656~657, 1993

- 16) Sputtek A., Kober C.h., Bacher C.h., Rau G.: Further improvement of human red blood cells with Hydroxyethyl starch. *Cryobiology* 25 : 523, 1988
- 17) Sputtek A., Langer R., Schmid H., Steigerwald R., Trenkel K., Kron W., Henrich H.A., Korber C., Rau G.: Cryopreservation of erythrocytes with hydroxyethyl starch. In vitro results leading to an autologous retransfusion model in the dog. *Beitrage zur Infusionstherapie* 30 : 292~296, 1992
- 18) Sputtek A., Meuser D., Kuehnl P.: A method for freezing red blood cells for transfusion using Hydroxyethyl starch. *Cryobiology* 32 : 544~545, 1995
- 19) Sputtek A., Rau G.: Cryopreservation of human erythrocytes with hydroxyethyl starch...Part 1 : The procedure. *Infusionstherapie und Transfusionsmedizin* 19(6) : 269~275, 1992
- 20) Sputtek A., Sensendorf H., Fruend V., Birmanns H., Kuehnl P.: Successful transfusion of previously frozen autologous red blood cells without post-thaw washing. *Cryobiology* 31 : 584~585, 1994
- 21) Sputtek A, Schmid H, Henrich HA, Korber C.h., Rau G.: Cryopreservation of dog red blood cells (DRBC) with Hydroxyethyl starch (HES) for autologous retransfusion as an animal study. *Cryobiology* 28 : 546, 1991
- 22) Sputtek A., Singbartl G., Schleinzner W., et al : Autologous transfusion of human erythrocytes cryopreserved with Hydroxyethyl starch (HES) in seven volunteers. *Cryobiology* 29 : 766, 1992
- 23) Sumida S.: Transfusion medicine in the new millennium-Kanehara Pub co., 2000 (in Japanese)
- 24) Sumida S.: Freezing red blood cells -The theory and Actual : 9~185, 1978 (in Japanese)
- 25) Sumida S., Watanabe T., Hayano Y.: Morphological and physiological integrity of red cells cryopreserved for 25 years. *Cryobiology* 32 : 544, 1995
- 26) Valeri CR., Ragno G, Pivacek LE., Cassidy GP, Srey R., Hansson-Wicher M., Leavy ME.: An experiment with glycerol-frozen red blood cells stored at -80°C for up to 37 years. *Vox Sang* ; 79 : 168~74, 2000

FIGURES

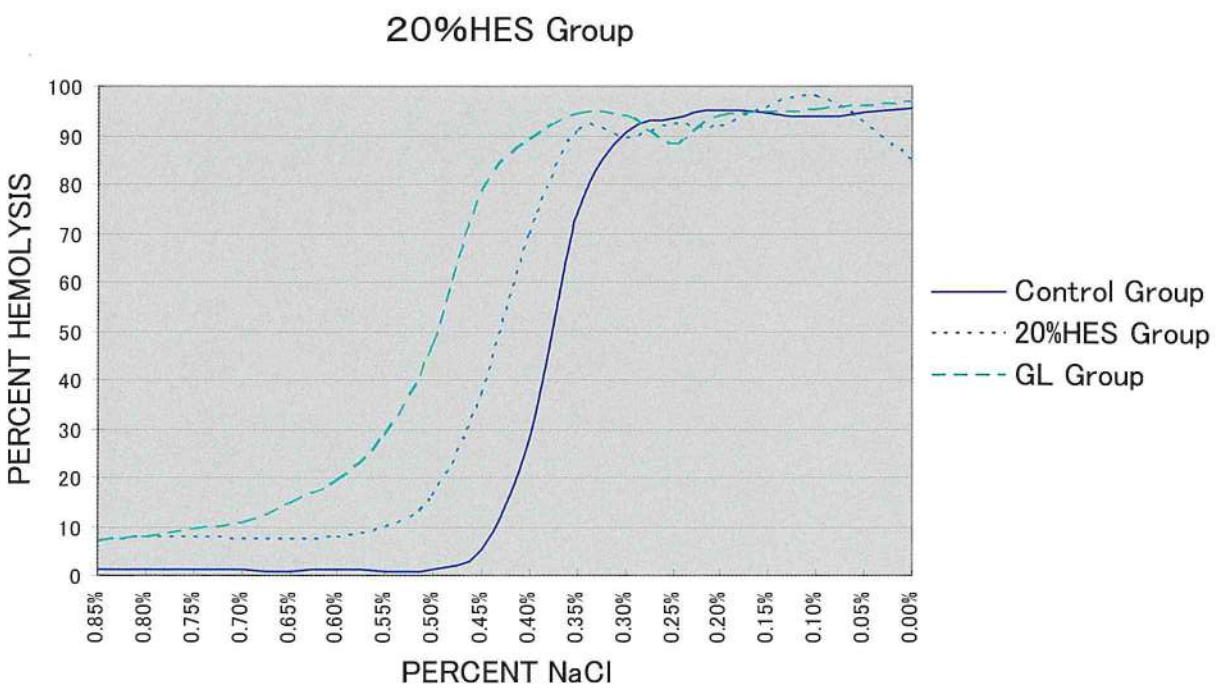
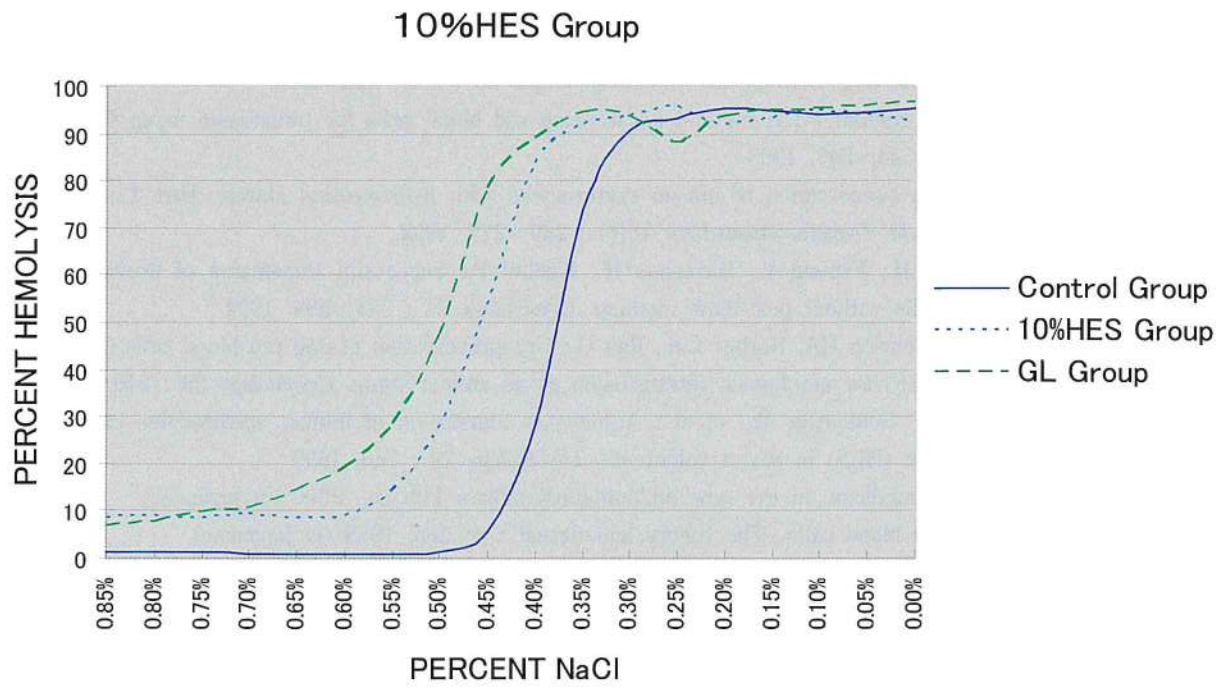


Fig. 1 Osmotic Fragility Test (10% HES group, 20% HES group)

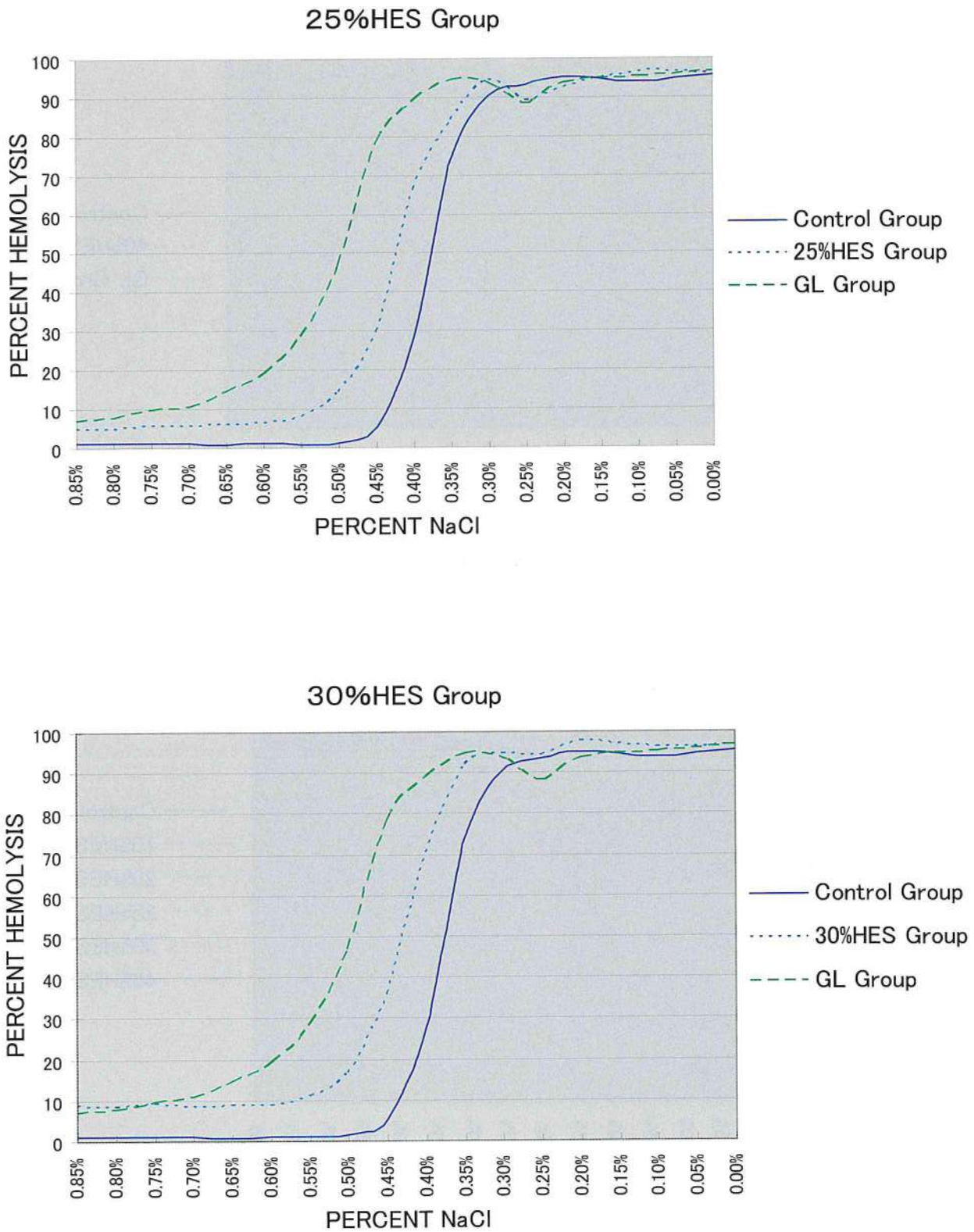


Fig. 2 Osmotic Fragility Test (25% HES group, 30% HES group)

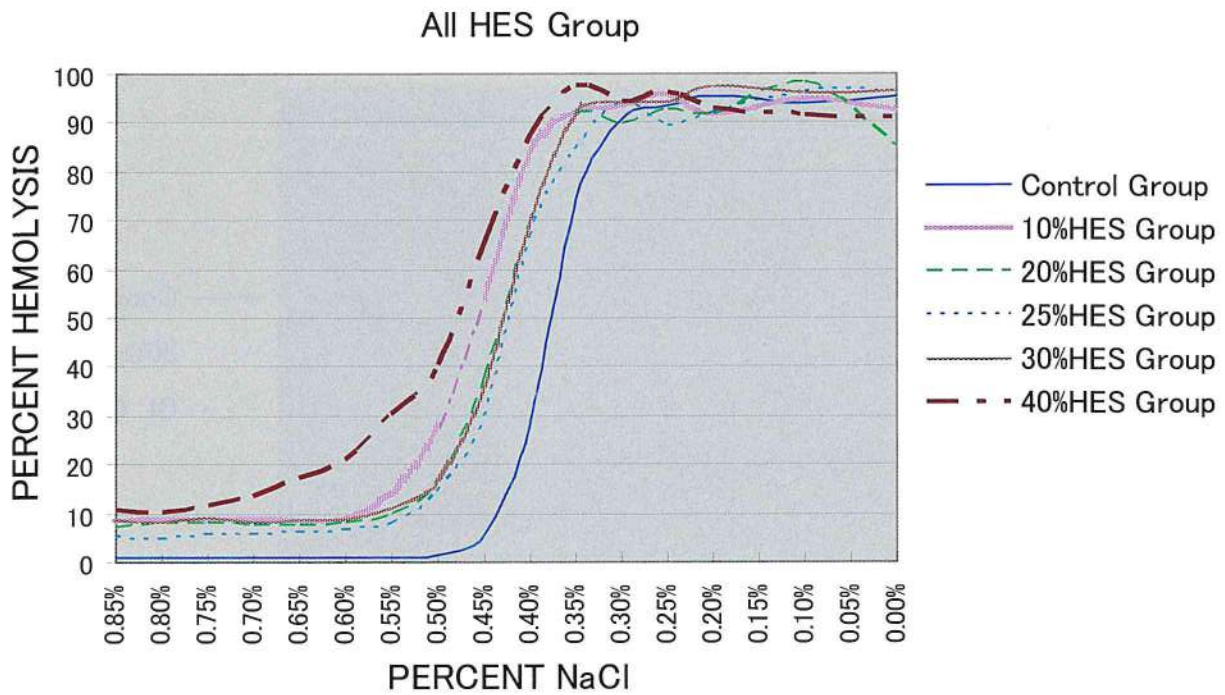
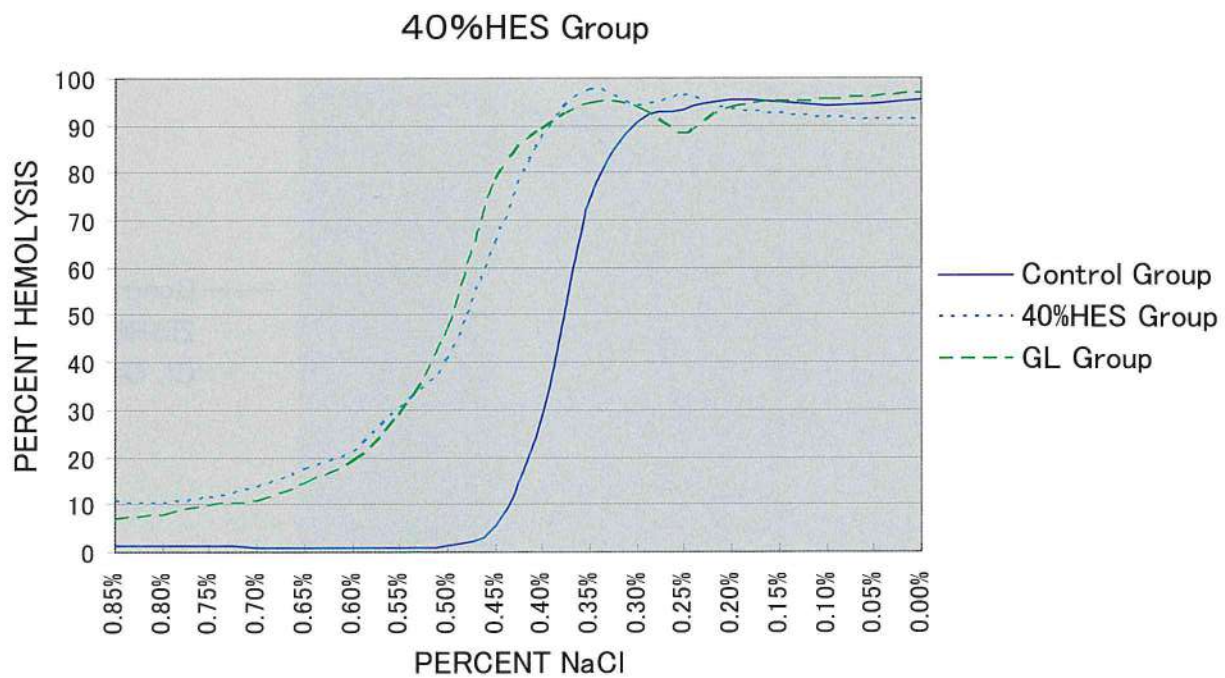


Fig.3 Osmotic Fragility Test (40%HES group , All HES group)

原 著

ヒドロキシエチル・スターチを用いた犬赤血球の -80°C 凍結保存法に関する研究

田浦保穂*¹, 石井淳*¹, 中市統三*¹, 板本和仁*¹, 谷 健二*¹, 金 喜廷*¹
杉本洋太*¹, アデル・モハメド・セヤド・アームド・アルアクラ*¹
岡村泰彦*¹, 隅田幸男*²

〔受付：2007年12月25日〕

今日、獣医学領域において十分なドナー血液を入手するのは困難な現状である。その解決策として考えられる方法の1つに赤血球の凍結保存が上げられる。赤血球の凍結保存を行う場合に必要である凍害保護物質として細胞内性、細胞外性のものがある。前者で汎用されるGlycerolは現在の人医学では -196°C で使用されているが、解凍時の複雑な脱Glycerolが必要である。後者のヒドロキシエチル・スターチ (Hydroxyethyl starch, HES) は抗原性が少なく、生体内で分解されることからその応用が期待されている。HESの凍害保護作用のために急速に冷却、解凍する必要があるが、*in vivo*で -196°C 液体窒素のHES保存血を用いた自己輸血ではGlycerolと比較して輸血反応が少なかった。しかし、液体窒素での保存はコストや使用管理面から問題が残った。そこで本研究では、獣医臨床の応用のための次の段階としてプラスチックバッグを使用した -80°C 凍結保存法、すなわち、 -196°C で急速冷却後に -80°C 超低温ディープフリーザーに移す2ステップ法の可能性について*in vitro*で検討した。

平均分子量20万のHESを用い最終濃度が5%~20%W/Vの保護液を作製し、洗浄濃厚赤血球と混和後、塩化ビニル製のプラスチックバッグに封入し、 -196°C の液体窒素内で急速凍結後、 -80°C 超低温ディープフリーザーに移し24時間保存した。凍結解凍後、HES群は一回洗浄し、GL群は脱グリセロール操作を行い測定に用いた。

その結果から、解凍後の回収率は10%HES群65.0%、20%HES群86.2%、25%HES群87.0%、30%HES群88.9%、40%HES群85.6%、GL群84.4%であった。したがってHESの凍害保護能はGLと同様であり、浸透圧脆弱性の亢進は認められたが、温度変化に伴う氷晶の形成による赤血球の障害はわずかであると思われた。

以上より、HESを凍結保護物質として用いた場合、GLのような脱グリセロール操作は必要とせず、犬赤血球の -80°C 多量凍結保存の可能性が示唆された。

* 1 山口大学農学部獣医学科臨床獣医学講座獣医外科学研究室

* 2 日本低温医学輸血研究所隅田研究室

ORIGINAL ARTICLE

SOME EFFECTS OF THE STORAGE PERIODS OF CANINE ERYTHROCYTES
AT -80°C CRYOPRESERVATION USING HYDROXYETHYL STARCH

Yasuho TAURA¹⁾, Kenta UNO¹⁾, Munekazu NAKAICHI¹⁾, Kazuhito ITAMOTO¹⁾, Kenji TANI¹⁾
Heejaung KIM¹⁾, Yota SUGIMOTO¹⁾, Adel Mohamed Saved Ahmed AL AKRAA¹⁾
Syuhei TANAKA²⁾, and Sajio SUMIDA³⁾

1) *Department of Veterinary Surgery, Faculty of Agriculture, Yamaguchi University, 1677-1
Yoshida, Yamaguchi-shi 753-8515, Japan*

2) *Department of Biological and Environmental Sciences, Faculty of Agriculture,
Yamaguchi University, 1677-1 Yoshida, Yamaguchi-shi 753-8515, Japan*

3) *Sumida Laboratory of Cryomedicine and Blood Transfusion,
2-11-6 Ginza, Chuo-ku, Tokyo 104-0061, Japan*

[Received for publication : December 25, 2007]

ABSTRACT

The objective of this study is to examine the relations between the storage periods of canine erythrocytes at -80° cryopreservation and the quality of the erythrocytes.

The washed and concentrated blood, which was collected from six healthy dogs, was mixed with the equal volume of cryoprotective solution which contains 25%(w/v) hydroxyethyl starch (HES) and 60 mM NaCl. The mixture was put in plastic bags made from vinyl chloride, and frozen in liquid nitrogen (-196°C). The bags containing the frozen mixture were immediately transferred to a -80°C deep-freezer, and kept for 24 hours, 1 (one) month, 2 (two) months, and 3(three) months. When the storage period of each bag was due, in order to make separation possible by centrifugation, the thawed blood was mixed with the equal amount of physiological saline. The relations between the storage periods of erythrocytes at -80° cryopreservation and the quality of the erythrocytes were evaluated by measuring the hemolysis and the osmotic fragility, as well as by morphologically examining with scanning electron microscopy(SEM). The mean rates of hemoglobin recovery in 24 hours, 1 month, 2 months, and 3 months groups were 97.8%, 95.6%, 96.3%, and 95.9%, respectively. With respect to the recovery rate, osmotic fragility, and morphology, there were no significant differences due to the different storage periods.

The result of the present study indicates that canine erythrocytes can be cryopreserved at -80°C for three months, longer than liquefied preservation. morphology, there were no significant differences due to the different storage periods.

The result of the present study indicates that canine erythrocytes can be cryopreserved at -80°C for three months, longer than liquefied preservation.

INTRODUCTION

In veterinary medicine, just as in human medicine, blood transfusion is indispensable as a treatment of big loss of blood, such as bleeding at the time of an operation, a traffic accident, declining of blood production, reduction of other blood components, and progressive erythrocytes destruction. In spite of such circumstances veterinary medicine is far behind human medicine regarding blood preservation^{1,2,7,8,14,17,19,20)}. Therefore it is important to establish a cryopreservation method of canine erythrocytes in veterinary medicine. An advantage of cryopreservation over liquefied preservation is the extended preservation period^{13,23,24)}.

While erythrocytes deteriorate rapidly and substantially in liquefied preservation²³, they do not deteriorate much in -80°C cryopreservation. This indicates that the cryopreservation of erythrocytes will be possible and useful in the practical field. It has been demonstrated that erythrocytes could be preserved as long as 20 to 30 years¹⁵. There are a few reports on the cryopreservation of canine erythrocytes using a cryoprotectant, such as glycerol (GL)^{2,24,26}.

Cryopreservation is believed to induce the physical destruction of cell structure by the growth of crystals, the change of electrolyte solution and pH, the precipitation of protein, and the disappearance of structure water²³. A cryoprotectant is used to avoid the destruction of cell structure during freezing. Intracellular protectants can pass through erythrocytes cell membrane freely because of their low molecular weight, while extracellular protectants cannot pass through the cell membrane because of the amount of high polymers. The former includes GL, dimethylsulfoxide(DMSO), and ethyleneglycol(EG), while the latter includes hydroxyethyl starch(HES), polyvinylpyrrolidone (PVP), polyglycol, and dextran.

Glycerol is widely used as an intracellular protectant. Due to the characteristic action and the toxic effect of GL, however, inadequate deglycerolization induces hemolysis after thawing³.

On the other hand, HES is degraded in the body by alpha-amylase and used as carbohydrate⁶. Because of its character, the exposure of erythrocytes preserved by HES to physiological saline is harmless. When HES is used as a cryoprotectant, therefore, it is expectable to eliminate the complicated operation of washing after thawing.

We can find several reports regarding cryopreservation of human erythrocytes^{14,19,21}, including a clinical test¹⁸. It is expected that HES can be used as a method of transfusing with no post-thaw washing. But we can find few reports^{17,20} about the possibility of cryopreservation of canine erythrocytes.

We found that by using HES erythrocytes could be cryopreserved at -196°C and -80°C . We also learned that cryopreservation at -80°C was safer than -196°C . Accordingly we conducted our experiment to establish the method of -80°C cryopreservation with HES by examining four different storage periods of cryopreservation at -80°C .

MATERIALS AND METHODS

Donor dogs:

Blood was collected from six healthy dogs, which were bred at Yamaguchi University, Faculty of Agriculture, Veterinary Medicine. Prior to blood collection, physical and blood examinations of them were conducted. The weights of the dogs were from 7 to 15kg, and their ages were from 2 to 7 years. Blood was sterilely collected from a cervical vein. As anticoagulant, CPD (Blood bag CPDA, TERUMO) was added at the rate of 12.2V/V%.

Washing of blood:

The collected blood samples were poured into 50ml plastic test tubes. The plasma was separated by centrifugation at 3,000 rpm at 4°C for 5 minutes. The same volume of physiological saline was added to the separated blood. They were subsequently mixed well, and the supernatant fluid was removed after centrifugation at 3,000 rpm at 4°C for 5 minutes. After the centrifugation was performed three times, the value of hematocrit (Hct) was adjusted to approximately 80%.

Cryopreservation with 25%(w/v)HES:

HES(A-HYDROZYETHYLSTARCH, Ajinomoto) solution consists of 25wt% HES and 60mM NaCl. The washed blood was mixed with the equal volume of HES solution. The mixture was poured into freezing bags(FHYSISALZ-FC 1000ml bag, Fuso), kept for 15 minutes at room temperature. and put between aluminum plates. The bags were subsequently submerged into the liquid nitrogen in the tank (CryoMed, Forma Scientific), and kept there for another 15 minutes. Then the bags were transferred into a deep-freezer (-80°C), and stored for 24 hours (24-h group), 1 month(1-M group), 2 months(2-M group), or 3 months(3-M group).

Thawing:

In order to prevent erythrocytes from being destroyed by the recrystallization during warming, the freezing bags were quickly transferred to the warm water of 43°C , shaken by hands, and thawed in less than 3 minutes.

The thawed blood was mixed with the equal volume of physiological saline, and separated by centrifugation at 3,000 rpm at 4°C for 10 minutes. After the supernatant solution was separated, the remaining cells were used as erythrocyte solution.

Experiment groups:

The experiment groups were divided into 5(five), according to preservation periods, that is, 24-h, 1-M, 2-M, 3-M, and the control group with no cryopreservation. Both the osmotic fragility and the recovery rates of the control group were examined immediately after the blood was mixed with the equal volume of HES.

Measurement:

[1] Recovery rate:

The ratio of the quantity of hemoglobin of erythrocytes and the amount of hemoglobin lost in the supernatant fluid was calculated as the hemoglobin recovery rate. It was used as an index, which indicates the damage of erythrocytes caused by freezing and thawing. The recovery rate was calculated from the following formula using the hemoglobin value²⁵⁾.

$$\text{Recovery rate} = 100 \times \text{①} / (\text{①} + \text{②})$$

①: Hemoglobin concentration of erythrocytes after centrifugation x Amount of erythrocyte solution

②: Hemoglobin concentration of supernatant fluid after centrifugation x Amount of supernatant fluid

To measure hemoglobin, the hemoglobin measure indicator (hemoglobin B-test wako) was used.

[2] Osmotic fragility test:

Osmotic fragility was determined by adding 0.02 ml of blood solution to 5.0 ml of buffered NaCl solution with concentration ranging from 0.1 to 0.9%, or to 5.0 ml of distilled water. The frozen-thawed erythrocytes were mixed with buffered NaCl solution or distilled water. The mixture was kept at 37°C for 30 minutes. It was centrifuged at 3,000rpm for 5 minutes. The supernatant fluid was transferred into another set of tubes. The hemoglobin content of the supernatant fluid was determined spectrophotometrically at 546 nm. The percentage of hemolysis was calculated, assuming hemolysis in the biggest absorbance to be equal to 100%. The control value of the dog was also decided by using the mixture of washed erythrocytes and the equal volume of 25wt% HES (control group) .

[3] Scanning electron microscopy

The frozen-thawed and washed erythrocytes were fixed with 1.0% glutaraldehyde in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.0) for 1 (one) hour, washed with 0.1 M phosphate buffer three times, and dehydrated with an ascending ethanol series 50% to 100%. The specimens were dried by a critical point dryer and coated with gold in an ion-coater apparatus. They were observed under a scanning electron microscope (JSM 6100, Japan Electron Optics Laboratory) at accelerating voltage of 15 kv. Erythrocytes were classified into 3 groups on the basis of shape of erythrocytes (Discocyte, Echinocyte-1, and Echinocyte-2) (Fig. 4). They were counted from the scanning electron photomicrographs taken at the magnification of x1000 on two randomly selected areas in each sample, and the ratio of each erythrocyte was calculated. Discocyte was defined as the erythrocyte with the smooth surface of membrane. Echinocyte-1 was defined as the erythrocyte with protrusions on the surface of membrane, while Echinocyte-2 was defined as the erythrocyte with sharper protrusions than those of Echinocyte-1.

Statistical analysis:

The results present the mean \pm standard deviation (SD). Statistically significant difference was analyzed by *t*-test. Differences at $p < 0.05$ were considered significant.

RESULTS

[1] Recovery rate:

The recovery rates of 24-h, 1-M, 2-M, and 3-M groups were $97.8 \pm 1.6\%$, $95.6 \pm 3.6\%$, $96.3 \pm 3.3\%$, and $95.9 \pm 3.3\%$, respectively. The recovery rate of the control group was $98.9 \pm 0.9\%$ (table 1). With respect to the recovery rate ($p > 0.05$), there were no significant differences among the groups.

[2] Osmotic fragility test:

There are relations between the osmotic fragility of erythrocytes and the geometrical structure. Osmotic pressure causes expansion, hemolysis, the change of membrane permeability, and damage, which results in the termination of structure maintenance. In order to find out the damage of erythrocytes during cryopreservation, the osmotic fragility of the HES groups and the control group was tested. The results of the test are shown in Fig. 1 to Fig. 3. Compared with the mean value of the control group, the graph curves of the cryopreserved groups move to the right, indicating that the osmotic fragility of erythrocytes increases. In addition, the concentration of NaCl producing 50% hemolysis is one of the evaluation methods which determine the degree of the damage of erythrocytes membrane. As the graph curves show, the concentration of NaCl producing 50% hemolysis in the control group, 24-h, 1-M, 2-M, and 3-M groups were $0.47 \pm 0.029\%$, $0.50 \pm 0.030\%$, $0.54 \pm 0.029\%$, $0.53 \pm 0.024\%$, and $0.54 \pm 0.031\%$, respectively. Regarding the osmotic fragility, there were no significant differences among the groups.

[3] Scanning electron microscopy:

The percentages of discocytes in the 24-h, 1-M, 2-M, and 3-M groups were $82.3 \pm 8.1\%$, $82.3 \pm 8.1\%$, $79.3 \pm 7.2\%$, and $80.5 \pm 7.0\%$, respectively. The percentages of echinocyte-1 were $12.93 \pm 5.0\%$, $13.3 \pm 5.8\%$, $15.7 \pm 4.7\%$, and $14.8 \pm 5.4\%$. The percentages of echinocyte-2 were $4.9 \pm 3.8\%$, $4.3 \pm 2.9\%$, $5.0 \pm 3.3\%$, and $4.6 \pm 2.5\%$. In the control group the percentages of discocytes, echinocyte-1, echinocyte-2 were $98.5 \pm 1.7\%$, $1.7 \pm 2.0\%$, and 0% (Fig. 5, Fig 6, Table 2). With respect to the morphological analysis by using scanning electron microscopy, there were no significant differences among the groups.

DISCUSSION

The preservation of blood in the liquid state is useful and simple. Blood can be preserved for 21 days. Many attempts have been made to extend the preservation period of blood in the liquid state. However, the preservation of blood in the liquid state for a prolonged time has not materialized yet. At present the cryopreservation is the sole method which enables the preservation of blood for a longer period.

Blood transfusion is performed in the field of veterinary medicine. However, unlike human medicine, neither the blood donation system nor the blood bank is established. It is difficult to prepare the needed amount of blood all the time, that is, the matching type of the fresh blood or the liquefied preservation blood. At the time when a transfusion is performed, some crucial issues must be considered, which include how to avoid infection or immunity antibody, and how to prevent side effects or the isoimmunization in case of a rare blood type. Unfortunately the present condition is far from being satisfactory to deal with the cases which need an autotransfusion.¹⁰⁾

Even when the blood transfusion to animals is necessary due to their chronic anemia and some other long-term medical treatment, an autotransfusion may not be applied clinically, because the period of the conventional refrigeration preservation of blood is only 21 days, and the needed blood is not always available. It is supposed that cryopreservation has the advantage of the period of storage and the state of cells. It is reported that the preservation as long as 37 years is not impossible^{13,23,24,25,26)}. When erythrocytes are kept under -80°C (especially at -196°C), the normal structure is retained²⁵⁾. They are suited to prolonged preservation.

The protection mechanism of hydroxyethyl starch (HES) used in human medicine is as follows. HES is classified into an extracellular (non-penetrating) cryoprotective additive. In contrast to glycerol, as a plasma substitute, HES offers the advantage of being a nontoxic, biodegradable compound. There are various opinions about the process of freeze protection. It is suggested that the holes on the surface of the cell membrane are closed by HES, so that the cells are protected from the ice crystals in the cytoplasm which will be otherwise formed.

Dehydration prevents the growth of the ice crystals, which will cause cytoplasmic damage²³⁾.

It is reported that quick freezing is effective²³⁾ for the cryopreservation of human erythrocytes, as well as for the quality of the blood platelet. It is necessary to freeze quickly and control the molecular movement, because the extracellular (non-penetrating) cryoprotective effect of HES is not strong.

HES is the polysaccharide of molecular weight 10^4 to 10^5 . It is biodegrades in the body by alpha-amylase, and used as carbohydrate⁶⁾. Moreover, it has less antigen⁹⁾, so its clinical application is carried out with PVP or dextran as a plasma expander at the time of bleeding^{9,10)}. The freezing erythrocytes by HES may be transfused without washing after thawing²¹⁾, because they are not hemolyzed by direct exposure to physiological salt solution. The licensed drug HES offers the advantage of being a nontoxic, biodegradable cryoprotectant and plasma substitute.

When GL is used as a cryoprotectant, the cryopreserved blood cannot be transfused immediately after thawing. GL must be washed sterilely and removed first. If deglycerolization is inadequate, hemolysis will occur. And GL toxicity will be suspected¹⁾. On the other hand, erythrocytes frozen with HES can normalize oxygen transport and blood volume loss in case of extended hemorrhage. For this reason HES cryopreserved erythrocytes can be transfused by no washing after thawing. And HES may be suitably used for cryopreservation of canine erythrocytes. Attempts have been made to use HES for the cryoprotectant as an alternative to glycerol. It is reported that the possibility of RBC cryopreservation at -196°C was examined by using a small quantity of canine erythrocytes with HES⁵⁾. The demerit of the cryopreservation in liquid nitrogen is the possible damage of the freezing bag at the time of thawing. It seems that the cryopreservation by -80°C deep-freezer is safer, as well as more suitable for a large amount of blood. It is reported that the cryopreservation of canine erythrocytes at -80°C could result in a slight injury. The erythrocytes cryopreserved at -80°C using HES could be used for autologous transfusion. In this study, therefore, we limited the periods of cryopreservation of erythrocytes no more than three months (3-M). As a result, we found out that at -80°C erythrocytes could be preserved longer than at liquefied preservation.

The recovery rate is an important guideline which determines the usefulness of the cryopreservation of erythrocytes. When fresh blood is used for cryopreservation, the recovery rate after thawing is high²⁴⁾. In this study no significant differences were noticed among the storage periods ($p>0.05$). It is conceivable that the destruction of erythrocytes was much lower during the preservation. The existence rate within the vital body is another important guideline that shows the usefulness of erythrocytes. The existence rate within the living body is measured with ⁵¹Cr method. The blood transfusion effect index is decided by the product of the collection rate and the erythrocytes existence rate measured 24 hours after the blood transfusion²⁴⁾.

The cell membrane of erythrocytes is tender, but it lacks elasticity. It will explode, therefore, if the amount of water taken in erythrocytes exceeds the critical capacity. The osmotic fragility of the erythrocytes in cryopreservation rises by the presence of ice crystals, which are formed inside and outside the freezing cells. A hole on erythrocytes membrane bigger than the diameter of 64\AA of a hemoglobin molecule may bring about some sort of damage on erythrocyte membrane, such as the direct escape of hemoglobin after thawing. It may also be damaged by the fall of the membrane function caused by the reduction of ATP of erythrocytes after freezing-thawing. The consequence is the possible increase of osmotic fragility and hemolysis¹²⁾. The concentration of NaCl producing 50% hemolysis is a criterion for judgment. In this study no significant differences were observed among the storage periods ($p>0.05$). The decline of the membrane function by the decrease of ATP in erythrocytes after freezing-thawing was conceivable as one factor. It was also conceived that the membrane of erythrocytes was simultaneously damaged by the formation of the ice crystals associated with freezing. However, osmotic fragility is influenced by both exogenic factors (pH, temperature, and oxygenation) and intrinsic factors (age of the animal, kind, lipemia, aging of erythrocytes)¹²⁾. It was presumed that the injury of erythrocytes by the above-mentioned factors was limited to the minimum when they were preserved at -80°C ²⁴⁾.

The erythrocyte changes the form of its membrane by the freezing damage and the exogenic factors. The surface of erythrocytes will protrude if the membrane injury advances. In this study the erythrocytes were classified into three types. The comparison of ratio was used as a guideline to judge the injury of erythrocytes. When the control group was compared with the cryopreserved groups, a significant difference was observed in the ratio of discocytes and echinocytes. Among the storage periods no significant differences were noticed in the ratio of erythrocytes. Therefore, the results of our study indicate that the injury caused by the prolongation of cryopreservation may be minor.

From the results of the recovery rate, the osmotic fragility test, and the scanning electron microscopy, we discovered that canine erythrocytes can be cryopreserved at -80°C as long as three months, which is longer than the period of liquefied preservation. This may contribute to the possible creation of canine frozen blood banks.

ACKNOWLEDGMENT

The authors sincerely appreciate the guidance and support extended by Ms. Kana SHIRAISHI, Mr. Akihisa ITO, Mr. Natsuki MORIMOTO, Ms. Kumiko NOMA, Mr. Masayuki KAWAI, Mr. Yusuke SASAKI, Ms. Mio MATOBA, and Mr. Tatsuhumi YAMASHITA of Veterinary Surgery, Faculty of Agriculture, Yamaguchi University.

REFERENCES

- 1) Chavey P. S., Andrews G. A., Smith J. E.: A Method for freezing canine erythrocytes for blood typing purposes. *Veterinary Clinical Pathology* 23:43~45, 1994
- 2) Contreras T. J., Lindberg J. R., Lowrie G. B., Pivacek L. E., Austin R.M., Vecchione J. J., Valeri C. R.: Liquid and freeze-preservation of dog red blood cells. *Transfusion* 19:279~292, 1979
- 3) Cregan P., Donegan E., Gotelli G: Hemolytic transfusion reaction following transfusion of frozen and washed autologous red cells. *Transfusion* 31:172~175, 1991
- 4) Inayoshi H., Taura Y., Sakonju L, Kanoe M., Nakaichi M., Nakama S.: Cryopreservation of dog red blood cells using hydroxyethyl starch (HES). *Journal of the Japan Veterinary Medical Association* 51, 3:147~152, 1997 (in Japanese)
- 5) Jain N.C: Osmotic Fragility of erythrocytes of Dogs and cats in health and in certain hematologic disorders. *Cornell Vet.*63: 41 1~423, 1973
- 6) Knorpp C. T., Merchant W. R., Gikas P.W., Spencer H.H., Thompson N.W.: Hydroxyethyl starch : Extracellular cryophyllactic agent for erythrocytes. *Science* 157: 1312~1313, 1967
- 7) Langer R., Albrecht R., Hempel K., Krug S., Sputtek A., Steigerwald R., Trenkel K., Henrich H.A.: Characterization of 24 hour survival rate and duration of survival of hydroxyethyl starch cryopreserved erythrocytes after autologous transfusion in the dog. *Infusionstherapie und Transfusionsmedizin* 21(6): 393~400, 1994
- 8) Langer R., Korn W., Schmid H., Sputtek A., Stegerwald R., Trenkel K., Rau G, Henrich H.A.: Studies on functional acceptability of autologous with hydroxyethyl starch (HES) cryopreserved erythrocytes in dogs. *Clin. Hemorheol* 12: 476, 1992
- 9) Maurer P. H., Berardinelli B.: Immunologic studies with hydroxyethyl starch (HES). *Transfusion* 8: 265~268, 1968
- 10) Miwa S.: Guideline oftransfiision therapeutics. *Clinical pathology* No.88, 1991
- 11) Rowe A.W., Eyster E., Keller A.: Liquid nitrogen preservation of red blood cells for transfusion. *Cryobiology* 5: 1 19~128, 1968
- 12) Sonoda M., Ichijo S.: Veterinary hematology II. Ishiyaku Publication Co., Ltd.: 403~443, 1979 (in Japanese)
- 13) Spieles G, Kresin M., Heschel I., Rau G.: A phase diagram for erythrocytes cryopreserved in Hydroxyethyl starch solution. *Cryobiology* 32: 545, 1995
- 14) Sputtek A., Bacher C., Langer R., Kron W., Henrich H.A., Rau G.: Cryopreservation of human erythrocytes with hydroxyethyl starch-Part 2 : Analysis of survival. *Infusionstherapie und Transfusionsmedizin* 19(6): 276~282, 1992
- 15) Sputtek A., Barthel B., Rau G: Cryopreservation of human platelets: An in vitro comparison of a 4% HES method with the standard 5% DMSO method. *Cryobiology* 30: 656~657, 1993
- 16) Sputtek A., Kober C.h., Bacher C.h., Rau G: Furrherr improvement of human red blood cells with Hydroxyethyl starch. *Cryobiology* 25: 523, 1988
- 17) Sputtek A., Langer R., Schmid H., Steigerwald R., Trenkel K., Kron W., Henrich H.A., Korber C., Rau G.: Cryopreservation of erythrocytes with hydroxyethyl starch. In vitro results leading to an autologous retransfusion model in the dog. *Beitrage zur Infusionstherapie* 30: 292~296, 1992

- 18) Sputtek A., Meuser D., Kuehnl P.: A method for freezing red blood cells for transfusion using Hydroxyethyl starch. *Cryobiology* 32: 544~545, 1995
- 19) Sputtek A., Rau G: Cryopreservation of human erythrocytes with hydroxyethyl starch-Part 1: The procedure. *Infusionstherapie und Transfusionsmedizin* 19(6): 269~275, 1992
- 20) Sputtek A, Schmid H, Henrich HA, Korber C.h., Rau G: Cryopreservation of dog red blood cells (DRBC) with Hydroxyethyl starch (HES) for autologous retransfusion as an animal study. *Cryobiology* 28: 546, 1991
- 21) Sputtek A., Sendorf H., Freund V., Birmanns H., Kuehnl P.: Successful transfusion of previously frozen autologous red blood cells without post-thaw washing. *Cryobiology* 31: 584~585, 1994
- 22) Sputtek A., Singbartl G, Schleinzler W., et al: Autologous transfusion of human erythrocytes cryopreserved with Hydroxyethyl starch (HES) in seven volunteers. *Cryobiology* 29: 766, 1992
- 23) Sumida S.: Freezing red blood cells-The theory and Actual: 9~185, 1978 (in Japanese)
- 24) Sumida S.: Transfusion medicine in the new millennium - Kanehara Pub co., 2000 (in Japanese)
- 25) Sumida S., Watanabe T., Hayano Y.: Morphological and physiological integrity of red cells cryopreserved for 25 years. *Cryobiology* 32: 544, 1995
- 26) Valeri CR., Ragno G., Pivacek LE., Cassidy GP, Srey R., Hansson-Wicher M., Leavy ME.: An experiment with glycerol-frozen red blood cells stored at -50°C for up to 37 years. *Vox Sang*; 79: 168~74, 2000

FIGURES

Table 1 Recovery rate

	Recovery rate(%)
Control group	98.9±0.9%
24 hours group	97.8±1.6%
1 month group	95.6±3.6%
2 month group	96.3±3.3%
3 month group	95.9±3.3%

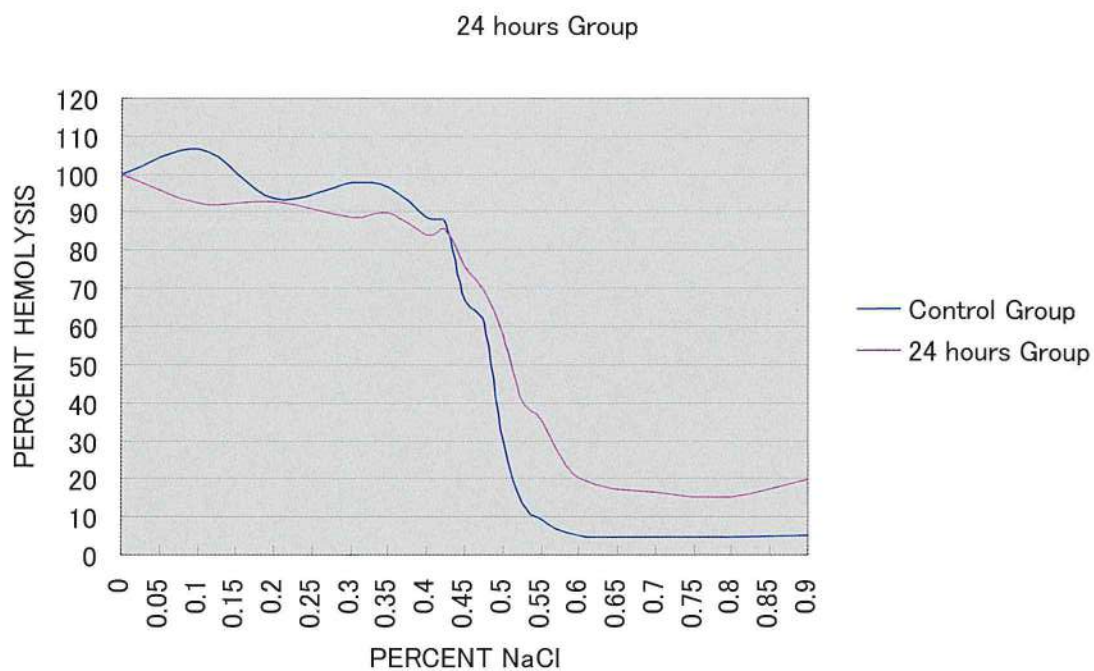


Fig. 1 Osmotic Fragility Test (24 hours Group)

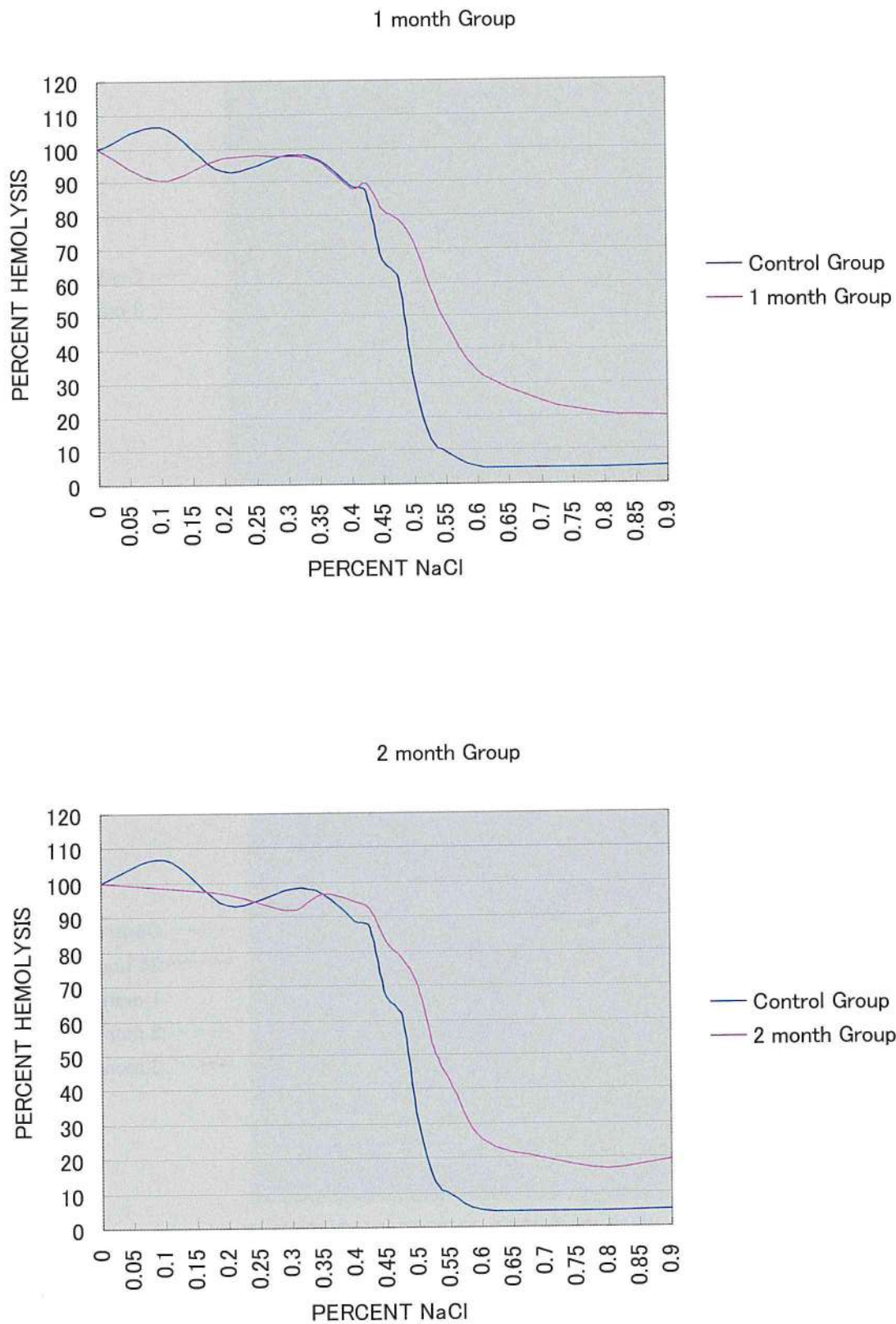


Fig. 2 Osmotic Fragility Test (1 month group, 2 month group)

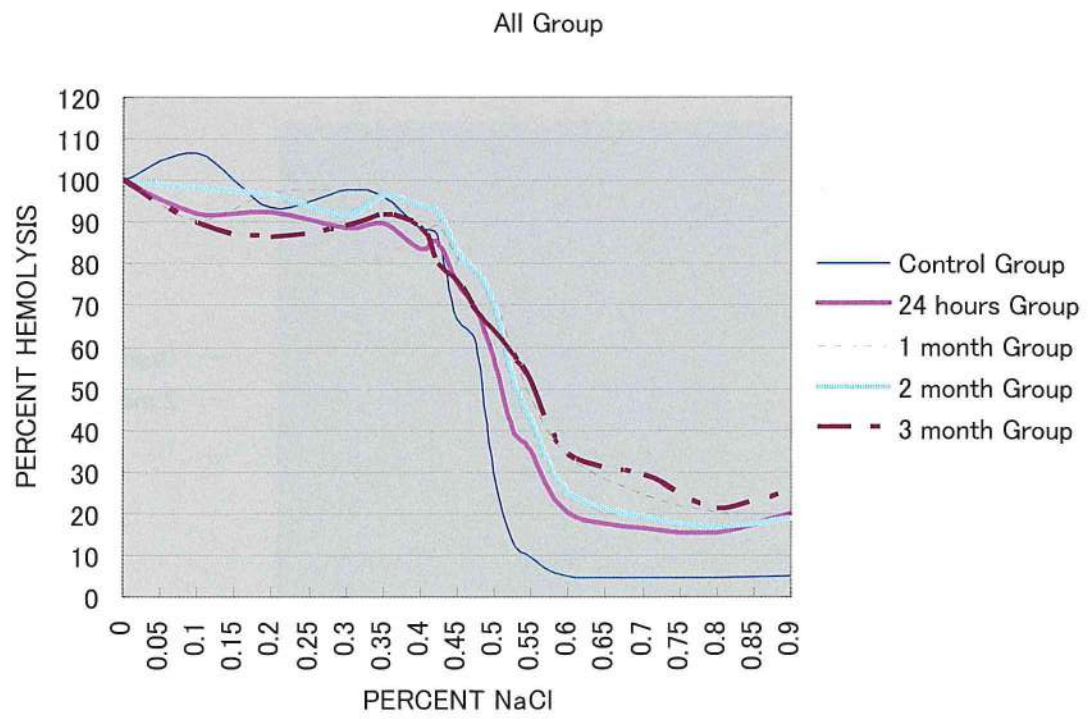
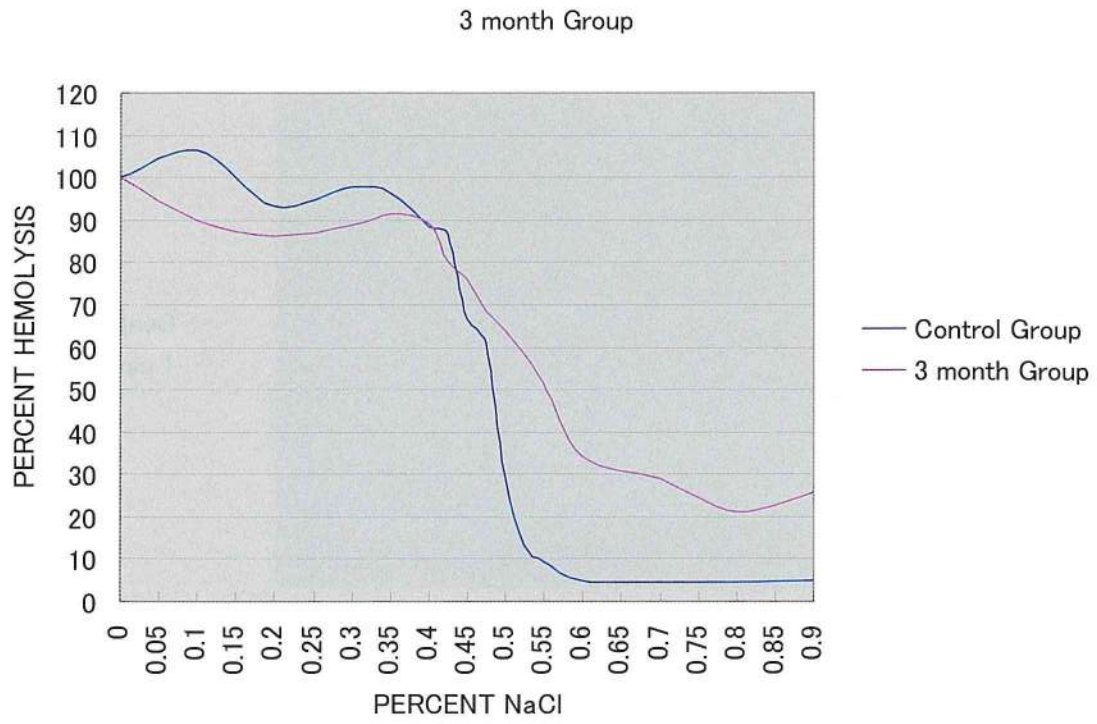


Fig. 3 Osmotic Fragility Test (3 month group, All group)

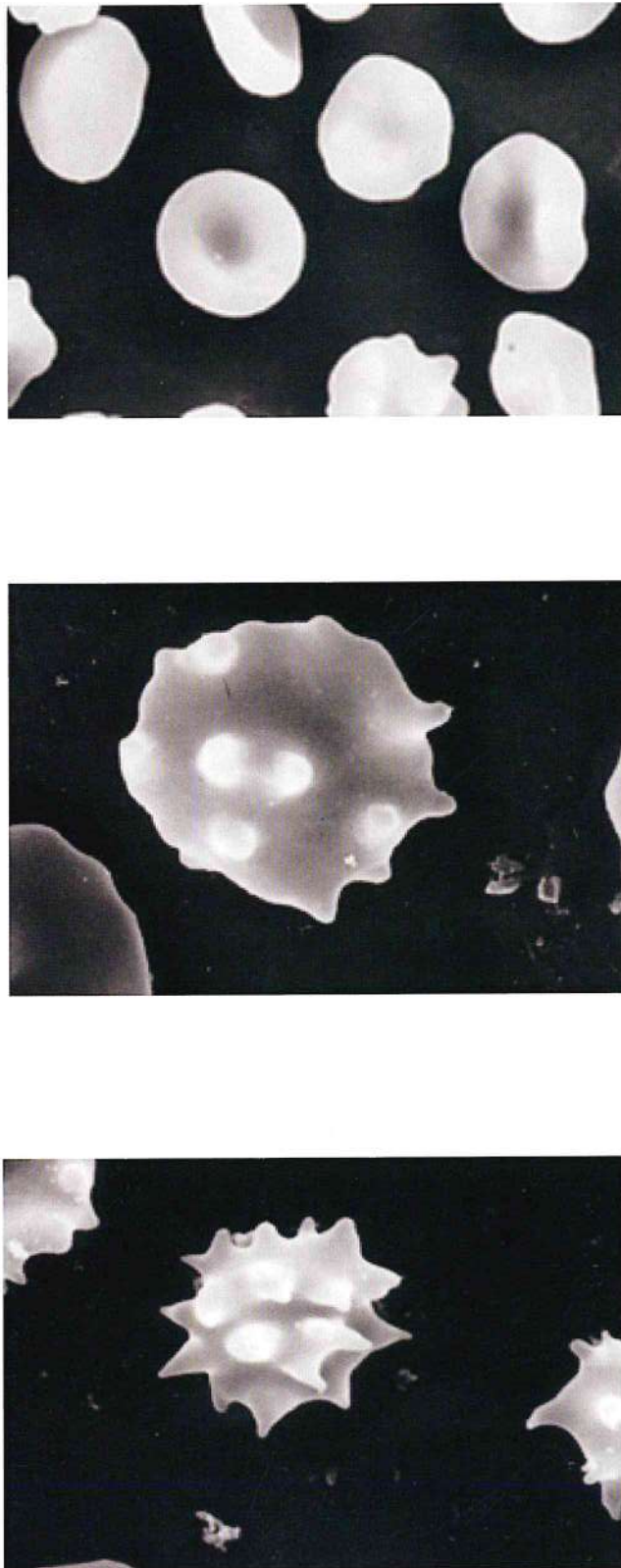


Fig. 4 Scanning electron microscopy
Discocyte (magnification $\times 3000$)
Echinocyte-1, Echinocyte-2 (magnification $\times 4000$)

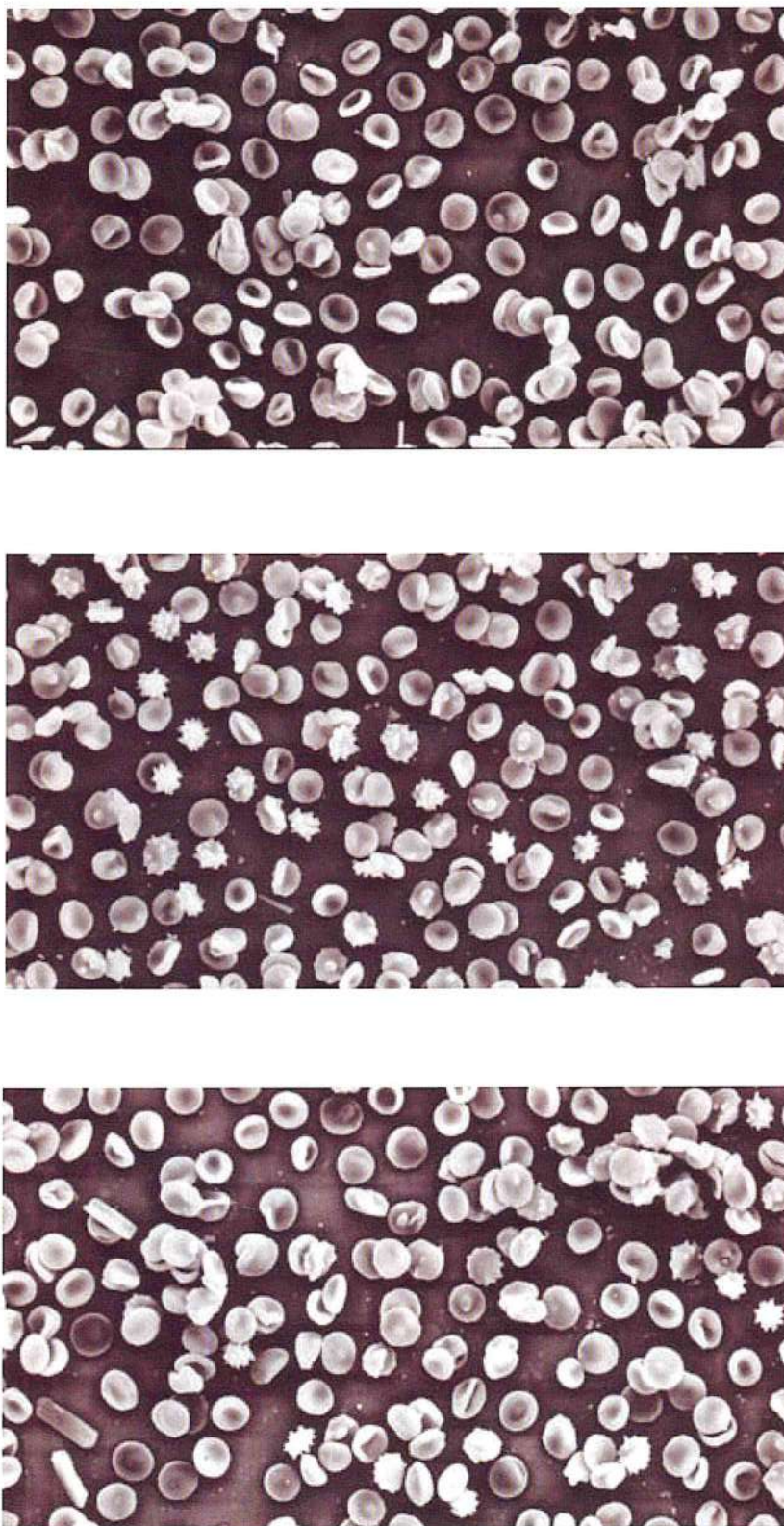


Fig. 5 Scanning electron microscopy
Control, 24 hours and 1 month group (magnification $\times 1000$)

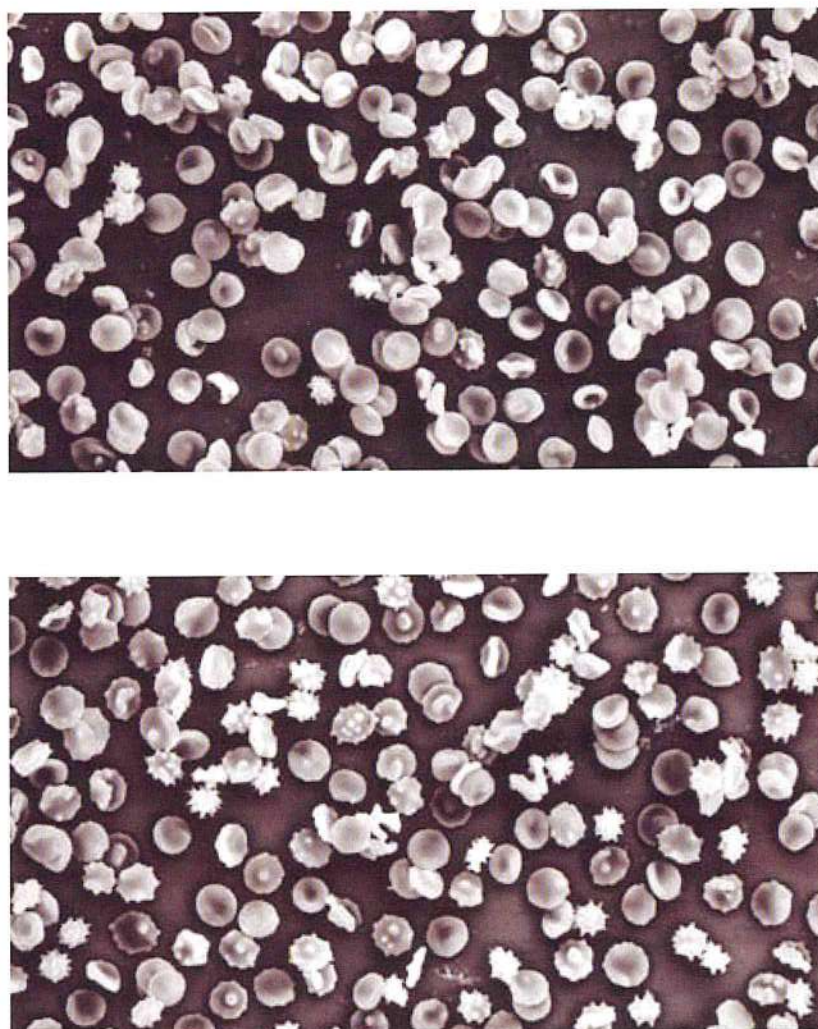


Fig. 6 Scanning electron microscopy
2 months group and 3 months group (magnification $\times 1000$)

Table 2 Scanning electron microscopy Ratios of Discocyte, echinocyte-1 and echinocyte-2

	discocyte	echinocyte-1	echinocyte-2
Control group	$98.5 \pm 1.7\%$	$1.7 \pm 2.0\%$	0%
24 hours group	$82.3 \pm 8.1\%$	$12.9 \pm 5.0\%$	$4.9 \pm 3.8\%$
1 month group	$82.3 \pm 8.1\%$	$13.3 \pm 5.8\%$	$4.3 \pm 2.9\%$
2 month group	$79.3 \pm 7.2\%$	$15.7 \pm 4.7\%$	$5.0 \pm 3.3\%$
3 month group	$80.5 \pm 7.0\%$	$14.8 \pm 5.4\%$	$4.6 \pm 2.5\%$

原 著

ヒドロキシエチル・スターチを用いた犬赤血球の -80°C 凍結保存法の保存時間による影響

田浦保穂*¹, 宇野堅太*¹, 中市統三*¹, 板本和仁*¹, 谷 健二*¹, 金 喜廷*¹
杉本洋太*¹, アデル・モハメド・セヤド・アーメド・アルアクラ*¹
田中秀平*², 隅田幸男*³

〔受付：2007年12月25日〕

獣医臨床の進歩により、輸血の必要性は高まる一方であるが、十分なドナー血液を入手するのは困難な現状である。赤血球の保存法として液状保存と凍結保存があげられる。液状保存では簡易に保存が可能であるが1ヵ月ほどしか保存ができない。凍結保存ではより長期間の保存ができるが、凍結保護物質と保存装置が必要となる。現在の人医学では凍結保存は凍害保護物質としてGlycerolを用い、 -196°C で行われている。しかし、Glycerolは解凍後に洗浄除去せねばならず、液体窒素での保存はコストや使用管理面から問題がある。このため獣医学領域への応用は難しいと考えられた。そこで、非洗浄で輸血が可能でヒドロキシエチル・スターチ(Hydroxyethyl starch, HES)を用い、 -196°C で急速冷却後に -80°C 超低温フリーザーに移す2ステップ冷凍保存法による実験を行ったところ、ヘモグロビン(Hb)回収率、浸透圧脆弱試験はともにGlycerol群よりもHES群の方が良好であった。さらに、 -80°C 凍結保存血の自己輸血では輸血後の重篤な副作用の発現は認められなかった。そこで、本研究では -80°C 凍結保存血の経時的な*in vitro*での変化を観察することにより、 -80°C 凍結保存での保存可能な期間について検討をおこなった。

実験群は保存期間、24時間、1ヵ月、2ヵ月、3ヵ月の保存血群と対照群(凍結保存を行っていない血液)の5群とした。6頭の健常実験犬から採血後作製した濃厚赤血球と25% HESを等量混合し、液体窒素内で急速凍結し、その後 -80°C 超低温フリーザー内で24時間、1ヵ月、2ヵ月、3ヵ月凍結保存後、急速解凍し、Hb回収率、浸透圧脆弱性試験、走査電子顕微鏡による観察を実施した。

24時間、1ヵ月、2ヵ月、3ヵ月保存血群のHb回収率はそれぞれ $97.8 \pm 1.6\%$ 、 $95.6 \pm 3.6\%$ 、 $96.3 \pm 3.3\%$ 、 $95.9 \pm 3.3\%$ となった。Hb回収率、浸透圧脆弱性試験での50%溶血濃度、走査電子顕微鏡による観察による赤血球の形態的な分類ではそれぞれに保存期間による有意差は認められなかった。

以上の結果により、 -80°C でHESを用いた2ステップ冷凍保存法が犬赤血球を長期に保存する方法になりうることを示唆された。さらに長期間の保存の評価を行うことにより、犬の自己血液バンク設立の一助になりうると思われた。

* 1 山口大学農学部獣医学科臨床獣医学講座獣医外科学研究室

* 2 山口大学農学部生物資源環境科学科生物生産科学講座

* 3 日本低温医学輸血研究所隅田研究室

原 著

Bartonella clarridgeiae のパルスフィールドゲル電気泳動法による
分子疫学的解析

富 田 正 章*

[受付 : 2007年12月25日]

ORIGINAL ARTICLE

MOLECULAR ANALYSIS OF *BARTONELLA CLARRIDGEIAE* STRAINS ISOLATES
BY PULSED-FIELD GEL ELECTROPHORESIS.

Masaaki TOMITA*

Hofu Public Health and Welfare Center of Yamaguchi Prefecture 14-28

Ekinan-cho, Hofu-shi, Yamaguchi-ken 747-0801, Japan

[Received for publication : December 25, 2007]

Twelve restriction enzymes (*Apa* I, *Bam*H I, *Bln* I, *Bss*H II, *Hind* III, *Nae* I, *Nar* I, *Nhe* I, *Sac* II, *Sfi* I, *Spe* I, and *Xba* I) were employed to establish the molecular analysis of *Bartonella clarridgeiae* isolates by PFGE, which causes Cat-Scratch-Disease. Three restriction enzymes, *Bln* I, *Nhe* I, and *spe* I, produced apparent band patterns. Five *B. clarridgeiae* isolates from domestic cats revealed several different restriction patterns by PFGE. The above results suggest that the PFGE protocol is a useful tool for epidemiological analysis of *B. clarridgeiae* isolates.

猫ひっかき病の原因となる*Bartonella clarridgeiae*の分子疫学的解析法を確立するために、パルスフィールドゲル電気泳動法による遺伝子解析に有用な制限酵素について検討した。供試した12種類の制限酵素 (*Apa* I, *Bam*H I, *Bln* I, *Bss*H II, *Hind* III, *Nae* I, *Nar* I, *Nhe* I, *Sac* II, *Sfi* I, *Spe* I, *Xba* I) のうち、*Bln* I, *Nhe* I, *Spe* I が最も適していることが明らかになるとともに、飼猫から分離した5株は異なるPFGE泳動パターンが認められたことから、猫は多様な遺伝子型の*B. clarridgeiae*を保菌していることが明らかとなった。

結 言

猫のひっかき傷や咬傷を受けた後に発病する猫ひっかき病 (Cat-Scratch-Disease:CSD) の病原体は長い間不明であったが、1990年代の初めに*Bartonella henselae*がその原因となることが明らかとなった。*B.henselae*の主要な保菌動物は猫であり、我が国ではMaruyamaら¹⁾が、猫の保菌率は平均で7.2%であったが、温暖な気候の地域では高い傾向であったことを報告した。私たちは、山口県内の飼猫38匹の血液中の*Bartonella*属菌の保菌率が15.8% (6/38匹)であったこ

とを報告した²⁾。猫の血液中からは、*B.henselae*の他に*B.clarridgeiae*が分離されるが、本菌の病原性については不明であった^{3,4)}。Kordicら⁵⁾は、猫に咬まれた後に、CSDと同じく咬傷部の丘疹、発熱、リンパ節の腫脹をおこした症例で、飼育されていた猫から*B.clarridgeiae*を分離するとともに、患者血清の*B.clarridgeiae*に対する抗体が有意に上昇していたことから*B.clarridgeiae*もCSDの原因となることを報告した。さらに、Chomelら⁶⁾により*B.clarridgeiae*が犬の心内膜

* : 山口県防府健康福祉センター 〒747-0801 山口県防府市駅南町14-28
Tel 0835-22-3740, Email tomita.masaaki@pref.yamaguchi.lg.jp

炎の原因と推定される症例が報告され、人獣共通感染症の病原体として認識されるようになってきた。

近年、細菌感染症の疫学調査に分子疫学的手法による遺伝子多型解析法が応用されている。なかでも、パルスフィールドゲル電気泳動 (Pulsed-Field Gel Electrophoresis: PFGE) 法は多くの細菌性食中毒や感染症においてその有用性が高く評価されている。猫から分離される *B.henselae* では、PFGE法による解析で、多様な遺伝子型の株が流行していることが報告さ

れている^{1, 2, 7, 8)}が、*B.clarridgeiae*の分離株については、遺伝子多型があるとする報告はないものの、これは解析法が妥当でなく、遺伝子多型を検出できていないこと、もしくは単一の遺伝子型のもものが流行していることのいずれかが推測されるものの未解明の課題である。

本研究では、PFGE解析法で重要な要素である制限酵素の処理方法について検討した結果、*B.clarridgeiae*の遺伝子多型性を明らかにすることができた。

材料と方法

菌株：*B.clarridgeiae*は、山口県内の飼猫の血液から分離した5株を供試した。

PFGE法：菌株を5% 兔血液加ハートインフュージョン寒天培地で培養し、滅菌蒸留水200 μ lに浮遊し、等量の1% SeaKem Gold Agarose (TAKARA) と混合し、固化の後、Lysis buffer (0.5M EDTA, 1% lauroyl sarcosine, 1mg/ml proteinase K, pH8.0) により50 $^{\circ}$ C 1夜処理後、TE緩衝液 (pH8.0) で洗浄後0.5M EDTA (pH8.0) 中で冷蔵保存した。

ゲルブロックは、各制限酵素 (*Apa* I, *Bam*H I, *Bln* I, *Bss*H II, *Hind* III, *Nae* I, *Nar* I, *Nhe* I, *Sac* II, *Sfi* I, *Spe* I, *Xba*I) 30Uで至適温度で3時間消化の後、1.2% SeaKem Gold AgaroseゲルでCHEF-DR III (Bio-Rad) により、制限酵素 *Bln* I は、パルスタイム1~17秒、17時間、その他の制限酵素では、パルスタイム1~8秒、13時間 (電圧6V/cm, 温度14 $^{\circ}$ C, x0.5 TBE緩衝液, pH8.3) で泳動後、エチジウムブロマイドで染色し泳動パターンを観察した。

結果

PFGE泳動により明瞭なバンドパターンが観察された制限酵素は *Apa* I, *Bln* I, *Nhe* I, *Sfi* I, *Spe* I であった。このうち、*Nhe* I と *Spe* I では、分子量150Kb以下の領域に10以上の断片が観察された。これらのパターンは、株間で同じものや異なるものがあった (Fig. 1)。制限酵素 *Bln* I では、分子量250Kb以下の領域に断片が

観察され株によってパターンに違いが見られた (Fig. 2)。制限酵素 *Apa* I と *Sfi* I では分子量数100Kbの領域に断片が1本観察され、その他の制限酵素の *Bam*H I, *Bss*H II, *Hind* III, *Nae* I, *Nar* I, *Sac* II, *Xba*I では分子量の小さい領域に多数の断片が観察されたが、識別が難しく株間の多型は解析できなかった。

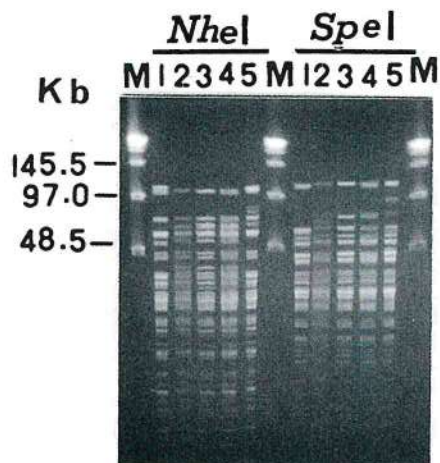


Fig. 1 *B.clarridgeiae*のPFGE泳動パターン (制限酵素 *Nhe* I と *Spe* I)

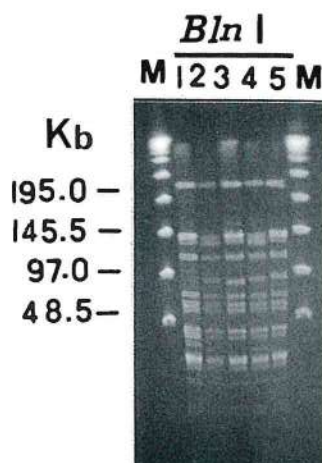


Fig. 2 *B.clarridgeiae*のPFGE泳動パターン (制限酵素 *Bln* I)

考 察

CSDの原因は1990年代の初めに*B.henselae*であることが明らかにされた。*B.henselae*は猫が病原巣となっているが、猫の血液からは*B.henselae*とともに*B.clarridgeiae*も分離される。猫の血液中の*B.clarridgeiae*の保菌について、フランスの猫では、Hellerら³⁾は16%、Gurfieldら⁴⁾は1.1%であったことを報告している。我が国の飼猫では、Maruyamaら¹⁾が0.9% (6/690匹)、高橋ら⁷⁾は、84匹中の1匹に保菌していたことを報告した。私たちが²⁾、飼猫の保菌調査で、5.3% (2/38匹) から分離したことを報告した。しかし、*B.clarridgeiae*の病原性については不明であったが、Kordickら⁵⁾は、*B.clarridgeiae*が原因となったCSDの症例を報告した。また、Chomelら⁶⁾により犬の心内膜炎の原因となることが報告されたことから、*B.clarridgeiae*が、人と動物の共通感染症の病原体であり、最も身近で飼育されている猫が、保菌動物となっていることから、今後本菌の疫学を解明していく必要があると思われる。細菌感染症における疫学調査の中で、分子疫学的手法として、PFGE法は信頼性の高い技術として、多くの菌種で応用されている。これまで、*B.henselae*のPFGE解析

では、制限酵素*Sma* Iと*Not* Iが主に用いられており、様々な遺伝子型の菌が流行していることが明らかにされている^{1), 2)}。しかし、*B.clarridgeiae*については、これまでにPFGE解析による遺伝子の切断パターンの違いは報告されていない。これは、用いた制限酵素をはじめとするPFGE解析技術、手法の未熟によるもの、もしくは単一の遺伝子型の菌だけが流行していることが推測されるが、未解明となっていた。このことから*B.clarridgeiae*のPFGE解析法に用いることのできる有効な制限酵素の検索と、*B.clarridgeiae*の遺伝子多型性について解析した。私たちが、山口県内の飼猫から分離した*B.clarridgeiae* 5株を供試し、12種類の制限酵素によりPFGE解析を行った結果、*Bln* I, *Nhe* I, *Spe* Iの3種類の制限酵素は明瞭なバンドパターンが観察され、菌株によってそれらのパターンは異なっていたことから、*B.clarridgeiae*の遺伝子多型が明らかとなった。

*B.clarridgeiae*は猫での保菌率も低く、これまで解析された例も少数でPFGE解析技術も未熟であったが、今後は、本菌種についてもPFGE法による有効な分子疫学的解析が可能となったものと考えられる。

文 献

- 1) Maruyama, S., Nakamura, T., Kabeya, H., Tanaka, S., Sakai, T. and Katsube, Y.: Prevalence of *Bartonella henselae*, *Bartonella clarridgeiae* and the 16S rRNA Gene Types of *Bartonella henselae* among Pet Cats in Japan. *J. Vet. Med. Sci.*, 62: 273~279. 2000.
- 2) 富田正章, 矢端順子, 富永 潔, 松村健道: 山口県内の飼猫からのバルトネラ属菌の分離と分離株の分子疫学的解析. *日獣会誌*, 57: 664~666. 2004.
- 3) Heller, R., Artois, M., Xenar, V., Briel, D. D., Gehin, H., Jaulhac, B., Montell, H. and Piemont, Y.: Prevalence of *Bartonella henselae* and *Bartonella clarridgeiae* in Stray Cats. *J. Clin. Microbiol.*, 35:1327~1331.1997.
- 4) Gurfield, A. K., Boulouis, H-J., Chomel, B. B., Heller, R., Kasten, R. W., Yamamoto, K. and Piemont, Y.: Coinfection with *Bartonella clarridgeiae* and *Bartonella henselae* and with Different *Bartonella henselae* Strains in Domestic Cats. *J. Clin. Microbiol.* 35: 2120~2123.1997.
- 5) Kordic, D., Hilyard E. J., Hadfield, T. L., Wilson, K. H., Steigerwalt, A. G., Brenner, D. J. and Breitschwerdt, E. B.: *Bartonella clarridgeiae*, a Newly Recognized Zoonotic Pathogen Causing Inoculation Papules, Fever, and Lymphadenopathy (Cat Scratch Disease). *J. Clin. Microbiol.*, 35:1813~1818.1997.
- 6) Chomel, B. B., Mac Donald, K. A., Kasten, P. W., Chang, C-C., Wey, A. C., Foley, J. E., Thomas, W.P. and Kittleson, M. D.: Aortic Valve Endocarditis in a Dog Due to *Bartonella clarridgeiae*. *J. Clin. Microbiol.*, 39: 3548~3554. 2001.
- 7) 高橋敏子, 久保雅敏, 鈴木宣夫, 長井 章, 松本寿男, 小林羊平, 森田幸雄, 丸山総一: 群馬県の猫および犬における*Bartonella*保菌状況と分離株の遺伝子多型性. *日獣会誌*, 58: 697~702. 2005.
- 8) Maruyama, S., Kasten, R. W., Boulouis, H-J., Gurfield, N. A., Katsube, Y. and Chomel, B.B.: Genetic Diversity of *Bartonella henselae* Isolates from Domestic Cats from Japan, the USA and France by Pulsed-Field Gel Electrophoresis. *Vet. Microbiol.*, 79: 337~349. 2001.

原 著

ブロイラー筋胃びらんからのトリアデノウイルスの分離と
山口県内の浸潤状況

柳澤郁成¹⁾・中谷英嗣¹⁾・大石大樹²⁾・日高秀次³⁾

〔受付：2007年12月25日〕

ORIGINAL ARTICLE

AVIAN ADENOVIRUS ISOLATED FROM GIZZARD EROSION OF BROILER CHICKENS:
A SEROLOGICAL SURVEY IN YAMAGUCHI PREFECTURE

Fuminori YANAGISAWA¹⁾ Hidetsugu NAKATANI¹⁾ Daiki OISHI²⁾ and Shuji HIDAKA³⁾

1) *Yamaguchi Prefectural Chubu Livestock Hygiene Service Center 671-5 Kagawa,
Yamaguchi-shi, Yamaguchi-ken 754-0897, Japan*

2) *Yamaguchi Prefectural Seibu Livestock Hygiene Service Center 1892 Tonoshiki,
Toyota-cho, Shimonoseki-shi, Yamaguchi-ken 750-0421, Japan*

3) *Fukawa Chicken Farm Cooperative Society, 1859-1 Higashifukawa,
Nagato-shi, Yamaguchi-ken 759-4101, Japan*

〔Received for publication : December 25, 2007〕

The outbreaks of gizzard erosion among slaughtered broiler chickens led us to conduct pathological and microbiological examinations. The lesion was noticed among 20% to 25% of the killed chickens, but no clinical signs were found. The nourishment rate was 97 to 98%. From gizzard lesion group I avian adenovirus (GIAAV) was isolated, and it was identified as serotype 1. As a result of neutralizations tests, it was confirmed that GIAAV strain was widespread in Yamaguchi Prefecture. Seroconversion rate was higher among breeding stocks and layers, and it went up higher with their age. This is the first report on GIAAV in Yamaguchi Prefecture.

はじめに

鶏の筋胃びらんは、食鳥処理場で発見された際には、廃棄されることから“筋胃（砂ずり）”の確保に支障が出る等、しばしば問題となる。1978年頃には、飼料原料中の魚粉に含まれる化合物ジゼロシンが原因となるものが、西日本のブロイラーで多発したが³⁾、その後の改善策により、発生報告は見られなくなった。しかし、1993年に谷村ら⁴⁾がグループI型トリアデノウイルス（GIAAV）による筋胃びらんをレイヤーで初めて報告して以来、国内においてもGIAAVによる筋胃びらのん¹⁾の散発例が相次いで報告されるようになった^{1, 5, 6)}。

今回、県内のブロイラーにおいて、山口県では初めてGIAAVによる筋胃びらんに遭遇したので報告する。

1) 山口県中部家畜保健衛生所 〒754-0897 山口県山口市嘉川671-5
2) 山口県西部家畜保健衛生所 〒750-0421 山口県下関市豊田町殿敷1892
3) 山口県深川養鶏農業協同組合 〒759-4101 山口県長門市東深川1859-1

I 発生概況

2004年6月に県内の食鳥処理施設において、筋胃びらんの発生が目立ち、筋胃の廃棄率が高まったため、ブロイラー養鶏組合より病性鑑定の依頼があった。発生は同組合内の複数の養鶏場で見られたが、今回、A市内2カ所(B, C)の農場について検査を実施した。

各農場の飼養、出荷羽数、出荷日齢をTable 1に示した。筋胃びらんは、食鳥処理羽数の20~25%で見られたが、発生農場の育成率は97~98%と高く、臨床症状は見られなかった。

II 材料と方法

材料は、食鳥処理施設でびらんが見つかったB, C農場由来の筋胃各1ロットと2004年度に採取したブロイラー、ブロイラー種鶏、レイヤーの血清28農場232羽を用いた。筋胃について、病理組織学的検査(HE)と免疫組織化学的検査⁴⁾、発育鶏卵尿膜腔内並びに鶏腎培養細胞(CK)によるウイルス分離及びト

リアデノウイルス(AAV)特異的プライマーを用いた遺伝子増幅法(PCR)⁸⁾を実施した。分離されたAAVは、GIAAV血清型1(JM1/1株)及び8(B13-1株)に対する抗血清を用いて血清型別を行い、同定後に野外血清抗体調査を中和試験⁷⁾により実施した。

III 成績

1. 病理組織学的検査

供した筋胃は食鳥処理施設において採取され、既に洗浄されていたため、肉眼的に出血は確認できなかったが、粘膜は顕著に肥厚し、角質層から粘膜上皮にかけてびらんの形成が見られた(Fig. 1)。

HEでは、角質層は肥厚、剥離し、中層~深層にかけて出血や偽好酸球の浸潤が認められた(Fig. 2)。病変部の筋胃腺上皮細胞は変性、膨化し、核内に大型の好酸性~好塩基性の封入体や一部でハローを形成する好酸性封入体が散見され、固有層では、偽好酸球や単核細胞の浸潤が見られた(Fig. 3)。

免疫組織化学染色では、核内封入体に一致して、GIAAV陽性抗原が確認された(Fig. 4)。

2. ウイルス学的検査

両症例とも、尿膜腔内液からはHA性を有するウイルスは分離されなかったが、CK接種2代目において円形化の細胞変性効果(CPE)を認めるウイルスが分離された(Fig. 5)。

筋胃乳剤の上清とCK接種2代目の培養上清について、AAV特異的プライマーを用いたPCRを実施したところ、筋胃乳剤上清では、AAV遺伝子は検出されなかったが、CPEを示した培養上清ではAAV遺伝子を検出し、分離ウイルスをAAVと同定した。また、症例2では、顕著なCPEを示さなかったものでもAAV遺

伝子が確認された(Fig. 6)。

分離ウイルスと筋胃びらんを起こすとされるGIAAV血清型1及び8の抗血清を用い、間接蛍光抗体法(IFA)並びにウイルス希釈法による中和試験を行った。中和抗体価は、血清無添加ウイルス感染価と抗血清混合ウイルス感染価の指数の差により算出した。結果、IFAでは、血清型1, 8共に蛍光が認められたが(Fig. 7)、中和試験では、血清型1であるJM1/1株において有意な抑制が見られ、分離ウイルスは血清型1に分類された(Table 2)。

3. 血清学的検査

山口県下を4地域に分け、鶏種別に分離株に対する抗体陽性率を調査した。中和抗体価が40倍以上を示したものを抗体陽性とした。その結果、本症例が見られた西部地域ではブロイラー、ブロイラー種鶏、レイヤーいずれも陽性率が高く、東部や北部のブロイラーでは陽性例は無かったが、いずれの地域もレイヤーでは、陽性率が高い傾向にあった(Table 3)。

各鶏種について、日齢を4つに区分し、抗体陽性率を見ると、ブロイラーでは、発生農場の一部に出荷直前の49日齢で陽性(陽性率 8.3%)が確認された他は、陰性であった。種鶏、レイヤーでは210日齢以降から80%以上の陽性率を示し、日齢が増すごとにウイルス感染の機会が増大していることが確認された(Table 4)。

IV 考察

GIAAVによる鶏の筋胃びらんは、1993年に谷村らが国内初報告後、西日本を中心に相次いで報告されている^{1, 4, 5, 6)}が、今回、山口県で初めて本ウイルスを分離した。筋胃びらんを起こすGIAAVには、血清

型1と8があり、感染実験により病変の再現性が確認されている^{2, 5, 7)}。今回の分離株は、IFAでは血清型1, 8共に蛍光を呈したが、中和試験では、血清型1の抗血清で有意に抑制されたことから、血清型1に同

定された。

分離株を用いた抗体調査から、GIAAV血清型1は県内に広く浸潤していることが明らかになった。鶏種では、ブロイラーの陽性率は低く、発生農場であっても別ロットの鶏では、陽性が認められない事例もあった。しかし、長期間飼養する種鶏やレイヤーにおいて陽性率が高いことから、日齢が増すごとにウイルス感染の機会が増大していると思われた。今回の発生は、養鶏組合内において、本ウイルスに感染した種鶏から生産されたコマーシャル鶏も感染し、筋胃びらんを発現したと推測された。

AAVは鶏の呼吸器や腸管に常在し、不顕性感染や健康と思われる鶏からしばしば分離され、特に筋胃びらん病変からはGIAAV血清型1が高率に分離されている。山田ら⁷⁾は、鹿児島県内においても筋胃びらんにGIAAV血清型1が強く関与していると報告している。

島田ら³⁾はGIAAV血清型1の感染実験を行い、筋胃びらんは一定期間見られるものの、その後治癒すると報告している。今回、組合系列農場であっても筋胃び

らん発生率に差が見られ、必ずしも抗体陽性率と一致しなかったことから、感染時期や飼養環境がびらん発生率やウイルス分離率に影響していると考えられた。当組合では、2002年9月にも同様の病性鑑定依頼があったが、当時の鑑定結果では、ウイルスの関与は認められなかった。しかし、当組合では、過去にジゼロシン中毒を経験し、給与飼料中の魚粉の配合については特に注意を払っており、独自検査したAAVの抗体陽性率も発生農場では高かったことから、2002年の発生もGIAAVの関与が示唆された。

以上のことから、GIAAVは野外に広く常在化しており、飼養環境や日和見感染等の影響により筋胃びらんの発現や死亡率の増加を呈すると考えられ、予防するには、日常の飼養管理に留意し、本ウイルスに効果のある消毒薬を選択する必要がある。

稿を終えるにあたり、免疫組織化学染色を実施していただいた動物衛生研究所中村菊保先生、抗GIAAV血清を分与していただいた鹿児島大学農学部獣医学科高瀬公三教授に深謝する。

文 献

- 1) Masaaki Ono, Yo Okuda, Shigeto Yazawa, Isao Shibata, Nobuhiko Tanimura, Kumiko Kimura, Makoto Haritani, Masaji Mase, and Shizuo Sato: Epizootic Outbreaks of Gizzard Erosion Associated with Adenovirus Infection in Chickens., *Avian Dis.* 45: 268~275, 2001
- 2) Masaaki ONO, Yo OKUDA, Isao SHIBATA, Shimizu SATO and Kosuke OKADA: Reproduction of Adenoviral Gizzard Erosion by the Horizontal Transmission of Fowl Adenovirus Serotype 1., *J. Vet. Med. Sci.* 69 (10): 1005~1008, 2007
- 3) 宮崎 茂: ブロイラーの筋胃糜爛. 家畜衛試研究報告, 第90号, 1~8, 1988
- 4) N. Tanimura, K. Namura, K. Nakamura, K. Imai, M. Maeda, T. Gobo, S. Nitta, T. Ishihara, and H. Amano: Necrotizing Pancreatitis and Gizzard Erosion Associated with Adenovirus Infection in Chickens. *Avian Dis.*, 37: 606~611, 1993
- 5) 島田善成・豊田勇夫: ブロイラー筋胃び爛からのトリアデノウイルスの分離および接種試験. 平成16年度長崎県家畜保健衛生業績発表会収録: 58~60. 2004
- 6) 飛梅三喜・東城孝良: ブロイラーひなにみられたアデノウイルス性筋胃炎. 平成11年度徳島県家畜保健衛生業績発表会収録: 42~46. 1999
- 7) 山田貴美子・高瀬公三・田原口智士・山崎憲一・太田秀幸・平良和代・高江行一: ブロイラー筋胃びらんから分離された鶏アデノウイルスの血清型および筋胃病変の再現試験・鹿児島大学農学部学術報告・第55号, 15~21, 2005
- 8) Zhixun Xie, Amin A. Fadl, Theodore Girshick, and Mazhar I khan: Detection of Avian Adenovirus by Polymerase Chain Reaction. *Avian Dis.*, 43: 98~105. 1999.

Table 1 発生概況

	症例 1	症例 2
農場名	B農場	C農場
飼養羽数	4,000羽	15,400羽
出荷羽数	950羽	5,100羽
出荷日齢	71日齢	49日齢
筋胃びらん出現率	約20%	約25%
育成率	97.4%	98.6%

Table 2 抗血清による血清型別

	JMI/1株		B13-1株	
	IFA	中和試験	IFA	中和試験
症例 1	+1)	3.5 ²⁾	+	1.0
症例 2	+	4.5	+	0.5

1) 蛍光を示したもの
2) 中和抗体価 (指数)

Table 3 抗体陽性率 (地域別)

地域	ブロイラー	ブロイラー 種鶏	レイヤー	全体
東部	{ 0.0% (0/24)	NT	75.0% (6/8)	18.8% (6/32)
中部	{ NT	0.0% (0/8)	56.3% (9/16)	37.5% (9/24)
西部	{ 12.5% (8/64)	80.0% (64/80)	100% (16/16)	55.0% (88/160)
北部	{ 0.0% (0/8)	NT	75.0% (6/8)	37.5% (6/16)
計	{ 8.3% (8/96)	72.7% (64/88)	77.1% (37/48)	47.0% (109/232)

中和抗体価40倍以上を陽性とした
NT: 実施せず

Table 4 抗体陽性率 (日齢別)

日齢	~70	71~140	141~364	365~	全体
ブロイラー	{ 8.3% (8/96)	NT	NT	NT	8.3% (8/96)
ブロイラー 種鶏	{ NT	0.0% (0/8)	77.5% (31/40)	82.5% (33/40)	72.7% (64/88)
レイヤー	{ NT	25.0% (2/8)	100% (8/8)	84.4% (27/32)	77.1% (37/48)
計	{ 8.3% (8/96)	12.5% (2/16)	81.3% (39/48)	83.3% (60/72)	47.0% (109/232)

中和抗体価40倍以上を陽性とした
NT: 実施せず

附 図 説 明

Fig. 1 食鳥処理施設で採取された筋胃 (びらん部; 矢印)

Fig. 2 筋胃のびらん部 (HE染色, ×20)

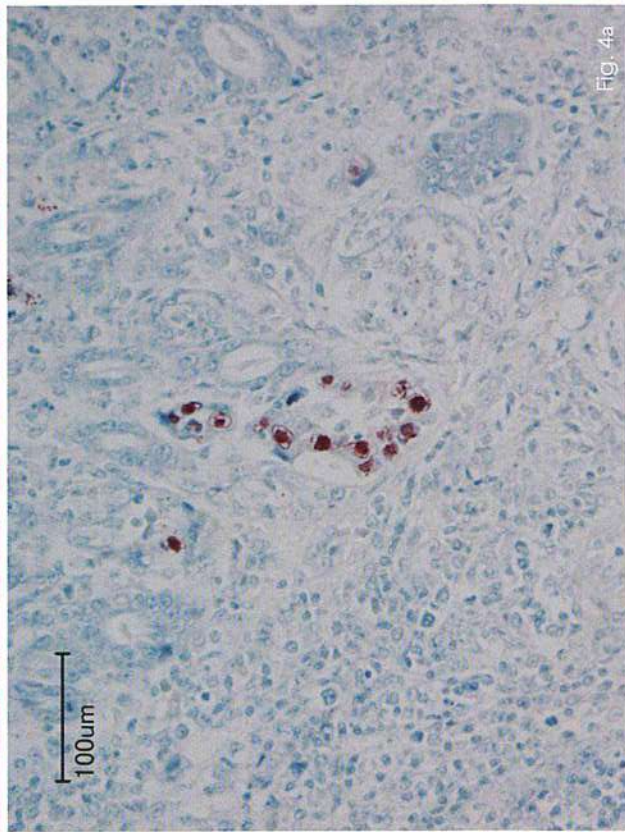
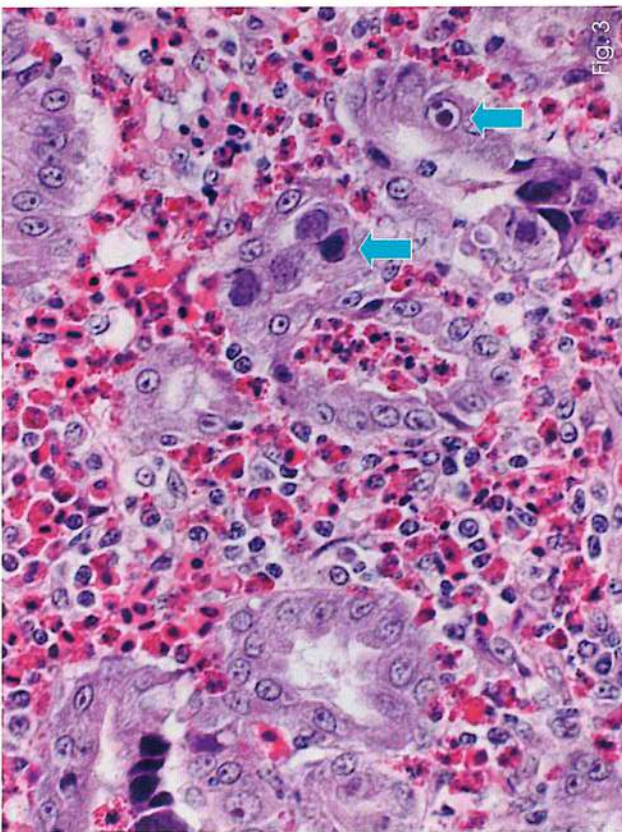
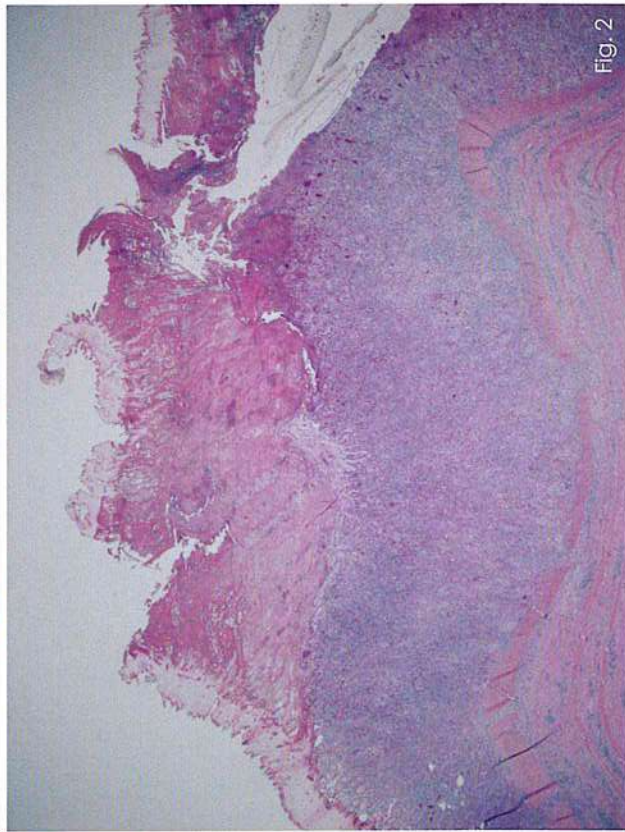
Fig. 3 筋胃腺 (HE染色, ×600) ; 上皮細胞の核内に大型の好酸性~好塩基性の封入体 (矢印左), ハローを形成する好酸性封入体 (矢印右) を認める. 固有層に偽好酸球や単核細胞の浸潤を認める.

Fig. 4 筋胃腺 (免疫組織化学染色, Bar=100 μm) ; 症例1 (Fig.4a), 症例2 (Fig.4b) ともに, 核内にGIAAV陽性抗原を認める.

Fig. 5 病変部乳剤を接種したCK; 正常CK (Fig.5a), 継代2代目のCPE像 (Fig.5b)

Fig. 6 AAV遺伝子の検出

Fig. 7 GIAAV抗血清によるIFA像; 正常CK (Fig.7a), 分離ウイルス接種CK (Fig.7b)



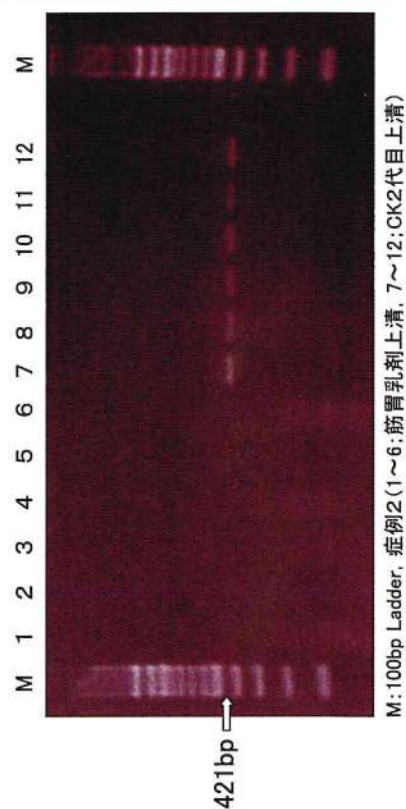
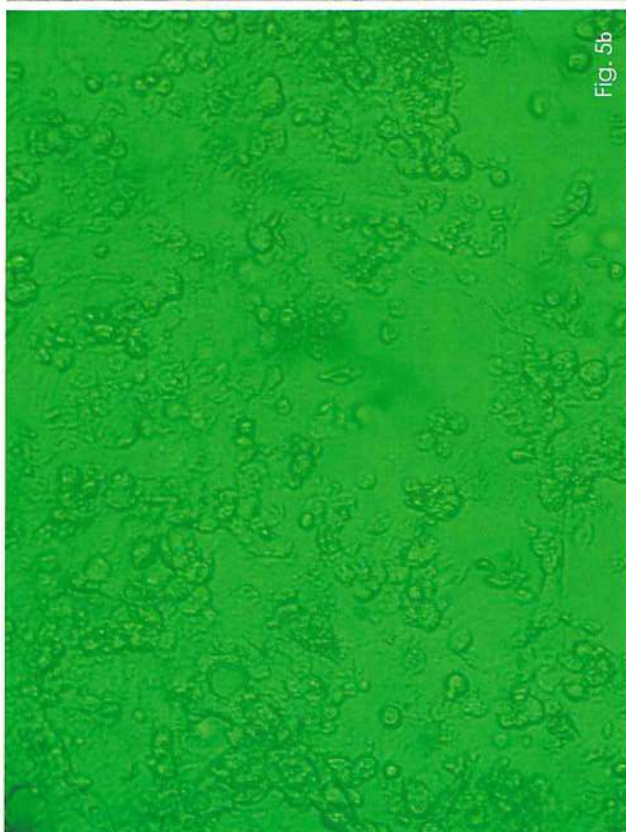
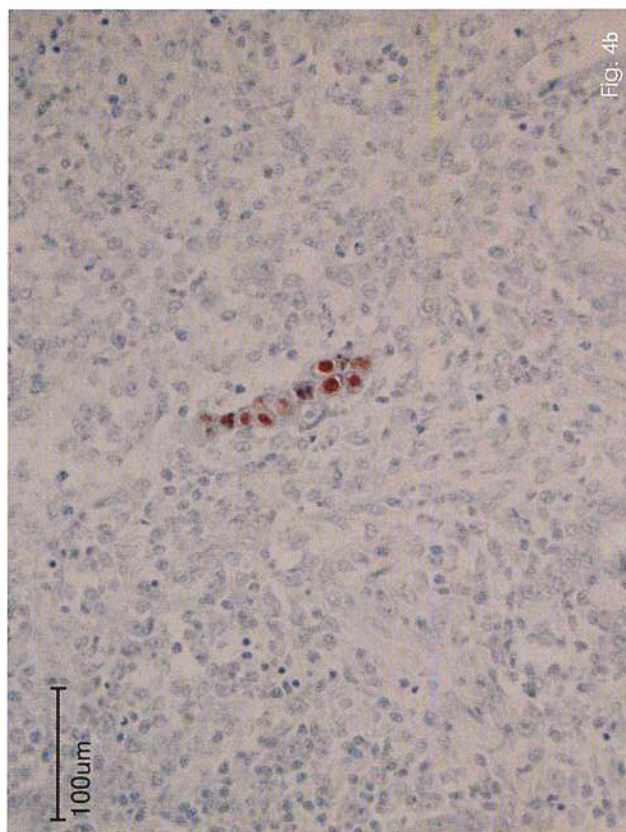
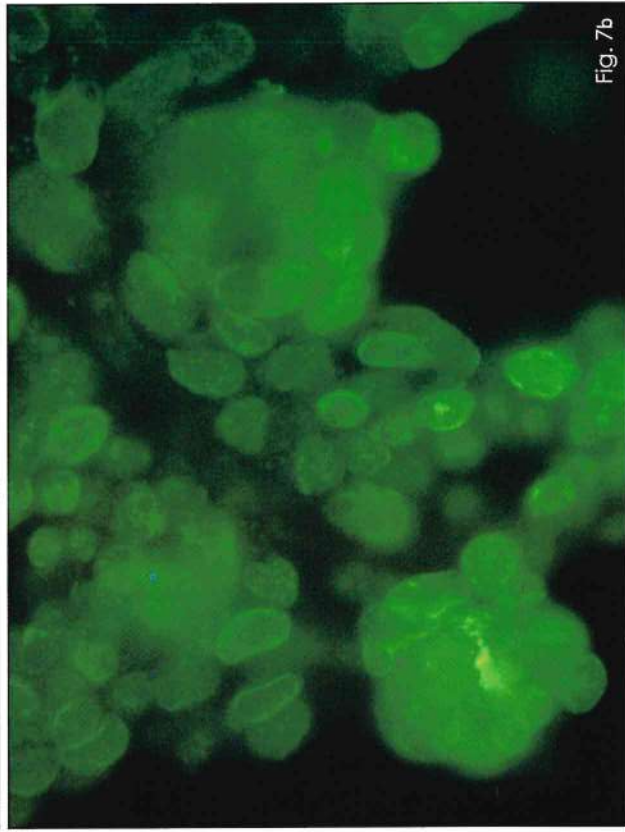
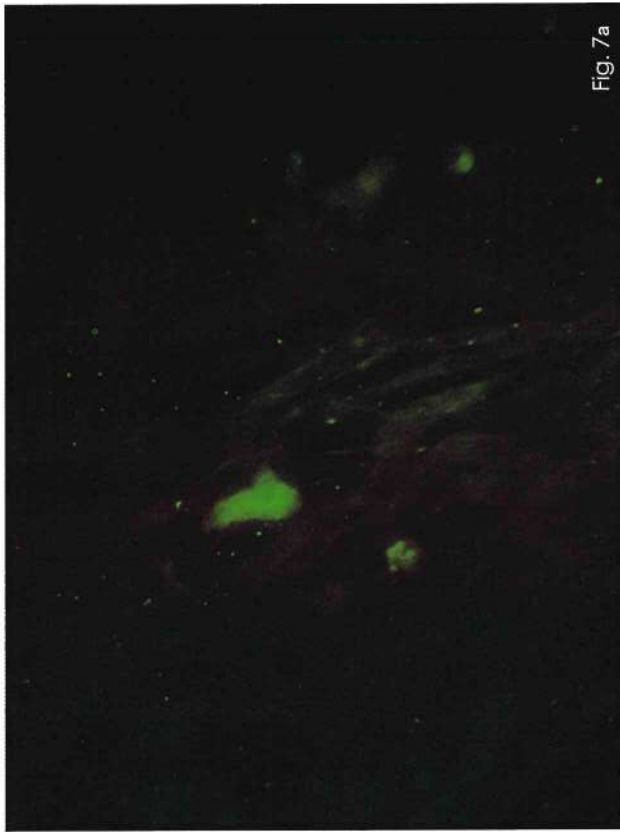


Fig. 6 AAV遺伝子の検出



短 報

めん類製造施設における改善指導について

亀山光博*・大橋めぐみ*・小林浩幸*・水津隆市*・山根孝治*

〔受付：2007年12月25日〕

SHORT COMMUNICATION

SOME GUIDANCE AND RECOMMENDATION REGARDING THE SANITATION OF
A NOODLE PRODUCTION FACILITY.

Mitsuhiro KAMEYAMA*・Megumi OHASHI*・Hiroyuki KOBAYASHI*・

Takaichi SUIZU* and Koji YAMANE

Yamaguchi Health and Welfare Center of Yamaguchi Prefecture, 1-1 Shimohigashi 3-chome,

Yamaguchi-shi, Yamaguchi-ken 753-8588, Japan

〔Received for publication : December 25, 2007〕

We collected and inspected some noodles, which were produced at a local factory in our jurisdiction. Coli bacillus group was detected in the steamed Chinese noodles. We visited the plant and recommended some remedies of the equipment. They voluntarily received two inspections of the Chinese noodles. In both inspections coli bacillus group was detected. We conducted a detailed inspection of the plant, found out the possible causes of the contamination, and showed them our guidelines accordingly. In the ensuing inspection no bacillus group was detected.

In August and September 2007 we wiped the surface of the production machines, and sampled noodles and cooling water. The inspected headings included bacterial count, coli bacillus group, staphylococcus aureus, and residual chlorine.

In the first and the second inspections coli bacillus group was detected at various spots, such as the front of the cooling machine, the cooling container, the introduction, the hopper, and the tube of the packing machine, noodle products, and cooling water. In the third inspection, however, no bacterial group was detected. Bacterial count was within the standard level ($<10 \times 10^6$ CFU/g or /ml).

We encouraged the noodle producer to identify the spots of the equipment liable to contamination, to wash and sterilize these areas completely. We are convinced that the most important is to give the producers specific, easy-to-understand instructions, which are supported by scientific evidence.

1 はじめに

当所管内のめん類製造業者が製造しためん類製品（ゆでうどん、むし焼きそば、むし中華そば）を収去検査をしたところ、むし中華そば（ゆでめん）において大腸菌群が「生めん類の衛生規範（平成3年4月25日付け衛食第61号）（以下、「衛生規範」という。）の基準に適合していなかった。

このため、当所は当該施設に立ち入り、改善指導を行ったうえで業者にむし中華そばの依頼検査を2度実施させ

たが、いずれも大腸菌群の項目が不適であった。

このように改善が見受けられないため、当該施設に対して原因究明のため詳細な調査を行い、その結果に基づき改善指導を行い、改善が図られたのでその概要を報告する。

2 調査方法

- (1) 調査期間 平成18年8月から9月
 (2) 対象施設 管内のめん類製造施設
 (3) 調査目的 製造工程中の汚染されやすい箇所を特定すること
 (4) 調査内容 製造工程及びめん類
 (5) 調査項目等
 ア 検体 むし中華そば、むし焼きそば、チャンポン、蒸し機・冷却機・包装機の拭き取り、冷却水
 イ 検査項目
 (ア)めん類及び拭き取り
 生菌数、大腸菌群、黄色ブドウ球菌（第2、3回調査時は未実施）
 (イ)冷却水：生菌数、大腸菌群、黄色ブドウ球菌（第2、3回調査時は未実施）及び残留塩素
 ウ 細菌検査方法
 (ア)めん類 衛生規範による。
 (イ)拭き取り及び冷却水 衛生試験法による。

3 調査結果

- (1) 聞き取り調査結果
 ア 蒸し機、冷却機、包装機の洗浄状況
 作業終了後、めん類の冷却槽、冷却用かごについては除菌剤入りの洗剤を用い、製造時と同様に機械を作動させながら洗浄を行った後、水で洗い流していた。包装機は分解し、分解できないその他の製造機はそのままの状態、それぞれ除菌剤入りの洗剤を用いて高压ウォッシャーで洗浄し、その後水で洗い流していた。
 イ めん類冷却水の管理状況
 冷却用の水には井戸水が使用されており、管理として塩素滅菌を行っていたが、定期的な水質検査は実施されていなかった。
- (2) 細菌検査結果
 ア 第1回検査結果（8月下旬）
 検査結果はTable 1、Table 2のとおりである。Table 1の作業終了直後では冷却前の受入口（右）、ホッパー広口部、包装機内筒（上部、下部）、洗浄後では包装機内筒（上部）が大腸菌群に汚染されていた。菌数（/cm²）に着目すると、冷却前受入口（460CFU/cm²）包装機内筒上部（9600CFU/cm²）が高度に汚染されていた。また、Table 2の包装機直前のむし中華そば、製品（むし中華そば、むし焼きそば）、作業後の冷却水も大腸菌群に汚染されていた。
 生菌数、黄色ブドウ球菌については衛生規範の適合範囲であった。（以降の検査結果においても生菌数に問題がみられなかったため、Table 3～5では生菌数を省略した。）

Table 1 第1回検査結果（拭き取り）

検体名	検査結果						
	作業終了後			洗浄後			
	生菌数(/10 ² cm ²)	大腸菌群*	黄色ブドウ球菌	生菌数(/10 ² cm ²)	大腸菌群	黄色ブドウ球菌	
蒸し機	蒸し機手前	300以下	陰性	陰性		陰性	陰性
	蒸し機後	3.2×10 ²	陰性	陰性	300以下	陰性	陰性
冷却機	冷却前受入口右	9.1×10 ³	陽性(460)	陰性	300以下	陰性	陰性
	冷却前受入口左	300以下	陰性	陰性	300以下	陰性	陰性
	冷却用かご①	300以下	陰性	陰性	300以下	陰性	陰性
	冷却用かご②	300以下	陰性	陰性	300以下	陰性	陰性
包装機	包装機手前口	3.4×10 ³	陰性	陰性	1.1×10 ³	陰性	陰性
	ホッパー長筒部	8.6×10 ²	陰性	陰性	300以下	陰性	陰性
	ホッパー広口部	1.4×10 ⁴	陽性(50)	陰性	300以下	陰性	陰性
	包装機受入口	1.0×10 ³	陰性	陰性	4.0×10 ²	陰性	陰性
	包装機内筒上部	9.9×10 ⁴	陽性(9600)	陰性	5.7×10 ²	陽性(30)	陰性
包装機内筒下部	2.7×10 ⁴	陽性(170)	陰性	4.6×10 ²	陰性	陰性	

*大腸菌群()内：CFU(colony forming unit)/10²cm²

Table 2 第1回検査結果 (めん類、冷却水)

検体名	検査結果			
	生菌数(/10 ² cm ²)	大腸菌群*	黄色ブドウ球菌	残留塩素(mg/L)
むし中華そば(細切直後)	3.7×10 ⁵	陰性	陰性	
むし中華そば(蒸し機直後)	3.3×10 ³	陰性	陰性	
むし中華そば(冷却前)	3.1×10 ³	陰性	陰性	
むし中華そば(冷却終了後)	7.7×10 ³	陰性	陰性	
むし中華そば(包装機直前)	3.1×10 ¹	陽性(30)	陰性	
むし中華そば(製品)	1.2×10 ¹	陽性(690)	陰性	
チャンポン(製品)	1.0×10 ¹	陽性(100)	陰性	
むし焼きそば(製品)	1.0×10 ³	陽性(80)	陰性	
水(冷却水)	300以下	陰性	陰性	0.2
水(冷却シャワー水)	3.6×10 ²	陰性	陰性	0.2
水(作業後の水槽水)	1.1×10 ³	陽性(10)	陰性	0.8

*大腸菌群()内: CFU/g 又は /ml

イ 第2回検査結果 (9月上旬)

検査結果は Table 3, Table 4 のとおりである。Table 4 の作業終了直後では冷却前の受入口(右, 左), 冷却用かご, 包装機手前口, ホッパー広口部, 包装機受入口, 包装機内筒(上部), 洗浄後では包装機手前口が大腸菌群に汚染されていた。特に冷却用受入口が汚染されており, 10³CFU/10²cm²以上の大腸菌群が検出された。Table 3 の製

品検査ではむし中華そば, チャンポン, むし焼きそばが, また作業後の冷却水からも大腸菌群が検出された。

ウ 第3回検査結果 (9月下旬)

検査結果を Table 5 のとおりである。すべての検体で大腸菌群は陰性であった。

Table 3 第2回検査結果 (めん類、冷却水)

検体名	検査結果	
	大腸菌群*	残留塩素(mg/L)
むし中華そば(製品: 4時20分製造)	陽性(30)	
むし中華そば(製品: 4時40分製造)	陰性	
むし中華そば(製品: 4時55分製造)	陽性(40)	
チャンポン(製品: 5時25分製造)	陽性(40)	
むし焼きそば(製品: 6時45分製造)	陽性(20)	
水(冷却水)	陰性	ND
水(冷却シャワー水)	陰性	ND
水(作業後冷却水)	陽性(140)	

*大腸菌群()内: CFU/g 又は /ml

Table 4 第2回検査結果 (拭き取り)

検体名	検査結果		
	大腸菌群*		
	作業終了直後	洗浄後	
蒸し機	蒸し機手前	陰性	陰性
	蒸し機後	陰性	陰性
冷却機	冷却前受入口右	陽性(10)	陰性
	冷却前受入口左	陽性(2760)	陰性
	冷却用かご①	陰性	陰性
	冷却用かご②	陽性(40)	陰性
	包装機手前口	陽性(10)	陽性(80)
包装機	ホッパー長筒部	陰性	陰性
	ホッパー広口部	陽性(10)	陰性
	包装機受入口	陽性(1280)	陰性
	包装機内筒上部	陽性(110)	陰性
	包装機内筒下部	陰性	陰性

*大腸菌群()内: CFU/10²cm²

Table 5 第3回検査結果 (めん類、拭き取り)

検体名	検査結果	
	大腸菌群*	
むし中華そば(製品: 4時15分製造)	陰性	
むし中華そば(製品: 4時35分製造)	陰性	
むし中華そば(製品: 4時45分製造)	陰性	
チャンポン(製品: 5時5分製造)	陰性	
むし焼きそば(製品: 6時30分製造)	陰性	
冷却機	冷却前受入口右	陰性
	冷却前受入口左	陰性
	冷却用かご①	陰性
	冷却用かご②	陰性
包装機	包装機手前口	陰性
	ホッパー長筒部	陰性
	ホッパー広口部	陰性
	包装機受入口	陰性
	包装機内筒下部	陰性

*大腸菌群()内: CFU/10²cm²

4 考 察

第1, 2回の拭き取り検査及びむし中華そばの検査の結果, 以下の部位が汚染されていたことがわかった.

- ・冷却前受入口 ・冷却用かご ・包装機手前口
- ・ホッパー広口部 ・包装機内筒 (上部, 下部)
- ・包装機受入口

また, 大腸菌群数から, 特に冷却前受入口と包装機内筒が高度に汚染されていることが判明した. このことから, 作業終了後の洗浄が不十分なために残存した大腸菌群が次の日の製造開始までに増殖し, むし中華そば等の製品を汚染したと考えられた. めんの冷却前受入口については簡単には分解できない構造であり, 洗浄・殺菌が容易にはできないが, 包装機については分解可能な構造であり, 作業後の分解洗浄・殺菌を徹底する必要があることがわかった.

また, めんの冷却水については塩素注入器の故障により残留塩素が検出されないこともあった. このことを踏まえた上で, 以下の指導を行った.

- ①作業終了後は従来の高圧ウォッシャーにより蒸し機・包装機の洗浄・殺菌を徹底すること. 特に汚染のひどかった包装機内筒については分解洗浄・殺菌を, 分解できない冷却前受入口については, 特に時間を

かけて洗浄・殺菌を行うこと.

- ②作業開始前には, アルコールスプレーを用いて汚染が認められた箇所を重点的に殺菌すること.
- ③使用する水については, 作業前に残留塩素 (0.1mg/L以上) の確認を行うこと.

第3回調査ではすべての検体から大腸菌群は検出されず, 製品は衛生規範適合となった. 作業終了後の洗浄・殺菌が不十分なために, 残った菌がたとえわずかであっても, 特に夏場の高温多湿な環境中ではかなり増殖し, 翌日の製造に影響を及ぼすのではないかと示唆され, 作業後の入念な洗浄・殺菌及び作業開始前の再殺菌が効果を発揮したと考えられた.

洗浄担当者は作業終了後の製造ラインにめん屑等がみられなかったことに安心していましたが実際は汚染が起こっており, 殺菌に対する認識の甘さが問題であったと言える.

また, 数回にわたる指導にもかかわらず, 施設の衛生状態はなかなか改善しなかった. 聞き取り調査の結果, 指導事項が製造・洗浄担当者に十分伝わっていないことがわかり, 社内の従業員教育体制にも問題があることが考えられた.

5 ま と め

- (1) 汚染されやすい箇所を特定し徹底的に洗浄・殺菌を行うよう指導したことにより大腸菌群による汚染を防止できたことから, 業者に対しては科学的根拠に基づいた具体的でわかりやすい指導が重要であると思われた.
- (2) 当施設では, 責任者が洗浄・殺菌について指示するのみで実施状況の確認がされておらず, 製造終了後はパート社員に任せっきりであったため, 当所の指示が徹底しにくかったと思われる. 責任者から各従業員にまで指示が徹底できる体制の確立を指導することが不可欠であることから, 洗浄・殺菌作業手順のマニュアルや日々の洗浄・殺菌チェックリストの作成等を行っていくこととする.
- (3) また, 当製造業者に行った指導を他のめん類製造業者あるいは他種の製造業者への指導につなげていきたい.

症 例

左上顎埋伏犬歯の外科的歯牙移動を行ったイヌの1症例

白石加南¹⁾・八村寿恵¹⁾・山岡佳代¹⁾・久山朋子¹⁾・鳥越賢太郎¹⁾

加藤吉男²⁾・網本昭輝¹⁾

〔受付：2007年12月25日〕

CLINICAL CASE

THE SURGICAL ORTHODONTIC MOVEMENT OF THE IMPACTED CANINE TEETH IN A DOG

Kana SHIRAISHI¹⁾, Hisae HACHIMURA¹⁾, Kayo YAMAOKA¹⁾, Tomoko KUYAMA¹⁾

Kentaro TORIGOE¹⁾, Yoshio KATOH²⁾ and Akiteru AMIMOTO¹⁾

1) *Amica Pet Clinic, 3-2-3 Onda-cho, Ube-shi, Yamaguchi-ken 755-0023, Japan*

2) *Pet Clinic Katoh, Isahaya-shi, Nagasaki-ken 854-0036, Japan*

〔Received for publication : December 25, 2007〕

It is known that impacted teeth development in both deciduous teeth and permanent teeth, which are most seen among small-sized dogs, causes various symptoms, when it is left untreated. We performed a gingival incision, as well as a surgical orthodontic treatment, for a canine impacted tooth in the left maxilla of a seven-month-old toy poodle. As a result the impacted tooth developed neutrally.

埋伏歯は乳歯・永久歯ともに発生し、かつ小型犬に多く、放置した場合様々な症状を引き起こすことが知られている。今回我々は、7ヵ月齢のトイ・プードルの左上顎永久犬歯の埋伏歯に対し、歯肉切開術に加えて外科的歯牙移動を行ったところ、埋伏犬歯は正常方向に萌出し、経過は良好であった。

はじめに

埋伏歯とは、萌出すべき歯がその時期を過ぎても顎骨内もしくは歯肉下にとどまっている状態をいう^{8, 9, 10)}。動物の埋伏歯に関する国内での報告は少なく^{1~4)}、獣医歯科学に関する成書のなかでの記載もごく僅かしか見られないのが現状である^{5, 6)}。埋伏歯は小型犬に多く発生するとされ、その原因として、埋伏歯が多数存在する場合は全身疾患や遺伝によるもの、数歯である場合は、局所的な原因（歯胚の位置や萌出方向の異常、乳歯の晩期残存など）^{8, 10, 11)}が挙げられる。埋伏歯はその程度によって、完全埋伏歯と不完全埋伏歯に区別される^{8, 10)}。完全に埋伏しており、かつ無症状の場合は、肉眼において欠如歯との判別を行うことは困難であり、X線検査を行うことが必要になる^{1~6)}。今回、我々は、左上顎犬歯（204：トライアダンナンバリング法での表示、以下この表記に従う）の埋伏歯を有する7ヵ月齢の犬の症例で歯肉切開術に加えて外科的歯牙移動を行い、正常な方向へ萌出を完了したので、その概要を報告する。

1) 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 TEL 0836-34-2861 FAX:0836-22-3341
MAIL:info@amicapet.co.jp

2) ペットの病院 カトウ 〒854-0036 長崎県諫早市長野町1485-7

症 例

トイ・プードル、7ヵ月齢、避妊雌、2.0kg。6日前に左上顎乳犬歯(604)の抜歯を行ったが、永久犬歯(204)が萌出しないとのことで紹介され来院した。このとき、右上顎永久犬歯(104)は既に萌出していた。肉眼的に左上顎犬歯部の歯肉膨隆が認められた(Fig. 1)。麻酔下で口腔内X線検査を行ったところ、前方から撮影したX線写真から、左上顎第3切歯(203)が欠歯であること、また左上顎永久犬歯が埋伏していることにより左右の犬歯が非対称であること(Fig. 2)、および側方から撮影したX線写真より左上顎永久犬歯が歯肉下に埋伏しており、根尖は大きく開放していることを確認した(Fig. 3)。

処置として始めに、X線写真で左上顎埋伏犬歯の位置を確認し、メスにて歯肉切開を行った(Fig. 4)。つぎに、骨膜剥離子にて犬歯部歯肉を歯槽骨から分離し、犬歯歯冠を露出させ、エレベーターを用いて頬側に外科的歯牙移動を行い(Fig. 5)、犬歯部頬側の歯肉をナイロン糸で縫合した(Fig. 6)。

処置1ヵ月後の検診において、左上顎犬歯は正常な位置に萌出し、動揺や不正咬合、歯冠の変色などはなかった(Fig. 7)。X線検査で、上顎犬歯は左右どちらの犬歯も順調に成長し、処置前と比較して歯根は伸長し、根尖は狭くなっており、左上顎犬歯は外科的歯牙移動後も順調に成長していることが確認できた(Fig. 8)。

処置7ヵ月後の検診において、左上顎犬歯は前回よりさらに萌出しており、動揺や不正咬合はなかった(Fig. 9)。X線検査では、左上顎犬歯の根尖は、前回より狭くなっており、歯髓腔の狭小化も認められた(Fig. 10)。

処置1年後の検診において、左上顎犬歯は動揺や不正咬合はなく、右上顎犬歯と比べて変わりなく萌出していた(Fig. 11)。X線検査では、左右上顎犬歯の根尖は閉鎖し、萌出は終了していた(Fig. 12)。また、前方から撮影したX線写真において左上顎犬歯が頬側に向かって萌出し、左右の犬歯が対称であることを確認した(Fig. 13)。



Fig. 1 左上顎犬歯部の外観(処置前)
歯肉の膨隆がみられる(矢印)

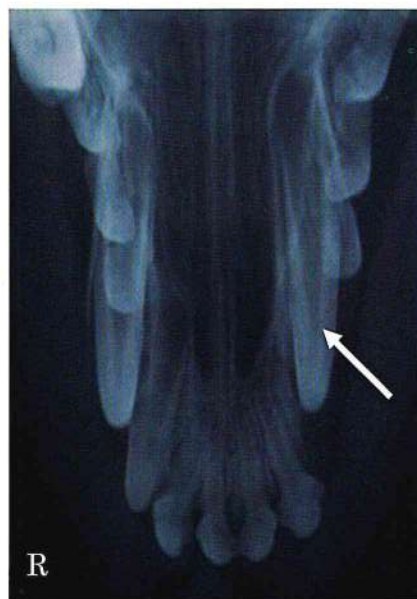


Fig. 2 上顎を前方から撮影した口腔内X線写真(処置前)
左上顎第3切歯(203)が欠歯であり、左上顎犬歯(204)が歯肉下に埋伏しているのがわかる(矢印)

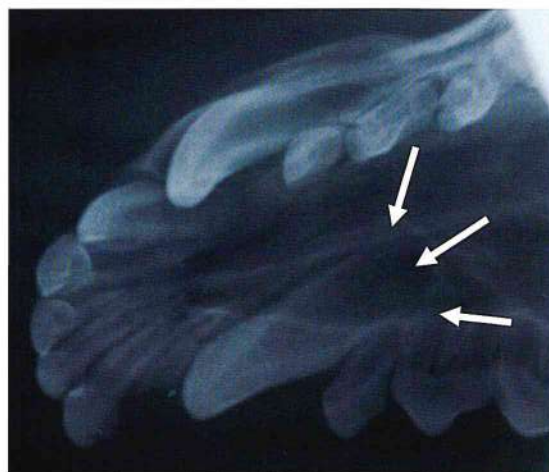


Fig. 3 左上顎埋伏犬歯(204)を側方から撮影した口腔内X線写真(処置前)
犬歯の根尖は大きく開放している(矢印)

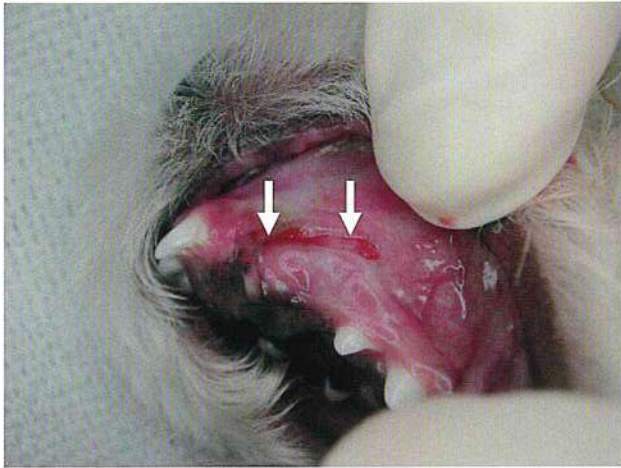


Fig. 4 左上顎犬歯部 (処置中)
埋伏犬歯の位置を確認し、メスにて歯肉を切開した (矢印)



Fig. 7 左上顎犬歯部の外観 (1ヵ月後)
正常な位置に萌出し、動揺や不正咬合は認められない



Fig. 5 左上顎犬歯部 (処置中)
エレベーターを用い、左上顎埋伏犬歯 (204) を頰側に外科的歯牙移動を行っているところ

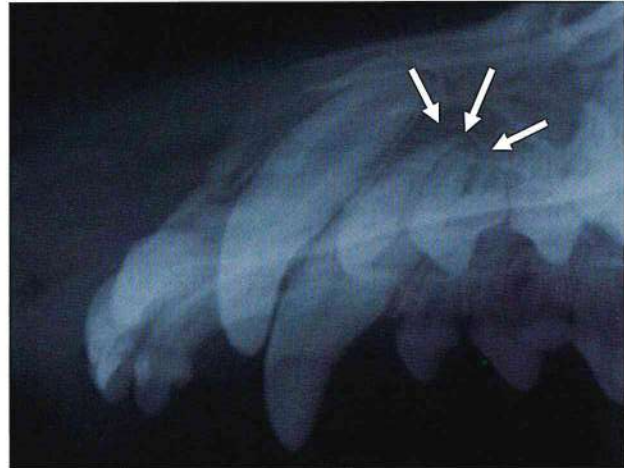


Fig. 8 左上顎犬歯 (204) を側方から撮影した口腔内X線写真 (1ヵ月後)
根尖はまだ開放しているが (矢印)、処置前と比較して小さくなった



Fig. 6 左上顎犬歯部 (処置中)
外科的歯牙移動後、歯肉をナイロン糸で縫合した



Fig. 9 左上顎犬歯部の外観 (7ヵ月後)
1ヵ月前より左上顎犬歯 (204) が萌出し、動揺や不正咬合は認められない

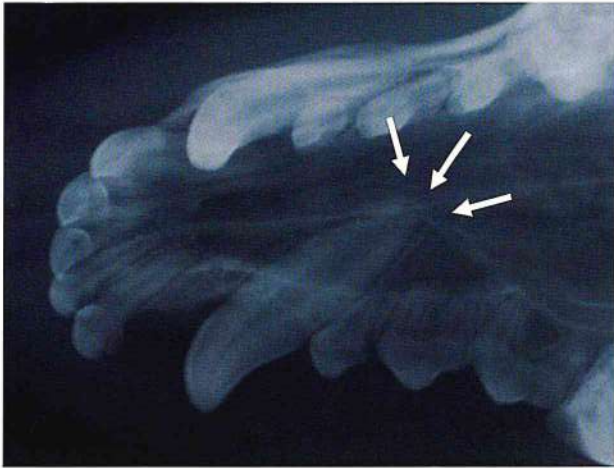


Fig. 10 左上顎犬歯 (204) を側方から撮影した口腔内X線写真(7ヵ月後)
根尖はほぼ閉じており (矢印)、歯髓腔の狭小化が認められ、順調に成長している様子がうかがえる

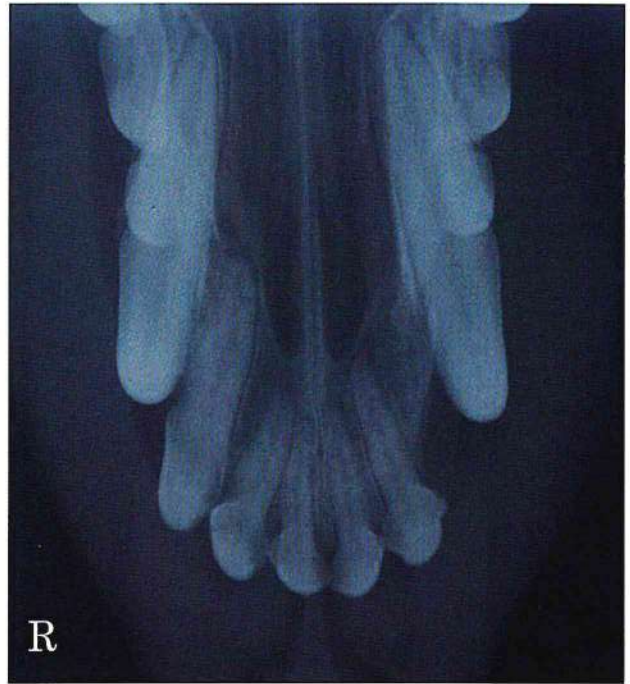


Fig. 13 上顎を前方から撮影した口腔内X線写真 (1年後)
左上顎犬歯が頬側に向かって萌出し、左右の犬歯はほぼ対照である



Fig. 11 上顎の外観 (1年後)
左右ともに正常な位置にあり、萌出方向の異常や、歯冠の変色、動揺は認められない

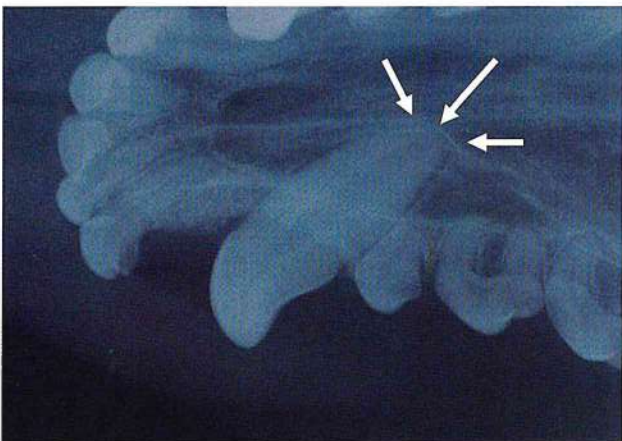


Fig. 12 左上顎犬歯 (204) を側方から撮影した口腔内X線写真 (1年後)
7ヵ月前と比べて歯髓腔の狭小化が認められ、根尖は閉鎖している (矢印)

考 察

埋伏歯の症状は、歯肉の肥厚、膨隆、腫張、変色、嚢胞の形成、圧痛などである^{8, 10)}が、本症例では、歯肉の膨隆がみられたのみであった。埋伏歯が放置された場合の続発症として、歯原性嚢胞形成⁹⁾、膿瘍、鼻漏(埋伏歯が上顎の場合)、顎骨の骨折(埋伏歯が下顎の場合)、近隣歯の歯根吸収につづく脱落や動揺を引き起こす可能性があることが知られている。本症例では早期発見であったため、いずれの症状も認められなかった。治療法は、歯肉切開術^{7, 13)}、開窓術¹³⁾、抜歯^{8, 10, 12, 13)}などであるが場合によっては、処置せず経過観察を行う。これらの治療法を選択する上で、動物の年齢、埋伏歯の位置や歯根の状態が重要な指標の一つとなっている。一般的に歯冠は、その歯根が発生予定長のおよそ1/3～1/2に達したときに萌出するとされており、歯冠が萌出していない場合、そのときの月齢に比し、歯根が未完成であれば、歯の発育遅延あるいは萌出遅延と考えることができる。獣医歯科学書では、犬の永久犬歯の萌出時期は、4～6ヵ月齢と記載

があるが¹⁴⁾、体の大きさや犬種差、個体差が歯冠や歯根の形成時期や萌出時期に影響を与えられるので、犬の平均的な萌出時期を決めることは困難である¹⁴⁾。また埋伏歯歯根の根尖が閉鎖すると、これ以上の萌出は望めないため、歯肉切除や開窓術、外科的歯牙移動といった選択は難しくなる。今回の症例は、7ヵ月齢で犬の平均的な永久犬歯の萌出時期を過ぎており、かつ反対側の右側永久犬歯(104)は萌出していたにも関わらず、左上顎埋伏犬歯に対して歯肉切開と外科的歯牙移動を行い、良好な経過を得た。この症例では、萌出方向の異常と埋伏歯が厚い結合組織に覆われていたために、物理的に萌出が傷害されていたと考えられた。しかし、埋伏歯の発見が早いほどより多くの処置法が選択できるため、ワクチン接種時などの若齢期から、口腔内の検査を積極的に行い、異常が認められれば、口腔内X線検査を実施し、埋伏歯を発見し、適切な処置を行うことが必要であると思われる。

文 献

- 1) 網本昭輝・岩本伸二・八村寿恵・佐々木主計・田浦保穂・中間実徳・山内高史：幼犬における埋伏歯の外科的矯正。日本獣医師会雑誌, 46 (5), 945～951. 1993
- 2) 網本昭輝：埋伏歯の治療。獣医畜産新法, 48, 6, 469～473. 1996
- 3) 網本昭輝：犬の乳犬歯萌出嚢胞の1例。日本獣医師会, 51, (11), 655～658. 1998
- 4) 網本昭輝・野口道修・八村寿恵・中野正司・山岡佳代・甲斐千恵美・松本光晴：40頭の犬にみられた埋伏歯に対する処置と経過。動物臨床医学, 10, 1, 1～7. 2001
- 5) Eisenmenger E. and Zenter K：獣医歯科学。青木秀希, 川瀬 清訳, 歯の埋伏, 39, インターズー, 東京. 1993
- 6) Gorrel C., Hannet P. and Verhaert L.：犬と猫の臨床ハンドブック。藤田桂一訳, 埋伏歯, 28, ファームプレス, 東京. 2003
- 7) 泉 広次：口腔外科マニュアル。嚢胞, 58～59.嚢胞の手術, 129, 南山堂, 東京. 1991
- 8) 中村進治：埋伏歯の診断と治療, 株式会社書林, 東京
- 9) 中原 泉：新常用歯科辞典。第3版, 医歯薬出版, 東京. 1998
- 10) 太田義之・山本 学：埋伏歯の臨床。川本達雄監修, 第1版, 医歯薬出版, 東京. 1998
- 11) 関根 弘：歯科医学辞典。第1版, 医歯薬出版, 東京
- 12) 高須 淳・松本英夫・山本美朗：口腔外科・麻酔。埋伏歯の抜歯, 170～173, 第1版, 医歯薬出版, 東京. 1994
- 13) 宇賀春雄・園山 昇：最新口腔外科小手術図説。第1版, 埋伏歯の抜歯, 58～66, 嚢胞の手術, 159～178, 医歯薬出版, 東京. 1985
- 14) Wiggs R. B. and Lobprise H. B.：Pedodontics in Veterinary dentistry. 167～185, Lippincott&Laven, Philadelphia. 1997

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、掲載誌、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、2006年現在第45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、厚生労働省、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（2007年12月）第559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（2007年12月）第34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

2007年12月25日印刷

第34号

No.34

2007年12月30日発行

2007年

2007

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@beam.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. 34

DECEMBER

2007

CONTENTS

REVIEWS

- Recent Japanese Encephalitis Virus Infection and the Sero-Epidemiology in Animals.
Ken MAEDA 1 ~ 14
- Zoonosis in Exotic Animals and Wild Animals.
Yumi UNE 15 ~ 22

ORIGINAL ARTICLES

- A Study of -80°C Cryopreservation of Canine Erythrocytes by Using Hydroxyethyl Starch(HES).
Yasuho TAURA, Jun ISHII, Munekazu NAKAICHI, Kazuhito ITAMOTO, Kenji TANI,
Heejaung KIM, Yota SUGIMOTO, Adel Mohamed Sayed Ahmed ALAKARA,
Yasuhiko OKAMURA and Sachio SUMIDA 23 ~ 34
- Some Effects of the Storage Periods of Canine Erythrocytes at -80°C Cryopreservation
Using Hydroxyethyl Starch.
Yasuho TAURA, Kenta UNO, Munekazu NAKAICHI, Kazuhito ITAMOTO, Kenji TANI,
Heejaung KIM, Yota SUGIMOTO, Adel Mohamed Sayed Ahmed ALAKARA,
Syuhei TANAKA and Sachio SUMIDA 35 ~ 48
- Molecular Analysis of *Bartonella clarridgeiae* Strains Isolates by Pulsed-Field Gel Electrophoresis.
Masaaki TOMITA 49 ~ 52
- Avian Adenovirus isolated from Gizzard Erosion of Broiler Chickens : A Serological Survey
in Yamaguchi Prefecture.
Fuminori YANAGISAWA, Hidetsugu NAKATANI,
Daiki OISHI and Shuji HIDAKA 53 ~ 60

SHORT COMMUNICATION

- Some Guidance and Recommendation Regarding the Sanitation of a Noodle Production Facility.
Mitsuhiro KAMEYAMA, Megumi OHASHI, Hiroyuki KOBAYASHI,
Takaichi SUZU and koji YAMANE 61 ~ 64

CLINICAL CASE

- The Surgical Orthodontic Movement of the Impacted Canine Teeth in a Dog.
Kana SHIRAIISHI, Hisae HACHIMURA, Kayo YAMAOKA, Tomoko KUYAMA,
Kentaro TORIGOE, Yoshio KATOH and Akiteru AMIMOTO 65 ~ 70

ADDENDA

- Rules of Contribution to the Official Journal. 71
- Rule of the Association 72
- Bylaw for the Arrangement of the Official Journal. 72
- Outline of the Enterprises and the Publications (*colophon page*)