

NIBS LETTER 2013 NOVEMBER
No. 583

日生研おより

2013年(平成25年)11月号 第59巻第6号(通巻583号)

挨拶・巻頭言

スポーツを見ながら獣医師養成を考える
.....小川博之(2)

獣医病理学研修会

第53回 No.1083 ウマの腎臓
.....北海道大学比較病理学教室(3)

レビュー

動物のボツリヌス症
.....小崎俊司(4)

学会参加記

2013 American Veterinary Medical
Association (AVMA) / American
association of Avian Pathologists
(AAAP) Annual Convention
.....稲吉勇仁(9)



NIBS

一般財団法人 日本生物科学研究所

NIPPON INSTITUTE FOR BIOLOGICAL SCIENCE

<http://nibs.lin.gr.jp/>



スポーツを見ながら獣医師養成を考える

小川 博之

獣医学教育改善の努力は、私が大学に勤め始めた昭和 50 年頃から営々と続けられている。しかし、臨床獣医師として 50 年近く進捗状況を見てきた私には、改善は遅々として進んでいないように見える。現在は獣医大学に入学する学生の成績は驚くほど高くなっており、金の卵に例えられる。金の卵を順調に孵化、成長させるためにはどうしたらよいのかと考えたとき、スポーツの中でも最近躍進著しい競技における人材育成法に獣医師養成のヒントがあるのではないかと思いついた。

近年、スポーツの世界で力をつけ、日本人（馬）が海外に活躍の場を広げている競技として、野球、サッカー、水泳、競馬などが挙げられる。これらの競技のトップレベルの選手（競走馬）はどのように生み出されてきたのだろうか。共通点を拾ってみると

1. いずれの競技も高い人気を誇り、スター選手を生み出して長年多くのファンを持ち続けている。子供たちがあこがれるような競技、職業であり、親が競技者やサポーターであることも少なくない。
2. 少年野球クラブ、少年サッカークラブ、水泳教室などが全国津々浦々にあり、小さな頃から競技に親しむ環境が整っている。中学校、高校になると学校、クラブが広い底辺を持って受け皿となり、地区大会、全国大会を開催し、甲子園大会に象徴されるように全国規模の大きな行事となっている。
3. 野球はプロ野球からメジャーリーグへ、サッカーは J1 から欧州クラブへ、水泳は国内大会からオリンピックへ、競馬はダービーや有馬記念の国内 G1 レースから凱旋門賞へとそれぞれ大きな目標があり、世界のレベルを目指して競技施設、強化体制などが整えられてきた。
4. 競走馬はもともとサラブレッドという共通の祖先をもつ馬の競争であり、強い馬を生み出すために良血種牡馬を求め、繁殖、育成、トレーニング、競馬場などさまざまな環境が整えられて現在がある。

このように見てくると、いずれの競技も社会の応援を受けながら高い目標を掲げ、幼時から競技に親しみ、優れた指導者に恵まれ、国内、国外の試合でもまれながら階段を上ってきたことが見てとれる。これらの中で獣医師養成にぜひ取り入れたいことが二つある。

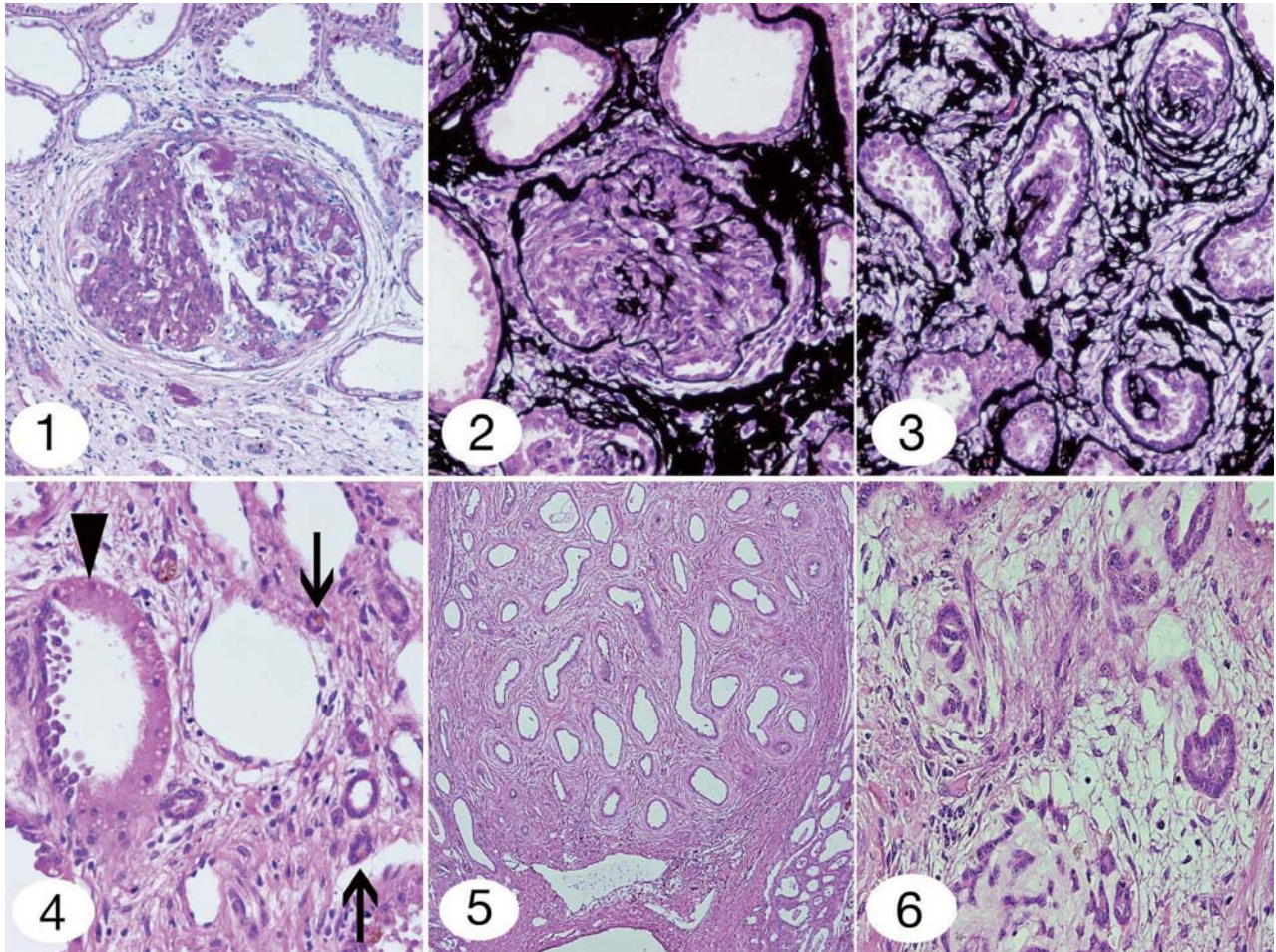
一つは幼児期の環境整備である。獣医師は動物の病気の専門家であり、病気の動物の専門家である。犬猫を飼育する家庭は増えているが、講義の時に聞いてみると学生の約半数に動物飼育の経験がない。少年動物クラブをつくるもよし、動物飼育の経験を入学の条件とするもよし、方策は種々であるが、子供のころから動物に親しむ環境を整えたい。

二つ目は、大学の診療環境の整備である。現在の日本の獣医学教育では病気の動物を診る機会が極めて少ない。小学校以来 10 年以上も椅子に座って受け身の講義を受けてきた頭でっかちの学生に何より必要なのは実習である。少なくとも 4 年間みっちり臨床実習ができる動物医療センターが欲しい。

(評議員)

ウマの腎臓

北海道大学比較病理学教室 第53回獣医病理学研修会 No.1083



動物：ウマ、サラブレッド、雌、2歳5ヵ月齢。

臨床事項：2歳の調教中に結腸背方変位による疝痛を発症し、開腹による整復手術を行った。1週間後の血液検査ではBUN 156 mg/dl（正常値は9.0-20.0）、CRE 9.74 mg/dl（正常値は0.9-1.8）で、術後の感染性腹膜炎を発症した。その後、食欲廃絶と貧血が明らかとなり、尿毒症を発症したので、手術より5ヵ月後に安楽殺処分となった。末梢血を用いたPCRと抗体価測定でレプトスピラは陰性であった。

剖検所見：臨床獣医師が解剖し、ホルマリン固定後の左右の腎臓、脾臓および肝臓が組織検査のため送付されてきた。固定後の左右腎臓は貧血色を呈し、腎表面になだらかな凹凸があった。剖面で3層の境界は不整で、点状、線状あるいは島状の白色巣が皮質を中心に不規則に認められた。肝臓と脾臓に特記すべき病変はなかった。
組織所見：糸球体では巣状全節性あるいは分節性糸球体硬化（図1、PAS染色）と未熟な糸球体様構造の形成（図2、PAM染色）が見られた。大部分の皮質尿細管が軽度～中等度に拡張し、尿細管上皮細胞が時折、管内に乳頭状に増殖していた（図3、PAM染色）。それらの中には毛細血管および間葉系細胞が混在しており、前述の糸球体様構造との区別が困難であった。また、管腔が不明瞭な未熟尿細管（図4、矢印）および近位尿細管上皮細胞の異形成（図4、矢頭）が指摘された。尿細管内には少

量の尿円柱、コレステリンおよび尿酸結晶が沈着していた。間質は軽度び慢性あるいは島状に線維化（図5）し、島状線維化巣では尿細管周囲を輪状に取り囲む線維走行と少量の好塩基性液状物質（アミロイドおよび多糖体染色陰性）の沈着（図6）が認められた。また、少数のリンパ球と形質細胞がび慢性に浸潤していた。

診断：馬の腎異形成（Equine renal dysplasia）

考察：尿細管上皮細胞の乳頭状増殖、未熟な尿細管および島状線維化は過去の馬の腎異形成報告例に一致しており、上記の診断名に至った。尿細管上皮細胞の異形成と未熟な糸球体様構造の記述は成書に見当たらないが、後腎組織の分化異常に起因すると考えられた。

（梅村孝司）

参考文献：

1. Anderson, W. I., Picut, C. A., King, J. M., Perdrizet, J. A. 1988. Renal dysplasia in a standardbred colt. *Vet. Pathol.* 25 : 179-180.
2. Ronen, N., van Amstel, S. R., Nesbit, J. W., van Rensburg, I. B. J. 1993. Renal dysplasia in two adult horses: clinical and pathological aspects. *Vet. Rec.* 132 : 269-270.
3. Gull, T., Schmitz, D. G., Bahr, A., Read, W. K., Walker, M. 2001. Renal hypoplasia and dysplasia in an American miniature foal. *Vet. Rec.* 149 : 199-203.

動物のボツリヌス症

小崎 俊 司 (大阪府立大学大学院生命環境科学研究科獣医学専攻 獣医感染症学研究室)

はじめに

ボツリヌス症は、グラム陽性偏性嫌気性桿菌であるボツリヌス菌 (*Clostridium botulinum*) から産生される毒素により起こる極めて致死性の高い疾患である。毒素は抗原性の違いにより A～G 型の 7 種類の存在が知られている。ヒトのボツリヌス症は A、B、E 型菌が原因であり、希に F 型菌中毒の発生が認められている。ヒトのボツリヌス症は、菌が食品内で増殖し、その際産生された毒素を摂取することにより起こる典型的な食品内毒素型の食餌性食中毒として知られていたが、近年、1 歳未満の乳児の腸管内で芽胞が発芽・増殖し産生された毒素による乳児ボツリヌス症が米国では多発している [1]。一方、ボツリヌス菌は、同一あるいは類似した生化学的性状を有している菌群ではなく、生化学的性状から 4 群に分類されている。第 1 群にはタンパク分解性の A、B、F 型菌、第 2 群にはタンパク非分解性の B、E、F 型菌、第 3 群に C、D 型菌が属している。第 4 群には糖非分解性の G 型菌がある。C および D 型菌は比較的高い栄養要求性および高い嫌気度を要求するためボツリヌス菌の中でも培養が難しい。ボツリヌス菌が自然界では芽胞の形で世界各地に分布していることが明らかになっており、また、ヒトの食中毒の原因である A、B、E 型菌の分布状況はよく知られている。わが国では東北地方、北海道沿岸で高頻度に E 型菌が検出されることがわかっている [12]。一方、C および D 型菌は日本各地の河川、湖沼ばかりでなく山岳地帯でも分布していることがわかっている。

動物のボツリヌス症は、家禽および牛のボツリヌス症が獣医領域で注視されているが、野生動物における水禽類のボツリヌス症も重要である。これらのボツリヌス症は主として C 型および D 型菌が原因とされているが、B 型菌によるウマのボツリヌス症も報告されている [3]。わが国では産卵鶏、ブロイラーでのボツリヌス症が多発した時期もあったが、野鳥、特に、水禽類のボツリヌス症も散見されている。

牛ボツリヌス症は、南アフリカ、南米、オーストラリアなどの地域で斃死した牛の体内で産生された D 型毒素を摂取して起こる疾病と考えられていた。欧州ではサイレージ中に混入し斃死した小動物が毒

素源となり C 型および D 型菌による本症の発生や、サイレージの発酵不完全により産生された毒素による B 型菌による中毒が知られている [10]。さらに、鶏糞を含む床敷きを肥料として牧草に散布し、これらが原因とされる症例が英国などで報告され、多大な経済的損失を引き起こす疾病として取り扱われている [11]。一般に、本症の発生は食餌性ボツリヌス症のように飼料中に含まれる毒素を摂取することが原因とされていたが、その一方で毒素源を見いだせない症例も報告されており、本症の発生原因の探求を困難にしているのが現状である [2、13]。わが国では 1994 年北海道で C 型菌による本症の発生があったが、2004 年以降現在まで乳牛、肥育牛の区別なく散発的に全国的な発生が認められる。

本稿では C 型および D 型菌による鳥類および牛ボツリヌス症の原因毒素の特徴および発生状況、毒素の検出法などについて概説する。

1. C 型および D 型神経毒素の特徴

ボツリヌス菌の型別は菌の産生する神経毒素 (分子量 15 万) の抗原性の違いにより決定されている。神経毒素 (BoNT) は型に共通して軽鎖 (L)、重鎖 N 末端領域 (H_N) および重鎖 C 末端領域 (H_C) の機能の異なる 3 つのドメインから構成されている [5]。他の型の神経毒素と異なり、C および D 型神経毒素の抗原類似性が高く、さらに、C 型菌では $C\alpha$ と $C\beta$ の亜型が提案されている。Jansen [4] は粗毒素標品から作製したトキシドを抗原として作製した抗毒素血清を用いた中和試験より、 $C\alpha$ 亜型には 3 種類の毒素因子 (毒素本体ではなく抗原因子と考えられる)、C1、C2 および D 因子を産生し、 $C\beta$ 亜型では C2 のみ、D 型菌は D および C1 因子を産生すると報告した (Table 1)。これらの知見は、C 型と D 型毒素間の免疫交差性を理解する上で貴重な知見であるが、その理由については不明であった。その後、多くの細菌毒素と同様にボツリヌス神経毒素遺伝子の解明も急速な進展がみられ、C 型菌ではミンク由来株とウマ由来株神経毒素遺伝子が非常に類似し、これらが典型的な C 型菌神経毒素であると考えられている。一方、C、D 型神経毒素に H_C 領域が相互に入れ替わった C・D モザイク神経毒素 (C/D あるいは D/C) の存在が報告されているが、

Table 1 ボツリヌス菌C型およびD型の産生する毒素因子

毒素因子	亜型 (subtype)		
	C α	C β	D
C1	+++	-	+
C2	+	+++	-
D	+	-	+++

Jansen 1971

ボツリヌス症発症におけるこれらの毒素の意義については解明が進んでいなかった [6]。さらに、これらモザイク神経毒素の存在がC、D型菌の型別を決定する際に混乱を生じさせていることが明らかになってきた。

2. 鳥類ボツリヌス症由来菌の毒素の性状

鶏を初め種々の鳥類ボツリヌス症を疑う症例が発生し、これらの検体からC型とD型の両抗血清で中和される毒素が検出された。また、分離菌の産生する毒素も同様にC、D型抗血清で中和された。そこで鳥類ボツリヌス症由来菌株の持つ神経毒素遺伝子の解析を行った結果、すべての菌株の神経毒素遺伝子においてH_C領域がD型神経毒素と非常に類似したC/Dモザイク構造を持つことがわかった (Fig.1)。C型、D型菌神経毒素遺伝子の性状を容易に区別するためにPCRによる判別法を確立した。既報のC型、D型NT遺伝子および鳥類ボツリヌス症由来菌遺伝子の塩基配列を参考に軽鎖(L)内、重鎖C末端(H_C)領域内、重鎖N末端(H_N)領域内でそれぞれ各型に特異的な塩基配列をコードする

8種類のプライマーを設計し、これらを4組のプライマーセット(C型NT遺伝子上流と下流、およびD型NT遺伝子上流と下流)としてPCRを行った。中和試験でC、D型両抗血清で中和されたニワトリ、キジ、アイガモ、オシドリ、コサギなど鳥類ボツリヌス症由来菌株の持つ神経毒素遺伝子はPCRですべてC/Dモザイクであることが判明した (Table 2) [14]。これらの結果は、鳥類ボツリヌス症起因菌の産生する毒素は、主としてC/Dモザイク毒素であり、さらにJansenが報告したC α 亜型の毒素因子の性状を示していると考えられる。

CB-19株(C型)、003-9株(C/Dモザイク)および1873株(D型)の精製M毒素をニワトリに静脈内投与し、その感受性を調べた。ニワトリはC型毒素よりC/Dモザイク毒素に高い感受性を示した。D型毒素に対しては耐性であることがわかった [14]。

3. 牛ボツリヌス症の症状と発生状況

牛ボツリヌス症は乳牛、肥育牛、月齢の区別なく発症する。症状は38℃前後の低体温(発熱しない)、起立不能、腹式呼吸が特徴的である。子牛(2ヵ月齢程度)の発症は少なく、発症から半日から2日の経過で死亡する牛が大半である。わが国における本症のすべてにおいて、飼料などから毒素源は検出されておらず、乳児ボツリヌス症のように生体内で菌が増殖し、産生された毒素に起因した疾病と考えられる。実際、発生農場で生残した見かけ上の健康牛から毒素と菌が長期間排泄されることを確

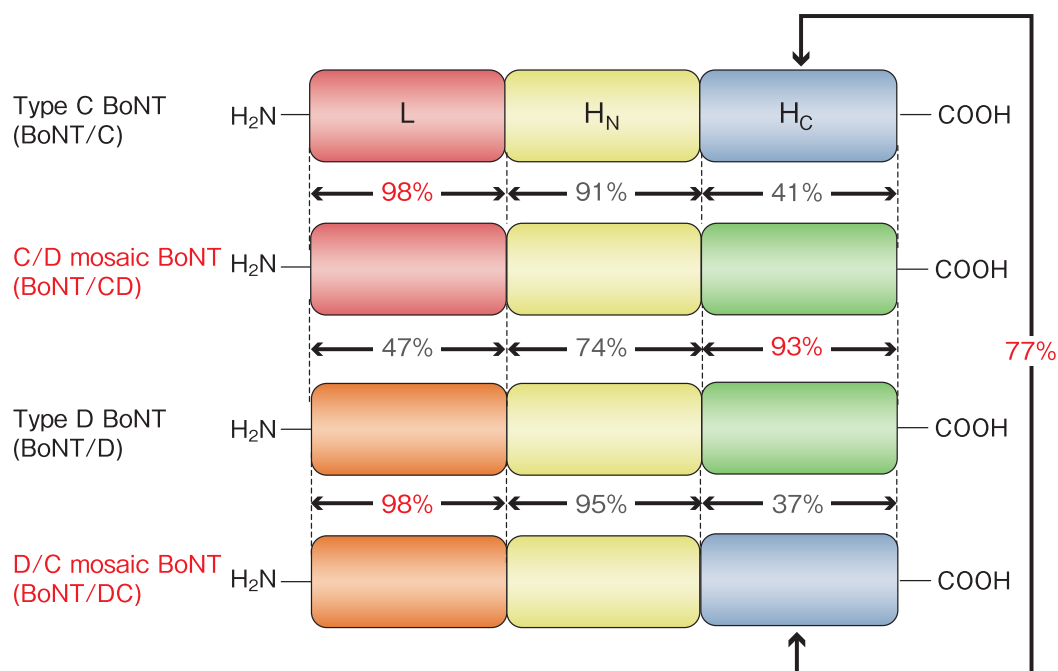


Fig.1 ボツリヌスC型、D型およびモザイク毒素のアミノ酸配列の相同性

Table 2 家畜・家禽由来のボツリヌスC型およびD型菌の中和反応とPCRによる神経毒素遺伝子の性状

Strain	Origin	Neutralization	PCR	Accession no. in Genebank
Stockholm	Mink	C	C-C	D90210
468	Horse	C	C-C	X72793
1873	unknown	D	D-D	AB012112
CB-19	Mink feed	C	C-C	AB200358
003-9	Chicken	C/D ^{a)}	C-D	AB200360
OFD-01	Chicken	C/D	C-D	AB200361
005-1	Pheasant	C/D	C-D	AB200362
OFD-02	Domestic duck	C/D	C-D	AB200363
OTZ 01	Mandarin duck	C/D	C-D	AB200364
348	Chicken	C/D	C-D	
205-1	Pheasant	C/D	C-D	
005-6	Pheasant	C/D	C-D	
OFD-03	Domestic duck	C/D	C-D	
006-9	Domestic duck	C/D	C-D	
OTZ 02	Ferruginous duck	C/D	C-D	
OTZ 03	Little Egret	C/D	C-D	
OTZ 04	Tufted duck	C/D	C-D	
OTZ 05	Little Egret	C/D	C-D	
OTZ 06	Little Egret	C/D	C-D	
OTZ 07	Little Egret	C/D	C-D	

a) The toxin in culture supernatant was neutralized with both of type C and D and antitoxins.

認している。家畜・家禽のボツリヌス症は家畜伝染病の対象となる疾病でなく、十分な発生状況の把握は出来ていないが、これまで全国各地からの検査依頼および種々の症例報告（私信も含む）を集計した結果を Table 3 に示した。

4. 牛ボツリヌス症由来菌の毒素の性状

牛ボツリヌス症に由来する検体から分離した菌の培養上清を用いて、マウス中和試験を行った。その結果、毒素はD型抗毒素血清で完全に中和されたが、C型抗毒素血清でも致死時間が遅延することから部分的な中和が認められた。分離菌の内 OFD05株の保有する神経毒素遺伝子塩基配列を解析した結果、H_c領域がC型神経毒素と非常に類似したD/Cモザイク構造を有していることが分かった。そこで、鳥類ボツリヌス症由来菌の持つC/Dモザイク毒素遺伝子の検出に用いたPCR法を改良し、典型的なC型、D型および2種類のモザイク毒素遺伝子を判別するため、各遺伝子に共通する部分と変異部分を組み合わせた4種類のプライマーセットを新たに作製して、各神経毒素遺伝子の判別が可能なPCR法を再構築した。このPCR法により各地で発生した本症罹患牛由来の分離菌が保有する神経毒素遺伝子を調べた結果、すべてがD/Cモザイク構造を持つことを明らかにした (Table 4) [8]。さらに、異なる年代・地域で分離された菌に対し、制限酵素

SacII または *NruI* を用いたパルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) 解析を行うと共に、神経毒素遺伝子全長の塩基配列を決定した。*SacII*・*NruI* いずれの場合も PFGE に基づくデンドログラムにより

Table 3 牛ボツリヌス症の発生状況

Case	Place	Year	Production purpose	Number of bovine affected or death/Total
1	Hokkaido	1994	Milk	52/ 58 (90%)
2	Okayama	1998	Beef	4/150 (3%)
3	Kanagawa	1999	Beef	28/ 42 (67%)
4	Kanagawa	2004	Beef	17/550 (31%)
5	Mie	2005	Beef	80/700 (11%)
6	Aichi	2005	Beef	33/250 (13%)
7	Hyogo	2005	Beef	127/140 (91%)
8	Akita	2005	Milk	4/ 52 (8%)
9	Tottori	2005	Milk	35/130 (27%)
10	Kagoshima	2006	Milk	37/ 51 (73%)
11	Iwate	2006	Beef	4/160 (3%)
12	Aichi	2007	Beef	16/1200 (1%)
13	Aichi	2008	Milk	Unknown
14	Yamagata	2009	Unknown	Unknown
15	Okayama	2009	Beef	14/100 (14%)
16	Aichi	2009	Milk	Unknown
17	Okayama	2010	Beef	61/1040 (6%)
18	Kagoshima	2010	Milk	56/64 (88%)
19	Hyogo	2011	Beef and Milk	18/426 (4%)
20	Kagoshima	2011	Beef	13/501 (3%)
21	Okayama	2011	Beef	1/26 (4%)
22	Okayama	2012	Beef	4/143 (3%)
23	Gifu	2012	Beef	53/78 (68%)
				Total 657

分離菌は3つのクラスターに分類された。D/C モザイク毒素のアミノ酸配列は同一の PFGE パターンを示した株間で完全に一致しており、異なるパターンを示す株の D/C モザイク毒素の配列においても H_C 領域のアミノ酸 2 残基の置換を除いて他のモザイク毒素の配列と一致した。

5. D/C モザイク毒素の毒性発現

精製 D/C モザイク毒素はこれまで知られている他の型の神経毒素と比べて最も高いマウス致死活性を持っていた。一方、C 型、D 型および 2 種のモザイク毒素のラットに対する致死活性をマウス致死活性と比較すると、C 型、D 型および C/D モザイク毒素はマウスとラット間で体重当たりの毒性に大差はなかった。しかし、D/C モザイク毒素のラットに対する致死活性はマウスに比べて著しく低かった。D 型神経毒素軽鎖の基質であるシナプトブレビン (VAMP) のマウスおよびラット由来のホモログを GST 融合リコンビナント蛋白として調製し、D 型神経毒素軽鎖の基質切断活性を比較した。D 型軽鎖はマウスとラットのリコンビナント VAMP2 および VAMP3 を同程度分解したが、ラット VAMP1 に対する切断活性はマウスと比較して低かった。D 型神経毒素と D/C モザイク毒素のマウスおよびラット初代小脳顆粒細胞に対する作用を VAMP2 の切断とグルタミン酸の開口放出阻害を指標に調べた。

マウス小脳顆粒細胞に対して、両毒素は同程度の VAMP2 切断活性とグルタミン酸放出阻害活性を示したが、ラット小脳顆粒細胞に対する D/C モザイク毒素の VAMP2 切断活性とグルタミン酸放出阻害活性は D 型神経毒素より低かった。これらの結果は、両者の神経毒素におけるマウスおよびラット小脳顆粒細胞に対する受容体への結合も毒素感受性に関与していることが示唆された。C 型神経毒素はガングリオシド GD1b と GT1b に結合することが明らかにされている。TLC 免疫染色法で D/C モザイク毒素はガングリオシド GM1a に結合することが分かった。ラット褐色細胞腫由来 PC12 細胞に対し D/C モザイク毒素は細胞質内の基質切断活性を示さないが、ガングリオシド GM1a を前処理すると、VAMP2 分解が確認された。これらの結果から、GM1a が D/C モザイク毒素の機能的受容体であることが示唆された [9]。

6. D/C モザイク毒素の免疫学的特性

BoNT/DC の免疫学的特異性を確認するため、BoNT/DC に対するモノクローナル抗体 (mAb) を作製した。精製 mAb の C 型、D 型およびモザイク BoNT との反応性を ELISA およびイムノブロットングで調べ、BoNT/DC に対する中和活性を確認した。BoNT/DC の H_C 領域にのみ反応する 4 種の mAb が得られ、すべて BoNT/DC に対する中和

Table 4 牛ボツリヌス症由来菌の中和反応と神経毒素遺伝子の性状

Case	Area	Year	Strain	Specimen	Neutralization	PCR
4	Kanagawa	2004	OFD04	Feces	D, (C) ^{a)}	D/C mosaic
5	Mie	2005	OFD05	Ruminal contents	D, (C)	D/C mosaic
7	Hyogo	2005	OFD08	Ruminal contents	D, (C)	D/C mosaic
			OFD09	Small intestine	D, (C)	D/C mosaic
			OFD12	Ruminal contents	D, (C)	D/C mosaic
			OFD13	Small intestine	D, (C)	D/C mosaic
10	Kagoshima	2006	OFD16	Small intestine	D, (C)	D/C mosaic
12	Aichi	2007	OFD17	Feces	D, (C)	D/C mosaic
13	Aichi	2008	OFD21	Feces	D, (C)	D/C mosaic
			OFD22	Feces	D, (C)	D/C mosaic
			OFD24	Small intestine	D, (C)	D/C mosaic
14	Yamagata	2009	OFD24	Small intestine	D, (C)	D/C mosaic
16	Aichi	2009	OFD23	Feces	D, (C)	D/C mosaic
			OFD25	Feces	D, (C)	D/C mosaic
			OFD26	Feces	D, (C)	D/C mosaic
			OFD28	Feces	D, (C)	D/C mosaic
17	Okayama	2010	OFD28	Feces	D, (C)	D/C mosaic
18	Kagoshima	2010	OFD30	Ruminal contents	D, (C)	D/C mosaic
			OFD31	Feces	D, (C)	D/C mosaic
19	Hyogo	2011	OFD32	Feces	D, (C)	D/C mosaic
20	Kagoshima	2011	OFD33	Feces	D, (C)	D/C mosaic

^{a)} Neutralized partially with type C antitoxin.

活性を有していた。競合 ELISA により 3 種の mAb が異なる部位を認識していることから、BoNT/DC の H_C 領域には中和活性に関与する型特異的抗原決定基が少なくとも 3 ヶ所存在することが分かった。BoNT/DC は C 型、D 型抗毒素血清の両方と反応するため、ボツリヌス毒素の型別法として一般的なマウス中和試験による診断が困難である。このため BoNT/DC 特異的 mAb を用いた免疫学的検出法の確立を試みた。BoNT/DC と mAb のアフィニティーを表面プラズモン共鳴系によって算出し、BoNT/DC と親和性の高い 2 種類の mAb を選別した。これら 2 種の mAb を用いて BoNT/DC を特異的に検出するイムノクロマトキットを試作し、OFD05 株培養上清の検出感度を測定した。試作キットは 1,000 LD₅₀/ml の毒素を検出することが可能であった。ボツリヌス症罹患牛の検体を増菌培養した後の上清中の毒素は、一部を除き本キットによって検出が可能であった (Fig. 2) [7]。

7. 今後の課題

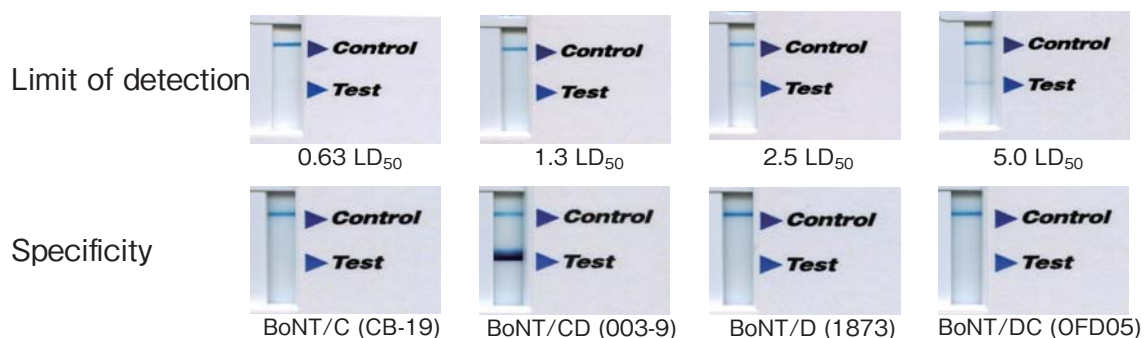
家畜・家禽のボツリヌス症の発生は、生産者に対して経済的な損失や消費者に食の安全に対する不安感を及ぼすため、科学的な根拠に基づいた情報発信が必要である。しかしながら、ボツリヌス症の発生要因や毒素検出法の開発、原因毒素の性状解析などの

科学的な知見が十分に集積されているとは言えない。本稿で記載したように C 型、D 型菌の産生する毒素は他の毒素と較べて複雑な抗原性を有している。このため、ボツリヌス症起因菌の産生する毒素の性状を迅速に検出・同定できる検査法の確立が必要と思われる。

参考文献

1. Arnon, S. S. 1980. Infant botulism. *Annu. Rev. Med.* **31** : 541-560.
2. Böhnelt, H., Schwagerick, B., Gessler, F. 2001. Visceral botulism—new form of bovine *Clostridium botulinum* toxication. *J Vet Med A Physiol. Pathol. Clin. Med.* **48** : 373-383.
3. Haagsma, J., Haesebrouck, F., Devriese, L., Bertels, G. 1990. An outbreak of botulism type B in horses. *Vet. Rec.* **127** : 206.
4. Jansen, B.C. 1971. The toxic antigenic factors produced by *Clostridium botulinum* types C and D. *Onderstepoort J. Vet. Res.* **38** : 93-98.
5. Montecucco, C., Schiavo, G. 1995. Structure and function of tetanus and botulinum neurotoxins. *Q. Rev. Biophys.* **4** : 423-472.
6. Moriishi, K., Koura, M., Abe, N., Fujii, N., Fujinaga, Y., Inoue, K., Oguma, K. 1996. Mosaic

Detection of BoNT/CD in culture supernatant



Detection of BoNT/DC in culture supernatant

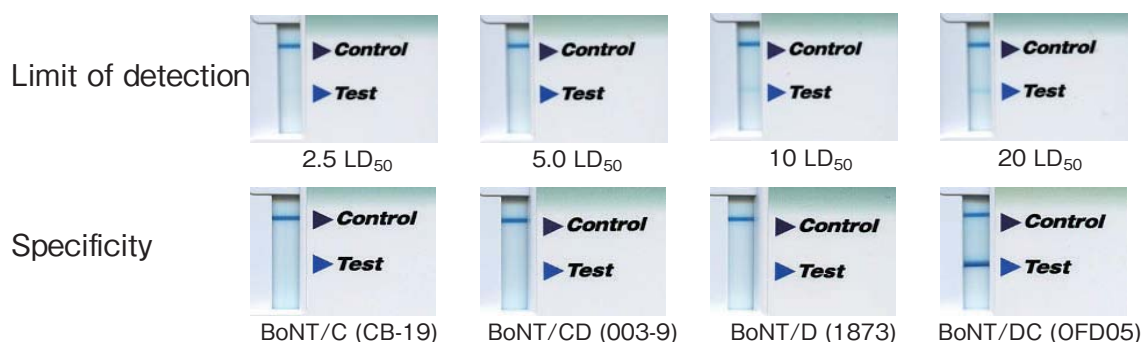


Fig. 2 イムノクロマトグラフィーによる C/D および D/C モザイク毒素の検出

- structure of neurotoxins produced from *Clostridium botulinum* types C and D organisms. *Biochim. Biophys. Acta* **1307** : 123–126.
7. Nakamura, K., Kohda, T., Seto, Y., Mukamoto, M., Kozaki, S. 2013. Improved detection methods by genetic and immunological techniques for botulinum C/D and D/C mosaic neurotoxins. *Vet. Microbiol.* **162** : 881–890.
 8. Nakamura, K., Kohda, T., Umeda, K., Yamamoto, H., Mukamoto, M., Kozaki, S. 2010. Characterization of the D/C mosaic neurotoxin produced by *Clostridium botulinum* associated with bovine botulism in Japan. *Vet. Microbiol.* **140** : 147–154.
 9. Nakamura, K., Kohda, T., Shibata, Y., Tsukamoto, K., Arimitsu, H., Hayashi, M., Mukamoto, M., Sakakawa, N., Kozaki, S. 2012. Unique biological activity of botulinum D/C mosaic neurotoxin in murine species. *Infect. Immun.* **80** : 2886–2893.
 10. Notermans, S., Dufrenne, J., Oosterom, J. 1981. Persistence of *Clostridium botulinum* type B on a cattle farm after an outbreak of botulism. *Appl. Environ. Microbiol.* **41** : 179–183.
 11. Payne, J. H., Hogg, R. A., Otter, A., Roest, H. I., Livesey, C. T. 2011. Emergence of suspected type D botulism in ruminants in England and Wales (2001 to 2009), associated with exposure to broiler litter. *Vet. Rec.* **168** : 640.
 12. Sakaguchi, G. 1983. *Clostridium botulinum* toxins. *Pharmac. Ther.* **19** : 165–194.
 13. Smart, J. L., Roberts, T. A. 1977. Bovine botulism. *Vet. Rec.* **101** : 201–202.
 14. Takeda, M., Tsukamoto, K., Kohda, T., Matsui, M., Mukamoto, M., Kozaki, S. 2005. Characterization of the neurotoxin produced by isolates associated with avian botulism. *Avian Dis.* **49** : 376–381.

学会参加記

2013 American Veterinary Medical Association (AVMA) / American association of Avian Pathologists (AAAP) Annual Convention

稲吉 勇仁

2013年7月19日から7月23日にかけてアメリカ合衆国シカゴにおいてAVMA/AAAPの年次学会が開催され、そこに参加する機会を得ましたのでその概要を報告致します。例年通りこの年次学会は、多くの動物種に関する内容でのAVMAと鳥関連でのAAAPの共同開催でしたが、主にAAAPを中心として参加しましたので本報告の内容は鶏病関連のみとしました。

学会会場

学会はシカゴ南の郊外に位置したMcCormick

Placeで開催されました。中心街から少し離れた場所にありましたが、主催者側が指定したホテルからシャトルバスが運行されていたことから、不自由なく会場にアクセスすることができました。車窓から眺めるレンガ造りの町並みの中を行くと、広い敷地内に会場があり、天井の高いオープンな造りが印象的でした(写真1)。

AVMAは1863年に設立され、今年で150周年を迎えたことから、今回の年次学会の会場はお祝いムードも感じられました。また、日本で開催される学会とは大きく異なるところですが、一般的に海外の学会ではアクティビティーが充実しており、本学

会でも開催期間中にシエド水族館見学ツアー、無料コンサート、Night Zoo など様々なイベントがセッション後に開催されており、会場内には家族連れの姿もありました。

学会構成

参加者は、獣医師 4,097 人、獣医の学生 448 人、テクニシャンとその学生 542 人、展示関係者 1,527 人、ゲスト 1,453 人、そしてその他の参加者が 1,022 人で合計は 9,089 人でした。アメリカ獣医師会が主催していることから参加者の半数が獣医師（学生を含む）でしたが、研修や教育的要素を取り入れたテクニシャン向けのセッションも構成されていたことから、学生を含むテクニシャンの参加者は全体の 6% を占めていました。この年次集会は、自分たちの成果を発表する場にとどまらず、獣医療関係者の若手教育の場として活用されているようでした。

その中で、AAAP は会場の 3 部屋を使用して行われていました。初日は 2 部屋を使ってカンピロバクターのシンポジウムが行われ、翌日からはその 2 部屋で別々のセッションが同時に行われ、残り 1 部屋

はポスター会場となっていました。

演題内容

セッションのトピックを以下にあげます。事例報告、免疫学、鶏白血病、コクシジウム症、マレック病、伝染性ファブリキウス嚢病、伝染性気管支炎 (IB)、サルモネラ症、伝染性喉頭気管炎、細菌感染症、腸炎、マイコプラズマ症、鳥インフルエンザ、ニューカッスル病そしてレオウイルス感染症と、一般的な鶏感染症を網羅していました。これだけまとめて鶏感染症に関する話題を聞ける機会は珍しいことから、どちらのセッションに行こうか迷うほどでした。

全口演数は 122 題で、3 割は事例報告でした。ワクチンに関する演題は 31 題あり、そのうちウイルス感染症については 25 題で、10 題は組換えウイルスに関する発表でした。サルモネラ及び大腸菌に関しては、事例報告、遺伝子型別等の分類学または診断に関する発表が多く、七面鳥に関する発表も 20 題ありました。七面鳥に関しては、ターキーコロナウイルス感染による腸炎やレオウイルスによる関節

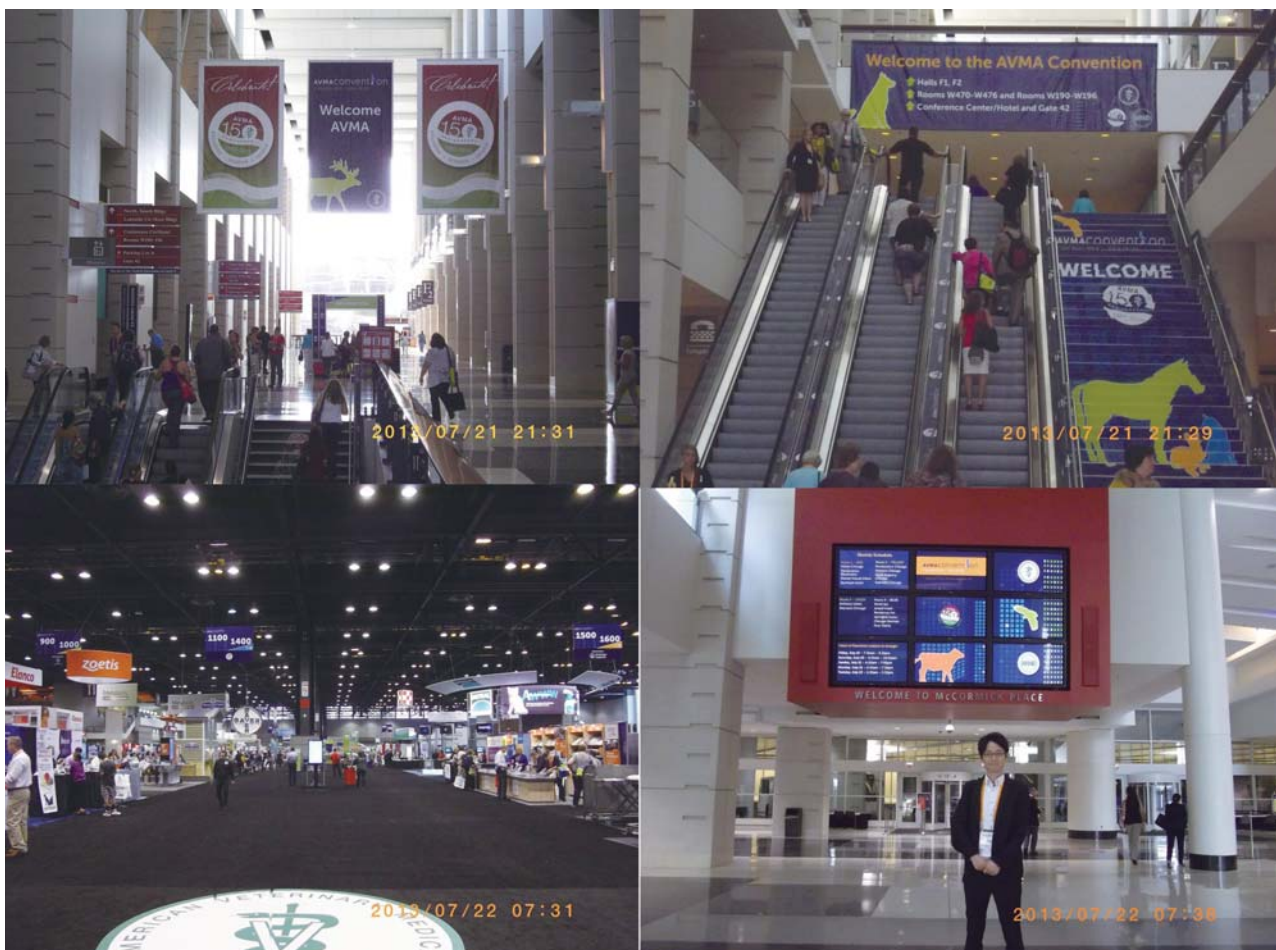


写真 1

炎、腱滑膜炎に関する事例も発表されていました。

カンピロバクターのシンポジウムでは、新しいワクチンネーションの話題はなく、レビュー、疫学調査または衛生対策が主となっていました。カンピロバクターについては血清型の多様性と、宿主に対する免疫不応答性等がワクチン開発を困難にしていると思われまます。アメリカではカンピロバクターによる感染者数は年間 130 万人と推定されており、その感染の 80% は食品からの感染であり、さらにその 95% は *C. jejuni* あるいは *C. coli* を原因としており、その感染源のほとんどが鶏と言われています。疫学調査では、飼育農場から食鳥処理場までのカンピロバクターの汚染状況を同一鶏群で追跡調査していました。55 鶏群に対してサンプル採取が行われたところ、飼育農場の環境サンプル（靴カバーサンプル、ドラッグスワブ、糞便サンプル）の 50～60% がカンピロバクターに陽性を示しました。そして、処理前の鶏の感染率が 70% であったことから、輸送ストレスによる鶏間の感染拡大が示唆されていました。一方で、鶏肉加工の冷却過程では感染率が 45% に減少しました。飼育農場から食鳥処理場へと向かう過程でカンピロバクター汚染が拡大している可能性については、日本でも対策を講じる必要があると思われました。

以下に、AAAP の一般発表演題の中から興味深い内容を簡単に紹介いたします。

Dr. Mark W. Jackwood のグループは、マイクロスフェア（粒子径が数 μm 程度の薬剤粒子）を基盤とした新規 IBV 検査法の検討結果を報告していました。ポリスチレン製のマイクロスフェア表面に IB ウイルスの血清型特異的 S1 領域の部分的配列プローブを固定し、RT-PCR によって得られたビオチン化 DNA 増幅断片とハイブリダイズさせます。この複合体を蛍光タンパク質で標識されたストレプトアビジンで発光させて検出器で読み取ることによって、プローブにハイブリダイズされた IBV 特異的な DNA 断片を検出することができます。通常、IB の病性鑑定は RT-PCR や遺伝子解析を含めると 2 日以上かかりますが、この方法を用いると 5～6 時間で解析結果を得ることが可能とのことでした。現在のところ、開発の初期段階のため検討したプローブが 5 株であることや、弱いシグナルとして偽陽性が検出される場合があることなど課題が残されていました。今後の進展が期待されます。

日本に限らず世界中の養鶏業者を悩ませている IB ですが、この IB ウイルスの感染に対して比較的強い遺伝的系統の鶏がいるようです。Dr. Ellen W.

Collisson のグループは MHC の B2、B8 ならびに B5 では IB ウイルスに対する抵抗性が B12 及び B19 よりも高いことに着目し、抵抗性の高い B2 鶏由来のマクロファージと抵抗性の低い B19 鶏由来のマクロファージについて比較したところ、B2 鶏由来のマクロファージは poly I:C や IFN- γ に対してより強い免疫応答を示したと発表していました。さらに、今回の解析ではマクロファージを活性化する多くのターゲット遺伝子を見つけており、それらの発現メカニズムおよび分子メカニズムを解析することで RNA ウイルス感染に対する抵抗性を亢進する分子メカニズムの解明に繋がることが期待されます。

ポスター発表は 71 題で、その討論は Cheese and Wine Social の際に行われ、参加者はワインを片手に討論や談笑をしていました。Dr. Susan M. Williams が抗 IB ウイルスのマウスポリクローナル抗体を用いて組織免疫染色を行った発表をしていたのでお話を聞いたところ、Arkansas 株、Massachusetts 株及び Georgia 98 株の 3 種類の不活化ウイルス液を混ぜ、マウスに 3 回免疫して得られた抗血清が比較的広域な IB ウイルス株の組織免疫染色に使えることを示されました。しかし、わずかながらバックグラウン



写真 2

ドが検出されるということで、今後はバッファーについて検討していくとのことでした。

最後に

AAAP 自体は大きい組織ではなく参加者同士も良く知った仲という、いわば、ファミリー的な雰囲気ではありましたが、私のような新参者でも進んで飛び込んでいけば喜んで受け入れてくれるウェルカムな印象を受けました。私にとって初めての AAAP 参加でしたが、国内外の他ワクチンメーカーの方々と交流できたことや、IB ウイルス研究を牽引する Dr.

Mark W. Jackwood (写真 2 上) と Dr. Ellen W. Collisson (写真 2 下) にお会いすることができ、挨拶程度とは言ってもお話ができたことは今後の研究活動の励みになる貴重な経験でした。両博士ともに気さくに会話して下さっただけでなく、記念写真の撮影にも快く応じてくださいました。このような交流において唯一残念であったのが、私自身が研究発表をしなかったことから自分の研究内容について討論ができなかったことです。次回参加する際は、是非自分の研究成果を携えてより多くの方々と交流できたらと考えています。

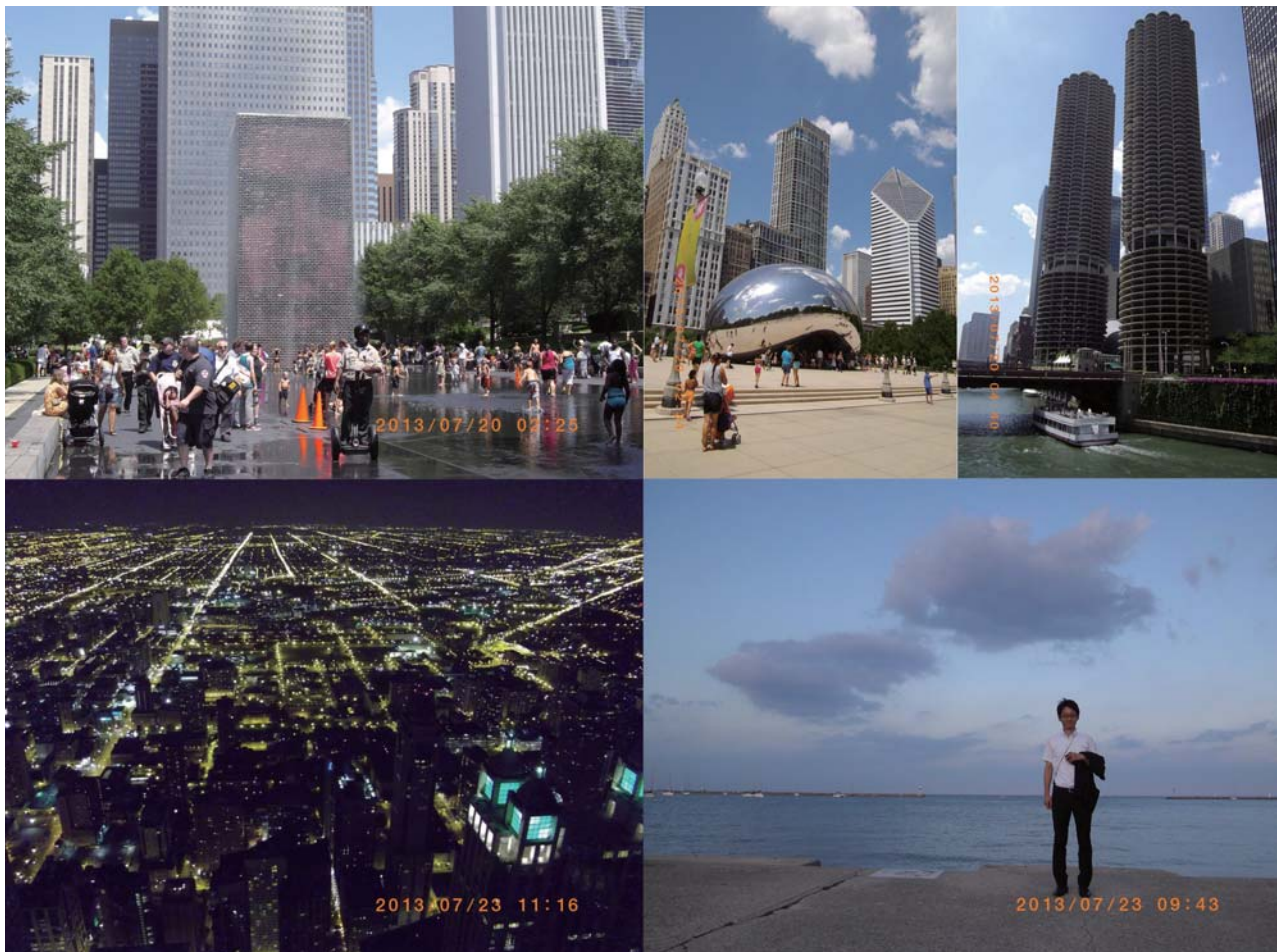
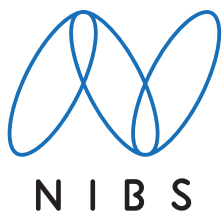


写真 3 シカゴの街並み



—— テーマは「生命の連鎖」——
生命の「共生・調和」を理念とし、生命体の豊かな明日と、研究の永続性を願う気持ちを快いリズムに整え、視覚化したものです。カラーは生命の源、水を表す「青」としています。

表紙題字は故中村稔治博士の揮毫

日生研たより 昭和 30 年 9 月 1 日創刊(隔月 1 回発行)
(通巻 583 号) 平成 25 年 10 月 25 日印刷 平成 25 年 11 月 1 日発行(第 59 巻第 6 号)
発行所 一般財団法人 日本生物科学研究所
〒 198-0024 東京都青梅市新町 9 丁目 2221 番地の 1
TEL : 0428(33)1056(企画学術部) FAX : 0428(33)1036
発行人 岩田 晃
編集室 委員/山下 龍(委員長)、大嶋 篤、堤 信幸
事務/企画学術部
印刷所 株式会社 精興社
(無断転載を禁ず)