

ISSN 0388-4376

馬の科学

Equine Science

Vol.51

No.3

2014



日本中央競馬会 **競走馬総合研究所**

Equine Research Institute, Japan Racing Association, Utsunomiya, Tochigi, Japan

研究コーナー

研究レポート

- 26プレックスSNP分析法による競走馬の尿検体の個体識別 梶 裕永 185
外科的切除とマゴットセラピーにより治癒したスピロヘータ感染性蹄癬の1症例 桑野睦敏 196
ウマにおける角膜上皮幹細胞の培養に関する基礎的研究 守山秀和 203

症例報告

- 競走馬における *Klebsiella pneumoniae* 肺炎の一症例 東樹宏太 210

解説記事

- 装蹄歴史案内 第5回競走蹄鉄と負担重量 関口 隆 214

情報コーナー

海外報告

- 第7回 国際馬蹄病学会 (7th International Equine Conference on Laminitis and Diseases of the Foot) に参加して 桑野睦敏 216
第59回AAEP年次大会 (59th Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners) へ参加して 高橋敏之 220

特別記事

- 韓国ソウル大学獣医学部の獣医学教育国際認証組織
American Veterinary Medical Association (AVMA) 認証へのロードマップ 佐々木直樹 225

研修報告

- 日本ウマ科学会・馬臨床獣医師ワーキンググループ臨床実習
Dr.Whiteによる開腹手術研修会レポート 関 一洋 228

衛生情報

- エクワイン・ディジーズ・クォーターリー (2014年2号) の紹介 近藤高志 237

文献紹介

- 大結腸左背側変位を発症した142頭の馬について、
治療法決定と治療直後の生存率に関連した要因の解析 石川貴士 243
ウマ多血小板血漿の活性化：活性化方法の比較とウマ自己トロンビンの特性 福田健太郎 245

学会見聞記

- 第24回日本臨床スポーツ医学会学術集会 大村 一・向井和隆 249
第5回PRP (多血小板血漿) 療法研究会 福田健太郎 251
第61回日本ウイルス学会学術集会 根本 学 252
第28回日本整形外科学会基礎学術集会 笠嶋快周・守山秀和・琴寄泰光・田村周久 253
第87回獣医麻酔外科学会 間 弘子 258
第3回家畜感染症学会学術集会 根本 学・村中雅則・木下優太 259
第17回超音波骨折治療研究会 笠嶋快周・守山秀和 263
第38回日本角膜学会総会および第30回日本角膜移植学会 守山秀和 266
第10回日本獣医内科学アカデミー 笠嶋快周・田村周久 268

催事案内

- 第27回日本ウマ科学会学術集会のお知らせ 269

研究レポート

26プレックスSNP分析法による競走馬の尿検体の個体識別

梶 裕永¹⁾・須田 功¹⁾・側原 仁¹⁾・木下賢治¹⁾・戸崎晃明¹⁾・廣田桂一¹⁾・吉澤 緑²⁾

要約

競走馬の薬物検査に供される尿検体の個体識別法を構築するため、26個のSNP (Single Nucleotide Polymorphism; 一塩基多型) の遺伝型を判定する26プレックス SNP分析法を開発した。尿DNAはDNA/RNA抽出キットを用いて単離し、各SNPの遺伝型の判定はSNaPshot™法により実施した。この方法により、尿、血液および毛根に対してすべてのSNPの遺伝型を検出・判定すること(DNAプロファイリング)が可能であった。サラブレッド種集団の調査から算出される26プレックス SNP分析法のPower of Identity (P(ID)) (2個体が同一の遺伝型を有する確率) は、 5.80×10^{-11} であった。また、今回の分析法により、140 μ Lの少量の尿を使用して97%のDNAプロファイリング成功率を得ることが可能となった。したがって、26プレックス SNP分析法は、これまでに競走馬の個体識別に利用されていたSTR (Short Tandem Repeat; マイクロサテライトDNA)分析法と比較してより少量の尿検体で分析可能であり、高い確率で個体識別を実施できる方法であると考えられた。尿検体の保存については、冷蔵期間が4週間以上、あるいは、凍結融解の繰り返し2回以上となることは、DNAプロファイリングを実施するうえで好ましくないと考えられた。一方、冷凍保存を実施した場合、少なくとも12か月間はDNAプロファイリングが可能であることが明らかとなった。本研究で構築した26プレックス SNP分析法は、競走馬の薬物検査における禁止薬物陽性尿検体の有効な個体識別法として利用することが可能である。

はじめに

競馬では、公正確保を目的として、レース後に薬物検査を実施することが国際的に取り決められている。通常、レース終了後ただちに競馬主催者が指定する競走馬の尿が採取され、薬物検査に供される。レース終了後、一定の時間を経てもなお尿が採取できない場合には、血液が採取される。これらの尿あるいは血液検体に対して薬物スクリーニング検査が実施され、検体中に禁止薬物が存在するか否かが検査される。薬物スクリーニング検査において陽性と判定された場合、確認検査が実施され、禁止薬物が同定される。この際に、検査に用いた検体が、競馬主催者が指定した競走馬から間違いなく採取されたものかについて疑義が生じた場合、競馬主催者がそ

の異同を確認することは重要である。そのため、競馬主催者の要請により、検査機関はこの確認作業を実施しなければならない場合がある。こうした検体と個体を照合する個体識別に関しては、尿や血液に有核細胞が含まれていることから、DNA (デオキシリボ核酸)分析を基にした方法が有用である。

STR (Short Tandem Repeat; マイクロサテライトDNA)分析法は、少量のDNAでも分析が可能なPCR (Polymerase Chain Reaction; ポリメラーゼ連鎖反応)法を基軸とした遺伝型分析法である。この分析法は、血液や毛根を検体として、競走馬の血統登録における親子判定・個体識別に利用されている¹⁻⁴⁾。また、STR分析法を用いて尿検体の個体識別を実施した報告もある⁵⁻¹⁰⁾。さらに、血液由来および

¹⁾ Kakoi Hironaga, Kijima-Suda Isao, Gawahara Hitoshi, Kinoshita Kenji, Tozaki Teruaki, Hirota Kei-ichi: 競走馬理化学研究所

²⁾ Yoshizawa Midori: 宇都宮大学

本論文は、Journal of Forensic Science Vol.58 (1) 21-28に掲載された論文を一部改編し、和訳したものである。

毛根由来の遺伝型と尿由来の遺伝型は一致することがSTR分析法を用いて確認されている^{5,6)}。したがって、STR分析法は尿検体の個体識別にとって有効な方法の一つといえる。一般的に、血液あるいは毛根からはPCR増幅が可能なDNAが十分量抽出できるため、適切に保存されている限りSTR分析を実施するうえでほとんど問題が生じない。一方、尿から抽出されるDNAの量は、尿沈渣に含まれる剥離した尿管上皮細胞等の量に依存する。そのため、これまでの研究においては0.1～15 mLの尿量をSTR分析に供することが試行されているものの、分析したすべてのSTRの遺伝型を検出・判定すること(DNAプロファイリング)ができない例が認められている^{6,10)}。こうした場合はさらに使用する尿量を増加させる必要があり^{7,10)}、1 mLの尿では67%の検体しかSTR分析に成功しなかったものの、80 mLの尿を使うことで100%の検体の分析に成功したとの報告もある⁷⁾。また、尿は長期間の保存あるいは凍結融解の繰り返しなどによって状態が悪化し変質してしまうため、高分子DNAの分解が進むとともに、PCR増幅が阻害されることがある。結果として、STR分析に適したDNAの量および質を尿検体から得ることは難しい場合があるといわざるを得ない。

近年、ウマの全ゲノム配列が解読されるとともに、ゲノムデータベースEquCab2.0 (<http://www.broadinstitute.org/mammal/horse>)上に多数のSNP (Single Nucleotide Polymorphism; 一塩基多型)が同定された¹¹⁾。SNP分析は、人や動物を対象とした法医学分野において、親子判定・個体識別に利用されている^{12,14)}。また、ウシにおいては、トレーサビリティを目的として25個のSNPを用いた分析法が開発されている¹⁵⁾。SNP分析は、DNAが著しく分解し40～50 bp (base pair; 塩基対)といった小さなDNA断片となっても遺伝型判定が実施できるという利点がある¹⁶⁾。そのため、尿を対象としたDNAプロファイリングに利用できると考えられる。多数のSNPのDNAプロファイリングシステムはDNAチップやリアルタイムPCRを用いる方法など多岐にわたるが^{17, 18)}、その中でSNaPshot™技術(ライフテクノロジー社)を用いたSNP分析法は、少数検体の処理に適した安価で信頼性の高い方法である。薬物検査における陽性の発生頻度はそれほど多くないことから、

SNaPshot™法は尿検体の個体識別に適していると考えられる。また、本法は遺伝型検査を実施する機関が一般的に所有するPCR装置およびDNAシーケンサーを使用する手法であるため、新たな設備投資をする必要がないという利点もある。

尿からのDNA抽出については、これまで数多くの方法が試行されてきた^{5-10, 21-23)}。Yasudaら²³⁾は、市販のDNA/RNA抽出キットを用いて少量(140 μ L)のヒト尿からDNAを抽出しSTR分析で良好な結果を得ている。また、尿を4℃で3週間冷蔵保存した場合や凍結融解を数回繰り返した場合でも、正確なDNAプロファイリングが可能であることを報告している。わが国の競馬における薬物検査では、レース後に採取された尿検体は、A検体(60 mL以上)およびB検体(20 mL以上)に分割され、1～2日かけて冷蔵もしくは冷凍状態で検査機関である公益財団法人競走馬理化学研究所(競理研)へ輸送される。そして、競理研に到着した後、薬物スクリーニング検査が実施されるまで4℃にて保存される。その後、A検体のスクリーニング検査が実施されるが、尿検体はその時点でもなお凍結している場合は、40℃の温浴槽で融解して検査に供される。A検体の検査において陽性と判定された尿検体については、B検体を用いて再検査が実施される。この間、AおよびB検体は4℃にて保存される。そして、これらの工程は14日以内に終えることとなっている。DNAプロファイリングを実施する場合は、これらAおよびB検体の残量が使用されることになる。こうした尿検体の保存状態であっても、Yasudaら²³⁾のDNA抽出法を用いれば、良好なDNAプロファイリングが可能となることが期待される。

本研究では、SNaPshot™技術により26個のSNPの遺伝型を判定する26プレックスSNP分析法を開発し、競走馬の個体識別法を構築する。そして、競走馬集団を分析することで本分析法の個体識別能力を評価する。また、DNA/RNA抽出キットにより得た尿DNAを用いて、尿検体の個体識別における26プレックスSNP分析法の有用性について検証する。

材料および方法

検体

新たに構築した分析法におけるDNAプロファイ

リング能力を評価する目的で、378頭のサラブレッド種から得た血液(2頭)および毛根(376頭)を使用した。また、これらの検体を対象として、サラブレッド種集団における26個のSNPに関する遺伝的データを収集した。26プレックスSNP分析を実施するまでの間、血液を -80°C にて、毛根を室温にて保存した。

尿については、レース終了後に競理研に輸送され薬物スクリーニング検査に供されたサラブレッド種の尿検体から192頭分をランダムに選択した。これらは薬物検査において陰性と判定されており、薬物スクリーニング検査が終了するまでの間、上述のように冷蔵保存されている。分析には、薬物スクリーニング検査後に2～3日間 4°C で冷蔵保存されたA検体を使用した。2 mLのA検体をマイクロチューブに分取し、26プレックスSNP分析を実施するまでの1～4日間、引き続き 4°C で冷蔵保存した。これらの尿検体は、抽出した尿DNAに対してDNAプロファイリングが可能であるか評価する目的で使用した。

26プレックスSNP分析法における尿検体の保存状態の影響について調査するため、20頭分の尿検体を競理研到着後から2、3、4および5週間 4°C にて冷蔵保存し、その後、尿DNAを抽出しDNAプロファイリングを実施した。また、別の20頭分の尿検体(競理研到着後10日間 4°C にて冷蔵保存)について、その後1週間 -40°C で冷凍した後、 40°C の温浴槽で融解して尿DNAを抽出し、直ちに再度冷凍する凍結融解の工程を3回繰り返し、各工程で抽出した尿DNAの26プレックスSNP分析を実施した。また、4頭分の尿検体(競理研到着後10日間 4°C にて冷蔵保存)について、1、3、6、9および12か月間 -40°C にて冷凍保存した後、尿DNAを抽出し26プレックスSNP分析を実施した。

26プレックスSNP分析法において血液DNAの遺伝型と尿DNAの遺伝型が一致することを確認するために、4頭のサラブレッド種の血液および尿を使用した。これらは分析を実施するまでの間、 -80°C および 4°C にてそれぞれ保存した。

DNA抽出・精製

血液からのDNA抽出は、 $100\mu\text{L}$ の全血を用いて自動核酸抽出装置MagExtractor System MFX-2000(東洋紡績)により実施した。抽出された血液DNA

を $100\mu\text{L}$ の超純水に溶解し、そのうち $2\mu\text{L}$ を後述のPCRに供した。

毛根からのDNA抽出はKakoiら²⁴⁾の方法に従った。3本の毛根をProteinase Kを含む $200\mu\text{L}$ のDNA抽出緩衝液中でインキュベートし、そのうち $2\mu\text{L}$ を直接後述のPCR反応に供した。

尿からのDNA抽出は、Yasudaら²³⁾の方法に従い、DNA/RNA抽出キットQIAamp® Viral RNA Mini Kit(キアゲン社)を使用した。2 mLの尿検体を穏やかに攪拌した後に、 $140\mu\text{L}$ を分取し、分析に使用した。なお、尿検体の濃縮および遠心操作は実施しなかった。DNA抽出はキットプロトコルに準じ、 $60\mu\text{L}$ の溶出緩衝液にて尿DNAを溶出した。その後、この溶出液を減圧下で乾燥し、再度 $10\mu\text{L}$ の超純水に溶解した。このうち $5\mu\text{L}$ を後述のPCR反応に供した。

$140\mu\text{L}$ の尿検体を用いてDNAプロファイリングが実施できなかった場合、再度同じ尿検体から1 mLを分取し、Amicon Ultra-4 100K device(ミリポア社)により約 $100\mu\text{L}$ まで濃縮した。その後、濃縮した尿検体を用いて尿DNAを抽出した。

DNAの定量

血液DNAの溶液の濃度について、分光光度計DU800(ベックマン社)による計測を実施した。このDNAの濃度値をもとにDNAの量を算出し、後述の26プレックスSNP分析法における鋳型DNAの必要量に関する調査に使用した。

なお、尿DNAの溶液の濃度については、Yasudaら²³⁾の報告にあるように、DNA抽出キット付属の溶液中にキャリアRNAが含まれることから計測することが不可能であった。

DNAプロファイリング

Hirotaら¹⁴⁾は、ウマゲノムデータベースEquCab1.0から高いヘテロ接合率を基準に、53個のSNPを選択しSNP分析法による親子判定法を開発している。今回は、この53個のSNPの中から、異なる染色体に位置すること、および最終的にSNaPshot™産物の増幅効率が良いことを条件に26個のSNPを選択した(表1)。

26個のSNPを含むDNA断片をPCR増幅するため

に、新たなプライマーペアを設計した。これらのプライマーペアは、Hirotaら¹⁴⁾の方法によって得られるPCR産物よりも短いDNA断片(51 ~ 63 bp)が増幅されるよう設計されている(表1)。26個のSNPを含む各DNA断片を同時に増幅するマルチプレックスPCRは、抽出DNA溶液(2 μLの血液DNA、2 μLの毛根DNAあるいは5 μLの尿DNA)、0.25 μMの各プライマー、2.5 mM MgCl₂、0.3 mM dNTPs、PCR用緩衝液および2.5 U AmpliTaq Gold (ライフテクノロジー社)からなる計20 μLの反応溶液を使用し、初期変性反応として95°Cで10分、サイクル反応として95°Cで30秒、55°Cで1分および72°Cで30秒を30サイクル、最終伸長反応として72°Cで10分の温度条件により実施した。その後、PCR産物に対してExoSAP-IT[®] (USBコーポレーション)処理を37°Cで30分間施し、SNaPshot[™]反応の鋳型とした。SNaPshot[™]反応はSNaPshot[™] Multiplex キットの方法に従った。なお、反応液の組成は、1 μLのExoSAP-IT[®] 処理済みPCR産物、2.5 μLのSNaPshot[™] Multiplex Ready Reaction Mix、2.5 μLのPCR用緩衝液、2 μLの超純水、2 μLの0.05 ~ 0.5 μM SNaPshot[™]用プライマー混合液(表1)からなる計10 μLとした。反応後、SNaPshot[™]産物をShrimp Alkaline Phosphatase (USBコーポレーション)にて37°Cで1時間処理し、DNAシーケンサー 3130xl Genetic Analyzerにより電気泳動を実施した。電気泳動には、0.5 μLのShrimp Alkaline

Phosphatase 処理済みSNaPshot[™]産物、0.5 μLのGeneScan[™]-120LIZ[™]サイズスタンダード(ライフテクノロジー社)、9 μLのHi-Di[™]ホルムアミド(ライフテクノロジー社)を混合し、95°Cで5分の加熱処理を施した溶液を供した。電気泳動後のDNAプロファイリングには、GeneMapper[®] ソフトウェア(ライフテクノロジー社)を使用した。なお、予備実験において、6頭のサラブレッド種の毛根DNAを用いて各SNPを含むDNA断片の塩基配列解析を実施し、26プレックスSNP分析法により判定されるSNPの遺伝型が塩基配列データと一致することを確認した。

SNP分析およびSTR分析における遺伝型の検出能力

26プレックスSNP分析法における鋳型DNAの必要量を調査するため、DNA濃度データをもとに10 ng、1 ng、100 pg、10 pgおよび1 pgの量に調整した血液DNAを鋳型として分析を実施した。また、26プレックスSNP分析法と競走馬の親子判定・個体識別に利用されているSTR分析法とのDNAプロファイリング能力を比較する目的で、上述の各DNAを鋳型として既報のSTR分析²⁾を改変した18プレックスSTR分析を実施した。なお、18プレックスSTR分析法とは、わが国の軽種馬の血統登録のための親子判定において経常的に使用されているものであり、18個のSTRの遺伝型を判定する方法である。この18プレックスSTR分析法は、以下の各STRを増幅する3種のマルチプレックスPCRにより構成される。

表1. 26SNPのID (認識)番号、染色体位置、PCRおよびSNaPshotに関する情報

SNP ID番号*	EquCab 1.0 ID番号	染色体	プライマー塩基配列		PCR 産物 サイズ (塩基対)	SNaPshotプライマー塩基配列	最終濃度 (μM) /SNaPshot 反応 サイズ (塩基)
			フォワードプライマー (5'-3')	リバースプライマー (5'-3')			
SNP02	BIEC42118	1	TGACCTTGATCAAAAATTTC AAT	ATTGGGGTATAGCTTTAAATG	60	(gact) ¹⁰ GATCATFAAAAATTTC AATTAATGCAAAAA	0.5 94
SNP05	BIEC397614	2	TCGGTAGACGTGCCCA	TTAGAAAAACACAATTGGGGAG	51	(gact) ³ GACGTGCCCAAGAAC	0.2 25
SNP08	BIEC681989	3	TCATATTTCCCAAGACCCAT	GATAAGACGAGAAGAACAAA	55	(gact) ⁷ gacCCAAGACCCATTTCAATAG	0.1 52
SNP09	BIEC707898	4	AATAACAGACAATGTCATGATAAT	AAGAGGACTACGGGCTTTT	57	(gact) ¹⁰ AATAACAGACAATGTCATGATAATCC	0.2 91
SNP13	BIEC811791	6	TCAGCCACCATGAAACATAA	ACGTTGAATTTAATTCCTTACGA	56	(gact) ¹⁰ gaACCATGAAACATAAAGGCAAG	0.05 64
SNP18	BIEC870244	8	GCCGCTCAGACTGGCCA	CTACGTGCCATGCAGAAAAT	60	(gact) ³ gAGGCGGAGGAAAATGTC A	0.05 40
SNP23	BIEC915102	9	AGCTGAAGGAAGGAATTATT	GTCTCAATCGTGGTGT	51	(gact) ³ ga(gact) ³ gaGGAATTAATGTTTTCTTCTAATAATCA	0.2 82
SNP25	BIEC119158	10	AGGAAATTAATAAACTCTTGCT	ACCTCTCCAGATTTCTCAAT	59	(gact) ⁸ CTCTTGCTTTCTTGCTA	0.2 55
SNP28	BIEC136821	11	GTTTCTGTGAAGGAAGAAT	AACAAACCAGGATTCACCTT	55	(gact) ¹¹ gTGTGAAGGAAGAATGCAATTC	0.2 67
SNP31	BIEC155175	12	TGTTGAGTTAATGCCAAC	AGAGGTCTTCCCACTT	61	(gact) ³ gATGCCAACCCGCTTCA T	0.5 43
SNP34	BIEC180122	13	TCGATATTACAGAGGAGCT	CCATATGAAATAGACCTGT	59	(gact) ³ gAGCTGGCCGACCACTGTC	0.2 28
SNP45	BIEC247284	15	ACACAGCATATGTCGCAAAAT	TGATTTATCAACAATAAGCAAGGA	57	(gact) ³ gaAGCATATGTCGCAAAATCTATAAAAT	0.5 88
SNP46	BIEC266761	16	TCAGATGGCTCCCTGGCCTA	GGTTAATTACCTCCCACTTAA	57	(gact) ³ gaCTGGCTAGTTTACCC	0.5 31
SNP49	BIEC324530	18	TCAGGGTAAAATCTACCAAT	ATAGGGAGAAGACTGAGCCA	63	(gact) ³ CAGCAAAGCCTATGAGG	0.5 46
SNP51	BIEC344848	19	TCAGTCCAATGCAGGGCTGGT	ACTCCACAGGGTGAAACACT	59	gacGTGAAACACTGTAAC	0.3 19
SNP54	BIEC431445	20	CCTAGAAGTTAAGAAAGGAA	AGAGTTGAGAAGATATGCA	59	(gact) ³ gAGAAAGGAAAAGACTAGGGA	0.5 58
SNP58	BIEC493879	22	ACAATGACACTTCACATATGT	ACTACAAGCCAGAAAGCAGT	56	(gact) ³ gACACTTCACATATGTTATCACTT	0.1 85
SNP61	BIEC508410	23	AATCTACTGATCTGAGACT	TCAATTTCTGATTTAATTTCAAAAT	55	(gact) ³ gaTCTCTGAGACTGCTGTG	0.05 49
SNP66	BIEC532060	24	CAGGGATCAATCAGACAGGA	ACTTTGATGTTGCTTTCTAAG	53	(gact) ³ gAGCAGGAGCCACTAC	0.1 34
SNP68	BIEC555737	25	TGAGACACCTACCCTCAATT	GCTTATTTCTGGCTCTGT	54	(gact) ³ gACCATCCCTAATTCGAGAAT	0.05 70
SNP70	BIEC581695	26	GTCGTGAGACAGAGCCCAA	AAGAACTAGAGTGAACCTA	54	(gact) ¹² gacAGACAGAGCCCAAATGGAAT	0.2 73
SNP72	BIEC604433	27	TAAGTGAATTTCTTCAGAATG	ATAGCTCAGGCTTTTGTAT	57	(gact) ³ gaTATCTTCAGAATGCAAAAGAT	0.2 76
SNP75	BIEC607490	28	ACCAAAAATGAAATCTGATGGT	AAAGTGACACTGAACGCAAT	62	(gact) ³ gGCATTCCTCTCTCA	0.3 37
SNP79	BIEC633181	29	CTAGTTCCACCAAGAACCT	CAAGATGAAAGTTCGTCCTA	57	(gact) ³ gCAAAAGAACCTGACTGAAAAT	0.1 79
SNP84	BIEC686800	30	CTGCTGGTAGCAGTAATACT	GTCCGTAGAACCTTAAACGGA	54	(gact) ¹⁰ AGAACCTTAAACGGAATCC	0.2 61
SNP85	BIEC696480	31	ATCTAGGAAAGCCAGACA	GCCAGTCTAAGGCGAAAATA	51	gactgaAGCCAGACACATCC	0.05 22

* SNP ID番号は、Hirotaら¹⁴⁾の報告で調査された120個のSNPのID番号を使用した。

マルチプレックス1; AHT4、HMS2、HMS3、HMS7、HTG4、TKY19およびVHL20

マルチプレックス2; ASB17、ASB23、AHT5、HMS6、LEX3、TKY28およびTKY321

マルチプレックス3; ASB2、CA425、HTG10およびLEX33

各マルチプレックスPCRは15 μ Lの反応液をもって実施し、PCR反応後は各マルチプレックスPCR溶液を混合し、15倍に希釈した。その後、2 μ Lの希釈済みPCR産物、0.5 μ LのGeneScan™-500ROX™サイズスタンダード(ライフテクノロジー社)、20 μ LのHi-Di™ホルムアミドを混合し、95℃で2分間の加熱処理を施し、DNAシーケンサーによる電気泳動に供した。

また、26プレックスSNP分析法によるDNAプロファイリングが可能であった20頭分の尿DNAを鋳型DNAとして5 μ L使用し、上述のマルチプレックス1(7個のSTR)のSTR分析が可能であるか調査した。

サラブレッド種集団における26個のSNPの遺伝学的データ

378頭のサラブレッド種におけるDNAプロファイリングを実施し、そのデータをもとに各SNPのマイナーアレル頻度(MAF)、ヘテロ接合率(期待値 H_e および観察値 H_o)および多型情報含有値(PIC)を求めた。さらに、Jameisonら²⁵⁾およびWaitsら²⁶⁾の報告に従い、各SNPおよび26個のSNPを総合した場合のProbability of exclusion (PE) (父権否定率、JameisonらのPE01値)およびPower of Identity (PID) (2個体が同一の遺伝子型を有する確率)をそれぞれ算出した。

結果

DNAプロファイリングの評価およびSNPの遺伝学的データ

血液(2頭)および毛根DNA(376頭)を用いて26プレックスSNP分析を実施したところ、すべてのDNAにおいてDNAプロファイリングが可能であった(図1)。また、各SNPにみられるすべてのアレル

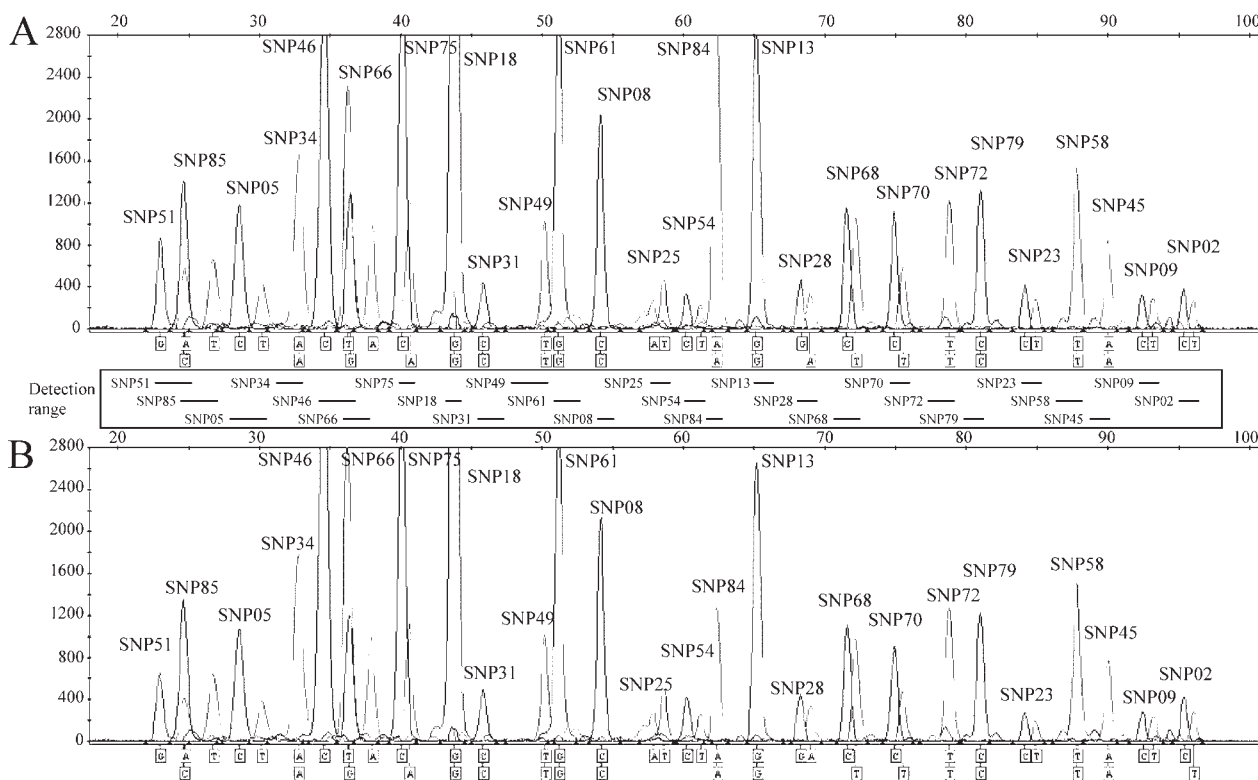


図1. DNAシーケンサーにより同一個体の(A)血液および(B)尿から得た26個のSNPを示すSNaPshot™産物の電気泳動像図。Y軸はアレルピークの蛍光シグナル強度(RFU; 相対蛍光ユニット)を示す。X軸は塩基サイズ(測定値)を示す。ピーク下のラベルはアレルの型(遺伝型)を示している。SNaPshot™産物の検出範囲は、中央枠内(Detection range)のスケールバーにより示した。

が増幅されていることが確認できた。これらのアレルは、Hirotaら¹⁴⁾の報告したアレルとすべて一致していた。26個のSNPの遺伝学的データ(表2)については、MAFは0.165～0.499の範囲にあり、He、HoおよびPICの平均値はそれぞれ0.454、0.456および0.349であった。また、26個のSNPの総合PE値および総合P(ID)値は、それぞれ0.9932および 5.80×10^{-11} であった。

鋳型DNAの量に対するSNP分析およびSTR分析の検出能力

26プレックスSNP分析法における鋳型DNAの必要量について調査したところ、10 ng、1 ngおよび100 pgのDNAを用いた場合、DNAプロファイリングが可能であった。なお、DNAの量が減少するに伴い、アレルピークの蛍光シグナル強度が低くなり、10 pgおよび1 pgのDNAでは、蛍光シグナル強度の閾値を50 RFU(相対蛍光ユニット)とした場合でもほとんどのSNaPshotTM産物を検出できず、DNAプロファイリングは不可能であった。図2に、1 ng、

100 pgおよび10 pgのDNAを用いた場合の26プレックスSNP分析と18プレックスSTR分析の電気泳動像図を示す。18プレックスSTR分析では、10 ngおよび1 ngのDNAを用いた場合にDNAプロファイリングが可能であったが、100 pgのDNAでは遺伝型が判定できないアレルピークが複数認められた。10 pgおよび1 pgのDNAでは、すべてのSTRにおいて十分なPCR増幅を認めることができなかった。

尿DNAを用いたマルチプレックス1のSTR分析では、すべての尿検体において2個のSTR(HMS2およびTKY19)のPCR増幅が認められなかった。また、他の5個のSTRについてもアレルピークのシグナル強度が微弱もしくは皆無であった。電気泳動に供する際のPCR産物の希釈工程を省略した場合、これら5個のSTRについては遺伝型の判定の成功率がわずかに改善されたものの、HMS2およびTKY19に関しては遺伝型の判定が不可能であった。

尿検体を対象としたSNP分析

尿DNAを使用して26プレックスSNP分析を実施

表2. 26SNPのマイナーアレル頻度(MAF)、ヘテロ接合率(期待値 Heおよび観察値 Ho)、多型情報含有値(PIC)、父権否定率(PE)およびPower of Identity(2個体が同一の遺伝型を有する確率、P(ID))

SNP ID 番号	MAF	He	Ho	PIC	PE	P(ID)
SNP02	0.438	0.492	0.505	0.371	0.186	0.379
SNP05	0.335	0.445	0.474	0.346	0.173	0.407
SNP08	0.335	0.445	0.437	0.346	0.173	0.407
SNP09	0.238	0.363	0.280	0.297	0.148	0.472
SNP13	0.456	0.496	0.526	0.373	0.187	0.377
SNP18	0.315	0.431	0.476	0.338	0.169	0.416
SNP23	0.499	0.500	0.532	0.375	0.187	0.375
SNP25	0.402	0.481	0.466	0.365	0.183	0.385
SNP28	0.284	0.407	0.452	0.324	0.162	0.434
SNP31	0.380	0.471	0.489	0.360	0.180	0.391
SNP34	0.230	0.354	0.376	0.292	0.146	0.480
SNP45	0.460	0.497	0.481	0.373	0.187	0.377
SNP46	0.479	0.499	0.556	0.375	0.187	0.375
SNP49	0.303	0.422	0.463	0.333	0.167	0.423
SNP51	0.405	0.482	0.508	0.366	0.183	0.385
SNP54	0.339	0.448	0.418	0.348	0.174	0.405
SNP58	0.448	0.495	0.468	0.372	0.186	0.378
SNP61	0.463	0.497	0.407	0.374	0.187	0.376
SNP66	0.423	0.488	0.481	0.369	0.185	0.381
SNP68	0.362	0.462	0.450	0.355	0.178	0.396
SNP70	0.499	0.500	0.516	0.375	0.187	0.375
SNP72	0.267	0.392	0.402	0.315	0.157	0.447
SNP75	0.397	0.479	0.481	0.364	0.182	0.386
SNP79	0.392	0.476	0.455	0.363	0.181	0.388
SNP84	0.165	0.276	0.267	0.238	0.119	0.562
SNP85	0.462	0.497	0.489	0.374	0.187	0.376
平均	0.376	0.454	0.456	0.349	0.175	0.406
総合確率					0.9932	5.80×10^{-11}

したところ、血液DNAの場合と同様にDNAプロファイリングが可能であった(図1)。ただし、尿DNAを使用した場合、ほとんどのケースにおいて、各SNPのアレルピークの蛍光シグナル強度が血液あるいは毛根DNAを使用したときよりも低かった。192頭分の尿検体を分析したところ、187頭分の尿検体においてDNAプロファイリングが可能であった。残りの5検体については、アレルピークの蛍光シグナル強度が全体に低く、複数のSNPにおいて遺伝型判定が不可能であった。これら5検体について尿量を1 mLに増量して分析したものの、アレルピークの蛍光シグナル強度や検出状況は改善されず、DNAプロファイリングは不可能であった。

192頭分の尿検体のうち20検体については2回分析を繰り返し、DNAプロファイリングに再現性があることを確かめた。また、4頭分の血液および尿検体を分析し、血液DNAの遺伝型および尿DNAの遺伝型が相互に一致することを確認した(図1)。

尿検体の保存状態の影響

26プレックスSNP分析法における尿検体の保存状態の影響を調査した結果を表3に示した。4℃で2週間冷蔵保存した尿検体では、すべての検体においてDNAプロファイリングが可能であった。しかしながら、3週間冷蔵後では、17検体のDNAプロファイリングが可能であったものの、残る3検体において

は、アレルピークの蛍光シグナル強度が低いSNPが認められたためDNAプロファイリングが不可能であった。4および5週間冷蔵後では、DNAプロファイリングが可能な尿検体が9つまで減少した。凍結融解を1、2および3回繰り返した尿検体では、17、14および8検体のDNAプロファイリングがそれぞれ可能であった。DNAプロファイリングの成功率が80%以上となるのは3週間以内の冷蔵保存および1回までの凍結融解であり、4週間以上の冷蔵保存および3回以上の凍結融解を繰り返した場合は半分以上の尿検体のアレルピークの蛍光シグナル強度が低くなり、DNAプロファイリングが困難であることが判明した。

一方、1、3、6、9および12か月間-40℃にて冷凍保存した尿検体では、すべての検体においてDNAプロファイリングが可能であった。

考察

今回分析した26個のSNPについては、Hirotaら¹⁴⁾が報告したようにすべて多型性があり、個体識別に有用であることが示された。また、26プレックスSNP分析法の総合P(ID)値は 10^{-10} よりも低く、25個のSNPを用いたウシトレサビリティのための分析法¹⁵⁾(総合P(ID)値 $1.11 \times 10^{-8} \sim 2.3 \times 10^{-10}$)と同等の個体識別能力があると考えられた。公益社団法人日本馬事協会(<http://www.bajikyo.or.jp/>)の報告に

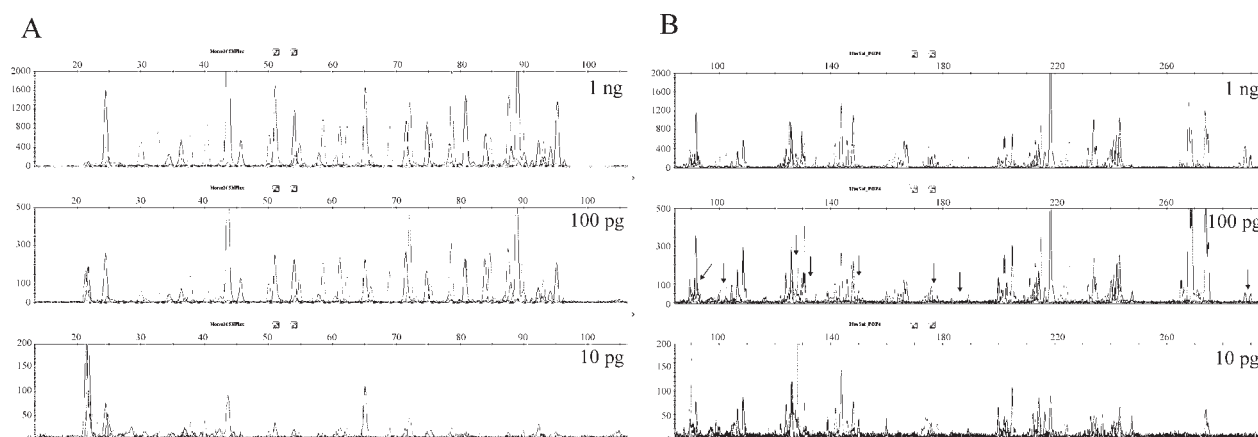


図2. 血液より抽出した1ng、100pgおよび10pgのDNAから増幅した(A) 26個のSNPを示すSNaPshotTM産物および(B) 18個のSTRを含むPCR産物の電気泳動像図。X軸は塩基サイズ(測定値)を示す。Y軸のスケールは、1ng、100pgおよび10pgのDNAにおける泳動像に対し、それぞれ2000、500および200RFUとした。100pgのDNAにおける18個のSTRの泳動像上の矢印は遺伝型を判定できなかったピークを示している。10pgのDNAでは、26個のSNPおよび18個のSTRともに十分な増幅が認められなかった。

よれば、2011年にわが国で飼養されている軽種馬は42,877頭である。この数値と比較すると、本SNP分析法の総合P(ID)値はわが国の軽種馬の個体識別を問題なく実施できることを示している。

本研究では26個のSNPの総合PE値も求めたが、国際血統書委員会(International Stud Book Committee; ISBC)が推奨するウマの親子判定に必要なPE値0.9995^{2, 3, 14)}を下回る結果となった。それゆえ、26プレックスSNP分析法はウマの個体識別に特化して利用すべきである。なお、ブタにおいては10個のSTR分析と同等の総合PE値を得るためには60個のSNPが必要であり¹³⁾、ウマにおいては15個のSTR分析と同等の総合PE値を得るためには少なくとも50個のSNPが必要であるとの報告がある¹⁴⁾。既報の17個のSTR分析法の親子判定能力(総合PE値0.999991)²⁾を考慮すると、親子判定に用いるためにはより多くのSNPを分析することが必須である。

今回使用したDNA抽出法は、尿検体の遠心操作や濃縮操作を必要とせず、簡便であることが利点として挙げられる。26プレックスSNP分析では、血液から抽出したDNAを少なくとも100 pg使用すれば、DNAプロファイリングが可能であることが示された。また、尿については140 μ Lしか使用していないにもかかわらず、これまでに報告のあった尿DNAのSTR分析^{6,9)}の結果と比較すると、DNAプロファイリング成功率が97% (187/192)と上回る

結果となった。このことは、今回のDNA抽出法によってほとんどの尿検体の140 μ L中からPCR増幅が可能な100 pg以上のDNAが回収できたことを示している。また、PCR増幅においては、26個のSNPを含むPCR産物のサイズが63 bp以下となるようプライマーペアを再設計したことから、尿中の分解したDNAを鋳型とした増幅も可能となり、DNAプロファイリング成功率が向上したと考えられる。

今回の調査では、192頭分の尿検体のうち5検体(3%)については、アレルピークの蛍光シグナル強度が全体に低く、複数のSNPにおける遺伝型の判定ができなかった。鋳型DNA量に対するSNP分析の検出能力の調査から、26プレックスSNP分析を成功させるためには少なくとも100 pgのDNAを含む尿量を用いる必要があると考えられる。1 mLの尿に含まれるDNAの量は0 ng ~ 2.41 μ gあるいは1 ng ~ 4.601 μ gの範囲にあるとの報告がある^{7, 10)}。そのため、今回の5検体については、それぞれ約10倍量となる1 mLの尿を濃縮して分析したが、SNP分析の結果は改善されなかった。このことから、これら5検体の尿は著しく変性しており、その結果としてDNAが極度に分解・劣化していた可能性が考えられた。

鋳型DNAの量に対する検出能力の調査では、STR分析には1 ng以上のDNA量が必要であることが示された。この結果は、STRのプライマー配列、

表3. 冷蔵・冷凍保存を行った尿検体および凍結融解を繰り返した尿検体のDNAプロファイリング成功数

保存条件	検体数	保存期間				
		1週	2週	3週	4週	5週
冷蔵保存 (1~5週間)	20	20	20	17	9	9
凍結融解 (1~3回繰り返し)	20	凍結融解繰り返し数				
		1回	2回	3回		
		17	14	8		
冷凍保存(-40°C) (1~12か月)	4	保存期間				
		1か月	3か月	6か月	9か月	12か月
		4	4	4	4	4

電気泳動システムなどに違いはあるものの、Chenら¹⁰⁾が開発した21個のSTR（ヒトの3個のSTRを含む）のマルチプレックスPCR法における結果と類似している。このマルチプレックスPCRでは、1 ngもしくはそれ以下のDNAの量を用いた場合、ほとんどのSTRのアレルピークの蛍光シグナル強度が低くDNAプロファイリングが不可能であったが、20～50 ngのDNAの量を用いた場合、アレルピークの蛍光シグナル強度が改善されたと報告されている。一方、尿DNAを用いたマルチプレックス1のSTR分析では、多くのSTRのアレルピークの蛍光シグナル強度が低く、2つのSTRについて増幅が認められなかった。Chenら¹⁰⁾の報告に従えば、理論的には10 μ Lの尿からPCR増幅に十分なDNAの量(20～50 ng)を抽出することが可能である。しかしながら、今回の結果は、140 μ Lの尿から得られるDNAの量ではSTR分析に対して十分ではないことを示している。ヒトにおいては、今回の研究と同一の尿量と抽出法により得られた尿DNAを使用して、1個のSTRの分析およびマルチプレックスSTRキットPowerPlex[®] 16 System（プロメガ社）による分析を実施したところ、十分な分析結果が得られたと報告されている²³⁾。また、PowerPlex[®] 16 Systemは、62.5 pgの鋳型DNAでDNAプロファイリングが可能であるとの報告もある²⁷⁾。これらのことは、今回調査したウマのSTR分析法が、ヒトのそれに比べて、少量の鋳型DNAの分析に対して最適化されていないことを示しているかもしれない。対照的に、26プレックスSNP分析はこのSTR分析に必要とされる量よりも少ない鋳型DNAで良好な結果を得ることができるため、分析法としてより有用性が高いといえる。

尿は長期間の保存あるいは凍結融解の繰り返しにより、尿成分の変質や高分子DNAの分解が進んでしまう。今回の調査では、尿を4週間以上冷蔵保存した場合、26プレックスSNP分析におけるDNAプロファイリング成功率が45%まで低下した。この結果は、ヒトの尿から同一の抽出法を用いて得た尿DNAに認められるSTR分析の結果と類似する²³⁾。しかしながら、5週間以上冷蔵保存したウマ尿を用いてSTR分析のDNAプロファイリングに成功した報告もある⁷⁾。26プレックスSNP分析は、STR分析よりも遺伝型の検出能力が高いものの、長期間にわ

たり冷蔵保存した尿検体に対しては、STR分析よりも良好な結果を得るまでには至らなかったと考えられる。結果として、冷蔵での保存期間が3週間までであれば、ヒト尿の場合と同様に、SNP分析でウマ尿の個体識別を確実に実施できると考えられる。

一方、尿の凍結融解の繰り返しについては、2回の繰り返し操作を実施した場合、26プレックスSNP分析におけるDNAプロファイリング成功率は70%と減少し、3回の繰り返しでは40%まで低下した。STR分析に関しては、1および2回の凍結融解の繰り返しではDNAプロファイリングに支障はないものの、3回の繰り返し後ではDNAプロファイリング成功率が44%まで低下したと報告されている⁷⁾。これらの結果を総合すると、2回以上の尿の凍結融解の繰り返しは、26プレックスSNP分析において良好な結果を得るためには避けるべきであると考えられる。

こうした尿の保存条件を考慮した場合、競理研で実施されている薬物検査における尿検体の保存は、26プレックスSNP分析に支障のない範囲で実施されていると考えられる。しかしながら、今回の調査では、尿検体を冷凍保存することによって少なくとも12か月間にわたり安定した分析が可能であることが明らかとなった。このことから、個体識別を必要とする尿検体については、薬物検査後直ちに冷凍保存し、さらに凍結融解の繰り返しを避けるために小分けしておくことが肝要である。こうした一連の保存工程は、確度の高い尿検体の個体識別を実施するうえで非常に重要である。

サラブレッド種のような競走馬は、血統登録時に必ず親子判定が実施される。ISBCの勧告により、この判定にあたっては国際標準マイクロサテライトマーカーを含めたSTR分析が実施されなければならない。したがって、レースに出走するすべての競走馬は、STRによるDNAプロファイリングが実施されていることになる。そのため、禁止薬物陽性の尿検体の個体識別にSTR分析を利用できるならば、迅速かつ容易に検体と個体を照合することが可能となる。このことは、STR分析を用いた場合の利点かもしれない。一方、今回のSNP分析は親子判定に適用されていないため、血統登録時などに予めDNAプロファイリングを実施することは不可能である。したがって、尿検体の個体識別を実施する場合は、該

当する個体から血液あるいは毛根などを再度採取して分析しなければならない。SNP分析を実施する際は、この再採材の過程において取り間違いや汚染が起らないよう細心の注意を払うことが必要である。

本研究により、競走馬の尿検体のDNAプロファイリングに適したSNP分析法を開発することができた。この分析法により、既報のSTR分析法に比べてより少量の尿から十分なDNAプロファイリングデータを得ることが可能となり、さらに分析成功率も改善された。また、尿検体の冷蔵および冷凍保存ならびに凍結融解を適切に施すことにより、DNAプロファイリングを良好に実施できることが示された。26プレックスSNP分析法は、競走馬の薬物検査後における禁止薬物陽性の尿検体の個体識別に利用することが可能である。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、ご理解とご協力を頂きました日本中央競馬会関係者の皆様に感謝申し上げます。

参考文献

1. Bowling AT, Eggleston-Stott ML, Byrns G, Clark RS, Dileanis S, Wictum E. Validation of microsatellite markers for routine horse parentage testing. *Anim Genet* 1997; 28 (4): 247-52.
2. Kakoi H, Nagata S, Kurosawa M. DNA typing with 17 microsatellites for parentage verification of racehorses in Japan. *Anim Sci J* 2001; 72 (6): 453-60.
3. Lee SY, Cho GJ. Parentage testing of Thoroughbred horse in Korea using microsatellite DNA typing. *J Vet Sci* 2006; 7 (1): 63-7.
4. Tozaki T, Kakoi H, Mashima S, Hirota K, Hasegawa T, Ishida N, et al. Population study and validation of paternity testing for Thoroughbred horses by 15 microsatellite loci. *J Vet Med Sci* 2001; 63 (11): 1191-7.
5. Marklund S, Sandberg K, Andersson L. Forensic tracing of horse identities using urine samples and DNA markers. *Anim Biotechnol* 1996; 7 (2):145-53.
6. Tobe SS, Reid SJ, Linacre AMT. Successful DNA typing of a drug positive urine sample from a race horse. *Forensic Sci Int* 2007; 173 (1): 85-6.
7. Chen JW, Uboh CE, Soma LR, Li X, Guan F, You Y. Microsatellite loci in urine supernatant and stored samples from racehorses. *Am J Vet Res* 2009; 70 (5): 648-57.
8. De Iuliis P, Grasso C, Bonuglia M, Bocci C, Dobosz M. Forensic evaluation of DNA typing in equine urine samples: applications in controversial confirmation analysis cases. In: Houghton E, Keskin FI, Wade JF, Yazicioğlu N, editors. *Proceedings of the 17th International Conference of Racing Analysts and Veterinarians*; 2008 Oct 11-17; Antalya, Turkey. Newmarket, Suffolk, UK: R & W Communications, 2009; 341-4.
9. Diaz S, Kienast ME, Villegas-Castagnasso EE, Pena NL, Manganare MM, Posik D, et al. Substitution of human for horse urine disproves an accusation of doping. *J Forensic Sci* 2008; 53 (5): 1145-8.
10. Chen JW, Uboh CE, Soma LR, Li X, Guan F, You Y, et al. Identification of racehorse and sample contamination by novel 24-plex STR system. *Forensic Sci Int: Genet* 2010; 4 (3): 158-67.
11. Wade CM, Giulotto E, Sigurdsson S, Zoli M, Gnerre S, Inslan F, et al. Genome sequence, comparative analysis, and population genetics of the domestic horse. *Science* 2009; 326 (5954): 865-7.
12. Lee HY, Park MJ, Yoo JE, Chung U, Han GR, Shin KJ. Selection of twenty-four highly informative SNP markers for human identification and paternity analysis in Koreans. *Forensic Sci Int* 2005; 148(2-3): 107-12.
13. Rohrer GA, Freking BA, Nonneman D. Single nucleotide polymorphisms for pig identification

- and parentage exclusion. *Anim Genet* 2007; 38 (3): 253-8.
14. Hirota K, Kakoi H, Gawahara H, Hasegawa T, Tozaki T. Construction and validation of parentage testing for Thoroughbred horses by 53 single nucleotide polymorphisms. *J Vet Med Sci* 2010; 72 (6): 719-26.
 15. Karniol B, Shirak A, Baruch E, Singrün C, Tal A, Cahana A, et al. Development of a 25-plex SNP assay for traceability in cattle. *Anim Genet* 2009; 40 (3): 353-6.
 16. Sanchez JJ, Børsting C, Hallenberg C, Buchard A, Hernandez A, Morling N. Multiplex PCR and minisequencing of SNPs- a model with 35 Y chromosome SNPs. *Forensic Sci Int* 2003; 137 (1): 74-84.
 17. Kim S, Misra A. SNP genotyping: technologies and biomedical applications. *Annu Rev Biomed Eng* 2007; 9: 289-320.
 18. Perkel J. SNP genotyping: six technologies that keyed a revolution. *Nature methods* 2008; 5 (5): 447-53.
 19. Campana MG, Whitten CM, Edwards CJ, Stock F, Murphy AM, Binns MM, et al. Accurate determination of phenotypic information from historic thoroughbred horses by single base extension. *PLoS One* 2010; 5 (12): e15172.
 20. Kakoi H, Tozaki T, Nagata H, Gawahara H, Kijima-Suda I. Development of a method for simultaneously genotyping multiple horse coat color loci and genetic investigation of basic colour variation in Thoroughbred and Misaki horses in Japan. *J Anim Breed Genet* 2009; 126 (6): 425-31.
 21. Brinkmann B, Rand S, Bajanowski T. Forensic identification of urine samples. *Int J Leg Med* 1992; 105 (1): 59-61.
 22. Nakazono T, Kashimura S, Hayashida Y, Hara K, Miyoshi A. Successful DNA typing of urine stains using a DNA purification kit following dialfiltration. *J Forensic Sci* 2005; 50 (4): 860-4.
 23. Yasuda T, Iida R, Takeshita H, Ueki M, Nakajima T, Kaneko Y, et al. A simple method of DNA extraction and STR typing from urine samples using a commercially available DNA/RNA extraction kit. *J Forensic Sci* 2003; 48 (1): 108-10.
 24. Kakoi H, Hirota K, Gawahara H, Kurosawa M, Kuwajima M. Genetic diagnosis of sex chromosome aberrations in horses based on parentage test by microsatellite DNA and analysis of X- and Y-linked markers. *Equine vet J* 2005; 37 (2): 143-7.
 25. Jamieson A, Taylor St. CS. Comparisons of three probability formulae for parentage exclusion. *Anim Genet* 1997; 28 (6): 397-400.
 26. Waits LP, Luikart G, Taberlet P. Estimating the probability of identity among genotypes in natural populations: cautions and guidelines. *Mol Ecol* 2001; 10 (1): 249-56.
 27. McLaren R. PowerPlex® 16 versus Identifiler® systems sensitivity and effects of inhibitors. Promega Corporation Web site. <http://www.promega.com/resources/articles/pubhub/applications-notes/powerplex-16-versus-identifiler-systems-sensitivity-and-effects-of-inhibitors/> Updated 2007. Accessed August 05, 2011.

研究レポート

外科的切除とマゴットセラピーにより治癒した
スピロヘータ感染性蹄癬の1症例桑野睦敏¹⁾・丹羽秀和²⁾・樋口 徹³⁾・三井秀也^{4,5)}・Robert A. Agne⁶⁾

要約

本研究論文は、Journal of Equine Science, 2012, 23(3), pp.41-46に掲載された内容を馬の科学用に再校正したものである。すでにアメリカでは蹄病治療の一般的な対処法として定着したマゴットセラピーをトレポネーマ感染性蹄癬に応用した治験例の報告である。またマゴット効果のみならず、蹄癬がトレポネーマ感染により発生あるいは演出される証拠としても重要な報告である。

はじめに

蹄癬は、特徴的な肉眼的形態と独特の異臭をもってそれと診断される疾患名で、蹄叉腐爛や蹄葉炎とは区別される。四肢蹄すべてに発症するが、後肢蹄に多い。本症は、潰瘍と肉芽増生を伴う非定型的な蹄皮炎から始まり、徐々に周囲の蹄皮に病巣が拡大していくと、蹄表皮の増生性変化が加わって典型病変となる[1, 13, 14]。ところが、肉眼的にも組織学的にも、初期段階の非定型的病変を本疾患と確定診断することは難しく、慢性病変となってからそれと診断される傾向にある。慢性病変は、一般的には乳頭状からカリフラワー状あるいは歪なブロック状の軟角質の増生を特徴とするが、浸出性の強い病変では角質の形態が崩れ、色素沈着のない乳白色コテージチーズ様の軟角質となり、多様な形態をとる。なお、蹄癬を放置すれば極めて難治性となる[12]。昭和初期、ドイツ語装蹄教本の邦訳教本[22]において、Hufkrebs (Huf; 蹄-Krebs; 腫物)を“蹄癬”と直訳したのが日本語命名の最初であるようだ。だが、

当時から真の癌腫ではないと推察されていた。現在では、仮説的に複数の発症要因が考えられており、なかでも不衛生あるいは湿潤した飼育環境が発症背景に潜伏することが知られている[10-14]。一方で、よく手入れされている飼育環境の良好な競走馬にもまれに起こる[13]。直接的原因としては、アレルギー、細菌感染、ウイルス感染とくに牛乳頭腫ウイルスの感染が疑われているが[5, 12]、特定されていない[13]。さて、蹄癬の臨床経過および病理所見は、牛蹄の趾間によく発生するTreponema属細菌の感染[3, 6, 15]を起源とした牛の趾皮膚炎(DD; digital dermatitis)と酷似している。牛DDは、Treponema属細菌を含む汚染された牛床あるいは発病部位に接触することによって他趾・他牛に伝播していくと考えられている[19]。近年、Treponema属細菌の特異的16SリボゾームRNA遺伝子(16S rDNAs)をターゲットとした逆転写ポリメラーゼ連鎖反応解析(PCR検査)により、馬の蹄癬からも複数の非培養性Treponema属細菌の存在が証明された[8]。その中

1) Kuwano Atsutoshi : 競走馬総合研究所

2) Niwa Hidekazu : 競走馬総合研究所 栃木支所

3) Higuchi Toru : NOSAI日高 三石家畜診療センター

4) Mitsui Hideya : 岡山大学大学院心臓血管外科

5) Mitsui Hideya : ツカザキ病院

6) Robert A. Agne : Rood and Riddle Equine Hospital

に牛DDで証明されるものと同じ種類のTreponema属細菌がいたことから、本細菌による馬の蹄癩発生や土壤汚染を介した伝搬の可能性が疑われている。一方で、Treponema属細菌は蹄癩の直接的原因ではなく、日和見感染との議論も残っている[12, 13]。

さて、本症に対する治療は、中程度までの蹄癩なら薬剤塗布が[10]、重症例ならメスや蹄刀あるいは全身麻酔下でのデブリートメントが一般的である[4, 12]。デブリートメントでは、増生した角化域のみならずその産生母体である真皮炎領域まで深く実施し、正常な真皮を露出させる。既報[21]では、比較的早期に完全な病巣部の切除を行うなら予後は良いとされている。しかしながら、進行した症例で完全病巣切除を実施しても、容易に再発してしまう症例は多い[1]。アメリカで盛んに用いられている比較的新しい蹄癩の治療法として、医療用無菌ウジ虫(マゴット)によるバイオ・デブリートメント、すなわちマゴット・セラピー(MDT; Maggot debridement therapy)がある[9, 17, 18]。MDTでは、健康な表皮の発育に必要な良好な肉芽組織の形成が期待できるばかりか[7]、そこに感染している細菌をも死滅させることが知られている[9]。ただし、Proteus属細菌感染性の症例には効果がないと言われ、マゴットが対処できる細菌種の範囲については知見が乏しい。また、マゴットは呼吸する昆虫であるため、漿液浸出性の強い病巣下ではマゴットが水没して死んでしまうデメリットがある[7]。

今回、我々は、飼育環境の比較的良好な競走馬に発症した浸出性の強い稀な蹄癩を経験し、病変を検索したところ重度のトレポネーマ属細菌の感染を証明できた。また、本疾患に対して、a)一般療法(ステージ1)、b)MDT単独による対応(ステージ2)、c)麻酔下における完全デブリートメント(ステージ3)、d)完全デブリートメント後の再発病変に対するMDT対応(ステージ4)の4つの対処法で治療成績の違いを経験した。マゴットがトレポネーマ属細菌を死滅させる直接的証拠はなく、トレポネーマ属細菌感染性蹄癩に対応できるか否かについての知見は見当たらないことからここに報告する。

材料と方法

臨床経過

ステージ1；症例は、サラブレッド種、雄、3歳の競走馬だった。臨床経過の概要は、最初、競馬場にて疼痛と関連するイチゴ大の肉芽形成を蹄叉側面に認め、外科処置と抗生剤の全身投与で対応した。数ヵ月後に北海道に放牧時、蹄叉のほぼ全域および一部の蹄底に疼痛、漿液漏出、蹄下面の真皮域の腫脹、真皮を覆うカスタードクリーム状からゼリー状の軟性な異常角質の増生、局所的な角質の脱落(潰瘍)が確認された(図1)。北海道で診察を受け



図1. 不整形に増生した異常角質が蹄叉および一部の蹄底を覆う。蹄叉の膨大は真皮の腫脹による。

始めてから1ヵ月後の血液検査の結果、高いフィブリノーゲン値(199 mg/dl)および血清アミロイド；SAA値(1.4u)から真皮炎の継続が診断された。除去可能な異常角質は蹄刀で削切し、一般療法として日常的な外科処置、間欠的なテレピン油とヨウ素による化学療法、次いで病変の退縮を期待した収斂剤Astringent(ミヨウバン)塗布を次々に行ったがほとんど効果はなかった。

ステージ2；そこで、北海道における初診から2ヵ月後、医療用のマゴット(1～2齢幼虫；ジャパン・マゴット・カンパニー)を用いたMDTを開始した。部分的な角質搔爬と生理食塩水による洗浄の後(図2a)、マゴット(図2b)を湿潤したガーゼごと病変部に添加し、蹄下面をホスピタルプレートで覆い(図2c)、さらに接着型弾性包帯で蹄全体を包んだ(図2d)。マゴットの添加量は、人医療で用いられている創1cmあたり7～8匹を基準に算出し[7]、1回あたり600匹とした。ガーゼ交換は毎日、マゴット交換は週2回行い、交換時には成長したマゴットおよび死んだマゴットを全て取り除いた(図2e)。また、マゴット添加中は、外用薬および抗生剤投与は行わ

なかった。

ステージ3；しかしながら、異常角質増生の勢いおよび漿液浸出の強さからか、MDT期間中、異常角質の減少は一進一退を繰り返し、ゆっくりと病変は蹄叉全域および蹄底の広い範囲にまで拡大した。この時点での異常角質は、独特の異臭を放ち、乳頭状からコテージチーズ様の漿液を多く含んだ



図2. 初回マゴット適用時の蹄；a) 部分的な角質搔爬と生理食塩水による洗浄、b) ジャパン・マゴットカンパニー生産の無菌マゴット、c) 蹄下面を覆うホスピタルプレート、d) 接着型弾性包帯で蹄全体を包む、e) 交換時；マゴットは3日で長径7mmを越える。



図3. 全身麻酔下での完全除去時の蹄下面；a) 術前の蹄下面では、蹄下面全体に著しい真皮の腫大および発赤を伴う異常角質の増生が認められた、b) 術時の保定では駆血帯はとくに必要としなかった、c) 蹄下面では部分的に蹄皮胚芽層を残し、多くの部で腫脹した真皮もろとも異常角質を全切除した、d) 術後；出血が止まった蹄下面。

白色軟性角質として認められた(図3a)。経過は不良であったことから、MDTを一旦あきらめ、全身麻酔下にて前病変の完全デブリートメントを実施した(北海道における初診から約4ヵ月後に相当)。手技は、トリプル・ドリップによる全身静脈麻酔[2]および掌側指神経の局所麻酔[16]の下、既報[21]に従い、可能なかぎり表皮基底細胞層を残すように、真皮炎の強い領域では真皮も含めて異常な表皮組織を外科的に切除した。この際、手術で蹄壁中層が大きく削切されることを防止する目的で除鉄なしに手術を行った(図3b, c)。術後の起立時には術野からの出血が多かったが、蹄下面に滅菌ガーゼを詰めて接着型弾性包帯で被覆するだけで経過観察することとした。出血は徐々に緩やかとなり術後3時間で止まった(図3d)。その後、術野の一般的な外傷処置および全身抗生剤投与(セファロチン)で治療を継続した。

ステージ4；術後3週間で再生した蹄表皮は、初期病変と同様の異臭を放つ黄白色カスタードクリーム状の軟性角質であり、再発病変と診断された(図4a)。その異常角質はMDTを最初に実施したステージ2よりも量的に少なかったことから、マゴットが処理できる程度の病変と判断してMDTを再度試みた。この際、マゴットへの空気供給および浸出漿液の貯留を防止する目的で、穴を多目に開けたホスピタルプレートで蹄下面を保護した(図4b)。1ヵ月間、MDTを再継続した結果、異常角質の全てを除去することに成功した(図4c)。マゴットの処理した病変部では、一部の表面が黒色、内部は通常の色から黄土色の硬度を有する角質が形成されていた(図4d)。蹄底および蹄叉の境界は不明であったが、後々削蹄によって整形できると判断し、この時点でMDTを終了とした。その後の蹄下面の角質形成は順調であり、北海道での初診から約8ヵ月後には、正常と変わらない蹄叉と蹄底に整形することができたことから、完治と判断した。この後、馬は4回出走できた。

病理検索

ステージ2の部分搔爬された異常角質、ステージ3の手術時に摘出した病変、および術後再発時の生検材料、ステージ4で削蹄時に得られた角質材料のMDT終了後に、小指頭大から親指大の角質

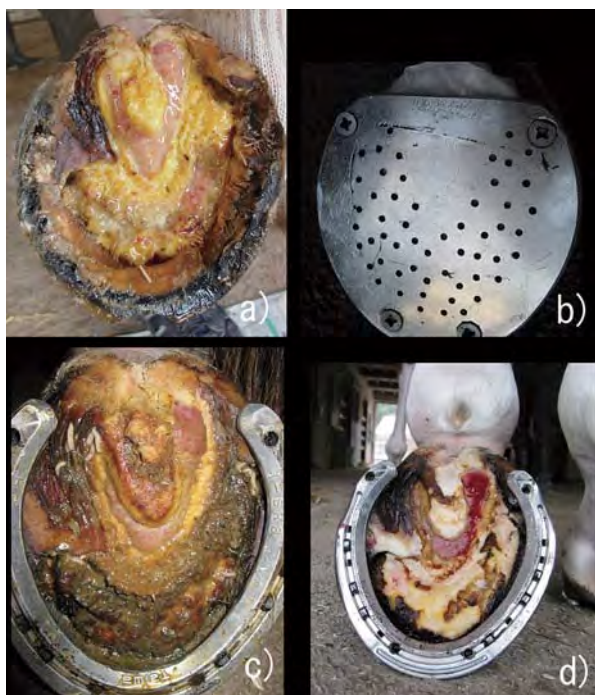


図4. 術後の再発病変；a)異常角質はMDTを最初に実施した時よりも量的に少なかった、b)多孔性のホスピタルプレート、c)マゴットにより異常角質の全てが貪食され、徐々に硬い角質が形成され始めている、d) マゴットの処理した病変部では、一部の表面が黒色、内部は通常の黄色から黄土色の硬度を有する角質が形成されていた。

組織を含む削切片を病変あるいは治癒域から採取し、10%中性緩衝ホルマリンで固定後、病理組織学的に検索した。検索は、ヘマトキシリン・エオジン(HE)染色、フッカーコンのグラム染色、PAS染色およびワルチン・スターリー染色といった光学的組織検索の他、抗*Treponema pallidum*・ウサギ抗体(Dako)を用いた免疫組織化学的解析、透過型電子顕微鏡(Hitachi H-7100, Tokyo, Japan)を用いた電子顕微鏡学的解析およびPCRを用いた分子病原微生物学的解析を実施した。分子病原微生物学的解析は、DNA Isolator PS-Rapid Reagent*を用いてパラフィン切片から細菌DNAを抽出し、16SリボゾームRNA遺伝子を標的としたPCRにより特異的バンドの検出を試みた。すなわち、Rijpkemaら[15]の方法に準じて、*Treponema*属特異的プライマーセットとしてSPF5 (Forward primer; 5'-AATACCGAATACACTCAGTGCTT)およびSPR4 (Reverse primer; 5'-CCATTGCGGAATATTCTTAG)を用い、タッチダウンPCRを実施した。陽性対照は

牛DDから抽出した*Treponema*属菌由来DNAを用いた。

結果

ステージ2および3の病変部の病理組織所見はほぼ同様であった。すなわち、ヘマトキシリン・エオジン(HE)染色では、表皮細胞は遺残核をもった多角形から不整形の不全角化細胞により構成され、また、それらの一部は水腫性に膨化し、まれに空胞化していた。これら変性した角質の一部では、細胞間あるいは細胞内に少数から多数の好中球を主体とした単核細胞の浸潤が認められた(図5)。表皮基底細胞の一部では核の分裂像が散見された。一方、真皮乳頭は伸長性で、結合組織における局所的な出血に加えて、形質細胞、リンパ球を主体とした単核細胞の中程度の浸潤が認められ、慢性炎症の像を呈していた。フッカーコンのグラム染色では、変性角質の一部にグラム陽性球菌の集簇が、ワルチン・スターリー染色では増生した蹄表皮内に黒色に染まるスピロヘータ様細菌が多数観察された(図6)。ステージ

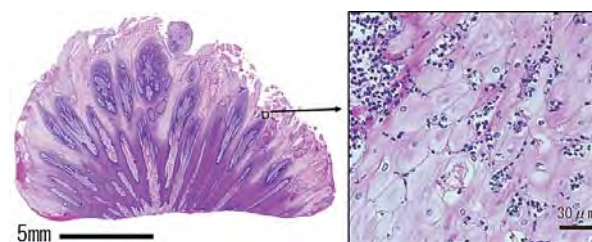


図5. 表皮細胞は遺残核をもった多角形から不整形の不全角化細胞により構成され、変性した角質の一部では、細胞間あるいは細胞内に少数から多数の好中球を主体とした単核細胞の浸潤が認められた。HE染色

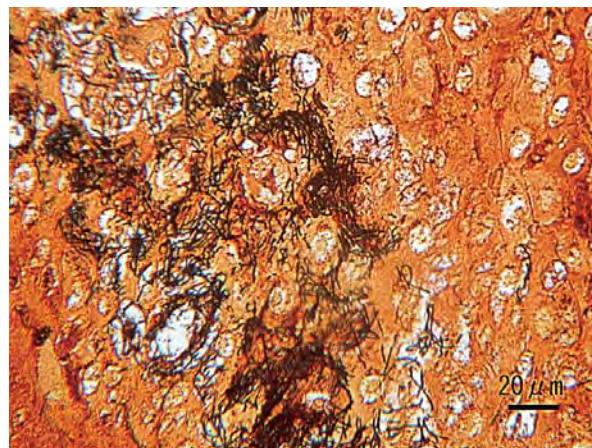


図6. 増生した蹄表皮内に黒色に染まるスピロヘータ様細菌。ワルチン・スターリー染色

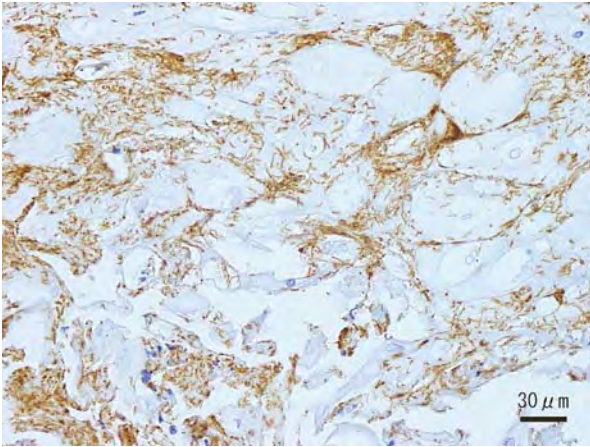


図7. 抗*Treponema pallidum*・ウサギ抗体(Dako)陽性のスピロヘータ様細菌

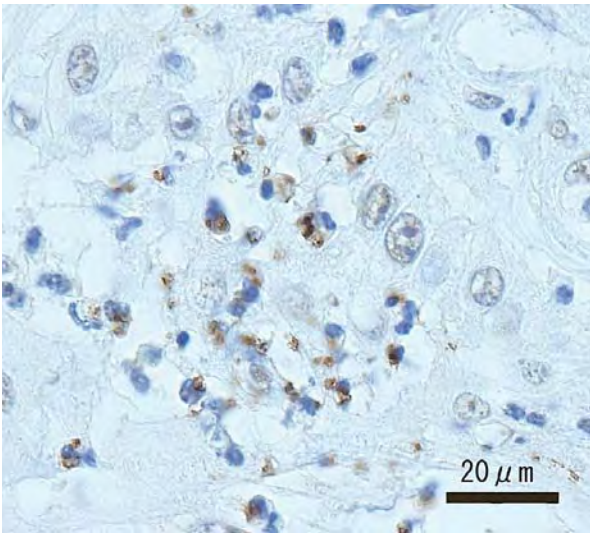


図8. 表皮内浸潤した好中球に顆粒状の抗*Treponema pallidum*・ウサギ抗体(Dako)陽性所見が認められた。

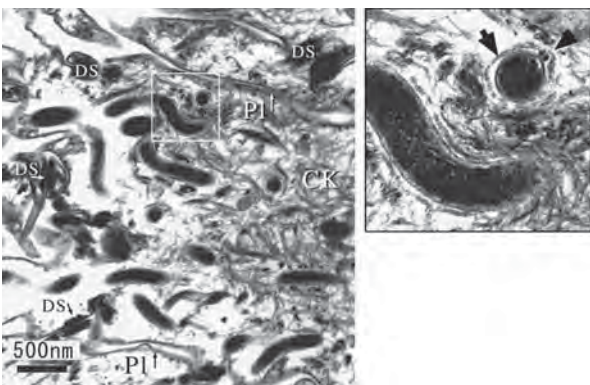


図9. 透過型電子顕微鏡所見；太さ100から200μmの高電子密度の螺旋状細菌の断面では、細胞壁の周囲に外皮(太い矢印)、細胞壁と外皮の間に2本から8本の軸糸(太い矢頭)が観察される。DS；デスモゾーム、CK；サイトケラチン、PI；細胞膜

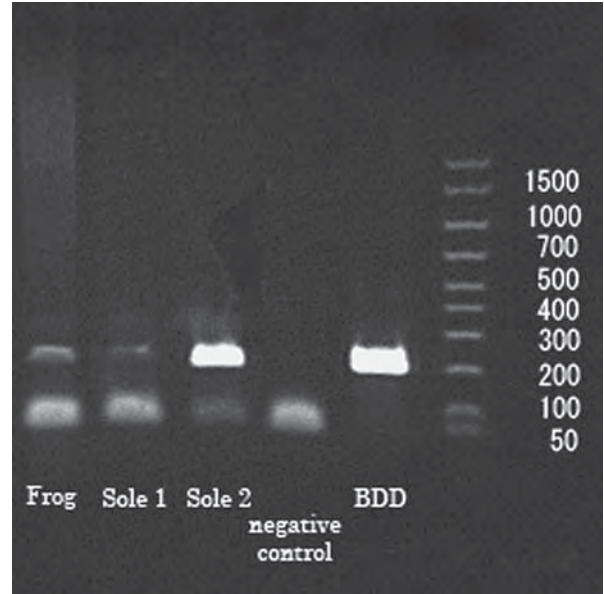


図10. 分子病原微生物学的解析(PCR)結果；パラフィン切片から抽出したcDNAから陽性対照と同じ分子サイズ(薬200kd)の特異的PCR産物が増幅された。Frog；蹄叉、Sole；蹄底、BDD；牛の趾皮膚炎から得られたトレポネーマ遺伝子、negative controlは正常蹄

3の手術時および術後再発病変からの削切片において、抗*Treponema pallidum*・ウサギ抗体(Dako)陽性の糸状細菌が変性角質内に多数観察された(図7)。陽性域および陽性細菌の形態は、ワルチンスターリー染色で観察されたスピロヘータ様細菌が存在していた領域およびその細菌形態とほぼ一致していた。また、表皮内に浸潤していた好中球細胞質にも、顆粒状の同抗体陽性所見が認められた(図8)。透過型電子顕微鏡所見では、病変部の角化細胞内あるいは細胞間に、高電子密度の太さ100から200μmの螺旋状細菌が多数認められた。螺旋菌の断面では、細胞壁の周囲に外皮が存在し、細胞壁と外皮の間に2本から8本の軸糸が存在した(図9)。分子病原微生物学的解析では、抽出したDNAから陽性対照と同じ分子サイズの特異的PCR産物が増幅された(図10)。これに対し、ステージ4のMDT終了時に治癒域から得た削切片では、遺残核のないエオジン好性から染色抵抗性を示す明るい正常な角化細胞が光学的に観察され、*Treponema*属を証明できるいかなる所見も検出されなかった。

考察

病理組織学的、免疫組織化学的、電子顕微鏡学のおよび病原微生物学的な各検索結果から、本症例の蹄癌病変の広くに、かつ長期的にTreponema属細菌の感染が証明された。その他、病理組織学的にグラム陽性球菌が認められたが、病変角質の広い範囲に観察されたTreponema属細菌とは異なっており、その存在域は一部の異常角質に限局していた。今回は牛乳頭腫ウイルスの検出を実施していないため、直接原因としてウイルスを完全に否定できないものの、常態としてTreponema属細菌感染が病変全体に優性に認められたことから、蹄癌の病態形成にTreponema属細菌が深く関わっていたと推察された。また、表皮内に浸潤していた好中球にもTreponema属細菌の抗体反応が認められた。よって、Treponema属細菌感染に対する表皮炎が起こっていたと診断された。Treponema属細菌では、外毒素や内毒素のみならずその細胞壁に含まれるペプチドグリカンにも免疫担当細胞を刺激する炎症誘導効果がある[20]。表皮内に感染した本菌がこれらの物質を介して真皮に炎症を誘導する機序が予想される。牛では土壌—腸内環境間においてTreponema属細菌の汚染サイクルが成立しており、これを經由して趾間から蹄球にかけて牛DDが発生する機序が提案され[6, 15, 19]、同様の機序で牛群伝搬性も説明ができる[19]。一方、馬の蹄癌の伝搬性は報告されていない。実際、症例馬では、他肢の蹄には同様の病変は発生しなかった上に、隔離環境で繋養されていなかったにもかかわらず他馬への感染もなかった。その理由として、1)管理上、馬蹄の清潔がよく保たれていることが原因細菌の伝搬を阻止していること、2) Treponema属細菌感染は二次感染として関与しているだけで一時的要因は他にある、例えば外傷、蹄叉腐爛あるいは蹄葉炎といった何らかの一次傷害が前駆的に必要であり、正常な蹄には伝搬しないことなどが考えられた。これについては、さらなる研究と調査が必要である。

今回、蹄皮増生が著しかった病期前半では、部分的搔爬(ステージ1)、一般的な外科治療(ステージ1)、抗生剤の適用(ステージ1)、装蹄療法(ステージ1)および単独MDT(ステージ2)は全く効果を発揮しなかった。症例ではTreponema属細菌の感

染域の広さ、細菌の薬剤感受性、薬剤が浸透しにくい角質組織内に感染が成立、蹄皮増生の勢いが強かったことなどの多種の要因が複雑に絡んだ結果と目された。また、外科的切除単独では再発を認めた。再発の原因は蹄負面の亀裂や蹄釘の挿入部に細菌が残存していたためか、細菌対策を施さないまま対応している間に本菌が厩舎や馬房を汚染していた可能性、あるいは牛と同様に消化管内に寄生した細菌が糞便を介して二次的に再感染した可能性が考えられたが、今回の検索では証明できなかった。今回、治癒に至った最終的理由は、外科的切除後の再発病変がMDTで対応できるほど量的に少なかったこと、そして、マゴットがTreponema属細菌を死滅させることができたためと考える。異常な蹄皮の増生が広範囲かつ盛んな難治性蹄癌では、外科的切除とMDT両者の併用が効果的であることが示された。

Reference

1. Baxter, G.M., Stashak, T.S., Belknap J.K. and Parks, A. 2002. Canker. pp. 519-521. In: *Adams and Stashak's lameness in horses*, 6th ed. (Baxter, G.M. ed.) Wiley-Blackwell Publishing (A John Wiley & Sons Inc.), West Sussex, UK.
2. Benson, G.J. and Thurmon, J.C. 1990. Intravenous anesthesia. *Vet. Clin. North Am. Equine Pract.* 6: 513-528.
3. Blowey, R.W., Done, S.H. and Cooley, W. 1994. Observations on the pathogenesis of digital dermatitis in cattle. *Vet. Rec.* 135:115-117.
4. Booth, L. and White, D. 2007. Pathologic conditions of the external hoof capsule. pp. 224-252. In: *Equine Podiatry*. (Floyd, A.E. and Mansmann, R.A. eds.) Saunders Elsevier, MO.
5. Brandt S., Schoster A., Tober R., Kainzbauer C., Burgstaller J.P., Haralambus R., Steinborn R., Hinterhofer C. and Stanek C. 2011. Consistent detection of bovine papillomavirus in lesions, intact skin and peripheral blood mononuclear cells of horses affected by hoof canker. *Equine Vet. J.* 43:202-209.
6. Collighan, R.J. and Woodward, M.J. 1997. Spirochaetes and other bacterium species

- associated with bovine digital dermatitis. *F.E.M.S. Microbiol. Lett.* 156: 37-41.
7. Fleischmann, W., Grassberger, M. and Sherman, R. 2006. Maggot Therapy. In: *A handbook of maggot-assisted wound healing* (Translation of the English edition). Thieme New York, NY.
 8. Moe, K.K., Yano, T., Kuwano, A., Sasaki, S. and Misawa, N. 2010. Detection of Treponemes in canker lesions of horses by 16S rRNA clonal sequencing analysis. *J. Vet. Med. Sci.* 72: 235-239.
 9. Morrison, S.E. 2005. How to use sterile maggot debridement therapy for foot infections of the horse. *A.A.E.P. Proceeding.* 51: 461-464.
 10. Moyer, W.A. 1999. Canker. pp. 1544-1546. In: *Equine Medicine and Surgery*, 5th ed. (Colahan, P.T., Mayhew, I.G., Merritt, A.M. and Moore, J.N. eds.) Mosby, St. louis.
 11. Nagamine, C.M., Castro, F., Buchanan, B., Schumacher, J. and Craig, L.E. 2005. Proliferative pododermatitis (canker) with intralesional spirochetes in three horses. *J. Vet. Diagn. Invest.* 17: 269-271.
 12. O'Grady S.E. and Madison J.B. 2004. How to treat equine canker. *A.A.E.P. Proceeding.* 50: 202-205.
 13. Oosterlinck, M., Deneut, K., Dumoulin, M., Gasthuys, F. and Pille, F. 2011. Retrospective study on 30 horses with chronic proliferative pododermatitis (canker). *Equine Vet. Educ.* 23: 466-471.
 14. Reeves, M.J., Yovich, J.V. and Turner, A.S. 1989. Miscellaneous conditions of the equine foot. *Vet. Clin. North Am. Equine Pract.* 5: 221-242.
 15. Rijpkema, S.G., David, G.P., Hughes, S.L. and Woodward, M.J. 1997. Partial identification of spirochaetes from two dairy cows with digital dermatitis by polymerase chain reaction analysis of the 16S ribosomal RNA gene. *Vet. Rec.* 140: 257-259.
 16. Schumacher, J., Schumacher, J., Schramme, M.C., DeGraves, F. and Smith, R.K.W. 2007. Diagnostic analgesia of the equine foot. pp. 128-140. In: *Equine Podiatry*. (Floyd, A.E. and Mansmann, R.A. eds.) Saunders Elsevier, MO.
 17. Sherman, R.A. and Wyle, F.A. 1996. Low-cost, low-maintenance rearing of maggots in hospitals, clinics, and schools. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 54: 38-41.
 18. Sherman, R.A., Morrison, S.E. and Ng, D. 2007. Maggot debridement therapy for serious horse wounds - A survey of practitioners. *Vet. Rec.* 174: 86-91.
 19. Shibahara, T., Ohya, T., Ishii, R., Ogihara, Y., Maeda, T., Ishikawa, Y. and Kadota, K. 2002. Concurrent spirochaetal infections of the feet and colon of cattle in Japan. *Aust. Vet. J.* 80: 497-502.
 20. Tanabe, S.I., Bodet, C. and Grenier, D. 2008. *Treponema denticola* peptidoglycan induces the production of inflammatory mediators and matrix metalloproteinase 9 in macrophage-like cells. *J. Periodontal Res.* 44: 503-510.
 21. Wilson, D.G. 1994. Topical metronidazole in the treatment of equine canker. *A.A.E.P. Proceeding.* 40: 49.
 22. グーテンエッケル氏著 蹄病学(競走馬総合研究所製本) 発行年不明(昭和40年翻訳)

研究レポート

ウマにおける角膜上皮幹細胞の培養に関する基礎的研究

守山秀和^{1,2)}・笠嶋快周¹⁾・桑野睦敏¹⁾・和田信也¹⁾

緒言

集団で走行する競走用馬では角膜疾患が多発する。日本の競走用馬の報告では、1997年から2008年の12年間で角膜疾患発症頭数は延べ3,000頭以上にものぼる[1]。そのほとんどは、レース中に跳ね上げられた馬場素材による外傷性の角膜潰瘍であり、治癒や競走復帰までに長期間を要するケースもある[1]。また、失明に至らなくとも角膜に残存する瘢痕や混濁により機能的視機能が制限され、競技生活を終えるケースもある。

ウマにおけるこれら難治性角膜疾患の治療法としては、これまでに羊膜移植術[2]や全層角膜移植術[3, 4]の応用例が数報、近年になってようやく米国でパーツ別層状角膜移植術[5]が報告されているが、いずれも他家移植が主であり、拒絶反応の出現[4, 6, 7]や移植片の安定供給が困難であることが問題になっている。

一方、ヒトでは近年、Stevens-Johnson症候群などの難治性角膜疾患に培養角膜上皮移植術[8]が応用されるようになってきた。この方法では、患者の角膜輪部に残存する僅かな角膜上皮組織[8-13]あるいは口腔粘膜上皮組織[14, 15]から幹細胞を含む自家移植片を作製することが可能であるため、他家移植における問題点も克服できると期待されている[9, 16-18]。一方、ウマではウマ角膜上皮幹細胞の局在や培養角膜上皮移植術に関する報告は見当たらない。しかし、ウマの角膜疾患の組織修復過程がヒトと類似していることから、ヒトと同様に角膜輪部に角膜上皮幹細胞とそれが必要とする細胞環境すなわちニッチ(Niche)が存在し、角膜の修復と恒常性

の維持に関与していると考えられる。

本研究では、ウマにおいてもヒト同様に角膜上皮幹細胞が角膜輪部の上皮基底層に存在するものと仮説を立て、形態学的にウマ角膜上皮幹細胞の局在を明らかにすることを試みた。またこの仮説に基づき、ウマ角膜輪部上皮細胞Equine Limbal Epithelial Cells (ELECs)からの角膜上皮幹細胞の分離を試みた。

材料および方法

a. 角膜上皮幹細胞の局在の確認

本試験では、食肉衛生検査所において屠殺されたサラブレッド種成馬のウマ眼球を用いた。採取時に、眼疾患がないことを確認し、3-9時方向に縦断後、メタカルン固定液(メタノール：クロロホルム：酢酸=6：3：1)中に一晩浸漬して固定した。固定した眼球はパラフィンブロックに包埋後、縦断面を厚さ4μmに薄切し、p63 [11, 19-21] (mouse monoclonal antibodies anti-human p63 protein clone 4A4;DAKO M7247)およびCK14 [11] (mouse monoclonal antibodies anti-human cytokeratin14;Novocastra Laboratories Ltd NCL-LL002)、CK3 [8, 11, 15, 16, 19, 20, 22, 23] (AE5 mouse monoclonal antibodies anti-Keratin K3/K76;PROGEN Biotechnik GmbH 61807)の3種のタンパクに対する抗体を用いて免疫染色を実施した。免疫染色に必要な抗原賦活は、p63については既製品(target retrieval solution pH9;DAKO S1699)を、CK14およびCK3については6M Ureaを調整して、前者は業者プロトコールに従って95℃、20分で、後者は室温45分にて抗原賦活化処理を行っ

¹⁾ Moriyama Hidekazu, Kasashima Yoshinori, Kuwano Atsutoshi, Wada Shinya : 競走馬総合研究所

²⁾ Moriyama Hidekazu : 馬事部生産育成対策室

本論文は、Vet Ophthalmol. 2014 Mar; 17(2) : 106-12. に掲載されたものを翻訳改変した。

た。また、二次抗体はFITC標識抗マウスIgウサギポリクローナル抗体(Polyclonal Rabbit Anti-Mouse Immunoglobulins/FITC;DAKO F0261)を使用し、対比染色としてヨウ化プロピジウムPropidium Iodide(PI)を用いた核染色を行った後に観察した。

b. ウマ角膜上皮細胞の分離と培養

眼疾患以外の理由で病理解剖されたサラブレッド種成馬5頭、食肉衛生検査所で屠殺されたサラブレッド種成馬7頭より角膜上皮組織を採取した。これらについて角膜輪部より上皮組織を採取したELECsで構成される群(L群12頭)および中央部より採取したELECsを含まない群(C群12頭)に分類し、各個体についてそれぞれ50mm²の面積の角膜上皮組織を採取した。これらの組織よりディスプレイII(1,000U/mL;三光純薬 GD81070)および0.25%トリプシン-EDTA溶液(GIBCO 25200-072)を用いて角膜上皮細胞を分離した。分離した角膜上皮細胞は、予めフィーダー細胞を播種しておいた直径35mmの培養皿上に 2×10^4 個/well濃度で播種し、SHEM (supplemented hormone epithelial medium)培地[DMEM (SIGMA,D6429)、Hams F12 (SIGMA,N6658)、FBS、Penicilin Streptomycin (GIBCO,15140-122)、Insulin (Wako,096-3443)、Cholera Toxin (CALBIOCHEM,227041)、Gentamicin (GIBCO,15750-060)、Hydrocortisone (Wako,080-05581)、DMSO (SIGMA,D2650)、EGF (Invitrogen,13247-051)]を用いて共培養した。また、両群から分離した全ての角膜上皮細胞は、供試馬の死亡より6時間以内にフィーダー細胞上への播種を完了させた。培養期間中は3回/週の頻度でSHEM培地を交換し、培養細胞が培養皿上でコンフルエントになるまでの期間について、その増殖速度および形態学的特徴を観察した。

本実験におけるフィーダー細胞は、8 μ g/mLのマイトマイシンで37 $^{\circ}$ C、1時間処理したNational Institutes of Health (NIH) /3T3細胞を 2×10^5 個/well濃度で播種して24時間培養したものをを用いた。

c. 培養ELECsの幹細胞マーカに対する染色性

予めb. 同様にフィーダー細胞を播種しておいた 20×20 mm \times 2wellのチェンバースライド上にb.で分離

したL群のELECsを 1.66×10^4 個/well播種し、SHEM培地を用いて共培養した。培養期間中は3回/週の頻度でSHEM培地を交換し、コンフルエントに至った時点でa. 同様p63、CK14およびCK3に対する免疫染色を実施した。

結果

a. ウマ角膜輪部における角膜上皮幹細胞の局在

抗p63免疫染色では、角膜輪部における角膜上皮基底層のメラノサイトが存在する領域に一致して基底層から頂端面方向に2~3層までの角膜上皮基底細胞の核が陽性に染色された(Fig.1-b)。

抗CK14免疫染色では、角膜輪部における角膜上皮基底層のメラノサイトが存在する領域に一致して基底面から頂端面方向に3~4層までの角膜上皮基底細胞の細胞質が均一に濃染された(Fig.1-c)。

抗CK3免疫染色では、角膜輪部における角膜上皮基底層のメラノサイトが存在する領域に一致して基底面から頂端面方向に4~6層までの角膜上皮基底細胞は不染であったが、基底直上から頂端面にかけての角膜上皮細胞における細胞質は濃染した。また、輪部より中央方向のメラノサイトが存在しない部位における角膜上皮細胞においては、基底面から頂端面まで全層の細胞の細胞質が染色されたが、この染

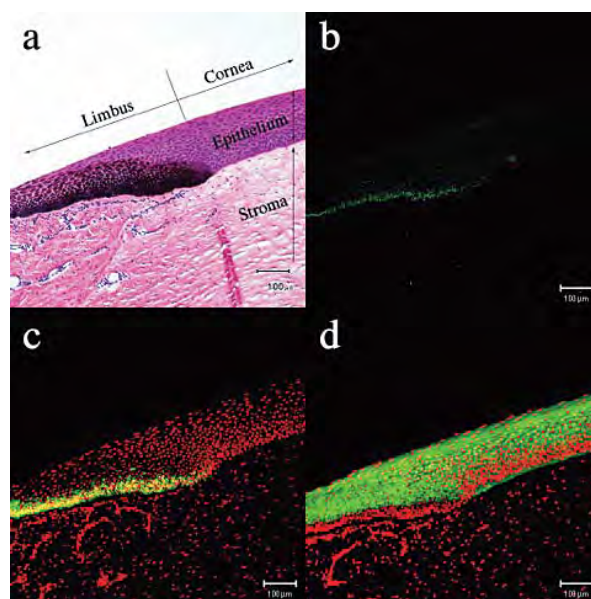


Fig.1 角膜輪部における幹細胞マーカー発現細胞の分布 Hematoxylin & eosin(a), anti-p63(green in b), anti-cytokeratin 14(green in c), anti-cytokeratin 3(green in d)

色性は中間層の細胞で最も強く、頂端面および基底層の細胞で染色性が弱まる傾向がみられた(Fig.1-d)。

b. ウマ角膜上皮細胞の分離と培養

L群、C群の組織片からは、それぞれ 2.01×10^6 (s.d. ± 0.67)、 7.30×10^5 (s.d. ± 0.34) 個の有核細胞が回収できた。

L群は、12例中10例において播種後数日でコロニーを形成し、直径35mmの培養皿上において21.7日 (s.d. ± 4.4) でコンフルエントに達した。しかし、2例についてはコロニーを形成した後に増殖が停止し、コンフルエントには至らなかった。一方C群の細胞は、少数ではあるがL群同様に播種後数日でコロニーを形成したものの、全例においてコンフルエントに達することはなかった(Table.1)。

Table.1 L群およびC群から分離した角膜上皮細胞がコンフルエントまでに要した日数(35mm培養皿、播種濃度 2×10^4)

-: コンフルエントに達しなかった

	L群	C群
No.1	27	-
No.2	16	-
No.3	30	-
No.4	18	-
No.5	22	-
No.6	20	-
No.7	25	-
No.8	16	-
No.9	-	-
No.10	21	-
No.11	-	-
No.12	22	-
Mean \pm s.d.(例/全体)	21.7 \pm 4.4(10/12)	ND (0/12)

また、L群およびC群の角膜上皮細胞のコロニーについて両者の形態学的特徴を比較したところ、L群のコロニーは円形に近い形状を呈して比較的小型で均一な大きさの細胞で構成されていたのに対し、C群のコロニーは歪な形状を呈して大型の細胞で構成されており、構成する細胞はその大きさに均一性を欠くものであった。さらにL群では一般的に上皮細胞の特徴とされる多角形の細胞が互いに密接した敷石状の配列がみられた(Fig.2)。

c. 培養ELECの幹細胞マーカーに対する染色性

培養ELECにおける抗p63染色ではほとんどの細胞の核に染色性が確認されたが、この染色性は大型細胞に比較して小型細胞の核がより強く染色される

傾向がみられた。抗CK14染色においては、概ね全ての細胞の細胞質が均一に濃染された。抗CK3染色については、ごく一部の大型細胞で淡染する傾向がみられたものの、そのほかの大部分については不染であった(Fig.3)。

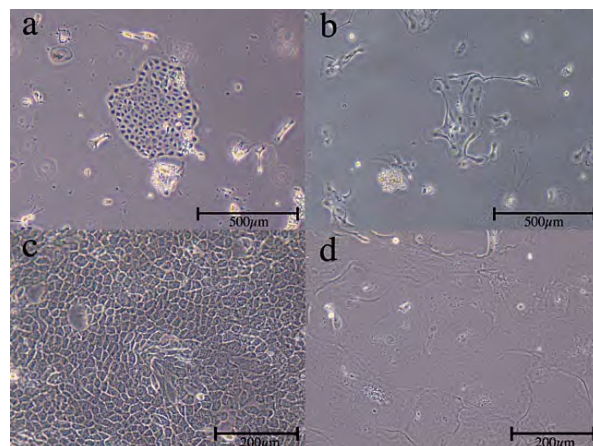


Fig.2 L群とC群から分離、培養した細胞のコロニー形状と構成する細胞の形態 7日目におけるL群のコロニー(a)、9日目におけるC群のコロニー(b)、16日目におけるL群の細胞形態(c)、16日目におけるC群の細胞形態(d)

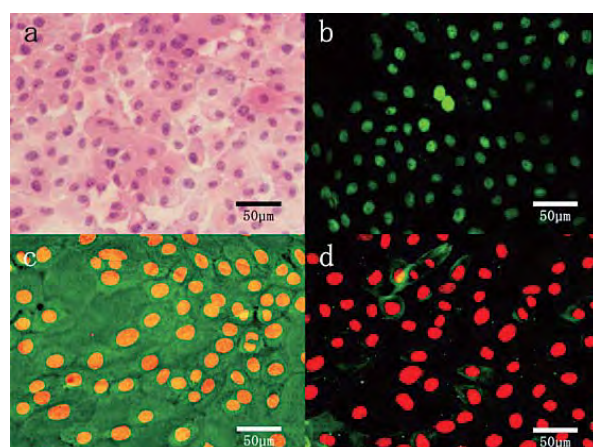


Fig.3 培養ELECにおける幹細胞マーカーの発現 Hematoxylin & eosin(a), anti-p63(green in b), anti-cytokeratin 14(green in c), anti-cytokeratin 3(green in d)

考察

培養角膜上皮移植術は、角膜上皮細胞の恒常性と治癒を担うと考えられている角膜上皮幹細胞の枯渇(損傷で幹細胞領域を失う)に起因する難治性角膜疾患に対して幹細胞を供給することを目的として開発されたものであるが、幹細胞を含むごく僅かな組織より移植片を作製することが可能であることからdonorに対する侵襲は極めて軽微である[8]。このこ

とから、角膜上皮幹細胞が広範囲にわたって傷害されている重症例においても、自己の幹細胞が僅かでも残存していれば自家移植用の移植片を作製することが可能であり、他家移植が主体であった従来の全層角膜移植術[3, 4]における移植後の拒絶反応の出現やdonorの供給不足などの問題点を同時に解決できるものと期待されている。この移植片の作製に必要なウマ角膜上皮幹細胞の分離については、ウマ眼球における同細胞の局在を明らかにすることが必要であるが、過去に調査報告された例はない。そこで本研究では角膜上皮幹細胞がヒト同様に角膜と強膜との境界部である組織学的輪部の上皮基底層に存在するものと仮定し、強膜、輪部、角膜を含む眼球横断標本に数種類の幹細胞マーカーを用いた免疫染色を実施することで組織内に分布している幹細胞の局在を明らかとした。

ヒト角膜上皮幹細胞については、p63、CK14、CK19、ABCG2、インテグリン α 9などのマーカーを発現する一方でCK3、CK12などの角膜上皮分化マーカーを発現しないこと[11, 20]、細胞周期が比較的長いこと[24]などの特徴が報告されている。本研究で用いたp63はp53 familyの一つである核転写因子であり、様々なヒト上皮組織の基底細胞に発現してヒトケラチノサイトの増殖能に深く関係することが知られており[21, 25]、幹細胞マーカーの一つである[9, 14, 19-21, 26]。また、同様に幹細胞マーカーの一つと考えられているCK14は、基底細胞活性を有する前駆細胞の鑑別に有効であると考えられている[11]。一方、CK3は輪部上皮の基底層には発現せず成熟した角膜上皮細胞に発現するため[11, 27]、CK3の非発現も角膜上皮幹細胞マーカーの一つであると考えられる。

これらのマーカーを用いてウマ角膜輪部を免疫染色した結果、輪部のメラノサイトが存在する領域と一致して上皮基底層の細胞がp63およびCK14に対して陽性に、CK3に対して陰性の発現を示した。これらはヒトで角膜上皮幹細胞であるとされる角膜輪部の上皮基底細胞の発現パターンと一致していることから[11]、ウマ角膜輪部の上皮基底部に角膜上皮幹細胞が分布することが明らかとなった。またこれらのマーカーを発現している角膜上皮幹細胞が輪部以外の領域で見られないことから、ウマにおける角膜

上皮幹細胞の分布はマウス[28]よりヒトやラットに近い[28-32]ことが示唆された。すなわち、ELECsにはウマ角膜上皮幹細胞やこれに近い未分化な細胞、中央部の角膜上皮細胞にはterminal differentiated cellsに近い分化の進んだ細胞が存在しており、ヒト同様ウマにおいてもELECsに混在する角膜上皮幹細胞がterminal differentiated cellsに分化しながら角膜中央方向に移動することで組織の修復や恒常性の維持が図られているものと推察された。

ヒトで角膜上皮幹細胞が存在するとされる角膜上皮基底層にはPalisades of Vogt (POV)と呼ばれる襞状構造が存在することが知られているが[33]、同部は有色人種で特に明瞭なメラニン色素の沈着がみられるために視認性に優れ、肉眼でのPOV構造の確認は角膜上皮幹細胞の有無を判断するための簡便な臨床的指標とされている[33]。ウマ眼球においても幹細胞マーカーを発現する角膜上皮幹細胞の分布と輪部角膜上皮におけるメラノサイトが存在する領域が概ね一致していたことから、メラノサイトを指標として角膜上皮組織を採取することで、幹細胞を含むELECsを効率よく採取できるものと考えられた。

輪部および中央部から分離した角膜上皮細胞の増殖能を比較した結果、L群の細胞は増殖停止した例を除いた10例が活発な増殖活性を示したが、ELECsを含まないC群では全例で増殖が停止し、両群における増殖活性やコロニー性状に明らかな相違がみられた。これらケラチノサイトの分裂増殖能については、活発な増殖能を有する小型細胞から大型化するに当たってその増殖能が低下することはよく知られている[34]。また、ケラチノサイトのsingle cellを培養した際のコロニー形成能とterminal colonyの出現率の相違によってもholoclone、meroclone、paracloneの3種類の異なるタイプに分類されており[21, 35]、これらは増殖能が高く最も幹細胞に近い[36]とされるholocloneからmeloclone、paracloneの順に分化が進むものと考えられている[35]。この分類に照らし合わせると、本研究においてELECsであるL群から分離された細胞の小型で活発な増殖能という特徴はholocloneに相当する一方、角膜中央部から分離した細胞の大型で増殖活性が低いという特徴はより分化が進んだparacloneやmerocloneに相当するものと考えられる。これらのことは、本研究で

角膜輪部から分離されたELECsには、幹細胞が多数含まれていることを示唆している。

このことを裏付けるため、ELECsを分離・培養した培養ELECsについて前述の幹細胞マーカーに対する発現パターンを調査した。その結果、p63についてはほぼ全ての培養ELECsの核が染色されたが、この染色程度には小型細胞が大型細胞に比較して濃染される傾向がみられ、小型細胞が大型の細胞に比較して活発な細胞増殖活性を有していることが示された。また、CK14についてはほぼ全ての培養ELECsの細胞質が均一に濃染、CK3についてはごく一部の大型細胞を除いて染色されなかった。これらの発現パターンはウマ角膜輪部組織中に局在する角膜上皮幹細胞と同じであり、ELECsから増殖した細胞がウマ角膜上皮幹細胞であることが明らかとなった。すなわち、ウマ角膜輪部より分離したELECsを培養することで、これらELECsに含まれる角膜上皮幹細胞の未分化性を維持したまま増殖させることが可能であることが示唆された。

本研究では角膜輪部における僅か50mm²の角膜上皮組織より直径35mmの大きさまでELECsを増殖させることが可能であった。今後、培養角膜上皮移植術の臨床応用を鑑みた場合、手技的損失を考慮してもdonorに1mm²の輪部上皮組織が残存していれば移植用培養細胞シートの作製が可能であると考えられた。

本研究では、培養ウマ角膜上皮細胞シートを作製する上で必要なウマ角膜上皮幹細胞はメラノサイトが存在する角膜輪部の角膜上皮基底細胞中に局在し、このメラノサイトを指標として角膜上皮組織を採取することで未分化な角膜上皮細胞を含むELECsを分離できること、さらに分離したELECsを培養することで未分化を維持したままの状態でウマ角膜上皮幹細胞を培養できることを明らかとした。

1. Wada S, Hobo S, Ode H *et al.* Equine keratomycosis in Japan. *Veterinary Ophthalmology*. 2013; 16: 1-9.
2. Plummer CE. The use of amniotic membrane transplantation for ocular surface reconstruction: a review and series of 58 equine clinical cases (2002-2008). *Veterinary Ophthalmology*. 2009; 12 Suppl 1: 17-24.
3. van der Woerd A, Gilger BC, Wilkie DA. Penetrating keratoplasty for treatment of recurrent squamous cell carcinoma of the cornea in a horse. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 1996; 208: 1692-1694.
4. Brooks DE, Plummer CE, Kallberg ME *et al.* Corneal transplantation for inflammatory keratopathies in the horse: visual outcome in 206 cases (1993-2007). *Veterinary Ophthalmology*. 2008; 11: 123-133.
5. Brooks DE. Targeted lamellar keratoplasty in the horse: a paradigm shift in equine corneal transplantation. *Equine Veterinary Journal Supplement*. 2010; 37: 24-30.
6. Hekmati P, Schels H. Lamellar corneal transplantation in the horse. *The Veterinary record*. 1976; 99: 46-49.
7. Denis HM. Equine corneal surgery and transplantation. *The Veterinary clinics of North America Equine practice*. 2004; 20: 361-380, vi-vii.
8. Pellegrini G, Traverso CE, Franzi AT *et al.* Long-term restoration of damaged corneal surfaces with autologous cultivated corneal epithelium. *Lancet*. 1997; 349: 990-993.
9. Nishida K, Yamato M, Hayashida Y *et al.* Functional bioengineered corneal epithelial sheet grafts from corneal stem cells expanded ex vivo on a temperature-responsive cell culture surface. *Transplantation*. 2004; 77: 379-385.
10. Daya SM, Watson A, Sharpe JR *et al.* Outcomes and DNA analysis of ex vivo expanded stem cell allograft for ocular surface reconstruction. *Ophthalmology*. 2005; 112: 470-477.
11. Harkin DG, Barnard Z, Gillies P *et al.* Analysis of p63 and cytokeratin expression in a cultivated limbal autograft used in the treatment of limbal stem cell deficiency. *British Journal of Ophthalmology*. 2004; 88: 1154-1158.
12. Rama P, Bonini S, Lambiase A *et al.* Autologous fibrin-cultured limbal stem cells permanently

- restore the corneal surface of patients with total limbal stem cell deficiency. *Transplantation*. 2001; 72: 1478-1485.
13. Kolli S, Ahmad S, Lako M *et al*. Successful clinical implementation of corneal epithelial stem cell therapy for treatment of unilateral limbal stem cell deficiency. *Stem Cells*. 28: 597-610.
 14. Hayashida Y, Nishida K, Yamato M *et al*. Ocular surface reconstruction using autologous rabbit oral mucosal epithelial sheets fabricated ex vivo on a temperature-responsive culture surface. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2005; 46: 1632-1639.
 15. Nishida K, Yamato M, Hayashida Y *et al*. Corneal reconstruction with tissue-engineered cell sheets composed of autologous oral mucosal epithelium. *New England Journal of Medicine*. 2004; 351: 1187-1196.
 16. Talbot M, Carrier P, Giasson CJ *et al*. Autologous transplantation of rabbit limbal epithelia cultured on fibrin gels for ocular surface reconstruction. *Molecular Vision*. 2006; 12: 65-75.
 17. Nishida K. Tissue engineering of the cornea. *Cornea*. 2003; 22: S28-34.
 18. Williams KA, Coster DJ. The immunobiology of corneal transplantation. *Transplantation*. 2007; 84: 806-813.
 19. Figueira EC, Di Girolamo N, Coroneo MT *et al*. The phenotype of limbal epithelial stem cells. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2007; 48: 144-156.
 20. Chen Z, de Paiva CS, Luo L *et al*. Characterization of putative stem cell phenotype in human limbal epithelia. *Stem Cells*. 2004; 22: 355-366.
 21. Pellegrini G, Dellambra E, Golisano O *et al*. p63 identifies keratinocyte stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2001; 98: 3156-3161.
 22. Arpitha P, Prajna NV, Srinivasan M *et al*. High expression of p63 combined with a large N/C ratio defines a subset of human limbal epithelial cells: implications on epithelial stem cells. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2005; 46: 3631-3636.
 23. Li W, Hayashida Y, Chen YT *et al*. Niche regulation of corneal epithelial stem cells at the limbus. *Cell Research*. 2007; 17: 26-36.
 24. Cotsarelis G, Cheng SZ, Dong G *et al*. Existence of slow-cycling limbal epithelial basal cells that can be preferentially stimulated to proliferate: implications on epithelial stem cells. *Cell*. 1989; 57: 201-209.
 25. Parsa R, Yang A, McKeon F *et al*. Association of p63 with proliferative potential in normal and neoplastic human keratinocytes. *Journal of Investigative Dermatology*. 1999; 113: 1099-1105.
 26. Kim MK, Lee JL, Oh JY *et al*. Efficient cultivation conditions for human limbal epithelial cells. *Journal of Korean Medical Science*. 2008; 23: 864-869.
 27. Schermer A, Galvin S, Sun TT. Differentiation-related expression of a major 64K corneal keratin in vivo and in culture suggests limbal location of corneal epithelial stem cells. *The Journal of Cell Biology*. 1986; 103: 49-62.
 28. Moore JE, McMullen CB, Mahon G *et al*. The corneal epithelial stem cell. *DNA Cell Biology*. 2002; 21: 443-451.
 29. Ebato B, Friend J, Thoft RA. Comparison of central and peripheral human corneal epithelium in tissue culture. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 1987; 28: 1450-1456.
 30. Lavker RM, Tseng SC, Sun TT. Corneal epithelial stem cells at the limbus: looking at some old problems from a new angle. *Experimental Eye Research*. 2004; 78: 433-446.
 31. Lindberg K, Brown ME, Chaves HV *et al*. In vitro propagation of human ocular surface epithelial cells for transplantation. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 1993; 34: 2672-2679.
 32. Ang LP, Tan DT. Ocular surface stem cells

- and disease: current concepts and clinical applications. *Annals Academy of Medicine Singapore*. 2004; 33: 576-580.
33. Kinoshita S, Kiridoshi A, Ohji M. Disappearance of palisades of Vogt in ocular surface diseases. *Japanese Journal of Clinical Ophthalmology*. 1986; 40: 363-366.
34. Barrandon Y, Green H. Cell size as a determinant of the clone-forming ability of human keratinocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1985; 82: 5390-5394.
35. Barrandon Y, Green H. Three clonal types of keratinocyte with different capacities for multiplication. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1987; 84: 2302-2306.
36. Lajtha LG. Stem cell concepts. *Differentiation*. 1979; 14: 23-34.

症例報告

競走馬における*Klebsiella pneumoniae*肺炎の一症例東樹宏太¹⁾・塩瀬友樹²⁾・栗本慎二郎¹⁾・前 尚見³⁾・高橋佑治⁴⁾・木下優太⁵⁾・村中雅則⁴⁾・額田紀雄⁴⁾

【はじめに】

*Klebsiella pneumoniae*は自然界に広く分布し、ヒトや動物の上部気道や腸管に常在している。ヒトでは肺炎や尿路感染症を引き起こすことが知られている。

一方、ウマにおいては繁殖牝馬における子宮炎、流産および不妊症の原因菌の一つとして知られているが、競走馬の呼吸器感染における症例報告は見当たらない。今回、競走馬における*K. pneumoniae*の単独感染による肺炎症例に遭遇したので、その概要を報告する。

【臨床経過】

症例はサラブレッド競走馬(雄、3歳)で、通常調教後より発熱(40.7℃)し、黄色水様の鼻汁と粗励肺音を認めた。初診時における血液検査では、白血球数が $15,700/\mu\text{l}$ 、血清アミロイドA (以下SAA)が $85.2\mu\text{g}/\text{ml}$ であったため、呼吸器感染症を疑い抗菌剤による治療を開始した。さらに、第3病日に実施した気管支鏡検査において、左肺の気管支腔内に黄色の滲出液を認めたため(図1)、気管支洗浄および気管支肺胞洗浄(BAL)を実施したところ、気管支洗浄液および気管支肺胞洗浄液(BALF)から*K. pneumoniae*が単独で分離された(それぞれ $3.0\times 10^7\text{CFU}/\text{ml}$ および $1.8\times 10^6\text{CFU}/\text{ml}$)。第6病日までは体温 40°C 以上、第10病日までは体温 39°C 以上の高熱が続き、末梢血中白血球数(約 $20,000/\mu\text{l}$)およびSAA ($>1,000$)ともに高値を示した。第12病日以降はいずれの値も漸減した。気管支鏡検査およびBALは第7、11、15および18病日に実施

し、左肺からの滲出液は病態が進むにつれて徐々に血様に変化した(図2)。また、第11病日に実施した超音波検査では、左側胸腔に少量の胸水貯留像を認めた。



図1 気管支鏡検査 (第3病日)



図2 気管支鏡検査 (第18病日)

第21病日に実施した胸部X線検査では、11～13肋間の背側領域に腫瘤様の不透過陰影が確認された(図3)。複数の抗菌剤を第1～28病日まで投与した結果、臨床症状は改善した。抗菌剤の投与終了後、臨床症状は示さなかったが、第50病日に試験的にBALを実施したところ、BALFから依然として*K. pneumoniae*が分離された($1.2\times 10^4\text{CFU}/\text{ml}$)。また、胸部X線検査においても所見に変化が認めらなかった。以上より感染は未だ収束しておらず、競走復帰は困難と判断し、安楽死処置後に病理解剖を実施した。

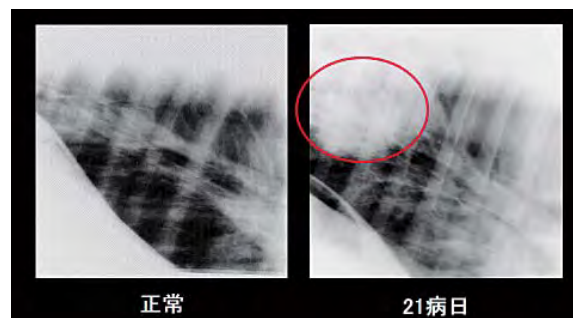


図3 腫瘤様の不透化陰影

¹⁾ Touju Kouta, Kurimoto Shinjiro : 馬事部防疫課

²⁾ Shiose Tomoki : 函館競馬場 競走馬診療所

³⁾ Mae Naomi : 美浦トレーニング・センター 競走馬診療所

⁴⁾ Takahashi Yuji, Muranaka Masanori, Nukada Toshio : 栗東トレーニング・センター 競走馬診療所

⁵⁾ Kinoshita Yuta : 競走馬総合研究所 栃木支所

【病理解剖学的検索】

病変は、ウマの肺炎の好発部位である右肺後葉ではなく、左肺後葉の葉気管支周囲に限局して認められた。病変の中心部には直径約4cmの周囲を固い結合組織で被包化された凝固壊死巣が形成されていた。また、それに隣接して陳旧性の出血を伴う軟弱な壊死巣が観察され、一部で肺胸膜に達していた。同部からは 1.0×10^9 CFU/mgの*K. pneumoniae*が分離された。さらに、それら病変の周囲は膠様化を伴って結合組織が増生し、肺胸膜も線維性に肥厚していた。また、胸水の貯留が両側において観察され、特に左側は赤色調を呈していた。左右の胸腔を二分する縦隔には異常が認められなかったが、肺リンパ節の軽度の腫大が認められた。

以上の所見より、左肺後葉に限局した慢性壊死性出血性肺炎と診断された(図4～7)。

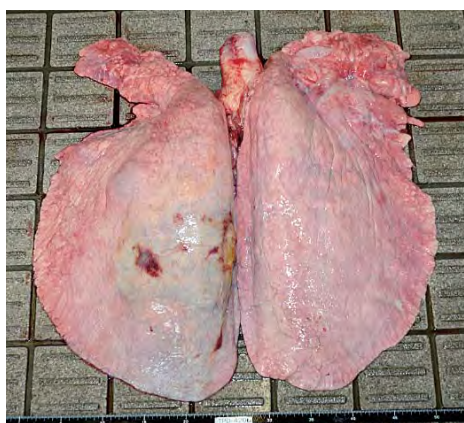


図4 肺全貌(背側面)

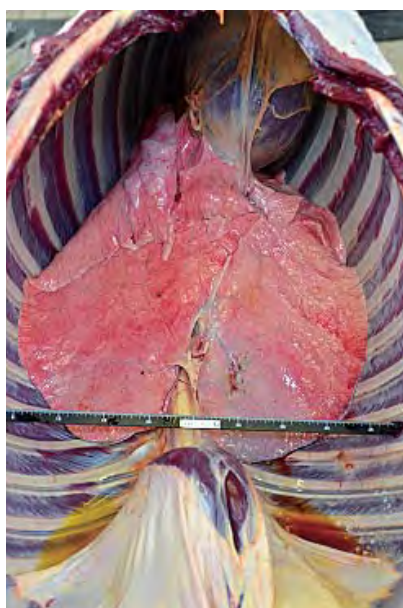


図5 横隔膜側から見た胸腔

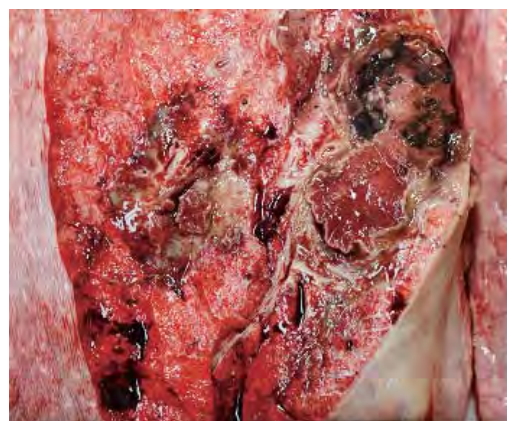


図6 病変中心部の剖面(水平断)



図7 病変中心部の剖面(矢状断)

【病理組織学的検索】

病変の中心である凝固壊死巣内部には壊死産物や多数の変性した好中球が充満していた(図8)。また、これら壊死組織を取り囲むように膠原線維が増生し、膠原線維間にはリンパ球やマクロファージの浸潤が認められた(図9)。さらに、その外側の肺実質では出血が認められ、肺胞内には好中球やマクロファージの浸潤を伴って好酸性物質が貯留していた(図10)。

抗*Klebsiella spp.*抗体を用いた免疫染色では、壊死巣内部だけではなく、壊死組織を覆った結合織の外側でも細胞外で増殖する菌やそれを貪食したマクロファージの細胞質に陽性像が認められた(図11)。

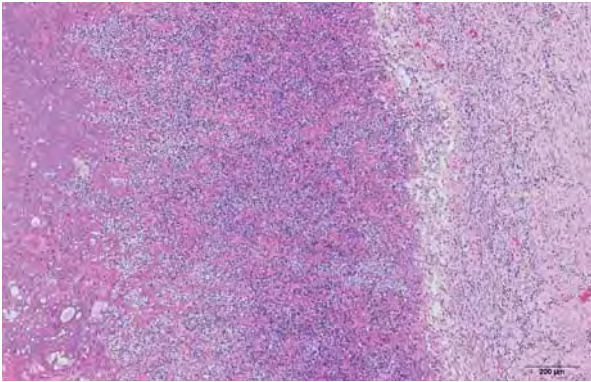


図8 凝固壊死巣の境界部(HE染色)

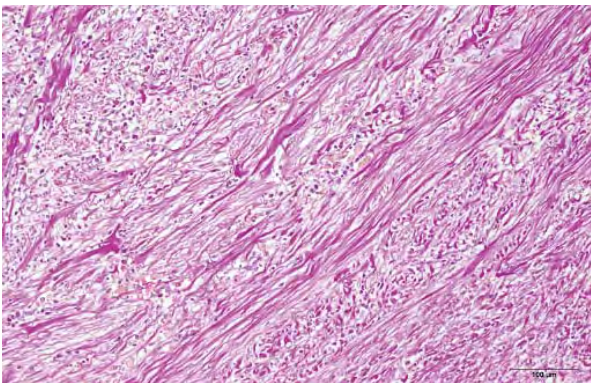


図9 壊死組織周囲の膠原線維(EVG染色)

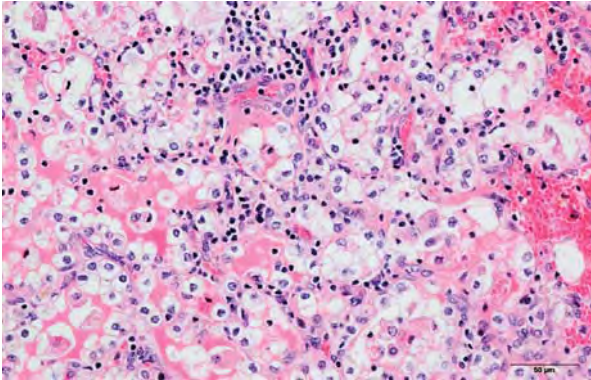


図10 壊死部を覆う結合織より外側の肺実質(HE染色)

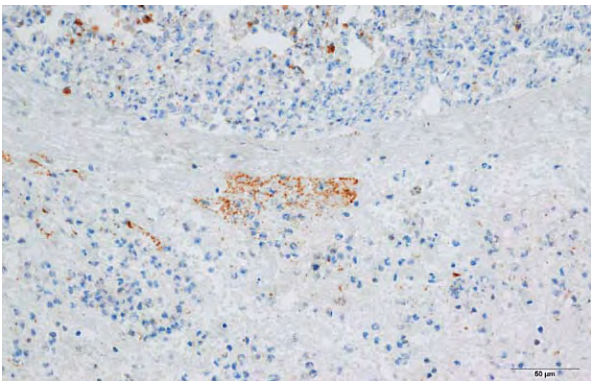


図11 壊死巣およびそれを覆う結合織(抗Klebsiella spp.抗体による免疫染色)

【治療経過】

治療初期にはウマにおける肺炎の主要原因菌に対して効果が期待されるセファロチン(20mg/kg)、ミノサイクリン(2mg/kg)およびホスホマイシン(20mg/kg)を投与し、第6病日からは*K. pneumoniae*が原因菌と判明したため、BALFから分離された同菌に対する薬剤感受性試験の結果(表1)に基づき、感受性を示したマルボフロキサシン(2mg/kg)を追加投与した。しかしながら、臨床的に著効が認められなかったことから、第16病日よりさらに感受性を示したゲンタマイシン(6mg/kg)を追加投与したところ、臨床症状は改善していった(図12)。第15および18病日のBALFから分離された同菌に対する薬剤感受性試験(表1)においても上記2薬剤に感受性を示したが、臨床効果には違いがみられたことから、薬物動態と薬力学を組み合わせた解析方法を用いて、その効果を検証した。

表1 BALF由来 *K. pneumoniae*に対する薬剤感受性試験の結果 (S:感受性 I:中間 R:耐性)

	第3病日	第15病日	第18病日
セファロチン	S	I	I~R
ゲンタマイシン	S	S	S
ミノサイクリン	S	I	R
ホスホマイシン	I	I	R
マルボフロキサシン	S	S	S~I

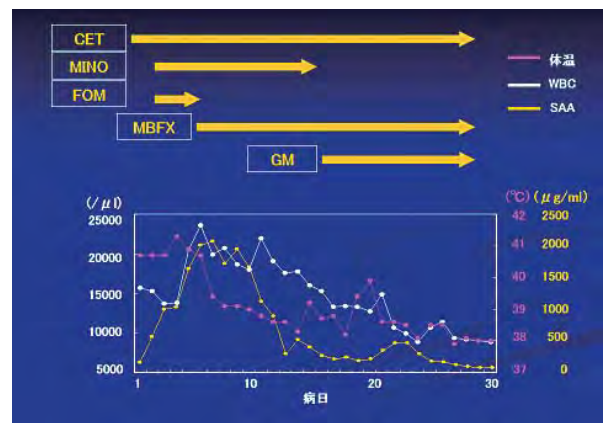


図12 抗菌剤と臨床経過

【抗菌効果の検証】

マルボフロキサシンは濃度依存性の抗菌薬で、その臨床効果の評価にはAUC(薬物濃度曲線下面積)/MIC(最小発育阻止濃度)が用いられており、こ

の値が125以上あれば効果が期待できると報告されている[1]。今回と同様の投与方法におけるAUCは $11.27 \mu\text{g}\cdot\text{hr}/\text{ml}$ とされている[2]。また、本症例のBALFから分離された*K. pneumoniae*に対するマルボフロキサシンのMICを測定したところ $0.25 \sim 2 \mu\text{g}/\text{ml}$ であった(表2)。以上の値よりAUC/MICは $5.64 \sim 45.08$ となることから、その濃度は不十分であった可能性が示唆された。

一方、ゲンタマイシンも濃度依存性抗菌薬であるが、その臨床効果の評価にはCmax (最高血中濃度)/MICが用いられており、この値が8～12以上あれば効果が期待できると報告されている[3]。また、今回と同様の投与方法のCmaxは $37.24 \mu\text{g}/\text{ml}$ であった[未発表データ]。さらに、*K. pneumoniae*に対するゲンタマイシンのMICを測定したところ $<0.25 \sim 1 \mu\text{g}/\text{ml}$ であった(表2)。以上の値よりCmax/MICは $37.24 \sim 136.96$ となることから、今回の投与量は有効濃度に達していたものと考えられた。

表2 BALF由来 *K. pneumoniae* に対する各種抗菌剤のMIC

	セファロチン	ゲンタマイシン	ミノサイクリン	ホスホマイシン	マルボフロキサシン
第3病日	4	≤ 0.25	≤ 2	≤ 32	0.25
第15病日	16	≤ 0.25	4	≤ 32	1
第18病日	32	≤ 0.25	4	64	1
第50病日	4	1	≤ 2	64	0.25
	32	0.5	4	64	2

【考察】

本症例は競走馬では症例報告のない*K. pneumoniae*の単独感染による細菌性肺炎であった。病理解剖所見から、結合組織の増生が顕著であった凝固壊死巣が最初の感染部位と考えられた。同部位は徐々に被包化され器質化が進んだが、周囲に感染が波及したことで臨床症状消失後もBALFから本菌が分離され

たものと考えられた。

本症例では、ウマの上部気道の常在菌で、競走馬における肺炎の主要原因菌とされる*Streptococcus zooepidemicus* は分離されず、*K. pneumoniae*のみが単独で分離された。この*K. pneumoniae*は、ヒトにおいて日和見感染症や菌交代症として重要とされている。本症例馬は肺炎発症17日前にフレグモーネを発症し、セファロチンによる治療歴を有していた。したがって本症例においても、*S. zooepidemicus*に効果が高いセファロチンが肺炎発症前に投与されたことにより上部気道の正常細菌叢に変化が生じた結果、*K. pneumoniae*による肺炎が惹起された可能性も考えられた。

また、薬物動態と薬力学を用いた効果の検証により、薬剤感受性試験においてともに感受性を示した上記2薬剤について有効性が異なることが明らかとなり、ウマにおける*K. pneumoniae*肺炎の治療薬としてゲンタマイシンが有効であると考えられた。

【参考文献】

- Forrest, A., Nix, D. E., Ballow, C. H., Goss, T. F., Birmingham, M. C. and Schentag, J. J. 1993. Pharmacodynamics of intravenous ciprofloxacin in seriously ill patients. *Antimicrob. Agents Chemother.* 37, 1073-1081.
- M. Carretero, C. Rodriguez, M. I. San Andres, P. Fores, J. J. De Lucas, J. Nieto, S. Waxman, M. D. San Andres and F. Gonzalez 2002. *Equine vet. J.* 34(4) 360-365.
- Moore RD, Lietman PS, Smith CR. 1987. Clinical response to aminoglycoside therapy: importance of the ratio of peak concentration to minimal inhibitory concentration. *J Infect Dis.* 155: 93-99.

解説記事

装蹄歴史案内

JRA競走馬総合研究所 関口 隆

第5回 競走蹄鉄と負担重量

明治13年に制定された日本競馬倶楽部競馬規程(日本レース倶楽部)には、「蹄鉄の高は寸幹(すんかん:体高のこと)に除くことを許さず」という条文があります。これは出走馬の体高を検査するための規定で、蹄鉄の厚さは体高より差し引かないことを意味しています。

当時の競走馬はサラブレッドのような大型馬はごく少数で、ほとんどが中国や日本産の道産子のような小型馬でした。そして出走馬の負担重量は勝利回数と年齢及び体高が主な基準でした。つまり、体高の高い馬は負担重量が重かったため、蹄鉄の厚さが微妙に影響したのかも知れません^{1,2)}(写真1)。



(写真1)明治初年の競走馬

明治10年 根岸競馬シルクカップ 優勝馬 三戸号。

(馬之友 第3巻第8号・大正8年馬之友社
発行より引用。JRA提供)

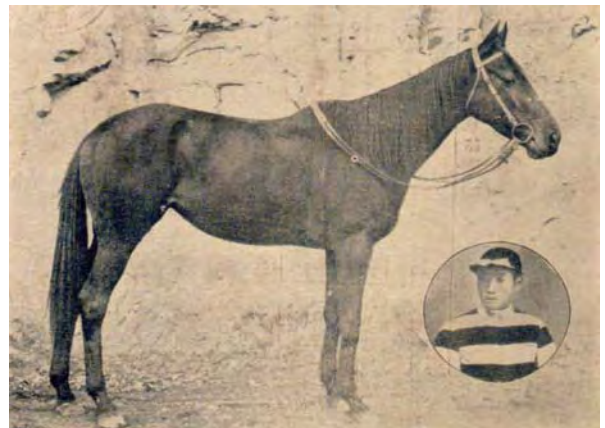
明治時代の競馬は、軍馬改良のための競馬でもありました。政府は日清、日露戦争で軍馬の劣弱さを痛感し、馬政計画を策定しました(写真2)。そして計画のひとつとして、競馬を通して軍馬の改良を図ることを目的に、明治30年頃からオーストラリア産サラブレッドの輸入を始めました。そして明治40年、

軍馬改良に貢献しない中国産馬の輸入が禁止され、根岸競馬名物の支那産馬レースが廃止されると、豪州産サレブレッドが主流を占めるようになりました(写真3)。



(写真2)明治初年の騎兵

(馬の博物館 提供)



(写真3)メルボルンⅡ世号

1903年産、サラ系、牝、オーストラリア産
主な勝鞍：帝室御賞典 明治40年春、横浜ダービー 明治40年秋・41年春。

(明治40年発行。競馬世界第1号より引用。
国立国会図書館 所蔵)

そして明治39年に改正された競馬規則では、豪州産馬の負担重量が現在と同じように、勝利回数と年

令及び性別が主な基準になりました。また蹄鉄に関する規則として、「蹄鉄の重量は酌減*(しゃくげん)せざるものとす」という条文が登場します。これは、蹄鉄の重量は負担重量から差し引かないことを意味しています^{3,4)}。

※酌減：裁判用語で、犯罪の情状を酌量してその刑を減輕する酌量減輕(しゃくりょうげんけい)という言葉があることから、負担重量を軽減するという意味で使用されたと思われる。



(写真4)オーストラリア人騎手
W・H・コッフィー氏
(馬の博物館 提供)



(写真5)アルミニウム製 競走蹄鉄 大正時代

和田氏がコッフィーからもらったという蹄鉄。
(馬の博物館 提供)

写真4の人物は、オーストラリア人騎手W・H・コッフィー氏です。彼は明治41年から根岸競馬で

騎乗するようになり、日本にモンキー乗りを伝え、トップジョッキーとして活躍しました^{5,6)}。また写真5の蹄鉄は、横浜で馬車馬や競走馬の装蹄をしていた和田新太郎氏が、コッフィーからもらったというアルミニウム製の競走蹄鉄です。豪州産馬が輸入されると、オーストラリア流の調教法や装蹄法も取り入れられ、馬具や蹄鉄も輸入されるようになりました⁷⁾。もう蹄鉄は厚いものでも重いものでもなくなって、軽くてスパイク効果の高い蹄鉄が使用されるようになりました。

このように明治から昭和初期の競馬倶楽部時代では、競馬施行規則に蹄鉄の厚さや重さと負担重量との関係について記載はありますが、蹄鉄を規制するような条文は見あたりません。つまり自由だったのです。

「今度は勝負だからこの蹄鉄を打ってくれよ」コッフィーはそう言って、新型の蹄鉄を和田新太郎氏に渡したのかもしれませんが。

参考文献

- 1) 日本競馬史第三巻. 1968. 日本競馬倶楽部定款及競馬規定. 208-218. 日本中央競馬会, 東京.
- 2) 鈴木建夫. 1970. 競馬資料別冊. 日本レース・クラブ五十年史. 支那産馬競走. 38-44. 日本中央競馬会, 東京.
- 3) 日高嘉継. 横田洋一. 1998. 浮世絵明治の競馬. 明治期に輸入された外国馬. 113-119. 小学館, 東京.
- 4) 長森貞夫. 1937. 東京競馬会及東京競馬倶楽部史第二巻. 日本競馬倶楽部競馬規則. 重量及寸幹測定. 489-490. 東京競馬倶楽部, 東京.
- 5) 関根菊次郎. 1942. 優駿第2巻第3号. 外人騎手コッフィーの事など. 62-64. 日本競馬会, 東京.
- 6) 早坂昇治. 1987. 競馬異外史股ぐらからのぞくな！ーモンキー乗りのはじめー. 102-108. 中央競馬ピーアールセンター, 東京.
- 7) 松葉重雄. 1942. 優駿第2巻第3号. 競走馬の二十年. 56-57. 日本競馬会, 東京.

海外報告

第7回 国際馬蹄病学会 (7th International Equine Conference on Laminitis and Diseases of the Foot) に参加して

競走馬総合研究所 臨床医学研究室 桑野睦敏

【学会の概要】

平成25年11月1日(金) - 3日(日)にフロリダ州 West Palm Beachにて開催された7th International Equine Conference on Laminitis and Diseases of the Foot (国際馬蹄病学会)に、最新の蟻洞に関する研究知見を報告、および、蹄葉炎を代表とする蹄病に関する各種最新知見を聴講するために参加しました。本学会は、アメリカにて四肢蹄葉炎をきっかけに安楽殺となったセクレタリアトを偲んで、蹄病克服のために研究基金が集められたのが発足のきっかけです。2020年までに蹄葉炎を克服しようというスローガンの元、研究基金が集められ、それら成績が隔年で開催されるこの大会で披露されています。また、大会開催は隔年ですが、その間の年度には小さな臨床報告会も催され、年々活動および研究内容が活発かつ充実してきております。現在では、馬の蹄病とくに蹄葉炎にスポットをあてた世界で唯一の国際ウマ蹄病学会として成長し、アメリカのみならずヨーロッパ、アジア、オセアニアから馬臨床家、蹄病研究者、装蹄師が一堂に集うようになりました。本学会の開催内容は、招聘されたシンポジストが行うトピック的な長時間講演(口頭発表)とポスター発表で構成されておりました。図表説明がないと分かりにくいものなど一部のポスター発表は、podium presentationとして10分程度の口頭発表としても講演されました。全てのポスター発表約30題は、講演要旨の段階で委員会により審査、受理されたものであり、これら受理された要旨は国際雑誌Journal of Equine Veterinary Science (JEVS) Volume 33,

Number 10に掲載されていますので、ご興味のある方はそちらをご覧ください。

さて、私は慢性蹄葉炎とも深い関わりのある蟻洞¹(日本古来の蹄病名)に関する最新知見をポスター発表してきました。日本では蹄病の研究者は少なく、この分野を議論できる者が圧倒的に少ないため、国際的な場で活躍する研究者および装蹄技術をもった獣医師(ポディアトリスト: Podiatrist)と意見交換できるのは大変有意義かつ貴重な機会でありました(図1)。蹄の角質は硬くて水に不溶性であるため研究しづらいのは世界共通ですが、加えて蹄葉炎以外の蹄病には基金が集まりにくいという切実な話もあり、なかなか蹄病全体の解明は進んでいません。この観点から、蹄葉炎とは異なる蹄病に視点を向けた我々JRAの研究課題(蟻洞)は、世界の研究動向とは違っていることがむしろ貴重であるという評価を受け、サイエンス・ポスター部門で褒賞を受けることとあいなりました(図2)。国内では評価されに

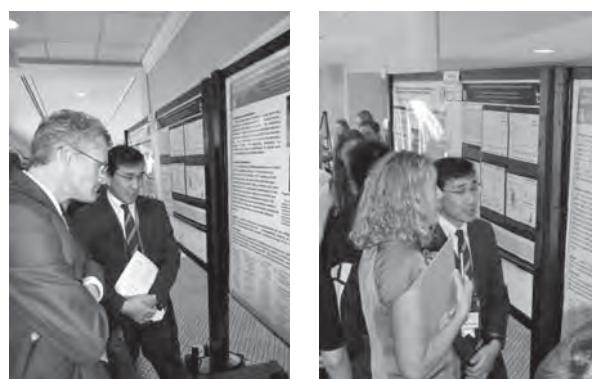


図1. ポスター内容の説明をする筆者(左: Tufts大学のFrank教授、右: 褒賞審査員からの質問に答える)

くい分野だったので、大変勇気づけられた次第です。以下にその内容の概略を説明します。



図2. 受賞時にいただいた表彰状

【報告内容】

我々の報告した演題タイトルは、Horn-degrading bacteria associated with “*Gidoh* in Japanese” in thoroughbred horses and the antimicrobial susceptibilityで、翻訳すると“サラブレッド種ウマの蟻洞から分離された角質分解細菌の菌種および薬剤感受性について”になります。本研究の目的は蟻洞(蹄壁深層に形成される空洞病変)と関連した角質分解能を有する細菌種(HDB; horn-degrading bacteria)の同定を試み、それらの薬剤感受性を調査することにあります。蟻洞は後蹄より前蹄、それも蹄尖部に頻繁に発生することから、主因は蹄壁にかかる力学的ストレス、特に反回時に生じる床反力に起因した外傷、もうひとつは蹄葉炎で形成された組織欠損が蹄壁深層に反映されたものと考えられています¹⁾。一度発生した蟻洞を増悪拡大し、難治性にする要因の1つにHDBの存在があると我々は考えています。そこで、蟻洞をもつサラブレッド種99頭の病変から、まず角質パウダー含有寒天培地の透明化試験(HoPAT; Horn powder agar-transparency test)、次いで角質ザイモグラフィーを実施することで、HDBを単離しました。HDBと判定された細菌種の同定を16SリボゾームRNA遺伝子のシーケンス解析およびBLASTデータベース検索から試み、さらにディスク拡散法によって各株の抗菌薬に対する感受性を試験しました。全部で118の株がHDBと判定されましたが、菌種を同定できなかったものを除き、これらはみな土壌細菌でした。そのうち最も

分離率の高かった菌種は*Brevibacterium*属(23/118株)でした。この菌種はいろいろな物質を産生します。あるものはチーズやラーメンの熟成に必要な酵素を、また最も有名な*Brevibacterium flavum*はグルタミン酸を産生し、‘味の素’を生物学的に生産するのに利用されています。118株に対する抗菌薬の感受性試験では、アミノグリコシド系のゲンタマイシンに対する感受性が最も高いという結果がでました(95.8%/118株)。他の抗菌薬では33.1～89.0%の感受性でした。以上の所見は、蟻洞の病態を悪化させる可能性のある細菌として、角質を分解できる土壌由来のHDBが複数種存在すること、これらHDB対策(殺菌)が蟻洞の治療や予防に貢献できる可能性があることを示唆していました。なお、HDBに対してアミノグリコシド系抗菌薬が高い感受性を示しましたが、耐性菌の発現を考慮するならば、我々は、抗菌対策として消毒薬の使用を優先したいと考えています。

さて、その他にも沢山の有意義な発表がありました。その中でA.W. van EpsとC.C. Pollitt (University of Queensland; 図3)らが発表した演題; The effect of continuous digital hypothermia (cryotherapy) applied after the onset of lameness in the oligofructose laminitis modelは有意義な情報でした。このタイトルを翻訳するなら、“オリゴフルクトース誘発性蹄葉炎モデルにおける蹄葉炎発症後の持続的肢端冷却(クライオセラピー)の効果”となります。これは、実験発症にて蹄に疼痛が出た直後から肢端冷却(クライオセラピー)をした場合の効果判定に関する報告でした。実験発症では蹄葉炎の病態形成期というステージを確認できますが、これはまだ跛行していないものの蹄温が低下している肢端の虚血が起こっているステージです。血液再灌流や炎症により蹄温が上昇して跛行を呈する蹄葉炎の完成より前の段階と言われています。この前駆段階に予防的にクライオセラピーを実施すると、炎症阻止とコラーゲン分解酵素MMPの活性化抑制、血管収縮因子(エンドセリンなど)の抑制から、蹄葉炎の発症を予防あるいは軽減できることがすでにわかっています。しかし、蹄葉炎発症後すなわち跛行を示した後にクライオセラピーを行うことは、蹄の虚血を

助長し、本症を進行させるという意見があり、慎重論が強かった背景があります。演者らは実験的に蹄葉炎を発症させ、疼痛がObelの跛行分類でグレードIIに進行した時点から前肢の一側蹄にクライオセラピーを実施し、これを36時間継続しました。冷却方法は、ゴム製ブーツ内に氷水を入れ、交代制で氷を入れ替えながら低水温を維持する方法を選択していました。36時間後に冷却を止めた時点でもう一度跛行グレードを記録し、馬を安楽殺し、両前肢の蹄尖の葉状層を採材して病理組織学的に解析しました。その結果、跛行グレードはクライオセラピー実施群で改善されていたこと、対照蹄(クライオセラピー未実施)と比べてクライオセラピー実施蹄では病理組織学的スコアが有意に低かったことが解りました。以上の結果は、急性蹄葉炎(疼痛発生後、まだ蹄骨の掌側変位が起きていないステージ)を持続的に冷却することは、病態の進行を遅らせる、あるいは軽減する効果があることを示していました。この成績は、これまで発症後の蹄冷却は禁忌とする頑固な考えに挑戦し、その壁を打ち破った新しいデータです。冷却タブー説は否定されましたが、この研究では蹄骨の掌側変位が始まってしまった慢性蹄葉炎(葉状層に取り返しのつかない組織障害が起こったステージ)におけるクライオセラピーの効果については検証されていません。口演後のプライベート・コミュニケーションでは、演者らの経験からも慢性蹄葉炎の進行時にはクライオセラピーは勧められないと話していました。おそらく、重度な葉状層の障害が進行している段階では、蹄内循環抑制を助長するクライオセラピーは葉状層の治癒力を奪い逆効果と思われる。競馬会では以前、慢性蹄葉炎を冷却していた時代がありましたが、諸先輩方の貴重な経験談では、蹄冷却はその病態を悪化させるいっぽうであったと聞き及んでいます。先輩達の証言は、前演者らの逸話と合致します。総括すると、レントゲン撮影時にまだ蹄骨の位置が変わっていない初期段階(急性期)では蹄冷却を、慢性蹄葉炎の進行時はクライオセラピーは禁忌と理解しておくのが良いでしょう。今後、慢性蹄葉炎に対するクライオセラピーの影響について検証されていけば、また違った視点から慢性蹄葉炎を冷やすべきか温めるべきか明確になっていくことでしょう。

もうひとつ、興味深い疫学調査が報告されました。現在はRosssdales Equine Hospital (Newmarket)で活躍されているClaire E. Wylieさんの演題: Epidemiological aspects of equine laminitis in Great Britain: 2009-2011です。翻訳するなら、“2009から2011までの英国におけるウマ蹄葉炎の疫学調査”となるでしょう。本調査は、世界で初めての包括的な蹄葉炎の疫学調査といえます。2009年から2011年の間に、英国各地で臨床に従事する多くの獣医師の協力の元、獣医師に診察が依頼された全てのウマを対象に、蹄葉炎の発生頻度と発生趾蹄などを調査し、有病率prevalenceや発生率incidenceを算出したものでした。調査の結果、各動物病院施設に来所した馬全部を母集団とし、その中で蹄葉炎だった馬を対象とした場合、蹄葉炎の有病率Prevalenceは0.47% (95%信頼限界: 0.42-0.52)でした。また、馬繋養者が臨床獣医師に登録した馬の全頭数(ほぼ英国の全繋養馬頭数と一致)を母集団とし、治療が必要のなかった蹄葉炎をも含めて罹患頭数として算出した有病率は0.49% (95%信頼限界: 0.43-0.55)でした。両者に大きな違いはなく英国の蹄葉炎の有病率はほぼ0.5%以下と考えられました。さらに、発生率Incidence (新規に発症した実頭数/英国繋養馬頭数)は年間実頭数100頭あたり0.5症例(0.5% at risk)と同様の結果がでました。また、蹄葉炎は四肢に同時に発症する傾向が強いと教科書に記載されているものの、本調査では両側の前肢蹄に発症する馬が52.5% (95%信頼限界: 46.5-57.5)と多く(残りは一蹄のみか両後肢蹄)、進行具合も前肢蹄の方が後肢蹄より重症になっているケースが多いことがわかりました。この調査の結果、予想されていたほど蹄葉炎の有病率は高くないこと、フィールドの馬群では両側の前肢蹄に同時に病状が進行しやすいことがわかりました。フロアーからの質疑応答では、血液診断マーカーなどの確定診断基準が設定できていない現時点では、そもそも獣医師によって蹄葉炎の診断基準が異なる可能性が高いことが問題と指摘されていました。また、日本と同様に装蹄師のみが対応しているケースが少なからずあるはずで、その分がカウントされていない点が気になりました。ですが、他に英国全国規模の大がかりな蹄葉炎の疫学調査は実施されたことはなく貴重なデータです。なお、

前肢蹄で偏って発症が多いことが明らかになりましたが、これは本会での経験と合致しており理解しやすいものでした。近年、蹄葉炎発生とともに葉状層組織内で動く炎症マーカー遺伝子(血中マーカーではない)を探索すると、確かに四肢の蹄にほぼ同時に炎症が起こっていることを裏付けるデータがあります。ところが、今回の報告のように蹄葉炎として症状が進行するのは前肢蹄が多いのも事実です。この事はおそらく前後の肢蹄への荷重の違いが発症や病状の進行具合に影響しているためと予想されます。すなわち、体重が多くかかる前肢の方が、後肢より悪化して慢性化する傾向が強い可能性があります。今後、こういった事象がどのように解明され、対策が練られていくのか大変興味深いところです。



図3. A.W. van Eps (中央)と C.C. Pollitt (右端)とともに。



図4. 学会の活動報告や予算報告の場はランチョン形式にて開催。この場で2020年までに蹄葉炎を克服しようというスローガンも提出された。その意気込みは実現するだろうか・・・。

【終わりに】

今回の国際馬蹄病学会の参加・発表では、競馬会内の国際部および馬事部の方々から多くのサポートをいただきました。紙面を借りて、関係者の方々に厚くお礼申し上げます。この学会を通して、海外では、個人あるいは事業団体が、蹄葉炎を克服するための蹄研究に毎年多くの資金を投入していることを知りました(図4)。学会の目標は2020年までの蹄葉炎の病態解明と対策の確立ですが、有識者がこぞって口にするのは、研究で蹄病を明らかにすればするほど、蹄がいかに特殊な器官であるのか、そして、すばらしい機能的調和の元に維持されているのかが分かる一方で、その疾患は複雑かつ謎に満ちているということでした。この感想を鑑みるに、学会の目標である“2020年までに蹄葉炎を克服する”は達成できないだろうと思われま。しかしながら、単なる夢でおわらせず、ひとつひとつ丁寧に多方向から研究が進みつつあり、将来はこの学会を通じて多くの問題がクリアされていくと信じます。我々も微力ながら、目標の一翼を担うことができれば幸いです。

【参考文献】

- 1) Epidemiological survey of the hoof-wall cavity (*Gidoh* in Japanese) in racehorses. Kuwano Atsutoshi, et. al., Vet. Rec. 2012. November 171, 623-624.

海外報告

第59回AAEP年次大会 (59th Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners) へ参加して

競走馬総合研究所 運動科学研究室 高橋敏之

平成25年12月7日から11日の日程で、テネシー州ナッシュビルにて開催された第59回AAEP年次大会(59th Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners)へ参加したので、興味を持った演題および企業展示について報告する。

一般演題

Comparison of cellular properties of equine multipotent mesenchymal stromal cells after the use of two different isolation techniques

(2つの異なる分離方法によるウマ多能性間葉性間質細胞の細胞特性の比較)

Claudia Gittel*, Walter Brehm, Janina Burk, Henriette Juelke, Carsten Staszzyk, and Iris Ribitsch
*Large Animal Clinic for Surgery, University of Leipzig, Leipzig, Germany

(要旨)

酵素的な組織消化および外植の方法は、分離された多能性間葉性間質細胞(MSCs)の特性に重要な影響を示さなかった。消化により分離されたMSCsは、腱マーカーであるスクレラキシスの高レベル発現により起こるウマの腱再生への応用に適している可能性がある。加えて、多数のMSCが利用できる。

(序文)

間葉性間質細胞(MSCs)は、馬の腱領域損傷に対する再生医療の有望なツールである。MSCsは、様々な固形組織から酵素的消化および外植法のいずれかにより分離することができる。そのため、異なる分離方法により細胞特性が異なることが予想される。

従って、この研究の目的は、異なる方法で固形組織から分離されたMSCsの細胞特性を比較、調査することである。

(材料と方法)

ウマ脂肪組織、腱、および臍帯を採取し、MSCsをコラゲナーゼによる酵素的消化および外植により分離した。その後、細胞の採取数、成長および分化能、腱マーカーの発現を比較した。

(結果)

酵素的組織消化によるMSCsの分離は短時間で有意に多くのMSCsを採取できた。MSCsの増殖、移動、および分化能に分離方法による影響は見られなかった。しかし、臍帯から分離されたMSCsは、骨、軟骨、脂肪への分化能、移動能などが低かった。興味深いことに、外植により分離したMSCsに比較して、コラーゲン消化法により分離されたMSCsには、腱マーカーであるスクレラキシスが有意に多く発現していた。

(考察)

分離方法による細胞特性の相違は、酵素的に分離されたMSCsが特定の臨床応用に有利であることを示す。さらに、多数の細胞を採取可能であることは酵素的に分離されたMSCsでは効率的に臨床応用を可能としている。

(著者の感想)

腱損傷に対する再生医療については、他にも多くの研究が進行しており、企業展示においても幹細胞の培養を請け負う会社が数社出展していた。しかし、本発表には聴衆はあまり興味を示しておらず、出展

企業のブースもそれほど多くの人は訪れていなかった。これは、参加者は臨床獣医師であり、幹細胞の採取部位や方法についての興味よりも、臨床応用の成績に興味があるためかもしれない。

Dual-Axis gene therapy with the use of stem cells overexpressing transforming growth factor- β 3 in combination with interleukin-1 β and tumor necrosis factor- α RNA silencing for osteoarthritis control in a large-animal osteochondral chip fracture model

(大動物の骨軟骨骨片骨折モデルにおける骨関節炎の制御のための形質転換増殖因子 β 3の過剰発現と、インターロイキン1 β および腫瘍壊死因子- α のRNAを抑制した幹細胞を使用した二重遺伝子療法)

Ashlee E. Watts*, Laila Begum, Michael S. Scimeca, and Alan J. Nixon

*Texas A&M University, 4475 TAMU, College Station, TX, USA

(要旨)

成長因子およびサイトカイン抑制遺伝子を共発現した間葉性幹細胞の関節内注入は骨関節炎モデルにおける炎症の進行を抑制するのに効果があった。この有益な効果は、滑液成分、炎症、サイトカインの構成の変化、または軟骨の直接修復により起こると考えられる。

(序文)

抗サイトカインおよび同化性成長因子による二重遺伝子治療は、単一目標だけでは明らかにならない相乗的な効果を発現する可能性がある。この研究の目的は、同化性形質転換増殖因子(TGF)- β 3遺伝子の過剰発現と、異化的なインターロイキン(IL)-1 β および腫瘍壊死因子(TNF)- α サイトカインを抑制するためのRNA干渉モチーフが同時に発現した間葉性幹細胞(MSCs)を、骨関節炎治療モデルの関節内に注入した効果を調査することである。

(材料と方法)

13頭の骨成熟したサラブレッドにおいて、骨軟骨の骨片化により中央手根関節に初期の骨関節炎を誘発させた。対側の関節には偽の手術を行った。第二代自己骨髄導出MSCs(10e6)にIL-1 β およびTNF- α に対するlong hairpin silencing construct、および

TGF- β 3を導入した。MSCs(n = 6)またはプラセボ(n = 7)を、OA誘導後14日目のOA関節に注入した。観察は、ブラインドまたは非ブラインドの混合で行った。

(結果)

治療による不利な影響は観察されなかった。MSCまたはプラセボを注入したOA関節を比較したところ、MSCにおいて、1週間後には関節稼働範囲および関節浸出液の改善、対向する第三手根骨関節のグルコサミノグリカン(GAG)の増加、軟骨の基質タンパク分解酵素(matrix metalloproteinase)- β 13および滑膜IL-1 β 遺伝子発現の増加、および滑膜線維化の低下が認められた。

(著者の感想)

14日間の短期的な結果では、関節可動範囲の改善や腫脹の減少が認められているが、組織所見には大きな効果はなく、遺伝子発現に差が見られたのみであった。そのため、より長期的に観察した場合の組織や症状の改善についての結果が必要であると考えられた。

Application of the fetlock support shoe for suspensory desmopathy

(繫靭帯症に対する球節サポート蹄鉄の応用)

Nathaniel A. White II*, Jennifer G. Barrett, and Paul Goodness

*Marion duPont Scott Equine Medical Center, Virginia Tech, Leesburg, VA, USA

(要旨)

繫靭帯の損傷は、競技馬および競走馬における跛行の重要な原因である。大部分の損傷の治療には消炎と靭帯治癒の刺激が行われるが、休息時に通常の負重を行うため、靭帯に対するストレスは変化しない。球節支持蹄鉄を使用することにより、繫靭帯に対する過度のストレスが防止されるため治癒が促進する。この技術は、特に、繫靭帯症の治療のために後肢球節を支持するのに役立つ。

(序文)

球節支持蹄鉄または支持具(brace; "Roberts Shoe"として知られる)は1900年代初めに出版された本に、腱または繫靭帯断裂の治療方法として描写されている。最近の本では、数多くの支持蹄鉄の改良品が記

述されている。教科書には多くの記述があるが、異なるタイプの損傷に対する成功または失敗を記述した報告はほとんどない。腱の裂傷の支持に用いられた支持蹄鉄は、60%の馬において回復したと報告されている。

球節の背側の支持はキムジースプリントのような副木により提供することができるが、通常は治療の初期に使用され、長期間の治療に必要な繋靭帯の部分的な荷重を行うことはできない。肢の背側面に副木を装着する試みは著者により行われてきたが、これらの副木では球節の正常な屈曲はできず、中手骨/中足骨部および球節後面のバンテージにより加えられる張力が辱瘡を引き起こす。

近位後面の繋靭帯症(起始部の損傷)の治療は、直線になった後肢および球節の過剰な背屈を認め、繋靭帯に一定のストレスを与えられているウマでは成功率が低いと報告されている。

繋靭帯症において治療を促進するためには、治療期間に球節の過剰な背屈を制限し、繋靭帯にかかるストレスを軽減するために、球節支持蹄鉄が用いられる。

(材料と方法)

後肢繋靭帯起始部または繋靭帯脚(超音波による診断)の傷害により慢性跛行を示すウマを球節支持蹄鉄により治療した。全てのウマは、休養し、低エコー領域に外科的または再生医療的な治療を受けた。過度の球節背屈および近位繋靭帯症のウマを選び、推奨される馬房内休養期間中の1から2カ月間、球節支持蹄鉄を装着した。

適切な物を作成するのに経験と技術が必要な球節支持蹄鉄は、toe chipと延長した蹄踵部(3-5 cm)を付け、延長部に六角ナットを溶接したbar蹄鉄である。

六角ナットにネジ止めすることによりロッドの動きを防止する。このことにより、パットとして必要なバンテージの管理時にロッドを取り外すことが可能となる。綿シート数層の支持包帯を蹄冠部から中手骨/中足骨近位部まで巻く。弾性粘着バンテージ(エラスチコン)をサポートロッド周りに横に巻き、負重した時に球節を支えるように位置させる。荷重時にさらに柔軟性を出すために、代わりにゴムチューブを支持部に巻くこともある。Braceはオープンにしておくかサポートロッドを覆うように

薄いバンテージを巻き、常歩時に肢への圧迫がないように球節が屈曲するようにしておく。肢への適切なパッドは、球節後部の辱瘡を防止するために必要である。

(結果)

過度の後肢球節背屈および慢性繋靭帯症の7頭の馬を球節支持蹄鉄および休養により治療した。近位繋靭帯症の6頭の馬のうち3頭は繋靭帯形成術/膜切開術により治療され、2頭はPRP注射、1頭は繋靭帯形成術/膜切開術、PRPおよび幹細胞により治療された。慢性繋靭帯脚症の1頭は球節支持蹄鉄を装着し、休養により治療した。すべてのウマは、支持蹄鉄を装着している間は馬房内休養とした。7頭すべては、約8週間の蹄鉄装着により超音波的に改善が認められ、主観的に形状の改善が見られた(球節の異常な背屈が減少した)。

繋靭帯の低エコー領域すべては、2ヶ月間の治療と休養によりエコー強度が増加した。慢性繋靭帯脚損傷のウマはコア領域にPRPを注入する予定だったが、2か月の支持により、損傷領域への治療は必要なくなった。短期間の追跡が可能であった6頭では、検査またはオーナーの話によると6頭すべての跛行が解消した。長期間の追跡では、4頭の跛行が解消していた。そのうち1頭は極軽度の乗馬に使用し、1頭はドレッサージュに使用、1頭は健康で復帰する予定であり、1頭は引退していた(健康ではあった)。3頭は追跡できなかった。

(考察)

繋靭帯症の推奨治療法は、休養、支持包帯、抗炎症剤、制御された運動へのゆっくりとした復帰が含まれる。幹細胞およびPRP注射は、治療を促進すると言われている。膜切開または超音波ガイド繋靭帯形成術とともに外側足底神経切除術を実施した後の跛行の解消および運動への復帰は、約70-80%であるが、休養時または常歩時に球節が沈下していたウマは治療しないまたは再発のため鞍を付けた運動に復帰することはできない。

異常な後肢形状のウマ(球節の過度の背屈を伴う飛節の直線化)は、繋靭帯に過度のストレスがかかり、損傷の危険性を高め、治療に抵抗する。著者らの経験では、近位繋靭帯の損傷は、後肢のこのような変形を引き起こす。しかし、1つの問題が他の問

題に先行するのかわかっていない。これらの症例では、治療期間中の7頭において、球節支持蹄鉄の使用は繋靭帯症を解消し、主観的には後肢の形状を改善した。1頭を除くすべてのウマは複数の治療法を行っていたので、球節支持なしに他の治療法が成功した可能性がある。しかし、これらの症例における臨床的な反応は、球節の支持が球節の異常形状を伴う後肢繋靭帯症の治療の成功に貢献していることを示す。この技術の批判的な評価は、以前のレベルの仕事に復帰できるかで決める必要がある。

(著者の感想)

サラブレッド競走馬においては、球節支持蹄鉄が適応される後肢の繋靭帯症はあまり見られないが、球節の過度の背屈を示すような重度の損傷において、関節にかかる力を物理的に支持することにより、回復が促進されることは興味深かった。しかも、このような物理的な支持では、皮膚の辱創を必ず起こすものであるが、支持素材と形状の工夫により防止していることが感心した点であった。

テーブルトピックス

・鼻出血について

原因については、主要な要因である高肺動脈圧による毛細血管の破綻以外にも要因があると考えている人が多かった。特に、詳細な調査が行われた香港は、米国と比較して、気候、特に湿度が異なることが関係しているのではないかとの意見が多かった。治療については、ラシックス、クレンプテロール、ピュートを使用する意見が多く、一酸化窒素による毛細血管拡張作用があるアルギニンを投与する人もいた。また、一部には幹細胞やPRPをネブライザーで投与する人もいた。薬物以外の発症予防については、ネーザルストリップが有効であるとの意見もあった。

・PRPや幹細胞移植による治療方法について

屈腱炎の治療には、PRP、幹細胞または両者を組み合わせたものが使用されていた。PRPは、凍結—解凍により活性化させたものも使用されていた。また、ショックウェーブ治療を投与前に行っている人もいた。投与するタイミングは、炎症が沈静化した1-2週間後が多かった。

また、浅指屈腱炎などの治療法について紹介していたTreating Soft Tissue Injuries in Racehorsesでは、PRPや幹細胞移植は、乗馬や競走馬では良好な治療成績が報告されていたが、競走馬では同様に良好な治療成績を得ることは難しいことが紹介されていた。

展示

UTC(Ultrasound Tissue Characterization) 超音波による組織特性評価

UTC Imaging社

この装置は、従来の3D超音波診断に、腱束の連続性および形状を評価するソフトウェアを組み合わせた装置であり、これまでの超音波診断よりも詳しく腱の状態を把握できる。この装置により、腱損傷部の治療過程をこれまでより詳細に観察できるのみでなく、運動に反応して起こる腱の変化や退行性変化および屈腱炎発症までの過程を観察することができる。運動による腱の変化についてのデータを蓄積していけば、どのような変化までは休養により正常に戻ることができるのか、浅指屈腱を発症する変化はどのようなものなのか把握することができ、浅指屈腱炎の発症を予防できる可能性がある。

この装置により観察できる腱束の連続性および形状については、論文発表もあることから信頼性が高いと思われる。しかし、屈腱炎を予防できるようなデータを蓄積するためには多くの労力と地道な測定を繰り返すことが必要である。

NEXT Equinext社

NEXTは腱のコラーゲン線維間のクロスリンクを形成することにより、腱損傷部の強度および弾性特性を回復させる化学物質である。特徴としては、損傷部に注入することにより、数時間で効果を発現し、効果が持続することである。ウマの研究についての論文は紹介されていなかったが、ウマに対する投与結果については損傷部の強度増加がパンフレットで紹介されていた。即効性があり、1回の組織内投与により腱の強度を増加させることから、浅指屈腱の治療方法として導入される可能性が高く、また線維軟骨では退行性変化の予防に使用されていることか

ら、浅指屈腱炎の発症予防に使用される可能性がある。また、PRPや幹細胞移植との併用も想定されている。

SQUID(Superconductive Quantum Interference Device; 超電導量子干渉装置) による屈腱炎の治療

Cytowave社

生体組織および損傷組織が固有に発生している電磁信号を解析し、その信号に合わせた磁気信号を損傷組織に照射することにより治療を促進させる

装置であった。これまで使用されていた磁気による血流促進作用とは作用機序が異なるものである。現在、臨床応用研究を進めており、2014年のAAPEにおいて発表予定であるとのことであった。初期の報告では、浅指屈腱の治療期間を2カ月程度まで短縮し、瘢痕形成させることなく、正常組織を再生させるとのことであった。論文的な裏付けがなく、ヒトにおける応用報告や科学的根拠も希薄なため普及するか疑問であるが、正常組織による短期間での治療は魅力的であるため、今後の進展に注意する必要があると思われる。

特別記事

韓国ソウル大学獣医学部の獣医学教育国際認証組織 American Veterinary Medical Association (AVMA)認証へのロードマップ

帯広畜産大学 臨床獣医学研究部門 大動物外科学研究室 佐々木直樹

韓国ソウル大学獣医学部と岐阜大学大学院連合獣医学研究科(岐阜連大)の第5回ジョイントワークショップが平成24年(2014年)2月18日(火)に開催された。今回、その概要ならびにソウル大学獣医学部の獣医学教育国際認証組織American Veterinary Medical Association (AVMA)認証へ向けた取り組みについて紹介する。

ソウル大学でのジョイントワークショップ

昨年まで岐阜連大とソウル大学獣医学部の共同で開催されてきたワークショップに台湾大学を加え、アジア3大学によるジョイントワークショップがソウル大学において開催された(Figure 1)。岐阜連大構成大学の帯広畜産大学、岩手大学、東京農工大学および岐阜大学の教員9名ならびに博士課程大学院生8名が参加した。ソウル大学の教員ならびにマスターコース(修士2年)とドクターコース(博士3

年)の大学院生が参加した他、台湾大学からも教員1名と学生2名が参加した。まず、所属大学の教授4名によるKeynote Lectureが行われ、つづいて学生23名(日本12名、ソウル大学9名、台湾大学2名)の口頭発表(使用言語は英語)が行われた。また、ポスター発表として11名(日本7名、ソウル大学4名)の学生による発表があった(Figure 2)。全演題中、岐阜大学大学院1年生井爪聡子さんの発表した演題「Characterization of viral protein US8A from equine herpes virus 1」は、馬のヘルペスウイルスに関する基礎的研究であり、留学経験を生かした発表が評価されて、Excellent Presentation Awardを受賞した。このワークショップは学生のスキルの向上を目的に開催されてきたが、5回目を迎えて日本人大学院生の英語プレゼンテーションの質は着実に向上している。今後、大学再編の動きの中で形を変えつつも学術交流を継続していくことが望まれた。



Figure 1 韓国ソウル大学獣医学部動物病院正面
ソウル市内獣医学部には小動物専用の動物病院があり、大動物診療は180km離れた産業動物飼育施設に建設された診療施設において実施していた。



Figure 2 ジョイントワークショップにおけるポスター発表の様子
ソウル大学マスターコースの学生達が熱心に聴講していた。

ソウル大学の獣医学教育制度

韓国には獣医系大学が10大学(国立9大学、私立の建国大学)あり、一般教養課程2年間に続いて獣医専修課程4年間の6年制の学部教育を実施している。また、ソウル大学では6年間の学部教育を卒業した学生の多くが、マスターコース(2年)に進み、その後ドクターコース(3年)もしくはマスタートドクター合コース(4年)へ進学する(Figure 3)。日本の学部教育にみられる卒業論文や研究室配属は、マスターコースならびにドクターコースで実施している。現在、ソウル大学獣医学部の教員(教授・准教授・講師)は40名であり、近年グローバル化を進めており外国人教員(ドイツ人、アメリカ人、日本人など)を採用している他、学部教育の30%、大学院教育の80%が英語での授業となっている。また、獣医学部の12名が臨床系教員(外科3名、放射線2名、野生動物1名、眼科1名、内科2名、繁殖1名、臨床病理1名、皮膚1名)としてポリクリ(参加型臨床実習)を担当している。各教員には6名程度のサポータースタッフ(インターン、大学院生)がポリクリ(参加型臨床実習)を支えている。



Figure 3 動物病院処置室
診療終了後にマスターコース学生達が
症例のまとめを行っていた。

獣医学教育国際認証組織 American Veterinary Medical Association (AVMA)

現在、獣医学教育の国際的認証組織として、American Veterinary Medical Association (AVMA) と European Association of Establishment for Veterinary Education (EAEVE) が世界的に認知されている。AVMAはアメリカ28獣医科大学と同等の教育水準にあるかどうかを査察評価する組織であり、AVMAの認証にパスした大学を卒業した学

生は、アメリカやカナダなどにおいて獣医師採用試験の受験資格を得て、獣医業務を行うことが許可される。2014年現在、AVMAの認証をうけている国はアメリカ28大学、カナダ5大学、オーストラリア4大学、イギリス1大学、アイルランド1大学、メキシコ1大学、オランダ1大学、ニュージーランド1大学、スコットランド2大学、西インド諸島2大学となっている。まず、AVMA認証の申請は2012年4月にAVMAより発行された「Accreditation Policies and Procedures of the AVMA Council on Education」に記載されている資料を作成しなければならない。この中にはAVMAの認証のためにクリアしなければならない条件として11項目(組織、資金、教育施設、臨床例、図書および情報源、MSおよびPhDのプログラム、承認、教員、カリキュラム、研究の義務、結果評価)が定められている。特に、臨床カリキュラムについて唯一数字をあげて下記のように明確な条件を提示している。すなわち、AVMA認証条件として「1. 臨床例について、臨床経験を積み上げるだけの十分な内科および外科の症例を用意しなければならない。2. フィールドにおいて臨床経験をつめる環境を整備し、討論する機会を与えなければならない。3. そのカリキュラムは4年間必要であり、参加型臨床実習を1年含む必要がある。」と明示されており、ポリクリ(参加型臨床実習)には1年間を要するとされている。最近、AVMAの認証に新たにパスした大学は、クィーンズランド大学、メキシコ国立自治大学、ロス大学、セント・ジョージ大学であり、香港城市大学とソウル大学はアジア初のAVMA認証大学を目指して教育改革を行っている。

ソウル大学の臨床獣医学教育の取り組み

学部教育6年目にはポリクリ(参加型臨床実習)が科されていて、4名で10班のグループを形成し、動物病院の10箇所の診療科(眼科、内科1・2・3、整形外科、一般外科、腫瘍外科、麻酔科、馬診療、牛診療など)をローテーションしながら指導をうける(Figure 4, 5)。従来、ソウル大学では半年間のポリクリを実施していたが、AVMA認証に向けてポリクリ期間を1年間(52週間)に延長した(Figure 6)。首都中心部に位置するソウル大学は、長年小動物臨床教育に特化した獣医学教育を実践してお

り、大動物臨床教育については郊外の農場や韓国競馬会(KRA)での数日間の研修で対応してきた。今回、AVMAの認証をパスするために、これまでの教育カリキュラムを見直すとともに、産業動物飼育診療施設(馬、牛、豚など)をソウル大学より180km離れた農場内に建設した(2014年4月完成)。この施設は全国共同利用施設として、全国10カ所の大学の産業動物臨床実習を年間通じて行うため、国家予算(日本の農水省に相当)が投じられている。プロジェクトリーダーの李先生によれば、日本のNOSAIの研修制度を参考にした卒業後5年目や10年目の獣医師を対象とした卒業教育の実施計画を進めている。



Figure 4 学生自習室。6年生は国家試験の勉強用に各自に机が割り当てられていた。



Figure 5 整形外科手術室
小動物の整形外科専用手術室として放射線防護が施されていた。



Figure 6 ポリクリ(参加型臨床実習)の様子
5年生が畜主から稟告を聴取していた。
5年生は各診療科をローテーションしながら1年間のポリクリを行う。

結語

AVMA認証のためのリスト作成は大学事務職員のみでは困難なため、ソウル大学では獣医学領域全般の知識と経験を有する臨床獣医師を新たに雇用し、4ヶ月間を費やしてリストを作成した。ソウル大学では2014年6月にAVMA認証の第一段階となるアドバイスを求める5日間の査察を受け入れる予定である。そこで指摘を受けた事項について改善を図り、アジアで最初のAVMA認証大学を目指している。今後、日本においても獣医学教育機能強化が整った大学から国際認証組織の認証を受けるための準備が加速するものと思われる。従来の日本の獣医学教育カリキュラムでは不十分であった参加型臨床実習(小動物、牛、馬など)、獣医公衆衛生、動物福祉、獣医師倫理、法律の分野を補強しつつ、国際水準の獣医学教育システムの構築が期待された。

研修報告

日本ウマ科学会・馬臨床獣医師ワーキンググループ臨床実習 Dr.Whiteによる開腹手術研修会レポート

美浦トレーニング・センター 競走馬診療所 関 一洋

近年、両トレーニング・センター競走馬診療所では、小腸捻転や結腸捻転などのいわゆる変位疝に対しては積極的に開腹手術が行われるようになり、ある程度の成果を上げています。しかし、しばしば遭遇する小腸の部分壊死に対する部分切除・吻合術に関しては、その成功率は未だ十分なものではなく、術前の診断法や術後の管理法も含め、手術技術のレベルアップが急務であります。

今回、馬の急性腹症の世界的権威であり、本会の馬の開腹手術の黎明期である21年前にも来日して技術指導を行った、バージニア工科大学のNathaniel A. White教授を再びお招きし、小腸の部分切除・吻合術に主眼を置いた講義と実習を行っていただきましたので報告します。

日時：平成25年11月28日(木)

17時30分～19時 講義

19時～21時15分 実習

場所：美浦トレーニング・センター競走馬診療所

主催：日本ウマ科学会

1. 講義「手術のポイントと術後管理」

(1) 手術のポイント

- 1) 術者は馬の左側に立ち、切皮を開始する。
- 2) ガスで膨満した盲腸は積極的に減圧する。
- 3) 小腸の減圧は内容物をしごいて盲腸へと流し込み、盲腸でガス抜きを行う。
- 4) 小腸探査中は、結腸は創外に出さない。
- 5) 創外に出した腸管の保湿には乳酸リングルを用い、腹腔内の癒着防止には1%CMC、5%fucoidanを用いる。


- 6) 腸管生存性の判断にはG1～G5の5段階。G3までは生存できるが、迷ったら切るべき。
- 7) 空盲吻合では、機能不全に陥った回腸は残さず切除したほうがよい。
- 8) 吻合する位置は回盲部の20cm遠位で、余裕をもって腹壁から出せる。
- 9) 腸鉗子にはFogarty clampを推奨する。
- 10) 腸管縫合糸はPolyglactin910(VICRYL®)を推奨する。

(2) 術後管理

- 1) 2～3時間ごとに症状や補液速度のモニタリングを行う(図1)。

手術直後のモニタリング

- ・2-3時間毎にモニタリング:
 - 出血や排液
 - 疼痛
 - 体温の変動
 - 粘膜色とCRT
 - 胃逆流
- ・1-2時間毎に痙攣症状の有無を確認
- ・3時間毎にPCVとTPによる循環状態チェック
 - 術後数時間は腸蠕動が弱いことが多い
 - 指動脈拍、排糞や排尿の頻度、補液速度と総投与量をモニタリングする。



(図1)

- 2) 補液速度 維持量は25 l / 500kghorse / 日
ショックには1～2時間ごとに5 l (図2)
- 3) 給餌 穀物よりも粗飼料を与える。

小腸閉塞の場合

- a) 1時間ごとに750ml～900mlの飲水
- b) 問題なければ自由飲水開始
- c) 自由飲水で24時間問題なければ給餌開始
- d) 3時間ごとに乾草を200g～450g 12時間後

から増量

e) 24～48時間後から乾草の自由採食

f) 7～10日間は乾草のみ

大腸閉塞の場合

a) 自由飲水

b) 3時間ごとに乾草200～450g

c) 12時間後から増量

d) 24時間後から乾草の自由採食

e) 7～10日間は乾草のみ

4) カテーテル管理 挿入部と静脈を観察し、ヘパリン加生食をルーチンでフラッシュする。

48時間でIVセットを交換する(図3)。

5) 術創管理 感染予防やヘルニア予防に腹帯が有効(図4-6)

補液のモニタリング

- 点滴速度
 - 維持量は、25 L/500 kg horse /日
 - 5 L単位で計算する:
 - 5時間毎に5L = 維持量
 - ショックには、1-2時間毎に5L
- 補液の種類
 - 乳酸リンゲル液、酢酸リンゲル液、生理食塩水
 - 電解質の喪失には、KおよびCaの添加が必要になる場合がある。
 - アシドーシスに重曹が必要となることは稀である。Caを含む溶液とは分けて投与する。
 - モニタリング毎の投与量および24時間の総投与量を記録する。

(図2)

カテーテル管理

カテーテル挿入部と静脈を観察する。

- 腫脹
- 熱感
- 疼痛
- 滲出液
- 静脈の開通性
- 観察する度にカテーテルの流れを確認する。
- カテーテル不使用時は、ルーチンでフラッシュする。
 - ヘパリン加生食でフラッシュする
- 48時間毎にIVセットを交換する。

頸静脈の血栓性静脈炎



(図3)

術創管理

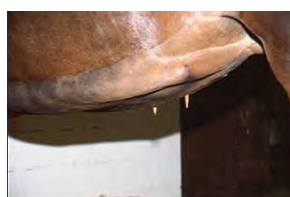
- 覚醒時は包帯またはステント包帯を巻く
- abdominal bandage (腹帯) を巻く



(図4)

術創の感染

- ± 抗生物質の全身投与
- 局所の処置
- ヘルニア予防

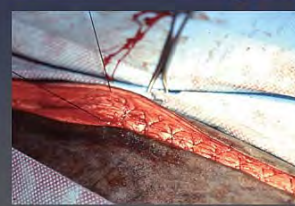


(図5)

ヘルニア管理

- 2-3ヶ月間は継続して腹帯を装着する
- 外科的修復は、ヘルニア縁が硬い癒痕組織になるのを待ってから行う(3ヶ月)
- メッシュの使用は避ける

Two independent crossing sutures.



(図6)



(写真1) 講義の様子

質疑応答のなかで、本会で経験した術創ヘルニアの症例について対処法をWhite先生に質問した。

症例の経緯

2013年3月21日 (0 day)

【術中】

- ★病名: 大結腸左側腹方変位(盲腸閉塞エントラップメント)
- ★縫合: 腹壁はPDS II 単純連続縫合
皮下組織は2-0/ビクリル 単純連続縫合
表皮はステイプラー
閉腹時に皮下にアミカシン2gを注入。
- ★手術時間: 135分 麻酔時間: 165分
- ★手術中の平均動脈圧(MAP): 55~70mmHg

症例の経緯

2013年3月21日 (0 day)

【回復期】

- ★後肢のミオパチー発症
いったん起立するものの後肢の踏み込みが利かすすぐに横臥
これを複数回繰り返す。
5回目の試みでようやく起立(190分)。
- ★術創の頭側1/3の腹壁が軟らかい
縫合糸が一部腫んでしまったためか?



2013年4月10日 (20 days)

術創の頭側1/3は軟らかいまま退院。

2013年11月9日 (234 days)



2013年11月9日 (234 days)

- ★ヘルニア嚢は12×8×6cm。
- ★軽く触診するだけで内反。
- ★疼痛症状認めず。順調に調教中。



Question

1. このようなヘルニアを避けるにはどうすればよかった?
2. この馬は今後どのような処置をするべきか?
再縫合? 無処置?
3. 無処置、再縫合、各々の場合のリスクについて。
4. 術後に創が離開していると気づいた場合の対処法は?

この質問に対するWhite先生からのアドバイス

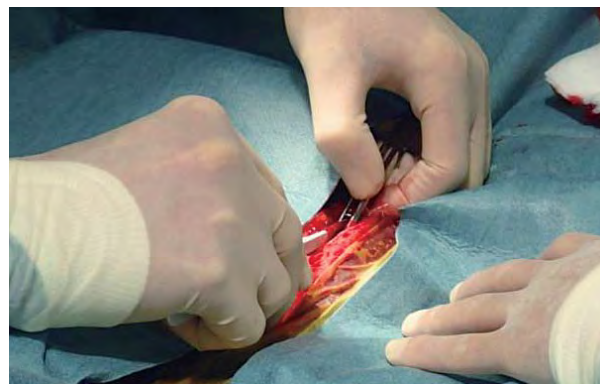
- ①縫合強度の関係で、縫合糸はPolydioxanone (PDS II®)よりもVICRYL®の方が好ましい(糸が緩みにくい)。
- ②この症例では、起立時のトラブルを考えれば、VICRYL®を使用してもヘルニアを避けるのは難しかったかもしれない。
- ③ヘルニアの徴候がみられた場合は、硬いガードルタイプの腹帯を装着する。
- ④外科的修復が必要なのは、絞扼の可能性がある場合や外傷を負う可能性がある場合(障害飛越に使役する場合)など。
- ⑤必要性のない手術はしないこと。

2. 実習

開腹～空盲側々吻合～空腸端々吻合～閉腹の順に行った。



(写真2)術者は馬の左側に立ち切皮する。この日行われた処置はすべて左側からであった。(※腹腔探査は右側から行ったほうがよい場合もある)



(写真3)白線の切開は臍側から行い、最初はピンセットを挿入し、その股の間で切るようにする。少し切り進んでからは左手で直接触って白線と腸管の位置を確認しながら切開する。



(写真4) 腹膜は肝鎌状間膜に小切開を加えてから指で広げる。



(写真5) 探査に先立ち、盲腸のガスは積極的に減圧する。バイアルセットの14G針で粘膜下を数cm這わせてから管腔に刺し込み、吸引器につないで吸引する。



(写真6) 針を刺す場所は腸ヒモではなく、血管を避けて腸ヒモに対してほぼ直角の方向。抜くときは濡らしたガーゼでつまみながら引き抜き、穿刺部位に漏れがないか確認する。通常、縫合は必要ないが、漏れがある場合や穿刺部位が出血している場合は#20のVICRYL®で十字縫合する。



(写真7) ガス抜きをした針は捨てずに胸部のドレープ上でタオル鉗子に挟んで固定し待機する(矢印)。

【空盲側々吻合】

空盲吻合術: 適応症

- 回腸の絞扼
- 回腸の機能不全
 - 筋肥大
 - 憩室
- 回盲口の狭窄
- 回盲部の腸重積
- 回腸の宿便



回腸の宿便

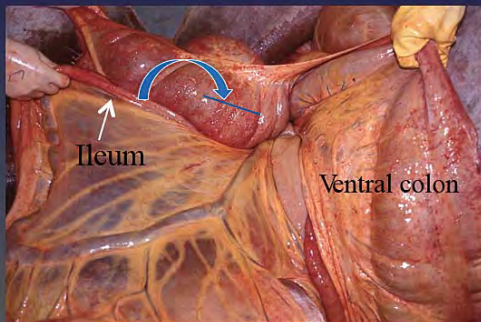
(図7) 空盲吻合の適応症

空盲吻合術: 手順

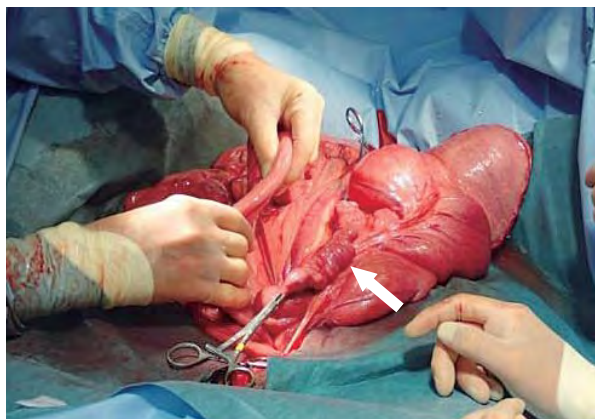
- 不完全なバイパス(推奨しない):
 - 回腸と盲腸の背側腸ヒモを並べる。
 - 空腸または回腸の反腸間膜側と側-側吻合。
- 完全なバイパス:
 - 腸管の切断and/or 切除
 - ダブル内反縫合で回腸端を閉じる。(Parker Kerr technique)
 - 盲腸へ端-側もしくは側-側吻合。ただし、側-側吻合が推奨される。

(図8) 空盲吻合には、機能不全に陥った回腸は残さずに切除し、健康な空腸を吻合するコンプリート法(完全なバイパス)を推奨していた。

空腸を吻合する場所の確認



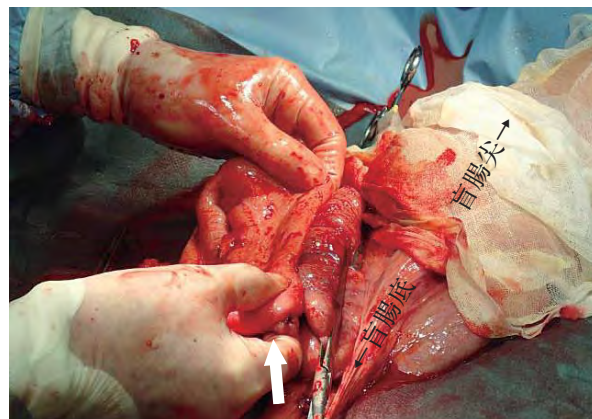
(図9)空腸の吻合部位は、背側盲腸ヒモと盲腸結腸ヒダの間の盲腸小囊(青線)で、本来の回盲部の20cm腹側で、腹腔外へ余裕をもって取り出せる部位である。



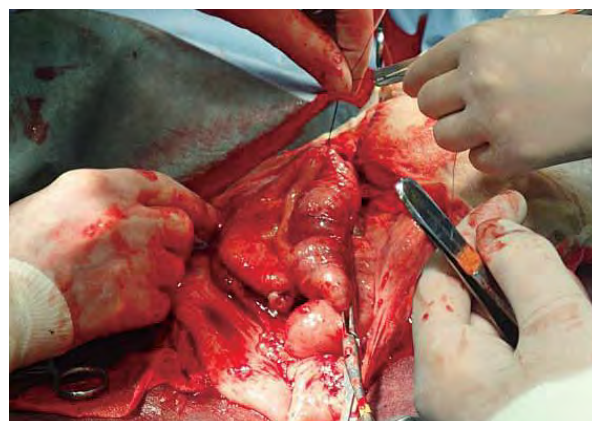
(写真8)盲腸の空腸吻合部(矢印)に腸鉗子を2本向かい合わせに掛ける(手に持っているのは小腸)。



(写真9)切除小腸の断端はレンベルト縫合を2層施して閉鎖した。(2層目はクッシング縫合でもよい。Parker Kerr縫合でもよいが手間がかかるためあまりやらないとのこと)



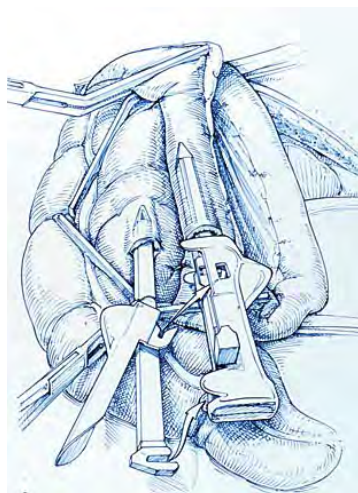
(写真10)盲端にした空腸は閉鎖端(矢印)を盲腸底方向にして、対腸間膜面を吻合部に並置する。



(写真11)閉鎖端およびそこから10cmの位置で盲腸と空腸を結節縫合し支持糸とする。

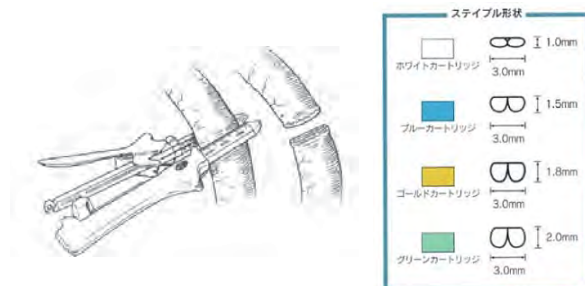


(写真12)吻合にはGIAステイプラーを用いた。GIAステイプラーの挿入方向はどちらからでもよいが、今回は盲端側から行った。空腸盲端にできるだけ近い位置で空・盲腸に切開を加えGIAステイプラー(80mm)を装着し、ステイプラーを打つと盲腸と空腸の側々吻合ができる(図10, 11)。



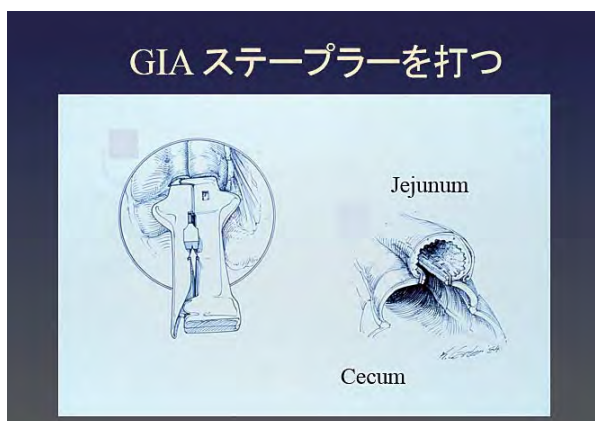
(図10)

組織の分割が同時にできる器具である。これを応用して空腸と盲腸の側々吻合を行った。

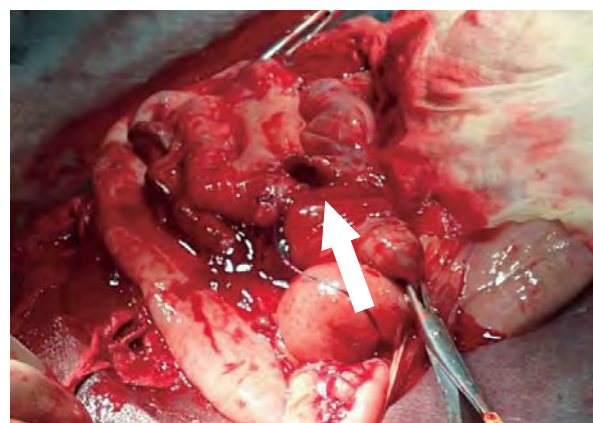


(図12) GIAステイプラー

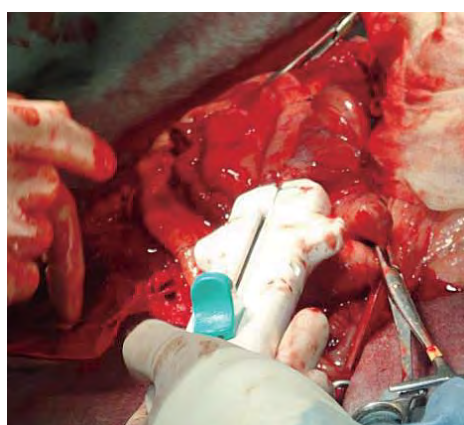
今回使用したのはグリーンカートリッジ。空盲吻合ではこのサイズを用いる。



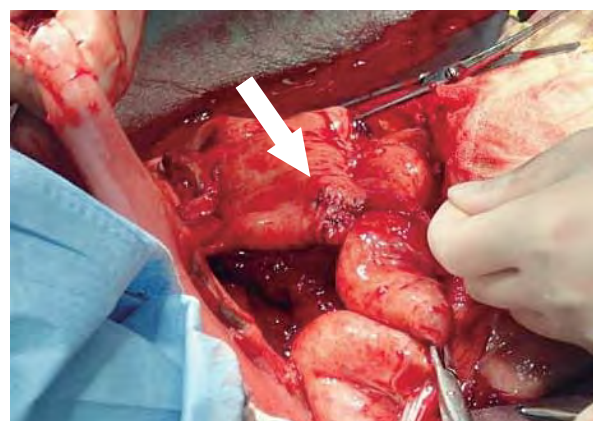
(図11)



(写真14)ステイプラー挿入部(抜いた後：矢印)

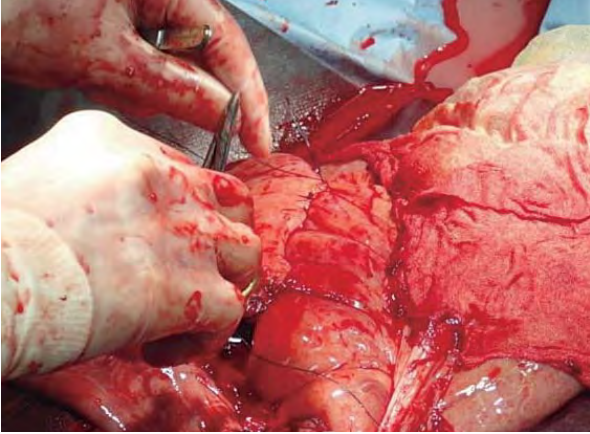


(写真13)装着完了したところ。このあと青いレバーを押すと片側2列(合計4列)のステイプラーが打ち出され、同時にその間をカッターが走り切開することで側々吻合が一瞬のうちに完成する。



(写真15)ステイプラー挿入部(矢印)は2層の内反縫合(連続レンベルト縫合)により閉鎖する。

GIA (gastrointestinal anastomosis)ステイプラー (図12)は、4列のステイプルの刺入と同時に真ん中をカッターが走り、片側2列のステイプルでの閉鎖と



(写真16) 支持系からステイプル列までの約5cmを #2-0 のVICRYL®で縫合して補強する。

空盲腸吻合術:術後合併症

- 再灌流障害
- 宿便
- 回腸膿瘍
- 腸間膜裂孔内への嵌頓
- 吻合部の盲端
- 長期的な盲空腸逆流?




(図13)空盲吻合術の術後合併症


【空腸端々吻合】

生存性の判定


動脈絞窄 vs 静脈絞窄
生存性に差なし



グレード I



グレード II




グレード III

(図14)腸管の生存性の判定(グレード I ~ III)

腸管の生存性


- ・グレード IV および V の腸管は生存できない。
- ・グレード III の腸管は生存できるが、臨床判断が必要となる。

グレード IV



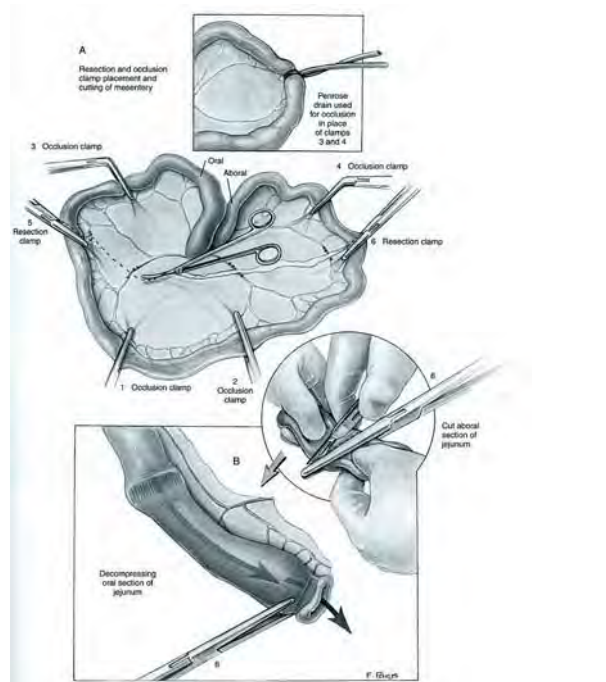
触診に反応しない

グレード V

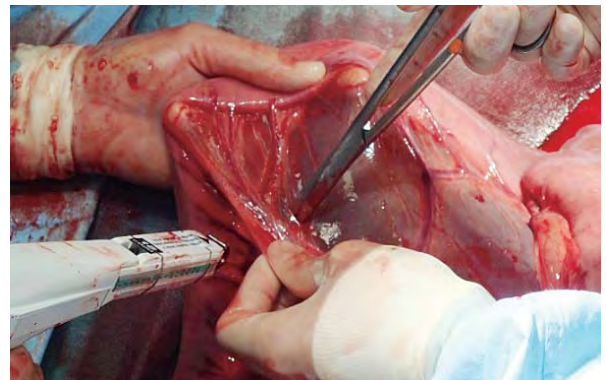


特徴的な臭気を放つ壊死腸管

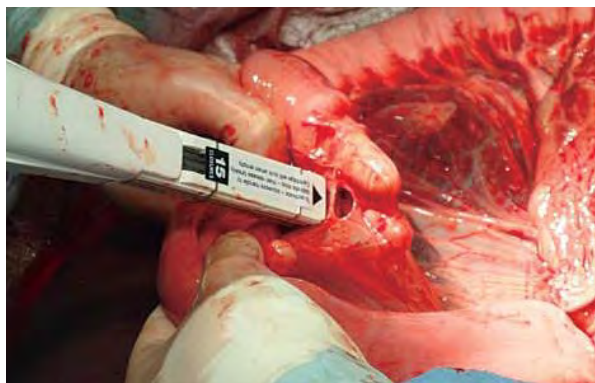
(図15)腸管の生存性の判定(グレードIV, V)



(図16) 切除する腸の両端には、15 ~ 30cmの正常な腸管を含めるべきである。切除線は主要な腸間膜動脈に隣接させ、対腸間膜側の血流を可能な限り確保する。大きな弓状の脈管はできるだけ残す。切除範囲を決めたら、先に腸間膜の血管の処理を行う。



(写真17)



(写真18)

(写真17, 18) 結紮ならびに切断にはPowered LDSを用いた。これにより、血管の切断とその近位・遠位の閉鎖が同時にできるが、近位については糸でもう1回結紮したほうが安全である。

Powered LDS (Ligate結紮 - Divide分離 Stapler)の解説



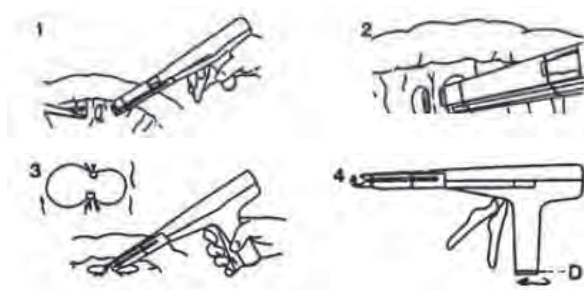
本品は、2個のチタン製ステイプルがカートリッジの顎の中の組織(血管など)を結紮し、ナイフが結紮した2個のステイプル間の組織を切断する。ハンドルを握ることでガスが噴射され、打針、切離される。

(操作方法)

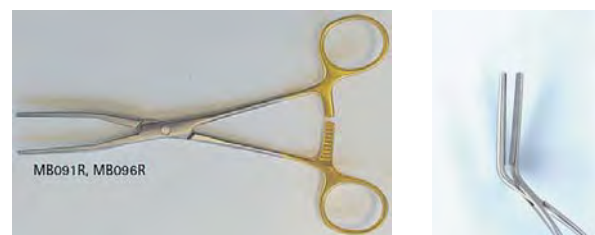
1. 結紮、切断する組織を遊離する(上の写真左)。
2. カートリッジの顎を組織にセットする(上の写真右)。ハンドルを握る前に組織が顎の中に完全に入っていることを確認すること。
3. ハンドルを完全に握り、顎の中の組織を結紮・切断する。そのあとハンドルを解放する。打針している間は組織を引っ張らないこと。
4. 本品には、ステイプルがなくなった場合にはナイフが組織を切断しないように安全装置がついている。そのため、15針すべて使い切ったあと

それに気付かずに結紮しようとするロックされて外れなくなる。その際には、持ち手の下のノブを回すとガスが抜け、顎が開き外すことができる。

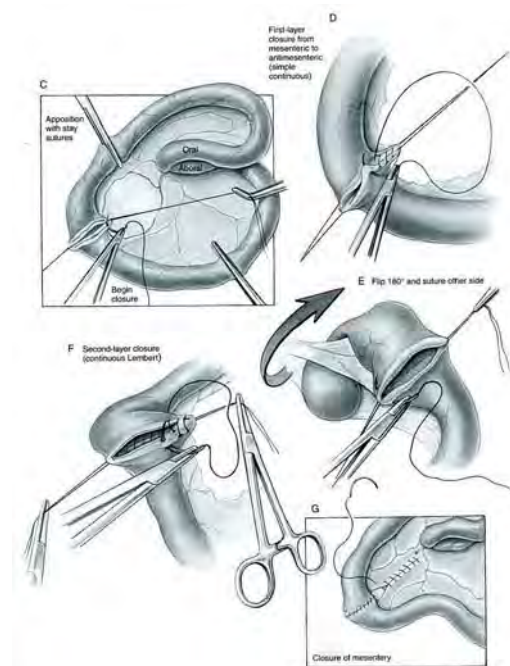
5. 替針はないため使い切ったら廃棄する。



腸鉗子には、今回はドヤンを用いたが、Fogarty Clampを推奨していた(写真19)。鉗子は約60度の角度で腸管を挟んで切除線を決定することで空腸の対腸間膜側の血行を十分に確保し、また吻合部の直径をわずかに増大させることで癒合後の狭窄を防ぐ。



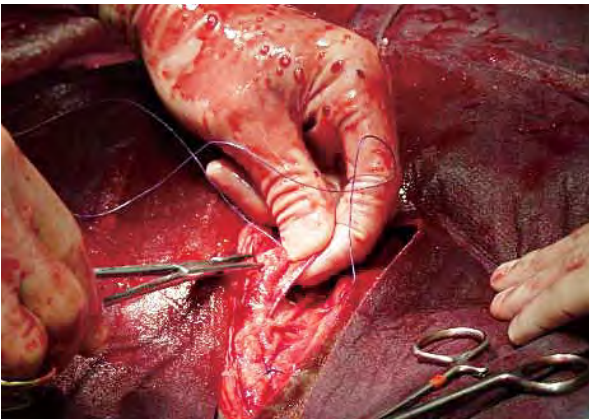
(写真19) Fogarty Clamp



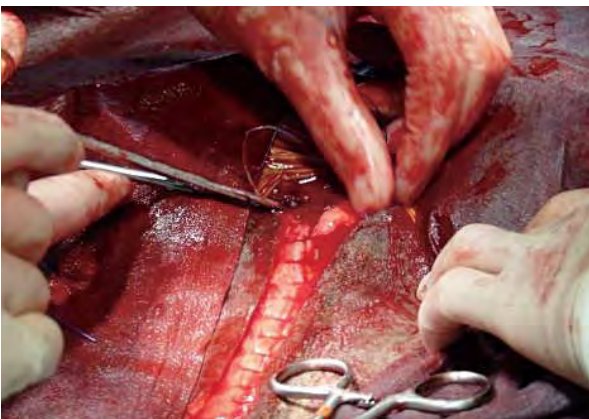
(図17) 2層縫合での吻合例

吻合に使用する糸は#2-0のVICRYL®を用いた。粘膜は縫わず、1層レンベルト縫合で縫合間隔は約4mm。縫いしろは、なるべく断端近くを取って内反しすぎないようにするが、吻合する腸管の径が一致しない場合、太いほうは大きく内反させ、細いほうは小さく取ることによって調整することができる。小腸の吻合は1層でも2層でも術後成績は変わらないという報告があるとのこと。

【閉腹】



(写真20)閉腹には、まず腹膜を#2のVICRYL®で連続縫合する。腹膜を縫うことで腹腔内の汚染から腹壁を守ることができ、また脂肪織が腹壁に挟まるのを防ぐことができるとのこと。



(写真21)腹壁も#2のVICRYL®で連続縫合した。単結節や十字結節縫合よりも連続縫合のほうが強度が高いとのこと。最初の1針は切開長より長い位置から始めると結び目にかかるストレスを軽減することができる。縫合間隔は1.5cmであるが強さは思いのほか緩かった。

皮膚はステイプラーを使用し約7mm間隔で縫合。私たちよりも密に縫合していた。密に縫うことで汚染を防ぐことができるとのこと。



(写真22)



(写真23)

(写真22, 23)懇親会の様子

今回の研修会には、本会内外合わせて60名以上が参加しました。White先生の話は長年の経験を反映した示唆に富んでおり非常に興味深く、講義のあとの質疑応答や実習後の懇親会では参加者からの質問が絶えず、予定時刻を大幅に超えてしまったほどでした。

今回の研修会をきっかけにして、本会の急性腹症に対する診断や開腹手術技術が格段に向上することを期待します。

最後に、今回の研修会の開催にあたりご尽力いただいた多くの関係者の方々に心より御礼申し上げます。

衛生情報

エクワイン・ディジーズ・クォーターリー（2014年2号）の紹介

時事解説

「私の訃報は大げさだった。」（マーク・トウェイン、1897年）

ソーシャルメディアの急激な普及は、人間の本质を変えていない。信頼できる根拠の有無にかかわらず、噂、推測、ゴシップや中傷的な非難を伝えようとする傾向は、言語そのものと同じく人間の本质の一部である。しかしながら、現在ソーシャルメディアがそのような情報を馬産業に行き渡らせる速度は、これまでとは異なり、憂慮すべきものである。

例えば、2011年に、複数の州において流行したウマヘルペスウイルス1型感染症がユタ州オグデンにおける馬事イベントを中止に追い込んだように、危機的な出来事は経済的あるいは心理的に強く影響し、馬産業を脅かす。ソーシャルメディア上で共有された疾病流行に関する情報のいくつかは正確であり、その役目を正しく果たした。その一方で、他の投稿には誇張されたり、あるいは完全な虚偽であり、間違った認識や不要な過剰反応を生み出すものもあった。

ソーシャルメディアが氾濫する世の中で、危機発生時の円滑なコミュニケーションには、馬産業のあらゆる階層の個人が関わる。リスクおよび危機発生時のコミュニケーションに携わる専門家によって行われてきた20年間におよぶ研究は、危機に際して共有されてしまう不正確なメッセージに対抗するためのいくつかの適した提案を我々に与える。

1. 有識者は、情報を公開し正直に伝える必要がある。公開されるべき情報が改ざんあるいは隠蔽されることによってもたらされる悪影響はよく知られている。そうすることで、馬の健康を危険にさらしたり、社会の信頼を損ねたりする。
2. 前もって自分達のネットワークや情報発信者を知っておく必要がある。全ての業界が危機に対して

脆弱であるが、常に危険管理を取り入れている業界は比較的少ない。環境が適切に整ったネットワークやそのネットワークを介して信頼できる情報発信者が通信するための方法を持つことは重要不可欠である。TwitterやFacebookなどのソーシャルメディアの場が、政府機関や業界のリーダーにそのようなネットワークを積極的に確立するための前例のない機会を与える。

3. 社会的関心を認識すべきである。たとえ我々が、ソーシャルメディアを駆け巡る問題が間違っていると信じていても、我々が応答しないことによって噂が広がる余地を与えてしまう。我々はしばしば、虚実の問題に対して実体として対応する必要がある。
4. 早期かつ頻繁に情報発信すべきである。ケーススタディや実験では、有事の際、情報源が初期に情報を発信していたら、より信頼されるということが示されている。話が広がってから応答すると、信頼性を著しく損なう。
5. 話の両面を認識することである。危機発生時のコミュニケーションにおけるメッセージ発信に関する調査では、広められている非難を認識し、それらがなぜ、正しいのか、あるいは誤っているかということ体を系統的に説明する発信者が圧倒的に優位に立つことが明らかになっている。憶測あるいは事実と異なる非難を単純に無視し、自分の立場を主張する行為は、周囲には傲慢で到底信頼できないと思われる。
6. 危機感を持つ者に対しては、何か有意義なことをやらせるべきである。驚くべきことに、伝統的な、あるいは新たなメディアを通じて伝えられる危機発生時のメッセージに関する広範な調査によると、脅

威を強調するものの方が、自己防衛を推奨するものよりはるかに多い。ソーシャルメディアに氾濫する情報から正しい情報を得ることよりも、誤った情報に翻弄される脅威について強調した内容がはるかに多い。脅威の回避または対処法を提案することによって、危機発生時のメッセージの信頼性を大幅に向上させ、合法的に危機の影響を減少させることができる。

多くの研究に基づいたこれらの6つの提案に従うことは、危機対応において成否を分ける可能性がある。

連絡先：Dr. Timothy Sellnow

(859)257-7805, tim.sellnow@uky.edu

Department of Communication

University of Kentucky Lexington, Kentucky

国際情報

2013年第4四半期(10月～12月)*

英国ニューマーケットの国際健康情報センター(ICC)をはじめとする諸機関から以下の疾病発生が報告された。

腺疫がデンマーク、フランス、ドイツ、スウェーデンならびに米国で発生した。デンマークでは、乗馬学校において50頭のウマのうち15頭が腺疫と診断され、そのうち2頭を安楽死処分する必要があった。フランスでは、4件発生した。ドイツでは、1例が腺疫と診断された。スウェーデンや米国では、腺疫は風土病とされ、インディアナ州、ケンタッキー州、ノースカロライナ州やバージニア州を含む米国のいくつかの州においては多数の発生が確認されている。

ドイツ、英国ならびに米国では、インフルエンザが発生した。ドイツ(1件)と英国(2件)では、それぞれ単発で発生した。米国では、カリフォルニア州、インディアナ州およびニュージャージー州などのいくつかの州において発生し、ウマはさまざまな程度の臨床症状を示した。

米国のみで、いくつかの州で繁殖馬において、馬動脈炎ウイルス感染が血清学的に診断された。

馬ヘルペスウイルス1型および4型(EHV-1, 4)に関連する疾患が、フランス、ドイツ、アイルランド、

日本ならびに英国で報告された。馬ヘルペスウイルス4型に起因する呼吸器疾患がフランス(12件)、ドイツ(4施設で7例)、英国(5件で罹患馬頭数はわずかであった)で発生した。

馬ヘルペスウイルス1型による流産がドイツ(1件)、アイルランド(4件)、日本(2施設で3件)、スウェーデン(1件)、英国(2件)、米国(3件)で発生した。発生施設の多くは単発での発生であった。

馬ヘルペスウイルス1型に起因する神経疾患がフランス(乗馬学校で1件)と米国(2件)で発生した。1件は競馬場で発生し、神経病原性変異株ではない通常型の株によるものであった。米国のもう1件は、乗馬学校で発生した。4頭が死亡したかあるいは安楽死処置が必要であった。これらの馬に接触した他の5頭の発熱馬も含め、馬ヘルペスウイルス1型の神経病原性変異株の感染が確認された。

馬ヘルペスウイルス2型と5型感染が米国で少数発生した。

馬ピロプラズマ病がフランス(風土病)と米国(クォーターホースの競走馬1頭の*Theileria equi*感染)で発生した。

ドイツと米国において、サルモネラ症が単発性あるいは集団で発生した。ドイツではグループBによるサルモネラ症が1例、米国では複数の施設で13例発生した。

*Lawsonia intracellularis*による馬増殖性腸症が、ケンタッキー州(16例)やオハイオ州(1例)などのいくつかの州で仔馬に発生した。

馬単球性エールリヒア症が、テキサス州で1例発生した。

C. perfringens A型によるクロストリジウム腸炎症例が米国のいくつかの州で報告された。また、*C. difficile*感染症例も2例発生し、いずれもケンタッキー州における発生であった。

レプトスピラ感染症による流産が、フランス(1例)と米国(6例)で発生した。

第4四半期において、米国の22州で発生している年間合計183例のうち40例の東部馬脳炎が確認された。サウスカロライナ州(49例)、フロリダ州(34例)およびジョージア州(25例)では、2013年における発

*オーストラリア第3四半期レポートより

生数が最も多かった。

ウエストナイルウイルス脳炎が米国で発生した。この3か月間で合計41州において201例が発生した。発生数が多かったのは、テキサス州(60例)、オクラホマ州(41例)、モンタナ州(27例)であった。

馬ヘンドラウイルス感染症が、2013年の第3四半期にオーストラリアで発生した。ニューサウスウェールズ州の別々の4施設とクイーンズランド州の1施設においてそれぞれ単発性に発生した。

スイスで非定型ミオパシーが1例発生した。

ウマにおけるメチシリン耐性黄色ブドウ球菌ST398型の出現

オランダでは2005年に、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)感染がブタと接触した人々に突然発生し、新型のMRSAクローンであるST398型が分離された。このクローンは、すぐに「家畜に関連する」MRSAとして知られたが、最近の研究によって、もともとヒト由来のメチシリン感受性株が、ヒトからブタに感染し、メチシリン耐性を獲得し、ヒトに適応したいくつかの性質を失ったことが示唆される。

いずれにせよ、ST398型MRSAはどのように呼ばれようとも、一部の地域においては、ヒトや動物にとって重要である。この細菌は、世界中のブタから分離されており(牛や家禽などの他の家畜では少ない)、また家畜と接触のある人々からも一般的に分離されている。いくつかの北欧の国々では、この細菌はヒトのMRSA感染症の主な原因である。

ウマのMRSA感染症は、1990年代後半に初めて報告された。MRSAは、多くの地域のウマに常在しており、健康馬の保菌している割合は低く(一般的に3%未満)、散発的な感染や流行の発生を引き起こすことがやがて明らかとなった。

少数の動物由来の感染例と合わせて、ウマのオーナーやウマの獣医師がMRSAを保菌している割合が異常なほど高いことも報告されてきた。2000年代後半まで、ウマから分離されたMRSAの大半がヒトで流行していたクローンと同一であったことは(例えばST8型)、ウマのMRSAは結局のところヒトに由来することを示唆する。

しかし、近年はウマにおいてST398型が分離されたことによって、潜在的な新たな懸念が生じている。

現在ST398型は多くの欧州諸国のウマや、カナダでも1頭のウマで報告されている。ウマからヒトへの感染症例も報告されてきた。さまざまな保菌率(0.5～11%)が報告されており、ST398型は、ヨーロッパのいくつかの地域では、他の菌株に取って代わり、ウマにおけるMRSA感染症の主な原因となっている。どのMRSA株にも言えることは、皮膚や軟部組織の感染、手術部位の感染、肺炎、カテーテル挿入部位の感染、乳房炎、子宮炎など、さまざまな臨床症状の感染例が報告されていることである。

ウマにおけるST398型の出現が、ウマでの臨床症状の変化に関連しているのか、特定の地域や農場の種類に限定した問題であるのか、あるいは、単に限られた臨床例において優先的な株へ移行しているのかは、検討すべきである。北欧以外のウマでは、(現時点において)ST398型は稀であると考えられるが、ウマの移動を考慮すれば、ウマが、この動物とヒトの病原体が世界的に伝播する一助になりうることを示している。

ウマのオーナーと獣医師は、MRSA(ST398型など)の危険性に注意して、以下を実施すべきである。

1. 基本的な感染症対策の日常的な実施
2. すべての感染動物に対する強化された感染症対策の実施
3. 慎重な抗生剤の使用
4. 日和見感染している動物からの細菌分離培養と薬剤感受性試験の実施のルーチン化

この家畜に関連するMRSAクローンの出現は、食用家畜と直接的あるいは間接的に接触するウマで見落とされがちな、病原体暴露の可能性を強調する。

連絡先: Dr. J. Scott Weese

(519)824-4120, Ext. 54064, jsweese@uoguelph.ca

Ontario Veterinary College, University of Guelph
Guelph, Ontario, Canada

伝染性リンパ管炎

伝染性リンパ管炎は、二形性土壌真菌である*Histoplasma capsulatum* var. *farcinosum* に起因するウマの全身性感染症である。ロバはウマやラバと比較して、感染しにくい。これまでに本症はラク

ダやウシで報告されており、またヒトにおいてもまれではあるが報告がある。

本病は多くの国で根絶してきたものの、特に北アフリカ、アジアおよび中東諸国におけるウマ科動物については、依然として問題となっている。本病は接触伝染性であり、感染性の分泌物の吸入や皮膚接触、汚染された馬具や媒介昆虫を介して動物間に蔓延していく。病原体の進入経路としては、皮膚の創傷部が最も一般的である。

本病には、皮膚型、眼型あるいは呼吸器型の3型が存在する。皮膚型は最も一般的であり、慢性、化膿性、潰瘍形成を伴う肉芽腫性の皮膚炎およびリンパ管炎を発症する。初期の結節は全身に発生するが、特に下肢部、胸部および頸部に認められることが多い。結節は破裂すると濃い膿を排出し潰瘍性の病変部となり、その後癒痕化し治癒に至る。病変はリンパ管に沿って局所性に進行して、所属リンパ節の腫脹を伴い、数珠状やひも状となる。結節の潰瘍形成と治癒を繰り返す。

粘液膿性の滲出を伴う角結膜炎は、眼型の特徴であり、ロバにおいて最も一般的な型である。呼吸器型は、粘液膿性鼻汁の排出が認められ、これに続いて発咳や呼吸困難を呈する。

三型全てに共通して、疾病が慢性に経過することにより衰弱や食欲不振が認められる。使役動物の場合、もはやその役割を果たすことは不可能となり、特に獣医医療を利用できない場合やあるいは経済的な理由で利用しない場合、安楽死処置が容易に受け入れられない場合は、オーナーによる飼育放棄につながる。回復する場合もあるが、その免疫のメカニズムや保菌状態の可能性については解明されていない。

野外における伝染性リンパ管炎の診断法は、破裂していない結節から吸引して得た材料の塗沫標本を用いて病原体を同定することである。酵母は、直径2～5 μ mの卵形～球形の多形性であり、細胞外およびマクロファージ内に認められる。病原体は、グラム染色を行うと通常「ハロー」に囲まれて存在し、これは鼻疽との迅速な鑑別診断として有用である(臨床的には鑑別困難)。病原微生物の培養は可能であるが、困難である。Histofarcin skin test (ツベルクリンおよびマレインテストに類似)が開発されてきたものの、本法にはさらなる検証が必要とされて

いる。血清学的診断方法が報告されているが、市販されていない。*H. capsulatum* var. *capsulatum*に対するポリメラーゼ連鎖反応(PCR)が開発されており、将来的にその応用が期待される。

本症に対する治療には、問題が多い。アンホテリシンBが第一選択薬となっているが、本病は発展途上国における貧しい人々が所有する使役動物で発症していることが多く、最新の抗真菌薬が利用されることは稀であり、また手頃な価格とも言い難い。より一般的な治療方法としては、ヨウ化物の全身投与(ヨウ化カリウムの経口投与またはヨウ化ナトリウムの静脈内投与)と局所的な結節の切除およびヨードチンキの局所投与が適用されている。治療期間は長期に亘り(3～4週間)、所有者による服薬遵守は難しい。治療開始は早ければ早いほど、その成功率は向上する。

歴史的に、感染動物の殺処分、厳重な衛生管理および移動制限を重点的に行うことによって、本疾病の拡散は制御されてきた。これらの方法は、風土病となっている地域においては実行困難であることが多い。特に発展途上国では、所有者に対して、創傷予防、媒介昆虫の管理、馬具類の管理、初期の治療、そして病状が進行してしまった症例に対する安楽殺処置の奨励について教育することに重点が置かれている。

このなおざりにされてきた疾患は、使役馬の福祉に大きな影響を及ぼし、獣医医療の利用が困難であり、生計を動物に依存している多くの貧しいオーナー達にとって経済的に重要である。感染経路、危険因子、免疫を完全に解明するためや、野外における診断法や、簡便、低価格で現場で実施可能なきちんとした治療法を開発するためには、より多くの研究が必要である。

連絡先: Dr. Karen Reed

karen@thebrooke.org

Head of Animal Welfare and Research

The Brooke, London, United Kingdom

ウマのボツリヌス症

ウマのボツリヌス症は世界的にも報告されているが、ケンタッキー州と米国東部の中部大西洋沿岸地域で最も頻繁に報告されている。本疾病は、また、

shaker foal syndrome、飼料中毒、グラスシックネスとしても知られている。

ボツリヌス症は、*Clostridium botulinum*の神経毒によって引き起こされるウマの神経筋疾患であり、シナプス前軸策における様々なボツリヌス神経毒の作用によって、シナプスへのアセチルコリンの放出が阻害され、弛緩性麻痺となる。3タイプのうち、B型ボツリヌス菌症は、米国全土のあらゆる場所で発生するが、主に中部大西洋沿岸地域の州とケンタッキー州で多く発生する。A型ボツリヌス菌症は主に西部で発生し、C型ボツリヌス菌症はフロリダ州で発生する。ボツリヌス神経毒B型とC型が仔馬において最も一般的に報告される。

ボツリヌス症は、主に3つの経路による毒素への暴露の結果起こる。動物の死骸を含む干草や穀物などの採餌時に毒素前駆体を摂取することが、成馬に対する最も一般的な暴露形式である。ボツリヌス菌を嚥下し、腸で毒素が活性型となった場合には、1～3ヶ月の仔馬に見られるshaker foal syndromeとして知られている。本疾患は早ければ生後1週で発生することがある。まれであるが、本菌が創傷感染し、体内において毒素を放出することにより疾病を引き起こす。

毒素への曝露後における臨床徴候の出現は、12時間から数日以内に起こり、ボツリヌス神経毒素の量および種類によって異なる。1頭あるいはそれ以上の馬が、原因不明で突然死亡した場合、発生の最初の徴候の可能性がある。初期症状として、唸、舌および尾の緊張の減少が認められることがある。歩行可能なウマでも、運動失調まで行かないが、ぎこちなく歩幅の短い歩様を示すことがある。筋肉の震えや衰弱は、特に仔馬において明瞭である。瞳孔対光反射の鈍化を伴う瞳孔散大や嚥下困難(嚥下障害)が頻繁に観察される。臨床症状は急速に悪化し、ウマは横臥する。頻脈は特に仔馬において起こることがある。一般的に、死は呼吸筋麻痺に続発する呼吸不全に起因する。

診断は、臨床徴候に基づいて行われる。確定診断には、酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)、ラジオイムノアッセイ(RIA)あるいはポリメラーゼ連鎖反応(PCR)によって血清、糞便、胃腸内容物あるいは餌に含まれる毒素を検出する必要がある。特異的な

毒素活性はマウス接種試験によって確認され、また血清、糞便、胃腸内容物あるいは餌から*Clostridium botulinum*を分離することで裏付けられる。

治療法は、特異的な抗ボツリヌス神経毒素抗体(一般的にB型あるいはC型に対する)を含む血漿の静脈内投与によって毒素を阻害することによる。補液、栄養療法、抗生剤投与や呼吸器の支持療法などの対症療法が重要である。軽度の呼吸器症状を示す成馬や仔馬に対しては、経鼻的な酸素吸入と胸骨臥位の姿勢で治療することが多い。人工呼吸は仔馬の救命に使用できる。嚥下障害による誤嚥性肺炎などの合併症を予防あるいは軽減させるために、抗生剤が投与される(プロカインペニシリン、アミノグリコシド系やテトラサイクリン系の使用は避ける)。仔馬には留置した鼻腔栄養チューブやあるいは経鼻食道チューブを介してミルクやミルク代用品を給与することで栄養管理が可能である。その一方で、成馬に対しては、断続的に鼻腔栄養チューブを挿管してスラリー状にした餌あるいは市販の流動食を投与することができる。

B型ボツリヌス菌症を発症した生後6ヶ月齢未満の仔馬が適切な治療を受けた場合、その生存率は90%以上である。罹患した成馬で、起立している場合には、回復するまでには時間がかかるものの、予後は良好である。その一方で、横臥してしまった成馬の場合は、生存する可能性は低い。*Clostridium botulinum* B型トキシソイドを用いたワクチン接種は、成馬においてB型ボツリヌス菌症をほぼ100%予防できると考えられており、流行地域で実施されるべきである。母馬から仔馬への受動免疫の移行が適切であれば、妊娠牝馬のワクチン接種は、仔馬への受動免疫の移行が適切であれば、少なくとも部分的には仔馬を防御できるであろう。

連絡先: Dr. Pamela Wilkins

(217) 333-2000, pawilkin@illinois.edu

University of Illinois, College of Veterinary Medicine
Champaign-Urbana, Illinois

ケンタッキー州における2013年のEIA調査と検査

2013年1月～12月までの間に、ケンタッキー州内で得られたとされるウマの血清77,001検体で馬伝染性貧血(EIA)が検査され、陽性馬は1頭も検出さ

れなかった。これらのうち73,549検体は、ウマのセールや展示会におけるケンタッキー州の規則、あるいは州間の輸送要件(自衛検査)を満たすために検査された。残りの3,452検体は、我々の、飼養動物のマーケット調査プログラムの一環として検査された。この調査で、検体を採取し検査されたウマは、その多くが由来する飼育(生息)環境や「取引経路」が要因の一部となり、EIAに暴露する危険性が高いと考えられる。

自衛検査が2012年から4.7%減少したことと比較し、同期間におけるマーケット調査の検査は70%も減少した。自衛検査のわずかな減少は、景気が回復しきっておらず、それがレクリエーション用途のウマの州間の移動に影響を与えたためかもしれない。ケンタッキー州のマーケット調査プログラムで検体採取したウマの数が著しく減少したのも、また低迷する景気にある程度起因していると考えられるが、現実として、ウマの取引を継続している市場がわずかしかないことにより、さらに減少が目立ったものとなったのであろう。1990年から2013年までの24年間に、マーケット調査プログラムを通じて369,441検体が集められ、検査の結果、129頭(0.03%)のウマが陽性であることが判明した。比較してみると、自衛検査では、同期間において180万以上の検体が検査され、92頭(0.004%)のウマが陽性であった。ケンタッキー州では、2007年に1頭の陽性馬が検出されたのが最後である。

図1は、過去24年間の、年ごとの総検体数とマーケット調査プログラムでの検体数を示す。これらのデータは、検査されていないウマの頭数が潜在的

に増加していることを裏付け、歴史的に見て疾病の危険性が上昇していることを示す。特定できる集団における長期に亘る一貫性のある正確な疾病調査は、新たに発生したウマの疾患の罹患率、疾病の流行状況を評価するのに役立ち、またそれに関連するリスクを特定し、軽減するための方策を作成するうえで役立つ。

連絡先：E.S. Rusty Ford

(502)564-3956, Rusty1.ford@ky.gov

Equine Programs Manager, Kentucky Department of Agriculture

Frankfort, Kentucky

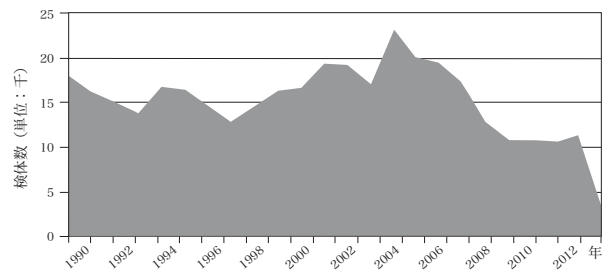
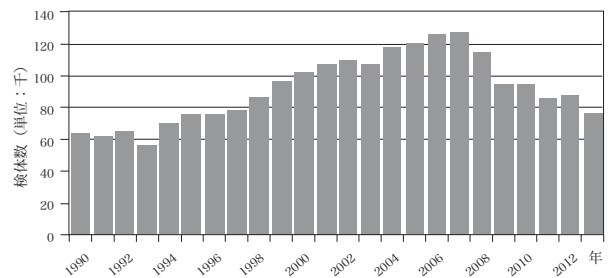


図1. EIA検査および調査 1990年～2013年

文献紹介

大結腸左背側変位を発症した142頭の馬について、 治療法決定と治療直後の生存率に関連した要因の解析

Nephrosplenic entrapment of the large colon in 142 horses (2000–2009): Analysis of factors associated with decision of treatment and short-term survival
C. LINDEGAARD, C.T. EKSTRØM, S. B.WULF, J. M. B.VENDELBO and P. H. ANDERSEN
Equine Vet. J. (2011) 43 (Suppl. 39): 63-68.

つくばレースホースクリニック 石川貴士

【はじめに】

馬の大結腸左背側変位は、大病院に来院する疝痛馬の原因の9%を占めている。過去の報告では、大結腸左背側変位馬は外科療法を行う行わないに関わらず、予後が良く、生存率は84.2%～95.9%とされている。

一般的に外科療法は様々なリスクがあるため、大結腸左背側変位の治療に関しても保存療法(外科療法を行わない)をもっと取り入れた方が良いと思われる。そこで、コペンハーゲン大学の大動物病院では、保存療法を大結腸左背側変位の主な治療方針とすることにした。

この研究の目的は上記の治療方針に基づく生存率を求めること、ならびに予後判定に関連する要素と外科療法適応に関連する要素について調べることである。

【材料と方法】

2000年1月から2009年10月にコペンハーゲン大学の大動物病院に来院した急性疝痛馬の診療記録を用いた。なお、大結腸左背側変位の確定診断は、直腸検査・エコー検査・開腹手術所見を用いた。

取り入れた情報は、年齢、性別、品種、来院までの時間、直腸検査、心拍数、腸温、ヘマトクリット、痛みの程度(なし・わずかな・ほどほど・かなり)、腸蠕動音(普通か違和・なし)、胃への逆流(な

し[<2ℓ]・あり[>2ℓ])、腹部膨満(あり・なし)、血漿乳酸値、血漿グルコース値、血漿タンパク値、腹水のタンパク値、腹水の白血球数、粘膜スコア(0;CRT<2秒で正常色・1;CRT=2～3秒で正常色か淡い充血色・2;CRT>3秒か重度の変色)、治療法(保存療法・外科療法)、入院期間、治療直後の生存率であり、これらについて比較・分析した。

なお、保存療法については、絶食、補液、鎮痙攣薬投与、鎮痛薬投与を行った。また、馬房で馬自身が転がる動作を行っても、自由にしておいた。

【結果】

1576頭の疝痛による入院馬のうち、142頭(9%)が大結腸左背側変位であり、品種については、温血種が71頭、ポニー種が13頭、アイスランド種が7頭、その他が40頭、品種不明が11頭であった。そのうち114頭(82%)を保存療法で治療し、25頭(18%)を外科療法で治療した。他の3頭に関しては外科療法適応であったが飼主の経済的理由で安楽死とした。

治療後の生存馬は全体で130/142頭(91.5%)であり、そのうち保存療法馬が110/114頭(96.5%)、外科療法馬が20/25頭(80%)であった。

外科療法を行った馬は、胃への逆流あり・痛みの増加・腹部膨満ありに対して、高い関連性があった。

治療直後の生存率に関しては、心拍数と治療法選択に対して、高い関連性があり、心拍数が高い馬や

外科療法を選択した馬は生存率が悪かった。

また、外科療法馬は、保存療法馬よりも有意に長く入院していたという結果が出た。

【考察】

今回、大結腸左背側変位を発症した142頭を調査し、そのうち82%は保存療法(全身麻酔下でのローリング法も行わず)にて治療を行った。外科療法を行った馬も合わせると、全体の生存率は91.5%であった。この生存率数は、過去のいくつかの文献と同様の値を示していたが、過去の文献では保存療法

よりも外科療法の割合が圧倒的に高かった。

外科療法は即効性の治療法であるが、麻酔のリスクや合併症の可能性もある。手術費や入院費などの経済的負担も多く、腹側正中線切開を行った場合は、4から6ヶ月の長い回復期間が必要となる(保存療法では数週間で済む)。

これらのことから、外科療法の必要性も注意深く考慮しながら、大結腸左背側変位は主に保存療法で治療すべきである。なお、外科療法を選択する時は、胃への逆流・痛みの増加・腹部の膨満を参考にすれば良い事が今回の研究で判明した。

文献紹介

ウマ多血小板血漿の活性化：活性化方法の比較とウマ自己トロンビンの特性

Activation of Equine Platelet-Rich Plasma: Comparison of Methods and Characterization of Equine Autologous Thrombin

Jamie A. Textor, DVM, Diplomate ACVS and Fern Tablin, VMD, PhD
Veterinary Surgery 41 (2012): 784-794.

競走馬総合研究所 臨床医学研究室 福田健太郎

多血小板血漿 (PRP) は、その安全性と作製法の簡便さから、世界のウマ臨床において多用されるようになり、その有用性が数多く報告されるようになりました。近年ではその効用の原因が、血小板の α 顆粒に含有されている各種成長因子の「カクテル」によるものと考えられています。しかし PRP の作製方法や使用方法については依然として統一見解がないのが現状です。血管内を循環している休眠状態の血小板を PRP として活用するには、どのタイミングで、どんな方法で活性化させ、血小板から有効成分を放出させるべきなのか。この論文は PRP を活用するためのベスト条件を模索した報告の一例です。なお、この分野に疎い方にも理解しやすいように一部意識しています。また、著作権の問題から、図表に関しては原文を参考にして下さい。

PRP を活用するためには、濃縮された血小板を活性化し、 α 顆粒に含有されている多種の成長因子や凝固因子を放出させることが重要であると考えられている。ヒト臨床では、ウシトロンビンか塩化カルシウムを血小板活性化の手段として使用する方法が一般的であり、ウマにおいても同様の活性化処理が行われている。しかし多くのウマ臨床医は、PRP の能力を最大限発揮させるための活性化に関するデータがないために、活性化不十分のまま、場合によっては休眠状態のまま PRP を使用している。この状態で PRP を用いてもそれなりの効果が得られると報告されてはいるが¹⁾、この方法では PRP が含有しているごく一部の成長因子しか放出されていない可能性も近年報告された²⁾。今回我々はウマ PRP を効果的に治療に用いるために、血小板活性化を行うための最も効果的な方法を模索しなければならないと考え、

実験を行った。また同時に、ウマ自己トロンビンの濃度と活性を調査した。

【材料および方法】

・被験馬

各実験について、様々な種、年齢、性別の成馬6頭を使用した。

・PRP作製法

抗凝固剤 ACD-A 液 (訳者注: クエン酸三 Na 加液) を 10% 混入して血液を採取し、卓上遠心機によって作製した。血小板凝集阻害剤は使用しなかった。それぞれの実験において、PRP 中の血小板数を全 PRP の最低濃度であった $770 \times 10^3 / \mu\text{L}$ に揃えるために、乏血小板血漿 (Platelet Poor Plasma; PPP) で希釈し、血小板濃度を全血中の 5 倍に濃縮した。休眠状態の

PRP上清をネガティブコントロールとし、Triton中で溶解し血小板細胞膜を破壊した休眠PRPをポジティブコントロールとした。

・ウマ自己トロンビンの調整法および特性確認法

トロンビンはヒト用で汎用されている生成キットをウマ用に転用して、業者説明書に従って調整した。調整したウマ自己トロンビンは -80°C で凍結保存し、使用時に氷上で解凍した。自己トロンビンは4つの異なる方法で評価した。まずトロンビン濃度を、特異的基質分解反応を利用して分光光度計により計測した。一度使用したトロンビンは、解凍後は再凍結や再使用はしなかった。次に自己トロンビン暴露後のPRPから放出された成長因子を測定した。そして自己トロンビンにより生じる血小板凝集量を測定することによりトロンビン活性を測定し、同程度の濃度のウシトロンビンによる血小板凝集量と比較した。最後にウマトロンビンの組成を調査するためにウエスタンブロットを行った。

・ウシトロンビン・ドーズレスポンス実験

適正なトロンビン濃度を調べるために、段階的に濃度勾配をつけたウシトロンビンでPRPを活性化させた。検査に使用したPRPには次のような処理を加えた：無処置(ネガティブコントロール)、TritonX-100 0.5% (ポジティブコントロール)、ウシトロンビン1U/mL、10U/mL、143U/mL。サンプルは室温で5分間インキュベートされ、その後21,000gで10分間遠心された。上清を採取し -20°C で凍結させ、その後成長因子測定を行った。トロンビン(143U/mLのみ)によって生じた凝集塊も凍結保存し、後に塩化カルシウムによって生じる凝集塊と比較した。

・血小板活性化方法の比較

10% 塩化カルシウム(100mg/mL)と高濃度(143U/mL)のトロンビンの混合による活性化を行うと成長因子が塩析反応を生じてしまうという報告もあり³⁾、この方法で活性化したPRPをELISAで測定しても信頼性に欠ける。この現象は、トロンビン単独または低濃度(3.4mg/mL=23mM)の塩化カルシウムによる活性化では認められない。さら

に、自己トロンビン濃度は143U/mLには及ばないほどの低濃度である。このことから、今回我々はトロンビンを評価する上で塩化カルシウムを添加せず、10U/mLの濃度で行った。

PRPの活性化は 1)自己トロンビン(10U/mL)、2)ウシトロンビン(10U/mL)、3)塩化カルシウム(3.4mg/mL=23mM)、4)PRPの凍結融解(血小板細胞膜の破壊により成長因子を放出させる)のいずれかの方法で実施した。トロンビン単独あるいは塩化カルシウム単独で活性化させたサンプルはガラスチューブ内で 37°C 30分間インキュベートし、生成した凝集塊の溶解液および凝集塊はクライオチューブにそれぞれ分けて保存した。凍結融解サンプルは、一昼夜 -20°C で保存された未処理のPRPを 37°C のウォーターバスで解凍し、遠心(21,000g、10分)後、上清を採取することで調整した。そして全てのサンプルは、成長因子測定まで -20°C で凍結保存された。

・成長因子測定

全サンプルは測定前に氷上で解凍され、攪拌された。凝集塊は溶解するまで10秒ほど超音波破碎され、遠心(21,000g、5分)された。得られた上清を成長因子測定に使用した。血小板 α 顆粒内に蓄えられている代表的な成長因子として、PDGF-BBおよびTGF- β 1の濃度をELISAにより測定した。

・凝集検査

ウシトロンビンと自己トロンビンによる活性化反応における差の有意性を測定した後、凝集懸濁度計を用いて、それぞれの光学的凝集検査を行った。PRPの血小板濃度は $500 \times 10^3 / \mu\text{L}$ とした。検査上でのベースラインはPPPを使用し、決定した。PRPに添加するトロンビン濃度は1、2.5、5 U/mLとした。凝集状態の観察は5分間行い、サンプルの透過度を可視的に評価した。

・トロンビンサブユニットのウエスタンブロット

同濃度のウシおよび自己トロンビンによって処理されたPRPで、凝集や成長因子放出について差異が認められた場合、その差異を説明するために、SDS-PAGEやウエスタンブロットによる組成分析を行った。自己トロンビン、ウシトロンビン、ウシア

ルファトロンビン、ヒトアルファトロンビン、ヒトベータトロンビン、ヒトガンマトロンビンを解析した。

【結果】

・ウマ血小板はウシトロンビンに対し濃度依存性の反応を示す

ヒト血小板において、ウシトロンビンの濃度の違いによって成長因子の放出量に変化することが報告されている。このため、ウマでも同様であろうと考えて実験を行った。その結果、PDGF-BB放出量については仮説の通りであった。すなわち、無処置群の数値はポジティブコントロールや他の全ての処置群に比べて有意に数値が低かった。ポジティブコントロールはトロンビン1U/mL群に比べ有意に大きい値を示したが、10U/mL群や143 U/mL群とは差がなかった。これは、これらのトロンビン濃度によってPRPに含有される全PDGF内容量の最大量、あるいはそれに近い量を放出させ得ることを示唆している。また、ウシトロンビンに対してPDGFは濃度依存性の反応を示した。

TGF β の放出量に関しては、無処置群の数値は他の処置群に対し有意に低かった。トロンビンによる濃度依存性の変化はPDGFと比べてTGF β は明らかではなかった。トロンビン143 U/mL群では、1U/mL群に比べ有意に高いTGF β の値を示したが、1 U/mL群と10U/mL群、あるいは10 U/mL群と143 U/mL群の間では有意な差は認められなかった。ポジティブコントロールでのTGF β の数値はトロンビン活性化群に比べ有意に高かった。これは、143 U/mLのような非常に高い濃度でのトロンビン暴露をウマPRPに行っても、TGF β 放出を最大限に誘導できないことを示している。

・活性化方法の相違によって、PRP中の成長因子の濃度構成が変わる

PRPを活性化させる4つの方法を比較したところ、自己トロンビンはPRP中の成長因子を放出させる効果が最も小さいことがわかった。塩化カルシウムによる活性化は他の方法に比べ有意に高いPDGF量を放出可能であることも判明した。

・自己トロンビンの特性

自己トロンビン濃度を測定した結果、13.6～93.6U/mL (平均(SD)=40.9 (28.98)、中央値=35.6)であった。一方、凝集検査の結果、ウシトロンビン(5 U/mL)では、同濃度の自己トロンビンや他種のトロンビンと比べて有意に高い凝集度を示した。また、ウエスタンブロットによって、自己トロンビンにはアルファ型およびベータ型トロンビンが存在し、ガンマ型トロンビンは存在しないことがわかり、その存在割合はウシに類似していることが判明した。

・凝集塊に含まれるPDGF量は活性化方法により異なる

凝集塊の中に成長因子がどれだけ含有されているのか調べるために、我々は塩化カルシウム(23mM)またはウシトロンビン(143 U/mL)で活性化させた後に形成された凝集塊およびその溶解液(凝集後の残りの液体成分)中のPDGFおよびTGF β 量を比較した。PDGFに関しては、塩化カルシウムによる活性化によってほとんどの因子が液体成分中に溶出されるのに対し、トロンビンによる活性化では、凝集塊内外での因子濃度がほぼ等しいという相違点が認められた。トロンビンで形成された凝集塊の中のPDGF濃度は、塩化カルシウムによる活性化で生じた凝集塊や溶解液中の濃度に比べて有意に高く、塩化カルシウムで生じた凝集塊中のPDGF量は他の全てに対して有意に低かった。TGF β については個体差が大きかった。特に凝集塊中の濃度でばらつきが大きく、塩化カルシウムとトロンビンによって形成される凝集塊や溶解液で比較しても有意な差は認められなかった。

・血小板活性化はPRP中の全PDGF内容量を増加させる

今回の実験で、高濃度のトロンビンや塩化カルシウムによるPRP活性化によって成長因子の分泌量が有意に増加することが確認された。これら2通りの活性化法で得られた全成長因子量(凝集塊および溶解液中)を、ポジティブコントロールと比較した。高濃度トロンビン(143 U/mL)による活性化後の凝集塊とその溶解液中のPDGF値を合算すると、ポジティブコントロールの値よりも有意に高い数値を示

した。同様の傾向はTGF β においても認められたが、ポジティブコントロールとの間に有意差はなかった。

【考察】

今回の結果は、PRP活性化の方法の違いで2つの成長因子の放出状況が変わること、ウマ自己トロンビンの利用は血小板活性化方法としては効果が低いということであった。また、体外でのPRP活性化後に形成される多血小板フィブリン塊には多量の成長因子が含有されているため、治療に使用する上で有益なものであろうと結論付けた。最後に今回の結果は、活性化処置はウマ血小板に含まれている成長因子量を放出させるだけでなく、PRP中の全PDGF量を増やしている可能性があることを示唆していた。ただ、トロンビンと塩化カルシウムでは活性化にかかる時間が大きく違い、前者では5分以内であるところ、後者では30分ほどかかる。このことが測定した成長因子量の変化に関与した可能性がある。

凍結融解法によるPRP活性化は、PDGFの放出という観点だと他の方法よりも劣るという結果が示された。塩化カルシウムによる活性化は確かに時間がかかるが、塩化カルシウム自体が安価であり、清潔であることや、本実験によって10U/mLの自己およびウシトロンビンや凍結融解法よりも23mM塩化カルシウムによる活性化によって有意に高いPDGFの放出を確認できたことから、臨床現場におけるウマPRPの活性化には塩化カルシウム単独が最適であろうと考えた。一方、高濃度のウシトロンビンにより、自己トロンビンや塩化カルシウムによる活性化に比べて迅速かつ効果的な活性化を行い得るという結果も得た。しかし、そもそもウシトロンビンの使用については絶対的な安全性を担保できるものではなく、ウマPRPを活性化させるのであれば他の方法を行うべきと考えている。ちなみに、塩化カルシウムをウシトロンビンと混合して使うと副作用を抑制することも知られている^{4,5)}。

今回我々は以上の結果をin vitroにおいて確認し

たが、今後はこれらの結果をin vivoで検証することで、ウマ臨床における活性化PRP適用の有用性を証明することができるだろう。

【訳者注】

今回筆者らは、その結果から塩化カルシウム(23mM)をベストの活性化方法として結論付けていますが、実験で得られたウマ自己トロンビン濃度は検証に用いたトロンビン濃度(10U/mL)よりも高く、濃度依存性効果を考慮すると、塩化カルシウムと同等あるいはそれ以上の効果をもたらす可能性があります。また、自己トロンビンを用いた活性化によって得られた凝集塊も調査していません。これらを調べることにより、PRPに自己トロンビンを加えて凝集させ、それを患部にapplyすることの本当の効用が明らかにされることでしょう。

(参考文献)

- 1) Bosch G, et al: Effect of platelet-rich plasma on the quality of repair of mechanically induced core lesions in equine superficial digital flexor tendons: a placebo-controlled experimental study. *J orthop Res* 2010; 28: 211-217.
- 2) Textor JA, et al: Effects of preparation method, shear force, and exposure to collagen on release of growth factors from equine platelet-rich plasma. *Am J Vet Res* 2011; 72: 271-278.
- 3) Baldwin RL: How Hofmeister ion interactions affect protein stability. *Biophys J* 1996; 71: 2056-2063.
- 4) Clark J, et al: Topical bovine thrombin and adverse events: a review of the literature. *Curr Med Res Opin* 2008; 24: 2071-2087.
- 5) Diesen DL, et al: Bovine thrombin: history, use, and risk in the surgical patient. *Vascular* 2008; 16 (Suppl 1) : S29-S36.

学会見聞記

第24回日本臨床スポーツ医学会学術集会

日本臨床スポーツ医学会学術集会は今年で24回を迎える学術大会であり、スポーツ障害やメタボリックシンドロームなど様々な臨床医療に即した問題を中心に10のシンポジウム、11の教育研修講演、450を越える一般演題があった。以下に興味深かった発表を紹介する。

○高強度インターバルトレーニングと血中脳由来神経栄養因子濃度との関連

東宏一郎ら(慶應義塾大学)

(大村 一)

高強度インターバルトレーニングは、持続時間が短い高強度のトレーニングを間欠的に行うトレーニングである。短時間運動のため非常に高強度の運動を負荷することができ、持久力や代謝の改善・筋力や筋量の増加にも有用であると考えられている。一方、脳由来神経栄養因子は、神経の発達に不可欠であり、食欲抑制やエネルギー消費亢進、糖代謝を改善する作用があることが知られている。運動により脳由来神経栄養因子は筋肉や脳での分泌が高まることが知られている。しかし、血中の脳由来神経栄養因子と、運動の関連については明らかでない。そこで高強度インターバルトレーニングと血中脳由来神経栄養因子の関係について実験を行った。対象は、健康な男性12名で、16週間にわたり高強度インターバルトレーニングを週2回行い、心肺持久力および血中脳由来神経栄養因子の測定を行った。結果、トレーニングの最高負荷量、最大酸素摂取量、無酸素性作業閾値は、それぞれ20%、15%、25%改善した。しかし、血中脳由来神経栄養因子はトレーニング前後において、上昇傾向が認められるものの有意な変化はなかった。一方、体力指標の変化は血中脳由来神経栄養因子の濃度が高いほど大きかった。以上のことから週2回、1回30分程度の高強度インターバルトレーニングは、全身持久力の改善を認めた。血中脳由来神経栄養因子はトレーニング前後で明らかな変化は認められなかったが、血中脳由来神経栄養因

子の高い例では持久力改善が認められやすいことが示唆された。血中脳由来神経栄養因子の意義や運動との関連については不明な点も多いがトレーニング効果予測の指標となる可能性が示唆された。

トレーニング効果については、昨今、遺伝子診断なども盛んに行われているが、まだその効果が明らかでないホルモンや調整因子なども多く、今後、トレーニングナビリティーなどとの関連も調査されるものと期待された。

○骨格筋間質由来多様性幹細胞移植による肉離れ治療の可能性

内山善康(東海大学)

繰り返し発症する「肉離れ」では、骨格筋において結合組織の増加や線維化、粘弾性の低下が見られ、正常な修復は得られない。筋サテライト細胞は原型質膜と基底膜の間に存在し、出生後の骨格筋の成長、再生、線維の維持に機能している。しかし演者らは、筋サテライト細胞とは異なるマウスの骨格筋間質(基底膜外)に存在するSk-34細胞(CD34⁺/CD45⁻)とSk-DN細胞(CD34⁻/CD45⁻)の同定・抽出に成功し、これらの細胞群は、筋線維、血管内皮細胞、脂肪細胞に分化することを確認した(Tamaki T, *et al J Cell Biol* 2002)。

演者らはマウスの前脛骨筋中心部を切除し、重度筋損傷モデルを作製(機能97%を消失)した。これに対し、同系Green fluorescent proteinトランスジェニック(GFP-Tg)マウス骨格筋から得られたSk-34細胞とSk-DN細胞を移植する群(移植群)とmediumのみを移植する群(対照群)の2群に分け、移植4週後の回復程度をそれぞれ健康側と対比検討した。その結果、対照群では損傷骨格筋の質量、筋収縮力共に20%程度の回復にとどまったが、移植群では、それぞれ対照群の3倍の増加が認められた。また、移植部の横断切片を蛍光顕微鏡で観察したところ、骨格

筋細胞や筋線維の再生が認められた。さらに、移植した左前脛骨筋内では神経様の形態を呈した構造物の存在が見られた。これを電子顕微鏡で解析したところ、移植した細胞がシュワン細胞に分化していることが分かった。また、骨格筋表面に見られた血管様の形態をした構造物を同様に解析したところ、血管周皮細胞、血管内皮細胞、血管平滑筋細胞、線維芽細胞様に分化しており、血管を構成するすべての細胞へ分化・誘導していることが明らかになった。これらの結果から、Sk-34細胞およびSk-DN細胞は筋形成、神経新生、脈管形成に関連した幹細胞あるいはprogenitor cell (起源細胞)であることが示された。

サラブレッドにおいても浅屈腱炎の症例に対して、幹細胞移植を実施している。しかし、浅屈腱内に移植した幹細胞の生存率は非常に低く、幹細胞移植のメインの効果は、幹細胞自身ではなく、幹細胞が放出する分化誘導因子がもたらすという認識を持っていたが、今回の演者らの研究では、骨格筋損傷部位にGFPで緑色に光る筋線維が再生しており、幹細胞由来の筋線維が力強く生存していた。腱に移植する場合と筋に移植する場合では、生存率が変わるのだろうか？それとも動物種の違いによるものなのだろうか？今後の研究の進展を待ちたい。

○高気圧酸素治療を用いた骨格筋損傷の治癒促進

柳下和慶(東京医科歯科大学)

高気圧酸素療法(Hyperbaric Oxygen Therapy: HBO)とは、高気圧環境下での高濃度酸素吸入により治療する特殊治療法で、通常約2～3気圧まで加圧しほぼ100%の酸素を吸入することで、特に血液の血漿成分に溶解する溶解型酸素濃度を14～20倍に上昇させ、生体内気体の圧縮・溶解作用、溶解型酸素濃度の上昇による生体内低酸素症の改善作用等を発揮する。厚生労働省の保険収載基準では、2気圧以上60分以上の治療と定められ、一酸化炭素中毒、ダイバーで発症する減圧症、骨髄炎や虚血性疾患など各種疾患に対して適応されている。肉離れはスポーツ現場において高頻度に遭遇するスポーツ軟

部外傷であり、再受傷も多い競技活動性を脅かす外傷である。肉離れ急性期は、線維断裂・血腫・腫脹で特徴付けられ、外傷により血管外への血漿流出とともに炎症細胞の浸潤を伴い、受傷部位の腫脹と微小循環不全を伴う低酸素環境を生じる。HBOは低酸素環境の改善に役立つだけではなく、血管透過性の改善などにより腫脹が軽減する効果を認められており、肉離れにおける早期治癒が期待される。また、ウサギ筋損傷モデルでは HBO群で有意に筋力が改善するなど、修復期・再生期における筋組織修復促進の効果も期待されている。

ヒトの運動誘発性骨格筋損傷実験においても、運動直後からのHBOや複数回のHBOをすると、対照群と比べ、トルクが有意に改善し、筋横断面積、MyoD mRNA、myogenin mRNA、IGF-1 mRNAも有意に増加した(MyoDおよびmyogenin：筋分化に関わるタンパク質、IGF-1：インスリンに類似した成長因子)。ラグビートップ選手の肉離れの臨床例においても、実験モデルと同様に、受傷早期からのHBOおよび3-5回のHBOを実施することによって、対照群に対して、疼痛や腫脹、MRI値が減少した。この結果により、特に早期競技復帰を希望するアスリートに対するHBOの有効性を示すことができ、今後有効な治療法として活用されることが期待される。

競走馬においても、HBOは以前より注目されており、2000年にW. E. Jonesが屈腱炎を含む難治性損傷の馬にHBOを実施した症例を報告している。しかし、2009年にはニューヨーク州競馬賭事委員会がレースの1週間以内にHBOを受けている馬の出馬投票を受け付けないことを決定しており、2012年にフロリダ州にある競走馬用のHBO施設が爆発し、診療所スタッフが死亡するという事故が発生している。ニューヨーク州で禁止薬と同等の制限を課せられるほどの治療法は非常に興味を引くところであるが、馬においてはHBOの治療効果を示した報告がいまだ出ていないことや、爆発を防ぐための安全性対策が必須であることは懸案材料となるだろう。

(向井和隆)

第5回PRP(多血小板血漿)療法研究会

本研究会は近年歯学や形成外科領域で注目されている多血小板血漿(PRP)を用いた治療法や基礎研究結果について、主に歯科口腔外科、整形外科、形成外科、美容外科の専門家が横断的に情報交換できる場として2009年より開催されている。今回は初めて北里大学の獣医師が発表に参加し、ウシ獣医臨床分野におけるPRP治療の現況が報告され大変注目を浴びていた。一方で、臨床分野でPRPを応用している医師たちの中には、PRPとPRF(多血小板フィブリン)の区別がつかない者や、血小板濃縮が達成されていなくても専用の生成キットで作製したからPRPが完成したと思っている者など、application上の基礎知識に疑問が残る臨床医がいることも判明し、今後に課題を残した。

○フリーズドライを用いて調製したヒトPlatelet-Rich Plasmaの創傷治療における至適濃度の検討

小倉常敬ら(関西医科大学)

PRPを作成し即座に使用するならば問題にならないが、事前に作製して保存することが可能であればさらに適応の幅が広がるというものである。しかし冷蔵保存を行うとPRP自体に対する細菌増殖の懸念が生じる。さらに血球成分を含むようなPRPの場合、白血球由来のMMPがおよぼす経時的な影響の増悪を懸念する者も少なくない。現在私達は、PRP治療についてはPRP中の成長因子の活用を目的としており、血小板の形態保存にこだわらない立場からPRPを冷凍保存することが多いが、今回演者達は同様の理由からフリーズドライによるPRPの保存に挑戦していた。

ヒトから採血した血液10 mLを材料に、450 g×7分→1600 g×5分によるダブルスピンを行った後に塩化カルシウムで活性化処理し、さらに強遠心をかけ上清を実験に使用した。これを分割し、100 μ Lを凍結PRP群、100 μ Lを1倍濃縮フリーズドライPRP群、300 μ Lを3倍濃縮フリーズドライPRP群、500 μ Lを5倍濃縮フリーズドライPRP群とした。フリーズドライPRPはデシケーター内で常温保存され、1ヶ月後にミリQ水100 μ L中で溶解した。こ

れら各群のPRP中の成長因子量測定を行った結果、PDGF-AB、VEGF、TGF- β 1について凍結保存群と同等であることが判明し、またその含有量は濃縮度に比例していた。

またこれらPRPを100 μ Lずつコラーゲンゲルスポンジに含浸させ、マウス背部皮膚創傷モデルに適用しその創面積縮小効果を観察したところ、適用6日目に3倍濃縮フリーズドライ群で有意な創面積縮小効果を認めた。

つまり成長因子はPRPをフリーズドライしても容量維持され、PRPの至適濃度は3倍である可能性が示唆された。PRPの効果を冷凍という方法だけでなくフリーズドライでも維持できるということは画期的で、保存法のoptionを広げることに意味は大きいと考えられた。

○分離材入り50ml遠沈管を用いたウシPRPの作製条件の検討

富岡美千子ら(北里大学)

ウシ臨床においてもPRP治療は最新の治療法として導入されているそうである。滑液嚢胞、褥瘡や臍帯ヘルニアといった疾病に対し使用することがあるそうであるが、特に適用されているのは、蹄葉炎に続発するような外側蹄の蹄底潰瘍だそうである。特に多発するのは蹄球接合部付近であり、びらんを伴う。この場合、患部の刮削を行い、露出した創部にPRPを含浸したアルギン酸ゲルを当て、また健康蹄にブロックパッドを当ててまとめて包帯を行う。ウシはウマと違い、下肢部に肉芽増生が生じにくく、PRPをこのように適用しても不整肉芽が生じにくいとのことであった。なお、ウシのPRP適用にあたっては、食肉牛とBSEの関係で他家適用が禁止されており、自己血液由来PRPのみ適用可能であることを付け加えていた。

今回の報告では、ウシPRPの最適な作製条件を検討するため、多様な条件で遠心を行う実験を試みた。血液30 mLに対し10%クエン酸ナトリウムを1 mLの割合で混じ、成牛2頭より400 mL～800 mL採血した。採材現場からラボまでの輸送時間をシ

ミュレーションし、採血後1時間氷床静置し、PRP作製を行った。細菌のコンタミネーションを防ぐため、材料の移動が最小限であるシングルスピンを採用した。その結果、パフィーコートが最も安定的に形成されるのは1800 g×15分で、この条件下でのPRP濃縮率は3.7倍であった。このPRPを活性化後の遠心上清を用い、ウシ皮膚線維芽細胞の増殖活性を

MTT法により調査した。その結果、培養開始72時間後以降で有意に活性が増していた。

ウシの血小板数はウマの2倍と多く(ちなみにヒトとウマは同等)、演者らはシングルスピんでも十分な血小板が得られると述べていた。調査は未だ継続中であり、今後の続報が注目される。

(福田健太郎)

第61回日本ウイルス学会学術集会

○エゾシカからのA群ロタウイルスの検出およびその遺伝的解析

岡寺康太ら(岐阜大学)

ロタウイルスは幼若動物に急性下痢症を引き起こすウイルスで、幅広い宿主域を持ち、異種間伝播を起こすことが明らかとなっている。したがって、ロタウイルス感染症を制御するためには自然界におけるロタウイルスの生態を解明する必要がある。一方、北海道において、ニホンジカの亜種であるエゾシカが人里および牧草地へ頻繁に侵入しており、家畜やヒトに病原体を感染させるリスクが懸念されている。ニホンジカにおいて、45%がウシロタウイルスに対する抗体を保有しているという報告があり、家畜やヒトへのロタウイルスの伝播が危惧される。そこで自然界におけるロタウイルスの感染環にエゾシカがどのように関わっているかを遺伝学的に検討した。

2012年北海道日高地方で捕獲されたエゾシカ40頭の糞便を材料としたところ、推定2ヶ月齢の1例からロタウイルス(Ezo-10株)が検出された。Ezo-10株の11分節全ゲノムを解析したところ、G遺伝子型を決定するVP7遺伝子がヒトロタウイルスWAG82株と、群を決定するVP6遺伝子がウマロタウイルスR-22株と共に99%の高い相同性を示した。その他の9分節についてはウシロタウイルスと高い相同性を示した。この結果より、Ezo-10株はウシ、ヒトおよびウマロタウイルスと遺伝的に関わりがあることが明らかとなった。ヒトロタウイルスWAG82株とウマロタウイルスR-22株は共にウシからの伝播が示唆されているウイルス株であることから、ロタウイルスがエゾシカとウシの間で伝播している可能性がある。

る。

R-22株(G10P[11])は1984年に分離された株で、この遺伝子型が馬群で流行した報告はこれまでになく、ウシロタウイルスがウマに偶発的に感染したものと考えられている。生産地疾病等調査で実施しているウマロタウイルスのサーベイランスでは、ウマ以外の動物種のVP7およびVP4遺伝子は検出されておらず、現状においても異種間伝播は問題となっていない。しかし、日高地方の牧場では頻繁にシカが目撃されており、子馬と容易に接触する環境にあることから、エゾシカを介して子馬へ現在流行していないロタウイルスが伝播する可能性はある。これまで私が実施してきたウマロタウイルスの疫学調査では、GおよびP遺伝子型を決定するVP7およびVP4のみの調査であったが、今回の発表ではそれ以外の分節を解析することによって異種間伝播の可能性が示されたことから、今後の疫学調査では全ゲノム解析が必須であると強く感じた。

○子牛におけるA群ロタウイルスの持続感染の可能性

三竹博道ら(岐阜大学)

ヒトロタウイルス感染症は毎年冬季に流行のピークを迎えることが知られているが、非流行期にロタウイルスがどのように存続しているかは不明な点が多い。演者らはロタウイルスの存続形態についてウシを対象に研究を進めてきた。その研究の中で、ロタウイルスが子牛に持続感染する可能性、および腸間膜リンパ節で潜伏感染する可能性を見出し、その内容が発表された。

持続感染が観察されたのは2011年11月下旬に肥育農場に導入された28日齢の子牛で、導入10日後に下痢を示した。下痢は4日で治癒したものの、2012年2月上旬に慢性肺炎のために死亡した。材料として、その子牛の38日齢の下痢便、下痢治癒後の46および83日齢の正常便、剖検時に採取した92日齢時の腸間膜リンパ節、空腸内容物、直腸便を用い、PCR法によってウイルス遺伝子の検出を試みた。その結果、生前に採取された下痢便および正常便全て、そして剖検時に採取された腸間膜リンパ節および直腸便からウイルス遺伝子が検出された。検出された各採取時期のウイルスのVP7およびVP4遺伝子を解析したところ、下痢発症から死亡まで同一のウイルスであったことが明らかとなった。この子牛は約2ヶ月間同じウイルスが感染しており、持続感染していたことが示唆された。

次に、2012-2013年に下痢以外の症状を主徴として死亡した子牛16例の剖検時に採取した腸間膜リンパ節、空回腸内容物および直腸便を材料とし、PCR法によってウイルス遺伝子の検出を試みた。その結果、16例中9例の腸間膜リンパ節からウイルス遺伝子が検出された。腸間膜リンパ節からウイルス遺伝子が検出された9例中2例の直腸便、および1例の空回腸内容物からもウイルス遺伝子が検出された。以上のことより、非健常子牛の腸間膜リンパ節には高率にロタウイルスが潜伏していることが明らかとなった。今回の発表において子牛におけるロタウイルスの持続感染および潜伏感染が示された。ロタウイルスの持続感染および潜伏感染は一般的に知られておらず、この発表は大変興味深い内容であった。

(根本 学)

第28回日本整形外科学会基礎学術集会

今回の学会のテーマは「Pleasure of Discovery – 新たな整形外科診療に向かって –」であり、新しい発見を見出すことが疾患の病態解明、診断、治療、予防につながり、幸福に直結する希望があるため、研究者の喜びは大きい、という意味が込められている。ポスター発表274題を含めると約600題の演題が、2日間にわたり8会場で発表され、その内容は骨、軟骨、筋肉、腱、靭帯、腫瘍など整形外科に関する分野の最先端のものであった。その中から特に興味深い演題を報告する。

トレセンの厩舎で管理される競走馬の筋損傷の多くは運動誘発性の筋の炎症であり、筋組織の一部を失うような外傷性の筋損傷というものは生産地に比較して少ない。しかし、ヒトでは事故による筋損傷は少なくない。また、骨格筋は比較的修復能力の高い組織と考えられるが、損傷が重篤な場合、損傷部の癒着組織形成により筋再生が阻害され、疼痛の残存、筋力低下、再損傷を起こすことも多い。こう考えると、筋損傷の治癒と腱組織の治癒は類似点があるように見受けられる。演者等は、積極的に筋再生

を促す新たな治療法として1)ヒト末梢血CD133陽性細胞、2)骨髄間葉系幹細胞、3)脂肪由来再生細胞などの組織幹細胞を利用した骨格筋の再生について研究した内容を紹介していた。

○組織幹細胞による損傷骨格筋の再生

亀井直輔ら(広島大学)

1)ヒト末梢血CD133陽性細胞

ラット骨格筋損傷モデルへ移植したヒト末梢血CD133陽性細胞の一部が損傷筋組織内で血管内皮細胞や筋細胞へ分化するとともに、血管新生が促進され、機能的および組織学的に骨格筋修復が促進されることを確認した。また、基本的に末梢血から得られるCD133陽性細胞の数が少ないことから、磁気ターゲティングによって細胞の効率良く損傷部への集積を行うことで、従来の10分の1量の移植によっても同様の筋修復効果を得ることができたと報告した。

2)骨髄間葉系幹細胞

ルシフェラーゼ遺伝子導入ラットの骨髄より培養樹立した間葉系幹細胞をラット骨格筋損傷モ

デルに移植して*in vivo*イメージングを行ったところ、移植細胞は移植後24時間までは細胞数が減少しなかったが、移植後3日以降に劇的に減少した。移植後の筋組織では癒痕抑制効果が認められ、幹細胞はパラクライン的に働き、筋組織再生を促進すると考えられると報告した。

3) 脂肪由来再生細胞

ラット骨格筋損傷モデルに移植するとヒト末梢血CD133陽性細胞と同様の骨格筋修復効果を得ることができたと報告した。

演者は、3種類の細胞ソースはいずれも筋再生効果を有しており、治療施設的环境や対象となる患者によって、それぞれにメリットがあるとして講演を締めくくった。個人的に興味深かったのは、「脂肪由来再生細胞」という名称である。演者は、脂肪組織を酵素処理して得られた細胞群には幹細胞以外の細胞も多く含まれるため「脂肪由来再生細胞」と呼び、幹細胞と区別していた。何とも的を得ている表現であり、私も今後はこの用語を使用したい。

また、骨格筋の再生に関する演題をもう一題紹介する。本研究では、筋再生とは言っても上記のような積極的組織治療に関する研究ではなく、従来から行われてきた筋損傷後のアイシングについて、それが修復時の筋再生にどのような影響を与えているのか検討していた。

○損傷骨格筋に対するアイシングの影響 - 損傷後のアイシング時期による検討

伊藤龍登ら(聖マリアンナ医科大学)

一般に骨格筋損傷では腫脹軽減、疼痛緩和の目的で受傷直後よりアイシングが行われている。しかし、損傷骨格筋の再生に及ぼすアイシングの影響については未だ不明な点が多い。演者らは骨格筋損傷モデルを用いて、損傷後のアイシングのタイミングが再生過程に与える影響について検討した。

マウスの前脛骨筋にCardiotoxin (CTX)を筋注して筋損傷を惹起させた。CTX筋注後無処置のC群、CTX筋注直後にアイシングする(IE)群、CTX筋注8日後にアイシングする(ID)群の3群に分類した。IEおよびID両群のアイシング時期の決定は、CTX筋

注後のPax7発現量を参照して、筋衛星細胞の活動のピークの前および後とした。アイシングは麻醉下にて4℃に設定した水に下肢を20分間浸すことで行った。処置後2週と4週の時点で前脛骨筋を摘出し、筋湿重量を測定後、連続凍結切片を作製し、HE染色および免疫組織学的染色を行い、体重当たりの相対的筋湿重量対体重比、中心核を有する筋線維数の割合(%)、筋線維横断面積(CSA)、全筋核数に対する相対的Pax7陽性核数を測定した。

結果は、筋注直後にアイシングしたIE群では無処置C群や8日後にアイシングしたID群に比較して相対的筋湿重量(2週および4週)および筋線維横断面積(4週)が有意に低値を示した。また、相対的Pax7陽性核数(2週)もIE群はID群よりも有意に低値を示した。逆に、筋線維数の割合(4週)は、IE群はID群より有意に高値を示した。

これらのことから、演者は、筋損傷後のアイシングは損傷骨格筋の再生を遅延させるが、筋衛星細胞の活動のピークを過ぎてからのアイシングは再生に影響を与えないとした。

最後は、腱組織や靭帯組織内に存在する幹細胞を利用した組織治療に関する研究を紹介する。

○前十字靭帯(ACL)由来CD34陽性細胞による移植腱治療促進のメカニズム - 血管新生の効果 -

高山孝治ら(神戸大学)

演者らは、前十字靭帯(ACL)損傷後の遺残組織に多分化能を有するCD34陽性の幹細胞が存在し、それらがACL再建術後の移植腱と骨の間の治癒を促進すること、また、破断強度を増強させる効果のあることを報告してきた。今回はACL由来CD34陽性細胞による移植腱治療促進過程における血管新生効果を検討していた。

実験方法であるが、ACL再建術時に採取したACL遺残組織より細胞を単離した後、FACSにてACL由来CD34陽性細胞を回収した。血管内皮細胞増殖因子(VEGF)または抗VEGF作用を持つsoluble FLT1s (sFLT-1)をエンコードしたレンチウイルスベクターを作成し、ACL由来CD34陽性細胞に遺伝子導入した。VEGF濃度を2種(100%および25%)設定し、CD34陽性細胞 + VEGF100%、CD34陽性細胞

胞 + VEGF25%、CD34陽性細胞、CD34陽性細胞 + sFLT-1、no cellsの5群を作成し、各の群より細胞シートを作成した。

免疫不全ラット(n=45)より長趾屈筋を採取し、移植腱とした。移植腱を細胞シートで被覆した後、ACL再建術を行った。組織学的(Masson's trichrome染色)、免疫組織学的(isolectine B4 (血管内皮細胞マーカー)、 α -smooth muscle actin (α -SMA; 線維化マーカー))評価を術後2週(n=6)、力学的評価を術後4、8週に行った。

結果、CD34陽性細胞 + VEGF100%群はCD34陽性細胞に比べ有意にisolectine B4の発現増加を認めるも、 α -SMAの発現および破断強度の増加は認めなかった。CD34陽性細胞 + VEGF25%群は有意なisolectine B4の発現増加と移植腱と骨の間での線維様組織の増加、 α -SMAの発現増加、術後4週での破断強度の増加を認めた。CD34陽性細胞 + sFLT-1群は有意なisolectine B4の発現減少、線維様組織の減少、術後4週および8週での破断強度の減少を認めた。

演者らは、sFLT-1で血管新生を抑制すると移植腱の成熟も抑制され、破断強度の減弱を認めたことから、ACL由来CD34陽性細胞によるACL再建術術後の破断強度の増強には血管新生が重要な役割を担っていると考えた。一方、VEGF濃度を高め過剰な血管新生を誘導した場合は破断強度を減弱させる可能性があることも報告した。

「過剰な血管新生」と「線維様組織の形成」この2つのバランスが力学的強度を左右するであろうことは理解できたが、肝心のCD34陽性細胞自体の働きがよく解らなかった。

(笠嶋快周)

○LIPUSはマウスiPS細胞由来骨前駆細胞の骨分化を促進させる

奥町悦子ら(神戸大学)

演者らは、胚葉体形成を介さずに直接単層培養を行うdirect-platingの手法を用いたiPS細胞から骨前駆細胞への分化誘導において、LIPUS (Low Intensity Pulsed Ultrasound)照射が及ぼす影響について報告した。

維持培養したマウスiPS細胞からTrypsin EDTAを用いて分離したsingle cellsをフィーダー細胞を用

いずにMSC専用培地で培養(direct-plating法)した。数世代後に得られた均質なfibroblasticな接着細胞(iPS細胞由来骨前駆細胞)をLIPUS照射群と非照射群の2群に分け、骨分化培地で14日間培養した。これらの培養細胞について、Real-time PCRによる骨分化関連遺伝子(Runx2、ALP)の発現とALP活性を測定し、骨分化能を比較した。また、Alizarin red染色後の定量によりCa沈着量について評価した。

骨分化関連遺伝子に関しては、Real-time PCRの結果よりLIPUS照射群は非照射群に比較して骨分化培養開始後1日目にRunx2発現が上昇し、3、5日目にALPの上昇を認めた。またALP活性に関しては培養3、7日目には照射群で有意に上昇した。Ca沈着量に関しては、培養14日目に照射群においてAlizarin redの有意な染色性上昇がみられた。これらより、LIPUSはiPS細胞由来骨前駆細胞の骨分化能に促進的な作用を示すことが明らかとなり、iPS細胞を用いた骨再生医療において有用な手段となることが示唆されたと報告した。

本報告で重要な点は、LIPUS照射によってiPS細胞から骨前駆細胞への分化誘導効率が高まるという点である。すなわち、iPS細胞から骨前駆細胞に分化させる際、実際には骨前駆細胞に分化する細胞は極僅かであるが、LIPUS照射によってこの効率を高めることが可能であり、分化誘導後の培養細胞の均一性が高まるという点において興味深い報告であった。

○低出力超音波パルス刺激がSclerostin発現と骨形成に与える影響(ポスター発表)

熊谷 研ら(横浜市立大学)

演者らは、骨形成促進作用が知られているがその作用機序に関しては未だ不明であるLIPUSと、骨形成抑制因子であるsclerostinとの関係について、マウス骨切りモデルを用いて検討した。

C57BL/6マウスの左坐骨神経を切除して下肢の不動化を得た後、同側の大腿骨骨幹部に骨切り術を実施した。その際、骨切り部の骨膜を2mmのみ除去した後に25G注射針で髓内固定した。翌日より20min/dayのLIPUS照射を開始したLIPUS群、対照群に群分けし、2、4週間後に検体を採取してX線、免疫染色学、ウエスタンブロット法による解析を実施した。

骨切り部における外仮骨量は対照群の2週間後が1.1mm²、4週間後が2.7mm²であるのに比較してLIPUS群で2週間後が2.6mm²、4週間後が3.4mm²と有意に増加した。また、骨切り部周辺における細胞のsclerostin陽性率は、対照群の2週間後が56.3%、4週間後が29.5%であるのに比較してLIPUS群の2週間後が33.8%、4週間後が10.1%と有意に減少した。ウエスタンブロットにおいても同様に対照群においてsclerostinの発現が遅延する傾向がみられ、組織所見においても対照群で内軟骨性骨化が遅延する傾向がみられた。これらより、下肢不動化マウス骨切りモデルに対するLIPUS照射により外仮骨形成量が増加し、sclerostin発現が減少することが明らかとなった。

骨折患者の血中sclerostinレベルは上昇することが知られているが、本発表においても治癒過程早期にその発現が確認されている。また、LIPUSは内軟骨性骨化の過程を短縮することで骨折治癒を促進するとの報告があるが、本発表では内軟骨性骨化の過程でsclerostinが発現しており、LIPUS照射によるsclerostinの減少が内軟骨性骨化期間を短縮させ、結果的に骨折治癒期間を短縮させているのではないかと考えられた。

(守山秀和)

○細胞シート工学を利用した関節軟骨再生

清水 良ら(広島大学)

昨年、関節軟骨欠損に対する三次元培養軟骨移植の有効性が報告されたが、軟骨細胞の増殖能の限界から非常に広範囲の軟骨欠損には適応困難であるなど、改善すべき点も存在する。一方、温度応答性培養皿を用いて作製された軟骨細胞シート移植による軟骨損傷治療の臨床研究が開始されており、非生体材料による足場が不要であるため臨床応用しやすく、軟骨細胞を薄く広くシート状に培養できることから、広範囲の欠損に対応できる可能性を秘めている。しかし、薄い細胞シートを貼ることで関節軟骨全層欠損が修復される機序について細胞シートからのパラクライン効果や骨髄細胞の関連が推測されているものの、いまだ証明はされていない。本研究の目的は、軟骨細胞シートおよび滑膜細胞シートを軟骨損傷モデルに移植し、軟骨修復作用を比較

検討することで修復機序を明らかにすることにある。温度応答性培養皿でラット由来軟骨細胞シートおよび滑膜細胞シートを培養し、12週齢のラット膝関節の軟骨面にφ2mmの骨軟骨欠損を作成後、それぞれの細胞シートを移植した。軟骨修復の評価として、macroscopic scaleによる肉眼的評価とPineda's grading scaleによる組織学的評価を行った。肉眼的評価では両群間に有意差は認めなかったが、組織学的評価では軟骨細胞シート移植群が滑膜細胞シート移植群と比較し、軟骨修復が有意に改善していた。軟骨欠損部を同じように細胞シートでカバーしても、軟骨細胞シートの方が滑膜細胞シートより軟骨修復に効果的であり、パラクライン効果の関与が示唆された。

修復像を認めた部位が移植された細胞由来であったのか聞いたところ、骨髄細胞のみにgreen fluorescent protein (GFP)が発現するラットに対して細胞シート移植を行った場合の骨髄細胞の軟骨修復への寄与に関する検討も行っており、組織学的検索においてサフラニンO染色陽性を示した移植軟骨細胞による再生部位はGFP陰性であったとのこと。この場合においても軟骨細胞シートの方が滑膜細胞シートに比べ軟骨修復により強く関与していると考えられていた。また、これまでに術後11週間の修復像も観察しており、術後4週間に比べて骨の再生が更に進んでいるのは両細胞シートに共通しているものの、軟骨細胞シートの優位はこの時点でも失われていないとのことであった。ウマ、特に競走馬における応用を考えた場合、軟骨細胞シートの貼着方法の検討など解決すべき点は多いが、関節鏡下での貼着が可能となれば軟骨の広範囲の損傷を伴うこともある腕節部の骨折に対する骨片摘出術に組み込むことで、より早期の調教再開を期待できるかもしれない。

○ウサギ膝蓋骨ゼン範囲の骨軟骨欠損に対するフィブロインスポンジ被覆法による早期組織修復

平方栄一ら(京都大学)

フィブロインスポンジ被覆法は、広範囲の軟骨・骨軟骨欠損を高強度担体であるフィブロインスポンジにて被覆することにより骨髄細胞などによる修復を期待する治療法である。今回は、cell-delivery機能と修復部に及ぶ過剰な力学的負荷からの保護機能

を期待し、ウサギ膝蓋骨全範囲の骨軟骨欠損修復を試みた。ウサギ膝蓋骨全範囲に骨軟骨欠損を作製し、A：フィブロインスポンジ、B：軟骨細胞を播種したフィブロインスポンジ、C：GFP蛋白陽性の軟骨細胞を播種したフィブロインスポンジのおのおのにより被覆固定した後、6週間飼育した。軟骨細胞(GFP陽性群を含む)を播種したフィブロインスポンジで被覆した群においては、8例中5例において層状構造を持つ硝子軟骨様組織による修復を得た。修復組織はサフラニンO染色、トルイジンブルー染色、II型コラーゲン免疫染色に陽性を示した。修復組織の長軸に沿った“被覆率”は平均53%であり、Cにおいては修復組織を構成する細胞の平均48%がフィブロインスポンジに播種したGFP蛋白陽性軟骨細胞に起因するものであった。フィブロインスポンジ被覆法は広範囲の軟骨あるいは骨軟骨欠損修復において、早期段階での修復を期待できる。今後さらに培養を必要としない治療システムの構築を行っていく予定である。

フィブリンとは、繭糸の中核を形成する線維性蛋白であり、軟骨細胞の凝集体形成効果と細胞移動効果を有することが知られている。また、シート状に形成したフィブロインスポンジがイヌやウサギにおける広範囲関節軟骨欠損の修復を促進する効果を有することも報告されている。一方、いわゆる腕節炎や腕節構成骨のチップフラクチャーが原因でパフォーマンスが低下する競走馬臨床においては、関節内の骨片に対する関節鏡下骨片摘出術の他は、患部の冷却やマイクロウェーブ等の物理療法に頼らざるを得ない。現状では、このフィブロインスポンジを用いた軟骨および骨軟骨損傷の修復促進は、損傷部を広範囲に包み込む必要があることから競走馬への応用に際して関節鏡下で実施することはできないと演者らは考えていた。従って競走馬での応用を前提とする場合、関節面全体を均等に包み込む現在の方法とは異なる、関節鏡下でも実施可能な手技を模索する必要があるだろう。

(琴寄泰光)

○トリアムシノロンアセトニドの腱細胞脆弱化は適正な使用量、投与間隔で回避できる

原田義文ら(神戸大学)

肩腱板障害などに対して、トリアムシノロンアセトニド(TA)が頻用されている。除痛効果も利点もあるが、頻用による腱断裂の報告もあるため、演者らは投与量や投与間隔を検討した。ヒト腱板断端組織から分離された細胞を①コントロール群②TA濃度0.1mg/mlのL群③TA濃度1.0mg/mlのH群に分けて、cell morphology と viability、apoptosisを評価した。

その結果、cell morphologyはL群、H群で7日目に形態変化を認めたが、L群は投与21日目に回復した。一方H群は回復しなかった。Viabilityに関してもL群、H群で7日目に低下が認められ、投与21日目にL群が回復した一方、H群は回復しなかった。Apoptosisに関してはL群、H群で7日目に上昇が認められ、投与14日目にL群が改善した一方、H群は改善しなかった。以上のことから、TAの過剰投与が細胞変性やapoptosisを惹起し、腱断裂の原因となることが考えられた。

○グルココルチコイド全身投与はラット・アキレス腱コラーゲンの量的・質的異常を惹起し強度低下をもたらす

田口哲也ら(東京慈恵医科大学)

グルココルチコイド(GC)の全身投与によるアキレス腱断裂の報告が散見されるが、GC投与が選択される基礎疾患の影響も関与するため、GC投与が直接、腱の脆弱化に影響を及ぼすのか明らかではない。そこで、GC全身投与がアキレス腱に及ぼす影響を検討するためにアキレス腱コラーゲンの量的・質的变化を生化学的・形態学的に検討した。方法は6か月齢のラット20匹を用い、10mg/kg/dayを8週間にわたり連日皮下投与した群(GC群)とコントロール群を比較した。終了後にアキレス腱を摘出し、①腱の強度試験、②コラーゲン量の測定、③生理的架橋の測定および老化架橋(悪玉架橋とも呼ばれる)の指標となるAGEsとペントシジンの解析、④顕微鏡による形態学的分析を実施した。

その結果、GC群の強度試験は有意に低値を示し、コラーゲン量も減少していた。また、GC群ではコラーゲンの質を表す生理的架橋の有意な低形成を認めた

が、老化架橋の指標には有意な差が認められなかった。顕微鏡による観察ではGC群には径の細いコラーゲンが多数存在していた。以上のことから、GCの全身投与は老化架橋を増加させるのではなく、生理的架橋の低形成をもたらし、形態学的な変化が生じることで、腱の脆弱性を高めることが示唆された。

会場からはGCの全身投与ではなく、局所投与によっても影響があるのかという質問があった。これに対し演者は、今回の研究では局所投与を実施していないが、これまでの報告から全身投与よりも腱周囲への局所投与のほうが、ColA1の低下が強く認められた結果があることから、全身投与よりも局所投与のほうが腱に対する影響は強いと推察され、特に

ロングアクティブな製剤による影響は大きいと考えられる、と回答した。

GCは競走馬の様々な疾患の治療薬として、全身投与や局所投与にて用いられることがあるが、これら2つの演題から、GCの不適切な長期大量投与が腱の脆弱化をもたらす可能性が考えられる。ウマを用いた研究ではないため、GCのウマに対する影響については比較することはできず、「過剰」と考えられる投与量やGCの種類による感受性の違いなどは分からないが、腱への影響は少なからずあると考えられる。

(田村周久)

第87回獣医麻酔外科学会

第87回獣医麻酔外科学会は、第99回日本循環器学会と合同で開催された。今回の合同学会のシンポジウムは「胸部外科の実施」ということで両学会講師陣により、アプローチ法、胸部外科の実際、胸部外科における術後疼痛管理について実践的な講演がなされた。また、学会開催地が仙台ということもあり、東日本大震災時に災害地拠点病院となった石巻赤十字病院の先生の講演も生まれ、貴重かつ切迫した体験談のご披露があった。馬に関連する演題は3題行われたのでその概要を以下に紹介する。

○馬におけるプロポフォール麻酔の検討

鈴木 吏ら(社台ホースクリニック)

2010年から社台ホースクリニックではプロポフォールの静脈内麻酔を臨床例に導入し、述べ65例の症例に対する記録を整理して発表したものであった。プロポフォールの使用内訳はプロポフォールを導入時のみ投与した症例が30例、術中にプロポフォールの追加投与が必要であった症例が15例、プロポフォールの持続点滴(0.1～0.2mg/kg/min)を実施した症例が17例、デトミジン・リドカイン・ブトルファノール・プロポフォールの持続静脈内投与を実施した症例が3例であった。手術や処置の内訳は咽喉頭部の手術が25例、レントゲン検査が24例、関

節穿刺・洗浄およびRegional perfusionが10例、その他が6例であった。8例で導入時に激しいパドリングが見られた。多くの症例で導入後の呼吸数低下が見られたが、いずれの胸部の圧迫で自発呼吸が再開した。酸素吸入を実施しなかった9例中5例で酸素飽和度が90%を下回った。起立はいずれの症例も非常に良好であった。多くの症例で呼吸数の低下、低酸素血症が観察されたことから、プロポフォールを使用する際には酸素吸入が、また、先行鎮痛の有用性も述べられ、局所麻酔や、神経ブロックの併用が望ましいとの考察であった。良好な起立がこの薬物の応用において一番の魅力であることから、呼吸および疼痛管理に主眼を置いた薬物の選択、適切な麻酔管理が重要であると思われた。可能であれば、多くの症例にさまざまに応用して経験値を上げたいものである。

○競走馬の骨折に対する吸収性螺子の有用性

東樹宏太ら(栗東トレーニング・センター)

競走馬の骨折における螺子固定術に生体内で吸収される螺子を用いた報告であった。スーパーフィクソープ(タキロン社性；以下SF)は、ポリ-L-乳酸と非焼成ハイドロキシアパタイトの複合体からなる生体骨より高い初期強度と生体内吸収性を兼ね備え

た螺子である。この螺子は一般的に用いられるステンレス螺子と同等の曲げ強度を有しながら、治癒が進むにつれて生体内で分解吸収されて骨に置換していくため抜去の必要がない。今回、SFを第1趾骨々折および第3中手骨々折症例に応用し、詳細な検索を行うことで、内固定材としての機能および生体内吸収性について調査し、その有用性について検討した。両症例とも順調に回復し、トレッドミルで13m/秒の駆歩が可能であった。採取した肢の光学顕微鏡での観察では、質骨の領域で骨折線の融合が観察され、Micro CTおよび電子顕微鏡による観察では、スーパーフィクソープと骨の直接接合が見られた。また、ポリ-L-乳酸の粘度平均分子量から生体内での適切な分解が示唆された。スーパーフィクソープは馬の骨折症例の内固定材として機能していることが明らかになり、撓みの影響を考慮した抜去も必要ないことから、競走馬の骨折に対して応用可能であることが示唆された。今回の報告での症例2は、遠位の関節面で強度の求められる骨折線の整復には従来のステンレス螺子を用いていることから、使用において若干強度に不安があるのかと想像した。しかし、競走復帰を目指す競走馬にとっては再手術による螺子の抜去が必要ないのは有利であり、さらに症例を増やして、臨床応用に繋げてほしい。

○腸管腫瘍を疑い試験的開腹術を実施したサラブレッドの2症例

山家崇史ら(社台ホースクリニック)

臨床症状と腹部超音波検査から腸管の腫瘍性疾患が疑われ、試験的開腹により確定診断を行うことができたサラブレッド2例の症例報告であった。症

例1はサラブレッド、5歳、雌。正常分娩後から食欲の低下および持続的な体重減少、間歇的な発熱および低蛋白血症が認められた。腹部超音波検査では、一部の小腸壁に重度の肥厚が認められた。小腸の腫瘍性疾患を疑い試験的開腹術を実施した。遠位空腸の漿膜面に複数の円形結節状病変が認められ、一部摘出した病変の病理学的検索により消化型リンパ腫と診断した。症例2はサラブレッド、2歳、雄。軽度の発熱を呈し、食欲および体重の減少が認められた。血液検査ではA/G比の低下が見られた。腹部超音波検査により脾臓実質に3cm大の低エコー領域が2~3箇所見られ、脾臓の内側に小児頭大の腹腔内腫瘍が認められた。腸管の腫瘍性疾患を疑い試験的開腹術を実施したところ、小腸壁の肥厚、小腸および大綱に癒着した腫瘍が認められた。一部摘出した病変部を病理組織学的に検索したところ、小腸壁は重度の炎症系細胞の浸潤・肥厚、粘膜下組織に化膿性肉芽腫の形成および多核巨細胞の浸潤が認められ、慢性肉芽腫性腸炎と診断した。どちらの症例においても食欲の低下と重度の消瘦ならびに発熱が認められた。原因不明のこれらの症状を示す症例では腫瘍性疾患や小腸の炎症性疾患を疑う必要があり、試験的開腹術の必要性を判断するためには腹部超音波検査が有用である。今後、組織生検には立位腹腔鏡によるアプローチの可能性があると考察していたが、腹腔鏡下での生検部位の処理や腸管の縫合などは難易度の高い手技となる。このような症例には年間1頭遭遇するかもしれないであろうが、確実な診断をするためのツールは多種多様に確保しておくことが重要であろう。

(間 弘子)

第3回家畜感染症学会学術集会

2013年12月6~7日の2日間、第3回家畜感染症学会学術集会が北海道札幌市にある札幌市教育文化会館にて開催された。本学会は、ウシを対象とする臨床獣医師、研究者および一般企業が多く参加するのが特徴である。そのため、今回の集会での演題の多くがウシに関する研究であった。以下に、我々が発表

した内容および興味深かった内容について記載する。

○ウマロタウイルスに対する各種消毒薬の消毒効果の検討

根本 学ら(JRA総研 栃木支所)

ウマロタウイルスは子馬に急性下痢症を引き起こ

す。ウマロタウイルスの伝播力は強く、適切な防疫措置を実施しない場合、牧場中の子馬に次々と感染が拡大する。しかし畜産用に様々な種類の消毒薬が市販されているものの、ウマロタウイルスに対する消毒効果を検討した研究はほとんどない。そこで本研究ではウマロタウイルスに対する市販消毒薬の消毒効果を検討した。

消毒薬は、塩素系2種(クレンテ、ビルコンS)、ヨウ素系1種(クリンナップA)、アルデヒド系1種(ヘルミン25)、両性せっけん1種(キーエリア)、および逆性せっけん3種(ベタセプト、クリアキル-100、パコマL)の計8種類を用いた。消毒薬は、メーカーが畜舎消毒用に推奨する最も濃い濃度から2倍階段希釈した。ウイルス液、PBSまたは牛胎児血清(FBS)、消毒薬を1:1:2の割合で反応液を作製した。FBSは有機物による消毒効果の変化を検討するために用いた。反応液は室温(23-24℃)または水温(1-2℃)で30秒または10分間反応させた後、培地で100倍希釈して反応を停止させた。消毒薬を含まない対照と比較してウイルス力価が100分の1以下に低下した場合、消毒効果ありと判定した。

クレンテおよびクリンナップAはFBSの混入により効果が減弱するものの、全ての条件において推奨濃度内で効果があった。ビルコンSはFBSを含まない場合、全条件で効果があったが、FBSの混入により効果がなくなった。ヘルミン25は室温10分の条件ではFBSが混入した場合も効果があった。ベタセプトは水温30秒以外のFBSを含まない条件で効果があった。クリアキル-100は室温10分間でFBSを含まない条件でのみ効果があった。キーエリア、パコマLは全ての条件で効果がなかった。以上の結果より、ウマロタウイルスに対して効果のある消毒薬は限られること、そしてそれらの消毒薬は有機物や反応温度・時間に影響を受けることが明らかとなった。各消毒薬の特性を理解して使用することが重要である。

演題発表後、FBSは有機物のモデルとして最適か、という質問があった。FBSで効果のあった消毒薬については、今回は発表しなかったが、10%糞便乳剤を用いて同様の実験を行ったところ、FBSと同様の傾向の結果を得ている。そのため、有機物のモデルとしてFBSを使用することは理にかなっているのではないかと回答した。さらに今回使用した製品以外

の消毒薬についてウマロタウイルスに対して効果があるかという質問をいくつかいただいたが、実際に実験をしていないのでわからないと回答した。ウシロタウイルスによる下痢症も問題となっており、ウシの臨床獣医師の方々にも興味を持って聞いていただいたようであった。本演題を含む今回発表のあった10題の一般演題から1つに最優秀学術賞が授与されることになっていた。一般演題終了後、フロアからの投票および事務局での審査が行われた結果、幸運なことに本演題が最優秀学術賞を受賞することになった。外部の学会や研究会の賞をいただくことは私にとって初めての経験であり、今後の研究の糧としたい。

○育成牛におけるワクチネーションによる呼吸器病対策 ～有効性向上のための取り組み～

乙丸孝之介(鹿児島県農業共済組合連合会)

牛呼吸器病は多くの牛でみられ、その損害は大きい。牛呼吸器病はウシヘルペスウイルス1型、ウシRSウイルス等のウイルス、パスツレラやマンヘミア等の細菌、マイコプラズマの感染が多い。治療および予防対策として抗菌剤が用いられることが多いが、近年薬剤耐性を示す細菌やマイコプラズマの分離頻度が上昇している。そのため、抗菌剤よりもワクチンによる予防対策が望まれている。演者らはこれまでワクチネーションによる呼吸器病対策とその有効性向上に取り組んでおり、本演題はこれまでの取り組みについての総説的な内容であった。

その中で興味深かった内容は、ビタミンEの投与により抗体産生が促進されるというデータであった。ビタミンE添加群と非添加群に分け、ウシヘルペスウイルス1型生ワクチンを2回接種し、2回目ワクチン接種後に両群を比較したところ、ビタミンE投与群の方が有意に抗体が上昇していた。これまでも、ウシやヒトにおいてアルブミン、ビタミンA、銅やセレンの不足によって、抗体産生が減少することが報告されている。栄養状態とワクチン接種による免疫応答との関連について、ウマにおいては注目されていないが、抗体上昇が低い場合、何かの栄養不足が原因のことがあると思われる。逆に過剰摂取によって抗体産生能が低下する場合も考えられる。今後、ワクチン接種にも関わらず抗体が上昇しない場

合の原因として、栄養状態も考慮に入れる必要があると思わせた演題であった。

(根本 学)

○牛の呼吸器病の病理

播谷 亮(動物衛生研究所)

本発表は、牛の生産性阻害要因の一つである呼吸器病の病理についての概説であった。以下に、それぞれの疾病に見られる病理学的特徴について要約する。

・牛RSウイルス病

病理解剖では、間質性肺気腫が高度で、肺の表面あるいは断面では、拡張した小葉間結合織が木の枝のように見える。肺は全体に弾力性を増しまだらに赤色化する。

病理組織学的にも間質性肺気腫が高度であるウイルスは、特に細気管支上皮細胞と肺胞上皮細胞に親和性を有し、これら細胞を傷害、あるいはウイルスが産生する融合蛋白により本病に特徴的な合胞体性多核巨細胞が形成される。合胞体性多核巨細胞では、高頻度にウイルスカプシドの集合体である好酸性細胞質内封入体が観察される。しかし、気管や気管支では合胞体性多核巨細胞は形成されない。肺胞では、肺胞上皮が剥離した後、肺胞壁に沿って血漿蛋白からなる硝子膜が形成される。このような合胞体性多核巨細胞を特徴とする牛RSウイルス性病変は、ウイルス感染後3～10日で形成される。感染が致死でない場合には、細気管支上皮細胞は再生し、肺胞ではⅡ型肺胞上皮細胞の増生がみられ、二次感染を伴わなければ、病変は発症後2～4週間で治癒すると考えられる。一方、進行性の牛RSウイルス肺炎では、び慢性増殖性胞隔炎と硝子膜形成を伴う気腫が生じる。

・牛伝染性鼻気管炎

病理解剖では、鼻粘膜の浮腫と偽膜の付着、咽頭・気管粘膜における水腫や出血、気管・気管支内における滲出液貯留等が観察される。死亡例では、肺全体でまだらに病変が形成される。

病理組織学的に最も特徴的な病変は多巣性巣状壊死である。気管支および細気管支では、全周の上皮細胞が同時に壊死するのではなく、所々に上皮細胞が壊死し、壊死部周縁では核内封入体の形成が観察

される。封入体は未熟ウイルス粒子の関連蛋白質の集合体である。核内封入体を有する多核巨細胞が認められることもある。壊死部では基底膜も傷害される。肺胞領域でも壊死は巣状であり、周辺部で核内封入体の形成が観察されるが、気管支や細気管支よりも封入体は観察しにくい。致死的な場合でも、病変の完全治癒は困難で、気管支や細気管支では肉芽組織形成とその後の器質化による閉塞性病変、肺胞では癒痕組織を残す。

・マイコプラズマ肺炎

病理解剖では、肺炎病変は頭腹側の肺、特に右前葉で観察される。特徴は肺炎病巣内における乾酪壊死の形成である。

病理組織学的には感染数日から1週間で化膿性気管支肺炎が観察される。気管支および細気管支腔内には好中球が浸潤する。病変の進行につれ、気管支上皮、細気管支上皮が剥離、好中球と同様に壊死、さらに好中球浸潤が続くが同様に壊死し、徐々に壊死は周囲に拡大、感染後3～4週で気管支および細気管支炎を中心とした特徴的な球形あるいは円筒状の乾酪壊死が形成される。これら壊死細胞のアウトラインは残存しているのが特徴である。壊死周囲では線維増生、マクロファージ、リンパ球浸潤が起きる。これら病変の完治は困難である。

・牛パスツレラ(マンヘミア)症

病理解剖では、とくに*Mannheimia haemolytica*血清型1と6の感染で、葉全体にわたる重度の胸膜肺炎が観察される。病変は常に前腹部に主座する。特徴は肺炎病巣内に大きさ0.5-5cmの幾何学的形状を呈する暗赤色から灰白色の結節性硬化巣が多発することである。加えて小葉間結合組織の膠様浸潤による拡張が生じ、肺の外観は典型的な“大理石文様”を呈する。

病理組織学的には、*M. haemolytica*血清型1と6の感染で、多発性凝固壊死の形成を特徴とする広範な肺炎病巣が観察される。凝固壊死巣の周囲は多数の燕麦様細胞で包囲される。燕麦様細胞とは、その形が燕麦に類似していることから名付けられた細胞で、菌の産生するロイコトキシンによって好中球が急速に変性壊死したものと考えられている。凝固壊死には、菌の毒素、好中球から放出される酵素および血栓が関与していると考えられている。壊死巣周辺の

肺組織では、線維素析出が顕著である。燕麦様細胞に包囲された凝固壊死は感染後1～3日で明瞭となる。牛が生き残った場合、感染後3～4週間で壊死巣は分離壊死片となり、周囲は線維化する。

*Pasteurella multocida*や*Bibersteinia trehalosi*の感染では、特徴に乏しい軽度な化膿性気管支肺炎を生ずる。肺炎病巣は一般的に小さく、凝固壊死の形成は稀であり、予後は良い。

馬の肺炎も基本的には牛の肺炎に類似しているが、特に細菌感染においては馬の方が重症化しやすいと思われた。その理由として、解剖学的に牛の肺を馬のそれと比較した場合、牛(8葉)は馬(5葉)に比べて分葉が多く、また、牛では小葉間の結合組織がよく発達していることから、牛の方が“感染の局所化”に有利であることが考えられた。

(村中雅則)

○LAMP法による*Streptococcus zooepidemicus*の迅速検出およびDNA抽出法の検討

木下優太ら(JRA総研 栃木支所)

競走期のサラブレッドでは*Streptococcus zooepidemicus*(以下Sz)を原因菌とする肺炎が最も頻繁に発生する。Sz肺炎の治療が遅れた場合には、致死性の高い胸膜肺炎や他の病原体による菌交代現象が生じ重篤化を招きやすいことから、Szを正確かつ迅速に診断し適切な治療を行う必要がある。本研究では、臨床現場で実施可能なSz迅速検出法の確立を目的として、LAMP法の開発を行った。また、検体からのDNA抽出法についても、簡便で有効的な方法を検討した。

LAMP法の特異性検討には、Sz 51株、Sz以外の*Streptococcus*属菌 93株、および他の馬由来病原細菌 30株を用いた。LAMP法の反応条件は65°C、60分とした。DNA抽出法はPURE法(栄研化学)、InstaGene Matrix (Bio-Rad)および煮沸法(100°C、10分間)を使用した。ヒトでの報告を参考に、臨床上有意と考えられる検体中のSzの菌数を 1×10^4 CFU/ml以上と設定し、臨床検体を下記の3グループに分類した。その後、各DNA抽出法をLAMP法と組み合わせ、それぞれの陽性率を比較検討した。グループ1：菌数が 1×10^4 CFU/ml以上の14検体、グループ2：菌数

が 1×10^4 CFU/ml未満の40検体、グループ3：Szが分離されていない検体に最終濃度が 1×10^6 CFU/mlとなるようSzを添加した34検体。

設計したLAMP法はSz以外の細菌とは反応せず、Szを特異的に検出した。臨床検体におけるPURE法、InstaGene Matrixおよび煮沸法の陽性率は、グループ1において92.9、78.6および50%、グループ2では2.5、5.0および2.5%、グループ3では100、91.2および79.4%であった。PURE法との組み合わせによるLAMP法が 1×10^4 CFU/ml以上の検体で最も検出率が高かった。

今回開発したLAMP法はSzを特異的に検出でき、PURE法によるDNA抽出法との組み合わせにおいて臨床検体での陽性率が最も高かった。本LAMP法を用いることで臨床現場において、1時間強でSzによる感染の有無を判定できるため、迅速かつ正確な診断に基づく適切な抗菌薬の選択が可能になると考えられた。

○牛の耳道疾患に対するオルビフロキサシンを用いた治療法の検討

安藤貴朗ら(鹿児島大学)

近年、マイコプラズマ感染の拡大と共に子牛の中耳炎が多発している。子牛の中耳炎は、細菌が耳管を介して中耳に感染し、発熱や耳介下垂、斜頸などの臨床症状を呈するとともに、重症例では顔面神経麻痺から採食不良へと陥る。本調査では、子牛の耳道疾患に対する客観的な診断法を検討するとともに、オルビフロキサシン(ピクタス注射液5%：DSファーマアニマルヘルス)による治療効果を検討した。

臨床現場で中耳炎と診断され、治療を行ったが治癒しない子牛9例(6ヶ月齢)について調査を行った。症例は臨床経過、検査時の臨床所見を記録した後、耳内視鏡検査および耳道洗浄液からのマイコプラズマの分離を実施した。耳道の治療は、オルビフロキサシン500mgを生理食塩水500mlに希釈した洗浄液で外耳の洗浄、あるいは鼓膜穿刺後に中耳の洗浄を行うとともに、オルビフロキサシン(5mg/kg)の筋肉内投与を1～3日間行った。

臨床現場における初診～検査までの日数は平均5.1日間で、抗生剤の全身投与のみが行われてい

た。臨床症状では、発熱(39.5°C以上)が5例、耳介の下垂(片側)が5例、耳介からの排膿が2例で認められ、斜頸および顔面神経麻痺の症状を示す症例は認められなかった。耳道洗浄液からは、2例より *Mycoplasma bovis* が分離された。耳内視鏡検査では、外耳の炎症が9例、中耳の炎症および鼓膜の化膿が6例で認められ、うち鼓膜穿孔が2例で認められた。検査後の耳道洗浄～終診日数は平均2.0日であり、オルビフロキサシンによる耳道洗浄および全身投与により短期間に治癒した。

本調査において、中耳炎に特有の臨床症状である耳介下垂あるいは耳介からの排膿が認められない症例でも、耳内視鏡により中耳炎や鼓膜化膿を示す症

例が認められ、子牛の耳道疾患に対しては、オルビフロキサシンを用いた耳道洗浄および全身投与は有効であると演者らは考察した。

ウマにおいては中耳炎をはじめとする耳道疾患の報告は多くない。しかし、耳道のケアはさほど注目されていないため、耳道疾患を呈する馬がどの程度存在しているのか、あるいは、病原体は牛と同様に *Mycoplasma sp.* であるか否かについて詳細に調査されたことも無い。このように耳道疾患については不明な点が多いため今後検討していくべき課題であると考え。

(木下優太)

第17回超音波骨折治療研究会

平成26年1月25日(土)、クラウンパレス神戸にて第17回超音波骨折治療研究会が実施された。本研究会は、近年、ヒト臨床整形外科領域で多用されているLow-intensity pulsed ultrasound (LIPUS)に関する基礎医学的および臨床医学的知見が報告される学術集会である。参加人数は60名程度で、主に整形外科分野に従事する医師が参加している。LIPUSを用いた治療に関しては、1994年に米食品医薬品局(FDA)が保存的治療を行う新鮮骨折患者への適用を、2000年に癒合不全への適用も承認した治療法であり、その歴史は意外に古い。近年、日本においてもようやくヒト医療で多くの骨折患者にLIPUSが適用され、初めは偽関節が治癒しないような慢性的な骨折病変に対して、2012年からは急性骨折病変も含めて全ての骨折病変に対して保険適用となっている。しかし、その臨床効果が実証されているにも関わらず作用機序に関しては未だ不明な点が多いというのが現状であり、機序解明のための動物実験は欠かせないと考えられるが、その報告はマウスやラットなどの小動物に関するものに限られている。臨床医学研究室では昨年よりLIPUSの馬骨折病変への効果を検証しているが、既報の小動物での成績とは合致しない結果が得られることも多く、結果の解釈に難渋する場面も多い。そこで、ヒト医療における治

療成績および基礎研究の現状を知る目的で本研究会に参加、聴講してきた。

聴講演題；

低出力超音波パルス(LIPUS)治療は2012年の診療報酬改定では、新鮮骨折に観血的手術を行った場合はすべて保険適用となったようだ。これにより、整形外科分野でのLIPUS治療の応用はますます盛んになっていくと思われる。

本研究会の発表のほとんどは、LIPUSによる骨折後の治癒促進に関連する報告だが、腱板損傷への応用を検討する例外的な報告が1題だけあった。

○低出力超音波パルスによるヒト腱板組織由来細胞への影響

名倉一成ら(神戸労災病院)

腱板修復術後の治療成績の向上には合併症である再断裂の率の低下が重要である。そこで演者らはLIPUS照射による腱骨移行部の早期修復の可能性を考え、LIPUS照射によるヒト腱板由来細胞の骨および腱分化への影響を *in vitro* で検討した。

実験方法は、ヒト腱板組織より分離したヒト腱板由来細胞を6 wellプレートに 5×10^4 cell/wellで平面培養し、コントロール群とLIPUS照射群に分けて、

5日間または10日間の培養を行った。LIPUSの照射時間は、臨床利用で一般的である毎日20分間と設定していた。細胞増殖能の評価、骨石灰化の目安となるArizarin Red染色、骨分化関連遺伝子としてALP, Runx2を、腱分化関連遺伝子としてScleraxis (SCX), Collagen I, Collagen IIIの発現をリアルタイムPCR法にて解析した。

結果は、細胞増殖能に両群間で有意な差は認めなかった。Alizarin Red染色ではLIPUS照射群において濃染を認めた。ALP, Runx2はLIPUS照射群で強く発現し、SCX, Collagen I, Collagen IIIの発現は培養5日目にLIPUS照射群で増強を認めた。しかし、10日目の成績ではRunx2以外の項目で両群間に差は認めなかった。

演者らは、骨および腱分化関連遺伝子の増強をLIPUS照射群で認めたとし、LIPUS照射は腱板由来細胞に作用し、骨および腱分化能を増強すると報告をまとめた。結論として、腱板修復術後のLIPUS照射により腱骨移行部の早期修復が促進される可能性があるとした。

しかし、5日目で得られた骨および腱分化関連遺伝子の増強が、10日目には維持されていないことについて考察もなく、本研究成績から結論を導き出すには無理があるように思われた。また、会場からの質問では、「临床上、腱板修復術で採取する組織は関節側に近い部位のはずである。本研究の腱板由来細胞は、その組織から分離していることを考えると分化した骨芽細胞ではないのか？」との臨床外科医からの質問があり、演者もクリアには答えられなかった。さらなる研究が望まれる。

骨折部位へのLIPUS照射は治療効果があるという点で整形外科医にはコンセンサスが得られているが、その作用機序は未だ不明な点が多く、効果にもばらつきがあるようだ。その理由として、演者らは骨折部に存在する骨芽細胞の性質が均一でないこと(骨芽細胞の分化度が異なる・生活習慣病などの影響で骨芽細胞の置かれる組織の特性が異なるなど)に注目していた。

○骨芽細胞のLIPUS応答性はオステオポンチン発現によって減弱する

楠山穰二ら(鹿児島大学)

オステオポンチン(OPN)は骨芽細胞分化前・中期に発現が増加する分泌タンパク質であり、骨分化マーカーとして重要である。演者らはこれまでの研究において、リポ多糖(LPS)や不飽和脂肪酸で「分化」が阻害された骨芽細胞にOPNが高度に発現していることを見出した。そこで、OPNを過剰発現する骨芽細胞におけるLIPUS応答性を検討した。

演者らは、最初にTet-onシステムによってOPN強発現が誘導されるMC3T3-E1 Tet-on OPN株を樹立した。この細胞株にLIPUSを20分間照射し、Focal Adhesion Kinase (FAK)のリン酸化レベルを調べた。また通常のMC3T3-E1細胞にリコンビナントOPNを6時間作用させ、同様の検討をした。さらに、内在性のOPN機能を抑制する実験として、分化したMC3T3-E1細胞をOPN siRNAやOPN中和抗体で処理した上で、LIPUS照射による解析を行った。

結果、MC3T3-E1 Tet-on OPN細胞にて、LIPUSで誘導されるFAKのリン酸化がOPN発現により減弱した。同様にリコンビナントOPNを加えた場合でもFAKの活性は抑制された。一方、siRNAや中和抗体でOPNの機能を阻害すると、LIPUSによるFAKのリン酸化は増強することがわかった。

LIPUS照射による骨治癒のカスケードとしてLIPUS照射によりFAKのリン酸化経路が活性化し、一酸化窒素(NO)産生が誘導され、骨芽細胞の増殖や骨基質の形成が促進されると考えられている。本研究では、OPNの過剰発現と発現抑制という正反対の条件でFAKの反応を検討していた。彼らの成績は、骨芽細胞のOPN過剰発現やOPNによる刺激は、LIPUS応答性を減弱させることを示唆し、OPNを高発現する骨芽細胞では、LIPUSによる治療効果が妨げられる可能性があると考えた。

(笠嶋快周)

○LIPUS照射はビスフォスフォネート関連顎骨壊死(BRONJ)モデルラットの病態を改善する

日高恒輝ら(神奈川歯科大学)

顎骨では力学的刺激存在下でのみRANKLやBCI-2が発現し、リモデリングが起きるという部位特性が報告されている。この特異性は $\alpha 5 \beta 1$ インテグリンが制御し、口腔内細菌に応答した炎症性サイトカイン産生に対する防御であるとも考えられて

いる。一方、ビスフォスフォネート関連顎骨壊死 (BRONJ) の誘因は抜歯 (外科的侵襲) と細菌感染とされているが、抜歯は咬合の負荷、すなわち力学的刺激の喪失をも意味する。力学的刺激が顎骨を維持し骨芽細胞のアポトーシスを防いでいると仮定すると、抜歯は顎骨壊死を惹起するとも考えられる。そこで、演者らはLIPUSが炎症を抑制し顎骨壊死を防止できるかどうかについて検証した。

Alendronate (ALN) を4週間投与したラットに歯周病原菌である *Porphyromonas gingivalis* を経口接種して実験的歯周炎を誘導した。歯周炎を誘導後に抜歯を実施し、LIPUSを4週間照射する群 (LIPUS照射群) と照射を行わない群 (LIPUS非照射群) に群分けして各群間で比較することでLIPUS照射の効果を検討した。

LIPUS非照射群では抜歯窩上皮と歯槽骨の修復が遅延し、上皮が陥入して壊死骨片を囲んだ骨柁様構造がみられた。一方LIPUS照射群では上皮の創傷治癒が起こり、抜歯窩周囲の歯槽骨では破骨細胞マーカーのTRAPおよび骨芽細胞マーカーのALPが回復していた。このことにより、抜歯による力学的刺激の喪失がBRONJを誘発する可能性と、LIPUS照射が代替の刺激として炎症を抑制し創傷治癒を正常化する可能性が示された。

BRONJは、少なくとも8週間ビスフォスフォネート製剤を投与し続けられた患者に起こる骨壊死として定義されている。その発症機序、発生率、対処法や予防法など、未だ明らかとなっていない点が多いが、発症機序の一つとしてビスフォスフォネート製剤の長期投与による過度の骨代謝抑制や血管新生抑制作用が関与しているという説がある。また、顎骨という特定の部位に起こる原因としては、咀嚼や会話により常に機械的刺激を受けていることが関連しているとされ、危険因子として、抜歯、炎症、口腔内不衛生などがあり、薬剤ではステロイド薬、免疫抑制薬、その他多くの化学療法剤が挙げられている。本研究におけるLIPUS照射群では、ビスフォスフォネート製剤を投与されているにも関わらずLIPUSの機械的刺激によって破骨細胞が活性化することが示され、抜歯部における骨のリモデリングが正常に行われていることが示された。しかし、本研究で用いたモデルマウスにおけるビスフォスフォネート製剤

投与期間が短いため、ヒトでのBRONJについても同様の効果が得られるかどうかは疑わしいが、抜歯直後より4週間という急性期短期間で両群間に差が出ている点は注目に値する。また、顎骨は骨形成において内軟骨性骨化が起こらずに膜性骨化のみで形成される例外的な骨である点は考慮する必要があるが、咬合など骨に対する負荷刺激が骨のリモデリングを亢進させること、さらにLIPUSが負荷刺激の代替刺激としても作用するという点は、競走馬の骨折に対するLIPUSの作用機序の一つとして仮定できるのではないだろうか。

○超音波を用いた正確なLIPUS照射のターゲッティング

松村福広ら (自治医科大学)

低出力パルス超音波 (LIPUS) は薬の内服と同様に患者自身が行うものであり、毎日の正確な照射が重要である。つまり、LIPUS照射が実際に行われているかという“量”の問題と、正確に照射されているかという“質”の問題を考慮しなければならない。LIPUS照射の“量”に関しては、既にLIPUS実行率として多くの研究者が調査し、その重要性を報告している。しかし、“質”に関しては、演者らはこれまで手術創などを参考に骨折部と予想される部位にクリップを貼り付けて単純X線を撮影した画像を基に、LIPUS照射部位の見当をつけて患者に教えてきたが、このターゲッティングの正確性には疑問を感じていた。特に軟部組織が厚い大腿部では医師自身も正確な照射部位を知ることは困難であり、さらに正確な照射方向を患者に示すこともできなかった。そこで演者らはこれらの問題点を解決するため、医師自身が正確に骨折部を認識可能かつ、患者に対してもLIPUS照射方向をリアルタイムで指導できる超音波検査機を用いた指導法を導入した。その結果、脛骨だけでなく上腕骨や大腿骨においても医師自身が骨折部位を容易に把握でき、患者に対しても照射すべき方向を正確に指し示すことができるようになった。また、超音波による描出画像はリアルタイムで患者と一緒に閲覧することができるため、患者の治療に対するモチベーションの向上もみられた。演者らは、超音波によるターゲッティングは、LIPUS照射の“質”をあげるだけでなく、LIPUS照射の“量”を

増やす可能性もあり、簡便で有用な方法と考えると括っている。

ヒト整形外科分野でLIPUSによる治療が広く普及したことにより、治療効果を最大限に得るための“質”に関して盛んに検討されている。LIPUS照射は毎日継続して照射することで効果を発揮することから、医療の現場で実際にLIPUSを照射しているのは患者自身であることがほとんどである。したがって、患者自身の治療に対するコンプライアンスの向上は言うまでもないが、経皮的に骨折部位に正確に照射するための適切な指導が不可欠である。しかし、LIPUSは超音波であるために指向性が高く、大腿や

上腕など厚い筋層に覆われた部位では盲目的に骨折部位に超音波を照射することは医師であっても困難である。医学的知識のない患者自身に対する照射方法の指導、照射の意義付けなどはすぐにでも治療効果を向上させることが可能な改善点である。我々の研究においても毎日の照射を研究者や獣医師自身が継続することは困難であり、いずれはLIPUSの普及に伴って馬取り扱い者や厩舎関係者に照射を依頼することが常態化するはずである。期待する治療効果が得られない場合など、再度基本的なこの部分について見直す必要がある。

(守山秀和)

第38回日本角膜学会総会および第30回日本角膜移植学会

本学会に参加するのは一昨年の平成24年以来2年ぶりであるが、たった2年間で角膜移植に関するトレンドが大きく変化していたことに驚いた。一昨年は全体の5割以上を占めていた角膜内皮に関する演題は1割程度まで減少し、それに替わって角膜移植後のドライアイや矯正視力の向上などレシピエントの術後QOLの向上に関する演題が大勢を占めていた。数年前までは研究段階であった、角膜上皮や内皮の培養・移植術に関しては既に臨床レベルの治療法にまで昇格したということであろうか。また、近年のトレンドであるパーツ別移植に関しても、従来の用手的移植片作製からレーシックで馴染みの深いフェムトセカンドレーザーを用いた移植片作製にシフトすることで、よりレシピエントの角膜形状に適合する角膜移植が可能となり、すでにこの方法も一般に普及しつつある。角膜再生医療分野で我が国が世界のトップを走り続けているという事実は、めまぐるしく移行するトレンドに必死に食らいついていく研究者達の努力の賜であることを実感した。また、本学会の開催においても講演スライドは全て英語で作製することが義務づけられており、本学会の国際的な注目度の高さが伺えた。

聴講演題：

○LRIG1による角膜の恒常性維持機構の解析

中村隆宏ら(同志社大学)

演者らは、幹細胞による角膜の恒常性維持機構の解明を目的に、組織幹細胞マーカーとして報告されているLRIG1に注目し、その分子機構の解析を行った。

解析はまず、LRIG1のマウス眼表面における発現の局在を免疫染色で確認した後、LRIG1ノックアウトマウス(KO)を作製し、角膜を含む前眼部の表現型の解析を経時的に行うという手法で進められた。さらにその形態学的特徴を電子顕微鏡、細胞生物学的特徴を種々の細胞マーカーを用いて観察し、角膜創傷モデルを用いて組織幹細胞による上皮修復過程の解析も行った。また、創傷前後での炎症性サイトカインの発現についてもPCRによる比較検討を行った。

その結果、LRIG1はマウス眼表面上皮基底細胞において局所特異的に発現していることが明らかとなった。KOでは、6ヶ月以降で炎症を伴って角膜の透明性が徐々に失われ、病的な表現型を示したKO角膜では角膜マーカーのケラチン12の発現が減弱し、表皮マーカーのロリクリンの発現が亢進していた。またKOでは角膜の創傷治癒過程も傷害され、創傷刺激により炎症性サイトカインの発現が明らかに亢進していた。

これらより、演者はLRIG1が未分化な癌表面上皮

細胞に特異的に発現し、局所の炎症を制御することにより角膜の恒常性を維持していると考察した。

近年、新たな幹細胞マーカーとして報告されているLRIG1については、角膜や小腸などにおける発現が盛んに研究され、Barrandonらが定義した幹細胞に近いホロクローン細胞に多く発現していることが明らかとなっている。我々もウマ角膜上皮幹細胞の培養でホロクローン細胞を分離・培養しているが、これらについてもLRIG1タンパクの発現を調べることで幹細胞であることの強固な根拠とすることが可能であろう。また、KOマウスでケラチン12の発現が減弱してロリクリン発現が増強することから、KOマウスでは角膜上皮細胞が正常なターンオーバーを受けられずに表皮細胞に分化転換してしまうものと考えた。

○Matrigelで形成した角膜輪部由来spheroidの解析

比嘉一成ら(東京歯科大学)

角膜輪部には角膜上皮幹細胞が存在し、骨髄幹細胞のようにその幹細胞を維持する環境であるニッチの存在が考えられる。演者らは、角膜カンファランス2011においてN-cadherin陽性の角膜輪部基底細胞直下にAquaporin1(AQP1)+のニッチ様の細胞が存在し、直接接着している可能性があることを報告したが、今回の報告は*in vitro*でlimbal nicheの培養法を確立するため、基底膜成分を多く含んだMatrigelを用いて角膜輪部由来の細胞をspheroid培養するというものであった。

角膜移植後の輸入角膜輪部組織をdispase II またはcollagenase処理後、輪部上皮周辺を回収してMatrigel上に播種した。これらについて、上皮シート作製時に角膜輪部フェノタイプを維持するKGF+Y27632添加培地と通常のEGF添加培地を用いて培養を行った。培養から1ヶ月後、形成したspheroidの凍結切片を作製し、組織学的解析を行った。

その結果、collagenase処理によって回収した細胞はdisphase II 処理によって回収したものよりも均一な球状のspheroidを形成した。培養1ヶ月後、通常の培地で観察された上皮の伸展は、角膜輪部フェノタイプ維持培地では遅く観察された。さらに培養1ヶ月後においても上皮には角膜輪部で発現するK15やp63陽性細胞が存在し、spheroidの周辺には、角膜輪部で観察されるAQP1陽性細胞も観察された。

演者らは、Matrigelを用いたKGF+Y27632添加培地でspheroid培養を行うと、培養1ヶ月後においても角膜輪部のニッチ様構造が維持されると考察した。

本発表は、幹細胞を用いた再生医療を広く臨床に普及させる上で非常に重要な意味を持つ発表である。幹細胞を臨床応用する上で、細胞の培養期間と長期保存に関する問題は不可避である。通常、培養細胞は対数期を過ぎると増殖活性が減弱して静止期、死滅期と死滅への道を辿るため、増殖活性を維持したまま培養細胞を維持し続けるためには継代操作を行う必要がある。しかし、細胞工学的手法を用いて意図する形状に増殖させた細胞については継代させることができず、培養細胞の移植においては培養細胞とレシピエントとのタイミングの調整が困難であった。本研究によって培養細胞と共にそのニッチも同時に培養することが可能となり、目的とする培養細胞の生存期間を延長させることが可能となった。このことは、今後の移植において常に最適のタイミングで高い活性を有する培養細胞の移植が可能となることが期待できるようになり、今後の発展によっては培養細胞の形状を保持したままターンオーバーさせることも可能となる可能性を秘めている。我々のウマ角膜上皮細胞の研究においても、本研究を応用してシート状に培養したまま細胞活性を維持して保存が可能となれば、臨床応用への大きな前進となるかもしれない。

(守山秀和)

第10回日本獣医内科学アカデミー

本年の日本獣医内科学アカデミーは第10回記念大会として、「獣医内科学をREVIEW!!」をテーマにパシフィコ横浜で平成26年2月7日から9日まで開催された。REVIEW!!のコンセプトに基づき、診断や治療、病態把握などに関する記念プログラムには「この10年をREVIEW!!」という副題が設けられ、この10年間の臨牀的知見の進歩を確認した上で、次世代に向けた取り組みが紹介されるように工夫されていた。ウマに関する講演や報告は少なかったものの、ウマ医療に応用可能な再生医療分野、超音波診断、麻酔学、臨牀病理学およびリハビリテーションなどに関する新たな知見が多数報告されていた。以下にその概要を報告する。

○脂肪組織由来間葉系幹細胞の特徴と臨床応用への可能性

藤田直己(東京大学)

間葉系幹細胞(MSC)はヒト医療では既に厚生労働省の認可のもと、臨床研究が進んでおり、獣医療においても脊髄損傷や変形性関節症などの疾患に対し、実際に臨床応用され、安全性・有効性が提示されている。治療効果としてMSCに期待される性質は、様々な細胞への分化能の他、液性因子などを介した組織修復や損傷抑制の補助的効果である。

MSCの細胞原として骨髄と脂肪が一般的に考えられているが、イヌでは組織侵襲が低い脂肪組織のほうが利用しやすい。演者らは採取する脂肪の部位によって脂肪由来間葉系幹細胞(ADMSC)のもつ能力や性質が異なることを明らかにした。大網、鎌状間膜、皮下組織から得られるADMSCを比較すると、大網から得られるADMSCは骨への分化能力が高い一方、増殖能力が他の2つと比較して低いことが分かった。鎌状間膜のADMSCは増殖能力が高く、骨への分化能力も高いことが分かった。皮下組織は増殖能が高く、比較的容易に得ることができるため、総合的にはADMSCの細胞源として最も有用である

と考えられた。

○膀胱における神経内分泌腫瘍(ガストリノーマ)に対してソナゾイドを用いた造影超音波検査を実施した犬の一例

遠山伸夫ら(北海道大学)

ソナゾイドは造影超音波検査(CEUS)の血管造影剤として利用されている。微小気泡を特別な膜で包んだ構造をしているため、血管内投与後の超音波検査によって血管を強調して描出することが可能である。ヒトでは腫瘍の診断に多く用いられており、獣医療においても腫瘍の診断への臨床研究がすすんでいる。

演者らはCEUSの手法を用いてイヌではこれまでに報告がないガストリノーマの鑑別診断を実施した。症例は間欠的な嘔吐を主訴とするミニチュアダックスフンドであり、かかりつけの獣医師が従来の超音波検査を腹部に実施したところ、十二指腸近傍の腫瘤を発見したものの、確定診断ができなかった。その後、精密検査のために演者らの動物医療センターに来院した。従来の超音波検査において、膀胱右葉の結節を発見したため、ソナゾイドを利用したCEUSを実施した結果、同結節には周囲の(健常な)膀胱組織とは異なる造影増強効果を認めることができた。その後、外科的切除および内科的治療により良好な経過が得られている。

従来の血流ドップラー法では直径10 μ m以下の血管や血流速度が1 μ m/s以下の血流を描出することはできなかった。その一方、CEUSによる血管造影では直径が2-3 μ mであれば造影可能であり、血流速度が遅い血管であっても描出することが可能である。また、短時間かつ非侵襲的に実施できることから整形外科領域を含む様々な分野での応用が期待されている。

(笠嶋快周・田村周久)

催 事 案 内

第27回日本ウマ科学会学術集会のお知らせ

日時：2014年12月1日(月) 12:30より

12月2日(火) 8:30より

場所：東京大学農学部 弥生講堂(一条ホール、
アネックス・セイホク)、3号館教授会室

プログラム：

12月1日(月)

一般口演・特別講演・ランチョンセミナー・
企業展示・JRAとの合同懇親会

12月2日(火)

一般口演・優秀発表賞候補口演・招待講演・
ランチョンセミナー・臨床委員会症例検討会・
定時総会・企業展示

なお、12月1日(月)は、第56回JRA調査研究発表
会が併行開催されます。

参加費： 会員3000円 非会員5000円

学生1000円(会員・非会員を問わず)

【臨床委員会招待講演】

(弥生講堂；12月2日(火) 13:00-15:00)

テーマ：蹄葉炎への限りなき挑戦

— 蹄病専門医(Podiatrist)による蹄葉炎治療 —

講演者：Dr. Scott Morrison DVM (Rood and Riddle
Equine hospital, USA)

座長：桑野睦敏(JRA競走馬総合研究所)

問い合わせ先

○日本ウマ科学会事務局

【ADD】〒320-0856 栃木県宇都宮市砥上町321-4

JRA競走馬総合研究所内

【TEL】028-648-5099

【FAX】028-647-0686

【E-mail】e-office@center.equinst.go.jp

【特別講演】

(3号館教授会室；12月1日(月) 13:30-15:30)

テーマ：ウマの心理とコミュニケーション

講演者：持田裕之(D-J RANCH)

座長：坂本浩治(JRA競馬学校)

【臨床委員会症例検討会】

(3号館教授会室；12月2日(火) 8:30-10:30)

テーマ：蹄疾患(装蹄師と獣医師のコラボレーション)

座長：桑野睦敏(JRA競走馬総合研究所)

コメンテーター：Dr. Scott Morrison DVM (Rood and
Riddle Equine hospital, USA)

「馬の科学」編集規定

昭和39年1月20日設定

平成18年3月29日改定

平成21年1月4日改定

平成23年6月6日改定

1. 発刊の目的

本誌は、馬についての自然科学、社会科学および人文科学に関する内容の普及と啓発のための和文記事を掲載する普及誌(学術誌ではない)とする。

2. 投稿資格

投稿は、日本中央競馬会の役職員およびその関係諸団体の役職員、日本ウマ科学会会員、ならびに編集委員会が特に認めたものとする。

3. 原稿の掲載

原稿の掲載については、編集委員会で協議し、編集委員長が決める。

4. 原稿の提出

原稿の提出は、原則として編集委員を通じて行うものとする。外部の投稿者は、編集主幹に提出するものとする。

5. 掲載の分類

本誌は、掲載内容により、研究コーナー(レポート、ノート)、総説、解説記事、技術コーナー(各種技術講座など)、特別記事、トピック、随筆、研修・セミナー、情報コーナー(衛生情報、学会見聞記など)、催事案内その他に区分して掲載する。

6. 発行回数

本誌の発行回数は、原則として年4回とする。

7. 別刷りの贈呈

原則として、研究コーナー(レポート、ノート)、総説、解説記事の執筆者にはPDFファイルを贈呈する。

8. 雑則

その他、この規定に定めのない事柄は、編集委員会の協議を経て別に定める。

「馬の科学」執筆要領

1. 原稿の作成

原稿は、A4版横書きとし、ワープロソフト（Microsoft Wordが望ましい）を用いて、下記の留意事項に従って作成して下さい。

2. 校正

校正は、原則として執筆者は初校の1回のみとし、再校および三校以上は編集主幹ならびに印刷所が行うものとします。

3. 転載の承認

本誌は、普及誌（学術誌ではありません）です。原稿作成にあたり、他の文献などから図表を引用する場合には、その転載許可は原則として著者の責任で行って下さい。

4. 用語

専門用語は、原則として日本語で記し、英語訳が必要と思われる場合には、日本語の後に付記して下さい。付記する英語は、本文の最初に出てくる場所のみとします。動・植物名および外国の国名は、原則としてカタカナで表記して下さい。学名はイタリック体で、度量衡の単位と略号は、CGS単位または国際単位（SI単位）を用いて下さい。数字および英字は半角文字を用いて下さい。

5. 引用文献

記載方法は一般的な学術誌の投稿規定に準じます。

本文中に引用ヶ所を明記し、著者名、発行年、タイトル、誌名、巻数ならびに頁を最後に記載して下さい。

6. 図（写真）

写真は鮮明なものを使用し、印刷物からの複写は原則として避けて下さい。

7. 原稿に関する照会および送付先

〒320-0856 栃木県宇都宮市砥上町321-4

日本中央競馬会競走馬総合研究所

「馬の科学」編集主幹 宛

メールによる送付先アドレス：equisci@center.equinst.go.jp

電話：028-647-0650（代表）

ファクシミリ：028-647-0686

馬 の 科 学 51巻3号（通刊471号）

発 行 平成26年9月15日

編集委員会

委員長： 間 弘子 主幹： 石田信繁

委 員： 岡田裕二、片山芳也、草野寛一、桑野睦敏

近藤高志、関 一洋、高橋敏之、羽田哲朗

発 行 所 日本中央競馬会競走馬総合研究所

〒320-0856 栃木県宇都宮市砥上町321-4

電話 028-647-0650（代）

印 刷 所 株式会社 松井ピ・テ・オ・印刷

〒321-0904 栃木県宇都宮市陽東5丁目9番21号

電話 028-662-2511（代）

Equine Science

馬の科学