

解説

本誌の「疾病診断における核酸をベースにした試験」で解説されているように、近年、疾病の診断に核酸の特異性を利用する技術は大幅に進歩した。従来の、時間を要する単調な技術は、自動化されたミクロ的抽出手順（単一の細胞でも抽出できる手順）や精巧な蛍光染色による光学的技術に取って代わられている。わずか5個の分子でも検出することができる核酸の塩基配列解析とポリメラーゼ連鎖反応（PCR）技術が、ハイブリダイゼーションや制限酵素フラグメント分析などを始めとする比較的単純な方法を凌駕するようになっている。近年のハイブリダイゼーション法は、しばしばマイクロアレイに応用され、これにより、数千もの遺伝子情報を発現させると同時に、その情報を自動的に分析することが可能となっている。

病原体の遺伝子を増幅させる技術により、診断の範囲は拡大した。このような感受性の高い手順の短所と長所は？ また、どのような場合に使用するのが最適で、どのような場合に不適當なのだろうか？ いくつかの例を挙げて示すことにしよう。

人類に脅威を与える病原体、すなわち HIV とウエストナイルウイルス（脳炎を引き起こす）の2種類のウイルスに対し、PCR は広く応用されている。核酸の抽出後は、病原体のサブゲノム部分の増幅は、低レベルの封じ込め施設でも作業を継続することが可能である。HIV に関しては、時間の経過に伴う HIV 感染患者の血液中のウイルス量（ウイルス RNA のコピー数）をモニターすると同時に、抗ウイルス薬による治療の有効性を確認する目的で、PCR が広く応用されている。ウイルス量のモニターにおいては、遺伝子のより高度に保存されている領域の解析が行われる。また、抗ウイルス薬による治療の有効性の確認においては、PCR に続いて塩基配列解析を行い、薬剤耐性を持つ突然変異体をモニターする。ウエストナイルウイルス（WNV）に関しては、ヒトや動物の病気診断を行う施設が、PCR 検査を行っている。それにより、これらの施設が WNV を分離し、北米のウエストナイルウイルス

ス監視活動に参加することが可能となった。

PCR を利用する診断方法の短所は、同時に長所にもなっている。理論的には PCR は、病原体のゲノムひとつでも増幅できるほど感度が高い技術である。したがって、不活性、あるいは欠陥のある病原体ゲノムでも増幅できる可能性は高い。しかし、PCR 技術は非常に高い感受性を有しているため、常時コンタミが発生する可能性があるのと同時に、疑陽性の結果がもたらされる可能性がある。いずれにしても、PCR 陽性シグナルを「リアルタイム PCR」法を用いて慎重に評価しなくてはならない。この方法では、病原体のゲノムのコピー数を示すことも可能である。このような技術を応用するには高価な装置が必要となる場合が多いが、一般的に小規模な研究所では購入する余裕がない。また、熟練した職員を配置してサンプル材料を適切に取扱い、サンプルの質の低下とコンタミを防止しなければならない。このような制約はあるものの、医学／獣医学的診断における PCR 技術の将来性は極めて明るいと言える。

核酸技術の普及に伴う問題点のひとつは、病原体の分離、識別、基礎研究があまりにも日常的に行われていることなので、いまさら資金提供を行う必要はないとの意見が生まれていることである。したがって、最新技術の導入に熱心なグループと従来の手法を守る保守的なグループとの間で健全なバランスを取り、既知の、あるいは新しい病原体の識別技術を進歩させなくてはならない。そうすることにより、病原体を効果的に抑制することができるのである。

問い合わせ先：C. J. イセル博士，電話 (859) 257-1710, cissel@uky.edu ; あるいは R. F. クック博士, rfcook1@uky.edu, マックスウェル・H・ゲルック馬研究センター, ケンタッキー大学

各国の情報

日本における馬ウイルス性動脈炎の試験

日本で馬ウイルス性動脈炎 (EVA) が発生したという臨床的証拠は存在しない。また、疫学調査の結果からも、日本には EVA は存在しないとされている。過去 10 年間で日本には数

千頭もの馬が輸入された。日本の農林水産省（JMAFF）の動物検疫所は、EVA に対して厳しい検疫を実施している。日本に馬が輸入される際には、国際獣疫事務局（OIE）が指定している血清中和（SN）試験が行われている。SN 試験は、多くの時間と労力が必要であるのと同時に、感染力のある馬動脈炎ウイルス（EAV）も必要であることから、高度の封じ込め施設で行わなくてはならない。

感染力のあるウイルスを必要としない EVA の ELISA（酵素免疫測定法）が開発されている。この試験では、組換えバキュロウイルス系において発現した GL 融合蛋白質抗原と EAV の N 蛋白を使用する。このため、封じ込めレベルの低い施設でも検査が可能となっている。ELISA の感受性と特異性を評価するため、実験的に EAV に感染させた馬の血清と、動物検疫所の輸入馬の血清を使用した比較調査を行った。さらに、放牧中の馬から採取した血清の共同調査を行うために、アメリカのケンタッキー大学のピーター・ティモニー博士、およびスウェーデンの国立獣医学研究所のサンドル・ベラク博士に ELISA の試験キットを送付した。ELISA の比較調査、および3ヶ所の研究所で実施された EVA の SN 試験の結果、SN 試験で陽性となった馬は ELISA でも陽性になったが、SN 試験で陰性となった血清の一部は、ELISA で疑陽性の結果が出た。1998 年から 2000 年にかけて、農林水産省と日本中央競馬会の職員で構成される「馬防疫検討会（LCCEID）」の専門委員会は、ELISA の結果を評価した。その結果、協議会では ELISA は、EVA に対する有用かつ適切な血清学的試験であるとの結論に達した。2001 年、動物検疫所は、2,000 頭の輸入馬に ELISA と SN の両方の試験を実施した。予防接種を受けた馬から採取した血清のうち 9 件が、両試験で陽性となった。残りの 1,991 件は、SN 試験では陰性であった。また、ELISA 試験の結果は、1,934 件が陰性、66 件（3.3%）が陽性であった。

現在、ELISA は、EVA の診断に応用されている。ELISA で陽性となったサンプルは、すべて SN 試験によって再確認されている。したがって、SN 試験の対象となるサンプル件数は大幅に減少している。

問い合わせ先：ヨシオ・フナカ^{*} 博士，日本中央競馬会 競走馬総合研究所 栃木支所，
yoshiof@epizoo.equinst.go.jp

鼻疽

1968年から1999年に至るまで、ブラジルでは鼻疽の発生は報告されていなかった。しかし、1999年末、ペルナンブコとアラゴアスの両州でこの疾病が発見された。ペルナンブコ連邦大学(UFRPE)が、ペルナンブコ州レシフェ市にあるブラジル農務省の地方事務所に鼻疽の発生を報告した。診断は、臨床症状、病理学的検査、補体結合試験、および細菌培養に基づいて行われた。鼻疽に罹患した動物の中には、サトウキビ工場の役務用の馬とラバも含まれていた。ブラジル農務省は、直ちにパリの国際獣疫事務局(OIE)にその情報を伝達した。

馬とラバが感染し、数頭のラバが死亡した。臨床症状は、膿性鼻汁、発熱、浮腫(四肢および胸部)などであった。ヘモグラムの変化(白血球数の増加・ $25,000/\text{mm}^3$ 以上)と血漿中フィブリノーゲン値の変化($0.8\text{g}/\text{dl}$ 以上)が頻繁に観察された。生き残ったラバには、皮膚の損傷、浮腫、飛節中央部と腹部の小結節、潰瘍などが長期間認められた。また、跛行もしばしば認められた。

馬では潜伏性の鼻疽が一般的であったが、9月から2月にかけてのサトウキビの収穫期に働いた馬には、慢性あるいは呼吸器系の鼻疽が発生し、皮膚の損傷もしばしば観察された。

剖検の結果、多くの症例で重度の胸膜肺炎、両側性の副鼻腔炎、および鼻腔(中隔と甲介)の壊死が認められた。細菌学的検査では、病原菌(*Burkholderia mallei*—鼻疽菌)が検出されなかったケースもあった。しかし、組織病理学的検査の結果から原因菌の存在が示唆され、皮膚の損傷部の周囲には石灰化が確認された。原因菌が分離できなかったのは、おそらくサンプルを収集してから、細菌学的検査を実施するまでに長時間を要したためと思われる。

治療が実施された個体の数はわずかだったが、治療しても原因菌を排除できなかったことが明らかにされた。

数州において、過去2年間にわたり疫学調査が実施された。11の州において、獣医師が使役馬から血液サンプルを採取し、補体結合試験を実施した。その調査は、ブラジルの鼻疽を制御・撲滅する新しいプログラムを支援することになるだろう。

2002年には調査結果の評価が行われ、全国撲滅プログラムが採用された。鼻疽の拡散を抑制するために、2000年1月以降、州境を超える馬の移動はブラジル農務省によって管理されるようになった。また、すべての馬主と土地の所有者に鼻疽を始めとする馬の病気についての情報を提供するため、衛生教育プログラムがペルネンブコ連邦大学によって作成された。

問い合わせ先：ヘリオ・マツ博士， equivet@globo.com， ペルナンブコ連邦大学， ブラジル

2002年第3四半期

ニューマーケットの国際照合センターは、以下の病気の発生を報告した。

オーストラリアのニューサウスウェールズ州からは、多くの施設で馬ヘルペスウイルス (EHV-1) による流産が発生したことが報告されている。多くの妊娠後期の牝馬が移動したことが、その原因と考えられている。馬ヘルペスウイルスによる呼吸器系の疾患は、フランスのいくつかの品種の多数の馬と、アルゼンチンの1ヶ所の牧場の数頭の仔馬に発生した。

馬インフルエンザは、フランスの多くの馬と、スウェーデンのサラブレッドの競走馬に発生したことが報告された。7月、馬インフルエンザ・ウイルス2型 (H3N8) がケンタッキー州の馬から分離された。予防接種を受けていた馬の臨床症状は一般的に軽く、期間も短かった。

馬ピロプラズマ病の発生例は、スイスから報告されている。その中には、スペインから最近輸入された1頭の馬が含まれている。アルゼンチンでは、分娩までの期間がおよそ60日から30日までの牝馬にロタウイルスの予防接種を行った結果、それらの牝馬から生まれた仔馬にロタウイルス性の下痢が発生する割合が激減した。

世界で最も頻繁に発生が報告されている疾病は、依然として腺疫である。腺疫はスウェーデンとスイスで数多く発生したことが報告されている。また、アルゼンチン、アラブ首

長国連邦、イギリスからも発生例が報告された。

アメリカ国内の情報

馬の画像診断法の進歩

超音波診断は、馬の臨床現場において必須となっている。1980年代初期に導入された超音波技術は、生殖器官、消化管、呼吸器、心臓の病気の診断や治療に応用されている。しかし、近年では他の先進的な画像診断法も応用され始めている。

ここ20年の間に導入された核シンチグラム造影は、放射性同位元素と鉱石検波器を使用し、放射性同位元素の取り込みが多い部位を描出する。描出部位は、筋骨格の炎症や骨の代謝増加を示している。

コンピュータ断層撮影（CT）と磁気共鳴映像法（MRI）は、一部の疾病に関しては、X線写真や超音波画像よりも鮮明な画像を描出する。これらの診断法を利用できる状況は依然として限られているが、大型の馬を収容できる施設の数は増加しつつある。現在、成馬の画像を撮影できるMRI施設は1ヶ所（ワシントン州立大学獣医学部）のみである。しかし、成馬の画像を撮影できるCT施設は、コーネル大学、オハイオ州立大学、コロラド州立大学など、数ヶ所の大学に設けられている。

CTもMRIも、非侵襲、多角的、二次元的、かつ断面的な画像診断技術で、解像度の高い画像を提供するが、コンピュータによって生のデータを再構築する必要がある。CTでは、X線に類似した電磁波が使用されているが、MRIでは磁場と無線周波数パルスが使用されている。CTの場合、対象となる部分にX線が円周回転的に発射され、放射線探知器によって受信される。連続的な平行のスライスが患者から記録され、透過度をコンピュータが分析し、断層画像が再構築されるのである。CTは、頭蓋骨、脳、頸椎、四肢などの骨構造を描出するのに頻繁に使用される。また、体重が約400ポンド（180 kg）以下の馬では、腹腔や胸腔の軟部組織などを描出するのにも有効である。小型の動物の場合は、副鼻腔、鼻腔、脳、耳管、肺、副腎などの組織を描出するのに使用されている。

MRI は、脳、脊髄、腫瘍、関節、腱などの軟部組織を描出するのに優れている。例外は肺と消化管である。肺や消化管の動きによってアーチファクトが発生するからである。これらの描出には、CTの方が適している。

大半の大学および近年増加傾向にある民間施設では、仔馬を対象としたCTを備えているが（仔馬用のMRIはまだ普及していない）、成馬の撮影が可能な施設は依然として不足している。しかし、CTやMRIの技術が普及し、その有用性が認識されるにつれ、成馬の撮影が可能な施設が増加するだろう。ケンタッキー州中部の動物専用CT/MRI施設が、4頭の仔馬のCTとMRIの画像を撮影した。これは麻痺あるいは奇形に関する脊髄と椎骨の異常を評価するためである。

新しい画像診断技術は、従来の診断法では正確な診断を行うことができないときに、「次のステップ」を提供する。最終目的である確定診断がなされなければ、獣医師は適切な治療および予後や長期的な情報を提供することができないのである。

問い合わせ先: ジェニス・シモン博士, あるいはリチャード・パーク博士, 電話 (859) 277-3336, VetScan, 1725 Harrodsburg Road, レキシントン, ケンタッキー州 40504

ウエストナイルウイルス情報、2002年

2002年、ウエストナイルウイルスが全米で爆発的に流行し、西海岸のワシントン州やカリフォルニア州にまで到達した。図1には、1999年夏にニューヨーク州でこのウイルスが初めて確認されて以来のウイルスの拡散状況が示されている。現在、ウエストナイルウイルス感染症が発生していないと考えられているのは、アラスカ州、アリゾナ州、ハワイ州、ネバダ州、オレゴン州、ユタ州のみである。この感染症は、現在、アメリカの風土病として正式に認定されている。ウエストナイルウイルス感染症はカナダでも蔓延し、サスカチュワン州からノヴァスコシア州に至る5つの州に広がっている。

2002年12月31日現在、疾病管理予防センター（CDC）は、39の州とコロンビア特別区

で3,873人が感染したと報告した。そのうち246人が死亡した。感染者の中央値は56歳、死亡者の中央値は78歳であった。イリノイ州、ミシガン州、ルイジアナ州では、300人を超える人々がウエストナイルウイルス感染症と診断された。

米農務省（USDA）は、昨年12月31日現在、2002年には40の州で14,717頭の馬に発生したと報告した。ウエストナイルウイルス感染症の馬の20～30%は、死亡あるいは殺処分されたと推定されている。州ごとの分布は図1に示されており、イリノイ、アイオワ、ネブラスカ、テキサスの各州では、1,000頭を超える例が報告された。その分布状況は、東部の各州の報告件数が、中央部および西部の諸州の報告件数より少ないことを示している。この原因としては、1999年以降の蚊の駆除、予防接種、および自然感染による抵抗性の獲得が考えられている。

馬およびヒトに加えて、14,000羽の鳥が死亡したことも報告されている。しかし、その数字は、ウエストナイルウイルス感染症で実際に死亡した鳥の数を大幅に下回っていると思われる。さらに、この感染症は、シカ、イヌ、ヒツジ、ヤギなどを始めとする哺乳類、およびアザラシなどの海洋哺乳類、また、最近ではワニなどの爬虫類の死亡原因にもなっていることが示唆されている。

ケンタッキー州農務局のラスティ・フォードは、2002年のケンタッキー州における罹患率に関する数字を発表した。彼は11月の末にかけて、西部および中央部の78の郡で27の異なる品種の馬、および1頭のロバと3頭のラバを含む500頭に発生したと報告した。その大半は1歳から20歳までの馬に発生し、死亡率は25%に達した。

ケンタッキー州の獣医師であるD. ノッター博士は、175,000回分を超えるウエストナイルウイルス・ワクチンを認可した。ウエストナイル病によって死亡、あるいは殺処分された129頭の馬のうち、3頭は推奨されている予防接種を受けていた。114頭は予防接種を受けておらず、12頭は予防接種を受けていたもののウイルスに暴露するまでの時間が短く、免疫機能が十分に発達していなかった。このことから、ワクチンはウエストナイルウイルス感染症による死亡件数を減少させるのに有効であると解釈することもできる。しかし、ワクチンの有効性を確認するには、予防接種を受けた牝馬と受けていない牝馬の頭数を対

象とした罹病率あるいは死亡率の比較を行わなくてはならない。

図 1：ウエストナイルウイルス感染症の馬のケース、2002 年

2002 年 12 月 31 日現在の米農務省の報告に基づいている

疾病診断における核酸をベースにした試験

過去 10 年において、分子生物学の新しい技術が導入された。つい最近まで研究用に過ぎなかった技術が、幅広く一般に使用されるようになった。そして、核酸をベースにした試験が、疾病診断に使用される傾向が強まっている。この技術を活用すれば、未知の微生物の識別、類似した微生物の鑑別、感受性の高い分析方法の導入による複雑なサンプル内からの少数の病原体の検出、分析評価結果の迅速な入手などが可能となる。これらの試験では、試験管内で DNA を自然に複製するという化学的技術が活用されているので、研究者は病原体ゲノムの特異的な塩基配列を識別することができるのである。

核酸の配列解析技術の進歩、およびコンピュータによる配列データの比較により、分子生物学者は、馬の病気の診断に大きく貢献するようになった。微生物ひとつの遺伝子配列の解析でも、かつては高度に専門的な研究所で数ヶ月の作業を要するプロジェクトであった。また、微生物のゲノムのすべての遺伝子配列を解析するには膨大な作業量が必要であったことから、10 年前にはほぼ不可能であった。その作業量を示す例を挙げると、大腸菌のゲノムは二重鎖の DNA 分子上の 4,377 個の遺伝子で構成されており、4,639,221 個の塩基対の特異的な塩基配列が存在する。最近では、遺伝子配列は一週間で解析できる場合も少なくない。また、微生物のゲノムの塩基配列の解析が行われることも多くなっている。技術は進歩し続けているので、まもなく微生物のゲノムの塩基配列を数時間で解析できるようになるだろう。

微生物の分類の一部は、特定の遺伝子配列の比較に基づいて行われている。最も一般的に使用されているのは、16SrRNA 分子をコード化している遺伝子であり、約 1,400 個の塩基により構成されている。それらの塩基配列のデータベースが利用可能となっており、研究者は、塩基配列中の保存領域と特異的な領域の両方を確認することができる。また、そ

の情報を利用することにより、分類学者は遺伝学的に微生物のグループ分けを行い、系統発生的なツリーを作成することが可能である。ある微生物が分離され、その識別が困難な場合、16S 遺伝子の塩基配列を迅速に解析し、既知の微生物の塩基配列と比較することができる。その方法を疾病の診断に応用した良い例として、ノルカジア状胎盤炎の原因となる微生物を確認した例がある。分離された微生物は、既知のすべての微生物との相同性が97%未満であった。核酸をベースにした試験を実施した結果、その微生物は *Crossiella* 属であることが示唆されたので、*Crossiella equi* と命名された。一般的なルールとして、未知の微生物の塩基配列が、既知の微生物の塩基配列の98%と同じ、あるいはそれ以上の場合、未知の微生物は既知の微生物と同じ種類である可能性が高いとされている。より多くの遺伝子と完全なゲノムの塩基配列が解析されるにつれ、より完全かつ詳細な情報が利用可能になるだろう。

病原性を持つ微生物あるいは遺伝子（毒素遺伝子など）に特異的な配列は、診断的な核酸を用いた試験の対象となることが多い。なぜなら、他の様々な塩基配列を含む混合物の中から、特定の塩基配列を標的として検出することが可能だからである。診断目的に最も頻繁に使用されている核酸を用いた試験は、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）試験である。この試験の基本的なプロセスは、分離から始まり、増幅に進み、検出で終わる。特定の微生物を含んでいると推測されるサンプルから、まず核酸を分離し、特異的な塩基配列を標的としたプライマー（同種の分子が複製されるとき元の分子）と共に（PCR）チューブの中に入れる。次に、核酸合成を促す化学物質（DNAポリメラーゼ、ヌクレオチド、塩基）を加えた後、温度を循環的に変化させる機械（サーモサイクラー）の中にサンプルを入れ、DNA合成の連鎖反応を起こさせる。その増幅段階は、迅速かつドラマチックである。わずか1時間で、ひとつの分子が10億個以上に増幅する場合があるからである。検出は質的な基準（陽性／陰性）に基づいており、通常、増幅したDNAのバンドをアガロース・ゲル上で観察することによって行われる。陽性増幅は、目標物（病原性を持つ微生物あるいは遺伝子）がサンプルに存在していることを示唆している。ほとんどの核酸を用いた試験は、この方法を基礎とした変形型である。「ネステッドPCR」と呼ばれる増幅手法を使用したり、ラベルしたプローブを使用して増幅したDNAを検出したりすることで、感度と特異性が強化される。また、多重PCRを使用すれば、1回の反応において複数の目標物を検出することも可能である。さらに、最初に逆転写段階（PCR増幅の前に追加される）を含むRT-PCR

を使用すれば、RNA の目標物も検出可能である。リアルタイムの PCR では、増幅段階と検出段階が組み合わされるので、多くの結果を迅速に得ることができる。特定の病原体を検出する技術は、核酸を用いた試験の進歩に伴い、今後もさらに向上するであろう。

問い合わせ先：ステファン・セルズ⁸ 博士，あるいはマイク・トナヒュー博士，電話 (859) 253-0571，sfsells1@uky.edu，家畜疾病診断センター，ケンタッキー大学