

第 63 回 競走馬に関する調査研究発表会 (2021 年度)

プログラム・講演要旨

日時：2021 年 11 月 29 日（月） 10：00～17：30

会場：KFC Hall & Rooms（3F：KFC Hall）

本年の調査研究発表会については、COVID-19感染拡大防止の観点から会場への集合人数を制限し、本会が指定した者以外の入場は不可とさせていただきますのでご理解とご協力をお願いいたします。



日本中央競馬会

■ 参加者へのご案内

参加者の皆様へ

- JRA 職員は、JRA 発行の身分証明書を着用してください。
- JRA 職員以外の参加者は、受付（3F）にて手続きを済ませてから、名札を付けて会場にお入りください。
- 講演順序は都合により変更することがあります。あらかじめご了承ください。
- 質問・討議される方は、通路に設置したマイクスタンドまでお越しいただき、必ず「所属・氏名」を述べてから発言して下さい。
- 質問・討議の採択・時間などは、座長に一任させていただきます。
- 講演中の会場の出入りはご遠慮ください。講演の合間の出入りは後方 1 ヶ所のドアからお願いします。
- 会場内での呼び出しはいたしません。
- 会場内での写真・ビデオ等の撮影はご遠慮ください。
- 会場内は飲食可ですが、会場で提供された物以外は持ち込みできません。
- 喫煙は所定の場所（3F に喫煙室があります）でお願いいたします。
- クロークスペースは自己責任でご利用ください（番号札を用意してあります）。
- 事前配布されている方は、当日このプログラムを持参してください。

演者・座長の皆様へ

- 講演時間は 7 分以内、討論は 3 分以内です。持ち時間（10 分）を厳守して下さい。
- 講演開始 7 分後に青ランプ、10 分後に赤ランプを点灯します。
- スライド送りについては、舞台上に用意したリモコンをお使い下さい。
- スライド説明のポインターについては、PowerPoint のレーザーポインター機能をお使い下さい。
- 演者・座長の方は、講演開始 10 分前までに次演者席・次座長席にお着きください。交代は速やかにお願いいたします。

■ 第 34 回 日本ウマ科学会学術集会のご案内

例年、同時開催しております日本ウマ科学会主催の「第 34 回日本ウマ科学会学術集会」につきましては下記日程で WEB 開催されますので、ぜひご参加ください。

【会期】 2021 年 12 月 1 日（水）～ 12 月 10 日（金）

【会場】 日本ウマ科学会 特設ページ

【参加費】 無料（ただし、2022 年度の日本ウマ科学会員に限る）

【参加登録】 2022 年度（2021 年 11 月 1 日～2022 年 10 月 31 日）の年会費を収めていただいた方に特設サイト専用の ID とパスワードをメールにて送付いたします。

詳細につきましては、日本ウマ科学会 HP（<http://jses.jp>）をご覧ください。

【学会事務局】

日本ウマ科学会事務局

〒329-0412 栃木県下野市柴 1400-4 JRA 競走馬総合研究所内

Tel : 0285-39-7398 FAX : 0285-44-5676

学術集会担当：近藤高志（JRA 総研 企画調整室）

第63回 競走馬に関する調査研究発表会 プログラム

開 会 10:00

10:10～

座長：栗本慎二郎（栗東）

1. ヒト用マalaria診断装置を用いた馬ピロプラズマ症の迅速診断 ～2020 東京オリンピックでの使用例～

○越智章仁¹・鳥家雄二²・仙石未佳子²・土屋成一郎²・岸 大貴¹・上野孝範¹・額田紀雄³・片山芳也³

（¹総研・²シスメックス株式会社・³栗東）

2. 血清検体からのウマヘルペスウイルス 1 型の検出

○辻村行司・坂内 天・上林義範・根本 学・太田 稔（総研）

3. ヒト用インフルエンザ遺伝子検査キットの馬インフルエンザ診断への応用

○根本 学¹・上林義範¹・坂内 天¹・辻村行司¹・木下優太¹・山中隆史²・太田 稔¹（¹総研・²馬事部）

10:40～

座長：関 一洋（日高）

4. 162 頭における運動時内視鏡検査所見および安静時喉頭機能グレードとの関連性

○新屋敷直希¹・東樹宏太¹・三田宇宙²・有馬大輔¹（¹美浦・²総研）

5. LCPによる頸椎固定術を実施した CVSM の一症例

○岩本洋平¹・宮越大輔³・吉村誠司³・都築 直⁴・武山暁子⁴・富成雅尚²・立野大樹¹

（¹日高・²馬事部・³NOSAI みなみ・⁴帯広畜産大学）

6. 第3中手骨単皮質骨顆骨折を発症した競走馬 25 頭の回顧調査

○原田大地¹・金井功太¹・溝部文彬¹・桂嶋勇輔²・飯森麻衣³・眞下聖吾¹（¹美浦・²常磐・³栗東）

7. 第3中手/中足骨々折に対する O-arm[®]を用いた掌/蹠側楔状骨片の診断

○瀬川晶子¹・東樹宏太¹・溝部文彬¹・桂嶋勇輔²・眞下聖吾¹（¹美浦・²常磐）

— 休憩 —

11 : 30～

座長：眞下聖吾（美浦）

8. ウマ持続的腕節炎モデルに対するヒアルロン酸および多血小板血漿投与が滑膜にもたらす影響

○福田健太郎・桑野睦敏・三田宇宙・田村周久・黒田泰輔・佐藤文夫（総研）

9. ウマ皮下におけるアミカシン含有アルギン酸ビーズの徐放効果の検討

○三田宇宙¹・南島陽平²・黒田泰輔¹・丹羽秀和¹・桑野睦敏¹・田村周久¹・福田健太郎¹・佐藤文夫¹
（¹総研・²競理研）

11 : 50～

座長：吉原英留（馬事部）

10. 競走馬から分離されたメチシリン耐性黄色ブドウ球菌（MRSA）の遺伝的関連性と特徴

I. 2020年に美浦トレセンで発生したMRSA感染症

○金井功太¹・内田英里²・桂嶋勇輔³・大和田さつき¹・黒田泰輔²・木下優太²・丹羽秀和²・上野孝範²・額田紀雄⁴・眞下聖吾¹（¹美浦・²総研・³常磐・⁴栗東）

11. 競走馬から分離されたメチシリン耐性黄色ブドウ球菌（MRSA）の遺伝的関連性と特徴

II. 医療環境の保菌調査

○内田英里¹・金井功太²・桂嶋勇輔³・大和田さつき²・長島剛史⁴・丹羽秀和¹・黒田泰輔¹・木下優太¹・眞下聖吾²・額田紀雄⁴・上野孝範¹（¹総研・²美浦・³常磐・⁴栗東）

12. 競走後の眼軟膏塗布中止による眼疾患発症率への影響

○春日 崇¹・植芝滉己¹・南 卓人¹・飯森麻衣¹・黒田泰輔²・栗本慎二郎¹（¹栗東・²総研）

13. 競走後の眼軟膏に含まれる抗菌薬成分の有無と眼疾患発症率の関係

○植芝滉己¹・南 卓人¹・飯森麻衣¹・黒田泰輔²・内田英里²・栗本慎二郎¹（¹栗東・²総研）

— 昼休み —

（12 : 30～13 : 30）

13 : 30～

座長：曾根 佑（馬事部）

海外研修帰朝報告

－国立トゥールーズ獣医学校（フランス）における薬物動態解析法の習得

（2019年10月～2020年11月）－

○黒田泰輔（総研）

14. グラム陽性球菌感染症に対するPK/PD解析に基づくセファゾリン投与法の検討

○黒田泰輔¹・南島陽平²・三田宇宙¹・田村周久¹・福田健太郎¹・徳重裕貴³・桑野睦敏¹・佐藤文夫¹

（¹総研・²競理研・³栗東）

15. 皮下織および呼吸器感染症における各抗菌薬の副作用と治癒成績に関する回顧調査

○湯浅麗子¹・新崎裕太¹・飯森麻衣¹・黒田泰輔²・徳重裕貴¹・溝部文彬³・栗本慎二郎¹（¹栗東・²総研・³美浦）

14 : 05～

座長：東 良剛（京都）

16. 芝コースにおけるノシバの回復に及ぼすLED照明の効果検証

○安藤恒平¹・大川内順也¹・施設部馬場土木課²・中山馬場造園課¹・松原秀樹¹（¹中山・²施設部）

－ 休 憩 －

14 : 25～

座長：佐藤文夫（総研）

17. DHEAS濃度測定を用いたウマの妊娠判定の検討

○琴寄泰光・村瀬晴崇・岩本洋平・関 一洋（日高）

18. 妊娠馬における血清アクチビンA濃度測定の有用性

○村瀬晴崇¹・琴寄泰光¹・南保泰雄²・関 一洋¹（¹日高・²帯広畜産大学）

19. 暑熱順化がサラブレッドの生理学的機能に及ぼす影響

○胡田悠作¹・向井和隆¹・高橋佑治¹・吉田年伸¹・大村 一²（¹総研・²美浦）

20. 高強度持続運動および高強度インターバル運動に対するサラブレッドの生理反応および骨格筋適応

○向井和隆¹・高橋佑治¹・胡田悠作¹・宮田浩文²・大村 一¹（¹総研・²山口大学）

15 : 05～

座長：上野孝範（総研）

21. 長距離輸送による下部気道疾患予防のための頭頸部自由度の重要性

○高橋佑治¹・丹羽秀和¹・胡田悠作¹・向井和隆¹・吉田年伸¹・Sharanne Raidal²・

Barbara Padalino³・大村 一⁴（¹総研・²チャールズスタート大学・³ポロニヤ大学・⁴美浦）

22. 長距離輸送された馬における馬鼻肺炎ウイルスに対する粘膜免疫の低下

○坂内 天¹・高橋佑治¹・大村 一²・胡田悠作¹・向井和隆¹・上林義範¹・根本 学¹・辻村行司¹・太田 稔¹・

Sharanne Raidal³・Barbara Padalino⁴（¹総研・²美浦・³チャールズスタート大学・⁴ポロニヤ大学）

— 休憩 —

15 : 35～

座長：太田 稔（総研）

23. HES130/0.4/9（ボルベン輸液 6%[®]）投与の安全性の検討

○仁比大記¹・大塚 佑¹・前 尚見¹・前田達哉²・黒田泰輔²・南島陽平³・眞下聖吾¹（¹美浦・²総研・³競理研）

24. セボフルラン吸入麻酔下における HES130/0.4/9（ボルベン輸液 6%[®]）投与が循環機能および凝固機能に与える影響

○山崎洋祐¹・前田達哉²・前 尚見³・南島陽平⁴・黒田泰輔²・湯浅麗子¹・植芝滉己¹・徳重裕貴¹・栗本慎二郎¹

（¹栗東・²総研・³美浦・⁴競理研）

25. プロポフォール-ケタミン-キシラジン-レミフェンタニル全静脈麻酔法の応用

○大塚 佑¹・前 尚見¹・溝部文彬¹・上林義範²・荒木成就¹・原田大地¹・大和田さつき¹・林 奈名子¹・神谷和宏¹・

眞下聖吾¹（¹美浦・²総研）

26. 立位鎮静局所麻酔下の喉頭形成術におけるモルヒネ投与が術中・術後に与える影響

○佐藤 岳¹・浦山俊太郎¹・徳重裕貴¹・三田宇宙²・黒田泰輔²・南島陽平³・栗本慎二郎¹（¹栗東・²総研・³競理研）

16 : 15～

座長：石川裕博（馬事部）

27. 競走馬のドーピング検査におけるメタボロミクスの応用

○大沼康平¹・内田大雅¹・Gary Ngai-Wa Leung¹・植田俊樹¹・小原 拓²・石井英昭¹

(¹競理研・²東北大学病院)

28. 遺伝子ドーピング検査における確認検出法の開発

○戸崎晃明¹・大沼 葵¹・菊地美緒¹・石毛太一郎¹・梶 裕永¹・廣田桂一¹・曾根 佑²・草野寛一²・永田俊一¹

(¹競理研・²馬事部)

— 休憩 —

16 : 45～

座長：小平和道（馬事部）

29. 感染実験馬を用いたウマコロナウイルスの感染部位の検索

○上林義範・根本 学・木下優太・岸 大貴・越智章仁・上野孝範・坂内 天・辻村行司・太田 稔（総研）

30. ウマコロナウイルス遺伝子を検出する *in situ* hybridization 法の開発と応用

○岸 大貴・上林義範・根本 学・太田 稔・越智章仁・上野孝範（総研）

31. 発酵飼料が腸内細菌叢に与える影響

○山本 匠¹・木下優太²・上野孝範²・宮田健二¹（¹公苑・²総研）

32. メトロニダゾール投与時における糞便移植の影響

○木下優太¹・額田紀雄²・丹羽秀和¹・内田英里¹・上野孝範¹（¹総研・²栗東）

講演要旨

演題 1~32

ヒト用マalaria診断装置を用いた馬ピロプラズマ症の迅速診断 ～2020 東京オリンピックでの使用例～

○ 越智章仁¹・鳥家雄二²・仙石未佳子²・土屋成一朗²・岸大貴¹・上野孝範¹・額田紀雄³・片山芳也³

¹総研・²シスメックス株式会社・³栗東

【背景と目的】

馬ピロプラズマ症 (Equine Piroplasmosis; EP) は、赤血球に寄生する *Babesia caballi* および *Theileria equi* によって引き起こされる原虫感染症である。EP の検査には、原虫を検出する方法 (鏡検法や PCR など) と原虫に対する特異抗体を検出する方法 (間接蛍光抗体法や競合 ELISA など) がある。しかし、いずれの検査も判定までに数時間から半日を要する。これまでに、我々は、ヒト用マalaria診断装置 XN-30 prototype (XN-30p; Sysmex 社) が EP の迅速診断に応用できる可能性を示してきた (第 61 回本発表会他)。今回、本診断法の実用化に向けて、XN-30p の精度評価を行うとともに、2020 東京オリンピック馬術競技において市販機 XN-31 の実用性を検証した。

【材料・方法】

B. caballi (USDA 株) および *T. equi* (USDA 株) は、既報に従い培養した。得られた原虫を XN-30p で検査し、感染赤血球数および感染率を計測、目視検査との相関性を検証した。また、XN-30p の最小検出感度 (LoD) および定量限界 (LoQ) を算出した。データの解析には、FlowJo (BD bioscience) を用いた。さらに、本検査法の実用性を検証するため、東京 2020 オリンピック期間中に馬事公苑に在厩していた 120 頭 (輸出時検査で EP と診断された 5 頭を含む) を XN-31 および EP 特異的 PCR で検査した。さらに、来日 3 日後に貧血および発熱を呈した馬 1 頭 (輸出時検査では EP 陰性) を XN-31 および既存検査法 (PCR, 鏡検法および競合 ELISA) で検査した。

【結果と考察】

XN-30p は、約 1 分で原虫が感染した赤血球を検出し、その測定結果は鏡検法と高い相関性を示した ($R^2 > 0.9$)。XN-30p を用いた検査の LoD は、*B. caballi* が 27 cells/ μ L, *T. equi* が 12 cells/ μ L, LoQ は *B. caballi* が 53 cells/ μ L, *T. equi* が 21 cells/ μ L であった。鏡検法によるバベシアの検出限界が 100 cells/ μ L であることから、XN-30p は迅速かつ感度の高い検査法であると考えられた (特許出願済み)。オリンピック期間中における XN-31 を用いた迅速診断法では、EP 罹患馬 5 頭中 2 頭から感染赤血球が検出された。これらの馬は EP 特異的 PCR で陽性であった。残る EP 罹患馬 3 頭は XN-31 ならびに PCR で陰性であり、血中の原虫数が両検査法の検出限界以下であったと考えられた。また、来日後に発熱ならびに貧血を呈した 1 頭は、EP の既往がなかったものの XN-31 で *T. equi* 感染が疑われ、その後の EP 特異的 PCR および鏡検法で EP (*T. equi* 感染) と確定診断された。本例は、動物検疫所以外で確認された我が国で初めての EP である。以上のことから、ヒト用マalaria診断装置は、EP のスクリーニング検査法として有用であると考えられた。

血清検体からのウマヘルペスウイルス 1 型の検出

○ 辻村行司・坂内 天・上林義範・根本 学・太田 稔

総研

【背景と目的】

ウマヘルペスウイルス 1 型 (EHV-1) 感染症では、鼻腔内に侵入したウイルスが、上気道粘膜細胞での増殖後にリンパ節に移行し、末梢血単核球 (PBMC) に感染することで全身に伝播する。一方で、EHV-1 感染馬の血中には遊離したウイルスはほとんど存在しないと考えられてきた。そのため、従来から活動性の感染を示唆するウイルス血症の検出には PBMC が用いられており、これまで血清検体から EHV-1 が検出可能か検証されてこなかった。本研究では、過去の EHV-1 実験感染馬の血清と PBMC、さらに野外発熱馬の血清から、リアルタイム PCR 法を用いて EHV-1 遺伝子の検出を試み、ウイルス血症の検出用の検体としての血清の有用性を評価した。

【材料と方法】

実験感染馬材料：1～2 歳馬 3 頭の EHV-1 接種後 14 日目まで毎日採取された血清および PBMC (2015 年および 2017 年実施)。EHV-1 接種後に脊髄脳症を発症した妊娠馬 3 頭の安楽死措置時に採取された血清および PBMC (2010 年実施)。

野外発熱馬血清：2020 年 2～6 月の美浦 TC の発熱馬 40 頭の発症時血清 (ペア血清の EHV-1 ELISA 検査陽性馬 11 頭、陰性馬 29 頭)。

遺伝子検出：検体から核酸を抽出し、リアルタイム PCR 法を用いて EHV-1 遺伝子の検出を試みた。

【結果】

実験感染馬材料：1～2 歳馬の血清では接種後 5 あるいは 7 日目から 11 日目まで、PBMC では接種後 5 あるいは 6 日目から 11 日目まで EHV-1 遺伝子が検出された。妊娠馬の安楽死措置時の全頭の血清および 3 頭中 2 頭の PBMC から EHV-1 遺伝子が検出された。

野外血清：発症時血清から EHV-1 遺伝子が検出されたのは、ELISA 検査陽性馬 11 頭中 6 頭で、陰性馬からは検出されなかった。

【考察】

1～2 歳馬の実験感染後、経時的に採取した血清と PBMC から、ほぼ同時に EHV-1 遺伝子が検出された。また、野外の EHV-1 感染症例の発症時血清の半数以上は EHV-1 遺伝子陽性であった。したがって、EHV-1 感染症の検査で PBMC が入手できなかった場合は、代替として血清をウイルス血症の検出に用いることが可能と考えられた。さらに、実験感染で脊髄脳症を発症した妊娠馬の安楽死措置時の材料では、PBMC よりも血清の方が EHV-1 遺伝子の検出率が高かった。このことから、EHV-1 感染による脊髄脳症を疑って検査を行う際には、PBMC に加えて血清からのウイルス検出も試みる必要があると考えられた。

ヒト用インフルエンザ遺伝子検査キットの馬インフルエンザ診断への応用

○ 根本 学¹・上林義範¹・坂内 天¹・辻村行司¹・木下優太¹・山中隆史²・太田 稔¹

¹総研・²馬事部

【背景と目的】

馬インフルエンザは伝染力が非常に強いことから、競馬産業に大きな損害を与える可能性のある疾病であり、蔓延防止には迅速な診断および防疫措置が求められる。現在臨床現場では、10分程度で検査結果を得ることができるヒト用インフルエンザ抗原検出キットが用いられているが、RT-PCR法等の遺伝子診断法と比較して検出感度が低い。一方遺伝子検査法は、抗原検出キットと比較して手順が複雑であり、現状では臨床現場で実施することが難しい。しかし近年リアルタイムRT-PCR法を原理とし、抗原検出キットと同程度の簡単な作業、かつ20分程度で自動的に結果を得ることができるヒト用インフルエンザ遺伝子検査キット（cobas Influenza A/B&RSV : cobas）が発売され、注目されている。本研究ではこのキットが、馬インフルエンザ診断に応用可能か検討した。

【材料と方法】

A/equine/Yokohama/aq100/2017(H3N8)株を10倍階段希釈したものを用いて、cobas、抗原検査であるクイックチェイサーFluA,B（QC）とクイックチェイサーAuto FluA,B（QCA）、およびOIEマニュアルに記載されているリアルタイムRT-PCR法を実施し、各検査法の検出限界を求めた。臨床検体における有用性を評価するため、健康馬の鼻腔スワブ10検体および実験感染馬の鼻腔スワブ65検体を用いた。

【結果と考察】

cobasとリアルタイムRT-PCR法の検出限界はともに $10^{1.0}$ 50% egg infective dose (EID₅₀)/200 μ lであり、QCとQCAの検出限界は $10^{4.0}$ と $10^{3.0}$ EID₅₀/200 μ lであった。健康馬から採取した無処理の鼻腔スワブをcobasに用いたところ、10検体中4検体陰性で、6検体は判定不能であった。判定不能であった6検体について遠心処理（10,000g×1分）後に再検査したところ、5検体は陰性であったが1検体は再度判定不能であった。遠心処理によって判定不能の割合が減少したことから、実験感染馬の鼻腔スワブの遠心上清を用いたところ、cobasは49検体陽性、11検体陰性、および5検体判定不能であった。一方、QC、QCAおよびリアルタイムRT-PCR法はそれぞれ19、26および53検体陽性で判定不能の検体はなかった。cobasはQCとQCAより高感度であり、リアルタイムRT-PCR法と同程度の感度でウイルス遺伝子を検出可能であった。以上の結果から、cobasは馬インフルエンザ診断に有用であるが、臨床応用のためには判定不能となる検体の割合を減らす改善が必要であろう。

cobasに関して機器の提供およびご助言をいただいたロシュ・ダイアグノスティックス社の沖田規幸博士および北畑昌詳氏、また馬インフルエンザウイルスを分与いただいた農林水産省動物検疫所およびIrish Equine CentreのAnn Cullinane博士に深謝いたします。

162 頭における運動時内視鏡検査所見および 安静時喉頭機能グレードとの関連性

○ 新屋敷直希¹・東樹宏太¹・三田宇宙²・有馬大輔¹

¹美浦・²総研

【背景と目的】

Overground Endoscopy を用いた運動時内視鏡検査(以下 OGE 検査)は、安静時には診断できない病態を把握できることからブアパフォーマンスや異常呼吸音の原因を特定する上で非常に有益である。しかしながら、本会診療所で得られた所見の報告は導入初期における少頭数の結果に限られている。そこで今回我々は、2013 年以降の OGE 検査所見を調査するとともに、安静時喉頭機能グレードとの関連性について検討した。

【材料と方法】

2013~2020 年に美浦 TC においてブアパフォーマンスや異常呼吸音を主訴に OGE 検査を実施し、動画の評価が可能であった 162 頭(牡 118 頭、牝 40 頭、騙 4 頭、中央値 3 歳)を調査対象とした(喉頭外科手術既往馬は除く)。各検査において最大運動時に気道を閉塞する所見および運動時の喉頭機能グレード(A~C)を記録した。また、本会医療システムから対象馬の安静時内視鏡検査における喉頭機能グレード(I~IV, Havemeyer grading system)を調査し、運動時グレードとの相関性についてスピアマンの順位相関係数を用いて解析した。さらに、運動時に認められた各所見と安静時喉頭機能グレードの関連性について検討した。

【結果】

少なくとも 1 つの所見が認められたのは 138 頭(85%)であった。このうち 32 頭(23%)は 1 種、68 頭(49%)は 2 種、38 頭(28%)は 3 種以上の所見が認められた。単独の所見は声帯虚脱(VCC)が最も多く、2 種は左喉頭片麻痺(LH)と VCC、3 種以上は LH、VCC、披裂喉頭蓋ヒダ虚脱(ADAF)の組み合わせが最も多かった。各所見別の有病率は VCC60% (98 頭)、LH54% (88 頭)、ADAF25% (40 頭)および DDSP15% (24 頭)等であった。安静時グレード I の馬における運動時グレードの割合は A92%、B6%、C2%、II は 51%、27%、22%、III は 11%、29%、60%、IV は 0%、0%、100%であり、安静時と運動時の喉頭機能グレードには相関が認められた($\rho=0.68$, $P<0.001$)。また、運動時に認められた各所見と安静時グレードの関連性について、VCC はグレード II 以上で有意に発症が多く、その他の所見はあらゆる安静時グレードで確認された。

【考察】

本調査により美浦TCにおけるOGE検査所見の概要が明らかとなった。有所見馬の割合や複数の所見が併発する結果は既報と概ね一致していた。安静時と運動時の喉頭機能グレードには相関が認められ、安静時グレード I およびIVでは運動時における披裂軟骨の外転の程度を予測できる可能性が示唆された。一方、グレード II および III では運動時の結果にばらつきが認められたことから、これらのグレードでは LH の病態を把握するために特に OGE 検査を実施する必要があると考えられた。また、VCC は安静時グレードが高いほど発症が多いことから、VCC の有無を安静時の喉頭機能グレードから予測できる可能性が示唆された。

LCPによる頸椎固定術を実施した CVSM の一症例

○ 岩本洋平¹・宮越大輔³・吉村誠司³・都築 直⁴・武山暁子⁴・冨成雅尚²・立野大樹¹

¹日高・²馬事部・³NOSAI みなみ・⁴帯広畜産大学

【背景と目的】

CVSM (cervical vertebral stenotic myelopathy : 通称ウォブラー症候群) は、頸椎の異常による脊髄の圧迫に起因する運動失調のことである。生産地では 2 歳以下の若馬にしばしば Type 1 が発症することから問題となる。保存療法として、症状を緩和させる消炎剤投与や食事制限が行われるが、完治は難しいことから多くの症例が廃用となっている。外科的治療法として、これまで海外を含めて様々な手法の頸椎固定術が実施されてきたが、成功率は 23~100%と報告されている (Anderson, 2020)。今回、CVSM 発症馬に対して国内で初めてとなる LCP を用いた頸椎固定術を実施したので、その概要を報告する。

【症例】

JRA 日高育成牧場で生産したサラブレッド種の 1 歳牡馬で、13 か月齢から後躯の運動失調を呈し、レントゲン検査で C5-7 領域に脊柱管狭窄を疑う所見を得た。徐々に症状は悪化して Mayhew 運動失調グレード 4 となり、保存療法では改善しなかった。14 か月齢で帯広畜産大学にて造影 CT 検査を実施したところ、C5-7 領域に脊柱管狭窄を確認した。損傷部位を正確に診断できたことから、15 か月齢で NOSAI みなみ家畜高度医療センターにて LCP による頸椎固定術を実施した。

【手術手技および経過】

Anderson Sling を用いて倒馬し、術中は仰臥位とした。頸部腹側を正中切開し、気管右側からアプローチし頸椎を露出させた。DR にて病変部の位置を確認し、長さの合う 12-hole 4.5/5.0 broad LCP を選択して頸椎腹側の彎曲に合わせて成型した。頸椎の腹側突起を骨ノミで切除して LCP の密着度を高め、頸椎間の癒合促進のために椎間板をドリルで搔把した。LCP は、皮質骨螺子を 3 本、locking head cancellous screw を 2 本、locking head screw を 7 本用いて固定した。術後は 7 日間の消炎剤投与、14 日間の抗生物質投与を実施した。60 日間馬房内休養後にパドック放牧を開始し、術後 97 日からウォーキングマシンを開始した。その後、術後 287 日から馴致を開始し、術後 325 日から騎乗を行った。現在では、1 ハロン 18 秒程度での走行が可能で、80 cm の障害飛越も可能である。

【考察】

手術前にはグレード 4 まで悪化したものが、本手術後にはグレード 2 まで改善し、これまでの頸椎固定術に関する報告と同程度の結果であった。C3-4 領域の方が C6-7 領域に比べ術後成績が良い (Walmsley, 2005) ことや CVSM の Type により術後成績の違いも報告されており、造影 CT を用いた術前の詳細な診断が重要である。また、本法では LCP を用いた外科手術を実施できる施設であれば、特殊な器具の準備を必要としないという点は大きな利点と言える。今後は、運動機能回復を目指すグレード 2 程度の馬に対して造影 CT を用いた確定診断を早期に実施し、LCP を用いた頸椎固定術の有用性を検討していく必要がある。

第3 中手骨単皮質骨顆骨折を発症した競走馬 25 頭の回顧調査

○ 原田大地¹・金井功太¹・溝部文彬¹・桂嶋勇輔²・飯森麻衣³・眞下聖吾¹

¹美浦・²常磐・³栗東

【背景と目的】

競走馬において第3中手骨顆骨折は一般的に認められる骨折であり、診断には主にX線検査が用いられる。一方、骨折線が掌側に限局する単皮質骨顆骨折 Unicortical Condylar Fracture (UCF) については、骨折線の描出が困難な場合があり、そのような症例では立位MRI検査が推奨される（2018年研究発表会）。また、近年ではX線検査における屈曲位背掌側（FlexDP）像の撮影により、UCFと診断される症例が増えつつあるが、本会の現役競走馬における発生状況や予後についての情報は未だ限られる。診断の遅れや不十分な休養期間は骨折の重篤化を招く危険があるため、適切な診断に基づく治療・予後判定を行うための一助として、UCFの発生状況、治療法および予後について回顧調査を実施した。

【材料と方法】

2018～2020年に本会施設内において、X線検査（FlexDP像）またはMRI検査によりUCFと診断された25頭を対象とした。カルテおよび画像データを基に、性別、年齢、骨折部位、跛行グレード（AAEPグレード1～5）、診断法、治療法、競走復帰率、休養日数、再骨折の有無を調査した。さらに、骨折部位、跛行グレードおよびMRI検査所見（骨折線の長さ、骨内炎症像の範囲）と休養日数の関連性を検討した。

【結果】

発症馬の内訳は牡16頭、牝8頭、騙1頭であり、平均3.7±1.6歳であった。骨折部位は内顆（7頭）より外顆（18頭）が多く、跛行グレードは4（19頭）が多かった。X線検査（FlexDP像）では23/25頭で骨折線が描出され、MRI検査では10/10頭で骨折線および炎症像が認められた。そのうち1頭では約3か月後に再MRI検査が行われ、炎症像の改善が確認された。治療法は20頭で保存療法、5頭で内固定が選択された。繁殖供用3頭を除く19/22頭（86.4%）が競走復帰し、休養日数の中央値は251日（157-410日）であった。再骨折は5/22頭（22.7%）で認められ、全てが保存療法症例であり、うち2頭は致命的な骨折であった。骨折部位、跛行グレードおよびMRI検査所見と休養日数に関連は認められなかった。

【考察】

対象期間内のUCFは25頭であり、本会施設内で同期間に発生した第3中手骨顆骨折症例（111頭）の2割強を占めることが明らかとなった。発生状況および予後については海外の既報と概ね一致しており、UCFは両皮質外顆骨折と同程度の半年以上の休養を要することが示された。MRI検査は早期診断に有用であるが、検査所見が予後判定の指標となるには至らなかった。一方、経時的な検査が行われた症例において炎症像の推移が確認されたことから、治療過程の評価に応用できる可能性が示された。再骨折率は過去の本会における第3中手骨顆骨折の報告より高く、手術実施症例では再骨折を認めなかったことから、骨折の重篤化を予防するために積極的な螺子固定術の実施が検討されるべきと考えられた。

第3 中手/中足骨々折に対する O-arm®を用いた掌/蹠側楔状骨片の診断

○ 瀬川晶子¹・東樹宏太¹・溝部文彬¹・桂嶋勇輔²・眞下聖吾¹

¹美浦・²常磐

【背景と目的】

2018年の藤木らの報告において、O-arm®検査によって第3中手/中足骨(Mc/tIII)骨折の遠位掌/蹠側面に単純X線撮影では描出されない楔状骨片が確認できることが明らかとなった。Mc/tIII完全変位骨折においては、変形性関節症を予防するために楔状骨片の摘出が推奨されているが、不完全骨折では骨片摘出の是非について結論付けた報告はなく、最適な手術の選択が望まれる。そこで、我々は病態の一つとして楔状骨片に注目し、骨片の保有状況と予後を調査したところ、若干の知見を得たので報告する。

【材料と方法】

2017年9月から2021年5月にMc/tIII骨折と診断され、美浦診療所でO-arm®検査と内固定術を実施した54頭を対象とし、単純X線画像とO-arm®断層画像から骨折の形態と掌/蹠側楔状骨片の有無を評価した。また、予後については2020年12月末までに発症し、比較的発症頭数の多かった外側顆不完全Mc/tIII骨折24頭を対象に、楔状骨片を保有する症例をA群、しない症例をB群とし、2021年9月末時点で中央もしくは地方競馬に競走復帰した頭数を群間で比較した。

【結果】

対象馬54頭のうち32頭(59.3%)で掌/蹠側楔状骨片を認めた。その内訳は、外側顆骨折41頭のうち28頭(68.3%)、内側顆骨折13頭のうち4頭(30.8%)であった。また、前肢発症38頭のうち28頭(73.7%)、後肢発症16頭のうち4頭(25.0%)で掌/蹠側楔状骨片を認めた。競走復帰については、それぞれA群で17頭中10頭(58.8%)、B群で8頭中6頭(75.0%)であった。また、競走復帰した症例の休養日数中央値は、A群で304日(168-422日)、B群で320日(210-344日)であった。

【考察】

Mc/tIII骨折を発症した競走馬は、比較的高率に掌/蹠側面に楔状骨片を有していることが明らかとなった。また、骨折部位(内外)および発症肢(前後)で保有率に差が認められ、これらMc/tIII骨折の発症機序の違いが影響したものと推察された。Mc/tIII不完全外側顆骨折に関しては、楔状骨片を保有する方が復帰していない症例が多く、休養日数にばらつきも認めたことから、楔の有無が予後に影響する可能性が示唆された。今後は、Mc/tIII骨折全体を対象に、楔の有無以外の項目(発症起点、楔の大きさなど)も含め、予後に影響する因子の調査を継続し、骨折起始部の詳細な評価に基づいた適切な手術の選択が可能となるよう努めて参りたい。

ウマ持続的腕節炎モデルに対するヒアルロン酸および多血小板血漿投与が滑膜にもたらす影響

○ 福田健太郎・桑野睦敏・三田宇宙・田村周久・黒田泰輔・佐藤文夫

総研

【背景と目的】

ウマにおける関節炎治療法としては、消炎を目的としてヒアルロン酸（HA）や多血小板血漿（PRP）の関節内投与が実施されている。しかし、慢性的な炎症を有する関節内への投与により得られる効果についてこれまで十分検証されていない。本研究ではウマ持続的腕節炎モデルに対する HA および PRP の関節内投与が滑膜にもたらす影響について組織学的および生化学的に比較した。

【材料と方法】

サラブレッド 6 頭（3～8 歳；牡 1 頭、牝 2 頭、セン 3 頭；440～520 kg）の両側の橈骨手根骨関節内側より腕節液を 2 ml 採取した後、モノヨード酢酸（MIA: 0.18 mg/kg BW）生理食塩水溶液を 2 ml 投与し、持続的腕節炎モデルを誘導した。MIA 投与 3 週後（day0）に両側の腕節液を 2 ml 採取し、片側の腕節内に HA 製剤（ハイオネート®）（HA 群：3 頭）あるいは活性化 PRP 遠心上清（PRP 群：3 頭）を 2 ml 投与した。対側の腕節内に生理食塩水 2 ml を投与し、対照群とした。7 日後（day7）および 14 日後（day14）に同様の処置を実施し、21 日後に腕節の解剖学的観察を行った後に滑膜組織の採取を行い、作製した各組織標本を HE および PTAH 染色にて観察した。また MIA 投与前、day0、7 および 14 に採取した腕節液について、炎症マーカーである IL-1Ra 濃度を ELISA 法で測定した。

【結果】

対照群と PRP 群では投与後に臨床症状の変化を認めなかったが、HA 群では投与翌日から著明な腕節腫脹および疼痛の発生を認めたため、1 頭は 1 回、2 頭は 2 回で HA 投与を中止した。剖検時の腕節液は対照群と PRP 群では粘稠性を失い黄色または橙色だったが、HA 群では 3 頭中 2 頭で血様だった。組織学的観察では、対照群で炎症細胞の浸潤と肉芽組織増生が、PRP 群ではさらに新生血管の増加と滑膜細胞様細胞の重層化が見られ、HA 群では炎症細胞と新生血管の増加、出血、部分的に脱落した一層の滑膜細胞様細胞とそれを裏打ちする線維素様物質の沈着および線維素様物質内で疎に分布する線維芽細胞様細胞を認めた。腕節液中 IL-1Ra 濃度は PRP 群では対照群と同様に経時的に減少したが、HA 群では高濃度が維持されていた。

【考察】

持続的腕節炎モデルに対する HA 投与により、生食や PRP の投与では認められなかった出血性線維素性炎が発生した。健常馬でさえ HA の関節内投与で一過性の炎症が生じたという報告があり、消炎を目的とした HA の関節内投与は避けるべきと考えられた。一方、PRP の投与により得られた組織所見は PRP の組織修復促進効果によるものと考えられた。PRP の消炎効果に関しては、各種炎症マーカー発現についてさらなる生化学的および分子生物学的な解析を予定している。

ウマ皮下におけるアミカシン含有アルギン酸ビーズの徐放効果の検討

○ 三田宇宙¹・南島陽平²・黒田泰輔¹・丹羽秀和¹・桑野睦敏¹・田村周久¹・福田健太郎¹・佐藤文夫¹

¹総研・²競理研

【背景と目的】

手術部位感染症はしばしば遭遇する周術期合併症の1つであり、その予防方法の1つに抗菌薬を保持した担体を手術部位に留置して局所で有効な抗菌薬濃度を維持する方法がある。ウマの整形外科分野では担体として骨セメントが用いられているが、骨セメントは生体非分解性であることに加えて感染した軟部組織への投与には不向きであることから適応症例が限定的である。一方、抗菌薬を徐放できる担体の中でもアルギン酸は昆布から精製される多糖類で、生体内分解性、抗菌薬徐放作用、および幹細胞の増殖促進効果を持つことからヒトや動物の医療分野で広く用いられている。そこで、本研究では、アルギン酸のウマへの応用を検討するための基礎研究として、アルギン酸ビーズの抗菌薬徐放効果を *in vitro* と *in vivo* で検討した。

【材料と方法】

In vitro 徐放試験ではまずアルギン酸 7.5 % を含む PBS 溶液にアミカシン (以下 AMK) を 5 % (w/v) もしくは 2.5 % 加えて混合し、それぞれの溶液を 100 mM 塩化カルシウム溶液に滴下して AMK 濃度が異なるアルギン酸ビーズを作成した。総量 50 mg の AMK を含むビーズを 1 ml の PBS に浸漬し、24 時間おきに PBS を全量回収した後に新たに PBS を 1 ml 加えた。回収した PBS を遠心して上清中に含まれるビーズから遊離した AMK 濃度を微量液体希釈法によって推定した。

In vivo 徐放試験では立位鎮静局所麻酔下で 4 頭のウマの頸部に 5 か所の皮下ポケットを作製し、AMK 含有 (5.0 %、50 mg/pocket) アルギン酸ビーズを皮下に留置した。ビーズを留置してから 1,2,3,4,7 日後にそれぞれのウマの 1 か所の皮下からビーズとその周囲の組織液を回収し高速液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析法で組織液中の AMK 濃度を測定した。ビーズ周囲液の AMK 濃度を術部感染症からの分離頻度が高い黄色ブドウ球菌の MIC₅₀、MIC₉₀ と比較して有効濃度の維持日数を検討した。

【結果と考察】

In vitro 試験において両条件の AMK 濃度は 4 日目まで 1000 µg/ml を超えた。ビーズが溶解するまでの日数と溶解時の AMK 濃度は 2.5 % と 5.0 % でそれぞれ 5 日および 6 日、25 µg/ml、50 µg/ml だった。これらの結果から AMK 濃度は 5.0 % でより長期に AMK を放出できることが示された。*In vivo* 徐放試験においてビーズ周囲液の AMK 濃度は全頭で処置後 4 日までブドウ球菌の MIC₉₀ (4 µg/ml) と MIC₅₀ (1 µg/ml) を超えたことから AMK 含有アルギン酸ビーズは局所の感染症予防・治療に効果が期待できると考えられた。本研究の結果、アルギン酸ビーズは抗菌薬の徐放効果を有していることが示されたため、AMK 以外の抗菌薬についても今後検討していく予定である。

競走馬から分離されたメチシリン耐性黄色ブドウ球菌（MRSA）の 遺伝的関連性と特徴 I. 2020年に美浦トレセンで発生したMRSA感染症

○ 金井功太¹・内田英里²・桂嶋勇輔³・大和田さつき¹・黒田泰輔²・木下優太²・丹羽秀和²・上野孝範²

額田紀雄⁴・眞下聖吾¹

¹美浦・²総研・³常磐・⁴栗東

【背景と目的】

メチシリン耐性黄色ブドウ球菌（MRSA）はメチシリンに耐性を示す黄色ブドウ球菌であり、多くの株は他の抗菌薬にも耐性を示す多剤耐性菌であることが知られる。本会施設内でのMRSA分離は2009年から2019年まで29例（0-4例/年）で確認されているが、2020年は7症例から分離された。これら7症例は全て美浦トレーニング・センター（TC）競走馬診療所に入院しており、疫学上の関連性が疑われた。そこで本調査では、症例について報告するとともに、分離株の薬剤感受性および遺伝的関連性を検討し得られた知見を報告する。

【材料と方法】

2020年に美浦TC競走馬診療所に入院した7症例（手術部位感染症1例、眼科感染症6例）および分離されたMRSA7株を対象とした。分離された株に対して、ディスク法を用いた薬剤感受性試験を実施した。また、遺伝的関連性の調査として、SCC*mec*型別とPCR-based ORF Typing（POT）法による遺伝子型別を行った。

【結果】

MRSA分離症例のうち眼科感染症6例の治療期間は27～77日で、1例を除き初診時（発症から4～38日後に分離）には分離されなかった。また、一部の症例は同時期に入院していた。薬剤感受性はゲンタマイシン、トブラシン、オフロキサシンに対して7株中6株が耐性を示した。分離された7株はすべてSCC*mec* IV型であり、POT法による分類（POT型）は5株が106-183-37、2株が106-137-31であった。

【考察】

2020年に発生したMRSA分離症例は難治性であり、治療が長期化する傾向にあった。2020年分離株の薬剤感受性は、これまで多く分離されたSCC*mec* II型株と比較してセファロチン、イミペネム、ミノサイクリンに感受性を示し、薬剤耐性が限定的であった。一方、本会で2019年以前に分離された遺伝子型は主にSCC*mec* II型であったが、2020年は全てSCC*mec* IV型であった。2020年分離株はPOT法で2種類の遺伝子型に分類されたことから、2種類の遺伝的近縁株によるMRSA感染症の発生が疑われた。2016年に分離されたSCC*mec* IV型株のPOT型は2020年分離株と異なることから、2020年分離株と過去のMRSA分離株とは遺伝学的関連性がないと考えられ、伝播経路の精査が求められた。

競走馬から分離されたメチシリン耐性黄色ブドウ球菌（MRSA）の 遺伝的関連性と特徴 II. 医療環境の保菌調査

○ 内田英里¹・金井功太²・桂嶋勇輔³・大和田さつき²・長島剛史⁴・丹羽秀和¹・黒田泰輔¹

木下優太¹・眞下聖吾²・額田紀雄⁴・上野孝範¹

¹総研・²美浦・³常磐・⁴栗東

【背景と目的】

2020年に美浦トレーニング・センター（TC）において競走馬7例からメチシリン耐性黄色ブドウ球菌（MRSA）が分離された。分離株は2種類の遺伝子型に分類され（5株がPOT: 106-183-37および2株がPOT: 106-137-31）、2種類の遺伝的近縁株によるMRSA感染症の発生が疑われた。一般にMRSA感染症は医療環境から日和見感染的に発生することが知られている。そこで本研究では、美浦TC競走馬の医療環境（診療所・競走馬・獣医師）におけるMRSAの保菌状況を調査し、分離株を遺伝学的に検索した。

【材料と方法】

美浦TC競走馬診療所内25か所のスワブ検体（2021年1月）、美浦・栗東TC診療所に入院した競走馬33頭と研究用馬11頭の鼻腔スワブ（2021年6～7月）、および美浦TC競走馬診療所の獣医師28名の鼻粘膜スワブと手指スワブ（2021年1月）を採取した。各検体についてセフォキシチンを添加した卵黄加マニット食塩培地を用いてMRSAの選択的培養を行い、分離株についてSCC*mec*型別およびPCR-based ORF Typing（POT）法による遺伝子型別を行った。

【結果】

研究用馬11頭中1頭（9%）、獣医師28名中9名（32%）からMRSAが分離された。診療所および競走馬からは、MRSAは分離されなかった。研究用馬から分離されたMRSA1株はSCC*mec* IV型・POT: 106-137-31であった。獣医師から分離されたMRSA9株の遺伝子型は、SCC*mec*型別では8株がIV型、1株がII型であった。POT法での分類では、POT: 106-9-80が3株、POT: 106-183-37およびPOT 106-9-2が各2株、POT: 106-11-83およびPOT: 125-190-43が各1株であった。

【考察】

獣医師から分離されたMRSA9株はPOT型が5種類に分類され、2020年症例分離株7株（POT型2種類）よりも多様であった。SCC*mec*型別では、本会内獣医師保菌調査（2011年研究発表会：SCC*mec* II型7株、IV型5株）と比較してSCC*mec* IV型株の占める割合が増加していた。また、獣医師あるいは研究用馬由来株には、2020年症例分離株と遺伝学的に近縁であるものも含まれていた（SCC*mec* IV型・POT 106-183-37およびSCC*mec* IV型・POT: 106-137-31）。このことから、MRSAの感染源は不明であるものの、獣医師から馬・馬から獣医師・馬から馬への水平伝播が生じた可能性が否定できないと考えられ、処置前後の手指消毒や頻繁な手袋交換など、衛生管理を徹底することの重要性が示唆された。

競走後の眼軟膏塗布中止による眼疾患発症率への影響

○ 春日 崇¹・植芝滉己¹・南 卓人¹・飯森麻衣¹・黒田泰輔²・栗本慎二郎¹

¹栗東・²総研

【背景と目的】

競走後の馬は、競走中に眼内に混入した異物により、創傷性角膜炎などの眼疾患をしばしば発症する。本会では、その予防として、競走後の全馬に対し、洗眼とエリスロマイシン・コリスチン含有眼軟膏（エコリシン®眼軟膏、参天製薬）の塗布を行っている。本年 1 月、眼軟膏の供給停止に伴い、競走直後の眼軟膏塗布を一時的に中止したところ、競走後の眼疾患発症率が増加した。そこで競走後の眼軟膏塗布中止前後の眼疾患発症率について調査を実施するとともに、眼疾患発症メカニズム解明の手掛かりとするため、眼軟膏以外の眼疾患発症に関わる因子について回顧的調査を行った。

【材料と方法】

2016～2021 年 1 回中山・中京・小倉競馬の平地競走に出走した 24,192 頭を対象とし、出走から 4 日以内に本会獣医師が創傷性角膜炎・ブドウ膜炎・結膜炎のいずれかの診断をした馬を、競走による眼疾患発症馬と定義した。競走直後に眼軟膏を塗布していた 2016～2020 各年の出走馬(計 19,645 頭)、眼軟膏塗布中止期間の出走馬 2,428 頭、眼軟膏塗布再開後の出走馬 2,119 頭における眼疾患発症率を算出し、各期間で比較した。さらに、全調査期間において、発症に関わる可能性のある因子(芝/ダート、競馬場、平均コーナー通過順位)と眼疾患発症率の関係を調査した。

【結果】

競走後の眼疾患発症率は、競走直後に眼軟膏を塗布していた 2016～2020 年平均は 0.76%(芝 0.81%、ダート 0.71%)であったのに対し、眼軟膏塗布中止期間には 3.54%(芝 7.44%、ダート 0.77%)と芝競走で有意に上昇し、眼軟膏塗布再開後は 0.94%(芝 1.32%、ダート 0.62%)まで低下した。また、全調査期間を通して、眼疾患発症率は小倉>中京>中山競馬場の順で有意に高いという地域差がみられ、この傾向は特に芝競走で顕著だった。また、平均コーナー通過順位に関しては、芝・ダート競走共に、逃げ・先行馬では有意に眼疾患発症率が低く、特に逃げ馬では眼疾患の発症がほとんど見られなかった。

【考察】

芝競走では、眼軟膏塗布中止期間における有意な眼疾患発症率増加から、競走後の眼軟膏塗布が眼疾患予防に有効であることが示唆されたが、ダート競走では眼軟膏塗布の有無と眼疾患発症の関連は芝競走よりも低いと考えられた。また、芝・ダート競走に共通して、逃げ・先行馬で眼疾患発症率が有意に低かったことから、眼疾患発症には、前の馬により蹴り上げられた芝塊や砂粒による「キックバック」が関与していることが示唆された。眼疾患発症率の地域差や芝・ダート競走での違いからは、各競馬場の気候や芝・土壌が眼疾患と関連している可能性があるため、さらなる検討が必要である。

競走後の眼軟膏に含まれる抗菌薬成分の有無と眼疾患発症率の関係

○ 植芝滉己¹・南 卓人¹・飯森麻衣¹・黒田泰輔²・内田英里²・栗本慎二郎¹

¹栗東・²総研

【背景と目的】

抗菌薬含有眼軟膏の供給停止に伴い、競走後の眼軟膏塗布を中止したところ、芝競走では眼疾患発症率が増加した。この結果から、芝競走では同眼軟膏が眼疾患予防効果を有することが示された一方、構成成分である軟膏基剤・抗菌薬成分それぞれの効果は不明である。今般、抗菌薬の供給が不安定になる事態がたびたび生じており、安定的な薬品の確保もしくは代替品の検討が課題の1つである。そこで、抗菌薬含有眼軟膏不足時に、代替として抗菌薬を含まない軟膏基剤の塗布を行った。本発表では、その際の眼疾患発生状況について、従来の抗菌薬含有眼軟膏の塗布と比較し、報告する。

【材料と方法】

中京競馬の平地競走に出走した 738 頭に対し、競走直後に軟膏基剤である高純度ワセリン(プロペト®)またはエリスロマイシン・コリスチン含有眼軟膏(エコリシン®眼軟膏)を塗布し、前者を塗布した芝およびダート出走馬を、それぞれ芝 P 群 (159 頭)・ダート P 群 (214 頭) とし、後者を塗布したものをそれぞれ芝 E 群 (152 頭)・ダート E 群 (213 頭) とした。出走後 4 日以内に本会獣医師が創傷性角膜炎・結膜炎・ブドウ膜炎のいずれかの診断した馬を競走による眼疾患発症馬と定義し、各群の眼疾患発症率を比較した。また、採材可能な創傷性角膜炎発症馬に対して角膜スワブを採取し、微生物学的検査を行った。

【結果】

芝 P 群の眼疾患発症率 (15/159 頭; 9.43%) は、芝 E 群の発症率 (0/152 頭; 0.00%) に比べて有意に高かった。一方、ダート P 群 (4/214 頭; 1.87%) とダート E 群 (3/213 頭; 1.41%) で眼疾患発症率に有意差はみられなかった。また、角膜スワブ採取可能であった芝 P 群 7 症例の微生物学的検査の結果、全てから細菌もしくは真菌が分離され、うち 3 症例で 100 CFU/swab を超える菌数の *Staphylococcus* 属菌が分離された。

【考察】

芝 P 群の発症率は眼軟膏塗布中止時における同競馬場での芝競走出走馬の発症率 (7.67%) と同程度であったことから、芝競走後の眼疾患予防には軟膏基剤単独では不十分と考えられる。芝 P 群での分離菌の病原性は不明だが、競走後の眼疾患予防における抗菌薬の有効性が認められたことから、角膜での細菌増殖が眼疾患発症に関与した可能性が考えられる。一方、ダート競走における眼疾患発症率は、ダート P 群・E 群間では有意差がなく、眼軟膏塗布中止時 (0.90%)、過去 5 年の軟膏塗布時 (0.83%) も両群と同程度の発症率であることから、ダート競走後の眼疾患発症には軟膏基剤、抗菌薬ともに関連がないと考えられる。本調査の結果、芝競走では抗菌薬含有眼軟膏が競走後の眼疾患予防に有効であることが明らかとなった。今後は安定的な確保のために別の代替薬の検討を続けるとともに、発症馬のさらなる微生物学的検査や芝・ダートの環境中微生物の調査などによって眼疾患発症メカニズムを明らかにし、眼疾患予防につなげたい。

グラム陽性球菌感染症に対する PK/PD 解析に基づく セファゾリン投与法の検討

○ 黒田泰輔¹・南島陽平²・三田宇宙¹・田村周久¹・福田健太郎¹・徳重裕貴³・桑野睦敏¹・佐藤文夫¹

¹総研・²競理研・³栗東

【背景と目的】

競走馬の輸送熱やフレグモーネに使用している抗菌薬セファロチンは、国内の供給が不安定であると共に世界的に製造国が減少しており、製造中止に備えて代替薬が求められている。セファロチンと同じ第1世代セファロスポリンのセファゾリンは、培地上セファロチンと同程度の抗菌効果を有し、代替薬として期待されている。時間依存性であるセファロスポリンは、血漿中遊離薬物濃度が MIC を超えている時間($fT > MIC$)が長いほど効果が高くなると考えられており、吸収が緩徐な筋肉内投与ではより高い効果が期待されている。本報告では、セファゾリン筋肉内投与および静脈内投与の PK(薬物動態)/PD(薬力学)解析から、競走馬の輸送熱やフレグモーネの原因菌であるグラム陽性球菌感染症に対する投与法を検討した。

【材料と方法】

健常馬 7 頭に対し、セファゾリン 5 mg/kg の静脈内および頸部筋肉内単回投与を実施した。投与後に経時的な採血を行い、高速液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析法にて血漿中セファゾリン濃度を測定した。*Streptococcus zooepidemicus* (*S. zoo*)の MIC₉₀(0.12 μg/ml)と *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*)の MIC₉₀(0.5 μg/ml)に対する $fT > MIC$ を求め、静脈内投与と筋肉内投与における $fT > MIC$ を Mann-Whitney U test で比較した。さらに、複数回投与シミュレーションを作成し、グラム陽性球菌感染症に対し有効となる指標($fT > MIC$ が 1 日の 35-40%)を基に、*S. zoo* と *S. aureus* に対し有効となる投与法を解析した。

【結果】

セファゾリン 5 mg/kg 筋肉内単回投与後の *S. zoo* と *S. aureus* の MIC₉₀ に対する $fT > MIC$ は、それぞれ平均 10.0 h ± 1.7 h と 6.8 h ± 1.3 h で、静脈内投与後の 6.1 h ± 1.2 h と 3.1 h ± 0.4 h と比較して有意に長かった($p < 0.01$)。複数回投与シミュレーションの結果、*S. zoo* と *S. aureus* の MIC₉₀ に対し、静脈内投与ではそれぞれセファゾリン 5 mg/kg・1 日 2 回投与と 3 回投与、筋肉内投与では 5 mg/kg・1 日 1 回投与と 2 回投与で有効となる指標を達成した。

【考察】

筋肉内投与では、筋肉から血管への緩徐な吸収により血漿中に薬物が長く留まるため $fT > MIC$ が延長し、効果が高まることが示された。以前の報告において、セファロチン 22 mg/kg 静脈内投与は、1 日 2 回投与で *S. zoo* 感染症に対し、1 日 3 回投与で *S. aureus* に対し有効と示されている。本解析の結果、セファゾリン 5 mg/kg 静脈内投与は、セファロチンと同じ 1 日 2 から 3 回投与で効果が期待できることが示された。また、セファゾリン 5 mg/kg 筋肉内投与は、より少ない 1 日 1 から 2 回投与でグラム陽性球菌感染症に対して有効であり、副作用の軽減や獣医師の負担減が期待できる投与法であると考えられた。

皮下織および呼吸器感染症における 各抗菌薬の副作用と治癒成績に関する回顧調査

○ 湯浅麗子¹・新崎裕太¹・飯森麻衣¹・黒田泰輔²・徳重裕貴¹・溝部文彬³・栗本慎二郎¹

¹栗東・²総研・³美浦

【背景と目的】

セファロチン(CET)は、皮下織および呼吸器感染症の主な原因菌となる連鎖球菌およびブドウ球菌に対して有効であり、本会では第1選択薬として使用している。しかし、2020年にはCETの供給が不安定となり他抗菌薬をこれらの感染症に対して投与する機会が増加した。本研究では、皮下織および呼吸器感染症に用いる抗菌薬を検討するため、CETとその他抗菌薬の副作用および治癒成績に関して回顧調査を実施した。

【材料と方法】

調査対象は、2015年～2020年にフレグモーネおよび代表的な呼吸器感染症である輸送熱に対し、CET、マルボフロキサシン(MBX)、セフトリオキサム(CEF)、ミノサイクリン(MINO)を投与した本会所属競走馬 5,803頭とした。調査項目は、副作用に関しては、即時副作用発症率(投与後1日以内のショック、不穏・発汗、薬疹症状)および腸炎発症率(3日以上連続投与後2週間以内の発症)とした。治癒成績に関しては、初診時から単独使用された薬剤について、薬剤ごとの症例の重症度(初診時体温、治療開始日から3日間の最高SAA値)、治癒成績(単独治癒率、治療日数)について調査した。

【結果】

即時副作用発症率はCET:0.39%(18/4,636頭)、MBX:1.79%(9/503頭)、CEF:0.00%(0/379頭)、MINO:1.94%(5/258頭)、腸炎発症率は0.05%(2/3,848頭)、0.00%(0/293頭)、2.13%(1/47頭)、0.85%(2/235頭)であった。MINOおよびMBXの即時反応は、CETに対して有意に高い結果となったが、MBXの副作用はすべて薬疹でありショックや腸炎のような重篤な症状は発生しなかった。治療成績は、MINOは第2選択薬としての使用が多く、CEFは症例数不足のため、CETとMBXを比較した。フレグモーネにおける発症7日後の単独治癒率はCET:88.9%、MBX:86.1%、治療日数の中央値は共に3日と有意差を認めなかった。輸送熱における発症7日後の単独治癒率はCET:93.6%、MBX:94.7%、治療日数の中央値は共に3日と有意差を認めなかったが、輸送熱ではCET投与馬の方が最高SSA値は有意に高く、重症馬に適用されていた。

【考察】

副作用に関して、MBXはCETの4倍の副作用発症率であるものの、重篤な症状の発生は認められず、多頭数への適用も可能であると考えられた。MINOは3頭でショック、2頭で腸炎を認めたため投与時には注意が必要であり、重症馬への使用が妥当であると考えられた。CEFは連続投与症例が少なく、更なる検証が必要である。単独治癒率に関して、輸送熱では適応症例の重症度の差があったものの、MBXはフレグモーネと輸送熱ともにCETと同程度の治癒成績であった。以上のことから、皮下織および呼吸器感染症に対してMBXはCETの代替薬として適用可能であると考えられた。

芝コースにおけるノシバの回復に及ぼす LED 照明の効果検証

○ 安藤恒平¹・大川内順也¹・施設部馬場土木課²・中山馬場造園課¹・松原秀樹¹

¹中山・²施設部

【背景と目的】

競馬場の芝コース管理において、ノシバが旺盛に生長する夏季の整備は極めて重要である。競走により大きく損傷した走路部については芝を張り替え、残る芝コースの大部分はオーバーシードしていた洋芝を消去した後に既存ノシバを回復させるが、梅雨などの天候不順による日照不足は芝コースの回復に悪影響を及ぼす。昨年実施した芝張り後のノシバに対する LED 照明補光処理試験において、芝張り後の芝の生育促進に LED 照明による補光が有効であることが報告された。しかし、既存ノシバの回復促進に対しての効果は検証されていない。本研究では LED 照明による補光処理がノシバの回復にも有効であるか検証することを目的とする。

【材料と方法】

中山競馬場の芝コースにおいて、補光区と対照区（無補光）の 3 反復の計 6 区（1 区画あたり 1 m²）用意した。その後 LED 照明（色温度 2700K 広角タイプ）を 24 時間連続照射し、開始から 43 日後に各区の部位別乾物重量、貯蔵養分量及びせん断抵抗値を測定した。なお、芝刈りや肥料散布等の芝コースで実施する管理作業は補光区・対照区とも同様に実施している。

【結果】

地上部・ほふく茎部・根部乾物重量において、対照区（無補光）に対し補光区の重量の上昇率が大きい結果となった。貯蔵養分量やせん断抵抗値も同様であった。なお、補光区内のノシバの生育状況は均一で生育に著しい差はみられなかった。

【考察】

オーバーシード消去後における梅雨時期を含んだ夏季の既存ノシバの回復に LED 照明による補光処理が有効であると示された。これまでの芝コースの管理において、日照不足に対処する管理手法は無かったが、LED 照明による補光処理を行うことで、天候不順により日照が少ない年であっても、良好な芝馬場の提供が可能となることが期待される。

今後実用化に向けて設置費用の低減および、馬場の管理作業に伴う一時撤去及び再設置の簡略化について取り組む必要がある。

DHEAS 濃度測定を用いたウマの妊娠判定の検討

○ 琴寄泰光・村瀬晴崇・岩本洋平・関 一洋
日高

【背景と目的】

ウマの妊娠判定には一般的に超音波画像診断が用いられているが、技術を有する獣医師不在の地域や直腸検査ができない小型馬では、確実性の劣る血液検査（ホルモン濃度測定）に頼らざるを得ない。これにはエストロン濃度の測定が有用とされているが、当研究室では、同じエストロゲンで類似の変動を示すエストラジオール（E2）濃度を用いている。しかし、これらの測定結果は、妊娠早期では個体差が大きいため妊娠判断が曖昧になることが多く、明確に判定できる別の指標が求められている。一方、近年、ヒト医療において利用されているホルモンの一種で、馬においては胎子性腺由来であることが知られているデヒドロエピアンドロステロンサルフェート（DHEAS）の測定試薬が開発・市販されたことから、本測定系によるDHEAS濃度測定がウマの妊娠判定指標として利用可能か検討した。

【材料と方法】

2018年から2021年にかけてJRA日高育成牧場で繋養していたサラブレッド種繁殖雌馬20頭（妊娠群14頭、空胎群6頭）から採血（妊娠馬：妊娠4週目から48週目まで4週毎、空胎馬：4・7・10月および翌年1月）、イムノアッセイシステム・アクセス2（ベックマンコールター社）を用いて化学発光酵素免疫測定によりDHEAS濃度およびE2濃度を測定した。また、両ホルモンについて、空胎群の3か月毎の変動の有無を一元配置分散分析により検定し、空胎群と妊娠週齢毎の測定結果をT検定により比較した。

【結果】

DHEAS濃度については、空胎群では測定期間中に有意な濃度の季節変動は認められず、空胎群と比較して妊娠群は妊娠16週以降、有意に上昇していた（ $p<0.01$ ）。その後、妊娠28週を頂点に40週にかけて一旦低下し、妊娠48週に最高値となるまで再上昇していた。一方、E2測定では、空胎群に有意な季節変動は認められず、空胎群と比較して妊娠群は、妊娠16週以降有意に高くなり（ $p<0.01$ ）、緩やかに上昇を継続した後、妊娠40週を頂点に分娩直前にかけて大きく低下していた。

【考察】

本測定系によるDHEAS濃度は、空胎馬においては年間を通じて一定の低値を維持していた一方で、妊娠馬においては妊娠の進行に伴う濃度の推移が明らかとなったことから、ウマにおける妊娠判定の指標として有用であると考えられた。これに経時的上昇傾向の異なるE2濃度の測定結果を併せて判断することにより、従来よりも血液検査による妊娠判定の精度を高められる可能性が示された。今後は、競走馬の生産領域にて妊娠異常を検出するマーカーとしても活用できるか検討したい。

妊娠馬における血清アクチビン A 濃度測定の有用性

○ 村瀬晴崇¹・琴寄泰光¹・南保泰雄²・関 一洋¹

¹日高・²帯広畜産大学

【背景と目的】

競走馬の生産において受胎馬のおよそ 1 割が健康な子馬の出生に至らない。この妊娠期の損耗を防ぐためには妊娠異常を早期に検知することが重要であり、その診断マーカーとしてプロゲステロン (P4) およびエストラジオール (E2) が有用であることを報告している。アクチビン A (ActA) は多様な生理機能を有するホルモンであるが、妊娠期における役割は不明である。本研究では、妊娠、分娩における血清 ActA 濃度の推移を明らかにするとともに、妊娠異常を診断する指標としての有用性について P4、E2 と比較した。

【材料と方法】

(実験 1) 正常妊娠馬 5 頭において 2 週間ごとに採取した血清 ActA 濃度をサンドイッチ ELISA 法により測定した。(実験 2) 流死産例を含む 81 症例の妊娠馬血清を用いて ActA、P4、E2 濃度を測定した。症状や娩出結果に何らかの異常があったもの (異常妊娠群、n=47)、早期乳房腫脹や陰部滲出液といった症状を示したもの (有症状群、n=19)、流産 10 日以内のもの (流産前群、n=11) および正常分娩 10 日以内のもの (正常分娩前群、n=14) および特に異常所見のなかったもの (正常妊娠群、n=34) について以下の通り 2 群比較を行い、Wilcoxon 検定により両群の有意差を検定した。i) 異常妊娠群 vs 正常妊娠群、ii) 有症状群 vs 正常妊娠群、iii) 流産前群 vs 正常妊娠群、iv) 流産前群 vs 正常分娩前群。なお、ii、iii については検体の妊娠時期を揃えるため、正常妊娠群の一部を抽出した。また有症状馬における子馬の予後判定精度について、ROC 解析により各ホルモンのカットオフ値を算出し、診断精度を検証した。

【結果】

(実験 1) 妊娠初期の血清 ActA 濃度はおよそ 50pg/ml であったところ、妊娠の進行に伴って 200pg/ml まで徐々に上昇した後、分娩直前には大きく上昇し 350pg/ml に至った。(実験 2) i) 異常妊娠群と正常妊娠群の間において ActA、P4、E2 はいずれも有意差が認められた ($P<0.05$)。ii) 有症状群と同時期正常妊娠群の比較においても、3 項目ともに群間差を認めた ($P<0.05$)。有症状馬における子馬の予後の診断精度は ActA が最も高かった (カットオフ値 169.03pg/ml、感度 100%、特異度 72.7%)。iii) 流産前群と同時期正常妊娠群の比較において、3 項目ともに群間差を認めた ($P<0.05$)。iv) 流産前群と正常分娩前群の比較においては、いずれも有意差は認められなかった。

【考察】

アクチビン A は馬において妊娠進行に伴った特異的な血中動態を示すことが明らかとなった。また、異常妊娠の診断マーカーとしての有用性が示唆され、その診断精度は従来マーカーの P4、E2 と同程度以上であることが示唆された。ActA の変動は P4、E2 と同様に胎子娩出に向けた一連の生体機能を反映していることも考えられるが、詳細は不明でありさらなる研究が必要である。

暑熱順化がサラブレッドの生理学的機能に及ぼす影響

○ 胡田悠作¹・向井和隆¹・高橋佑治¹・吉田年伸¹・大村 一²

¹総研・²美浦

【背景と目的】

ヒトにおいて暑熱環境下での運動は、生体負担度の増加のみならずパフォーマンスの低下にもつながることが知られており、その対策として、暑熱環境でトレーニングを行うことで身体を順化させることの有用性が報告されている。ウマにおいては、馬術競技を対象とした暑熱順化の報告はあるものの、サラブレッド競走馬を想定した暑熱順化トレーニングについての報告は少なく、十分な知見は得られていない。そこで我々は、サラブレッドにおける暑熱順化がパフォーマンスや生理応答に与える影響を検討した。

【材料と方法】

WBGT 15 °C (気温 20 °C, 湿度 40%程度) の環境下で 3 週間トレーニングしたサラブレッド 9 頭をランダムに 2 群に分け、WBGT 29 °C (気温 36 °C, 湿度 35%程度) に 30 分間暴露 (暑熱群; n = 5)、または WBGT 15 °C (対照群; n = 4) で同じトレーニングを週 3 回 3 週間行った。トレーニングは、傾斜 6% のトレッドミル上で 7 m/s の駈歩 2 分間 + 90% $\dot{V}O_{2max}$ (最大酸素摂取量に達する速度の 90%; 9.4 – 11.1 m/s) の駈歩 2 分間を週 2 回、7 m/s の駈歩 3 分間を週 1 回行い、各々終了後 20 分間の常歩を行った。暑熱順化期間の前後 (Pre と Post) に暑熱環境下 (WBGT 29 °C) で高強度運動 (12.2 – 13.8 m/s, 約 113% $\dot{V}O_{2max}$) を実施し、規定された速度が維持できなくなるまでの走行時間、走行中の血漿中乳酸濃度および肺動脈血温を測定した。統計解析は Student's t-test を用い、有意水準は $P < 0.05$ とした。

【結果】

走行時間は Pre では両群間に差は認められなかった (対照群, 73.8 ± 3.3 秒; 暑熱群, 83.4 ± 25.8 秒; mean \pm SD) が、Post では暑熱群の走行時間は対照群と比べて有意に長かった (対照群, 71.8 ± 13.3 秒; 暑熱群, 102.8 ± 21.2 秒; $P = 0.039$)。血漿中乳酸濃度は、Pre では両群間に差は認められなかったが、Post では 7 m/s 走行時 (対照群, 5.3 ± 1.8 mmol/l; 暑熱群, 2.8 ± 0.5 mmol/l; $P = 0.022$) および最高値 (対照群, 37.5 ± 9.3 mmol/l; 暑熱群, 26.7 ± 3.7 mmol/l; $P = 0.046$) とともに暑熱群は対照群より有意に低値であった。肺動脈血温は Pre、Post とともに両群間に差は認められなかった。

【考察】

暑熱群では対照群と比較して暑熱環境下で長時間走行することが可能であり、血漿中乳酸濃度から生体負担度も軽減されることがわかった。本成績から、暑熱順化はウマにおいても暑熱環境下でのパフォーマンス発揮に有用であることが示唆された。一方、ヒトで報告されている運動中の体温上昇を抑制する効果は認められなかったため、競走後の馬体冷却は暑熱順化後においても必要と考えられた。

高強度持続運動および高強度インターバル運動に対する サラブレッドの生理反応および骨格筋適応

○ 向井和隆¹・高橋佑治¹・胡田悠作¹・宮田浩文²・大村 一¹

¹総研・²山口大学

【背景と目的】

高強度インターバルトレーニングはパフォーマンスや最大酸素摂取量 ($\dot{V}O_{2max}$) を効果的に向上させるトレーニング法として、近年注目されている。競走馬においても、インターバルトレーニングの運動時間、セット数などとトレーニング効果の関係には興味を持たれている。そこで、今回の研究では高強度持続運動と高強度インターバル運動がサラブレッドにどのような生理反応や骨格筋適応を引き起こすのかを調べた。

【材料と方法】

8頭のトレーニングされているサラブレッドを用いて、ランダム化クロスオーバー試験を実施した。同じ運動強度で、持続運動 (100% $\dot{V}O_{2max}$ で3分間; CON)、短時間インターバル運動 (100% $\dot{V}O_{2max}$ で30秒間+30% $\dot{V}O_{2max}$ で30秒間を6セット; S-INT) および長時間インターバル運動 (100% $\dot{V}O_{2max}$ で60秒間+30% $\dot{V}O_{2max}$ で30秒間を3セット; L-INT) を傾斜6%のトレッドミル上で実施し、運動中の血漿乳酸濃度や血液ガスなどを測定した。運動前、直後および4時間後に中殿筋バイオプシーを行い、エネルギー代謝の制御因子である AMPK のリン酸化をウエスタンブロットで、ミトコンドリア新生の制御因子である PGC-1 α と血管内皮成長因子である VEGF の mRNA 発現をリアルタイム PCR で分析した。統計解析には混合モデルを用い、有意水準は $P < 0.05$ とした。

【結果】

運動終了時の血漿乳酸濃度は CON が S-INT に比べて高く (CON, 18.2 mmol/l (平均値); S-INT, 15.3 mmol/l; L-INT, 15.8 mmol/l, $P < 0.05$)、pH は CON が S-INT に比べて低かった (CON, 7.212; S-INT, 7.257; L-INT, 7.252, $P < 0.05$)。動脈血の酸素分圧は CON と L-INT が S-INT より低かった (CON, 85.1 mmHg; S-INT, 91.6 mmHg; L-INT, 86.0 mmHg, $P < 0.05$)。運動前に比べて運動直後の AMPK のリン酸化は S-INT でのみ有意に増加した (CON, 1.3 倍; S-INT, 1.5 倍; L-INT, 1.3 倍, $P < 0.05$)。運動4時間後に PGC-1 α と VEGF の mRNA は L-INT (8.0 倍および 2.5 倍) で増加したが、CON (4.3 倍および 2.0 倍) と S-INT (5.3 倍および 1.8 倍) では有意な増加を認めなかった。

【考察】

高強度持続運動は、短時間高強度インターバル運動より重度の乳酸アシドーシスや低酸素血症を引き起こしたが、骨格筋における AMPK の活性化は短時間高強度インターバル運動で、ミトコンドリア新生や血管新生に関わる遺伝子の発現は長時間高強度インターバル運動でのみ有意に増加した。これらの結果は、骨格筋におけるミトコンドリアや毛細血管のトレーニング適応の制御には、インターバル運動の特徴である間欠的な運動や加速が関与している可能性を示唆している。

長距離輸送による下部気道疾患予防のための頭頸部自由度の重要性

○ 高橋佑治¹・丹羽秀和¹・胡田悠作¹・向井和隆¹・吉田年伸¹・Sharanne Raidal²・Barbara Padalino³

大村 一⁴

¹総研・²チャールズスタート大学・³ボローニャ大学・⁴美浦

【背景と目的】

長距離輸送はウマにストレスがかかり、輸送性肺炎を中心とした呼吸器系感染症につながるため、輸送時のストレスを軽減することは重要である。特に、馬房内で頭頸部の位置が高い位置に固定された状態が長時間続くと気道内の細菌数が増えることが報告されており、能動的に頭頸部を下げられる輸送環境が好ましいと考えられるが、その影響を検討した研究はない。そこで本研究では、長距離輸送時における頭頸部の自由度と生体負担を検討した。

【材料と方法】

6頭のサラブレッドを1台の馬運車に載せ、栃木-青森間の往復約1300 kmを22時間かけて輸送するランダム化クロスオーバー試験を実施した(輸送間隔は3週間)。頭絡と輸送時の繫留スペースの支柱をつなぐ引き手の長さを調整し、キ甲よりも低い位置に頭部が下げられない制限群とキ甲よりも低く頭頸部を下げられる非制限群に3頭ずつ分け、輸送中は乾草を自由採食できるように、乾草を制限群は地面からの高さ約170 cm、非制限群は110 cmに吊るした。馬運車内にカメラを設置し、輸送中に頭頸部がキ甲より下がる時間を計測した。輸送の6日前(Pre)、輸送直後(Post)に気管洗浄液を採材し、血液寒天培地上で培養された細菌コロニー数(Colony Forming Unit; CFU)を測定した。また、輸送中はホルター型心電計を装着し、心拍数および副交感神経活動指標となる高周波成分(HF成分)を測定した。頭頸部を下げている時間のデータは中央値で、それ以外は平均±標準偏差で表した。気管洗浄液中の細菌数の比較については混合モデルを用い、心拍数およびHF成分は輸送中の平均値を算出し、対応のあるt検定を行った(有意水準; 5%未満)。

【結果と考察】

観察時間において、キ甲より頭部を下げている時間の割合は制限群で0%に対し、非制限群で51%であった。気管洗浄液中の細菌数は、制限群は有意に増加していたのに対し(Pre vs. Post; 3.84 ± 0.83 vs. 6.01 ± 1.57 log CFU/ml)、非制限群は輸送による影響が認められなかった(Pre vs. Post; 4.31 ± 1.12 vs. 4.47 ± 0.47 log CFU/ml)。これらのことから、長距離輸送時には引き手の長さを調整して頭頸部がキ甲よりも低い位置に下げられる程度に自由度を持たせ、かつ乾草の位置を下げウマが能動的に頭頸部を下げさせることで、輸送に伴う呼吸器疾患を予防できる可能性があると考えられた。

また、輸送中の心拍数は非制限群(37 ± 3 bpm)が制限群(43 ± 4 bpm)に比べて、低い傾向を示し($P = 0.09$)、HF成分は非制限群(484 ± 175 ms²)が制限群(268 ± 40 ms²)よりも高い傾向であった($P = 0.06$)。以上から、輸送時に頭頸部の自由度を持たせることは副交感神経活動が高まっており、馬体にかかる輸送ストレスが軽減されている可能性も示唆された。

長距離輸送された馬における馬鼻肺炎ウイルスに対する粘膜免疫の低下

○ 坂内 天¹・高橋佑治¹・大村 一²・胡田悠作¹・向井和隆¹・上林義範¹・根本 学¹・辻村行司¹

太田 稔¹・Sharanne Raidal³・Barbara Padalino⁴

¹総研・²美浦・³チャールズスタート大学・⁴ボローニャ大学

【背景と目的】

馬鼻肺炎ウイルス（EHV-1 および EHV-4）は馬体内に持続感染し、ストレス等により免疫が低下した際に潜伏ウイルスが再活性化する。セリや競技会など馬の長距離輸送を伴うイベントでは、EHV-1 や EHV-4 の感染が頻繁に見られることから、感染と輸送ストレスによる免疫低下との関連が疑われている。これまでの研究で、長距離輸送された馬において気道粘膜のクリアランスやリンパ球の活性が低下することが知られているが、特定の病原体に対する免疫に与える影響は明らかではない。本研究では、馬運車で馬を 12 時間輸送した際の EHV-1 又は EHV-4 感染の有無、およびこれらのウイルスに対する液性免疫と粘膜免疫に与える影響を検討した。

【材料と方法】

6 頭のサラブレッドを 3 頭ずつ 2 台の馬運車に載せ、3 時間ごとに 15 分間の休憩を挟みながら 12 時間輸送した。輸送開始から 3 時間ごとに採取した血漿を用いてコルチゾール濃度を測定した。輸送の 6 日前、輸送直後、2 日後、6 日後に、鼻腔スワブ、末梢血単核球、血清、鼻腔洗浄液を採取した。鼻腔スワブと末梢血単核球を用いて EHV-1/4 遺伝子の有無をリアルタイム PCR 法にて調べた。血清については EHV-1/4 感染抗体の上昇の有無を ELISA 法で調べた。また、EHV-1/4 に対する中和抗体価を測定した。鼻腔洗浄液については、尿素、蛋白質、IgA 抗体濃度および EHV-1/4 に対する中和抗体価を測定した。

【結果と考察】

血漿コルチゾール濃度は輸送開始から 3 時間後と 6 時間後に有意に高く、馬が輸送によりストレスを受けたことが示された。鼻腔スワブと末梢血単核球からはいずれの時点においてもウイルス遺伝子は検出されず、感染抗体の上昇も見られなかった。鼻腔洗浄液中の尿素、蛋白質濃度が輸送直後に一過性に上昇したことから、鼻汁の分泌が亢進したことが示された。同様に IgA 抗体濃度も輸送直後に上昇したが、蛋白質濃度との比は一定であった。血清中の EHV-1 中和抗体価は輸送直後に 1 頭で 4 分の 1 に低下したが、他の 5 頭では著変を認めなかった。一方、鼻腔洗浄液中の EHV-1 中和抗体価は輸送直後に 6 頭中 4 頭で 4 分の 1 以下まで低下し、2 日後には元の抗体価まで復した。EHV-4 抗体価は血清中では輸送前後の期間一定の値を維持し、鼻腔洗浄液中では検出されなかった。

今回の輸送条件では、ウイルスの再活性化や感染は検出されなかった。輸送後に鼻汁の分泌亢進と比例して IgA 抗体の産生量も増加したが、EHV-1 中和抗体価については相対的に低下しており、鼻粘膜での感染防御能力が一時的に損なわれたと考えられる。粘膜免疫の一過性の低下は、長距離輸送後に EHV-1 の感染や流行が起きやすくなる原因の一つと考えられた。

HES130/0.4/9 (ボルベン輸液 6%®) 投与の安全性の検討

○ 仁比大記¹・大塚 佑¹・前 尚見¹・前田達哉²・黒田泰輔²・南島陽平³・眞下聖吾¹

¹美浦・²総研・³競理研

【背景と目的】

ヒドロキシエチルスターチ (HES) 製剤は、血漿増量作用による循環血液量の維持を目的として使用される輸液製剤である。2013 年に発売された第 3 世代 HES 製剤のボルベン輸液 6%®は、従来の HES 製剤よりも持続時間が長く、体内蓄積が少ないことに加え、HES 製剤の代表的な副作用とされる腎機能障害や凝固止血異常への影響は小さいと考えられている。一方、ウマにおけるボルベン輸液 6%®投与に起因する副作用の発現や安全性に関する報告は限られている。そこで本研究では、サラブレッド種健常馬におけるボルベン輸液 6%®投与の安全性について、他の輸液製剤と比較して検討した。

【材料と方法】

健康なサラブレッド種 6 頭を用い、ボルベン輸液 6%®10ml/kg (V 群)、HES70/0.55/4 (6%ヘスパンダー®) 10ml/kg (H 群) あるいは乳酸リンゲル液 (ラクテック注®) 10ml/kg (L 群) を静脈内投与した。投与前、投与直後から 1 時間までは 15 分毎に、以降は投与後 48 時間まで経時的に血液検査 (CBC・血清生化学) および臨床検査を行った。また、V 群および H 群においては、血中グルコース値から血中 HES 濃度を算出し、血中 HES 濃度の経時変化を比較した。統計解析には Tukey 検定、ウィルコクソンの符号付順位検定を用い、有意水準は $P < 0.05$ とした。各薬剤の投与試験については 1 週間以上のウォッシュアウト期間を設け、3 群のクロスオーバー試験とした。

【結果と考察】

ヘマトクリット値 (Hct)、赤血球数 (RBC)、総タンパク (TP)、アルブミン (ALB) は、投与直後から 1 時間までは L 群と比較して V 群および H 群で有意に低値となり、V 群と H 群は同程度の値を示したことから、V 群は H 群と同等の血漿増量作用を有することが示唆された。血中 HES 濃度から消失半減期 (h) を算出すると、V 群が H 群と比較して有意に短時間であった (V 群: 20.6 ± 3.2 、H 群: 39.3 ± 10.8)。このことから、HES の血中からの消失速度は、V 群が H 群よりも速いことが示された。腎機能の指標となる尿素窒素 (BUN) やクレアチニン (Cre) は全群で正常値を示し、発熱やその他の副作用を疑う所見も観察されなかった。以上の結果から、サラブレッド種健常馬におけるボルベン輸液 6%®投与は、6%ヘスパンダー®と比較して同等の血漿増量作用を有し、また、消失速度が速いため、体内蓄積が少なくなる可能性が示された。さらに、全群で臨床検査上の異常を認めず、安全性が確認された。今後は、連続投与時における安全性の確認など、臨床応用に向けての検討を進めていきたい。

セボフルラン吸入麻酔下における HES130/0.4/9(ボルベン輸液 6%®)投与が循環機能および凝固機能に与える影響

○ 山崎洋祐¹・前田達哉²・前 尚見³・南島陽平⁴・黒田泰輔²・湯浅麗子¹・植芝滉己¹

徳重裕貴¹・栗本慎二郎¹

¹栗東・²総研・³美浦・⁴競理研

【背景と目的】

ヒドロキシエチルスターチ (HES) は、血管内膠質浸透圧を上昇させることで血漿増量作用をもたらす循環改善効果を発揮するが、腎機能障害、凝固止血異常が欠点である。ウマでの立位安静時下でのボルベン輸液6%®投与の安全性について前演者が示したが、代表的な循環血液量減少ケースである吸入麻酔下での投与についての報告は見当たらない。本研究では、セボフルラン吸入麻酔下におけるボルベン®投与が循環機能および凝固機能に与える影響を、第2世代のHES70/0.55/4 (6%ヘスパンダー®) と比較調査した。

【材料と方法】

サラブレッド種 6 頭を用いて、ボルベン® (V 群)、ヘスパンダー® (H 群)、生理食塩液 (C 群) のランダム化クロスオーバー試験を実施した。メデトミジン、ミダゾラムによる鎮静後、ケタミン 1.5 mg/kg とプロポフォル 1.0 mg/kg の静脈内投与で倒馬した。導入後は横臥位で保定し、セボフルラン (呼気中濃度 2.8±0.1%) にて無侵襲下で 120 分間維持した。吸入麻酔開始 45 分後より 3 群のうち 1 つを 30 分かけて 10 ml/kg 急速静脈内投与した。全群とも急速投与前後に乳酸リンゲル液を 10 ml/kg/hr で投与し、昇圧剤は使用しなかった。麻酔維持中は心拍数、動脈圧を測定し、投与前、投与終了後 0、15、30、45、60、120 分、24 時間で採血を行い、血球数、血清生化学、凝固系指標を測定した。V 群と H 群は血中 HES 濃度ならびに、投与前から投与終了後 120 分までの血中濃度—時間曲線下面積 (AUC) を算出した。

【結果】

血管内容量の指標である Hct、TP は V 群と H 群が C 群に比べて有意に低値であり、特に循環血漿量の推定に利用できる TP は V 群と H 群との間に有意差は認められなかった。輸液剤投与前後の 3 群間の平均血圧 (mmHg) に有意差は認められず、低値での麻酔維持となった (V 群: 46.6±3.7、H 群: 46.2±9.6、C 群: 43.8±12.6)。心拍数、BUN、Cre、凝固系指標に群間の有意差は認められなかった。V 群、H 群ともに、血中 HES 濃度 (mg/ml) は投与直後に最高となり (V 群: 10.8±3.3、H 群: 7.0±2.2)、AUC (mg・hr/ml) は V 群: 22.1±5.8、H 群: 13.9±5.3 であった。投与 24 時間後において、V 群 2 頭が発熱し (38.7°C、39.5°C)、V 群 4 頭、H 群 1 頭、C 群 2 頭で SAA 値の上昇 (>10 µg/ml) が認められた。

【考察】

これらの結果から、セボフルラン吸入麻酔下におけるボルベン®投与が循環機能および凝固機能に与える影響は本実験の投与量・速度ではヘスパンダー®と同等であることが示唆された。一方、ボルベン®を投与した 6 頭中 2 頭で投与 24 時間後に発熱が認められたことから、セボフルラン吸入麻酔下でのボルベン®投与時には安全性を向上させる麻酔維持法の検討が必要であると考えられた。

プロポフォール - ケタミン - キシラジン - レミフェンタニル 全静脈麻酔法の応用

○ 大塚 佑¹・前 尚見¹・溝部文彬¹・上林義範²・荒木成就¹・原田大地¹・大和田さつき¹
林 奈名子¹・神谷和宏¹・眞下聖吾¹
¹美浦・²総研

【背景と目的】

JRA における全静脈麻酔法 (TIVA) では、グアイフェネシン - ケタミン - キシラジンを組み合わせた “triple drip 法” が汎用されているが、良好な麻酔深度が得られる一方で、麻酔薬の蓄積作用による覚醒の質の低下をもたらすことがある。短時間作用型麻酔薬であるプロポフォールにケタミンとキシラジンを加えた PKX 法は、十分な麻酔深度が得られることが報告されているが、侵襲下での報告はない。また、近年、超短時間作用型オピオイド薬のレミフェンタニルが、調節性の優れた鎮痛薬としてヒトおよび小動物領域の TIVA で臨床応用されているが、ウマでの使用報告は限られている。そこで今回、PKX 法にレミフェンタニルを加えた PKXR 法の有用性について検討した。

【材料と方法】

健康なサラブレッド種 8 頭 (4.9 ± 2.4 歳・469 ± 36 kg) を用いた。キシラジン (0.8-1.0 mg/kg) およびミダゾラム (0.02 mg/kg) による前処置後、ケタミン (1.5 mg/kg) およびプロポフォール (1.0 mg/kg) を静脈内投与し、倒馬、導入した。直後よりプロポフォール (3.0 mg/kg/hr) - ケタミン (3.0 mg/kg/hr) - キシラジン (1.0 mg/kg/hr) の混合液とレミフェンタニル (6.0 μg/kg/hr) の持続投与により麻酔を維持し、仰臥位で去勢術を実施した。全頭で気管挿管を行い、PaCO₂<70mmHg となるように 100% 酸素下で補助換気を行った。覚醒時には必要に応じてキシラジンを投与し、自由起立とした。測定項目は、心拍数、動脈圧および動脈血ガス分圧とし、覚醒の質は 5 段階 (G5:excellent~G1:poor) で評価した。

【結果と考察】

術中は、2 頭でわずかな精巣挙筋の牽引を認めたが、十分な麻酔深度で維持することが可能であった。一方、3 頭で鼻端の振戦および舌動を認めた。1 頭は手術終了時の発現であったため予定通り TIVA を終了し、1 頭はレミフェンタニルの持続投与を中止し PKX 法で維持した。2 頭とも投与中止数分後に振戦は消失したが、残る 1 頭では頸部の筋硬直も認めたため TIVA を中止し、吸入麻酔に変更した。心拍数は 27±1 回/分、平均動脈圧は 104±4 mmHg で推移し、循環状態は良好に維持された。PaCO₂、PaO₂ も適切に維持され、換気状態も良好であった。手術終了まで PKXR 法で維持した 6 頭の麻酔終了から起立までの時間は 35 ± 7 分で、全頭で起立回数は 1 回、覚醒の質は G5 であり、起立直後からスムーズな歩行が可能であった。以上の結果から、レミフェンタニルによる副反応と思われる体性反応を認める場合があるものの、極めて良好な覚醒が得られることから、本法は有用な静脈麻酔法であると考えられた。今後は副反応を軽減できる投与方法を検討することで、さらなる臨床応用を進めていきたい。

立位鎮静局所麻酔下の喉頭形成術における モルヒネ投与が術中・術後に与える影響

○ 佐藤 岳¹・浦山俊太郎¹・徳重裕貴¹・三田宇宙²・黒田泰輔²・南島陽平³・栗本慎二郎¹

¹栗東・²総研・³競理研

【背景と目的】

現在栗東では喉頭形成術を立位下で行っており、その疼痛管理として、モルヒネ全身投与および第2・第3頸神経(C2・C3)領域局所神経ブロックを併用している。モルヒネは周術期の鎮痛薬として海外で広く使用されているが、立位下喉頭形成術におけるモルヒネ投与の有効性についての報告は限られている。また、モルヒネは便秘、イレウスおよび興奮作用などの副作用を有する。特に本会では同手術の術後合併症として便秘症が散見されるが、それらのモルヒネとの関連性は不明である。そこで本研究では、立位下喉頭形成術を実施する競走馬における、モルヒネ投与が術中および術後に対して与える影響の調査を目的とした。

【材料と方法】

立位下喉頭形成術を実施したサラブレッド種競走馬 16 頭を対象とし、生理食塩水投与群【生食群】とモルヒネ投与群【Mo 群】の各群 8 頭ずつに無作為に分類した。Mo 群にはモルヒネ塩酸塩注(0.1 mg/kg)、生食群には生理食塩水(0.01 mL/kg)の筋肉内投与を行った。手術中はメドミジン投与により適切な鎮静状態を維持し、鎮静開始 30 分後にメピバカインにより C2・C3 領域局所神経ブロックを実施した。術中の調査項目は、心拍数・鎮静スコア・手術時間・麻酔時間・メドミジン投与量・Visual Analogue Scale(VAS)による手術の実施しやすさを術者が評価した術中スコア【0~100】とし、術後の評価項目は、1・2・4・24 時間後の心拍数・呼吸数・体温・疼痛スコア【8~32】(Lori C.Pritchett et al,2002)とし、それぞれ両群間で比較した。なお、全ての試験は二重盲検で行った。また、入院中の術後合併症の有無を調査した。

【結果】

VAS による術中スコア【中央値(最小値~最大値)】は、生食群【84(47~94)】、Mo 群【87(25~92)】で、群間に有意差は認められなかった。術後 1・2・4・24 時間の疼痛スコア【中央値(最小値~最大値)】は、生食群【11(8~15)・10(8~12)・9(8~11)・8(8~9)】、Mo 群【10(8~11)・10(8~12)・10(8~12)・8(8~14)】で、群間に有意差は認められなかった。その他の調査項目でも両群間に有意差は認められなかった。術後合併症は、Mo 群で蹄葉炎 1 頭、便秘症 1 頭、生食群で手術部位感染 1 頭、便秘症 1 頭認められた。

【考察】

すべての項目で両群間に有意差は認められなかったことから、モルヒネ投与は術中および術後における鎮痛効果の点で有効ではないことが示唆された。また、術後合併症では、モルヒネ投与に関わらず便秘症が同頭数認められたことから、今後症例数を増やし、術後管理方法を含めたモルヒネ投与以外の要因を検証する必要があると考えられた。以上のことから、立位鎮静局所麻酔下の喉頭形成術において、モルヒネ投与による術中・術後への有用性は限定的と考えられた。

競走馬のドーピング検査におけるメタボロミクスの応用

○ 大沼康平¹・内田大雅¹・Gary Ngai-Wa Leung¹・植田俊樹¹・小原拓²・石井英昭¹

¹ 競理研・² 東北大学病院

【背景と目的】

ドーピング検査は競馬における公正確保の一翼を担っているが、新規のドーピング薬の出現やドーピング手法の巧妙化により、直接的に薬物を検出する従来の検査をすり抜ける事例も海外では報告されている。このような事案に対応するため、薬物自体でなく薬物投与に呼応して変動する内因性物質をバイオマーカー (BM) として、間接的に検出する方法がドーピング検査に導入されつつある。特に競走馬の BM を確立するにあたり、競走に伴う生理的状態の著しい変化を定量的に把握することが極めて重要である。これまでに筆者らは、生命活動によって生じる代謝物を網羅的に検出できるメタボロミクスにより、競走後に劇的に増加した数種の血漿中代謝物について報告した (Ueda *et al. J Equine Sci.* 2019)。しかしながら、BM 候補となる代謝物の生理的意義を明らかにし、その有用性を担保するためには、関連する代謝経路の特定が必要である。本研究では、ドーピング検査におけるメタボロミクス応用への基盤形成を指向して、競走後に有意に変化した代謝物と代謝経路について網羅的に纏めた Post-race Biomarkers Database (PBD) を作成して、データベースとしての妥当性を確認したので (Ohnuma *et al, Drug Test Anal.*, 2021)、ここに報告する。

【材料と方法】

競技外および競走後の競走馬から得た血漿を液体クロマトグラフィー高分解能質量分析法 (LC/HRMS) で測定して網羅的に代謝物を検出した。次いで、統計解析により競走後に有意に増減した代謝物を抽出するとともに、パスウェイ解析により有意に変動した代謝経路を特定し、PBD として纏めた。さらに PBD のデータベースとしての妥当性を検証するために、受信者動作特性 (ROC) 解析において高い判別能を示した代謝物を組み合わせて競走後の BM とし、競技外及び競走後の血漿試料 20 例から構成される新規のバリデーションデータセットに適用して、一重盲検化試験により検定した。

【結果と考察】

競走馬の血漿から脂質やアミノ酸など約 5000 種の代謝物を網羅的に検出でき、競走後において 9 代謝経路中の 82 代謝物が有意に増加し、2 代謝経路中の 13 代謝物が減少した。これらの倍率変化を含む代謝物情報を PBD にリストアップし、ROC 解析により競走後の BM 候補を探索したところ、グリセロリン脂質代謝物に対するカルニチン代謝物の比が高い判別能を示した。これらの BM をバリデーションデータセットに適用したところ、真度、精度及び特異性は全て 100% であり、競技外及び競走後の群を良好に識別できた。以上より、競走後の BM の有用性が示されるとともに、PBD のデータベースとしての妥当性が確認された。

現在、本手法を薬物投与後に得られた試料に適用して、薬物投与を間接的に検出可能な BM 候補を探索しており、PBD を活用した BM の確立及びドーピング検査への導入に向けて、鋭意、研究を遂行している。

遺伝子ドーピング検査における確認検出法の開発

○ 戸崎晃明¹・大沼 葵¹・菊地美緒¹・石毛太郎¹・梶 裕永¹・廣田桂一¹・曾根 佑²

草野寛一²・永田俊一¹

¹ 競理研・² 馬事部

【背景と目的】

国際競馬統括機関連盟（IFHA）は、競馬の公正確保を目的に遺伝子ドーピングを禁止している。我々は、過去の調査研究発表会において、Real-Time PCR 法に基づくスクリーニング検出法と Digital PCR 法に基づく確認検出法を開発して報告した。年間約 2000 件の予備的調査を実施する中で、Digital PCR 法において検出限界域（1-5 copy）での陽性及び陰性判定が困難な場合が散見され、脆弱性が確認された。本研究では、この検出限界域の陽性及び陰性判定を確実に実施する検出法を開発することを目的に、プレ増幅したサンプルを Digital PCR で検出する手法である Nested Digital PCR 法を考案し、遺伝子ドーピングの確認検出に応用したので報告する。

【材料と方法】

遺伝子ドーピング物質の検出には、検出特異性の高い加水分解プローブ（TaqMan プローブ）を用いた。PCR 検出には、Real-Time PCR 法よりも堅牢であって絶対定量が可能である Droplet Digital PCR 法を採用した。高感度分析を実施するために、Nested PCR のためのプレ増幅プライマーを設計した。標的遺伝子配列を組み込んだプラスミドベクターを準備し、アッセイ系の確立に使用した。また、1.5 mL の血漿にプラスミドベクターを添加したサンプルを準備し、添加回収試験を実施した。

【結果】

Nested Digital PCR におけるプレ PCR 増幅条件の設定を行ったところ、15 サイクルのプレ増幅を行うことで、5 copy を Nested Digital PCR によって 496.0 copy/μL として検出することに成功した。この条件で添加回収試験を実施した結果、1.5 mL に 150 copy を加えて DNA 抽出した溶液（推定 DNA 抽出溶液濃度：2.5 copy/μL）に対しても 478.5 copy/μL として検出することに成功した。また、48 サンプルの未添加血漿から DNA を抽出し、Nested Digital PCR を実施したところ、非特異的増幅シグナルを明確に識別することができ、すべて陰性判定することができた。

【考察】

PCR 法では 1 copy の検出シグナルは非常に弱く、コンタミネーションや非特異的増幅によるシグナルかを識別するのが非常に難しいという欠点があるが、Nested PCR を加えた Digital PCR を実施することで、検出限界域であっても非特異的増幅に対して堅牢な検出を行うことが可能となった。ただし、Nested Digital PCR の高濃度の検出域は狭いことから、スクリーニング検出後に、高濃度検出の場合には従来の Digital PCR での確認検出、低濃度検出の場合には今回開発した Nested Digital PCR での確認検出と使い分けることで、高精度な遺伝子ドーピング検査を提供できると考えられる。

感染実験馬を用いたウマコロナウイルスの感染部位の検索

○ 上林義範・根本 学・木下優太・岸 大貴・越智章仁・上野孝範・坂内 天・辻村行司・太田 稔

総研

【背景と目的】

ウマコロナウイルス（ECoV）感染馬は、主に発熱、食欲不振、元気消失を示し、一部が下痢等の消化器症状を示す。重症感染馬の解剖検体を用いた組織学的検査において、小腸および結腸の腸細胞内におけるウイルス抗原の存在が報告されているが、報告例が少なく、他の組織への感染の有無など不明な点が多い。また、ECoV と近縁であるウシコロナウイルスは、消化器だけでなく呼吸器にも感染することが知られているが、ECoV の呼吸器感染は現在まで確認されていない。本研究では ECoV を実験的にウマに感染させ、各組織検体からウイルス遺伝子の検出を試みることにより感染部位の解明を試みた。

【材料と方法】

実験にはサラブレッド種 1 歳 3 頭を用いた。2012 年帯広競馬場で ECoV 感染症が流行した際に採取した ECoV 陽性下痢便 50g を PBS で希釈した懸濁液 500ml を作製し、各馬に経鼻投与した。投与後は、毎日、体温および臨床症状を記録し、糞便および全血を採取した。ウイルス投与から 3 日後（No.1）、5 日後（No.2）および 7 日後（No.3）に 1 頭ずつ解剖し、十二指腸、空腸、回腸、盲腸、結腸、直腸、気管および肺を採取した。糞便、全血および剖検材料から RNA を抽出し、リアルタイム RT-PCR 法にてウイルス遺伝子量を測定した。

【結果と考察】

ウイルス投与から 2、3 日後に 2 頭（No.1 および 2）が 38.5℃以上の発熱を示したが、残り 1 頭（No.3）は観察期間中に臨床症状を示さなかった。3 頭のいずれでも糞便性状の異常は認められなかった。全頭において、投与 3 日後から剖検までの期間に糞便中から大量のウイルス遺伝子が検出された。また、No.1 でのみ投与 2、3 日後の全血からウイルス遺伝子が検出された。剖検時の肉眼的観察では、3 頭とも腸管、気管および肺に明らかな異常所見は認められなかった。剖検材料を用いたリアルタイム RT-PCR にて、No.1 では空腸から結腸においてウイルス遺伝子が検出され、肺からも検出された。No.2 および 3 では、十二指腸～直腸の腸管全域でウイルス遺伝子が検出されたが、肺からはウイルス遺伝子は検出されなかった。また、3 頭とも気管からウイルス遺伝子は検出されなかった。

本研究より、ECoV は臨床症状の有無にかかわらず、腸管全域に感染することが示された。No.1 の肺からウイルス遺伝子が検出されたが、同馬は剖検時にはウイルス血症の状態であった。そのため、これは肺組織の血中に含まれるウイルスを検出した結果である可能性があり、肺への感染を示唆するものではないと推察された。

ウマコロナウイルス遺伝子を検出する *in situ* hybridization 法の開発と応用

○ 岸 大貴・上林義範・根本 学・太田 稔・越智章仁・上野孝範

総研

【背景と目的】

ウマコロナウイルス (ECoV) は、下痢等の消化器症状を引き起こすことから感染部位は腸管であると考えられるが不明な点が多い。病理組織学的にウイルス遺伝子を検出する手法 *in situ* hybridization (ISH) 法は、任意の遺伝子領域とその相補的な配列をもつ標識プローブを結合させることにより、ウイルス遺伝子の局在を組織中で可視化する手法である。ウイルス遺伝子の塩基配列が明らかであれば、そのウイルスに特異的な標識プローブを人工的に合成することも可能である。このように、組織病変の中のウイルス感染細胞を比較的容易に特定することができる ISH 法であるが、ECoV 感染組織への応用例はない。そこで本研究では ECoV 遺伝子を検出する ISH 法を開発し、その有用性を検討した。

【材料と方法】

ISH 法には RNAscope 2.5 Reagents Kit (ACD 社製) を使用し、標識プローブのターゲットは ECoV, Obihiro 12-1 株のヌクレオカプシド遺伝子とした。プローブの信頼性は ECoV 感染培養細胞から作製したセルブロック標本を用いて確認し、プローブのシグナル強度に影響を及ぼす賦活化処理およびプロテアーゼ処理について作用時間の検討を実施した。この後、ECoV 感染実験において PCR 法でウイルス遺伝子が検出された腸管を用い (ウイルス接種 3、5、および 7 日後、各 1 例)、ISH 法による ECoV 感染細胞の特定を試みた。

【結果と考察】

ECoV 感染培養細胞を用いた ISH 法の検証において、変性した培養細胞から多数の ECoV 遺伝子が検出された。ウイルス検出に適切なシグナル強度を示した反応条件は、賦活化処理 15 分、プロテアーゼ処理 30 分であった。この結果を踏まえた ECoV 感染馬の腸組織を用いた ISH 法では、管腔表面の上皮細胞や粘膜固有層表層のマクロファージなど、病変の中の特定の細胞から ECoV 遺伝子が検出された。また、ECoV 接種後の時間経過に伴い ECoV 遺伝子の検出部位は変遷し、接種 3 日後では空腸から盲腸、5 日後では腸管全体、そして 7 日後では盲腸から結腸と推移した。なお、肺においては ECoV 遺伝子を確認することはできなかった。以上の結果より、ECoV は腸管が主要な感染部位であることが明らかとなった。

本研究で開発した ISH 法は、ECoV を効率的に検出できるため、下痢症の鑑別診断や本ウイルスの病原性解析に使用できるツールとなることが期待される。

発酵飼料が腸内細菌叢に与える影響

○ 山本 匠¹・木下優太²・上野孝範²・宮田健二¹

¹公苑・²総研

【背景と目的】

ウマの腸内細菌叢は、腸管内に生息する多種多様な細菌によって構成されている。腸内細菌叢は、消化、免疫あるいは代謝などに関わり、細菌叢のバランスを整えることが健康維持に繋がる可能性が指摘されている。腸内細菌叢を整えることを目的に、様々な整腸剤あるいは発酵飼料が開発されている。特に、ウマ用として複数の発酵飼料が市販されており、給餌される機会が近年増加している。しかし、発酵飼料の給餌によって、腸内環境にどのような影響が出るかは不明な点も多い。本研究は、乗馬へ発酵飼料を給餌することによる影響を、継時的な腸内細菌叢の変化という側面から明らかにするために実施した。

【材料と方法】

乗馬 12 頭（サラブレッド種牡馬 6 頭、日本スポーツ種牡馬 1 頭、牝馬 5 頭、年齢 8.5±3.1 歳）を 4 頭ずつ A 群（F 社発酵飼料給餌）、B 群（G 社発酵飼料給餌）、C 群（コントロール：発酵飼料給餌なし）に振り分けた。試験開始 2 週間前より発酵飼料あるいは整腸剤の給餌を中止し、開始日より A 群および B 群には各発酵飼料を 4 週間給餌した。各馬の自然排出便を、投与前、投与 1 週間後、2 週間後、3 週間後および 4 週間後に採取した。採取糞便から DNA を抽出後、MinION (ONT 社) にてシーケンスを行った。得られたデータを用いてメタゲノム解析を実施し、各群における菌種構成の類似性および特徴的な菌種の変化を評価した。

【結果および考察】

1 週間～4 週間後における腸内細菌叢の菌種構成をコントロールである C 群と比較すると、A 群および B 群では、個体間の菌叢類似度が有意に高かった。また、B 群では試験期間を通して、同一個体内の菌叢類似度が高い傾向にあった。これらの結果より、発酵飼料の給餌によって別の個体であっても類似した腸内細菌叢になること、特に B 群で使用した G 社発酵飼料を給餌すると同一個体における菌叢構成細菌の変動が少なくなり、腸内の環境がより安定する可能性があることが示された。

発酵飼料の給餌による特徴的な腸内細菌叢の変化として、A 群および B 群では投与前と比較し、腸内細菌叢全体に占める *Clostridiaceae* の割合が有意に減少していた。*Clostridiaceae* の一部は、腸内において植物の細胞壁を分解する役割を担っており、製造段階で一度発酵されている発酵飼料では植物細胞壁の分解にかかる負荷が少ないことが示唆された。さらに、B 群では糖合成に関与する *Streptococcaceae* の占める割合が有意に増加しており、腸管内において細胞壁分解にかかる負荷が減少する一方で、エネルギー源となる糖の合成が増加していると考えられた。

以上の結果から、ウマへの発酵飼料給餌により、腸内細菌叢の安定化およびエネルギー吸収の効率化がなされることで、より安定した個体管理に繋がる可能性が示唆された。

メトロニダゾール投与時における糞便移植の影響

○ 木下優太¹・額田紀雄²・丹羽秀和¹・内田英里¹・上野孝範¹

¹総研・²栗東

【背景と目的】

下痢に対する古典的な治療法である糞便移植は、優れた有効性および簡便性から近年見直されている。特にヒト医療では、抗菌薬を主とする治療に反応が乏しい再発性 *Clostridioides difficile* 感染症において、糞便移植が症状を劇的に改善する例が多く報告されている。また、ウマ医療においても、急性あるいは慢性の下痢症例に対して糞便移植を実施することで、症状が改善する例が様々報告されている。下痢症例への治療法として、糞便移植の有用性が確立されつつある一方、下痢発症のリスクが高い症例における糞便移植の予防的な効果については不明である。本研究では、ウマの *Clostridioides difficile* 感染症に対する第一選択薬であるメトロニダゾール (MNZ) 投与時において、糞便移植が腸内細菌叢の構成に与える効果について検証した。

【材料と方法】

MNZ 投与および糞便移植の有無により 3 群を設定し (A 群 : MNZ、B 群 : MNZ + 糞便移植、C 群 : コントロール)、サラブレッド 9 頭を各群 3 頭ずつ振り分けた。直近 3 か月間の抗菌薬投与歴が無く、臨床的に健康な馬を糞便移植ドナーとし、採取した糞便を使用するまで冷凍保管した。MNZ 投与 (A 群および B 群) を 5 日間連続で実施し、B 群にのみ各日の MNZ 投与直後に糞便移植を行った。投与前 (0 日)、投与開始 1 日後、3 日後、5 日後、15 日後および 30 日後に糞便を採取し、MinION を用いてメタゲノム解析を実施した。各群の腸内細菌叢について、①糞便中の菌種多様性および②サンプル間菌種構成の類似性を評価した。

【結果】

A 群および B 群の各 1 頭で軽微な食欲不振を呈したが、投与 30 日後までに発熱あるいは下痢などの症状は認めなかった。糞便中の菌種多様性は、コントロールである C 群に比較して A 群および B 群の投与 1 日後の検体で有意に乏しかった。サンプル間の菌種構成に影響する要因として、MNZ 投与の有無が有意であった一方、糞便移植の有無に有意差は認めなかった。また、C 群との菌種構成の類似度について、投与前 (0 日) と投与後 (1 日後、3 日後、5 日後、15 日後および 30 日後) を比較すると、A 群では投与 1 日後および 3 日後、B 群では 1 日後、3 日後および 5 日後に、類似度が有意に低下していた。

【考察】

本研究では、MNZ 投与時に、糞便移植を合わせて実施することにより腸内細菌叢を構成する菌種の変動を抑制し、引いては下痢の予防に繋がる可能性を検証した。その結果、MNZ 投与による腸内細菌叢の明らかな変動が、糞便移植の有無に関わらず観察され、特に投与 1 日後および 3 日後において顕著であった。本研究の結果から、抗菌薬と同時に糞便移植を実施することによる下痢予防効果は限定的であることが示唆された。また、治療として糞便移植を行う際は、抗菌薬の投与を中止してから、あるいは投薬からの間隔を開け、抗菌薬の影響が小さいタイミングで実施することが重要であると考えられた。