

## 7 マルチプレックスリアルタイム PCR 法を用いた豚熱ウイルス検査の検証

中部家畜保健衛生所  
○西島 典子

### 要 約

豚熱及びアフリカ豚熱に関する特定家畜伝染病防疫指針の一部変更により、豚熱ウイルス (CSFV) 遺伝子検査法にマルチプレックスリアルタイム PCR (mrPCR) が追加された。そこで、mrPCR の導入を検討するにあたり、当所の検査機材を用いて mrPCR の検出精度、作業時間及び検査費用を検証した。CSFV 遺伝子の検出感度の比較のため、10 倍段階希釈した CSFV を用いて従来法のコンベンショナル PCR (cPCR) と mrPCR を実施した。特異性の検証のため、牛ウイルス性下痢ウイルス (BVDV) 及び cPCR で CSFV 遺伝子陰性と判定された検体を用いて mrPCR を実施した。また、解剖豚 3 頭及び同居豚 10 頭から採材したと仮定し、両 PCR 法の作業時間及び検査費用を比較した。mrPCR では cPCR と同じ希釈倍率まで CSFV が検出され、BVDV は検出限界以下、cPCR で陰性だった検体は全て CSFV 陰性と判定された。また、mrPCR では検査費用はやや高額になるが、検査時間は大幅に短縮された。結果より、mrPCR の CSFV 検出感度は cPCR と同等であり、CSFV 遺伝子に対する特異性は高いと考えられた。以上のことから、mrPCR を導入することで検査精度を保ち、作業時間の短縮や作業ミスの減少等が期待されると考えられた。

### はじめに

豚熱 (CSF) は、フラビウイルス科ペスチウイルス属の CSF ウイルス (CSFV) により起こる豚及びイノシシの熱性伝染病であり、特定家畜伝染病に指定されている。平成 30 年に国内で 26 年ぶりに発生が確認され、現在も感染の拡大が継続している。飼養豚で特定症状が認められた場合は直ちに病性鑑定を行い、症状が類似しているアフリカ豚熱 (ASF) と併せて迅速かつ正確に診断する必要がある。

豚熱及びアフリカ豚熱に関する特定家畜伝染病防疫指針の一部変更 (令和 3 年 10 月 1 日) により、従来法のコンベンショナル PCR (cPCR) に加え、新たにリアルタイム PCR (rPCR) による遺伝子検査が可能となった。従来法の cPCR では、RNA ウイルスである CSFV、DNA ウイルスである ASFV を個別に検査する必要がある。CSFV においては、まずペスチウイルス属を検出する RT-PCR を実施し、陽性が疑われる場合は、さらに制限酵素処理に進み CSFV 遺伝子を識別する [1]。変更後の豚熱の診断マニュアルでは、市販の検査キットによる rPCR 法が提示されている。そのうち、タカラバイオ及び国立研究開発法人農研機構が共同開発した検査キットでは、マルチプレックスリアルタイム PCR (mrPCR) 法を用いてお

り、CSFV 遺伝子及び ASF ウイルス (ASFV) 遺伝子、インターナルコントロール (IC) として豚由来の swine GAPDH 遺伝子が同一ウェルで検出可能である [2]。

病性鑑定への mrPCR の導入を検討するにあたり、当所の検査機材を用いて mrPCR の検出精度、作業時間及び検査費用を検証した。なお、ASFV については、検証に使用可能な陽性対照を保有していないため実施していない。

### 材料と方法

#### 1. CSFV 遺伝子の検出感度の比較

$10^4 \sim 10^{-1}$ TCID<sub>50</sub>/ml に 10 倍段階希釈した CSFV GPE<sup>-</sup>株を用いた。当所の現行法であるスピнкаラム法 (High Pure Viral Nucleic Acid Kit, Roche) 及び磁気ビーズ法 (KingFisher Duo Prime, Thermo Fisher Scientific) により核酸を抽出し、mrPCR 及び cPCR を実施した。

mrPCR は CSFV/ASFV Direct RT-qPCR Mix & Primer/Probe 及び CSFV/ASFV Positive Control DNA (タカラバイオ) を用いて、付属の説明書に従って実施した。rPCR 装置は Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific)、解析ソフトは 7500 Software v2.3 を使用した。

cPCRはTaKaRa One Step RNA PCR Kit(AMV) (タカラバイオ)を用いて、豚熱の診断マニュアル記載の Vilcek らの方法[3]に基づき実施した。cPCR 装置は Veriti 200 及び MiniAmp Plus Thermal Cycler (Thermo Fisher Scientific) を用いた。

## 2. ペスチウイルスに対する特異性の検証

$10^4 \sim 10^{-1}$ TCID<sub>50</sub>/ml に 10 倍段階希釈した牛ウイルス性下痢ウイルス (BVDV) KZ-91 株を用いた。上記 1 と同様に核酸を抽出し、mrPCR を実施した。

## 3. CSFV 陰性検体に対する特異性の検証

### 1) cPCR で産物が認められなかった検体

病性鑑定時の cPCR で産物が認められず陰性と判定された検体を材料とした。令和 4 年度に 4 農場から採材された血清 6 検体、扁桃、脾臓、腎臓の 10% 乳剤各 2 検体、計 12 検体の核酸抽出物を用いて、上記 1 と同様に mrPCR を実施した。

### 2) cPCR で産物が認められた検体

病性鑑定時の cPCR で図 1 のように陽性対照と類似した産物やラダー状の泳動像が認められ、制限酵素処理により CSFV を否定した検体を材料とした。令和 3~4 年度に 6 農場から採材された 10% 扁桃乳剤 7 検体、10% 脾臓乳剤 3 検体、10% 腎臓乳剤 2 検体、計 12 検体の核酸抽出物を用いて、上記 1 と同様に mrPCR を実施した。

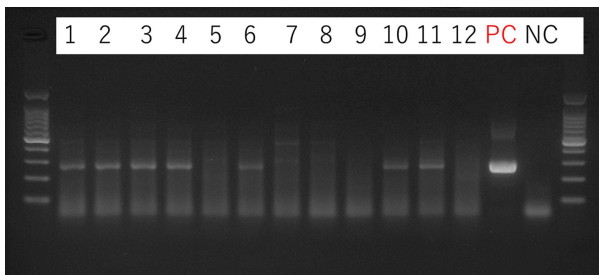


図 1 非特異的な産物が認められた CSFV 陰性検体の cPCR 結果

## 4. 作業時間及び検査費用の比較

当所の病性鑑定時の平均的な採材頭数である解剖豚 3 頭及び同居豚 10 頭と仮定し、mrPCR 及び cPCR にかかる作業時間及び検査費用を比較した。この仮定の場合、検査に供するのは臓器乳剤 9 検体、血清 13 検体の計

22 検体となる。そこに、核酸抽出工程の陰性対照、PCR 反応の陰性対照及び陽性対照を追加した数を検体数とした。よって、mrPCR では 25 検体、cPCR の CSFV では陽性対照が BVDV 培養上清と CSFV 改変 DNA の 2 種類があるため 26 検体、cPCR の ASFV では 25 検体とした。

また、検査費用は使用する試薬の費用のみで算出した。mrPCR 及び CSFV の cPCR は上記 1 と同様の試薬を用い、ASFV の cPCR は当所で病性鑑定時に使用している Premix Ex Taq Hot Start Version(タカラバイオ)を用いた。

## 成績

### 1. CSFV 遺伝子の検出感度の比較

各抽出方法の CSFV 遺伝子検出結果を図 2 及び図 3 に示した。スピнкаラム法で抽出した場合は、mrPCR、cPCR とともに CSFV 遺伝子が  $10^2$ TCID<sub>50</sub>/ml まで検出された (図 2)。また、磁気ビーズ法で抽出した場合は、mrPCR、cPCR とともに  $10^1$ TCID<sub>50</sub>/ml まで検出された (図 3)。

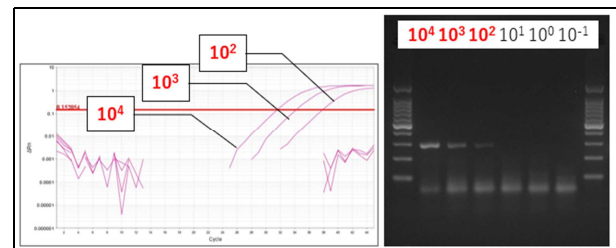


図 2 スピнкаラム法による検出結果

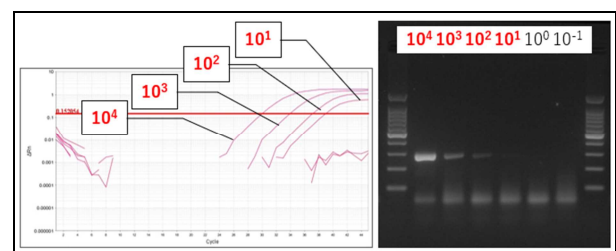


図 3 磁気ビーズ法による検出結果

### 2. ペスチウイルスに対する特異性の検証

各抽出方法の全ての検体で検出限界以下であった。

### 3. CSFV 陰性検体に対する特異性の検証

#### 1) cPCR で産物が認められなかった検体

12 検体全てで CSFV 遺伝子は検出限界以下であり、IC は検出されたため、CSFV 遺伝子陰性と判定された (表 1)。

表1 cPCRで産物が認められなかったCSFV陰性検体のmrPCR結果

No.	検体	mrPCR		cPCR (病性鑑定時)
		CSFV	IC	
1	扁桃	-	+ (23.3)	-
2	脾臓	-	+ (21.8)	-
3	腎臓	-	+ (20.2)	-
4	扁桃	-	+ (24.6)	-
5	脾臓	-	+ (24.7)	-
6	腎臓	-	+ (24.2)	-
7	血清	-	+ (30.7)	-
8	血清	-	+ (29.6)	-
9	血清	-	+ (31.0)	-
10	血清	-	+ (29.2)	-
11	血清	-	+ (27.0)	-
12	血清	-	+ (30.1)	-

※括弧内はCt値

2) cPCRで産物が認められた検体

1)と同様に、12検体全てでCSFV遺伝子は検出限界以下であり、ICは検出されたため、CSFV遺伝子陰性と判定された(表2)。

表2 cPCRで産物が認められたCSFV陰性検体のcPCR結果のmrPCR結果

No.	検体	mrPCR		cPCR (病性鑑定時)
		CSFV	IC	
1	扁桃	-	+ (22.6)	280bp付近のバンド
2	脾臓	-	+ (22.3)	280bp付近のバンド
3	腎臓	-	+ (21.9)	280bp付近のバンド
4	扁桃	-	+ (20.9)	280bp付近のバンド
5	扁桃	-	+ (19.8)	ラダー状
6	扁桃	-	+ (19.8)	ラダー状
7	扁桃	-	+ (21.0)	ラダー状
8	腎臓	-	+ (21.3)	ラダー状
9	脾臓	-	+ (24.9)	280bp付近のバンド
10	扁桃	-	+ (22.6)	280bp付近のバンド
11	扁桃	-	+ (21.4)	280bp付近のバンド
12	脾臓	-	+ (20.8)	280bp付近のバンド

※括弧内はCt値

4. 作業時間及び検査費用の比較

核酸抽出から判定結果のデータ処理までの作業時間は、mrPCRでは約5.5時間、cPCRで

はペスチウイルス陰性の場合には約8.5時間、制限酵素処理まで実施した場合は約12時間であった(表3)。

検査費用については、mrPCRでは1検体分の試薬が1,100円、1検査分の陽性対照が440円のため、1,100円×25検体+440円となり、計27,940円であった。一方、cPCRでは1検体分のCSFV試薬が550円、ASFV試薬が120円のため、550円×26検体+120円×25検体となり、計17,300円であった。

表3 検査時間の比較

工程	時間	
	mrPCR	cPCR
核酸抽出	3hr	3hr
PCR試薬調製	0.5hr	0.5hr
CSFV RT-PCR		2hr
ASFV PCR	1hr	(1hr)
CSFV 泳動	-	1hr
ASFV 泳動	-	1hr
判定, データ処理	1hr	1hr
計	約5.5hr	約8.5hr
制限酵素処理	-	約3.5hr
計	-	約12hr

※ASFV PCRはCSFV RT-PCRの反応中に実施

考 察

CSFV遺伝子の検出感度の比較では、核酸抽出方法に関わらずcPCRと同じ希釈倍率までCSFV遺伝子が検出されたため、mrPCRとcPCRの検出感度は同等であると考えられた。

CSFVと同じペスチウイルス属であるBVDV遺伝子はmrPCRでは検出されなかった。さらに、cPCRで産物が認められなかったCSFV陰性検体、cPCRで由来不明の増幅産物が認められたCSFV陰性検体のいずれもmrPCRでは検出されなかった。そのため、mrPCRのCSFV遺伝子に対する特異性は高く、過去の病性鑑定時に認められた非特異的な反応がmrPCRでは減少する可能性が考えられた。

また、mrPCRはcPCRと比較して作業時間が大幅に短縮され、検査費用はやや高額になるものの、予算の範囲内で運用可能であった。

従来法のcPCRではウイルスごとに遺伝子検査を実施する必要があったが、今回検証に

使用した mrPCR の検査キットでは、CSFV 及び ASFV 遺伝子、IC が同時に検出可能であり、増幅産物の電気泳動を行う必要がない。そのため、cPCR と比較して、作業工程の簡素化、IC の検出による試験成立の担保、増幅産物によるコンタミネーションのリスク低下が利点として挙げられる。当所では飼養豚の病性鑑定に迅速に対応するため、CSFV 及び ASFV の遺伝子検査を課員全員が実施できる体制を整えている。しかし、日常の業務では遺伝子検査を実施していない職員もいるため、作業工程の簡素化により遺伝子検査に不慣れな職員の負担を減らし、作業中のミスも減少できると考えられた。

以上より、当所で実施した mrPCR の検証結果は従来法の cPCR と遜色ない結果であり、飼養豚の病性鑑定に mrPCR を導入することで、検査精度を保ち、作業時間の短縮や作業ミスの減少等が期待されると考えられた。

#### 参考文献

- [1] 農林水産省：豚熱に関する特定家畜伝染病防疫指針別紙1「豚熱の診断マニュアル」
- [2] Nishi T, Okadera K, Fukai K, Yoshizaki M, Nakasuji A, Yoneyama S, Kokuho T: Establishment of a Direct PCR Assay for Simultaneous Differential Diagnosis of African Swine Fever and Classical Swine Fever Using Crude Tissue Samples, *Viruses*, 14, 498 (2022), (DOI:10.3390/v1403049)
- [3] Vilcek S, Herring AJ, Herring JA, Nettleton PF, Lowings JP, Paton DJ: Pestiviruses isolated from pigs, cattle and sheep can be allocated into at least three genogroups using polymerase chain reaction and restriction endonuclease analysis, *Arch Virol*, 136, 309-323 (1994)

## 8 過去5年間に県内で分離された *Mannheimia haemolytica* の薬剤感受性調査

中部家畜保健衛生所  
○杉本 郁子

### 要 約

牛呼吸器病はウイルスや細菌等の病原体の感染や輸送等のストレス感作により発生し、*Mannheimia haemolytica* (Mh)は主要な病原細菌の一つとされる。牛呼吸器病の治療は治療歴等を考慮した上で初期治療が実施される場合が多く、薬剤感受性動向は治療薬選択の一助となるが、県内の実態は不明であった。また *Mannheimia* 属菌は近年新菌種が登録されており、過去に Mh と同定されていた株の中には新菌種が含まれている可能性がある。そこで今回、近年分離された Mh の再同定を行い、薬剤感受性、薬剤耐性関連遺伝子の保有状況及び薬剤使用状況を調査した。

材料は 2019～2023 年に分離された Mh21 株を用い、遺伝子検査により再同定を実施後、10 薬剤の薬剤感受性試験、主要薬剤耐性遺伝子及び ICE 関連遺伝子の検出を実施した。また 2018～2023 年の牛呼吸器病 13 症例の治療歴を調査した。

再同定の結果、19 株が Mh、2 株が *M. pernigra* と同定された。Mh の血清型は 1 型、2 型のみで、多剤耐性傾向と報告がある 6 型の浸潤は確認されなかった。薬剤感受性試験の結果、多くの株では NA (耐性率 52.6%) を除いた薬剤で感受性を維持していた。一方 4 株は 5、6 薬剤耐性株で、薬剤耐性遺伝子を複数保有しており、これらの株について SM、KM、TC 及び ST 耐性と耐性遺伝子保有に関連性が確認された。またこの内 1 株は ICE 関連遺伝子を全て保有し、耐性遺伝子が水平伝播する可能性が考えられた。また治療薬としてフルオロキノロン系薬剤が多く使用される傾向にあることが確認されたことや NA 耐性率が高かったことから、フルオロキノロン系耐性株の出現が危惧された。以上のことから、現状では Mh に対する薬剤治療では多くの場合で効果が期待できると考えられたが、二次選択薬の慎重使用の啓発が求められる。

### はじめに

牛呼吸器病はウイルスや細菌等の病原体の感染と輸送等のストレス感作による免疫状態の低下により発生し、主要な病原細菌の一つとされているのは *Mannheimia haemolytica* (Mh) である。*Mannheimia* 属菌は近年新しい菌種が登録され、現在 9 菌種存在する。このため過去に生化学性状検査の結果から Mh と同定されていた株の中には他の *Mannheimia* 属菌種が含まれている可能性があり、遺伝子検査による同定を実施する必要がある。*Mannheimia* 属菌の中でも菌種により病原性が異なることから、病性鑑定時には正確な同定を実施することが重要である。また Mh は近年特に血清型 6 型で多剤耐性傾向が確認されている [1]。薬剤耐性機構には薬剤の過剰投与により生じるとされるキノロン耐性に代

表される染色体の突然変異やプラスミド等による薬剤耐性遺伝子の獲得があるが、近年パスツレラ科細菌では ICE (integrative conjugative element) と呼ばれる染色体上に存在する可動性遺伝子の関与も報告されている [2]。ICE 配列内には多くの場合で複数の薬剤耐性遺伝子や重金属耐性遺伝子が含まれており [2, 3]、ICE は Mh と *Pasteurella multocida* 等の細菌間で転移し、1 回の水平伝播で多剤耐性獲得を可能にさせるとの報告がある [2, 4]。

呼吸器病の治療には、過去の治療歴から初期治療が実施されることが多く、適切な治療薬の選択が求められる。しかしながら県内の Mh における薬剤耐性動向は不明であった。そこで今回治療薬選択の一助とするため、過去 5 年間に県内で分離された Mh の再同定を行い、

薬剤感受性を調査した。さらに薬剤耐性形質の水平伝播に関与するとされる主要な薬剤耐性遺伝子及び ICE 関連遺伝子の保有状況を調査した。

### 材料と方法

材料として、2019～2023年に呼吸器症状を呈し病性鑑定を実施した牛の肺由来3株及び鼻腔スワブ由来18株から分離されたMh21株（乳用牛5農場、肉用牛5農場）を用いた。

#### 1) Mhの再同定及び血清型別

##### a. 再同定

-80℃保存していたMhを羊血液寒天培地で一晚培養し、アルカリボイル法にてDNA抽出を行った。Alexanderらの方法[5]に基づき菌種同定PCR法を実施した。菌種同定PCR法の結果、同定不能だった株はエスクリン(ESC)、アラビノース(ARA)、ソルビトール(SOR)、キシリトール(XYL)及びマルトース(MLT)について生化学性状検査を追加で行い、さらに16S rRNA遺伝子領域の塩基配列全長を解読し、EzBioCloudにて基準株と照合した。

##### b. 血清型別

Mhの血清型別にはKlimaらの方法[6]に基づき血清型別PCR法を用いた。

#### 2) 薬剤感受性試験

Mhと同定された株を用い、薬剤感受性試験は臨床検査標準委員会(CLSI)に準拠した一濃度ディスク拡散法により、アンピシリン(ABPC)、セファゾリン(CEZ)、ストレプトマイシン(SM)、カナマイシン(KM)、フロルフェニコール(FFC)、テトラサイクリン(TC)、ST合剤(ST)、ナリジクス酸(NA)、エンロフロキサシン(ERFX)及びホスホマイシン(FOM)について薬剤感受性を判定した。精度管理株として*Escherichia coli* ATCC 25922を用いた。ブレイクポイントはCLSI、欧州抗微生物薬剤感受性試験委員会(EUCAST)及び農林水産省動物医薬品検査所により公表されている基準値に従った。

また血清型別の薬剤耐性率についてFisherの正確確率検定を用いて有意差検定を実施した。

#### 3) 薬剤耐性関連遺伝子の保有状況

##### a. 薬剤耐性遺伝子の検出

薬剤耐性遺伝子について *bla<sub>ROB-1</sub>* 遺伝子(ABPC耐性)、*aadB*、*strA*、*strB*、*aphA-1* 遺伝子(アミノグリコシド系耐性)、*floR* 遺伝子

(FFC耐性)、*catAIII* 遺伝子(クロラムフェニコール(CP)耐性)、*tet(H)*、*tetR* 遺伝子(TC耐性)、*sul2* 遺伝子(サルファ剤(SUL)耐性)の検出を実施した(表1)。

表1 薬剤耐性遺伝子

薬剤	耐性遺伝子	出典
ABPC	<i>bla<sub>ROB-1</sub></i>	[2]
SM	<i>strA</i> ・ <i>strB</i>	[2]
GM	<i>aadB</i>	[2]
NEO	<i>aphA-1</i>	[2]
CP	<i>catAIII</i>	[7]
CP/FFC	<i>floR</i>	[8]
TC	<i>tet(H)</i>	[2]
	<i>tetR</i>	[2]
SUL	<i>sul2</i>	[2]

##### b. ICE関連遺伝子の検出

薬剤耐性の水平伝播に関与するとされるICEについてBerkerらの方法[9]に基づき*parB*、*ICE-re11*、*int1*、*int2* 遺伝子の保有状況を調査した。

#### 4) 薬剤使用状況調査

2018～2023年の牛呼吸器病の病性鑑定調書から13症例について治療歴を調査し、治療薬の薬剤系統ごとに集計を行った。

## 成績

#### 1) Mhの再同定及び血清型別

##### a. 再同定

菌種同定PCRの結果、19株がMhと同定され、2株が同定不能となった。この2株については生化学性状のみでは同定に至らなかったが(表2)、16S rRNA遺伝子塩基配列解析の結果、2株とも*Mannheimia pernigra*(Mp)(相同性99.85、100%)と同定された。なお、Mpと同定された2株は今回の試験の対象外とした。

表2 生化学性状検査

	溶血性	ESC	ARA	SOR	XYL	MLT
供試株	—	—	+	+	+	+
Mh	+	—	—	+	+	+
Mg	—	+	—	±	d	d
Mr	—	—	—	—	不明	不明
Mp	w+	不明	—	d	—	d

Mg: *M. granulomatis*, Mr: *M. ruminalis*

b. 血清型別

血清型別では8株（肺由来2株、鼻腔スワブ由来6株）が1型、11株（肺由来1株、鼻腔スワブ由来10株）が2型と判定された。

2) 薬剤感受性試験

薬剤耐性率は高い順に NA : 52.6%、SM、KM 及び TC : 21.1%、ST : 15.8%、ABPC : 5.3% となり、その他薬剤に対しては全ての株が感受性を示した。耐性パターンは3パターンとなり（表3）、NAのみに耐性を示した株が6株、多剤耐性株が4株であった。また供試した全ての薬剤に対し感受性を示した株が9株であった。

血清型1型と2型の薬剤耐性率を比較すると、NAについては血清型1型の耐性率が87.5%となり、血清型間で有意差が認められた ( $p < 0.05$ ) (図1)。

表3 耐性パターン

耐性パターン	株数	血清型
A ABPC・KM・SM・NA・TC・ST	1	1
B KM・SM・NA・TC・ST	3*	2
C NA	6	1

※同一農場の別個体由来株

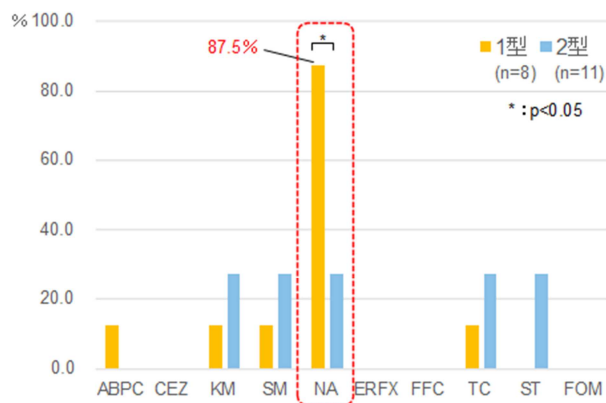


図1 血清型別の薬剤耐性率

3) 薬剤耐性関連遺伝子の保有状況

a. 薬剤耐性遺伝子の検出

薬剤耐性遺伝子を保有していたのは、耐性パターン A、B の4株で、ABPC耐性株では関連する薬剤耐性遺伝子は検出されなかったが、SM、KM、TC 及び ST耐性株は関連する薬剤耐性遺伝子を保有していた（表4）。

表4 薬剤耐性遺伝子保有状況

耐性パターン	ABPC	KM・SM				CP	FFC	TC		SUL
	<i>bla<sub>ROB</sub>-1</i>	<i>strA</i>	<i>strB</i>	<i>aadB</i>	<i>aphA<sub>-1</sub></i>	<i>catA<sub>III</sub></i>	<i>floR</i>	<i>tef(H)</i>	<i>tetR</i>	<i>su12</i>
A ABPC・KM・SM・NA・TC・ST	-	+	+	-	+	-	-	+	+	+
B KM・SM・NA・TC・ST	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+

b. ICE 関連遺伝子の検出

多剤耐性株4株はICE関連遺伝子を3又は4遺伝子保有していた（表5）。耐性パターンAの1株はICE関連遺伝子を全て保有していた。

表5 多剤耐性株のICE関連遺伝子保有状況

耐性パターン	ICE関連遺伝子			
	<i>parB</i>	<i>ICE-rel1</i>	<i>int1</i>	<i>int2</i>
A ABPC・KM・SM・NA・TC・ST	+	+	+	+
B KM・SM・NA・TC・ST	-	+	+	+

4) 薬剤使用状況調査

呼吸器病の治療薬にはフルオロキノロン (FQ)系薬剤、フロルフェニコール系薬剤及びマクロライド系薬剤が多く使用される傾向にあった（表6）。

表6 薬剤使用状況調査

農場	ペニシリン系	セファロスポリン系	アミノグリコシド系	テトラサイクリン系	マクロライド系	フロルフェニコール系	フルオロキノロン系
A	●	●					
B			●			●	
C			●	●	●		
D			●	●	●		
E		●				●	
F							
G							●
H	●	●			●		
D				●			●
I	●				●	●	●
J							●
I						●	●
D				●	●	●	●
合計	3	3	2	4	5	5	6

考 察

今回 Mh の再同定を実施したところ Mp と同定された株が確認された。Mp は 2021 年に登録された菌種で、報告例が少なく病原性等の詳細は不明である [10]。Mannheimia 属菌でも菌種により病原性が異なることから、分離菌の正確な同定をすることで病態の把握の一助

になり、分離菌が新菌種であった場合には病原性等の解明に貢献できると考えられた。

次に Mh の血清型別の結果、本県の実験株は血清型 1 型及び 2 型のみであった。血清型 2 型は健康牛からも分離され、1 型に比較して病原性が低いとされている [11]。Katsuda らは国内の牛呼吸器病由来 Mh の血清型分離割合は 1 型 42.9%、6 型 36.5%、2 型 14.4% と報告している [1] が、今回の調査では血清型 2 型の分離割合が高かった。このことは解剖未実施で鼻腔スワブのみ採材した症例からの分離が多数を占めていたため、分離された Mh が呼吸器症状に関与していたのか不明なものが含まれていると考えられた。

Mh の薬剤耐性率は全国的なモニタリング調査である動物由来薬剤耐性菌モニタリング (JVARM) の調査結果 [12] と比較して低い傾向にあり、NA のみに耐性を示した株と全薬剤に感受性を示した株を合わせると 15/19 株となり、多くの株が供試した薬剤に対して感受性を維持していることが確認できた。また薬剤使用状況調査の結果から、呼吸器病の治療薬として使用される傾向にある薬剤に対しても、Mh に対する治療では多くの場合で効果が期待されると考えられた。しかしながら、キノロン系薬剤については、ERFX 耐性株は確認されなかったが、NA 耐性率が 52.6% で、このうち血清型 1 型の NA 耐性率は 87.5% と高いことが分かった。薬剤使用状況調査の結果からも、治療薬として FQ 系薬剤が使用される傾向にあり、国内でも肉用牛の FQ 系薬剤の販売量は増加していると報告されていることから [12]、今後 FQ 系耐性株の出現が危惧された。

また、近年増加傾向で多剤耐性傾向と報告がある血清型 6 型 [1] の浸潤は確認されなかったが、血清型 1 型、2 型ともに多剤耐性株が確認された。多剤耐性 4 株は複数の薬剤耐性遺伝子を保有しており、アミノグリコシド系、TC 及び ST については薬剤耐性と薬剤耐性遺伝子の保有に関連があることが確認された。このうち ABPC 耐性株については薬剤耐性遺伝子の同定には至らず、この株の ABPC 耐性獲得の要因には薬剤耐性遺伝子以外の要因がある可能性が考えられた。また多剤耐性 4 株は ICE 関連遺伝子を保有しており、耐性パターン A 株は ICE の組み込みと維持に必要とされる ICE 関連遺伝子を全て保有していた。

ICE 配列内には薬剤耐性遺伝子を保有することが多いとされ [2]、Clawson らは Mh の一部の遺伝子系統で、保有する ICEPmu1 又は ICEMh1 配列内に薬剤耐性遺伝子である *strA*、*strB*、*aphA-1*、*sul2* 遺伝子が連鎖して存在し、さらに同時に *tet(H)* 遺伝子も存在することを報告している [13]。耐性パターン A の株は Clawson らの報告と同様に *strA*、*strB*、*aphA-1*、*sul2*、*tet(H)* 遺伝子を保有していた。この株の ICE 配列内に薬剤耐性遺伝子が存在するのことは未解析のため不明だが、ICE 配列内に薬剤耐性遺伝子が組み込まれていたと仮定すると、隣接する菌へ ICE により同時に複数の薬剤耐性遺伝子の水平伝播が生じ、多剤耐性株が出現する可能性も考えられる。

今回の調査では現状 Mh に対する薬剤治療では多くの場合で効果が期待できると考えられた。しかしながら、今後も FQ 系薬剤を多用すれば耐性株の出現が危惧されるため、二次選択薬の慎重使用が求められる。また多剤耐性株の出現も含めて定期的な調査の継続が必要と考えられた。

## 謝 辞

16S rRNA 遺伝子塩基配列解析を実施していただいた国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究部門の上野勇一先生に深謝いたします。

## 参考文献

- [1] Katsuda K, Kohmoto M, Mikami O: Relationship between serotype and the antimicrobial susceptibility of *Mannheimia haemolytica* isolates collected between 1991 and 2010, Res Vet Sci, 94, 205-208 (2013)
- [2] Klima CL, Zaheer R, Cook RC, Booker CW, Hendrick S, Alexander TW, McAllister TA: Pathogens of Bovine Respiratory Disease in North American Feedlots Conferring Multidrug Resistance via Integrative Conjugative Elements, J Clin Microbiol, 52, 438-448 (2014)
- [3] Wozniack RAF, Waldor MK: Integrative and conjugative elements: mosaic mobile genetic elements enabling dynamic lateral gene flow, Nat Rev Microbiol, 8, 552-563 (2010)



- [4] Eidam C, Poehlein A, Leimbach A, Michael GB, Kadlec K, Liesegang H, Daniel R, Sweeney MT, Murray RW, Watts JL, Schwarz S: Analysis and comparative genomics of ICE<sub>Mh1</sub>, a novel integrative and conjugative element (ICE) of *Mannheimia haemolytica*, 70, 93-97 (2015)
- [5] Alexander TW, Cook SR, Yanke LJ, Booker CW, Morley PS, Read RR, Gow SP, McAllister TA: A multiplex polymerase chain reaction assay for the identification of *Mannheimia haemolytica*, *Mannheimia glucosida* and *Mannheimia ruminalis*, Vet Microbiol, 130, 165-175 (2008)
- [6] Klima CL, Zaheer R, Briggs RE, McAllister TA: A multiplex PCR assay for molecular capsular serotyping of *Mannheimia haemolytica* serotypes 1, 2, and 6, J Microbiol, 139, 155-160 (2017)
- [7] Kehrenberg C, Schwarz S: Occurrence and linkage of genes coding for resistance to sulfonamides, streptomycin and chloramphenicol in bacteria of the genera *Pasteurella* and *Mannheimia*, FEMS Microbiol Lett, 205, 283-290 (2001)
- [8] Vu-Khac H, Trinh TTH, Nguyen TTG, Nguyen XT, Nguyen TT: Prevalence of virulence factor, antibiotic resistance, and serotype genes of *Pasteurella multocida* strains isolated from pigs in Vietnam, Vet World, 13, 896-904 (2020)
- [9] Beker M, Rose S, Lykkebo CA, Douthwaite S: Integrative and Conjugative Elements (ICEs) in Pasteurellaceae Species and Their Detection by Multiplex PCR, Front, 9, 1329 (2018)
- [10] Blackall PJ, Angen Ø, Fegan N, Blackall LL, Mutters R, Bisgaard M: Characterisation of a novel *Mannheimia* sp from Australian feedlot cattle, Vet J, 79, 634-639 (2001)
- [11] Singh K, Ritchey JW, Confer AW: *Mannheimia haemolytica*: Bacterial-Host Interactions in Bovine Pneumonia, Vet Pathol, 48, 338-348 (2011)
- [12] 農林水産省動物医薬品検査所：2020年度（令和2年度）JVARM（動物由来薬剤耐性菌モニタリング）年次報告書
- [13] Clawson ML, Murray RW, Sweeney MT, Apley MD, DeDonder KD, Capik SF, Larson RL, Lubbers BV, White BJ, Kalbfleisch TS, Schuller G, Dickey GA, Harhay GP, Heaton MP, Chitko-McKown CG, Brichta-Harhay DM, Bono JL, Smith TPL: Genomic signatures of *Mannheimia haemolytica* that associate with the lungs of cattle with respiratory disease, an integrative conjugative element, and antibiotic resistance genes, BMC Genom, 17, 982 (2016)

## 9 3D 画像による牛の体重・自動計測システムの開発

畜産技術研究所<sup>1)</sup>、農林環境専門職大学短期大学部<sup>2)</sup>  
○橘川 学<sup>1)</sup>、瀬戸 隆弘<sup>2)</sup>

### 要 約

当所では、平成 27～29 年度に実施した新成長戦略研究課題「センシング技術の集積による未来志向・酪農管理モデルの構築」において 3D 画像データを活用した牛の体重推定と疾病予測に取り組み、成果の実用化に向け一般研究課題「3D 画像による牛の体重・自動計測システムの開発」(H30-R3)を実施した。研究開始時は 3D グラフィック画像からパソコン上で体重を推定する技術の開発を行ったが、研究計画の見直しを行い、深度画像から 3 つの AI を用いて体重を推定するスマートフォンアプリを作成している。本技術を利用することで、安全に、正確な体重が分かるようになるため、牛の体調管理が容易になり、牛を健康に飼育することが可能となる。

### はじめに

牛の体重は、個体管理において重要な要素である。乳牛では泌乳と妊娠で日常的に多くのエネルギーを消費しており、当所の研究では、分娩 4 週前から 3 週前に体重が 3% 以上減少した個体はケトosis等の周産期疾病の発症率が高くなる[1]ことが分かっている。また、過肥になると受胎率の低下<sup>[2]</sup>や周産期疾病の増加が懸念される。

牛の体重測定には体重計や推定尺が利用されるが、測定作業は危険を伴う重労働であり、牛に大きなストレスを与えるため、定期的に搾乳牛の体重測定を行っている農家は少ない。また、乳牛の過肥や消瘦具合を把握するために体型をスコア化する BCS (Body Condition Score) が活用されているが、主観性が高く測定者により評価に差が出てしまい、正確性に欠けるという欠点がある。

そこで、乳牛の体重を安全かつ簡単に計測する方法の 1 つとして、3D 画像を用いた体重計測技術の開発に取り組んだ。

### 3D 画像モデルを用いた牛の体重推定

本研究は、平成 27～29 年度に実施した新成長戦略研究課題「センシング技術の集積による未来志向・酪農管理モデルの構築」の成果の実用化を目的とした継続研究である。

新成長戦略研究課題では、分娩検知・疾病制御・自給飼料増産の 3 部門にセンシング技

術を導入することで、酪農の省力化とコスト削減を図ることを目的とした。本研究は、疾病制御の細目課題である「3D 画像モデルを用いた牛の体重推定」の継続研究となる。

3D 画像モデルを用いた牛の体重推定では、牛の後駆の 3D 画像から体重を推定する回帰式を、下記のとおり作成した。

$$\text{体重} = 427.1 + 1.308 \times 10^{-6} \times \text{腰角間} \times (\text{腰角間} - \text{坐骨間}) \times (\text{腰角間} + \text{坐骨間})$$

推定された牛の体重と実測値は、高い相関 ( $r=0.87$ ) を示した (図 1)。また、分娩 4～3 週前にかけて推定体重が 3% 以上減少した牛は、周産期疾患の発症率が高く (図 2)、本技術により周産期疾病の発生予測が可能であることが分かった。

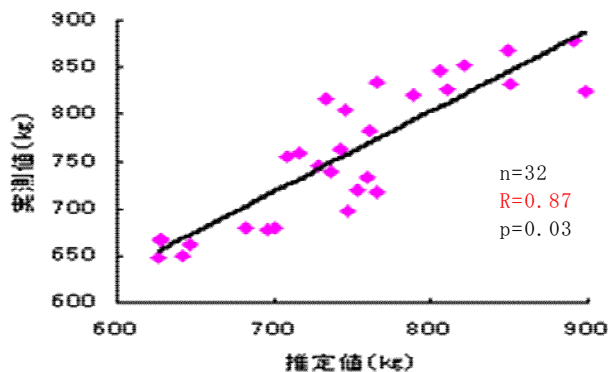


図 1 乳牛の体重推定相関図

周産期疾患の発症率	
減少率3%未満	0%(0/5)*
減少率3%以上	75%(3/4)*

\*:P<0.05

表2 推定体重減少率と周産期疾患発症率

一方で、撮影及び画像処理の方法に問題点が残った。撮影は、先端に3Dカメラをつけた棒を持って行う必要があり(図3)、一般の酪農場で実施することが困難である。また、画像処理をパソコン上で手作業で行っていたため(図4)、1頭あたり1時間程度の作業時間を要した。

このことから、酪農学園大学と共同で、3D画像の撮影及び解析を自動化する技術を開発することとし、成果の実用化に向け一般研究課題「3D画像による牛の体重・自動計測システムの開発」(H30-R3)を実施した。

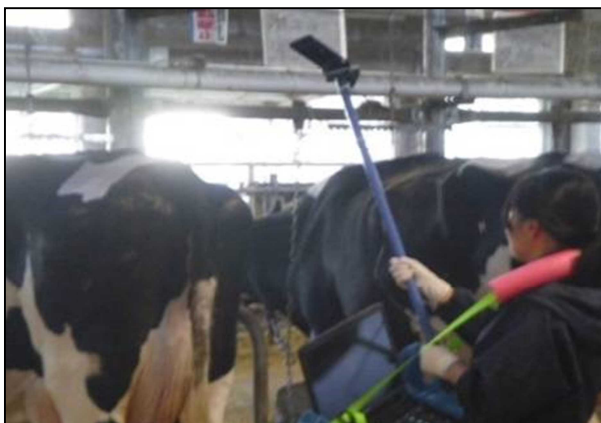


図3 撮影の様子

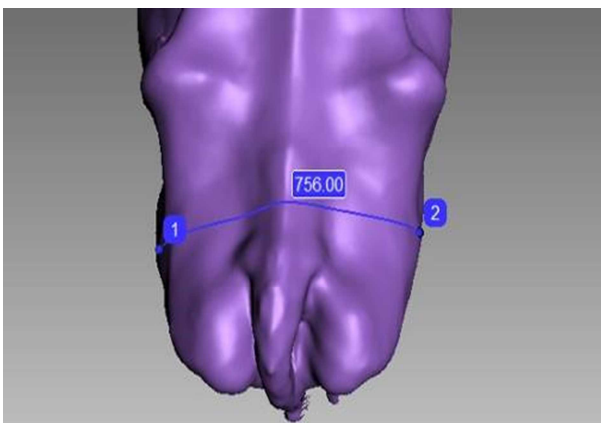


図4 手動による画像処理

### 牛の3D画像自動撮影装置の開発

牛舎通路の上方に3Dカメラ(kinect2、Microsoft社製)を設置し、通過する牛を自動で撮影、パソコンにデータを転送するシステムを構築した(図5、図6)。

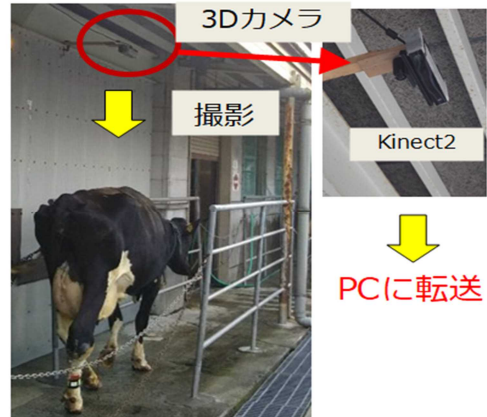
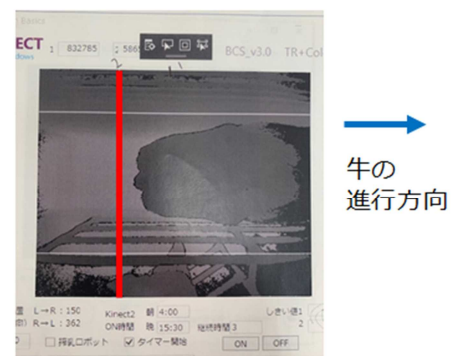


図5 自動撮影装置の外観



撮影ソフトの画面(抜粋)

図6 自動撮影の仕組み

また、自動撮影した牛の3D画像から前処理プログラムを作成(python3.6を使用)し、6つの手順((1)3D画像から牛の切り抜き、(2)画像圧縮、(3)ネガポジ変換、(4)サイズ変換、(5)ノイズ除去、(6)フィルタ処理)を、1頭あたり5秒程度で行うことが可能となった(図7)。

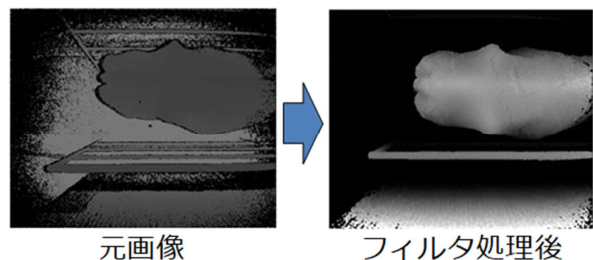


図7 前処理プログラム

しかし、この時点で2点のトラブルが発生した。1点目は、使用していた3Dカメラであるkinect2の販売中止である。このため、撮影装置の変更とシステムの再構築が必要となった。2点目は共同研究機関である酪農学園大学農業施設学研究室の廃止である。これにより、当所単独で開発を行うこととなった。

このことから、当所で実施可能な研究計画に見直しを行い、研究期間を当初の計画から1年間延長（R3年度まで）して開発に取り組むこととした。

### 研究計画の見直し

システムは、iOS搭載スマートフォン（iPhone、Apple社製）の標準機能である深度撮影機能を使用した。これにより、開発期間の短縮とシステム更新の簡略化が可能となった。

撮影から体重計測までの過程は全てスマートフォン内で行い、前処理と体重計測用人工知能（以下、AI）は、ディープラーニング（以下、深層学習）を用いて作成することとした。AIの開発には、深度撮影が可能な3Dカメラ（REALSENSE、Intel社製）を用い、REALSENSEで撮影した画像を教師データとした深層学習をパソコン上で行った。

AIによる体重推定は、牛の左後ろ側から撮影した深度画像から、3つのAIにより体重を推定する（図8）。1つ目のAIは、牛の位置を特定するため向きの判定を行う。2つ目のAIは、体重の推定の妨げとなる背景を削除する。3つ目のAIは、牛の3D画像から体重を推定する。

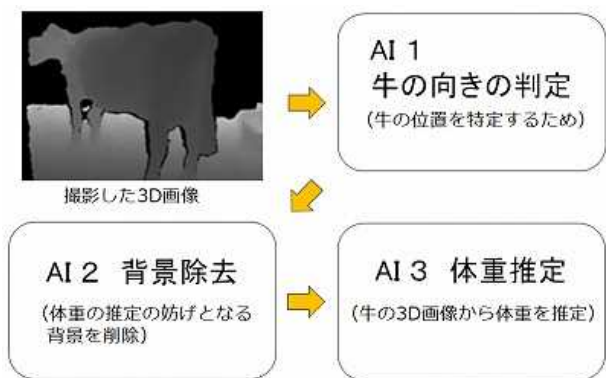


図8 AIによる体重推定のメカニズム

### iPhoneアプリの構築

当所が所有する搾乳牛の3D画像データ累計20,000枚を用いて、AIを作成した。また、近隣農場の搾乳牛1,000頭（8,600枚）の画像データを用いて、AIの再学習と精度の検証を行った。この結果、AIの精度は絶対誤差4.8%であり、体重実測値の±50kgの範囲に84.1%が入った。これは、市販されている豚用の体重推定装置と同等の精度を示しており、AIは実用可能と考えられた。

このため、共同研究機関の(株)テクノサイトに依頼して、同AIを利用するアプリの開発を開始した。

最初に試作したアプリは、牛の体重の推定ができなかった。この原因として、REALSENSEとiPhoneカメラの画像情報が異なるため、AIがiPhoneの画像を対象データとして認識しなかったことが考えられた。このことから、iPhoneで近隣農場の搾乳牛1,000頭（5,000枚）の画像を撮影し、推定尺を用いて体重を測定し、これを教師データとして、AIを再構築した。再構築したAIでiPhoneアプリを試作（図9）したところ、牛の体重の推定が可能となった。

一方で体重の推定精度は、600~750kgの牛では誤差±50kgの範囲であったが、それ以外の牛ではばらつきが目立った（図10）。この原因として、教師データが少ない体重域にばらつきが出たと考えられたため、教師データに重み付けを行い、AIを改良している。



図9 試作した体重推定アプリ

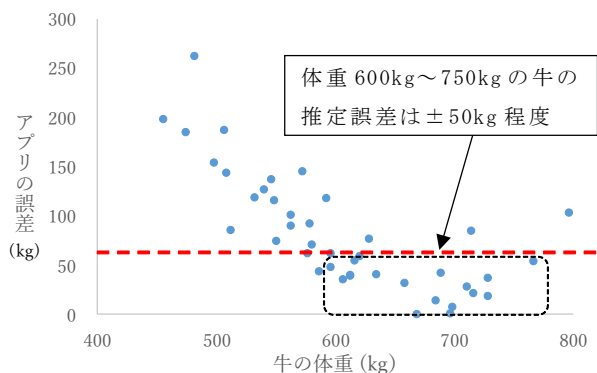


図 1 0 試作アプリの推定精度

### 考 察

本研究の成果の実用化により、安全かつ正確に牛の体重測定を行うことが可能となる。体重計や推定尺を用いた牛の体重測定は、危険を伴う重労働であったが、本アプリでは牛に触れずに体重を測定できるため、牛にストレスがかからず、作業者の安全が確保される。

牛の目視での体重推定は熟練が必要であったが、本アプリを利用することで、畜産未経験者でも簡単に牛の体重が計測できるようになるため、農場での適切な飼料給与量の設定が可能となる。

また、牛の治療時に本アプリを利用することで、体重に応じた投薬量の設定に有用であり、治療薬の過剰投与の防止が期待される。

本研究の目標として、令和 6 年度中頃にアプリの販売を目指す。このアプリを利用することで、牛の体調管理が容易になり、牛を健康に飼育することが可能となる。

### 参考文献

- [1] 曾布川亜弓、瀬戸隆弘、赤松裕久. 2018. 3D 画像を用いた乳牛の体重推定と周産期疾患との関連性. 静岡県畜産技術研究所研究報. 11. 4-6
- [2] S. Abe, M. Uematsu, H. Saitoh D. Watanabe. 2004. 乳牛のボディコンディションスコアの変化と繁殖成績. 家畜臨床誌. 27 (2). 46-50

# 新しいブタ用アイソレーターの特長と無菌マイクロミニピッグの解剖学的評価

畜産技術研究所中小家畜研究センター  
○大竹 正剛

## 要 約

ブタは解剖学・生理学的特徴が人に近く外挿性が高いとのことから動物実験での利用数が増えてきており、近年は異種移植用の組織や臓器を目的でも利用が期待されている。平成 28 年に改定された異種移植に関する衛生指針ではドナー動物の衛生水準にアイソレーターを用いることが明記されたことから、今後ブタ用アイソレーターが求められることが予想される。ブタ用アイソレーターは市販されているが、先端医療産業に用いるには、「長期飼育」「作業省力化」「動物福祉に準拠」に課題があった。そこで本研究では、これら課題を解決したアイソレーターを新たに開発するとともに、マイクロミニピッグの無菌環境下での飼育を 13 ヶ月齢まで試みた。アイソレーターは 3 種類(蘇生・若齢飼育・長期飼育)試作し、2%過酢酸溶液で滅菌した。妊娠マイクロミニピッグを妊娠 110 日目に子宮切断法にて蘇生アイソレーター内で子宮から子豚を無菌的に娩出させ、若齢飼育及び長期飼育アイソレーターにて滅菌した飼料と水で 13 ヶ月齢まで飼育した。無菌評価では試験期間を通じて菌は検出されなかった。13 ヶ月齢の無菌マイクロミニピッグは、体重がやや低値を示したものの体格および実質臓器重量は同等であり、正常に成長したと考えられた。一方、消化管は盲腸および結腸で顕著に大きくなる傾向が認められ、組織学的検索ではこれら消化管の粘膜下組織の菲薄化が認められた。以上から、長期飼育ブタ用アイソレーターを開発し、無菌的にマイクロミニピッグを 13 ヶ月齢まで飼育することに成功した。

## はじめに

ブタは解剖学的、生理学的に人と類似していることから外挿性が高い動物種とされ、近年では医薬品・医療機器評価等の実験動物分野でイヌやサルよりも使用頭数が増えている[1]。近年ではブタの新しい用途として、再生医療や異種移植用の臓器や組織として期待されている。これまでも異種移植では豚が使われた歴史があったが、最近アメリカで遺伝子改変ブタの心臓の移植例が報告されてきた[2]。国内では、これまで異種移植は衛生レベルとしても認められなかったが、国際異種移植学会のステートメントを受けて平成 28 年に「異種移植に関する衛生指針」を改訂し、ドナー動物の衛生水準について 85 項目の指定病原体やアイソレーターの使用が明記された[3]。今後異種移植におけるブタの利用が活発化されることが期待される。

このため、今後先端医療等の産業用にブタの供給が必要となると予想されるが、市販されているブタのアイソレーターは「長期飼育」「作業の省力化」「動物福祉に準拠」に課題があり、長期の無菌ブタ飼育管理技術の確立が必要である。さらに無菌ブタの基礎情報も乏しいことから基礎情報の収集も重要である。そこで本研究では、

産業用を目的とした上記 3 点を考慮したアイソレーターを新たに開発し、長期飼育したブタの解剖学的性状を明らかにすることとした。

## 材料と方法

### 1) ブタ用アイソレーターの製作

ブタ用アイソレーターは発育ステージごとに 3 種類製作した(図 1)。蘇生アイソレーターは、硬質塩化ビニル製で薬液槽を具備し無菌的に子ブタを蘇生できる構造とした。若齢飼育アイソレーターは、硬質塩化ビニル製で加温機能を有する構造とした。長期飼育アイソレーターは、ケージ(飼育面積 1.44 m<sup>2</sup>)を載せた基台を軟質ビニルで被覆した構造とし、動物の観察が容易で給餌給水作業が簡便な仕組みとした。

### 2) アイソレーターおよび資材の滅菌

アイソレーターは、過酢酸製剤または亜塩素酸製剤を用いて滅菌した。飼育に必要な資材はエチレンオキシドガスと亜塩素酸製剤を用いて滅菌し、飼料は $\gamma$ 線滅菌(50kGy)および飲用水は高圧蒸気滅菌(127°C 120 分)し、飼育試験に供した。資材は、ステリルロックを介して過酢酸製剤または亜塩素酸製剤を用いて滅菌して導入した。

### 3) 無菌ブタの作出と評価

ブタはマイクロミニピッグ[4]を用いた。交配後110日目のメスマイクロミニピッグのけん部を切開して子宮を露出・切断し、蘇生アイソレーター内に薬液槽を通して導入した後、アイソレーター内で子豚を娩出させた。2.5か月齢まで若齢飼育アイソレーターにて飼育し、その後13か月齢まで長期飼育アイソレーターにて飼育した(無菌区)。なお、給餌プログラムは通常環境下と同様に図2のとおりとした。またアイソレーター内には玩具(ステンレスチェーン)も導入した。ブタは13か月齢到達時に安楽死させ、体重、体格、臓器重量および組織学的検索を行った。組織学的検索においては、10%ホルマリンにて固定後、薄切標本作製しヘマトキシリン・エオジン染色を行い顕微鏡下にて評価した。無菌評価は2週から1か月毎に無菌マウスの方法に準じて検査した[5]。また、対照として通常環境下にてマイクロミニピッグオス3頭(通常区)を同様の給餌プログラムにて飼育した。

なお、本研究は静岡県畜産技術研究所中小家畜研究センター動物実験委員会の承認のもと実施した。

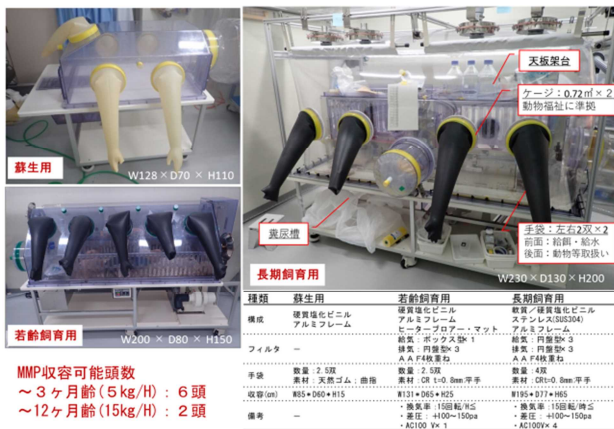


図1 3種類のブタ用アイソレーター  
左上: 蘇生 左下: 短期飼育 右: 長期飼育

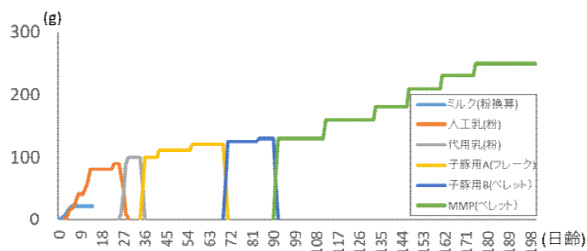


図2 無菌ブタ飼育実証試験の給餌プログラム

### 成績

無菌評価では、試験期間を通じて菌は認めら

れなかった。蘇生アイソレーター内に導入した子宮から4頭娩出し、3頭蘇生させた。蘇生子ブタは2.5ヶ月齢到達時に2頭に選抜し、13ヶ月齢まで個別飼育した。13ヶ月齢時の無菌区の体重は14.7kgおよび15.5kgであり、通常区18.2±2.0kg(n=3)に比べ低値を示したが体格に大きな差は認められなかった(図3)。剖検では無菌区で盲腸の肥大化傾向が認められ、臓器重量の比較では、実質臓器においては無菌区と通常区に差は認められなかったが、消化管において特に盲腸と結腸が無菌区で著しく大きかった(図3、4)。組織学的評価では、無菌区で盲腸および結腸の粘膜下組織の細胞浸潤が少なく腸壁に菲薄化傾向が観察された(図5)が、それ以外に異常は認められなかった。

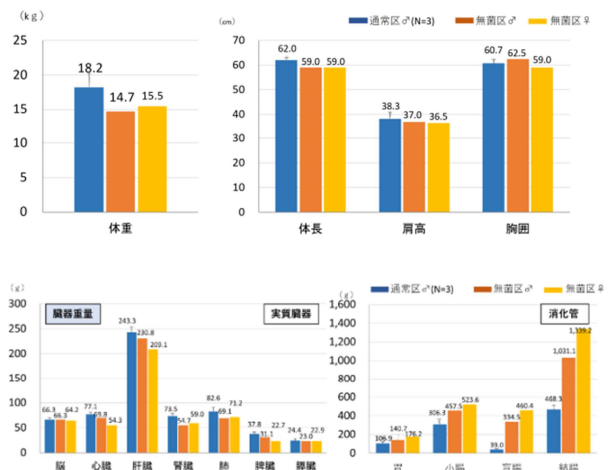


図3 13ヶ月齢の無菌ブタの体重、体格および臓器重量の比較

上段左: 体重データ 上段右: 体格データ  
下段左: 実質臓器重量 下段右: 消化管重量

グラフ内; 左: 通常区 (N=3)、中: 無菌区 No. 1、右: 無菌区 No. 2



図4 アイソレーターで飼育した無菌ブタの消化管像

左: 通常区、右: 無菌区

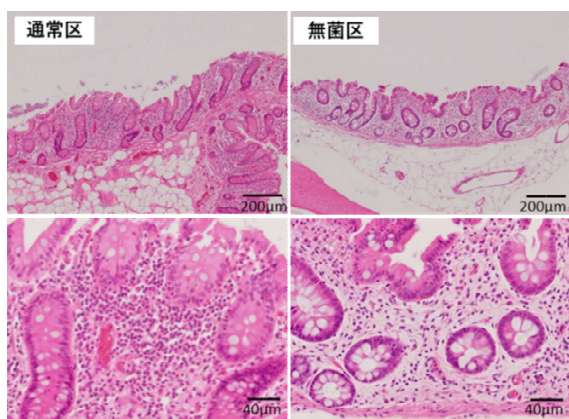


図5 アイソレーターで飼育した無菌ブタの盲腸組織像

左：通常区 右：無菌区

### 考察

動物用アイソレーターは1897年から無菌動物の研究が始まり、1960年代にはブタやウシをはじめとした大型動物でもアイソレーターを用いた無菌化が進められた[6]。ブタ用アイソレーターは市販されており、畜産分野ではSPF化に用いられている。しかし産業目的の無菌ブタは海外においても殆ど使用されておらず、研究レベルでとどまっている。既報で最も長く飼育されたのはポーランドチャイナを用いた5ヵ月齢まで[7]であり、飼料も滅菌ミルクのみでの飼育であることから[7、8]、ラボレベルでとどまっていると考えられる。

本研究では、産業用途を目的として「長期飼育」「作業の省力化」「動物福祉に準拠」したアイソレーターと無菌ブタ飼育管理技術の確立を目標として、新たなアイソレーターを開発するとともに通常環境下と同様の給餌プログラムによる実証試験を試みた。実証試験の結果、開発したアイソレーターによってブタは13ヵ月を通じて無菌状態を保ち飼育することに成功した。飼育期間中、アイソレーター内のブタは十分な飼育面積で群飼育中に玩具で互いに遊ぶ姿も認められたことから、動物にもストレスが少ない構造であることが伺えた。また給餌に関しても作業が簡便であったことから産業用途として、十分活用できるものと思われた。一方で、構造が複雑であるため、アイソレーターの組み立てや滅菌等の準備にかかる労力が大きいことから、短期飼育で分解洗浄の頻度が多い場合には、やや負担が大きいと考えられる。これらについてはさらなる改良が必要となる。

13ヵ月齢の無菌区の体重は、通常区に比較し

てやや低値を示したものの、体格や実質臓器重量は概ね同等であったことから、通常区と同様の給餌プログラムによって飼育できることが明らかとなり、本アイソレーターと給餌プログラムは有用であることが確認された。下部消化管の重量は、通常区よりも無菌区で著しく大きい傾向が認められた。無菌環境下で飼育された動物は一般に通常環境下と質的に異なる傾向があるとの報告[6]や、無菌マウスでは今回の無菌ブタと同様に盲腸や結腸が大きくなる傾向にあるとのことであったこと、さらに無菌のネコでは大きくなる[6]との報告もあることから、雑食性の無菌動物として同様の特長であることが推測された。

以上のことから、産業用途を目的とした「長期飼育」「作業省力化」「動物福祉に準拠」したアイソレーターの開発と無菌ブタ飼育プログラムが確立された。

なお、本研究は日商産業株式会社との共同研究成果であり、本アイソレーターは現在同社より市販されている。

### 参考文献

- [1] 令和4年度実験動物総販売数調査、公益社団法人 日本実験動物協会 令和5年3月
- [2] Man gets genetically-modified pig heart in world-first transplant, BBC news, 11 January 2022
- [3] 「異種移植の実施に伴う公衆衛生上の感染症問題に関する指針」の改定について、医政研発0613第1号平成28年6月13日付
- [4] Kaneko N, Itoh K, et al: J. Pharmacol. Sci., 115:112-114(2011)
- [5] 日本実験動物研究会 無菌試験の規準に関する委員会：実験動物、21、35-38 (1972)
- [6] 長澤博ら：実験動物ハンドブック、p576-593 養賢堂、東京 (1983)
- [7] R.C.Meyer, et al.: Appl. Microbiol 295-300(1964)
- [8] Hara H, et al.: Exp Anim., 67:139-146(2018)