

新動藥情報

○●2014年 第1号●○



一般財団法人生物科学安全研究所

RESEARCH INSTITUTE FOR ANIMAL SCIENCE IN BIOCHEMISTRY & TOXICOLOGY

目 次

文献抄訳

【感染症】

エジプトの肉と乳製品からのサルモネラ、大腸菌 0157:H7 及び赤痢菌の分離と分子特性解析	1
コロラド州、ニューメキシコ州の7種類の食虫性コウモリにおける狂犬病抗体の保有率	2
2012年にメキシコでアウトブレイクした高病原性鳥インフルエンザ H7N3 の病態及びそれに対するワクチンによる防御	3
狂犬病中和抗体検査で生じる細胞毒性の低減を目的とした蛍光抗体ウイルス中和試験法の改良	5
ヒトと犬における狂犬病中和抗体の定性的・半定量的な検出のため改良された迅速中和抗体検出検査 RAPINA の評価	6
【分析・残留】	
ビタミンミネラル混合物と豚飼料中のラクトパミン濃度の HPLC を用いたモニタリング	7
フランス西部地域における蜂中の化学物質調査	9
【環境影響】	
mWET は環境勾配から排水影響を分離して評価できる	10
【薬剤耐性】	
フィンランドにおける牛乳房炎の乳サンプル中のメチシリン耐性ブドウ球菌の発生とその特徴	11
【その他】	
触覚刺激において魚は恐怖を軽減する	12
編集後記	14

題字：野田 篤（事業部長）

文献抄訳

感染症

エジプトの肉と乳製品からのサルモネラ、大腸菌 O157:H7 及び赤痢菌の分離と分子特性解析

Isolation and molecular characterization of *Salmonella enterica*, *Escherichia coli* O157:H7 and *Shigella* spp. from meat and dairy products in Egypt

A, M. Ahmed, et al.

Int. J. Food Microbiol., **168-169**, 57-62 (2014)

[緒言]

食品媒介病原体による人の食品媒介疾患数は過去数十年間著しく増加している。WHO は、世界人口の 1/4 が疾患の危険にさらされており、年に 220 万人が食品媒介病原体の感染により死亡すると報告している。サルモネラ、大腸菌 O157:H7 及び赤痢菌は食品媒介病原体として世界的に主要な 3 病原菌として認知されている。発展途上国においては、食品媒介病原体の汚染状況についてあまり調査されていない。そこで本研究ではエジプト国内の広い範囲で肉製品と乳製品を収集し、これらの病原菌の汚染率を調査した。

[方法]

合計 1,600 の食材サンプル（肉製品 800、乳製品 800）をエジプトの様々な市町村の露天商、肉店、小売市場及び食肉処理施設から無作為に収集した。サンプルが研究所に到着後、ただちに培養法及び PCR 法を用いて菌の分離、同定を行った。

[結果]

サルモネラ、大腸菌 O157:H7 及び赤痢菌はそれぞれ 69(4.3%)、54(3.4%)、27(1.7%) 検出された。

サルモネラは *Salmonella*. Typhimurium、*S. Enteritidis*、*S. Infantis* がそれぞれ 28(1.8%)、22(1.4%)、16(0.1%) で血清型不明が 3(0.1%) であった。肉製品から 6.6%（牛肉 4.9%、鶏肉 1.8%）、乳製品から 2.0%（未殺菌牛乳 1.5%、チーズ 0.5%）分離された。大腸菌 O157:H7 は肉製品から 3.1%（牛肉 2.6%、鶏肉 0.5%）、乳製品から 3.6%（未殺菌牛乳 2.5%、チーズ 1.1%）分離された。分離株は *stx1* 又は *stx2* もしくは両方の毒素遺伝子を保有していた。赤痢菌は *Shigella. flexneri*、*S. sonnei*、*S. dysenteriae* がそれぞれ 18(1.2%)、7(0.4%)、2(0.1%) であった。肉製品から 2.0%（牛肉 1.8%、鶏肉 0.25%）、乳製品 1.6%（未殺菌牛乳 0.5%、チーズ 0.9%）分離された。また、ヨーグルトからはいずれの菌も検出されなかった。

[考察とまとめ]

サルモネラによる食品媒介疾患の一例として、未殺菌又は低温殺菌乳から作られたチーズなどからの感染、そしてサルモネラに酪農場で汚染された牛乳は、加工の過程で汚染につながることを報告されている。また肉製品は加熱不十分な商品や未加工肉と調理済み食材との交差汚染が、O157:H7 への感染の原因になりうると報告されている。赤痢菌に関しては、赤痢菌保菌者による食品加工後の食品の不適切な取り扱いが新たな疾病患者の発生の原因になると報告されている。従って、食品加工工場や小売店、消費者に対する、肉製品や乳製品の適切な取り扱いや保管方法及び石けんで手を洗うなどの衛生指導が、これらの病原菌による食品汚染を防止することに役立つといえる。

◎ 食の安全を守るためこのような調査は必要であり今後も継続して監視を続けていくことが望まれる。
(宮澤 和歌子)

コロラド州、ニューメキシコ州の7種類の食虫性コウモリにおける狂犬病抗体の保有率

Prevalence of neutralizing antibodies to rabies virus in serum of seven species of insectivorous bats from Colorado and New Mexico, United States

R. A. Bowen, et al.

J. Wildl. Dis., **49(2)**, 367-374 (2013)

[緒言]

コウモリは世界中に存在し、狂犬病などを媒介することが知られている。そこで2003年から2005年にかけて米国のコロラド州及びニューメキシコ州で7種類の食虫性コウモリを捕獲し、狂犬病ウイルスに対する中和抗体価及び唾液中の狂犬病ウイルス遺伝子の検出を実施した。

[方法と結果]

湖上などを飛んでいる *Lasiurus cinereus*、*Eptesicus fuscus*、*Lasionycteris noctivagans*、*Myotis volans*、*Myotis lucifugus*、*Myotis evotis* 及び *Myotis thysanodes* の7種類のコウモリを捕獲、さらにコロニーを形成する *E. fuscus* 及び *M. lucifugus* の2種類のコウモリを10か所のねぐらで捕獲し、種類、性別及び成獣か幼獣かを記録した。捕獲時に血液及び口腔スワブを採取した721羽について、狂犬病の抗体価を迅速蛍光焦点抑制試験法により調べ、狂犬病抗体が陽性の個体51羽を含む160羽の口腔スワブについて狂犬病ウイルス遺伝子の検出をRT-PCRにより実施した。その結果、*M. evotis* 以外の6種類のコウモリで抗体陽性の個体が確認され、抗体保有率は *L. cinereus* 27%、*L.*

noctivagans 8%、*E. fuscus* 23%、*M. lucifugus* 9%で、抗体保有率の高い2種(*L. cinereus*、*E. fuscus*)と低い2種(*L. noctivagans*、*M. lucifugus*)で有意な差が認められた($P<0.01$)。性別による有意差は*E. fuscus*のみで認められ、メス22%、オス9%であった($P<0.01$)。成獣と幼獣の抗体保有率はすべての種でほぼ同等であった。また、検査した口腔スワブから狂犬病ウイルスのRNAは検出されなかった。

[考察とまとめ]

今回の結果から、*E. fuscus*の様にコロニーを形成するコウモリは一般的にメスが大きい集団で過ごし、オスが単独で過ごすため、メスの抗体保有率がオスと比べ高いと考えられた。また、移動性のコウモリである*L. cinereus*と*L. noctivagans*の抗体保有率には約4倍の差があったが、このことは*L. noctivagans*は*L. cinereus*と比べ、単独で過ごすことが多く、狂犬病に対する感受性及び致死率が高いことが原因と考えられた。このように抗体保有率は様々な因子から影響を受ける。また、健康なコウモリから狂犬病の抗体が検出されたが、抗体陽性の個体の口腔スワブからウイルスのRNAを検出することは出来なかった。一般的に狂犬病ウイルスの抗体は臨床症状が出る直前若しくは発症後に検出される。その為、今回測定したコウモリは以前に感染したが発症せずに抗体を持っていたものと考えられる。これは臨床症状を示さない量のウイルスが感染、若しくは移行抗体がある状態でウイルスに感染したなどが考えられる。この詳細なメカニズムを解明することが今後の課題である。

◎先日、日本と同様に海に囲まれ、長年狂犬病ウイルスの清浄地域であった台湾において狂犬病が見つかった。これは日本にとって他人事ではない。サーベイランスの実施やワクチン接種率を上げるなど、対策が日本でも必要と考える。(中島 隆二)

2012年にメキシコでアウトブレイクした高病原性鳥インフルエンザH7N3の病態及びそれに対するワクチンによる防御

Characterization of the 2012 highly pathogenic avian influenza H7N3 virus isolated from poultry in an outbreak in Mexico: pathobiology and vaccine protection

D. W. Kapczynski, et al.

J. Virol., **87**(16), 9086-9096 (2013)

[緒言]

野生の水禽類は鳥インフルエンザウイルスの自然宿主であり、それらの糞便中に排泄されたウイルスが家禽に伝播し、家禽間で感染を繰り返す過程で、家禽の体内で高病原性鳥インフルエンザ(HPAI)に変化する。2012年にメキシコの主要な鶏卵生産地であるハリスコ州でH7N3亜型によるHPAIの集団発生があり、多大な経済損失を招い

た。分離されたウイルス株は北米の野鳥から分離されたウイルスと遺伝学的に近いことが分かった。そこで、分離された HPAIV 株の性状を解析すると同時に、米国の家禽及びメキシコの家禽と水禽から分離された H7 亜型低病原性 (LPAIV) 株を元にしたワクチンによる HPAIV(H7N3)感染防御について調べた。

[方法と結果]

分離ウイルスのヘマグルチニン (HA)をコードする RNA は市販のキットを用いて抽出し、RT-PCR で増幅後、塩基配列を決定した。決定した塩基配列を用いた系統樹解析の結果、分離された HPAIV は北米の野鳥から分離された株と近縁な関係にあることが示された。一方相同性解析の結果、HA 開裂部位に挿入されたと推測される 24 塩基の配列は鶏の 28S rRNA のそれと 100%一致した。

試作ワクチンによる感染防御試験では、攻撃株は今回の発生で分離された HPAIV(H7N3)とし、免疫には 5 株 (4 株はアメリカ鳥由来、1 株はメキシコ鳥由来) の LPAIV を不活化して作製したワクチン 5 種類を用いた。試験 1 は、57 週齢の SPF 鶏を用いてアメリカ鳥由来株免疫群 4 群及び非免疫群 (攻撃対照群) をおき、免疫 3 週後に HPAIV で攻撃し、その後 14 日間臨床症状の観察、口咽喉頭及び総排泄口スワブからのウイルス分離、抗体価測定、病理検査を実施した。試験 2 は、22 週齢の SPF 鶏を用いてメキシコ鳥由来株免疫群 1 群及び非免疫群をおき、その他の条件は試験 1 と同じように実施した。非免疫群の死亡率は試験 1 及び試験 2 とともに 100%で、発症鶏は多様な症状を呈して死亡するか、或いは症状を示す間もなく急死するかであった。これらの鶏では、全身の諸臓器や筋肉において肉眼的病変がみられ、それら臓器中にウイルス抗原が認められた。一方、免疫群では十分な抗体価の上昇及び HPAIV に対する 90%以上の発症防御が認められた。

[考察とまとめ]

メキシコでアウトブレイクした HPAI の症状は、従来の HPAI と類似していた。分離されたウイルス株の遺伝学的特性は、北米の野鳥から分離されたウイルス株と類似していたが、HA 開裂部位でのみ違いがみられ、この部分に挿入された塩基配列は鶏由来 28S rRNA の配列の一部であり、それがウイルスの病原性を高めることに繋がったと推測された。しかし、不活化した LPAIV で免疫することにより、本 HPAIV によるインフルエンザの発症は 90%以上予防できた。

◎病原性のアップに宿主自身も加担してしまう皮肉な事実を示した興味ある論文である。
(片岡 敦子)

狂犬病中和抗体検査で生じる細胞毒性の低減を目的とした蛍光抗体ウイルス中和試験法の改良

Modification of the fluorescent antibody virus neutralisation test--elimination of the cytotoxic effect for the detection of rabies virus neutralising antibodies

T. Bedeković, et al.

J. Virol. Methods., **189**(1), 204-208 (2013)

各国政府による犬猫等の狂犬病輸出入検疫では、OIE 主導で中和抗体検査が採用されている。蛍光抗体ウイルス中和試験法 (FAVN) は中和抗体検査法の一つとして用いられる。しかし、当検査の中和試験過程において、被検血清に由来する細胞毒性により BHK 細胞が増殖不全を起こし、試験が成立しない例がある。当検査における試験不成立は、被検動物の輸出入に支障を来すことから、その防止策の確立が望まれている。本研究では、FAVN で生じる被検血清由来の細胞毒性について、その軽減策の確立を試みた。

被検血清及び被検筋肉抽出液は、愛玩犬 102 頭からそれぞれ採取した。参照陽性血清及び参照陰性血清は、OIE から配布されたものを用いた。FAVN における細胞毒性の低減方法について検証するため、従来型 FAVN に以下の変更を行なった (以下、改変型 FAVN と称する)。(1)従来型 FAVN では、中和試験において、BHK 細胞の播種と狂犬病ウイルス/被検血清 (筋肉抽出液) の添加を同時に行うが、改変型 FAVN では、予め単層形成させた BHK 細胞に狂犬病ウイルス/被検血清 (筋肉抽出液) を接種し、1 時間静置した。(2)従来型 FAVN では、(1)の状態のまま 48 時間培養するが、改変型 FAVN では、(1)での静置後に培養液を全て除去し、新たな培養液を加えて 48 時間培養した。以上の条件のもとで、細胞毒性の発生率及び中和抗体価の測定能について、従来型 FAVN と改変型 FAVN の間で比較した。

被検血清及び被検筋肉抽出液での細胞毒性発生件数を比較したところ、従来型 FAVN では、それぞれ 2 件及び 35 件であったが、改変型 FAVN ではどちらでも発生はなかった。参照陽性血清及び参照陰性血清の ED₅₀ は、従来型 FAVN では 1.166 及び 0.24、改変型 FAVN では 1.095 及び 0.15 であった。被検血清から得られた抗体価をもとに、改変型 FAVN の従来型 FAVN に対する感度、特異度及び診断精度を比較したところ、それぞれ 88.8%、94.4% 及び 99% であった。被検筋肉抽出液を用いた場合についてもほぼ同様の結果が得られた。

以上の成績から、改変型 FAVN は従来型 FAVN に比べ、細胞毒性の発生が少ないことが明らかとなり、性能面でも両方法間に差異は認められなかった。従って、本研究で確立した改変型 FAVN は、従来型 FAVN の改良法としてとても有用であることが示唆された。

◎血清等に由来する細胞毒性については不明な点が多く、研究対象になることも少ないが、意外とシンプルな方法で対処可能であることが示されたことから、波及効果は大きいと思われる。(白石 力也)

ヒトと犬における狂犬病中和抗体の定性的・半定量的な検出のため改良された迅速中和抗体検出検査 RAPINA の評価

Evaluation of an improved rapid neutralizing antibody detection test (RAPINA) for qualitative and semiquantitative detection of rabies neutralizing antibody in humans and dogs
A. Nishizono, et al.

Vaccine, **30**(26), 3891-3896 (2012)

[背景・目的]

狂犬病ウイルスはその感染動物による咬傷により伝播し、致死的な急性脳炎を引き起こす。年に5万人以上が狂犬病で死亡する。効果的な予防方法はワクチン接種である。感染防御のためには十分な中和抗体価が必要であり、中和抗体価を簡易にかつ、敏速、正確に測定する必要がある。

イムノクロマトグラフィーの原理を使用した迅速中和抗体検出検査 (RAPINA) は、ウイルス中和試験や ELISA と比較して、血清中の狂犬病ウイルス中和抗体をより早く簡単に測定できる。本研究では、RAPINA の有効性を検証するため、ヒトと犬の血清を用いて試験を実施した。

[材料と方法]

定性的評価：ヒト血清 323 検体、犬血清 527 検体を収集し、迅速蛍光焦点抑制試験 (RFFIT) と RAPINA に供した。RFFIT は生物学的中和試験であり、中和抗体価は WHO の国際基準 (RAI) との比較によって算出した。中和抗体価 ≥ 0.5 IU/mL は、WHO により狂犬病の予防に十分な値と定義され、同価は国際獣疫事務局 (OIE) によって犬にも適用された。RAPINA でバンドがコントロールラインとテストラインに表示された場合は、中和試験においての < 0.5 IU/mL と解釈され、抗体陰性と定義した。バンドがコントロールラインにのみ表示された場合は、 ≥ 0.5 IU/mL であることを示し、抗体陽性と定義した。コントロールラインにバンドが表示されなかった場合、その試験は無効とみなした。

半定量的評価：ヒト血清 80 検体と犬血清 153 検体を RFFIT、ELISA 及び RAPINA に供した。RAPINA で半定量的に中和抗体価を推定するために、血清を希釈して使用した。RFFIT から得た中和抗体価を < 0.5 、 $0.5-4.0$ 、 ≥ 4.0 IU/mL に分類し、同じ中和抗体価に属する ELISA と RAPINA でそれぞれ的一致率を算出した。

[結果]

定性的評価：RAPINA と RFFIT の結果を比較した。陽性的中率は、ヒト血清で 99.5% (182/183)、犬血清で 99.7% (344/345)、陰性的中率は、ヒト血清で 98.6% (138/140)、犬血清で 95.6% (174/182) で、RAPINA と RFFIT の結果には高い相関関係が認められた。

半定量的評価：RFFIT と RAPINA の一致率は、ヒト血清で 88.8% (71/80)、犬血清で 87.6% (134/153)、RFFIT と ELISA の一致率は、ヒト血清で 67.5% (54/80)、犬血清で 81.7% (125/153) であり、RFFIT との一致率は ELISA よりも RAPINA の方が高かった。

[考察とまとめ]

中和試験では細胞毒性が生じる場合がある。これを避けるためには血清を事前希釈する必要があり、低い中和抗体価は測定できないことにもなる。また、中和試験や ELISA では標準血清の連続希釈が必要であるが、RAPINA は血清希釈を必要としないため、より簡単で安価である。すなわち、RAPINA は狂犬病中和抗体価を測定する簡単で迅速な方法であり、ワクチン接種後の免疫獲得状況の確認、ワクチン接種率の調査などに有用である。

◎ 簡単に迅速な中和抗体検出キットの開発報告である。より身近な使用目的も考えられるため今後の動きにも注目したい。(遠田 千穂)

分析・残留**ビタミンミネラル混合物中及び豚飼料中のラクトパミン濃度の HPLC を用いたモニタリング**

Monitoring of ractopamine concentration in mixture of this feed additive with vitamin mineral complex and with swine feed by HPLC

E. F. Freire, et al.

Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess, **30**(5), 796-803 (2013)

[緒言]

ラクトパミン (RAC) は呼吸器系疾患の治療薬として開発された薬剤であるが、投与量を増やした場合、飼料効率改善が認められ飼料節約及び飼育日数が短くなることから、本剤はアメリカ等では豚及び牛の成長促進剤として使用されているが、EU や日本では使われていない。

JECFA (FAO/WHO 合同食品添加物専門家会議) の評価では、RAC の ADI は 0~1 µg/kg

体重、MRLは豚及び牛の筋肉 10 µg/kg、脂肪 10 µg/kg、肝臓 40 µg/kg、腎臓 90 µg/kgと定められている。人へのリスクが確認されていることから、家畜に使用する際は低用量で使用する事にはなっているが、過去に RAC の豚への違法な使用による人の中毒事件も起こっている。

RAC 添加豚用飼料の調製に当たっては、まず RAC と賦形剤と混合した飼料添加物 Ractosuin (2.05% RAC 含有) とビタミンミネラル混合物とのプレミックス (VMC プレミックス) を調整する。VMC プレミックス中の RAC 濃度は 0.128% で、これを用いて RAC を 0.001% 含有する豚用飼料を調製する。と殺 28 日前からこの 0.001% RAC 含有豚用飼料が与えられる。そのため、適正な投与量を確認するために、VMC プレミックス及び豚用試料中 RAC 濃度分析が重要となる。

RAC 原体及び Ractosuin 中 RAC の HPLC/UV における分析法は、筆者らが以前に報告している。本研究では、この方法を改変して VMC プレミックスおよび豚用飼料中 RAC を定量する方法を検討した。

[方法]

6.25% の Ractosuin を含むように VMC を混合した VMC プレミックスを粉碎後 880 mg を秤量して、水で抽出し、25 mL に定容した後、2 mL を分取し、2 M 水酸化ナトリウム溶液 200 µL を加え、酢酸エチル 3 mL で分配抽出した。有機層を濃縮乾固後、溶離液に再溶解して HPLC に供する試料溶液とした。VMC プレミックス 2.5% を含む豚用飼料は、粉碎後 500 mg を秤量、水で抽出し、125 mL に定容後 4 mL を分取した。2 M-NaOH 400 µL を加え、酢酸エチル 5 mL で分配抽出した。濃縮乾固後、クロロホルムと水で再溶解して、水層を HPLC に供する試料溶液とした。HPLC カラムは、どちらも Gemini C18 column Phenomenex (250 × 4.6 mm、5.0 µm) を使用し、溶離液は、VMC 試料は 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.6)-アセトニトリル (74+26)、豚用飼料は 0.02 M ギ酸アンモニウム緩衝液 (pH 3.0) -アセトニトリル (80+20) を用いた。

[結果]

RAC の測定波長は、VMC プレミックスでは 275 nm、豚用飼料中では 223 nm が最適であった。液々分配による抽出溶媒を検討したところ、両マトリックスとも酢酸エチルが最適であった。検量線は VMC プレミックスでは 90~210 µg/mL、豚用飼料では 6.5~14.4 µg/mL の範囲で良好であった。3 濃度 (n=3) で行った際の回収率及び相対標準偏差は、VMC プレミックスでは 98.4~102.2% 及び 0.1~2.4%、豚用飼料で 90.2~97.9% 及び 3.9~13.2% であった。

本結果より、本法が豚用飼料中 RAC のモニタリングに必要な感度及び精度を有していることが明らかになった。

本研究によって確立された方法は、VMC プレミックス及び豚用飼料中の RAC のモニタリングに適用でき、豚肉の生産における経済性と消費者の安全確保に貢献する。

◎大容量の豚飼料中の RAC 濃度を均一に 0.001%にするのは難しいことである。日本では使用されていないが、RAC は多くの国で使用されており、簡単に濃度確認ができれば、安全性の向上につながるだろう。(宇野 明子)

フランス西部地域における蜂中の化学物質調査

Widespread occurrence of chemical residues in beehive matrices from apiaries located in different landscapes of western France

O. Lambert, et al.

Plos One, 8(6), 1-12 (2013)

[目的]

20世紀中頃から、世界中で工業の発展に伴う都市化、交通網の整備、大規模農業等により、生物の生息地や食料資源の質が変わってきた。さらに、感染性病原体や外来種の発生等のストレス要因が加わり、生態系に悪影響を及ぼす事態が発生してきた。

ミツバチを取り巻く環境は、まさにその中心であり、環境汚染調査生物であるミツバチの一種 *Apis mellifera* (西洋ミツバチ) は、近年、アメリカやヨーロッパにおいて前例のない集団消失が報告されている。この原因として、病原体の感染、栄養失調、農薬中毒等が推測される。本研究では、フランス西部の養蜂場における農薬及び動物用医薬品の薬剤残留調査を行ったので、その結果を報告する。

[方法]

試料は、西フランスの4つの異なる地域条件(島部、牧草地域、耕作地域、都市部)の18の養蜂場から、2008年と2009年の春、初夏、夏、初秋に合計、ミツバチ(141試料)、はちみつ(141試料)、花粉(128試料)を収集した。試料は QuEchERs 法で処理をし、GC-ToF 及び LC-MS/MS で 80 種の薬剤を測定した。分析結果は、統計解析としてマトリックス、地域、時期間で比較し、一般化線形混合モデルを用いて有意差検定を行った。

[結果]

試料は、はちみつ 95.7%、ミツバチ 72.3%、花粉 58.6%の頻度で測定したいずれかの薬剤が検出され、花粉、ミツバチ、はちみつの順に濃度の高い傾向があることが確認された。検出薬剤は、殺虫剤のカルベンダジムとダニ駆除剤のアミトラズとクマホスが多く、試料に検出され、地域毎の有意差は認められず、検出薬剤の使用目的と時期に一致し、春、特に早春時期に検出が多く見られた。

[考察]

試料採取時期や周辺環境条件が異なる養蜂場から集めたはちみつ、ミツバチ、花粉中の多くの汚染物質を明らかにした。また、複数の薬剤による汚染は、薬剤の組み

合わせによって起こる影響や、花粉を媒介したミツバチへの健康被害の潜在的な影響をも提起した。ミツバチ、はちみつ及び花粉における農薬、動物用医薬品の残留調査は、環境汚染の監視する目的として適切なものである。本結果は、ミツバチ由来の試料から複数の化学物質の残留を明らかにし、化学物質の制御がミツバチの健康を守るために有効な手段であることが示唆された。

◎ミツバチはその小さな体を使って、我々に化学物質の適正使用を訴えているようだ。今後は、検出された化学物質の濃度が、ミツバチに対して有害な作用をもたらす濃度であるかどうか検証していく必要がある。

(坂本 倫子)

環境影響

mWET は環境勾配から排水影響を分離して評価できる

Modified whole effluent toxicity test to assess and decouple wastewater effects from environmental gradients

S. Saucó, et al.

PLoS One, 8(6), e66285 (2013)

[緒言]

環境中において、海水に河川が流れこむことによる塩分の環境勾配は、河川に流れ込む排水による人為的影響の検出を不明瞭にし、海洋生物に対して複合的な影響を生みだす。実験室でミジンコや藻類を飼育して行う従来型の評価方法は毒性試験設計時に環境勾配による影響を考慮しておらず、誤った結論を導くかもしれない。そこで、排水の希釈に加えて環境勾配の影響を判別して評価する一般化線型混合モデル (GLMM : Generalized Linear Mixed Models) を適用する変法全排水毒性試験(mWET : modified Whole Effluent Toxicity test)を提案する。

[方法と結果]

モデル地域はウルグアイ東部大西洋岸の Barra del Chuy (BC) から La Coronilla (LC) の沖合 22 キロにあり、Andreoni 人工運河は、モデル地域において強力な沿岸塩分勾配 (LC-BC 砂浜に沿って南西-北東方向) を形成している。この人工運河の下流 1.5 km 付近に La Coronilla 町があり、下水システムは存在していない。採水は、稲作で使用した灌漑用水が運河に排水され、稲作で使用した農薬等が運河水から検出される 11 月および 12 月 (2011 年) に実施した。運河水は冷蔵で輸送した。試験対象生物は二枚貝 *Mesodesma mactroides* (長さ 50.16~65.89 mm) で、試験群は、脱イオン人工海水を用いて希釈する (灌漑用排水なし)SC 群 (塩分対照) 及び運河水を用いて希釈する

(灌漑用排水あり)CW 群の 2 群を設定した。各群の塩分濃度は 4、6、8、10 及び 12 ppt の 5 濃度区 10 反復、陰性対照として SC 群に塩分濃度 27 ppt の 10 反復を設定した。12 時間明暗周期で貝を飼育し、2 日ごとに塩分、温度、溶存酸素、pH を測定し、実験データは lme4 R の統計パッケージを使用して解析した。

GLMM による解析の結果、CW 希釈液に起因する死亡率は、4 ppt 及び 6 ppt 区で認められ、CW 希釈群の 11 月の排水は 12 月の排水よりも有意に高い死亡率が認められた。また、11 月及び 12 月の SC 群で差は認められなかった。これらのことから、運河水の灌漑用排水による潜在的な毒性と塩分濃度による毒性を判別して評価できた。

[考察とまとめ]

本試験で検討した mWET は、淡水による海産二枚貝に対する複合影響から、人的な影響因子を判別して検出できた。この結果は、mWET が、急性毒性試験を基礎とした迅速かつ低コストのスクリーニング手法の開発と環境汚染の早期発見技術という点で、沿岸生態系を脅かす人為的な影響を緩和するための非常に正確な意思決定プロセスとなりうることを示している。本研究により、沿岸及び他の生態系への人為的な影響を正確に評価するために、古典的な評価法の改善法である mWET が有用であることを確認できた。

◎WET 試験という人工的な試験環境下で行う従来試験に、一般化線形混合モデルを用いて複合影響を探索するという変法で、低コストで応用の幅が広いと感じた。

(大原 匡史)

薬剤耐性

フィンランドにおける牛乳房炎乳汁からのメチシリン耐性ブドウ球菌の分離とその特徴

Occurrence and characterization of methicillin-resistant staphylococci from bovine mastitis milk samples in Finland

V. Gindonis¹, et al.

Acta Vet. Scand., **55**, 61-69 (2013)

メチシリン耐性ブドウ球菌 (MRS) は牛乳房炎からの分離が増加していることから、フィンランドでの実態を明らかにするための調査を行った。

フィンランドの牛乳房炎乳汁から分離した黄色ブドウ球菌 135 株中 2 株 (1.5%) がメチシリン耐性だった。メチシリン耐性の 2 株のうち 1 株は MLST sequence type ST375 で、フィンランドの牛乳房炎からは初めての分離例である。

過去に収集されたフィンランドの牛乳房炎由来コアグララーゼ陰性ブドウ球菌 (CNS)の2つのコレクションでは、メチシリン耐性陽性率はそれぞれ5.2% (17/324) および1.8% (2/110)であり、黄色ブドウ球菌におけるメチシリン耐性陽性率より高かった。メチシリン耐性 CNS 19株のうち18株はメチシリン耐性表皮ブドウ球菌 (MRSE) で、同一の PFGE タイプが国内の様々な場所で分離されることから、同一のクローンが広範囲に分布していることがうかがわれた。牛由来の MRSE とヒトから分離された MRSE との疫学関連は確認できなかった。本研究はフィンランドにおける牛由来 MRS のさらなるモニタリングの基礎データとなる。

◎今のところ、家畜領域における MRS (特に MRSA) の検出頻度は低いものの、今後監視が重要と考えられる。 (伊藤 文世)

その他

触覚刺激は魚の恐怖を軽減する

Tactile stimulation reduces fear in fish

A. Schirmer, et al.

Front. Behav. Neurosci., 7, 1-9 (2013)

[目的]

哺乳動物においてはグルーミング等による触れ合い(触覚刺激)が、ストレス等の負の感情に対して良い影響を与えることは知られているが、非哺乳動物である魚においては不明な点が多い。そこで筆者らはゼブラフィッシュを用いて2種類の実験を行い、水流による触覚刺激が魚に対して恐怖を軽減させる効果があるかを調査した。

[実験 1]

方法：魚に与える恐怖として魚が仲間に対して発する警告信号である Schreckstoff (SS) を用いて、SS 曝露群 (SS 群)、水流による触覚刺激を与えた後に曝露させる群 (SS-タッチ群)、対照群 (no-SS 群) の3群に分け、行動パターン(底で停滞する、行動を停止する、すくむ、壁に激突する)について観察した。また、観察終了後に血液を採取し、ストレス発生時に放出されるコルチゾール値について分析を行った。

結果：各群の行動について比較したところ、SS 群は SS-タッチ群及び no-SS 群に対して有意に恐怖を感じる行動を示す傾向があった。また、コルチゾール値についても SS 群は他2群と比較して有意に高かった。

[実験 2]

方法：実験1の結果から、魚の体表面に存在して振動を感じる有毛細胞が刺激を受

けることにより、恐怖を軽減させる効果があると仮定し、実験2を行った。実験1と同様のSS群及びSS-タッチ群に加え、有毛細胞に障害を起こす作用のあるネオマイシンに薬浴した後、SS-タッチ群と同様の操作をした群（SS-ネオタッチ群）を設定し、行動を観察した。

結果：SS-ネオタッチ群は有毛細胞が機能していないにもかかわらず、SS-タッチ群に近い行動パターンを示した。

[結論]

水流による触覚刺激を与えることにより、恐怖を軽減させる効果があることが分かった。しかし、そのメカニズムは単純に体表の触覚刺激によるものだけではなく、解明されていないメカニズムも関与している可能性が示唆された。

◎魚に痛覚は無いと長い間考えられていたが、実は痛覚もあり恐怖も感じる事が近年明らかになってきた。安全研でも魚を用いた試験を行っているが、魚類にも苦痛やストレスを感じていると認識を改めて試験を行うように心がけたい。また本文中には「魚は非社会的な環境下での強制的な触覚刺激によっても恐怖が軽減したが、哺乳動物においては、社会を構築する上でグルーミングが重要であり、触覚刺激のみを与えても恐怖を軽減する効果がないのではないかと考察されており、生物によって刺激や接触による感じ方が大きく違うことが再認識できた。 (小林 久人)

編集後記

諸般の事情で前号の発行から大分時間が経過してしまいましたが、新動薬情報 2014 年第 1 号をお届けします。

今年度から担当が大幅に変わりましたが、冊子体からウェブ上での提供に変更した目的である「有用な情報をより迅速に」を確実に実行できるよう、編集態勢を整えてきたいと思っておりますので、今後ともよろしくお願い致します。

昨年秋から多発していた豚流行性下痢 (PED) も、6 月になって発生数が減少してきました。まだ予断を許しません、畜産農家はもちろん、家畜衛生にかかわる多くの方々の努力がやっと目に見える成果となってきたと言えるでしょう。PED の蔓延は、畜産農家への直接影響だけでなく、関連業界へも大きな影響を及ぼしています。農林水産省では、感染経路を明らかにするための疫学調査を実施するとともに、消毒の具体的方法などを記載した防疫マニュアルを、9 月を目途に作成するそうです。本病の予防は、適切な農場衛生管理の確実な実施につきますが、今回の PED の侵入及び拡大の要因を解析するとともに、解析結果を農場衛生管理へ反映していくことが重要でしょう。

編集委員長 宮崎 茂

新動薬情報 2014 年 第 1 号

編集：情報収集普及委員会

編集委員 委員長 宮崎 茂

委員 山本 譲、中村 政幸、山口 真樹子、薄井 典子、宮川 朋彦、
佐藤 彩乃、馬場 光太郎