

第 2 部

牛アデノウイルス 10 型に近縁の遺伝子が検出された乳用子牛の事例

東部家畜保健衛生所 ○齋藤那美香、大町雅則

【はじめに】

牛アデノウイルス (BAdV) は、複数の血清型に分類され、血清型により臨床症状が異なるとされており、国内では病原性の高い株として 3 型や 7 型が下痢や呼吸器症状を引き起こすことが知られている。しかし、他の血清型については、いまだ分離法や病原性に不明な点が多い。管内酪農家の乳用子牛において、BAdV10 型に近縁の BAdV 遺伝子が検出された事例に遭遇したので、その概要を報告する。

【発生の経緯】

飼養頭数約 90 頭の酪農家において、生後 5 ヶ月齢のホルスタイン種が元気消失、起立嫌悪、粘血便を認め、診療獣医師による治療を行うも、その後、消瘦が進行、後弓反張、四肢遊泳などの神経症状を伴って 10 日後に死亡し、病性鑑定に供された。

【材料及び方法】

材料：主要臓器、脳、脳脊髄液及び上部消化管内容等を用いた。

方法：(1) 病理学的検査及び細菌学的検査は、常法に従い実施した。ウイルス学的検査では、ウイルス分離培養検査において株化細胞 (MDBK 細胞、MDBK-SY 細胞、BT 細胞、BH5 細胞) 及び初代培養細胞 (BFL 細胞、BFT 細胞) を用いて 37°C、静置、3 代盲継代した。遺伝子検査において MagDEA Dx SV (プレシジョン・システム・サイエンス株式会社) を用いて核酸を抽出した後、牛ロタウイルス A 群、B 群、C 群、牛トロウイルス、牛コロナウイルス、牛ウイルス性下痢ウイルス、BAdV の検査を実施した。

(2) 検出された BAdV hexon 領域 (Maluquer ら, 2004、Howard ら, 2008) のシーケンス解析を実施した。さらに抗アデノウイルス抗体による免疫組織化学染色及び戻し顕微鏡検査を実施した。

【結果】

(1) 解剖所見

外貌は消瘦、胸部胸腺は顕著に萎縮していた。腸管は全域にわたり水腫様、空腸壁では多発性に菲薄化し、嚢状に突出、粘膜が暗赤色を呈していた。腸間膜のリンパ管は拡張し、リンパ節は腫大していた。腎臓では、肉眼的には著変を認めなかった (図 1)。

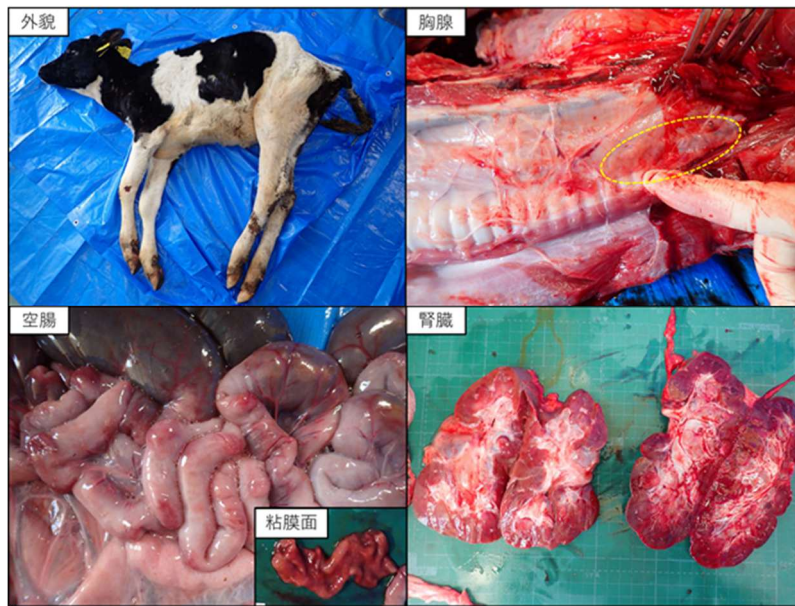


図 1. 解剖所見

- 左上：外貌
- 右上：胸腺
- 左下：空腸
- 右下：腎臓

(2) 病理学的検査

大腸では、盲腸及び結腸の陰窩上皮においてコクシジウムのシズント、ガメトサイトが高頻度にみられた。腎臓の髓質では、集合管上皮の変性壊死、核内封入体を認めた。

(3) 細菌学的検査

上部消化管内容から 7.2×10^4 CFU/g の *Clostridium perfringens* (A型) (*C. perfringens*) が検出された。

(4) ウイルス学的検査

① 分離培養検査

株化細胞の MDBK 細胞、MDBK-SY 細胞、BT 細胞及び BH5 細胞でウイルスは分離されず、初代培養細胞の BFL 細胞及び BFT 細胞でも分離はできなかった。

② 遺伝子検査

空腸腸間膜リンパ節及び腎臓で 430bp の BAdV 遺伝子 (BALN/BARN) が検出された (図 2)。その他の下痢関連ウイルスの遺伝子は、検出されなかった。

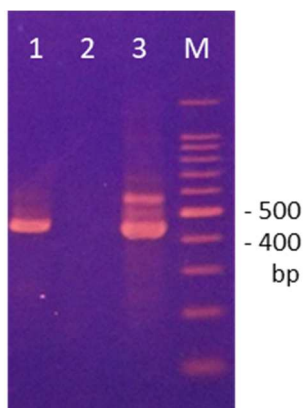


図 2. BAdV 遺伝子の検出

- 1：腎臓
- 2：陰性コントロール
- 3：陽性コントロール

(5) BAdV に関する解析

遺伝子検査によって得られた BAdV hexon 領域 601bp の PCR 産物 (BALF/BARF) を用いて、シーケンス解析を行った結果、2000 年アメリカで登録されている 10 型の株 (アクセッション番号: AF282774) と 100% の相同性を示した。

次に hexon 領域全長である約 2,700bp の PCR 産物 (MaHxF5/ MaHxR5) を用いて、簡易的な型別解析として制限酵素断片長多型 (RFLP) による解析を検討した。*EcoR* I、*Hind*III 及び *Pst* I の 3 種類の制限酵素で切断された断片長は、*EcoR* I では約 1,800bp 及び約 900 bp、*Hind*III では約 1,900bp 及び約 800 bp に切断され、*Pst* I では切断されなかった。今回得られた断片は、10 型の断片長の組み合わせと一致した (図 3)。

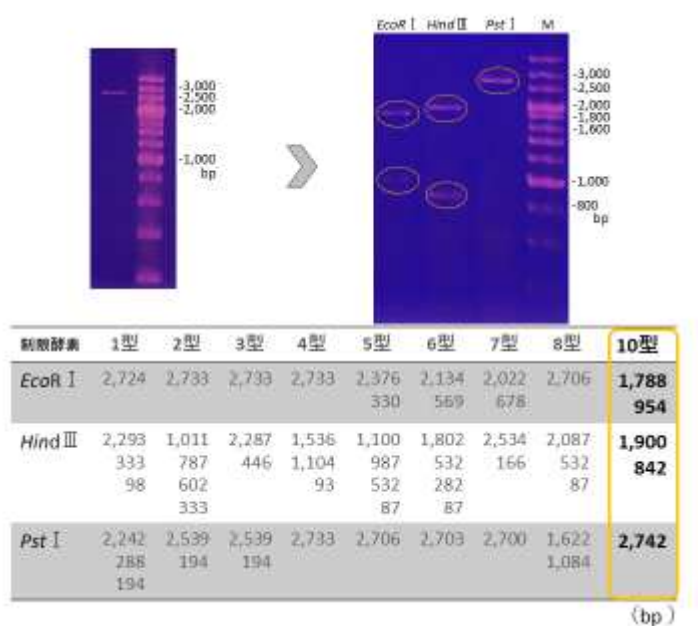


図 3. BAdV の RFLP による簡易型別解析

さらに同じ PCR 産物を用いてシーケンス解析を行った結果、10 型の株に近縁であると確認された (図 4)。

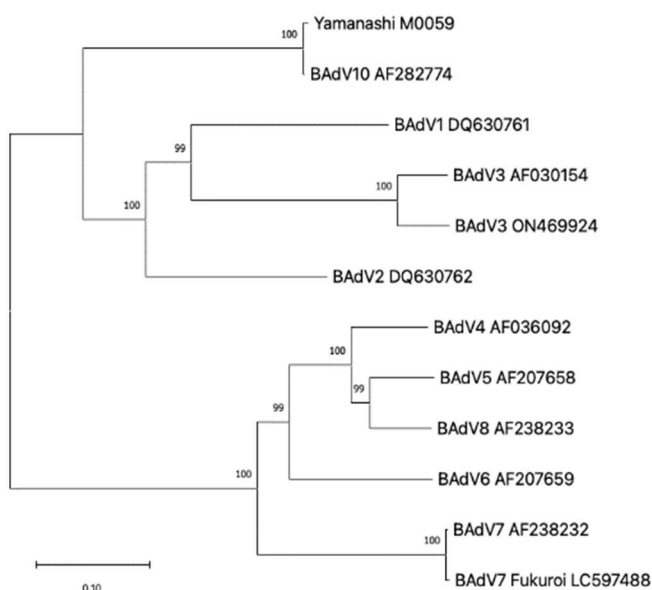


図 4. BAdV hexon 領域遺伝子の塩基配列を基に作成した分子系統樹

さらに抗アデノウイルス抗体による免疫組織化学染色では、腎臓において核内封入体と一致した核が染色された（図 5）。戻し電子顕微鏡像では、核内封入体の確認された核内において、直径約 70nm のウイルス粒子を多数認められた（図 6）。

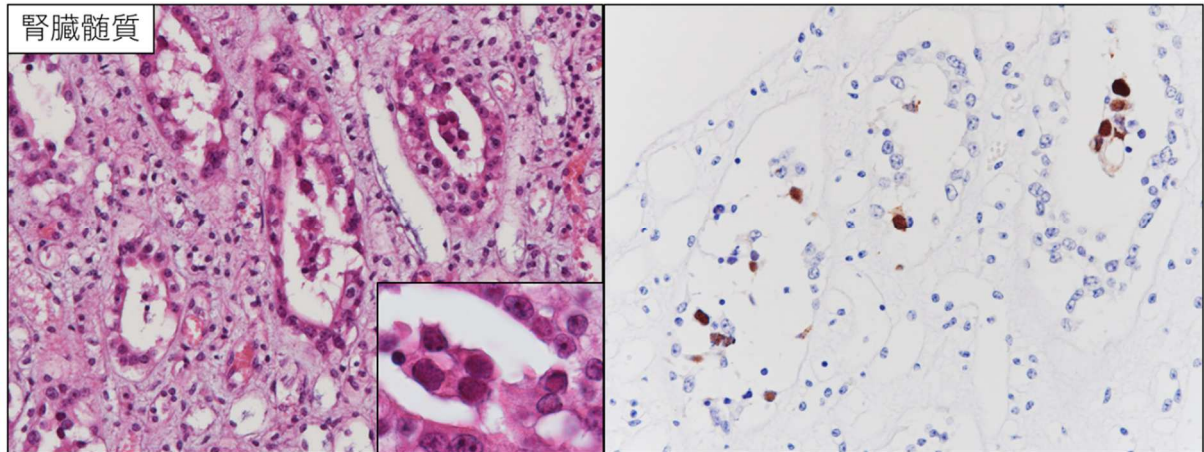


図 5. 腎臓における核内封入体（左：HE 染色、右：免疫組織化学染色）

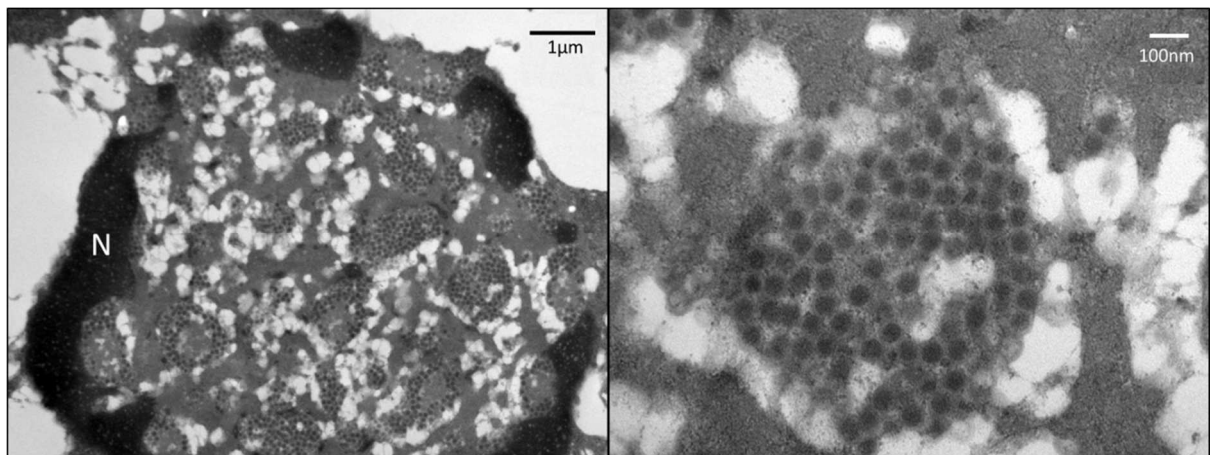


図 6. 核内封入体のみられた核の電子顕微鏡像

【まとめ】

本症例では、生後 5 ヶ月齢の乳用子牛から BAdV が検出された。BAdV は単独では、症状は不顕性もしくは軽微であることが多いが、今回は、*C. perfringens*、コクシジウムとの混合感染や胸腺の萎縮がみられたことから、症状が重篤化し、死亡に至ったと推測される。さらに検出された BAdV は、シーケンス解析、RFLP による簡易型別解析やウイルス粒子等の確認により、国内での報告はみられない 10 型に近縁であることが分かった。10 型についてはその病原性や分離法は明らかにされておらず、さらに検討を重ねていく必要がある。

散発性（子牛型）牛伝染性リンパ腫の発生事例

東部家畜保健衛生所 ○石原希朋・大町雅則 他

【はじめに】

牛伝染性リンパ腫は家畜伝染病予防法における届出伝染病に指定されており、牛伝染性リンパ腫ウイルス（以下、BLV）を原因とする地方病性（EBL）と原因不明で BLV が関与しない散発性（SBL）に分類される。散発性はさらに子牛型、皮膚型、胸腺型の3つの病型に分類され、子牛型は主に6ヶ月齢以下の子牛で、全身性リンパ腫を発症する。今回、散発性（子牛型）牛伝染性リンパ腫（B細胞性リンパ腫）と診断した事例に遭遇したので、その概要を報告する。

【発生概要】

飼養頭数約60頭の酪農家において、令和3年7月6日生まれの自家産の子牛が長期にわたり元気食欲減退を呈し、臨床獣医師が同年11月18日より治療を開始した。初診時には著しく発育不良で消瘦し、起立不能、泥状下痢、貧血、肺雑音等の症状を呈していた。加療も衰弱進行したため、予後不良と診断され、12月7日に病性鑑定を実施した（図-1）。

【材料と方法】

全血及び血清を用いて血液検査を行った。病原検査として、主要5臓器、リンパ節及び血液を用いて、常法に従い、細菌学的検査及びウイルス学的検査を実施した。病理学的検査として、主要5臓器、リンパ節及び消化管等についてHE染色を実施した。また、肝臓については、抗ヒトCD3マウスモノクローナル抗体（Dako）、抗ヒトCD5家兎ポリクローナル抗体（Invitrogen）、抗ヒトCD20家兎ポリクローナル抗体（Thermo Fisher Scientific）及び抗ヒトTdTマウスモノクローナル抗体（ニチレイバイオサイエンス）を用いた免疫組織化学的染色を実施した（図-2）。

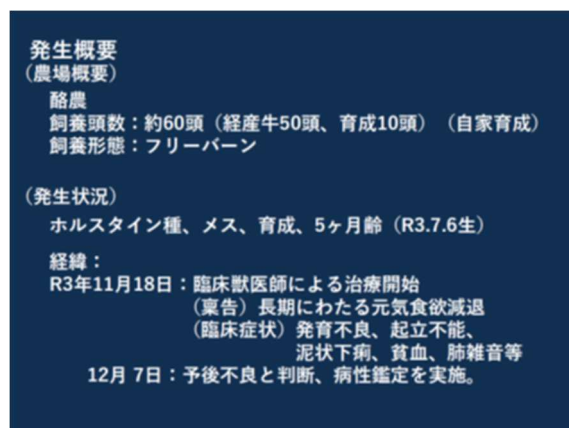


図-1 発生概要

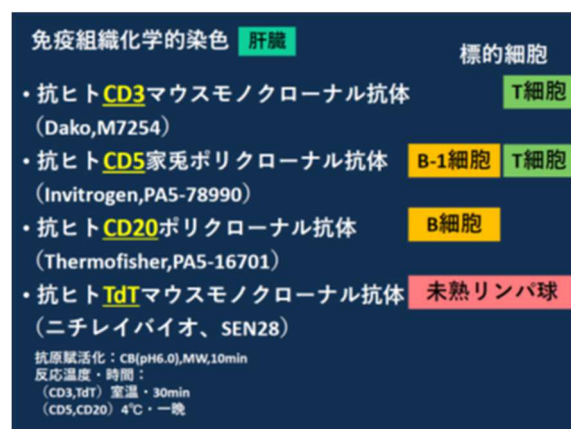


図-2 免疫組織化学的染色



図-3 剖検所見 1

【結果】

(剖検所見)

体躯の消瘦と可視粘膜の蒼白が顕著であった。また、腹囲膨満がみられ、白色半透明の腹水が貯留していた (図-3)。全身の体表リンパ節は左右対称性に著しく腫大し、割面は膨隆し、皮髓不明瞭を呈していた (図-4)。同様に臓器付属リンパ節など腹腔内及び胸腔内のリンパ節においても腫大がみられた一方で、胸腺は重度に萎縮していた。肝臓は著しく腫大し、全域にわたり褪色がみられた。また、被膜下出血がみられた。脾臓は大きさが正常であったが、被膜が白色を呈していた。腎臓では皮質表層に白色斑が多発性に認められた (図-5)。肺では播種性に暗赤色巣がみられたが、心臓では肉眼的な著変は確認できなかった (図-6)。

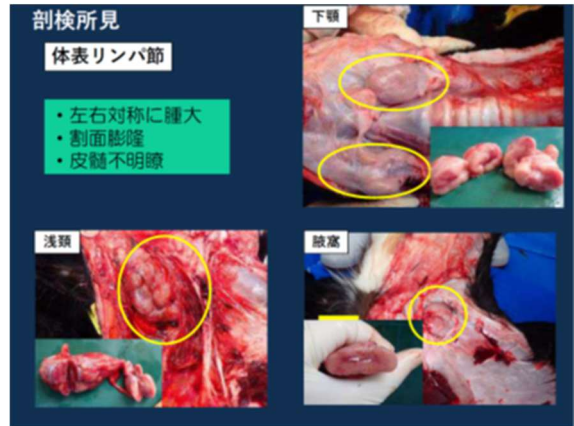


図-4 剖検所見 2

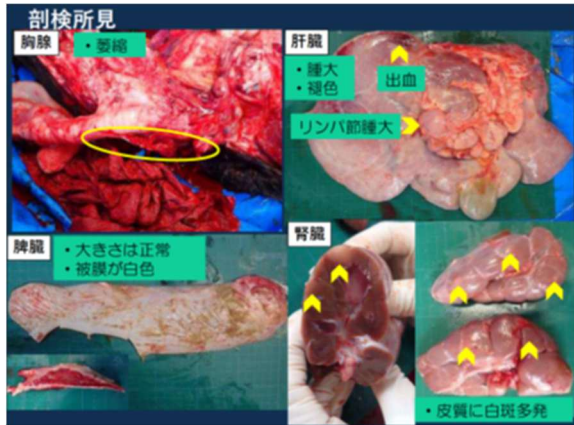


図-5 剖検所見 3

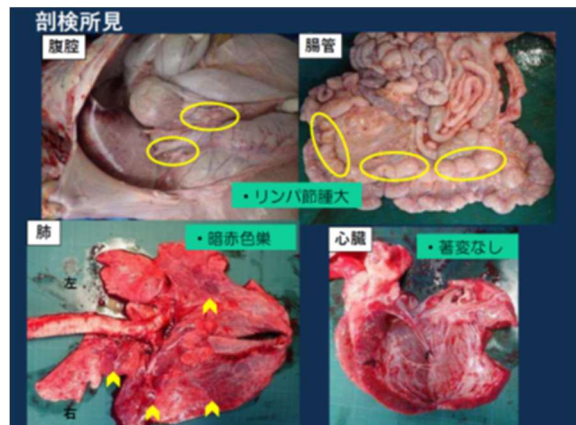


図-6 剖検所見 4

(血液検査)

白血球数：40,300/ μ L、リンパ球：29,800/ μ L (異型率：59.2%) であり、顕著に異型リンパ球の増多を認めた (図-7)。また、LDH 値は 728.0 U/L であり、上昇は認めなかった (図-8)。

血液検査			
全血 (自動血球計算)	測定値	測定値	参考値 (牛の臨床より)
RBC	5.9	$\times 10^6/\mu$ L	5.0~10.0 ($\times 10^6$) (平均7.0 $\times 10^6$)
WBC	40.3	$\times 10^3/\mu$ L	4~12 $\times 10^3$ (平均8 $\times 10^3$)
HBG	8.4	g/dL	8.0~15.0 (平均11.0)
Ht	28.4	%	24.0~46.0 (平均36)
MCV	48.4	fL	40.0~60.0 (平均52.0)
MCH	14.3	pg	11.0~17.0 (平均14.0)
MCHC	29.6	g/dL	30.0~36.0 (平均32.7)
PLT	51.7	$\times 10^3/\mu$ L	10~80 $\times 10^3$ (平均50 $\times 10^3$)
血球百分比			
測定値 %	測定値	測定値	参考値 (牛の臨床より)
好中球 (桿状核)	0	0	0~2% (0~120)
好中球 (分葉核)	23	9,269	15~47% (600~4000)
リンパ球	74	29,822	45~75% (2,500~7,500)
単球	2	806	2~7% (25~840)
好酸球	0	0	2~20% (0~2,400)
好塩基球	1	403	0~2% (0~200)

リンパ球異型率：59.2%

図-7 血液検査結果 1

血液検査		
血清 (ドライケム)	測定値	
A/G比	1.18	↑
TP	4.8	g/dl ↓
ALB	2.6	g/dl ↓
TCHO	42.0	mg/dl ↓
GGT	60.0	U/l ↑
GOT	61.0	U/l ↓
GPT	19.0	U/l
TBIL	0.4	mg/dl
BUN	35.6	mg/dl ↑
CRE	0.7	mg/dl ↓
BUN/CRE比	50.9	↑
Ca	8.7	mg/dl ↓
Mg	3.8	mg/dl ↑
Ca/Mg比	2.3	↓
LDH	728.0	U/l
ALP	244.0	U/l
CPK	190.0	U/l
Na	140.0	mEq/l
K	8.2	mEq/l ↑
Cl	104.0	mEq/l

図-8 血液検査結果 2

(病原検査)

細菌学的検査では有意菌は分離されなかった。ウイルス学的検査は分離検査及び遺伝子検査で検査した項目すべて陰性であった。BLVについても遺伝子検査及び抗体検査を実施したが、陰性であった(図-9)。

(病理学的検査)

肝臓では、び慢性重度にリンパ球様腫瘍細胞が浸潤していた。腫瘍細胞は小葉構造に関わらず浸潤し、肝細胞は変性、萎縮し、網目状に残存する程度で固有構造は消失していた(図-10、11)。また、被膜下では出血がみられた。腫瘍細胞は大きさがおおむね均一の中型の細胞で、2核のものや核に切れ込みが入るものがみられ、核の有糸分裂像も散見された(図-12)。リンパ節においても重度に腫瘍細胞の浸潤が認められ、濾胞形成は認められず、皮髄が不明瞭となっていた。また、スターリースカイ像が高頻度にみられた(図-13)。腫瘍細胞の浸潤は、程度の違いはあるものの、この他の臓器、器官でも認められた。肉眼で白色を呈していた腎臓皮質の間質(図-14)、脾臓の被膜(図-15)、肉眼では著変がみられなかった右心の心筋間(図-16)、消化管及び膀胱の漿膜(図-17)においても軽度から中等度に観察された。腫瘍細胞浸潤以外の所見として、肺では化膿性肺炎がみられた(図-18)。

病原検査

【細菌学的検査】 有意菌なし

【ウイルス学的検査】

1. ウイルス分離検査
IBR、PI3、BVD、BAdV、BCV
2. PCR検査
① 牛呼吸器病マルチプレックスPCR
RS、PI3、BVD、BCV
② 牛下痢5種マルチプレックスPCR
BCV・BLoV (A群、B群、C群)・BToV
③ BLV Nested-PCR
3. BLV抗体検査

すべて陰性

図-9 病原検査結果

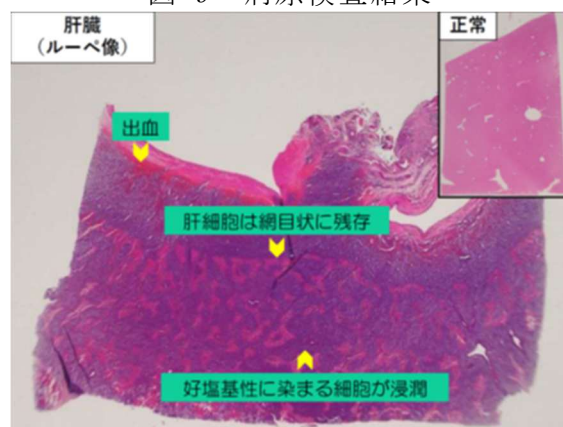


図-10 肝臓

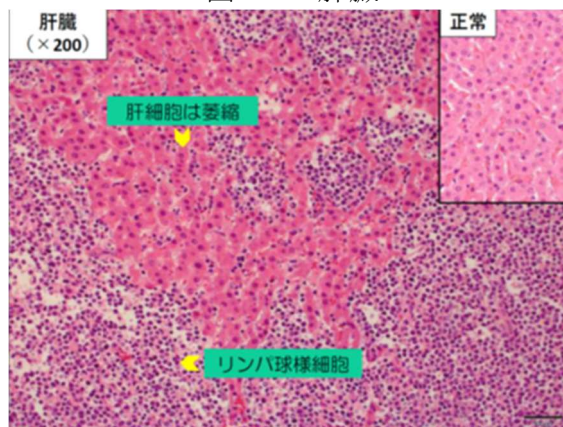


図-11 肝臓

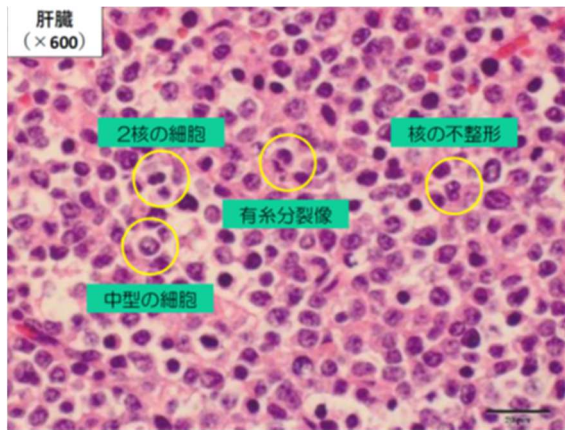


図-12 肝臓

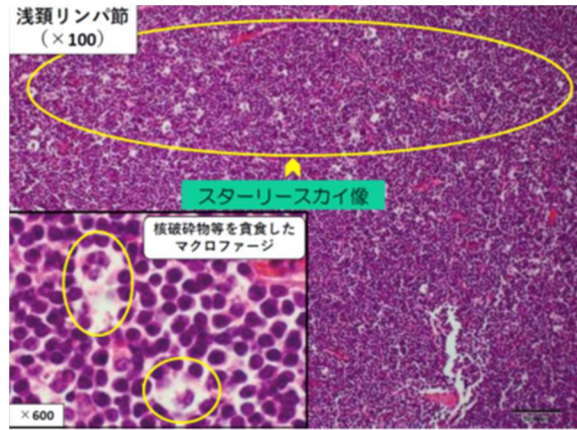


図-13 浅頸リンパ節

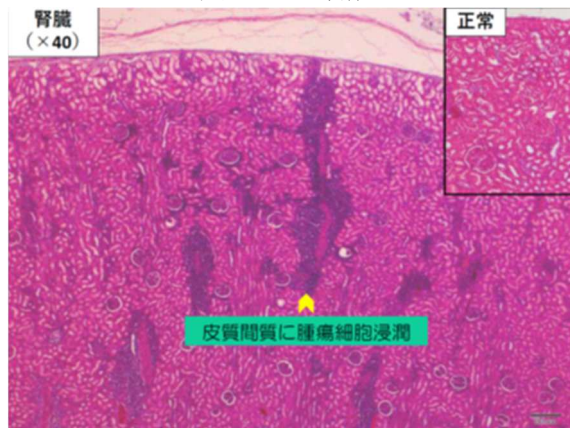


図-14 腎臓

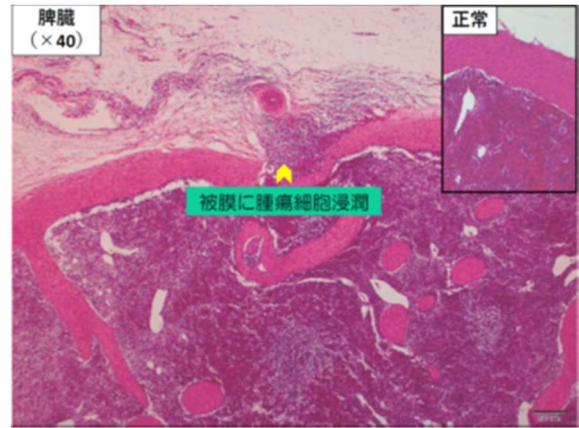


図-15 脾臓

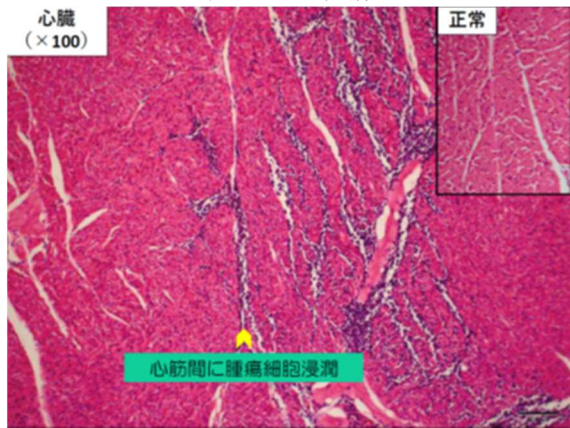


図-16 心臓

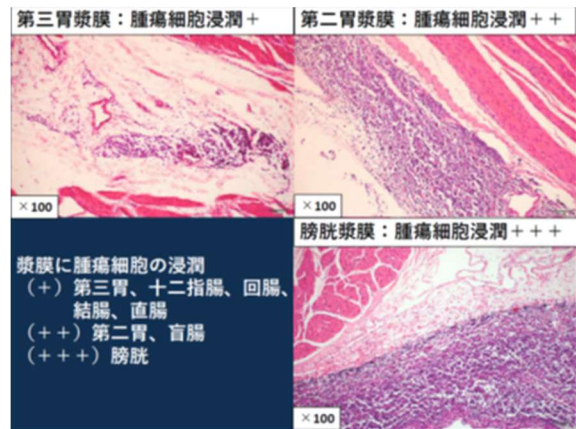


図-17 消化管・膀胱

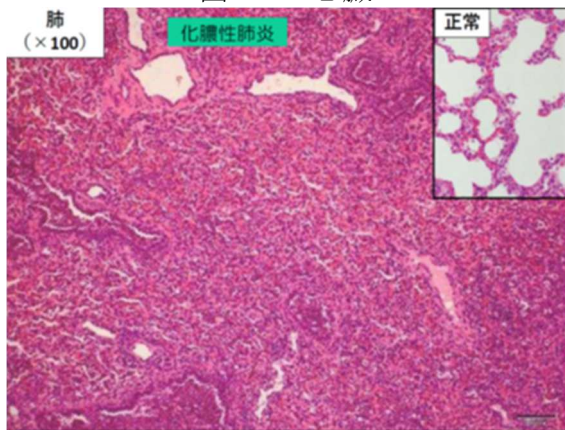


図-18 肺

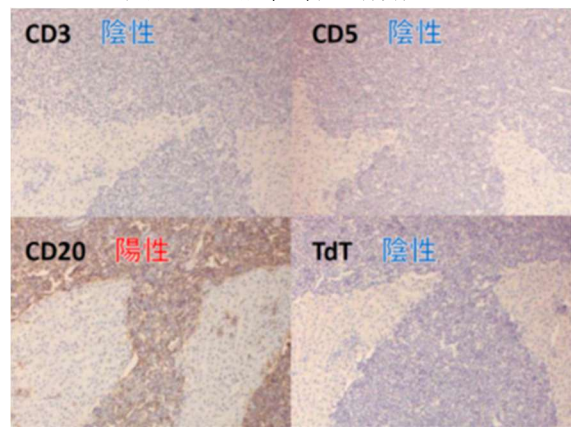


図-19 免疫組織化学的染色結果

また、浸潤していた腫瘍細胞の由来を調べるため、免疫組織化学的染色を行ったところ、腫瘍細胞は CD3、CD5 及び TdT では陰性、CD20 では陽性を示した（図-19）。このことから、腫瘍細胞は B 細胞であることが判った（図-20）。

【まとめ】

本症例は臨床症状、BLV の関与、発症月齢、病理学的検査から総合的に判断して、散発性（子牛型）牛伝染性リンパ腫、組織学的には B 細胞性リンパ腫と診断した（図-21）。

若齢牛においても EBL の発症事例があることから、臨床症状や発症月齢だけで診断することは困難である。一方で、ウイルスによる伝染病である EBL と伝染病ではない SBL では農家において取るべき対応が異なるため、病理学的検査を用いながら、正確に診断する必要がある。子牛型については報告例が少なく、不明な点が多い。今後も情報の積み重ねを行っていききたい。

免疫組織化学的染色

	CD3	CD5	CD20	TdT
主な標的細胞	T細胞	T細胞 B-1細胞	B細胞	未熟リンパ球
本症例	-	-	+	-

➡ 腫瘍細胞はB細胞

図-20 免疫組織化学的染色結果まとめ

まとめ

	本症例	子牛型	地方病性
症状	全身リンパ節の腫脹等	全身リンパ節の腫脹等	全身リンパ節の腫脹等
BLVの関与	なし	なし	あり
発症年齢	5ヶ月齢	6ヶ月齢以下	4～8歳
由来細胞	B細胞	BまたはT細胞	B細胞（B-1細胞）

➡ 散発性（子牛型）牛伝染性リンパ腫（B細胞性リンパ腫）




図-21 まとめ

乳用牛における *Clostridium perfringens* の分離率と薬剤感受性試験

東部家畜保健衛生所 ○土屋可奈 大町雅則

【はじめに】

Clostridium perfringens は健康な動物の消化管内常在菌であり、飼料の過給や急変等により、本菌が消化管内で急速に増加することで、下痢や急死を引き起こすことが知られている。一方、健常牛における本菌の保菌状況や薬剤耐性の獲得状況についてはほとんど調査されていない。

昨年度は、健常肉用牛について、分離率及び薬剤感受性試験の結果を報告した。今年度は、乳用牛について調査し、分離率及び分離株の薬剤感受性試験等の解析を実施した。

また、今年度の分離株を用いて、薬剤感受性試験の方法について、寒天平板希釈法（希釈法）とディスク拡散法（ディスク法）の相関を検討したので、概要を報告する。

【材料及び方法】

(1) 菌分離

材料には、管内酪農家 24 戸から採材した、健常乳用牛の直腸便 255 検体を用いた。分離培地には、卵黄加 CW 寒天培地を用い、糞便 1g を滅菌生理食塩水で 10^3 まで 10 倍段階希釈後、培地に接種した。

(2) 分離株の解析

分離株 125 株について以下の検査を実施した。

①毒素型別 PCR

A~G 型を識別可能な PCR [1] を実施した。

②薬剤感受性試験

寒天平板希釈法で実施し、精度管理株として *E. coli* ATCC 25922 を用いた。薬剤はアンピシリン (ABPC)、セファゾリン (CEZ)、エンロフロキサシン (ERFX)、オキシテトラサイクリン (OTC)、カナマイシン (KM)、フロルフェニコール (FF)、エリスロマイシン (EM) を使用し、最小発育阻止濃度 (MIC) を測定した。

薬剤濃度は、KM、EM、OTC は $0.25\sim 256\ \mu\text{g/ml}$ 、他の薬剤は $0.25\sim 16\ \mu\text{g/ml}$ とした。被験菌用の培地には GAM 寒天培地を用い、精度管理株用にはミューラーヒントン寒天培地を使用した。

③薬剤耐性遺伝子の検索

マクロライド耐性遺伝子 (*erm(B)*、*erm(Q)*) [2]、テトラサイクリン耐性遺伝子 (*tetA(P)* [3]、*tetB(P)*) について検索した。*tetB(P)* については動物衛生研究部門設計のプライマーを使用した。

④希釈法とディスク法の相関の検討

ディスク法では、滅菌生理食塩水 3ml に 0.5McFarland の菌液を調整し、GAM 寒天に綿棒を用いて 3 方向から菌液を塗抹。ディスクを設置後、嫌気培養し、阻止円直径(mm)を測定した。

ディスクは、KM (30 μ g)、ABPC (10 μ g)、CEZ (30 μ g)、EM (15 μ g)、テトラサイクリン (TC : 30 μ g) を用い、MIC と阻止円直径の相関について検討した。

【結果】

(1) 菌分離

255 検体中 129 検体 (50.6%) から *C. perfringens* が分離された。分離率は経産牛 52.0%、未經産牛 41.2%であり、両者の分離率に有意な差は認められなかった。また、農場間の偏りも確認されなかった。

(2) 菌株の解析

①毒素型別 PCR

全株が 324bp のみにバンドを示し、 α 毒素のみを保有する A 型であった (図 1)。

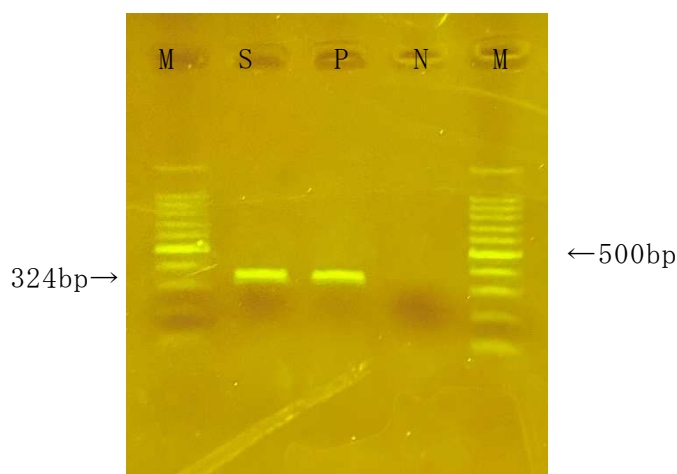


図 1. 毒素型別 PCR

②薬剤感受性試験

KM に対しては自然耐性を持つため、分離株はいずれも高値を示した。また、FF に耐性傾向を示す株は認められなかった。一方、ERFX、EM に耐性傾向を示す株や、感受性が高いことで知られる ABPC、CEZ にも耐性傾向を示す株が認められた。耐性傾向株が最も多かったのは OTC であり、53 株 (42.4%) であった (表 1)。

薬剤耐性の獲得状況をまとめると、1 剤に耐性傾向を示す株が 52 株、2 剤耐性傾向株が 1 株、3 剤耐性傾向株が 2 株、5 剤耐性傾向株も 1 株認められた (表 2)。

表 1. 各薬剤に対する MIC の分布

薬剤	MIC (μ g/ml)											
	≤ 0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	>256
KM	0	0	0	0	0	0	0	0	1	14	63	47
FF	0	50	74	1	0	0	0	-	-	-	-	-
ERFX	122	0	0	1	1	1	0	-	-	-	-	-
EM	0	39	83	0	0	0	0	0	1	1	1	0
ABPC	122	0	0	0	3	0	0	-	-	-	-	-
CEZ	122	0	1	0	2	0	0	-	-	-	-	-
OTC	72	0	0	7	11	33	2	0	0	0	0	0

表 2. 耐性傾向の獲得状況

	1 剤耐性傾向			2 剤耐性傾向	3 剤耐性傾向	5 剤耐性傾向
薬剤	OTC	ERFX	EM	OTC, EM	OTC, ABPC, CEZ	OTC, ABPC, CEZ, EM, ERFX
株数	49	2	1	1	2	1

③薬剤耐性遺伝子の検索

OTC に耐性傾向を示した株はいずれも、TC 耐性遺伝子を保有していたが、EM に耐性傾向を示した 3 株のうち、マクロライド耐性遺伝子を保有していたのは 1 株のみで、他の 2 株は今回検索した耐性遺伝子を保有していなかった (表 3)。

表 3. 薬剤耐性遺伝子の保有状況と MIC の関係

OTC	MIC (μ g/ml)												計
	≤ 0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	>256	
耐性遺伝子 (-)	72	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	72
<i>tetA(P)</i>	0	0	0	6	0	0	1	0	0	0	0	0	7
<i>tetB(P)</i>	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	2
<i>tetA(P), tetB(P)</i>				1	11	31	1						44
EM	MIC (μ g/ml)												計
	≤ 0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	>256	
耐性遺伝子 (-)	0	39	83	0	0	0	0	0	1	0	1	0	60
<i>erm(Q)</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1

④希釈法とディスク法の相関

MIC と阻止円直径の関係について、CEZ では負の相関が認められ、ABPC、EM、TC では強い負の相関が認められたことから、MIC が高いと阻止円直径が小さくなる傾向があることが確認できた。

MIC と阻止円直径をそれぞれ散布図で表した。KM に対しては、全検体がいずれも高い MIC を示し、阻止円直径は 1 株を除き、6mm 以下であった（図 2）。

ABPC と CEZ は同様の結果を示したので、ここでは、CEZ の結果を示した。耐性傾株のうち、MIC が $1\mu\text{g/ml}$ を示した 1 株は、 $4\mu\text{g/ml}$ を示した 2 株と比較してディスク法でも阻止円直径が大きくなった（図 3）。

OTC については、耐性傾向株が 53 株と最も多かったが、全株とも阻止円直径が 24mm 以下、感受性株は 28mm 以上にまとまった（図 4）。

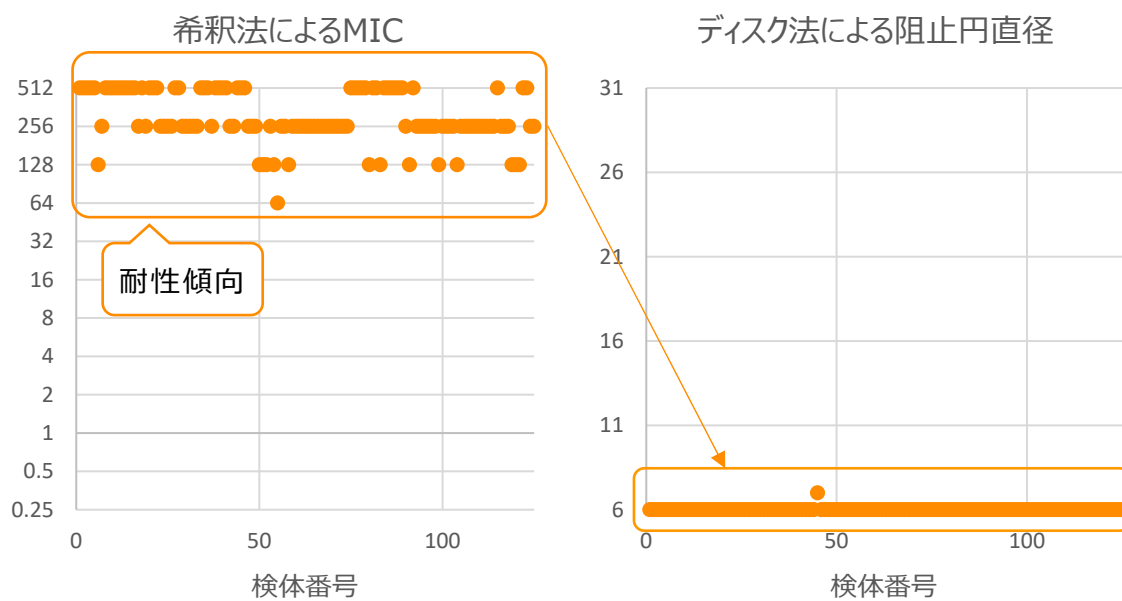


図 2. KM に対する MIC と阻止円直径

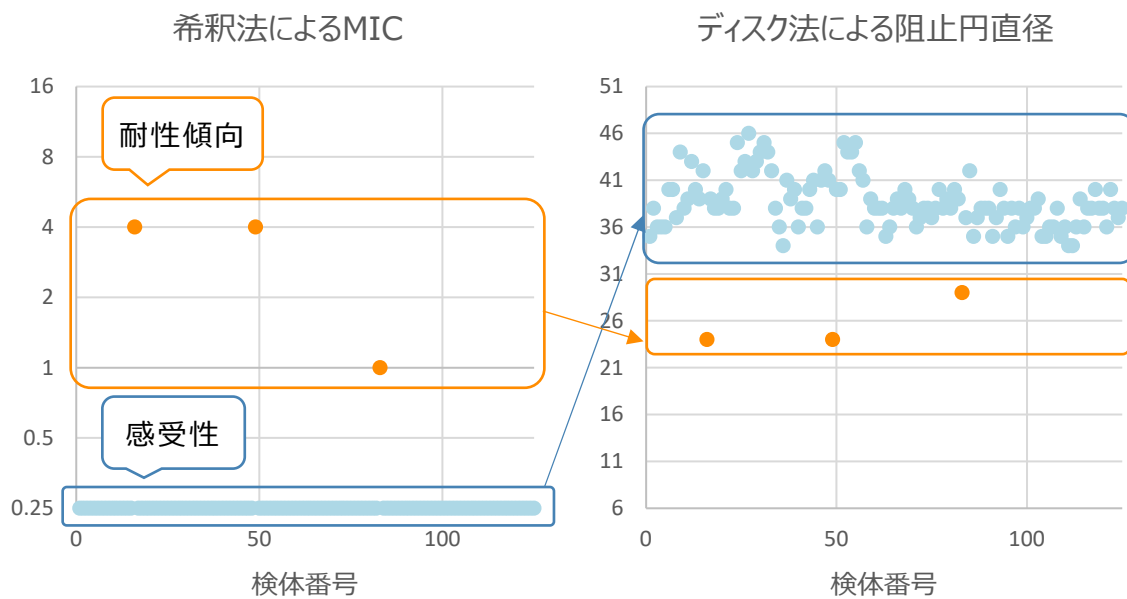


図 3. CEZ に対する MIC と阻止円直径

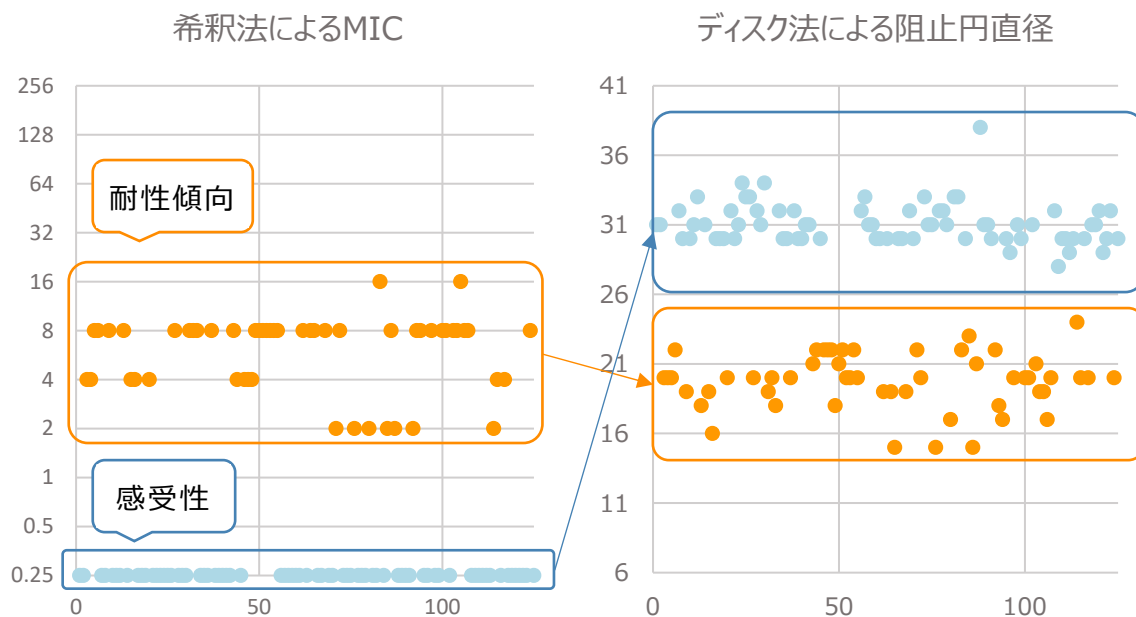


図 4. OTC に対する MIC と TC に対する阻止円直径

⑤ディスク法における判定基準の設定

MIC と阻止円直径に相関があることが確認できたことから、判定基準を設定するため、希釈法で測定した MIC を基に耐性傾向株と感受性株に分け、それぞれの阻止円直径について箱ひげ図を作成した。

TC に対して感受性を示した株は阻止円直径が 28mm 以上であり、耐性傾向株の阻止円直径が 24mm 以下で差は 4mm であった (図 4)。感受性株と耐性傾向株の差が少ないため、感受性の基準は 25% 値の 30mm、耐性傾向の基準は 75% 値の 21mm とした。他の薬剤についても同様に設定した (表 5)。

CEZ では、耐性傾向株の阻止円直径にばらつきが大きいこと、検体数も少ないことから、耐性傾向の基準を 25% 値とした (図 5)。

また、KM は 1 株を除き、6mm 未満であったことから、耐性傾向の基準を 6mm 未満とした。

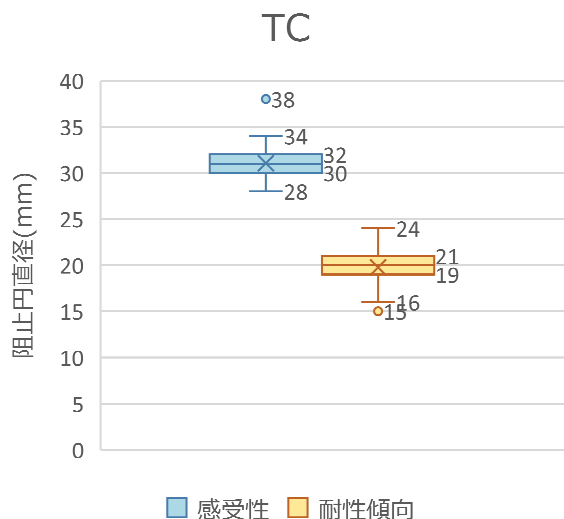


図 4. 箱ひげ図 (TC)

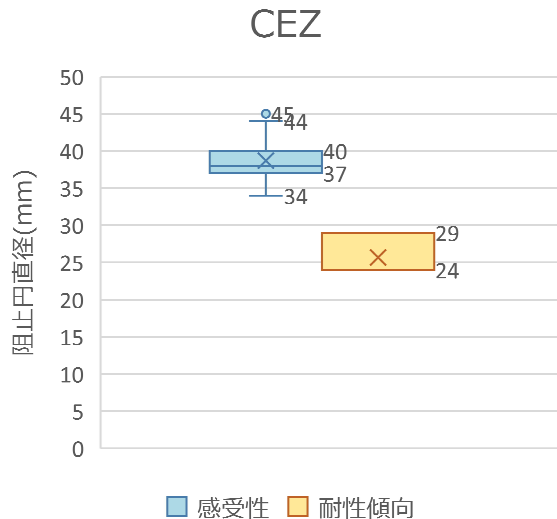


図 5. 箱ひげ図 (CEZ)

表 5. 設定した判定基準

判定基準	阻止円直径 (mm)				
	KM	ABPC	CEZ	TC	EM
感受性	-	≥ 38	≥ 37	≥ 30	≥ 22
耐性傾向	< 6	≤ 23	≤ 24	≤ 21	< 6

【まとめ及び考察】

菌分離の結果、健康な乳用牛からの *C. perfringens* の分離率は 50.6% であった。経産牛と未経産牛で差は認められず、農場間でも差は認められなかったことから、乳用牛では半数程度から菌が分離できることが示唆された。

薬剤感受性試験では、OTC に耐性傾向を示した株が 53 株確認され、いずれも TC 耐性遺伝子を保有していた。一方、EM に耐性傾向を示した 3 株のうち、今回検索した薬剤耐性遺伝子を保有していたのは、1 株のみであったことから、他の 2 株は別の薬剤耐性遺伝子を獲得していると考えられた。

TC 耐性遺伝子及びマクロライド耐性遺伝子は、いずれもプラスミド上にコードされており [3, 4]、耐性遺伝子が移動しやすく、他の株も耐性を獲得する可能性がある。

また、多剤耐性株や感受性が高いことで知られる ABPC や CEZ にも耐性傾向を示す株が検出されており、抗菌剤の慎重使用が必要と考えられた。

ディスク法における判定基準を設定したが、ABPC, CEZ, EM では耐性傾向株が少なかったことから、今後も株を収集し、検討していく必要がある。

今回、結果には示していないが、肉用牛1戸から分離された株についても、同様にディスク法を実施したところ、乳用牛の結果より阻止円直径が小さい傾向が認められた。乳用牛では、農家間での阻止円直径に偏りは認められなかったことから、肉用牛由来株の特徴なのか、1戸のみの結果であることから、当該農家の抗生剤使用状況が関係しているのかは、他の農家の株も収集して、詳細な検討が必要である。

今後、設定した判定基準が実際に利用可能か否かを検討していきたい。

【参考文献】

[1] Julian I Rood, Vicki Adams, Jake Lacey, Dena Lyras, Bruce A McClane, Stephen B Melville, Robert J Moore, Michel R Popoff, Mahfuzur R Sarker, J Glenn Songer, Francisco A Uzal, Filip Van Immerseel. (2018) Expansion of the *Clostridium perfringens* toxin-based typing scheme. *Anaerobe*. 2018 Oct;53:5-10. doi: 10.1016/j.anaerobe.2018.04.011. Epub 2018 Apr 20.

[2] Luna, V.A., Heiken, M., Judge, K., Ulep, C., Van Kirk, N., Luis, H., Bernardo, M., Leitao, J. et al. (2002) Distribution of *mef(A)* in gram-positive bacteria from healthy Portuguese children. *Antimicrob Agents Chemother* 46, 2513-2517.

[3] Trudi L. Bannam, Xu-Xia Yan, Paul F. Harrison, Torsten Seemann, Anthony L. Keyburn, Christopher Stubenrauch, Lakmini H. Weeramantri, Jackie K. Cheung, Bruce A. McClane, John D. Boyce, Robert J. Moore, Julian I. Rood. (2011) Necrotic Enteritis-Derived *Clostridium perfringens* Strain with Three Closely Related Independently Conjugative Toxin and Antibiotic Resistance Plasmids. *mBio* 2(5):e00190-11.

[4] David I. Berryman, Michael Lyristis, Julian I. Rood. (1994) Cloning and Sequence Analysis of *ermQ*, the Predominant Macrolide-Lincosamide-Streptogramin B Resistance Gene in *Clostridium perfringens*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, May 1994, p. 1041-1046.