

Semi-Free Ranging 下の有袋類における感染症の

ストレス評価と病態生理

外平友佳理

Semi-Free Ranging 下の有袋類における感染症の

ストレス評価と病態生理

酪農学園大学大学院

獣医学研究科

研究生／到津の森公園

外平友佳理

獣医寄生虫学

指導教員 教授 浅川満彦

2017 年度

第1章 序章

1.1 緒言	2
--------	---

第2章 Semi-Free Ranging 下の有袋類の糞便を用いた内部寄生虫保有状況の実態調査

2.1 小緒	10
2.2 材料及び方法	10
2.3 結果	11
2.4 考察	12
2.5 小活	13

第3章 Lumpy Jaw Disease 罹患オオカンガルー (*Macropus giganteus*) におけるストレス評価

3.1 Lumpy Jaw Disease 罹患オオカンガルー (*Macropus giganteus*) における血漿中マーカーによるストレス評価

3.1.1 小緒	25
3.1.2 材料及び方法	25
3.1.2.1 供試動物	
3.1.2.2 サンプルリング	
3.1.2.3 測定	
3.1.2.4 統計解析	
3.1.3 結果	27
3.1.4 考察	27

3.2 Lumpy Jaw Disease 罹患オオカンガルー (*Macropus giganteus*) における被毛中コルチゾール含有量によるストレス評価

3.2.1 小緒	30
3.2.2 材料及び方法	30
3.2.2.1 供試動物	
3.2.2.2 サンプルリング	
3.2.2.3 抽出	
3.2.2.4 測定	
3.2.2.5 統計解析	
3.2.3 結果	31
3.2.4 考察	31

3.3 考察及び結論	33
------------	----

3.4 小活	33
--------	----

第4章 Lumpy Jaw Disease 罹患オオカンガルー (<i>Macropus giganteus</i>) における血漿中エンドトキシン活性値	
4.1 Lumpy Jaw Disease 罹患オオカンガルー (<i>Macropus giganteus</i>) における血漿中エンドトキシン活性値	
4.1.1 小緒	43
4.1.2 材料及び方法	43
4.1.2.1 供試動物	
4.1.2.2 統計解析	
4.1.3 結果	44
4.1.4 考察	45
4.2 自動ハンドヘルド携帯型測定機器 (Portable Test System™) を用いた Lumpy Jaw Disease 罹患オオカンガルー (<i>Macropus giganteus</i>) の血漿中エンドトキシン活性値	
4.2.1 小緒	46
4.2.2 材料及び方法	46
4.2.2.1 供試動物	
4.2.2.2 サンプルング及び測定	
4.2.2.3 統計解析	
4.2.3 結果	48
4.2.4 考察	49
4.3 考察及び結論	50
4.4 小活	50
第5章 総括	
5.1 総括	59
5.2 付記	65
謝辞	66
引用文献	68

第1章

序 章

1.1 緒言

カンガルー類 (Macropods) は、哺乳綱有袋目 (双門歯亜目) カンガルー属の総称で、オーストラリアの乾燥した気候帯に生息し、広大な土地を周遊して生活する移動性の動物である[55, 106]。こうした生活様式のため、カンガルー類を飼育する際は「広ければ広いほど良い」といった原則で他の有袋類や哺乳類の3倍以上の飼育面積が必要とされる[73]。つまり、カンガルー類を飼育展示するには一般的なケージ飼育では困難なことから、多くは比較的広い露天の地面での放飼場、いわゆる Semi-Free Ranging (SFR) の形態で飼育される。ロンドン動物学会ホイップスネイド野生動物公園では、カンガルー類がマーラ (*Dolichotis patagonum*) 及びキバノロ (*Hydropotes inermis*) 等と一緒に約 265ha の草原で SFR されている[6, 85]。国内では、埼玉県立こども動物自然公園 (埼玉県東松山市) やひびき動物ワールド (福岡県北九州市) で、オオカンガルー (*Macropus giganteus*) が、シマオイワラビー (*Petrogale xanthopus*) 等と SFR の形態で飼育されている[50]。

こうした特殊な動物とも言えるカンガルー類の飼育上最も重要視される疾病が、Lumpy Jaw Disease (LJD) である。LJD とは口腔の壊死桿菌症 (Oral necrobacillosis) のことで、ヒトや野生のヒツジ及びカンガルー類の下顎もしくは上顎骨の腫脹が特徴的な侵襲性の高い骨髄炎である[17, 34, 42, 44, 55, 86]。特にカンガルー類においての LJD は、我が国でも古くから「カンガルー病」と呼ばれるほど代表的な疾病で[25]、顔の軟部組織や骨の化膿性病変を主症状とし、進行した場合は全身症状を呈し死に至ることも少なくない[3, 4, 5, 21, 55, 79, 106]。

カンガルー類の LJD の原因菌は *Fusobacterium necrophorum*、*Corynebacterium pyogenes*、*Dichelobacter nodosus* などの壊死桿菌であり、多くの動物の腸内にいる常在細菌である[37, 61, 92]。そのうち *F. necrophorum* が主要原因菌とされており、50 頭の LJD 罹患カンガルー類の創傷部位からの細菌分離では 81% が *F. necrophorum* であったとする報告 [86]や、Oliphant *et.al*[79]が 27 頭の LJD 罹患アカビワラビー (*Macropus rufogriseus*) について調査したところ、*F. necrophorum* が病変の 69% から分離されたとある。一方でヒトの歯周病の研究では、500 種以上の細菌種がヒトの口腔内常在菌として同定されており、歯周病の病因に関与する細菌は多様性が高い[71]。Antiabong *et.al*[4]は、歯肉炎は細菌の多様性を増加させるが、LJD においては、細菌の多様性が低いことを示した。なお、偶蹄類の LJD の主要原因菌である *Actinomyces* (放線菌) については、Samuel *et.al*[86]によるとカンガルー類では病変部から分離できたのは 29% 程度であった。

これらの知見からカンガルー類での LJD の主要原因菌は *F. necrophorum* であると言えよう[9, 21]。*F. necrophorum* はグラム陰性の無芽胞形成嫌気性桿菌で、

その病原メカニズムは複雑でまだ詳細には解明されていない。飼育下カンガルー類における潜在的な歯周病病因菌に関する PCR 調査及び遺伝子配列分析から、LJD の発症には *F. necrophorum* とその亜種及びロイコトキシン遺伝子の検出が同時に生じることが明らかにされている[5]。それらにより口腔粘膜への浸潤を伴う歯肉炎として始まり、隣接する骨に感染が波及し骨髄炎を引き起こすことで LJD は成立する[55]。

つまり、カンガルー類の LJD とは顎または歯根の膿瘍や外傷に起因した細菌性骨髄炎であり[32]、感染の最も多い部位は歯根膜組織で、これはカンガルー類の独特の臼歯の成長の様式、すなわち臼歯の萌出や脱落の際に歯肉が破裂し感染し易い状態になることにも関係している[8, 16]。リスク因子としては、歯石、口腔内損傷、糞便で汚染された飼料、口腔を傷つけるような硬い粗飼料及び劣悪な環境条件が挙げられる[79, 106]。

急性期の LJD の症状は、感染部周囲の広範な腫脹、大量の流涎、歯ぎしり、元気消失、食欲不振及び直腸温の 37.5°C 以上の上昇などである[55]。慢性期では感染部局所の腫脹に加えて悪臭を伴った緑色膿の排出や、患部の疼痛と筋肉壊死などによる摂餌障害を呈し、進行した場合は栄養失調に至るか、口腔病巣から各臓器へリンパ性又は血行性転移によって全身に感染が広がり敗血症に至り死亡する[25]。

根治治療については未だ確立されておらず、対症療法として抗生物質や消炎鎮痛剤などの薬物投与、麻酔下での化膿部の洗浄や抜歯などが実施されているが、様々な試みとして過酸化水素、次亜塩素酸ナトリウムとベタジンによる口腔環境の清浄化と根尖切除及び歯内充填の外科的処置なども行われている[32]。Bakal-Weiss *et.al* [7]は Gan-Garoo Australian Park で飼育されている LJD 罹患オオカンガルーに対してクロルヘキシジンによる殺菌効果を期待し、徐放性クロルヘキシジンワニスを用いた新しい治療法を考案している。馬毛塗料ブラシを用いてワニスを厚さ 1~2mm の層にして口腔内の特に歯肉に塗布することで、クロルヘキシジンが徐放し殺菌する。その結果、治療時間を有意に短縮し再発を予防し得ることを示したが、必ずしも効果的であるとは言えなかった[7]。また 18 頭の LJD 罹患オグロワラビーの治療成績によれば、抗生物質療法のみ行った 8 頭では最初の病変が治癒する前に死亡したが、同様に抗生物質療法と病変部の抜歯を試みた 10 頭についても、最初の病変は治癒しても平均で 14.8±15.7 ヶ月以内に再発しており、1 年以内の再発率は 68.4% であった[59]。

つまり、LJD はカンガルー類にとって最も重要な疾病であるにも関わらず、根治治療が確立されていない今日においては、LJD をいかに未然に防ぐか、つまり予防が第一であることは言うまでもない。そして、予防のためには栄養管理や衛生管理に加えて LJD の病因や疫学及び病態解明など様々な方面からのデ

ータや知見が必要であるものの、未解明な部分が非常に多い。従って、本研究ではカンガルー類の LJD について未だ科学的に実証されていない様々な方面について調査し検証を行うこととした。

疫学については、Kido *et.al* [59]が野毛山動物公園（神奈川）において 54 頭のオグロワラビー（*Wallabia bicolor*）を対象に実施している。この調査によると、54 頭中 22 頭が LJD に罹患しており、その罹患率は 40.7%であった。この罹患率は、Vogelnest & Portas [106]がオーストラリアでの LJD 発生率を報告した 9.5%よりも極めて高値である。この結果について Kido *et.al* [59]は日本とオーストラリアの両地域における給餌内容及び環境要因の差によるものと推察している。口腔内の損傷は月平均気温が 18°Cを下回った 1~4 月および 10~12 月に発生割合が増加していたことから[59]、寒冷ストレスが LJD 発生の要因となっていることが推察できる。また、この寒冷ストレスの影響を示唆した疫学データについては Oliphant *et.al* [79]も LJD のリスク因子として支持している。

前述したようにカンガルー類の LJD の原因となる、*F. necrophorum* を始めとした壊死桿菌類は、腸管内にいる細菌で生体由来であり、自然環境下及び飼育下のいずれにおいても糞便を介して感染している[8, 16, 37]。さらに、LJD は自然環境下と飼育下のいずれの環境でも発症するものの、飼育下での発症が多いとの報告があり [19, 61]、環境要因として前述の給餌内容や寒冷だけでなく飼育面積に関連したストレス負荷も関与していると考えられる。これらのことを鑑みて、本研究ではカンガルー類の LJD を腸内細菌による日和見感染症の一つと定義した。

カンガルー類は移動性の動物であるため[55, 106]、動物園等で飼育されているカンガルー類が、他の動物種と比較して広い飼育面積、SFR の形態などで飼育されていたとしても、その移動には限りがある。つまり、自然環境下と比較した場合、飼育下では糞便汚染など細菌の暴露リスクが高い上に、個体間の干渉や闘争及びその他の物理的障害など飼育下ならではの様々なストレス負荷により免疫力が低下するものと推察出来る。実際に、日和見感染症を含めたカンガルー類の感染症は数多くあり、一度発症すると全身性疾患へ波及することが知られている[74]。

カンガルー類の LJD は糞便汚染による日和見感染症の一つとみた場合に、同じく挙げられるものに寄生虫感染症がある。特に SFR ではその特徴から土壌表面のオーシスト及び虫卵の完全な殺滅を始め、中間宿主動物の排除、早期発見等が非常に困難であることから寄生虫症の防除が難しく問題視される。中でも寄生虫性胃腸炎は原虫類である *Eimeria* 属による急性出血性腸炎が上げられ [107]、育児嚢から出て間もない抵抗力の低い幼若個体は発症すれば死に至ることが多いため、日和見感染症のリスク因子として SFR 下カンガルー類の内部寄

生虫感染状況を把握することも必要である。

しかし、カンガルー類に限らず SFR 下の動物における内部寄生虫調査は、そのアプローチの難しさから国内では関東及び中国地方のサファリパークでの調査[43, 87] を除きほとんど行われていなかった。このため、LJD の疫学及び病態解明に先立って日和見感染症の疫学調査の一つとして、SFR 下のカンガルー類の寄生虫保有状況の実態を調査し検証を行うこととした。

次に LJD を含めた日和見感染症の最も大きな要因とされるストレス負荷について検討した。そもそもストレスとは、Hans Selye の *Adaptive reactions to stress* [89, 90, 91] で示したストレス学説によると、「外部環境からの刺激によって起こる歪みに対する非特異的反応」である。ストレスの原因となるものはストレスラーと呼ばれ、物理的ストレスラー（騒音、放射線など）、化学的ストレスラー（酸素、薬物など）、生物的ストレスラー（炎症、感染など）、心理的ストレスラー（怒り、不安など）に分類される[64, 80, 109, 110]。Hans Selye のストレス学説[89, 90, 91]は、ストレスラーに曝された生体が有害性に適応しようとする生化学的反応である「適応症候群」の理論にあり、これは脳の視床下部及び副腎皮質などのホルモン分泌や自律神経系の神経伝達活動により起こる反応である。この適応症候群の結果として生体はホメオスタシスを維持することができる[89, 90, 91]。Hans Selye は副腎摘出マウスにおいてストレスに対する適応反応は起こらないことから、副腎皮質から分泌されるステロイドホルモンが重要な働きを担うと提唱した[89, 90, 91]。ストレスには生体に有益であるとされる快ストレスと不利益となる不快ストレスとが存在し、いずれにしても過剰なストレスが生体に加わると様々な疾病を引き起こす原因となる。ストレスの診断方法として様々な方法が検討されているが、その中でもストレス関連物質による診断方法は有用性が高い。このストレス関連物質とは肉体的もしくは精神的なストレスを感じた際に、生体の防衛反応として合成され分泌されるものの総称であり、前述したように副腎皮質ホルモンがその代表である。

現在、ストレス関連物質の測定・評価はヒトを含めた様々な動物でのストレス状態の評価の指標、ストレスマーカーとして広く用いられている。比較的よく用いられ容易に測定できるストレスマーカーとしては、副腎皮質ホルモンの一種であるコルチゾールの他に唾液中分泌型免疫グロブリン A (sIgA)、抗酸化力 (BAP)、酸化ストレス値 (d-ROMs) 及びクロモグラニン A などが挙げられる[10, 53, 54, 64, 78, 109, 110]。コルチゾールはストレス負荷の程度によって分泌量の変動し、その反応は大変鋭敏であることが知られている[64, 67, 69, 78, 109, 110]。また、近年注目されているストレスマーカーの一つに、BAP と d-ROMs がある[64]。BAP とは様々な原因で生体内に生じた細胞障害性を有する活性酸素種やフリーラジカルを打ち消す力の程度を示すもので、d-ROMs は、生体の酸化

反応と抗酸化反応のバランスが崩れ、酸化状態に傾き、生体が受けている酸化障害の程度を示したものである。これらが疾病や精神的ストレスにより影響を受け、その血中濃度が増減することが注目され始めている[29, 60, 64, 109, 110]。

以上から、血中のコルチゾールは客観的なストレスマーカーとしてウシ[35, 62]及びグリズリーベア (*Ursus arctos horribilis*) [58]など多くの動物において用いられている。しかしながら、カンガルー類のストレス負荷と LJD の関連性を明らかにした報告はこれまでない。このため、SFR 下のカンガルー類について、特にそのストレス負荷と LJD との関連性を明らかにする必要があると考えた。

さらに、Hans Selye が示したとおり、ストレスマーカーとしてコルチゾールは有用な物質となり得るが、一方で採取時のストレス負荷に影響を受けることも憂慮される。特に SFR 下カンガルー類では、家畜や愛玩動物と異なり人との接触自体がストレスになることも予想され、血液サンプルを用いた評価は採取時の影響も考慮に入れなければならない。そのため、より低侵襲で簡便に採取可能な、かつ血中から移行していることが明らかとなっている生体サンプルでのコルチゾール濃度の測定が可能であればさらに有効であると考えた。

すでに、唾液中のコルチゾールや sIgA を用いた低侵襲的なストレス評価の有効性が検証されている [72] が、これらにはサーカディアンリズムがあるため採材時間を考慮しなければならず、動物園動物のようにサンプリングのタイミングを限定できない調査には困難である。近年、毛からもコルチゾールが検出されることが明らかとなっており[41]、毛中のコルチゾールは毛が成長する間の血中コルチゾール濃度が反映されるため、そのコルチゾール含有量を測定することにより、慢性的なストレスを評価できることが分かっている[70]。

以上から、これまで報告の無い SFR 下のカンガルー類について血漿中の 3 つのストレスマーカーを測定し、LJD とストレス負荷との関連について調査検証した上で、さらに被毛サンプルを用いた被毛中コルチゾール含有量を測定し血中の数値と比較することで、より実践的なストレス評価法の確立と、慢性的なストレス負荷について検証することとした。

続いて、カンガルー類の LJD の病態について検討した。カンガルー類の LJD の主要病因菌は前述したように *F. necrophorum* と言えるが、それらのグラム陰性細菌感染症は、エンドトキシンまたは細菌リポ多糖体として知られているグラム陰性細菌エンベロープなどの炎症誘発性物質が引き金となって、過剰な全身性炎症反応を引き起こす[31]。エンドトキシンはグラム陰性菌の一次病原因子であり、生体に対して強い傷害をもたらす。これはグラム陰性菌の細胞死の際に細菌から放出されて炎症反応を引き起こすためである[23]。感染源から放出されたエンドトキシンはマクロファージからインターロイキン-1 α 及び TNF- α の合成を引き起こし[45]、発熱や白血球減少症、補体活性化、マクロファージの活性

化、代謝産物やミネラル及び急性期反応物質の血漿レベルの変化などの、生体におけるグラム陰性細菌感染時に観察される多くの病態生理学的徴候の原因となる。

つまり、カンガルー類の LJD についても同様の病態があると予想されるが、これまで有袋類自体で血漿中エンドトキシン活性値と LJD に関する比較研究は行われていない。このため、今回の LJD の病態解明について LJD に罹患したカンガルー類の血漿中エンドトキシン活性値について調査し、全身性炎症との関連について検証を行うこととした。

Levin & Bang [63]が 1964 年にカプトガニ (*Tachypleus tridentatus*) の血液凝固におけるエンドトキシンの役割を発見して以来、リムルスアマーバサイトライゼート (LAL) に基づいた多くの測定方法が開発されている [27, 30] が、これらのアッセイは生体外試料用であり非常に煩雑であるため[100]、動物園動物などの臨床現場での診断には不適である。近年、Charles River 社 (Charleston, SC, USA) はエンドトキシンを検出するために Endosafe® Portable Test System (PTS™) という自動ハンドヘルド携帯型測定機器を市販した。この自動小型化 LAL ベースの比色計は 15 分で測定結果を提示することが可能である[26, 38, 39, 96, 100, 101]ことから、PTS™ は従来の典型的な LAL-比濁時間 (KT) アッセイと比較して 75-85% の処理時間の短縮が図れる[39]。つまり、PTS™ は、携帯が可能であり少量の検体で容易にかつ迅速にエンドトキシン活性値を測定出来るため臨床現場など時間に制約がある場合に非常に有用である。

以上から、カンガルー類の LJD の病態解明の一つとしてエンドトキシンと全身性炎症の関連性を検証し、さらには PTS™ を使用して測定可否を確認することで、より現場で検査可能な診断方法の確立を行うこととした。

ひびき動物ワールドは SFR の形態でオオカンガルー約 120 頭とシマオイワラビー約 130 頭及びケナガワラルー (*Common wallaroo*) 4 頭を、また同じ有袋類であるヒメウオンバット (*Vombatus ursinus*) 2 頭 (現在は飼育無し) を飼育している。これはカンガルー類の飼育総数としては国内随一である。今回このひびき動物ワールドの特徴を生かし数多くのサンプリングを行うことで、カンガルー類の LJD について、疫学調査や病態解明に対して様々な知見を集めることを目的として、これまで述べた多方面からの調査を行い検証することとした。

まず第 2 章では糞便汚染についての疫学調査として国内ではほとんど行われていない SFR 下有袋類の内部寄生虫保有状況の実態調査を試みた。次に第 3 章では最初に LJD 罹患個体及び健常個体の血漿中のコルチゾール、BMP 及び d-ROMs を測定し LJD により受けているストレス負荷について評価した上で、より低侵襲なストレス評価方法の開発と慢性的なストレス負荷の評価を行うことを目的に被毛中コルチゾール含有量を測定し検証を行った。さらに第 4 章で

は、LJD の病態解明として特に全身性炎症との関連について血漿中エンドトキシン活性値を指標に調査し、PTS™ を用いて同様に LJD 罹患個体の血漿中エンドトキシン活性値について測定が可能か、またその診断が有用であるかについての評価も行った。そして第 5 章では、これらの成果を総合的にまとめ考察することで、カンガルー類の LJD に対しての今後の対策などについて論じた。

第2章

Semi-Free Ranging 下の有袋類の糞便を用いた

内部寄生虫保有状況の実態調査

2.1 小緒

ケージ内飼育が困難な生態・行動学的特徴を有するカンガルー類では、一般的に SFR の形態で飼育されている [6, 50, 85]。そうした飼育下カンガルー類で最も重要視される疾病が LJD であり、顔の軟部組織や骨の化膿性病変が主症状で、進行した場合は全身症状を呈し死に至ることも少なくない疾病である [3, 4, 5, 21, 25, 79, 106]。LJD の主要原因菌は *F. necrophorum* などの壊死桿菌で、これは動物の腸内などの常在細菌であり [37, 61, 92]、糞便汚染による日和見感染症の一つと言える。糞便汚染に関連した日和見感染症としては、当然ながら寄生虫感染症が第一に憂慮されるものである。SFR 下ではその飼育形態から土壤消毒が困難であり、表面のオーシスト・虫卵の完全な殺滅、中間宿主動物の排除及び早期発見の難しさなどが重なり寄生虫症の防除が難しいと予想される。

しかしながら、SFR における内部寄生虫調査はそのアプローチの難しさもあって国内ではごく一部のサファリパークにおける調査を除き [43, 87] ほとんど行われていなかった。このため、糞便汚染による日和見感染症の調査の一つとして、今回ひびき動物ワールドの SFR 下有袋類について内部寄生虫保有状況の実態を調査し検証を行った。

2.2 材料及び方法

寄生虫保有状況の実態調査が開始された 2006 年時点、ひびき動物ワールドの敷地面積は約 1.8ha、シマオイワラビー約 130 頭、オオカンガルー約 120 頭及びヒメウオンバット 2 頭が SFR されていた (図 2-1)。

2006 年から 2009 年の 7 月ないし 8 月に 1 回 (合計 4 回)、対象種 3 種が頻繁に生活している場で動物種が明らかにされた新鮮糞便のみを選別しそれぞれ約 50 g を採取した (図 2-2)。個体の特定はなされなかったが、当該調査期間中の延べサンプル数 (糞粒数) は 77 で、その内訳としてシマオイワラビー由来 37、オオカンガルー由来 33 及びウオンバット由来 7 となった。これらについてシヨ糖遠心浮遊法 (ウィスコンシン法変法) を実施した。顕微鏡描画装置によりオーシストと虫卵の大きさ (単位 μm) を測定した。なお、検査に供された糞粒は予め重量を測定されていたので、濃厚寄生が示唆された場合に限り EPG 値もあわせ提示した。

斃死した個体については、シマオイワラビー 10 頭及びオオカンガルー 2 頭の 2 種 12 頭を解剖し、消化管を 5 部位 (胃・小腸上部・小腸下部・盲腸・結腸) に大別して切開し、肉眼にて内部寄生虫の有無を確認した後、消化管内容物を部位ごとに沈殿法により処理し、実体顕微鏡下で沈渣から蠕虫類を採取した。検査はひびき動物ワールドに併設された P3 作業室で、感染防護服、手袋、マスク及びゴーグルを着用して行った。採取された蠕虫類は 70% エタノール液で固

定・保存し、線虫の形態はラクトフェノール液により透徹し光学顕微鏡で観察した。観察後の標本は酪農学園大学野生動物医学センターで保存した。

2.3 結果

今回検査した全サンプルから何らかの内部寄生虫由来のオーシストあるいは虫卵（図 2-3 上）が認められ、それぞれの計測値（ μm ）は {} 内に示した。まず、シマオイワラビーでは、*Eimeria* 属のオーシスト {長径 22.6 から 29.5（平均値 27.42）、短径 17.1 から 20.2（平均値 18.55）}、条虫卵 {長径 47.1 から 53.0（平均値 49.36）、短径 30.8 から 35.2（平均値 32.56）} および線虫卵が検出された。条虫卵は内部に梨状器官が包含されたことから（図 2-3 上・中央）、裸頭条虫科 *Anoplocephalidae* のものであった。日本で飼育される有袋類では、アカカンガルー (*Macropus rufus*) での同科条虫 *Progamotaenia (Hepatotaenia) festiva* の多数寄生によると考えられる重篤症例が知られているので[77]、今回の条虫卵が由来した種との異同が注目された。シマオイワラビーの検査で特筆されたこととして、線虫卵はこの動物に由来する全サンプルから見つかったこと、また中には EPG 値 5,000 以上を示したサンプルも散見されたことであった（図 2-3 下）。なお、今回検出された虫卵は、その大きさから大型のタイプ {長径 141.7 から 168.6（平均値 156.05）、短径 67.6 から 80.3（平均値 72.83）} と小型のタイプ {長径 66.2 から 76.1（平均値 70.16）、短径 41.3 から 48.4（平均値 45.44）} が識別された。オオカンガルーからも *Eimeria* 属オーシストが全サンプルから得られた。サイズから大型 {長径 30.6 から 38.0（平均値 33.95）、短径 18.0 から 21.9（平均値 19.42）} と小型 {長径 19.3 から 24.3（平均値 21.40）、短径 10.3 から 14.2（平均値 11.97）} の 2 種の寄生が示唆された。これに加え線虫卵 {長径 138.0 から 162.3（平均値 151.42）、短径 67.9 から 81.7（平均値 73.10）} も検出されたが、条虫卵は得られなかった。一方、ヒメウオンバットでは線虫卵のみが得られ、大型のタイプ {長径 85.4 から 101.0（平均値 95.51）、短径 38.0 から 40.8（平均値 39.45）} と小型のタイプ {長径 60.2 から 69.1（平均値 66.78）、短径 36.5 から 40.2（平均値 39.18）} が認められた。

斃死した全個体の胃腔内から計 541 個体の *Cloacininae* 亜科（科 *Chabertiidae*; *Strongyloidea*: *Chabertiidae* 円虫目）に属する線虫類が検出された。検索表[2, 57, 93]をもとに同定した結果、シマオイワラビーからのものは *Rugopharynx australis*（図 2-5）、*Cloacina pearsoni*（図 2-6）、*C. hydriformis*（図 2-7）及び *Macropoema beveridgei*（図 2-8）と同定された。特に顕著な知見として *R. australis* が今回調べたシマオイワラビーの全個体で見つかったことから、この種がこの飼育個体群で優占的に寄生していたことが判った。一方、オオカンガルーから検出された線虫は雄を欠いたため種までの同定は不可能であったが、*Cloacina*

属のある種であることが判った（図 2-9）。今後の継続的な疫学調査の一助とするため、今回同定された線虫種の形態と計測値（mm）を *sotohira et. al* [95] に準じ図 2-5 から 2-9 に掲載した。

2.4 考察

今回の調査では、調べた 3 種全ての有袋類から線虫卵が検出されたが、この線虫類とはどのようなグループが想定されるかを考察した。自然環境下での有袋類の消化管では円虫類寄生が常態かつ優占すること[14, 28]、円虫類は感染幼虫の経口摂取という単純な感染様式を示すこと[51]、自主検疫時にこの線虫を標的にした駆虫を行っていなかったこと、日本で愛玩飼育されている有袋類にも寄生が認められていること[48]、実際に今回斃死したシマオイワワラビーとオオカンガルーの剖検時に *Cloacininae* 亜科の線虫類が検出されたことなどを総合的に考え合わせると、これら検出線虫卵は円虫類であると推察される。円虫類は、前述したように直接発育型であるため、本施設のように土壌で多数の個体を SFR する場合には、容易に濃厚感染するものと思われ、今回も実際に EPG 値 5,000 以上を示したサンプルも散見された。円虫類は頭部によく発達した歯環を有することから消化管粘膜を損傷し、宿主に病害を与える危険性があるばかりでなく[14, 28, 95, 107]、後述のように他の消化管寄生性ウイルス・細菌・原虫・他蠕虫類との混合感染、さらには強いストレス負荷などが加わった場合、ウマ類で知られるような重篤な円虫症[51]を誘因する危険性も指摘される。

今回、コクシジウム類 *Eimeria* 属の感染も証明されたが、原産地のオーストラリアでは飼育及び野生個体ともにコクシジウム症がよく知られ、その起因のコクシジウム類も 40 種以上が報告されている[28, 107]。とりわけ、オオカンガルーでは、コクシジウム類に対する感受性が高く、成体であっても致命的腸炎が惹起することが知られており [107]、実際に同施設での幼若個体においては少なからず発生している。今回の検査ではヒメウオンバットからコクシジウム類は未検出であったが、この種の野生個体では致死性コクシジウム症の報告があるため[47, 52]、新規個体の導入時の自主検疫では検査項目として追加すべきと考える。さらに、コクシジウム症の増悪化には、前述の円虫症同様、飼育環境に起因するストレス負荷なども関連しているとされている[107]ため、今回の寄生虫症の疫学調査に加え、飼育有袋類におけるストレス状態の把握も行う必要性がある。なお、今回の得られた寄生虫卵あるいはオーシストは、宿主特異性が高いと考えられるものが多く、公衆衛生学的に問題視されるものではなかった。

調べたカンガルー類 2 種の原産地のオーストラリアでは、今回見つかった線虫種は既に知られている [12, 13, 15, 20, 65, 66, 108] が、*C. pearsoni* 及び *M. beveridgei* がシマオイワワラビーから検出されたのは初めてであった（新宿主記

録)。これが導入以前からの寄生であったのか、導入後に新たな寄生をしたのかはこの調査だけでは不明であった。円虫類はカンガルー類の胃に潰瘍形成を惹起することが知られる [14, 28, 107] が、今回の剖検ではそのような病変は認められず、濃厚寄生が死因に繋がった事例も認められなかった。

当施設での内部寄生虫に対する予防や駆虫については、オオカンガルーで育児嚢から出て間もない幼若個体に対してコクシジウムの駆虫を徹底しており、前述したようにコクシジウムによる腸炎による死亡が少なくないためである。しかし、それ以外は SFR ならでは飼育面積や飼育頭数などからその必要性和コストや効果を鑑みれば、現実的ではないため実施していない。

日和見感染症と SFR 形態との関連性について疫学調査の一環として、今回は内部寄生虫の保有状況の実態を調査したが、サンプリングした材料全てにおいて寄生虫が確認されたものの、それについての病原性や疾病との関連性は見られなかった。しかし、SFR 下でのこうした寄生虫卵の撲滅とコントロールは困難であることから、ストレス評価などとも合わせ、今後も継続して調査を続けていくことは重要だと考える。

2.5 小活

2006 年から 2009 年、ひびき動物ワールドで SFR される有袋類 3 種、シマオイワラビー（宿主略号：P）、オオカンガルー（宿主略号：M）及びヒメウォンバット（宿主略号：V）の糞便について寄生虫学的な実態調査を行った。その結果、全サンプルにおいて何らかの内部寄生虫由来のオーシストあるいは虫卵が認められ、*Eimeria* 属のオーシスト（P、M）、裸頭条虫科 *Anoplocephalidae* の虫卵（P）及び円虫類と目される線虫卵（P、M、V）が検出されたので、診断資料の情報蓄積のため、計測値と写真画像を掲載した。また、これらに起因する可能性がある疾病について簡単に論考した。斃死したシマオイワラビーとオオカンガルー計 12 頭の胃腔内から多数の *Cloacininae* 亜科円虫類（*Rugopharynx australis*、*Cloacina pearsoni*、*C. hydriformis*、*Cloacina* sp. 及び *Macropoanema beveridgei*）が検出された。これらのうち、*C. pearsoni* 及び *M. beveridgei* がシマオイワラビーから検出されたのは初めてであった。円虫類は胃潰瘍の原因線虫として知られるが、今回の予備調査では顕著な病変は認められなかったが、潜在的な負荷を与えていることも否定出来ないことから、今後の継続的な調査は重要である。



図 2-1. ひびき動物ワールドで飼育された有袋類で内部寄生虫調査の対象とされた種（上：シマオイワラビー、中央：オオカンガルー、下：ヒメウオンバット）とその飼育状況



図 2-2. サンプルング対象とされた新鮮糞便の状況
(オオカンガルー)

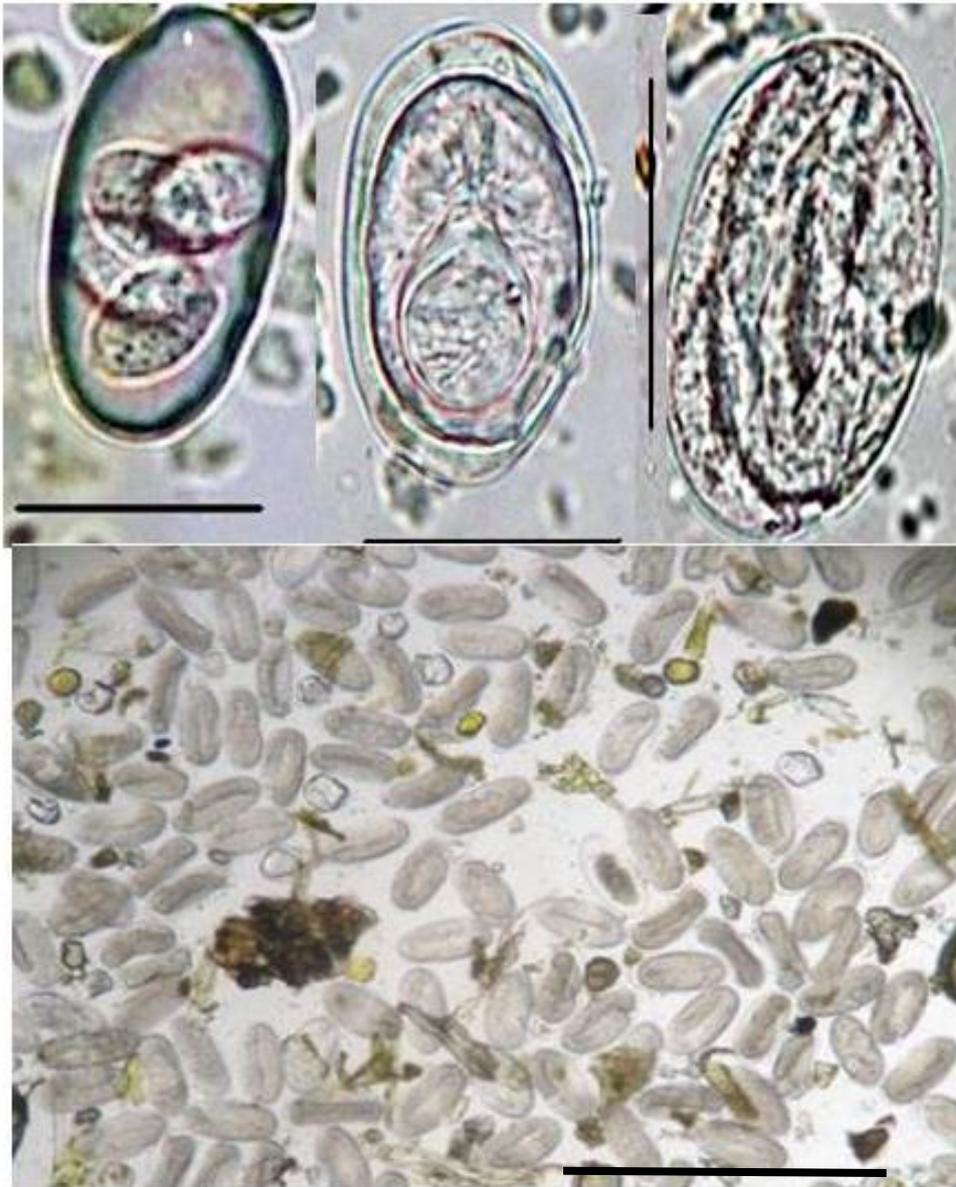
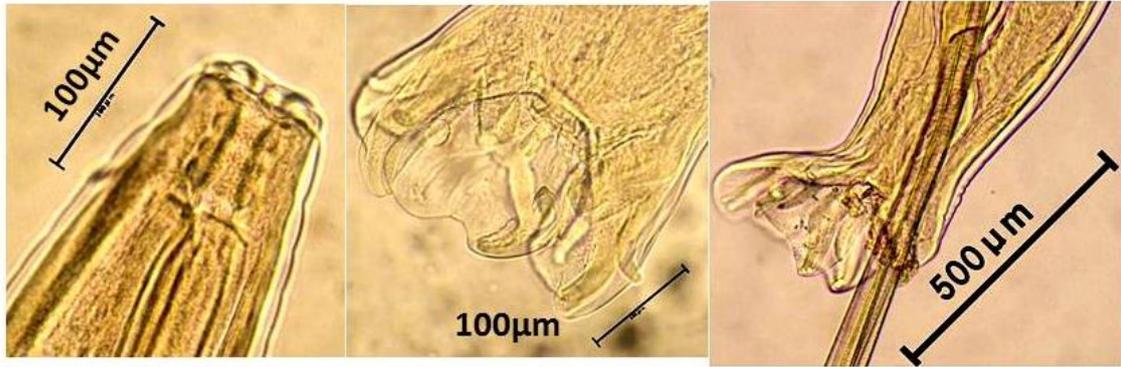


図 2-3 ひびき動物ワールドで飼育された有袋類の糞便から得られた寄生虫試料

上・左: オオカンガルーから得られた *Eimeria* 属オーシスト (Bar=20 μm)、
 上・中央: シマオイワラビーから得られた裸頭条虫科条虫卵 (Bar=30 μm)、
 上・右: ヒメウオンバットから得られた線虫卵 (Bar=50 μm)、下: シマオイワラビーで EPG 値 5,000 以上の線虫卵が認められた事例 (Bar=300 μm)



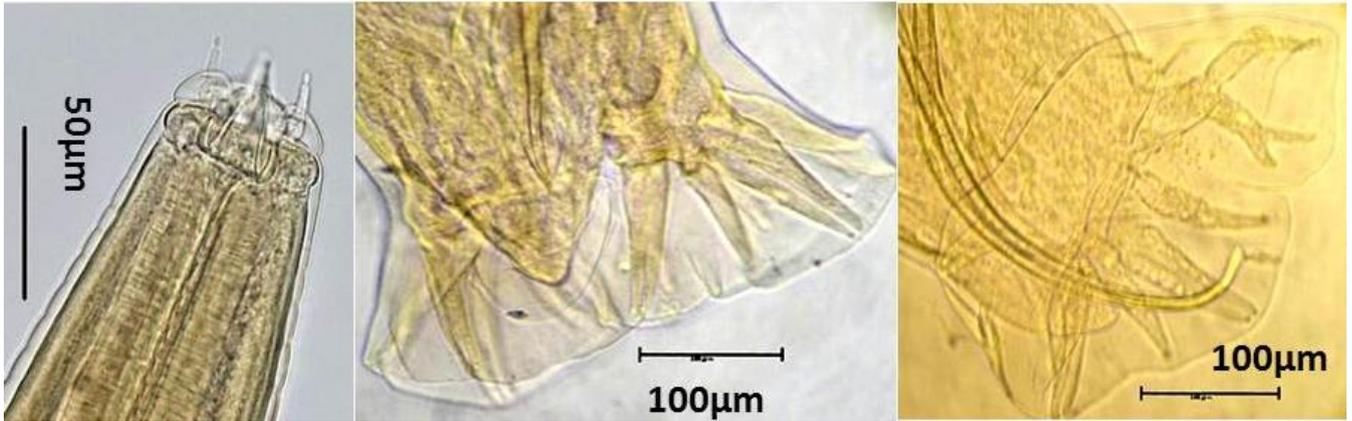
図 2-4 ひびき動物ワールドで飼育された有袋類の胃から得られた寄生線虫
(白色糸状のもの) (Bar=50mm)



性別	N	体長	体幅	咽頭長	食道長	交接刺
雄	10	6.2-7.6 (avg. 6.76)	0.3-0.4 (avg. 0.37)	0.05	0.8-0.9 (avg. 0.82)	1.5-1.9 (avg. 1.71)
雌	10	7.6-10.4 (avg. 9.00)	0.4-0.5 (avg. 0.48)	0.05	0.9-1.0 (avg. 0.93)	—

単位：mm、avg：平均値

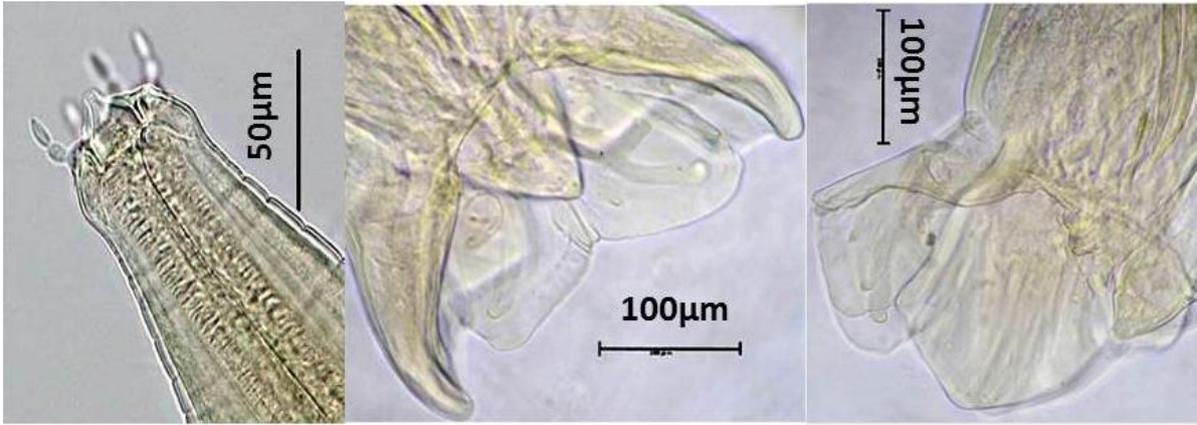
図 2-5 シマオイワラビーから検出された *Rugopharynx australis* の形態と計測値
 写真は雄の頭部（左）、交接囊・腹面（中央）および同・側面（右）



性別	N	体長	体幅	咽頭長	食道長	交接刺
雄	9	7.1-10.3 (avg. 8.63)	0.3-0.5 (avg. 0.41)	0.03	0.5-0.6 (avg. 0.52)	2.0-2.2 (avg. 2.10)
雌	10	8.9-14.2 (avg. 11.89)	0.4-0.7 (avg. 0.54)	0.03	0.5-0.6 (avg. 0.55)	—

単位：mm、avg：平均値

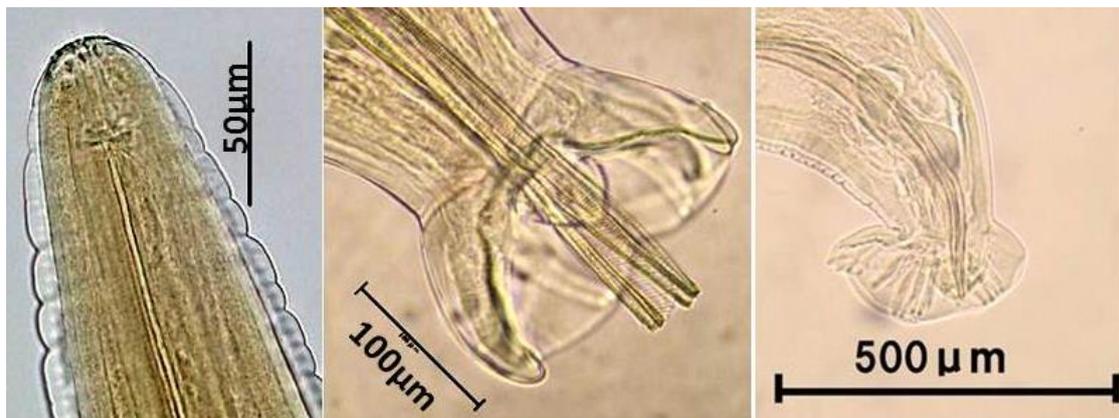
図 2-6 シマオイワラビーから検出された *Cloacina pearsoni* の形態と計測値
写真は雄の頭部（左）、交接囊・腹面（中央）及び同・側面（右）



性別	N	体長	体幅	咽頭長	食道長	交接刺
雄	1	5.85	0.36	0.02	0.54	1.37-1.39.

単位：mm、雌は検出されず

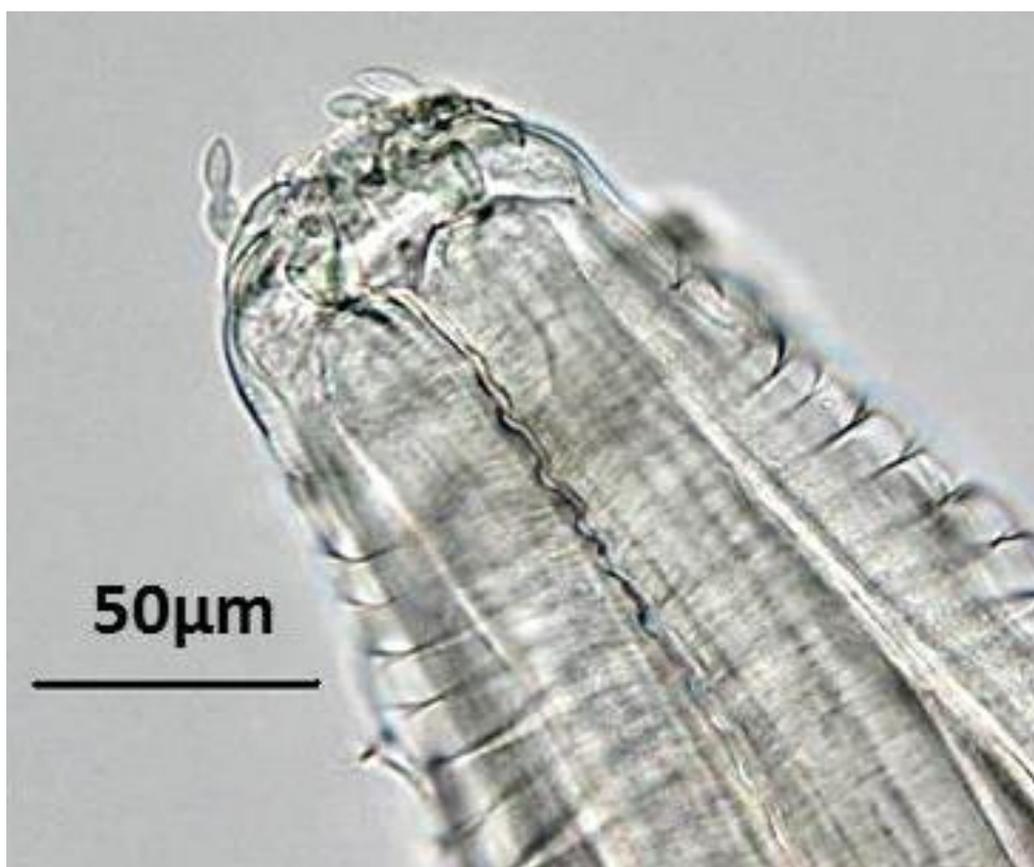
図 2-7 シマオイワラビーから検出された *Cloacina hydriformis* の形態と計測値
 写真は雄の頭部（左）、交接囊・腹面（中央）及び同・側面（右）



性別	N	体長	体幅	咽頭長	食道長	交接刺
雄	9	11.0-15.0 (av.12.35)	0.23	0.04	0.7-0.9 (av. 0.79)	1.1-1.3 (av. 1.18)
雌	10	17.8-26.0 (av.20.70)	0.2-0.3 (av. 0.27)	0.04	0.8-1.0 (av. 0.87)	—

単位：mm、avg：平均値

図 2-8 シマオイワラビーから検出された *Macroponema beveridgei* の形態と計測値
写真は雄の頭部（左）、交接囊・腹面（中央）及び同・側面（右）



性別	N	体長	体幅	咽頭長	食道長
雌	6	15.8-19.7 (avg. 17.94)	0.8-1.0 (avg. 0.93)	0.03	0.6-0.7 (avg. 0.63)

単位：mm、avg：平均値

図 2-9 オオカンガルーから検出された 雌の *Cloacina* sp.の頭部と計測値

第3章

Lumpy Jaw Disease 罹患オオカンガルー (*Macropus giganteus*)

におけるストレス評価

飼育下カンガルー類における LJD について、原因菌の特定や臨床症状の調査、治療法の検討など行われているが、未だ根治治療が確立されず、不明な点が多い疾患である。LJD は自然環境下よりも飼育下の個体での発生が高いこと[19, 61]から、糞便の暴露に加えストレス負荷による免疫力の低下があるものと推察出来る。しかし、実際にストレスとどのように影響しているのかは不明であるため、LJD 罹患カンガルー類のストレス状態を把握することは LJD 病態解明の上で重要である。

血中のコルチゾールは様々なストレス負荷において鋭敏に変動することから、客観的なストレス指標物質として多くの動物に応用されている[35, 58, 62]。また、BAP 及び d-ROMs なども血中ストレスマーカーとして注目されている[64]。

しかし、ストレス状態の指標としてこれらの血中マーカーを測定するためには採血する必要があり、特に SFR 下カンガルー類では、家畜や愛玩動物と異なり人との接触自体がストレスになることも当然予想され、血液サンプルを用いた評価は採取時の影響も考慮に入れなければならない。このため、より低侵襲で簡便に採取可能な、被毛中のコルチゾール含有量を測定することにより、即時的なストレスに左右されない慢性的なストレス状態を評価することができると考えた[70]。

そこで、本章第 1 節では SFR 下の LJD 罹患オオカンガルーの血漿中のストレスマーカーを用いてストレス評価を行い、第 2 節ではストレス負荷の少ないより低侵襲かつ簡便に採取できる被毛中コルチゾール含有量を測定するという新たな方法を用いることで、合わせて評価し検証を行った。

3.1 Lumpy Jaw Disease 罹患オオカンガルー (*Macropus giganteus*) における血漿中マーカーによるストレス評価

3.1.1 小緒

血中のストレス関連物質の測定は、ヒトを含めた様々な動物でのストレス状態の評価に広く用いられている[35, 58, 62]。比較的良く用いられ容易に測定できるストレス関連物質として、コルチゾール、sIgA、BAP、d-ROMs 及びクロモグラニン A などが挙げられる[10, 53, 54, 64, 78, 109, 110]。その中でも、特に多く用いられ認知度も高いコルチゾールは副腎皮質から分泌されるホルモンであり、受けるストレスの程度によって分泌量の変動し、その反応は即応的である [64, 67, 69, 78, 109, 110]。また、近年注目されているストレス状態の評価の指標物質の一つに、BAP (抗酸化力)、d-ROMs (酸化ストレス値) がある。抗酸化力とは様々な原因で生体内に生じた細胞障害性を有する活性酸素種やフリーラジカルを打ち消す力の程度を示すものである。一方、酸化ストレスとは生体の酸化反応と抗酸化反応のバランスが崩れて酸化状態に傾くなど、生体を受けている酸化的障害の程度を示したものである。これらが疾病や精神的ストレスにより影響を受けると、その血中濃度の変動するため注目が集まっている[29, 60, 64, 109, 110]。

これら血中に分泌されるストレス関連物質は、その感度は非常に高く比較的に様々なデータが存在するため、健康状態からの変動の評価や定点測定におけるストレス評価及び推定に有用であることが示されている。しかし、これらのストレス評価がカンガルー類でも可能であることや、さらには LJD との関連性については不明であった。そこで SFR 下のオオカンガルーの LJD 罹患個体及び健常個体の血漿中のコルチゾール、BAP 及び d-ROMs の測定を行いそれぞれ比較することで LJD 罹患個体のストレス状態についての評価と検証を行った。

3.1.2 材料及び方法

3.1.2.1 供試動物

ひびき動物ワールドで SFR されているオオカンガルー約 120 頭のうち、25 頭を供試した。LJD に罹患した個体 13 頭を LJD 群、健常個体 12 頭を対照群とした。LJD の確定診断は、顔面腫脹、体重減少、過剰な唾液分泌、舌が口外へ露出しているなどの臨床所見に基づいて行った[55]。

これら全ての個体へは、草食動物用配合ペレット (ZC Pellets, Oriental Yeast Co., Ltd., 東京)、乾草 (チモシー、アルファルファ)、野菜 (ニンジン、キャベツ、ジャガイモなど) 及びリンゴを給与するとともに、水は自由摂取した。

3.1.2.2 サンプルング

2016年1月14日の午前10時から午後3時までに全てのサンプルングを行い、4 ml の全血を頸静脈よりヘパリン処理シリンジを用いて採血し、採血後1時間以内に室温にて3,000 g、10分間の遠心分離を行った。そして、約1.8 mlの血漿を採取し、サンプルング管 (CryoTube™ バイアル、Nunc, Roskilde, Denmark) に分注し分析まで-30℃で保存した。

3.1.2.3 測定

保存していた血漿サンプルはCortisol Enzyme Immunoassay kit (Arbor Assays, Ann Arbor, MI, USA) を用い、記載されているプロトコルに従ってコルチゾール濃度の測定を行った。また、BAPの測定はフリーラジカル解析装置 (FREE carpe diem、株式会社ウイスマー、東京) と、Biological Anti-oxidant Potential (BAP テスト、株式会社ウイスマー、東京) キットを用いて測定した。BAP テストとは第二鉄イオンを第一鉄イオンに還元できる抗酸化力の血中濃度を測定するテストのことで、2種類の試薬 (第二鉄塩とチオシアン酸塩) を検査直前に混和し比色液を作製し、ここに血漿サンプル 10 µl を添加する。サンプルの生物学的抗酸化能により色調濃度が減少し、この脱色量を波長 505 nm で測定する。この BAP テストで得られた値を BAP 値として統計解析に用いた。d-ROMs は前述のフリーラジカル解析装置と Reactive Oxygen Metabolites Test (d-ROMs テスト、株式会社ウイスマー、東京) キットを用いて測定した。d-ROMs テストとは血漿サンプル 20 µl と呈色液クロモゲンと反応させ活性酸素・フリーラジカルによる代謝物であるヒドロペルオキシド量を測定する。血漿サンプル 20 µl を pH4.8 酸性緩衝液で希釈し、無色のクロモゲン試薬を 20 µl 添加することで、無色のクロモゲンがピンク色に変化した色調を光度計で測定する。この検査法では多種類のヒドロペルオキシドの血中濃度を総合的に数値化しているため、測定結果は仮想の単位である U.CARR が用いられている。この d-ROMs テストで得られた値を、酸化ストレスを表す値として統計に用いた。また、これら測定された値から潜在的抗酸化力を表す指標として BAP/d-ROMs を求め比較検討を行った。

3.1.2.4 統計解析

全てのデータは平均値±標準偏差で示した。統計解析は、SPSS ソフトウェアプログラム (ver. 21、日本 IBM、東京) を用いて解析した。血漿中コルチゾール濃度、d-ROMs 及び BAP、そして計算式である BAP/d-ROMs における LJD 群と対照群との 2 群間の平均値の比較は *F*-検定によって等分散を確認した後に Student's *t*-検定もしくは Mann-Whitney-*u* 検定で解析した。各パラメーターの LJD の診断能については ROC 解析を実施した。ROC 解析の結果、最適なカットオフポイントを Youden 指数[1]によって算出した(至適カットオフ)。Youden 指数(*J*)は、ROC 曲線と感度、特異度がともに 100%を示す頂点との最大垂直距離として定義されており、 $J = \text{最大}[\text{感度} + \text{特異度} - 1]$ として算出した [1]。有意水準は $p < 0.05$ とした。

3.1.3 結果

BAP については LJD 群と対照群の間での有意差は認められなかったが、血漿中コルチゾール濃度、d-ROMs 及び BAP/d-ROMs の各パラメーターにおいては両群間に有意な差が認められた。LJD 群の血漿中コルチゾール濃度は $4.53 \pm 1.97 \mu\text{g/ml}$ であり、対照群の $0.75 \pm 0.86 \mu\text{g/ml}$ よりも有意に高値を示した (図 3-1、 $p < 0.001$)。また、血漿中コルチゾール濃度は LJD の診断能を有しており (AUC=0.968, $p < 0.001$)、至適カットオフポイントは $>1.40 \mu\text{g/ml}$ であり、このときの感度及び特異度はそれぞれ 100% 及び 83.3% であった (図 3-2)。

LJD 群の d-ROMs は $89.08 \pm 13.76 \text{ U.CARR}$ であり、対照群の $62.58 \pm 5.35 \text{ U.CAA}$ よりも有意に高値を示した (図 3-3、 $p < 0.001$)。また、d-ROMs も血漿中コルチゾール濃度と同様に LJD の診断能を有しており (AUC=0.949, $p < 0.001$)、至適カットオフポイントは $>71.5 \text{ U.CAA}$ (感度 92.3%、特異度 100%) であった。潜在的抗酸化力である BAP/d-ROMs は対照群の 42.2 ± 8.1 に対して LJD 群では 29.4 ± 5.8 と有意に低値を示した (図 3-4、 $p < 0.001$)。

3.1.4 考察

本研究における血漿中コルチゾール濃度については、LJD 群が対照群に対して統計学的に有意に高値を示した。コルチゾールは副腎皮質ホルモンである糖質コルチコイドの一種であり、糖代謝をはじめ、蛋白代謝、脂質代謝、電解質代謝、骨代謝、さらには免疫機構に関与しており、生体にとって必須なホルモンである。特にストレスに対する応答が鋭敏に変動するためさまざまなストレス関連の研究の評価の一助として用いられることも多い[53, 54]。LJD 群の血漿コルチゾール濃度が有意に高かったことは、これまでの結果同様、LJD 罹患に

よる患部の炎症及び疼痛、さらにその疼痛により摂餌障害を引き起こしたことからストレス反応が健常個体よりも有意に生じていることが示唆された。コルチゾールは、サンプル採取時にかかるストレス負荷の程度などで鋭敏に変動することから、個体ごとのストレス負荷の影響は無視出来ない [53, 54, 67, 68, 69, 78] が、サンプリングを日中の限られた時間帯内で行ったことで、コルチゾールの朝から夜にかけて徐々に分泌が減少するという特有のサーカディアンリズムの影響についてはある程度回避できたものと考えられる。

BAP については、LJD 群及び対照群の両群間で統計学的有意差は認められなかったものの、LJD 群で対照群と比較し低値を示す傾向が示唆された。これは、LJD 群では発症により抗酸化力が減弱していることによるものと考えられた。BAP は様々な要因で変動する。疾病などによる抵抗力の低下はもちろんのこと、摂取ビタミン不足や食餌内容の影響、運動が及ぼす影響について報告されている [101]。カンガルー類の生態や他の動物における BAP に関連した報告などに基づいて本研究の BAP の両群間の数値の差を推察すると、口腔内に形成された膿瘍や筋肉の傷害により摂餌障害が惹起され、外的な抗酸化物質の摂取に差が生じてしまったこと、LJD に罹患した個体の重症度によっては運動抑制も起こるなど様々な外的要因が影響し、対照群に比べ LJD 群の BAP が低値を示したと考えられた。

また、LJD 群の d-ROMs は対照群よりも統計学的に有意に高値であった。ヒトをはじめとする好気性生物はエネルギー産生に酸素が必須であるが、その一方で呼吸により体内に取り込まれた酸素の一部は通常の状態でも不完全に還元され活性酸素やフリーラジカルとなる。この活性酸素とフリーラジカルが体内の蛋白質を変性させ、酵素の失活や、遺伝子と反応した場合に核酸塩基酸化分解や突然変異などを生じ、増大に伴って老化・発癌・炎症など多くの疾患に関与する [29, 80]。このため、LJD 罹患により炎症や膿瘍により活性酸素やフリーラジカルが増大し、炎症反応が増幅され d-ROMs が上昇した可能性や、前述のように LJD に罹患すること自体で摂餌障害や疼痛によるストレス及び運動抑制などが生じ、BAP の低下によって相対的に d-ROMs が増大したことで、その値が上昇したものと推察する。

潜在的抗酸化力を示すとされる BAP/d-ROMs は、LJD 群で対照群よりも統計学的に有意に低値であった。ヒトにおける研究では、線維筋痛症 (FMS) における酸化バランス防御系の研究がなされており、FMS 患者は健常者のデータと比較し BAP には有意差はないが d-ROMs が有意に高いことから BAP/d-ROMs は低下する。これは酸化バランス防御系でホメオスタシス機構が作動した結果、d-ROMs は高いが BAP はある程度維持されたと考察されている [76]。本研究の LJD 群の結果をヒトの FMS での研究結果になぞらえば、LJD 群でも同様に酸化

バランス防御系におけるホメオスタシス機構が破綻していることが示唆された。

本研究では有袋類としても初のストレス関連物質を測定し、LJD とストレスが密接に関連していることが明らかにすることが出来た。今後も測定数値やその評価に影響を及ぼす様々な要因について配慮しつつ、さらなる検証を続けていくことが重要であると考えた。

3.2 Lumpy Jaw Disease 罹患オオカンガルー (*Macropus giganteus*) における被毛中コルチゾール含有量によるストレス評価

3.2.1 小緒

Hans Selye が示したとおり[89, 90, 91]、ストレス指標として副腎皮質ホルモンであるコルチゾールは有用な指標物質となり得るが、血中コルチゾール濃度はストレスにより鋭敏に変動するため、サンプリング時の捕獲や保定自体がストレスになる飼育下野生動物においては、より低侵襲でサンプリングが可能な生体材料による評価が望ましい。特に SFR 下のカンガルー類から頻繁な採血や唾液の採取を行うのは捕獲や保定ストレスを伴うものである。

近年、毛においてもコルチゾールが検出されることが明らかとなっている[41]。毛中のコルチゾールは毛包細胞に接する血中より供給されると考えられているため、毛中のコルチゾールは毛が成長する過程での血中コルチゾール濃度が反映されることになる。そのため、毛中のコルチゾール含有量を測定することにより慢性的なストレスを評価することが可能である[70]。

そこで、本節では SFR されている LJD 罹患オオカンガルーの被毛中のコルチゾール含有量を測定し、血中での結果と比較検証することとした。より低侵襲で採取可能な実践的なストレス評価法の確立が出来れば、今後 LJD のみならず動物園動物のストレス評価を行う上で有用な指標であることが明らかに出来れば、動物園動物の健康管理においても極めて有用なツールとなり得るものである。

3.2.2 材料及び方法

3.2.2.1 供試動物

ひびき動物ワールドで SFR されているオオカンガルー約 120 頭のうち、62 頭を供試した。そのうち LJD に罹患した個体 37 頭 (6.7±3.1 歳齢、23.9±10.1kg) を LJD 群、健常個体 25 頭 (6.5±3.1 歳齢、体重 27.2±11.7kg) を対照群とした。

3.2.2.2 サンプリング

2016 年 1 月 14 日の午前 10 時から午後 3 時までに全てサンプリングを行い、4 ml の全血を頸静脈よりヘパリン処理シリンジを用いて採血し、採血後 1 時間以内に室温にて 3,000 g、10 分間の遠心分離を行った。そして、約 1.8 ml の血漿を採取し、サンプリング管 (CryoTube™ バイアル、Nunc、Roskilde、Denmark) に分注し分析まで -30°C で保存した。被毛は毛刈り用ハサミを用いて腹部及び背部よりそれぞれ約 1 g の被毛を採取した。採取した被毛はチャック付ビニール袋に

入れ、分析まで室温で保存した。

3.2.2.3 抽出

採取・保存していた被毛約 100 mg を秤量して 15 ml の遠沈管に入れ、イソプロパノール 5.0 ml を分注し、ローテーターにより室温で 5 分間攪拌 (12 rpm) して洗浄し、被毛表面の脂溶性物質を除去した。洗浄後、イソプロパノールをアスピレーターにより除去してドラフト内にて約 1 週間自然乾燥させた。乾燥させた被毛をハサミで 5 mm 程度にカットして 40 mg 秤量した後、破砕用チューブ (2.0 ml) に入れ、ジルコニアビーズ (5 mm : 1 個、3 mm : 3 個) を入れて、ビーズ式細胞破砕装置 (MS-100: TOMY、Micro Smash、東京) により破砕した (5,000 rpm、150 sec)。破砕したチューブにメタノール 1.0 ml を分注し、ローテーターにより室温で 24 時間攪拌 (12 rpm) してコルチゾールを抽出した。抽出したサンプルは遠心分離 (10,000 rpm、10 min、室温) した後、上清を 13×100 mm チューブにデカンタで移し、ヒートブロックで 38°C に加温しながら窒素ガスを当てて約 40 分乾固させた。乾固させたサンプルに PBS を 0.3 ml 分注し、約 1 時間振とうさせたのち、サンプルを 1.5 ml チューブに入れて分析まで -30°C で保存した。

3.2.2.4 測定

保存していた被毛からの抽出サンプル及び血漿サンプルは Cortisol Enzyme Immunoassay kit (Arbor Assays、Ann Arbor、MI、USA) を用い、記載されているプロトコルに従ってコルチゾールの測定を行った。

3.2.2.5 統計解析

すべてのデータは平均値±標準偏差で示した。血漿中コルチゾール濃度および被毛中コルチゾール含有量における対照群と LJD 群との比較は *F*-検定によって等分散を確認した後に Student's *t*-検定で解析した。また、被毛中コルチゾール含有量の部位間における比較も同様に行った。

3.2.3 結果

LJD 群の血漿中コルチゾール濃度は対照群よりも高い値を示したが、有意な差は認められなかった (図 3-5)。被毛中コルチゾール含有量において、腹部被毛では LJD 群は対照群に対して有意に高い値を示したが、背部被毛では両群間に有意な差は認められなかった (図 3-6)。また、両群ともに腹部よりも背部被毛中コルチゾール含有量が有意に高い値を示した ($p < 0.05$)。

3.2.4 考察

本節の結果では血漿中コルチゾール濃度は LJD 群と対照群の間に有意な差は認められなかった (図 3-5)。しかし、本章第 1 節での血漿中コルチゾール濃度は LJD 群において有意に高い値を示していた (図 3-1)。これは、本節で用いた LJD 群では治療履歴はあるが現在は小康状態であるという比較的軽症個体が多かったことに起因すると考えた。血漿中コルチゾール濃度は対照群と LJD 群との間に差は認められなかったにもかかわらず、腹部被毛中コルチゾール含有量は LJD 群において対照群よりも有意に高値を示した。近年の研究において慢性的なストレス負荷はヒトやサル of 被毛中コルチゾール含有量を増加させることが報告されており [33, 97, 105]、被毛中コルチゾール含有量は慢性的なストレス評価のバイオマーカーとして有用であることが示唆されている。そのため、本節においても血漿中コルチゾール濃度には反映されない軽症な LJD 罹患オオカンガルーであっても、慢性例であればコルチゾールが長期間にわたって被毛中に蓄積するため、両群間に有意な差として現れることが示唆された。

背部被毛中コルチゾール含有量は、LJD 群及び対照群のどちらにおいても腹部被毛中コルチゾール含有量よりも有意に高値を示した。ウシやイヌにおいて、被毛の色は被毛中コルチゾール含有量に影響することが報告されている [11, 41]。そのため、本節においても背部被毛が茶色であるのに対して腹部被毛は白色であり、被毛の色の違いが含有量の異なった理由であることが示唆された。

また、本研究では腹部被毛中コルチゾール含有量において、LJD 群は対照群よりも有意に高値を示したが、背部被毛中コルチゾール含有量では両群間に有意な差は認められなかった。ウシでは身体の部位によって被毛中コルチゾール含有量が異なることが明らかとなっており [22]、部位や被毛の色など様々な要因によって、背部被毛中コルチゾール含有量では LJD 群と対照群で差が認められなかったのではないかと考えられる。

以上のことから、本研究により被毛を用いたより低侵襲で実践的なストレス評価法が確立され、動物園動物の健康管理においても極めて有用なツールになることが示唆された。さらに、LJD に罹患しているオオカンガルーにおいて血漿中コルチゾール濃度では上昇が認められないような軽症例であっても、腹部被毛中コルチゾール含有量を測定することによって、慢性的なストレス状態を評価出来ることが明らかとなった。

3.3 考察及び結論

第1節でのLJD群の血漿中コルチゾール濃度は対照群よりも有意に高い値を示したのに対して、第2節でのLJD群では対照群に対して有意な差は認められなかった。これは、それぞれで供試した個体群間で症状にばらつきがあったことから、症状の重症化に伴って血漿中コルチゾールが増加することが示唆されたことにあると考えられる。さらに、血漿中コルチゾール濃度を有意に上昇させるLJD個体群は血漿中d-ROMsをも有意に上昇させ、BAP/d-ROMsを有意に減少させる結果となった。

また、第2章で血漿中コルチゾール濃度が対照群と有意差が無かったLJD群においても、腹部被毛中コルチゾール含有量は対照群よりも有意に高値を示すことが明らかとなった。しかしながら、第2章で供試したLJD群は血漿中のBAP及びd-ROMsの測定を行っていないため、コルチゾールの変動に応じて血漿中d-ROMsやBAP/d-ROMsが変動するかどうかは不明であり、今後の調査が必要である。

これらの結果から、LJDに罹患したオオカンガルーについて、他の多くの動物におけるストレス評価と同様に血漿中コルチゾール濃度を用いたストレス評価が可能であることが分かった。また、LJDはBAPには影響しないがd-ROMsを増大させるため結果として酸化バランス防御系でのホメオスタシス機構を乱していること、そのためd-ROMsを用いたLJDのストレス評価が可能であることが明らかとなった。

さらに、LJDの症状などから血漿中コルチゾール濃度では上昇が認められない場合であっても、腹部被毛中コルチゾール含有量を測定することによって慢性的なストレス状態を評価することが可能であることが分かった。つまり動物園動物のストレス評価法としてより低侵襲かつ簡便に採取可能な被毛中のコルチゾール含有量測定は、有用なツールとなり得ることが明らかとなった。

今後は症状の程度だけでなく性別、年齢などがストレスマーカーにどのように影響するかなどの調査も行うことで、よりストレス負荷との関連性が明らかになるものと考えた。

3.4 小活

カンガルー類において、LJDは野生及び飼育環境下のどちらにおいても発症し、特に飼育下の個体に多いことからストレスとの関係性が指摘されているが、実際にストレスがどのように関係しているのかは不明であった。このためLJD罹患カンガルー類のストレス状態を把握することは、LJDの予防や治療において重要な要素となり得ると考え、本研究ではSFR下にあるLJD罹患オオカンガルーの血漿中のストレスマーカーであるコルチゾール、BAP及びd-ROMsを用

いてストレス評価を行った。また採取時のストレス負荷の影響も考慮し、より低侵襲かつ簡便に採取可能な被毛中コルチゾール含有量を測定し比較した。

血漿中コルチゾール濃度は対照群よりも LJD 群で有意に高い値を示した。また、血漿中 BAP は対照群と LJD 群の間に有意な差は認められなかったが、血漿中 d-ROMs は対照群よりも LJD 群で有意に高く、BAP/d-ROMs も同様に対照群よりも LJD 群で有意に高い値を示した。血漿中コルチゾール濃度において対照群と LJD 群の間に有意な差は認められない LJD 罹患オオカンガルーにおいても被毛中コルチゾール含有量では腹部被毛において対照群に対して LJD 群で有意に高い値を示した。

これらの結果から、LJD 罹患オオカンガルーは他の多くの動物におけるストレス評価と同様に血漿中コルチゾール濃度を用いたストレス評価が可能であることが明らかとなった。また、LJD は BAP には影響しないが d-ROMs を増大させることにより、結果として酸化バランス防御系でのホメオスタシス機構を乱しており、d-ROMs を用いた LJD のストレス評価が重要であることが示唆された。さらに被毛を用いたストレス評価が可能かつ有効であることが分かり、動物園動物などへの実践的な新たなストレス評価法についても提示することが出来た。さらに被毛中コルチゾール含有量では血漿中コルチゾール濃度には反映しない軽度なストレス負荷の状態であっても、慢性的なストレス状態については評価可能であることが示唆された。

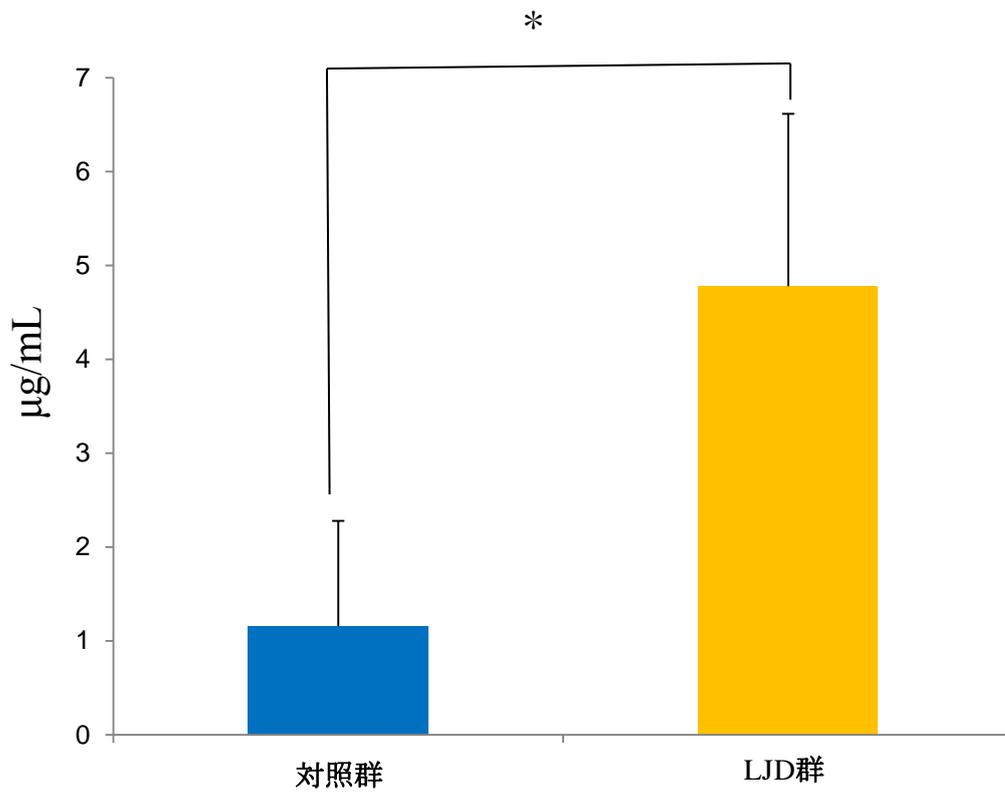


図 3-1 対照群及び LJD 群における血漿中コルチゾール濃度
* : $p < 0.05$

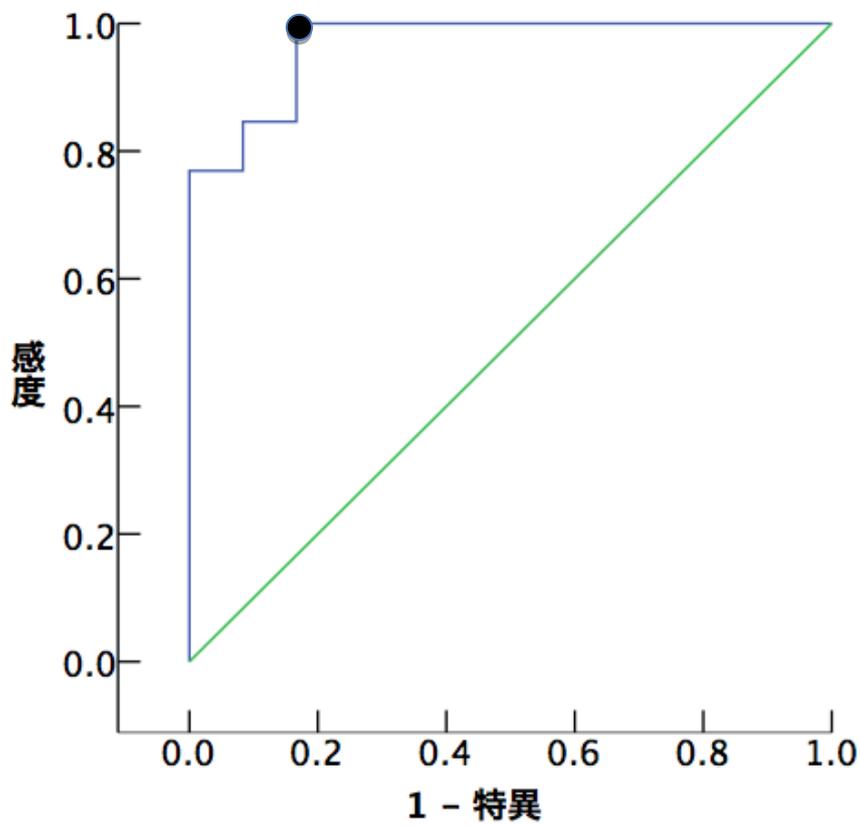


図 3-2 重度の LJD 罹患オオカンガルーを診断するための血漿コルチゾール濃度の ROC 曲線
 至適カットオフポイントは Youden 指数 (J) によって算出した。
 ●は至適カットオフポイント

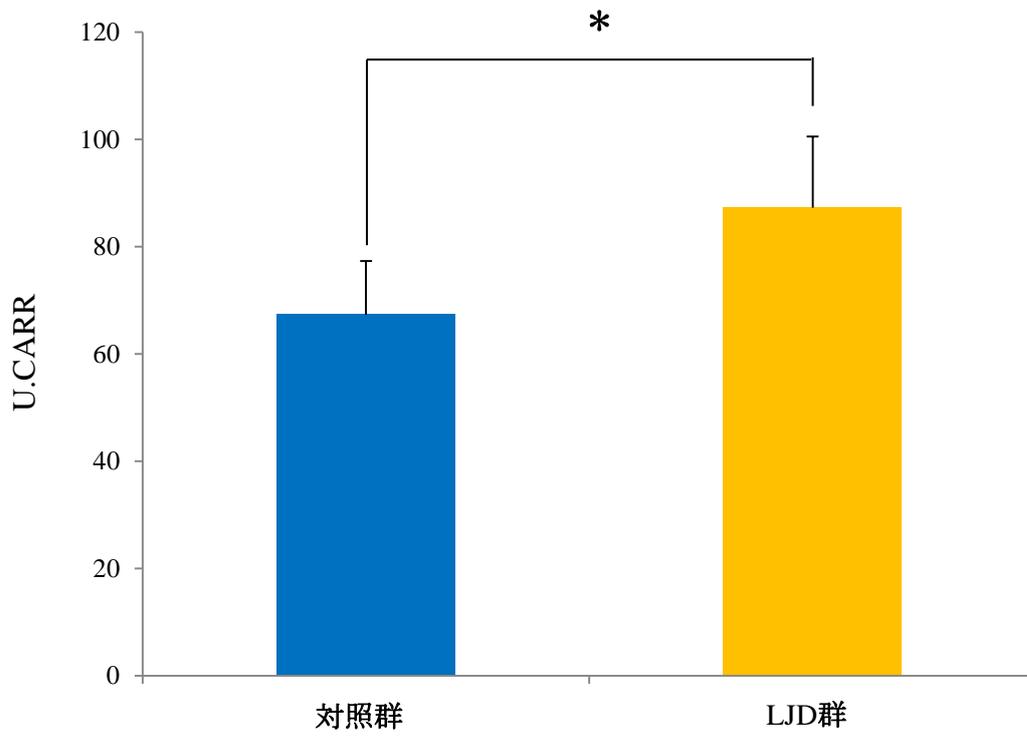


図 3-3 対照群及び LJD 群における血漿中 d-ROMs
* : $p < 0.05$

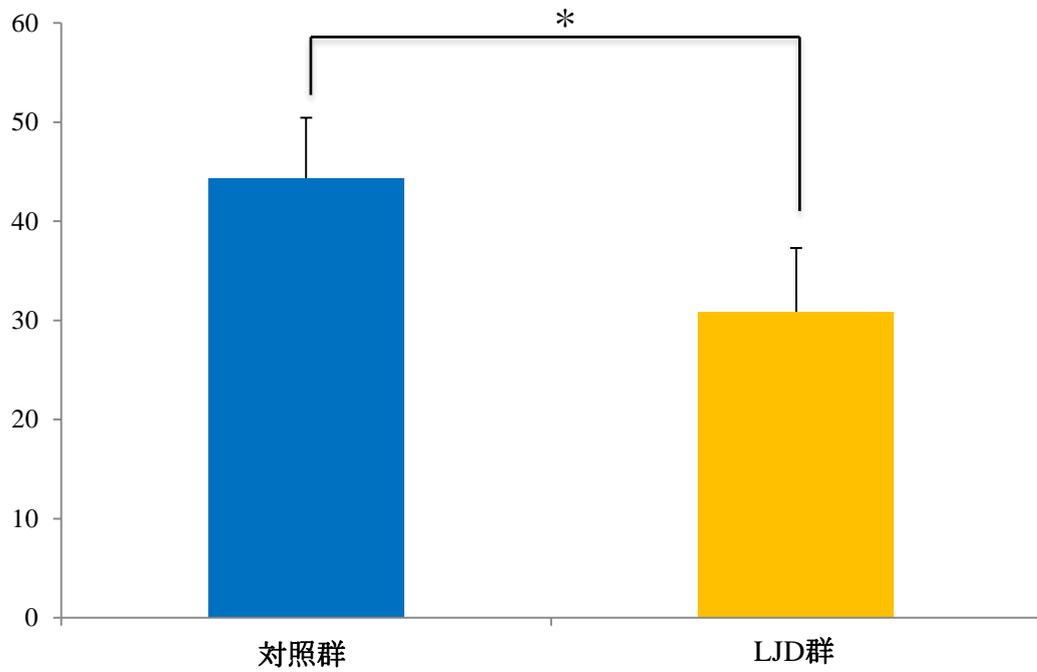


図 3-4 対照群及び LJD 群における BAP/d-ROMs
* : $p < 0.05$

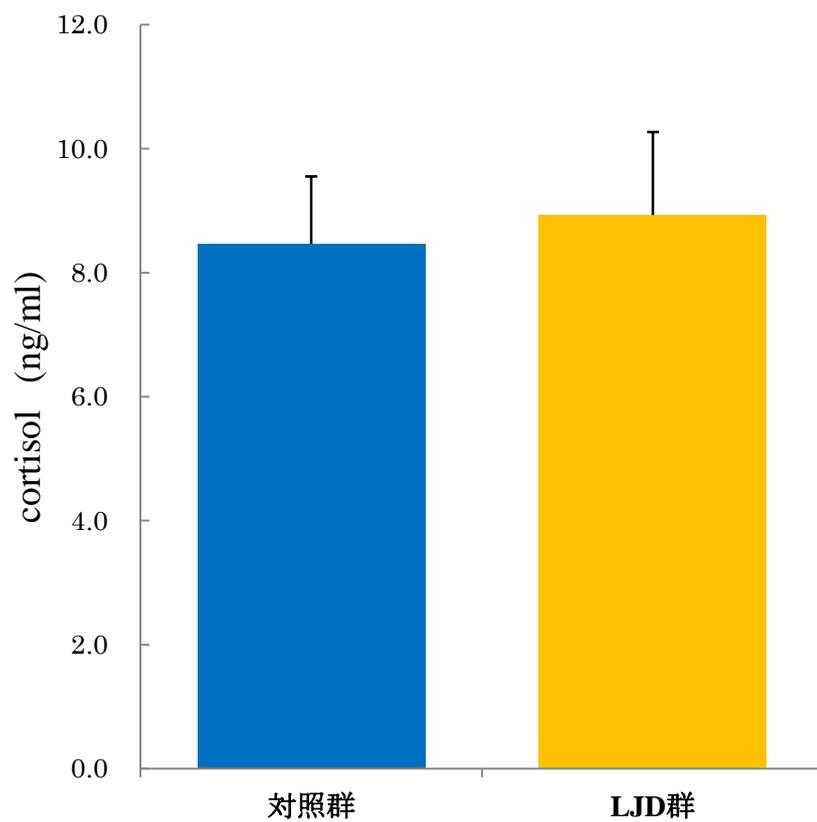


図 3-5 対照群および LJD 群における血漿中コルチゾール濃度
両群間に統計的な有意差無し ($p > 0.05$)

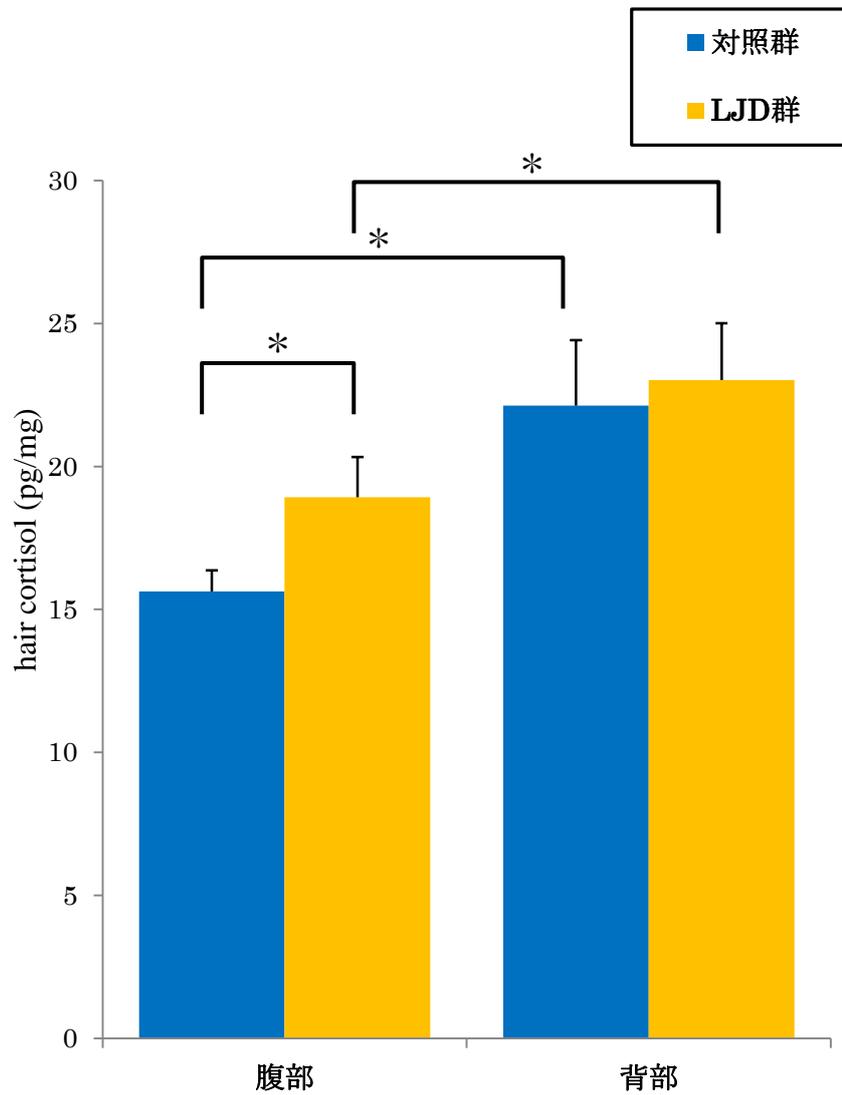


図 3-6. 対照群および LJD 群における被毛中コルチゾール含有量
*: $p < 0.05$

第4章

Lumpy Jaw Disease 罹患オオカンガルー (*Macropus giganteus*)

における血漿中エンドトキシン活性値

LJD はヒトや野生のヒツジ[44] 及び飼育下のカンガルー類[17, 34, 42, 55, 86] の下顎もしくは上顎骨に発生する侵襲性の高い骨髄炎について使用される用語であり、口腔の壊死桿菌症のことであるが、特にカンガルー類では高い死亡原因にもなりうる最も重要視される疾病である[55]。しかし、LJD は今日においても根治治療が確立されていないことから予防が第一であり、そのためには病態解明が鍵となる。

カンガルー類の LJD の主要原因菌である *F. necrophorum* を歯肉粘膜へ感染させることで骨髄炎を起こすことが実験的に証明されており[17]、発症には *F. necrophorum* とその亜種及びロイコトキシン遺伝子の検出が同時に生じることが明らかになっている[5]。それらにより口腔粘膜への浸潤を伴う歯肉炎として始まり、隣接する骨に感染が波及し、骨髄炎を引き起こすことで成立する[55]。

F. necrophorum は動物の消化管などの常在菌でグラム陰性の無芽胞形成嫌気性桿菌である。エンドトキシンはグラム陰性菌の一次病原因子であり、生体に対して強い傷害をもたらす。これはグラム陰性菌の細胞死の際に細菌から放出されて炎症反応を引き起こすためである[23]。感染源から放出されたエンドトキシンはマクロファージからインターロイキン-1 α 及び TNF- α の合成を引き起こし[45]、発熱や白血球減少症、補体活性化、マクロファージの活性化、代謝産物やミネラル及び急性期反応物質の血漿レベルの変化などの生体におけるグラム陰性細菌感染時に観察される多くの病態生理学的徴候の原因となる。つまり、カンガルー類の LJD についても同様の病態があると予想されるが、特に有袋類において血漿中エンドトキシン活性値と LJD の重症度に関する比較研究はこれまで行われていなかった。

このため、LJD の病態解明を目的に LJD に罹患したカンガルー類の血漿中エンドトキシン活性値について、特に全身性炎症との関連性について評価を行うこととした。さらに、動物園などの臨床現場における血漿中エンドトキシン活性値の測定を簡便に行う測定法の開発を目的とした。

すなわち、第 1 節では LJD 罹患オオカンガルーにおいて血漿中エンドトキシン活性値の増加と重症度との相関性を評価し、第 2 節では市販の自動ハンドヘルド携帯型測定機器である PTS™ を使用して LJD 罹患オオカンガルーの血漿中エンドトキシン活性値の測定の可否を確認し、PTS™ によって測定出来た場合は、血漿中エンドトキシン活性値が LJD 罹患オオカンガルーの診断への有用であるかについての解析も同時に行った。

4.1 Lumpy Jaw Disease 罹患オオカンガルー (*Macropus giganteus*) における血漿中エンドトキシン活性値

4.1.1 小緒

有袋類において血漿中エンドトキシン活性値と LJD の重症度に関する比較研究はまだ行われていない。したがって、本節では LJD 罹患飼育下オオカンガルーにおいて血漿中エンドトキシン活性値の増加と重症度との相関性について評価することを目的とした。

4.1.2 材料及び方法

4.1.2.1 供試動物

ひびき動物ワールドで飼育されているオオカンガルー約 120 頭のうち、計 82 頭を供試した。LJD に罹患した個体 36 頭 (5.8±3.2 歳齢、体重 21.2±9.8 kg) を LJD 群とし、健常個体 46 頭 (5.8±3.2 歳齢、体重 23.8±10.6 kg) を対照群とした。LJD の確定診断は、顔の腫脹、体重減少、過度の唾液分泌及び舌の口腔外露出などの臨床所見に基づいて行い[55]、LJD 群のうち食欲不振や活力低下など全身症状を呈して治療が必要な個体 12 頭を重度 LJD 群、過去に罹患歴があり下顎等の変形は見られても現在は治療を必要としない 24 頭を軽度 LJD 群とした。なお、LJD 罹患個体に対する主な治療は、全身症状の改善を目的としたペニシリン系抗生物質を中心とした抗生物質療法及び皮下輸液療法などであった。

4.1.2.2 サンプルング及び測定

エンドトキシン活性値測定のために 4 ml の全血を頸静脈よりヘパリン処理シリンジを用いて採血し、採血後 1 時間以内に室温にて 3,000g、10 分間の遠心分離を行った。そして、約 1.8 ml の血漿を採取しサンプルング管 (CryoTube™ バイアル、Nunc、Roskilde、Denmark) に分注し分析まで-30℃で保存した。測定直前に血漿サンプルをエンドトキシフリー精製水 (大塚製薬 (株)、東京) で 20 倍に希釈し、ボルテックスで 10 秒間攪拌した。次いで、プロテアーゼなどの妨害物質を不活性化するために試料を 80℃で 10 分間加熱した。

全ての試験においてエンドトキシフリー精製水をブランクとして使用した。1 バイアル当たり 10,000 エンドトキシン単位 (EU) を含む USP エンドトキシン標準試料 (RSE、USP エンドトキシン標準ロット G、米国薬局方協会、ロックビル、MD、USA) を陽性対照として使用した。LAL-KT (アッセイ用の LAL 試薬 Endosafe™、KTA2、Charles River、USA) は β-グルカンからの干渉を排除するためにエンドトキシン特異的緩衝溶液 (Charles River) で再溶解した。アッセイは 96 ウェルマイクロプレート (Endosafe™、96 ウェル、平底

マイクロプレート M9001、Charles River、USA) を用い、活性値はマイクロプレートリーダー (Sunrise™、Tecan Group Ltd.、Männedorf、Switzerland) 及び EndoScan-V™ エンドトキシン測定ソフトウェア (Charles River) を用いて測定した。標準曲線 (0.003-3.0 EU/ml) の範囲とし、アッセイの定量下限値は 0.027 EU/ml であった。

4.1.2.3 統計解析

LAL-KT アッセイによる測定結果は duplication において、スパイク回収率及びパーセンテージ変動係数 (CV) パラメーターに基づいて有効性を評価した。米国薬局方のエンドトキシン試験 (Bacterial Endotoxin Test) [104]によると、スパイク回収率が 50-200% の場合は有効であると判定する[26, 38, 39, 56, 96, 98, 99]。標準エンドトキシンを用いて作成した標準曲線の相関係数の絶対値は、米国薬局方のエンドトキシン試験[104]に準じれば重相関で 0.980 以上を有効とした。主に陽性対照の回収率が許容範囲内ないと判断された場合、その試験は有効ではないと判断した[38]。

試料のエンドトキシン活性の統計解析は、SPSS ソフトウェアプログラム (ver. 21. 日本 IBM、東京) を使用して解析した。LAL-KT アッセイから得られたエンドトキシン活性の平均値を Tukey HSD 試験を用いて重度 LJD 群、軽度 LJD 群及び対照群と比較した。さらに LAL-KT アッセイによって測定された血漿中エンドトキシン活性値が LJD の診断能を有するか否かについて ROC 解析を実施した。ROC 解析の結果、最適なカットオフポイントは Youden 指数[1]によって算出した。Youden 指数 (J) は ROC 曲線と感度特異度がともに 100% を示す頂点との最大垂直距離として定義されており、 $J = \text{最大}[\text{感度} + \text{特異度} - 1]$ として算出した。本研究では、J に対応する ROC 曲線のカットオフ値を至適カットオフ値とみなした[1]。なお有意水準は $p < 0.05$ とした。

4.1.3 結果

図 4-1 は血漿中エンドトキシン活性値と LJD との関係を示す。重度 LJD 群の血漿中エンドトキシン活性値は 0.199 ± 0.157 EU/ml であり、軽度 LJD 群 (0.051 ± 0.012 EU/ml、 $p < 0.001$) 及び対照群 (0.057 ± 0.028 EU/ml、 $p < 0.001$) のそれよりも有意に高値を示した。

血漿中エンドトキシン活性値の ROC 曲線下面積は 0.969 ($p < 0.001$) であった。ROC 曲線の分析結果に基づいて、特に重度の LJD 症状を有するオオカンガルーを同定するための血漿中エンドトキシン活性値の診断カットオフポイントは > 0.064 EU/ml に設定し (図 4-2)、このときの血漿中エンドトキシン活性値の診断カットオフ値の感度と特異度はそれぞれ 100% と 88.6% であった。

4.1.4 考察

E. necrophorum などの壊死桿菌症による LJD 罹患オオカンガルーの血漿中エンドトキシン活性値の診断能を評価したところ、軽度 LJD 群では対照群と有意な差はなかったが、食欲不振や活力低下など治療を必要とする全身症状を示す重度 LJD 群では軽度 LJD 群と比較して有意に上昇した。したがって、血漿中エンドトキシン活性値が LJD の全身症状に関連していることが明らかとなった。また、重度 LJD を検出するための ROC 曲線分析に基づく血漿中エンドトキシン活性値の診断上のカットオフは >0.064 EU/ml に設定することができた。この時の血漿中エンドトキシン活性値の診断カットオフの感度および特異性はそれぞれ 100%と 88.6%であった。

これまでこのような調査や検証はなされていなかったが、本研究により SFR 下オオカンガルーにおける LJD の重症度は、血漿中エンドトキシン活性値に関連していることが初めて明らかとなった。このことは、血漿中エンドトキシン活性値の評価が飼育下有袋類における LJD の診断及び予後の有望な診断ツールとなり得ると言えよう。

4.2 自動ハンドヘルド携帯型測定機器 (Portable Test System™) を用いた Lumpy Jaw Disease 罹患オオカンガルー (*Macropus giganteus*) の血漿中エンドトキシン活性値

4.2.1 小緒

Levin & Bang [63]が1964年にカプトガニの血液凝固におけるエンドトキシンの役割を発見して以来、LAL に基づいた多くの測定方法がエンドトキシンの検出と非経口薬物のエンドトキシン試験のために開発されてきた[27, 30]。しかし、これらのアッセイは生体外試料用であり非常に煩雑であるため動物園動物などの臨床現場での診断に用いるには不適である[100]。

近年、Charles River 社はエンドトキシンを検出するために PTS™ という自動ハンドヘルド携帯型測定機器を市販した。この自動小型化 LAL ベースの比色計は15分で測定結果を提示することが可能である[26, 38, 39, 96, 98, 99]。PTS™ は従来の典型的な LAL- KT アッセイ[39]と比較して75-85%の処理時間の短縮が図れる。つまり、PTS™ は小型で携帯が可能であり、極めて少量の検体しか必要とせず迅速かつ容易にエンドトキシン活性値を測定できるため、臨床現場など時間に制約がある場合には有利である。

したがって、より現場で実施可能な検査方法の確立を行う目的で PTS™ を使用して LJD に罹患したオオカンガルーの血漿中エンドトキシン活性値を測定し、標準法である LAL-KT アッセイを用いて PTS™ の信頼性および有用性を評価した上で、PTS™ によって測定した血漿中エンドトキシン活性値が LJD 罹患オオカンガルーの診断に有用であるかについての解析を行った。

4.2.2 材料及び方法

4.2.2.1 供試動物

ひびき動物ワールドで SFR されているオオカンガルー約120頭のうち、計27頭を供試した。LJD に罹患した個体15頭(年齢 3.5 ± 2.2 歳齢、体重 15.5 ± 6.3 kg) を LJD 群とし、健常個体12頭 (3.6 ± 2.3 歳齢、体重 20.5 ± 11.7 kg) を対照群とした。

4.2.2.2 サンプルング及び測定

エンドトキシン活性値測定のために4 ml の全血を頸静脈よりヘパリン処理シリンジを用いて採血し、採血後1時間以内に室温にて3,000g、10分間の遠心分離を行った。そして、約1.8 ml の血漿を採取しサンプルング管 (CryoTube™ バイアル、Nunc、Roskilde、Denmark) に分注して分析まで-30°Cで保存した。測定直前に血漿サンプルをエンドトキシンプリー精製水で20倍に希釈し、ボルテッ

クスで 10 秒間攪拌した。次いで、プロテアーゼなどの妨害物質を不活性化するために試料を 80°C で 10 分間加熱した。

全ての試験においてエンドトキシンフリー精製水をブランクとして使用した。1 バイアル当たり 10,000 エンドトキシン単位 (EU) を含む USP エンドトキシン標準試料を陽性対照として使用した。LAL-KT は β -グルカンからの干渉を排除するためにエンドトキシン特異的緩衝溶液で再溶解した。アッセイは 96 ウェルマイクロプレートを用い、活性値はマイクロプレートリーダー及び EndoScan-V™ エンドトキシン測定ソフトウェアを用いて測定した。標準曲線 (0.003-3.0 EU/ml) の範囲とし、アッセイの定量下限値は 0.027 EU/ml であった。

本節では分光光度計、リーダー及び LAL 試薬カートリッジを含む PTS™ システム (図 4-3) を用いて血漿エンドトキシン活性値の測定を行った。サンプル測定用カートリッジの測定レンジは 1-0.001 EU/ml (Lot # 3183249) である (Charles River Laboratories によって提供されたプロトタイプ)。このカートリッジは適正量の LAL 試薬、緩衝液成分及び β -グルカンブロッカー、発色基質及び対照標準エンドトキシンがカートリッジのチャンネル上で固層化されている。被験サンプルをカートリッジに充填した後、測定とともにスパイク回収を行い、次いで補正コードを入力することで製造会社において実施された力価試験で決定した試薬カートリッジ試験パラメーター及びそのカートリッジバッチの保存曲線に基づいた測定値の補正を行う。本節では、Charles River 社で事前に提示された補正コード (Cal # 419065608093) を用いた。カートリッジには 2 つのサンプルチャンネルと 2 つのスパイクチャンネルがある。分析者が 25 μ l のサンプルをカートリッジサンプルリザーバにロードし、アッセイを開始した後に機器内で被験物は自動的に混合・インキュベートされた。血漿中エンドトキシン活性値が、既知の生成物陽性対照、サンプル変動係数、エンドトキシンスパイク変動係数及びスパイクした参照値の回収率は、外挿機能を含む研究用ソフトウェアによって算出した。本研究では、80°C で 10 分間加熱した 20 倍希釈血漿を用いてエンドトキシン活性値を測定した。結果は自動的にシステムに入力された希釈係数で乗算した。このアッセイの定量下限は 0.050 EU/ml であった。PTS™ の詳細な説明は別に報告されている[26, 56]。

4.2.2.3 統計解析

PTS™ 及び LAL-KT アッセイによる測定結果は duplication において、スパイク回収率及びパーセンテージ変動係数 (CV) などのパラメーターに基づいて本測定が有効であるかを評価した。Bacterial Endotoxin Test[104]によると、スパイク回収率が 50-200% の場合は有効であると判定する[26, 38, 39, 56, 96, 98, 99]。標

準エンドトキシンを用いて作成した標準曲線の相関係数の絶対値は、米国薬局方のエンドトキシン試験[104]に準じれば重相関で 0.980 以上を有効とした。

血漿中エンドトキシン活性値の統計解析は、SPSS ソフトウェアプログラムを使用して解析した。PTS™ 及び LAL-KT の同等性の検定は、複数の検定間の差異を検出するために用いるノンパラメトリック検定であるフリードマン検定を用いて比較した[36]。ピアソンのプロダクトモーメント相関係数により任意の 2 つの連続変数間の関係を評価し、直線回帰式を得るために線形回帰モデル解析を行った。

PTS™ 法から得られた血漿中エンドトキシン活性値の中央値を両群間で比較するため Mann-Whitney U 検定を群間の比較に用いた。PTS™ によって測定された血漿中エンドトキシン活性値が LJD の診断能を有するか否かについては ROC 解析を実施した。ROC 解析の結果、最適なカットオフポイントを Youden 指数[1]によって算出した。Youden 指数 (J) は、ROC 曲線と感度と特異度がともに 100%を示す頂点との最大垂直距離として定義されており、 $J = \text{最大}(\text{感度} + \text{特異度} - 1)$ として算出する。本研究では、J に対応する ROC 曲線のカットオフ点を至適カットオフ点とみなした[1]。有意水準は $p < 0.05$ とした。

4.2.3 結果

LAL-KT アッセイにおける標準曲線の直線性は満足できるものであった ($r^2 = 0.984$)。また、同測定法における血漿中エンドトキシン活性値のスパイク回収率は 82.4% (範囲 73.2-88.5%) で CV 値は 10.9% (範囲 : 0.2-18.5%) であった。これらの値は米国薬局方の基準を満たしていた。PTS™ において、スパイク回収率 (98.3%、範囲 50-180%) 及び CV 値 (11.1%、範囲 2.4-24.4%) のいずれも米国薬局方の基準を満たしていた。

LAL-KT アッセイ及び PTS™ で検出された血漿中エンドトキシン活性値の中央値は、それぞれ 0.206 (0.027-1.06) と 0.222 (0.050-1.43) EU/ml であった。図 4-4 に示すように、PTS™ の測定結果は LAL-KT アッセイの測定結果と良好に相関していた ($r^2 = 0.915$, $p < 0.001$)。また、フリードマン検定の結果によれば PTS™ の血漿中エンドトキシン活性値の測定能力は LAL-KT アッセイのそれと有意に異ならなかった ($p > 0.05$)。

図 4-5 は LJD と血漿中エンドトキシン活性値の関係を示す。血漿中エンドトキシン活性値は対照群の 0.100 EU/ml (範囲 ; 0.05-0.74 EU/ml) に対して、LJD 群では 0.326 EU/ml (範囲 : 0.05-1.56 EU/ml) と有意に高値を示した ($p < 0.05$)。血漿中エンドトキシン活性値の ROC 曲線下面積は 0.793 であり (図 4-6, $p < 0.05$)、Youden 指数に基づいた ROC 曲線から求めた血漿中エンドトキシン活性値による LJD の診断能の至適カットオフポイントは > 0.22 EU/ml に設定できた。この

血漿中エンドトキシン活性値による診断カットオフの感度及び特異度はそれぞれ 80.0%及び 80.0%であった。

4.2.4 考察

壊死桿菌症による全身性炎症を伴う LJD 罹患オオカンガルーの血漿中エンドトキシン活性値を市販の自動ハンドヘルド携帯型測定機器である PTS™ を用いて測定しその診断能の適用性を解析することで、LJD 罹患オオカンガルーにおける全身性炎症の感受性マーカーとして血漿中エンドトキシン活性値が有用であるか否かを評価した。その結果、標準的なエンドトキシン活性値測定法である LAL-KT アッセイと同様に、PTS™ においても ROC 曲線に基づいた LJD の診断基準として > 0.22 EU/ml の診断カットオフポイントを示すことができた。

以上の結果より、PTS™ も有袋類の血漿中のエンドトキシン活性値の測定に適用できることが分かった。また、さらにその測定結果から LJD の重症度を診断出来ることまでが示唆された。つまり、動物園のような臨床現場でも PTS™ を用いることによって簡便にエンドトキシンが検査診断出来ることが、本研究により明らかとなった。

4.3 考察及び結論

カンガルー類の LJD の主要原因菌は壊死桿菌である[9, 21]。病巣からは、主に口腔内の常在細菌などの多種のグラム陰性菌が分離されるが、*F. necrophorum* を歯肉粘膜へ感染させることで骨髄炎を起こすことが実験的に確認される[17] など、これまでの報告 [79, 86] から主要原因菌は *F. necrophorum* と言える。

エンドトキシンは *F. necrophorum* などのグラム陰性菌の一次病原因子であり、動物に対して強い傷害をもたらす敗血症の病態生理学的徴候の原因となる。したがって、それを検知し定量する試みは感染の様々な状態を把握できる。

LAL に基づいた多くの測定方法が薬剤やワクチンのエンドトキシン試験として開発されてきた[27, 30]が、生体外試料用であり非常に複雑であるため[100]動物園などの臨床現場での診断に用いるには不適である。一方で PTSTM は従来の標準的なエンドトキシン活性値測定法であるトキシノメーター法や LAL-KT アッセイ法と比較して操作が簡便であり、かつ測定時間が従来法より短いことから[102]、動物園などの臨床現場での応用が期待できる。

本章では、第 1 節で LJD と血漿中エンドトキシン活性値との関連性を標準的なエンドトキシン活性値測定法である LAL-KT アッセイを用いて評価した。その結果、壊死桿菌症による LJD 罹患オオカンガルーの血漿中エンドトキシン活性値は、全身症状の無い軽度 LJD 群では対照群と有意な差は見られなかったものの、全身症状を示す重度 LJD 群では対照群及び軽度 LJD 群のものと比較して血漿中エンドトキシン活性値が有意に上昇することが明らかになった。

次に、LJD 罹患オオカンガルーの血漿中エンドトキシン活性値について PTSTM を用いて測定し、その診断能を調査することで LJD 罹患オオカンガルーにおける全身性炎症の感受性マーカーとして血漿中エンドトキシン活性値の有用性を評価した。その結果、PTSTM は標準的な LAL-KT アッセイと同様に既知エンドトキシンスパイク回収率は全てが許容範囲内であり、オオカンガルーの血漿中エンドトキシン活性値を効率的に測定することが可能であった。

以上のことから、SFR 下オオカンガルーにおいて LJD の重症度が血漿中エンドトキシン活性値に関連していることが明らかになり、予後判定の評価が可能となった。さらに、PTSTM を用いることで動物園などの臨床現場でも簡便にエンドトキシンが検査診断出来ることが分かり、カンガルー類の LJD の病態解明とその診断において重要なツールになり得ることが提言出来た。

4.4 小活

標準法である LAL 比濁時間法で測定した血漿中エンドトキシン活性値は、中程度 LJD 群 (0.051 ± 0.012 EU/ml, $p < 0.001$) 及び対照群 (0.057 ± 0.028 EU/ml, $p < 0.001$) よりも重度 LJD 群 (0.199 ± 0.157 EU/ml) で有意に高値であった。これらの結果

より、SFR 下オオカンガルーにおいて LJD の重症度が血漿中エンドトキシン活性値に関連していることが明らかになった。

PTS™ の性能は、標準的な LAL ベースのアッセイ系の性能と有意に異ならなかった。また、PTS™ を用いて得られたデータは KT を用いたデータと有意に相関していた ($r^2 = 0.963$, $p < 0.001$)。PTS™ で測定した血漿中エンドトキシン活性値による LJD 診断カットオフポイントは > 0.22 EU/ml であり、血漿中エンドトキシン活性値の評価が飼育下のカンガルー類における LJD 診断に有望な診断ツールとなることが分かった。

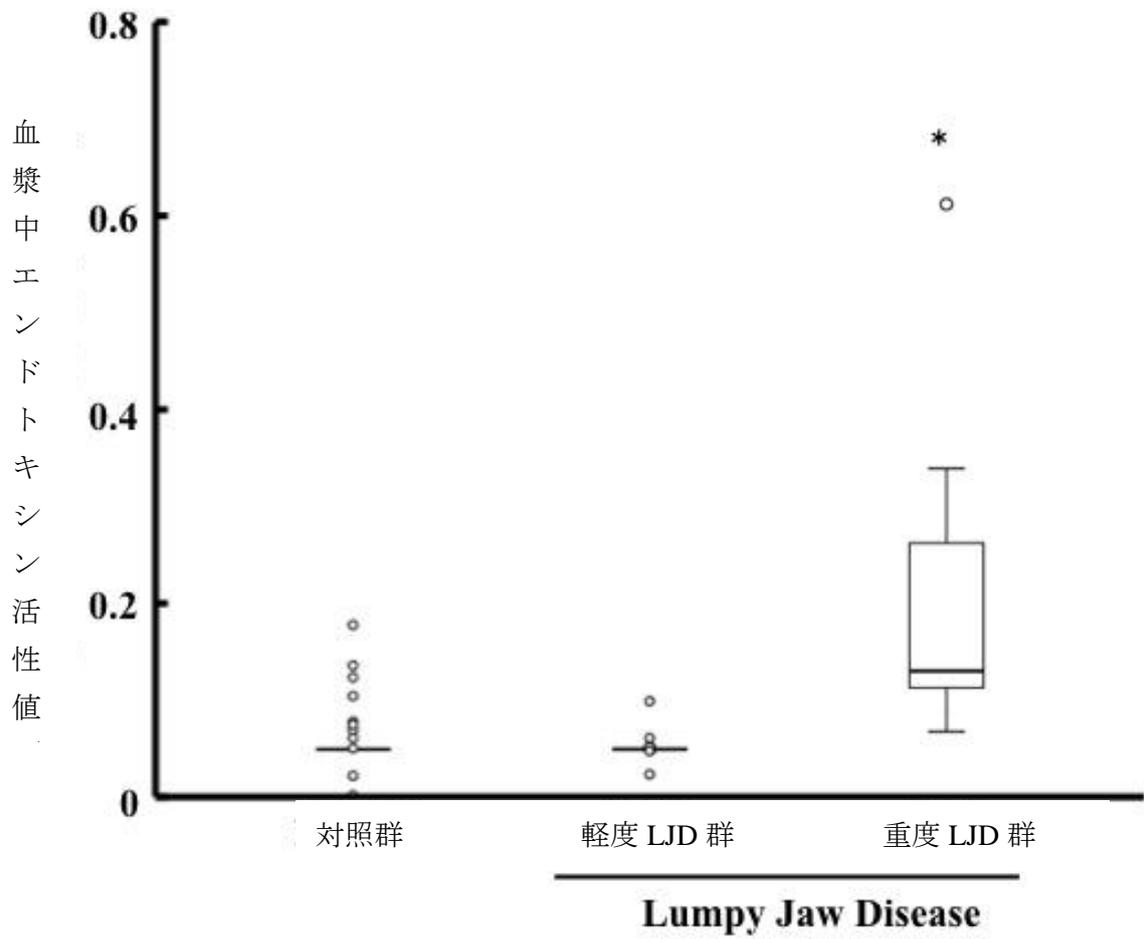


図4-1 軽度及び重度LJD罹患オオカンガルーにおける血漿中エンドトキシン活性値

* : 対照群及び軽度 LJD 群に対して $p < 0.001$

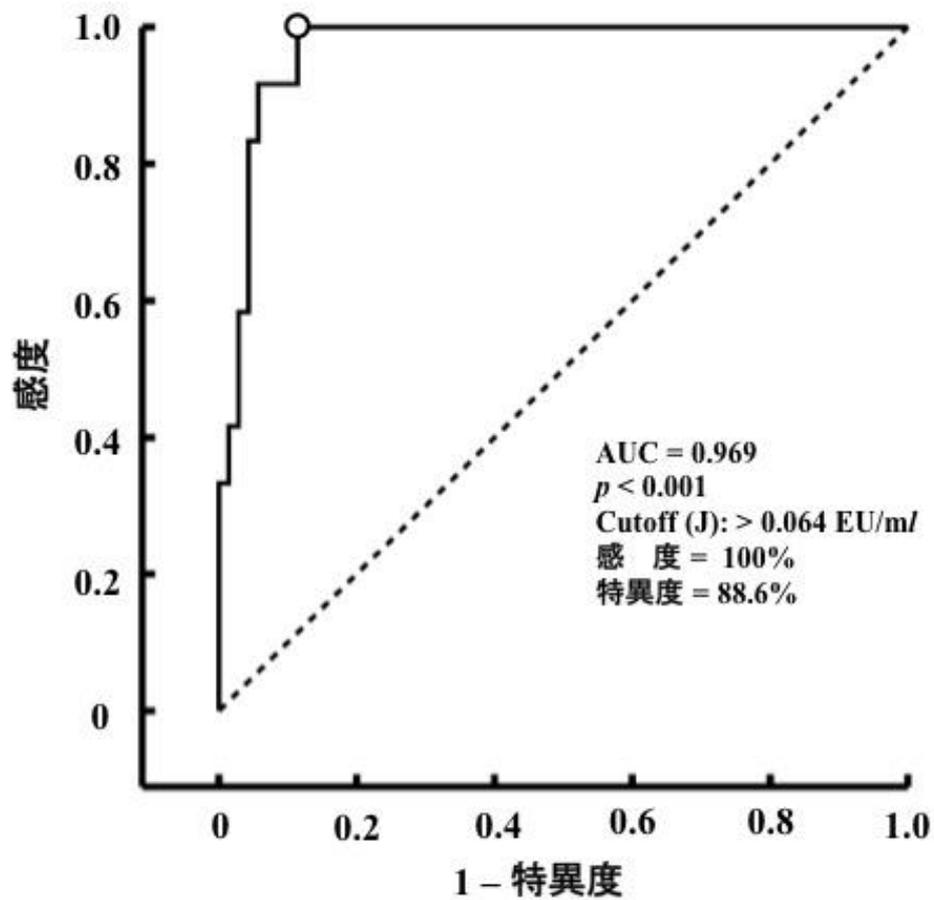


図 4-2 重度の LJD 罹患オオカンガルーを診断するための血漿中エンドトキシン活性値の ROC 曲線
 至適カットオフポイントは Yohden 指数 (J) によって算出した。
 ○オープンサークル：カットオフポイント

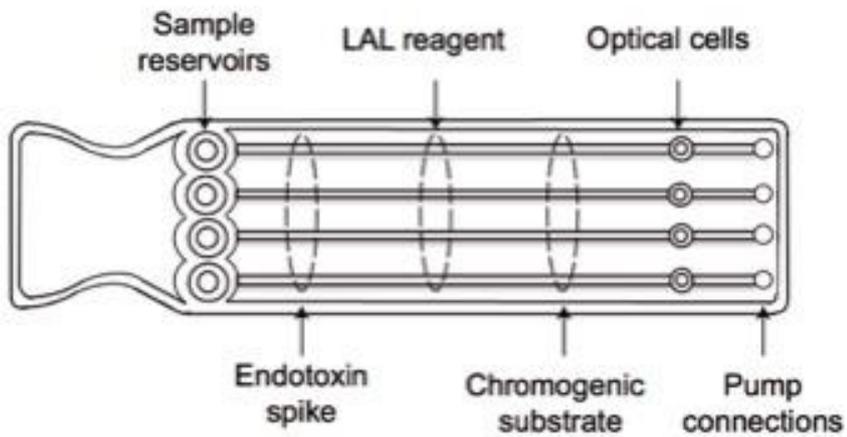


図 4-3 Endosafe® Portable Test System (PTS™) システム
リムルスアメラサイトライセート (LAL) 分光光度計 (上) 及び試
薬カートリッジ (下)

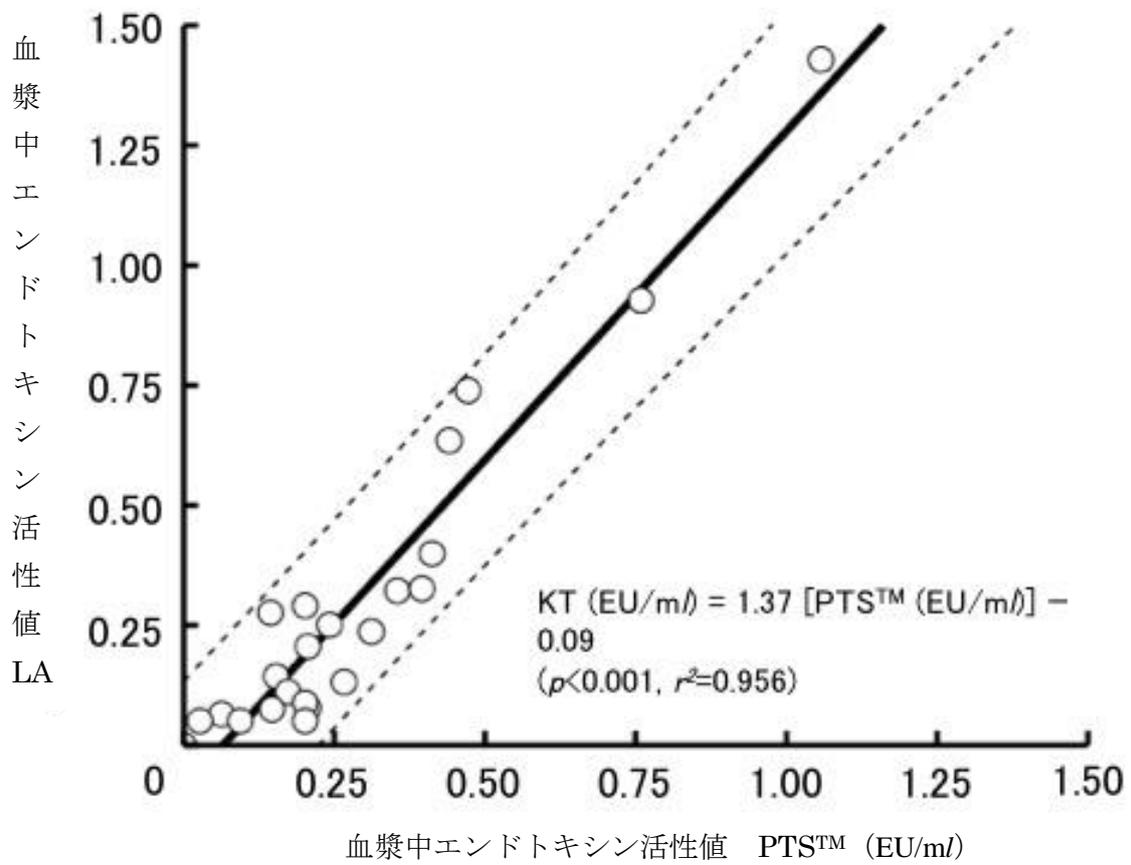


図 4-4 PTS™ と標準的なエンドトキシン活性値測定法である LAL-KT アッセイにおける血漿中エンドトキシン活性値の相関性

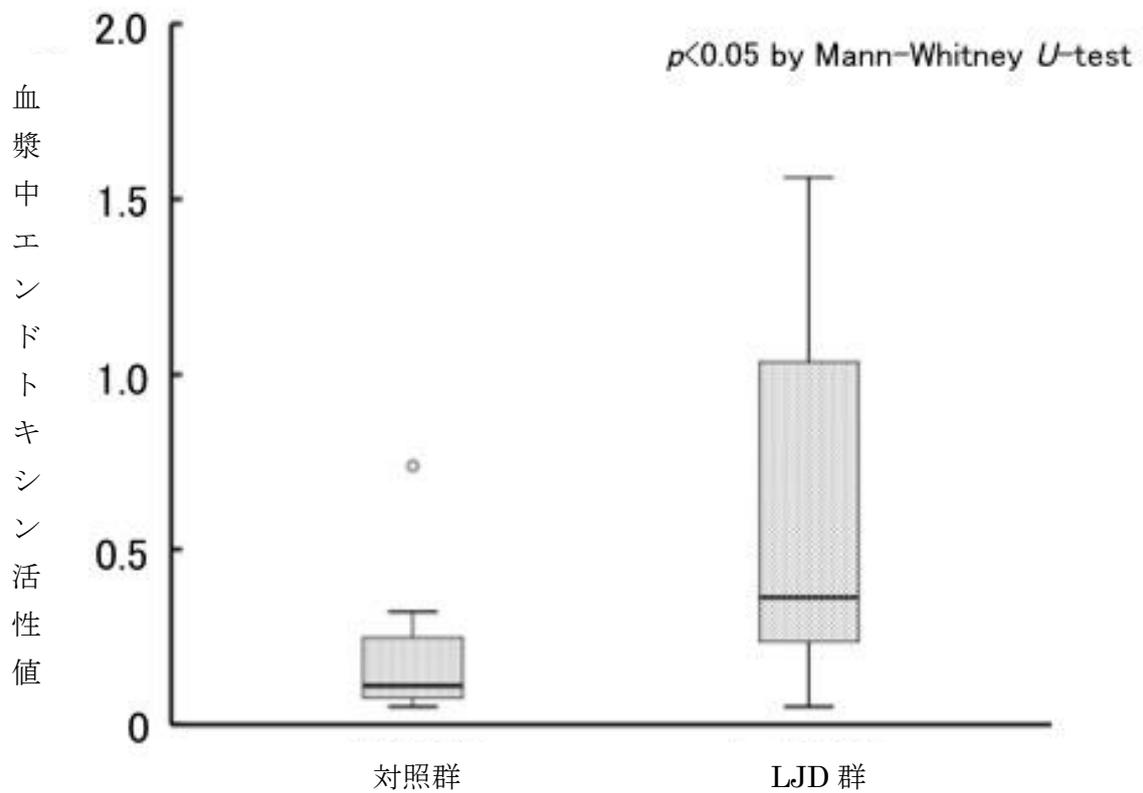


図 4-5 PTS™ によって測定した LJD 罹患オオカンガルーの血漿中エンドトキシン活性値の中央値
 各ボックスの水平線は中央値でボックスは四分位範囲 (25-75 パーセントイル) を表す。異常値は個別に点としてプロットした。
 * : 対照群に対して $p < 0.05$

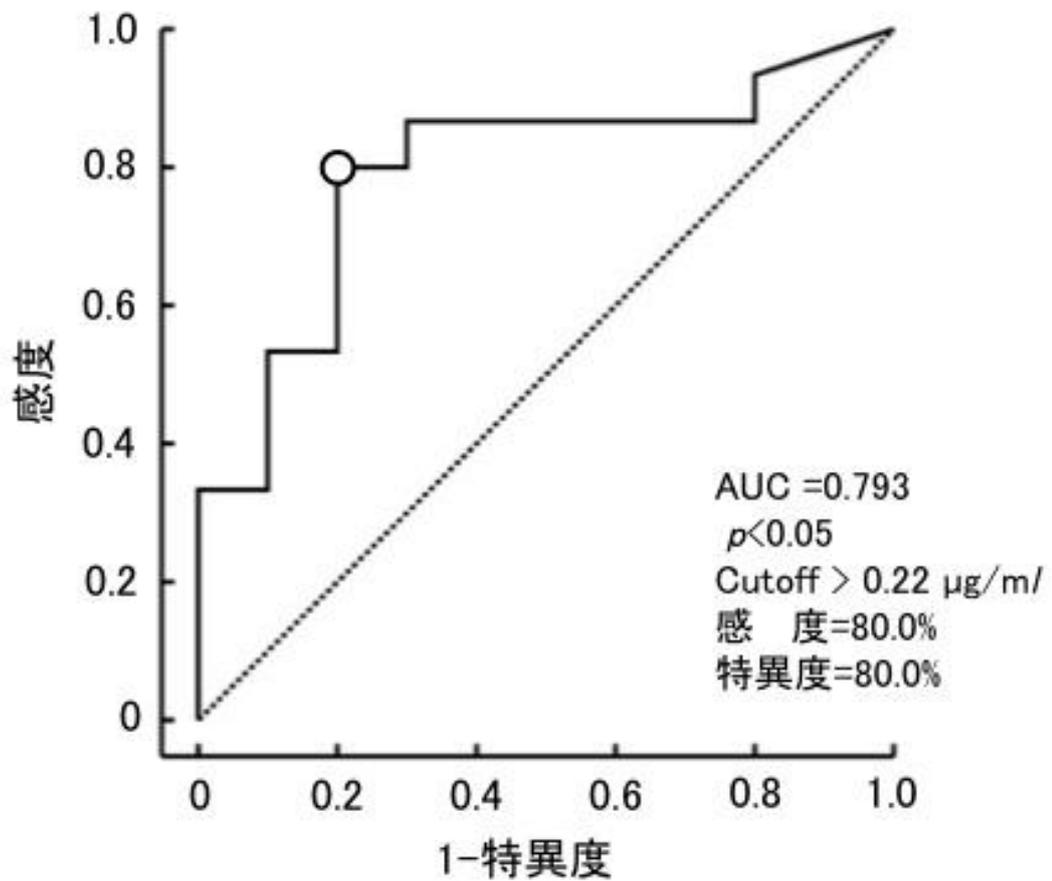


図 4-6 LJD 罹患オオカンガルーを診断するための血漿中エンドトキシン活性値の ROC 曲線
 至適カットオフポイントは Yohden 指数 (J) によって算出した。
 ○オープンサークル：カットオフポイント

第5章

総括

5.1. 総括

カンガルー類はオーストラリアの乾燥した気候帯を周遊して生活する移動性の動物であり、飼育の際には広い面積を必要とすることから世界的に見ても SFR の形態で飼育されていることが多い[6, 50, 85]。

飼育下カンガルー類における LJD は「カンガルー病」と称される程、代表的かつ最も重要視され、慢性経過を辿り死亡する場合も少なくない疾病である[3, 4, 5, 21, 55, 79, 106]。カンガルー類の LJD は主に *F. necrophorum* などの壊死桿菌による口腔内感染症で、顎や歯根の膿瘍など外傷に起因した細菌性骨髄炎である[32]。リスク因子として、歯石、口腔内損傷、糞便で汚染された飼料、口腔を傷つけるような硬い粗飼料及び劣悪な環境条件が挙げられる[79, 106]。

根治治療については未だ確立されておらず、対症療法として抗生物質や消炎鎮痛剤などの薬物投与に加えて様々な試みが行われている[7, 32]が、決して有効とは言えない。

カンガルー類の LJD 罹患率は、我が国の飼育個体において高く、原産地であるオーストラリアの 9.5%の報告[106]に比べ、40.7%との報告もあり [59]、未公開データ（投稿中）であるものの本研究実施施設であるひびき動物ワールドでのオオカンガルーの罹患率は 43.9%である。このように、地域によって LJD の罹患率が大きく違う理由として寒冷ストレスを始めとした環境要因が大きいとされ[19, 59, 61, 79]、原産地においても自然環境下より飼育下での発症が多い[19, 61]ことから、環境要因として寒冷だけでなく、飼育面積も重要な因子であると考えられる。前述したようにカンガルー類は移動性の動物であるため [55, 106]、動物園等で SFR されていてもその移動には限りがある。LJD は自然環境下においても、糞に汚染されやすい場所、糞に接触した裂傷や擦過傷が原因となって発生しており [8, 16, 37]、飼育下という限られた環境では糞便汚染を含めた細菌暴露のリスクがさらに高まる上、個体間の干渉や闘争、その他の物理的障害などより様々なストレス負荷が高まることが予測できる。これらの要因に加え、LJD の原因菌である *F. necrophorum* を始めとした壊死桿菌類は、腸管などの生体由来の細菌であることを考慮すると、カンガルー類の LJD は日和見感染症の一つであると言えよう。実際に、免疫力低下の結果として起こる日和見感染症を含めたカンガルー類の感染症は数多くあり、一度発症すると全身性疾患へ波及することが知られている[74]。

こうした背景から、本研究では飼育下カンガルー類の疾病管理において、LJD を含めた日和見感染症の予防を目的に、国内随一のカンガルー類の飼育頭数を誇るひびき動物ワールドを対象に、多数のサンプルを用いて飼育下カンガルー類の糞便汚染に関する疫学調査を始め LJD とストレス負荷との関連性や LJD の病態解明について解析を行った。

糞便汚染による日和見感染症としては、内部寄生虫感染症が第一に憂慮される。特に SFR の形態では土壌表面のオーシスト・虫卵の完全な殺滅、中間宿主動物の排除、早期発見の難しさなどにより内部寄生虫感染による暴露の可能性は高く問題視される。しかしながら SFR における内部寄生虫調査は、国内では関東及び中国地方のサファリパークでの調査[43, 87] を除き、ほとんど行われていなかった。このため、まず第 2 章では糞便を介した日和見感染症についての疫学調査として、SFR 下カンガルー類ほか有袋類の内部寄生虫保有状況の実態調査を行った。

その結果、全サンプルから何らかの内部寄生虫が認められた。糞便 77 サンプルだけでなく斃死したシマオイワラビー及びオオカンガルー 12 サンプルの胃腔内からは、多数の Cloacininae 亜科円虫類 (*R. australis*, *C. pearsoni*, *C. hydriformis*, *Cloacina sp.* 及び *M. beveridgei*) が検出された。

シマオイワラビーでは、その全サンプルから線虫卵を検出し、特に EPG 値 5,000 以上を示した濃厚感染例も散見された。また、*R. australis* が全斃死個体からのサンプルで見つかったことから、この種がこの飼育個体群で優占的に寄生していたことが分かり、その他に *C. pearsoni* および *M. beveridgei* が初めて検出され、新宿主記録となった。

オオカンガルーの全サンプルからもコクシジウム類 *Eimeria* 属オーシストが得られ、その感染も証明された。オオカンガルーではコクシジウム類に対する感受性が高く、成体であっても致死的腸炎が惹起することが知られており [107]、コクシジウム症の増悪化には、円虫症同様、飼育環境に起因するストレス負荷なども関連しているとされており [107]、SFR 下カンガルー類では特に注意すべき寄生虫感染症である。実際に同施設では袋出後間もない幼若個体がコクシジウム症による出血性腸炎で死亡しており、今後も最も警戒すべき寄生虫であることが示唆された。しかしながら、調査時の全サンプルにおいて宿主の症状との関係性は認められなかったが、例えば胃潰瘍の原因虫である円虫類が検出されたことは、顕著な病変は認められなくても潜在的な負荷を与えているものと考えられた。

以上から、SFR 下では糞便を介した直接発育型の内部寄生虫が多数常在していることが分かった。コクシジウムを除く今回検出された内部寄生虫は、あくまで日和見感染症であり病原性が高いものでは無いが、同施設でのこれらの内部寄生虫の撲滅やコントロールは非常に困難であることから、今後も飼育環境の指標としても継続したモニタリングが重要であることが示唆された。

LJD を含めた日和見感染症は何らかのストレス暴露を受けて免疫機能の低下をきたした生体に対して成立する。例えば Hulbert *et.al* [46]は乳牛の飼養管理がこの十年でめざましい進歩があったにもかかわらず、食餌の急激な変化や飼養

環境によるストレス暴露により、米国では 10 頭に 1 頭の乳用子牛が離乳前に死亡していることを報告した。それ故に、ストレスと日和見感染症との関係は重要視され、動物園動物もその条件は同様であると考えられる。LJD においても発症機序や罹患率、さらにその死亡率のリスクを低減するためには、カンガルー類のストレッサーに対する生理学的応答を理解する必要がある。すなわち、LJD 罹患動物は特にそのストレス負荷との関連性を明らかにすることは発症機序や病態を解明する上で重要である。

現在、ストレス負荷時におけるストレスマーカーの測定とその評価についてはヒトを含めた様々な動物で行われており、特に血中のコルチゾールは様々なストレス負荷において大変鋭敏に反応し変動することから様々な動物で用いられている[35, 58, 62]。また、BAP は生体内の抗酸化力状態の指標であり、d-ROMs テストとともに測定することでストレス状態の総合評価が可能となる[88]。「生体の酸化反応と抗酸化反応のバランスが崩れ、酸化状態に傾き、生体が酸化的障害を起こすこと」が酸化ストレスである[88]。BAP の総合評価は、生体内で産生される過剰なフリーラジカルのレベルを正確に測定することが求められ、実際には過酸化水素や次亜塩素酸などの化学物質の定量も正確にすべきであるものの、活性酸素・フリーラジカルは短い寿命と高い反応性のため生体内の状態を測定することは極めて困難である[88]。これに対して、d-ROMs テストは“*in vivo*”で生じている現象を“*in vitro*”で再現することで酸化ストレスの状態を総合的に評価出来る[88]。何故なら、d-ROMs 値の低いヒトが必ずしも BAP が高いとは限らないからである[49]。

つまり、カンガルー類においても同様にストレスマーカーを測定することで、酸化ストレスやストレス負荷の状態を把握できると予測し、これまでそうした報告がなかった。このため SFR 下のカンガルー類について、特にそのストレス負荷と LJD との関連性を明らかにする目的で、血中のコルチゾール、BAP 及び d-ROMs について調査検証した。さらに、動物園動物では採取時のストレス負荷に影響を受けることも特に大きいと考え、すでに血中からコルチゾールが移行していることが分かっている生体サンプルで、血液よりも低侵襲で簡便に採取可能な「被毛」に着目し、新たなストレス評価の手法として被毛中のコルチゾール含有量を測定評価した。

第 3 章 1 節で SFR 下のオオカンガルーについて、LJD 罹患個体及び健常個体の血漿中のコルチゾール、BAP 及び d-ROMs 濃度を測定し、それぞれのストレス状態の評価を行った。そして、同章 2 節では同じく LJD 罹患個体及び健常個体の血漿コルチゾール濃度の測定値と比較し被毛中コルチゾール含有量を、体の部位と色の異なる被毛を用いてそれぞれ測定した。

その結果、血漿中のコルチゾール、BAP 及び d-ROMs は非常に興味深い値と

なった。LJD 群の血漿中コルチゾール濃度は、対照群よりも有意に高値を示した。また両群間に BAP の有意な差は認められなかったが、LJD 群で対照群よりも低値を示す傾向が示唆された。一方 LJD 群の d-ROMs は、対照群よりも有意に高値であったことから、相対的に対照群よりも BAP/d-ROMs が有意に減少した。つまりこれは、(1) LJD 罹患により口腔内の化膿創より活性酸素やフリーラジカルが増大して炎症反応が増幅され酸化ストレスが上昇、(2) LJD に罹患することにより自由な食餌ができないために相対的に酸化ストレスが増大しているものと思われた。この結果をヒトの FMS での研究結果[76]になぞらえば、LJD 群では酸化バランス防御系におけるホメオスタシス機構が破綻していることが示唆された。また、ROC 曲線の分析結果により LJD 症状を診断するための数値も明らかとなった。

第 3 章 1 節での結果に対して、同章 2 節で測定した血漿中コルチゾール濃度は LJD 群と対照群に有意な差は認められなかった。これは、供試した LJD 罹患個体が異なり、症状にばらつきがあったことが原因と考えた。つまり、症状の重症化に伴って血漿中コルチゾールが増加することが示唆された。さらに、血漿中コルチゾール濃度を有意に上昇させる LJD 個体群は血漿中 d-ROMs をも有意に上昇させ、BAP/d-ROMs を有意に減少させる結果となった。また、同節の血漿中コルチゾール濃度は両群間で有意差が無かったにも関わらず、腹部被毛中コルチゾール含有量は LJD 群では対照群よりも有意に高値を示すことが明らかとなった。近年の研究において慢性的なストレス負荷はヒトやサル¹⁾の被毛中コルチゾール含有量を増加させることが報告されており[33, 97, 105]、被毛中コルチゾール含有量は慢性的なストレス評価のバイオマーカーとして有用であることが示唆されている。そのため、本節においても血漿中コルチゾール濃度には反映されない軽症な LJD 罹患個体であっても、慢性例であればコルチゾールが長期間にわたって被毛中に蓄積するため、両群間に有意な差として現れることが示唆された。

部位による差については、背部被毛中コルチゾール含有量は、対照群及び LJD 群のどちらにおいても腹部被毛中コルチゾール含有量よりも有意に高値を示した。また、腹部被毛中コルチゾール含有量において、LJD 群は対照群よりも有意に高値を示したが、背部被毛中コルチゾール含有量では LJD 群と対照群の間に有意な差は認められなかった。ウシやイヌにおいて、被毛の色は被毛中コルチゾール含有量に影響することが報告されている [11, 41]。そのため、本節においても背部被毛が茶色であるのに対して腹部被毛は白色であり、被毛の色の違いが含有量の異なった理由と考えられ、カンガルー類においても部位や被毛の色など様々な要因によって評価が異なることが示唆された。

これらの結果から、LJD に罹患したオオカンガルーについて、他の多くの動

物におけるストレス評価と同様に、血漿中コルチゾール濃度を用いたストレス評価が可能であることが本研究により明らかとなった。また、LJD は抗酸化力には影響しないが酸化ストレスを増大させるため結果として酸化バランス防御系でのホメオスタシス機構を乱していること、そのため酸化ストレスを用いた LJD のストレス評価が可能であることが明らかとなった。また、血漿中コルチゾール濃度では上昇が認められないような軽度な症状であっても、腹部被毛中コルチゾール含有量を測定することによって慢性的なストレス状態を評価することができることが明らかになった。

すなわち、本研究は LJD とストレス状態との関連性を評価した最初の報告であり、また被毛中コルチゾール含有量を指標としたストレス評価方法は動物園動物という特殊性を考慮した極めて有用な評価方法であることを示すことが出来た。

続いて LJD の病態解明について調査検証を行った。LJD を罹患しても下顎骨の骨髄炎による顎の変形の程度と、死に至るほどの全身性徴候を呈することとは必ずしも一致せず、第 4 章 1 節において 2 歳齢以上の 82 頭中 36 頭のオオカンガルーが LJD に罹患していたが、全身徴候を呈して抗生物質や輸液を中心とした支持療法が必要と判断した重症例は 12 頭 (14.6%) であった。この 14.6% の値はオーストラリアでの LJD 発生率である 9.5% よりも高値であった [106]。その是非はともかくとして全身性徴候を示す重症例と局所徴候のみの軽症例が存在しており、LJD の病態生理学的解明の緒端として症状による違いを明らかにする必要がある。

エンドトキシンは敗血症の様々な病態生理学的徴候の原因となる。したがって、それを検知し定量する試みは感染の様々な状態と予後を把握できるものである。しかし、有袋類全体においてもエンドトキシン活性値について調査された報告は無い。つまり LJD とエンドトキシンとの関連についての調査研究はこれまでなされていなかった。よって第 4 章第 1 節では LAT-KT アッセイを用いて LJD に罹患したオオカンガルーを症状別に分けて血漿中エンドトキシン活性値を測定し、症状との関連性についての評価を行った。さらにそれに基づいて、同章第 2 節では、動物園動物などの臨床現場でもエンドトキシンが検査可能な方法の開発のために PTSTM を用いて同様にオオカンガルーの血漿中エンドトキシン活性値を測定し、その有用性を評価した。

この結果、一般的なエンドトキシン測定法である LAL-KT アッセイでは、全身徴候の見られない軽度 LJD 群では対照群と有意な差は見られなかったものの、全身徴候の見られる重度 LJD 群では対照群及び軽度 LJD 群のものと比較して血漿中エンドトキシン活性値が有意に上昇していた。また、ROC 曲線の分析結果に基づき重度の LJD 症状を同定するための数値も明らかとなった。そして、

PTS™で測定した LJD 群の血漿中エンドトキシン活性値は、LAL-KT アッセイで測定した時と同様に対照群と比べて有意に高値を示した。よって、カンガルー類の血漿中エンドトキシン活性値の判定において、PTS™は迅速かつ簡便にエンドトキシン活性値が検査診断出来ることが分かった。

以上から SFR 下オオカンガルーにおける LJD の重症度は、血漿中エンドトキシン活性値に関連していることが明らかとなり、さらに PTS™を用いることで動物園などの臨床現場において迅速にエンドトキシン活性値が測定出来ることが分かった。そして血漿中のエンドトキシン活性値を測定することは、飼育下有袋類における LJD の診断及び予後判定における有望なツールとなり得ることが明らかとなった。

カンガルー類の LJD は、原産地とは異なる気候の加えて飼育下ならではの環境要因も併せてストレス負荷が増大した結果、免疫力の低下を招き発症する日和見感染症の一つであると考えられる。これらの日和見感染症を防ぐためには疫学、ストレス負荷との関連や病態解明が必要であり、日本最多数の飼育施設であるひびき動物ワールドのカンガルー類を対象に、多くのサンプルが得られたことで、上記の様々な調査と検証を行い多くの知見を得ることが出来た。特にカンガルー類の LJD については本研究によってその疾病管理に対する様々な科学的な知見とデータが集積できた。

すなわち、SFR 下では糞便を介した直接発育型の内部寄生虫に常在的かつ濃厚に感染していることが実態として分かり、糞便汚染の蔓延性が把握できた。これにより、内部寄生虫の撲滅とコントロールが困難な SFR の飼育形態においては、糞便を出来るだけ迅速に除去清掃することや定期的な土壌消毒が必要であり、糞便汚染の暴露を防ぐためにも個体あたりの広い飼育面積が必要であることが一層重要であることが科学的に裏付けられた。

また、LJD 罹患個体ではコルチゾールを始めとしたストレスマーカーが有意に上昇、変化しており、強い酸化ストレスに暴露されホメオスタシスが破たんしている状態を把握することが出来た。このため罹患個体のストレス負荷を軽減し、発症後に全身性症状を引き起こさないようにするための具体的な対処法について検討が必要であり、これまでの対症療法に加え、抗酸化物質の添加や摂取しやすい食餌の形態などを始めとした栄養改善給餌改善を行うこと、運動制限を減らしストレスの憎悪を防止することなどが重要であるとする科学的根拠が得られた。

LJD の病態について、カンガルー類においても血漿中エンドトキシン活性値を測定することにより、全身炎症の把握が可能であり LJD 罹患個体の予後判定に使えることが分かった。つまり、臨床現場においては PTS™を用いて簡便かつ迅速にエンドトキシン活性値を測定出来、今後の予後や症状の憎悪化が予測

可能となった。その結果に基づいてエンドトキシンによる各種症状、血圧の低下や心臓や腎臓及び肝臓などの諸臓器の傷害、DIC などへの治療も早期に行うことが出来るもので、今後さらに活用が広がるものと考ええる。

しかしながら課題も多く、LJD の発症機序と性別や年齢、季節や個体あたりの飼育面積とストレス負荷との関連など、多くは未解明である。また肉眼的な顎の変形、つまり骨髄炎の波及度と全身炎症に及ぶ重症化する要因についての検証や予後判定なども今後さらなる調査が必要である。

だからこそ、今回確立することが出来た被毛を用いたストレスマーカー測定方法や PTSTM での血漿中エンドトキシン活性値測定方法など、臨床現場に適した新たな方法を用いることで、環境改善の指標や重症度と性別年齢その他の要因との関連などさらなる検証を続けていくことが可能であると考ええる。すなわち、本研究によって確立したこれらの簡易なモニタリング方法は、動物園動物など多種多様な動物種を対象とする臨床獣医師にとって、有用なツールとなり得るものであり、今後の飼育管理や感染症予防に貢献に繋がるものとなった。

今後は上記課題についてもさらに研究を続け新たな知見を増やし、飼育下カンガルー類を始め動物園動物の疾病管理の発展に努めていきたいと考える。

5.2. 付記

本研究は、事前に酪農学園大学実験動物委員会に試験計画書を提出して承認されたものである（承認番号：第 VH16D1）。

謝辞

本論文をご審査下さった酪農学園大学大学院獣医学研究科 浅川満彦 教授（主査）、佐野忠士 准教授（副査）、鈴木一由 教授（副査）、林 英明 准教授（副査）及び樋口豪紀 教授（副査）（五十音順）に深謝する。また、日本大学生物資源科学部／よこはま動物園ズーラシア 村田浩一 教授／園長 には本主論文草稿について有益なコメント多数賜った。厚く御礼申し上げる。

また、日本では未販売であるエンドトキシン測定用試薬を提供していただいた米国チャールズリバー社の土谷正和博士に厚く御礼申し上げる。

さらに、飼育動物の健康管理に理解と協力及び指導をくれた到津の森公園 岩野俊郎 園長、津田能理子 獣医師、ひびき動物ワールドの赤平真美 飼育技師及び斎藤純子 飼育技師はじめ飼育技師各位に心より感謝する。

そして今回行った調査のサンプリングは、九州内外の多くの動物園水族館獣医師並びに飼育技師の方々の協力無しには得られなかった、ここに深く感謝申し上げます。

最後に、長期に渡り経済的並びに精神的に支えてくれた家族及び友人にも多大なる謝意を表したい。

本主論文で扱われた調査・研究の一部は文部科学省科研費基盤研究 C（14560271, 18510205, 21580393, 26450431, 26460513）及び2015年度アサヒグループ学術振興財団研究助成でご支援頂いた内容のものが含まれた。

引用文献

1. Akobeng, A. K. 2007. Understanding diagnostic tests 3: receive operating characteristic curves. *Acta. Paediatr.* **96**: 644-647.
2. Anderson, R. C., Chabaud, A. G. and Willmott, S. (eds). 2009. Keys to the Nematode Parasites of Vertebrates, Archival Volume, *CAB International, UK*: 463pp.
3. Antiabong, J. F., Boardman, W., Adetutu, E. M., Brown, M. H. and Ball, A. S. 2013. Does anaerobic bacterial antibiotics decrease fungal diversity in oral necrobacillosis disease? *Res. Vet. Sci.* **95**: 1012-1020.
4. Antiabong, J. F., Boardman, W., Moore, R. B., Brown, M. H. and Ball, A. S. 2013. The oral microbial community of gingivitis and lumpy jaw in captive macropods. *Res. Vet. Sci.* **95**: 996-1005.
5. Antiabong, J. F., Boardman, W., Smith, I., Brown, M. H., Ball, A. S. and Goodman, A. E. 2013. A molecular survey of a captive wallaby population for periodontopathogens and the co-incidence of *Fusobacterium necrophorum* subspecies *necrophorum* with periodontal diseases. *Vet. Microbiol.* **163**: 335-343.
6. Asakawa, M. 2010. Morphological observations on male nematodes of the subfamily Ostertagiinae in captive Chinese water deer (*Hydropotes inermis*: Artiodactyla: Mammalia) at Whipsnade Wild Animal Park, UK. *J. Rakuno Gakuen Univ.* **34**: 223-237.
7. Bakal-Weiss, M., Steinberg, D., Friedman, M., Gati, I., Avni-Magen, N., Kaufman, E. and Lavy, E. 2010. Use of a sustained release chlorhexidine varnish as treatment of oralnecrobacillosis in *Macropus* spp. *J. Zoo. Wildl. Med.* **41**: 371-373.
8. Ball, S. 2013. The oral microbial community of gingivitis and lumpy jaw in captive macropods. *Res. Vet. Sci.* **95**: 996-1005.
9. Barber, D., Campbell, J., Davey, J., Luke, T., Agren, E. and Beveridge, I. 2008. Unilateral failure of development of mandibular premolars and molars in an Eastern Grey kangaroo (*Macropus giganteus*) and its effects on molar progression. *Aust. Vet. J.* **86**: 64-66.
10. Beal, A. M. 1986. Effects of frow rate, duration of stimulation and mineralocorticoids on the electrolyte concentrations of mandibular saliva from the red kangaroo (*Macropus rufus*). *J. Exp. Biol.* **126**: 315-339.

11. Bennett, A. and Hayssen, V. 2010. Measuring cortisol in hair and saliva from dogs: coat color and pigment differences. *Domest. Anim. Endocrinol.* **39**: 171-180.
12. Beveridge, I., Chilton, N. B. and Spratt, D. M. 2002. The occurrence of species flocks in the nematode genus *Cloacina* (Strongyloidea: Cloacininae), parasitic in the stomachs of kangaroos and wallabies. *Austral. J. Zool.* **50**: 597-620.
13. Beveridge, I. and Presidente, P. J. A. 1978. *Rugopharynx rosemariae* sp. nov. (Nematoda: Pharyngostromylidae) from grey kangaroos (*Macropus giganteus* and *M. fuliginosus*) with life cycle stages and associated pathology. *Int. J. Parasitol.* **8**: 379-387.
14. Beveridge, I., Presidente, P. J. A. and Speare, R. 1985. Parasites and associated pathology of the swamp wallaby, *Wallabia bicolor* (Marsupialia). *J. Wildl. Dis.* **21**: 377-385.
15. Beveridge, I., Spratt, D. M., Close, R. L., Barker, S. C. and Sharman, G. B. 1989. Helminth parasites of rock-wallabies, *Petrogale* spp. (Marsupialia), from Queensland. *Aust. Wildl. Res.* **16**: 273-287.
16. Blanden, D. R., Lewis, P. R. and Ferrier, G.R. 1987. Vaccination against lumpy jaw and measurement of antibody response in wallabies (*Macropus eugenii*). *Vet. Rec.* **121**: 60-62.
17. Borland, D., Coulson, G. and Beveridge, I. 2012. Oral necrobacillosis ('Lumpy Jaw') in a free-ranging population of eastern grey kangaroos (*Macropus giganteus*) in Victoria. *Aust. Mammal.* **34**: 29-35.
18. Boulton, K. A., Vogelnest, L. J. and Vogelnest, L. 2013. Dermatophytosis in zoo macropods: a questionnaire study. *J. Zoo. Wildl. Med.* **44**: 555-563.
19. Bradley, A. J., McDonald, I. R. and Lee, A. K. 1980. Stress and mortality in a small marsupial (*Antechinus stuartii*, Macleay). *Gen. Comp. Endocrinol.* **40**: 188-200.
20. Bradley, C., Beveridge, I., Chilton, N. B. and Johnson, P. M. 2000. Helminth parasites of the purple-necked rock wallaby, *Petrogale lateralis purpureicollis*, from Queensland. *Trans. Roy. Soc. South. Austral.* **124**: 37-40.
21. Brookins, M. D., Rajeev, S., Thornhill, T. D., Kreinheder, K. and Miller, D. L. 2008. Mandibular and maxillary osteomyelitis and myositis in a captive herd of red

- kangaroos (*Macropus rufus*). *J. Vet. Diagn. Invest.* **20**: 846-849.
22. Burnett, T. A., Madureira, A. M., Silper, B. F., Nadalin, A., Tahmasbi, A., Veira, D. M. and Cerri, R. L. 2014. Short communication: Factors affecting hair cortisol concentrations in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* **97**: 7685-7690.
 23. Burvenich, C., Bannerman, D. D., Lippolis, J. D., Peelman, L., Nonnecke, B. J., Kehrli, M. E. Jr. and Paape, M. J. 2007. Cumulative physiological events influence the inflammatory response of the bovine udder to *Escherichia coli* infections during the transition period. *J. Dairy Sci.* **90**: 39-54.
 24. Celi, P., Sullivan, M. and Evans, D. 2010. The stability of the reactive oxygen metabolites (d-ROMs) and biological antioxidant potential (BAP) tests on stored horse blood. *Vet. J. Feb.* **183**: 217-218.
 25. 千葉胤孝, 浅井健, 佐藤晴久. 1960 カンガルー病の 3 例. 日獣学誌, 22: 516-517.
 26. Cooper, J. F., Latta, K. S. and Smith, D. 2010. Automated endotoxin testing program for high-risk-level compounded sterile preparations at an institutional compounding pharmacy. *Am. J. Health Syst. Pharmacol.* **67**: 280-286.
 27. Cooper, J. F., Levin, J. and Wagner, H. N. Jr. 1971. Quantitative comparison of in vitro and in vivo methods for the detection of endotoxin. *J. Clin. Med* **78**: 138-148.
 28. Davis, C. L., Fitzgerald, S. and Williams, B. (eds). 2008. Diagnostic Pathology of the Diseases of Aquatic, Aerial and Terrestrial Wildlife 2008. Australia, Australian Registry of Wildlife Health, *Taronga Conservation Society Australia*: 349pp.
 29. 江口裕伸, 藤原範子, 大河原知水, 鈴木敬一郎, 谷口直之. 2009. 酸化ストレスと健康, 生物試料分析, **32**: 247-256.
 30. Elin, R. J. and Hosseini, J. 1985. Clinical utility of the *Limulus amoebocyte lysate* (LAL) test. *Progr. Clin. Biol. Res.* **189**: 307-327.
 31. Erskine, R. J., Tyler, J. W., Riddell, M. G. and Wilson, R. C. 1991. Theory, use, and realities of efficacy and food safety of antimicrobial treatment of acute

- coliform mastitis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **198**: 980-984.
32. Fagan, D. A., Oosterhuis, J. E. and Benirschke, K. 2005. "Lumpy jaw" in exotic hoof stock: a histopathologic interpretation with a treatment proposal. *J. Zoo. Wildl. Med.* **36**: 36-43.
33. Fairbanks, L. A., Jorgensen, M. J., Bailey, J. N., Breidenthal, S. E., Grzywa, R. and Laudenslager, M. L. 2011. Heritability and genetic correlation of hair cortisol in vervet monkeys in low and higher stress environments. *Psychoneuroendocrinology.* **36**: 1201-1208.
34. Finnie, E. P. 1976. Husbandry and diseases of orphaned pouch-young marsupials. *Aust. Vet. Practitioner.* **6**: 19-28.
35. Frese, D. A., Reinhardt, C. D., Bartle, S. J., Rethorst, D. N., Hutcheson, J. P., Nichols, W. T., Depenbusch, B. E., Corrigan, M.E. and Thomson, D. U. 2016. Cattle handling technique can induce fatigued cattle syndrome in cattle not fed a beta adrenergic agonist. *J. Anim. Sci.* **94**: 581-591.
36. Friedman, M. 1937. The use of ranks to avoid the assumption of normality implicit in the analysis of variance. *J. Am. Stat. Assoc.* **32**: 675-701.
37. Frith, H. J. and Calaby, J. H. 1969. 世界動物記 5 カンガルー (白石哲 監訳), 思索社, 東京
38. Fukumori, N. T., de Campos, D. G., Massicano, A. V., de Pereira, N. P., da Silva, C. P. and Matsuda, M. M. 2011. A portable test system for determination of bacterial endotoxins in ¹⁸F-FDG, ^{99m}Tc, and lyophilized reagents for labeling with ^{99m}Tc. *J. Nucl. Med. Technol.* **39**: 121-124.
39. Gee, A. P., Sumstad, D., Stanson, J., Watson, P., Proctor, J., Kadidlo, D., Koch, E.,

- Sprague, J., Wood, D., Styers, D., McKenna, D., Gallelli, J., Griffin, D., Read, E. J., Parish, B. and Lindblad, R. 2008. A multicenter comparison study between the Endosafe PTS rapid-release testing system and traditional methods for detecting endotoxin in cell-therapy products. *Cytotherapy*. **10**: 427-435.
40. Golder, H. M., Lean, I. J., Rabiee, A. R., King, R and Celi, P. 2013 Effects of grain, fructose, and histidine feeding on endotoxin and oxidative stress measures in dairy heifers. *J. Dairy Sci.* **96**: 7881-7891.
41. González-de-la-Vara, Mdel, R., Valdez, R. A., Lemus-Ramirez, V., Vázquez-Chagoyán, J. C., Villa-Godoy, A. and Romano, M. C. 2011. Effects of adrenocorticotrophic hormone challenge and age on hair cortisol concentrations in dairy cattle. *Can. J. Vet. Res.* **75**: 216-221.
42. Hartley, M. P. and Sanderson, S. 2003. Use of antibiotic impregnated polymethylmethacrylate beads for the treatment of chronic mandibular osteomyelitis in a Bennett's wallaby (*Macropus rufogriseus rufogriseus*). *Aust. Vet. J.* **81**: 742-744.
43. 橋本千尋, 山本達也, 斉藤恵理子, 吉野智生, 外平友佳理, 川上茂久, 浅川満彦. 2015. サファリパークで飼育されたネコ科動物の糞便を用いた寄生虫保有状況調査. *野生動物医誌*, **20**: 47-49.
44. Hoefs, M. and Bunch, T. D. 2001. Lumpy jaw in wild sheep and its evolutionary implications. *J. Wildl. Dis.* **37**: 39-48.
45. Hong, C. Y., Lin, S. K., Kok, S. H., Cheng, S. J., Lee, M. S., Wang, T. M., Chen, C. S., Lin, L. D. and Wang, J. S. 2004. The role of lipopolysaccharide in infectious bone resorption of periapical lesion. *J. Oral Pathol. Med.* **33**: 162-169.
46. Hulbert, L. E. and Moisés, S. J. 2016. Stress, immunity, and the management of

- calves. *J. Dairy Sci. Apr.* **99**: 3199-3216.
47. Hum, S., Barton, N. J., Obendorf, D. and Barker, I. K. 1991. Coccidiosis in common wombats (*Vombatus ursinus*). *J. Wildl. Dis.* **27**: 697-700.
48. 井手百合子, 稲葉智之, 浅川満彦. 2000. 有袋目と貧齒目を中心とするペット用輸入哺乳類の寄生蠕虫類保有状況. *野生動物医誌*, **5**: 157-162.
49. Iorio, E. L., Cinquanta, L. and Pisano, R. 2006. A diagnostic algorithm to manage oxidative stress. *Australasian. J. Cosmet. Surg.* **2**: 26-30.
50. 石田 戢. 2010. 日本の動物園, 東京大学出版会, 東京. pp 253.
51. 板垣 博, 大石 勇(監). 2013. 最新家畜寄生虫病学, 朝倉書店, 東京. pp 324.
52. 伊藤友貴, 浅川満彦. 2010. 文献紹介: 有袋類ウォンバットのコクシジウム類. *北獣会誌*, **54**: 200-202.
53. 井澤修平, 小川奈美子, 原谷隆史. 2010. 唾液中コルチゾールによるストレス評価と唾液採取手順, *労安衛研*, **3**: 199-124.
54. 井澤修平, 鈴木克彦. 2007. 唾液中コルチゾールの測定キットの比較—唾液中・血漿中コルチゾールの相関ならびに測定法間の比較. *日補完代替医療会誌*, **4**: 113-118.
55. Jakson, S. 2003. Chapter 9. Macropods., 245-295. *In: Australian Mammals: Biology and captive management.* CSIRO Publishing, Melbourne.
56. Jimenez, L., Rana, N., Travers, K., Tolomanoska, V. and Walker, K. 2010. Evaluation of the Endosafe® Portable Testing System™ for the Rapid Analysis of Biopharmaceutical Samples. *PDA J. Pharm. Sci. Technol.* **64**: 211-221.

57. Johnston, T. H. and Mawson, P. M. 1940. A key to the nematode parasites of Australian marsupials and monotremes. *Trans. R. Soc. S. Austral.* **64**: 363-370.
58. Joyce-Zuniga, N. M., Newberry, R. C., Robbins, C. T., Ware, J. V., Jansen, H. T. and Nelson, O. L. 2016. Positive reinforcement training for blood collection in grizzly bears (*Ursus arctos horribilis*): results in undetectable elevations in serum cortisol levels: A Preliminary investigation. *J. Appl. Anim. Welf. Sci.* **19**: 210-215.
59. Kido, N., Chikuan, A., Omiya, T., Dan, M. and Nomura, M. 2013. Retrospective study of oral necrobacillosis in 54 swamp wallabies. *Vet. Rec.* **173**:118.
60. 菊池 淳, 大塚尚志, 山崎一春, 佐藤宏昭. 2009. 突発性難聴における酸化ストレスの検討. *Audiology Japan* **52**: 106-111.
61. King, J. M. and Bradshaw, S. D. 2010. Stress in an Island kangaroo? The Barrow Island euro, *Macropus robustus isabellinus*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **167**: 60-67.
62. Kovács, L., Kézér, F. L., Kulcsár-Huszenicza, M., Ruff, F., Szenci. O. and Jurkovich, V. 2016. Hypothalamic-pituitary-adrenal and cardiac autonomic responses to transrectal examination differ with behavioral reactivity in dairy cows. *J. Dairy Sci.* **99**: 7444-7457.
63. Levin, J. and Bang, F. B. 1964. The roll of endotoxin in the extracellular coagulation of *Limulus* blood. *Bull. Johns Hopkins Hosp.* **115**: 265-274.
64. Mandelker, L. 2008. 酸化ストレス—関連疾患と抗酸化物質・薬剤の治療効果, 金山喜一, 藏内勇夫 監訳, 33-126. 株式会社インターズー, 東京.
65. Mawson, P. M. 1961. A new species and some new records in the genus *Cloacina* (Nematoda: Strongyloidea) from Western Australia. *Trans. Roy. Soc. South. Austral.* **85**: 81-83.

66. Mawson, P. M. 1978. Macroponema (Nematoda: Trichonematidae): a new genus from macropod marsupials. *Internatl. J. Parasitol.* **8**: 163-166.
67. McKenzie, S. and Deane, E. M. 2003. The effects of age, season, and gender on serum cortisol levels in the tammar wallaby, *Macropus eugenii*. *Gener. Com. Endocrinol.* **133**: 273-278.
68. McKenzie, S. and Deane, E. M. 2005. Faecal corticosteroid levels as an indicator of well-being in the tammar wallaby, *Macropus eugenii*. *Comp. Biochem. Physiol. Part A.* **140**: 81-87.
69. McKenzie, S., Deane, E. M. and Burnett, L. 2004. Are serum cortisol levels a reliable indicator of wellbeing in the tammar wallaby, *Macropus eugenii*? *Comp. Biochem. Physiol. Part A.* **138**: 341-348.
70. Meyer, J. S. and Novak, M. A. 2012. Minireview: Hair cortisol: a novel biomarker of hypothalamic-pituitary-adrenocortical activity. *Endocrinology* **153**: 4120-4127.
71. Moore, W. E. and Moore, L.V., 1994. The bacteria of periodontal diseases. *Periodontology 2000* : 66.
72. Möstl, E. and Palme, R. 2002. Hormones as indicators of stress. *Domest. Anim. Endocrinol.* **23**: 67-74.
73. Murray, E. Fowler. and R, Eric. Miller[編]:中川志郎監訳.2007. 野生動物の医学, 文英堂出版, 東京. : 313
74. Murray, E. Fowler. and R, Eric. Miller[編]:中川志郎監訳.2007. 野生動物の医学, 文英堂出版, 東京. : 317-320

75. Nagaraja, T. G., Narayanan, S. K., Stewart, G. C. and Chengappa, M. M. 2005. *Fusobacterium necrophorum* infections in animals: pathogenesis and pathogenic mechanisms. *Anaerobe* **11**: 239-246.
76. 永田勝太郎, 長谷川拓也, 広門靖正 2009. 線維筋痛症 (FMS) における酸化バランス防御系の研究. *PAIN RESEARCH*, **24**: 93-93.
77. 西村専治郎, 永田新吾, 野田亮二. 1966. アカカンガルーの肝管より得た条虫について. *日動水誌*, **8**: 14.
78. 大平雅子, 須栗一路, 野村収作. 2011. 唾液中 Cortisol, sIgA, α -amilase 濃度の睡眠時変化特性. *生体医工学*, **49**: 798-804.
79. Oliphant, J. C., Parsons, R. and Smith, G. R. 1984. Aetiological agents of necrobacillosis in captive wallabies. *Res. Vet. Sci.* **36**: 382-384.
80. 尾仲達史. 2005. ストレス反応とその脳内機構. *日薬理誌*, **126**: 170-173.
81. Pasquini, A., Luchetti E. and Cardini, G. 2010. Evaluation of oxidative stress in hunting dogs during exercise. *Res. Vet. Sci.* **89**: 120-123.
82. Pasquini, A., Luchetti, E., Marchetti, V., Cardini, G. and Iorio, E. L. 2008. Analytical performances of d-ROMs test and BAP test in canine plasma. Definition of the normal range in healthy Labrador dogs. *Vet. Res. Commun.* **32**: 137-143.
83. Po, E., Williams, C., Muscatello, G. and Celi, P. 2013. Assessment of oxidative stress biomarkers in exhaled breath condensate and blood of Thoroughbred foals. *Vet. J.* **196**: 269-271.
84. Ranade, R., Talukder, S., Muscatello, G. and Celi, P. 2014. Assessment of

oxidative stress biomarkers in exhaled breath condensate and blood of dairy heifer calves from birth to weaning. *Vet. J.* **202**: 583-587.

85. Sainsbury, A., Fox, M. T., 大平久子, 河津理子, 浅川満彦. 2001. 英国王立獣医学校およびロンドン動物園による野生動物医学コースの概要と参加者の印象について. 獣畜新報, **54**: 801-812.
86. Samuel, J. L. 1983. Jaw disease in macropod marsupials: bacterial flora isolated from lesions and from the mouths of affected animals. *Vet. Microbiol.* **8**: 373-387.
87. 佐藤 梓, 村田浩一, 池辺祐介, 外平友佳理, 浅川満彦. 2017. 本州に所在する動物園展示動物から得られた寄生蠕虫類. *Clinic Note*, **139**: 4-5.
88. 関 泰一. 2009. d-ROMS テストによる酸化ストレス総合評価. 生物試料分析. **32**: 301-306.
89. Selye, H. 1950. Stress and the general adaptation syndrome. *Br. Med. J.* **17**: 1383-1392.
90. Selye, H. and Fortier, C. 1949. Adaptive reactions to stress. *Res. Publ. Assoc. Res. Nerv. Ment. Dis.* **29**: 3-18.
91. Selye, H. and Fortier, C. 1950. Adaptive reaction to stress. *Psychosom. Med.* **12**: 149-157.
92. 瀬戸口烈司 2006. 有袋類の道 アジア起源説に浮かぶ点と線, 株式会社 新樹社, 東京.
93. Skryabin, K. I., Shikhobalova, N. P., Schulz, R. S., Popova, T. I., Boev, S. N. and Delyamure, S. L. (eds) 1992. *Key to Parasitic Nematodes*, 3 Bold. Eds. J. Brill Publishing Company, Netherlands: pp 912.

94. Soto, E., Arauz, M., Gallagher, C. A. and Illanes, O. 2014. *Nocardia cyriacigeorgica* as the causative agent of mandibular osteomyelitis (lumpy jaw) in a cat. *J. Vet. Diagn. Invest.* **26**: 580-584.
95. Sotohira, Y., Ito, Y., Sano, T., Hayashi, H., Suzuki, K. and Asakawa, M. 2016. Parasitic nematodes from semi-free ranging marsupials in a zoological park of Japan. *Res. One. Heal.* *in press*.
96. Sotohira, Y., Suzuki, K., Sasaki, H., Sano, T., Tsuchiya, M., Suzuki, Y., Shimamori, T., Tsukano, K., Sato, A., Yokota, H. and Asakawa, M. 2016. Plasma endotoxin activity in kangaroos with oral necrobacillosis (lumpy jaw disease) using an automated handheld testing system. *J. Vet. Med. Sci.* **78**: 971-976.
97. Stalder, T., Kirschbaum, C., Heinze, K., Steudte, S., Foley, P., Tietze, A. and Dettenborn, L. 2010. Use of hair cortisol analysis to detect hypercortisolism during active drinking phases in alcohol-dependent individuals. *Biol. Psychol.* **85**: 357-360.
98. Suzuki, K., Shimamori, T., Sato, A., Tsukano, K., Tsuchiya, M. and Lakritz, J. 2015. Detecting endotoxin activity in bovine serum using an automated testing system. *J. Vet. Med. Sci.* **77**: 977-979.
99. Suzuki, Y., Suzuki, K., Shimamori, T., Tsuchiya, M., Niehaus, A. and Lakritz, J. 2016. Evaluation of a portable test system for assessing endotoxin activity in raw milk. *J. Vet. Med. Sci.* **78**: 49-53.
100. Svensson, A. and Hahn-Hägerdal, B. 1987. Comparison of a gelation and a chromogenic Limulus (LAL) assay for the detection of gram-negative bacteria, and the application of the latter assay to milk. *J. Dairy Sci.* **54**: 267-273.

101. 高橋雅信. 2001. チモシー主体粗飼料のビタミン濃度— α シトコフェロールと β コカロテンについて. 牧草と園芸, **49**: 1-3.
102. Trump, D., Danckwart, H., Jacobson, M. and Hung, J. 2006. Evaluation of Toxinometer ET-Mini and Endosafe-PTS endotoxin testing systems. *J. Nucl. Med.* **47**: 527.
103. Tsuzuki, N., Sasaki, N., Kusano, K., Endo, Y. and Torisu, S. 2016. Oxidative stress markers in Thoroughbred horses after castration surgery under inhalation anesthesia. *J. Equin. Sci.* **27**: 77-79.
104. United States Pharmacopeial, 2014. Chapter 85 Bacterial endotoxin test. 92-96. *In: The United States Pharmacopeia, 37th ed., The National Formulary, Convention, Rockville.*
105. Van Uum, S. H., Sauvé, B., Fraser, L. A., Morley-Forster, P., Paul, T. L. and Koren, G. 2008. Elevated content of cortisol in hair of patients with severe chronic pain. *Nov. Biomark. Stress.* **11**: 483-488.
106. Vogelnest, L. and Portas, T. 2008. Macropods. 33-225. *In: Medicine of Australian Mammals. CSIRO Publishing. Melbourne.*
107. Vogelnest, L. and Woods, R. (eds.). 2008. Macropods. 686. *In: Medicine of Australian Mammals. CSIRO Publishing, Melbourne.*
108. Wood, C. W. A. 1929. A note on *Rugopharynx australis* (Moennig 1926). *Ann. Mag. Nat. Hist.* **24**: 552-554.
109. 淀井敦司, 松尾禎之. 2005. 4-8. レドックス, ストレス防御の医学, 別冊「医学のあゆみ」, 医歯薬出版株式会社, 東京.

110. 吉川敏一. 2001. 156-158. 酸化ストレス, フリーラジカル医学生物学の最前線, 別冊「医学のあゆみ」, 医歯薬出版株式会社, 東京.