

病性鑑定材料採取時の留意点

I. 採材前の調査

1. 畜種:種類、品種、名号、家畜個体識別番号(牛の場合)、性、年齢、血統、特徴、産地、飼養地
2. 所属:畜主の住所、氏名、経験年数、飼養中の家畜の種類、頭数、年(日)齢
3. 飼養管理状態:飼料、特に飼料の切り替え時期と発症との関連、購入飼料の場合は同一ロットを使用している他の農家の状況など。自家配合飼料を使用している場合は、配合の内容と方法、飼料添加剤の有無、畜舎、放牧場の衛生状態など
4. 繁殖、泌乳の状況:産歴、生殖器疾患の既往歴
5. 死亡(患)畜の病歴:発病年月日、症状とその推移、治療の有無とその内容、死亡年月日、死後の経過時間、臨床診断名、過去における類似疾病の有無、同居家畜の臨床症状
6. 周辺地域の状況:常在疾病の有無、類似疾病の発生状況と発生地域との人、家畜、器材などの交流の有無
7. ワクチン接種の有無:接種時期、ワクチンの種類とロット番号
8. 最近の家畜の移動状況:導入元とその衛生状態、導入時期、出荷先、出荷時期
9. 放牧場:開設年次、草地の状態、入牧後の日数、放牧家畜の発育状態、衛生状態

II. 採材上の一般的注意

採材前の調査により、疑われる疾病を予測することは重要である。しかしながら、確実な根拠無くして疾病の原因を特定し、部分的採材を行うことは、避けねばならない。病性鑑定材料は、ウイルス性疾患、細菌性疾患、真菌性疾患、寄生虫性疾患、中毒、栄養障害など、全ての疾患を検索するのに適合した材料を得るようにしなければならない。この目的を全て満足させるためには、必要以上の材料の採取が必要となる。

ウイルス、細菌分離のためには、全て無菌的に採材することが必要で、それが実行不可能な場合(例えば、と畜場解体済材料などからの採取)には、無菌的採材に準ずる措置をとらなければならない。また、同時に、これらの採取した材料中に含まれていると思われる微生物の死滅を防止する処置を講じなければならない(材料の冷蔵、ドライアイス、氷、50%グリセリン加 PBS、魔法瓶等の必要な理由)。しかし、これらのことのみにとらわれると、ウイルス、細菌、寄生虫、毒物などが検出された際に、その原因の裏付けを行うのに最も重要な病理学的検査

材料の採取が忘れられたまま、死後変化(腎臓、胃、腸、脳などで起こりやすい)、腐敗、固定不十分、固定法の誤り、材料を凍結させてしまうなどの事態が起きて、この材料での判定ができなくなる。

無菌的に採材するためには、雑菌混入の少ない清浄な臓器から逐次行うことが必要である。また、使用する器具も、採材するたびに次第に汚染してくることも考慮しておく必要がある。

分析材料については、試料に含まれている可能性のある毒物等の分解を防ぐため、採取後直ちに遮光・氷冷する。

以下記述する採材順序は、病原体の分離、病理組織学的裏付けを同時に満足させるための採材方法である。したがって、剖検は死後、速やかに実施しなければならない。

なお、採材による病原体の散逸を防止するため、採取した試料で汚染された体表、四肢、畜舎の床、土壌、検査室、採取に使用した器材等の消毒、滅菌に十分留意する。また、術者自身の負傷、感染防止の観点から解剖時には防護服、ゴム手袋、切創防止用手袋、マスクおよびフェイスシールド等を着用する。

Ⅲ. 採材時の準備と基本技術

1. 採材時に準備する物品

バケツ、剥皮刀、解剖刀、検査刀、鈍鉤、鋭鉤、鋸、のみ、解剖槌、メス、有鉤ピンセット、鋏、骨鋏、腸剪刀、魔法瓶、クーラーボックス、血液凝固防止剤(ヘパリン、EDTA2Na、フッ化 Na、シュウ酸など)入り試験管または血清分離剤入り採血管、滅菌注射器および滅菌注射針、真空採血管および針、スライドグラスおよびカバーグラス、スパーテル、エタノール、メタノール、メイグリンワルド液、アルコールランプ、滅菌駒込ピペット、滅菌小試験管、ビニールシート(死体被覆用など)、10 または 20%中性リン酸緩衝ホルマリン液、アルコール綿、ガーゼ、布、記録用紙、鉛筆、ビニール袋、輪ゴム、油性ペン、滅菌シャーレ、消毒薬、薬用石鹼、ビニールテープ、ホーローバット(大きいものがよい)、広口瓶、滅菌スワブ入り小試験管、キャリーブレイ、ラブスティックス、氷(ドライアイス)、50%グリセリン加 PBS、剖検記録用紙、写真撮影器具。

2. 無菌的採材法

1) 広口瓶2本にエタノールを入れ、採材する際に使用するメス、鉤、ピンセット、鋏を1組

ずつ入れておき、使用の都度アルコールにつけたこれらの器具をアルコールランプの炎で焼き、臓器に手を触れないで採材する。使用器具は、一臓器の採材が終了したらアルコール綿で清拭した後、再びアルコール液中につける。これらの器具は交互に使用するようにする。

剥皮刀、のみ、解剖槌、ガーゼは死体清拭用のバケツと別にして消毒薬を入れたバケツの中につけて置く。

2) 採取した臓器は1つずつ滅菌した別々の容器に入れる。

3. 病理学的検索材料の採材

1) 肉眼的観察を十分に実施する。病変が存在した場合は、病変部と正常部の他に、境界部を必ず採材する。剖検記録を書く。記録写真を撮影する。

2) 臓器固定用には、10 または 20% 中性リン酸緩衝ホルマリン液を使用する。

3) ラベルを用意する。これは、リンパ節、腸管などのように部位がわかりにくくなる材料の名称を記入するために使用する。プラスチック製クリップまたは名札付き採材固定用メッシュ袋等が利用可能である。

4) 採材した臓器は十分量の固定液(臓器容量の10倍程度)で速やかに固定する。

5) 臓器の捺印標本を必要に応じて作製する。捺印標本を作る場合には、特に肺リンパ節、縦隔リンパ節、胃リンパ節、肝リンパ節、腸間膜リンパ節および肝臓の捺印を忘れないようにする。

4. 分析材料の採取

血液は、全血および血漿用の凝固防止剤入り試験管と血清用の凝固防止剤不使用の試験管にそれぞれ採血する。すでに死亡していて採血が不可能な場合は、眼房水、腹水等を採材しておく。血清用採血管以外は、採取後直ちに氷冷する。また、光で分解する物質があるので、遮光して持ち帰る。

また、生化学検査のため、肝臓、腎臓および肉眼的に病変のみられるその他の臓器各100g以上、尿100ml以上、胃内容物200g以上、給与していた現場の飼料2kg以上、その他原因と考えられるものを現場で採取する。飼料中の毒物濃度は不均一であることが多いので、対象の複数個所から採取する。乾燥飼料以外は直ちに氷冷する。

IV. 採材の順序

1. 血液の採材

血液は、全血および血漿用の凝固防止剤入り試験管と血清用の凝固防止剤不使用の試験管にそれぞれ採血する。測定項目によっては凝固防止剤が分析を妨げることがあるので、可能な場合は異なる凝固防止剤を使用して複数採血する。次いで血液塗抹標本を作り、乾燥後、広口瓶に入れたメタノールまたはメイグリュンワルド液に投入し、数分間固定し、風乾する。

2. 臓器の採材

以下に、牛の剖検術式の一例を述べる。この術式は、めん羊、山羊、馬および豚等に適用可能である。剖検を一定の術式によって行うことにより、採材ミスを防止できる。しかし、予想される疾病、人員および施設等の状況により、臨機応変に対応する必要がある。

- 1) 外貌検査。
- 2) 麻酔、放血殺。
- 3) 体に水をかける。
- 4) 右側横臥(右側に倒した状態)で、左前肢腋窩部および左後肢股関節を切り開く。反芻動物では左側横臥で実施する方法もある。
- 5) 下顎部から鼠径部まで正中線に沿って切開後、剥皮する。
- 6) 皮膚、体表リンパ節(下顎腺と下顎リンパ節、耳下腺と耳下リンパ節、浅頸リンパ節、腸骨下リンパ節、乳房上リンパ節(浅鼠径リンパ節)等)、乳房、精巣などを採材する。必要に応じ、無菌的採材を実施する。
- 7) 頸部胸腺を採材する。
- 8) 両側下顎枝にそって下顎部を切開し、舌を引っ張り出して後方に反転させる。舌を引っ張りながら扁桃を含む軟口蓋粘膜を舌と共に取り出す。舌骨を切断し、舌、喉頭、扁桃、気管(甲状腺を確認)および食道を一括して、胸郭前口まで体幹部から切り離す。(人手が十分の場合、ここで、18)以下のように頭部を離断し、頭部の検査を同時に実施する。)
- 9) 腹腔を開く。腹水、肝臓、脾臓、腎臓等は無菌的に採材する。
- 10) 胸腔を開く。胸水、心血、心臓、肺等は無菌的に採材する。
- 11) 腹腔臓器を摘出する。まず、脾臓を第一胃壁から剥離、摘出する。

- 12) 胃、小腸、大腸、空腸リンパ節、結腸リンパ節および脾臓を摘出する。
- 13) 肝臓、肝リンパ節を摘出する。
- 14) 腎臓、腎リンパ節を摘出する。結石などある場合には別途採取しておく。
- 15) 左右副腎および腹腔神経叢を一括して摘出する。
- 16) 膀胱、生殖器系を摘出する。
- 17) 胸腔臓器を摘出する。舌、喉頭、気管および食道を引っ張りながら、心臓、肺、胸部大動脈、縦隔、縦隔リンパ節および横隔膜を摘出する。
- 18) 必要に応じて脳脊髄液を採取後、頭部を離断する。下顎部を持って動かしながら、環椎後頭関節を離断する。
- 19) 頭部の剥皮後、頭蓋骨を鋸断あるいは斧断し、脳を露出させる。脳を無菌的に採材する。
- 20) 脳を摘出する。
- 21) 下垂体と左右三叉神経節を一括して摘出する。
- 22) 眼結膜と共に眼球を摘出する。
- 23) 上顎を鋸断し、鼻甲介を採材する。
- 24) 脊髄を採材する(頸膨大と腰膨大)。
- 25) 胸骨髄を一定の厚さで鋸断して採材し、さらに必要に応じ骨を採材する。また、大腿骨頭、椎骨、肋骨でも赤色髄を採材できる。
- 25) 筋肉(上腕二頭筋、背最長筋、大腿四頭筋など)を採材する。
- 26) 坐骨神経と膝窩リンパ節を採材する。
- 27) 膝関節などを切開観察し、必要に応じ採材する。

V. 生体からの経時的採材

日本脳炎、トキソプラズマ病、不明発熱などのために、経時的な材料によって診断する場合は、発熱時に血液塗抹標本、凝固防止剤加血液、血清を採取し、10～14日後に再び同じように採材する。採取した血液は、血清を無菌的に分離して最小限度 3ml を防腐剤を入れないで送付する。血液塗抹標本はメタノールで固定する。血球数を計算しておくようにする。

VI. と畜場で解体された動物からの採材

この場合は、無菌的に採材することが困難であるので、次のように行う。

血液は生体検査時に採取する。臓器の採材に当たっては、最初に流水で汚物を洗い流すようにし、バケツの中に入れて洗ってはならない。肝臓、脾臓、腎臓(採材できないことが多い)、心臓、肺などの実質臓器は表面をスパーテルで焼き、深部からできるだけ大きく切り取り、1 臓器ずつ滅菌した容器(例えば、滅菌シャーレ)に納める。リンパ節はエタノールに瞬時浸漬し、点火して表面を軽く焼いて付着した汚染菌を殺菌し、脂肪組織を除去して深部から採材する。

VII. その他の材料からの採材

胎子については、一般的な実質臓器の採材のほかに、胃(牛では第一胃と第四胃)、小腸、盲腸内容物、胸水、腹水の採材を忘れないようにする。胎盤については、細菌汚染を受けやすいので、細菌検査材料としては適当でないことが多いが、ウイルス、病理検査材料としては用いることができる。母畜の繁殖歴、授精回数、特に、最終授精年月日、胎子の体長、体重、発毛状態を調べ、在胎日数と発育状態を比較する。母畜からは、流産当日およびその約 2 週間目に血清、悪露を採取し、血清反応と病原検索を行う。時には、カンピロバクター症など種雄牛の検査が必要な場合もある。

VIII. 採材後の処理

1. 血清は無菌的に別の容器に移し、防腐剤を添加せず、凍結保存(-20℃以下)する。
2. 凝固防止剤加血液は、赤白血球数を計算した後、接種材料として保存(-80℃)する。
3. 無菌的にシャーレに採材した臓器はシャーレ 1 枚ごとにビニール袋に入れ、それを 5 枚ずつビニール袋に納め、口をビニールテープ等で封じる。
4. ビニール袋に採材した糞便、臓器は、中の空気を搾り出し、口を折り曲げて輪ゴム等で封じる。
5. 採取した材料が少ない場合は、魔法瓶、多い場合は、クーラーボックスに納め、周囲にドライアイスまたはビニール袋に氷をつめ、先を輪ゴムで止めたものを臓器の間に入れて保存し、ふたのまわりをビニールテープで封じる。
6. 50%グリセリン加食塩液(または PBS)に入れて送付する場合は、1 臓器ずつ滅菌した容器に入れる。
7. 固定材料は、固定液を交換し、前記材料と別の容器で送付する。遠方の場合は、ホルマリンに浸漬した脱脂綿を充填し、外側をビニール袋で被う。

8. 捺印標本、血液塗抹標本は、メタノールで固定し、振動により破損しないように処理し、ビニール袋に入れた固定臓器と一緒に送付する。
9. ウイルス・細菌分離用材料としては、生材料が望ましいが、やむを得ない場合は、氷またはドライアイスで保存して実験室に持ち込み、速やかに供する。残りの材料は再検査の必要に備えて、4℃または-80℃で保存する。糞便等については凍結による死滅あるいは核酸の分解を避けるため 4℃で保存する場合がある。

真菌分離用材料は生で室温保存するのが望ましいが、必要に応じ 4℃で保存する。凍結させてはならない。

寄生虫、原虫の分離用材料は、4℃で保存する。凍結させてはならない。寄生虫(蠕虫、ダニ等)を固定する場合は 70%エタノールを使用する。
10. 生化学分析用凝固防止剤加血液は、持ち帰ったら直ちに全血の分析に供する。残余凝固防止剤加血液および血清用血液は速やかに遠心分離し、血清および血漿を採取する。血清および血漿の分析も直ちに行うことが望ましいが、保存可能な項目については 4℃あるいは-20℃以下で保存し、後日分析する。分析用臓器や胃内容も、直ちに分析に供せない場合は-20℃以下で凍結保存する。乾燥飼料は 4℃あるいは-20℃以下で保存し、サイレージのように湿潤な飼料も凍結保存する。