

馬伝染性子宮炎

Contagious equine metritis:CEM

(第2版)

社団法人 全国家畜畜産物衛生指導協会



目 次

発刊にあたって	1
I 疾病の概要	2
II 痘学	3
1. 海外における流行の歴史と現況	3
2. 国内における流行の歴史と現況	4
III 病原体と感染	5
1. 病原体	5
2. 感染と保菌	7
1) 雌馬	
2) 雄馬	
3. 伝播	7
IV 臨床症状と診断法	8
1. 臨床症状	8
1) 雌馬	
2) 雄馬	
2. 臨床病理学的診断法	8
3. 病原学的診断法	8
1) 採材法	
2) 分離と同定	
3) PCR診断	
4. 血清学的診断法	14
1) 間接血球凝集反応	
2) その他の血清反応	
5. 病理学的診断法	17
1) 剖検所見	
2) 病理組織学的所見	
V 予防と治療	18
1. 予防	18
2. 治療	18
1) 薬剤投与と洗浄	
2) 陰核洞切除手術	
3) 淘汰	
おわりに	20

発刊にあたって

1977年、英国で突然発生した馬伝染性子宮炎（CEM）の世界的な拡大を目の当たりにして、軽種馬防疫協議会は、本症のわが国への侵入の危険性を警告し、関係者への啓蒙をはかる目的で、1980年3月、日本中央競馬会競走馬総合研究所栃木支所の鎌田、田淵両氏の執筆による馬伝染性子宮炎のパンフレットを作成し、関係者に配付しました。

わが国において、CEMの最初の発生が確認されたのは、そのわずか2か月後のことです。

その後、本症は、繁殖シーズンになると日高地方を中心に毎年その発生が認められ、関係者は対応に追われてきました。しかしながら、その一方で、CEMをわが国から一掃するための努力も地道に続けられており、その成果は、徐々にではありますが発生頭数の減少という形になって現れています。

このパンフレットは、上記の軽種馬防疫協議会が作成したパンフレットの改定版に相当するものであります。日本中央競馬会競走馬総合研究所栃木支所研究役安斉了氏に執筆をお願いし、その後明らかにされた事実及び研究開発された技術を盛り込みながら、現時点での本症に関する最新の情報を出来るだけ幅広く、また本症の診断、治療、防疫に関わる項目は、詳細かつ具体的に記載していただきました。同氏には、心より感謝申しあげます。

なお、一部血清反応の項目については、旧版との重複を避けた部分もありますので、必要に応じて旧版と併せてご利用下さい。

平成9年2月

社団法人 全国家畜産物衛生指導協会

I

疾病の概要

馬伝染性子宮炎 (Contagious equine metritis : CEM) は、グラム陰性微好気性桿菌である *Taylorella equigenitalis* (*T. equigenitalis*) の感染によって起こる馬科の動物に特有の伝染病で、交配によって伝播して雌馬の子宮炎・不妊症をもたらす。また、病原体は雌馬の陰核および雄馬のペニスに長期間保菌される。

本症は比較的最近になって発見された疾病で、1977年に英国の軽種馬生産牧場で最初に大流行し、その後はヨーロッパ、オセアニア、米国、そしてアジアと世界中に広がった。わが国でも1980年に北海道日高地方の軽種馬生産牧場で発生が確認されて以来、今日までなお撲滅に至らず発生が続いている。しかしながら、米国やオーストラリアで本症はすでに清浄化されており、ヨーロッパ諸国でもサラブレッドにおける発生はほとんど見られなくなっている。競馬の国際化が進む今日、本症の清浄化は内外の関係者から強く求められているところである。

T. equigenitalis 感染は雌馬の子宮に限局されており、その他の器官への感染はなく発熱等の全身症状も示さない。雄馬には保菌されるものの感染しない。感染した雌馬は子宮内膜炎を発症して滲出液を流出し、受胎率の低下を起こす。滲出液中

には多量の *T. equigenitalis* が含まれており、他馬への感染源となる。馬同士の伝播は主に交配によって起こるが、人や器具を介した間接的な伝播例も多い。感染した雌馬あるいは感染雌馬と交配した種雄馬は高い確率で保菌馬となる。保菌部位は雌馬では陰核、雄馬ではペニスである。

診断は感染馬の子宮頸管および保菌部位からスワブの採取と菌分離によって行う。本菌は通常の培地や培養法では培養できない。分離培養にはストレプトマイシンを添加したユーゴンチョコレート寒天培地を用い、10%の炭酸ガス存在下で一週間以上の培養が必要である。最近、迅速診断のためのPCR法が開発された。一方、間接血球凝集反応や補体結合反応による血清学的診断も行われている。

T. equigenitalis は多くの種類の消毒薬や抗菌剤に高い感受性を示すことから、局所の薬物療法が行われる。しかしながら、本菌は解剖学的に複雑な構造をもつ外部生殖器の垢の中で長期間生存することから、このような保菌部位からいかにして菌を除去するかが治療上の最大の課題である。本症はワクチンによる予防は行われておらず、感染馬・保菌馬の摘発と接触性伝播を防ぐための予防措置が防疫上重要である。

II 疫 学

1. 海外における流行の歴史と現況

馬伝染性子宮炎が知られるようになったのは1977年4月に英国のニューマーケットで勃発した大発生が最初である。この流行で、英国では29カ所の牧場で約250頭の繁殖用雌馬と25頭の種雄馬がCEMに罹患し、本格的な繁殖シーズンを前にして種付けの中止を含む厳しい措置がとられた。さらに同じ年に、アイルランド、フランス、オーストラリアでも発生が報告され、ついで、ベルギー、ドイツ、イタリア、ユーゴスラビア、オランダ、デンマーク、スウェーデン、米国、ブラジル、日本など世界の主要馬産国のはほとんどで本症の発生が確認された(図1)。このように本症がまたたく間に世界中に広がったことは、その伝播力の強さを認識させると同時に、1977年より以前にこれらの国のいくつかにはすでにCEMが存在していたことを伺わせた。このことを裏付けるように、その後に行われた多くの疫学調査の成績は1975年にフランスで起きた子宮炎の発生が本症の流行の発端であったことを示唆している。

CEMのその後の発生状況は国によって様々である。オーストラリアでは1980年を最後に国内での発生報告はなく、1985年に正式にフリー宣言が出されている。米国でも1978年以降は発生していない。一方、ヨーロッパ大陸においては、現在でも時折本症の発生が報告されており、完全な撲滅は未だなされてはいないが、最近では以前のような大規模な流行は起こらず、多くはサラブレッド以外の馬における散発的な発生もしくは地域的な流行に留まっているようである。このようなヨーロッパの状況の中で、英國においても1978年以降はCEMの大きな流行はなく、1990年に非サラブレッド一頭で発生が確認されたのを最後に発生そのものも認められなくなっていた。ところが1996年になって再び英国内で二つのCEMの流行が相次いで確認された。一つの流行は2カ所の種馬場のサラブレッド種雄馬と複数の雌馬を巻き込むものであり、もう一つの流行は非サラブレッドの種馬場で起きたものである。

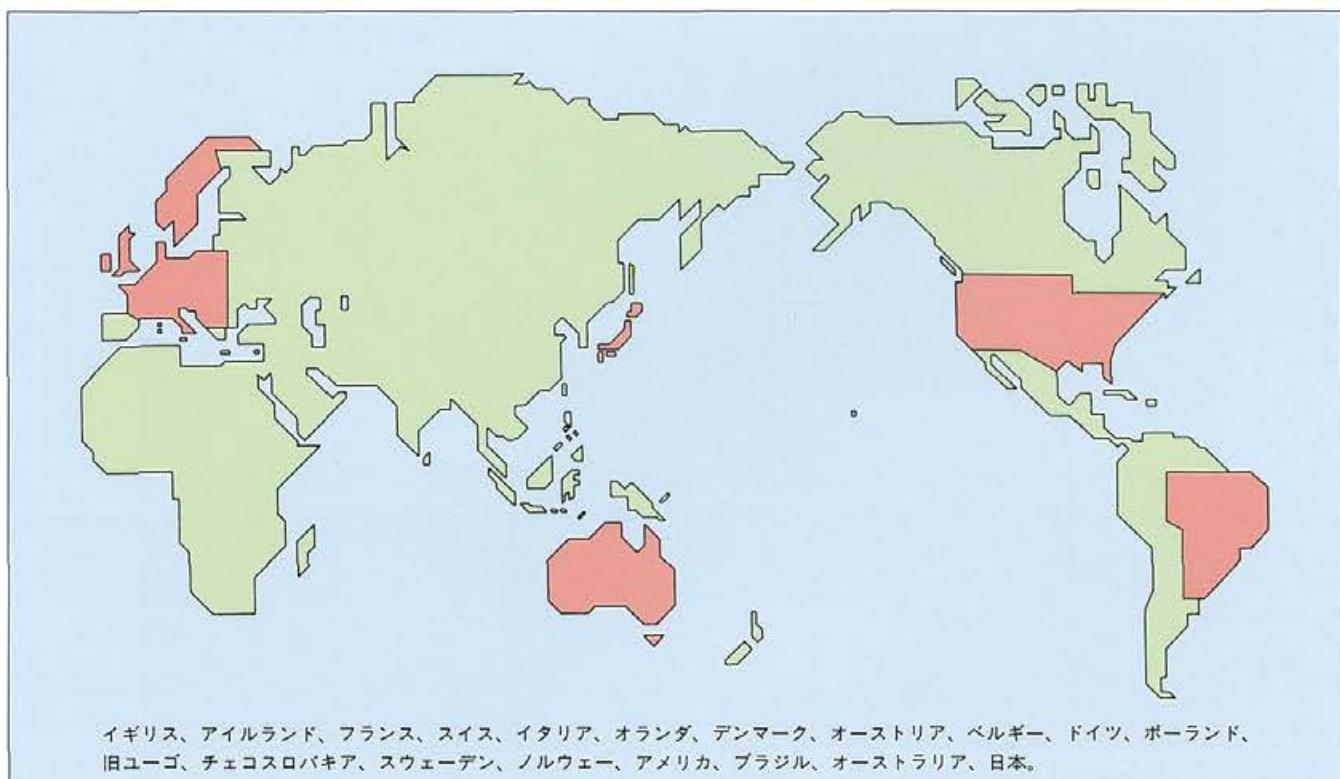


図1. これまでに、馬伝染性子宮炎の発生が確認された国

2. 国内における流行の歴史と現況

わが国でCEMの発生が確認されたのは、1980年の北海道日高・胆振地方が最初である。しかしながら、その後に行われた血清学的研究の成績は、1978年にはすでにCEM罹患馬が日本国内に存在したことを示唆している。

本症の発生が最初に確認された1980年には、家畜保健衛生所がただちに緊急対策を実施し、日高家畜保健衛生所管内で308頭の繁殖雌馬と13頭の種雄馬からCEMの原因菌である *T. equigenitalis* を分離した。この数字は英国のニューマーケットにおける最初の発生時に匹敵するものであり、当時のわが国の関係者の混乱が想像されよう。その後は家畜伝染病予防法第6条に基づく定期検査（菌分離）が、病性鑑定などの繁殖シーズン中の検査と併せて毎年実施されている（図2）。この間、

1980年に321頭であった感染馬は徐々に減少して1983年にはいったん25頭にまで減少した。ところが1985年には再び119頭と増加し1989年まであまり減少が認められなかった。その後再度減少して1995年には0頭となったが、残念なことに1996年には再び繁殖雌馬22頭から菌が分離されている。

一方、1990年からは血清反応法のひとつである間接血球凝集反応（IHA）を用いた血清診断が繁殖シーズン中に行われている（表1）。この成績は細菌分離検査の成績と類似した動向を示しており、繁殖シーズン中の本菌の伝播の様子を良く反映していると思われる。

このように、*T. equigenitalis*は1980年の最初の発生以来わが国の軽種馬生産地域に存在し続け、CEMを発生させ続けている。

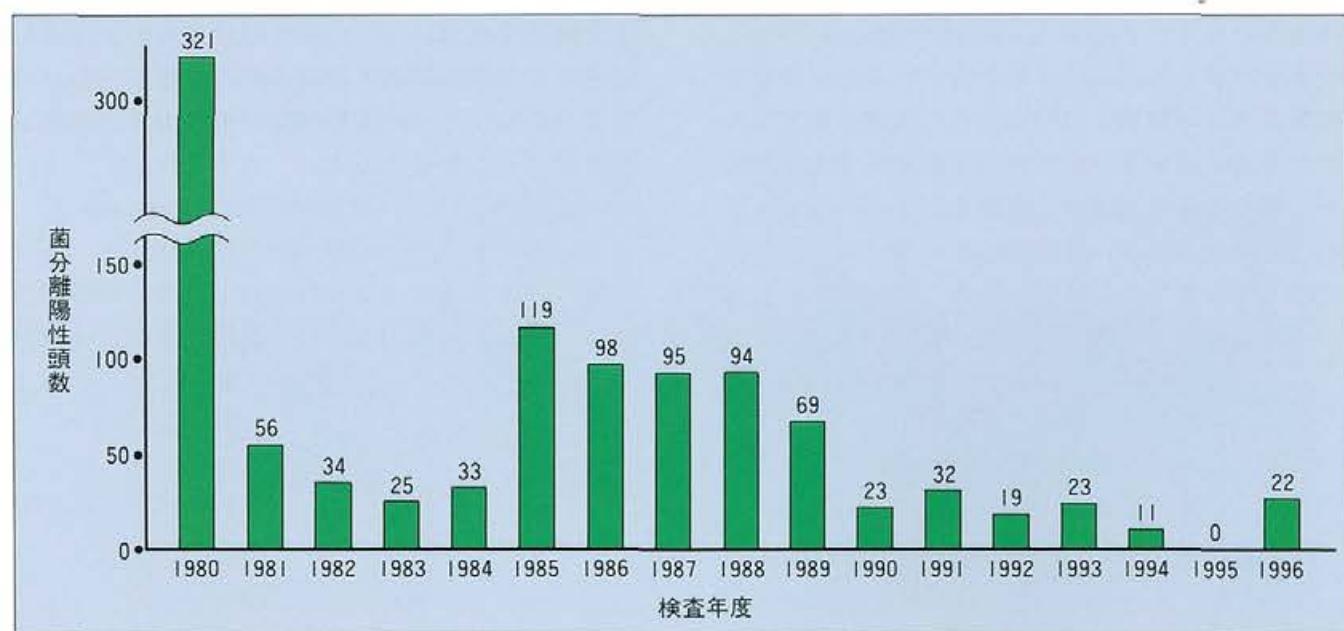


図2. 北海道日高地方における馬伝染性子宮炎菌分離検査成績

（日高家畜保健衛生所の資料より）

表1 北海道日高地方における馬伝染性子宮炎の間接血球凝集反応抗体陽性馬数の推移

検査年度	1990	1991	1992	1993	1994	1995	1996
陽性頭数	26	26	23	—	13	8	21
検査頭数	338	408	524	—	517	541	642

（馬防疫検討会および日高家畜保健衛生所の資料より）

III 病原体と感染

1. 病原体

本症の原因菌は *T. equigenitalis* である（図 3）。本菌は 1977 年の CEM が流行した際に Platt らによって初めて分離され、Taylor らによって *Haemophilus equigenitalis* と命名された。その後、杉本らによって新しい属である *Taylorella* の設定と当属への移行が行われ、*Taylorella equigenitalis* と命名された。本菌の主な培養性状は以下の通りである。

グラム陰性の桿菌で、通常は球桿菌の形状をとるが（図 4）、時に多形性を示す。非運動性で芽胞を形成しない。微好気性条件下で最も良く発育し、嫌気条件下では発育しない。通常の培地では発育せず血液寒天培地での発育も悪い。チョコレート寒天培地上で良く発育する。X および V 因子の要求性はない。至適発育温度は 35-37°C である。カタラーゼ、オキシダーゼ、 fosfataze 陽性、炭水化物から酸を産生しない。

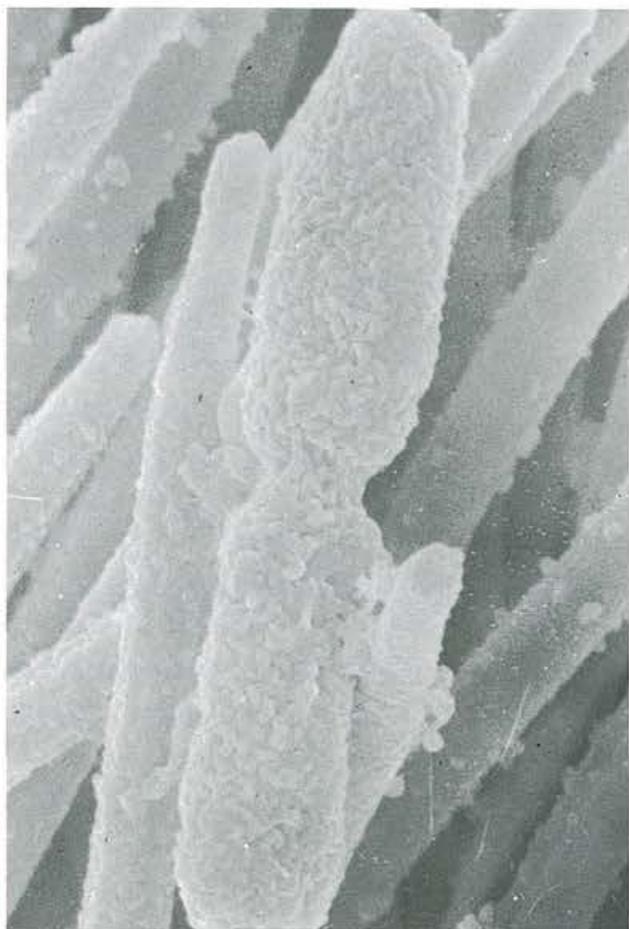


図 3. 子宮内膜に感染した *T. equigenitalis* の走査電子顕微鏡像：子宮粘膜上皮細胞の微絨毛に付着した分裂直前の桿菌として認められる。

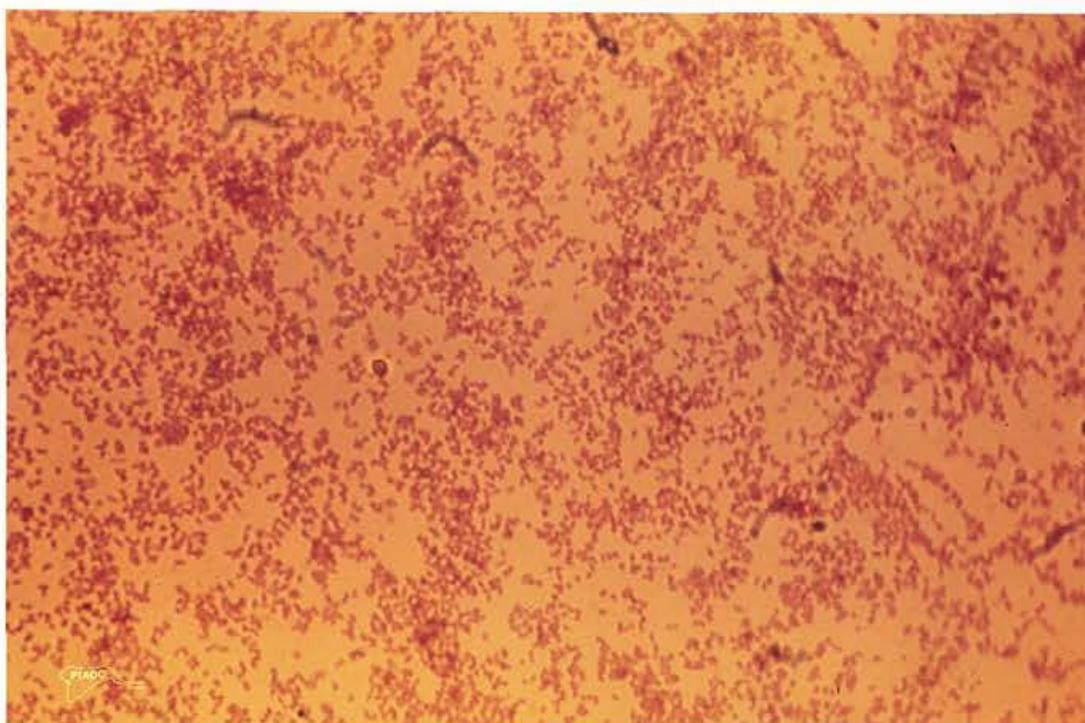


図 4. *T. equigenitalis* のグラム染色像：グラム陰性に染色された球桿菌が認められる。

本菌はまた乾燥、加熱、直射日光、酸などに弱く、50°C 1分の加熱、1時間の日光照射、pH3.0での5分間放置で死滅するとされる。また、多くの種類の消毒剤、抗菌剤に高い感受性を示す。抗生物質としてはペニシリン、アンピシリン、ペプチド系、テトラサイクリン系、ストレプトマイシン以外のアミノ配糖体系などに高感受性である。ストレプトマイシンに対しては感受性を示す株と耐性を示す株の両方が存在するが、わが国ではストレプトマイシン耐性株だけが分離される。(図5)

本菌は、馬科の動物に感染して子宮炎を起こすのが唯一の病原性である。他の動物あるいは生殖器以外の部位に感染することはない。実験的にはマウス、ネコ、ウサギ、モルモットの子宮内で一定期間定着させることができると報告されているが、自然感染例はない。本菌の自然界における分布についてはまったく不明である。なぜ突然、馬の子宮病原菌として登場したのか？その起源も謎のまま残されている。一方、本菌は一属一種から成るかなり遺伝的に均一な種であり、これまで亜種や血清型の存在は報告されていない。しかしながら、集落形態の異なる株が存在し、異なるDNA型株の存在も報告されている。本邦における分離株は、集落形態の異なる株は認められるものの、DNA型はこれまでのところ一種類のようである。本菌の病原因

子についてはほとんどわかっていないが、莢膜の存在と子宮粘膜上での線毛の発現が報告されており、本菌の定着因子と考えられている(図6)。病原性に関わる酵素や毒素の報告はない。



図6. *T. equigenitalis* の透過電子顕微鏡像：
菌体周囲に線毛の発現が認められる。



図5. *T. equigenitalis*ストレプトマイシン耐性株の
薬剤感受性：ストレプトマイシン(S)に強
い耐性が、アンピシリン(Pb)とカルベニ
シリソ(Pcb)に強い感受性が認められる。

2. 感染と保菌

1) 雌馬

感染部位は子宮である。子宮内に侵入した菌は子宮粘膜上に付着し、急激に増殖する。病理組織学的には感染馬の子宮リンパ管内に菌が認められることもあるが、通常は粘膜細胞上にとどまる。卵巣への感染も起こらない。子宮内では菌の増殖に伴って大量の滲出液が産生され、膿、さらには体外へと排出される。英國において、あるいは我が国においても、本症の最初の流行時は疼痛を伴う大量の滲出液の排出が特徴的な臨床症状であった。しかしながら、最近の症例ではその当時のような激しい症状や大量の滲出液の排出を示す症例は殆ど認められず、菌の病原性の変化、あるいは馬の抵抗性の獲得が示唆されている。感染した雌馬の受胎率は著しく低下する。感染増殖した菌はやがて局所抗体の産生に伴って減少し始め、最終的には子宮内から完全に消失する。消失までの期間は馬によってまちまちであるが、長い場合には2ヶ月間以上子宮内にとどまることもある。また、稀に本菌による流産の発症も認められる。

一方、本菌は子宮内から消失しても外部生殖器に付着して長期間棲息することが可能である。このような雌馬は保菌馬と呼ばれ本症の清浄化を妨げている最大の原因である。保菌馬における主な保菌部位は陰核であり、特に陰核洞と陰核窩の垢の中が絶好の菌の棲息部位である。実験感染においては、子宮内から菌が消失した後も陰核からは9ヶ月以上に亘って菌が分離され続けることが確認されており(表2)、野外では7年間保菌していた例もある。子宮内に感染した菌は馬の免疫系を刺激し、血液中の抗体および子宮粘膜上のIgA抗

体の産生をもたらすが、陰核に保菌された状態では免疫刺激はまったくなく、抗体の上昇や維持も認められない。

2) 雄馬

雄馬は保菌馬のみが存在する。CEM感染雌馬あるいは保菌雌馬と交配した種雄馬のペニスには菌が付着し長期間保菌される。しかしながら、どのような場合でも雄馬においては臨床症状の発現や抗体値の上昇は認められない。ペニスにおける好保菌部位は尿道洞、亀頭窩、包皮裂内などである。雌馬の場合と同様、これらの部位の垢の中で*T. equigenitalis*は長期間棲息する。

3. 伝播

*T. equigenitalis*は交配によって伝播する。感染した雌馬あるいは保菌雌馬と交配することによって雄馬のペニスに菌が付着し雄馬は保菌馬となる。さらにこのような保菌雄馬と交配した雌馬は感染して子宮炎を発症し、回復後も保菌馬となる。保菌種雄馬と交配した雌馬の中には子宮炎を発症せずにそのまま保菌馬になるものもある。保菌馬が出産した際に保菌部位から新生子の外部生殖器への感染が起り、やがて成長した仔馬が保菌馬として他馬への感染源となった例も報告されている。

一方、感染馬の滲出液で汚染した馬体は本症の間接的な感染の原因となる。さらに重要なのは雌馬や種雄馬の外部生殖器に接触する獣医師や治療器材、馬取り扱い者や保定器具などであり、本症の最初の流行時には交配による直接伝播以外にもこのようなものを介して間接的に伝播した例が相当数あった。

表2 馬伝染性子宮炎の感染と保菌：実験感染馬の長期観察例

菌接種後日数	1週間	2週間	1ヶ月	3ヶ月	6ヶ月	9ヶ月
臨床症状	++	-	-	-	-	-
子宮頸管からの菌分離	+++	++	+	-	-	-
血清抗体	++	+++	++	-	-	-
陰核からの菌分離	++	++	+++	++	++	+++

1. 臨床症状

1) 雌馬

CEMに罹患した雌馬は1～14日の潜伏期間を経て子宮内膜炎を発症し、不受胎、滲出液の排出、子宮頸管炎、膿炎、早期発情の繰り返しなどの臨床症状を示す。通常は全身症状を示さない。滲出液は灰白色で子宮頸管から排出され、激しいものでは膣内に貯留したものが間欠的に陰門部から外部へ流出して外陰部や尾を著しく汚染する。このような激しい症状は最初の流行時によく見られ、本症の特徴的臨床症状とされた（図7）。

一方、最近の発症例ではこのような激しい症状を示すものはほとんどなく、滲出液も少量しか認められないことが多い。従って現在では、臨床症状からだけで本症を推定することは困難である。

保菌馬は臨床症状を示さない。

2) 雄馬

雄馬は保菌馬であり、臨床症状を示さない。

2. 臨床病理学的診断法

臨床症状が認められる馬の子宮頸管や子宮内膜のスワブあるいは滲出液を採取し、塗沫標本を作製する。ギムザ染色やグラム染色を施すと滲出液中に多数の好中球に混じって少数の剥離上皮細胞、リンパ球、單球が認められる。また、これらの細胞の他に滲出液中にグラム陰性の球桿菌ないし短桿菌がみとめられ、好中球に貪食されている像がみられることがある（図8）。ただし塗沫検査だけで本症を診断するのは困難である。

直腸検査では子宮頸管の軟化や子宮の腫大が認められることがある。また、微弱発情を繰り返す症例では小さな複数の卵胞を有する萎縮卵巣を呈することもある。

3. 病原学的診断法

1) 採材法

菌分離用検体の採材は綿棒を使って行い、輸送にはアミューズ培地を用いる。通常の細菌検査によく用いられるスチュアート培地も使用できる

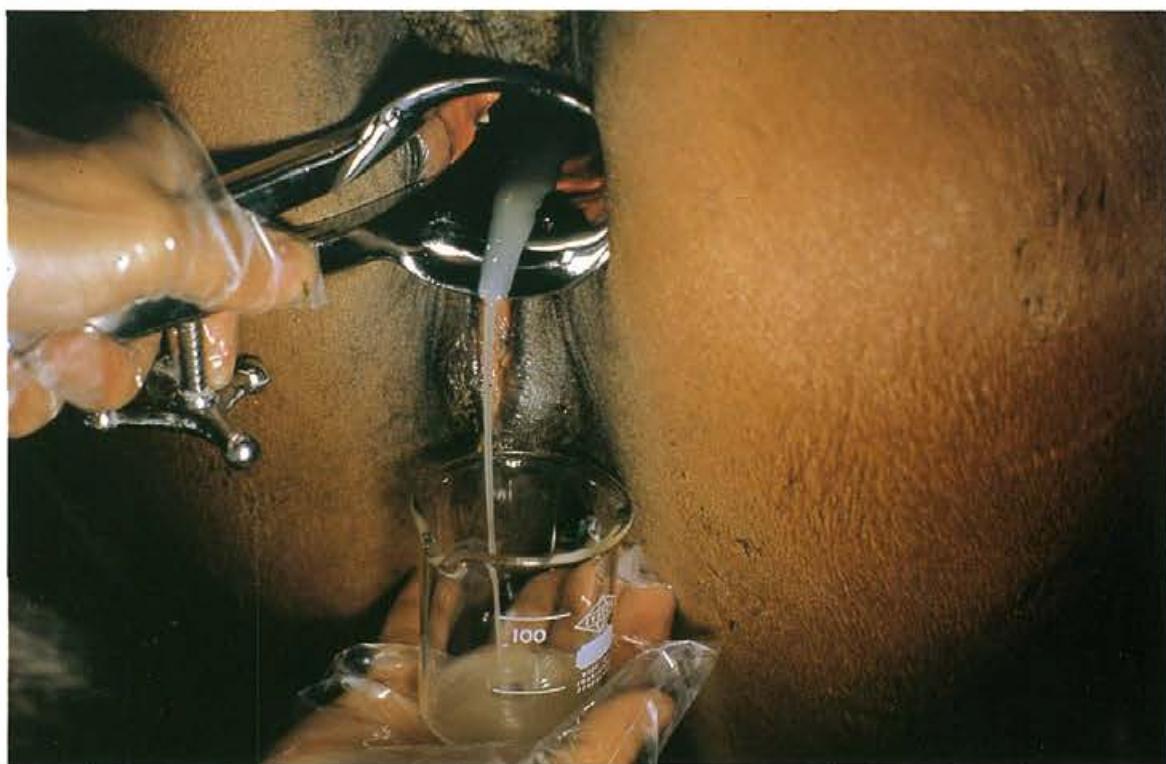


図7. CEMの臨床症状：雌馬の外陰部から流出する大量の滲出液。

が、アミューズ培地に比べて菌の死滅が早い。これらの綿棒と培地の組み合わせはキットとして市販されている。

子宮炎を発症した雌馬の採材は子宮頸管から行

う（図9）。滲出液のある場合には滲出液を直接綿棒に含ませても良いが、この場合でも雑菌による汚染を防ぐために出来るだけ子宮外口付近から採材するようとする。子宮頸管からの採材法

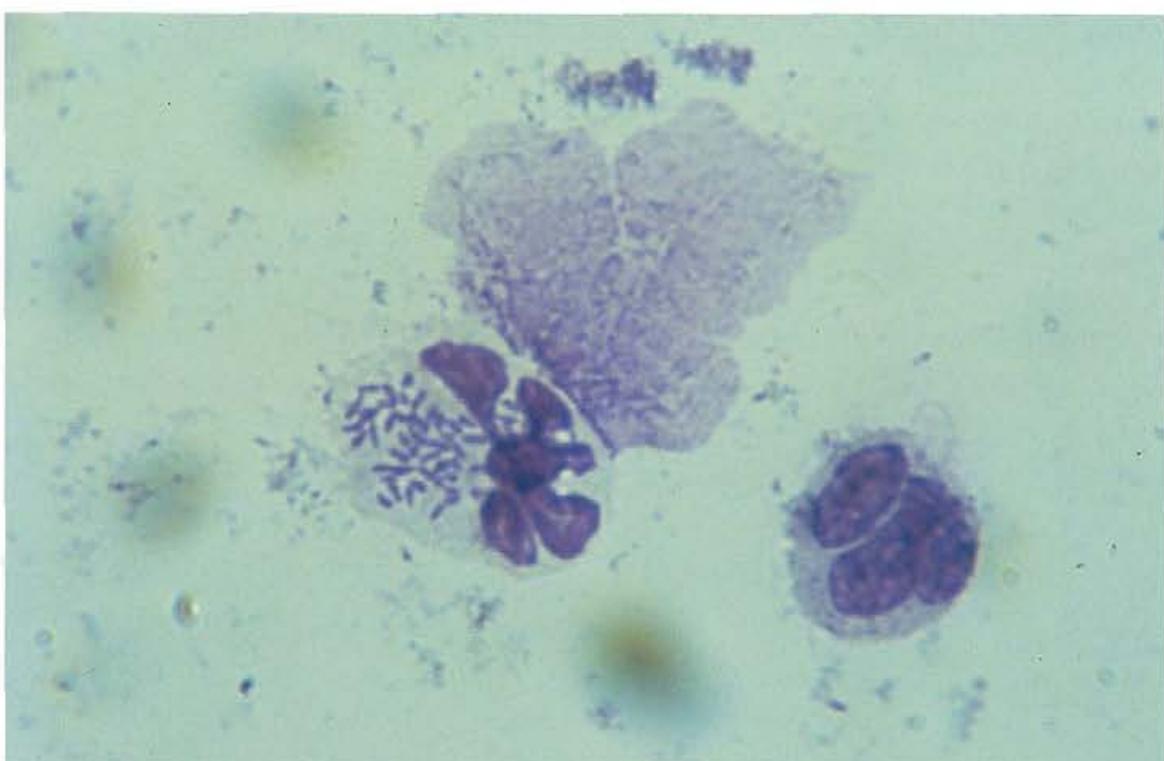


図8. 滲出液のギムザ染色塗末標本：大多数は好中球であり、細胞質にグラム陰性菌を貪食しているものも認められる。



図9. 子宮頸管からの採材法：膣鏡で外陰部を開き、鉗子で挟んだ綿棒を子宮頸管内まで挿入する。

は以下の通りである。まず鉗子など細長い器具の先に綿棒を固定する。次に保定した雌馬の外陰部を膣鏡で開き、綿棒を膣内に挿入して綿を子宮頸管内に挿入する。この時、綿が外陰部や膣に触れて雑菌の汚染を受けないよう注意する。発情期あるいは感染があれば子宮頸管は弛緩しており、綿棒の挿入は容易である。

保菌馬検査のための採材は、雌馬では陰核の陰核窩および陰核洞から行う(図10)。まず保定した雌馬の陰唇を指で強く開いて陰核亀頭を突出させ、陰核窩に綿棒を挿入して内部の垢を採材する。陰核洞からは耳鼻科もしくは小児科用の細い綿棒を用いて採材を行う。

雄馬の採材はペニスから行う(図11)。この場合、ペニスは勃起させておくのが望ましい。尿道洞および亀頭窩、包皮の皺内の垢、射精前液や尿道口から採材を行なう。

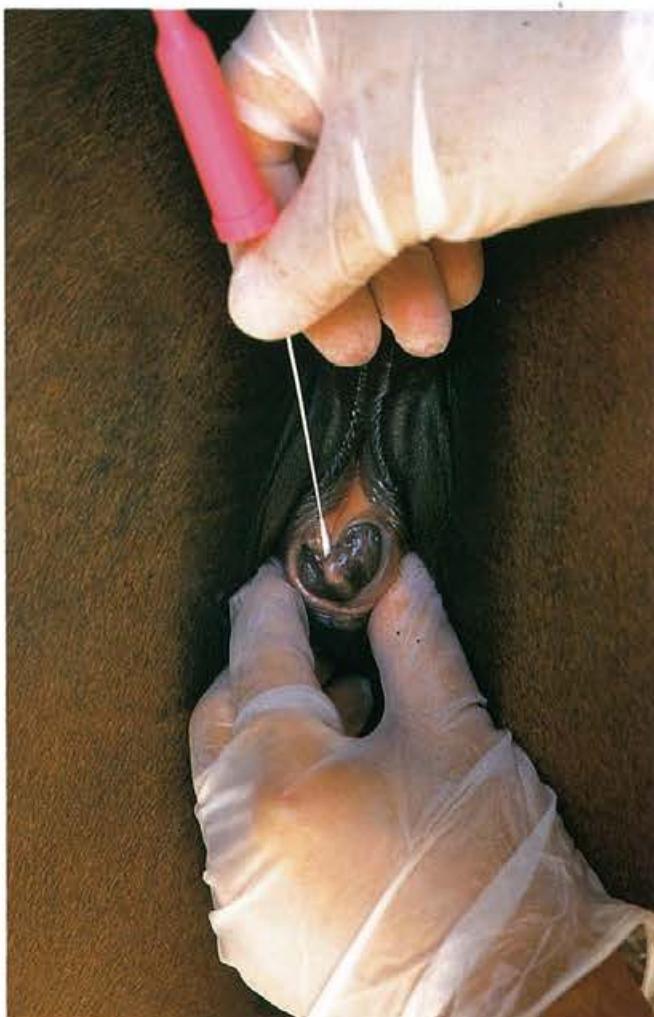
採材の際に最も注意しなければならないのは、採材器具や人の手を介した他馬への水平感染を防ぐことである。採材者、採材助手、馬の保定者は必ず使い捨ての手袋を着用し、器材も使い捨てのものを使う。菌が付着する恐れのある器具を再使用する場合は、必ず使用後に滅菌もしくは完全な消毒を行う。

採材した綿棒は直ちに輸送用培地に入れて冷暗状態に保ち、48時間以内に分離培養が行えるよう検査室に輸送する。

採材は1頭につき3回行なうことが望ましい。特に感染や保菌を疑う馬の検査、あるいは菌が分離されて治療を行った後の菌の消失を確認するための検査などでは、間隔をあけて3回の検査を行い、いずれの検査でも菌が分離されなかった場合に、CEM陰性を証明することが出来る。



陰核窩からの採材。



小児科用の綿棒を用いた陰核洞からの採材。

図10. 陰核からの採材法



尿道洞からの採材。



包皮からの採材。



尿道口からの採材。

図II. ペニスからの採材法

2) 分離と同定法

分離にはユーゴンチョコレート寒天培地(ECA)を用いる(表3)。通常はECAにストレプトマイシン(SM)を添加したSM添加ECAを分離培養に、SM無添加ECAを純培養に使用する。一方、*T. equigenitalis*の中にはSM感受性株が存在することが報告されており、このような株の分離にはSM添加ECAとSM無添加ECAを併用する必要がある。また、SMの代わりにトリメトプリンを1 µg/mlとクリンダマイシンを5 µg/ml添加した選択培地の有用性も報告されている。これまでのところ、わが国で分離された*T. equigenitalis*にSM感受性株は認められていないものの、分離培養時に限ってSM添加ECAに発育しない株の存在が認められており、2種の培地を併用するのが望ましい。

分離培養は10%の炭酸ガス(CO₂)存在下、37°Cで2週間まで行う。特に湿度を高める必要はない。逆にあまり高湿度にするとシャーレの皿と蓋の間に水滴がたまり、これが接着剤の働きをして皿と蓋とを密着させてしまう事がある。このような状態では菌は発育しないので注意が必要である。

集落は早ければ3-4日後には肉眼で認められるようになる。しかしながら、採材後の時間が経過した検体やSM添加培地では発育が遅いことが多く、培養15日目に初めて集落が確認された例も

報告されていることから、通常は3-4日間隔で観察しながら1週間以上培養する。

ECA上の集落の大きさは培養4日目で直径1-2mm程度で、培養を続けるとさらに大きさを増す。一方、分離培養時には0.1mmから1cmまでの大きさの異なる集落がひとつの培地上に同時に認められることも多い(図12)。

ECA上に発育した典型的な集落は、形は円形・やや平坦な凸状・辺縁円滑、色は灰白色~茶褐色、表面は滑らかでメタリックな光沢がある。また、集落塊自体はまとまりが強いが、培地へ粘着することはない。一方、このような典型的な集落以外にも半透明あるいは透明な集落を形成したり、光沢を失った集落を形成したり、あるいは長期培養しても非常に小さな集落(直径0.1mm)の形成に留まつたりする集落変異株の存在が報告されている。またそのような変異株でなくとも、分離培養時に*T. equigenitalis*は様々な非典型的な集落を形成があるので注意が必要である。

すべての集落は臭気を発せず、周囲の培地を変化させない。

このように、本菌は典型的な集落では分離培地上の特徴から予測がつくものの、非典型的な集落では他の菌との区別は困難である。従って分離培地上で、臭気がなく周囲の培地に変化がない集落

表3 ユーゴンチョコレート寒天培地の作り方

ユーゴン寒天培地 (BBL)	40.5g	↓	118°Cで15分間滅菌
クリスタルバイオレット	1mg		
蒸留水	900ml		
馬血液 (脱線血 or ヘパリン加血液)	100ml	↓	80°Cで保温
ストレプトマイシン アンホテリシンB	400mg 10mg	↓	無菌的に添加後攪拌しながら 80°Cで10分間加熱処理
		↓	50°Cに温度を下げて保温
		↓	無菌的に添加後良く攪拌し シャーレに分注
		↓	4°Cで保存(1ヶ月まで)

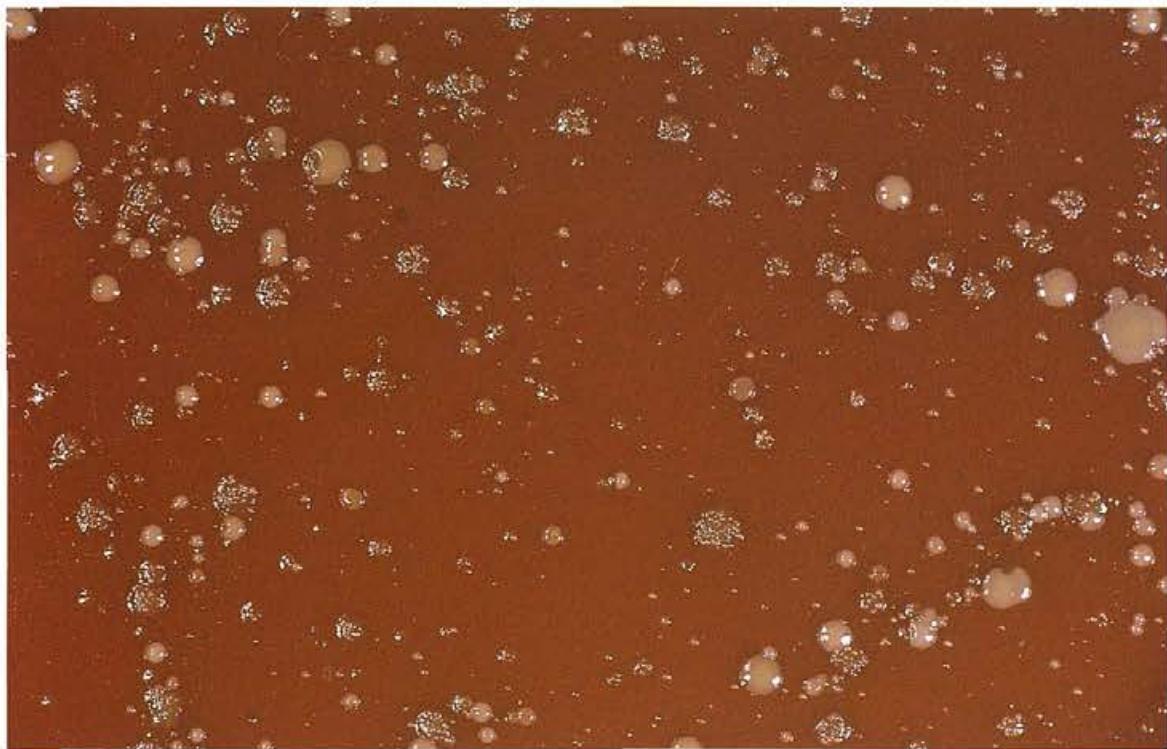


図12. ユーゴンチョコレート寒天培地上に形成された*T. equigenitalis*の集落：分離培養4日目。大小様々な大きさの集落が認められる。

の中で、はっきりと*T. equigenitalis*を否定できると思ったもの以外は疑わしい集落として釣菌し、以下の方法で同定を行うべきである。

釣菌した集落を血液寒天培地とSM無添加のECAに接種し、前者は好気で後者は10%の炭酸ガス(CO₂)存在下で4日間培養する。*T. equigenitalis*は血液寒天に集落を形成せず、ECAに集落を形成する。この集落の形態を観察するとともにグラム染色し、カタラーゼ試験、オキシダーゼ試験を行う。*T. equigenitalis*はグラム陰性の球桿菌で、カタラーゼ試験陽性、オキシダーゼ試験陽性である。分離培養時に非典型的な集落を形成していた株も、稀な集落変異株の例を除いて、純培養することによって典型的な集落を形成するようになる。

さらに紛らわしい場合には、家兎免疫血清を作製してスライド凝集反応を行うか、もしくはアビザイム(日本ビオメリュー・バイテック)を用いて菌体酵素活性の測定を行う。純培養した菌をキットの使用説明に従って、プレートに接種すれば4時間で成績が得られる(表4)。また、標準的な株入手しておけば、同定の参考になる。

表4 アビザイムを用いて測定した*T. equigenitalis*の菌体酵素活性

Control	-
2-naphthyl-phosphate	+
2-naphthyl-butyrate	-
2-naphthyl-caprylate	-
2-naphthyl-myristate	-
L-leucyl-2-naphtylamide	+
L-valyl-2-naphtylamide	-
L-cystyl-2-naphtylamide	-
N-benzoyl-DL-arginine-2-naphtylamide	-
N-glutaryl-phenylalanine-2-naphtylamide	-
2-naphthyl-phosphate	+
Naphtol-AS-BI-phosphate	+
6-Br-2-naphthyl- α D-galactopyranoside	-
2-naphthyl- β D-galactopyranoside	-
Naphtol-AS-BI- β D-glucuronide	-
2-naphthyl- α D-glucopyranoside	-
6-Br-2-naphthyl- β D-glucopyranoside	-
L-naphthyl-N-acetyl- β D-glucosaminide	-
6-Br-2-naphthyl- α D-mannopyranoside	-
2-naphthyl- α L-fucopyranoside	-

3) PCR診断

ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）とは、*in vitro*で特定のDNA領域を短時間で数百万倍に増幅させる技術であり、分子生物学の研究手段であるばかりでなく、最近では種々の疾病的診断法として応用が試みられている。

CEMのPCR診断法については、Bleumink-pluymらの方法（1994）、安斎・江口らの方法などがあるが、ここでは後者の方について記載する。

PCR診断に用いる試料は、感染馬の子宮頸管スワブがもっとも適している。保菌馬の陰核や陰茎スワブも検出可能であるが、垢の中にはPCR反応を阻害する因子があるため検出感度が低下する。

1) 採材は綿棒で行い、スチュアートの培地（アミューズ培地は不適）で輸送する。2) 綿棒を1.5mlのマイクロチューブに入れた1mlのPBSに懸濁し、15,000rpm 1分間遠心する。3) 上清を除き、沈査に蒸留水を50μlを加えて攪拌し、100°C 10分間加熱する。4) 15,000rpm 1分間遠心後の上清をDNAサンプルとする。5) 以下アニーリング温度55°Cで35サイクルのPCR反応を行い、増幅されたDNA断片を電気泳動で確認する（図13）。

使用出来るプライマーは以下のフォワードプライマー2種類（P1、P2）とリバースプライマーワン種類（N2）である（P1：CCATTAGAGGCTGT TATCAATCGGGAAACC、P2：CCATACCGAA

CCCAATACCAAGCACACAAG、N2：GTGT CATTAAGGTGTGTATTTGGTCTGGTG）。P1とN2の組み合わせで445bpのDNA断片が、またP2とN2の組み合わせで238bpのDNA断片がそれぞれ特異的に増幅される。またP1N2でPCRを行ったあとP2N2で2回目のPCRを行うことも出来る。

PCR診断は菌分離法では1週間以上かかる検査日数を一日に短縮することができる。従って、繁殖シーズン中の検査など迅速性が求められる状況での診断に有用な方法である。一方、PCR診断は菌分離に比べて検出感度がやや低い欠点を有しており、あくまで限局した使用に留めるべきである。最終的な診断は菌分離と併せて下す必要がある。

4. 血清学的診断法

1) 間接血球凝集反応

間接血球凝集反応は、感作血球を作製しておけば短時間で多くの血清を診断することの出来る簡便な血清反応法であり、わが国では現在、本法を用いて馬伝染性子宮炎の血清診断を実施している。以下に江口らの方法を紹介する。

固定赤血球の作製：1) アルサーバー液で採取した馬血液をPBG ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 20.4g、 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 2.8g、glucose 27.0gに蒸留水を加え1,000mlとする)で4回洗浄し、20%赤血球浮

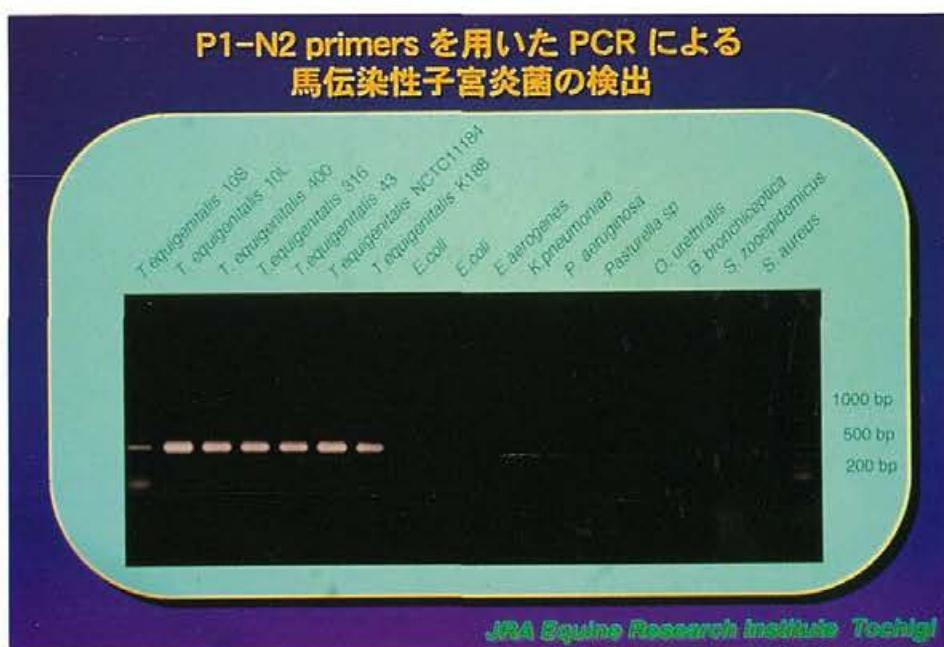


図13. PCRによる*T. equigenitalis*の検出：*T. equigenitalis*では445bpのバンドが認められるが、それ以外の菌では認められない。

遊液を作製する。2) 等量の0.2%グルタールアルデヒドPBGを徐々に加え、37°Cで15分間インキュベートして赤血球を固定する。3) PBGで4回、更にPBS ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 2.56g, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.45g, NaCl 8.0g)に蒸留水を加え1,000mlとする。 $\text{pH}7.2$)で10回洗浄後、10%固定赤血球を作製する(保存するときはアジ化ナトリウムを0.1%となるように添加して4°Cに保存する)。

抗原の作製: 1) SM無添加ECAに*T. equigenitalis* K188株を接種し、4日間培養する。2) 寒天平板培養1枚あたり2mlの滅菌PBSで集菌し、滅菌ガーゼで濾過して大きな夾雑物を除去する。3) PBSで5回洗浄後、初期菌液量の2.5倍量の滅菌蒸留水に再浮遊させる。4) 等量の0.5%ヒアルロニダーゼ水溶液を加え、37°Cで2時間インキュベートし、5分間ポイルする。5) PBSで2回洗浄後、少量の滅菌蒸留水に懸濁して超音波処理により菌体を破壊した後、ヒアルロニダーゼ処理直前の菌液量の1/2容量まで滅菌蒸留水を加える。6) 遠心により非破壊残渣を除いた後で、グルタールアルデヒド不溶化馬血清で吸収する。

感作血球の作製: 1) 10%固定馬赤血球をPBSで2回洗浄後、PBSで20%血球液を調整する。2) 等量0.005%タンニン酸PBSを混合し、37°Cで10分間インキュベートする。3) PBS($\text{pH}6.4$)で1回洗浄後、同PBSで20%血球液とする。4) この

20%血球液：抗原液：PBS($\text{pH}6.4$)を1:1:8の割合で混合し、ゆっくり攪拌しながら37°Cで1時間感作する。使用する抗原液の濃度は予め対照血清を用いた予備試験により決定しておく。5) PBS及び0.5%牛血清アルブミンPBSでそれぞれ1回洗浄後、0.5%牛血清アルブミンPBSで血球濃度が1%となるように調整したものを感作血球液とする。

反応方法: 1) 被検血清をPBSで2倍に希釈し、60°Cで20分間非効化する。2) V底マイクロプレートに最初の1列を除いてPBSを50μlずつ分注する。3) 非効化した2倍希釈血清50μlを最初の列に入れ、以下2倍階段希釈を行う。4) 感作血球を全ての穴に50μlずつ加え、すぐにプレートミキサー等で攪拌し(1分間)、室温に2時間静置する。必要に応じ対照血清を置く。

判定: 血球の凝集が明瞭でV底にほとんど非凝集血球の沈降(目玉)が認められない穴を+、V底に明瞭な非凝集血球の沈降(目玉)が認められる穴を-とし、+を示した血清の最高希釈倍数(抗原液を加える前の血清希釈倍数)をその血清のIHA値とする。IHA値が64倍以上の血清を陽性、32倍を疑陽性、16倍以下を陰性とする(図15)。ただし、個体別の診断を行う場合は、感染前後の2点血清を用いて抗体価の変動を確認することが望ましい。



図14. 間接血球凝集反応用の感作血球液

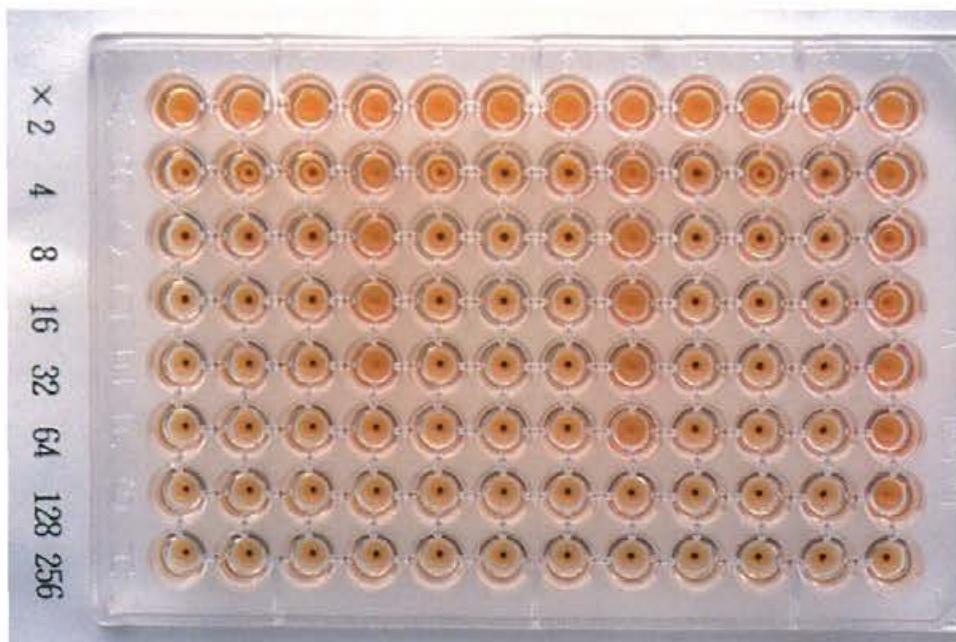


図15. 間接血球凝集反応: 左から4列目が32倍の疑陽性、8列目が64倍の陽性、12列目が128倍の陽性を示している。

2) その他の血清反応

試験管凝集反応、補体結合反応（CF）、ELISAなどが開発されているが、その中では補体結合反応が最も信頼性の高い方法とされている。CFは、

希釈液に Mg-食塩水（0.85%NaCl、0.01% MgSO₄・6H₂O）を用い、3%羊赤血球液と3単位溶血素を等量混合して作製した感作血球、2単位補体液、4単位の抗原液を使用し、定法により試

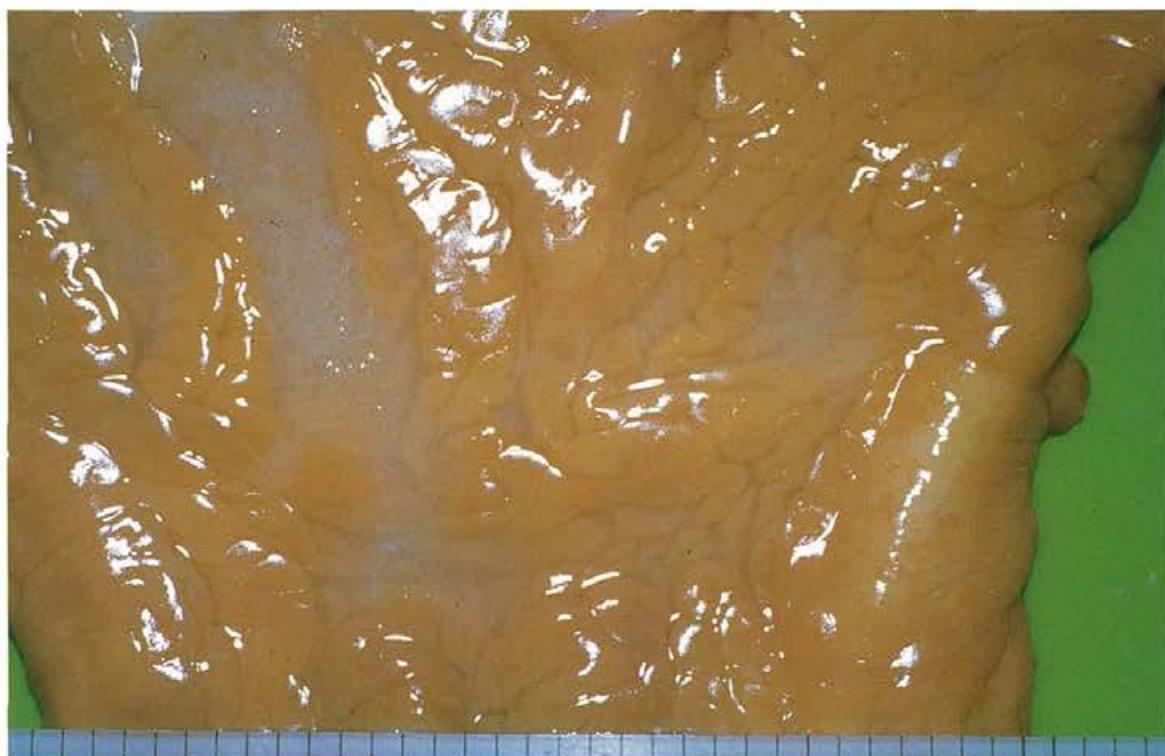


図16. 急性期剖検例：子宮粘膜は水腫性。乳白色（重湯様）で粘稠な滲出液に被われている。



図17. 亜急性期剖検例：子宮粘膜は軽度に充血し、不潔な茶褐色を呈する。
子宮体部には乳白色の滲出液が貯留している。子宮腰部にも充血が認められる。

験管法あるいはマイクロプレート法で実施する。抗原液は以下の方法で作製する。1) SM無添加ECA 5枚に *T. equigenitalis*K-188株を接種し4日間培養する、2) PBSに培養菌を懸濁し3回洗浄した後10mlの生理食塩水に浮遊させる、3) 4℃、20W、5分間の超音波処理を行ったあと遠心し上清に0.4%となるようにホルマリンを加える、4) Box titration法で抗原力値を測定し4単位に希釈する。判定は75%以上の溶血阻止を示した血清の最高希釈倍数をCF値とし、CF値4倍以上の血清をCEM陽性と判定する。

なお、試験管凝集反応法、補体結合反応法の詳細については本パンフレットの旧版に詳しく記載してある。

5. 病理学的診断法

1) 剖検所見

肉眼的病変は子宮、子宮頸管にはほぼ限局している。子宮内膜の皺壁は水腫性となり、粘膜は灰白色でやや粘稠な滲出液におおわれる。滲出液は、急性例では重湯様の粘度の低い混濁液であり、経過が長引いた例では粘度を増し、淡黄色調をおびる。ふつう卵巣、卵管、膣および膣前庭には病変

は認められない。実験感染による急性例の剖検では子宮内膜、子宮頸管、卵管、膣などの粘膜の著しい水腫が認められ、子宮および膣に滲出液の貯留を認めた。また、子宮頸管および膣の粘膜にはしばしば充血が顕著で、ときに出血を認める例もあった。(図16) (図17)

2) 病理組織学的所見

病理組織学的には子宮全域におよぶ急性子宮内膜炎像を呈する。とくに、粘膜固有層の水腫と好中球およびリンパ球からなる炎症性細胞浸潤が注目される。子宮内膜上皮および腺上皮の細胞間隙はしばしば拡張し、好中球の遊走を認める。子宮内膜表面および腺腔には多数の好中球を認める。固有層には好中球の他、リンパ球やプラズマ細胞が多数浸潤し、ときには好酸球が認められる。その他、実験感染例では子宮内膜上皮の変性・壊死あるいは過形成、子宮腺の拡張、固有層のリンパ管の拡張なども認められている。(図18)

通常、*T. equigenitalis*は子宮内膜表面(腺腔内)の粘液中で増殖するので、病変は内膜にとどまる。しかし、ときに上皮間隙から侵入し、リンパ管のなかで増殖することがある。このような症例では病変は筋層におよぶ。

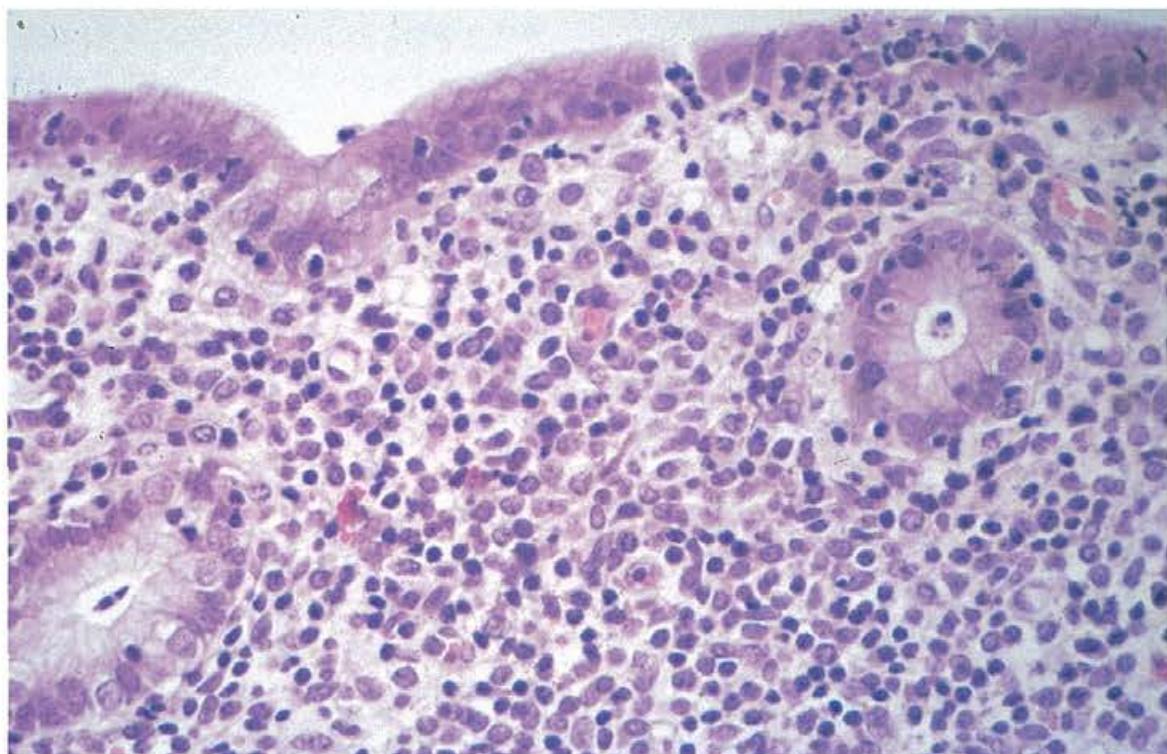


図18. 子宮粘膜面の病理組織所見：粘膜固有層には水腫と炎症性細胞浸潤が顕著。浸潤細胞の大多数はリンパ球で、子宮粘膜表面や子宮腺腔には上皮細胞間隙から遊走する好中球が認められる。

V 予防と治療

1. 予防

ワクチンによるCEMの予防は行われていない。これまで試みられたワクチンが子宮内における感染抗体の十分な産生を促さず、感染実験においても感染を十分に防ぐことが出来なかったことや、ワクチンは保菌状態にある*T. equigenitalis*への殺菌効果が期待出来ないことなどがその理由である。

本症の予防には、まず保菌馬の摘発が最も重要である。すべての繁殖雌馬、種雄馬および試情馬は交配に供する前に*T. equigenitalis*陰性であることを確認しておかなければならない。一方、繁殖シーズン中は感染馬の早期発見と交配中止が重要である。臨床的に本症を疑う馬が認められたらただちに検査を実施し、陰性が証明されるまで交配を中止しなければならない。もちろん、馬を取り扱うものや獣医師はこの間、馬同士の接触によるおよび人為的な伝播を防ぐための最大限の努力を怠ってはならない。

2. 治療

1) 薬剤投与と洗浄

雌馬

CEMに感染した雌馬は、子宮洗浄と子宮内への抗菌剤の投与および陰核からの除菌を行う。全身の薬物投与の併用も効果があるとされるが通常は必要ない。子宮洗浄液にはペニシリンGやアンピシリンなどのペニシリン系抗生物質を単独で用いるか、これにゲンタマイシン等のアミノ配糖体系抗生物質(ただしストレプトマイシンは不可)、ポリミキシンB、ニトロフラゾンなどを併用するかして行う。

子宮洗浄と併せて陰核からの菌の除去が必要である。0.02%のクロルヘキシジンを使って陰核の消毒を行う、この際、ブラシや綿棒などの器材を用い、陰核窩や陰核洞内の垢を完全に除去することが治療の決め手となる。消毒後はたっぷりの抗生物質軟膏を陰核に塗り、表面を覆って菌の再付着を防ぐ。これらの治療を毎日5-7日間行った後、子宮頸管および陰核からの菌分離検査を行って、

菌の消失を確認する。検査は治療終了後7日目より始め、1週間隔で3回行う。通常は上述した治療によりほとんどの症例で治癒するが、治療に反応しない頑固な保菌馬の存在も稀に認められる。このような雌馬では、外科手術による陰核の摘出・除去を行うか、馬そのものを淘汰しなければならない。

雄馬

雄馬の治療も雌馬の陰核と同様の方法で陰茎垢の中に潜伏している菌を完全に除去する。0.02%のクロルヘキシジン液を使ってブラッシングを行い、包皮の襞、尿道洞、亀頭窩から垢を完全に除去する。その後、抗生物質軟膏をたっぷりと塗布して菌の再付着を防ぐ。処置は陰茎を勃起させて実施するとよい。これらの治療を毎日5-7日間行い、治療終了後7日目より始めて1日おきに3回の菌分離検査を行い、完全に菌が消失したことを確かめる。

CEMの治療を行う際に注意しなければならないことに、菌交代症がある。薬剤抵抗性菌による菌交代現象は雌雄を問わず起こる危険性があり、特に莢膜1型クレブシェラと緑膿菌が治療後の生殖器に感染して子宮炎の流行を起こすことが多い。このような疾病を防ぐためには、治療薬の濃度や強すぎるブラッシングに注意し皮膚や粘膜に過剰な刺激を与えないことが重要である。また、感染の機会をなくすように生殖器の衛生的な管理も大切である。一方、CEMの治療が終了した後に、健康な馬の陰核・陰茎の正常細菌叢を再定着させる方法が有効とも言われている。

2) 陰核洞切除手術

薬剤投与と洗浄を完全に実施すれば、ほとんどの感染馬および保菌馬から菌を除くことが出来る。しかしながら稀に、いくら洗浄を行っても除菌されない頑固な保菌馬が認められることがある。繁殖牝馬におけるこのような症例の多くは、陰核洞の深部に菌が存在するため洗浄によってこれを除くことが困難な例と考えられる。そういう場合、陰核洞切除手術が有効な場合がある。以下にその術式を紹介する。1) 馬を柵場保定し、尾

を上方につり上げて固定する。陰核を0.02%クロルヘキシジン液で良く洗浄し、陰核洞内の除去困難なもの以外の陰核の垢を完全に除去する。2) キシラジンで鎮静処置を行う。3) 細い探子を用いて正中および測陰核洞の深さおよび方向を予め測っておく。4) 鼻捻子保定する。5) 陰核洞周囲の切開部位（横行小帶ヒダ、陰核亀頭等の組織）に、局所麻酔を注入する（図19）。その際、陰核亀頭部への注入は大きな圧を必要とし疼痛を伴うので注意を要する。通常は2%キシロカイン10mlで十分である。6) 2本のアリス組織用ピンセットを用いて横行小帶ヒダを背側に持ち上げ、助手がそのまま押さえる。7) 外科用メスを用いて陰核洞周囲に横行小帶ヒダを中に含む台形の切り込みを入れる（図20）。8) 切り込み部分をピンセットで挟み。曲尖鉄を用いて横行小帶ヒダおよび陰核洞を含む組織を切り取る（図21）。その際には2)で予め測っておいた陰核洞の深さおよび方向を念頭におき陰核洞の取り残しがないようにすることが重要である。9) 切除面に消毒剤を塗布する。通常、出血は少量で約2週間で完全に治癒する。10) 切除了陰核洞の細菌検査を行う場合は、手術前後の消毒は行わずに微温湯で洗浄し、切除片をアミューズ培地に入れ検査室へ輸送する。

3) 淘汰

頑固な保菌馬の最も有効な対策は淘汰である。治療による効果が認められない場合、淘汰を行う必要がある。



図19. 陰核洞切除手術：陰核亀頭へ局所麻酔薬の注入

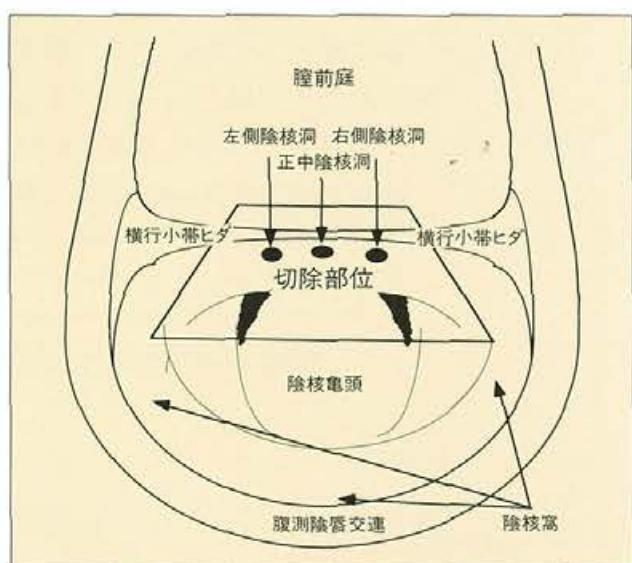


図20. 陰核洞切除手術：切除部位



図21. 陰核洞切除手術：切除後の陰核

おわりに

本パンフレットの作成に際しては、以下の文献・資料を参考にするとともに、多くの方々の助言および協力を頂きました。特に、臨床病理学的診断法および病理学的診断法の項は微生物研究室長の和田隆一氏に、間接血球凝集反応の項は農林水産省家畜衛生試験場病原診断研究室長の江口正志氏に、陰核洞切除術の項は日本中央競馬会馬事部防疫課の菊田淳氏に、それぞれ全面的なご協力を頂きました。また、写真撮影にあたっては微生物研究室の山川武男氏に協力いただきました。

末尾ではありますがご紹介ならびにお礼を申し上げます。

馬の伝染性子宮炎. 鎌田正信・田渕英一, 軽種馬防疫協議会刊(非売品), 1980.

馬の伝染性子宮炎. 鎌田正信, 日獣会誌, 1979, 32, 489-494.

馬伝染性子宮炎. 江口正志, 日獣会誌, 1986, 39, 679-686.

Refresher Article: Contagious equine metritis(CEM)., Ricketts, S. W., 1996.

Equine Vet. Education, 8, 166-170, 1996.

日本中央競馬会競走馬総合研究所栃木支所
研究役 安斎了

(社)全国家畜畜産物衛生指導協会の馬関係資料一覧

馬の健康管理

消毒法Q&A

馬の伝染性子宮炎（第1版）

馬のウイルス性動脈炎

馬の寄生虫病

馬輸送の実際

腺疫

馬のロドコッカス感染症

馬のインフルエンザ（JRA競走馬総合研究所発刊）

馬の毛色と特徴

解説書（軽種馬登録協会発刊）

下敷き（軽種馬防疫協議会）

ビデオ

馬のハンドブック（上下巻）

日本中央競馬会助成事業

地方競馬益金補助事業

社団法人 全国家畜産物衛生指導協会

〒106-0041 東京都港区麻布台2-2-1 麻布台ビル

TEL.03(5570)3561