

# 第 45 回生産地における軽種馬の 疾病に関するシンポジウム

( 平 成 29 年 度 )

## 講 演 抄 録

日時 平成 29年 7月 13日 (木)

会場 静内エクリップスホテル  
2F エクリップスホール

日本中央競馬会  
馬事部 防疫課



## 第45回 生産地における軽種馬の疾病に関するシンポジウム

### タイムテーブル

10:00～	開会式
10:10～	シンポジウム1 「馬鼻肺炎による流産対策」 ・演題 1) ～ 4) 座長:佐藤 研志、松村 富夫 ・総合討論
12:00～	帰朝報告 「米国ケンタッキー州における繁殖牝馬および子馬の獣医療」 遠藤 祥郎
12:30～	昼食
13:20～	シンポジウム2 「感染症対策－有効な消毒法と医療施設における実践例」 ・演題 1) ～ 3) 座長:丹羽 秀和 ・総合討論
14:30～	一般講演 ・演題 1) ～ 3) 座長:羽田 哲朗
15:00	閉会式
	終了・解散

## 第45回 生産地における軽種馬の疾病に関するシンポジウム

### プログラムおよび抄録目次

主催：日本中央競馬会（JRA）

開催日時：平成29年7月13日(木) 10時00分～15時00分

開催場所：静岡エクリプスホテル2F エクリプスホール

<開 会>		10:00
<開会の辞>	額田 紀雄（JRA 馬事部防疫課）	
<開会挨拶>	木村 一人（JRA 馬事担当理事）	

#### <演 題>

● シンポジウム1	10:10～
-----------	--------

### 「馬鼻肺炎による流産対策」

座長：佐藤 研志（北海道日高家畜保健衛生所 次長）、松村 富夫(JRA 参与)

1) 牧場における馬鼻肺炎流産の予防策	2
○富成 雅尚（JRA 日高育成牧場）	
2) 日高管内における流産発生状況と ERV 継続発生防止への取り組み	9
○宮澤 国男（北海道日高家畜保健衛生所）	
3) 馬鼻肺炎生ワクチン（エクエヌテクト ERP）について ー妊娠馬への効能追加ー	15
○大森 崇司（日本生物科学研究所）	
4) 妊娠馬での馬鼻肺炎生ワクチンの使用方法に関する考察	23
○辻村 行司（JRA 競走馬総合研究所）	

#### 総合討論

● 帰朝報告	12:00～
--------	--------

### 「米国ケンタッキー州における繁殖牝馬および子馬の獣医療」

○遠藤 祥郎（JRA 日高育成牧場）

----- 昼食休憩（12:30～13:20） -----

● シンポジウム 2

13 : 20~

「感染症対策－有効な消毒法と医療施設における実践例」

座長：丹羽 秀和（JRA 競走馬総合研究所）

- 1) 馬の医療関連感染症原因菌の生残性と各種消毒薬の効果・・・・・・・・・・ 32  
○越智 章仁（JRA 競走馬総合研究所）
- 2) JRA における *Clostridioides difficile* 感染症の発生状況と感染防止対策・・・・・・・・ 39  
○内田 英里（JRA 競走馬総合研究所）
- 3) 社台ホースクリニックにおける感染症対策・・・・・・・・・・ 43  
～オゾンガス ・ オゾン水を利用した消毒～  
○鈴木 吏（社台ホースクリニック）

総合討論

● 一般講演（発表 8 分、質疑応答 2 分）

14 : 30~

座長：羽田 哲朗（JRA 日高育成牧場 生産育成研究室長）

- 1) 社台ホースクリニック馬細胞治療センターと ADRCs・・・・・・・・・・ 50  
○加藤 史樹（社台ホースクリニック）
- 2) 馬の黄体の超音波所見から何が読み取れるか？・・・・・・・・・・ 54  
○七尾 祐樹（NOSAI みなみ日高支所 中部家畜  
診療センター）
- 3) 抗ミュラー管ホルモン（AMH）値が微増した繁殖牝馬の 2 症例・・・・・・・・ 59  
○大塚 智啓（日高軽種馬農業協同組合）

<閉会の辞> 田嶋 義男（JRA 競走馬総合研究所）

<閉 会>

15 : 00



第 45 回生産地における軽種馬の疾病に関するシンポジウム

## シンポジウム 1

### 「馬鼻肺炎による流産対策」

# 牧場における馬鼻肺炎流産の予防策

JRA 日高育成牧場 富成雅尚

馬鼻肺炎ウイルスによる流産および生後直死は、1頭の流産に止まらず、複数頭続発するケースが認められるため、生産牧場に大きな被害を及ぼす。この原因ウイルスであるウマヘルペスウイルス1型（Equine Herpesvirus type 1、以下 EHV-1）は、一度感染すると馬の体内に一生潜伏し、何らかのタイミングで突然再活性化し流産を引き起こす場合がある。また、再活性化した馬は感染源となり、ウイルスを周囲の馬に拡散する。このことから、EHV-1は撲滅が困難なウイルスであると言われている。

EHV-1流産に対しては「適切な飼養管理」「ワクチン接種」「流産発生を想定した準備」が予防策の3本柱であり、このうち1つでも欠かすことができない。

さらに、これらの予防策および発生時の対策を適切に実施するためには、獣医師や牧場スタッフ全員が EHV-1の感染経路やウイルス特性などを十分に認識しておくことが極めて重要である。

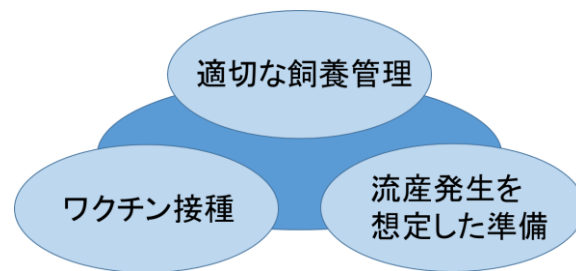


図1. 馬鼻肺炎の流産予防策の3本柱

## 牧場スタッフが熟知しておく必要がある EHV-1の基礎知識

### 感染経路

感染源は「感染馬の鼻汁」や「流産時の羊水・後産・流産胎子」である。妊娠馬がこれらの感染源に直接的、または間接的（人、鼻ねじなどを介して）に接触して感染する（図2）。また、ウイルス粒子を含むエアロゾルを介した空気感染の可能性も指摘されている。

### 再活性化

一度 EHV-1に感染すると、生涯にわたって、その馬の体内（リンパ節や三叉神経節など）に潜伏し、体力低下、輸送、寒さなどのストレスが引きがねとなって、再活性化がおこる（図3）。これにより、潜伏部位から体内に EHV-1が拡散し、子宮内の胎子に到達した場合、流産を引き起こす。EHV-1が再活性化した馬はウイルスを拡散し、特に若馬が初感染した場合、一度感染した経験をもつ馬よりも多くのウイルスを拡散させる。また、このような若馬はその後 EHV-1を潜伏させて、再活性化のリスクを有することになる（図4）。このように、EHV-1はウマの体内に潜伏する特異的なライフサイクルを有しているため、根絶不可能なウイルスと考えられている。





図 2. EHV-1 の感染経路

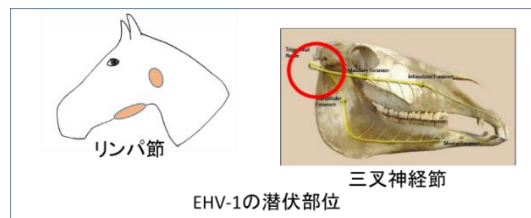


図 3. EHV-1 の潜伏場所

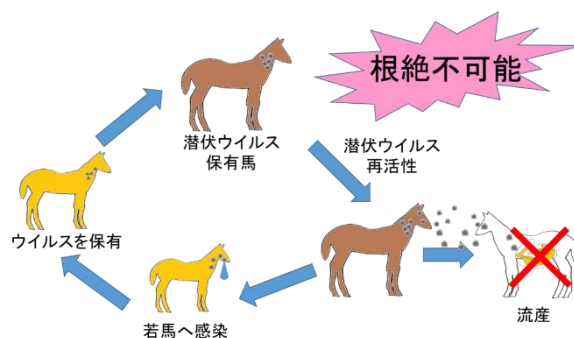


図 4. EHV-1 の感染環

## 症状

EHV-1 は、妊娠末期（9 ヶ月以降）の流産または生後直死を引き起こす。発症した母馬は発熱や鼻漏などの呼吸器症状が認められないことが多い。また、流産胎子は汚れや腐敗などがなく新鮮で、見た目が比較的きれいであることが特徴である。なお、生後直死する子馬は、明らかに虚弱で元気がない様子が観察される。その他の症状として、稀に母馬に起立不能などの神経症状を認める。注意が必要なのは、全く症状がないままウイルスを拡散させる馬がいることである。この場合、飼養者の注意が行き届かないことが多く、感染拡大に繋がる。

## EHV-1 流産の予防方法

### 予防接種

ワクチンについては、正確な知識を持ったうえで適切に接種することが馬の飼養管理者には求められる。しかし、予防接種による効果が完全ではないため、生産現場では「馬鼻肺炎のワクチンは流産予防に効果がないのではないか？」「ワクチン接種が流産をおこすのではないか？」との流言が囁かれていることも事実である。たしかに、流産発生状況を見ると、ワクチン接種馬でも流産していることから、ワクチンの流産予防効果を疑う人がいても何ら不思議ではない。しかし、ワクチンの効果については「馬鼻肺炎ウイルスの流産に対しては、ワクチンでは完全には予防することができない」というのが事実である。その理由の1つとして、EHV-1 の免疫回避能力が挙げられる。

多くのウイルスや細菌などの病原体は、免疫が備わったウマの体内に入った際には、抗体

や白血球などによる攻撃を受けることで死滅もしくは病原性が減弱する。一方、EHV-1 の場合はウマの白血球内に入り込むことで様々な免疫による攻撃から逃れる性質を有している (図 5)。このため、ウマの体内で生き続けられる、すなわちワクチンがその効果を十分に発揮できない病原体と考えられている。

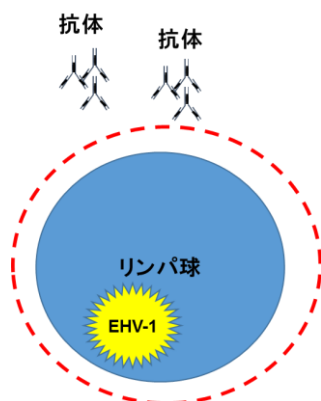


図 5. EHV-1 は免疫による攻撃を逃れる性質を有している。

だからといってワクチン接種が意味をなさないわけではない。馬鼻肺炎ワクチンに認められている重要な効果の 1 つに、感染・発症したウマの鼻からのウイルス拡散の防止効果がある。これは、EHV-1 がリンパ球から呼吸器粘膜の細胞に移行する際に、リンパ球から外にでた「無防備な EHV-1」を抗体が攻撃することによるものと推察されている (図 6)。

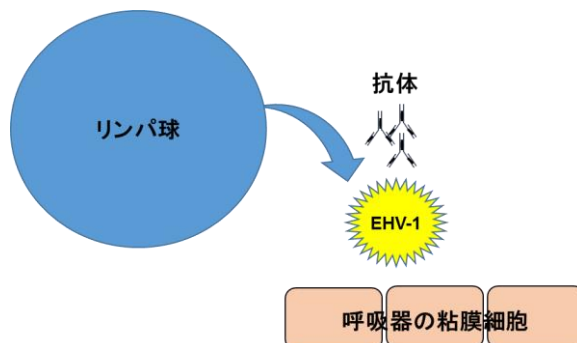


図 6. リンパ球の外に出た EHV-1 を抗体が攻撃する。

前述したように、1 頭のウマが再活性化した EHV-1 を鼻からバラ撒くことで同居馬への感染が拡がり、厩舎全体さらには牧場全体のウイルス量が増加することで、流産発生リスクは確実に高まる。このことから、ワクチンは再活性化した 1 頭のウマからのウイルス拡散を抑制し、厩舎全体あるいは牧場全体の感染リスク、ひいては流産発生リスクを減少させることができる (図 7)。

このため、牧場内のワクチン接種プログラムを考慮する場合には、「一部の妊娠馬だけ接種する」「同居している空胎馬や当て馬には接種しない」などは、馬鼻肺炎ワクチンの効果的な使用方法ではない。

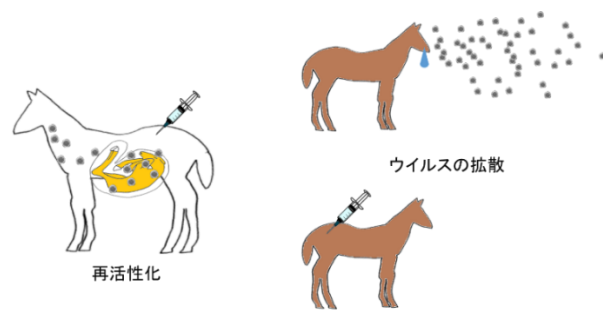


図 7. ワクチンでは EHV-1 の再活性化を防げないが、ウイルス拡散の抑制は可能。

不活化ワクチンの場合、妊娠馬に対して最初の 1 回目接種を妊娠 6～7 ヶ月目、2 回目を妊娠 7～8 ヶ月目に実施し、以後は出産まで、毎月接種するプログラムが推奨されている。しかし、牧場の馬群全体の免疫を上昇させるためには、妊娠末期の馬のみならず、それ以前の妊娠ステージの馬や、牧場で管理している他の同居馬（育成馬、空胎馬、乗馬、あて馬など）にも接種した方が、予防効果が高まることは容易に理解できる（図 8）。

また、ワクチンの複数回投与の影響を調査したコーネル大学の研究チームは、3 回目以降のワクチン接種については、2 回目接種との間隔を 90 日以上とした方が抗体価の増加が見込まれる一方で、60 日以内では逆に抗体価が減少するリスクがあると発表している。このことから、現行のワクチン接種プログラムの接種間隔に関しては再考の余地があるかもしれない。

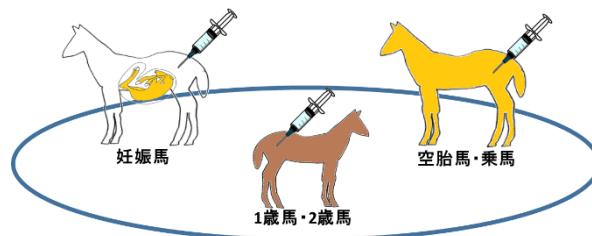


図 8. 妊娠馬だけではなく同居馬にも接種し、牧場全体の馬の EHV-1 免疫を上昇させる。

#### 妊娠馬の隔離

妊娠馬については、他の同居馬と可能な限り隔離して飼養管理することが望ましい。特に若馬（当歳～1 歳）が初めて感染した場合、多くのウイルスを拡散させるので注意が必要であるため、これらの馬を妊娠馬の近くでは管理しないこと、若馬を触った後は妊娠馬を触らないようにすること、および、触った場合の消毒・着替えが推奨される。特に、馬取扱者が育成馬厩舎と繁殖牝馬厩舎を行き来する際には注意が必要である。また、新たに入厩する上がり馬などでは、輸送や環境変化のストレスによりウイルスが再活性化しやすいので、妊娠馬のいる厩舎に直接入れることは推奨されない。繁殖シーズンが終了するまで妊娠馬と隔離して管理することが好ましいが、やむをえない際には 3 週間程度の隔離を行い、感染徴候がないことを確認したうえで入厩させる。

#### ストレスの軽減

ウイルスの再活性化を引き起こすストレスとして、長距離輸送、手術、寒冷ストレス、放

牧地や馬群の変更、過密放牧、低栄養などがあげられる。普段から、なるべく妊娠牝馬に対するストレスを軽減した飼養管理を心がける。

## 消毒

妊娠馬の厩舎には踏み込み消毒槽を設置する。消毒液としてはアンテックビルコン S やクレンテなどの塩素系消毒薬、パコマやクリアキルなどの逆性石鹼が有効である。しかし、いずれの消毒薬も低温では効果が低下するので、微温湯での希釈や屋内の温かい場所への設置など、水温低下を防止する措置が必要である（図 9）。また、消毒薬は、糞尿などの有機物の混入で効果が低下するので、頻繁な薬液交換が推奨される。野外や土間などには、消石灰の散布が効果的であるが、塩素系消毒薬と混ざった場合、効果が減弱するので注意が必要である。



図 9. 冬季は消毒液の微温湯希釈や屋内の設置等の水温低下防止措置が必要となる。

## 発生時の対応 一流産が発生したら！！2つのTー

EHV-1 による流産は、妊娠 9 ヶ月以降、時期としては 2～3 月に多発する。このため、特にこの時期に流産もしくは生後 1～2 日後に子馬が死亡した場合には、検査結果が判明するまでは EHV-1 感染を想定した「続発防止措置」が必要となる。この場合、2つの T、「徹底消毒」と「単独隔離」が重要となる。

続発防止措置 2つのT  
「徹底消毒」  
「単独隔離」

### 「徹底消毒」

馬鼻肺炎による流産の継続発生を防止するためには、流産胎子や羊水、およびその母馬からの感染拡大防止が重要である。流産によって排出されたウイルスは冬の低温環境下では 2 週間経過しても全体の約 1/4 が生存する。

流産が発生した場合、すみやかに発生厩舎（胎子、寝藁、母馬および馬房）の徹底的な消毒を実施する。使用する消毒薬は塩素系消毒剤のように金属腐食性がなく、生体にも比較的安全とされるパコマなどの逆性せっけんの使用が推奨される。微温湯で希釈した消毒液を大量に用いて徹底的に消毒する（図 10）。



図 10. 流産が発生した場合、すみやかに胎子、寝藁、母馬、馬房を消毒する

### 「単独隔離」

流産をおこした母馬はウイルスの感染源となる。他の妊娠馬への継続発生を防止するため、ただちに流産母馬を牧場内の離れた場所に位置する厩舎に隔離する。もし、その隔離厩舎に他の馬がいる場合、それらが感染し牧場全体の被害を拡大させる可能性があるため、単独隔離が可能な厩舎への移動が望ましい（図 11）。特に EHV-1 への感受性が高い育成馬群との同居を避ける必要がある。なお、流産発生に備えて、消毒薬、バケツ・じょうろなどの必要品の準備（図 12）、また、流産発生時の母馬隔離場所や行動計画作成などの緊急時対応を事前に厩舎スタッフに周知することも重要である。

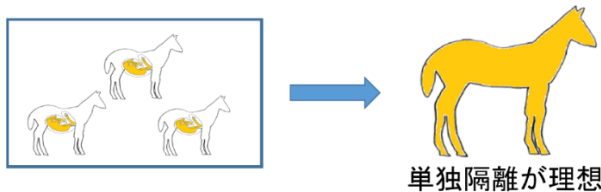


図 11. 流産した母馬は、単独隔離する



図 12. 流産発生時に必要な用具

### 流産発生時の手順

流産が発生した場合、管轄家畜保健衛生所における検査結果が出るまで「馬鼻肺炎」によるものと想定し、以下の措置を実施する。

- a) 流産胎子および母馬に触れる前に、獣医師に連絡する。その後、馬房前に逆性石鹼などの消毒液を入れた消毒槽を設置し、馬房に出入りする際は、必ず消毒槽で長靴を消毒する。
- b) 流産胎子と胎盤を処理するスタッフは 1 名に限定し、この担当者が流産胎子および胎盤を消毒し、プラスチック製の密閉容器に入れる。容器の代わりにビニール袋を使用する場合には二重にし、液漏れを防ぐ。また、羊水が付着したと考えられるすべての場所を直ちに消毒する。
- c) 流産牝馬は、消毒液を浸したタオルを用いて羊水中で汚れた部分を中心に洗浄・消毒した後、単独隔離する。
- d) 羊水が付着した寝藁は、十分に消毒液をかけて他の妊娠馬に接触しないように、堆肥下に埋めるなど、適切に処理する。

- e) 胎子、流産牝馬や寝藁を運んだ通路、使用した馬房掃除道具にも消毒液をかける。
- f) 流産原因が判明するまで、特定の1名のスタッフのみに流産牝馬の手入れや馬房清掃などを担当させる。また、作業中は作業着を着替え、他の妊娠馬への伝染の予防に努める。作業着は他の作業に使用せず、必ず消毒後に洗濯する。

#### EHV-1 のアウトブレイクに対するヘパリンの有用性

近年、EHV-1 に対するヘパリンの有用性が話題になっている。2009 年にドイツの牧場で EHV-1 による流産に端を発し、発熱および神経症状を呈する馬が多発するアウトブレイクが起こった。その際、発熱馬に対するヘパリン投与（25000IU 皮下注射 b.i.d.）により、神経症状の発生抑制が確認され、同剤の予防効果の可能性が示唆された。ヘパリンには、神経症状の要因とされている中枢神経領域における血栓性虚血に対する効果に加えて、EHV-1 ウイルスの細胞内への侵入阻害の効果があると考えられている。今後も更なる調査が必要だが、流産もしくは生後直死が起こった場合の継続発生防止策の 1 つとして考慮しても良いかもしれない。

#### 参考文献

Allen GP, (2002) Epidemic disease caused by Equine herpesvirus-1: recommendations for prevention and control. *Equine Vet Educ.* 14(3), pp. 136-142

Timoney PJ, (2011) Equine Herpesviruses. In *Equine Reproduction*. 2nd edn ed. A. O. McKinnon, Wiley-Blackwell, Oxford. pp.2376-2390

社団法人全国家畜産物衛生指導協会 (2007) 馬鼻肺炎 Equine rhinopneumonitis 東京

辻村行司・坂内 天・根本 学・山中隆史・近藤高志 (2015) 馬の病原ウイルスに対する消毒薬の不活化効果に関する研究 *馬の科学* 52(2):pp152-153

枝松 弘樹、浅野 明弘、西 英機 (2007) 馬鼻肺炎ウイルス野外株に対する消毒薬の効果 第 35 回生産地における軽種馬の疾病に関するシンポジウム 講演要旨 pp35-38

Wagner B, Goodman LB, Babasyan S, Freer H, Torsteinsdóttir S, Svansson V, Björnsdóttir S, Perkins GA. (2015) Antibody and cellular immune responses of naïve mares to repeated vaccination with an inactivated equine herpesvirus vaccine. *Vaccine.* 13;33(42):5588-97.

Walter J, Seeh C, Fey K, Bleul U, Osterrieder N. (2016) Prevention of equine herpesvirus myeloencephalopathy - Is heparin a novel option? A case report. *Tierarztl Prax Ausg G Grosstiere Nutztiere.* 44(5):313-317.

## 日高管内の流産発生状況と馬鼻肺炎の継続発生防止への取り組み

宮澤国男（北海道日高家畜保健衛生所）

### 【はじめに】

軽種馬の生産牧場では、安定した経営のために毎年健康な子馬を生産することが求められている。しかし、生産牧場では様々な原因により流産が発生しており、軽種馬の予防医学が発達した現在でも、流産は大きな問題となっている。

そこで、日高管内の流産発生状況を当所に搬入された軽種馬の流産胎子の病性鑑定結果をもとに調査し、検討した。また、管内の流産の主要な原因である馬鼻肺炎について、管内におけるまん延防止対策を紹介するとともに、近年問題となっている継続発生の要因を調査し、継続発生防止への取り組みを行ったので報告する。

### 【日高管内の流産原因調査】

平成16年度から平成25年度までの10年間に、病性鑑定のため当所に搬入された軽種馬の流産胎子2,002検体を対象に調査した。原因の判明した検体については、原因を感染性流産と非感染性流産に分類し、感染性流産はウイルス性、細菌性、真菌性に細分化した。また非感染性流産については、臍帯の捻転による循環障害（循環障害）、多胎、奇形、胎盤異常、その他に細分化した。

結果は、感染性流産は17.8%（357検体）、非感染性流産は25.2%（504検体）、原因不明は57.0%（1,141検体）であり、全体の43.0%で原因が特定された。なお原因不明のうち、食害や腐敗などにより、十分な検査が実施できなかったものは11.2%（128検体）であった。

感染性流産の内訳は、ウイルス性53.2%（190検体）、細菌性40.6%（145検体）、真菌性6.2%（22検体）であった。

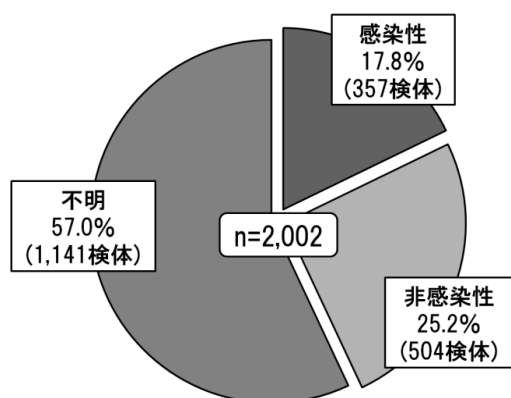


図1 全体の結果

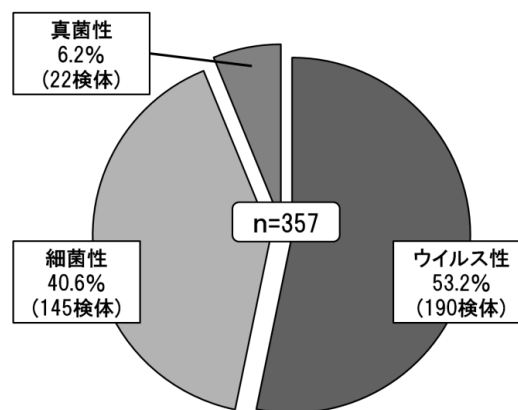


図2 感染性流産の内訳

非感染性流産の内訳は、循環障害68.7%（346検体）、多胎24.4%（123検体）、奇形3.2%（16検体）、胎盤異常2.4%（12検体）、その他1.3%（7検体）であった。

ウイルス性の原因は、全て馬ヘルペスウイルス1型（EHV1）による馬鼻肺炎であった。細菌性の原因菌は、*Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* が最も多く、次いで大腸菌が多かった。なお、平成19年度に馬パラチフスによる流産が確認された。

以上の調査結果から、管内での流産の原因として、馬鼻肺炎が多くの割合を占めており、本病の対策が重要であることが再認識された。

### 【日高管内における馬鼻肺炎のまん延防止対策】

日高管内では、各町の自衛防疫組合、畜産・軽種馬関係機関、獣医師組織が構成員である日高家畜衛生防疫推進協議会（以下、推進協）が、主に発生農場に対する防疫指導を記した「馬鼻肺炎ウイルス流産防疫要領」を定め、まん延防止対策を講じている。

流産発生時には、担当獣医師の指導に従い、病性鑑定を受けることを定め、診断に要する検査手数料は日高軽種馬農業協同組合が助成している。

本病が発生した場合は要領に基づき防疫対策を実施する。担当獣医師と家保は、発生牧場へ立ち入り、流産発生状況、馬房や放牧地の状況、ワクチン接種状況、その他飼養状況等を聞き取り、発生牧場に対して、その情報を基にした効果的な消毒方法と飼養管理、まん延防止のための移動自粛（最終発生から15日以上）等の防疫対策を指導している。また、同居馬の感染状況を把握するため、初発生時及び最終発生から2週間後に抗体検査を実施している。

なお、移動自粛の解除日については、臨床症状の有無、抗体検査、流産発生状況等を考慮の上、担当獣医師、家保及び推進協技術専門部会が協議して決定している。

このように日高管内では、関係機関が協力して本病のまん延防止に努めている。

### 【馬鼻肺炎発生農場における疫学調査及び継続発生要因の解析】

近年、日高管内の馬鼻肺炎発生戸数・頭数は増加傾向（図3）にある。

平成24年の繁殖シーズンは23戸34頭の発生がみられ、特にX地区では5戸13頭と発生が集中し、同地区のA牧場では8頭の継続発生があった。

本事例の疫学的な調査から、多発要因として、寒冷ストレスや近接した放牧地における接触感染による水平伝播が挙げられ、多発したA牧場では分娩時期が集中していたこと、また、EHV1を増幅しやすい育成馬が繁殖馬と同一厩舎内に飼養されていたことが感染拡大を招いたと考えられた。これらの事例から得られた対策も含め、当所は本病の対策を啓発してきたところであるが、特に平成26年のシーズンから、継続発生戸数・頭数が顕著に増加（図4）し、

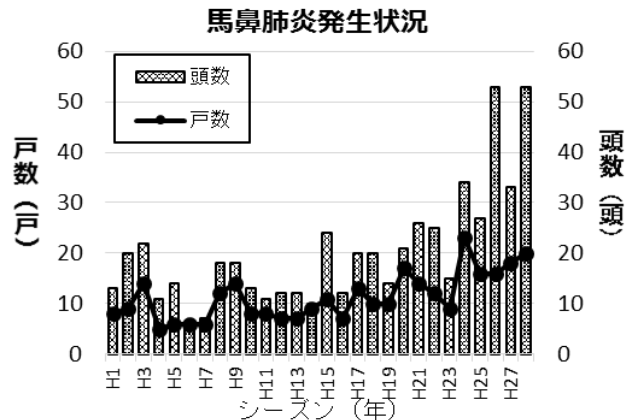


図3 馬鼻肺炎発生状況

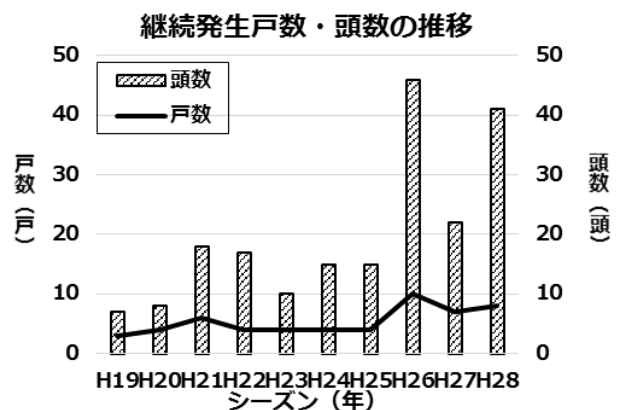


図4 馬鼻肺炎継続発生戸数・頭数の推移



妊娠馬のほとんどが流産するという事例もみられるようになった。継続発生の増加は、生産地全体に甚大な被害を及ぼすことになり対策が急務である。そこで、継続発生要因について調査・解析を行った。

## 1 調査方法

### 1) EHV1 の遺伝子解析

継続発生への関与を調査するため、日本中央競馬会競走馬総合研究所に依頼し、平成 25 年 10 月から 28 年 5 月に当所で検出された EHV1 遺伝子 148 検体の ORF30 及び 68 型別を行った。

ORF30 は、DNA ポリメラーゼ遺伝子であり、この遺伝子の 1 塩基置換を持つ変異株（以下、神経病原性変異株）による脊髄脳症の発生が欧米で増加している。さらに、この変異株が原因と判明している脊髄脳症の発生は流行規模が大きくなる傾向にある。

ORF68 は、68 番遺伝子の塩基配列の多型によって EHV1 は 6 つのグループに分類され、それらの分布とウイルスの地理的分布の関連が最近示された。したがって、ORF68 の多型は分子疫学遺伝子マーカーとなる可能性が示唆されている。

### 2) 疫学調査

農場における本病の防疫意識を調査するため、平成 25 年 12 月から平成 28 年 4 月に本病の発生があり、妊娠馬を 5 頭以上飼養している農場のうち、発生が 1 頭の農場（以下、単発）9 戸と発生が複数頭の農場

（以下、継続）9 戸を対象に調査を行った。内容として主に 4 つの区分に分け、①初発生時の対応状況、②放牧地・厩舎・馬房等の飼養状況、③消毒の実施状況、④その他の飼養・衛生管理について、それぞれ、図 5 に示す調査項目（65 項目）を設定の上、今回改めて聞き取り調査を実施し、防疫意識や飼養環境に差がないか両群を比較した。

聞き取り調査項目			
<b>1) 初発生時の対応状況</b>	<b>2) 放牧地・厩舎・馬房等の飼養状況</b>		
<ul style="list-style-type: none"> <li>・流産発見場所</li> <li>・流産発見までの時間</li> <li>・発見から胎子処置までの時間</li> <li>・胎子梱包方法</li> <li>・胎子梱包後の消毒</li> <li>・流産馬の消毒</li> <li>・流産馬の隔離状況</li> <li>・発生馬房の消毒</li> <li>・対応後の他馬への接触</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・放牧時間</li> <li>・放牧地毎の距離</li> <li>・放牧や集牧の順番</li> <li>・厩舎の配置状況</li> <li>・厩舎や馬房の構造</li> </ul>		
<b>3) 消毒の実施状況(発生前後)</b>	<b>4) その他の飼養・衛生管理</b>		
<ul style="list-style-type: none"> <li>・蹄邊消毒槽設置</li> <li>・厩舎通路</li> <li>・馬房</li> <li>・餌桶</li> <li>・水桶</li> <li>・放牧地の水桶・餌桶</li> <li>・頭絡・引き手</li> <li>・作業服・手袋</li> <li>・馬房掃除道具</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・馬鼻肺炎流産馬の管理の区別（管理者、衣服の交換等）</li> <li>・繁殖馬と育成馬の管理者</li> <li>・馬鼻肺炎発生後元の状態に戻すまでの期間</li> <li>・育成馬へのワクチン接種状況</li> <li>・管理馬の体温測定実施状況</li> </ul>		

図 5 聞き取り調査項目

## 2 結果

### 1) EHV1 の遺伝子解析結果

ORF30 による型別では、148 検体中 1 検体で神経病原性変異株が確認されたが、変異株が検出された流産胎子の母馬に神経症状はみられず、神経病原性変異株による継続発生はみられなかった。

ORF68 による型別では、単発ではグループ 1、2、3、5、

区分	単発						継続						
	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6	
グループ													
H25	4		1		7		2				2		
H26		2			5	1	4				5		
H27	3		2		6		3		2		2		
H28	1	1			8	1	1		1		6		

図 6 EHV1 の ORF68 による型別

6が検出され、継続ではグループ1、3、5が検出された（図6）。継続のみで検出されたグループは存在しなかった。

## 2) 疫学調査成績

### ア) 初発生時の対応状況（図7、8）

「流産発見までの時間」の項目では、継続7戸、単発3戸が翌日の朝に発見し、継続は単発と比較して流産発見までの時間が長い傾向であった。

「流産胎子発見から処置までの時間」の項目では、単発の全戸が発見後すぐに処置していたが、継続は5農場で発見から処置までの時間を要した。

「発生馬房の消毒までの時間」の項目では、単発7戸、継続4戸で流産発見後すぐに消毒し、単発は継続と比較して、すぐに発生馬房の消毒を実施している傾向が高かった。

「流産馬の隔離」、「流産馬の消毒」、「流産胎子の梱包方法」の項目では、両群とも半数以上がまん延防止を意識して行っており、両群に差はみられなかった。また、「梱包後の外側の消毒」、「発見場所」及び「流産対応後の他馬への接触」の項目では、両群に顕著な差はみられなかった。

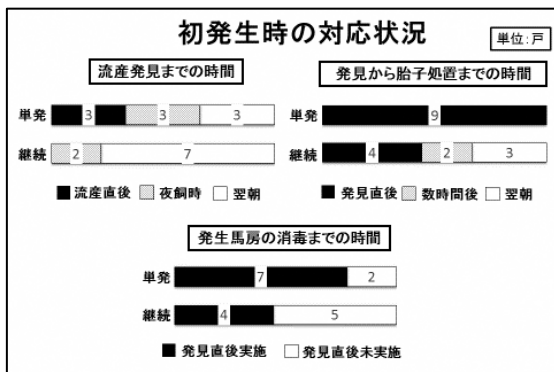


図7 初発生時の対応状況結果（1）

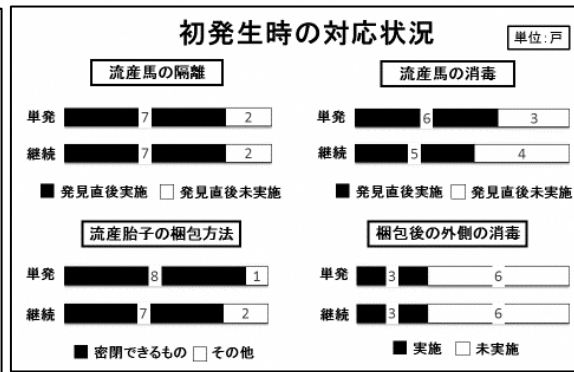


図8 初発生時の対応状況結果（2）

### イ) 放牧地・厩舎・馬房等の飼養状況

放牧状況や厩舎の構造、馬房の配置等の飼養環境が同居馬へのウイルスまん延に影響していることを考慮して、放牧地・厩舎・馬房等の飼養状況を比較したが、「放牧時間」、「放牧地毎の距離」、「放牧や集牧の順番」、「厩舎の配置状況」、「厩舎や馬房の構造」の項目で、両群に顕著な差はみられず、飼養環境の影響はなかった。

### ウ) 発生前後の消毒の実施状況（図9、10）

消毒についての意識を検討するため、通常時の消毒と発生後の消毒を比較した。

「厩舎通路の消毒」及び「餌桶の消毒」の項目では、単発4戸、継続1戸で通常より毎日実施しており、単発は継続と比較して、厩舎通路及び餌桶の消毒を日頃から実施している傾向が高かった。発生後において、「厩舎通路の消毒」の項目では、単発5戸、継続7戸が毎日実施し、「餌桶の消毒」の項目では、単発で4戸、継続7戸が毎日実施し、継続の方が高い傾向であった。

「踏込消毒槽の設置」及び「馬房の消毒」の項目では、発生前及び発生後で両群に顕著な差はみられなかった。

「水桶」、「頭絡・引き手」、「作業服」、「手袋」、「放牧地の水桶及び餌桶」及び「馬房掃除道具」の消毒の項目では、発生前後で両群に顕著な差はみられなかった。

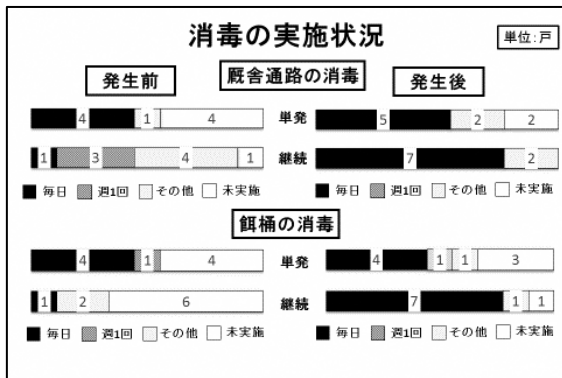


図9 消毒の実施状況結果（1）

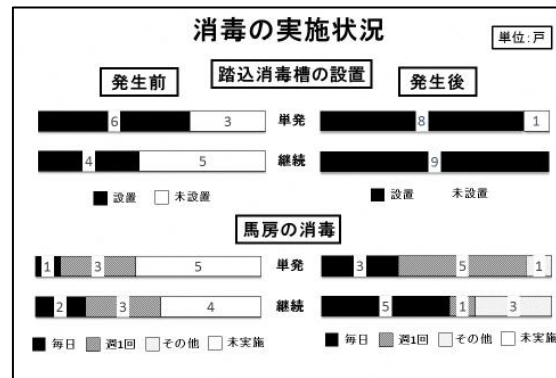


図10 消毒の実施状況結果（2）

エ) その他の飼養・衛生管理

「馬鼻肺炎流産馬の管理者の衣服の交換」、「繁殖馬と育成馬の管理者」、「馬鼻肺炎発生後元の状態に戻すまでの期間」、「育成馬へのワクチン接種状況」、「管理馬の体温測定実施状況」の項目では、両群に顕著な差はみられなかった。

3 考察

EHV1 遺伝子解析の結果から、神経病原性変異株の流行や継続のみで検出されたグループはなかったため、継続発生要因は、EHV1 の特定の株やグループによるものではないと推察された。

疫学調査結果から、「流産発見までの時間」、「流産胎子発見から処置までの時間」、「発生馬房の消毒までの時間」の項目で差がみられたことから、継続発生要因として流産発見時や流産胎子処置の対応、流産発生馬房消毒の遅れが考えられた。馬鼻肺炎流産馬の羊水や胎子、胎盤等には多量のウイルスが含まれているため、これらの処置の遅れがウイルスのまん延を引き起こし、継続発生に繋がったと推察された。また、単発では、「厩舎通路」や「餌桶」の消毒を発生前から実施している傾向が高く、発生前から消毒を実施することが継続発生予防に効果的であると考えられた。

その他、本調査を実施している中で、単発・継続牧場の両方で、日頃の消毒の重要性の認識不足や流産時の処置方法に不明点が多い傾向にあることが判明した。

【継続発生防止への取り組み】

馬鼻肺炎による被害を防ぐためには、放牧管理を含めた侵入防止対策、寒冷ストレス軽減等の発生予防対策、発生時の早期隔離等のまん延防止に努める必要があり、総合的な飼養衛生管理の徹底が重要である。

さらに今回の調査から、継続発生を予防するには、妊娠後期には妊娠馬の観察を徹底し、早期に流産を発見すること、毎日の消毒、特に厩舎通路や餌桶の消毒を徹底し、ウイルスまん延を防止すること、流産時の対応について農場内でルールを作り、農場内全員へ周知し、流産発生時の対応をスムーズにすることが重要であると考えられた。

また、流産時の適切な処置方法に不明点がある農場が多いことから、流産時の対応について農場内でのルール作りを推進するために、流産発生時の対応マニュアル（図 11）を作

成した。

マニュアルは、写真を多用し、見る人がわかりやすいことを目標とし、関係機関を通じて、本病流行前に管内馬飼養農場全戸へ配布し、流産発生時に農場内で共通認識を持てるルール作りを推進している。

また、これまで以上に、農場に対し本病が流行する妊娠後期の重点的な消毒について啓発するとともに、検体搬入時や発生後の防疫対応の指導は臨床獣医師と連携して行うことで、継続発生防止の一助としたい。

**流産発生時に備えて・・・**  
 流産に備えて、以下のものを準備しておく。いつでも使えるようにまとめて保管しておきましょう。また、目録から流産発生時の担当者を決めておきましょう。

- バケツ (絡込消毒剤や消毒薬作成に使用)
- じょうろ (廊下や床、壁の消毒用)
- ビニールシート (180cm×270cm くらいの大寸)
- タオル (自兵の消毒用)
- 使い捨て手袋
- 厚手のビニール袋 (梱包用)
- 消毒薬

このようにまとめて保管しましょう

**流産が発生した時は・・・**  
 馬鼻肺炎を含む伝染性の流産を想定して、以下の手順で速やかに実施しよう。

**流産発生時の作業手順**

<注意点>  
 ・使い捨て手袋を使用する  
 ・消毒薬がもたらすときは長靴を消毒  
 ・消毒薬や胎手を扱った後の衣服や手袋を他の馬は触らない  
 ・流産馬が落ちる場合やない場合は、隔離を確保する

- 流産馬に近づかず、隔離を確保する。
- 流産馬が落ちる場合は、床を消毒する。
- 流産馬が落ちた後は、周囲の環境を消毒する。
- 流産馬が落ちた後は、周囲の環境を消毒する。

10. 流産馬を隔離し、消毒薬を散布する。  
 11. 流産馬が落ちた後は、周囲の環境を消毒する。  
 12. 流産馬が落ちた後は、周囲の環境を消毒する。  
 13. 消毒後、馬舎の床や壁 (馬の鼻が届く高さまで) を消毒薬をかける。  
 14. 胎子や産物を運んだ容器、使用した馬房掃除道具、消毒薬を移動した容器に消毒薬をかける。  
 15. 着替えて流産胎子を家保へ搬入

**消毒**

16. 消毒薬を散布する。  
 17. 消毒薬を散布する。  
 18. 消毒薬を散布する。

**目録からの消毒・消毒薬の使い方**  
 消毒薬の目録には、消毒薬の種類、消毒薬の量、消毒薬の使い方などが記載されています。消毒薬の種類は、消毒薬の種類によって異なります。消毒薬の量は、消毒薬の種類によって異なります。消毒薬の使い方は、消毒薬の種類によって異なります。

**消毒薬の種類と価格**

消毒薬	容量 (L)	価格 (円)
消毒薬 A	500	500
消毒薬 B	1,000	1,000
消毒薬 C	500	500

消毒薬の種類と価格 (参考価格)

消毒薬の種類と価格 (参考価格)

図 11 流産発生時の対応マニュアル

## 馬鼻肺炎生ワクチン（エクエヌテクト ERP）について —妊娠馬への効能追加—

大森崇司（一般財団法人 日本生物科学研究所）

### 【製剤の概要】

#### 用法及び用量

乾燥ワクチンに添付の溶解用液を加えて溶解し、その2mLずつを3週間隔で2回、6か月齢以上の馬の筋肉内に注射する。妊娠馬では4週間隔で2回とし、妊娠6～8か月で第1回目を注射する。

#### 効能又は効果

馬ヘルペスウイルス1型感染による呼吸器疾病の症状の軽減及び妊娠馬の異常産（流産、妊娠中の胎子死亡又は生後直死）の抑制（図1）。

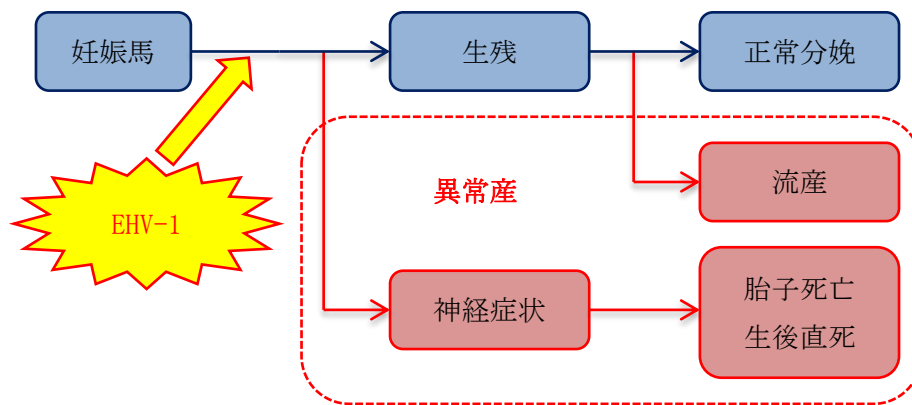


図1. 馬鼻肺炎ウイルス感染による異常産の概念

### 【エクエヌテクト ERP の妊娠馬における有効性】

#### 試験概要

国内では馬ヘルペスウイルス1型（EHV-1）感染による神経麻痺の報告は少ないが、諸外国では神経症状の発生が多く報告されている。妊娠馬が神経麻痺を引き起こすと予後不良となり、胎子も死亡する。本試験では、EHV-1の中でも強毒で、馬に対し神経麻痺をもたらす神経病原性株であるAb4p株を攻撃用株として用いた。また、EHV-1感染による妊娠馬の流産は胎齢270～329日目での発生が最も多いことから、胎齢8か月前後の妊娠馬を供試動物とした。12頭の妊娠馬を無作為に免疫群と非免疫群の2群に分け、試作ワクチンを免疫群の馬の筋肉内に4週間隔で2回投与した。第2回目投与後4週に両群各6頭の妊娠馬をさらに2群各3頭に分け、 $10^5$ PFUあるいは $10^3$ PFUのEHV-1 Ab4p株を鼻腔内接種による攻撃を行った（図2）。

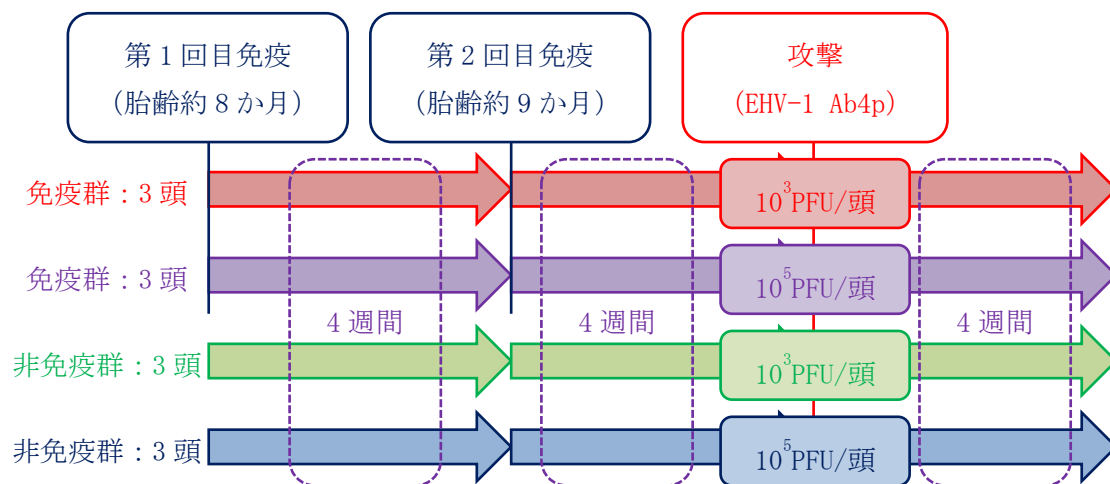
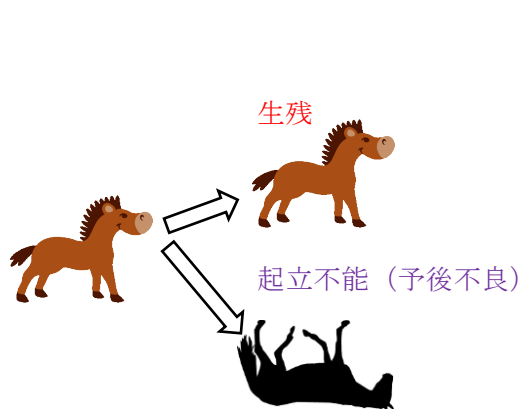


図2. 試験概要

有効性の判定基準

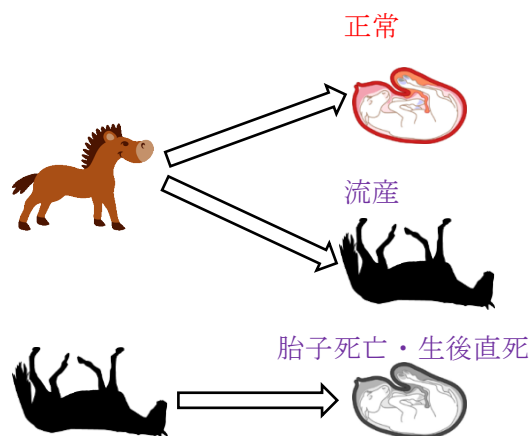
母馬の転帰、胎子の転帰、母馬の発熱、母馬からのウイルス検出を基に判定を行った。

母馬の転帰は、攻撃後4週までの免疫群の生残頭数が非免疫群よりも多い場合に有効とした（図3）。胎子の転帰は攻撃後4週までの免疫群で胎子に異常が認められなかった頭数が非免疫群よりも多い場合に有効とした（図4）。母馬の発熱は攻撃後4週までの免疫群の発熱日数の合計が非免疫群よりも少ない場合に有効とした（図5）。母馬からのウイルス検出は神経病原性株（Ab4p株）と非神経病原性株（国内流行株）が識別可能なPCR法を用いて、攻撃後2週までの免疫群の母馬（鼻腔スワブ、血液材料あるいは両材料）で、神経病原性株が検出された日数が非免疫群よりも少なかった場合に有効とした（図6）。



免疫群の生残頭数が非免疫群よりも多い場合に有効とした。

図3. 有効性の判定基準（母馬の転帰）



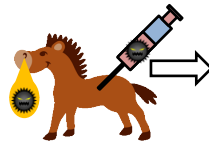
免疫群で胎子に異常が認められなかった頭数が非免疫群よりも多い場合に有効とした。

図4. 有効性の判定基準（胎子の転帰）



攻撃後 4 週までの免疫群の発熱日数の合計が、非免疫群よりも少ない場合に有効とした。

図 5. 有効性の判定基準 (母馬の発熱)



神経病原性株 (Ab4p 株) と非神経病原性株 (国内流行株) が識別可能な PCR でウイルス検出を行った。

攻撃後 2 週までの免疫群の母馬 (鼻腔スワブ、血液材料あるいは両材料) で、神経病原性株が検出された日数が非免疫群よりも少なかった場合に有効とした。

図 6. 有効性の判定基準 (母馬からのウイルス検出)

### 試験結果

母馬の転帰は、免疫群では6頭が生残し、非免疫群では3頭が生残した (表 1)。また、胎子の転帰は、免疫群では3頭が異常なし、非免疫群では1頭が異常なしであった (表 2)。攻撃後の発熱は、発熱日数の合計が免疫群では1日、非免疫群では11日であった (表 3)。ウイルス検出の結果、母馬の鼻腔スワブ及び血液材料からは、攻撃後4週間のいずれの検査時点においても、非神経病原性株の遺伝子は検出されなかった。攻撃後2週までの母馬で鼻腔におけるウイルス排泄あるいはウイルス血症が認められた日数の合計は、免疫群で12日及び非免疫群で43日であった (表 4)。

表 1. 試験結果 (母馬の転帰)

群	馬番号	母馬の転帰		
免疫群	10 <sup>5</sup> PFU 攻撃群	1	生残	6 頭生残
		2	生残	
		3	生残	
	10 <sup>3</sup> PFU 攻撃群	4	生残	
		5	生残	
		6	生残	
非免疫群	10 <sup>5</sup> PFU 攻撃群	7	生残	3 頭生残
		8	起立不能 (15)	
		9	生残	
	10 <sup>3</sup> PFU 攻撃群	10	生残	
		11	起立不能 (12)	
		12	起立不能 (13)	

( ) : 攻撃後日数

表 2. 試験結果 (胎子の転帰)

群	馬番号	胎子の転帰		
免疫群	10 <sup>5</sup> PFU 攻撃群	1	流産 (20)	3 頭 異常なし
		2	流産 (17)	
		3	異常なし	
	10 <sup>3</sup> PFU 攻撃群	4	異常なし	
		5	異常なし	
		6	流産 (25)	
非免疫群	10 <sup>5</sup> PFU 攻撃群	7	生後直死 (27)	1 頭 異常なし
		8	流産 (15)	
		9	流産 (13)	
	10 <sup>3</sup> PFU 攻撃群	10	異常なし	
		11	死亡	
		12	死亡	

( ) : 攻撃後日数

表 3. 試験結果 (母馬の発熱)

群	馬番号	攻撃後日数		
免疫群	10 <sup>5</sup> PFU 攻撃群	1	-	合計 1 日
		2	-	
		3	-	
	10 <sup>3</sup> PFU 攻撃群	4	-	
		5	-	
		6	15	
非免疫群	10 <sup>5</sup> PFU 攻撃群	7	10	合計 11 日
		8	-	
		9	6, 7	
	10 <sup>3</sup> PFU 攻撃群	10	-	
		11	8~10	
		12	7~11	

( ) : 攻撃後日数

表 4. 試験結果 (母馬からのウイルス検出)

検出されたウイルスは全て神経病原性株であった。

群	馬番号	攻撃後日数			
		鼻腔	血液		
免疫群	10 <sup>5</sup> PFU 攻撃群	1	3, 7	11~13	鼻腔のみ : 7 日 血液のみ : 5 日 鼻腔及び血液 : 0 日 ⇒ 合計 12 日
		2	-	11	
		3	-	-	
	10 <sup>3</sup> PFU 攻撃群	4	-	-	
		5	-	-	
		6	7~11	14	
非免疫群	10 <sup>5</sup> PFU 攻撃群	7	1~4	9, 10, 12	鼻腔 : 22 日 血液 : 7 日 鼻腔及び血液 : 14 日 ⇒ 合計 43 日
		8	1~7	7, 10, 11	
		9	2~13	6~12	
	10 <sup>3</sup> PFU 攻撃群	10	9	-	
		11	3, 5, 8~12	8~10	
		12	8~12	6, 7, 9~11	

- : ウイルスは検出されなかった



## まとめ

本ワクチンは妊娠馬に免疫を付与し、EHV-1 感染による妊娠馬の異常産の抑制に有効であると考えられた。

### 【エクエヌテクト ERP の北海道向け出荷本数】

北海道向けの出荷本数は、平成 27 年度に 3 施設へ計 192 本 (960dose)、平成 28 年度に 15 施設へ 851 本 (4,255dose) であった (表 5)。実際の使用用途は不明であるが、生産地へのお荷であることを鑑みると「呼吸器疾病の症状の軽減」を目的とした使用は少なく、獣医師の裁量を基に「妊娠馬の異常産 (流産、妊娠中の胎子死亡又は生後直死) の抑制」を目的として使用された可能性が高い。現時点では生産地からの有害事象 (副作用) の報告はされていない。

表 5. エクエヌテクト ERP の北海道向け出荷本数

	出荷先施設数	出荷本数
平成27年度	3箇所	192本
平成28年度	15箇所	851本

### 【製造販売後調査制度 (市販後調査)】

#### 目的

製造販売承認取得前に得られる情報は試験頭数等の点から限定されたものであり、市販されるとその使用頻度が増加し、使用動物の背景も多様化し、予測されなかった副反応 (副作用) 等が発現するおそれがある。そこで、承認取得後に種々の状況下での使用においてワクチンの有効性と安全性を調査する必要がある。

#### 実施概要

試験群は生ワクチン群と不活化ワクチン群の 2 群が必要で、両群共に 2 施設以上かつ 60 頭以上の妊娠馬に投与する。投与方法は用法および用量に則り、生ワクチン群で胎齢 6~8 か月、不活化ワクチン群で胎齢 6~7 か月に第 1 回目投与を行い、その 4 週後に第 2 回目投与を行う (表 6)。

表 6. 実施概要

試験群	生ワクチン群	不活化ワクチン群
施設数	2箇所以上	2箇所以上
症例数	60頭以上 (80頭以上を目標とする)	60頭以上 (80頭以上を目標とする)
第1回目投与時 胎齢	6~8か月 (8か月齢を中心に実施する)	6~7か月 (7か月齢を中心に実施する)
第2回目投与時 胎齢	8~9か月	7~8か月

## 評価方法

有効性の評価は調査開始前と第2回目投与後4週の血清を用いてCF抗体を測定し、生ワクチン群の第2回投与後4週のCF抗体価あるいは抗体応答率が不活化ワクチン群と同等あるいは、それ以上であった場合に有効とする。また、調査期間中に馬鼻肺炎ウイルスによる異常産が発生した場合は、「馬鼻肺炎ウイルス感染による母馬の死亡率」及び「馬鼻肺炎ウイルス感染による胎子及び産子の死亡率」を比較し、生ワクチン群の死亡率が不活化ワクチン群と同等あるいはそれ以下であった場合に有効とする。

安全性の評価は投与部位の反応による評価として、各回ワクチン投与後14日間、体温測定、投与部位の観察、臨床症状の観察を行う。加えて、分娩後7日間は産子の観察を行う。臨床症状による評価として、「馬鼻肺炎ウイルス感染による母馬の発熱を指標とした評価」「馬鼻肺炎ウイルス感染による母馬の死亡を指標とした評価」「馬鼻肺炎ウイルス感染による胎子または産子の死亡を指標とした評価」を行う。

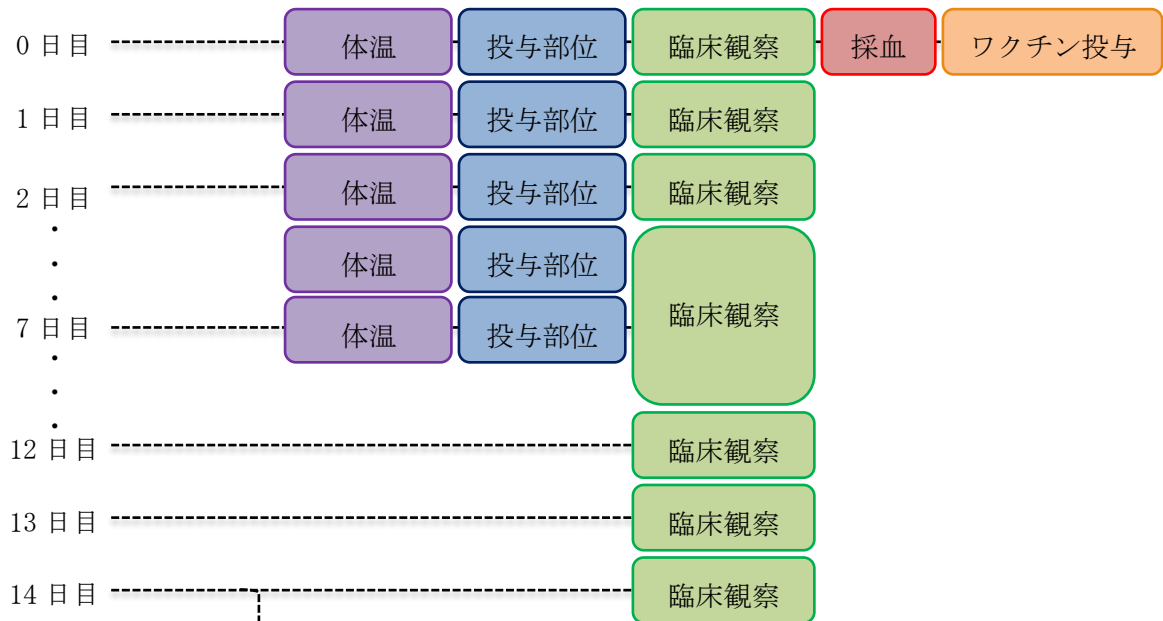
## 実施状況（平成28年12月～平成29年6月）ならびに今後の予定

生ワクチン群は12施設39頭の妊娠馬に投与した。不活化ワクチン群は11施設25頭の妊娠馬に投与した。有効性に関して、両群共にEHV-1感染による異常産は発生しておらず、CF抗体を測定中である。安全性に関して、各回投与後の異常ならびに産子の異常は認められていない。

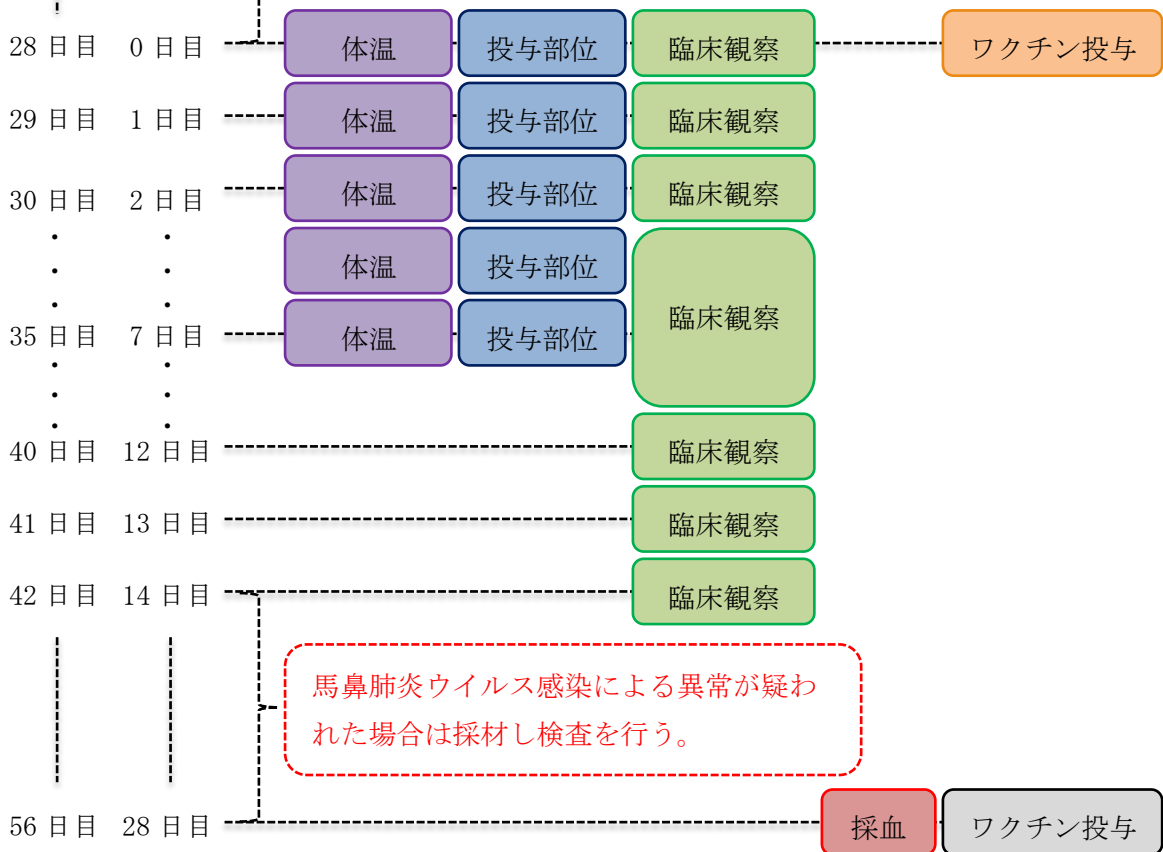
今シーズン（平成29年秋～）は、生ワクチン群、不活化ワクチン群共に2施設以上、80頭以上の調査を実施する予定である（表7）。

表7. 実施スケジュール (予定)

第1回目  
投与後日数

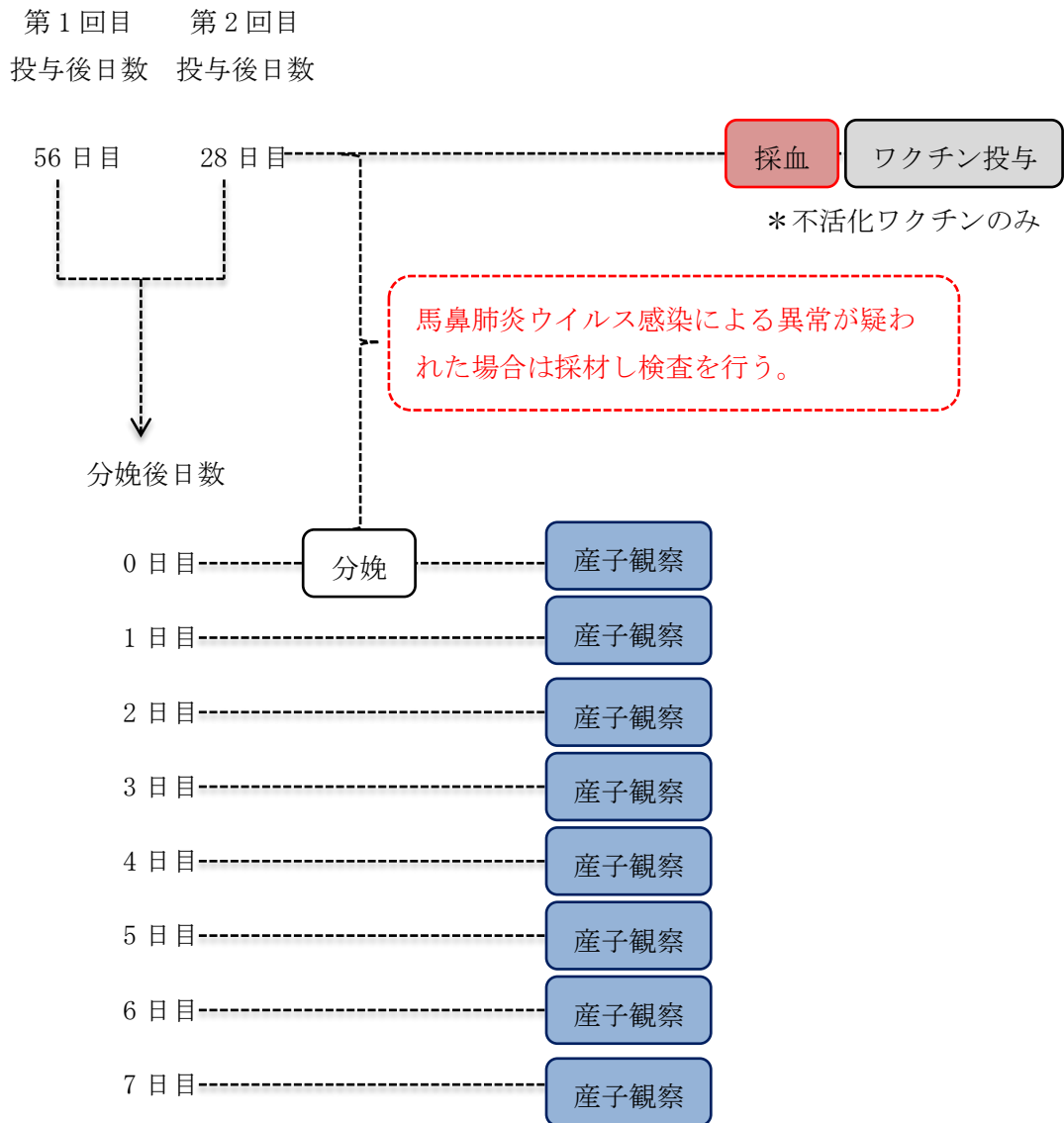


第2回目  
投与後日数



\* 不活化ワクチンのみ

表 7. 実施スケジュール (予定)



## はじめに

馬鼻肺炎生ワクチン（エクエヌテクト ERP、日生研株式会社製）を妊娠馬の異常産の抑制を目的として有効利用するためには、①ウマヘルペスウイルス 1 型（EHV-1）感染症の発症機序、②生ワクチン接種後の免疫反応、③集団免疫の概念の理解が必要となる。そこで、今回の講演では、これまでに明らかとなっているこれらに関する知見をもとに、現時点での妊娠馬における生ワクチンの最適な使用方法を検討したい。

### ①EHV-1 感染症の発症機序

EHV-1 感染症の主な臨床症状は、呼吸器症状、流産および神経症状であるが、それぞれ発症機序には異なる部分がある。例えば、呼吸器症状とその他の 2 症状については、ウイルス血症が関与するかどうかの違いから、感染後の発症時期が異なる。したがって、ワクチンの接種方法を検討するにあたっては、このような違いを考慮する必要がある。

#### 【呼吸器症状】

EHV-1 は鼻汁、流産材料あるいはエアロゾルを介して鼻腔から侵入し、上気道の粘膜上皮で増殖する[1]。この際に、粘膜上皮細胞が傷害され、炎症反応が起こることによって、発熱を伴う呼吸器症状が生じる。したがって、これらの臨床症状はウイルス感染後 1～3 日目の早期に認められる。ただし、典型的な呼吸器症状の発現は、基本的には EHV-1 に初感染の場合に限られ、再感染の場合は軽症あるいは無症状のことが多い。また、リンパ球や三叉神経節に潜伏感染した EHV-1 がストレス等により再活性化し、粘膜上皮細胞に移行して増殖する場合も、大半が無症状と考えられている。このように無症状で EHV-1 を排出するキャリアーの存在が、集団内でのウイルス伝播の抑制を困難にしている。

#### 【ウイルス血症による EHV-1 の体内伝播】

上気道の粘膜上皮細胞で増殖した EHV-1 は、粘膜固有層に分布するリンパ球等の末梢血単核球（PBMC）に感染する[1]。感染 PBMC によって所属リンパ節に運ばれた EHV-1 は同部位で増殖し、その後、細胞随伴性ウイルス血症として全身を循環する。JRA 総研で行った妊娠馬への EHV-1 の感染実験で、ウイルス血症は接種後 4～17 日目にかけて検出され、陽性頭数のピークは 7～10 日目であった（図 1）。このウイルス血症によって、中枢神経系あるいは妊娠子宮に到達した EHV-1 が神経症状や流産を引き起こす。したがって、呼吸器症状とは異なり、これらの臨床症状が現れるまでには感染後に一定の時間を要する。なお、PBMC 中で EHV-1 は成熟粒子を形成せず、血清抗体による攻撃のターゲットとなるウイルス膜糖蛋白の

発現も抑制している[2]。したがって、血清中和抗体の存在下でもウイルスは体内を伝播することが可能である。また、EHV-1 が宿主の細胞性免疫を抑制する可能性も指摘されている。

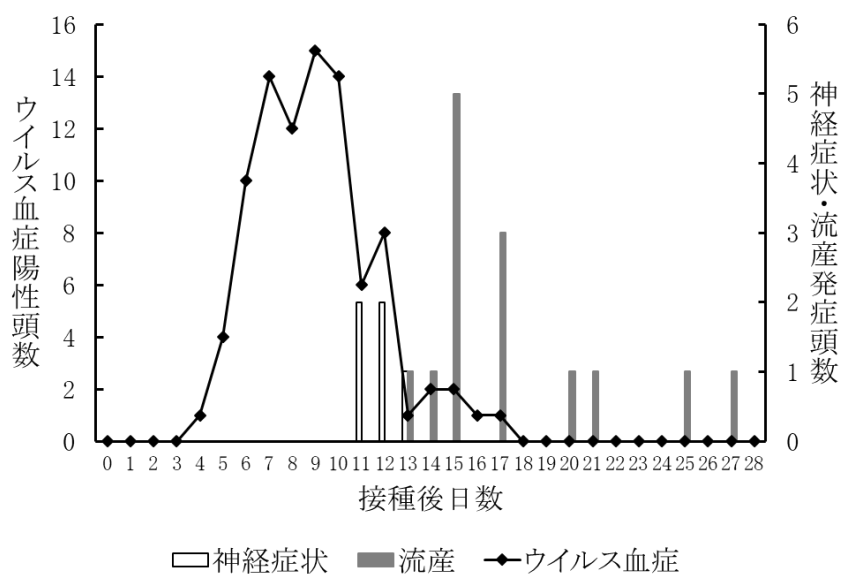


図1. 妊娠馬 (n=24) に対するEHV-1 (Ab4p株) 接種後のウイルス血症陽性頭数および神経症状・流産発症頭数の推移

### 【神経症状】

ウイルス血症で EHV-1 が局所に運ばれて病変を形成する時期は、中枢神経系と妊娠子宮で差はないと推測されるが、臨床症状の発現は流産と比較して神経症状の方が早い傾向がある。上述の妊娠馬を用いた実験では、神経症状が EHV-1 接種後 11～13 日目に認められたのに対し、流産の発症は 13～27 日目であった (図 1)。感染 PBMC によって中枢神経系に運ばれた EHV-1 は、神経組織に分布する血管の内皮細胞に感染し血管炎を引き起こす。その結果生じた血栓により血管が栓塞すると (図 2)、支配領域の神経組織に虚血性壊死 (梗塞) が起こる。すなわち、EHV-1 感染症の神経症状は、ウイルスによる神経細胞の破壊によってではなく、ウイルス性血管炎に起因する脳脊髄梗塞による臨床症状である。

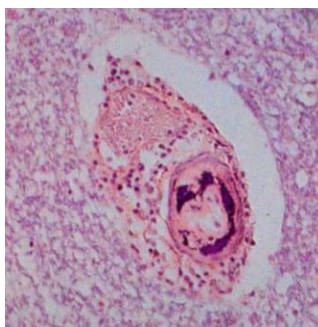


図 2. 神経症状発症馬の脳嗅球付近に認められたフィブリノイド血栓 (PTAH 染色)

## 【流産】

妊娠子宮においても、中枢神経系と同様な血管病変が形成されることが、流産発症の主要な要因と考えられている。ウイルス血症の発症後 1 週間程度経過した EHV-1 感染妊娠馬の子宮を検索したところ、子宮内膜に血管炎が観察され、同部位の内皮細胞および浸潤マクロファージに免疫染色で EHV-1 抗原が認められた (図 3)。中枢神経系の場合は、血管炎に起因する梗塞が直接的に神経症状を引き起こすが、妊娠子宮の場合は血管病変を介して EHV-1 が胎子側に移行し、さらにウイルスが増殖して胎子が死んだ時点で流産が起こるため、発症時期が遅れるものと推察される。なお、子宮内膜の EHV-1 感染が、胎子側の絨毛膜上皮、さらに胎子へと波及していく詳細な機序は今のところ明らかではない。

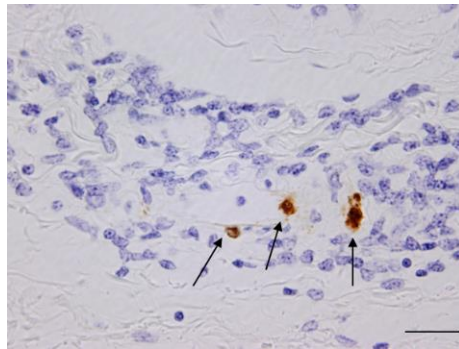


図 3. EHV-1 感染妊娠馬の子宮内膜の血管炎で認められた EHV-1 抗原 (矢印)

これまでの疫学調査から、EHV-1 感染による流産が妊娠 9 か月以降に好発することは明らかである [3]。一方で、EHV-1 感染による流産は、ウイルスの上気道粘膜への感染→所属リンパ節での 2 次的な増殖→全身性のウイルス血症の発症→妊娠子宮へのウイルスの到達→胎子への感染といった発症機序を経るため、ウイルス感染後発症までに比較的長い時間がかかる。これまでの感染実験の成績からは、その期間が 2 週間から 1 か月であることが示されている。したがって、野外においても、好発時期の 1 か月前の妊娠 8 か月時点からの EHV-1 感染が、流産を引き起こしている可能性が推察される。そこで、個体レベルでの予防の観点からは、この妊娠 8 か月の時点での免疫誘導を目標にして、ワクチン接種を行うことが望ましいと考えられる。

## ②馬鼻肺炎生ワクチン接種後の免疫反応

ヘルペスウイルスに対する宿主の免疫において、細胞性免疫が重要な役割を果たすと一般的に考えられている。EHV-1 についても、ウイルス特異的な細胞傷害性 T 細胞の前駆細胞が流産や神経症状の発症防御に貢献することが報告されている [4, 5]。今回の馬鼻肺炎生ワクチンも、不活化ワクチンでは難しい、細胞性免疫の誘導を主要な目的として開発されたものである。したがって、生ワクチン接種後の免疫反応を評価する際には、細胞性免疫を測定することが望ましい。しかしながら、JRA 総研でこれまでに実施した生ワクチン接種後の細胞

性免疫の測定結果は、個体差および同一個体内での経時的な変動が大きく、現時点では免疫反応の評価に使用可能な段階にない。そこで、本講演では、生ワクチン接種後の血清抗体応答をもとにして、同ワクチンの最適な使用方法を検討したい。

#### 【妊娠馬における CF 抗体応答】

CF 抗体価の高低は、直接的に EHV-1 に対する防御能を反映するものではない。しかしながら、同抗体は感染やワクチン接種の初期に上昇することが知られている [6]。したがって、少なくとも CF 抗体価の上昇が認められなければ、その他の免疫反応についても誘導が十分でない可能性が推察される。妊娠馬 6 頭に 4 週間隔で馬鼻肺炎生ワクチンを 2 回接種したところ、CF 抗体価の幾何平均値は 1 回目接種後 2 週目にピークの値を示した (図 4)。なお、2 回目接種後にブースター応答は確認されなかった。

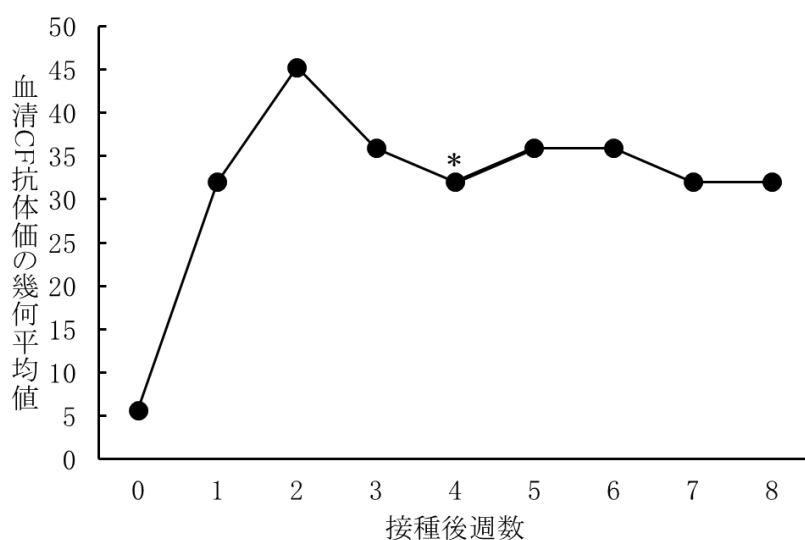


図4. 馬鼻肺炎生ワクチン接種後の妊娠馬の血清CF抗体価の推移  
\*2回目のワクチン接種。

#### 【競走馬における中和抗体応答】

馬鼻肺炎生ワクチンは、明け 3 歳馬における冬季の呼吸器病予防の目的で、2015 年度 (2014 年 12 月～) から JRA トレーニング・センターに導入されている。導入前で不活化ワクチンを使用していた 2014 年度と導入後 2 シーズンについて、各シーズンにつき約 100 頭を無作為に抽出してワクチン接種後の血清中和抗体応答調査を行った。なお、不活化ワクチンは 1 か月間隔で 3 回、生ワクチンは 1 か月間隔で 2 回の接種を行っている。不活化ワクチン群と比較して、生ワクチン群では、接種後の血清中和抗体価の幾何平均値が有意に高く、両群の差は 2 倍から 3.2 倍であった (図 5)。また、接種後に 4 倍以上の有意な抗体価の上昇を示した馬の割合は、不活化ワクチン群では 3 回接種の合計で 50%未満であったのに対し、生ワクチン群は 1 回接種のみで 75%以上に達した (図 6)。これらの成績から、生ワクチンが 1



回接種で良好な中和抗体応答を誘導することが示された。一方で、1回目接種後と2回目接種後の中和抗体価の幾何平均値に有意な差が認められず、2回目接種がブースター効果を発揮していない可能性が考えられた。なお、接種3か月後の中和抗体価の幾何平均値は2か月後と比較して有意に低下していた。

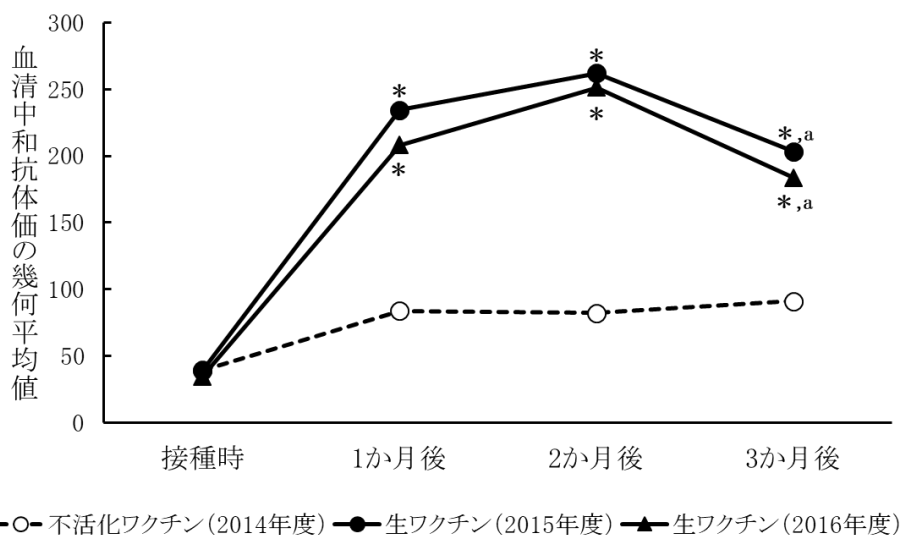


図5. ワクチン接種後の血清中和抗体価の推移

\* 不活化ワクチン接種群と比較して有意に高値( $P<0.0001$ )。

a) 2か月後と比較して有意に低値( $P<0.05$ )。

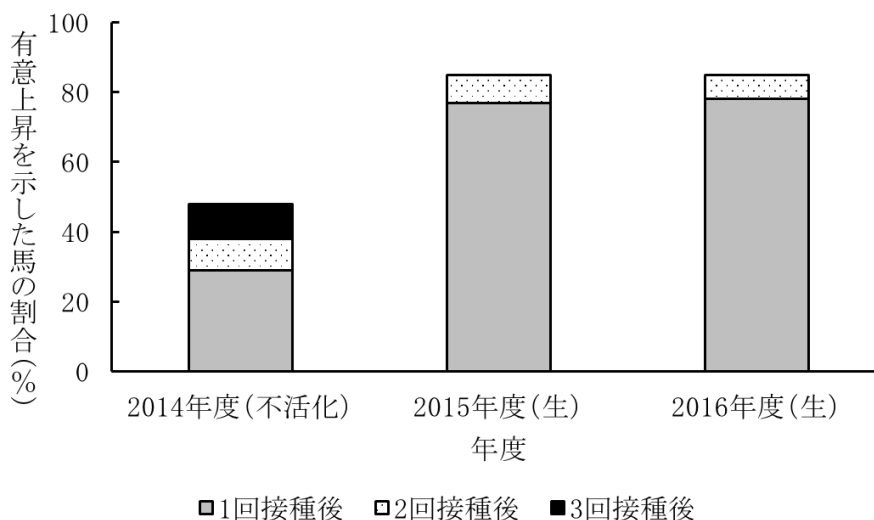


図6. ワクチン接種後に中和抗体価の有意上昇を示した馬の割合

妊娠馬のCF抗体応答の成績から、馬鼻肺炎生ワクチンによる免疫誘導には、1回目接種後に少なくとも2週間が必要と推察された。JRAトレーニング・センターでの調査では、生ワクチンの1回接種で良好な中和抗体応答が誘導可能であることが示されたが、2回目接種に

よるブースター応答は認められなかった。その理由としては、接種間隔が短いため、1回目接種で誘導された免疫によって、2回目接種の生ワクチンが排除される可能性が推察された。その一方で、1回目接種の3か月後から中和抗体価の低下傾向が認められた。この結果は、生ワクチンの接種間隔を3か月以上開ける必要のあることを示しているかもしれない。なお、海外で市販されている馬鼻肺炎生ワクチン（Rhinomune, Boehringer Ingelheim 社製）は、文献等で根拠が示されていないものの、使用説明書上は3か月間隔での追加接種が推奨されている。ただし、今回のトレーニング・センターの成績については、2回目接種が中和抗体価の維持に関与している可能性も考えられる。したがって、生ワクチンの最適な接種間隔を明らかにするためには、1回接種のみでの中和抗体価の推移を確認するなど、更なる検討が必要と考えられる。

### ③集団免疫について

EHV-1は宿主の免疫を回避する機構を多数備えており、野外株の感染で獲得した免疫であっても、その防御効果は4～8か月程度しか持続しないと考えられている[2]。したがって、いかに最適な接種を行ったとしても、馬鼻肺炎生ワクチンによる個体レベルでの流産発症予防は完全なものではない。特に、PBMCに潜伏感染したEHV-1の再活性化による流産をワクチンで予防することは困難である。一方、生ワクチンの効果で比較的確実に期待できることとしては、EHV-1の上気道粘膜での増殖の抑制が挙げられる。これは、PBMCに感染したものと比較して、粘膜上皮細胞で増殖中のウイルスは、各種免疫の攻撃を受けやすいためと推察される。このことは、個体レベルでは、EHV-1の上気道粘膜での増殖量およびその後の血中量の減少やウイルス血症の発現期間の短縮につながるとともに、牧場レベルで考えると、集団内を伝播するウイルス量の減少により、感染拡大のリスクの低下が期待できる。ただし、この効果は集団におけるワクチンの接種率が十分高くなければ発揮されないと考えられており、これが集団免疫の概念である。集団免疫でのEHV-1感染症予防の実例として挙げられるのは、JRAトレーニング・センターでの明け3歳馬に対する馬鼻肺炎不活化ワクチン全頭接種である。

#### 【明け3歳馬不活化ワクチン全頭接種】

1997年度の不活化ワクチン接種開始から2009年度までは、12月から4月にトレーニング・センターに入厩する馬で血清抗体価の低いものみに接種を行い、12月以前に入厩した馬は接種対象としていなかった。この間、ワクチン導入前よりは発症頭数が減少したものの、依然として比較的規模の大きいEHV-1感染症の発生が続いていた。そこで、2010年度から、冬季に在厩する明け3歳馬全頭への接種に切り替えたところ、初年度は前年までと同様の発生が認められたが、その翌年の2011年度から発症頭数の大幅な減少が認められた。このように導入初年度からではなく、翌年度から全頭接種の効果が発揮された理由として考えられたのが、トレーニング・センター在厩馬全体での不活化ワクチン接種率の変化であ

る（図7）。導入初年度の70%台の接種率では流行抑制にはつながらず、翌年度になって80%を超える接種率が得られた段階で集団免疫の効果が発揮されたと考えられた[7]。

年度	栗東	美浦
2006-2007	48.0	50.3
2007-2008	51.3	48.6
2008-2009	53.2	51.2
2009-2010	77.9	79.3
2010-2011	85.3	87.8
2011-2012	91.1	88.0
2012-2013	95.7	95.1

図7. JRAトレーニング・センター在厩馬全体の不活化ワクチン接種率  
（各年1月1日時点の在厩馬）

この集団免疫の概念は、生産牧場で馬鼻肺炎生ワクチンを使用する際にも重要となる考え方である。妊娠馬に対するワクチン接種は、胎齢をもとに接種時期を決定することが基本となるが、同一集団内の馬については一斉接種を行うことが望ましい。その際には、分娩予定の最も早い馬に合わせることを推奨される方法ではあるが、個別の状況に応じた最適な時期に関しては、担当獣医師の意見をもとに決定する必要があると考えられる。また、不受胎馬や1歳馬などの育成馬もウイルスの伝播に関与することから、同一集団内での繋養と見なされるのであれば、可能な限り接種対象に加えることが推奨される。なお、ここでいう同一集団内の馬とは、同一厩舎・同一放牧地のみならず、取り扱い担当者が一緒など何らかの形で接触の可能性があるものは全て含まれる（人を介したウイルス伝播の可能性があるため）。

#### まとめ

エクエヌテクト ERP の妊娠馬に対する現時点での使用方法は、妊娠6～8か月で1回目接種、その4週間後に2回目接種を行うとされている。まず、流産の発症機序の考察から、妊娠8か月時点での免疫誘導の必要性が示された。また、生ワクチン接種後のCF抗体応答から、免疫誘導には少なくとも2週間を要すると考えられたことから、6～8か月の幅のなかでも、妊娠7か月頃が1回目接種の最適な時期ではないかと推察された。ただし、集団免疫の観点からは、同一集団内の馬については必ずしも個体ごとの状態に合わせるのではなく、集団として最適な時期に一斉接種を行うことが望ましいと考えられる。なお、JRA トレーニング・センターでの調査から、4週間隔での接種の場合、2回目接種が抗原性を十分に発揮しない可能性が示された。ただし、現時点で異常産の抑制効果が実験的に確認されている方

法は4週間隔での2回接種のみであり、最適な接種間隔を明らかにするためには、今後更なる検討が必要と考えられる。

#### 【引用文献】

1. Allen, G. P., Kydd, J. H., Slater, J. D. and Smith, K. C. 2004. Equid herpesvirus 1 and equid herpesvirus 4 infections. pp. 829-859. *In: Infectious Diseases of Livestock* (Coetzer, J. A. W. and Tustin, R. C. eds.), Oxford University Press, Cape Town.
2. Paillot, R., Case, R., Ross, J., Newton, R. and Nugent, J. 2008. Equine Herpes Virus-1: Virus, Immunity and Vaccines. *The Open Vet. Sci. J.* **2**: 68-91.
3. 物部朋子, 秋葉利文, 富川創平, 西英機. 2003. 軽種馬生産地における疾病防除対策—馬鼻肺炎による流産・生後直死の実態と防除対策—. 北海道獣医師会雑誌. 47: 276.
4. Kydd, J. H., Wattring, E. and Hannant, D. 2003. Pre-infection frequencies of equine herpesvirus-1 specific, cytotoxic T lymphocytes correlate with protection against abortion following experimental infection of pregnant mares. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **96**: 207-217.
5. Allen G. P. 2008. Risk factors for development of neurologic disease after experimental exposure to equine herpesvirus-1 in horses. *Am. J. Vet. Res.* **69**:1595-1600.
6. Kydd, J. H., Townsend, H. G. and Hannant, D. 2006. The equine immune response to equine herpesvirus-1: the virus and its vaccines. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **111**: 15-30.
7. Bannai, H., Mae, N., Ode, H., Nemoto, M., Tsujimura, K., Yamanaka, T, Kondo, T. and Matsumura T. 2014. Successful control of winter pyrexias caused by equine herpesvirus type 1 in Japanese training centers by achieving high vaccination coverage. *Clin. Vaccine Immunol.* **21**: 1070-1076.

第 45 回生産地における軽種馬の疾病に関するシンポジウム

## シンポジウム 2

「感染症対策－有効な消毒法と  
医療施設における実践例」

## 馬の医療関連感染症原因菌の生残性と各種消毒薬の効果

越智章仁 (JRA 競走馬総合研究所)

### 【はじめに】

我が国の競馬サークルにおける医療技術の進歩は目覚ましく、これまで治療が困難であった疾病に対しても積極的な治療が行われている。しかし、医療の高度化によって易感染状態の馬も増加し、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA), *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) ならびに *Clostridioides (Clostridium) difficile* (*C. difficile*) などによる細菌性医療関連感染症 (healthcare associated infection; HAI) の発生が散見されている。人医療では、これらの細菌は長期間にわたって環境中で生存できるため、汚染された環境が感染源となり、医療従事者や医療機器を介して感染が拡大することが知られている [1, 2]。そのため、これら細菌性 HAI の予防あるいは蔓延の防止には、医療環境や医療器具などを適切に消毒することが推奨される [3]。一方、獣医医療においては、実際に使用されている消毒薬の HAI 原因菌に対する有効性や使用方法に関する情報は多くない。また、馬の飼育環境あるいは医療環境における HAI 原因菌の生残性に関する知見も乏しい。本研究では、馬から分離された HAI 原因菌の生残性ならびに各種消毒薬の効果を検索した。

### 【HAI 原因菌の生残性】

(材料および方法)

#### 1. 菌株

JRA 競走馬総合研究所で分離した *C. difficile* (anaero-125 株), MRSA (Stap-163 株) および *P. aeruginosa* (NE-209 株) を供試菌とした。*C. difficile* は血液寒天培地で、37°C、4~7 日間、嫌気培養し、密度勾配遠心法を用いて芽胞を単離し、 $3.7 \times 10^7$  spores/ml に調整した。その他の 2 菌種は液体培地で 37°C、12~18 時間、好気培養し、 $1 \sim 4 \times 10^7$  colony forming unit (cfu)/ml に調整した。

#### 2. 汚染モデル

試験菌を付着させる基材として、木材 (合板)、ゴムシート (トリニトリルゴム製)、手術用マットレス、プラスチック (ポリスチレン製 6 well plate, non-treatment)、アルミニウム板 (JIS A5052 規格)、ガラス板 (スライドガラス, JIS R 3703 規格, 松浪)、ゴム管 (ポリ塩化ビニル製, 内径 5 mm)、蛇管 (ポリエチレン製, 内径 22 mm) および園芸用土を用いた。板状物は 70% エタノールで清拭した後、24 時間 UV を照射した。管状物は 1 cm 長に切断したのち、エチレンオキサイドガスを用いて滅菌した。土は流水および蒸留水で 24 時間洗浄し、乾熱滅菌した。プラスチックには 100 $\mu$ l/well (9.6 cm<sup>2</sup>)、そのほかの板状物には 100  $\mu$ l/9 cm<sup>2</sup> の菌液を均一に塗布した。土 1 g には 100  $\mu$ l の菌液を接種した。管状物は菌液あるいは芽胞液に 37°C、30 分間浸漬した。これら汚染モデルは、20~26°C、

相対湿度 48~65% の環境下で保管し、経時的に生菌数を計測した。なお、各条件において 3 回の試験を行った。

(結果および考察)

*C. difficile* の芽胞はすべての基材で 4 ヶ月後も生存していた (図 1)。MRSA はプラスチックでは接種後 56 日目まで生存していた (図 2)。 *P. aeruginosa* は土で接種後 56 日目まで生存していた (図 3)。

本研究では、可能な限り有機物を除去し、滅菌した基材を使用した。また、保存環境は一般的な室内環境を模倣した。この条件下では、*P. aeruginosa* は土で、MRSA はプラスチック表面で 56 日間にわたって生残することが明らかとなった。一方、*C. difficile* の芽胞は検索した基材では少なくとも 4 ヶ月間は生存し、増殖能力を保持していることが明らかとなった。過去の報告では、温度、湿度、有機物や水分の存在が細菌の生存期間に影響を与えることが明らかにされている。そのため、血液や排泄物などの付着した環境表面あるいは低温環境下では、これら HAI 原因菌はより長期間にわたって環境中で生存する可能性が考えられる。

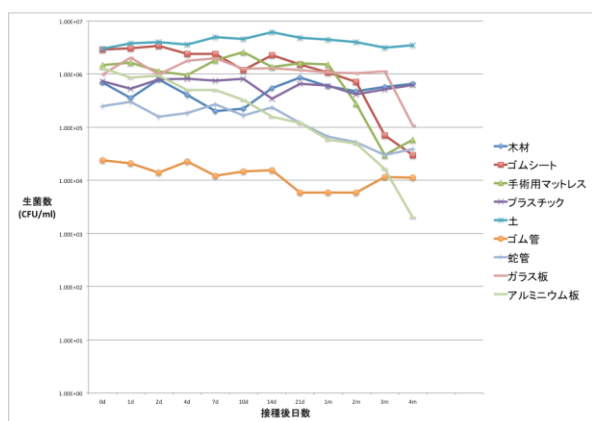


図 1. *C. difficile* の生残性

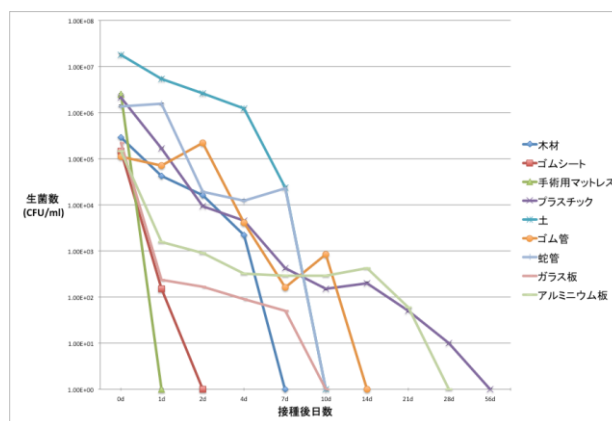


図 2. MRSA の生残性

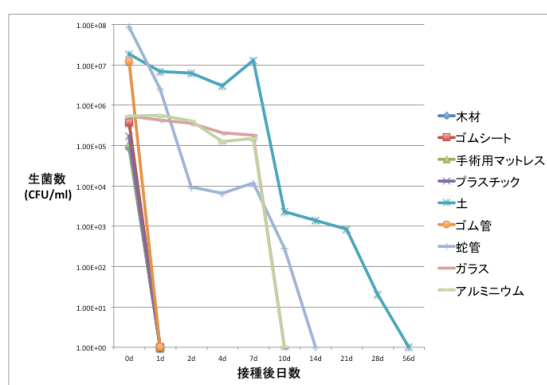


図 3. *P. aeruginosa* の生残性

## 【馬由来 HAI 原因菌に対する消毒薬の効果】

(材料および方法)

### 1. 菌株

供試菌および培養方法は、前述のとおりである。*C. difficile* の芽胞は  $1\sim 2 \times 10^{8-9}$  spores/ml, その他の 2 菌種は  $1\sim 2 \times 10^{8-9}$  cfu/ml に調整した。

### 2. 消毒薬

検索した消毒薬ならびに検索した希釈倍率・濃度を表 1 に示す。

表 1. 検索した消毒薬

分類	商品名	推奨 希釈倍率・濃度	検索した 希釈倍率・濃度
逆性石けん系	アストップ	500-3000	250-512000
	パコマ	500-2000	250-512000
ピグアナイド系	ヒビテン	10-100	5-102400
アルデヒド系	ステリハイド	10	5-10240
	ヘルミン25	200-1000	100-204800
塩素系	ピューラックス	300	1-3072
	ピージア	4-10	1-2048
酸化剤系	ビルコンS	500-2000	250-512000
	ハイブックス	16-64	8-20384
ヨード系	クリンナップA	200-800	100-102400
アルコール系	2-プロパノール	70%	1-100%

### 3. 最大有効希釈倍率の測定 (図 4)

各消毒薬の最大有効希釈倍率の測定には浮遊試験法を用いた。希釈した消毒液  $500 \mu\text{l}$  に芽胞あるいは菌液  $10 \mu\text{l}$  を加え、 $20^\circ\text{C}$  あるいは  $4^\circ\text{C}$  で、一定時間 (30 秒, 1 分, 5 分, 10 分, 30 分) 反応させた。その後、反応液  $2 \mu\text{l}$  を中和剤添加培養液  $100 \mu\text{l}$  に接種し、48 時間培養した。培地が混濁したものを菌の発育陽性 (殺菌効果なし), 澄明なものを発育陰性 (殺菌効果あり) とし、最大有効希釈倍率を求めた。また、有機物が消毒効果に与える影響を検索するため、10% ウシ胎児血清 (FBS) 存在下で同様の試験を行った。

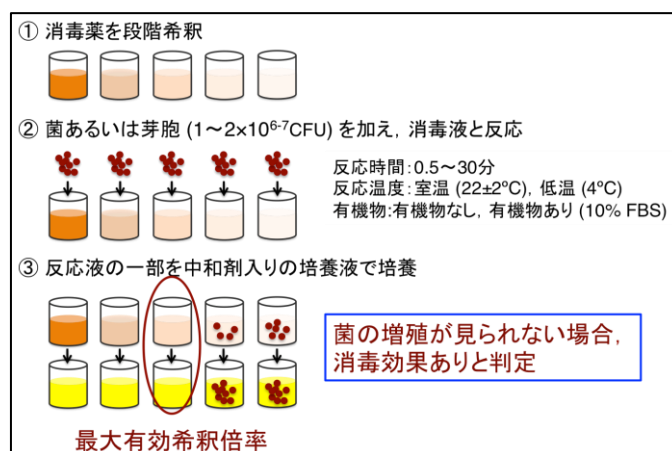


図 4. 浮遊試験法の概要



(結果)

1. *C. difficile* の芽胞に対する消毒効果 (表 3)

20°C かつ有機物非存在条件では, アルデヒド系 (ステリハイド, ヘルミン 25), 塩素系 (ビージア, ピューラックス) ならびに酸化剤系 (ビルコン S, ハイプロックス) は推奨希釈濃度あるいはそれ以下の濃度で殺芽胞効果を認めた。さらに, ハイプロックスは 4°C あるいは有機物存在下でも殺芽胞効果に変化は認められなかった。一方, 塩素系ならびにアルデヒド系消毒薬の効果は有機物の混入あるいは 4°C によって減弱した。4°C では, ピューラックスの最大有効希釈倍率は 6~12 倍となり, 推奨希釈倍率を下回った。また, ビージアは 4°C で, ビルコン S は有機物存在下で消毒効果が低下した。

2. MRSA に対する消毒効果 (表 4)

20°C かつ有機物非存在下では, すべての消毒薬が推奨濃度で殺菌効果を示した。4°C で消毒薬を作用させた場合, 推奨濃度に希釈したパコマ, ヒビテンおよびヘルミン 25 は殺菌に 5 分以上の反応時間を要した。また, 有機物によって, 塩素系 (ピューラックスならびにビージア) および酸化剤系 (ビルコン S) の消毒効果は著しく減弱した。

3. *P. aeruginosa* に対する消毒効果 (表 5)

20°C かつ有機物非存在下では, すべての消毒薬が推奨濃度で殺菌効果を示した。しかし, 4°C で反応させた場合, ヘルミン 25 の殺菌効果は著しく減弱し, 殺菌には 5 分以上の反応時間を要した。有機物の存在下では, 塩素系消毒薬の最大有効濃度は低下し, ビージアおよびピューラックスの最大有効希釈倍率は推奨希釈倍率を下回った。また, 4°C かつ有機物が存在する場合, アストップおよびパコマの最大有効希釈倍率は推奨希釈倍率以下であった。

表 3. *C. difficile* に対する消毒薬の最大有効希釈倍率・濃度

分類	消毒薬 (推奨希釈倍率・濃度)	反応時間 (分)	室温		低温 (4°C)	
			有機物 なし	有機物 あり	有機物 なし	有機物 あり
逆性石けん	アストップ (500-3000)	0.5-30	-	-	-	-
	パコマ (500-2000)	0.5-30	-	-	-	-
ピグアナイド系	ヒビテン (10-100)	0.5-30	-	-	-	-
アルデヒド系	ステリハイド (10)	0.5	-	-	-	-
		5	40	10	-	-
		30	640	80	10	-
	ヘルミン25 (200-1000)	0.5	-	-	-	-
		5	200	-	-	-
		30	400	200	200	-
塩素系	ピューラックス (300)	0.5	-(24)	-	-	-
		5	384	-	96	-
		30	3072	-	768	-
	ビージア (4-10)	0.5	-	-	-	-
		5	16	-	8	-
		30	16	-	8	-
酸化剤系	ビルコンS (500-2000)	0.5	-	-	-	-
		5	-	-	-	-
		30	-(250)	-	-	-
	ハイプロックス (16-64)	0.5	128	128	128	64
		5	128	128	128	64
		30	512	128	256	64
ヨード系	クリンナップA (200-800)	0.5	-	-	-	-
		5	-	-	-	-
		30	-(100)	-	-	-
アルコール系	2-プロパノール (70%)	0.5-30	-	-	-	-

—: 推奨希釈倍率・濃度で効果なし

表 4. MRSA に対する消毒薬の最大有効希釈倍率・濃度

分類	消毒薬 (推奨希釈倍率・濃度)	反応時間 (分)	室温		低温 (4℃)	
			有機物なし	有機物あり	有機物なし	有機物あり
逆性石けん	アストップ (500-3000)	0.5	<b>64000</b>	4000	4000	-
		5	<b>128000</b>	4000	16000	4000
		30	<b>128000</b>	8000	64000	4000
	バコマ (500-2000)	0.5	<b>4000</b>	1000	-	-
		5	<b>16000</b>	2000	2000	1000
		30	<b>64000</b>	2000	16000	1000
ビグアナイド系	ヒビテン (10-100)	0.5	-	-	-	-
		5	$\geq 10240$	320	320	80
		30	$\geq 10240$	320	$\geq 10240$	640
アルデヒド系	ステリハイド (10)	0.5	<b>320</b>	160	80	20
		5	<b>1280</b>	640	640	80
		30	<b>5120</b>	1280	2560	320
	ヘルミン25 (200-1000)	0.5	<b>400</b>	200	-	-
		5	<b>3200</b>	1600	800	200
		30	<b>12800</b>	3200	3200	800
塩素系	ビューラックス (300)	0.5	$\geq 3072$	-	$\geq 3072$	-
		5	$\geq 3072$	-	$\geq 3072$	-
		30	$\geq 3072$	384	$\geq 3072$	-
	ビージア (4-10)	0.5	<b>8</b>	-	4	-
		5	<b>64</b>	8	64	-
		30	<b>512</b>	8	512	12
酸化剤系	ビルコンS (500-2000)	0.5	<b>4000</b>	-	1000	-
		5	<b>8000</b>	-	4000	-
		30	<b>8000</b>	-	8000	-
	ハイブロックス (16-64)	0.5	<b>256</b>	128	256	128
		5	<b>256</b>	128	256	128
		30	<b>512</b>	128	256	128
ヨード系	クリンナップA (200-800)	0.5	<b>25600</b>	200	12800	200
		5	<b>51200</b>	200	51200	200
		30	<b>102400</b>	200	102400	200
アルコール系	2-プロパノール (70%)	0.5	<b>40%</b>	40%	50%	50%
		5	<b>30%</b>	40%	50%	50%
		30	<b>30%</b>	40%	40%	50%

表 5. *P. aeruginosa* に対する消毒薬の最大有効希釈倍率・濃度

分類	消毒薬 (推奨希釈倍率・濃度)	反応時間 (分)	室温		低温 (4℃)	
			有機物なし	有機物あり	有機物なし	有機物あり
逆性石けん	アストップ (500-3000)	0.5	<b>16000</b>	500	4000	-
		5	<b>32000</b>	1000	16000	-
		30	<b>64000</b>	2000	16000	-
	バコマ (500-2000)	0.5	<b>16000</b>	500	4000	-
		5	<b>16000</b>	500	8000	-
		30	<b>32000</b>	500	8000	-
ビグアナイド系	ヒビテン (10-100)	0.5	<b>640</b>	80	20	-
		5	<b>5120</b>	320	2560	10
		30	$\geq 10240$	320	$\geq 10240$	160
アルデヒド系	ステリハイド (10)	0.5	<b>160</b>	80	40	10
		5	<b>2560</b>	640	640	80
		30	$\geq 10240$	1280	2560	320
	ヘルミン25 (200-1000)	0.5	<b>200</b>	-	-	-
		5	<b>1600</b>	400	400	-
		30	<b>12800</b>	1600	3200	400
塩素系	ビューラックス (300)	0.5	$\geq 3072$	-	$\geq 3072$	-
		5	$\geq 3072$	-	$\geq 3072$	-
		30	$\geq 3072$	-	$\geq 3072$	-
	ビージア (4-10)	0.5	<b>256</b>	-	128	-
		5	<b>512</b>	-	128	-
		30	<b>512</b>	-	128	-
酸化剤系	ビルコンS (500-2000)	0.5	<b>2000</b>	-	1000	-
		5	<b>8000</b>	-	4000	-
		30	<b>8000</b>	500	8000	500
	ハイブロックス (16-64)	0.5	<b>256</b>	16	64	-
		5	<b>256</b>	16	256	-
		30	<b>512</b>	32	256	16
ヨード系	クリンナップA (200-800)	0.5	<b>12800</b>	-	3200	-
		5	<b>12800</b>	200	25600	-
		30	<b>25600</b>	200	25600	200
アルコール系	2-プロパノール (70%)	0.5	<b>30%</b>	30%	40%	50%
		5	<b>30%</b>	30%	40%	40%
		30	<b>20%</b>	20%	40%	40%

## (考察)

*C. difficile* の芽胞は多くの消毒薬に強い抵抗性を示した。今回用いた消毒薬のうち、アルデヒド系（ステリハイドおよびヘルミン 25）、塩素系（ビージアおよびピューラックス）および酸化剤系（ハイプロックス、ビルコン S）が殺芽胞効果を有することがわかった。しかし、低温条件や有機物の混入によって、アルデヒド系および塩素系消毒薬の殺芽胞効果は著しく減弱した。このことから、これらの消毒薬を使用する際には、消毒前の洗浄と温湯による希釈が重要であると考えられた。アルデヒド系消毒薬はグルタルアルデヒドを含む劇薬であり、特有の刺激臭をもつ。そのため、一般的には厩舎や馬房などの環境消毒には適さず、医療器具や医療装置の消毒に使用することが望ましい。また、塩素系消毒薬は *C. difficile* の消毒に広く用いられている。しかし、有機物の混入によって容易に失活すること、特有の臭気を有し人や馬に有害であることなどに留意すべきである。一方、ハイプロックスは加速化過酸化水素と界面活性剤を有効成分とする薬剤で、北米を中心に人医療施設で使用されている。同消毒薬は、有機物存在下や低温でも安定した消毒効果をもつことから、厩舎や馬房などの消毒にも適していると考えられた。

MRSA および *P. aeruginosa* の感染様式は接触感染であり、医療環境、医療器具ならびに医療従事者を介して伝播する。本試験の成績から、パコマ、アストップ、ヒビテン、イソプロパノール、クリンナップ、塩素系消毒薬ならびにハイプロックスを用いた消毒によって、MRSA、*P. aeruginosa* および *S. zooepidemicus* の医療器具や環境からの感染を予防できることが示唆された。しかし、逆性石鹼（アストップ、パコマ）、塩素系（ピューラックス）、およびハイプロックスアクセルの殺菌効果が低温条件で減弱した。そのため、冬季には、これらの特徴を理解した上で消毒薬を選択し、さらに希釈に温湯を用いるなどの温度管理が必要と考えられた。また、有機物の混入による殺菌効果の低下を防ぐため、清掃などによって有機物を除去する必要があると考えられた。

### 【消毒を行う際に注意すべきこと】

- ・対象となる微生物の種類，性状
- ・消毒をおこなう時間，作用温度
- ・有機物の有無
- ・対象物の性状，材質
- ・使用者，馬ならびに環境への影響

### 【結語】

消毒薬は化学薬品であり、病原体と物理的に接触することで効果を発揮する。また、その効果は消毒薬の濃度，反応温度ならびに作用時間，有機物の有無などに影響を受ける。そのため、環境表面を消毒する際には、どのような細菌を対象とするのかを念頭に置き、

消毒薬の選択，使用濃度や使用方法を正しく選択することが肝要である。また，事前に徹底的な洗浄を行うこと，消毒前に乾燥させること，馬房の隅や窓枠などの汚れが貯まりやすい場所や馬や人が直接接触する可能性のある場所を丁寧に消毒することなどがポイントである。

#### 参考文献

- [1] Boyce, et al. "Environmental contamination due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* possible infection control implications." *Infection Control & Hospital Epidemiology* 18.09 (1997): 622-627.
- [2] Weber, et al. "Role of hospital surfaces in the transmission of emerging health care-associated pathogens: norovirus, *Clostridium difficile*, and *Acinetobacter* species." *American journal of infection control* 38.5 (2010): S25-S33.
- [3] Schulster, Lynne, et al. "Guidelines for environmental infection control in health-care facilities." *Morbidity and mortality weekly report recommendations and reports RR* 52.10 (2003): 1-42

## 1. 馬の *Clostridioides difficile* 感染症 (CDI) について

※*Clostridioides difficile* (*C. difficile*) は、以前は *Clostridium* 属に分類されていたが、2016 年より新たに *Clostridioides* 属となった。

*C. difficile* は人医療において抗菌薬関連下痢症の原因菌であるとともに、医療関連感染症の代表的な原因菌の一つでもある。馬においては、1987 年に初めて CDI の発生が認められてから、海外での医療関連感染を疑う発生例や、生産地での発生例が報告されている。国内においても、競馬場やトレーニング施設などの競走馬の繋養施設や、生産牧場での発生が確認されている。馬の CDI の発症には抗菌薬の使用による腸内細菌叢の攪乱が関係すると考えられており、周術期や他の感染症の治療中に発症することが多く、輸送もリスクファクターとされている。CDI は X 大腸炎の原因の一つとも考えられており、臨床症状は軽度から重篤なものまでであるとされているが、国内では発症後の致死率は高く、感染を未然に防ぐことが重要である。

*C. difficile* はグラム陽性偏性嫌気性有芽胞菌であり、芽胞を形成すると多くの消毒薬に耐性となり、自然環境中では数ヶ月～数年間生存する。感染は芽胞に汚染された環境において、菌を経口的に摂取することにより成立する。感染馬の糞便や、汚染された馬房、治療器具、医療従事者の手指などは容易に感染源となる。前述した抗菌薬の投与や輸送等のストレスを受け感受性が高まっている個体においては、菌の摂取後数日以内に CDI を発症すると考えられている。

## 2. JRA における CDI の発生状況

JRA 所属の競走馬では、2010 年に初めて CDI が確認されて以降、散発的に発生が認められている。この内、栗東トレーニング・センターにおける CDI 発生数を表 1 に示す。これら全ての症例で、CDI の主な発症要因とされている抗菌薬の投与が行われていた。なお、栗東トレーニング・センターでは 2013 年 12 月に診療所の移転・改築が行われており、2013 年以前の症例は移転前の診療所 (旧診療所)、2014 年以降は移転後の診療所 (新診療所) で治療している。

表1. 栗東トレーニング・センターにおける CDI 発症数

年	発症頭数 <sup>I</sup>
2010年	3
2011年	4
2012年	3
2013年	6
<hr/>	
2014年	4
2015年	2
2016年	2
2017年 <sup>II</sup>	0

I：2010年~2013年は旧診療所、2014年以降は新診療所で加療

II：2017年5月現在

### 3. 栗東トレーニング・センター診療所における感染防止対策

#### 1) CDI 疑い馬発生時の診療体制

CDI を含め腸炎が疑われる場合には、速やかに症例馬を隔離馬房に移動させている。治療や馬房作業の際には、馬房別に用意された長靴（図1）やガウン、手袋（図2）、マスクなどの个人防护具（PPE）を着用している。これらの防護具は入院馬房の前室で着脱しており、獣医師や厩務員を介した感染拡大の予防に努めている。



図1. 馬房前室の長靴

馬毎に長靴を複数組用意している。



図2. 馬房前室の防護用具

使い捨てのガウン・手袋を着用している。

## 2) 入院馬房の整備

新診療所の入院馬房では、床ゴムマットの繋ぎ目に隙間はなく、汚染物がゴムマット下には漏出せず排水溝のみから排出されるように加工されている。更に、床はコンクリート構造であるため、馬房の洗浄・消毒を容易に行うことができる（図3）。また、2～4馬房単位で壁が設置され、ブロック毎に前室や水道設備を設け、隣接した馬房とは隔離できるような構造である（図4）。



図3．新診療所の馬房床面

ゴムマットの繋ぎ目は塞がれている。



図4．新診療所の馬房

数馬房ずつのブロック毎に隔離が可能。

なお、旧診療所の入院馬房では、ゴムマットが敷かれていたものの、繋ぎ目の裂けた部分から汚染物の一部が床面下に流れ出る状態となっていた。床面下は土が敷かれており、洗浄が困難であった。また、それぞれの馬房が連続して設置されているため、隣接した馬房への感染拡大が予防しづらい構造となっていた。

## 3) CDI 発生時の消毒

*C. difficile* が分離された馬房の効果的な除菌方法を検討する目的で、水洗、オゾンガス燻蒸、オゾン水洗浄、高圧洗浄、加速化過酸化水素水による洗浄の順で作業を行い、各作業後の馬房内各所（6箇所）の *C. difficile* の芽胞の残存数を調べた（表2）。この結果、オゾンガス燻蒸により菌数は大きく減少していた。この作業順では *C. difficile* の菌数を検出範囲以下にすることはできなかったものの、オゾンガス燻蒸には一定の効果があると考えられた。

表 2. *C. difficile* により汚染された馬房の洗浄効果

処置	採材箇所					
	床	壁	排水溝	窓枠	床(壁付近)	床(入口付近)
水洗	17 <sup>1</sup>	>150	>20	-	-	-
オゾンガス燻蒸	2	5	2	3	-	-
→オゾン水洗浄	ND	1	5	2	-	-
→高圧洗浄	1	2	3	5	-	-
→加速化過酸化水素水	ND	1	2	ND	2	ND

1: CFU/スワブ

ND: 検出されず

-: 未採材

*C. difficile* に汚染された馬房については洗浄と消毒の効率を考慮し、まず高圧洗浄機を用いて有機物を除去した後に、加速化過酸化水素水とオゾンガス燻蒸による消毒作業を行っている。全ての処置後、馬房内の数か所についてスワブを採材し、*C. difficile* が検出されなくなるまで上記処置を繰り返し行うこととしている。また、CDI 以外の腸炎発症馬が使用した馬房については、次亜塩素酸ナトリウムおよび加速化過酸化水素水による消毒を行なっている。

#### 4. まとめ

旧診療所では、汚染物が床材の下に到達・浸透しやすく、汚染された馬房が隔離できないことなどの構造的な要因により、洗浄および消毒には限界があったと考えられた。一方、新診療所では診療時における PPE の使用、床材と馬房の構造を整備、加速化過酸化水素水やオゾンガスなどの消毒剤の導入等の様々な感染防止対策を実施しており、*C. difficile* による医療関連感染が疑われる症例は認められていない。

しかし、散発的な CDI の発生はなお認められており、診療施設内の感染防止対策のみでは予防が完全であるとは言えない。CDI の発生を防ぐためには、抗菌薬の使用方法を始めとした他の発症要因についての更なる検討が必要であると考えられる。



# 社台ホースクリニックにおける感染症対策

## ～ オゾンガス・オゾン水を使用した消毒 ～

鈴木 吏（社台ホースクリニック）

### 1. はじめに

診療所における感染症対策として、主に‘持ち込み病原体’への対策と、‘院内感染’に対する対策を考慮する必要がある。不特定多数の牧場から馬が集まるため、病原体の侵入機会は多く、毎日の清掃・除菌・消毒は欠かせない業務である。また、急性腹症に対する開腹手術を実施した馬や、内固定手術などの長時間麻酔を要した馬など、術後に免疫力の低下した症例が長期間入院する機会も多いため、感染源に対する曝露には日常から非常に気を遣っている。

### 2. これまでの経緯

2004年3月に、喉嚢炎に対する内頸動脈コイル塞栓術を実施した2歳馬が、術後から水溶性の下痢を呈し、便から *Clostridium difficile* が分離された。同時期に別厩舎に入院していた当歳馬も下痢を発症し、同馬の便からも *C. difficile* が分離された。その後、3カ月の間に開腹手術による術後治療中の2頭を含む3頭が *C. difficile* による下痢を発症した。2004年に *C. difficile* 下痢症を発症したこれら5頭のうち、2頭が大腸炎により死亡した。翌年の2005年に2頭、2006年2頭、2007年2頭、2008年3頭、2009年3頭、2011年1頭の発症がみられたが、幸いなことにその後は現在まで発症例がない。当歳馬の下痢便から *Salmonella.sp* が分離されたこともある。

当時は、術後感染予防としてペニシリンやセファゾリンを投与する症例が多かった。*C. difficile* は分離されないが、抗菌剤関連性と思われる下痢症も発生していた。関連性は定かではないが、2009年末から術後にセファロチンを使用するようになってからは、重篤な抗菌剤関連性下痢症の発生は減少している。

下痢ではなく、術後感染創などから MRSA や *Acinetobacter* を含む多剤耐性菌が分離されることもある。

このような経緯から、入院厩舎のホルムアルデヒド燻蒸を2007年に2回、2008年に1回実施した。ホルムアルデヒド燻蒸は芽胞菌まで死滅させることが可能であり、厩舎燻蒸として有効であるが、生体への悪影響が強いため、漏洩防止あるいは曝露防止のために厳重な目張りや管理が必要となる。さらに、燻蒸後の再使用（安全化処理）に時間を要す。

2010年頃からは、弱酸性に調整された次亜塩素酸ナトリウム水 (Solution Water<sup>®</sup>) を手術室や馬房の空間除菌に使用した。現在では、以下に紹介する様々な利点等を考慮し、オゾンガスとオゾン水を導入し、その他の消毒剤等と併用して衛生管理を行っている。

### 3. 環境消毒に関する考え方

人医領域において、床や壁などの環境表面に存在する多くの微生物は、医療関連感染の直接的原因となることはほとんどないと考えられている。感染拡大の多くは、ドアノブや電灯のスイッチなど、手指が高頻度に接触する表面を中心に、医療従事者や患者が手指を汚染させ、媒介し、感染拡大へとつながっている。加えて、環境における頻回な消毒や洗浄処置は、金属腐食や環境中の残留、消毒薬抵抗菌（種々の異論もあるが）など、多くの課題を有する。このような背景から、現在の人医領域においては、日常的に環境を広範囲に消毒する必要性はないとされている。しかしながら、ヒトよりは明らかに微生物に汚染された動物を相手にする我々の環境における同様の報告はない。

当院では、手術前に洗蹄して手術室に入室させているが、多少の糞便やゴミの付着は避けられず、人医領域の床や壁と汚染度合いが同等とは考えにくい。人医領域において清掃を毎日するように（消毒は不要）、我々は手術室の床を手術のたびに簡易に洗浄し、手術室・倒馬（覚醒）室・検査室の床を毎日の業務終了時に丹念に洗浄している。

数年前までは、塩化ベンザルコニウムやジデシルジメチルアンモニウム等の逆性石鹼による消毒を毎日実施していたが、現在はオゾン水による洗浄やオゾンガス燻蒸を併用することで、これらの界面活性剤の使用頻度を減らしている。

### 4. オゾンガス・オゾン水の特徴

オゾンは通常の大気中で  $0.005\sim 0.1\text{ppm}$  の濃度で観測される。コピー機などの静電気を発生させる機器におけるコロナ放電の副産物としても発生しており、日常的に存在する。

オゾンの分子式は  $\text{O}_3$ 、すなわち酸素  $\text{O}_2$  を原料としており、極めて不安定で反応性が高いため、通常的环境中で長時間存在することはできず、酸素に戻ろうとする ( $2\text{O}_3 \rightarrow 3\text{O}_2$ )。塩素の約 7 倍の酸化力を持ち、その強力な酸化力により細菌やウイルスの細胞膜やカプシドを酸化変性させることで除染する。すなわち、細胞膜の破壊、細胞膜タンパク質の不活化を起し、さらに遺伝子に対する親和性も高いため、遺伝子の不活化や細胞内酵素の失活によっても死滅させるため、耐性菌は発生し得ないとされている。また、残留性もなく安全性も高いため、現在では東京都・大阪府などの高度浄水処理場や、自衛隊・消防局などでもオゾンガス・オゾン水の使用が急速に広まってきた。

オゾンによる環境衛生管理がこれまで浸透していなかった理由は、主にオゾンガスの濃度依存性の人体への影響を考慮した濃度管理の難しさ、あるいは安定したオゾン水生成技術の難しさにあったが、これらが解消されたことが現場での使用につながった。多くの現場で急速に普及し始めたこともあり、平成 27 年に厚生労働省によって医療用消毒器としてオゾンガスが認可された（ガスのみ）。

#### オゾンガス

上述したように、高濃度オゾンガスの吸入は人体に有害な影響があり、特に鼻腔・喉・気管・肺などの気道表面が酸化される。日本産業衛生学会の指定した

0.1ppm（作業環境基準）を超えると濃度依存性に症状が悪化し、5～10ppm となると肺水腫・昏睡といった危険性が増す。実際には、0.015～0.02ppm でオゾン特有の臭気を感じるため、0.1ppm 以上の濃度で気付かずに作業する危険性は、ほとんどない。なお、発癌性は確認されていない。（図1）

オゾンガス燻蒸の有効性は CT 値で指標化されている。CT 値は【オゾンガス濃度 ppm×曝露時間 min】で求められる値であり、各病原体を対象とした除染に必要な CT 値があるため、燻蒸の際は一定空間における CT 値を達成する必要がある。

《手術室》 当院では、毎日の業務終了後に手術室をオゾンガス燻蒸している。目的とする消毒対象病原菌を一般細菌（黄色ブドウ球菌、緑膿菌など）とし、CT 値 70 に設定して燻蒸を行っている。

オゾンは酸素や窒素に比較して比重が重いいため、燻蒸の際はオゾン発生機器を一定の高さ（床上 1.5m）に設置している。また、手術室の天井は約 5m と高いため、同時に空気清浄機などを用いて空気の流れをつくっている。

オゾン濃度(ppm)はオゾン発生量(mg/h)/室内容積 (m<sup>3</sup>) /2.14 で理論値が求められる。しかしながら、実際には室内換気、反応物（有機物・菌・臭気物質）、自己分解などにより計算値よりも減少する。すなわち、推測値（理論値）では、実際の濃度が不明であるため、測定する必要がある。CT 値達成に必要なオゾン発生能力および CT 値測定能力を兼ね備える機器として、我々は(株)タムラテコ社製の【BT-88H】を用いている。オゾン発生量は最大 2.5g/hr であり、手術室の空間において CT 値 70 を達成するのに要する時間は 70～80 分である。

《入院厩舎》 入院馬が退院する度に馬房単位でオゾンを用いた環境消毒を実施している。長期間の入院あるいは下痢を呈した馬の馬房の壁や床には糞便がこびりついていることも少なくない。オゾン水は有機物が存在すると有機物との反応にオゾンが消費されてしまい、除菌効果が落ちてしまうため、（厩舎消毒時の原則ではあるが）まず家庭用高圧洗浄機（FAW110SB 日立）とブラシで、床や壁に付着した有機物や汚れを落とす。その後に、オゾン水で床と低い壁を中心に洗浄を行う。最後に、手術室と同様にオゾンガス燻蒸を実施している。

### オゾン水

オゾン水は強力な殺菌能力を持ち（オゾンガスの約 10 倍）、1ppm の濃度でもほとんどの細菌やウイルスを短時間で死滅することが可能である。オゾンガスと同様に、除染に必要な CT 値とオゾン水生成濃度から、対象とした微生物に対する必要な曝露時間を概算することができる。

オゾン水は、水道水と空気から精製するため、備蓄が不要であり大量に洗い流しながら除染できる利点がある。一定の水圧のある水道水さえ確保できれば、キャリアに乗せてどこでもオゾン水が使用可能となる。備蓄はできないが、残留性のない殺菌水を量の制限なく使用できる点は、非常に大きな利点である。すなわち、厩舎・馬体などを洗浄や消毒した際に、環境中や排水にそのまま流しても問題ない。

実際の使用に際しては、水温に気を付ける必要がある。オゾン溶解度には pH と温度が大きく影響を与えるが、水道水を用いるのであれば pH は通常問題ない。常

温(21度)よりも低温(8度)の方が、オゾン溶解速度(ひいてはオゾン水のオゾン濃度)が上昇するとの研究結果もみられる。35度以上の水温では、オゾン水は水に戻ってしまうので注意が必要である。

当院においては、手術前の術者の手指洗浄、手術室・馬房の床洗浄に使用している。さらに、創傷部の洗浄、子宮洗浄、腸管切開部(結腸捻転時の骨盤曲切開)縫合時の洗浄などに使用している。使用しているオゾン水生成器は、(株)タムラテコ社製の【BT-01】と【BT-10】を用いている。生成されるオゾン水濃度は1ppmである。

## 5. その他の感染症対策

2015年に隔離厩舎を設立した。馬房は2つで、馬房間に観察室がある。現在は、術後入院時に下痢を発症した馬や、繁殖雌馬と育成馬の入院時期が重なった時などに使用している。また、別の目的で種雄馬の入院にも利用している。

馬房に入る際は、長靴あるいはシューズカバーを着用したうえで、ガウンや手袋を着用して、感染の拡大防止に努めている。(使い捨ての手袋を使用することで、クロストリジウムデフィシル関連性下痢症の発生率が減少したとの報告もある。)

馬房前、あるいは隔離厩舎前には踏み込み槽を設置している。使用する消毒薬は、有機物混入に強く、広範囲な病原体に効果的な塩素系消毒剤(ペルオキソー硫酸水素カリウム+塩化ナトリウム:商品名 アンテックビルコン®)を選択している。

入院馬の管理に携わるスタッフに関しては、頻回の手指の洗浄、業務終了後に直接帰宅すること(他の厩舎等に立ち寄らない)、衣類を洗濯すること等を指導している。

## 6. 牧場などの他施設におけるオゾン運用の可能性

既に、道内の多くの競走馬生産牧場や育成牧場などの施設においてオゾン水生成器の導入が進んでいる。その背景には、他の機能水などと比較した際にも劣らない優れた除菌効果と、有害な二次生成物を残さない利点があげられる。さらに、水道水から大量に生成することが可能であり、ランニングコストが少ない点も強調できる。オゾン水の糸状菌に対する効果も実験的な結果が示されており、皮膚病治療(あわせて馬具の除染)にも有効であると思われる。また、生産牧場においては最大の懸案事項であるEHVや、仔馬の下痢症を引き起こすロタウイルスに対しても有効とされており、感染拡大防止の一助となりうる可能性がある。その他にも、種馬所・馬運車・セリ場などを介した感染拡大防止、馬具の手入れ等、使用の可能性は広範に広がるであろう。

様々な感染症が大量発生した際などに備えて、常日頃からその対応策を考えておくことは重要であるが、煩雑すぎでは実行できない。その点において、オゾン水やオゾンガスを用いて病原体の除染を行うことは、簡便かつ迅速に感染の拡大防止に大きな役割を果たすことが可能であると考えている。

図 1

■ 気中オゾン濃度とその影響(日本産業衛生学会)

空气中濃度	影 響
0.1ppm	臭気を認めうる
0.1~0.3ppm	呼吸器の刺激
0.4ppm	気道抵抗の上昇
0.8~1.7ppm	上気道の刺激症状
1.0ppm	咳嗽、疲労感
1.5ppm	2時間で時間肺活量の20%減少、咳嗽、胸痛、精神作用減退
9.0ppm以下	呼吸困難、肺うっ血
1,700ppm以上	数分間で死亡

■ 生体へのオゾンの影響

空气中濃度	影 響
0.01ppm	敏感な人の嗅覚閾値
0.01~0.015ppm	正常者における嗅覚閾値
0.06ppm	慢性肺疾患患者における嗅気能に影響ない
0.1ppm	正常者にとって不快、大部分の者に鼻、咽喉の刺激
(労働衛生的許容濃度)	
0.1~0.3ppm	喘息患者における発作回数増加
0.2~0.5ppm	3~6時間暴露で視覚低下
0.23ppm	長期間暴露労働者における慢性気管支炎有症率増大
0.4ppm	気道抵抗の上昇
0.5ppm	明らかかな上気道刺激
0.6~0.8ppm	胸痛、咳、気道抵抗増加、呼吸困難、肺のガス交換低下
0.5~1.0ppm	呼吸障害、酸素消費量減少
0.8~1.7ppm	上気道の刺激症状
1.0~2.0ppm	咳嗽、疲労感、頭重、上部気道の乾き、2時間で時間肺活量の20%減少、胸痛、精神作用減退
5~10ppm	呼吸困難、肺うっ血、肺水腫、脈拍増加、体痛、麻痺、昏睡
50ppm	1時間で生命の危険
100ppm以上	数分間で死亡
6,300ppm	空气中落下細菌に対する殺菌

出典:平成15年度省エネルギー型廃水処理技術開発報告書(NEDO)

図 2

■ オゾンガス除染目安

【各種ウイルス・細菌の目安】

大腸菌・黄色ブドウ球菌(MRSA)・緑膿菌・インフルエンザウイルス・ベスト・野兔病菌・  
 コクシジオイデス真菌・エボラ・天然痘ウイルス等

<b>90%以上除染目安CT値</b>	<b>25</b>
<b>99%以上除染目安CT値</b>	<b>50</b>
<b>99.9%以上除染目安CT値</b>	<b>60</b>

(注)除染室内環境温度は60%以上が望ましい。

■ オゾンガス除菌データ

①	ウイルス・細菌	除菌方法	CT値(ppm×min)	死滅率(減少率)(%)	⑥	ウイルス・細菌	除菌方法	CT値(ppm×min)	死滅率(減少率)(%)
①	大腸菌	ガス	60	99.99	⑥	Norevirus(ノロウイルス)	ガス	72	100
②	Staphylococcus pyogenes(化膿レンサ菌)	ガス	60	100	⑦	Bacillus cereusFO13494(セレウス菌)	ガス	24	100
③	Staphylococcus aureusFO12732(化膿レンサ菌)	ガス	24	100	⑧	Vibio ParahaemolyticusFO12711(腸炎ビブリオ)	ガス	24	100
④	新型インフルエンザ(H1N1)	ガス	18	99.7	⑨	Salmonella typhimurium FO14183(サルモネラ菌)	ガス	24	100
⑤	新型インフルエンザ(H5N1)	ガス	60	100	⑩	硫化水素	ガス	28	100

図 3

■オゾン水除菌データ ————— 厚生労働省データ

微生物の種類		水中オゾン濃度 ppm(mg/l)	微生物濃度 (個別/ml)	温度 (°C)	pH	接触時間	死滅率 (%)
一般細菌	大腸菌	0.96	10 <sup>5</sup> cells	21	7	5秒	100
	ブドウ球菌	1.08	10 <sup>5</sup> cells	21	7	5秒	100
緑膿菌		1.01	10 <sup>5</sup> cells	21	7	5秒	100
※(結核菌)・枯草菌		0.3~0.5	10 <sup>5</sup> cells	20	6.5	30秒	99.9
インフルエンザウイルス		0.96	10 <sup>5.0</sup> EID50	21	7	5秒	100
クロストリニューム パーフルンジェンス		0.96	10 <sup>5</sup> cells	21	7	5秒	100
鶏脳脊髄炎ウイルス		0.72	10 <sup>2.0</sup> EID50	20	7	5秒	100
犬伝染性肝炎ウイルス		1.2	10 <sup>1.5</sup> EID50	21	7	5秒	100
犬パルボウイルス		0.96	10 <sup>2.5</sup> TCID50	21	7	5秒	100
鶏コクシジウム		1.92	約3×10 <sup>5</sup> cells	20	7	30秒	100
カビ		0.3~0.5	10 <sup>5</sup> cells	20	6.5	19秒	99.9
酵母		0.3~0.5	10 <sup>5</sup> cells	20	6.5	90秒	99.9

参考文献

Johnson S, Gerding DN, Olson MM, et al.

Prospective, controlled study of vinyl glove use to interrupt *Clostridium difficile* nosocomial transmission. *Am J Med.* 1990; 88(2):137-140.

Centers for Disease Control and Prevention(CDC)

Guidelines for Environmental Infection Control in Health-Care Facilities.

<http://www.cdc.gov/mmwr/PDF/rr/rr5210.pdf>

特定営利活動法人 日本オゾン協会

オゾンハンドブック

第 45 回生産地における軽種馬の疾病に関するシンポジウム

一 般 講 演

## 社台ホースクリニック馬細胞治療センターと ADRCs

加藤史樹（社台ホースクリニック）

### 【はじめに】

馬の再生獣医療に対する関心と期待は高いものの、その作用機序や治療効果については、いまだに不明な点が多い。社台ホースクリニックでは、2007年より浅屈腱炎に対する自己脂肪組織由来間葉系幹細胞による治験（臨床応用）を行い、一部の症例が飛び抜けた成績を残したが、全体的にみれば明らかな治療効果を見いだすことはできなかつたと結論づけた。

2016年4月1日、社台ホースクリニック馬細胞治療センターが開設した。ここでは、従来の自己脂肪組織から分離した細胞を用いる自家移植に加え、まったく別の馬の脂肪組織からの細胞を用いた同種（他家）移植による細胞治療を行えるよう、機材と設備を整えた。

サイトリ・セラピューティクス社セルーション®遠心分離器（図1）を用いて作成される脂肪組織由来再生細胞を Adipose Derived Regenerative Cells : ADRCs と呼んでいる。細胞治療センターでは、この遠心分離器を用いて ADRCs を作成し、さらに液体窒素凍結保存容器にてその ADRCs を長期間保存することが可能である。そして、いつでも解凍して投与に使用できることも大きなメリットである。



今回は、実際に ADRCs を作成する方法と、現在までに同種移植を行った症例についての治療実績および成績を紹介する。

図1 セルーション®遠心分離器

### 【ADRCs 作成方法】

移植免疫の観点からは、当然ながら自家移植が望ましいと思われる。しかし自家移植では採取できる脂肪組織量は症例ごとにばらつきがあり、一定数の細胞数を確保することが難しい。実施可能回数も、脂肪量が限られるためせいぜい2回が限度である。それにもかかわらず数十万円のコスト（消耗品だけで）かかるというのでは、再生医療を受けるにはお金がかかるとは言え、簡単に選択できる治療法とはいえない。我々の行う同種移植は、1回の ADRCs 作成工程で最大で30回投与できる数の細胞が抽出され、1頭の症例に対して頻回投与することも可能である。さらに、投与1回あたりのコスト、ひいては治療費を抑えられ、クライアントの負担を軽減することが可能になる方法でもある。脂肪組織



は、やむを得ない理由で淘汰廃用が決定した、臨床的に全身状態の異常が認められない1才または2才の若い馬からの提供を受けて採取される。臀部の皮下脂肪が採取部位に適しており、十分な量（200～300g程度）の脂肪組織を採取することができる。脂肪組織を採取する際は、手術覚醒室で安楽死をしたのち、通常の手術と同様の外科的消毒をして行われる。採取された脂肪組織はいくつかの滅菌シャーレに取り（図2）、細胞治療センターのクリーンベンチへ運ばれる。そこで鉗や注射針を束ねたもので細切し（図3）、次にセルーション®遠心分離器のチャンバー内にリングル液とともに注入し、洗浄および酵素処理を経て乳白色の懸濁液となる。この懸濁液の遠心分離濃縮細胞群がADRCsである。セルーション®遠心分離器では、最終的に5mlのADRCs溶液として出来上がる。この溶液中の総細胞数をセルカウンターで計測し、 $1 \times 10^7$ 個/mlとなるように希釈、保存用アンフルに1mlずつ分注し、さらに凍害保護液1mlを加えて凍結させる（図4、5）。また、投与する際には、ADRCs溶液を急速解凍し、細胞数を計測したのち、使用目的に合わせたボリュームに調節する。



図2 採取した脂肪組織

図3 クリーンベンチ内での作業



図4 液体窒素凍結保存容器

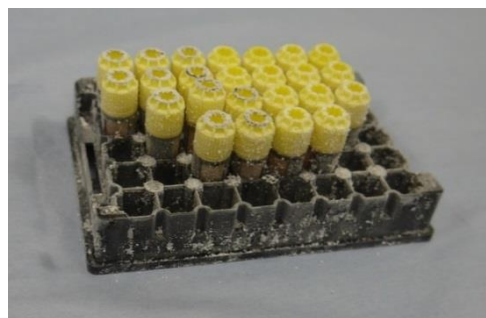


図5 凍結保存されたADRCs

#### 【治療成績】

幹細胞が持っているとされている作用に、ホーミング効果とパラクライン効果というものがある。ホーミング効果とは、「体内に放出された幹細胞が、自動的に再生を必要としている場所を見つけ出す効果である。幹細胞が静脈内に投与された場合には、末梢循環からリンパや末梢血を通じて損傷部位に到達し、血管内皮細胞に接着して組織に浸潤する。そこで増殖し、目的の細胞へ分化する」とされる。パラクライン効果とは、「投与された細胞が生成する様々な成長因子などが直接拡散などにより周辺細胞に作用する」というものである。

このような作用のメカニズムは、まだ不明な点が多い。これまでの報告やわれわれの浅屈腱炎に対する治療経験から、投与した幹細胞（群）が目的とする細胞へ分化する可能性は低いと考える。もっとも期待している作用は、投与した細胞から放出（分泌）されるサ

イトカインによって誘発される組織修復作用と、抗炎症作用である。

そこで、浅屈腱炎や治療困難な特定の疾患の治療を目的とするのではなく、対象とする疾患を広げ、この ADRCs 治療の可能性を検証していくべく治験（臨床応用）を開始した。

なお、この治験を開始する前に、ADRCs 同種移植の安全性を確認するための投与試験を行った。ADRCs は、投与試験当日に作成されたものを使用し、全身（静脈内）投与が 6 頭、関節内（手根間関節）投与が 4 頭、全身投与と関節内（飛節）の両方が 1 頭、全身投与と Regional Perfusion（指静脈）の両方が 1 頭で行った。血液検査（全頭）および関節の腫脹等の臨床症状（関節内投与実施馬）のモニタリングを行った。この投与試験では、①ADRCs 投与直後の急性アレルギー反応は認められなかった、②ADRCs 投与に関連する血液検査値の変化は認められなかった、③ADRCs 関節内投与による跛行または腫脹等の炎症性反応は認められなかった、という結果となった。しかしながら、どのような副反応が起こるのかは個体により異なる可能性があるため、そのリスクには常に注意を払う必要がある。

現在までに ADRCs を投与した疾患の種類は、全身投与では開腹手術後の症例（結腸捻転、小腸捻転など）や腸炎などの消化器疾患、肝炎、肺炎、慢性閉塞性肺疾患（COPD）、慢性化した感染性関節炎（滑膜炎）、繁殖雌馬の慢性蹄葉炎、子宮破裂による腹膜炎など、局所投与では、繋靭帯炎、浅屈腱炎が主である。

結腸捻転では、開腹手術後に投与を行っており、最も効果を実感している疾患である。17 頭に投与し、14 頭（82.4%）で救命できた。これは 2009 年の我々の調査における 1 カ月生存率 76.6% を上回る結果である。

小腸捻転や重積等、他の開腹手術症例に対しても、術後に投与を行い、良好な結果が得られている。また、少数ではあるが重篤な腸炎の症例と、子宮破裂による腹膜炎の症例でも効果を感じた。

当歳の間質性肺炎は、数日で死亡に至ることが多い治療が難しい疾患である。入院による集中治療に加え、ADRCs の投与を行った 3 頭のうち、2 頭は改善し退院することができた（図 5）。COPD のポニーは、かなり呼吸が楽になった。

局所投与は、育成馬の繋靭帯炎の症例が最も多く、次に浅屈腱炎であるが、まだリハビリ

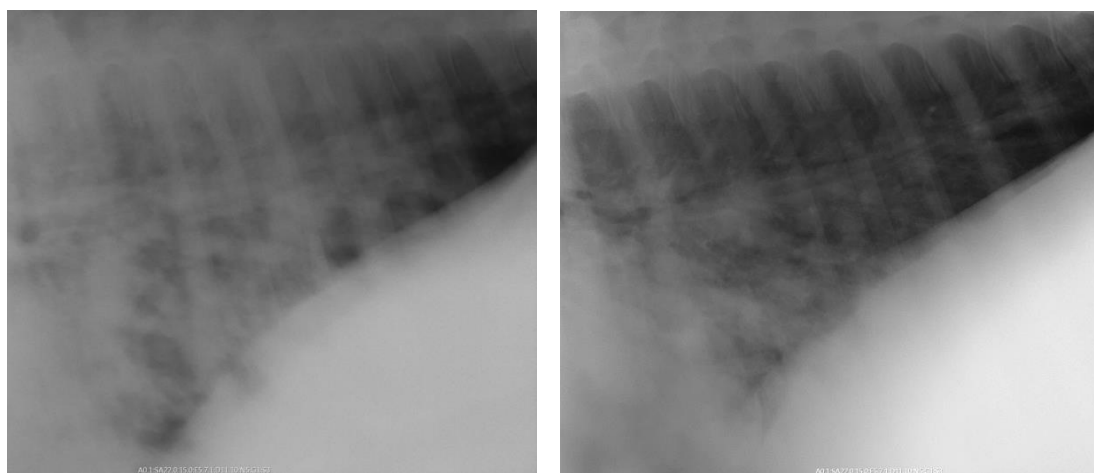


図 5 間質性肺炎の症例 初診時

ADRCs 投与の 10 日後

リ中の症例が多いので、結果が出るのはまだ先となる。

現在までのところ、全身投与および局所投与による副反応の発生は、まったく認められていない。

#### 【まとめ】

「まずはいろいろな症例に使ってみよう」ということから始めた ADRCs 同種移植であるが、実際に効果を強く感じる疾患があり、特に結腸捻転手術後の成績は良好であった。全身性の炎症性疾患や再灌流障害、エンドトキシンが関与する疾患に対して積極的に使用してみる価値はあるかもしれない。

ADRCs は決して万能薬ではなく、あくまで通常の治療に加えて補助的な作用（自己免疫補完）を期待して投与されるものであると考える。投与する細胞数、投与方法、タイミング、等まだ検証すべき点は多く残されているが、データの集積、分析を今後の課題として、これからの治療につながるよう症例を重ねていきたい。

## 馬の黄体の超音波所見から何が読み取れるのか？

N O S A I みなみ

日高支所 中部家畜診療センター

七尾 祐樹

### 【はじめに】

馬において卵巢及び子宮疾患の診断や交配適期の判定、妊娠診断に超音波検査は欠かせない。その中で形態が異なる黄体に遭遇するが、その形成の仕方や機能に関する詳細な報告はない。今回、妊娠黄体を超音波所見からいくつかのタイプに分類し、その黄体形成に関する要因を交配前の卵巢及び子宮所見から探索した。また、妊娠黄体の形態と産子の性別との関係について調査を行い、若干の知見を得たので報告する。

### 【材料及び方法】

2014年の繁殖期に交配後15～21日の妊娠診断時に妊娠黄体1個で受胎を確認したサラブレッド種雌馬75頭を調査対象とした。対象馬は未経産馬5頭、経産馬70頭（空胎馬：14頭、泌乳馬：56頭）で、平均年齢は11.2歳（4～20歳）であった。妊娠黄体を超音波画像から、S（均一な黄体組織像で内腔を有さない）、C（黄体内部にエコーフリーの内腔を有する）、F（黄体内部にエコージェニックの強い内腔を有する）の3つのタイプに分け、さらにSはS1（均一な黄体組織像）とS2（黄体の中心に強いエコージェニックライン）、CはC1（エコーフリー像の直径が1cm未満）とC2（エコーフリー像の直径が1cm以上）に分類した（図1）。交配前の超音波検査で主席卵胞の直径（5mm単位で計測）、子宮の浮腫の程度（-：浮腫なし、+：軽度の浮腫、++：中程度の浮腫、+++：明瞭な車軸状浮腫）を記録した。交配前に超音波検査を2回実施した例から主席卵胞の発育速度（mm/day）を求め、妊娠黄体のタイプ別での主席卵胞の発育速度を比較した。対象馬はすべて交配から48時間以内に排卵を確認し、排卵確認時の黄体の超音波画像から内腔の有無及び内腔の大きさから内腔無、内腔小及び内腔大の3つに分類した（図2）。また、2015年に分娩した対象馬の産子の性別を調べた。

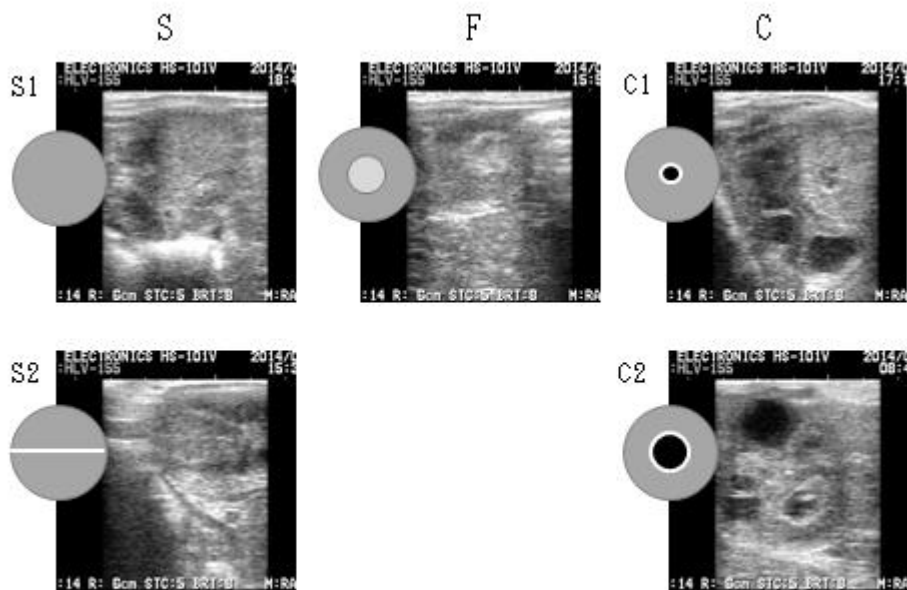


図1 妊娠黄体を超音波画像から3つのタイプに分類



図2 排卵確認時の黄体を超音波所見から3つのタイプに分類

**【結果】**

1) 妊娠黄体のタイプ別割合

S1、S2、C1、C2、Fの割合は32.0、10.7、21.3、13.3、22.7%で、エコーフリーの内腔を有したCの割合は34.6%であった(図3)。

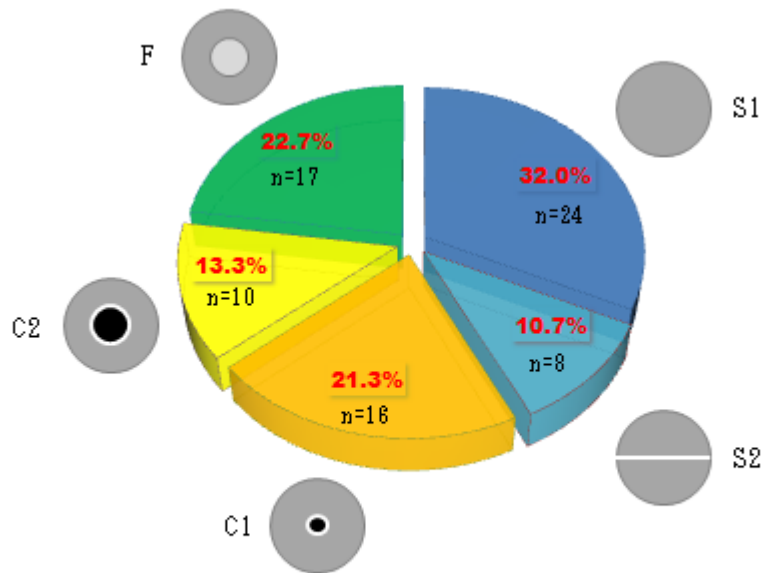


図3 妊娠黄体のタイプ別割合

2) 排卵確認時の黄体所見と妊娠診断時の黄体所見

Sでは排卵確認時の黄体で内腔無が13例と最も多く、内腔小が5例、内腔大は認められなかった。これに対して、内腔を有したCでは排卵確認時の黄体で内腔大が6例と最も多く、内腔無は2例であった(表1)。







		排卵確認時の黄体所見		
		内腔無	内腔小	内腔大
	S	13	5	0
	C	2	2	6
	F	1	5	3

表1 排卵確認時の黄体と妊娠黄体の超音波所見

3) 妊娠黄体のタイプと交配前の主席卵胞の大きさ、子宮の浮腫の程度

交配前の卵巣所見で主席卵胞の大きさが 30~35 mm の時、S では子宮の浮腫の程度が+から++の割合が多かったのに対して、C では子宮の浮腫の程度は、-から+の割合が多かった。主席卵胞の大きさが 40~45 mm 時も S では子宮の浮腫の程度は++から+++の割合が多かったのに対して、C では+から++の割合が多く、S に比べ、C では同レベルの主席卵胞の大きさが子宮の浮腫の程度が 1 段階低い傾向が認められた (表 2)。また、主席卵胞の発育も S に比べて、C で遅い傾向が認められた (図 4)。

主席卵胞		30-35 mm				40-45 mm			
		-	+	++	+++	-	+	++	+++
	S		4	3			2	6	2
	C	2	2		1		3	3	1
	F	1	3	1	1		2	1	1

(分娩後20日未満の交配データは除く)

表2 交配前の主席卵胞及び子宮浮腫の程度と妊娠黄体の形状との関係

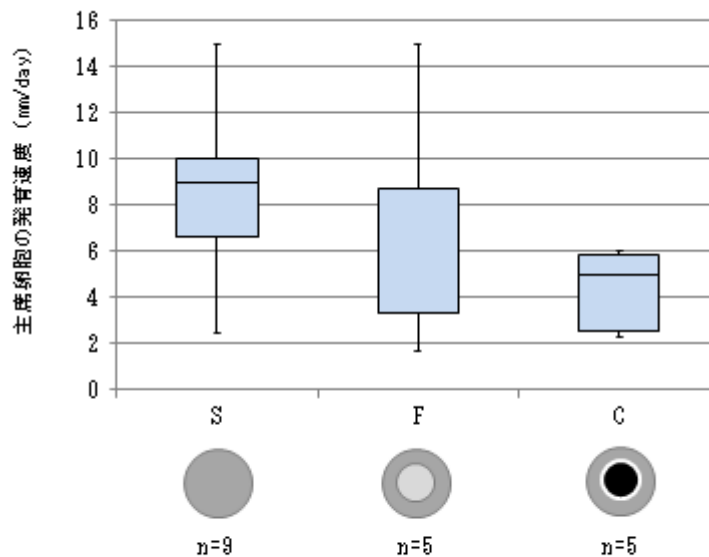


図4 交配前の主席卵胞の発育速度と妊娠黄体のタイプ

#### 4) 妊娠黄体のタイプと産子の性別

S、C、Fの産子の雄比率はそれぞれ73.0、26.3、57.1%で、SとCの間で有意な差を認めた ( $p<0.05$ ) (図5)。

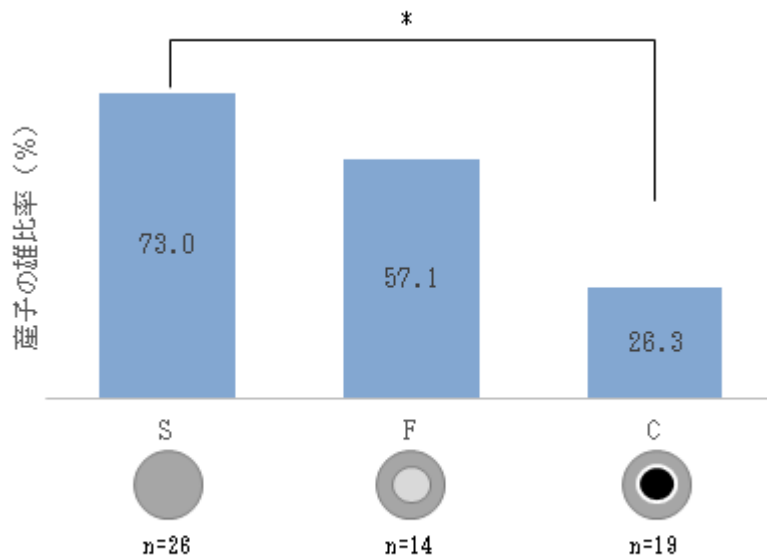


図5 妊娠黄体のタイプと産子の性別との関係

#### 【考察】

妊娠黄体の約4割が超音波検査でエコーフリーの内腔を有していた。エコーフリーの内腔を有する妊娠黄体では内腔を有しない黄体に比べて、発情期における主席卵胞の発育が緩慢で、産生されるエストロゲン濃度も低い傾向であったことから、主席卵胞の発育過程がその後の黄体形成に影響を及ぼしていることが示唆された。また、妊娠黄体の超音波所見と産子の性別との関連性を示唆する結果が得られた。



## 抗ミュラー管ホルモン (AMH) 濃度が微増した繁殖牝馬 2 症例

○大塚智啓<sup>1)</sup> 村瀬晴崇<sup>2)</sup> 野田龍介<sup>1)</sup>伊藤克己<sup>1)</sup>

1) 日高軽種馬農協 2) JRA 日高育成牧場

### 【はじめに】

ウマの顆粒膜細胞腫 (Granulosa Cell Tumor : GCT) は、ウマの卵巢腫瘍の中で最も多く、発情異常や雄様行動を呈し、卵巢が正常に働かないことから不妊となる。発症した卵巢はほとんどが腫大するが、最大直径が 7cm や 8cm であった顆粒膜細胞腫の報告もある [1]。超音波所見は蜂の巣状構造と言われる多嚢胞性構造の他に実質性や単胞性等様々な形態がみられる。従来 GCT のホルモン診断は、インヒビン (GCT : >0.7 ng/ml) やテストステロン (GCT : >45 pg/ml) 濃度の測定が行われてきたが、診断率はインヒビンで 70-85%、テストステロンで 40-70% と高くなく、また発情時期や妊娠により値が変動するため判断が難しいと考えられている [2,3,4]。そこで近年は、発情期や妊娠期等による影響が少なく、診断率も高く、また他の卵巢腫瘍でも値が上昇しないことから、抗ミュラー管ホルモン (Anti-Mullerian Hormone : AMH) 濃度の測定が有用であると考えられている [4]。過去の報告では、AMH 濃度は GCT 罹患馬で  $1,901 \pm 1,144$  ng/ml (14~10,596 ng/ml)、健常妊娠馬で  $0.72 \pm 0.05$  ng/ml (0.26~2.61 ng/ml)、健常非妊娠馬で  $0.96 \pm 0.08$  ng/ml (0.22~2.94 ng/ml) であり、GCT 診断におけるカットオフ値は 4 ng/ml とされている [5]。今回、臨床症状から GCT を疑い AMH 濃度を測定したところ、カットオフ値前後まで上昇が認められた繁殖牝馬の 2 症例について概要を報告する。

【症例 1】

17 歳齡、前年より無発情、左側卵巣は大きさ約 5 cm、実質様構造、対側卵巣は不活性（約 3 cm）。経口黄体ホルモン剤投与やデスロレリン注射等による発情誘起を試みたが効果は認められず、交配を行うことは出来なかった。2～6 月にホルモン測定を実施し、AMH 濃度は 2.07 ～ 4.02ng/ml、インヒビン濃度は 1.71 ng/ml（初回のみ測定）、黄体ホルモン値（P 値）は 1 ng/ml 以下。臨床症状やホルモン濃度から顆粒膜細胞腫を疑い卵巣摘出を考えたが、実施には至らなかった。

翌年 3 月時の AMH 濃度は 3.78ng/ml であった。その後発情回帰し交配を 2 回行ったが不受胎であった。

	AMH (ng/ml)	インヒビン (ng/ml)
2015 年 2 月	3.10	1.71
3 月	4.02	—
4 月	3.34	—
6 月	2.17	—
2016 年 3 月	3.78	—

AMH およびインヒビン濃度



2015 年 2 月左卵巣



2015 年 5 月左卵巣

【症例 2】

13 歳齡、当年産後より無発情、左側卵巢は大きさ約 6 cm、実質様構造、対側卵巢は不活性（約 2 cm）。PG 投与も効果は認められず、交配を行うことは出来なかった。7～10 月にホルモン値測定を実施し、AMH 濃度は 1.00～5.51 ng/ml、インヒビン濃度は 1.88 ng/ml、P 値は 1ng/ml 以下であった。臨床症状やホルモン濃度から顆粒膜細胞腫を疑い卵巢摘出を考えたが、実施せず経過観察とした。

翌年 6 月に直腸検査を行ったところ、右側卵巢に黄体を認めた。その後交配を 2 回行い、受胎を確認した。6 月時点での AMH 濃度は 0.88 ng/ml、インヒビン濃度は 0 ng/ml、P 値は 1.13ng/ml であった。

	AMH (ng/ml)	Inhibin (ng/ml)
2015 年 7 月	3.17	1.88
8 月	1.00	—
10 月	5.51	—
2016 年 6 月	0.88	0

AMH およびインヒビン濃度



2015 年 7 月左卵巢



2015 年 8 月左卵巢

### 【まとめと考察】

今回の2症例は、卵巣の腫大は見られず、AMH濃度もカットオフ値前後まで上昇したのみであったが、インヒビン濃度は高値、P値は低値、無発情かつ対側卵巣不活性を呈していたことから顆粒膜細胞腫が疑われた。しかし翌年および翌々年には発情が回帰し、交配を行うことが可能となったため顆粒膜細胞腫は否定された。

本症例では臨床症状より顆粒膜細胞を疑い卵巣を摘出し組織学検査を行うことも考えたが、実施には至らなかった。2症例ともその後発情が回帰したことから、顆粒膜細胞腫を疑うケースであってもAMH濃度がカットオフ値前後まで僅かに上昇しているのみかつ卵巣は腫大していない場合、卵巣摘出は必ずしも必要ではないと思われた。

顆粒膜細胞腫の場合、インヒビン濃度が上昇すると負のフィードバックが働き下垂体からの卵胞刺激ホルモン（FSH）分泌が抑制されるため対側卵巣の卵胞発育が抑制される[1,2]。本症例では機序は不明であるが一時的に顆粒膜細胞が増殖したためAMH濃度が微増し、同じく顆粒膜細胞から分泌されるインヒビン濃度も上昇したため対側卵巣の卵胞の発育が抑制された可能性がある。今回は卵巣摘出を実施していないため、AMH濃度が微増した原因の組織学的診断はできていないが、本症例からGCTでない場合においてもAMHおよびインヒビン濃度がカットオフ値を超えるケースがあることが示唆された。

今後は本症例の経過を追うと共に、症例数を増やし、対処法およびAMH濃度微増の要因を検討していきたい。

【参考文献】

- [1] J. Crabtree: Review of seven cases of granulosa cell tumour of the equine ovary, *Vet Rec* 169 (10) : 251, 2011
- [2] McCue P, Roser J, Munro C, Liu I, Lasley W: Granulosa cell Tumors of the Equine Ovary , *Vet Clin Equine* 22: 799-817, 2006
- [3] Stabenfeldt GH, Hughes JP, Kennedy PC, Meagher DM, Neely DP: Clinical findings, pathological changes and endocrinological secretory patterns in mares with ovarian tumours, *J Reprod Fertil Suppl* 27: 277-285, 1979
- [4] B.A. Ball, J. Almeida, A.J. Conley: Determination of serum anti-Mullerian hormone concentrations for diagnosis of granulosa-cell tumours in mares, *Equine Vet J* 45 (2): 199-203, 2013
- [5] J. Almeida, B.A. Ball, A.J. Conley, N.J. Place, I.K.M. Liu, E.L.Scholtz, L. Mathewson, S.D.Stanley, B.C. Moeller: Biological and clinical significance of anti-Mullerian hormone determination in blood serum of the mare, *Theriogenology* 76: 1393-1403, 2011