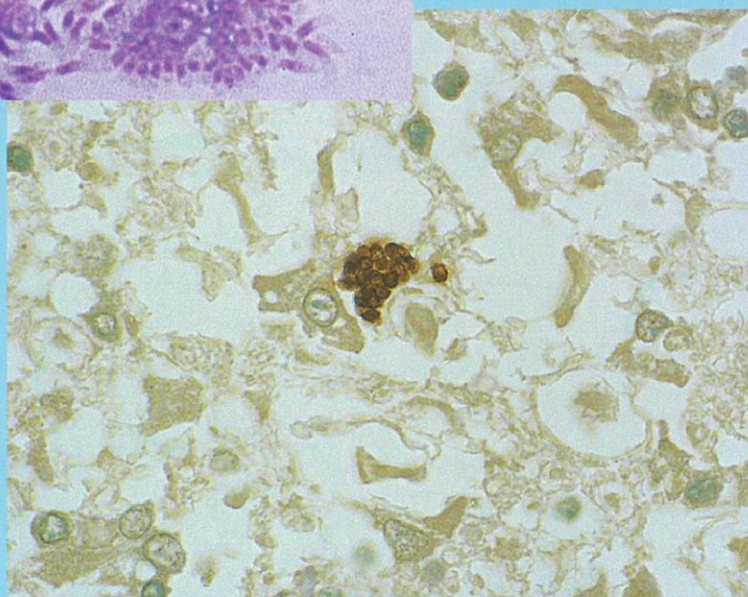
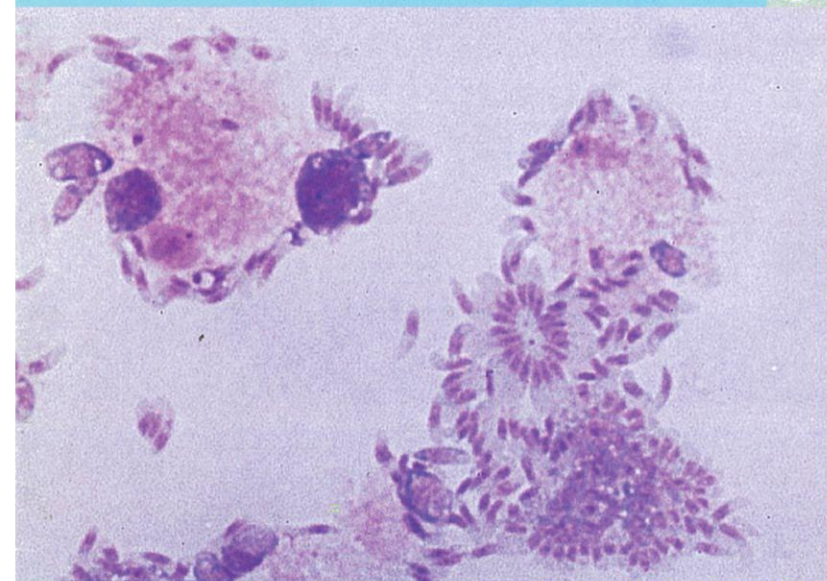


馬原虫性脊髄脳炎(EPM)

Equine Protozoal Myeloencephalitis

(第2版 補訂版)



社団法人 中央畜産会

目 次

発刊にあたって	1	
馬原虫性脊髄脳炎要約	2	
馬原虫性脊髄脳炎について		
I 発生の歴史と疫学	3	
1. 発生の歴史	3	
2. 疫学	3	
3. 分布	4	
II 病原検索	5	
1. 病原体	5	
2. 生活環	6	
3. 感染	7	
III 臨床	8	
1. 臨床症状	8	
2. 臨床生化学的検査	9	
IV 病理学的所見	10	
1. 肉眼所見	10	
2. 組織学的所見	11	
V 診断	12	
1. 臨床診断	12	
2. 免疫学的診断	12	
2-1 脊椎腰仙部からの髄液の採取方法		
2-2 ウエスタンブロット法		
1) 電気泳動	2) 転写	3) ブロッキング
4) 抗体反応	5) 発色	
2-3 ELISA法		
3. 病原体の分離培養	13	
4. PCR法	14	
5. 病理学的検索	14	
VI 診療と予防	15	
1. 診療	15	
2. 予防	15	
おわりに	16	

発刊にあたって

馬の原虫性脊髄脳炎（Equine Protozoal Myeloencephalitis）は米国で多くの発生がみられ、EPM と一般的に呼ばれている疾患です。本病は住肉胞子虫の一種である *Sarcocystis neurona* (*S. neurona*) が馬に感染した後、脊髄や脳に病変を形成することで運動麻痺を主徴とする中枢神経障害を引き起こす病気です。*S. neurona* の生活環については完全には解明されていませんが、現時点では、終宿主としてはオポッサムが、中間宿主としては、アライグマ、スカンク、アルマジロ、ラッコなどが考えられています。馬は、*S. neurona* に感染したオポッサムの糞便により汚染された飼料を摂取することで感染すると考えられています。本病の診断は脊髄液中の抗体の免疫学的検出、病巣からの原虫の分離培養、PCR 法による遺伝子の検出、そして病理組織標本における原虫の証明などによりなされます。本病の発生は世界的には北米が中心で、オポッサムの生息域と一致しています。わが国の自然界にはオポッサムは生息していませんので、本病の感染サイクルは成立しないと考えられます。しかし、2001年7月には米国から輸入された競走馬において、わが国で最初の EPM が確定診断され、今後さらに本病の発生する可能性が考えられることから、その動向には充分注意する必要があります。本小冊子が海外で問題となっている馬の感染症に対する情報源として、病性鑑定や防疫の一助になれば幸甚です。

平成 24 年 12 月

社団法人 中央畜産会
会長 小里貞利

馬原虫性脊髄脳炎要約

馬の原虫性脊髄脳炎は、海外では Equine Protozoal Myeloencephalitis (EPM) として知られる疾患である。本病は 1970 年代、米国で初めて報告されて以来、北米各地で発生が認められている。本病は住肉胞子虫の一種である *Sarcocystis neurona* (*S. neurona*) の感染によって起こる。

一般に、住肉胞子虫は動物の筋肉組織に寄生する原虫で、その病原性はあまり強くないとされているが、*S. neurona* が馬に感染し、脳・脊髄に病変を形成すると、運動麻痺を主徴とする中枢神経障害を引き起こす。*S. neurona* の生活環は現在まだ完全には明らかにされてはいないが、オポッサム (Opossum、和名：フクロネズミ) を終宿主とし、中間宿主としてアルマジロ、アライグマ、スカンクなどが最も疑われている。すなわち、オポッサムは *S. neurona* の寄生した中間宿主の死体を食べることによって感染し、糞便中に原虫を大量に排出する。そして、この糞便中の *S. neurona* にアルマジロ、アライグマ、スカンクなどが感染することで本原虫の生活環が成立している。馬は、原虫に感染したオポッサムの糞便で汚染された飼料を摂取することにより感染する異常な宿主と考えられている。本病の発生地域は世界的には北米が中心で、なかでも米国では多数の州で発生報告がある。米国以外では中南米での発生報告や米国から英国へ輸入された馬での発生報告がある。本病の疫学調査では、軽種馬における発生が多く、潜伏期は 4 週間から 1 年以上と考えられている。症状は、主に進行性運動失調、痙攣および不全麻痺であるが、抑鬱、旋回運動、咬筋や腰殿筋の萎縮、腰痠などを伴うこともある。病原体が中枢神経系のどの部位に病変を形成するかにより、その程度や症状は異なる。米国では、本病の診断法として免疫学的小および分子生物学的手法がほぼ確立されている。JRA 競走馬総合研究所栃木支所においてもこれら技術を導入し、本病の診断体制の整備に取り組んできた。わが国では *S. neurona* の終宿主と考えられているオポッサムは、自然界に生息していないので、本病の感染サイクルは成立しないと考えられる。しかし、2001 年 7 月には、米国からわが国に輸入された競走馬が JRA 競走馬総合研究所栃木支所によって、本病と診断され、わが国で初めての発生が確認された。国際交流が年々盛んになってきた現在、さらに多くの EPM 症例がわが国でも発生する可能性がある。

馬原虫性脊髄脳炎について

I

発生の歴史と疫学

1. 発生の歴史

馬原虫性脊髄脳炎 (Equine Protozoal Myeloencephalitis: EPM) は、1964年に米国の獣医病理学者J.R.Rooneyによる馬の巣状脊髄炎の報告が最初と考えられている。この症例は北東部の競馬場からケンタッキー州に帰ってきたスタンダードブリードであった。その後、このような病変の症例は米国の多くの地域の馬で発生が確認された。1974年になって、この病変内にトキソプラズマに類似した原虫が病理組織学的検索により確認されたことから、本症はEPMとして認知されるようになった。1991年、J.P.DubeyとS.W.Davisは、これら病変の認められた馬の脊髄から原虫を分離・培養することに成功し、本病の原因が*Sarcocystis*属の原虫であることが明らかにされた。この原虫は神経系の組織で成長することから、彼らは*Sarcocystis neurona* (*S. neurona*) と命名した。1993年、D.E.Granstormらは生前診断法として脳脊髄液中の原虫に対する抗体をウエスタンブロット法で検出する手法を開発した。そして1995年にC.K.Fengerらにより*S. neurona*の終宿主がオポッサム (Opossum、和名：フクロネズミ) であることが明らかにされた。このオポッサムはまた鳥類を中間宿主とする別の住肉胞子虫である*Sarcocystis falcatula* (*S. falcatula*)の終宿主でもあり、それが、*S. neurona*の遺伝子配列と類似していたことから、一時、鳥類が*S. neurona*の中間宿主と疑われた。しかし、その後の詳細な検索により、*S. falcatula*と*S. neurona*は異なる種であることが明らかになった。そしてアライグマ、スカンク、アルマジロなどが*S. neurona*の中間宿主となる可能性の報告がなされるようになった。*S. neurona*の他に原虫によって起

る馬の脳脊髄炎としては*Toxoplasma*症や*Neospora*症が知られているが、通常、*S. neurona*によるものを馬原虫性脊髄脳炎と呼んでいる。

2. 疫学

最初に行われた大規模なEPMの疫学調査は、1990年R.Fayerらによって行われ報告されている。それは、北米の10ヵ所の異なる機関から病理組織学的に本症と診断された364例についての解析である。品種別の発生率はサラブレッド、スタンダードブリード、クォーターホースの順に高かったが、ポニーやその他の品種にもいくらかの発生が認められている。通常は一つの馬群で1頭程度の発生であるが、まれに、一つの牧場で数頭の馬が発症することもある。発症馬の年齢は2ヵ月齢から19歳までで、4歳以下の馬が61.8%を占めていた。発症馬に性別、地理的または季節的な偏りはないようであるが、アメリカ西部の乾燥した地域ではほとんど発生がない。血清中の*S. neurona*に対する抗体の保有率については、オレゴン、オハイオ、コロラドおよびペンシルベニア州で1990年代に行われた大規模な調査があり、オレゴン州とペンシルベニア州では45%、オハイオ州では53.6%、コロラド州では33.6%が抗体を保有し、加齢とともにその保有率は上昇する傾向がみられた。またケンタッキー州では、各牧場において10～30%の抗体陽性率であった。米国以外ではブラジルおよびアルゼンチンの馬の抗体保有率はいずれも約35%であったと報告されている。*S. neurona*の経口摂取により感染して抗体陽性となった馬うちのどれだけかが、何らかの要因でEPMを発症すると考えられている。このEPMの発

症率についての報告は極めて少ないが、ケンタッキー大学の家畜疾病診断センターの調べによれば、1988-1995年までの期間に神経系疾患と診断された馬のうち、本症の占める割合は8～9%であった。またD.E.Granstromは全米の馬全体の0.5～1%が臨床的にEPMであると見積もっている。いっぽう、終宿主と考えられているオポッサムにおけるSarcocystis属の寄生率に関しては、J.P.Dubey(2000)らによる道路上で轢死していたオポッサム44頭についての調査報告があり、*S. farcatula*は47.7%、*S. neurona*は18.1%、そして*S. speeri*は18.1%であったと報告されている。

3. 分布

世界的にみた本病の発生地域は北米が中心で、なかでも米国ではカリフォルニア州や東部諸州（ケンタッキー、フロリダ、イリノイ、ニューヨーク、オハイオ、オクラホマ、オンタリオ、ペンシルベニア、オレゴン、テキサスなど）およびカナダの東部地方に多く発生がみられ（図-1）、これは終宿主であるオポッサムの分布域にほぼ一致する。さらに、中南米（パナマ、ブラジル、アルゼンチンなど）でも発生報告がある。

いっぽう、わが国では、2001年7月にJRAのトレーニングセンターで米国からの輸入馬において最初のEPMが確認された。

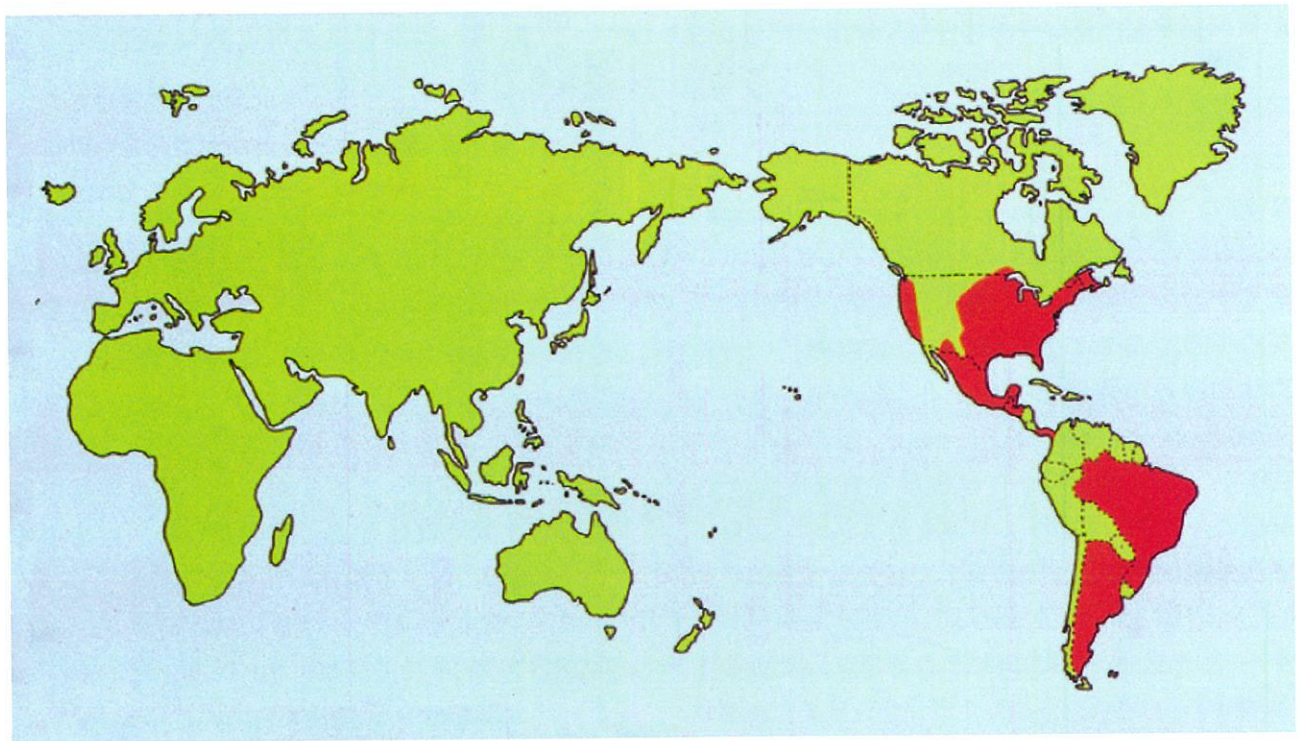


図-1 EPMの発生が確認された地域

II

病原検索

1. 病原体

馬に寄生する*Sarcocystis*属の原虫は、これまで*S. bertrami*、*S. fayeri*、*S. equicanis*および*S. asinus*が知られていた。これらはもっぱら筋肉内にサルコシスト（図-2）を形成するのみで、その病原性はほとんどないと考えられていた。ところが、1964年J.R.Rooneyにより示された巣状脊髄炎病巣から、1974年に原虫様の病原体の存在が確認され、1991年J.P.Dubeyらはこの原虫を*Sarcocystis neurona*と命名した。本原虫はアピコンプレックス門の*Sarcocystis*属の住肉胞子虫の一種で、その特徴としてメロゾイトには極環（polar ring）、円錐体（conoid）、ミクロネーム（microneme）およびペ

クリル下微小管（subpellicular microtubule）などを保有している。ロプトリー（rhoptry）は観察されないといわれている。本属は、*Toxoplasma*属、*Besnoitia*属、*Isospora*属および*Eimeria*属と近縁の原虫である。オポッサム（図-3）の糞便中に排出されるスポロシストは $9.7 \sim 11.4 \times 6.2 \sim 8.4 \mu\text{m}$ で内部にスポロゾイトが観察される（図-4）。また典型的なメロゾイトは $4.2 \sim 4.5 \times 1.2 \sim 1.8 \mu\text{m}$ 、シizontは $11 \sim 12 \times 5 \sim 7 \mu\text{m}$ である（D.D.Bowmanら1992）。本原虫の分離培養はウシ単球株化細胞やウマ皮膚株化細胞などを用いて行われており、それら細胞の内外に紡錘形から三日月状のメロゾイトがロゼット状ないし単独で観察される（図-5）。

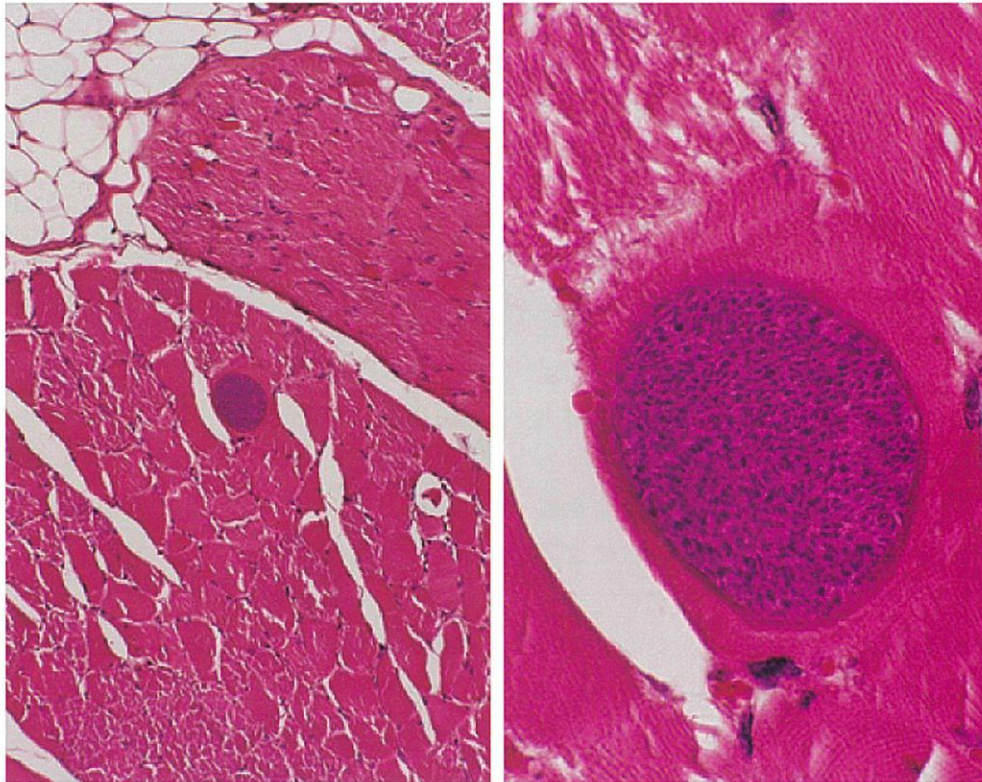


図-2 筋肉内にみられる住肉胞子虫のサルコシスト:内部には多数のブラディゾイトが存在している。



図-3
北米に生息するオポッサム
(*Didelphys virginiana*)

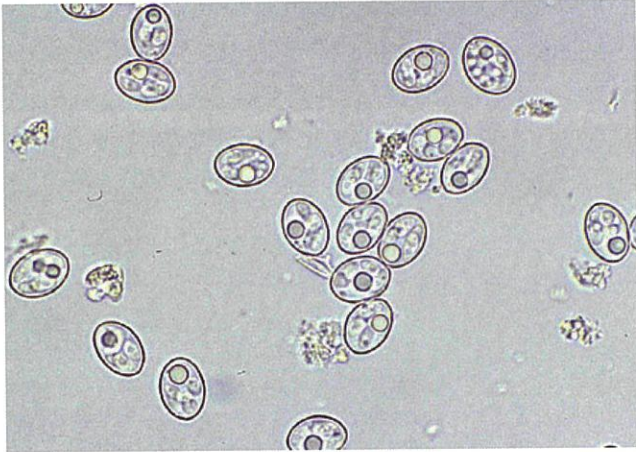


図-4 オポッサムの糞便中の *S. neurona* のスポロシスト

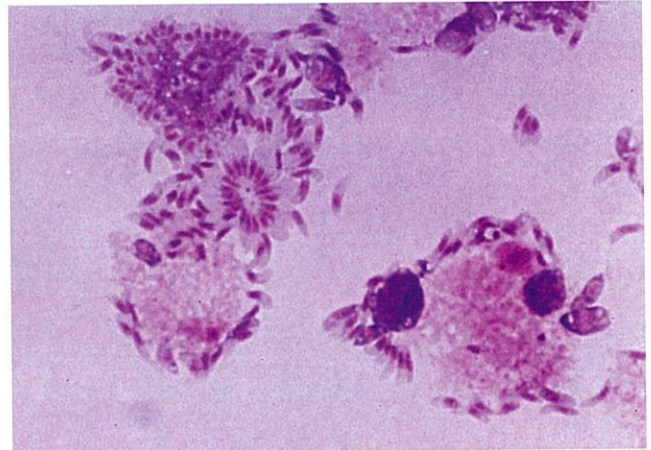


図-5 *S. neurona* のメロゾイト:M617細胞(ウシの単球球化細胞)による組織培養

2. 生活環

住肉胞子虫は一般的に、中間宿主の体内で無性生殖を行い、終宿主の体内では有性生殖を営む。すなわち、オーシスト(胞子)の形成は、終宿主の体内で行われ、胞子形成オーシストは終宿主から排出される。このオーシスト(あるいはスポロシスト)は中間宿主だけに感染し、中間宿主に摂取されると、宿主の組織内の小血管内皮細胞でタキゾイトの分裂が行われる。その後、これらの虫体は筋肉組織内のサルコシスト(sarcocyst)内でブラディゾイトが増殖する。このサルコシストは終宿主だけに感染する。終宿主に食べられたサルコシスト内のブラディゾイトは宿主の腸の粘膜上

皮細胞ですぐにガメトサイトとなり、雌雄のガメートが生じ、これらが合体してザイゴート(接合子)となり、さらにオーシストに変わり、中にスポロシスト(胞子)を形成する。現時点では*S. neurona*の終宿主としてはオポッサム*が、中間宿主としては、アライグマ、スカンク、アルマジロ、ラッコ、ネコが考えられている。すなわち、本原虫の感染により筋肉内にサルコシストが形成されたアライグマ、スカンク、アルマジロ、ラッコなどの中間宿主の死骸を終宿主であるオポッサムが食べ、消化管での有性生殖の後、その糞便中にスポロシストを排泄し、中間宿主が経口摂取する生活環が考えられている。馬は*S. neurona*に感染したオポッサムの糞便により汚染された飼料を摂取すること

* オポッサム(Opossum、和名フクロネズミ、学名*Didelphys virginiana*):大きなドブネズミに似た有袋類で、フクロネズミ科に属する。米国で唯一の有袋類で体長45cm、尾37cmくらい、尾は裸出して鱗があり、物を巻くことができる。綿毛は白色で、密生し、上毛は長く、黒と白が混在する。足の第一指はよく発達して、他の指と向き合い、育児嚢は完全である。米国各地で普通にみられ、都会にも住み、夜出歩いて果実、根、鳥、卵、トカゲなどを捕食するが、ときにニワトリをもとる。尾を使ってたくみに木に登る。春に6~22仔産み、仔はハツカネズミ大になるまで袋の中で育つ。毛皮はビーバーやヌートリアの代用になる。なおオーストラリアでオポッサムと呼ばれるものは全く別のフクロギツネ類である。

により感染するとされ、異常な宿主あるいはDead End Hostと考えられている（図-6）。したがって、本病は感染馬ないしEPM発症馬から他の馬へ直接感染することはないとされている。また妊娠馬に

おいて胎子へ垂直感染したとの報告も見当たらない。しかし、牧場内で一頭でもEPMの発生があれば、同一環境下で飼育されている馬における感染率は高いと考えられる。

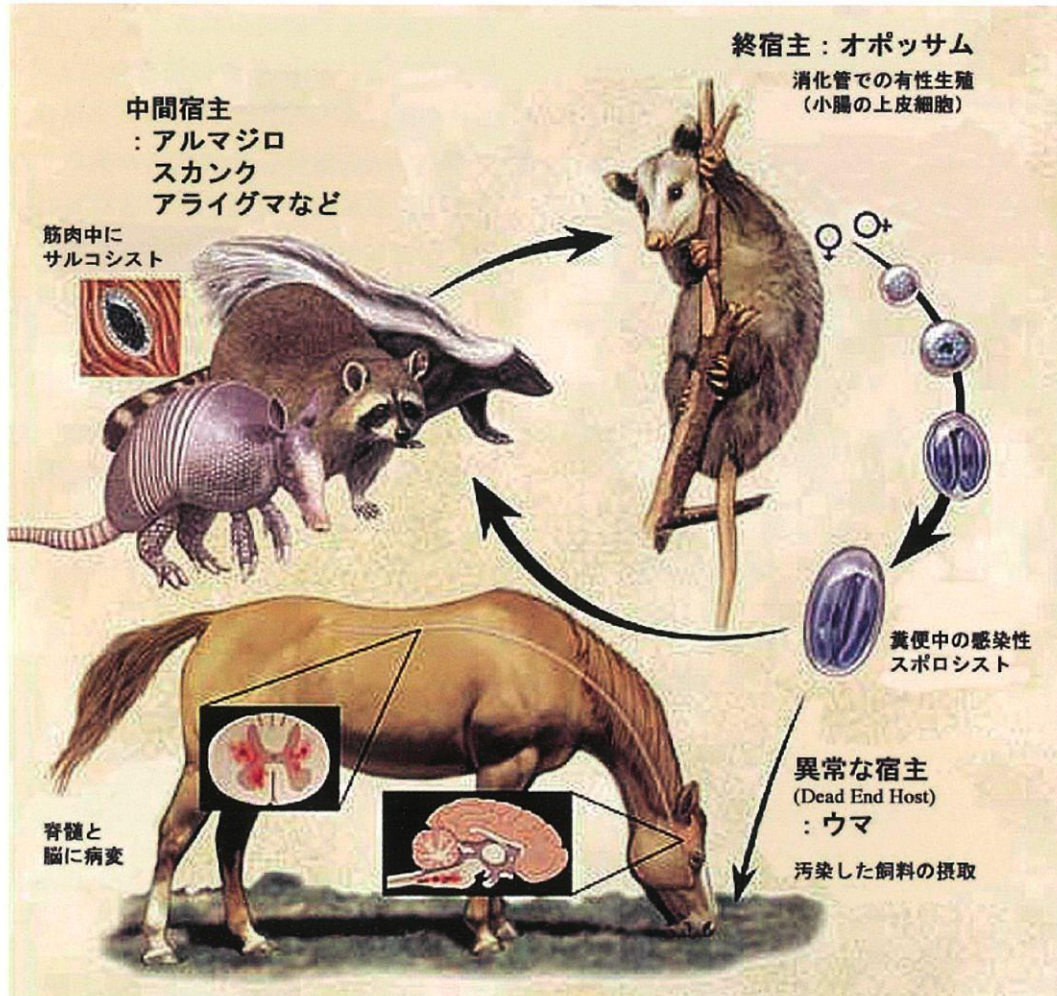


図-6 *S. neurona*の生活環 (Bayer ホームページを一部改変)

3. 感染

本病は米国ではサラブレッドおよび中半血種の若い成馬で多く発生しており、とくに競走馬で頻繁にみられる。重種馬や野生馬ではあまり発生がないようである。潜伏期は、4週間程度の短い期間から1.5年位の長期間にわたるかもしれないと考えられている。この病原体の自然界における終宿主はオポッサムであることが知られているが、自然界における中間宿主はアライグマ、スカンク、アルマジロ、ラッコなどである。また、ネコも中間

宿主になる可能性がある。馬はオポッサムの糞便とともに排泄されたスポロシストを経口的に摂取することにより感染し、EPMの発症は原虫が中枢神経系に侵入して病変を形成した場合に認められる。なお*S. neurona*に感染した馬が、EPMを発症する機序については全く不明である。しかし、γインターフェロンノックアウトマウスに*S. neurona*のスポロシストを投与するとEPMと類似の脳脊髄炎を再現できることが報告されていることから、何らかの感染防御機能の低下が関係しているのかもしれない。

Ⅲ 臨床

1. 臨床症状

一般的な住肉胞子虫はヒトや動物の筋肉内に寄生し、ほとんど障害を起こさない。しかし*S. neurona*は何らかの機序あるいは侵入経路により馬の中枢神経系に病変を形成し、その障害に起因した臨床症状を示す。EPMの神経症状は、原虫による中枢神経の直接的な破壊に起因するものと、原虫に対する生体側の炎症反応によるものがあり、EPM発症馬の臨床症状の種類やその程度はさまざまである。これは、中枢神経系の障害の程度・領域・範囲が馬によって異なっていることによる。最も一般的な症状は、後躯の非対称性の運動失調症である。運動失調の程度はよく観察しないとわから

ないような軽度な跛行から、蹄を引きずるような重度な跛行まで認められる(図-7)。運動失調がひどくなると、起立不能に陥る場合もある。また、体表の変化として、左右に同じく存在する筋肉の片方のみ(非対称性)に筋肉の萎縮がしばしば見られる。これは、脊髄における病巣はかなり限局した領域に形成される傾向があるため、その部位から出発した末梢神経が分布する体幹や四肢の筋肉に萎縮(神経原性筋萎縮)を起こすためと考えられている(図-8、-9)。この他の症状として、口唇の弛緩、耳介の麻痺、眼球の異常な動き、視覚異常、咀嚼・嚥下困難、部分的な発汗、斜頸、痙攣、挙動の変化、運動許容量の減退などが報告されている。EPM発症馬の流産も報告されているが、



図-7 EPM発症馬にみられた後肢の跛行

*S. neurona*が直接の原因となっているのかは明白ではない。EPMと似たような症状を引き起こす病気として、中枢神経に影響を与えるような外傷、カビの生えたトウモロコシによる中毒、脳脊髄線虫症（セタリア症、ハプロネーマ症など）、狂犬病、細菌性ないしウイルス性脳脊髄炎（日本脳炎、ウエストナイル脳炎、ウマヘルペスウイルス1型による馬鼻肺炎の神経型など）、破傷風、ボツリヌス中毒、頸椎の先天異常（wobbler syndrome）、腫瘍、多発性筋炎などがあり、これらの病気との類症鑑別が必要である。

2. 臨床生化学的検査

EPM発症馬の血液の血球成分および生化学検査値は正常範囲である。しかし、脊髄液中のアルブミン濃度およびIgG濃度は上昇する場合がある。



図-8 EPM発症馬にみられた腰・臀筋の非対称性の萎縮
(米国農務省研究所 J.P.Dubey 博士提供)



図-9 EPM発症馬にみられた咬筋の萎縮
(米国農務省研究所 J.P.Dubey 博士提供)

IV

病理学的所見

1. 肉眼所見

本病に罹患し中枢神経障害を示す馬では、病変は脊髄および脳にみられる（図10）。肉眼的に病変は、脳や脊髄の断面において、急性例では限局性の出血巣が散在性に認められ、慢性例では限局性の小さな帯黄褐色病巣が認められる。また、脳脊髄液はしばしば混濁し、増量している。肉眼的に萎縮した骨格筋は、ほとんど皮下の結合組織のみを残すだけの顕著な萎縮を示す場合があり、同部に分布する末梢神経の出発部位である中枢神経組

織に限局性ないし片側性に病変が多くの場合形成されている（神経原性筋萎縮）。

EPMの中枢神経系における病変の好発部位は不定であるが、臨床症状からある程度推測できることもある。またEPMの病巣の大きさや範囲、色調も症例により様々で、肉眼的に中枢神経組織に形成された病巣の存在を識別・判断することが極めて困難な場合も少なくない。従って、本病が疑われる症例の解剖では、全ての中枢神経組織（脳および脊髄全長）を採取して、検索を行わなければならないこともある。

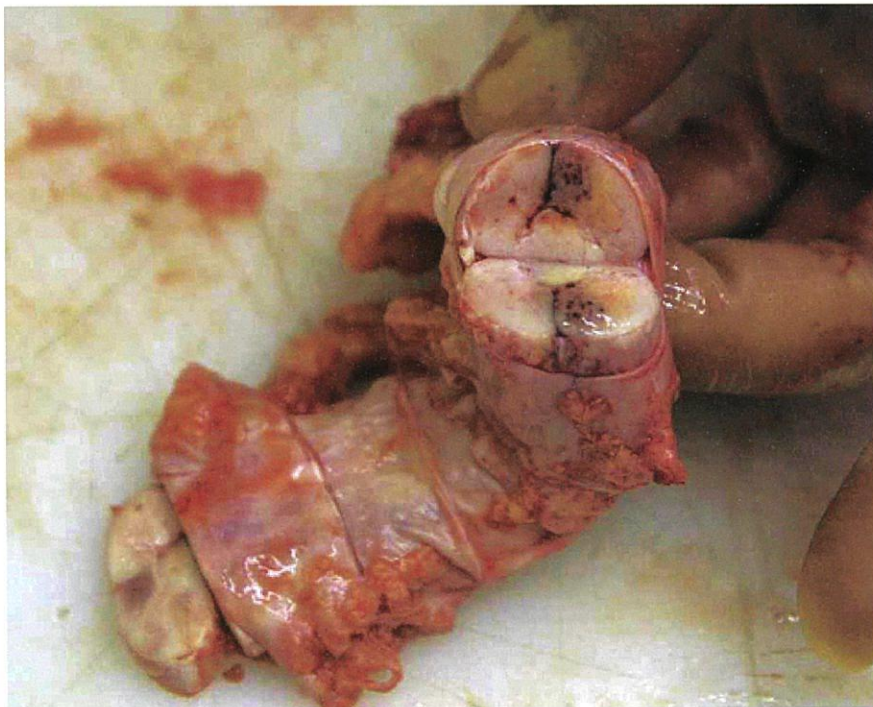


図-10 EPM発症馬の頸髄にみられた出血

2. 組織学的所見

中枢神経系にみられるEPMの病変は、通常の場合、散在性の非化膿性脊髄脳炎で、出血と巨細胞および好酸球を伴った肉芽腫性ないし壊死性脊髄脳炎である。様々なステージの原虫がマクロファージ、多核巨細胞、時には神経細胞などの細胞質内あるいは

細胞外に集合あるいは単独で観察される。また、これら細胞質内でロゼットを形成することもある(図11)。壊死巣やその周辺部では、単核球を主体とする囲管性細胞浸潤もみられる(図12)。*S. neurona*以外の原虫による脳脊髄炎としては*Toxoplasma gondii*や*Neospora hughesi*によるものも知られており、それらとの類症鑑別が重要である。

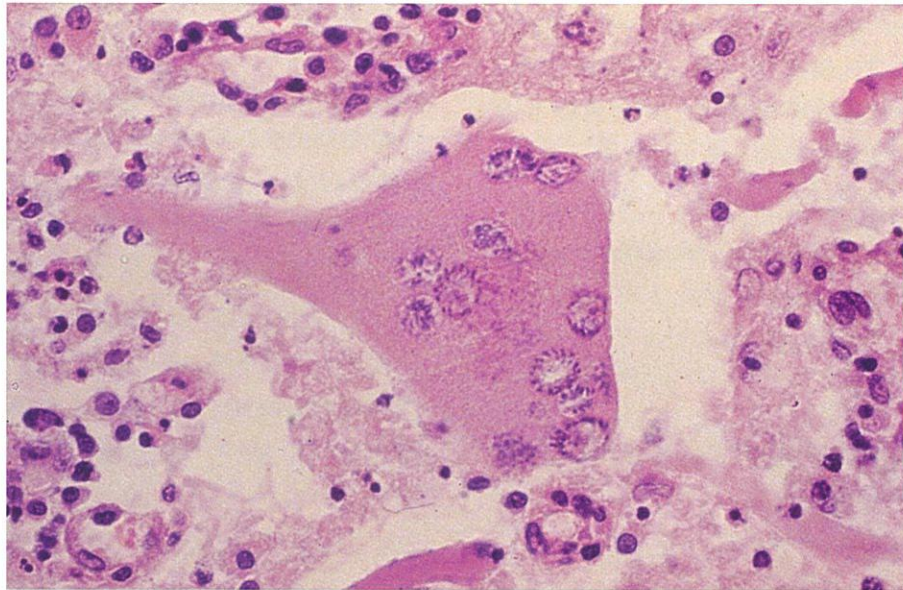


図-11 神経細胞内での*S. neurona*のメロゾイト:ロゼットの形成がみられる(HE染色)
(米国農務省研究所 J.P.Dubey博士提供)

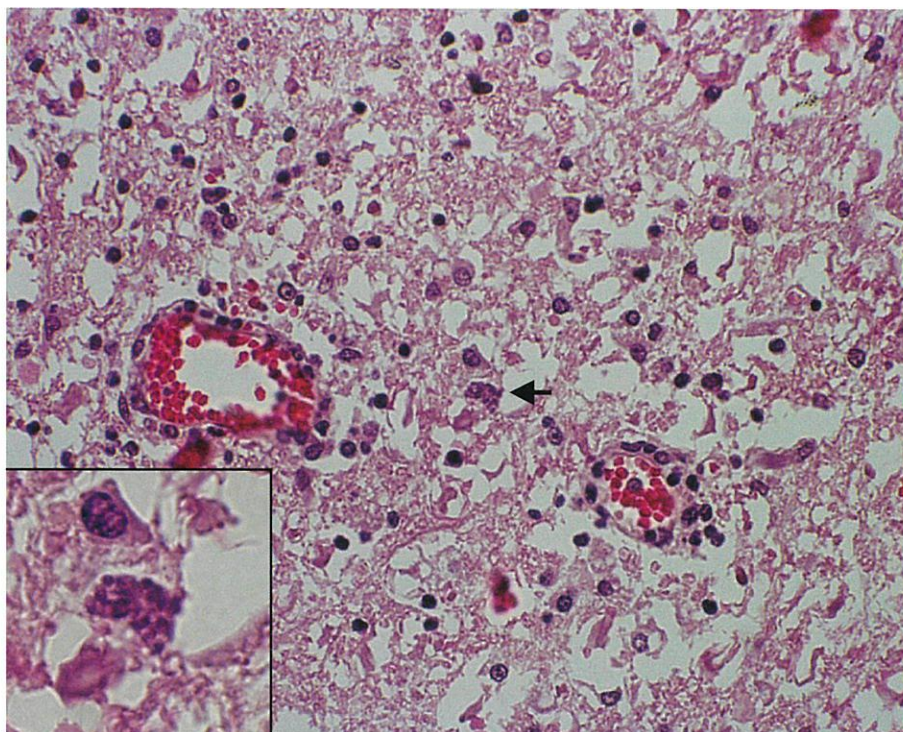


図-12 血管周囲への細胞浸潤とシジント(矢印)

1. 臨床診断

臨床的には中枢神経系の障害を原因とするさまざまな神経症状を呈する。しかし、この臨床症状は *S. neurona* による脳や脊髄の障害の部位と程度によりさまざまである。さらに、ウイルス性脳炎やウマヘルペスウイルス感染症、狂犬病、脳脊髄線虫症、その他細菌性の脳脊髄炎、破傷風、中枢神経系の腫瘍や膿瘍などでも類似の症状を示すことがある。また、感染しても症状を示さない（不顕性感染）例も存在するために、臨床症状のみからEPMと診断することは困難な場合が多い。

2. 免疫学的診断

血清および脳脊髄液中の、*S. neurona* に特異的な蛋白質に対する抗体をウエスタンブロット法で検出する免疫学的診断法が一般的に用いられる。しかし、アメリカの中西部では約半数近い馬がEPMに感染しており、血清中におけるこれら抗体の存在は、その馬がこれまでに *S. neurona* に感染したことを示す証拠でしかない。一方、脳脊髄液中の抗

体はEPMの症状と深い関係にあることが証明されている。したがって、ウエスタンブロット法を用いて脳脊髄液中の抗体を検出する方法は、EPMの診断法として必須である。なお、通常では血清中の抗体は脳脊髄液中には存在しないが、血液—脳関門に何らかの障害がある場合は、脳脊髄液中に血清中の抗体が流入し、本病とは拘わりなく陽性の結果を示すことがある。

EPMにおいて診断的価値の高い脳脊髄液の病馬からの採取は、頸部あるいは腰仙部から実施可能である。頸部からの精髄液採取は全身麻酔が必要であるが、腰仙部からの採取では鎮静と局所麻酔により立位で実施される（図13）。脊髄硬膜下腔へ長い脊髄穿刺針を刺入することは、馬にとって脊髄損傷の大きなリスクを伴うと考えられがちであるが、実際には経験を積んだ術者が手順を踏んで正しく実施すれば問題なく安全に実施できる。JRA競走馬総合研究所ではこれまで多くの実験馬で腰仙部からの脊髄液採取を実施してきているが、脊髄損傷による運動機能障害を発症した馬はいない。以下に我々が行っている手法を記述する。



図-13 腰仙部からの脊髄液の採取

2-1 脊椎腰仙部からの髄液の採取方法

- ①馬を枡場に入れる。
- ②剃毛：左右の寛結節後端を結ぶ線と脊椎との交点、つまり最後位腰椎棘突起と仙骨棘突起の間を中心として、約15×10cmの領域。
- ③消毒：ヒビスクラブとヒビテンで充分洗浄し、イソジンとアルコールで3回消毒する。
- ④鎮静：500kgの馬でスタドール4アンブル、キシラジン8mlの混合液を静注。
- ⑤局所麻酔：2%キシロカインを21Gカテラン針で②の中心（最後位腰椎棘突起と仙骨棘突起の中間）の皮下1cmに1mlおよび深部に4ml注射。
- ⑥手術用手袋、18G注射針（切皮用）、脊髄穿刺針（18G、長さ18cm）、無菌ガーゼ3枚、5mlシリンジなどを無菌的に準備する。
- ⑦鼻ネジ保定し、②の中心に脊髄穿刺針の刺入部を18G注射針で切皮する。
- ⑧脊髄穿刺針の先端を深さ14cm位まで（皮膚の上部に穿刺針が4cm位残るまで）一気に刺入し、さらにゆっくりと1～2cm進めると硬膜を貫通し、脊髄硬膜下腔に針先が入る（硬膜貫通時に馬が動揺することがある）。
- ⑨内套を抜き、5mlシリンジでゆっくり吸引。数本採取する（血液が全く混入していない髄液が必要）。
- ⑩穿刺針を抜いて終了。
- ⑪髄液中に血球が混在していないことを血球計算盤を用いて確認し、ウエスタンブロットに用いる。

2-2 ウエスタンブロット法

1) 電気泳動

- SDSポリアクリルアミドゲルのサンプルウェルに、それぞれメロゾイト抗原*あるいはマーカーを入れる。
- 電気泳動。

2) 転写

- 電気泳動が終了したゲルをとりだして、ニトロセルロース膜に転写。

3) ブロッキング

- ニトロセルロース膜をブロックエースでブロッキング（1時間）。

- 洗浄（PBS-T;0.05%Tween20加PBS）5分×2。
- ミニプロッター装置（28SL型）にニトロセルロース膜をセット。

4) 抗体反応

- 10%ブロックエース加PBSで血清を10倍に希釈（髄液は2倍希釈）。
- ミニプロッター装置のサンプル注入穴に血清あるいは髄液80μl入れ、90分間反応。
- アスピレーターで各穴からサンプルを吸引・廃棄後、PBS-Tでフィルターを洗浄。
- ミニプロッター装置からフィルターを取り出し、PBS-Tで洗浄5分×3。
- ビオチン標識抗ウマIgG(2次抗体)と30分反応。
- PBS-Tで洗浄5分×3。
- アビジン-ビオチン標識ペルオキシダーゼ複合体（VECTASTAIN Elite、ABCキット）を30分反応。
- PBS-Tで洗浄5分×3。

5) 発色

- HRP発色基質（HRP Conjugate Substrateキット、BIO-RAD）を入れ発色。
- 蒸留水で発色停止。
- 特異バンド（14.5kDa、13kDa、7kDa）の確認（図14）。

*メロゾイト抗原の作製法はGranstromら（1993）の文献参照：J.Vet.Diagn.Invest. 5, 88-90

2-3 ELISA 法

米国ではメロゾイトの表面抗原としてSnSAG-1が2003年にEllisonらによってクローニングされ、血清や髄液におけるELISAに応用されている。さらに近年ではSnSAG2、SnSAG3、SnSAG4に対するELISAも開発されている。

3. 病原体の分離培養

- 病理解剖により脊髄あるいは脳組織を無菌的に採取し、少量のRPMI 1640中で細切。
- M617細胞（ウシの単球株化細胞）を80%コンフルエントに培養し、培養液を除去したのちに細切した組織液を均一に広げ、37℃で1時間静置する。

- 10%ウシ胎仔血清加RPMI 1640を静かに加え37℃、5%CO₂で培養する。
- 2～3日おきに培養液を交換し、虫体の有無を倒立顕微鏡およびスメアー標本のギムザ染色で観察する（図15）。

4. PCR法

近年、PCR法も診断に利用されるようになっていいる。この方法は、脳脊髄液やその他の組織中に存在する*S. neurona*の遺伝子を検出する方法である。症状が典型的ではない場合や、治療の効果を検討する場合に使われている。治療によって症状が回復した

場合は、脳脊髄液中の抗体は消失し、PCR法によっても病原体の遺伝子は検出されなくなる。

5. 病理学的検索

病理学的診断は、罹患者の死後、病理解剖を行い、脳や脊髄など中枢神経系を組織学的に検索し、病原体そのもの、あるいはEPMに特徴的な所見を検索する。またこの脊髄あるいは脳組織の組織切片を用いて、他の病原体との区別をする目的で免疫組織化学染色を行う（図15）。*S. neurona*のポリクローナル抗体を用いた場合は、他の住肉胞子虫との交差反応に注意する必要がある。

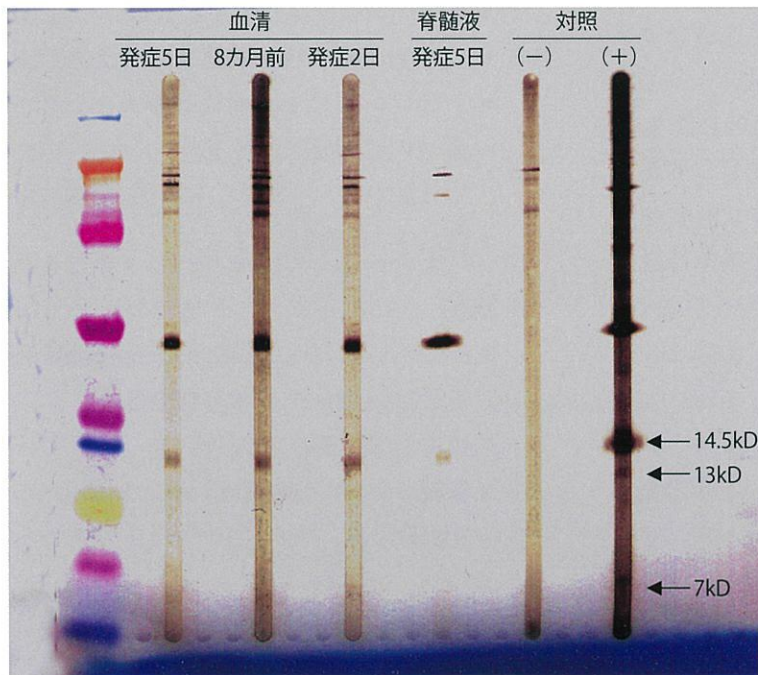


図-14
本邦初発のEPM症例のウエスタンブロット：血清および脊髄液に*S. neurona*に特異的なバンド（14.5kD, 13kD, 7kD）がみられる

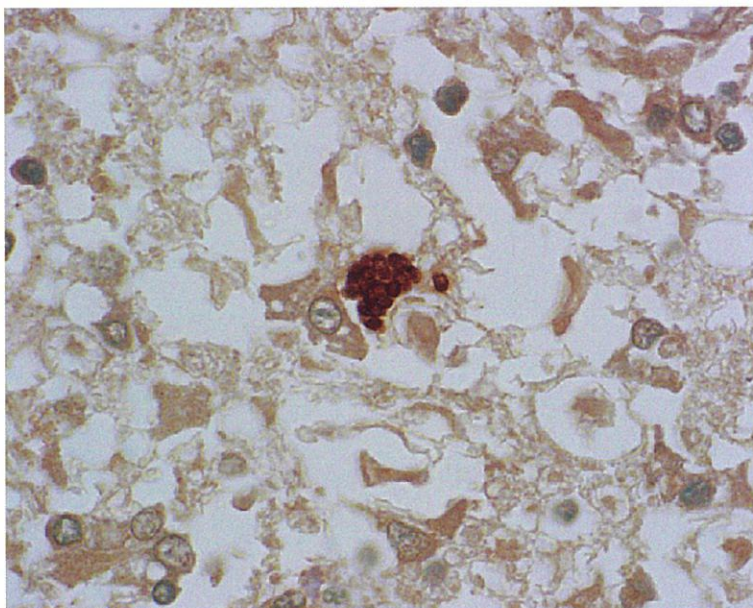


図-15
抗*S. neurona*の抗体を用いた免疫組織化学染色：シズントが陽性

VI

治療と予防

1. 治療

米国で行われている治療法を以下に記載する。原則的かつ安価な治療法として、SulfonamideとPyrimethamineが用いられる。治療プログラムは大学や診療所によって若干異なっているが、ミズーリー大学の治療プログラムは以下のようである。

- Trimethoprim・Sulfadiazine (または Sulfamethoxazole) の配合剤を15～25mg/kgBWで12時間おきに少なくとも12週間経口投与する。ジヒドロ葉酸還元酵素阻害剤とスルホンアミド系抗菌剤からなる配合剤は、微生物による葉酸の合成・利用における2つの連続的なステップを阻害する。Sulfamethoxazoleのほうが、Sulfadiazineよりいくらか安価である。
- Pyrimethamineは葉酸拮抗薬で、有効な抗マラリア薬であるが、これを1.0 mg/kgBWで24時間毎に12週間以上経口投与する。
- ビタミンE 5,000単位を12時間おきに経口投与する。

症状によっては、DimethylsulfoxideやFlunixinmeglumineなどの抗炎症例を用いてもよい。特に急性期には抗炎症療法を行う。しかし、どうしても必要でない限りステロイドは用いてはならない。また、妊娠馬には葉酸(20～40mg/day)を併用してもよい。治療は少なくとも12週間は続けなくてはならない。理想的には、脳脊髄液中の抗体がウエスタンプロット法で陰性になるまで投与しなくてはならない。神経症状が消失しても、さらに4週間の治療が望まれる。約60%の馬が治療により良い反応を示すが、ほとんど正常な状態に回復することは無い。治療開始後4～6週間経っても効果が現れない時には、もはや回復は望めない。罹患馬に対しては休息やストレスの軽減をはかる必要がある。治療薬による副作用としては貧血、白血球減少症、大腸炎などの発生が報告されている。

また、他種動物のкокシジウム症に使用されてきたDiclazuril(Clinacox) やToltrazuril(Baycox)なども治療に用いられている。しかしこれらはEPMの治療薬として米国では認可されていない。

- Diclazuril(Clinacox) : 5～10mg/kgBW/dayを21日間から28日間混飼経口投与。
- Toltrazuril(Baycox) : 10mg/kgBW/dayを28日間あるいは5mg/kgBW/dayを少なくとも45日間、経口投与。

米国食品医薬品局(FDA)に認可されているEPM治療薬としては、細菌、原虫および腸内蠕虫などに効果のあるNitazoxanide(NTZ)がある。25mg/kgBW/dayを5日間とその後50mg/kgBW/dayを23日間以上、経口投与する。

さらにToltrazurilの改良により開発されたPonazuril(Marquis)は米国で最も使用されているEPM治療薬で、より安全で効果的な作用を有し、FDAの認可も受けている。本薬剤はペースト状で専用のシリンジに充填され、正確な量を馬に経口投与できる。5mg/kgBW/dayを28日間投与する。

2. 予防

わが国には、*S. neurona*の終宿主であるオポッサムは生息しておらず、また馬から馬への感染も起らないことから、わが国でのEPMの発生は、もっぱら海外で感染した輸入馬である。米国では以下のような予防策が推奨されている。第一の予防策として、EPM終宿主であるオポッサムの糞便内の*S. neurona*のオーシスト(スポロシスト)が馬に感染することで引き起こされることから、原虫に汚染された飼料や飲料水を馬に与えないことである。そのため、*S. neurona*の生活環に関連する野生動物は、牧場の厩舎や放牧地に近づけないことが重要である。オポッサムは、北米の山岳地帯や寒冷地帯を除いてほぼ全域に棲息し、牧場の周辺や牧場内に10～50エーカーの縄張りを持っている。従っ

て、多くの牧場で馬はオポッサムと接触する機会が頻繁にあることから馬の飼い葉桶や水桶を常に清潔に保ち、オポッサムの糞便が混入しないようにする。また、飼料置場の管理を厳重にして、オポッサムが飼料置場を荒らさないようにすることが重要である。さらに、オポッサムはヒトの食べ残したフルーツ類や残飯も餌にするため、牧場内で屋外に残飯を無造作に放置したり、食料となるような植物を牧場内に栽培してはならない。第二の予防策として、牧場からオポッサムを隔離することである。オポッサムはねずみ取りなどの生け捕り用の罠で簡単に捕まえることが出来る。さらに、

放牧地のフェンスの外側に電気フェンスを設けることによってオポッサムを締め出すことが出来る。ただし、広大な牧場を囲むフェンスを設けるためには、多額の資金が必要である。また、イヌやネコを飼うことで、オポッサムが牧場に侵入することをある程度は防止出来る。第三の予防策として、*S. neurona* に対するワクチンの接種が考えられ、現在、米国の一部で使用されているようであるが、その効果については疑問視されている。また、ワクチン抗体の上昇は診断や治療効果判定のよりどころとしている特異抗体との区別が困難となる場合もあることから、その使用に際しては注意を要する。

おわりに

馬原虫性脊髄脳炎 (EPM) は、わが国には本来存在しない感染性疾患ですが、近年の競走馬の輸入増加に伴い、発生国からの輸入馬における発症が危惧され、一刻も早い本病の診断体制の確立が望まれていました。日本中央競馬会競走馬総合研究所では、本小冊子の作成に際しても多数の貴重な写真を提供していただいた米国農務省研究所の J.P.Dubey 博士や Neogen Co. の C.K.Fenger 博士の協力により、ウエスタンプロット法の導入と免疫組織化学に必須の抗 *S. neurona* 抗体の作製に取り組み、米国と同等の診断技術を確立しました。そして、2001 年 7 月にはわが国で最初の EPM 症例を、これら検査手法により確定診断しました。EPM は馬から馬へは伝染しないとされ、またわが国の自然界には終宿主であるオポッサムも生息していないことから、わが国では本病の感染環は形成されないものと考えられますが、*S. neurona* の終宿主や中間宿主となりうる野生動物種については未だ研究途上にあり、本病の発生には細心の注意を払う必要があるものと思われま

す。また、日本中央競馬会競走馬総合研究所栃木支所における EPM の診断体制は、招聘研究として J.P.Dubey 博士や C.K.Fenger 博士の多大な協力と指導により確立されました。両氏に心より御礼申し上げます。なお、この招聘研究は馬事関係諸氏に多大な配慮をいただき、栃木支所の多くの方々の協力のもとでなされたものです。

日本中央競馬会
競走馬総合研究所
片山 芳也
和田 隆一
吉原 豊彦

刊行の馬感染症シリーズ

1. 馬伝染性貧血診断のための寒天ゲル内沈降反応の術式	昭和 51 年
2. 馬伝染性子宮炎	昭和 55 年
3. 馬ウイルス性動脈炎	昭和 56 年
4. 馬のサルモネラ症	昭和 56 年
5. ベネズエラ馬脳炎	昭和 57 年
6. アフリカ馬疫	昭和 58 年
7. 馬鼻肺炎	昭和 59 年
8. 馬鼻肺炎ウイルス感染症のための寒天ゲル内沈降反応の術式と応用	昭和 59 年
9. 馬伝染性貧血診断のための寒天ゲル内沈降反応の術式(第2版)	昭和 59 年
10. 馬のピロプラズマ病	昭和 61 年
11. 馬の水胞性口炎	昭和 62 年
12. 馬の寄生虫病	昭和 63 年
13. 馬ウイルス性動脈炎(第2版)	平成 元年
14. 馬のポトマック熱	平成 2 年
15. 消毒法 Q & A	平成 3 年
16. 馬トリパノゾーマ病	平成 5 年
17. 馬インフルエンザ	平成 6 年
18. 馬の感染症	平成 6 年
19. 腺疫	平成 8 年
20. 子馬のロドコッカス感染症	平成 8 年
21. 馬鼻肺炎(第2版)	平成 9 年
22. 馬伝染性子宮炎(第2版)	平成 9 年
23. 馬原虫性脊髄脳炎	平成 10 年
24. 馬パラチフス	平成 10 年
25. 馬の日本脳炎	平成 10 年
26. 馬ピロプラズマ病(第2版)	平成 11 年
27. 馬のゲタウイルス感染症	平成 11 年
28. 馬ロタウイルス感染症	平成 12 年
29. 馬ウイルス性動脈炎(第2版・補訂版)	平成 12 年
30. 馬伝染性貧血の診断術式(第3版)	平成 13 年
31. 馬の水胞性口炎(第2版)	平成 13 年
32. 馬の感染症(第2版)	平成 13 年
33. 腺疫(第2版)	平成 14 年
34. 馬原虫性脊髄脳炎(第2版)	平成 15 年
35. 馬のウエストナイルウイルス感染症	平成 15 年
36. 馬の真菌症	平成 16 年
37. 馬の感染症(第3版)	平成 17 年
38. 馬インフルエンザ(第2版)	平成 17 年
39. 馬鼻肺炎(第3版)	平成 19 年
40. 馬パラチフス(第2版)	平成 20 年
41. 消毒法 Q & A(第1版・補訂版)	平成 20 年
42. 馬ウイルス性動脈炎(第3版)	平成 21 年
43. 馬伝染性貧血の診断術式(第3版・補訂版)	平成 22 年
44. 馬の寄生虫病(第1版・補訂版)	平成 22 年
45. アフリカ馬疫(第2版)	平成 23 年
46. 馬のゲタウイルス感染症(第1版・補訂版)	平成 23 年
47. 腺疫(第3版)	平成 23 年
48. 馬ピロプラズマ病(第3版)	平成 24 年
49. 馬インフルエンザ(第3版)	平成 24 年
50. 消毒法 Q & A	平成 24 年
51. 馬原虫性脊髄脳炎(第2版・補訂版)	平成 24 年

平成10年3月 第1版第1刷発行

平成15年3月 第2版第1刷発行

平成24年12月 第2版第2刷発行

社団法人 中央畜産会

〒101-0021 東京都千代田区外神田 2-16-2

第2 ディーアイシービル 9階

TEL. 03 (6206) 0832