

原 著

山羊のロドコッカス・エクイ感染症国内初症例

中尾聡子^{1)†} 荒木美穂²⁾ 津波 修³⁾ 高木和香子²⁾ 加藤貴誉湖⁴⁾
 稗田 優⁴⁾ 高井伸二⁴⁾ 三上 修⁵⁾

- 1) 沖縄県北部家畜保健衛生所 (〒905-0012 名護市名護4606-4)
- 2) 沖縄県畜産課 (〒900-8570 那覇市泉崎1-2-2)
- 3) 沖縄県家畜改良センター (〒905-1503 国頭郡国頭村安田1477)
- 4) 北里大学獣医学部 (〒034-8628 十和田市東23番町35-1)
- 5) 国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究所
(〒305-0856 つくば市観音台3-1-5)

(2015年4月1日受付・2015年7月24日受理)

要 約

沖縄本島の肉用繁殖山羊農場において、ボアー種1頭が食欲不振及び起立不能を呈し死亡した。剖検では、腸間膜及び肝臓リンパ節の腫大が認められた。組織学的には、潰瘍形成を伴う肉芽腫性回腸炎、腸間膜リンパ節及び結腸リンパ節の壊死性肉芽腫性リンパ節炎がみられた。同組織のグラム染色では、病変部のおもにマクロファージ内にグラム陽性菌がみられ、抗*Rhodococcus (R.) equi* 兔血清を用いた免疫組織化学的染色では、同マクロファージ内に陽性反応が認められた。細菌学的には、肝臓、脾臓、肺、腸管及び腸間膜リンパ節から*R. equi* が分離され、病原性プラスミドの毒力関連抗原の遺伝子検索の結果、すべて無毒株に分類された。以上のことから、本症例はロドコッカス・エクイ感染症と診断された。本症例は山羊でロドコッカス・エクイ感染症と診断された国内初の報告である。

——キーワード：無毒株、山羊、壊死性肉芽腫性リンパ節炎、*Rhodococcus equi*、ロドコッカス・エクイ感染症。

-----日獣会誌 68, 751~755 (2015)

Rhodococcus (R.) equi は、馬や豚などの家畜の飼育環境土壌に広く生息している土壌細菌で、1~3カ月齢の仔馬に致死率の高い化膿性肺炎や肺炎及び化膿性腸間膜リンパ節炎を主徴とするロドコッカス・エクイ感染症を引き起こす [1]。本菌は保有する病原性プラスミドの種類により、強毒株、中等度毒力株、無毒株の3種類に分けられ、強毒株のみが仔馬にロドコッカス・エクイ感染症を引き起こすとされているが、まれに無毒株による感染症の報告もみられる [2]。また、人においては AIDS 患者における日和見感染症としての報告がされている [3, 4]。一方、本菌が山羊の感染症に関与する例はまれで、世界的には数例の報告があるが [5-10]、わが国ではこれまでに報告がない。今回、われわれは日本で初めて山羊から *R. equi* を分離し、毒力検査の結果、無毒株であることを確認した。さらに、発生農場及び沖

縄県内の山羊においてロドコッカス・エクイ感染症の疫学調査を行ったのでその概要を報告する。

材料及び方法

発生概要：発生農場は沖縄県北部地域の肉用山羊繁殖農場で雄山羊8頭、雌山羊20頭、子山羊3頭、肥育山羊22頭の合計53頭を飼養していた。導入歴としては、2010年1月に当該山羊を含むボアー種12頭をニュージーランドから輸入し、さらに2013年4月に肥育用に22頭を県内2農場から導入していた。当該山羊はニュージーランドからの輸入時に動物検疫所本所にて、ブルセラ病、結核病、ヨーネ病、マエディ・ビスナ、山羊関節炎・脳脊髄炎及び住血微生物についてすべて陰性を確認後、農場内に導入された。2013年10月に5歳齢となった当該雄山羊1頭が食欲不振と消瘦を呈し、その後12

† 連絡責任者：中尾聡子（沖縄県北部家畜保健衛生所）

〒905-0012 名護市名護4606-4 ☎0980-52-2939 FAX0980-53-3311
E-mail: oohashsa@pref.okinawa.lg.jp

月に食欲廃絶、起立不能となったため、予後不良と判断し病性鑑定を実施した。同山羊の体重は70kgから50kgにまで減少し、腹腔内には20cm大の腫瘤が触知された。当該山羊は未治療で外部寄生虫対策としてイベルメクチン製剤（アイボメック®トピカル、メリアル・ジャパン(株)、東京）のみが使用されていた。

血液検査：血液検査は自動血球計数器（MEK-6258セルタックα、日本光電工業(株)、東京）を用いて実施した。血清の生化学的検査は生化学自動分析装置（富士ドライケム7000V、富士フィルムメディカル(株)、東京）を用いて実施した。

病理組織学的検査：剖検後、リンパ節及び各臓器を10%中性緩衝ホルマリン液で固定した後、常法に従いパラフィン切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン（HE）染色を行い鏡検した。回腸リンパ節については、グラム染色、チール・ネルゼン染色、ギムザ染色、過ヨウ素酸シッフ（PAS）反応及び抗*R. equi*ATCC33701（強毒株）兔血清（1：5000倍希釈）を用いた免疫組織化学的染色を行った [11]。

細菌学的検査：一般細菌は主要臓器、十二指腸、空腸、回腸、盲腸、結腸及び腸間膜リンパ節を5%羊血液寒天培地、チョコレート寒天培地、変法GAM寒天培地（以上、日水製薬(株)、東京）に接種し、37℃で48時間、CO₂及び嫌気条件下で培養した。分離株はグラム染色、カタラーゼ試験及びオキシダーゼ試験を行い、簡易同定キット（API CORYNE 及び API20 STREP、シスメックス・ビオメリユール(株)、東京）により同定を試みた。

同定のためには、16S rRNAをコードする遺伝子のシーケンスを行った。肝臓、脾臓及び肺から分離された菌を核酸自動抽出機（Magtration System 12GC Plus、プレジョン・システム・サイエンス(株)、千葉）を用いてDNA抽出した後、16S rRNA遺伝子の一部をPCRにて増幅した。プライマーには（Pag313：5'hCACACTGG GACTGAGACACGGh3'）及び（Pag1128：5'hAAGG ATAAGGGTTGCGTCTCGh3'）を用いた。増幅産物の650bpについて塩基配列を決定した。得られた配列の相同解析はNational Center for Biotechnology Information (NCBI) ウェブサイトのBLASTサーチで実施した。

マイコプラズマの分離は、主要臓器を変法Hayflick寒天培地に接種し、37℃で5日間、CO₂条件下で培養した。

ヨーネ菌の検査は、空腸、回腸、直腸及び直腸便をヨーネ菌核酸抽出試薬（ヨーネスピン®、ファスマック(株)、神奈川）を用いて核酸抽出を行い、リアルタイムPCR試薬（ヨーネジーン・KS、共立製薬(株)、東京）を用いて、リアルタイムPCR装置（ライトサイクラー®96、ロッシュ・ダイアグノスティック、東京）によりヨーネ菌遺伝子を定量した。

薬剤感受性試験：肝臓、脾臓、肺及び盲腸から分離された4株の*R. equi*について、一濃度ディスク拡散法により、アンピシリン（ABPC）、アモキシシリン（AMPC）、ベンジルペニシリン（PCG）、オキシテトラサイクリン（OTC）、カナマイシン（KM）、ゲンタマイシン（GM）、エリスロマイシン（EM）、セファゾリン（CEZ）、セフォタキシム（CTX）、オフロキサシン（OFLX）（以上、日本ベクトンディッキンソン(株)、福島）及びエンロフロキサシン（ERFX）（栄研化学(株)、栃木）の薬剤感受性試験を行った。

毒力検査：肝臓、脾臓、肺、十二指腸、空腸、回腸、盲腸、結腸及び腸間膜リンパ節から分離された32株の*R. equi*について病原性プラスミド並びに毒力関連抗原遺伝子（VapAとVapB）の検査を実施した [12]。

疫学調査：同居山羊13頭の糞便と隣接草地土壌4検体を*R. equi*選択培地（NANAT培地）に接種し、30℃で48時間、好気条件下で定量培養を行った [12]。菌数測定後、29コロニーを釣菌し、毒力検査に用いた。

抗体調査：2010年から2014年にかけて採取された当該山羊を含む農場内の山羊血清112検体と、2007年から2011年にかけて採取された県内の山羊血清66検体を用いて強毒株ウェスタンブロット法を行い [13]、陽性となった検体についてELISA検査を実施した [13]。抗体価0.5以上で陽性、0.3～0.5を疑陽性、0.3以下を陰性と判定した。

成 績

血液検査：血液検査の結果、好中球増多による白血球数の増加がみられた。また、赤血球数、ヘモグロビン数及びヘマトクリット値の減少が認められた（表1）。血清生化学的検査では、GGT、T-Bil、BUN、Cre、UA、LDH及びIPの増加がみられた（表2）。

病理解剖検査：腸間膜リンパ節の腫大が顕著であり、最大30cm大に腫大していたため（図1）、腹腔内に触知された腫瘤であると推察された。その他、胃リンパ節及び肝臓リンパ節の腫脹と肝臓の退色がみられた。肺では軽度の胸膜癒着がみられた。その他の臓器に異常はみられなかった。

病理組織学的検査：腸管でコクシジウムの軽度寄生及び潰瘍形成を伴う肉芽腫性回腸炎、腸間膜リンパ節及び結腸リンパ節の壊死性肉芽腫性リンパ節炎がみられた。回腸の潰瘍部では、変性した好中球、マクロファージ及び多核巨細胞の浸潤がみられた。腸間膜リンパ節及び結腸リンパ節は広範囲の壊死を示し、出血及び石灰化が散見され、壊死巣の周囲には好中球、マクロファージ及び多核巨細胞の浸潤が認められた（図2）。グラム染色では、回腸及びリンパ節の病変部に浸潤するマクロファージ内に、グラム陽性の短桿菌が観察された。チール・ネ

表1 血液検査成績

測定項目	測定値
WBC ($\times 10^2/\mu l$)	918
好中球 (%)	81
リンパ球 (%)	16
単球 (%)	2
好酸球 (%)	1
好塩基球 (%)	0
RBC ($\times 10^4/\mu l$)	382
Hb (g/dl)	7.4
Ht (%)	11.7

表2 血清生化学的検査成績

測定項目	測定値	基準値*
AST (IU/l)	127	167~513
ALT (IU/l)	11	24~83
GGT (IU/l)	180	20~56
T-Bil (mg/dl)	1.3	0~0.1
TP (g/dl)	7.7	6.4~7.0
Alb (g/dl)	2.7	2.7~3.9
BUN (mg/dl)	94	22~38
Cre (mg/dl)	3.3	1.0~1.8
UA (mg/dl)	1.4	0.3~1
T-Cho (mg/dl)	89	80~130
LDH (IU/l)	601	123~392
IP (mg/dl)	15	6.5
Mg (mg/dl)	3.4	2.8~3.6
K (mol/l)	7.2	3.5~6.7

*引用文献 [14]



図1 腸間膜リンパ節の著しい腫脹

ルゼン染色, ギムザ染色及びPAS染色では, 病変部に陽性反応はみられなかった. 抗 *R. equi* 兎血清による免疫組織化学的染色では, 回腸の潰瘍部に浸潤するマクロファージ内, 腸間膜リンパ節及び結腸リンパ節の壊死巣内とその周囲の浸潤マクロファージ及び多核巨細胞内に陽性反応が認められた (図3).

その他, 肝臓では肝細胞索の配列不整及び顆粒状変性

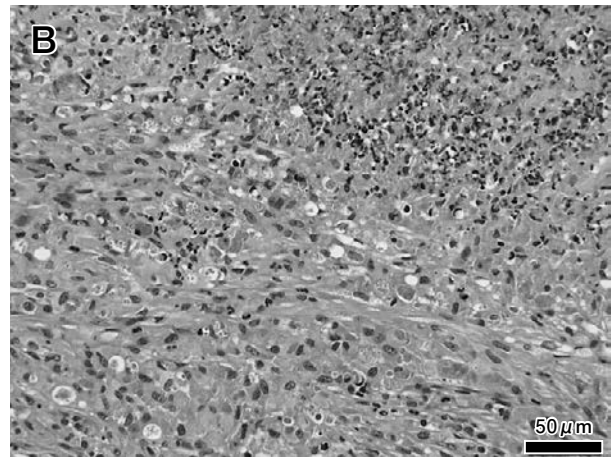
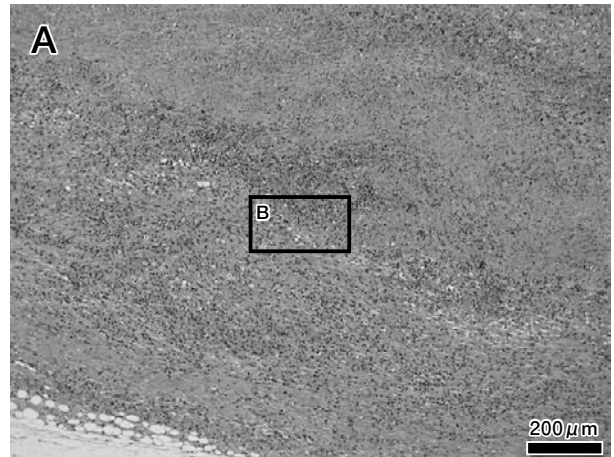


図2 腸間膜リンパ節の壊死性肉芽腫性リンパ節炎 (HE染色)

A: 広範なリンパ節の壊死とその周囲に炎症細胞の浸潤がみられる.

B: 壊死巣境界部の拡大図. 変性した好中球とマクロファージの浸潤がみられる.

がみられた. 脾臓ではリンパ濾胞の過形成がみられた. 腎臓では, 尿円柱形成が認められ, 尿細管上皮細胞は硝子滴変性を呈していた. 肺では肺胞内に線虫の寄生がみられ, 一部肺胞中隔の肥厚, リンパ球の集簇がみられた.

細菌学的検査: 肝臓, 脾臓及び肺から露滴状のコロニーを形成するグラム陽性短桿菌が純粋に分離された. 分離株はカタラーゼ陽性, オキシダーゼ陰性を示し, 簡易同定キットでは同定不可能であったが, 16S rRNA をコードする遺伝子のシーケンスにより *R. equi* と100%一致した. 十二指腸, 空腸, 回腸, 盲腸, 結腸及び腸間膜リンパ節からは, *R. equi* と *Aerococcus viridans* が分離された. いずれの臓器からもマイコプラズマは分離されなかった. 腸管各部位と直腸便からヨーネ菌遺伝子は検出されなかった.

薬剤感受性試験: 分離された *R. equi* は4株ともアンピシリン (ABPC), アモキシシリン (AMPC), ベンジルペニシリン (PCG), セファゾリン (CEZ), セフォ

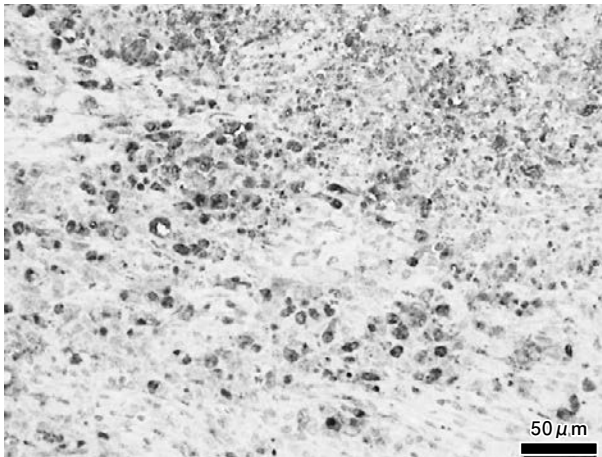


図3 腸間膜リンパ節の抗*R. equi* 兔血清を用いた免疫組織化学的染色像
壊死巣と周囲に浸潤するマクロファージ内に陽性反応が認められる。

タキシム (CTX) に耐性を示したが、それ以外の薬剤に対する耐性は認められなかった。

毒力検査：いずれの*R. equi* 分離株からも病原性プラスミド及び毒力関連抗原の遺伝子は検出されず、無毒株に分類された。

疫学調査：隣接草地土壌4検体中3検体から*R. equi* が 9.8×10^2 /g から 1.6×10^5 /g 分離されたが、同居山羊の糞便から*R. equi* は分離されなかった。土壌から分離された*R. equi* 29株について毒力検査を行った結果、いずれも病原性プラスミド及び毒力関連抗原の遺伝子は検出されず、無毒株に分類された。

抗体調査：農場内の山羊の検査ではウェスタンブロット法の結果、112頭のうち4頭で交差反応がみられた。この4頭についてELISA検査を行ったところ、当該山羊1頭と同居輸入山羊1頭の合計2頭が抗体価2以上の高い値を示し、抗体陽性と判断された。残り2頭については抗体価が低く、ウェスタンブロット法との交差反応は非特異反応と判断された。

当該山羊はニュージーランドからの導入後、年1～2回の採血が行われていたが、導入後2010年2月から2013年5月までに採材された6検体はすべて抗体陰性であり、発症後の検体(2013年12月)で抗体の陽転が認められた。県内の山羊の検査では、ウェスタンブロット法による検索の結果、66頭のうち1頭で交差反応がみられた。ELISA検査の結果、抗体価0.4以上を示したが、発症山羊と比べて抗体価が低く、疑陽性と判断された。

考 察

剖検所見では腸間膜リンパ節の腫大が顕著であり、腫瘍性疾患を示唆する所見であったが、病理組織学的に

は、広範な壊死を伴う肉芽腫性病変が認められ、腫瘍は否定された。一方、細菌学的検査で肝臓、脾臓、肺、十二指腸、空腸、回腸、盲腸、結腸及び腸間膜リンパ節から*R. equi* が分離された。また、*R. equi* に対する免疫組織化学的染色の結果、腸間膜リンパ節、結腸リンパ節や回腸病変部に浸潤するマクロファージ内に陽性反応が認められた。十二指腸、空腸、回腸、盲腸、結腸及び腸間膜リンパ節から*A. viridance* が分離されているが、病理組織学的には、ロドコッカス・エクイ感染症に特異的な反応を示しており、本症例をロドコッカス・エクイ感染症と診断した。

山羊におけるロドコッカス・エクイ感染症は、これまで国内での症例報告がなく、今回国内で初めて山羊から*R. equi* が分離された。分離された*R. equi* は薬剤感受性試験の結果、ペニシリン系薬剤とセフェム系薬剤に耐性を示したが、当該農場も含めて一般的に山羊では飼料添加剤や抗菌薬による治療投薬が行われないため、自然耐性と推察された。

毒力検査の結果、当該山羊から分離された*R. equi* はすべて病原性プラスミドや毒力関連抗原を保有しない無毒株であり、農場内の草地土壌からも同様に無毒株の*R. equi* が分離された。また、抗体検査の結果、当該山羊は導入後6回採血を行ったがすべて抗体陰性であり、発症後の検体で抗体の陽転が確認されたことから、農場内で感染して発症したと考えられた。しかし、同居山羊1頭が抗体価陽性であったにも関わらず、臨床症状に異常はみられていないため、感染・発症するには何らかの誘因が関与したと推察された。人のAIDS患者では、*R. equi* の感染が報告されているが[3, 4]、山羊ではコクシジウムによる粘膜の破壊や山羊関節炎・脳脊髄炎による免疫抑制の関与が指摘されている[5-7]。本症例ではコクシジウムの感染が認められたが、免疫抑制状態であったかどうかは不明である。同居山羊の抗体検査の結果、農場内での蔓延はみられず、県内山羊の抗体検査でも、高い抗体価を保有する山羊は確認されなかったため、通常山羊が*R. equi* に感染する可能性は低いと考えられた。

山羊におけるロドコッカス・エクイ感染症は、アメリカ、イギリス、オーストラリア、カナダなどで散発例が報告されているのみで、世界的にも報告は少ない[5-10]。既報の多くは1歳齢以下の症例で、肝臓や腹部リンパ節のほか、脾臓、肺、骨髄などに多発性の膿瘍ないし肉芽腫性病変が認められている[5-10]。本症例では、肉芽腫性病変が腸間膜リンパ節などの腹部リンパ節と回腸に限局し、回腸の潰瘍部でも免疫組織化学的染色で*R. equi* 抗原が検出されたことから、経口感染が示唆された。また、5歳齢での発症という点でもまれな症例と考えられる。本症例はイギリスでの報告と同様に無毒株

によって引き起こされており，山羊における発病機序に興味を持たれる [5].

引用文献

- [1] 高井伸二： *Rhodococcus equi* 研究の現状と新展開，日本細菌学雑誌，51，485-496 (1996)
- [2] Nakamura Y, Nishi H, Katayama Y, Niwa H, Matsumura T, Anzai T, Ohtsu Y, Tsukano K, Shimizu N, Takai S : Abortion in a thoroughbred mare associated with an infection with avirulent *Rhodococcus equi*, Vet Rec, 161, 342-346 (2007)
- [3] Prescott JF : *Rhodococcus equi*: an animal and human pathogen, Clin Microbiol Rev, 4, 20-34 (1991)
- [4] Scott MA, Graham BS, Verrall R, Dixon R, Schaffner W, Tham KT : *Rhodococcus equi*-an increasingly recognized opportunistic pathogen: report of 12 cases and review of 65 cases in the literature, Am J Clin Pathol, 103, 649-655 (1995)
- [5] Davis WP, Steficek BA, Watson GL, Yamini B, Madarame H, Takai S, Render JA : Disseminated *Rhodococcus equi* infection in two goats, Vet Pathol, 36, 336-339 (1999)
- [6] Jeckel S, Holmes P, King S, Whatmore AM, Kirkwood I : Disseminated *Rhodococcus equi* infection in goats in the UK, Vet Rec, 169, 56 (2011)
- [7] Tkachuk-Saad O, Lulis P, Welsh RD, Prescott JF : *Rhodococcus equi* infections in goats, Vet Rec, 143, 311-312 (1998)
- [8] Fitzgerald SD, Walker RD, Parlor KW : Fatal *Rhodococcus equi* infection in an Angora goat, J Vet Diagn Invest, 6, 105-107 (1994)
- [9] Ojo MO, Njoku CO, Freitas J, Nurse L, Romain H : Isolation of *Rhodococcus equi* from the liver abscess of a goat in Trinidad, Can Vet J, 34, 504 (1993)
- [10] Carrigan MJ, Links IJ, Morton AG : *Rhodococcus equi* infection in goat, Aust Vet J, 65, 331-332 (1988)
- [11] Madarame H, Matsuda H, Okada M, Yoshida S, Sasaki Y, Tsubaki S, Hasegawa Y, Takai S : Cutaneous malakoplakia in pigs inoculated with *Rhodococcus equi*, FEMS Immunol Med Microbiol, 22, 329-333 (1998)
- [12] Sakai M, Ohno R, Higuchi C, Sudo M, Suzuki K, Sato H, Maeda K, Sasaki Y, Kakuda T, Takai S : Isolation of *Rhodococcus equi* from wild boars (*Sus scrofa*) in Japan, J Wildl Dis, 48, 815-817 (2012)
- [13] Takai S, Hidaka D, Fujii M, Shindoh Y, Murata T, Nakanishi S, Sasaki Y, Tsubaki S, Kamada M : Serum antibody responses of foals to virulence-associated 15- to 17-kilodalton antigens of *Rhodococcus equi*, Vet Microbiol, 52, 63-71 (1996)
- [14] Kaneko JJ : 付録Ⅶ 大動物の血液成分の正常値^a, 獣医臨床生化学, 久保周一郎, 友田勇監訳, 第四版, 884-888, 近代出版, 東京 (1991)

First Case of *Rhodococcus equi* Infection in a Goat in Japan

Satoko NAKAO^{1)†}, Miho ARAKI²⁾, Osamu TSUHA³⁾, Wakako TAKAGI²⁾, Kiyoko KATO⁴⁾, Yu HIEDA⁴⁾, Shinji TAKAI¹⁾ and Osamu MIKAMI⁵⁾

- 1) HOKUBU Livestock Hygiene Service Center of Okinawa Prefecture, 4606-4 Nago, Nago, 905-0012, Japan
- 2) Livestock Division, 1-2-2 Izumizaki, Naha, 900-8570, Japan
- 3) National Livestock Breeding Center, 1477 Ada, Kunigami, Kunigami, 905-1503, Japan
- 4) Kitasato University, 35-1 Higashi 23 bancho, Towada, 034-8628, Japan
- 5) National Institute of Animal Health, National Agriculture and Food Research Organization, 3-1-5 Kannondai, Tsukuba, 305-0856, Japan

SUMMARY

A goat showed loss of appetite and astasia, and died at a goat-breeding farm in Okinawa Prefecture, Japan. The mesenteric and hepatic lymph nodes were enlarged. Histopathologically, granulomatous ileitis with ulcer formation and necrotic granulomatous lymphadenitis of the mesenteric lymph node and colic lymph node were observed. Gram-positive bacteria and *Rhodococcus (R.) equi* antigens were mainly detected in the macrophages of the lesions by Gram staining and immunohistochemical staining using anti-*R. equi*. *R. equi* was isolated from the liver, spleen, lungs, intestinal tract and mesenteric lymph nodes. All *R. equi* were found to be avirulent by plasmid profiles and PCR. The present case was finally diagnosed as *R. equi* infection. This is the first case of *R. equi* infection in goats in Japan. — Key words : avirulent strain, goat, necrotizing and granulomatous lymphadenitis, *Rhodococcus equi*, *Rhodococcus equi* infection.

† Correspondence to : Satoko NAKAO (HOKUBU Livestock Hygiene Service Center of Okinawa Prefecture) 4606-4 Nago, Nago, 905-0012, Japan
TEL 0980-52-2939 FAX 0980-53-3311 E-mail : oohasha@pref.okinawa.lg.jp