

## —日本における競走馬医療の現状 (VI)—

## 子馬のロドコッカス感染症について

片山芳也<sup>†</sup> (特)日本中央競馬会競走馬総合研究所微生物研究室室長)

## 1 はじめに

子馬のロドコッカス感染症は、子馬に肺炎(図1)や腸炎を起こす難治性の細菌性疾患で、世界各国の馬産地で発生している。わが国でも戦前から本病が確認されていたが、1960年代には、北海道日高地方の軽種馬でも本病の発生がみられるようになった。本症の感染初期は臨床症状に乏しく、畜主が子馬の異常に気付いた時には病態はすでにかかり進行し、病状は悪化していることが多いことから、軽種馬生産地では非常に重要な感染症の一つである。本記事では、北里大学と日高地区軽種馬防疫協議会及びJRA競走馬総合研究所が共同で実施した調査研究から得られた興味ある成績を、適宜引用しながら、子馬のロドコッカス感染症の概要について紹介する。

## 2 原因菌と発生状況

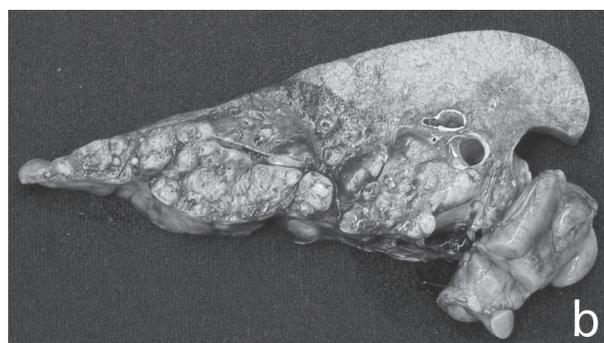
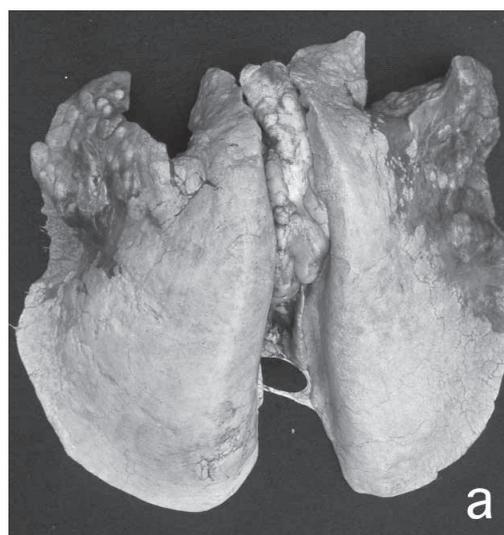
子馬のロドコッカス感染症の原因菌である *Rhodococcus equi* (*R. equi*) は、1923年、スウェーデンの Magnusson が化膿性肺炎を示す子馬の肺膿瘍から初めて分離した [1]。当時は *Corynebacterium equi* と命名されたが、1980年の属の再分類により現在の菌種名になった。

*R. equi* は好気性、非運動性のグラム陽性球桿菌で、結核菌と同様にミコール酸を含む莢膜(図2)を保有しており、抗酸性を示す。

本来は土壤中に生息する細菌で、強毒株(マウスへの実験的接種における50%致死量が $10^6$ 個以下)と無毒株(同じく $10^8$ 個以上)が存在する。発症子馬の病変部から分離される菌株のほとんどは強毒株であり、土壌や糞便から分離される株の多くは無毒株である。牛、羊、豚などの家畜の飼育環境や畑あるいは公園などの土壌からは無毒株しか分離されないが、馬の飼育環境からは強毒株が分離される。また本症が地方病的に発生している牧場の飼育土壌は発生のない牧場に比べ、強毒株の汚染度合いが高い。強毒株は菌体表層に毒力関連抗原(Virulence-associated protein antigen: VapA)を発現しており、これをコードする遺伝子は3種類の病原性プラスミド(85、

87及び90kb)に存在し、いずれかを保有している [2]。2010~2012年に日高地区で行われた調査では、87kbの病原性プラスミドを持つ強毒株は全体の8割を占めており、残りは90kbの病原性プラスミドを持つ株であった。これは飼育環境中における強毒株の比率を反映しているものと推測され、3種類の病原性プラスミドを保有する菌株間での馬に対する病原性に大差はみられない。

本菌はマクロファージに貪食された後も死滅、消化されず、細胞質の小胞内で生存し増殖することができる。すなわち、通常のマクロファージによる細菌の処理では、ファゴサイトーシスによって貪食された細菌は細胞

図1 *R. equi* 感染子馬の肺 (a: 全体像 b: 断面)

<sup>†</sup> 連絡責任者: 片山芳也 (特)日本中央競馬会競走馬総合研究所微生物研究室)

〒329-0412 下野市柴1400-4 ☎0285-44-0090 FAX 0285-40-1064 E-mail: Yoshinari\_Katayama@jra.go.jp

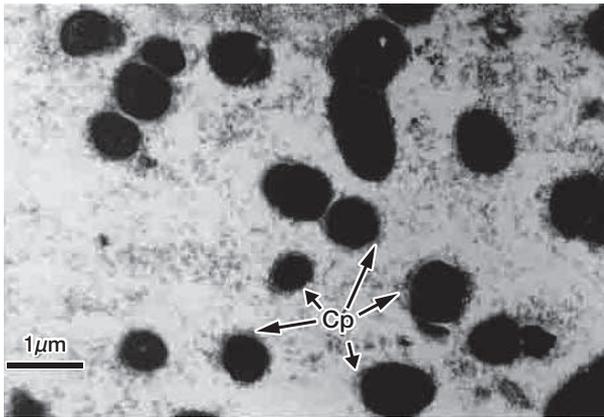


図2 *R. equi*の電子顕微鏡像 (Cpが莢膜)

質内の小胞に取り込まれ、これにライソゾームが結合することで消化されるのに対し、*R. equi*は結核菌と同様にこのライソゾームの結合を阻害する機能を有しているため消化されず、生存できると考えられている。

*R. equi*の染色体DNAの全塩基配列は2010年に解読され、標準株(103S株)の全塩基は5043kb、GC含量は68.8%である[3]。

本菌の培養は、通常30℃で48～72時間行う。選択培地にはNANAT培地を用いるが、増殖は遅く、典型的なコロニーの観察には3～5日を要する。血液寒天培地では、溶血性は示さず、半透明灰白色の光沢を持つ小さなコロニーが認められる。3～5日後には3～6mmの大きな粘液様に膨隆したサーモンピンクの典型的なコロニー形態を示す。NANAT培地では、培養2～3日後に亜テルル酸カリウムを還元し、2～3mm大の濃灰色のコロニーが観察される。強毒株を38℃で培養を続けると無毒化するが、これは病原性プラスミドの脱落した菌の方がプラスミドを保有する菌よりも増殖速度が速いため、継代を重ねるうちにプラスミド脱落株の比率が高くなることによると考えられている。

子馬のロドコッカス感染症の発生報告は1923年のスウェーデンのMagnussonによる*R. equi*の発見が最初で、それ以降、ヨーロッパ、北米、南米、オーストラリア、ニュージーランド、南アフリカ共和国など多くの国で報告され、わが国でも、原川ら[4]が1949年に青森県の子馬感染例から本菌を初めて分離している。1960年代には、競走馬生産の中心地である北海道日高地方でも本症の発生がみられるようになった。発生時期は毎年4月下旬から9月上旬で、子馬が30～50日齢の頃に発病し、50～70日齢の頃に死亡する場合が多い。通常は散発的に発生するが、特定の牧場では地方病的に毎年発生することもある。諸外国での本症の罹患率は5～17%、致死率は40～80%と報告されている[5]。

本症の感染経路は経気道及び経口である。これまでの疫学調査から、わが国の症例ではそのほとんどが肺炎を原発

病巣としており、腸炎や腸付属リンパ節炎は肺の化膿性病巣からの滲出物が気管の線毛運動により上向性に咽喉頭まで押し上げられ、*R. equi*を含む滲出物(喀痰)を嚥下して消化管に至り、小腸のパイエル板のM細胞などを介して*R. equi*が取り込まれることで病変が形成されると考えられている。しかし腸管病変だけしかみられない症例も存在することから、直接経口感染により腸炎や腸付属リンパ節炎が引き起こされる症例も存在するようである。

*R. equi*の感染源は馬の飼育環境中の土壌であり、ここからは $10^2 \sim 10^4$ 個/gの範囲で必ず分離できる[6]。10～40℃で発育可能で、土壌の表層に多く存在し、地下30cmよりも深い土壌からはほとんど分離されない。また、本菌は腸内菌の一面も持ち合わせ、新生馬から3カ月齢までの子馬の腸管内で増殖し( $10^3 \sim 10^5$ 個/g)、その後、腸内細菌叢が形成されるにつれて菌数は減少する。成馬では通常は病気を起こさず、通過菌( $10^2$ 個/g以下)と考えられている。本菌は厩舎内の空気中からも分離され、特に湿度が低くホコリが舞うような風が吹く日には、浮遊菌として多く検出される。これは、飼育環境土壌が感染源となって気道感染を引き起こす可能性を強く示唆している。

### 3 臨床症状

本症は1～3カ月齢の子馬にみられ、特に30～50日齢の子馬に多発する。罹患した子馬は、通常38.5～40.0℃の発熱を示した後、発咳など呼吸器症状を呈するようになる。また、挙動不安あるいは体動を嫌い、横臥姿勢をとることが多くなる。症状が進行すると、鼻翼の拡張や腹式呼吸がみられるようになり、呼吸困難に陥った症例では、可視粘膜はチアノーゼを示す。このような子馬は哺乳しなくなり、しだいに衰弱する。聴診では、肺の粗励音のほか、ラッセル音や警笛音を聴く。このような重症例では、治療しないと数日以内に死亡する。四肢関節に関節炎を発症する子馬もあり、複数の関節が腫脹して跛行を呈する。このような関節炎では、肺や消化器の病巣から血行を介して*R. equi*が播種され、これによる四肢構成骨の骨髓炎から化膿性関節炎を発症する敗血症性の場合と非化膿性で関節液からは*R. equi*が検出されない免疫介在性の関節炎の場合が知られている。病理解剖時に消化管病変が認められた症例でも、臨床的に明瞭な消化器症状を呈することはまれである。野外例では、これといった症状もなしに死亡しているところを発見され、病理解剖で初めて肺に多発性膿瘍が認められる症例もあれば、突然に高熱を發し、呼吸速迫あるいは呼吸困難に陥る症例もある。また、本症以外の疾病で病理解剖された子馬においても、ときおり*R. equi*が分離される肺膿瘍が見いだされる場合がある。このことから、本症には、ほとんど症状を示さない軽症例や不顕性感染例があるものと考えられる。

妊娠馬における垂直感染は、成馬の発症がほとんどな

表 子馬の気管洗浄液の採取方法

手順	操作
1	子馬に鎮静処置を行う(必要に応じて)。
2	子馬の頭頸部を気管洗浄液の回収に適した高さ(胸, 頸, 頭をほぼ水平にする)に調整する(頭の位置が高いと生理食塩水が肺に流入するため発咳し, 低いと鼻口から生理食塩水が流出する)。
3	気管洗浄用シリコンチューブを経鼻ルートで気管分岐の手前まで挿入する。
4	ディスプレイ注射器(50ml)に生理食塩水 20ml を吸引し, 気管洗浄用シリコンチューブに接続する。
5	気管分岐部手前の気管最下部付近にシリコンチューブの先端が達していることを, 注射器の内筒を少し引いて空気が吸引できることで確認する(食道にチューブが入っていると空気は吸引できない)。
6	注射器内の生理食塩水を注入し, 気管最下部に貯留した洗浄液を素早く回収する。

いことなどから, 可能性は非常に低いと考えられるが, 流産胎子から *R. equi* が検出されたとの報告もある [7]。

血液所見としては, 白血球数, フィブリノーゲン,  $\alpha$ -グロブリンの増加がみられ, 血液塗抹標本では好中球の左方移動と好酸球の減少が認められる。また X 線検査で X 線透過度を減じた明瞭な気管支炎あるいは肺膿瘍が認められることもある。

#### 4 診 断 法

本症の診断は, 罹患子馬では細菌学的検査ないし血清学的検査によって行われる。また, 死亡例では病理学的検査は重要である。

##### (1) 細菌学的検査

細菌学的検査は, 気管洗浄液(可能ならば気管支肺胞洗浄液が望ましい)や糞便及び病理解剖時に採取した臓器・組織などを材料として, *R. equi* の分離培養を行う。

##### ア 気管洗浄液からの菌分離

気管洗浄液の採取は, 馬用の気管支内視鏡を用いて実施することが望ましいが, そのような機器がなくてもシリコンチューブとディスプレイ注射器を用いて比較的容易に気管洗浄液を採取することができる(表)。

採取した気管洗浄液は, ① *R. equi* の分離培養のほか, 塗抹(サイトスピン)標本作製し, ②細胞診や③ VapA の免疫染色に用いる。また VapA 遺伝子を検出する PCR 法, LAMP 法なども開発されており, 短時間での診断も可能となっている。

気管洗浄液の細胞診では, 塗抹(サイトスピン)標本作製し, パパニコロウ染色, ギムザ染色, グラム染色などを行う。罹患子馬の気管洗浄液には多

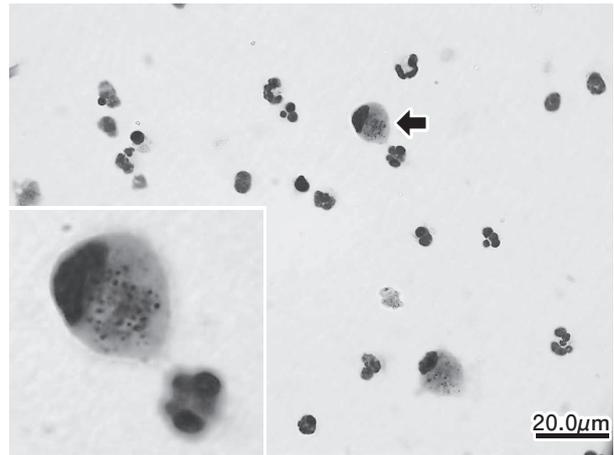


図3 気管洗浄液の塗抹標本(ギムザ染色)  
多数の好中球と *R. equi* を貪食した大型のマクロファージ(矢印)が観察される。

数の好中球とマクロファージが存在し, マクロファージの細胞質内には多量に貪食された *R. equi* 菌体が観察される(図3)。

##### イ 糞便からの菌分離

本症の子馬の糞便からは多量の *R. equi* が分離されるが, 健康馬の糞便からも *R. equi* はしばしば分離される。したがって, 臨床的に本症状が疑われる子馬の糞便から *R. equi* が分離された場合でも, 菌数や強毒株であることを検査したうえで, 総合的に診断する必要がある。通常, 感染子馬の糞便からは  $10^5$  個/g 以上の *R. equi* が分離される。

##### ウ 死亡子馬の臓器からの菌分離

死亡した子馬の病理解剖時に採取した臓器等の材料から菌分離を行う場合は, 死後の経過時間が長い場合は, NANAT 選択培地を用いるほうがよい。発症子馬の膿瘍中には多量 ( $10^6 \sim 10^8$  個/g) の菌が存在している。検査材料 1g を秤り取り, 滅菌乳鉢中に滅菌生理食塩水 5ml 及び滅菌海砂を共に入れ, 乳棒で乳剤とする。これを  $10^{-5}$  まで希釈し, 0.2ml を NANAT 培地シャーレに接種する。

##### エ 病原体遺伝子検査

*R. equi* の迅速診断法として, 強毒株が保有している VapA 遺伝子を検出する PCR 法が開発されている [8, 9]。子馬の気管洗浄液や糞便などの検査材料から, DNA を抽出し, 以下の PCR プライマーを用いる。PCR 反応は, 変性  $94^{\circ}\text{C}$  90 秒, アニーリング  $55^{\circ}\text{C}$  1 分, エクステンション  $72^{\circ}\text{C}$  2 分, 30 サイクル行くと, 564bp の VapA 遺伝子の増幅産物が確認できる。

##### *R. equi* 検出用 PCR プライマー

IP1 (5'-GAC TCT TCA CAA GAC GGT-3')

IP2 (5'-TAG GCG TTG TGC CAG CTA-3')

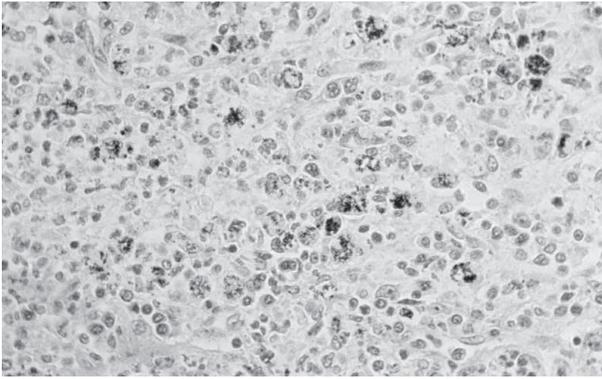


図4 ロドコッカス肺炎の病理組織像（グラム染色）  
肺胞腔には多数の好中球とグラム陽性の *R. equi* を貪食したマクロファージが浸潤している。

また、近年、PCR法で必須のサーマルサイクラー等の特別な検査機器を必要としない遺伝子検査法として、LAMP法が開発され、その有用性も報告されている [10]。

## (2) 血清学的診断

本症の特異抗体の検出にはELISA法が用いられる。*R. equi*の菌体から抽出した抗原を吸着させた96穴のマイクロプレートを準備し、これに子馬の被検血清を100倍希釈して反応させる。その後、ペルオキシダーゼ標識抗ウマIgG血清を加え、標識酵素と基質の発色反応により抗体価を測定する。本法は特異抗体の検出感度が高いうえに多数の検体を効率良く検査できる点及び多くの罹患子馬では、すでに初診日に高い抗体価を示すことから、早期診断法の一つとして有用である [11]。

## (3) 病理学的診断

おもな剖検所見は化膿性気管支肺炎である。急性例では赤色肝変色巣の中心に微小膿瘍を認め、慢性例では小豆大から鶏卵大で、多発性の肺膿瘍の形成がみられる(図1)。肺病巣は、後葉前部及び副葉に好発する。病理組織学的には化膿性肉芽腫性肺炎で、好中球の集簇による膿瘍の周囲にはマクロファージやリンパ球等の浸潤を認める。グラム染色ではマクロファージ内にグラム陽性の菌体が多数観察される(図4)。肺病変のほかには、腹腔内の膿瘍形成や前腸間膜リンパ節ないし腸付属リンパ節の膿瘍形成、小腸パイエル板の化膿性肥大(図5)、結腸壁や粘膜面における膿瘍や多発性潰瘍の形成などがみられる。

## 5 実験感染子馬の病態

初乳非摂取の子馬の気管内へ、*R. equi*強毒株 $10^4$ 個(馬の飼育環境に存在する菌数と同程度)を噴霧すると発病し、実験的に感染させることができる(図6)。

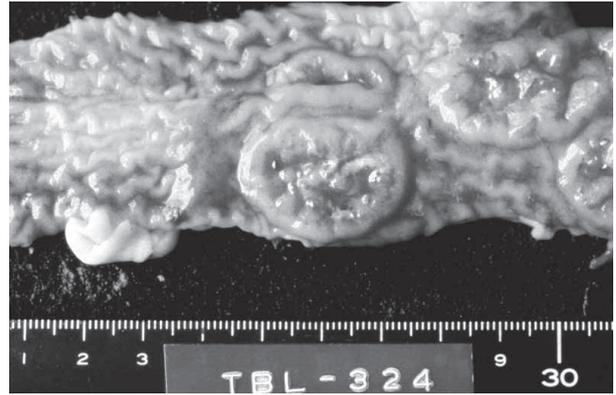


図5 小腸パイエル板の肥大

*R. equi*を接種した後、発熱などの臨床症状が発現するまでの期間(潜伏期間)は約2週間である。発熱後、数日間は元気や食欲に変化は認められず、朝・夕の体温測定を実施していないと異常に気付かないことが多い。臨床症状としては、発熱のほか、肺の聴診音の異常、食欲・元気消失が認められる。発熱の3~4日前には気管洗浄液から強毒株が分離され始め、その直後には糞便からも強毒株が分離されるようになる。気管洗浄液塗抹標本では、VapA免疫染色(蛍光抗体法)が発症初日~2日目から陽性となり、多数の好中球やマクロファージが観察される。血清抗体価(ELISA抗体)は、最初の発熱から4~5日目に陽性基準値(OD値0.3以上)を超えて上昇する [12]。

肺の病変は、発症日には、針頭~粟粒大の多発性膿瘍がすでに形成されており、その周囲には炎症の急速な広がり示す赤色肝変色病巣も認められる。発症3日目には、小豆大の肺膿瘍に増大する。以上のことから、本症の肺病変の進行ないし拡大はかなり速く、本症は早期の発見、診断及び治療が非常に重要であることが感染実験で明らかにされた。

## 6 治療法

本症の治療法としては、1986年のロドコッカス国際ワークショップでマクロライド系抗菌薬のエリスロマイシンと結核菌に有効なリファンピシンの併用が効果的であったことが報告されて以来、この治療が欧米では基準となっている。しかしながら、エリスロマイシンはしばしば馬に重篤な下痢を誘発する副作用が知られていることから、わが国の軽種馬生産地ではエリスロマイシンよりも消化管への副作用が少ないとされるクラリスロマイシンとリファンピシンの併用による治療が主流となっている。

*R. equi*の薬剤耐性については、平成22~24年に北海道日高地方の軽種馬で調査したところ、 $\beta$ ラクタム系のベンジルペニシリン、アンピシリン、セファロチン、セファゾリンに対しては高い耐性率が認められたが、ア

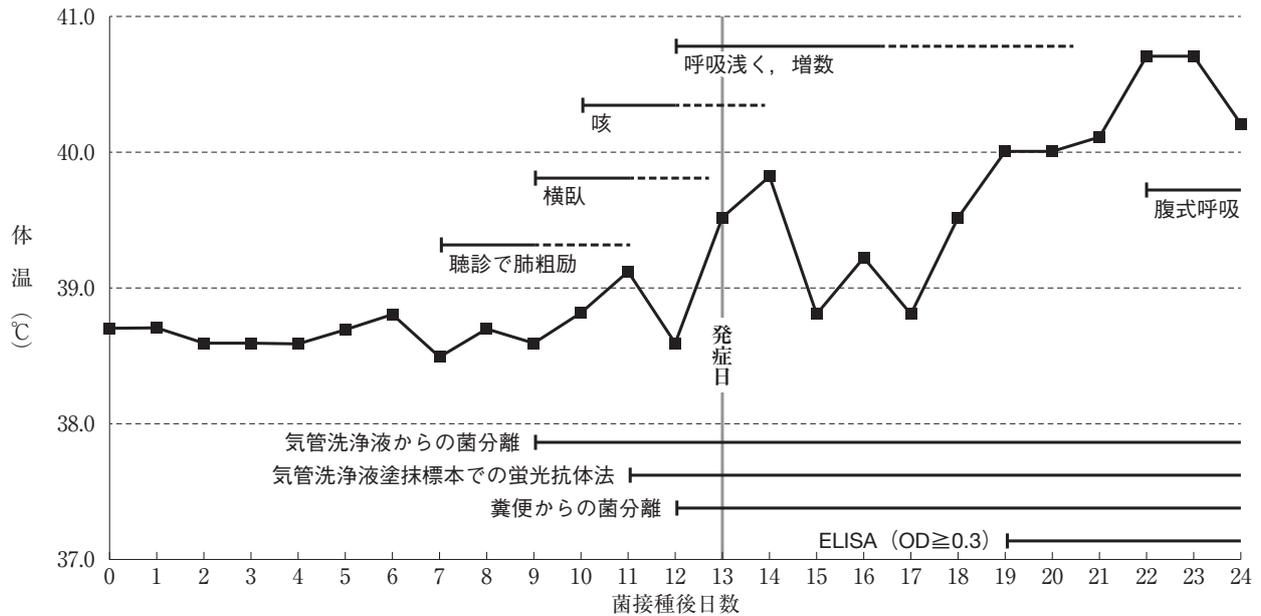


図6 実験感染子馬の臨床症状と各種検査法による診断時期

ミノグリコシド系（ゲンタマイシン，アミカシン），マクロライド系（エリスロマイシン，クラリスロマイシン，アジスロマイシン），フルオロキノロン系（シプロフロキサシン，エンロフロキサシン）及びその他のイミペネム，ミオサイクリン，リネゾリドに対する耐性株は認められなかった。なお，リファンピシリンに対しては検査した189株中1株で耐性が認められたのみであったことから，今後も耐性菌の出現に注意して使用する必要があるが，本症の治療には有効であると考えられる。

## 7 予 防 法

感染子馬の糞便中には非常に多量の強毒株が排泄される。汚染牧場の子馬も3カ月齢までは強毒株を含んだ糞便を排泄する。これらは厩舎，パドック及び牧草地の汚染源となるので，できる限り除去するように心掛ける。また，本症が発生した厩舎では馬房の壁などを逆性石鹼等の消毒薬で消毒し，床面は生石灰の散布などにより消毒する必要がある。これら消毒作業は定期的に行うことが望ましい。また，汚染された土壌をすべて消毒することは不可能であることから，本症が発生した牧場で生後間もない子馬が使用するパドックなどについては，*R. equi*が土壌中で生息する深度0～20cmまでの表土を取り除き，客土することで土壌中の菌数を減少させる等の対応が必要である。糞便は*R. equi*をきわめて大量に含み，その後も菌は増殖することから，糞便などを厩舎の近くに野積みせず，風向きと厩舎との関係などを考慮して，堆肥場の設置場所を十分に検討するとともに，堆肥の発酵熱で*R. equi*は十分に殺滅されるが，熟成が不十分な糞便を堆肥として牧草地等へ散布することは，避けるようにする。

## 8 お わ り に

子馬のロドコッカス感染症はわが国の馬産地において毎年発生し，多くの被害がでている。本症に感染した子馬の臨床症状は比較的乏しいため，しばしば発見が遅れて死亡する症例や，慢性経過をたどり，最終的に予後不良となってしまう症例が多くみられる。これまでの調査・研究により，本症の病原体である*R. equi*に関する知見も数多く得られ，早期診断に有用な方策も示されている。私ども競走馬総合研究所では，今後とも子馬のロドコッカス感染症の減少に積極的に取り組んでいきたいと考えている。

## 参 考 文 献

- [1] Magnusson H : Spezifische infektiöse Pneumonie beim Fohlen, Ein neuer Eitererreger beim Pferd, Arch Wiss Prakt Tierheilkd, 50, 22-38 (1923)
- [2] Takai S, Sekizaki T, Ozawa T, Sugawara T, Watanabe Y, Tsubaki S : Association between a large plasmid and 15- to 17-kilodalton antigens in virulent *Rhodococcus equi*, Infect Immun, 59, 4056-4060 (1991)
- [3] Letek M, González P, Macarthur I, Rodríguez H, Freeman TC, Valero-Rello A, Blanco M, Buckley T, Cherevach I, Fahey R, Hapeshi A, Holdstock J, Leadon D, Navas J, Ocampo A, Quail MA, Sanders M, Scotti MM, Prescott JF, Fogarty U, Meijer WG, Parkhill J, Bentley SD, Vázquez-Boland JA : The genome of a pathogenic *Rhodococcus*: Coaptive virulence underpinned by key Gene acquisitions, PLoS Genet, 6, e1001145 (2010)
- [4] 原川俊郎，盛田慎蔵 : *Corynebacterium equi*による仔馬の肺膿瘍，日獣学誌，11, 63-74 (1949)
- [5] Cohen ND : *Rhodococcus equi* foal pneumonia, Vet Clin North Am Equine Pract, 30, 609-622 (2014)

- [ 6 ] Takai S, Ohbushi S, Koike K, Tsubaki S, Oishi H, Kamada M : Prevalence of virulent *Rhodococcus equi* in isolates from soil and feces of horses from horse-breeding farms with and without endemic infections, *J Clin Microbiol*, 29, 2887-2889 (1991)
- [ 7 ] 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 a virulent *Rhodococcus equi*, *Vet Rec*, 161, 342-346 (2007)
- [ 8 ] Sekizaki T, Takai S, Egawa Y, Ikeda T, Ito H, Tsubaki S : Sequence of the *Rhodococcus equi* gene encoding the virulence-associated 15-17-kDa antigens, *Gene*, 155, 135-136 (1995)
- [ 9 ] Takai S, Ikeda T, Sasaki Y, Watanabe Y, Ozawa T, Tsubaki S, Sekizaki T : Identification of virulent *Rhodococcus equi* by amplification of gene coding for 15- to 17-kilodalton antigens, *J Clin Microbiol* 33, 1624-1627 (1995)
- [10] Kinoshita Y, Niwa H, Higuchi T, Katayama Y : Development of a loop-mediated isothermal amplification method for detecting virulent *Rhodococcus equi*, *J Vet Diagn Invest*, 28, 608-611 (2016)
- [11] Higuchi T, Hashikura S, Gojo C, Inui T, Satoh S, Yoshida M, Ishiyama T, Yamada H, Takai : Clinical evaluation of the serodiagnostic value of enzyme-linked immunosorbent assay for *Rhodococcus equi* infection in foals, *Equine Vet J*, 29, 274-278 (1997)
- [12] Anzai T, Wada R, Kamada M, Takai S, Shindo Y, Tsubaki S : Comparison of tracheal aspiration with other tests for diagnosis of *Rhodococcus equi* pneumonia in foals, *Vet Microbiol*, 56, 335-345 (1997)
-