

2009～2015年における北海道日高管内で発生した 新生子馬の *Actinobacillus equuli* 感染症の回顧的調査、 分離株の分子疫学解析及び薬剤感受性

山本敦子^{1)†} 齊藤真里子²⁾ 伊藤 満³⁾ 原田健弘¹⁾
越智章仁⁴⁾ 丹羽秀和⁴⁾

- 1) 北海道十勝家畜保健衛生所 (〒089-1182 帯広市川西町基線 59-6)
2) 北海道日高家畜保健衛生所 (〒056-0003 日高郡新ひだか町静内旭町 2-88-5)
3) 北海道網走家畜保健衛生所 (〒090-0008 北見市大正 323-5)
4) 日本中央競馬会競走馬総合研究所 (〒329-0412 下野市柴 1400-4)

(2018年6月28日受付・2019年9月26日受理)

要 約

新生子馬の *Actinobacillus equuli* (AE) 感染症の実態を把握するため、北海道日高管内における本症の回顧的調査、分子疫学解析及び薬剤感受性試験を実施した。2009～2015年に0～5日齢で死亡した新生子馬284例のうち、AE感染症と診断された26例を対象とした。発症馬の出生時体重は健常馬より低く、半数は初乳摂取不十分な虚弱馬であり、7割が生後2日以内に死亡した。13例中10例はAE subsp. *equuli* (AEE)、3例はAE subsp. *haemolyticus* (AEH)であり、主とする病態はAEEが敗血症、AEHは肺炎であった。分離株の薬剤感受性試験では、馬の臨床で一般的に使用される抗菌薬に対する耐性株は認められず、分子疫学解析により分離株の多様性が確認された。

——キーワード： *Actinobacillus equuli*, 薬剤感受性, 新生子馬, Random amplified polymorphic DNA法, 回顧的調査。
-----日獣会誌 73, 185～190 (2020)

馬の *Actinobacillus equuli* (AE) 感染症は、新生子馬の敗血症の原因として知られており、初乳未摂取による移行抗体伝達不全や不衛生な飼養環境がリスク要因と考えられている [1]。また、AE感染症の肉眼的な病変の特徴として、腎臓における微小膿瘍の形成が知られている [2]。AEはパストレラ科に属するグラム陰性菌で、馬の口腔内、消化管、生殖器に常在し [1]、溶血毒 (AE toxin : Aqx) を保有するAE subsp. *haemolyticus* (AEH) と、Aqxを保有しないAE subsp. *equuli* (AEE) の2つの亜種に分類される [3]。AqxはAEと近縁な *Actinobacillus pleuropneumoniae* が産生するロイコトキシンと類似の毒素 [4] で、馬のリンパ球に対して細胞溶解作用をもつことが報告されている [5]。

日高管内では2013～2015年にかけて本症の発生が増加した。本症が発生すると、農場では生産馬を失う大きな経済的被害があるが、AEに関する調査研究は行わ

れておらず、発生を阻止することは必ずしも容易ではない現状にある。そこで、本症の病態悪化を防ぐ方法を講じるうえで有用な情報を得ることを目的として、日高管内で診断された症例の回顧的調査、分離株の分子疫学解析、薬剤感受性試験を実施した。

材料及び方法

調査期間及び対象：2009～2015年に0～5日齢で死亡した新生子馬 (生後直死馬) 284例のうち、AE感染症と診断された26例を対象とした。なお、全症例について、死亡馬のみの搬入で胎盤や臍帯の搬入はなかった。各症例の診断は、五大臓器からのAE分離、16S rRNA 遺伝子の検出とその相同性解析及び病理学的検査成績により実施した。AEの同定は5%羊血液加寒天培地を用い、好気性下で37℃、24時間培養し、分離されたコロニー性状や市販キット (IDテストHN-20

† 連絡責任者：山本敦子 (北海道十勝家畜保健衛生所)

〒089-1182 帯広市川西町基線 59-6

☎ 0155-59-2021 FAX 0155-59-2571

E-mail : nakatani.atsuko@pref.hokkaido.lg.jp

ラピッド「ニッスイ」, 日水製薬(株, 東京) を用いた生化学性状試験により実施した。

回顧的調査: 各年の発生率, 各症例の在胎日齢, 死亡日齢, 解剖時の体重及び病理解剖・組織検査成績について, 過去の検査成績をもとに回顧的調査を実施した。在胎日齢及び解剖時の体重については, 平均値及び標準誤差を求めた。また, 22 戸の飼養者へ初乳摂取状況や出生時の健康状態について, 20 戸の飼養者へ臍帯消毒実施の有無について聞き取りを実施した。

亜種の同定: 分離株の DNA は, 核酸抽出キット (InstaGene Matrix kit, バイオ・ラッドラボラトリーズ(株, 東京) を用い使用説明書に従って抽出した。Aqx の遺伝子を検出する PCR は Berthoud ら [6] の方法に従って, 市販の PCR 試薬 (EmeraldAmp® PCR Master Mix, タカラバイオ(株, 滋賀) を用い, 94°C 30 秒, 60°C 30 秒, 72°C 30 秒を 35 サイクルで実施した。増幅産物の有無は, 電気泳動装置 (E-Gel Electrophoresis System, ライフテクノロジーズジャパン(株, 東京) を用いて確認した。細菌が分離されなかった症例については, 脾臓から抽出された DNA を 16S rRNA 遺伝子の全長を PCR で増幅後, 増幅産物の塩基配列を決定し [7, 8], 相同解析により亜種を決定した。

分子疫学解析: Random amplified polymorphic DNA 法 (RAPD) は AE と近縁な *Actinobacillus pleuropneumoniae* を用いた Chatellier ら [9] の報告を参考に 3 種類のプライマー (OPB7, OPB12, OPB17) を用いて実施した。DNA は上記と同様に抽出したものを使用した。市販の PCR 試薬 (EmeraldAmp® PCR Master Mix, タカラバイオ(株, 滋賀) を用い, PCR 条件は, 94°C 4 分, 36°C 1 分, 72°C 2 分を 2 サイクル, 94°C 1 分, 36°C 1 分, 72°C 2 分を 31 サイクル, 94°C 2 分, 36°C 1 分, 72°C 10 分を 2 サイクルで実施した。DNA を増幅後, 1.5% アガロースゲルで 40 分間泳動後, エチジウムブロマイドで染色し, 紫外線下で観察した。

薬剤感受性試験: 供試菌は AEE9 株, AEH3 株を使用した。アンピシリン (ABPC), セファロチン (CET), ゲンタマイシン (GM), ミノサイクリン (MINO), サルファ剤トリメトプリム (ST), エンロフロキサシン (ERFX) について, 薬剤感受性キット (Etest® シングルパック, ビオメリユー・ジャパン(株, 東京) を用いて最小発育阻止濃度 (MIC) を測定した。薬剤感受性の判定は「Etest 性能・判定基準・精度管理基準一覧」をもとに, AE と近縁なグラム陰性菌の感性, 中間, 耐性の各ブレイクポイントを参考に実施した。なお, *Escherichia coli* ATCC25922 株を用いて精度管理範囲内であったことを確認した。

成 績

発生状況の調査結果: 2009~2015 年に AE 感染症と診断された生後直死馬は 26 症例で, 2015 年の発生率は 22.9% (11/48 例) であった (図 1)。24 戸の発生牧場のうち 2 戸で 2 頭の発生 (いずれも母馬は異なる症例) があったが, その他 22 戸は 1 頭のみでの発生であった。AE 感染馬の在胎日齢は 336 ± 13 日であり, 7 割の感染馬が生後 2 日以内に死亡し, 解剖時の体重は 43 ± 7 kg であった (図 2)。AE 感染母馬の年齢は, 19 及び 20 歳が各々 1 頭ずつ, その他 23 頭の母馬は 5~14 歳であり, 1 頭の母馬の年齢は不明であった。飼養者への聞き取り調査から, 出生時より虚弱な個体は 54.5% (不明 9.1%) であった。初乳摂取状況については, 摂取不十分な個体は 50.0% (不明 9.1%) であった。臍帯の消毒については 20 戸中 1 戸の飼養者はヨウ素系消毒薬とピグアナイド系消毒薬との併用で実施していたが, 残り 19 戸ではヨウ素系消毒薬のみで実施していた。GM 及びセフトオフルによる治療が 1 症例でみられたが, 残り 19 症例では抗菌薬による治療は実施されていなかった。

亜種の同定: 菌株が保存されていた 12 症例 (表 1) について, PCR による分離株の Aqx 遺伝子の有無を検討したところ, 9 症例の分離株では Aqx 遺伝子が検出されず AEE と同定された。3 症例の分離株は Aqx 遺伝子が検出され AEH と同定された。No. 10 は細菌分離陰性であったが, 脾臓から検出された 16S rRNA 遺伝子配列の解析により AEE と判別した。なお, No. 10 の症例のみ生前時に抗菌薬による治療歴が確認された。

病理学的検査成績: AEE 感染馬の肉眼所見では, 典型的な腎臓皮質の白斑や腎臓被膜の膠様化がみられた。組織所見では, 肉眼病変がみられた腎臓をはじめ, 肝臓, 肺に多発性化膿巣がみられた。組織検査を実施した 7 症

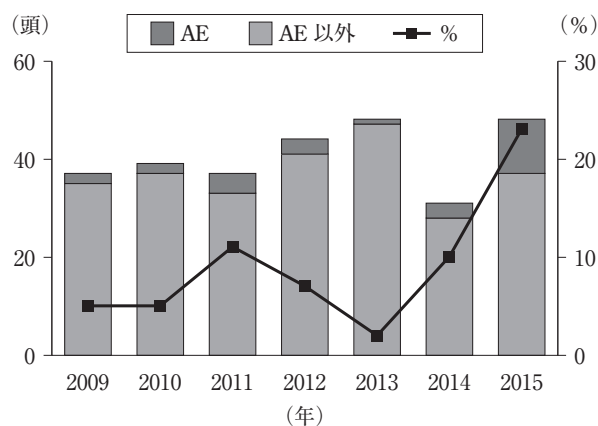


図 1 AE 感染症の各年における発生数と発生率の推移
2009~2014 年における AE 感染症による生後直死馬の発生率は 10% 以下であったが, 2015 年は 22.9% であった。

表1 病原体の検出が可能であったAE感染の症例における亜種の特定及び病理解剖学的検査成績の概要

No.	亜種	細菌学的検査成績						病理解剖学的検査成績	
		AE分離臓器					その他病原体	解剖所見	組織所見
		肝臓	脾臓	腎臓	心臓	肺			
1	AEE	-	-	+	-	-		腎臓皮質に白斑	多臓器に多発性化膿巣
2	AEE	+	+	+	+	+		腎臓皮質に白斑	NT*5
3	AEE	+	+	+	+	+		腎臓皮質に白斑	NT
4	AEE	+	+	+	-	+		著変なし	多臓器に多発性化膿巣
5	AEE	+	+	+	+	+		腎臓被膜に膠様化	NT
6	AEE	+	+	+	+	+		腎臓皮質に白斑	多臓器に多発性化膿巣
7	AEE	+	-	-	+	-		腎臓皮質に点状出血散在	多臓器に多発性化膿巣
8	AEE	+	+	+	+	+		腎臓被膜に膠様化	多臓器に多発性化膿巣
9	AEE	-	-	-	-	+	+*2	肺炎	肝臓に化膿巣, 壊死性化膿性気管支肺炎
10	AEE	-	*1	-	-	-		腎臓被膜に膠様化, 皮質に白斑	多臓器に多発性化膿巣
11	AEH	+	+	+	+	+	+*3	肺炎	壊死性化膿性肺炎
12	AEH	-	-	-	-	+	+*4	肺炎	壊死性化膿性気管支肺炎
13	AEH	-	-	-	-	+		肺炎	線維素性化膿性胸膜肺炎

+ : 分離陽性, - : 分離陰性

*1 AE分離陰性であったが, AEの遺伝子を検出.

*2 五大臓器: *Listeria innocua* (*L. innocua*), 肺: *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), *Streptococcus* spp.

*3 五大臓器: *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* (*S. zooepidemicus*)

*4 肺, 胸水: *S. zooepidemicus*

*5 NT: not tested

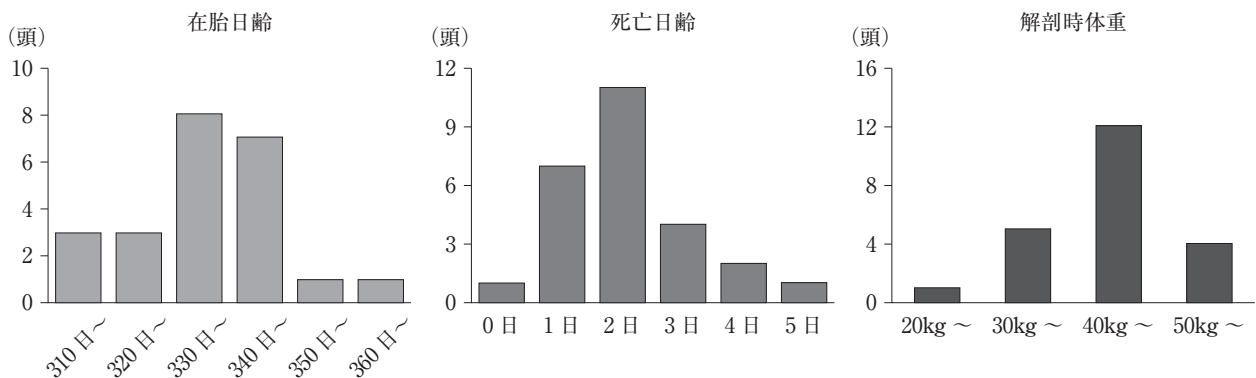


図2 AE発症馬の在胎日齢, 死亡日齢, 及び解剖時体重

AE感染馬の在胎日齢は336±13日であり, 7割の感染馬が生後2日以内に死亡し, 解剖時の体重は43±7kgであった.

例中6症例に, 敗血症の所見である多臓器に多発性化膿巣がみられた(表1). AEH感染馬の肉眼所見では黄色透明の胸水が貯留し, 肺は硬結感があり, 線維素の付着がみられた. 組織所見では, 壊死性化膿性気管支肺炎や線維素性化膿性胸膜肺炎を呈していた. AEHが分離された症例では, 3症例中2症例はAE以外の細菌の混合感染がみられたが, すべて肺炎の所見であった(表1).

分子疫学解析結果: RAPDの結果では, プライマーOPB7ではNo. 4と7の株は同一パターンの泳動像であったが, その他はすべて異なる泳動像であった. プライマーOPB12についてはすべて異なる泳動像であった. プライマーOPB17はNo. 4と7, No. 8と9が同じで, その他はすべて異なる泳動像であった. RAPDでは近縁な株はあったがすべてのプライマーで一致する株は存

在しなかった.

薬剤感受性試験結果: 各抗菌薬の感性のブレイクポイントについては表2の星印で示した. AEE, AEHいずれもこの値を超える株はなく, 今回検討を行った抗菌薬に対して耐性株は存在しなかった. ABPC, CET, MINO, STでは, 8割以上の株は, 各薬剤の感性のブレイクポイントよりも約1桁低いMIC値であった. GMは, 耐性を示す株は存在しなかったものの, すべての株が感性のブレイクポイントに近いMIC値であった.

考 察

調査期間内の生後直死馬におけるAE感染症の発生率は平均9.2%であったが, 2015年の発生率は22.9%であり, 例年に比べて高くなった. この要因を調べるため

表2 AE 12 株の薬剤感受性試験結果

AE (12株)	MIC ($\mu\text{g/ml}$)								耐性率 (%)		
	≤ 0.03	0.06	0.13	0.25	0.5	1	2	4		8	
ABPC			5	6	1					★	0
CET				3	7	2				★	0
GM						1	11			★	0
MINO			3	9						★	0
ST	6	4	2							★	0
ERFX	8	4		★							0

★：感性のブレイクポイント

に RAPD による分子疫学解析を実施したところ、各年や地域によらず分離株の多様性が確認され、特定のクローンによるものではなかったと考えられた。既報 [10] においても、同一牧場飼養馬の口腔内から分離された AE に多様性が確認されたことから、AE は同一牧場内で特定のクローンがまん延するほどの感染力が強い細菌ではないと思われた。また、複数の株は互いに近縁であると推察されたが、各症例の母馬の飼養牧場は異なることから、偶発的に存在した環境中の近縁株に由来すると考えられた。このことから、2015 年に日高管内において本症が急増した理由を明らかにすることはできなかった。

AEH が保有する Aqx は馬のリンパ球に細胞溶解作用をもつことが報告されているが [5]、AEH と AEE の新生子馬への致死性の違いは明らかになっていない。Layman ら [1] は、Aqx は AEH の主要な病原因子であると考えられるものの、生後 6 カ月以内の子馬の AE 感染症の多くが AEE 感染であったと報告している。今回の結果も、AE 感染症のうち約 8 割が Aqx を保有しない AEE によるものであった。このことから、Aqx 以外の他の病原因子も AE 感染症にかかわっていると考えられた。

病理学的検査成績より、AEE による半数以上の症例でみられた腎臓における病変は AEH による 3 症例では認められなかった。AEH の 3 症例中 2 症例は AEH 以外の細菌による混合感染が確認されたものの、いずれも肺炎の所見が確認された。新生子馬の症例ではないが、AEH が関与した出血性肺炎による成馬の死亡事例 [11] もあることから、AEE と AEH では、亜種による病態の違いがある可能性が示唆された。

AE による生後直死馬の約半数は虚弱で初乳摂取が不十分であった。既報 [12] においても、移行抗体伝達不全が AE 感染症の重要な要因であると報告されている。正常な馬の在胎日齢は 301～349 日 (平均 338 日) [13] であり、AE 感染症と診断された生後直死馬の多くの在胎日齢に異常はなかった。また、AE 感染馬の母

馬の年齢は、19 及び 20 歳の高齢な母馬が各々 1 頭ずつみられたものの、その他 23 頭の年齢は 5～14 歳であったため、どの年齢の母馬であっても本症は発生し得ると考えられた。AE 感染馬は、解剖時の体重から、サラブレッド種の出生時の正常体重 50～64kg (平均 57kg) (石橋 昇：軽種馬の標準発育、軽種馬飼養標準 (2004 年度版)、日本中央競馬会競走馬総合研究所編、初版、12、アニマル・メディア社、東京 (2004)) よりも低体重であったと示唆された。本調査においても、初乳摂取不十分で、通常よりも低体重である虚弱子馬は本症発生のリスクが高いと推察された。

聞き取り調査を実施した全飼養者がヨウ素系消毒薬を用いて臍帯消毒を実施しており、消毒方法に大きな問題はなかったと考えられた。本症の感染経路として臍帯感染のみならず、AE による流産事例の報告 [1] があることから、妊娠中の経胎盤感染や分娩中の経膈感染も考えられる。今回の全症例については、胎盤や羊水の搬入がなく検査が実施できなかったため、感染経路の特定には至らなかった。今回の AE 感染馬の多くは妊娠満期で出生しているにもかかわらず、低体重での出生が推察される結果であったため、妊娠期にすでに当該菌に感染し、流産には至らずとも、胎子の発育不全に関与している可能性が考えられた。

今回の症例のほとんどで抗菌薬による治療は未実施であった。馬の臨床において一般的に使用される抗菌薬に対して、分離株の耐性化は確認されず、薬剤の有効性が確認された。AE 感染による発症馬の約 7 割は生後 2 日以内に死亡しており、経過が非常に早かったと考えられることから、哺乳欲の低下や元気消失といった臨床所見がみられる新生子馬に対しては、AE 感染症を疑い、敗血症や肺炎に対して有効な抗菌薬や補液による早期治療が必要と考えられた。なお、他の抗菌薬に比べて GM の MIC は感性のブレイクポイントに近い値であったため、第一選択薬としては他の抗菌薬を選択することで、より良い治療効果が望めると考えられた。

本研究により、新生子馬の AE 感染症は病態の進行が早いこと、異常時には迅速な治療が必要であることがわかった。また、分離された AE は馬の臨床で一般的に使用される抗菌薬に対して薬剤耐性が進んでいないことがわかった。例年に比べて発生率が高い年もあったが特定のクローンによる流行ではなかったと推察された。AEE と AEH では、亜種による病態の違いがある可能性が示唆されたため、今後も症例数を重ねた検討を継続していく必要があると考えられた。今回の研究で得た知見を生産者や臨床獣医師へ情報提供し、軽種馬生産における AE 感染症の被害軽減に努めていきたい。

引用文献

- [1] Layman QD, Rezabek GB, Ramachandran A, Love BC, Confer AW : A retrospective study of equine actinobacillosis cases: 1999–2011, *J Vet Diagn Invest*, 26, 365–375 (2014)
- [2] 代田欣二, 吉川 堯, 落合謙爾 : 泌尿器, 動物病理学各論, 日本獣医病理学会編, 初版, 301, 文永堂出版, 東京 (2007)
- [3] Christensen H, Bisgaard M, Olsen JE : Reclassification of equine isolates previously reported as *Actinobacillus equuli*, variants of *A. equuli*, *Actinobacillus suis* or Bisgaard taxon 11 and proposal of *A. equuli* subsp. *equuli* subsp. nov. and *A. equuli* subsp. *haemolyticus* subsp. nov., *Int J Syst Evol Micr*, 52, 1569–1576 (2002)
- [4] Frey J : The role of RTX toxins in host specificity of animal pathogenic *Pasteurellaceae*, *Vet Microbiol*, 153, 51–58 (2011)
- [5] Kuhnert P, Berthoud H, Straub R, Frey J : Host cell specific activity of RTX toxins from haemolytic *Actinobacillus equuli* and *Actinobacillus suis*, *Vet Microbiol*, 92, 161–167 (2003)
- [6] Berthoud H, Frey J, Kuhnert P : Characterization of Aqx and its operon: the hemolytic RTX determinant of *Actinobacillus equuli*, *Vet Microbiol*, 87, 159–174 (2002)
- [7] Hiraishi A : Direct automated sequencing of 16S rDNA amplified by polymerase chain reaction from bacterial cultures without DNA purification, *Lett Appl Microbiol*, 15, 210–213 (1992)
- [8] Hiraishi A, Shin YK, Ueda Y, Sugiyama J : Auto-mated sequencing of PCR-amplified 16S rDNA on 'Hydro-link' gels, *J Microbiol Meth*, 19, 145–154 (1994)
- [9] Chatellier S, Harel J, Dugourd D, Chevallier B, Kobisch M, Gottschalk M : Genomic relatedness among *Actinobacillus pleuropneumoniae* field strains of stereotypes 1 and 5 isolated from healthy and diseased pigs, *Can J Vet Res*, 63, 170–176 (1999)
- [10] Susanna S : Isolation of *Actinobacillus equuli* from the oral cavity of healthy horses and comparison of isolates by restriction enzyme digestion and pulsed-field gel electrophoresis, *Vet Microbiol*, 59, 147–156 (1998)
- [11] Patterson-Kane JC, Donahue JM, Harrison LR : Septicemia and peritonitis due to *Actinobacillus equuli* infection in an adult horse, *Vet Pathol*, 38, 230–232 (2001)
- [12] Kamada M, Kumanomido T, Kanemaru T, Yoshihara T, Tomioka Y, Kaneko M, Senba H, Ohishi H : Isolation of *Actinobacillus equuli* from neonatal foals with death in colostrum-deficiency or failure of maternal immunity transfer, *Bull Equine Res Inst*, 22, 38–42 (1985)
- [13] 津曲茂久 : 妊娠と分娩, 獣医繁殖学, 浜名克己, 中尾敏彦, 津曲茂久編, 第3版, 169, 文永堂出版, 東京 (2008)

Retrospective Analysis, Epidemiological Studies and Antimicrobial Susceptibility
of Equine Neonatal Actinobacillosis in Hidaka District, Hokkaido,
from 2009 to 2015

Atsuko YAMAMOTO^{1)†}, Mariko SAITOU²⁾, Mitsuru ITO³⁾, Takehiro HARADA¹⁾,
Akihiro OCHI⁴⁾ and Hidekazu NIWA⁴⁾

- 1) *Hokkaido Tokachi Livestock Hygiene Service Center, 59-6 Kisen, Kawanishi-cho, Obihiro-shi, 089-1182, Japan*
- 2) *Hokkaido Hidaka Livestock Hygiene Service Center, 2-88-5 Shizunai-asahi-cho, Shinhidaka-cho, Hidaka-gun, 056-0003, Japan*
- 3) *Hokkaido Abashiri Livestock Hygiene Service Center, 323-5 Taishou, Kitami-shi, 090-0008, Japan*
- 4) *Equine Research Institute, Japan Racing Association, 1400-4 Shiba, Shimotsuke-shi, 329-0412, Japan*

SUMMARY

The object of this study is to investigate the characterization of equine neonatal actinobacillosis by retrospective analysis, epidemiological studies and antimicrobial susceptibility testing. In Hidaka District, Hokkaido, from 2009 to 2015, we investigated 26 cases diagnosed with actinobacillosis in 284 neonatal foals that died within 5 days after birth. The investigation discovered that the body weight of these foals is lower than that of healthy foals. Half of the foals were weak due to failure to receive the passive transfer of immunoglobulin. Around 70% of them died within 2 days after birth. Nine of the 12 isolates obtained from the diseased foals were *Actinobacillus equuli* (AE) subsp. *equuli* (AEE), and 3 isolates were AE subsp. *haemolyticus* (AEH). In the necropsy, legions from AEE infection were associated with septicemia, whereas that by AEH infection were associated with pneumonia. All strains were susceptible to antimicrobial agents tested here. Molecular analysis by polymorphic DNA analysis of the isolates suggests high diversity of the isolates.

— Key words : *Actinobacillus equuli*, antimicrobial susceptibility, neonatal foal, random amplified polymorphic DNA analysis, retrospective analysis.

† Correspondence to : Atsuko YAMAMOTO (*Hokkaido Tokachi Livestock Hygiene Service Center*)

59-6 Kisen, Kawanishi-cho, Obihiro-shi, 089-1182, Japan

TEL 0155-59-2021 FAX 0155-59-2571 E-mail : nakatani.atsuko@pref.hokkaido.lg.jp

J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 73, 185 ~ 190 (2020)