

2015年に沖縄で山羊とその飼育環境土壌から分離されたロドコッカス・エクイの毒力の再検討

中尾聡子¹⁾ 石塚 駿²⁾ 川島 豪²⁾ 中川竜太郎²⁾ 佐々木由香子²⁾
角田 勤²⁾ 鈴木康規²⁾ 高井伸二^{2)†}

1) 沖縄県家畜衛生試験場 (〒904-2241 うるま市兼箇段3-1)

2) 北里大学獣医学部 (〒034-8628 十和田市東二十三番町35-1)

(2020年3月5日受付・2020年5月25日受理)

要 約

山羊における国内初のロドコッカス・エクイ感染症例を沖縄県肉用繁殖山羊農場のボア一種で認め、その分離株が毒力関連抗原遺伝子 (*vapA* と *vapB*) のPCRで陰性を示したことから、無毒株であると報告した (日獣会誌, 68, 751-755, 2015)。その後、新たな毒力関連抗原遺伝子 *vapN* がイギリスの牛分離株で2015年に報告され、その病理所見が山羊症例ときわめて類似していたことから、今回、毒力の再検討を実施した。その結果、山羊分離株32株のすべて (100%) と土壌分離株29株中10株 (34.5%) が *vapN* 遺伝子陽性であった。以上の成績から、国内初の山羊症例は *vapN* 遺伝子陽性の新型病原性プラスミドを保有する毒力株による感染症であったことが明らかとなった。

——キーワード：山羊, *Rhodococcus equi*, *vapN*。

-----日獣会誌 73, 582~584 (2020)

Rhodococcus equi (*R. equi*) の病原性は病原性プラスミドと毒力関連抗原により規定されることが明らかになっている。馬に対する強毒株は毒力関連抗原遺伝子 *vapA* を保有する病原性プラスミド pVAPA を、豚に対する中等度毒力株は毒力関連抗原遺伝子 *vapB* を保有する病原性プラスミド pVAPB を保有する [1]。2015年本誌に国内初の山羊のロドコッカス・エクイ感染症を報告し、*vapA* 遺伝子並びに *vapB* 遺伝子陰性であったことから無毒株によるものであると報告した [2]。同年、イギリスにおいて牛の病変部分離株から、新たな毒力関連抗原遺伝子 *vapN* と病原性プラスミドである線状プラスミド pVAPN が報告された [3]。その後、わが国でも食肉検査場において病変を示す牛から pVAPN を保有するロドコッカス・エクイが分離され [4]、日本国内にも存在することが明らかとなった。その後、病原性プラスミド pVAPN 保有株による山羊、人、犬などにおける感染例も相次いで報告されている [5-7]。今回、2015年に無毒株と報告した山羊並びに土壌分離株について *vapN* 遺伝子の検索、線状プラスミドの検出を実施した。

材料及び方法

使用菌株：発生農場は沖縄県北部地域の肉用山羊繁殖農場でボア一種雄5歳1頭が2013年12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ところ、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32株、隣接草地土壌から29株の *R. equi* が分離された [2]。これらの分離株を以下の検査に供した。

病原性プラスミドの検出並びに *vapN* 遺伝子検索：分離株について、既報に従って *vapN* 遺伝子の検索をPCR法で、線状病原性プラスミドの検出をパルスフィールドゲル電気泳動法 (PFGE) で実施した [3]。

成 績

***vapN* 遺伝子の検索**：PCRにより *vapN* 遺伝子を検索したところ、山羊分離株32株すべて (100%) と、土壌分離株29株中10株 (34.5%) が陽性となった。陽性となったすべての株について、PFGEにより線状プラスミドの分離を試みたところ、分子量マーカー97kbの少

† 連絡責任者：高井伸二 (北里大学獣医学部獣医衛生学研究室)

〒034-8628 十和田市東二十三番町35-1

☎ 0176-24-9458 FAX 0176-24-8703

E-mail : takai@vmas.kitasato-u.ac.jp

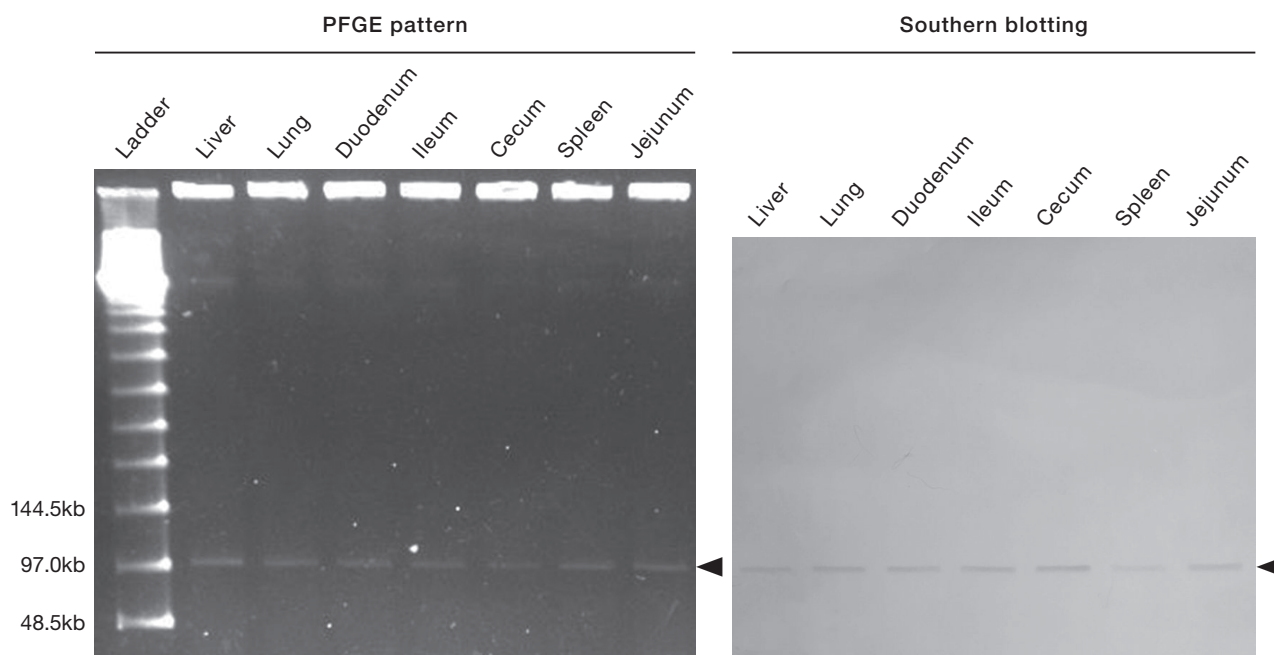


図 山羊の病変部由来分離株（肝臓，肺，十二指腸，回腸，盲腸，脾臓，空腸）のPFGE像とサザンプロットの結果
LadderはLambda PFG ladderを用いた。矢頭はそれぞれの菌株が保有するpVAPNの位置を示す。

し上に1本のバンドが確認された（図）。そのゲルをニトロセルロース膜に転写し、*vapN* 遺伝子をプローブとしたサザンハイブリダイゼーションを実施したところ、プローブが結合しDNAバンドが検出された（図）。

考 察

2015年に沖縄県の山羊における肉芽腫性回腸炎、腸間膜リンパ節等の壊死性肉芽腫性リンパ節炎を国内初のロドコッカス・エクイ感染症と診断し、毒力関連抗原遺伝子 *vapA* と *vapB* をコードする病原性プラスミドを保有していないことから、無毒株による感染例と報告した [2]。追加調査の結果、山羊分離株は新規毒力関連抗原遺伝子 *vapN* をコードする病原性プラスミド pVAPN を保有する毒力株であった。

これまで著者が馬，豚，及び AIDS 患者等において報告した病原性プラスミド pVAPA と pVAPB が環状プラスミドで、その大きさが 80～95kb であるため、従来のプラスミド抽出法とアガロース電気泳動法で分離できる [8]。一方で、新規の病原性プラスミド pVAPN は約 120kb の大きなサイズの線状プラスミドで、通常のアガロースゲル電気泳動法ではプラスミド DNA をバンドとして分離できず、パルスフィールドゲル電気泳動法のみで可能である [3]。中尾ら [2] の報告では、*vapA* 遺伝子と *vapB* 遺伝子が陰性であったことから無毒株と判定されたが、追加調査により 97kb から 144.5kb のマーカーの間に 1 本のバンドが検出され、それらが *vapN* 遺伝子をコードしていることが示された。これらのバンドは Valero-Rello ら [3] の報告における新規の

線状プラスミド pVAPN のサイズと一致している。

山羊の剖検所見では腸間膜リンパ節の腫大が顕著で、広範な壊死を伴う肉芽腫性病変が認められたが、毒力関連抗原遺伝子 *vapA* と *vapB* が陰性であったことから、宿主側に免疫不全などの原因があり、結果として無毒株による感染症と考察した [2]。その後、わが国でも pVAPN を保有するロドコッカス・エクイによる牛の感染症が報告された [4]。この牛は食肉衛生検査所で敗血症と判定され、肺に多発性の腫瘍（肉芽腫病変）と、肺門，肝門，腸間膜，第四胃のリンパ節の腫大を呈していた [4]。牛においてもきわめて強い病変形成がみられた。

飼育環境土壌分離株 29 株中 10 株（34.5%）が陽性となり、発症山羊の飼育環境土壌はすでに pVAPN 保有株に汚染されていたことが明らかとなった。2015 年の報告 [2] 以降、わが国でも牛 [4] や山羊（私信）における発症例が見出されていることから、すでに国内の牛，山羊などの反芻獣の飼育環境には pVAPN 保有株が伝播しているものと思われる。発生農場を含めた山羊飼育施設における抗体調査，糞便・土壌からの菌分離など疫学調査を継続し，本菌の汚染状況を明らかにしたい。

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] 中尾聡子，荒木美穂，津波 修，高木和香子，加藤貴誉湖，稗田 優，高井伸二，三上 修：山羊のロドコッカス・エクイ感染症国内初症例，日獣会誌，68，751-755（2015）
- [3] Valero-Rello A, Hapeshi A, Anastasi E, Alvarez S,

- Scortti M, Meijer WG, MacArthur I, Vázquez-Boland JA : An invertron-like linear plasmid mediates intracellular survival and virulence in bovine isolates of *Rhodococcus equi*, *Infect Immun*, 83, 2725-2737 (2015)
- [4] Nakagawa R, Moki H, Hayashi K, Ooniwa K, Tokuyama K, Kakuda T, Yoshioka K, Takai S : A case report on disseminated *Rhodococcus equi* infection in a Japanese black heifer, *J Vet Med Sci*, 80, 819-822 (2018)
- [5] Stranahan LW, Plumlee QD, Lawhon SD, Cohen ND, Bryan LK : *Rhodococcus equi* infections in goats: characterization of virulence plasmids, *Vet Pathol*, 55, 273-276 (2018)
- [6] Ribeiro MG, Lara GHB, da Silva P, Franco MMJ, de Mattos-Guaraldi AL, de Vargas APC, Sakate RI, Pavan FR, Colhado BS, Portilho FVR, Motta RG, Kakuda T, Takai S : Novel bovine-associated pVAPN plasmid type in *Rhodococcus equi* identified from lymph nodes of slaughtered cattle and lungs of people living with HIV/AIDS, *Transbound Emerg Dis*, 65, 321-326 (2018)
- [7] Portilho FVR, Paes AC, Megid J, Hataka A, Neto RT, Headley SA, Oliveira TES, Colhado BS, de Paula CL, Guerra ST, Mota AR, Listoni FJP, Takai S, Ribeiro MG : *Rhodococcus equi* pVAPN type causing pneumonia in a dog coinfecting with canine morbillivirus (distemper virus) and *Toxoplasma gondii*, *Microb Pathogenesis*, 129, 112-117 (2019)
- [8] Takai S, Tharavichitkul P, Takarn P, Khantawa B, Tamura M, Tsukamoto A, Takayama S, Yamatoda N, Kimura A, Sasaki Y, Kakuda T, Tsubaki S, Maneekarn N, Sirisanthana T, Kirikae T : Molecular epidemiology of *Rhodococcus equi* of intermediate virulence isolated from patients with and without AIDS in Chiang Mai, Thailand, *J Infect Dis*, 188, 1717-1723 (2003)

Re-examination of Virulence of *Rhodococcus equi* Isolates from an Infected Goat and Its Environmental Soil in Okinawa Reported in 2015

Satoko NAKAO¹⁾, Shun ISHIZUKA²⁾, Go KAWASHIMA²⁾, Ryutaro NAKAGAWA²⁾,
Yukako SASAKI²⁾, Tsutomu KAKUDA²⁾, Yasunori SUZUKI²⁾
and Shinji TAKAI^{2)†}

1) *Okinawa Prefectural Institute of Animal Health, 3-1 Kanekadan, Uruma, 904-2241, Japan*

2) *Kitasato University, School of Veterinary Medicine, 35-1 Higashinijusanbancho Towada, 034-8628, Japan*

SUMMARY

Rhodococcus equi isolates from an infected Boa goat in Okinawa reported in 2015 (*J. Jpn. Vet. Med. Assoc.*, 68, 751-755, 2015) were re-examined with PCR for virulence-associated protein antigen N gene (*vapN*), which was recently found in bovine isolates in the U.K., and granulomatous lesions on the organs in the cattle were similar to those in the goat. *VapN* was detected in all 32 isolates from the organs of the goat, and they possessed a novel linear virulence plasmid. Ten (34.5%) of 29 environmental isolates from soil on the goat farm were *vapN*-positive. These results revealed that the goat was infected by *vapN*-positive *R. equi*, not avirulent as previously reported. — Key words : goat, *Rhodococcus equi*, *vapN*.

† Correspondence to : Shinji TAKAI (*Kitasato University, School of Veterinary Medicine*)

35-1 Higashinijusanbancho Towada, 034-8628, Japan

TEL 0176-24-9458 FAX 0176-24-8703 E-mail : takai@vmas.kitasato-u.ac.jp

J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 73, 582 ~ 584 (2020)