

輸入肥育用馬における腺疫菌の保有状況調査及び 分離菌株の SeM 遺伝子解析

中島 溪¹⁾ 粕谷和史^{1)†} 大島美美¹⁾ 漆崎祥平¹⁾ 鶴飼 寿²⁾
住吉理穂¹⁾ 田上勝則¹⁾ 丹羽秀和³⁾

- 1) 農林水産省動物検疫所門司支所 (〒 800-0113 北九州市門司区新門司北 3-1-2)
2) 農林水産省動物検疫所成田支所 (〒 282-0001 成田市三里塚大字天浪字西原 254-1)
3) 日本中央競馬会競走馬総合研究所 (〒 329-0412 下野市柴 1400-4)

(2020年6月19日受付・2021年4月30日受理)

要 約

腺疫は腺疫菌の感染によって起こるウマ科動物特有の感染症で、世界中で発生がみられている。2019～2020年に輸入された肥育用馬 1,303 頭の腺疫菌の保有状況調査を実施したところ、フランス産の無症状馬 11 頭から rPCR により腺疫菌の遺伝子が検出され、そのうち 3 頭から腺疫菌を分離した。この 3 株に、2018～2019年にカナダ産肥育用馬及びベルギー産乗用馬の腺疫発症馬から分離された 4 株を加えた計 7 株の SeM 遺伝子領域の DNA 解析を実施したところ、フランス由来 2 株が新たな SeM 型 (SeM-200) に型別された。また分子系統樹解析の結果、フランス由来の 3 株とベルギー由来の 1 株で、カナダ由来株とは異なるクラスターが形成された。本研究の結果、輸入肥育用馬の中に腺疫の無症状保菌馬が存在することが分かった。——キーワード：動物検疫, 分子疫学, 腺疫。

-----日獣会誌 74, 636～639 (2021)

腺疫は *Streptococcus equi* subsp. *equi* (腺疫菌) の感染によって起こるウマ科動物特有の感染症で、ヨーロッパや北米を含む世界中で発生がみられている [1-3]。腺疫発症馬は発熱し膿性鼻汁を排出、下顎リンパ節など頭部のリンパ節や咽喉頭リンパ節に膿瘍を形成し、膿瘍はしばしば自潰する [1, 2, 4]。腺疫は伝染性が強く、国際獣疫事務局 (OIE) は、腺疫をリスト疾病に含めてはいないものの、重要な感染症として馬群への侵入防止対策を推奨している (<https://www.oie.int/app/uploads/2021/03/oie-guideline-for-establishment-of-anedfz.pdf>), (accessed 2021-05-06)。わが国においては、散発的に腺疫の発生が報告されている [5-7]。

腺疫菌は *Streptococcus equi* M-like protein (SeM) と呼ばれる病原性に係る膜タンパク質を持ち、SeM をコードする遺伝子領域の分子系統樹解析が、疫学調査に用いられている [8-13]。著者ら [14] も以前、2010～2017年にカナダから輸入された肥育用馬 12 頭から分離した腺疫菌 12 株の SeM 遺伝子領域の解析を実施し、その結果を報告した。

動物検疫所においては、肥育用馬を中心として、輸入

検疫期間中に腺疫発症馬をまれに認めるが、無症状馬を含めた輸入馬全体の腺疫菌の保有状況については不明である。本研究では、輸入馬の大半を占めるカナダ産肥育用馬及び近年輸入頭数が増加傾向にあるフランス産肥育用馬を対象に、輸入検疫中に腺疫の臨床症状を示していない馬の腺疫菌保有状況を調査した。さらに、輸入検疫中の馬から分離された腺疫菌 7 株の SeM 遺伝子解析を実施し、前報 [14] と比較した。

材料及び方法

腺疫菌保有状況調査：2019～2020年に輸入され、動物検疫所新門司検疫場または太刀浦検疫場で係留検査を実施したカナダ産肥育用馬 969 頭、フランス産肥育用馬 334 頭、合計 1,303 頭から鼻腔粘膜スワブを採取し、2ml の滅菌 PBS(-) 溶液に浸漬した。10 頭分を上限として、鼻腔粘膜スワブ浸漬溶液を 100 μ l ずつプールし、プール検体を作製した。DNA 簡易精製剤 (InstaGene Matrix, Bio-Rad Laboratories, Inc., U.S.A.) を用いてプール検体から DNA を抽出し、抽出した DNA をテンプレートとして rPCR を用いた腺疫菌の検出を行った。rPCR は

† 連絡責任者：粕谷和史 (農林水産省動物検疫所門司支所)

〒 800-0113 北九州市門司区新門司北 3-1-2

☎ 093-481-7335 FAX 093-481-7348

E-mail : kazufumi_kasuya160@maff.go.jp

既報 [15] に従い実施し、反応液の組成を一部変更して、それぞれの特異遺伝子を個別に検出するシングルプレックス rPCR とした。次に rPCR で陽性となったプール検体について、個別検体 1,000 μ l から同様に DNA を抽出し rPCR を実施した。さらに個別検体の rPCR で陽性となった鼻腔粘膜スワブを 5% 羊血液加コロンビア CNA 寒天培地 (日本ベクトン・ディッキンソン(株), 東京) (以下、「CNA 血液寒天培地」という) に画線塗布し、既報 [16, 17] により腺疫菌の分離及び同定を行った。

腺疫菌株：輸入検疫中に腺疫を発症した馬から分離された 4 株 (No. 13~16) 及び腺疫菌保有状況調査時に分離された 3 株 (No. 17~19) の計 7 株を集落形状の確認及び SeM 遺伝子解析に供試した。なお、No. 13 は 2018 年に新門司検疫場で係留検査を実施したカナダ産肥育用馬から、No. 14 は 2018 年に鹿児島空港出張所で係留検査を実施したカナダ産肥育用馬から、No. 15 は 2018 年に天浪検疫場で係留検査を実施したベルギー産乗用馬から、No. 16 は 2019 年に太刀浦検疫場で係留検査を実施したカナダ産肥育用馬からそれぞれ分離された。No. 17~19 は 2019 年に新門司検疫場で係留検査を実施したフランス産肥育用馬から分離された。

集落形状：供試菌株を CNA 血液寒天培地に画線塗布し、37℃ で 48 時間 5% CO₂ 存在下で培養後、発育した集落の形状を既報により分類した [18-20]。

SeM 遺伝子解析：供試菌株から抽出した DNA を用いて、前報 [14] と同様の方法により、PubMLST (<https://pubmlst.org/organisms/streptococcus-zooepidemicus>), (accessed 2021-05-06) のデータベースと照合して SeM 遺伝子型を決定するとともに、SeM 遺伝子領域の分子系統樹解析を実施した。

成 績

腺疫菌保有状況：1,303 頭のうち、フランスから輸入された 11 頭 (0.84%) から rPCR で腺疫菌の遺伝子が検出された。またそのうちの 3 頭から腺疫菌を分離した。なお、11 頭はいずれも無症状であった。

集落形状：No. 13~16 はマット型、No. 17~19 はムコイド型の集落形状を示した。

SeM 遺伝子解析：7 株は、No. 13 及び 14 は SeM-192, No. 15 は SeM-48, No. 16 は SeM-28, No.17 は SeM-9, No. 18 及び 19 は SeM-200 に各々 SeM 遺伝子型別された。なお、PubMLST のデータベースの改編に伴い、一部の SeM 遺伝子型が前報 [14] から変更となっている。これら 5 種類の SeM 遺伝子型株は、分子系統樹解析により、3つのクラスターに分類された (図)。

考 察

わが国向けに輸出される馬の家畜衛生条件において

は、輸出国の飼養農場で一定期間腺疫の発生がないことを求めているが、肥育用馬の輸入検疫段階でしばしば腺疫が摘発されており、今回の調査でさらに無症状保菌馬の存在も明らかとなった。肥育用馬は輸入後、肥育専用の農場で飼育され、と畜されるまでの間、他の用途の馬と接触する機会はないことから、国内の他の用途の馬へ拡大する可能性は低いと考えられるものの、過去には輸入乗用馬が感染源となった国内発生事例も報告されており、無症状保菌輸入馬により持ち込まれる腺疫菌により、国内での再流行も危惧される [7]。輸入検疫においてすべての無症状保菌馬を摘発することは困難であるが、今後も同様の調査を継続実施するとともに、その情報を輸入者や仕向先の都道府県に提供することで、着地検査期間における隔離飼育の適切な実施及び再流行の防止に寄与することが可能である。なお、今回の調査では、10 頭分を上限としてプールした検体を rPCR [15] に供したが、事前に実施した感度比較で、同定に用いた semi-nested PCR [16] と比べ、rPCR が約 10 倍高感度であることを確認していた。

腺疫菌は莢膜発現量の違いからムコイド型、マット型及びグロッシー型の 3 種類の集落型が知られている。ムコイド型集落株は典型的な腺疫発症馬から、マット型集落株はマイルドな症状を呈する非典型的な腺疫から分離されることが報告されている [18-20]。一方、馬への感染実験において、ムコイド型集落株とマット型集落株との間に病原性の違いは認められず、グロッシー型集落株の病原性は弱いとした報告もある [21]。また、持続感染馬から分離された菌株は莢膜発現量が少ないとの報告もある [22]。今回の分離 7 株のうち、腺疫発症馬から分離された 4 株はすべてマット型であったのに対し、無症状保菌馬から分離された 3 株はすべてムコイド型であった。腺疫菌の集落型と病原性との関連については、さらなる研究が必要と考えられる。

分子系統樹解析の結果、フランス由来株 (SeM-9 及び 200) とベルギー由来株 (SeM-48) は、過去のわれわれの解析においてはみられなかった特有なクラスターを形成した。SeM-9 はイギリス由来の株とされ、SeM-48 もイギリスにおける分離報告がある [9, 13]。一方、今回新たな SeM 型として登録された SeM-200 は、2016 年にスウェーデンで分離された SeM-151 と近縁であった (図には示していない)。これらのことから、本研究で分離されたフランス由来株とベルギー由来株は、近年のヨーロッパ由来株として一つの大きなクラスターを形成している可能性が考えられた。一方、カナダ由来の 3 株は、前報 [14] で分離されたカナダ由来株が形成したいずれかのクラスターに属していたが、輸出者ごとに異なるクラスターを形成する傾向を示した前報 [14] とは異なり、同一の輸出者 (図中では、輸出

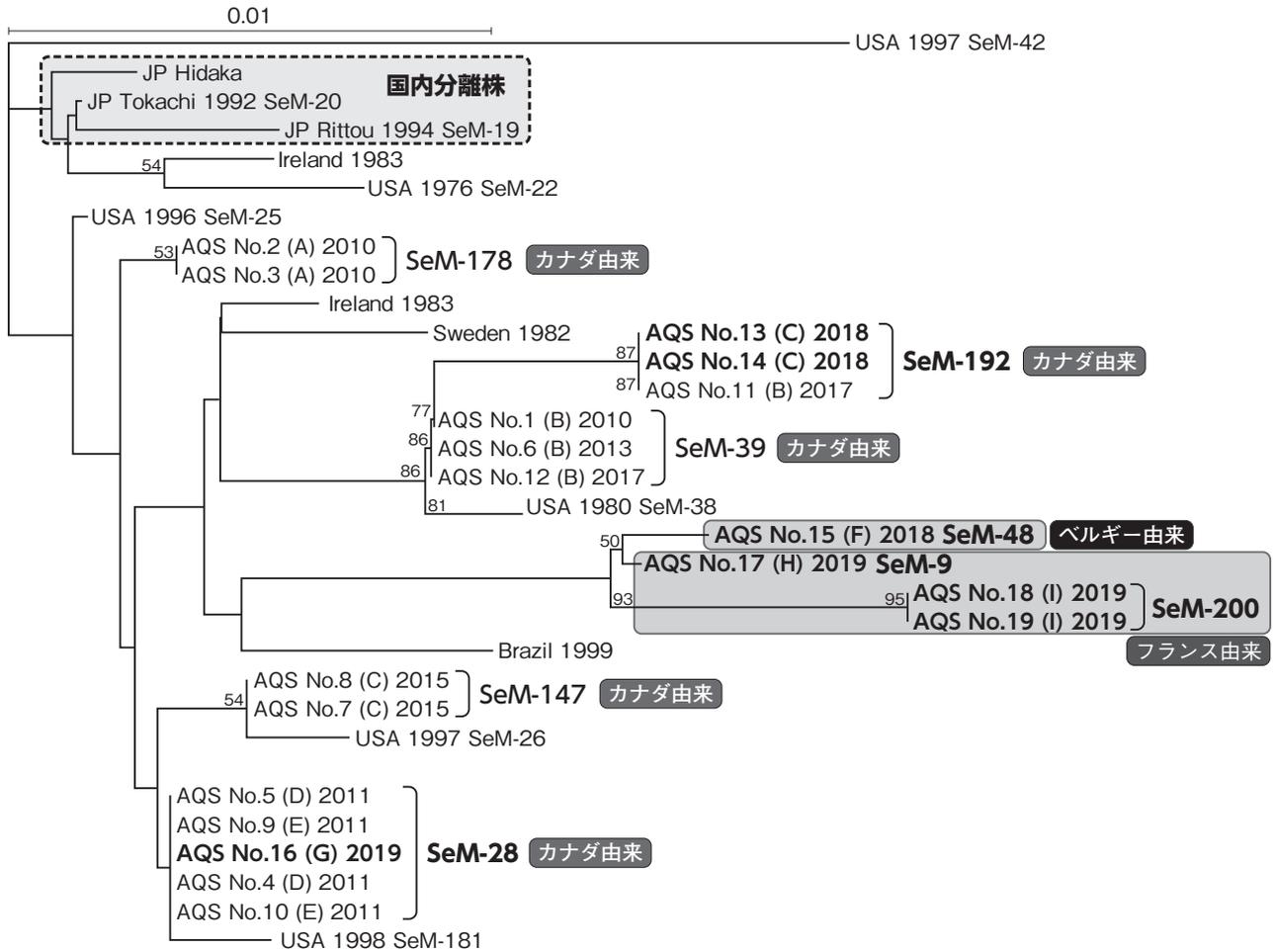


図 SeM 遺伝子領域の分子系統樹
 株名の JP は国内分離株を, AQS は輸入検疫分離株を, それ以外は国外分離株の国名をそれぞれ示す。
 () 内のアルファベットは輸出者を, その後の数字は分離年を示す。
 また, 菌株名の右側には SeM 型を示し, 本研究の供試菌株は太字で示した。
 系統樹上の数値はブートストラップ値 (パーセント表示) で, 50%以上を表示した。
 スケールバーは塩基置換率を示す。

者 C) から異なるクラスターに属する株が分離されたことから, カナダ国内で腺疫菌が拡散もしくは伝播された可能性が示唆された。

引用文献

[1] Sweeney CR, Timoney JF, Newton JR, Hines MT : *Streptococcus equi* infections in horses: Guidelines for treatment, control, and prevention of strangles, J Vet Intern Med, 19, 123-134 (2005)

[2] Timoney JF : The pathogenic equine streptococci, Vet Res, 35, 397-409 (2004)

[3] Waller AS, Jolley KA : Getting a grip on strangles: Recent progress towards improved diagnostics and vaccines, Vet J, 173, 492-501 (2007)

[4] Waller AS : New perspectives for the diagnosis, control, treatment, and prevention of strangles in horses, Vet Clin N Am-Equine, 30, 591-607 (2014)

[5] Anzai T, Nakanishi A, Wada R, Higuchi T, Hagiwara S, Takazawa M, Oobayashi K, Inoue T : Isolation of

Streptococcus equi subsp. *equi* from thoroughbred horses in a racehorse-breeding area of Japan, J Vet Med Sci, 59, 1031-1033 (1997)

[6] 帆保誠二, 村中雅則, 丹羽秀和, 内山孝志, 依田真理, 鈴木優美子, 前田守幸 : 腺疫集団発生事例における腺疫特異的血清診断法の応用ならびに分離腺疫菌株の遺伝学的解析, 日獣会誌, 63, 696-701 (2010)

[7] 片山雅一, 深山美和子, 古屋聡子, 桑本 康, 帆保誠二, 安齊 了 : 輸入馬を感染源とする腺疫の集団発生事例の疫学解析, 日獣会誌, 56, 139-143 (2003)

[8] Anzai T, Kuwamoto Y, Wada R, Sugita S, Kakuda T, Takai S, Higuchi T, Timoney JF : Variation in the N-terminal region of an M-like protein of *Streptococcus equi* and evaluation of its potential as a tool in epidemiologic studies, Am J Vet Res, 66, 2167-2171 (2005)

[9] Ivens PAS, Matthews D, Webb K, Newton JR, Steward K, Waller AS, Robinson C, Slater JD : Molecular characterisation of 'strangles' outbreaks in the UK: The use of M-protein typing of *Streptococcus equi* ssp. *equi*, Equine Vet J, 43, 359-364 (2011)

- [10] Kelly C, Bugg M, Robinson C, Mitchell Z, Davis-Poynter N, Newton JR, Jolley KA, Maiden MCJ, Waller AS : Sequence variation of the SeM gene of *Streptococcus equi* allows discrimination of the source of strangles outbreaks, *J Clin Microbiol*, 44, 480-486 (2006)
- [11] Libardoni F, Vielmo A, Farias L, Matter LB, Pötter L, Spilki FR, de Vargas AC : Diversity of SeM in *Streptococcus equi* subsp. *equi* isolated from strangles outbreaks, *Vet Microbiol*, 162, 663-669 (2013)
- [12] Lindahl S, Söderlund R, Frosth S, Pringle J, Båverud V, Aspán A : Tracing outbreaks of *Streptococcus equi* infection (strangles) in horses using sequence variation in the seM gene and pulsed-field gel electrophoresis, *Vet Microbiol*, 153, 144-149 (2011)
- [13] Parkinson NJ, Robin C, Newton JR, Slater J, Waller AS : Molecular epidemiology of strangles outbreaks in the UK during 2010, *Vet Rec*, 168, 666 (2011)
- [14] Kasuya K, Tanaka N, Oshima F, Fujisawa N, Saito M, Tagami K, Niwa H, Sasai K : Genetic analysis of *Streptococcus equi* subsp. *equi* isolated from horses imported into Japan, *J Vet Med Sci*, 81, 924-927 (2019), (DOI: <https://doi.org/10.1292/jvms.18-0656>), (accessed 2021-05-06)
- [15] Cordonì G, Williams A, Durham A, Florio D, Zanoni RG, La Ragione RM : Rapid diagnosis of strangles (*Streptococcus equi* subspecies *equi*) using PCR, *Res Vet Sci*, 102, 162-166 (2015)
- [16] Anzai T, Hobo S, Niwa H : Development of a diagnostic shuttle PCR test targeting the *Streptococcus equi* SeM gene, *J Equine Sci*, 17, 101-104 (2006)
- [17] Kuwamoto Y, Anzai T, Wada R : Microplate sugar-fermentation assay distinguishes *Streptococcus equi* from other Streptococci of Lancefield's Group C, *J Equine Sci*, 12, 47-49 (2001)
- [18] Spanier JG, Timoney JF : Bacteriophages of *Streptococcus equi*, *J Gen Virol*, 35, 369-375 (1977)
- [19] Prescott JF, Srivastava SK, deGannes R, Barnum DA : A mild form of strangles caused by an atypical *Streptococcus equi*, *J Am Vet Med Assoc*, 180, 293-299 (1982)
- [20] Timoney JF : Shedding and maintenance of *Streptococcus equi* in typical and atypical strangles, *Equine Infectious Diseases V*, Powell D, eds, 28-33, University of Kentucky Press, Kentucky (1989)
- [21] Anzai T, Timoney JF, Kuwamoto Y, Fujita Y, Wada R, Inoue T : In vivo pathogenicity and resistance to phagocytosis of *Streptococcus equi* strains with different levels of capsule expression, *Vet Microbiol*, 67, 277-286 (1999)
- [22] Harris SR, Robinson C, Steward KF, Webb KS, Paillot R, Parkhill J, Holden MTG, Waller AS : Genome specialization and decay of the strangles pathogen, *Streptococcus equi*, is driven by persistent infection, *Genome Res*, 25, 1360-1371 (2015)

Survey of *Streptococcus equi* subsp. *equi* in Imported Draft Horses and SeM Genetic Analysis of Isolates

Kei NAKAJIMA¹⁾, Kazufumi KASUYA^{1)†}, Fumi OSHIMA¹⁾, Shohei URUSHIZAKI¹⁾, Hisashi UKAI²⁾, Riho SUMIYOSHI¹⁾, Katsunori TAGAMI¹⁾ and Hidekazu NIWA³⁾

- 1) *Animal Quarantine Service, Moji Branch, MAFF, 3-1-2 Shinmojikita, Moji, Kitakyushu, 800-0113, Japan*
- 2) *Animal Quarantine Service, Narita Branch, MAFF, 254-1 Aza-nishihara, Oaza-tennami, Sanrizuka, Narita, 282-0001, Japan*
- 3) *Equine Research Institute, Japan Racing Association, 1400-4 Shiba, Shimotsuke, 329-0412, Japan*

SUMMARY

Strangles, which is caused by *Streptococcus equi* subsp. *equi*, is an important commonly diagnosed bacterial infectious disease of equids worldwide. In the present study, we investigated the prevalence of *S. equi* in 1,303 imported draft horses quarantined at the Japanese border by the Animal Quarantine Service from 2019 to 2020. Eleven asymptomatic horses from France tested positive on rPCR. Three *S. equi* strains were isolated from three individuals. We performed SeM genetic analysis on these three strains, in addition to four other strains isolated from Canadian draft horses and a Belgian riding horse that were developing strangles. The two strains from the French isolates were classified into a new SeM allelic group (SeM-200). Molecular phylogenetic tree analysis suggested that the French and Belgian strains were closely related and classified into different clusters from the Canadian strains. This study identified asymptomatic carriers of strangles among imported draft horses. — Key words : animal quarantine, molecular epidemiology, strangles.

† Correspondence to : Kazufumi KASUYA (Animal Quarantine Service, Moji Branch, MAFF)

3-1-2 Shinmojikita, Moji, Kitakyushu, 800-0113, Japan

TEL 093-481-7335 FAX 093-481-7348 E-mail : kazufumi_kasuya160@maff.go.jp

J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 74, 636 ~ 639 (2021)