

【原 著】 産業動物

子馬のロドコッカス・エクイ感染症の 10年間にわたる回顧的調査と対策の推進

本間慎太郎^{1,2)} 篠田 理恵¹⁾ 武智 茉里¹⁾ 前田友起子¹⁾ 一條 満¹⁾

1) 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 丁目88番地の 5

2) 農林水産省消費・安全局動物衛生課 (〒100-8950 東京都千代田区霞が関 1 丁目 2 番 1 号)

要 約

過去10年間の日高家畜保健衛生所の *Rhodococcus equi* (*R. equi*) 分離事例を回顧的調査した。*R. equi* は子馬の死亡原因の29.7%を占め、平均死亡日齢は84.2日であった。気管洗浄液の50.0%から *R. equi* が分離され、平均分離日齢は55.9日であった。死亡子馬の病態の10年間平均値は肺型32.5%、腸管型6.0%、混合型61.5%であった。病原プラスミドは、87 kbIIa型が73.3%、90 kbI型が17.1%で大部分を占めた。リファンピシン耐性は8株確認された。土壌生存試験では有機物の添加でも6週間生存していた。消毒効果試験では塩素系消毒薬と濃度50%以上のエタノールで効果が確認された。過去10年間で流行株および病態に変化はないが、薬剤耐性株出現による治療効果の低減が示唆された。分離日齢から、子馬は生後1カ月以内に厩舎内で感染していると推察された。厩舎の塩素系消毒薬による消毒、薬剤耐性株モニタリング、早期摘発が重要であると考えられた。

キーワード：ロドコッカス・エクイ 疫学的解析 分離株解析 性状試験

-----北獣会誌 63, 389～393 (2019)

ロドコッカス・エクイ感染症(本症)は、*Rhodococcus equi* (*R. equi*) の感染により、子馬の肺や腹腔内のリンパ節等に膿瘍を形成する難治性の疾患である。*R. equi* は莢膜を保有する土壌菌で、子馬は主に放牧地において感染するとされている。馬に病原性を示すのは、病原プラスミドを保有する強毒株であり、病原プラスミドを持たない無毒株における本症は報告されていない^[1,2]。また、本症で死亡した子馬の病態は、肺にのみ膿瘍がみられる肺型、腹腔内のリンパ節のみに膿瘍がみられる腸型、両方がみられる混合型がある^[3]。

近年、日高家畜保健衛生所(当所)の病性鑑定において、本症を疑う検体および *R. equi* が分離される事例が増加している(図1)。そのため、疫学的解析および分離株解析を行い、過去10年間の回顧的調査を実施した。また、これまでほとんど報告がない *R. equi* の性状試験を実施し、増加要因の分析および対策方法の再検討を行った。

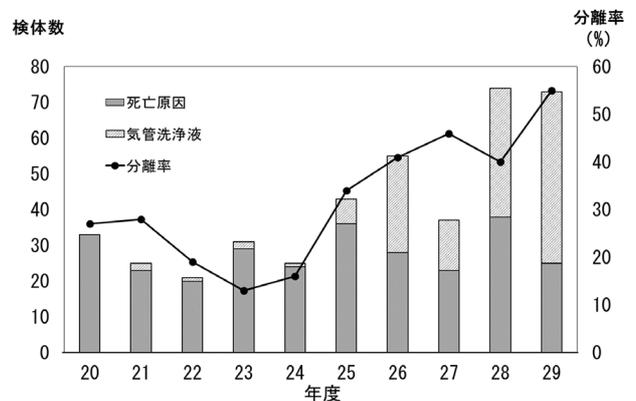


図1. 日高家畜保健衛生所の病性鑑定における子馬からの *R. equi* 分離率

材料および方法

1. 疫学的解析

疫学的解析は、平成20年4月～29年9月末までの当所における子馬の死亡原因を検索した全279件および呼吸

連絡責任者：一條 満 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 丁目88番地の 5
TEL 0146-42-1333 FAX 0146-42-0542 E-mail: ichijou.michiru@pref.hokkaido.lg.jp

器病原原因検索のため搬入された気管洗浄液全138件の病性鑑定データを用いた。*R. equi*の分離率を調査し、死亡子馬の病態分類および*R. equi*分離日齢について分析した。

2. 分離株解析

(1) 病原プラスミド解析

病原プラスミド解析は、疫学的解析と同時期に日高管内で分離した*R. equi*322株について、高井らの手法に準じRFLP法により実施した^[4]。すなわち、血液寒天培地で24時間培養した*R. equi*株のコロニーを液体培地で30℃48時間培養後、アルカリ法で溶菌してプラスミドを抽出する。抽出したプラスミドを、制限酵素の*EcoRI*で処理し、電気泳動により得られた切断パターンを比較・分類した。

(2) 薬剤感受性試験

薬剤感受性試験は、病原プラスミド解析を実施した株のうち98株について、臨床検査標準協会 (Clinical and Laboratory Standards Institute : CLSI) で定めた標準的試験法に従い、微量液体希釈法により最小発育阻止濃度 (MIC) を測定した^[5,6]。測定は、アンピシリン (ABPC)、セファゾリン (CEZ)、セフトロフル (CTF)、ゲンタマイシン (GM)、ミノサイクリン (MINO)、ドキシサイクリン (DOXY)、アジスロマイシン (AZM)、クラリスロマイシン (CAM)、リファンピシン (RFP)、エンロフロキサシン (ERFX)、マルボフロキサシン (MAR) およびイミペネム (IPM) の抗菌剤について実施した^[5-7]。

3. 性状試験

(1) 土壌中生存試験

*R. equi*の環境中における生存期間を調査した。土壌は市販のさし芽用無菌土と、有機物が生存期間へ影響することを考慮し、無菌土に有機物として滅菌した馬糞便を重量10%添加した土を用い、無菌土50 kgに対し発症馬排菌量相当 (10^8 CFU/ml) の*R. equi*菌液を1 l接種した。表層から深度0 cm、10 cm、20 cmおよび30 cm地点における菌量について経時的に6週間測定した。

(2) 消毒効果試験 (実験室内)

*R. equi*に対する消毒薬の効果を調査した。試験は秋山らの方法に従い実施した^[8]。消毒薬は、塩素系消毒薬 (50~6,400倍)、複合次亜塩素酸系消毒薬 (50~6,400倍)、逆性石鹼 (50~6,400倍)、エタノール (1.5~100%) および10%消石灰液 (消石灰沈殿後の上清) を使用した。

(3) 消毒効果試験 (環境試料)

環境中における消毒薬の効果を調査した。環境試料 (重量1 kg) として発症馬排菌量相当 (10^8 CFU/ml) の*R. equi*菌液500 mlを接種した乾草を用い、希釈した各種消毒薬500 mlまたは1 lを散布後に攪拌して24時間感作させた。消毒薬は使用説明書に記載されている推奨希釈倍率をもとに、塩素系消毒薬 (500、1,000、3,000倍)、複合次亜塩素酸系消毒薬 (500、2,000倍)、逆性石鹼 (500、2,000倍)、70%エタノールおよび10%消石灰液を使用した。乾草20 gに滅菌生理食塩水200 mlを添加し、懸濁液を回収した。懸濁液の遠心沈渣をNANAT培地に接種し、菌量を測定した。なお、消毒については3日間継続して実施した。

結果および考察

1. 疫学的解析

(1) 子馬からの*R. equi*分離状況

子馬の死亡原因279件のうち、本症による死亡は29.7%を占めており、子馬の死亡原因の最大原因であった。また、気管洗浄液138件における*R. equi*の分離率は、全体の50.0%を占めた (図2)。本症は子馬の難治性細菌性感染症で、世界各国の馬産地で発生しており^[9,10]、気管内においても子馬の死亡および呼吸器病の主たる原因

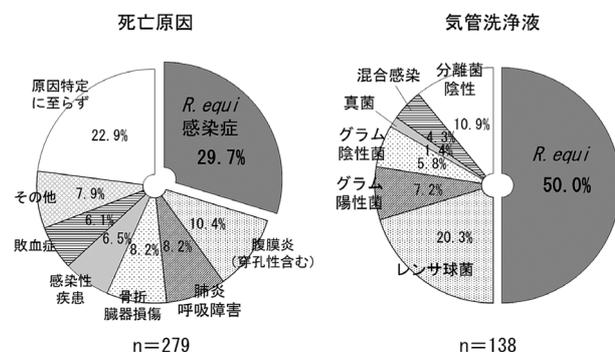


図2. 子馬からの*R. equi*分離状況

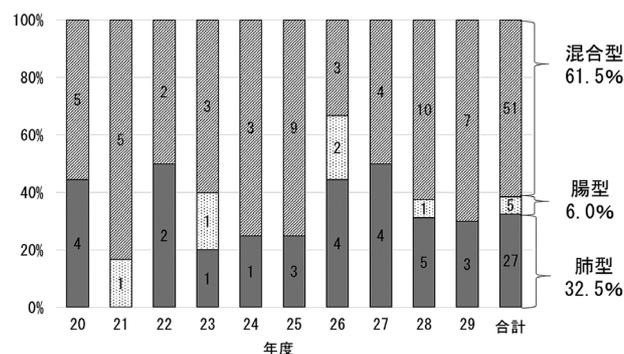


図3. ロドコッカス・エクイ感染症による死亡子馬の病態分類

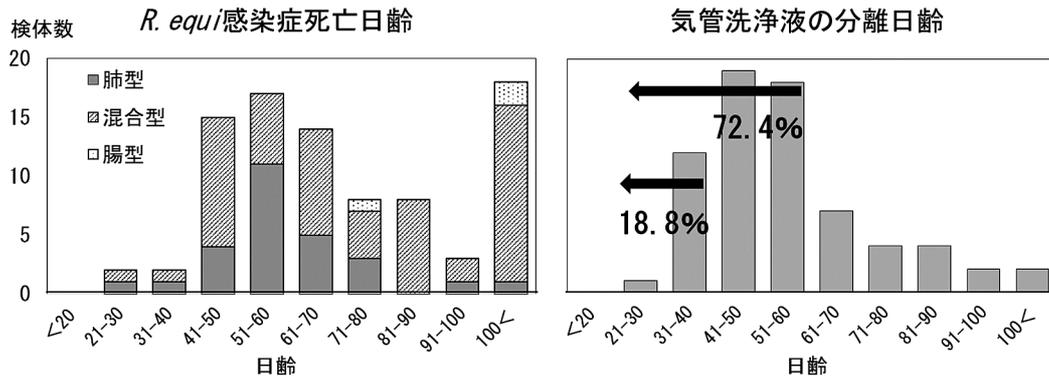


図4. R. equi分離日齢

であることが改めて確認された。

(2) 本症で死亡した子馬の病態分類

10年間の病態分類の平均値は、混合型が最も多く61.5%、肺型は32.5%、腸型は6.0%であった。なお、各年度における病態の傾向に大きな差はみられなかった(図3)。

(3) R. equi分離時の日齢

本症の死亡時平均日齢は84.2(23~295)日で、40日齢以下の若齢でも死亡例が確認された。気管洗浄液からのR. equi分離平均日齢は55.9(30~123)日で、60日齢以下が72.4%を占め、40日齢以下でも18.8%から分離された(図4)。これらのことから、生後1カ月にはR. equiに感染していると推察された。空気中からのR. equi検出率は、滞在期間の長い場所や厩舎で高いという報告[11,12]もあり、この時期は、厩舎に滞在する期間が長い場合、厩舎内の感染リスクは高いと考えられた。

2. 分離株解析

(1) 病原プラスミド解析

病原プラスミド解析では、87 kbIIa型が73.3%、90 kbI型が17.1%で、2つのタイプが大部分を占めた。また、

国内未報告の85 kbI型が1株確認されたが、各年度におけるプラスミド型の傾向に、大きな差はみられなかった(図5)[1,3]。

(2) 薬剤感受性試験成績

各抗菌剤におけるMICの成績について、これまで日高管内では報告されていないRFP耐性株が8株確認され、その他、テトラサイクリン系耐性2株、マクロライド系耐性7株、ニューキノロン系耐性29株が確認された(表1)。これらの結果から、耐性株による治療効果の低減が考えられた。また、当管内は輸入馬も多く、馬の

	年度									合計(割合)		
	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29		
85kbI								1			1	0.3%
87kbIIa	8	20	50	52	45	1	15	7	18	20	236	73.3%
87kbIIc	1		2	1							4	1.2%
87kbIIe				2							2	0.6%
90kbI		7	8	8	20		1	3	5	3	55	17.1%
90kbIV			1								1	0.3%
型別不能	4			3		5	6	4	1		23	7.1%

図5. R. equi病原プラスミド解析成績

表1. 薬剤感受性試験成績

分類	薬剤名	濃度									系統別耐性株数	
		<0.06	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8	16		16<
ペニシリン系	ABPC							1	22	69	6	75
セファロスポリン系	CEZ										98	196
	CTF										98	
アミノグリコシド系	GM				8	42	44	4				0
テトラサイクリン系	MINO				5	10	79	3		1		2
	DOXY	2		6	5	28	56			1		
マクロライド系	AZM						3	90	4		1	7
	CAM	1	6	67	22				2			
キノロン系	ERFX				1	32	55	8	2			29
	MAR					5	74	18		1		
その他	RFP	13	34	26	14	2	1	1		1	6	8
カルバペネム系	IPM	21	73	4								0

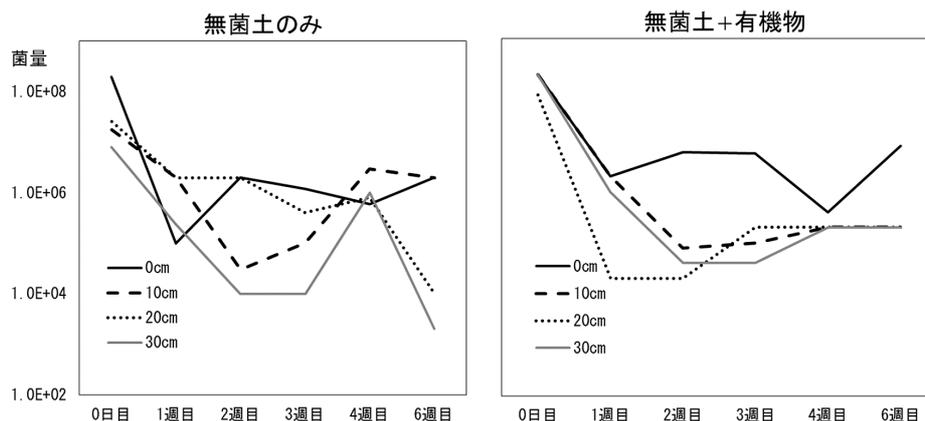


図6. *R. equi*の土壌中生存試験

表2. 実験室内における消毒効果試験

消毒薬	希釈倍率	感作時間				畜舎消毒 推奨希釈倍率
		30秒	1分	5分	10分	
塩素系	50~6,400倍	6,400倍 \leq	6,400倍 \leq	6,400倍 \leq	6,400倍 \leq	300~3,000
複合次亜塩素系	50~6,400倍	4,000倍	6,400倍 \leq	6,400倍 \leq	6,400倍 \leq	500~2,000倍
逆性石鹼	50~6,400倍	250倍	250倍	250倍	250倍	500~2,000
エタノール	1.5~100%	50%以上	50%以上	50%以上	50%以上	消毒用70%
10%消石灰液		効果なし	効果なし	効果なし	効果なし	

移動等に伴う新たなプラスミド型や耐性株の侵入と流行のリスクが懸念された。

3. 性状試験

(1) 土壌中生存試験

1週間隔で6週間、深度0~30 cmの菌量を測定した結果、菌量の減少はみられるものの、有機物の添加に関わらず、各深度の土壌中で6週間以上生存していた(図6)。

(2) 消毒効果試験(実験室内)

実験室内試験では、塩素系消毒薬は全ての感作時間で6,400倍以上、複合次亜塩素酸系消毒薬は、30秒では4,000倍、1、5、10分で6,400倍以上、逆性石鹼は、全ての感作時間で250倍、エタノールは、全ての感作時間で50%以上の濃度において効果がみられた。10%消石灰液は、全ての感作時間において効果が認められなかった。逆性石鹼は、使用説明書に記載されている推奨希釈倍率(50~6,400倍)では効果がみられなかった。推奨希釈倍率における濃度で効果が認められたのは、塩素系、複合次亜塩素酸系の消毒薬およびエタノールであった(表2)。

(3) 消毒効果試験(環境試料)

環境試料試験では、重量1 kgの乾草に対し塩素系消毒薬500倍希釈液を1 l散布した場合、および70%エタノールを500 ml散布した場合、1日後に*R. equi*は検出

限界以下となり、その後も検出されなかった。塩素系消毒薬1,000および3,000倍希釈では、1日後に菌数の減少が見られたが、その後は増加した。複合次亜塩素酸系消毒薬500および2,000倍希釈、逆性石鹼500および2,000倍希釈、10%消石灰液は、散布量にかかわらず、検査期間中、菌数の減少は認められなかった。効果がみられた消毒薬は、500倍希釈の塩素系消毒薬1 lを散布した場合と70%エタノール500 mlを散布した場合のみであった。実験室内で効果があった複合次亜塩素酸系消毒薬は効果がみられず、10%消石灰液および逆性石鹼は実験室と同様に効果がみられなかった(図7)。

消毒効果は塩素系では期待できるが、牧場で一般的に使用されている逆性石鹼では期待できず、環境で長期生存可能な*R. equi*は厩舎内で保持される可能性が考えられた。また、敷料の消毒は塩素系消毒薬やエタノールで効果が認められるものの実用性に欠くことから、現場での実施は困難と考えられた。

まとめ

今回の調査結果から、これまで放牧地における対策が主体であった本症の対策について、当所では、厩舎内における対策も必要と考え、再検討を行った。

(1) *R. equi*は環境中で長期生存が可能なため、牧場で

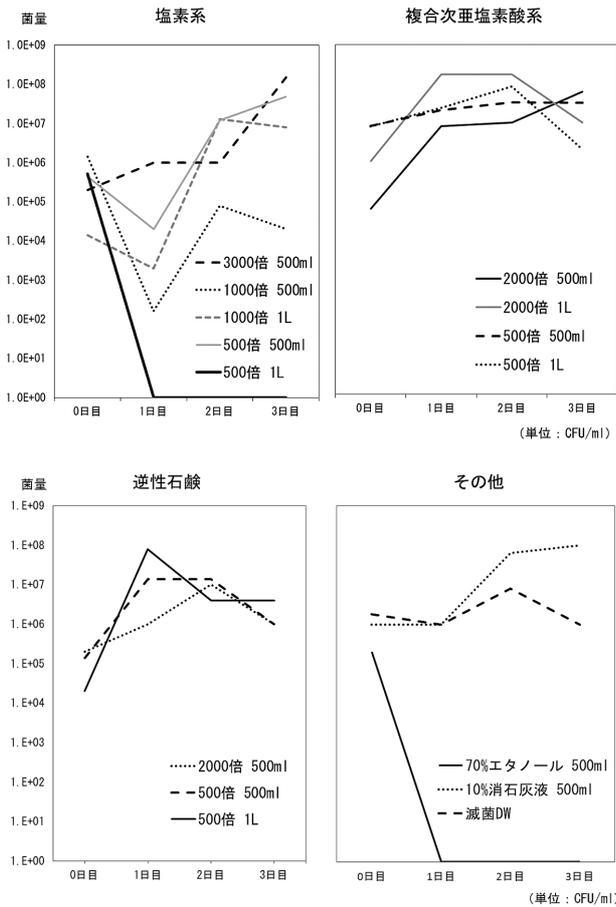


図7. *R. equi*の環境試料における消毒効果試験

は、分娩シーズンにおける敷料の再利用を行わず、分娩房や馬房の消毒には塩素系消毒薬を使用する。

(2) 薬剤耐性株の出現を抑えるため、抗菌剤の予防的投与は実施せず慎重使用し分離された菌については、耐性株モニタリングを継続的に実施する。

(3) 気管洗浄液の培養は早期診断法として有用であるため、汚染度が高い牧場では、一定月齢の子馬全頭を対象にした健康検査を検討する。

これらのことを関係機関・団体と連携して普及・啓発し、本症の対策を推進していきたい。

稿を終えるにあたり、分離株の解析および薬剤感受性試験にご指導・ご協力いただきました日本中央競馬会競走馬総合研究所の丹羽秀和先生、データ提供等にご協力いただきましたみなみ北海道農業共済組合日高支所家畜高度医療センターの樋口 徹先生に深謝いたします。

引用文献

[1] 片山芳也：子馬のロドコッカス感染症第2版、中央畜産会、東京 (2016)

[2] N. M. Solvis: *Rhodococcus equi* pneumonia update,

Equine Dis Quart, 13 1-9 (2004)

[3] 高井伸二、樋口 徹、加藤昌克：ロドコッカス・エクイによる子馬死亡例の病理・細菌学的検索、日獣会誌、50、527-531 (1997)

[4] 高井伸二：*Rhodococcus equi* 研究の現状と新展開、日細菌誌、51、485-496 (1996)

[5] Natuional Committee for Clinical Laboratory Standards : Performances standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals, 2nd ed, Approved Standard, NCCLS document M31-A2, 22 (6) (2002)

[6] 動物用抗菌剤研究会 MIC測定法改訂委員会：動物由来細菌に対する抗菌性物質の最小発育阻止濃度 (MIC) 測定法 (動物用抗菌剤2003年改訂標準法、動物用抗菌剤研究会報 18, 40-41 (1997)

[7] Riesenber g A, Feßlerl AT, Ero E, Prenger-Berninghoff E, Stamm I, Böse R, Heusinger A, Klarmann D, Werckenthin C, Schwarz A : MICs of 32 antimicrobial agents for *Rhodococcus equi* isolates of animal origin, J Antimicrob Chemother 69, 1045-1049 (2014)

[8] 秋山 茂、小林正枝、岩下正人：消毒薬の殺菌効力試験方法の検討 改良kelsey-sykes法に関する実験的考察、感染症誌、63、575-583 (1989)

[9] 片山芳也：子馬のロドコッカス感染症について、日獣会誌、70 336-341 (2017)

[10] Galvin NP, Corley KTT: Causes of disease and death from birth to 12 months of age in the Thoroughbred horse in Ireland, Ir Vet J, 63: 37-43 (2010)

[11] Kuskie KR, Smith JL, Wang N, Carter CN, Chaffin MK, Slovis NM, Stepusin RS, Cattoi AE, Takai S, Noah D, Cohen ND : Effects of location for collection of air samples on a farm and time of day of sample collection on airborne concentrations of virulent *Rhodococcus equi* at two horse breeding farms, Am J Vet Res, 72, 73-79 (2011)

[12] Cohen ND, Kuskie KR, Smith JL, Slovis NM, Brown SE 2nd, Stepusin RS, Chaffin MK, Takai S, Carter CN : Association of airborne concentration of virulent *Rhodococcus equi* with location(stall versus paddock) and month (January through June) on 30 horse breeding farms in central Kentucky, Am J Vet Res, 73, 1603-1609 (2012)