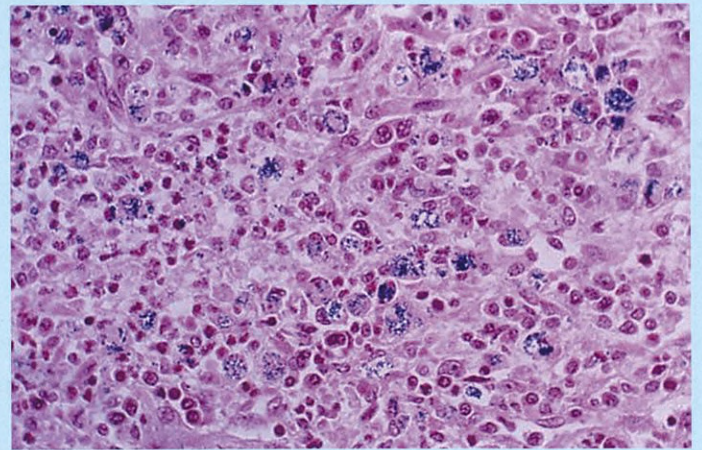


子馬のロドコッカス感染症

Rhodococcus equi infection in Foals

(第2版)

公益社団法人 中央畜産会



目次

発刊にあたって	1
子馬のロドコッカス感染症の要約	2
子馬のロドコッカス感染症について	
I. 発生の歴史と分布	3
1. 発生の歴史	
2. 本症と強毒株	
II. 病原体	4
1. 菌の分類と特徴	
2. 菌の遺伝学的特徴	
3. 菌の培養とコロニー形態	
4. 菌の生物学的性状	
5. 病原性試験	
III. 馬飼育環境における <i>R. equi</i> の生態	7
1. 感染経路	
2. 生態と感染源	
3. 強毒株を指標とした環境汚染調査	
IV. 臨床所見	8
1. 臨床症状	
2. 血液所見	
3. X線所見	
V. 診断	10
1. 臨床細菌学的診断	
2. 血清学的診断	
3. 病理学的診断	
VI. 実験感染モデルにおける病態解析	14
1. 実験感染モデル子馬の作出	
2. 臨床経過からみた各種診断法の有用性	
3. 病理解剖学的所見	
VII. 治療と予防	15
1. 治療法	
2. 予防法	
おわりに	16

発刊にあたって

子馬のロドコッカス感染症は、子馬に肺炎や腸炎を起こす難治性の細菌性疾患です。本症は世界各国の馬産地で発生しており、わが国でも戦前から発生が報告されています。1960年代からは、北海道日高地方の軽種馬で毎年春から夏にかけて散発的に発生がみられ、時には地方病的に流行しています。本症の病原体である *Rhodococcus equi* (*R. equi*) は馬の飼育環境の土壤中に広く生息し、子馬は呼吸器や消化器から感染します。かつては、本病の発生要因は、漠然と、子馬側の易感染因子が重要であると考えられていましたが、近年の精力的な研究により、*R. equi*には強毒株と無毒株が存在し、強毒株は病原性に関与するプラスミドを有していることが明らかにされてきました。またこの強毒株を用いた感染モデル子馬の様々な研究から、本病の発症機序や診断・治療法に関する多くの知見も得られてきています。このような成果は、主として北里大学、日高家畜衛生防疫推進協議会およびJRA競走馬総合研究所が共同で実施した調査研究によるものです。この小冊子が本病の防疫に有効な指針を示すものとなれば幸いです。

平成28年2月

公益社団法人 中央畜産会

子馬のロドコッカス感染症の要約

子馬のロドコッカス感染症は、1～3ヵ月齢の子馬に多く認められる疾患で、重度な化膿性肺炎や腸炎ならびに付随リンパ節炎を主徴とする難治性の細菌感染症である。本症は感染初期の臨床症状に乏しく、畜主が子馬の異常に気付いた時点では病態はかなり進行し、病状は悪化していることが多い。本症の死亡例では肺や腹腔に膿瘍が認められることから、感染経路は気道ないし消化管で、感染源は子馬の飼育環境の土壌と考えられている。本病は散発的発生を特徴とするが、時に地方病的に集団発生を引き起こす場合もある。わが国では毎年晩春から夏にかけて北海道の軽種馬生産地で発生が認められている。日高地方の罹患率は～5%、致死率は約8%と推測されている。本症の治療期間は長く、診断が遅れた例では予後不良となり、死亡率が極めて高くなるため軽種馬生産地では経済的損失の大きな幼駒感染症として問題となっている。病理学的には肺の化膿性肉芽腫性気管支肺炎が主病変である。急性例では赤色肝変化病巣の中心に微小膿瘍を認め、慢性例では肺膿瘍の形成がみられる。肺膿瘍の大きさは小豆大から鶏卵大までさまざま、多くは多発性である。肺病巣は、後葉前部および副葉に好発する。病

理組織学的検査では膿瘍周囲にマクロファージの浸潤を認める。ギムザ染色やグラム染色ではマクロファージに貪食された多数の菌体を見出すことができる。肺病変のほかには、まれに消化管にも感染性の病変がみられる。すなわち、小腸パイエル板の化膿性肥大、前腸間膜リンパ節の膿瘍形成、結腸における腸壁の膿瘍形成および粘膜面の潰瘍形成などである。病原体である*Rhodococcus equi*はグラム陽性球桿菌で、土壌中に生息し、馬の飼育環境中に広く存在する。本菌には強毒株と無毒株がある。強毒株は3種類の類似した85kb、87kbおよび90kbの病原性プラスミドのいずれかを保有しており、これらのプラスミド上に毒力関連抗原遺伝子の存在が近年明らかにされた。本症にはワクチンなどの予防法が確立されていないため、感染子馬を如何に早期診断し、治療を開始するかが予後を左右する。本症の診断法としては、発熱などの臨床症状に加えて、気管洗浄液を用いた分離培養法やPCR法、あるいはスクリーニング法として有用な血清抗体を検出するELISA法がある。治療法としては、ゲンタマイシンとセファロチンの静脈内投与あるいはリファンピシンとアジスロマイシンの経口投与が有効である。

子馬のロドコッカス感染症について

I 発生の歴史と分布

1. 発生の歴史

子馬のロドコッカス感染症は、1～3ヵ月齢の子馬に認められる疾患で、重度な化膿性肺炎や腸炎ならびに付随リンパ節炎を主徴とする難治性疾患である。1923年、スウェーデンのMagnussonは、本症の起原菌である*Rhodococcus equi*を、初めて発見した。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本症の発生報告がなされている。わが国でも1940年代に子馬病の原因菌の一つとして本菌が記載されており、原川らが1949年に青森県の子馬感染例から本菌を初めて分離した。1960年以降になると、競走馬生産の中心地である北海道日高地方においても、本症の発生報告がなされるようになった。本症の発生時期は毎年4月下旬から9月上旬で、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。日高地方では年間20頭前後の子馬が本症で死亡あるいは予後不良で淘汰されている。本症は通常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。諸外国では本症の罹患率は5～17%、致死率は40～80%と報告されている。わが国の日高地方における罹患率は～5%であり、その致死率は約8%と推定されている。

なお、ヒト医療においては、後天性免疫不全症患者における*R. equi*感染が問題となっている。

2. 本症と強毒株

日高地方において、1993年から1995年の4年間に実施された細菌学的調査によれば、*R. equi*は肺膿瘍などの病変部と主要臓器並びに腸管内容物から多数分離され、ほとんどの株が15～17kDa抗原（毒力関連抗原）を発現していた。また、これらの抗原は85、87および90kbのプラスミド（病原性プラスミド）にコードされていた。以上のことから、毒力関連抗原を発現する病原性プラスミド保有株は馬に対する強毒株であることが明らかになった。なお、2010年から2012年の3年間の日高地方の調査では、強毒株は87kbの病原性プラスミドを持つ株が全体の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。これは飼育環境中の強毒株における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保有株間での馬に対する病原性に大差はない。また、*R. equi*は正常な子馬の糞便からもしばしば分離されるが、そのほとんどは病原性プラスミドを保有しない無毒株で、罹患馬の腸管内容物から分離される多量の*R. equi*には、高率に強毒株が含まれている。子馬を用いて行った感染実験では、強毒株は本症を再現できたが、無毒株は再現できなかった。また本症は土壌中の*R. equi*の感染によって引き起こされるが、馬の飼育環境の土壌中に存在する本菌のほとんどは無毒株であり、強毒株に汚染された牧場で本症の発生が多い。

1. 菌の分類と特徴

子馬のロドコッカス感染症の原因菌である*R. equi*は、1923年にスウェーデンのMagnussonによって化膿性肺炎を示す子馬の肺膿瘍から分離され、旧学名*Corynebacterium equi*と命名された。その後の細胞壁糖脂質の化学組成に基づく化学分類（1980年）により、*Mycobacterium*、*Gordonia*および*Corynebacterium*属の20菌種が*Rhodococcus*属に分類変更され、本菌もそこに再分類された。現在では*Rhodococcus*属には56種が属しているが、病原性が知られているのは*R. equi*を含めた数種類のみである。

*R. equi*は好気性、非運動性のグラム陽性球桿菌で、多糖体の莢膜を持つ（図1）。本菌は本来、土壤中に生息する細菌（土壌1g当たり数百から数百万個存在）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）と無毒株（ $>10^8$ 個）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、土壌および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15~17kDaの毒力関連抗原（Virulence-associated protein antigen：VapA）を発現しており、これをコードする遺伝子は強毒株が保有している3種類の病原性プラスミド（85、87および90kb）に存在している。

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、細胞質内の小胞体内で生存し複製することができる。通常の細菌ではマクロファージがエンドサイ

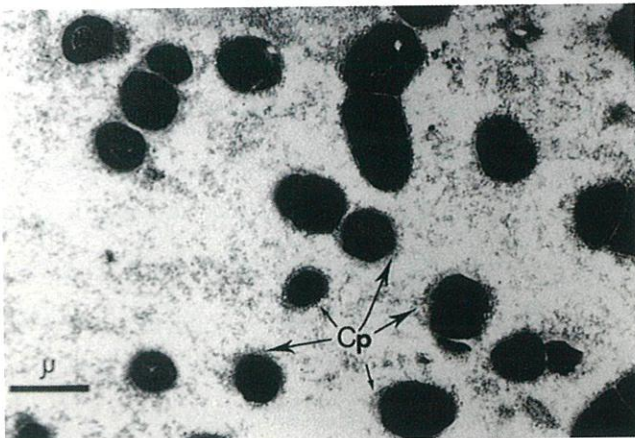


図1. *R. equi*の電子顕微鏡像：CPが莢膜

トシスによって菌体を貪食すると細菌を含有する細胞質内の小胞体にライソゾームが結合して細菌は消化される。*R. equi*の場合は小胞体へのライソゾームの結合が阻害されるため、マクロファージの細胞質内で*R. equi*は生存できると考えられている。

2. 菌の遺伝学的特徴

*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）の全塩基数は5043kb、GC含量は68.8%である。

3. 菌の培養とコロニー形態

本菌の培養は30℃で48~72時間行う。特に選択培地（NANAT培地：表1）上での増殖は遅く、典型的なコロニーの観察には3~5日を要する。血液寒天培地による24時間培養では、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（図2）。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。しば

表1. NANAT培地の組成

基礎培地	普通寒天培地あるいはハートインフュージョン寒天培地などに酵母エキス10g/lとグルコース10g/lを追加する。 自家製の馬肉エキスを加えるとさらに発育が良い。	
抗菌剤等	滅菌した培地を55℃に冷やした後、4種類の添加剤を加える	
	・ナルジクス酸	20 μg/ml
	・ノボビオシン	25 μg/ml
	・シクロヘキシミド	4 μg/ml
	・亜テルル酸カリウム	50 μg/ml

※4種類の添加剤は滅菌蒸留水で100倍液を作製し、冷凍保存する。感染子馬の臓器材料など真菌の汚染がないと思われる検体からの分離培養にはシクロヘキシミドを除いたNANAT培地が良い。

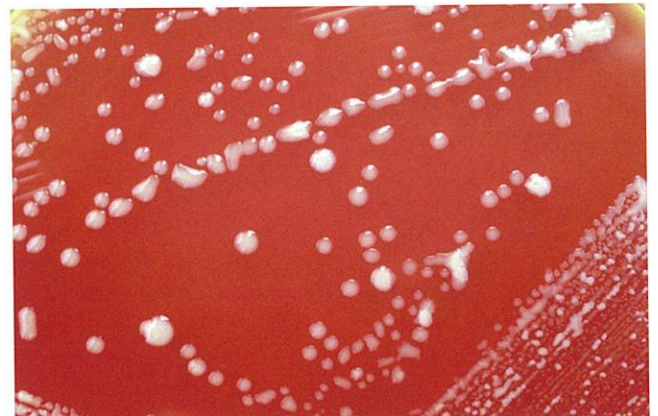


図2. 血液寒天培地の*R. equi*：コロニーは光沢のある半透明灰白色で、溶血性は示さない

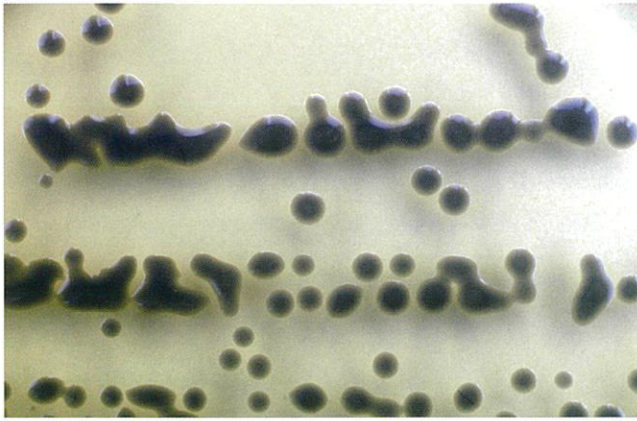


図3. NANAT選択培地の*R. equi*：コロニーは濃灰色露滴状で融合性

しば近隣のコロニーと融合する。長く放置するとコロニーは黄褐色を帯びる。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(図3)。なお、本菌を38℃で継代培養を続けると無毒株化する。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。

4. 菌の生物学的性状

*R. equi*はグラム染色陽性で、抗酸性を示す。これは結核菌と同様にミコール酸を含む莢膜が存在することによる。カタラーゼ、ウレアーゼ(18時間以上)陽性。硝酸塩還元。炭水化物とカゼイン分解能を欠く。運動性と溶血性なし。また、*R. equi*は*equi factors*と呼ばれる菌体外酵素(ホスホリパーゼCとコレステロールオキシダーゼ)を産出し、この特性に基づくCAMP試験では*Corynebacterium pseudotuberculosis*および*Staphylococcus aureus*との相乗溶血活性を示し、本菌の簡易同定法として利用される。

莢膜はグルコース、マンノースおよびグルクロン酸などからなる多糖体で、中沢らは菌体凝集試験により27種の血清型に、Prescottらはゲル内沈降反応により7種の血清型に分類しているが、莢膜型と病原性に関連は認められていない。

また、*R. equi*には、結核菌と同様にミコール酸が細胞壁のペプチドグリカン層の外側にアラビノガラクトンと共有結合して存在している。

5. 病原性試験

1) マウス病原性試験

マウスを用いた病原性試験は、まず分離株を普通ブイヨンなどの液体培地で30℃、48時間培養して、およ

そ 10^9 個/mlの菌液を準備し、これを滅菌生理食塩水で10倍(10^8 個)および100倍(10^7 個)に希釈する。これらの菌液を4～5週齢のマウス(ddyなど)の尾静脈内に0.2ml接種して1週間観察する。マウスは、接種菌が強毒株であれば5～6日で死亡するが、無毒株であれば死亡しない。強毒株のマウス50%致死量(LD₅₀)は静脈内接種で $2 \sim 4 \times 10^6$ 個であるが、接種経路によって大きく変動する。例えば、腹腔内接種のLD₅₀は静脈内接種菌量の10倍となる。

2) 毒力関連抗原の検出

強毒株は15～17kDa抗原(VapA)を発現するので毒力マーカーとして利用できる。抗原検出にはウエスタンブロット法を用いる。まず菌体抗原をSDS-ポリアクリルアミド電気泳動(SDS-PAGE)した後、ニトロセルロース膜に転写し、*R. equi*感染子馬血清あるいは15～17kDa抗原(VapA)に対するマウスモノクローナル抗体と反応する毒力関連抗原を検出する(図4)。なお、本法は多数検体の検査には不向きであるので、多数検体を一度に検査できるコロニーブロット法が開発されている(図5)。純培養した分離株を滅菌ツマヨウジで拾い、寒天培地のシャーレに縦横6×7個となるように穿刺して36時間培養の後、穿刺部に形成されたコロニーをそのままニトロセルロース膜に転写する。これを105℃、1分間オートクレーブで熱固定する。この後はウエスタンブロット法と同じく、モノクローナル抗体で15～17kDa抗原(VapA)の存在を確認する。ここで注意することは15～17kDa抗原(VapA)の発現が培養温度とpHに影響される点である。抗原は培養温度38℃、培地のpH6.5で最も良く発現する。菌の培養はこれの方法も培地のpHを6.5～7.0とし、38℃で培養する。

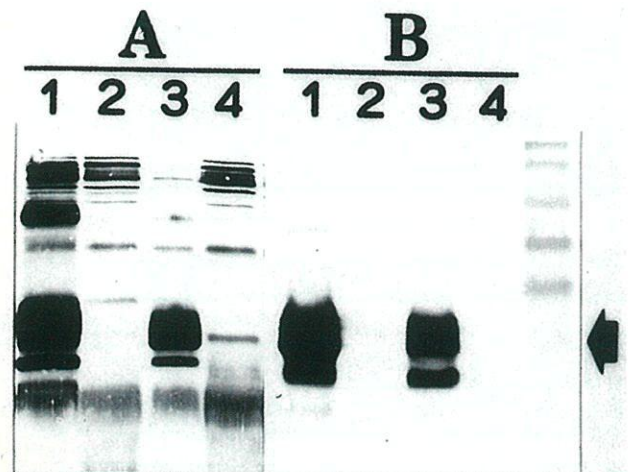


図4. ウエスタンブロット法による毒力関連抗原の検出：レーン1と3は強毒株(ATCC33701株とL1株)、レーン2と4はそれぞれのプラスミド脱落株。Aは感染子馬血清による反応、Bは15～17kDa抗原(VapA)に対するモノクローナル抗体による反応。

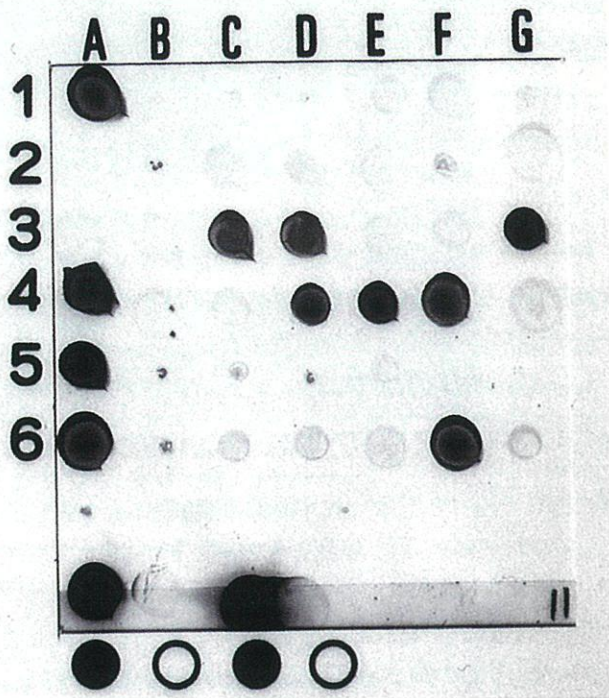


図5. 15~17kDa抗原 (VapA) に対するモノクローナル抗体を用いたコロニーブロット法

3) 病原性プラスミドの検出と型別

R. equi 強毒株の病原性プラスミドは85kb、87kb、90kbの3種類が知られている。これら病原性プラスミドの検出と型別は、強毒株の同定や疫学調査に有用である。

R. equi 強毒株からの病原性プラスミドの抽出は、まず菌株を液体培地で36時間培養する。対数増殖期の菌体をアルカリ法で溶菌させてプラスミドを抽出し、精製してアガロース電気泳動、エチジウムブロマイド染色すると大きさの異なるプラスミドが確認できる (図6)。これらプラスミドの型別は、抽出したプラスミドを制限酵素 *EcoRI* で処理し、電気泳動によるそれらバンドパターンを比較・分類することで、12種類に型別される。

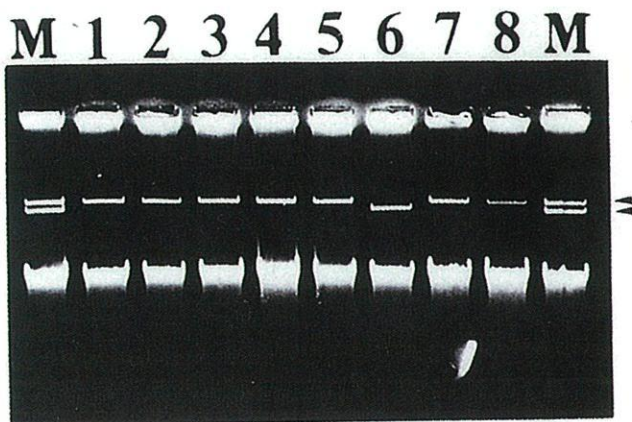


図6. 病原性プラスミドの検出：レーン1から8は *R. equi* 分離株で、Mは85kbプラスミド (ATCC33701株) と90kbプラスミド (L1株) を混合したマーカー

4) PCR法を用いた迅速同定法

R. equi の強毒株が有する毒力関連抗原をコードする VapA 遺伝子の塩基配列をもとに、PCR法が開発され、気管洗浄液中の強毒株の迅速同定に利用されている。子馬の気管洗浄液や糞便などの検査材料から、市販のDNA抽出キット (InstaGene matrix, BioRad社など) を用いてDNAを抽出する。PCRプライマーおよび反応液は表2に示すものを準備する。PCR反応は、変性94℃、90秒、アニーリング55℃、1分 エクステンション72℃、2分を30サイクル行い、このPCR反応液をアガロース電気泳動し、エチジウムブロマイドで染色すると564bpのVapA遺伝子の増幅産物が確認できる (図7)。

表2. *R. equi* のVapA遺伝子を検出するためのPCR法
プライマー：IP1 (5'-GAC TCT TCA CAA GAC GGT -3')
IP2 (5'-TAG GCG TTG TGC CAG CTA -3')

成分	容量/反応	最終濃度
マスターミックス		
10xPCR Buffer	5 μ l	1 x
dNTP (各dNTP 25mMを含有)	4 μ l	各dNTP200 μ M
プライマー-IP1	適量	1 μ M
プライマー-IP2	適量	1 μ M
TaKaRa Taq (5 U/ μ l)	0.5 μ l	2.5U
滅菌蒸留水	適量	-
テンプレートDNA		
テンプレートDNA	10 μ l	-
トータル容量	50 μ l	-

※参考文献 Sekizaki et al. (1995) *Gene* 155:135-136
Takai et al. (1995) *J Clin Microbiol* 33: 1624-1627

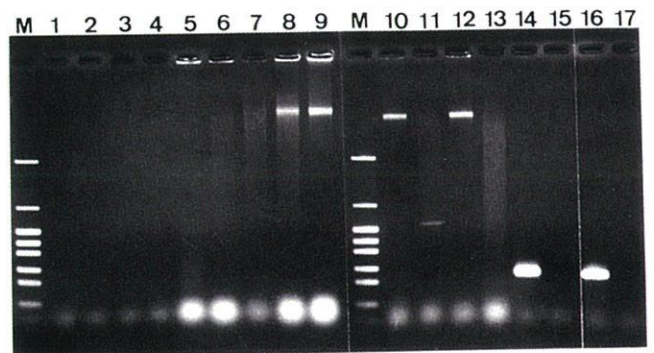


図7. *R. equi* のVapA遺伝子のPCR法：馬の呼吸器の常在菌と病原菌13種類 (レーン1~13)、*R. equi* 強毒株 (ATCC33701株：レーン14とL1株：レーン16) およびそれらのプラスミド脱落株 (レーン15と17)。15~17kDa抗原遺伝子を有する *R. equi* 強毒株 (レーン14と16) のみに564bpの特異バンドが認められる。

注) Mはマーカー。レーン1~13の菌種は、それぞれ
1; *Actinobacillus equuli*, 2; *Bordetella bronchiseptica*,
3; *Enterobacter aerogenes*, 4; *Enterococcus faecalis*,
5; *Escherichia coli*, 6; *Klebsiella pneumoniae*,
7; *Mycobacterium avium* complex, 8; *Pasteurella* spp.,
9; *Pseudomonas aeruginosa*, 10; *Staphylococcus aureus*,
11; *Streptococcus equi* subsp. *equi*,
12; *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*,
13; *Streptococcus pneumoniae*.

1. 感染経路

本症の感染経路は経気道および経口である。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、これら*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。しかしながら腸管病変だけを有する症例も存在することから、小数ではあるが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場合もある。

2. 生態と感染源

感染源は馬の飼育環境中の土壌である。本菌は古くから土壌細菌と考えられてきたが、本格的な疫学調査はWoolocockらがNANAT選択培地を開発した1980年以降に行なわれた。馬の飼育土壌からは $10^2 \sim 10^4$ 個/gの範囲で本菌が必ず分離できる。*R. equi*は $10 \sim 40^\circ\text{C}$ で発育可能である。土壌浸出液でも増殖可能である。また、発育至適pHは $7 \sim 8$ であるが、pH $4.8 \sim 8.1$ の土壌からも分離されている。本菌は表土に多く存在し、地下30cm以下の土壌からはほとんど分離できない。また、家畜の飼育環境のみならず、広く土壌から分離される。本菌は腸内細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（ $\leq 10^2$ 個/g）と考えられている。しかし、パドックなどに排泄された糞便中で菌は1,000倍以上に増殖し飼育環境を汚染する。この様に、*R. equi*は馬の腸管と土壌を循環し、

汚染が広がるものと考えられる。事実、本菌は厩舎内の空気中からも分離され、特に乾燥した風が吹く日には浮遊菌数が多く検出される。これは、飼育環境土壌が感染源となって気道感染が起きる可能性を強く示唆している。

3. 強毒株を指標とした環境汚染調査

これまでに述べたように、本菌には強毒株と無毒株が存在する。北海道日高地方および青森県の軽種馬生産牧場の土壌および馬糞便中の強毒株を検索したところ、過去に本症の発生があった牧場は強毒株に濃厚に汚染されていることが判明した。無作為に選んだ牧場では、全く強毒株が分離されなかった牧場から高い頻度で分離された牧場まで様々であった。強毒株の汚染調査により、その牧場における本症発生の可能性と危険度を推察できる。また、この調査は予防衛生面からも汚染牧場の飼育環境の改善の指標として有用であると考えられる。一方、子馬糞便中にも高濃度に本菌が存在する。子馬糞便中の強毒株の割合を調べたところ、同一牧場の土壌と親馬糞便中の強毒株割合に比較して、有意に高かった。さらに感染子馬の糞便中には健康子馬に比較して極めて高濃度の強毒株が存在することから、感染子馬の糞便は重要な牧場環境汚染源と考えられる。馬生産歴の長い牧場ほど感染子馬による強毒株汚染が進行し、本症の発生頻度が高くなり、地方病的発生がみられる傾向がある。Magnussonは本症が地方病的に発生する牧場の妊娠馬を、全く本症の発生がない牧場に避難させて、そこで子馬を出産させることにより本症を予防したと1923年の論文で報告している。このような対策は、強毒株に汚染された牧場における*R. equi*の感染の機会を断つことになり、ロドコッカス感染症を未然に防ぐために有効な手段であると考えられる。

1. 臨床症状

本症は1～3ヵ月齢の子馬にみられ、とくに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、漸次、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うようになり、横臥姿勢をとることが多くなる。実験感染例では、10日～2週間の潜伏期の後、体温の上昇が始まる。発熱後、数日間は元気や食欲に変化は認められず、朝・夕の体温測定をしていないと異常に気付かないことが多い。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、しだいに衰弱し、ときには意識障害を起こす。聴診では、肺の粗励音のほか、ラッセル音や警笛音を聴く場合もある。このような重症例は、治療を施さなければ、数日以内に死亡することが多い。罹患馬は、ときには数週間にわたる慢性経過をたどる。慢性例では体温の上昇、沈鬱、呼吸困難、呼吸頻回、頰脈などが認められる。また、このような子馬はふつう元気がなく、発育が悪いこともある。膿性鼻漏や弱々しく深い咳が認められることもあるが、必発の症状ではない。聴診では、肺の硬化による乾性の粗励音あるいは明瞭な気道音として聴取される。肺硬化部が広範囲におよぶ場合あるいは肺表面にある場合は、打診によって、鈍性領域として認められる。罹患した子馬はふつう、運動負荷に耐えられず、小さなストレスでも虚脱に陥るなど、急激な症状の悪化をきたすことがある。また、四肢関節に関節炎を発症する子馬もいる(図8)。そのような症例では、複数の関節が腫脹し、跛行を呈する。この様な*R. equi*による関節炎は、肺や消化器の病巣から血行を介して*R. equi*が播種され、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が知られている。さらに、ブドウ膜炎(眼房水に水性、硝子性、線維索性あるいは膿性の滲出物を認める)が見られることもある。多くの症例で、病理解剖時に消化管病変が認められるにもかかわらず、



図8. *R. equi*自然感染子馬の球節炎(元家畜衛生試験場石野清之博士提供)

ず、臨床的に明瞭な消化器症状が観察され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、病理解剖ではじめて肺に多発性膿瘍が認められる症例もあれば、突然に高熱を発し、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出されることから、本症には、ほとんど症状を現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いことなどから、その可能性は非常に低いと考えられるが、本邦でも流産胎仔から*R. equi*が検出された報告もある。

2. 血液所見

主な血液所見としては、白血球数、フィブリノーゲン、 α -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。実験感染例では、血小板数の減少、アンチトロンビンⅢの減少、血清亜鉛の減少なども認められ、これらは本症罹患馬の早期発見および病勢の診断に有用な所見と考えられる。また本症では菌血症を起こすことが報告されているが、時期や期間などの詳細は明らかではない。

3. X線所見

X線透過度を減じた明瞭な気管支炎あるいは肺膿瘍を認めることがある（図9）。臨床経過とあわせて、予後判定に有用である。

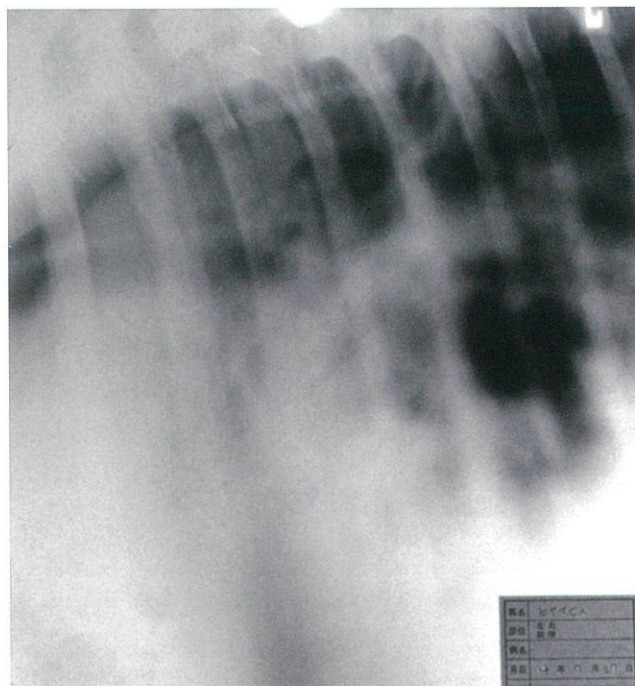


図9. 感染子馬のレントゲン写真。肺病変部はX線の透過度が減少し、白く見える。

V 診断

本症の診断は、罹患子馬では臨床細菌学および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によって診断される。日高地区では、30日齢と45日齢時（あるいは28日齢と35日齢）の2回に渡り定期健康診断として血清学的検査（ELISA法）を行い、呼吸器症状を示す子馬ではさらに気管洗浄液を材料とした菌分離を行うことによって精度の高い診断が可能になった事例がある。

1. 臨床細菌学的診断

臨床的には気管洗浄液や糞便および病理解剖時に採取した臓器・組織などを分離材料とし、選択培地（NANAT培地）を用いて*R. equi*の分離を行う。

1) 気管洗浄液の検査

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ポーザブル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（図10、11、表3）。採取した気管洗浄液は、(1)*R. equi*の分離培養、(2)塗抹（サイトスピン）標本での免疫染色および(3)細胞診に用いられる。またVapA遺伝子領域を用いたPCR法も行われており、短時間での診断が可能となっている。

(1) 気管洗浄液からの分離培養

気管洗浄液からの菌分離は確定診断法として極めて有用である。菌分離は血液寒天培地と選択培地（NANAT培地）を用いて行う。病状の進展度により気管洗浄液1mlから数個～ 10^6 個までの菌が分離されるので、洗浄液は原液から1,000倍までの希釈液を上記2種類の培地に接種する。強毒株が分離されれば本症を強く疑う。しかしながら、健康な子馬の気管洗浄液からも数個から数10個の*R. equi*が分離さ



図10. *R. equi*の気管洗浄法

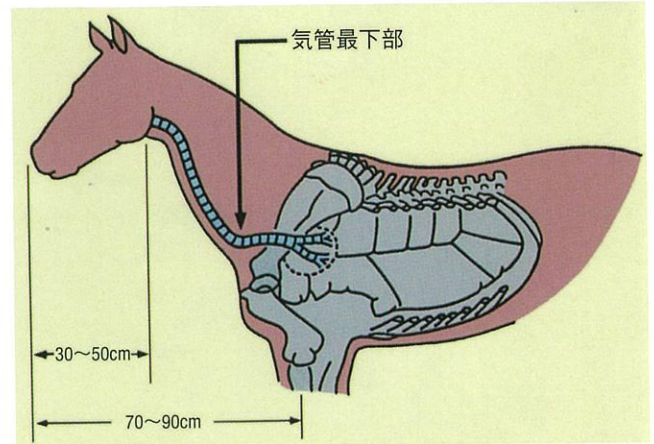


図11. 気管洗浄液の採取部位

表3. 気管洗浄液の採取方法

手順	操作
1	必要に応じて子馬に鎮静処置を行う。
2	気管洗浄液の回収に適した高さに子馬の頭頸部を調整する（胸、頸、頭をほぼ水平にする。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	生理食塩水20mlを入れたディスポーザブル注射器（50ml）をシリコンチューブに接続する。
5	注射器の内筒を少し引いて空気が吸引できることで、シリコンチューブの先端が気管最下部付近に達していることを確認する（食道にチューブが入っていると空気が吸引できない）。
6	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。

れる場合もある。これは子馬が土壤中に生息する本菌を呼吸と共に吸入したことによると考えられ、後述する細胞診の結果と併せて診断する必要がある。分離株が強毒株か無毒株かはコロニープロット法やPCR法などで識別する。

(2) 気管洗浄液を用いた免疫染色法

気管洗浄液中の細胞成分を遠沈収集後、スライドグラスに直接塗抹あるいはサイトスピンを用いて塗抹標本を作製し、冷風乾燥する。アセトン固定後、一次血清として抗*R. equi*強毒株モノクローナル抗体を反応させる。その後、間接蛍光抗体法の場合は、二次血清としてFITC標識抗マウスIgGを反応させ、常法にしたがって蛍光顕微鏡で観察する。また酵素抗体法の場合は、二次血清としてペルオキシダーゼ標識抗マウスIgGを反応させ、発色基質で発色させて光学顕微鏡で観察する。*R. equi*強毒株に感染した

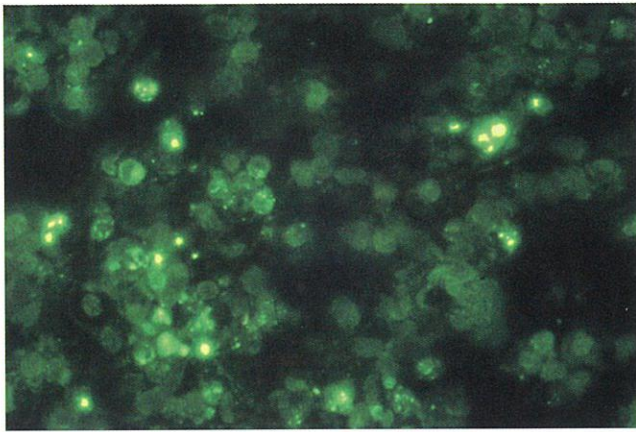


図12. 気管洗浄液を用いた*R. equi*の間接蛍光抗体法

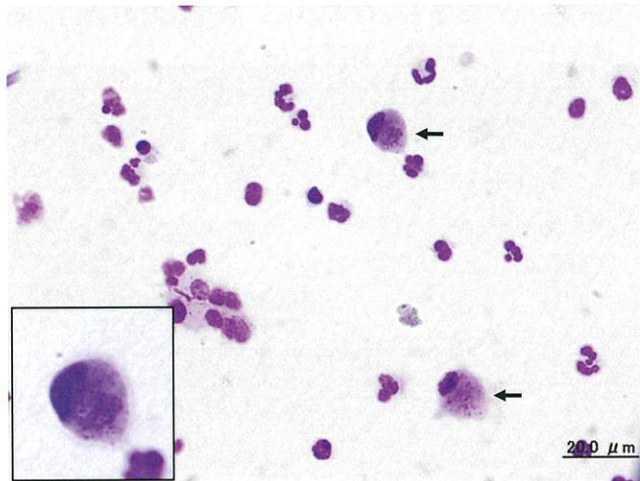


図13. 気管洗浄液の塗抹標本（ギムザ染色）：多数の好中球と細菌を貪食し大型化したマクロファージ（矢印）が観察される

子馬から採取した検体では、マクロファージなどの細胞質内に特異的な陽性所見が認められる（図12）。

(3) 気管洗浄液の細胞診

前記と同様に塗抹標本を作製し、パパニコロウ染色、ギムザ染色、グラム染色などを行う。これらは日常的に使用される染色法で、実施が簡単であるわりには有益な情報が得られる。すなわち本症罹患子馬の気管洗浄液の塗抹標本では多数の好中球とマクロファージが認められ、マクロファージの細胞質内には貪食された菌体がしばしば観察され、経験を積むと菌の形態などから*R. equi*をある程度推測できるようになる（図13）。

2) 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*が分離された場合には、菌数や病原因子（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 $\geq 10^5$ 個/gの*R. equi*が分離される。

3) 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良い。安楽死させた症例では、血液寒天培地あるいは普通寒天培地でも良い。発症子馬の膿瘍中には $10^6 \sim 10^8$ 個/gの菌が多量に存在しているため、他の検査臓器がそのような膿瘍で汚されないように気をつける。検査臓器1gを秤り取り、滅菌乳鉢中に滅菌生理食塩水5mlおよび滅菌海砂を共に入れ、乳棒で乳剤とする。病変部材料は 10^{-5} まで希釈した乳剤液0.2mlをNANAT培地シャーレに接種する。

2. 血清学的診断

1) ELISA (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay) 法

あらかじめ*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用意し、これに検査を行う子馬の血清（一次抗体）を100倍希釈して反応させ、その後、ペルオキシダーゼ標識抗ウマIgG血清（二次抗体）を加え、標識酵素と基質の発色反応により特異抗体の量を測定する（図14）。本法は特異抗体の検出感度が高い上に多数の検体を効率良く検査できることから、日高地方で臨床検査法として応用されている。野外臨床例において、呼吸器症状を示した子馬の多くで初診日に高い抗体価を検出できることから、早期診断法としての評価も高い。

なお上述のELISAは*R. equi*無毒株の菌体に対する抗体を検出するものであるが、強毒株の菌体表面に存在するVapAに対する抗体を検出できるELISAも開発されている。

i) 抗原とプレートの作製方法

R. equi (ATCC6939株) を酵母エキスとブドウ糖を加えた普通寒天培地で3～4日間培養する。回収

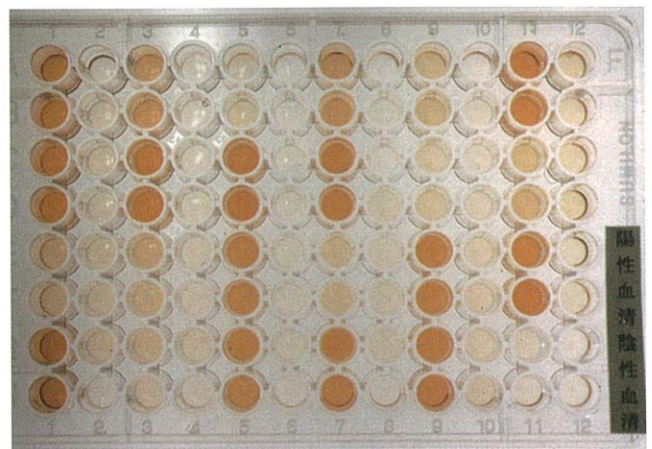


図14. *R. equi*の特異抗体を検出するELISA

した菌 2 gを10mlの0.1% Tween20リン酸緩衝液に溶解し、37℃で90分間振盪した後、15,000rpm、30分間遠心し、上清をTween20抽出抗原とする。タンパク含量を測定し、10 μ g/mlとなるように炭酸緩衝液 (pH9.6) で希釈し、96穴プレート (Sumilon MS-8496F) の奇数番号の穴に入れて4℃、16時間以上の吸着を行う。抗原液を洗浄後、ブロックエース (雪印乳業、粉末 4 gを100ml精製水に溶解) でブロッキングを37℃、1時間以上行う。このプレートは-80℃で数週間保存可能。

ii) 被検血清と二次抗体

被検血清はブロックエースで100倍に希釈して用いる。二次抗体は、ペルオキシダーゼ標識抗ウマIgGヤギ血清 (Cappel社、コスモバイオ販売) を購入後ブロックエースで10倍に希釈し、100~500 μ lに小分けして-20℃に保存したものを事前に準備しておく。二次抗体の希釈倍数は陽性血清 (感染子馬の血清を予め準備) のOD値が1.2~1.5の範囲となるようロット毎に決定する (通常3,000~10,000倍希釈)。頻回の凍結融解は避けるようにする。

iii) 基質液

基質液はオルトフェニレンジアミン二塩酸20mgを50mlのリン酸水素ナトリウム・クエン酸緩衝液 (pH4.8) に溶解し、過酸化水素水 (25%) 10 μ lを加える。酵素・基質の反応停止には3N硫酸を用いる。

iv) 操作法

- ①希釈した被検血清をプレートの奇数穴 (抗原吸着) と偶数穴 (抗原非吸着) に100 μ lを加え、37℃で1時間反応させる。
- ②プレートを洗浄液 (0.02% Tween20・PBS) で3回洗浄する。
- ③二次抗体をプレートの全ての穴に100 μ lずつ入れ、25℃で30分反応させる。
- ④プレートを洗浄液 (0.02% Tween20・PBS) で3回洗浄する。
- ⑤基質液をプレートの全ての穴に100 μ l加え、25℃で20分反応させる。
- ⑥反応停止液を全ての穴に100 μ l加え、酵素反応を

停止する。

⑦ELISAリーダー (波長492nm) で吸光度を測定する。

⑧抗原吸着穴の吸光度 (OD値) から抗原非吸着穴の吸光度を引き、抗体価をOD値で示す。

v) 判定

抗体の陽性基準値はOD値0.3以上とする。この値は健康な200頭以上の馬の血清の平均値に3倍の標準偏差値を加えた値として算出したものである。

vi) 注意点

検査には必ず陽性血清と陰性血清を準備し、全てのプレートに加える。気候・天候などにより発色反応の速度が影響を受けるので、陽性血清の発色を基準にして反応時間を調節する。

2) ゲル内沈降反応

本法は、感染した子馬の血中に産生される菌体外酵素 (equi factors) に対する抗体を測定する方法で、*R. equi*の液体培養上清中の菌体外酵素を濃縮し、ゲル内沈降反应用抗原として用いる。この方法は簡便であるが、感度が低く、ELISA法が普及した現在ではほとんど利用されていない。海外では、equi factorsに対する抗体を相乗溶血性 (CAMP試験) の中和阻止試験で測定する方法も開発されている。

3. 病理学的診断

主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化巣の中心に微小膿瘍を認め、慢性例では肺膿瘍の形成がみられる。肺膿瘍の大きさは小豆大から鶏卵大までさまざま、ふつう多発性である (図15)。肺病巣は、後葉前部および副葉に好発する。病理組織学的検査では膿瘍周囲にマクロファージの浸潤を認める。グラム染色ではマクロファージに貪食されたグラム陽性の菌体が多数観察される (図16)。肺病変のほかには、腹腔内の膿瘍形成 (図17) や消化管における感染性変化、すなわち、前腸間膜リンパ節や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18)、結腸壁や粘膜面における膿瘍や多発性潰瘍の形成 (図19) なども見られる。



図15. 子馬の肺における多発性膿瘍 (NOSAI日高 樋口徹博士提供)

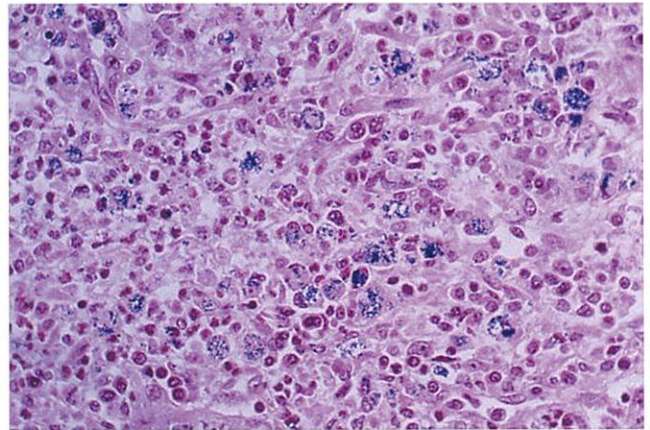


図16. ロドコッカス肺炎の病理組織像 (グラム染色) : 肺胞内に浸潤した多数の好中球とグラム陽性の*R. equi*を貪食したマクロファージが認められる

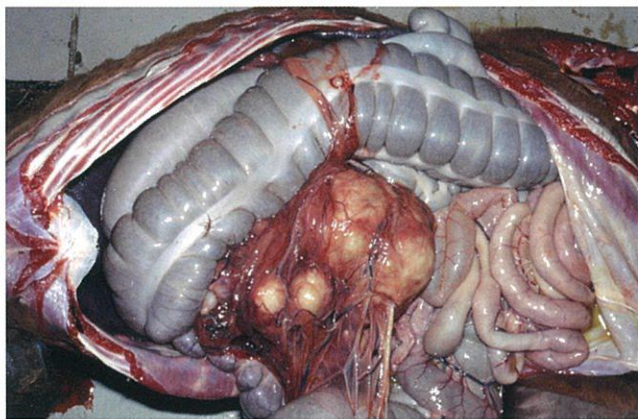


図17. 子馬の腹腔内に形成された膿瘍 (NOSAI日高 樋口徹博士提供)



図18. 小腸パイエル板の肥大



図19. 結腸の粘膜の肥厚と潰瘍の多発

1. 実験感染モデル子馬の作出

初乳非摂取の子馬に*R. equi*強毒株 10^4 個を気管内に噴霧接種すると、感染が成立し発病する。この菌量は馬の飼育環境に存在する菌数（土壌中： 10^4 個/g、糞便： 10^6 個/g）に比較的近似した菌量である。

2. 臨床経過からみた各種診断法の有用性

典型的な感染モデル子馬における臨床症状と各種診断法による診断時期を図20に示した。すなわち、*R. equi*接種から臨床症状が発現するまでの期間は約2週間で、これが本症の潜伏期間と考えられる。臨床症状としては、発熱、肺の聴診音の異常、食欲・元気消失が認められる。発熱に3～4日先行して気管洗浄液から強毒株が分離され始め、その直後より糞便からも強毒株が分離されるようになる。気管洗浄液を用いた蛍光抗体法では、発症初日～2日目には陽性所見が得られる。気管洗浄液の細胞診では多数の好中球やマクロファージが認められる。血清抗体価（ELISA抗体）は発症後、4～5日目から陽性基

準値（OD値 ≥ 0.3 ）を超えて上昇し始める。

3. 病理解剖学的所見

実験感染馬における肺病変の進展を経時的にみると、初めて発熱が認められた日（発症初日）に剖検された子馬の肺には、すでに針頭～粟粒大の多発性膿瘍が形成されており、その周囲には炎症の急速な広がりを示す赤色肝変化病巣がみとめられた。発症3日目に剖検された子馬では、個々の肺膿瘍は小豆大であり、病巣はさらに周囲に波及する様相を呈していた。実験感染馬で、発症初日および3日目以降の約2週間、ゲンタマイシンとセファロチンの投与あるいはリファンピシンの経口投与によって治療された症例の剖検では、前記の肺膿瘍に相当する部位が、限局性の灰白色硬化巣として認められたものの、肺炎病巣は認められなかった。以上の所見は、本症における肺病変の進行・拡大がきわめて速いことを示すものであった。そして、本症における早期発見、早期診断および早期治療の重要性が明らかになった。

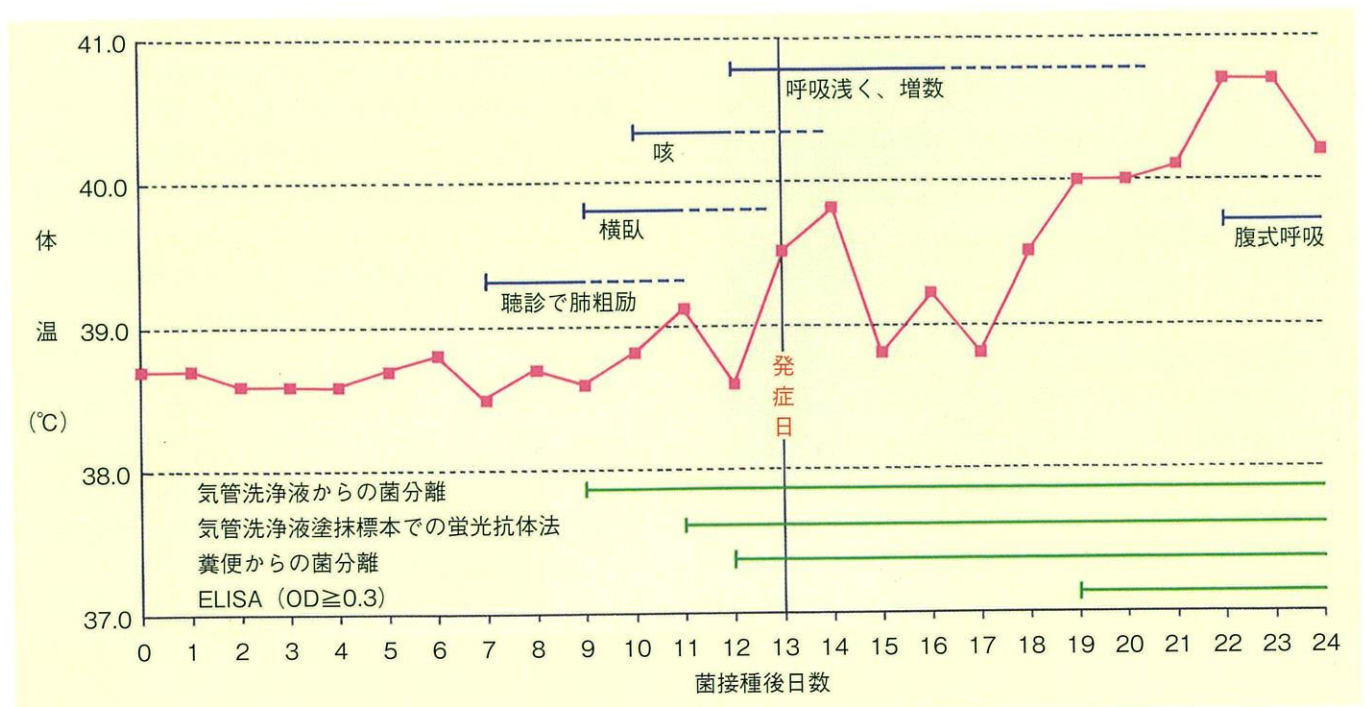


図20. 臨床症状と各種検査法による診断時期

VII 治療と予防

1. 治療法

治療開始時期については、できるだけ早いほうが好ましいことは言うまでもない。ロドコッカス感染症は約2週間の潜伏期間があり、発病時点では多くの場合病変はすでにかかなり進行している。したがって、初診時より投薬を開始すれば当然最も高い効果が期待できる。本症は臨床症状や血液検査だけで他の感染症と鑑別することは極めて困難であり、気管洗浄液の細胞診と組み合わせた細菌培養やPCR検査が、今日の主要な判断基準となっている。しかしながら、細菌培養には数日間を要し、PCR検査は特別な機器を所有する施設に依頼する必要がある。迅速な検査手法の確立と整備が望まれる。

本症の治療法としては、1986年にゲルフ大学で行われた国際ワークショップで、マクロライド系抗菌薬である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との臨床報告以来、この組み合わせによる治療が欧米では一般的に行われている。しかしながら、エリスロマイシンは副作用としてしばしば重篤な下痢を誘発することが知られており、本邦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である。なお、競走馬総合研究所栃木支所で行った実験馬を用いた治療実験では、セファロチンとゲンタマイシンの併用あるいはリファンピシンの単独投与でも、それぞれ治療効果を認めている。しかしながら、*in vitro*の薬剤感受性試験では*R. equi*はセファロチンにあまり感受性を示さないことや、ゲンタマイシンは*R. equi*を貪食したマクロファージの細胞質内への移行性に乏しいことなど、実際の症例での治療効果に限界がある可能性も考えられる。また、リファンピシンの単独投与は、容易に耐性菌の出現を誘導する可能性の高いことが懸念されている。*R. equi*の薬剤耐性に関して、平成22年から24年にかけて北海道日高地方の軽種馬で実施された調査では、β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、セファゾンに対しては高い耐性率が認められたが、アミノグリコシド系（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、エンフロキサシン）およびその他のイミペネム、ミオサイクリン、リネゾリドに対しては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ことで、本症の治療には有効であることが確認されている。

2. 予防法

1) 強毒株汚染の防止と除去

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ヵ月齢まで強毒株を含んだ糞便を排泄する。これらは厩舎、パドックおよ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、感染子馬の発生した厩舎では壁などを逆性石鹼等の消毒薬で、床面は生石灰の散布などにより消毒する必要がある。これらの消毒は定期的に行うことが望ましい。また、汚染された土壌を全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、本菌が土壌中で生息する深度0-20cmまでの表土を取り除き、客土することで表土中の菌数を減少させ、強毒株による暴露の機会を減らすことは大変有効である。糞便などが厩舎の近くに野積みされている光景を良く見かける。糞便は本菌を極めて大量に含み、その後も菌は増殖することから、これらも感染源として重要である。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必要がある。堆肥の発酵熱で*R. equi*は十分に殺滅される。堆肥を牧草地に還元することは土壌の栄養面から推奨されている。しかしながら熟成不十分な糞便を散布することは、本症のみならず、寄生虫感染症の面からも危険な行為である。

本症の予防法として、本症が多発する牧場の子馬への高度免疫血清の投与や死菌ワクチンの開発に関する研究が一部で進められているが、実用化されてはいない。

2) 子馬の健康診断

*R. equi*感染症の発生が問題となっている牧場では日常的な健康管理と定期的な健康管理の2本建てで本症の予防と早期発見に努める。これらに費やす労力は感染子馬の治療費に比べれば経済的にも安価である。日常的な健康管理として最も重要なのは毎日の体温測定で、できれば朝晩2回の測定が望ましい。本症の臨床症状として最も早く認められるのは発熱で、実験感染例では発症3日以内に治療を開始すれば、早く回復することが証明されている。定期的な健康管理としては、本症の感染や発病が最も起りやすい時期である30-45日（あるいは28-35日）齢時の臨床検査、血清ELISA抗体の測定、血液検査などの実施が推奨される。

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ます。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ます。近年の研究の進展により、本症の病原体である*R. equi*に関する数多くの知見が得られてきており、本症の早期診断に有用な指針も数多く示されています。これらを参考に、感染子馬を早期に発見すれば治療が可能であることもわかってきました。本冊子の初版は、日高家畜衛生防疫推進協議会が主体となり、北里大学（獣医衛生学研究室 高井伸二教授）およびJRA競走馬総合研究所が共同で行った生産地疾病等調査研究で得られた成果を普及するために、平成8年7月に編集・発行されました。第2版の本冊子はそれ以降に実施された調査・研究で得られた新たな知見や数々の情報を盛り込んで改訂したものです。本冊子に記載した情報が、本邦のロドコッカス感染症の減少に多少なりとも貢献できれば幸いです。

日本中央競馬会競走馬総合研究所
片山 芳也

刊行の馬感染症シリーズ

1. 馬伝染性貧血診断のための寒天ゲル内沈降反応の術式……………昭和51年
2. 馬伝染性子宮炎……………昭和55年
3. 馬ウイルス性動脈炎……………昭和56年
4. 馬のサルモネラ症……………昭和56年
5. ベネズエラ馬脳炎……………昭和57年
6. アフリカ馬疫……………昭和58年
7. 馬鼻肺炎……………昭和59年
8. 馬鼻肺炎ウイルス感染症のための寒天ゲル内沈降反応の術式と応用……………昭和59年
9. 馬伝染性貧血診断のための寒天ゲル内沈降反応の術式（第2版）……………昭和59年
10. 馬ピロプラズマ病……………昭和61年
11. 馬の水胞性口炎……………昭和62年
12. 馬の寄生虫病……………昭和63年
13. 馬ウイルス性動脈炎（第2版）……………平成元年
14. 馬のポトマック熱……………平成2年
15. 消毒法Q&A……………平成3年
16. 馬トリパノゾーマ病……………平成5年
17. 馬インフルエンザ……………平成6年
18. 馬の感染症……………平成6年
19. 腺疫……………平成8年
20. 子馬のロドコツカス感染症……………平成8年
21. 馬鼻肺炎（第2版）……………平成9年
22. 馬伝染性子宮炎（第2版）……………平成9年
23. 馬原虫性脊髄脳炎……………平成10年
24. 馬パラチフス……………平成10年
25. 馬の日本脳炎……………平成10年
26. 馬ピロプラズマ病（第2版）……………平成11年
27. 馬のゲタウイルス感染症……………平成11年
28. 馬ロタウイルス感染症……………平成12年
29. 馬ウイルス性動脈炎（第2版・補訂版）……………平成12年
30. 馬伝染性貧血の診断術式（第3版）……………平成13年
31. 馬の水胞性口炎（第2版）……………平成13年
32. 馬の感染症（第2版）……………平成13年
33. 腺疫（第2版）……………平成14年
34. 馬原虫性脊髄脳炎（第2版）……………平成15年
35. 馬のウエストナイルウイルス感染症……………平成15年
36. 馬の真菌症……………平成16年
37. 馬の感染症（第3版）……………平成17年
38. 馬インフルエンザ（第2版）……………平成17年
39. 馬鼻肺炎（第3版）……………平成19年
40. 馬パラチフス（第2版）……………平成20年
41. 消毒法Q&A（第1版・補訂版）……………平成20年
42. 馬ウイルス性動脈炎（第3版）……………平成21年
43. 馬伝染性貧血の診断術式（第3版・補訂版）……………平成22年
44. 馬の寄生虫病（第1版・補訂版）……………平成22年
45. アフリカ馬疫（第2版）……………平成23年
46. 馬のゲタウイルス感染症（第1版・補訂版）……………平成23年
47. 腺疫（第3版）……………平成23年
48. 馬ピロプラズマ病（第3版）……………平成24年
49. 馬インフルエンザ（第3版）……………平成24年
50. 消毒法Q&A……………平成24年
51. 馬原虫性脊髄脳炎（第2版・補訂版）……………平成24年
52. 馬伝染性子宮炎（第3版）……………平成25年
53. 馬の感染症（第4版）……………平成25年
54. 馬のゲタウイルス感染症（第1版・補訂版）……………平成26年
55. ウマロタウイルス病（第2版）……………平成26年
56. 馬の寄生虫病（第1版・補訂版）……………平成26年
57. 馬の日本脳炎（第2版）……………平成26年
58. 馬パラチフス（第3版）……………平成27年

日本中央競馬会助成事業

地方競馬益金補助事業

平成8年7月 第1版発行

平成28年2月 第2版発行

公益社団法人 中央畜産会

〒101-0021 東京都千代田区外神田2-16-2

第2ディーアイシービル9F

TEL. 03-6206-0832