

馬の生産地疾病ロドコッカス・エクイ感染症の制御に関する研究

高井伸二

北里大学獣医学部教授・獣医学博士

ロドコッカス・エクイは1~3ヶ月齢の子馬における化膿性肺炎の起因菌であり、本菌感染症は全世界で発生し、我が国においても競走馬生産の中心地である北海道日高地方で毎年認められる。本症は肺膿瘍形成に至る難治性疾患で農家にとって経済的損失が大きく、生産地では依然として大きな問題となっている。筆者は馬生産地における本症の制御を目的として、本症の疫学調査と診断法の開発、本菌強毒株の病原性分子基盤の確立、強毒株と中等度毒力株の保有する病原性プラスミドの分子遺伝学的・分子生態学的研究を展開した。

1. 子馬のロドコッカス・エクイ感染症の疫学調査と診断法の開発

筆者らが開発した血清診断システムにより、北海道・日高地方で常時検査できる体制が整えられ、毎年800検体以上の感染を疑う子馬の抗体価測定が行われている。同時に経鼻カテーテルで採取する子馬気管洗浄液の細菌学的検査は本症確定診断法として臨床現場に定着した。その結果、臨床獣医師の本症に関する知識と診断技術が向上し、早期診断と早期治療が可能となり、重症・死亡例が減少した。

2. 病原性の分子基盤：強毒株の毒力マーカーの発見

本菌基準株 ATCC6939 株は子馬に本症を再現できないことから、その病原因子については不明であった。そこで筆者は、本菌の病原性について再検討し、強毒株が発現する毒力関連抗原と病原性プラスミドの存在を世界で初めて見いだした。強毒株は15-17 kDa 抗原を菌体表層に発現しマウスを 10^6 の菌量で死亡させたが、本抗原を発現しない株は致死毒性が無かった。さらに、この毒力関連抗原遺伝子が85~90kbのプラスミド上に存在し、本プラスミドの脱落が抗原発現と毒力の消失に一致することを証明した。その結果、ATCC6939株は実験室継代により本病原性プラスミドが脱落し無毒化したことが明らかとなった。

3. ロドコッカス・エクイ病原性プラスミドの分子遺伝学的研究

筆者は強毒株(ATCC33701)の病原性プラスミド全塩基配列(80,610bp)を決定し、その解析から、GC含量が異なり、15-17kDa毒力関連抗原(virulence-associated protein antigens; VapA)遺伝子とその関連抗原(VapC, D, E, F, G, H; Vap family) 遺伝子群を含み transposon の転移に関する酵素に類似する遺伝子2個がこの領域を挟むように存在する約23kbの Pathogenicity island (PAI)の存在を発見した。さらに PAI 以外の領域に相同性の高い潜在プラスミドを見出し、PAIが他の菌からロドコッカス

の潜在プラスミドに水平伝播した外来遺伝子であろうと推察した。

VapA は菌体表層に発現される蛋白抗原で、培養温度と培養液 pH によって発現調節を受ける。細胞内寄生菌の性格を有する本菌が食細胞内での生き残りに関与する遺伝子群であることが強く示唆され、VapA の発現が様々な環境因子によって転写制御されて病原性を発揮していることを明らかにした。

4. 強毒株の分子生態学：病原性プラスミドの多型性と分布の地域特性

筆者は強毒株が馬飼育環境土壌中にのみに分布し、地方病的発生牧場の放牧地土壌では強毒株汚染度が高いこと、世界各地の馬並び馬飼育環境由来強毒株が保有する病原性プラスミド DNA 制限酵素切断像の比較から、その多型性と分布に地域特異性を見出し、北米・南米には 15 世紀以降の初期探検隊や移民・征服民の馬と共に強毒株が侵入・伝播したと推察した。更に、わが国の軽種馬生産地並びに日本在来馬（北海道和種馬、木曾馬、御崎馬）と飼育環境土壌からも強毒株を分離し、本邦特有の病原性プラスミド型の国内分布に地域性を見出し、日本在来馬が古墳時代にアジア大陸から韓国を経て移動・定着したことから、韓国・中国・モンゴルへ在来馬の起源を遡って分子疫学調査を実施した。

5. 中等度毒力株の分子生態学：豚から AIDS 患者への感染

1990 年代に入るとヒト AIDS 患者におけるロドコッカス・エクイ感染症例報告が急増した。筆者は強毒株とは異なる分子量 20kDa の毒力関連抗原を発現する菌株を見出し、15-17kDa 抗原を VapA と呼称したので、20kDa 抗原は VapB と命名した。VapB を発現する AIDS 由来株はマウス LD₅₀ 値が強毒株に比べて約 10 倍大きいことから中等度毒力株と命名し、本菌の 3 つの毒力レベル（強毒、中等度、無毒）が 2 種類の病原性プラスミドに規定される病原性の分子基盤と概念を提唱した。

ところで強毒株は馬とその飼育環境土壌中にのみに生息するが、中等度毒力株はどこに生息する菌であろうか？本菌の分離報告を遡ると 1923 年以降は馬で、さらに 1940 年代には意外ではあるが豚で数多く報告されていた。そこで豚の下顎リンパ節分離株の病原性を検討したところ、約 4 % の健康な豚の下顎リンパ節から本菌が分離され、分離株の 95% が中等度毒力株であることを初めて明らかにした。豚由来の中等度毒力株は馬に対しても化膿性肺炎を起こすこと、最小感染量は 10⁶/頭で、馬に対してもその毒力が中等度であることを確認した。タイ・チェンマイ大学医学部では過去 10 年間の本菌感染症が 80 症例を越えており、現地調査を実施したところ、患者自宅の豚飼育環境から中等度毒力株を分離し、チェンマイにおける AIDS 患者での本菌感染症はその食文化や生活環境を強く反映していることが示唆され、人獣共通感染症としても本菌の存在に注意を払う必要があることを明らかにした。

6. 謝辞

長年、この研究を支えて頂いた国内外の共同研究者、北里大学獣医衛生学研究室教員（椿志郎名誉教授、角田勤准教授、佐々木由香子職員）並びに 250 名を越える専攻学生に深く感謝申し上げます。

7. 主な関連研究業績

- 1) Takai, S. *et al.* (1985) Enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of *Corynebacterium (Rhodococcus) equi* infection in foals. *Am. J. Vet. Res.*, 46:2166-2170.
- 2) Takai, S. *et al.* (1991) Identification of 15- to 17-kilodalton antigens associated with virulent *Rhodococcus equi*. *J. Clin. Microbiol.* 29:439-443.
- 3) Takai, S. *et al.* (1991) Association between a large plasmid and 15- to 17-kilodalton antigens in virulent *Rhodococcus equi*. *Infect. Immun.* 59:4056-4060.
- 4) Takai, S. *et al.* (1992) Virulence-associated 15- to 17-kilodalton antigens in *Rhodococcus equi*: temperature-dependent expression and location of the antigens. *Infect. Immun.* 60:2995-2997.
- 5) Takai, S. *et al.* (1993) Monoclonal antibody specific to virulence-associated 15- to 17-kilodalton antigens of *Rhodococcus equi*. *J. Clin. Microbiol.*, 31:2780-2782.
- 6) Takai, S. *et al.* (1994) Effect of growth temperature on maintenance of virulent *Rhodococcus equi*. *Vet. Microbiol.*, 39:187-192.
- 7) Takai, S. *et al.* (1994) Virulence of *Rhodococcus equi* isolates from patients with and without AIDS. *J. Clin. Microbiol.*, 32:457-460.
- 8) Sekizaki, T. *et al.* (1995) Cloning and nucleotide sequence of *Rhodococcus equi* virulence-associated 15- to 17-kilodalton antigens gene. *Gene*, 155:135-136.
- 9) Takai, S. *et al.* (1995) Identification of virulent *Rhodococcus equi* by amplification of gene coding for 15- to 17-kilodalton antigens. *J. Clin. Microbiol.* 33:1624-1627.
- 10) Takai, S. *et al.* (1995) Identification of virulence-associated antigens and plasmids in *Rhodococcus equi* from patients with AIDS. *J. Infect. Dis.*, 172:1306-1311.
- 11) Takai, S. *et al.* (1995) *Rhodococcus equi* infection in foals: Current concepts and implication for future research. *J. Equine Sci.* 6:105-119.
- 12) Takai, S. *et al.* (1996) Identification of the intermediately virulent *Rhodococcus equi* isolates from pigs. *J. Clin. Microbiol.*, 34: 1034-1037.
- 13) 高井伸二 (1996) *Rhodococcus equi* 研究の現状と新展開 日細会誌 51:485-496
- 14) Higuchi, T. *et al.* (1997) Clinical evaluation of the serodiagnostic value of enzyme-linked immunosorbent assay for *Rhodococcus equi* infection in foals. *Equine Vet. J.*, J. 29:274-278.
- 15) Takai, S. (1997) Epidemiology of *Rhodococcus equi* infections. *Vet. Microbiol.* 56:167-176.

- 16) Higuchi, T. et al. (1998) Measurement of ELISA antibody titer against *Rhodococcus equi* at 30 and 45 days of age in foals: an approach to early diagnosis of *R. equi* infection on endemic farms. J. Am. Vet. Med. Assoc. 212:976-981.
- 17) Takai, S. et al. (1999) Genetic analysis of virulent *Rhodococcus equi* based on restriction fragment length polymorphism of virulence plasmids: A molecular approach for epidemiology of virulent *R. equi* in the world. J. Clin. Microbiol., 37:3417-3420.
- 18) Hashikura, S. et al. (2000) Evaluation of nasotracheal aspiration as a diagnostic tool for *Rhodococcus equi* pneumonia in foals. Equine Vet. J., 32:560-564.
- 19) Takai, S. et al. (2000) Some epidemiological aspects of *Rhodococcus equi* infection in foals in Japan: A review of 108 cases in 1992-1998. J. Equine Sci., 11:7-14
- 20) Takai, S. et al. (2000) DNA sequence and comparison of virulence plasmids from *Rhodococcus equi* ATCC 33701 and 103. Infect. Immun., 68:6840-6847.
- 21) Byrne, B. A. et al. (2001) The virulence plasmid of *Rhodococcus equi* contains an inducible gene family encoding secreted protein. Infect. Immun., 69:650-656.
- 22) Takai, S. et al. (2003) *Rhodococcus equi* virulence plasmids recovered from horses and their environment in Jeju, Korea: 90-kb type II and a new variant, 90-kb type V. J. Vet. Med. Sci., 65:1313-1317.
- 23) Takai, S. et al. (2003) 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.
- 24) Takai S, et al. (2005) The absence of *Rhodococcus equi* in Mongolian horses. J Vet Med Sci., 67(6):611-613.
- 25) Makrai, L. et al. (2008) Isolation and characterisation of *Rhodococcus equi* from submaxillary lymph nodes of wild boars (*Sus scrofa*). Vet. Microbiol., 131(3-4):318-23.
- 26) Cohen, N. D. et al. (2008) Association of soil concentrations of *Rhodococcus equi* and occurrence of *R. equi* foal pneumonia at farms in central Kentucky. Am. J. Vet. Res., 69(3):385-395.
- 27) Ribeiro, M. G. et al. (2011) Virulence genes and plasmid profiles in *Rhodococcus equi* isolates from domestic pigs and wild boars (*Sus scrofa*) in Brazil. Res. Vet. Sci., 91:478-481.
- 28) Sakai, M. et al. (2012) Isolation of *Rhodococcus equi* from wild boars (*Sus scrofa*) in Japan. J. Wild Dis., 48(3):815-817.
- 29) Kakuda T, et al. (2015) Transcriptional regulation by VirR and VirS of members of the *Rhodococcus equi* virulence-associated protein multigene family. Microbiol. Immunol., 59(8):495-459.