

鹿児島,青森県および宮城県の豚下顎リンパ節ならびに農場
環境由来Rhodococcus equi中等度毒力株のプラスミド
DNA制限酵素切断型

| | |
|-------|--|
| 誌名 | 日本獣医師会雑誌 = Journal of the Japan Veterinary Medical Association |
| ISSN | 04466454 |
| 巻/号 | 5212 |
| 掲載ページ | p. 789-792 |
| 発行年月 | 1999年12月 |

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



鹿児島、青森県および宮城県の豚下顎リンパ節ならびに 農場環境由来 *Rhodococcus equi* 中等度毒力株の プラスミドDNA制限酵素切断型

福永成昭¹⁾ 大小田 勉²⁾ 勝見正道³⁾ 高井伸二⁴⁾

1) 鹿児島県志布志食肉衛生検査所 (〒899-7104 鹿児島県曾於郡志布志町安楽5972-10)

2) 鹿児島県曾於家畜保健衛生所 (〒899-7601 鹿児島県曾於郡松山町新橋21-17)

3) 仙台市食肉衛生検査所 (〒983-0034 仙台市宮城野区扇町6-3-6)

4) 北里大学獣医畜産学部 (〒034-8628 十和田市東23-35-1)

(1999年2月24日受付・1999年7月8日受理)

要 約

鹿児島および青森県の豚下顎リンパ節から *Rhodococcus equi* を分離し、モノクローナル抗体を用いて毒力関連20kDa抗原を検索したところ、ほとんどの分離株が20kDa抗原を発現する中等度毒力株であった。鹿児島、青森および宮城由来分離株の病原性プラスミドを制限酵素切断像により解析したところ8つの型に分類された。これらのうち、各地域に共通して認められたものは3つの型であり、これらに型別された分離株は鹿児島由来株では91.3%に、青森由来株では62.8%に、宮城由来株で74.7%に達した。さらに、鹿児島県の1出荷農場の飼育環境から本菌の分離を試みたところ、豚下顎リンパ節分離株と同一プラスミド型の中等度毒力株が出荷農場周辺土壌から分離された。以上の成績から、鹿児島、青森県および宮城県の豚下顎リンパ節に同一の病原性プラスミド型の中等度毒力株が同じ頻度で分布し、さらに本菌の伝播に土壌などの環境が重要な役割を担っている可能性が示唆された。

—キーワード：豚, *Rhodococcus equi*, 病原性プラスミド。

-----日獣会誌 52, 789~792 (1999)

Rhodococcus equi (*R. equi*) は1~3カ月齢の子馬に化膿性肺炎、潰瘍性腸炎および付属リンパ節炎を引き起こす細胞内寄生菌である [1, 5, 8]。子馬に対する病原性は15~17kDa抗原を菌体表層に発現する強毒株 ($LD_{50} = 10^6$ /マウス) のみが持ち、その毒力関連抗原遺伝子は85~90kbの病原性プラスミドにコードされていることが報告されている [8, 15]。

近年、AIDS患者において結核と酷似した臨床症状を示す日和見感染の原因菌として *R. equi* が注目されている [5, 6]。世界各国から集めたAIDS患者由来株の中には15~17kDa抗原を発現する強毒株のほかに、新たに20kDa抗原を発現する中等度毒力株 ($LD_{50} = 10^7$ /マウス) が認められ、この20kDa抗原遺伝子は79~95kbの4種類のサイズの異なるプラスミドにコードされていることが明らかとなった [12, 14]。15~17kDa抗原遺伝子と20kDa抗原遺伝子はDNAレベルでも79%の相同性があり、アミノ酸レベルでも75%一致する類似性の高い毒力関連抗原である [7]。2種の抗原が同時に発現する菌株は認められないことから、プラスミドDNAも不和合性を示すものと考えられている。

R. equi は子馬の病原細菌であるが、豚の下顎リンパ

節からも分離されることが以前から報告されている [1, 2, 4, 16, 17]。また本菌は食肉検査において、乾酪化などの異常を認めた豚の下顎リンパ節から高率に分離される (45.6%) が、肉眼病変を認めない下顎リンパ節や扁桃からも分離される (9.4~21.7%) ため、本菌の豚における病原性には不明な部分が多い [2, 5, 16, 17]。一方、AIDS患者における *R. equi* 感染症の感染源と馬や豚など本菌が分離される家畜との関連性を明らかにするための疫学調査の一環として、1994年に青森県において豚下顎リンパ節を検索したところ、分離株のほとんどは中等度毒力株であった [10]。またその際に分離した豚由来中等度毒力株の病原性プラスミドは制限酵素切断像の解析から79~100kbの5種類の型が認められ、これまでに明らかとなったAIDS患者由来株の4種類のうち2種類が同一であった [10]。したがって、中等度毒力株の病原性プラスミドはこれまで少なくとも7種類の存在が認められていることになる [10, 12]。

わが国における豚からの *R. equi* の分離に関する調査研究としては青森県以外には仙台市食肉衛生検査所の研究報告がある [2] が、本菌の荚膜血清型との関連を中心に検討されており、病原性プラスミドの保有状況は

不明である。また、青森および宮城県以外の地域における豚からの本菌分離に関する成績はまったくない。そこで今回、東北地方の汚染状況と比較する目的で地理的にも離れ、わが国の主要な豚肉生産県である鹿児島、青森県および宮城県の豚から *R. equi* を分離するとともに両県に加えて宮城県から分離された中等度毒力株の病原性プラスミドの型別を試みた。また、鹿児島県の調査では出荷農場別保菌状況ならびに高保菌率の豚を出荷した農場の周辺環境における本菌の汚染状況の解明を試みた。

材料および方法

菌分離方法および供試菌株：1996年3～8月に鹿児島県志布志食肉衛生検査所および1995年2～8月に青森県十和田食肉検査所に搬入され、生体検査に合格した豚1,103検体および1,592検体について実施した。出荷農場ごとに肉眼病変のみられない下顎リンパ節を採材し、80℃の湯中に3秒間浸して表面を消毒した後、豚下顎リンパ節分離のために改良された *R. equi* 選択培地（変法 NANT 培地：ナリジクス酸 20 μg/ml; ノボビオシン 2.5 μg/ml; 亜テルル酸カリウム 5 μg/ml）にスタンプ塗抹し、30℃で48時間培養した [10]。特徴的な *R. equi* コロニーをトリプトソイ寒天培地で30℃、48時間純培養し、CAMP 試験を実施して陽性の株を *R. equi* と同定した [10, 15, 16]。また、出荷農場周辺の環境材料として、場外では発酵処理前の汚物および土壌を、場内では糞便、土壌および飼料を用いた。なお、環境からの菌分離には NANAT 選択培地（ナリジクス酸 20 μg/ml; ノボビオシン 2.5 μg/ml; シクロヘキシミド 40 μg/ml; 亜テルル酸カリウム 50 μg/ml）を用いた [13, 15]。上記方法により分離された菌株に加えて、宮城県分離株として、1986年に仙台市食肉衛生検査所において、豚の下顎リンパ節から分離・保存されていた *R. equi* 156株を用いた。

毒力関連抗原の検出およびプラスミドプロファイル：毒力関連 20kDa 抗原の発現を確認するため分離株を Tris-HCl で pH 6.5 に調整したトリプトソイブイオンに接種し、38℃で48時間培養した。中等度毒力株および強毒株の毒力関連抗原である 20kDa 抗原および 15～17kDa 抗原に対するモノクローナル抗体を用いてウエスタンブロッティングを行い、毒力型を判定した [10, 14, 15]。したがって、以後 20kDa 抗原発現株を中等度毒力株と、15～17kDa 抗原発現株を強毒株と呼称する。

分離株はトリプトソイブイオン培地で30℃、48時間増菌後、アルカリ抽出法でプラスミドを抽出し、アガロースゲル電気泳動でプラスミドを確認した。プラスミドが存在した場合、既法に従って *EcoRI*、*BamHI* および *HindIII* の制限酵素処理を行い、プラスミド DNA の制限酵素切断像を解析した [10, 11, 14]。プラスミド型の対照として AIDS 患者由来代表株 4 菌株（A2, A5,

A11 および A43）を用いた [10]。

成 績

鹿児島および青森県の豚下顎リンパ節からの *R. equi* の分離と分離株における毒力抗原の検出：1996年3～8月の6カ月間に志布志食肉衛生検査所において鹿児島県の豚下顎リンパ節を出荷農場ごとに合計16日間採材した。採材した下顎リンパ節は肉眼病変がなくすべて生体検査で合格した豚からのものである。1,103検体中51検体より *R. equi* が分離され、分離率は4.6%であった。一方、青森県では1995年2～8月の7カ月間に豚下顎リンパ節1,592検体から65検体（4.1%）の分離率で *R. equi* が分離された（表1）。鹿児島由来283株、青森由来441株および宮城県由来156株について20kDa および15～17kDa 抗原に対する2種類のモノクローナル抗体を用いたウエスタンブロッティングにより毒力型を決定した。その結果、鹿児島、青森県および宮城県の中等度毒力株の検出率は97.9、84.8および58.3%であった（表1）。

鹿児島、青森県および宮城県で分離された中等度毒力株のプラスミド型別の比較：中等度毒力株の病原性プラスミドを分類するため3種類の制限酵素 *EcoRI*、*BamHI* および *HindIII* を用いてプラスミド DNA 切断像を解析したところ、*HindIII* においてはすべて類似し、*BamHI* においては切断されたバンドの数が多く識別が

表1 飼育地および採取年を異にする豚下顎リンパ節からの *R. equi* 中等度毒力株の分離

| 飼育地 | 採取年 | <i>R. equi</i> 分離率 (%) ¹⁾ | 中等度毒力株検出率 (%) ²⁾ |
|-----|------|--------------------------------------|-----------------------------|
| 鹿児島 | 1996 | 51/1,103 (4.6) | 277/283 (97.9) |
| 青森 | 1995 | 65/1,592 (4.1) | 374/441 (84.8) |
| 宮城 | 1986 | — ³⁾ | 91/156 (58.3) |

- 1) 分離陽性検体数/検索検体数。
- 2) 中等度毒力株数/検索株数。
- 3) 不明。

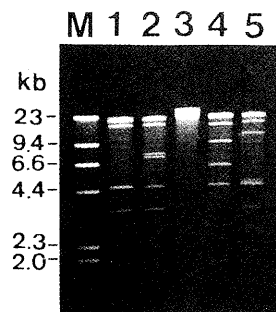


図1 20kDa 抗原を発現する鹿児島由来株に認められた5種類のプラスミドの制限酵素 *EcoRI* 切断像。

M は λ ファージ、レーン1から5が代表株（レーン1：1型、レーン2：3型、レーン3：5型、レーン4：6型、レーン5：7型）。これらのうちレーン1はエイズ患者由来株プラスミド型A2と、さらにレーン5はエイズ患者由来株のプラスミド型A5と同一である。

表2 豚下顎リンパ節から分離された中等度毒力株のプラスミドの制限酵素切断像による型別状況

| 生産地 | 採取年 | 検査菌株数 | プラスミド型 | | | | | | | |
|-----|------|-------|------------|------------|-----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| | | | 1 (=A2) | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 (=A5) | 8 |
| 鹿児島 | 1996 | 277 | 162 (58.3) | | 81 (29.2) | | 10 (3.6) | 10 (3.6) | 14 (5.1) | |
| 青森 | 1995 | 374 | 173 (46.3) | 116 (31.0) | 51 (13.6) | 12 (3.2) | 11 (2.9) | 1 (0.3) | | 10 (2.7) |
| 宮城 | 1986 | 91 | 50 (54.9) | 12 (13.2) | 9 (9.9) | | 9 (9.9) | | 9 (9.9) | 2 (2.2) |

() 内は%

表3 出荷農場環境からの *R. equi* 中等度毒力株の分離

| 採取材料 | <i>R. equi</i> 分離率 ¹⁾ (%) | 中等度毒力株検出率 ²⁾ (%) |
|---------|--------------------------------------|-----------------------------|
| 発酵処理前汚物 | 4/5 (80.0) | 1/29 ³⁾ (3.4) |
| 養豚場周辺土壌 | 10/12 (83.3) | 7/88 ⁴⁾ (8.0) |
| 糞便 | 1/11 (9.1) | 0/4 (0) |
| 飼料 | 0/4 (0) | — |
| 養豚場内土壌 | 0/3 (0) | — |

- 1) 分離陽性検体数/検査検体数.
- 2) 中等度毒力株数/検査株数.
- 3) プラスミド型: 7型
- 4) プラスミド型: 3型, 3株; 7型: 4株.

困難であった。EcoRIによる切断像の比較では8つのプラスミド型に型別された。図1には鹿児島分離株277株に認められた制限酵素EcoRIでの5つのプラスミド型を代表例として示した。

鹿児島県で分離された277株, 青森県で分離された374株および宮城県で分離された91株の中等度毒力株の病原性プラスミドは制限酵素切断像から5, 7および6つの型に型別された。分離菌株の制限酵素切断像によるプラスミド型別状況を表2に示した。8つのプラスミド型の中で1, 3および5型が鹿児島, 青森および宮城由来株に共通して認められ, これら共通型に型別される頻度は鹿児島由来株では91.3%, 青森由来株では62.8%および宮城由来株で74.7%であった。

鹿児島県の出荷農場別 *R. equi* 分離率: 出荷農場別に豚下顎リンパ節からの分離率を比較したところ29の出荷農場のうち14農場 (A~N) から本菌が1.8~12.5%の頻度で分離された。そこで, 平均分離率10.7%を示したG出荷農場に注目し, 農場周辺環境からの本菌の分離を試みた。

G出荷農場周辺環境からの *R. equi* の分離とプラスミド型別: G出荷農場周辺環境からの本菌の分離を実施した (表3)。その結果, 発酵処理前の汚物5検体中4検体, 場外周辺土壌12検体中10検体および豚糞便11検体中1検体から *R. equi* が分離された。これらの環境分離株の毒力関連抗原について検討したところ, 発酵処理前の汚物から分離された29株中1株 (3.4%) が中等度毒力株で, そのプラスミド型は7型であった。同じく周辺の土壌から分離された88株中7株 (8.0%) が中等度毒力株で, そのプラスミド型は3株が3型, 4株が7型であった (表3)。なお, G出荷農場豚由来中等度毒力株

のプラスミド型については3型 (24/61株), 1型 (18/61株), 5型 (10/61株), 7型 (9/61株) の順に多く認められた。

考 察

豚下顎リンパ節から *R. equi* が分離されることは1940年代から知られていたが, 当時から本菌の豚に対する病原性については不明のまま, 未解決の問題として残されてきた [1, 3, 5]。わが国においても豚下顎リンパ節からの分離が青森県や宮城県など東北地方において報告されていた [2, 3, 10, 16, 17]。しかし, 全国規模の調査は行われておらず, 豚における詳細な分布は不明であった。今回, 東北地方とは地理的に離れた有数の畜産県である鹿児島県の豚について疫学調査を行ったところ, 中等度毒力株が青森県とほぼ同率で分離され, *R. equi* の中等度毒力株がわが国の豚下顎リンパ節内に広く分布している可能性が示唆された。

鹿児島, 青森県および宮城県で分離された中等度毒力株が保有する病原性プラスミドは, 制限酵素切断像による解析で全部で8つに型に型別された。これらのうち3つの型が鹿児島, 青森および宮城由来株に共通しており, 豚下顎リンパ節由来中等度毒力株における病原性プラスミドがこれら共通型に型別される頻度は少なくとも60%以上であったことから地域差が少ないことが示唆された。

子馬における本菌感染症の疫学調査は広範かつ詳細に行われており, 本症が地方病的に流行する牧場においては飼育環境が15~17kDa抗原を発現する強毒株に汚染されており, これらが毎年生産される子馬へ経気道感染することが明らかとなっている [13]。一方, 鹿児島県の1出荷農場周辺の環境から分離された中等度毒力株の一部の病原性プラスミド型は, 同農場出荷豚の下顎リンパ節からの分離株のもの一致した。著者らはこれまでに子馬の本症の疫学調査を行い, 軽種馬生産牧場における本症の発生と強毒株による飼育環境の汚染との関連性を指摘した [8]。飼育環境土壌を調査した31牧場中24牧場から1.7~23.3% (平均6.5%) の割合で強毒株が分離され, 分離率の高い牧場では本症の地方病的流行が確認された。残り7牧場から強毒株はまったく分離されなかった [9]。今回の豚の飼育環境調査用に採取した検体数は少ないが, 馬の疫学調査成績から推察すると, これらの土壌が豚への感染源となっている可能性は否定で

きない。

AIDS患者における本菌感染症の発生が世界的に認められるに至り、本菌の病原性と人との関連性が注目されている [5, 6]。AIDS患者は生体防御能が著しく減退することによりさまざまな日和見感染症を発症するが [5, 6]、豚下顎リンパ節およびAIDS患者由来中等度毒力株に共通するプラスミド型が認められた事実は大変興味深い。わが国のAIDS患者から本菌が分離された報告は現時点ではないが、海外のAIDS患者における本菌感染症例の約3割は何らかの形で家畜との接触があると報告されている [5, 6, 12]。一方、中等度毒力株は、現在のところ人の生活環境（日本全国の公園内土壌）や馬の飼育環境からはまったく分離されていない [11]。したがって、豚下顎リンパ節や飼育環境に存在する本菌が、家畜との接触等、何らかの経路により人へ感染する可能性は十分に考慮されるべきであろう。豚の体内における中等度毒力株の分布および養豚場内での汚染の機序等、豚と関連する本菌の生態は依然として不明な点が多く、AIDS患者を含めた免疫抑制状態の人への感染経路の解明など、人獣共通感染症の一つとして感染防御の観点からも疫学を中心とした検討が今後必要と考えられる。

引用文献

- [1] Barton MD, Hughes KL : Vet Bull, 50, 65-80 (1980)
- [2] Katsumi M, Kodama N, Miki Y, Hiramune T, Kikuchi N, Yanagawa R, Nakazawa M : Zentralbl Veterinarmed, B38, 299-302 (1991)
- [3] Madarame H, Yaegashi R, Fukunaga N, Matsukuma M, Mutoh K, Morisawa N, Sasaki Y, Tsubaki S, Hasegawa Y, Takai S : J Comp Pathol, 119, 397-405 (1998)
- [4] Mutimer MD, Prescott JF, Woolcock JB : Aust Vet J, 58, 67-69 (1982)
- [5] Prescott JF : Clin Microbiol Rev, 4, 20-34 (1991)
- [6] Scott MA, Graham BS, Verrall R, Dixon R, Schaffner W, Tham KT : Am J Clin Pathol, 103, 649-655 (1995)
- [7] 高井伸二 : 日本細菌学雑誌, 51, 485-496 (1996)
- [8] Takai S : Vet Microbiol, 56, 167-176 (1997)
- [9] Takai S, Anzai T, Yamaguchi K, Kakizaki S, Takahagi J, Sato Y, Takehara F, Tamada Y, Matsukura S, Tani A, Kato M, Seno N, Sasaki Y, Tsubaki S, Kamada M : J Equine Sci, 5, 21-25 (1994)
- [10] Takai S, Fukunaga N, Ochiai S, Imai Y, Sasaki Y, Tsubaki S, Sekizaki T : J Clin Microbiol, 34, 1034-1037 (1996)
- [11] Takai S, Fukunaga N, Ochiai S, Sakai T, Sasaki Y, Tsubaki S : J Vet Med Sci, 58, 669-672 (1994)
- [12] Takai S, Imai Y, Fukunaga N, Uchida Y, Kamisawa K, Sasaki Y, Tsubaki S, Sekizaki T : J Infect Dis, 172, 1306-1311 (1995)
- [13] Takai S, Koike K, Ohbushi S, Izumi C, Tsubaki S : J Clin Microbiol, 29, 2887-2889 (1991)
- [14] Takai S, Sasaki Y, Ikeda T, Uchida Y, Tsubaki S, Sekizaki T : J Clin Microbiol, 32, 457-460 (1994)
- [15] Takai S, Sekizaki T, Ozawa T, Sugawara T, Watanabe Y, Tsubaki S : Infect Immun, 59, 4056-4060 (1991)
- [16] Takai S, Takeuchi T, Tsubaki S : J Vet Med Sci, 48, 445-448 (1986)
- [17] Takai S, Tsubaki S : Jpn J Vet Sci, 47, 493-496 (1985)

Restriction Cleavage Patterns of Plasmid DNA of Intermediately Virulent *Rhodococcus equi* Isolates from the Mandibular Lymph Nodes of Pigs in Kagoshima, Aomori and Miyagi Prefectures and the Environment of Pig-breeding Farms

Nariaki FUKUNAGA*, Tsutomu OKODA, Masamichi KATSUMI and Shinji TAKAI

* *Shibushi Meat Inspection Center, Kagoshima Prefectural Government, 5972-10 Anraku, Shibushi-cho, So, Kagoshima 899-7104, Japan*

SUMMARY

Rhodococcus equi (*R. equi*) was isolated from 4.6 and 4.1% of the mandibular lymph nodes of pigs in Kagoshima and Aomori Prefectures. Virulence of the isolates was investigated by means of immuno-noblotting with a monoclonal antibody against a 20-kDa virulence-associated antigen. Most isolates were intermediately virulent manifesting a 20-kDa antigen. As a result of analysis by means of plasmid-DNA restriction cleavage patterns, isolates with the 20-kDa antigen from Kagoshima, Aomori and Miyagi Prefectures were divided into 8 types. Three of the 8 types were observed commonly in the isolates of 3 Prefectures. Of Kagoshima isolates, 94.9%, 63.1% of Aomori isolates and 74.7% of Miyagi isolates were typed as these 3 types. Intermediately virulent *R. equi* was isolated from the environment of a pig-breeding farm in Kagoshima Prefecture and one plasmid type of soil isolates was proved identical with that of isolates from pigs on the farm. This investigation shows that intermediately virulent *R. equi* was almost equally prevalent in the mandibular lymph nodes of pigs in Kagoshima, Aomori and Miyagi Prefectures. The role of soil might be significant in distribution of intermediately virulent *R. equi* in pig-breeding farms. — Key words : pig, *Rhodococcus equi*, virulence plasmid.

J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 52, 789 ~ 792 (1999)