

氏名(本籍)	中澤宗生(長野県)
学位の種類	獣医学博士
学位記番号	乙第220号
学位授与の要件	学位規則第3条第2項該当
学位論文題名	馬由来 <i>Rhodococcus equi</i> に関する研究
論文審査委員	(主査) 教授 田 淵 清 (副査) 教授 清 水 武 彦 教授 尾 形 学

### 論 文 内 容 の 要 旨

*Rhodococcus equi* (Magnusson 1923) Goodfellow and Alderson 1979 は子馬の肺炎・腸間膜リンパ節炎・潰瘍性腸炎・結合織炎および関節炎,あるいは豚の頸部リンパ節炎の原因菌として古くから知られているが,他方,馬・牛・豚・羊・人などの糞便や土壌からも分離され,広く自然界に分布していることが最近明らかにされてきた。この事実は,本菌が腐生菌として自然界や動物の糞便中に生存していることを示しているが,同時に子馬感染症の疫学においては,とくに馬の腸管に生息している本菌の存在を無視することはできない。したがって,本菌の生物学および血清学的型別法を確立し,糞便由来株と病変部由来株との関連を解明する必要性が重要な課題として残されている。

一方,子馬における本菌の感染像は,わが国や諸外国における数多くの症例報告によってほぼ明らかにされたが,本菌の毒力因子や本症の病理発生といった基本的な問題についての検討は極めて少ないのが実状である。

著者は上記の *R. equi* に関する重要な問題点を解明するため,まず馬の糞便における *R. equi* の保有状況を調べ,本菌の生態の一端を明らかにすることを試みた。ついで,糞便および病変部由来株の生理・生化学的性状を比較検討するとともに,血清群別法を確立し,血清群による特徴づけを行ない,その分布を比較することによって両者の関連性を検討した。さらに,本菌の毒力因子を解析するために,マウス培養細胞を実験モデルとして用い,一連の研究を実施した。

#### 1. 馬の糞便からの *R. equi* の定量培養

馬の糞便から *R. equi* を選択的かつ定量的に分離するための選択分離培地の検討を行なった。その結果,本菌の選択分離培地として報告されている NANAT 培地には *R. equi* に対する発育阻止作用があり,しかもそれが本培地に添加されている亜テルル酸カリウムの影響であることがわかった。したがって,この培地を用いての糞便における本菌の正確な定量培養は不可能であることが明らかとなった。

そこで, NANAT 培地から亜テルル酸カリウムを除き,さらにナリジキシン酸 (NA) 10.0  $\mu\text{g/ml}$ , ノビオン (NB) 12.5  $\mu\text{g/ml}$  およびシクロヘキシミド (CH) 20.0  $\mu\text{g/ml}$  を添加した NANC 培地を試作し,糞便の定量培養に応用したところ, *R. equi* に対する発育阻止作用は殆ど認められず,しかも共存菌の発育を抑える優れた培地であることが明らかとなった。

つぎに, NANC 培地を用いて母馬と子馬の糞便における *R. equi* の定量培養を行なった。その結果,検

査対象とした127頭の全例から本菌が分離された。糞便1グラム中の平均菌数は母馬において $8.42 \times 10^2$  CFU、子馬において $7.57 \times 10^2$  CFUであり、両者に菌数の差は認められなかった。また、母馬5頭の糞便内菌数の推移を経時的に調べたところ、本菌は全期間(1980年1月～7月)を通して $10^2 \sim 10^4$  CFU/gの範囲で分離されたが、とくに季節的な菌数の変動は認められなかった。

このように、*R. equi* は馬の糞便内に常在しており、腸内細菌叢を構成する1菌種であることが明らかとなった。

## 2. *R. equi* の生理・生化学的性状

本菌が馬の正常な糞便から例外なく分離されることから、本菌感染症における糞便由来株の存在を無視することはできない。

そこで、分離由来の相違により菌株間の生理・生化学的性状に特徴的な差異があるかどうかを知らるために、糞便由来40株、病変部由来40株および参考株8株の計88株について、一般的な生理・生化学的性状23項目および19種類の菌体酵素活性を調べ比較した。その結果、糞便由来株も病変部由来株もおおむね参考株と同様の性状を示し、分離由来の相違による特徴的な差異は認められないことが明らかとなった。

## 3. *R. equi* の血清群別

本研究におけるこれまでの成績から、*R. equi* が馬の腸内細菌叢を構成する1菌種であること、および糞便由来株と病変部由来株との間に生理・生化学的性状の差異は殆ど認められないことが明らかとなった。

そこで血清学的性状にもとづく本菌の特徴づけ、すなわち血清群別法を確立し、糞便および病変部由来株の血清群の分布や異同を明らかにすることを目的として実験を行なった。併せて Prescott の血清型と著者の血清群との関連についても検討を加えた。

### 1) 血清群別法の確立

総計1,195株の分離株から代表株を選び、それらの血清学的性状を交差定量凝集反応と吸収テストにより検討し、血清群別用抗血清の作製を試みた。

代表株の抗血清はすべてホルマリン処理死菌でウサギを免疫して作製した。交差定量凝集反応において、ホルマリン処理抗原を凝集原とした場合、27代表株の抗血清はホモの抗原に対して1:640～1:2,560の凝集価を示し、このうち13の抗血清はホモの抗原とのみ特異的に反応したが、残りの14は凝集価は低いものの1～4のヘテロ抗原とも交差した。

一方、凝集原としてオートクレーブ処理抗原を用いた場合、27代表株の抗血清はホモの抗原に対して1:320～1:2,560の凝集価を示したが、このうちホモの抗原と特異的に反応した抗血清は1つのみで、他の26の抗血清は1～8のヘテロ抗原とも交差反応を示した。このようにオートクレーブ処理によって抗原の特異性が失われることがわかった。このことは、ホルマリン処理抗原のほうがオートクレーブ処理抗原よりも株特異性があり、血清群別用抗原として適していることを示している。

しかし、ホルマリン処理抗原を用いた交差定量凝集反応でも14の抗血清に交差反応が認められたが、これらに対応するヘテロ抗原で吸収操作を行なった結果、特異抗体の存在が確認され、結局、総計27の特異抗血清を作製することができた。これらを血清群別用抗血清とし血清群1～27の番号を付した。

つぎに、分離株の血清群別を迅速かつ容易に行なうために、上記群別用抗血清を用いてスライド凝集反応を検討した。その結果、1:4～1:10に稀釈した群別用抗血清と抗原濃度 McFarland No.10に調

整したホルマリン処理抗原の組合せで、交差定量凝集反応の結果と同じ特異反応が得られ、スライド凝集反応による血清群別が可能となった。

## 2) 糞便および病変部由来株の血清群

上述のスライド凝集反応により糞便由来 821 株と病変部由来 374 株の群別を行ない血清群を比較した。

糞便由来株のうち 84.3% (692 株) は次の 9 つの血清群に群別された。群 4 (204 株)、群 2 (107 株)、群 11 (93 株)、群 3 (82 株)、群 15 (59 株)、群 8 (42 株)、群 7 (36 株)、群 1 (35 群) および群 14 (34 株) であり、残りの 15.7% (129 株) は別の 18 血清群 (群 : 5, 6, 9, 10, 12, 13, 16~27) に属していた。

一方、病変部由来株では 86.4% (323 株) が群 4 (122 株)、群 2 (112 株)、群 2 (112 株) および群 8 (89 株) に属し、残りの 13.6% (51 株) は 7 血清群 (群 : 1, 3, 5, 6, 7, 9, 11) に群別された。

以上のように、糞便由来株の血清群は病変部由来株のそれに比較すると多種多様であるが、上述の 9 つの血清群に集中する。また、病変部由来株も群 4、群 2 および群 8 に集中しているが、これら 3 つの血清群は糞便由来株にも多く検出され、両者の関連が示唆された。

## 3) Prescott の血清型との関連

Prescott は各種動物由来 *R. equi* 97 株を 7 つの血清型に分類している。そこで彼の血清型に属する菌株を入手し、著者の群別法でそれらの血清群を調べてみた。

その結果、Prescott の 1 型は著者の群 4、2 型は群 16、3 型は群 2、4 型は群 12、5 型は群 21、6 型は群 1、および 7 型は群 9 にそれぞれ一致した。さらに、ATCC や NC TC から入手した 8 株の本菌も著者の血清群に全株群別された。

したがって、ここに確立した血清群別法は馬を含む各種動物や土壌由来株の群別にも応用できることが明らかとなり、本菌感染症の疫学的研究に広く活用できるものと思われる。

## 4. *R. equi* の毒力

本菌の毒力因子や発症機序についてはこれまでに十分な検討が加えられたとはいえ、不明な点が少なくなかった。なかでも、本菌感染症の実験的再現は常に成功するものではなく、これは宿主側の条件もさることながら、用いた菌株に毒力の差異があるためと推測された。

そこで、本菌の毒力をマウスに対する LD<sub>50</sub>、生体内での増殖態度、さらに培養したマクロファージや単球に対する態度を指標として検討した。

その結果、マウスに対する LD<sub>50</sub> は菌株により異なり、10<sup>8</sup> CFU 以上の株、10<sup>7</sup> CFU の株および 10<sup>6</sup> CFU の株の 3 段階に分かれ、菌株により毒力に差があることがわかった。また、糞便および病変部由来株のマウスに対する毒力を比較したところ、明らかに病変部由来株に毒力株が多く認められた (P < 0.01)。

そこで、本菌の毒力因子を調べるために、毒力株と非毒力株をマウスに注射し、経時的に病理組織検査を実施するとともに、脾臓における生菌数を調べたところ、毒力株は肝臓や脾臓の細網内皮系の細胞内で増殖しているのに対し、非毒力株ではそのような所見は全く得られなかった。したがって、毒力株と非毒力株の決定的な違いは生体内、とくに細網内皮系細胞内における増殖能の差にあることが明らかとなった。

さらに、上述の所見を *in vitro* で証明するために、培養したマウス腹腔マクロファージや馬の単球を用い両者の増殖能を比較したところ、毒力株は *in vitro* の細胞内でも増殖できるのに対し、非毒力株は増殖できず生残率は有意に低下した (P < 0.01)。

前述の結果から、*R. equi* は外観健康な馬（母子とも）の糞便から高率（127/127）に検出されること、および本菌はその莖膜様抗原によって27種の血清群に分類されることが明らかとなった。馬の病変部由来株の86.4%（323/374株）は3種の血清群（群：2, 4 & 8）に分類された。糞便由来株の84.3%（692/821株）は9種血清群（群：1, 2, 3, 4, 7, 8, 11, 14&15）に分類されたが、血清群2, 4および8に所属する株はその43.0%（352/821株）を占めていた。このことから、本菌による馬とくに子馬感染症の感染源として糞便中の *R. equi* が重要であり、本症は内因性感染として発症するものと推定した。そして、マウス感染実験およびマウスマクロファージと馬単球による食菌作用の実験成績から、*R. equi* の毒力は特定血清群の種類によらず、菌の細胞内増殖能の強弱（有無）によって規制されることを初めて証明した。

## 論文審査の結果の要旨

*Rhodococcus equi* は従来、*Corynebacterium equi* と呼ばれ、Gram 陽性の桿菌で、淡桃色・ムコイド状集落の形成を特徴とし、古くから馬や豚の化膿性炎および流産、とくに子馬の気管支肺炎・リンパ節炎・腸炎・関節炎などの原因菌として知られていた。一方、本菌は自然界に広く分布し、各種動物の糞便からも分離されることが報告されていた。しかしながら、本菌の子馬感染に関する疫学的側面については必ずしも十分に研究されておらず、その実態は不明であった。

著者は *R. equi* の子馬感染をとりまく感染環を中心にして、本菌の生態学的側面および菌側発病要因を解明すべく一連の研究を実施し、本菌の血清群別法を確立するとともに、病原性との関連性についても一定の方向性を明示した。本研究の概要は次のとおりである。

### 1. 馬の糞便からの *R. equi* 定量培養法の確立

*R. equi* の選択分離培地としての NANAT 培地（0.005%  $K_2TeO_3$  添加）に本菌の発育阻止作用を認めたので培地の改良に着手し、選択的定量培養が可能な NANC 培地（NA・NB・CH 添加）を作出した。

NANC 培地を用いて、外観健康馬 127 頭（母馬：91, 子馬：36）の糞便から *R. equi* の分離・定量培養を試みたところ、本菌は全例から検出され、平均菌数は母馬； $10^{2.93}CFU/g$ , 子馬； $10^{2.88}CFU/g$  であって菌数に差はなかった。本菌は生後10日齢ですでに腸管内に定着し、母馬（5頭）の経時的観察（1980年1月～7月）からは菌数の季節的変動は認められず、腸内細菌の1構成菌であると判断された。

### 2. *R. equi* の生理・生化学的性状

馬の病巣由来株と糞便由来株との間に本菌の生理・生化学的性状に差異があるかどうか知るために42項目にわたる生理・生化学的性状を比較検討した。供試菌88株（馬病巣由来菌40株、糞便由来菌40株および参考株8株）は全て同様の活性パターンを示し、分離由来による菌性状の差異は認められなかった。

### 3. *R. equi* の血清群別

*R. equi* の血清型としては Prescott の7種が知られているが、今回、新鮮分離菌1,195株を用いて検討した。その結果、本菌の血清群別には莖膜様抗原に基づく群別が最も有効・安定的であった。本菌のホルマリン処理死菌抗原とそのウサギ抗血清との間の交差定量凝集反応および吸収試験成績から、本菌種内の特異抗原としては27種存在することが明らかとなった。そして、この27種群別用抗血清はホルマリン処理死菌（Mc Farland No.10濃度）によるスライド凝集反応が可能であって、全供試菌1,195株が群別された。

そこで、馬の病巣由来菌374株と糞便由来菌821株との間の血清群別パターンについて比較したところ、

病巣由来株の86.4% (323/374株)は3種の血清群(群:2, 4 & 8)に分類されたが、糞便由来株の84.3% (692/821株)は9種血清群(群:1, 2, 3, 4, 7, 8, 11, 14 & 15)に分類され、血清群:2, 4, 8に所属する株は43.0% (353/821株)であった。このことから、糞便中の *R. equi* が本症とくに子馬感染症の感染源として重要であり、本症は内因性感染として発症するものと推定された。

#### 4. *R. equi* の毒力

*R. equi* の血清群と毒力との関連性を明らかにする目的で、マウスに対するLD<sub>50</sub>と体内菌増殖態度および *in vitro* 培養細胞での菌増殖能を指標として検討した。

マウスLD<sub>50</sub>を指標とした場合、*R. equi* の毒力は3段階(10<sup>6</sup>, 10<sup>7</sup> & 10<sup>8</sup> CFU/mouse)に区分され、この毒力株はマウス生体内、特に細網内皮系で著しく増殖(接種5日後:10<sup>7.45</sup> CFU/脾)しているのに対して、非毒力株では1週間以内に菌の消失が認められた。一方、この毒力株は糞便由来株より馬病巣由来株中に多く認められたが(P<0.01)、必ずしも馬病巣由来株の主要血清群:2, 4および8に限定されるものではなかった。

培養細胞(マウス由来マクロファージと馬由来単球)における食菌率および細胞内菌増殖性を指標とした場合、*R. equi* の毒力株と非毒力株間の食菌率上に差は認められなかったが、細胞内菌増殖態度には有意な差が認められた(P<0.01)。すなわち、マウスマクロファージにおいては毒力株群が24時間後に、1.5~3倍に菌数増加を示すのに対して、非毒力株群では菌数の減少傾向(1/7~1/2)が認められた。そして、馬単球でも類似の傾向が認められたが、マウスマクロファージ内での強増殖株のみが、菌数増加(48時間後:2倍)を示し、他の株では菌数の顕著な減少または消失を示した。

この実験成績から、本菌の毒力は宿主細胞内における増殖能と深く関係していることが明らかとなった。前述のように、著者は *R. equi* の血清群別法を確立して、馬の病巣由来株と糞便由来株との間の血清群に一定の関連性のあることを明らかにするとともに、本菌の病原性(毒力)はその特定血清群によって規定されるものではなく、むしろ宿主細胞内での菌増殖性の強弱によって規定されることを *in vitro* 培養細胞を用いて証明した。本研究の成果は獣医細菌学および獣医伝染病学上、寄与するところ大であり、獣医学博士の学位を授与するにふさわしい業績と評価する。