

# 腺疫集団発生事例における腺疫特異的血清診断法の 応用ならびに分離腺疫菌株の遺伝学的解析

帆保誠二<sup>1)†</sup> 村中雅則<sup>1)</sup> 丹羽秀和<sup>1)</sup> 内山孝志<sup>1)</sup>  
依田真理<sup>2)</sup> 鈴木優美子<sup>2)</sup> 前田守幸<sup>2)</sup>

1) 日本中央競馬会競走馬総合研究所栃木支所 (〒329-0412 下野市柴1400-4)  
2) 福島県会津家畜保健衛生所 (〒965-0077 会津若松市高野町上高野村前90)

(2009年12月7日受付・2010年5月6日受理)

## 要 約

100頭規模の馬を飼養可能な牧場において発生した腺疫を清浄化することを目的に、腺疫特異的血清診断法を応用するとともに、分離腺疫菌株の遺伝学的解析を行った。第1回全頭検査では91頭中17頭がPCR陽性、7頭が腺疫菌分離陽性であった。しかし、約1カ月間隔で実施した第2回以降の全頭検査では、PCRおよび腺疫菌分離陽性頭数がそれぞれ漸減し、第4～6回全頭検査において、連続3回の腺疫菌分離陰性が確認された。このことから、当該事例は清浄化されたものと判断した。また、分離された腺疫菌株からは2種類の*seM* 遺伝子型が特定された。本事例では、鼻腔粘膜からの細菌検索に加えて腺疫特異的血清診断法を応用した結果、検査時点での腺疫罹患馬、腺疫非罹患馬および腺疫快復馬を明確に区別することができ、腺疫の清浄化を効率的に進めることが可能であった。

—キーワード：遺伝学的解析，集団発生，血清診断法，腺疫，腺疫菌。

----- 日獣会誌 63, 696～701 (2010)

腺疫は、腺疫菌 (*Streptococcus equi* subsp. *equi*: *S. equi*) の感染によって起こる馬科動物に特有の伝染病である [1-3]。腺疫菌は、馬の頭頸部リンパ節を中心に感染し、馬同士の直接的な接触や、飼料、飲用水、飼養者、馬房をはじめとした飼養環境要因を介して伝染性に広がる。腺疫に罹患した馬は、通常、抗体の上昇に伴って数週間のうちに自然治癒するが、重症例では死亡することもあり、その致死率は8.1%と報告されている [1]。腺疫の発生は、ヨーロッパ諸国やアメリカ合衆国を中心に報告されており、馬の競技会や競馬開催の中止に至った事例も少なくない。わが国においても、散発的な発生が認められており、集団発生による汚染の拡大が危惧されている [4, 5]。いったん腺疫が発生すると、その清浄化には多大な労力とコストを必要とすることから防疫上きわめて重要な伝染病の一つである [1-3]。

伝染病の防あつには適確な診断が欠かせないが、従来、腺疫の血清学的診断法として報告されている診断法は、腺疫菌の亜種である *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* (*S. zooepidemicus*) 感染馬血清と交差反応する不十分なものであった [6-8]。Hoboら [9]

は、腺疫菌の主要な表層蛋白質である *SeM* および *SzPSe* のエピトープ解析を行い、*SzPSe* のC末端領域に存在するプロリン-グルタミン酸-プロリン-リジン (PEPK) 繰り返しアミノ酸配列に従って合成したペプチドは、腺疫菌感染馬血清と強く反応するが *S. zooepidemicus* 感染馬血清および *S. zooepidemicus* で免疫した馬の血清とはほとんど反応しないことを報告した。またHoboら [10] は、このPEPK繰り返しペプチド抗原の腺疫血清診断用抗原としての有用性を確認することを目的に、*S. zooepidemicus* 感染馬血清を含む多くの血清検体を用いて本抗原の感度および特異性について検討した結果、PEPKのアミノ酸配列を5回繰り返すペプチド抗原 (PEPK×5抗原) が腺疫血清診断用抗原として最も適していることを明らかにした。

本研究では、腺疫集団発生事例の清浄化を推進することを目的に、PEPK×5抗原を用いた腺疫特異的血清診断法を腺疫集団発生牧場の清浄化に応用した。さらに、分離腺疫菌株の遺伝学的解析を行った。

† 連絡責任者：帆保誠二 (日本中央競馬会競走馬総合研究所栃木支所)

〒329-0412 下野市柴1400-4 ☎0285-44-0090 FAX 0285-40-1064 E-mail: hobo@epizoo.equinst.go.jp

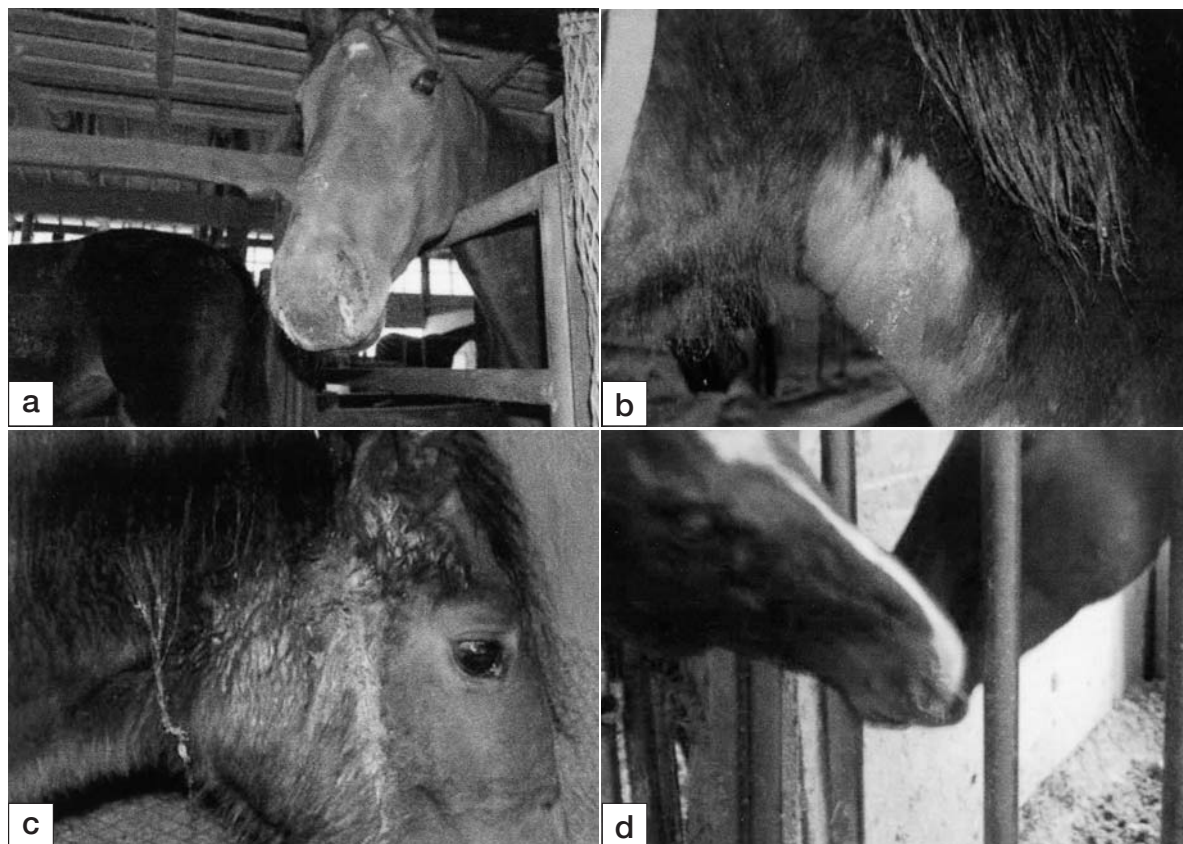


図1 腺疫罹患馬および馬同士の接触感染

- a 鼻漏を特徴とする腺疫罹患馬
- b 頸部リンパ節からの排膿を特徴とする腺疫罹患馬
- c 耳下腺からの排膿を特徴とする腺疫罹患馬
- d 隣接する馬房の馬同士の接触による腺疫菌の伝播

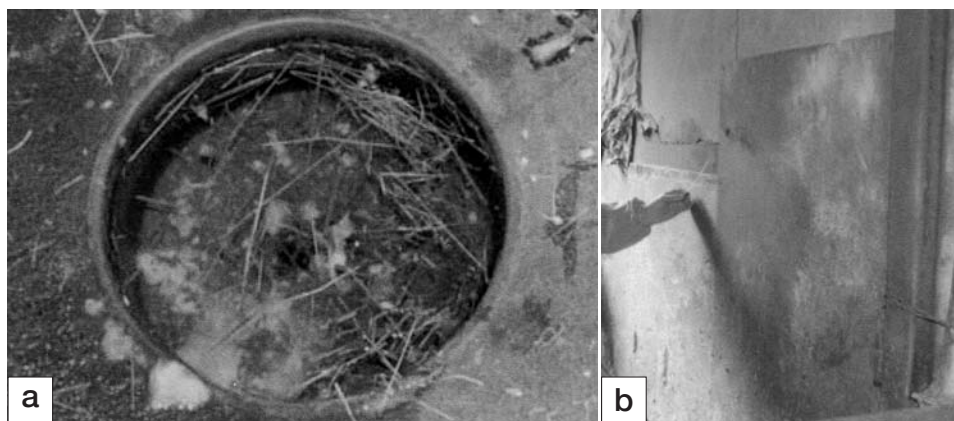


図2 腺疫集団発生牧場の水槽および馬房の壁からの腺疫菌分離

- a 腺疫菌を含む腺疫罹患馬の鼻漏が水槽に存在した
- b 乾燥している馬房の壁からも腺疫菌が分離された

### 材料および方法

供試馬および採材：福島県下の100頭規模の馬を飼養可能な牧場において、2006年9月上旬に鼻漏や下顎リンパ節の腫脹をはじめとした臨床症状を示す腺疫が発生し、その後集団発生に至った(図1)。そこで、2007年1月から同年6月までの各月にわたる計6回の全頭検査

(第1～6回全頭検査)と、腺疫陽性馬およびその周辺の馬ならびに新規導入馬を対象とした計2回の抽出検査(第1, 2回抽出検査)を同年2月初旬に実施した(表1, 2)。供試馬から、非鎮静下で鼻腔粘膜のスワブ(BD BBL CultureSwab Plus™, 日本ベクトン・ディッキンソン株, 東京)および血液(VP-P100K, テルモ株, 東京)を採取した。また第1回抽出検査時に、飲用水およ

表1 全頭検査における腺疫PCR検査, 細菌分離検査および腺疫抗体検査結果

全頭検査		第1回	第2回	第3回	第4回	第5回	第6回
検査日		1月23日	2月27日	3月27日	4月17日	5月22日	6月5日
検査頭数		91	65	67	92	76	69
PCR陽性	頭数	17	16	5	5	0	0
	%	18.7	24.6	7.5	5.4	0.0	0.0
分離陽性	頭数	7	4	1	0	0	0
	%	7.7	6.2	1.5	0.0	0.0	0.0
抗体陽性	頭数	19	13	8	6	5	4
	%	20.9	20.0	11.9	6.5	6.6	5.8
PCR陽性, 抗体陽性	頭数	4	6	1	0	0	0
	%	4.4	9.2	1.5	0.0	0.0	0.0
PCR陽性, 分離陽性, 抗体陽性	頭数	3	2	0	0	0	0
	%	3.3	3.1	0.0	0.0	0.0	0.0

表2 抽出検査における腺疫PCR検査, 細菌分離検査および腺疫抗体検査結果

抽出検査		第1回	第2回
検査日		2月1日	2月7日
検査頭数		51	29
PCR陽性	頭数	21	15
	%	41.2	51.7
分離陽性	頭数	14	9
	%	27.5	31.0
抗体陽性	頭数	9	11
	%	17.6	37.9
PCR陽性, 抗体陽性	頭数	2	4
	%	3.9	13.8
PCR陽性, 分離陽性, 抗体陽性	頭数	2	4
	%	3.9	13.8

び馬房の壁面からスワブ材料を採取した(図2)。得られた検体は, それぞれ腺疫菌分離検査および遺伝子検査に供した。

**腺疫菌分離および遺伝子検査:** 採取したスワブは, 500  $\mu$ l の滅菌生理食塩水に懸濁し, 常法により培養後, 細菌同定に供した。すなわち, 鼻腔粘膜スワブ懸濁液を, 馬血液を5%添加したコロンビアCNA寒天培地(コロンビアCNA寒天培地, 日本ベクトン・ディッキンソン株, 東京)に接種(0.005, 0.5, または50  $\mu$ l/プレート)した後, 恒温培養器(37  $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub>)で培養(48時間)した。得られたコロニーのうち $\beta$ 溶血性を示すコロニーは, 馬血液を5%添加したコロンビア寒天培地(コロンビア寒天基礎培地, 日本ベクトン・ディッキンソン株, 東京)で純培養後, 市販の細菌同定キット(API 20 Strep, シスメックス・ピオメリュー株, 東京)により同定した。また, 腺疫菌の遺伝子検査は, 鼻腔粘膜スワブ懸濁液50  $\mu$ lを用い, 市販のDNA抽出キット

(InstaGene Matrix, BIO-RAD, U.S.A.)によりDNAを抽出した後, 既報に準じて腺疫菌 *seM* 遺伝子をターゲットとしたsemi-nested PCRにより実施した[11]。いっぽう, 分離腺疫菌株の *seM* 遺伝子型解析は, 既報に準じて腺疫菌 *seM* 遺伝子領域(510bp)を増幅し, ダイレクトシーケンス法によりDNAの塩基配列を決定した後, アミノ酸1次配列(N末端から164AA)を推定することにより, *seM* 遺伝子型を決定した[12]。

**腺疫血清抗体検査:** 得られた血液は, 遠心分離(2,000g, 4  $^{\circ}$ C, 10分間)後, 既報に準じて腺疫血清抗体検査に供した[10]。すなわち, マイクロタイタープレート(MAXISORP, NUNC, Denmark)に10mM PBS(a large volume of phosphate-buffered saline<sup>®</sup>(25X), Lab Vision, U.S.A.)で10  $\mu$ g/mlに調整したPEPK $\times$ 5抗原を50  $\mu$ l/well固相化し, ブロッキングバッファー(ブロックエース, 大日本住友製薬株, 大阪)でブロッキングした後, ブロッキングバッファーで100倍希釈した血清(50  $\mu$ l/well)を反応(37  $^{\circ}$ C, 60分間)させた。その後, ブロッキングバッファーで5,000倍希釈したペルオキシダーゼ標識抗ウマIgG(H+L)抗体(50  $\mu$ l/well; Southern Biotechnology Associates, U.S.A.)を反応(37  $^{\circ}$ C, 60分間)させ, 発色試薬(50  $\mu$ l/well; Horseradish Peroxidase Substrate Kit, BIO-RAD, U.S.A.)により発色させた。発色開始後15分に50  $\mu$ l/wellの2%シュウ酸(シュウ酸, 関東化学株, 東京)を加えることにより発色を停止させ, 分光光度計(Spectrophotometer DU 800, Beckman Coulter, U.S.A.)を用いて波長415nmでの吸光度(OD)を測定した。得られた吸光度は, 既報に準じ吸光度0.427よりも高値であった血清を陽性と判断した[10]。

## 成 績

**腺疫菌分離および遺伝子検査:** 第1回全頭検査では,

91頭中17頭(18.7%)がPCR陽性であり、うち7頭から腺疫菌が分離された(表1)。第1回および第2回抽出検査では、陽性馬の周辺の馬に新たな腺疫の伝染が認められ、それぞれ21頭(41.2%)、15頭(51.7%)がPCR陽性であり、おのおの14頭(27.5%)および9頭(31.0%)から腺疫菌が分離された(表2)。第2回全頭検査も第1回全頭検査と同様に高いPCRおよび菌分離陽性率を示したが、第3回以降の全頭検査では、同陽性率はともに漸減した。また、第4～6回全頭検査において連続3回の腺疫菌分離陰性が確認された。いっぽう、実頭数24頭(のべ頭数35頭)から分離された腺疫菌株35株の*seM* 遺伝子を解析した結果、実頭数20頭から分離された25株の*seM* 遺伝子型は*seM* type 4であり、実頭数4頭から分離された10株の*seM* 遺伝子型は*seM* type 2であった。また、飲用水および馬房の壁面から採取したスワブはPCR陽性かつ腺疫菌分離陽性(*seM* 遺伝子型は*seM* type 4)であった。

**腺疫血清抗体検査：**第1回全頭検査では、抗体陽性馬は19頭(20.9%)であり、第2回抽出検査時には抗体陽性率が37.9%に達した(表1, 2)。しかし、その後の抗体陽性率は漸減し、第4回以降の全頭検査では抗体陽性率は比較的低値(5.8～6.6%)で安定していた。また、PCR陽性かつ抗体陽性馬、あるいはPCR陽性、腺疫菌分離陽性かつ抗体陽性馬は、比較的低値(それぞれ0.0～13.8%)であった(表1, 2)。

## 考 察

腺疫は、日本国内においては監視伝染病に指定されていないが、諸外国においては馬の細菌性伝染病の中でも特に注意深く監視されている伝染病である[1-3]。これまで、腺疫の集団発生は諸外国においても数多く報告されており、日本国内においても、2001年に千葉県での輸入馬に起源する集団発生事例が報告されている[4]。腺疫を清浄化するためには、伝染病清浄化の大原則である摘発・淘汰を完全に実施するとともに、きゅう舎環境の清浄化を進めることが最も重要である[1]。しかし、実際の牧場経営やきゅう舎環境を考慮すると、腺疫罹患馬の淘汰は容易ではなく、その清浄化は困難な場合が多い。このような中、腺疫の清浄化を効率よく進めるためには、腺疫罹患馬、腺疫非罹患馬および腺疫快復馬を明確に区別することが重要となる。しかし、従来の腺疫清浄化事例では、腺疫菌の分離もしくはPCR検査を主体に清浄化が進められてきたため、その清浄化には相当の時間を要していた。特に、腺疫PCR検査および腺疫菌分離検査が陰性の馬が、腺疫非罹患馬であるのか、それとも過去に腺疫に罹った後に快復した馬であるのかを区別することは容易ではなかった。この区別のためには、特異性の高い腺疫血清診断法の確立が必要であった[6-

8]。Hoboら[10]が開発した腺疫特異的血清診断法は、従来の問題点であった*S. zooepidemicus* 感染馬と腺疫罹患馬とを明確に区別可能であるきわめて特異性の高い血清診断法であることから、本腺疫集団発生事例に応用した。

本腺疫集団発生事例は、本調査の実施よりも以前(2006年9月上旬)に10頭程度の腺疫症状を呈した馬に起源していた。これは、他の牧場から腺疫罹患を疑う馬を同牧場に導入したことに起因し、馬同士の直接接触や飲用水、飼料あるいは飼養者を介して伝染したものと考えられた。同牧場は、単独馬房と集団飼養馬房とを併用しており、馬同士の接触が容易であったこと、集団飼養馬房においては、上流側の飲用水槽の飲用水が下流側の飲用水槽へと順次流れるシステムであったことが腺疫の集団発生に強く関与したものと推察された。実際、新規導入馬が腺疫罹患馬と接触した結果、腺疫菌が水平伝播した(図1, 2)。当該牧場の腺疫検査においては、当初、腺疫を疑う馬の個別検査および加療が診療獣医師により実施されていたが、腺疫の伝染拡大が懸念されたため、われわれに対し腺疫の清浄化を目的とした検査が依頼された。初回の全頭検査により腺疫罹患馬を特定できたことや、第1回全頭検査後に新規導入馬がいたことから、腺疫罹患馬周辺の馬および新規導入馬を中心に抽出検査を実施した。第1回全頭検査および第1, 2回抽出検査の結果を受けて、腺疫罹患馬の淘汰もしくは隔離、きゅう舎消毒、馬の新規導入の抑制もしくは隔離飼養を指導し、清浄化を推進した。その結果、比較的短期間のうちに腺疫を清浄化することができた。なお、腺疫馬に対しては、急性期を除いての加療は推奨されていないので、本腺疫集団発生事例においては実施しなかった。

いっぽう、腺疫菌分離およびPCR検査の結果では、初回検査時よりも抽出検査時の腺疫菌分離およびPCR陽性率が高値であった。これは、初回検査の結果から、腺疫に罹患している可能性の高い馬を抽出して検査を実施したことに起因するが、検査対象馬の約30%から腺疫菌が分離されたことは、腺疫の伝染性の強さを示唆するものと考えられた。また、腺疫菌の分離陽性は、第3回全頭検査まで継続したが、第4～6回の全頭検査ではまったく分離されなかったことから、当該腺疫集団発生事例は清浄化されたものと判断した。この清浄化の判断は、北海道日高家畜衛生防疫推進協議会が、欧米のガイドラインを参照して腺疫自衛防あつ指針(日高管内における馬感染症防疫マニュアル; <http://www.agri.pref.hokkaido.jp/kaho/hidaka/>)として運用している清浄化の基準を参考に実施したものであり、本腺疫集団発生事例においても、その後の腺疫の発生が認められなかったことから、同ガイドラインは適切な基準であったものと考えられた。なお同指針では、おおむね1週間間隔で

の検査を推奨しているが、本清浄化事例ではおおむね1カ月間隔での検査となった。これは、飼養頭数が比較的多かったことや飼養者の諸事情により、短期間における継続検査が不可能であったことに起因する。

腺疫抗体検査において、腺疫陽性との判断は既報のカットオフ値を参照して決定した [10]。本腺疫集団発生事例における抗体検査は、菌分離検査とあわせて検査時点での腺疫罹患馬、腺疫非罹患馬および腺疫快復馬を明確に区別することができ、腺疫の清浄化を効率的に進めることができた。すなわち、抗体陽性馬は、すでに腺疫に罹患しているか腺疫から快復した馬である可能性が高いことを推察可能であった。いっぽう、本腺疫集団発生事例において、第6回全頭検査においても抗体陽性馬が存在した。これらの馬は、早期に腺疫に罹患したものの、所有者の経営上の事情により淘汰が困難であったため、第5回目の全頭検査時にも在きゅうしていた。しかし、腺疫菌の分離およびPCR検査では、いずれの検査においても陰性であったことから、腺疫菌保菌の可能性は低いものと推察された。なお、実験的に腺疫を発症させた馬における抗体検査では、感染成立後約30週で腺疫感染抗体は陰転していた（未発表データ）。

本調査において、2種類の *seM* 遺伝子型 (*seM* type 4, *seM* type 2) の腺疫菌が分離された。*seM* type 4は、1992年に北海道十勝地方で分離された株と同型であり、*seM* type 2は1999年に北海道日高地方で分離された株と同型であった [12]。本調査における分離腺疫菌株の多くは、*seM* type 4であったが、*seM* type 2とはきわめて近縁であることから、その起源は同一であると推察され、これら2つの遺伝子型を持った腺疫菌株が国内に散発し、腺疫の発生に関与しているものと推察された。詳細な解析については、今後実施する必要があると考えられた。

本研究では、腺疫野外発生事例におけるPEPK×5抗原の腺疫血清診断用抗原としての有用性を明らかにするために、腺疫集団発生牧場の清浄化に従来の細菌検査法とともに血清診断法を応用した。その結果、検査時点での腺疫罹患馬、腺疫非罹患馬および腺疫快復馬を明確に区別することができ、腺疫の清浄化を効率的に進めることができた。今後も、本血清診断法を腺疫野外発生事例に対して応用することにより、腺疫の清浄化が効率的に推進されるものと考えられた。

## 引用文献

- [1] Sweeney CR, Timoney JF, Newton JR, Hines MT : *Streptococcus equi* infections in horses : guidelines for treatment, control, and prevention of strangles, J Vet Intern Med, 19, 123-134 (2005)
- [2] Timoney JF : Strangles, Vet Clin North Am Equine Pract, 9, 365-374 (1993)
- [3] Harrington DJ, Sutcliffe IC, Chanter N : The molecular basis of *Streptococcus equi* infection and disease, Microbes Infect, 4, 501-510 (2002)
- [4] 片山雅一, 深山美和子, 古屋聡子, 桑本 康, 帆保誠二, 安齊 了 : 輸入馬を感染源とする腺疫の集団発生事例の疫学解析, 日獣会誌, 56, 139-143 (2003)
- [5] Anzai T, Nakanishi A, Wada R, Higuchi T, Hagiwara S, Takazawa M, Oobayashi K, Inoue T : Isolation of *Streptococcus equi* subsp. *equi* from Thoroughbred Horses in a Racehorse-Breeding Area of Japan, J Vet Med Sci, 59, 1031-1033 (1997)
- [6] Chanter N, Newton JR, Wood JL, Verheyen K, Hanant D : Detection of strangles carriers, Vet Rec, 142, 496 (1998)
- [7] Timoney JF, Sheoran A, Artiushin S : Detection of strangles carriers, Vet Rec, 142, 648 (1998)
- [8] Timoney JF, Artiushin S, Wang J : Regions of the protective M-like protein of *Streptococcus equi* recognized by serum and mucosal antibodies of convalescent horses, Equine Infectious Diseases VIII, Wernery U, et al eds, 88-94, R and W publications Limited, Newmarket (1999)
- [9] Hobo S, Niwa H, Anzai T : Proline-glutamic acid-proline-lysine peptide set as a specific antigen for the serological diagnosis of strangles, Vet Rec, 159, 629-632 (2006)
- [10] Hobo S, Niwa H, Anzai T : Proline-glutamic acid-proline-lysine repetition peptide as an antigen for the serological diagnosis of strangles, Vet Rec, 162, 471-474 (2008)
- [11] Anzai T, Hobo S, Niwa H : Development of a diagnostic shuttle PCR test targeting the *Streptococcus equi seM* gene, J Equine Sci, 17, 101-104 (2006)
- [12] Anzai T, Kuwamoto Y, Wada R, Sugita S, Kakuda T, Takai S, Higuchi T, Timoney JF : Variation in the N-terminal region of an M-like protein of *Streptococcus equi* and evaluation of its potential as a tool in epidemiologic studies, Am J Vet Res, 66, 2167-2171 (2005)

Application of Serodiagnostic Test Specific to Strangles in Strangles Outbreak  
and Genetic Analysis of *Streptococcus equi* Isolates

Seiji HOBO\*†, Masanori MURANAKA, Hidekazu NIWA, Takashi UCHIYAMA,  
Mari YODA, Yumiko SUZUKI and Moriyuki MAEDA

\* *Epizootic Research Center, Equine Research Institute, Japan Racing Association, 1400-4  
Shiba, Shimotsuke-shi, 329-0412, Japan*

SUMMARY

A serodiagnostic test specific to strangles was used in an outbreak of strangles at a horse farm in Fukushima Prefecture, and genetic analysis of the *Streptococcus equi* subsp. *equi* isolates was performed. In the first examination, conducted on all horses on the farm, 18.7% of nasal samples collected from 91 horses were PCR positive for *S. equi*, and *S. equi* was isolated from seven horses. Positive rates of PCR and bacterial isolation decreased gradually after the third examination. Finally, negative results for the isolation of *S. equi* strains were obtained from the fourth to sixth consecutive examinations conducted at monthly intervals. We therefore considered that strangles had been eradicated from the farm. Two kinds of *seM* genotype were detected in all *S. equi* isolated. Application of the serodiagnostic test differentiated affected, unaffected horses, and horses that had recovered from the disease at the time of examination. This report provides valuable information for the effective control of strangles on farms.

—Key words : genetic analysis, Outbreak, Serodiagnostic test, Strangles, *Streptococcus equi*.

† *Correspondence to : Seiji HOBO (Epizootic Research Center, Equine Research Institute, Japan Racing Association)*

*1400-4 Shiba, Shimotsuke-shi, 329-0412, Japan*

*TEL + 81-285-44-0090 FAX + 81-285-40-1064 E-mail : hobo@epizoo.equinst.go.jp*

*J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 63, 696 ~ 701 (2010)*