

総説

馬の腸内フローラと抗菌薬

丹羽秀和

日本中央競馬会 競走馬総合研究所 微生物研究室
〒 329-0412 栃木県下野市柴 1400-4
Email: niwa@equinst.go.jp

【要約】

ウマは大腸内の発酵によって食物繊維を分解し、エネルギー源とする後腸発酵動物である。ウマの大腸は消化管全体の約60%の容量を占め、その中に生息する多数の細菌、真菌、原虫などが食物繊維の分解に大きな役割を果たしている。体内でありながら体外とも言える消化管腔内に形成される腸内フローラは、外的な要因である食物や薬剤、宿主側の要因である消化管の運動や免疫状態などによって影響を受けると考えられる。これまで、ウマの腸内フローラに関する研究は、腸内細菌の培養などに特殊な技術が必要なことやウマの研究者自体が少ないことから、その重要性にも関わらず研究は進んでいなかった。しかし、近年、腸内フローラ構成細菌の網羅的解析（メタゲノム解析）を可能とする次世代シーケンサー（NGS）の登場により、様々な研究が行われるようになってきた。

抗菌薬の投与によって誘発される下痢症、いわゆる抗菌薬関連下痢症は、重篤化した場合には致死率の高いウマにとって重要な疾病の一つである。当研究室では競走馬に使用される抗菌薬の投与が腸内フローラに与える影響についてNGSを用いて調査を続けている。また、競走馬ではヒトの抗菌薬関連下痢症の主要な原因菌として知られている *Clostridioides difficile* による致死的な腸炎が散見されており、その調査も継続的に実施している。抗菌薬の投与と腸炎の発症との関連性は未だ解明されていないが、本講演では、これまでの調査によって得られたデータを紹介するとともに、直面している課題についても議論したい。

キーワード: ウマ, 腸内フローラ, メタゲノム解析, *Clostridioides difficile*

はじめに

ウマは、ウサギ、モルモット、ハムスターなどと同じく後腸発酵動物であり、生体の維持や運動に必要なエネルギーを小腸だけでなく後腸である盲腸や結腸から吸収している。ウマの消化管の構造は他の家畜と異なり、体の大きさに比較して小さな胃、成馬では20mにも達する長い小腸、消化管全体の約60%の容量を占める大腸を特徴としている。ウマが摂取した栄養

素の中で、炭水化物、タンパク質、脂質などは大部分が小腸で吸収され、ウマの主食である食物繊維の分解によって生じた揮発性脂肪酸(VFA)、さらにはビタミンBやビタミンKなどは大腸で吸収される(表1)。これらの栄養素の中で、食物繊維の分解、腸内でのビタミンBやビタミンKの産生には腸内フローラの働きが不可欠であることが明らかとなっており、VFAは生体の維持や運動に必要なエネルギーのうち60-70%を占めるとされている[10]。また、腸内フローラにはサルモネラなどの腸管病原性をもつ病原体の競合排除、免疫機能の活

受理: 2020年9月4日

表1 ウマの消化管の容積と各部位で吸収される主な栄養素

部位	容積 (L)	栄養素
胃	18.3	—
小腸	64.9	炭水化物, タンパク質, 脂質
盲腸	34.1	揮発性脂肪酸 (食物繊維), 炭水化物, ビタミンB, ビタミンK
大結腸	82.6	
小結腸~直腸	15	

性化などの働きが知られており [11]、健全な腸内フローラはウマの健康にとって不可欠と考えられている。腸内フローラは様々な要因によって影響を受けることが知られており、ウマでは抗菌薬の投与、炭水化物の多給、調教、輸送、絶食、麻酔などの要因が報告されている [1, 3, 8, 9]。

抗菌薬関連下痢症

抗菌薬関連下痢症 (Antimicrobial associated diarrhea: AAD) は、抗菌薬の投与によって誘発される下痢症をいい、ウマにおける抗菌薬の副作用として最も一般的に認められる症状である [5]。症状は、投薬の中止によって自然に回

復するものから、致死的な腸炎に発展するものまでである。AADの発症メカニズムは不明な点が多く、はっきりとした因果関係が示されているデータはないが、直接的な薬理作用を原因とするものやフローラの攪乱を原因とするものが推測されている [6] (図1)。ウマのAADに關与する抗菌薬を示した報告が複数あるが、各抗菌薬の発症リスクを比較する体系的な評価は行われておらず、客観的なデータが不足しているとの意見もある (Weese SJ., 2000. Thesis)。全身的に投与される抗菌薬のほとんどがAADの発症に關与する可能性があるとの意見もある [6]。また、ウマのAADに対する感受性は地理的な要素に影響も受けると考えられており、

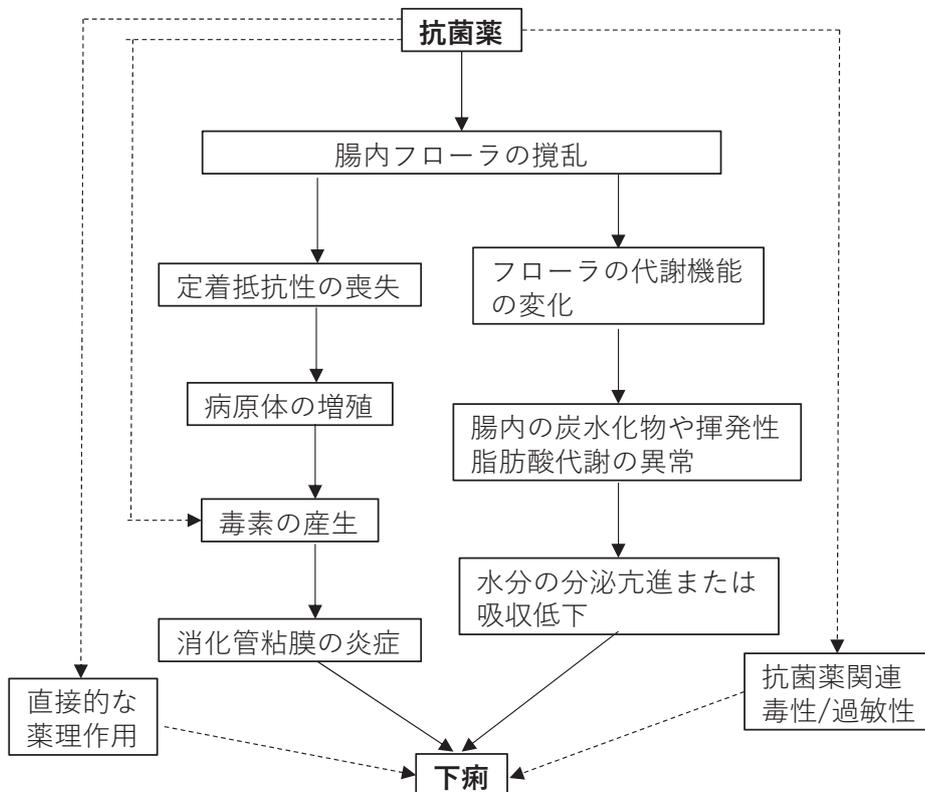


図1 馬の抗菌薬関連下痢症に想定されている発症メカニズム (McGorumらの報告 [6] から図を引用・和訳)

例えば北米においてロドコッカス・エキイ感染症の治療に使用されるエリスロマイシンは、国内では腸炎の発症リスクが非常に高い薬剤とされ、使用されていない。

抗菌薬の投与が腸内フローラに与える影響

競走馬は、他の家畜・家禽と異なり、増体を目的とした抗菌性飼料添加物は使用されておらず、輸送熱や周産期の子宮内膜炎の予防のような一部の目的を除けば、ほとんどの抗菌薬が治療を目的に使用されている。国内の競走馬に対してはセファロチン (CET) とミノサイクリン (MINO) が治療目的として最も多く使用されている。これらの抗菌薬の投与による日本中央競馬会 (JRA) 内における腸炎や下痢などの

副作用の発生率は、CET では 0.02% (投与 4452 例中 1 例)、MINO では 0.98% (投与 305 例中 3 例) であり、MINO での発生率が優位に高値であった (黒田, unpublished data)。そこで我々は、両薬物の投与がウマの腸内フローラに与える影響について調査を行った。健康なウマ 6 頭を CET 投与群および MINO 投与群の 2 群に分け、競走馬に用いられる常用量を 3 日間投与し、次世代シーケンサー (NGS) による 16S rRNA 遺伝子の V4-V5 領域を用いたメタゲノム解析を実施したところ、CET と比較して MINO の投与が腸内フローラにより大きな影響を与えることが明らかになった (図 2)。本実験では一部の個体における薬疹の出現を除き副作用は認められなかったが、上述のよ

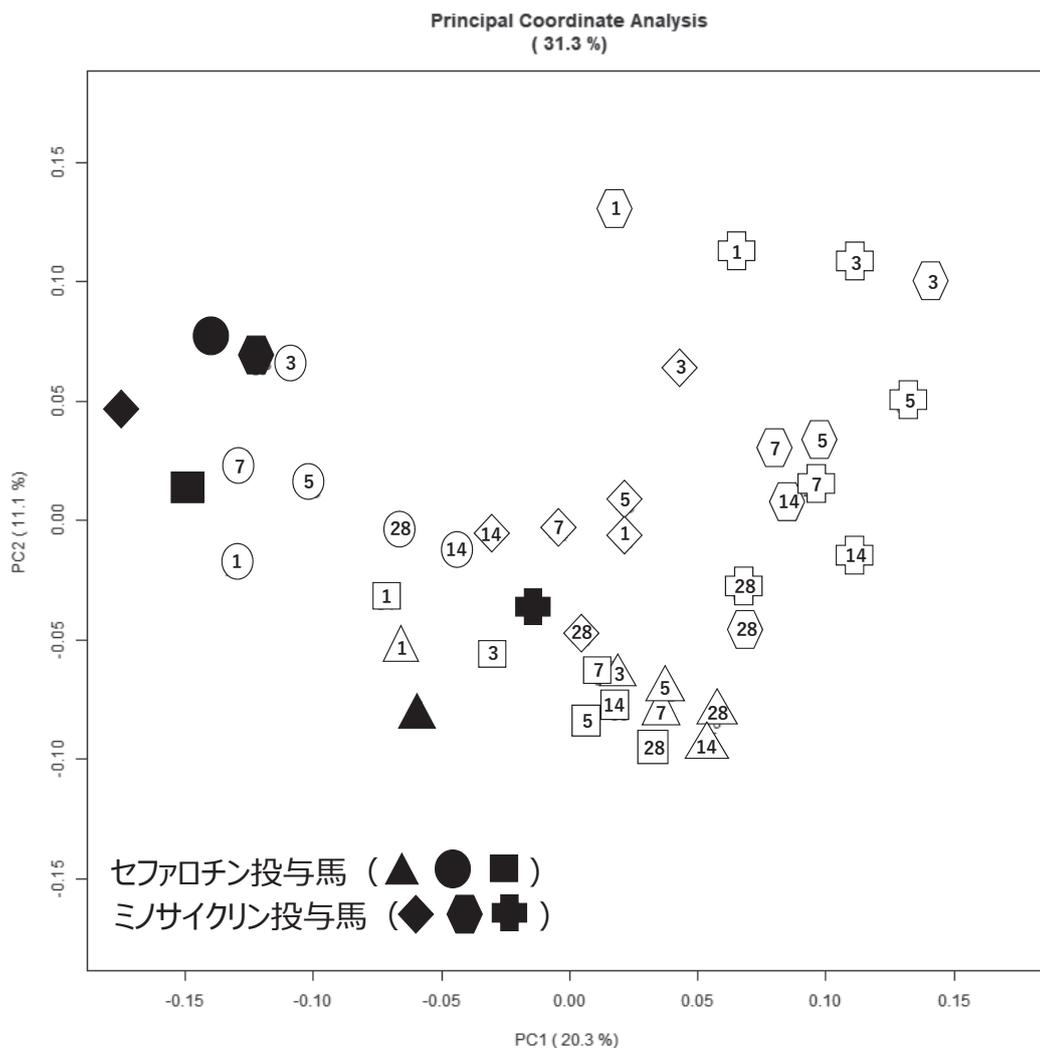


図2 セファロチンおよびミノサイクリン投与馬における腸内フローラの経時的変化 (主座標分析)。黒塗り記号は投与前、白抜き記号は投与終了後の腸内フローラを表し、記号内の数字は投与後の日数を示す。

うに CET と MINO における副作用の発生率には違いが認められることから、抗菌薬による腸内フローラの変化と副作用の発生率との関係性は興味深い点と考えられた。一方、抗菌薬投与前後の腸内フローラは、両薬剤とも腸炎により死亡したウマの腸内フローラとの類似性は低く、抗菌薬の投与によって生じた腸内フローラの変化と致死的な腸炎との関連性は不明であった (図3)。

ウマの *Clostridioides difficile* 感染症

Clostridioides difficile 感染症 (CDI) は、有芽胞グラム陽性桿菌である *Clostridioides difficile* を原因とする疾病である。CDI は腸内フローラの攪乱によって本菌が増殖し、発症に至ることから、AAD としての側面も持つ。ウマの

CDI は、1988 年に米国で確認された子馬の出血性壊死性腸炎が文献上最初の報告となるが [4]、現在では世界各国で発生がみられている。CDI は、子馬だけでなく成長した馬 (成馬) での発生も確認されており、発症と年齢との関連は認められない。また、医療施設内でアウトブレイクを引き起こすことがある一方、野外における孤発例も少なくない。感染および発症は、汚染された糞便や環境から経口的に摂取された *C. difficile* の芽胞または栄養型細胞が、何らかの要因によって腸内フローラが攪乱された消化管の中で異常に増殖することで起こると考えられている。

JRA 競走馬総合研究所では、2010 年に国内で初めてウマから本菌を分離して以降 [7]、2017 年までに 29 例の CDI 発生を JRA 馬医療

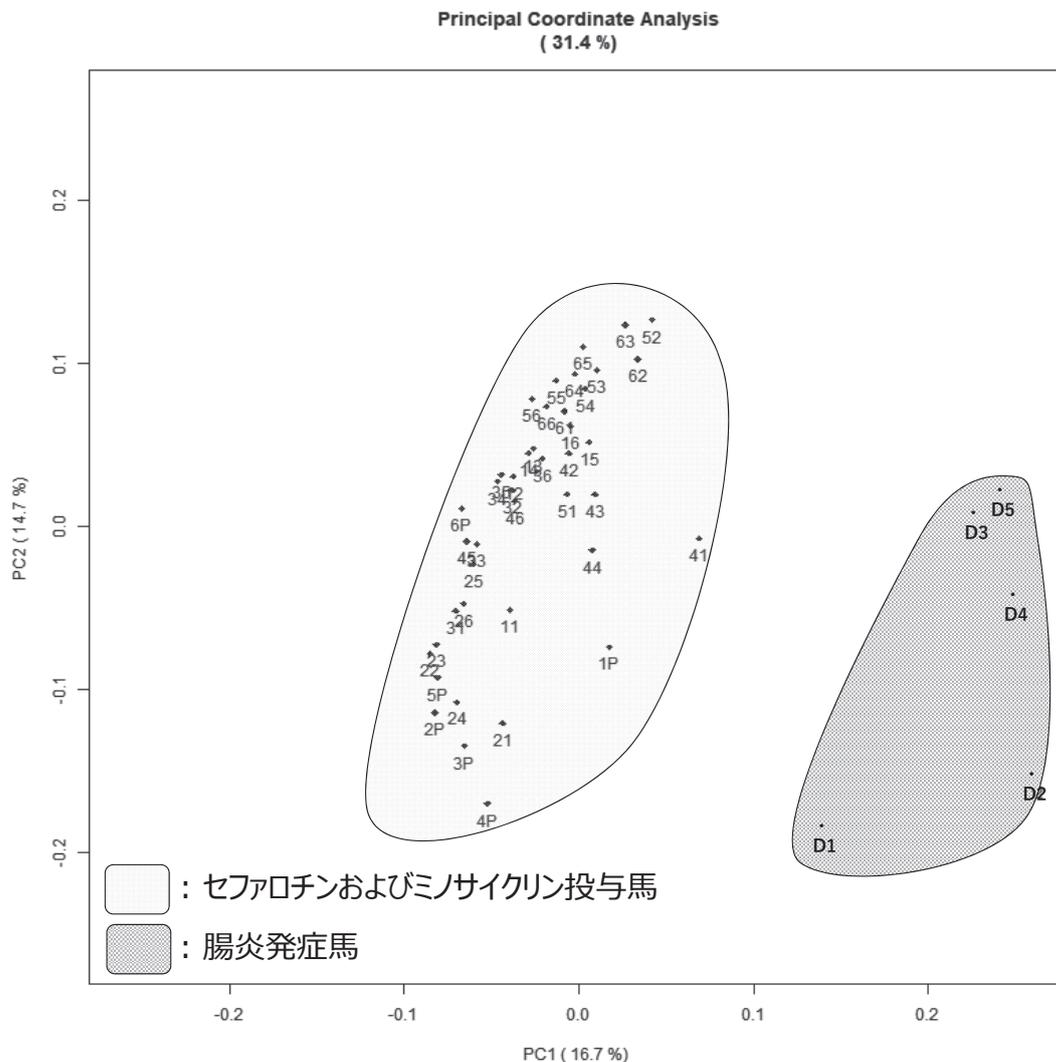


図3 セファロチンおよびミノサイクリン投与馬と腸炎発症馬における腸内フローラの類似性の検討 (主座標分析)

施設内で確認している（表2）。競走馬以外のCDI国内発症例も確認されているが、獣医領域において*C. difficile*の検査を実施している検査施設は限られており、正確な発生状況は不明である。CDIは、ウマの感染性腸炎のなかでは死亡率が高い疾病と言われているが、とりわけ国内の競走馬においては重篤な症例が多く、死亡率は85%に達する（表2）。死亡例では腸管粘膜上皮全域の壊死が認められる（図4）。

JRA馬医療施設内におけるCDIの発生状況は、時期によって変化が認められている。2010～2012年までは11例中8例が外科手術後入院

2～4日目に発症しており、そのうち7例がtoxin A、toxin B、および、binary toxinを産生するPCR ribotype (RT) 078とよばれる遺伝子型による感染であった。一方、2013年以降、入院例は18例中5例に減少するとともに、多様な遺伝子型が確認され、RT078株は2例のみであった（表2）。なお、すべての症例で発症前に抗菌薬の投与が行われていた。RT078は、獣医領域におけるCDIでは従来から問題となっている遺伝子型であるが、ヒトのCDIにおいても通常の株よりも強い病原性を持つhypervirulent株のひとつとして注目されてい

表2 JRA所属競走馬で確認された*Clostridioides difficile*感染症

症例	発症年	性別	手術歴	入院	転帰	毒素型 ^{a)}	PCR ribotype
1	2010	雄	開腹術	○	安楽死	A ⁺ B ⁺ CDT ⁺	078
2	2010	雌	螺子固定術	○	死亡	A ⁺ B ⁺ CDT ⁺	078
3	2010	雌	結膜フラップ術	○	安楽死	A ⁺ B ⁺ CDT ⁺	078
4	2011	雌	螺子固定術	○	安楽死	A ⁺ B ⁺ CDT ⁺	078
5	2011	雄	開腹術	○	安楽死	A ⁺ B ⁺ CDT ⁺	078
6	2011	雄	開腹術	○	死亡	A ⁺ B ⁺ CDT ⁺	078
7	2011	騾	去勢(外部施設で実施)	×	死亡	A ⁺ B ⁺ CDT ⁻	hnc08162
						A ⁺ B ⁺ CDT ⁺	078
8	2012	騾	直近の手術歴なし	○	安楽死	A ⁺ B ⁺ CDT ⁻	014
9	2012	雄	直近の手術歴なし	×	安楽死	A ⁺ B ⁺ CDT ⁻	km0429
10	2012	雄	開腹術	○	安楽死	A ⁺ B ⁺ CDT ⁻	078
11	2012	雄	直近の手術歴なし	×	死亡	A ⁺ B ⁺ CDT ⁻	014
12	2013	雄	直近の手術歴なし	×	安楽死	A ⁺ B ⁺ CDT ⁻	014
						A ⁺ B ⁺ CDT ⁺	027
13	2013	雄	関節鏡手術	×	生存	A ⁺ B ⁺ CDT ⁺	rh13124
14	2013	騾	直近の手術歴なし	×	生存	A ⁺ B ⁺ CDT ⁻	014
15	2013	雌	開腹術	○	生存	A ⁺ B ⁺ CDT ⁺	078
16	2013	雌	直近の手術歴なし	×	安楽死	A ⁺ B ⁺ CDT ⁻	c056
17	2013	雄	直近の手術歴なし	×	安楽死	A ⁺ B ⁺ CDT ⁻	056
18	2014	雄	直近の手術歴なし	×	安楽死	A ⁺ B ⁺ CDT ⁻	j41
						A ⁺ B ⁺ CDT ⁻	014
19	2014	雄	直近の手術歴なし	×	安楽死	A ⁺ B ⁺ CDT ⁻	017
20	2014	雄	直近の手術歴なし	×	安楽死	A ⁺ B ⁺ CDT ⁻	017
21	2014	雄	開腹術	○	死亡	A ⁺ B ⁺ CDT ⁻	c056
22	2014	雌	関節鏡手術	○	死亡	A ⁺ B ⁺ CDT ⁻	002
23	2015	雄	直近の手術歴なし	×	安楽死	A ⁺ B ⁺ CDT ⁻	017
24	2015	雄	直近の手術歴なし	×	安楽死	A ⁺ B ⁺ CDT ⁻	ND
25	2016	雄	直近の手術歴なし	×	安楽死	A ⁺ B ⁺ CDT ⁺	078
26	2016	雄	喉頭形成術	○	安楽死	A ⁺ B ⁺ CDT ⁺	078
27	2017	雄	開腹術	○	安楽死	A ⁺ B ⁺ CDT ⁻	ND
28	2017	雄	直近の手術歴なし	×	死亡	A ⁺ B ⁺ CDT ⁻	ND
29	2017	騾	縫合術(外傷)	×	生存	A ⁺ B ⁺ CDT ⁻	ND

b) A: toxin A; B: toxin B; CDT: binary toxin A
ND: not determined

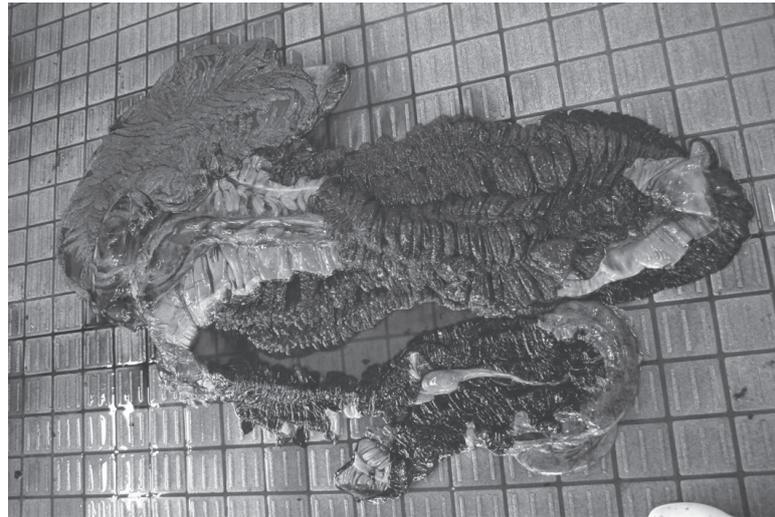


図4 *Clostridioides difficile* 感染馬に認められた腸管病変 (大腸)
粘膜上皮細胞は腸管全域で広範囲に壊死しており、高度の充出血が認められた。

る [2]。コアゲノム SNPs を用いた分子系統解析から、2010～2014年に入院例から分離された RT078 株は同一のクローンであることが明らかとなり、入院例の多くは RT078 株による医療関連感染であったことが強く疑われた (図5)。なお、同時期に分離され、系統樹上の位置が異なる RT078 株 (図5の a)) は外部施設で去勢手術を受けた後に下痢を発症し、JRA 馬

医療施設内へ転院した症例からの分離株である。2016年に分離された RT078 株は、入院を伴わないまたは術後入院1日目で発症した症例を由来とする株であることから、医療施設外での感染と推測されており、系統学的にも医療関連感染が疑われた上述のクローンとは異なっていた。

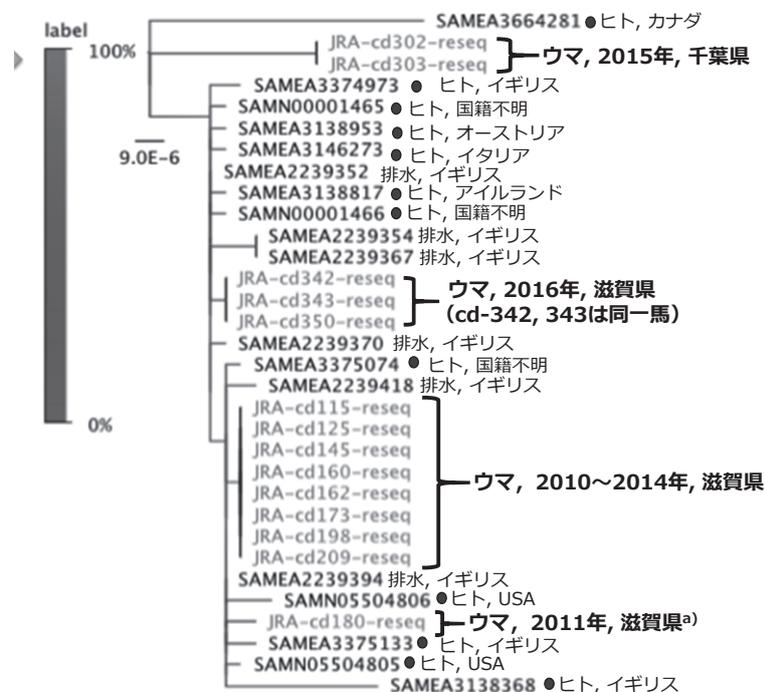


図5 国内のウマ由来および公開されている *Clostridioides difficile* PCR ribotype 078 の core-genome SNPs をもとに作成した系統樹。

a) JRA 施設外で実施された手術後に下痢を発症し、治療のために施設内へ転院

今後の課題

NGSの登場によってウマの腸内フローラを構成する細菌のメタゲノム解析が比較的容易に実施可能となり、ウマを取り巻く様々な因子が腸内フローラに与える影響が明らかになりつつある。しかし、我々の研究も含め、これらの要因によって起こる腸内フローラの変化が、CDIを含めた腸炎の発症に対してどのように関与するかは現在でも明らかにできていない。我々の使用している細菌DNAを用いたメタゲノム解析は、生菌だけでなく死菌のDNAの存在もデータに含まれるとともに、腸内フローラ構成細菌の構成比が解析結果の中心となる。この方法では実際に腸内で活動している生きた菌の数を見積もることは困難であるとともに、細菌が腸内で産生する様々な代謝物が宿主や腸内フローラ自体に与える影響を明らかにすることはできない。さらに、観測される腸内フローラの変化は、疾病の原因としてだけでなく宿主側の変化を反映している場合もある。ウマにおける腸内フローラの機能や役割を解明し、疾病の予防や治療に役立てていくためには、メタゲノム解析だけではなく様々な視点からのアプローチがさらに必要と考えられる。

引用文献

- [1] Costa MC., Stämpfli HR., Arroyo LG., Allen-Vercoe E., Gomes RG., Weese JS. 2015. Changes in the equine fecal microbiota associated with the use of systemic antimicrobial drugs. BMC Vet Res. 3;11:19. doi: 10.1186/s12917-015-0335-7.
- [2] Goorhuis A., Bakker D., Corver J., Debast SB., Harmanus C., Notermans DW., Bergwerff AA., Dekker FW., Kuijper EJ. 2008. Emergence of *Clostridium difficile* infection due to a new hypervirulent strain, polymerase chain reaction ribotype 078. Clin Infect Dis. 47:1162-70.
- [3] Harlow BE., Lawrence LM., Hayes SH., Crum A., Flythe MD. 2016. Effect of dietary starch source and concentration on equine fecal microbiota. PLoS One. 29;11(4):e0154037. doi: 10.1371/journal.pone.0154037.
- [4] Jones RL., Adney WS., Shideler RK. 1988. Isolation of *Clostridium difficile* and detection of cytotoxin in the feces of diarrheic foals in the absence of antimicrobial treatment. J Am Vet Med Assoc. 193:76-9.
- [5] McGorum BC., Pirie RS. 2009. Antimicrobial associated diarrhea in the horse. Part 1: Overview, pathogenesis and risk factors. Equine Vet Educ. 21:610-6.
- [6] McGorum BC., Pirie RS. 2010. Antimicrobial associated diarrhea in the horse. Part 2: Which antimicrobials are associated with AAD in the horses? Equine Vet Educ. 22:43-50.
- [7] Niwa H., Kato H., Hobo S., Kinoshita Y., Ueno T., Katayama Y., Hariu K., Oku K., Senoh M., Kuroda K., Nakai K. 2013. Postoperative *Clostridium difficile* infection with PCR Ribotype 078 strain identified at necropsy in five Thoroughbred racehorses. Vet Rec. 173: 607.
- [8] Proudman CJ., Hunter JO., Darby AC., Escalona EE., Batty C., Turner C. 2015. Characterisation of the faecal metabolome and microbiome of Thoroughbred racehorses. Equine Vet J. 47:580-6.
- [9] Schoster A., Mosing M., Jalali M., Staempfli HR., Weese JS. 2016. Effects of transport, fasting and anaesthesia on the faecal microbiota of healthy adult horses. Equine Vet J, 48: 595-602.
- [10] Vermorel M., Martin-Rosset W. 1997. Concepts, scientific bases, structure and validation of the French horse net energy system (UFC). Livest Prod Science. 47:261-75.
- [11] Vollaard EJ., Clasener HA. 1994. Colonization resistance. Antimicrob Agents Chemother. 1994:409-14.

Equine intestinal flora and antimicrobial agents

Hidekazu Niwa

Equine Research Institute, Japan Racing Association
Shiba 1400-4, Shimotsuke, Tochigi 329-0412, Japan
Tel: +81 285-39-7589, Fax: +81-285-40-1064
Email: niwa@equinst.go.jp

[Abstract]

Horses are hindgut fermenter which degrade dietary fiber by fermentation in the large intestine and use it as an energy source. Volume of horse's large intestine reaches about 60% of total volume of gastrointestinal tract, and the numerous bacteria, fungi, and protozoa that live therein play a major role in the degradation of dietary fiber. The intestinal flora that forms inside the gastrointestinal tract, which is both extracorporeal and intracorporeal, is thought to be affected by external factors such as food and drugs, and host factors such as gastrointestinal motility and immune status. Research on the intestinal flora of horses has not been sufficiently proceeded despite the importance because of the requirement of special techniques for analysis of intestinal flora, such as culture of intestinal bacteria, and the fact that there are few equine researchers. However, various studies have been recently conducted by utilizing a next-generation sequencer (NGS) that enables comprehensive analysis of the intestinal flora such as metagenome analysis. Diarrhea induced by administration of antimicrobial agents, so-called antimicrobial-associated diarrhea, is one of the important diseases for horses with high mortality when serious. In our laboratory, we are investigating the effects of antimicrobial agents used in racehorses on intestinal flora using NGS and the fatal enteritis due to *Clostridioides difficile*, which is known to be a major causative agent of human antimicrobial-associated diarrhea. The association between antimicrobial administration and the incidence of enteritis has not yet been elucidated. Further approaches from various respects will be needed for better understanding of equine intestinal flora.

Keywords: equine, intestinal flora, metagenome analysis, *clostridioides difficile*