

11 牛呼吸器病由来 *Mannheimia haemolytica* 株の性状調査 および同定法に関する一考察

中央家畜保健衛生所

○荒井 理恵

I はじめに

Mannheimia haemolytica は牛呼吸器病の主要な原因菌であり、時に成牛の死亡も引き起こすことから重要視される病原体である。本菌はパスツレラ科に属するグラム陰性短桿菌であり、莢膜の抗原性により、現在、12種類の血清型に分類されている¹⁻³⁾。国内では血清型1型菌に対するワクチンが平成16年に販売開始された。ワクチン接種を検討する上で分離株の血清型は重要な情報となるが、型別に用いる抗血清は市販されておらず、県内分離株についてはこれまで血清型別を実施できていないのが現状である。また、*M. haemolytica* には性状が近縁な菌種が存在することが知られている。これらの菌種は *Mannheimia complex* と呼ばれ、*M. haemolytica*、*M. glucosida*、*M. ruminalis*、*M. granulomatis* および *M. varigena* の少なくとも5菌種が含まれる⁴⁾。これらの菌種は生化学性状が似通っていることから、市販の簡易同定キットでは正確な同定が難しいことが報告されている⁵⁾。当所の病性鑑定において、*M. haemolytica* の同定には簡易同定キットを用いていることから、*M. haemolytica* ではない株を誤同定しているかもしれない可能性が考えられる。さらに、前述したように、県内分離株について血清型等の基本情報も把握出来ていない状態である。

今回、過去の分離株が真に *M. haemolytica* であるかどうかを確認すること、県内分離 *M. haemolytica* 株について血清型等の基本性状を把握することを目的に以下の調査を行った。

II 材料および方法

1 供試株

M. haemolytica として当所に凍結保存されていた44株を用いた。これらは平成元年～25年に呼吸器症状を呈した牛の肺または鼻腔スワブから分離された株である。

2 一次性状の確認および簡易同定キット

全ての供試株について、コロニー形状の観察、グラム染色、カタラーゼ試験、オ

キシダーゼ試験を実施した。さらに、2種類の簡易同定キット（アピ20NE、IDテストHN-20ラピッド「ニッスイ」）に供試した。

3 *Mannheimia* 属菌同定用 Multiplex PCR

全ての供試株について、Alexanderらが報告した *Mannheimia* 属菌同定用 Multiplex PCR 法⁶⁾を行った。本PCRでは、*Mannheimia complex*の内、*M. haemolytica*、*M. glucosida*および *M. ruminalis*の3菌種が同定可能である。

4 血清型別および薬剤感受性試験

3により *M. haemolytica*と同定された株について、スライド凝集法による血清型別および一濃度ディスク法による薬剤感受性試験（8薬剤）を実施した。

5 16S rRNA 遺伝子解析

3により *M. haemolytica*が否定された株について、16S rRNAの部分塩基配列を決定し、EzTaxon-e⁷⁾（<http://eztaxon-e.ezbiocloud.net>）、BLAST（<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>）および CLUSTALW（<http://clustalw.ddbj.nig.ac.jp/top-e.html>）により解析を行い、更なる同定作業を試みた。

III 成績

1 一次性状および簡易同定キットによる判定結果

44株全てが、5%羊血液加寒天培地上で溶血性を示す、灰白色・正円の中型コロニーを形成した（5%炭酸ガス培養・24時間）（図1）。全ての株がグラム陰性短桿菌、カタラーゼ陽性、オキシダーゼ陽性であり、いずれも *M. haemolytica*の性状と合致した。

さらに、アピ20NEおよびIDテストHN-20ラピッドのいずれの簡易同定キットにおいても、全ての株が *M. haemolytica*と判定された。



図1 羊血寒上のコロニー

2 *Mannheimia* 属菌同定用 Multiplex PCR 成績

PCRにより *M. haemolytica*と同定されたのは44株中42株（95.5%）であり、2株（4.5%）は、*M. haemolytica*、*M. glucosida*、*M. ruminalis*のいずれも否定された。

3 *M. haemolytica* 株の血清型および薬剤感受性

M. haemolytica 株 42 株の内、血清型 1 型は 19 株(45.2%)、6 型は 16 株(38.1%)、型別不能が 7 株(16.7%)であった。これらを分離年別に整理すると、平成元年～15 年までは 1 型菌のみが分離されていたが、平成 16 年以降、新たに 6 型菌の分離が確認されるようになった(図 2)。その分離株数も 6 型菌が半数以上を占めていた。さらに、分離株の血清型を症例別に確認すると、多くの症例で 1 型菌もしくは 6 型菌のいずれかが分離されていた。しかし、平成 16 年の一症例および平成 23 年の一症例では 1 型菌および 6 型菌の両方が分離されていた。

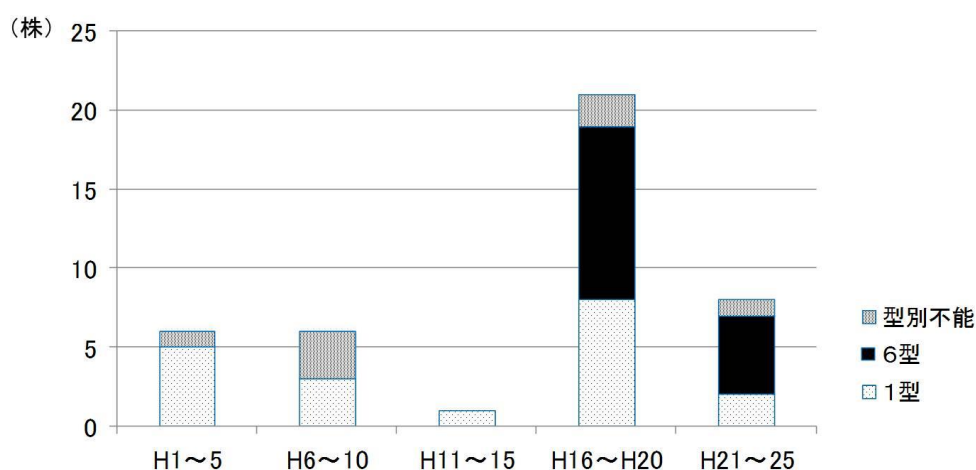


図 2 *M. haemolytica* 株の血清型 (分離年別)

薬剤感受性試験では供試薬剤 8 薬剤の内、ABPC、KM、OTC、CP、ERFX に耐性株が少数ではあるが認められた(図 3)。ERFX 耐性株は全て 6 型菌であり、かつ、6 型菌では多剤耐性の傾向が確認された(表 1)。

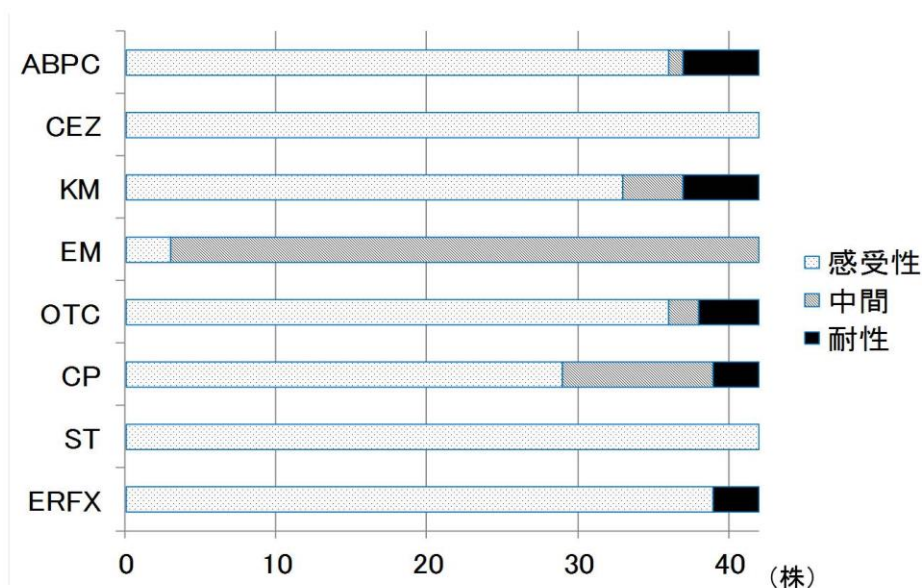


図 3 *M. haemolytica* 株の薬剤感受性試験成績

表 1 *M. haemolytica* 株の薬剤感受性試験成績 (血清型別)

血清型	薬剤耐性パターン	耐性薬剤数	株数
1型 (19株)	耐性薬剤なし	0	14 (73.6%)
	ABPC	1	3 (15.8%)
	KM	1	1 (5.3%)
	ABPC, OTC	2	1 (5.3%)
6型 (16株)	耐性薬剤なし	0	13 (81.2%)
	KM, CP, ERFX	3	1 (6.3%)
	KM, OTC, CP, ERFX	4	2 (12.5%)
型別不能 (7株)	耐性薬剤なし	0	6 (85.7%)
	ABPC, KM, OTC	3	1 (14.3%)

4 *M. haemolytica* が否定された 2 株の同定成績

PCR により *M. haemolytica* が否定された 2 株 (A 株・B 株) について 16S rRNA 遺伝子解析を行った。EzTaxon-e および BLAST を用いた、データベース上の登録株との相同性検索の成績を表 2 に示す。本解析では相同性 99% 以上で同一菌種の可能性、相同性 97% 以上で近縁関係にあるとされていること、および一次性状・簡易同定キットの成績から、A 株・B 株のいずれも *Mannheimia* 属菌と同定され、種の同定には至らなかった。また、CLUSTALW を用いて、A 株・B 株の相同性を確認したところ、99.3% と高い相同性を示し、これらは同一菌種であることが示唆された。A 株・B 株ともに鼻腔スワブから分離された株であり、鼻腔粘膜の常在細菌等を *M. haemolytica* と誤同定してしまっていた可能性が考えられた。

表 2 16S rRNA 遺伝子解析結果

	A 株	B 株
EzTaxon-e による基準株との 相同性検索結果	① <i>Mannheimia varigena</i> (96.6%) ② <i>Mannheimia glucosida</i> (96.5%) ③ <i>Mannheimia granulomatis</i> (96.4%) ⋮ ⑧ <i>M. haemolytica</i> (95.6%)	① <i>Mannheimia granulomatis</i> (96.2%) ② <i>Mannheimia varigena</i> (96.2%) ③ <i>Mannheimia glucosida</i> (96.1%) ⋮ ⑧ <i>M. haemolytica</i> (95.3%)
BLAST によるデータベース上 全ての株との相同性検索結果	① <i>Mannheimia</i> sp. HPA121 (98.6%) ② <i>Mannheimia</i> sp. strain PH704 (98.5%) ③ <i>Mannheimia</i> sp. R19.2 (98.3%)	① <i>Mannheimia</i> sp. HPA121 (98.7%) ② <i>Mannheimia</i> sp. strain PH704 (98.6%) ③ <i>Mannheimia</i> sp. R19.2 (98.2%)

※ 相同性検索の結果、上位3菌種を示した。

IV まとめおよび考察

今回、保存株の再同定により、44 株中 2 株は *M. haemolytica* と誤同定されていたことが確認された。勝田らも、簡易同定キット (アピ 20NE) により *M. haemolytica* と同定された 133 株の内、遺伝子検査によっても *M. haemolytica* と同定されたのは

102株(76.7%)であると報告している⁵⁾。したがって、*M. haemolytica*の同定にあたっては、簡易同定キットのみを使用するのではなく、PCRなど遺伝子検査を活用する必要があると考えられた。特に、鼻腔スワブから菌分離を行う場合、常在細菌等の多種多様な菌が分離されてくることから、遺伝子検査は有効な方法と思われる。また、症例によっては複数の血清型(1型菌および6型菌)が同時に分離されていた。病性鑑定において原因となる病原体を正確に把握することは基本的かつ疾病予防のために重要であることから、一症例につき出来る限り複数個体・複数株の検査を実施する必要があるであろう。

県内分離*M. haemolytica*株について初めて血清型別を行ったところ、ワクチン株とは異なる6型菌の県内への侵入が明らかとなり、6型菌はERFX耐性を含む多剤耐性の傾向にあった。国内で初めて6型菌が分離されたのは平成5年であり、以降、その分離株数は全国的に増加傾向にある⁸⁾。しかも、本県分離株よりも多くの薬剤に耐性を示す株の存在も報告されている⁹⁾。*M. haemolytica*による呼吸器病は斃死に至る経済的損失の観点から重要視されており、有効な予防・治療のために、本菌の動向を今後注視していく必要があると考えられた。

V 謝辞

16S rRNA 遺伝子解析および*M. haemolytica*株の血清型別を実施頂いた動物衛生研究所の勝田賢先生に深謝いたします。

VI 参考文献

- 1) Biberstein. 1978. Biotyping and serotyping of *Pasteurella haemolytica*. Academic Press, London.
- 2) Fodor et al. 1988. ELISA for the measurement of sheep antibodies to the capsular antigens of *Pasteurella haemolytica* serotypes. Res Vet Sci 45: 414-415.
- 3) Angen et al. 1999. Taxonomic relationships of the [*Pasteurella*] *haemolytica* complex as evaluated by DNA-DNA hybridizations and 16S rRNA sequencing with proposal of *Mannheimia haemolytica* gen. nov., comb. nov., *Mannheimia granulomatis* comb. nov., *Mannheimia glucosida* sp. nov., *Mannheimia ruminalis* sp. nov. and *Mannheimia varigena* sp. nov. Int J Syst Bacteriol 49 Pt 1: 67-86.
- 4) Angen et al. 1999. Investigations on the species specificity of *Mannheimia* (*Pasteurella*) *haemolytica* serotyping. Vet Microbiol 65: 283-290.

- 5) 勝田ら 2009. *Mannheimia* 属菌の野外実態と同定法の確立. 動衛研研究報告 115: 15-18.
- 6) Alexander et al. 2008. A multiplex polymerase chain reaction assay for the identification of *Mannheimia haemolytica*, *Mannheimia glucosida* and *Mannheimia ruminalis*. Vet Microbiol 130: 165-175.
- 7) Kim et al. 2012. Introducing EzTaxon-e: a prokaryotic 16S rRNA gene sequence database with phylotypes that represent uncultured species. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 62: 716-721.
- 8) Katsuda et al. 2008. Serotyping of *Mannheimia haemolytica* isolates from bovine pneumonia: 1987-2006. Vet J 178: 146-148.
- 9) Katsuda et al. 2009. Antimicrobial resistance and genetic characterization of fluoroquinolone-resistant *Mannheimia haemolytica* isolates from cattle with bovine pneumonia. Vet Microbiol 139: 74-79.