

原著論文

Pasteurella multocida と *Mannheimia haemolytica* の 農場内伝播様式に関する考察

西 清二¹⁾*・木嶋友洋¹⁾・大久保雅人¹⁾・瀧上新蔵¹⁾
天辰正秋²⁾・東山拓也³⁾・中馬猛久³⁾

1) かごしま中部農業共済組合 (〒 899-6401 鹿児島県霧島市溝辺町有川 2013)

2) 東亜薬品工業 (〒 151-0073 東京都渋谷区笹塚 2-1-11)

3) 鹿児島大学共同獣医学部 (〒 890-0024 鹿児島県鹿児島市郡元 1-21-24)

*連絡担当：西 清二

TEL : 0995-59-2409 FAX : 0995-59-3215

E-mail : nosaiseibu15@gmail.com

[要 約]

呼吸器病の多発する一肥育農場において、*Pasteurella multocida* (*P. multocida*) と *Mannheimia haemolytica* (*M. haemolytica*) の農場内での伝播感染様式について調査を行った。調査1として導入1ヵ月後、2ヵ月、3ヵ月の牛各12頭における保菌状況調査を行った。調査2として、導入牛30頭の導入時から導入2ヶ月後までの鼻腔スワブを継続採取し、同一牛における *P. multocida* と *M. haemolytica* の分離状況の変化について、遺伝子解析手法である PFGE (pulsed-field gel electrophoresis) により型別判定を行い農場内における動態を検討するとともに、呼吸器病の発生状況も調査した。調査1の結果、導入1ヵ月後、2ヵ月、3ヵ月において *P. multocida* は8頭、5頭、7頭から、*M. haemolytica* はそれぞれ1頭から分離された。調査2のPFGE型別判定の結果、*P. multocida* は20種のPFGE型(A~V)に分けられ、*P. multocida* は病原性が弱く臨床症状を示しにくいことから継続分離されやすいと考えられた。一方、*M. haemolytica* は9種のPFGE型(A~J)に分けられ、導入直後にみられなかった特定のPFGE型が優勢を占め、保菌牛からの水平感染、あるいは農場内の環境から伝播が起こっていることが示唆された。今回、新たに取り組んだPFGE型による型別判定は原因菌の伝播感染様式が把握でき、農場における防疫対策に有用であると考えられた。

キーワード：導入牛、*Mannheimia haemolytica*、*Pasteurella multocida*、PFGE

[緒 論]

近年、大型農場を中心に牛呼吸器症候群 (BRDC) の発生が増加しており、死産事故などによる経済的損失が大きく問題となっている [9]。外部から導入牛を受け入れる肥育農場においては、輸送や環境変化からのストレス [1,

7, 8] が原因となり BRDC を発症するとされている。そのため、BRDC の原因菌の調査および治療薬選択を目的として、多くの農場で鼻腔スワブを用いた病原微生物の種類や薬剤感受性について調べられている [3, 5, 6]。我々は、一肥育農場にて無作為に抽出した導入牛を対象に、呼吸器における病原微生物の調査を2009年度から開始し、薬剤感受性結果に基づき感受性を有する薬剤を使用して治療を行ったが、呼吸器疾患の再発が繰り返し認められ、治療件数

受付：2013年9月9日

受理：2013年12月20日

の減少は認められなかった。これらの結果から、当該農場 BRDC 対策を行うために2つの問題点が挙げられた。1つ目は、呼吸器病の再発を繰り返す症例では常に同種細菌が分離され、薬剤耐性菌が出現している可能性が疑われた。2つ目は、原因菌の伝播経路が不明であり、呼吸器病の原因菌が外部からの導入牛の保菌株より農場内に拡散しているのか、あるいは農場内に常在する株が導入牛に伝播しているのか把握できず、感染に対する有効な予防法を構築することが困難であった。以上のことより、分離菌株の識別が必要であると考え、*M. haemolytica* について調査の報告がある PFGE を用いた分子疫学調査方法 [5] に注目し、肥育農場における導入直後から導入2ヶ月後までの個体別の保菌状況とその動態について調査を行った。

[材料と方法]

①農場の概要

調査を行った農場は、約1,000頭の牛を飼養する黒毛和種肥育農場で、導入は管内の家畜市場より、生後8~11ヶ月齢の去勢および雌牛を月に一回40~60頭購入していた。導入牛管理舎1棟と仕上げ舎4棟を有しており、導入牛管理舎は導入後3~4ヶ月間使用され、1群6頭(25m²)で飼育し、それ以降は仕上げ舎にて1群2頭で飼育していた。BRDC対策として、導入時に *Mannheimia haemolytica* 1型感染症不活化ワクチンの接種、およびアモキシシリン(アモスタック LA 注、Meiji Seika ファルマ株式会社)

の投与を行っていた。

2009年度から事前に行った薬剤感受性試験(拡散法)の結果では、農場より分離された *Pasteurella multocida* (*P. multocida*)、と *Mannheimia haemolytica* (*M. haemolytica*) は共にストレプトマイシンの感受性が低く、その他の薬剤は感受性を有していることが確認された。そのため、農場における治療にはストレプトマイシンを使用しないよう、診療を担当する獣医師間で取り決めを行った。Fig. 1に薬剤感受性試験結果に基づき治療した2011年度における、導入後90日間の呼吸器病治療回数を示した。病傷件数は導入後2週間から3週間にピークに発症が多くみられ、その後は徐々に減少していく傾向に変化が認められなかった。感受性を有する薬剤による治療を行っても、呼吸器疾患の発症パターンに大きな変化が認められず、導入牛管理舎内で繰り返し呼吸器疾患を発症していることが示された。

②調査の概要

調査1

導入牛管理舎内における保菌状況を把握する目的で、農場内における *P. multocida* および *M. haemolytica* の分離状況および分離株の調査を実施した。供試牛は2010年8月(導入後3ヶ月)、2010年9月(導入後2ヶ月)、2010年10月(導入後1ヶ月)に導入された牛36頭(各導入月12頭ずつ)の鼻腔スワブを2010年11月に一斉採取し、外部検査機関において *P. multocida*

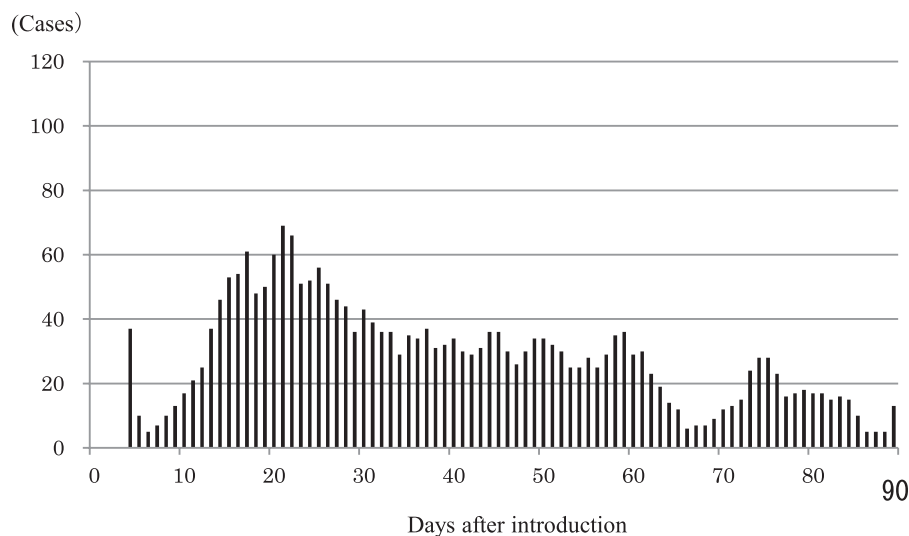


Figure 1 The number of cases of respiratory disease during 90 days after introduction for 2011

および *M. haemolytica* の分離および同定を実施した。

調査 2

間隔をあけた 2 期間における導入牛の *P. multocida* および *M. haemolytica* 保菌状況を把握する目的で、継続的な病原性細菌の種類および分離株の調査を実施した。供試牛として 2010 年 11 月に導入した牛 10 頭と、2011 年 7 月に導入した牛 20 頭に対して調査を行い、導入直後、導入 1 ヶ月後、導入 2 ヶ月後に鼻腔スワブを採取して、*P. multocida* および *M. haemolytica* の分離および同定を実施した。

調査 3

調査 2 で用いた牛の導入後 90 日間の呼吸器病発症の有無および、保菌状況について調査を実施した (Table 1)。

調査 4 パルスフィールド電気泳動 (PFGE)

調査 1 および 2 で分離された *P. multocida* 56 株、および *M. haemolytica* 26 株について、パルスフィールドゲル電気泳動法により PFGE 型の分類を行った。PFGE は Hotchkiss ら [6] の方法に従い、制限酵素 Apa I、泳動条件 22 時間、パルスタイム 1~30 秒の条件で実施した。

[結 果]

調査 1：農場内株調査の分離状況

P. multocida は導入後 1 ヶ月の牛では 8 頭 (67%)、2 ヶ月の牛では 5 頭 (42%)、3 ヶ月の牛では 7 頭 (58%) より分離され、*M. haemolytica* は各時期においてそれぞれ 1 頭 (8%) ずつ分離された (Table 1)。両菌種が同時に分離された個体は、導入後 1 ヶ月の 1 頭 (8%) のみであった。

調査 2：導入牛における保菌および追跡調査の分離状況

P. multocida は導入時に 7 頭より分離され、導入 1 ヶ月後には 13 頭、2 ヶ月後には 16 頭より分離された (Table 2)。一方、*M. haemolytica* は導入時に 3 頭より分離され、導入 1 ヶ月後には 8 頭、2 ヶ月後には 12 頭より分離された。両菌種が同時に分離された個体は導入時 1 頭、導入 1 ヶ月後に 2 頭、導入 2 ヶ月後に 6 頭と増加した。

調査 3：導入牛保菌および追跡調査を行った供試牛の呼吸器病治療の有無

導入後 90 日間の呼吸器病における治療の有無を調査した結果 (Table 3)、2010 年 11 月に導入した牛においては、10 頭の供試牛に対し 5 頭において治療経過があり、*M. haemolytica* 5 株、*P. multocida* 3 株が分離された。導入後 90

Table 1 Change of *P. Multocida* and *M. Haemolytica* isolation in Research 1

	導入 1 ヶ月後	導入 2 ヶ月後	導入 3 ヶ月後
検査頭数	12 頭	12 頭	12 頭
<i>P. Multocida</i> のみ分離	8 頭	5 頭	7 頭
<i>M. Haemolytica</i> のみ分離	1 頭	1 頭	1 頭
両菌分離	1 頭	0 頭	0 頭
分離なし	4 頭	6 頭	4 頭

Table 2 Change of *P. Multocida* and *M. Haemolytica* isolation in Research 2

	導入直後	導入 1 ヶ月後	導入 2 ヶ月後
検査頭数	30 頭	30 頭	30 頭
<i>P. Multocida</i> のみ分離	7 頭	13 頭	16 頭
<i>M. Haemolytica</i> のみ分離	3 頭	8 頭	12 頭
両菌分離	1 頭	2 頭	6 頭
分離なし	21 頭	11 頭	8 頭

Table 3 Isolation of *P. Multocida* and *M. Haemolytica* depend on treatment

n=30		分離頭数			
		導入直後	導入1ヶ月後	導入2ヶ月後	
TOTAL	菌種	3	9	10	
治療あり	13	<i>M. haemolytica</i>	2 *	4 *	7 *
		<i>P. multocida</i>	2 *	6 *	6 *
TOTAL	菌種	6	10	12	
治療なし	17	<i>M. haemolytica</i>	1	4 *	5 *
		<i>P. multocida</i>	5	7 *	10 *

* *P. Multocida* と *M. Haemolytica* の両菌種ともに分離

Table 4 PFGE types and number of cows isolated *P. Multocida*

PFGE 型	A	B	C	E	F	G	I	J	K	L	
株数	18	6	1	2	1	6	1	1	3	1	
PFGE 型	M	N	O	P	Q	R	S	T	U	V	総株数
株数	1	6	1	1	2	1	1	1	1	1	56

日間治療経過の無い牛5頭においても *M. haemolytica* 3株、*P. multocida* 4株が分離された。

2011年7月に導入した牛では、20頭中8頭で呼吸器病に対する治療が行われており、*M. haemolytica* 8株、*P. multocida* 11株が分離された。導入後90日間治療に治療12頭においても、*M. haemolytica* 7株、*P. multocida* 18株が分離された。

調査4：PFGE型による分類

P. multocida は全56株が20種のPFGE型(A~V)に分けられ、A型が18株(33%)、B、G、N型が6株(11%)、K型が3株(6%)、E、Q型が2株(4%)、残りの13種の型は1株(2%)ずつであった(Table 4)。調査1では9種の型(A、B、C、E、F、G、I、K、U)が分離された。調査2の2010年11月導入牛では、調査1と同じPFGE型が3種(A、B、G)に加え、新たに1種(J)が分離された。調査2の2011年7月導入牛では、調査1と同じPFGE型が4種(A、B、E、G)に加え、新たに10株(L、M、N、O、P、Q、R、S、T、V)が分離された。調査2において、同一個体から継続的に*P. multocida* が分離された牛は11頭で、そのうち5頭は同じ型が分離された(Table 5)。

M. haemolytica は全26株が9種のPFGE型(A~J)に分けられ、D型が13株(50%)に、J型は3株(11%)、A、C、H型は2株(8%)、残りの4種の型は1株(4%)ずつであった

Table 5 Change of PFGE types of *P. Multocida* in Research 2

供試牛	導入直後	導入1ヶ月後	導入2ヶ月後
1	A	A	A*
2	G	G	S
3	L	N	N*
4		A	A*
5		A	R
6		A	U
7		B	B*
8		B	N
9		E	T
10		N	N*
11		F	V

*：前月と同一のPFGE型が分離

(Table 6)。調査1では3種の型(A、B、C)が分離され、調査2の2010年11月導入牛からは同じPFGE型が2種(A、C)に加え、新たに4種(D、F、G、H)が分離された。一方、調査2の2011年7月導入牛では、調査1と同じPFGE型が1種(B)に加え、新たに2株(I、J)が分離された。調査2において、同一個体から継続的に*M. haemolytica* が分離された牛は5頭であったが、すべての牛で導入2か月後には1種のPFGE型(D)に収束した(Table 7)。

[考察]

本調査の結果では、調査1において導入1ヶ月後、2ヶ月後、3ヶ月後の牛において、農場内で*P. multocida* と *M. haemolytica* が分離さ

Table 6 PFGE types and number of cows isolated *M. haemolytica*

PFGE 型	A	B	C	D	F	G	H	I	J	総株数
株数	2	1	2	13	1	1	2	1	3	26

Table 7 Change of PFGE types of *M. haemolytica* in Research 2

供試牛	導入直後	導入1ヶ月後	導入2ヶ月後
9		I	D
11	H	A	D
12		B	D
13		D	D
14		J	D

れ、両菌種では伝播感染様式に違いが確認された。導入直後から2ヶ月後まで同一牛を追跡した調査2では、*P. multocida*と*M. haemolytica*の分離率はそれぞれ増加したが、調査期間を通して*P. multocida*の分離率が高かった。これはCravensらの報告[1]と一致し、肺病変とは違って鼻腔スワブからは*P. multocida*の分離頻度が高くなると思われた。*P. multocida*は同型が継続分離され、その後分離される頭数も増加していたが、PFGE型別分類の結果から農場に持ち込まれた型の伝播拡散も認められず、同居牛からの伝播拡散も確認されなかった。このことから*P. multocida*は病原性が弱く臨床症状を示しにくいいため、無治療で継続的に感染している可能性が示唆された。また、*P. multocida*は導入後90日間に治療を行われなかった牛からも多く分離されたことから、呼吸器の臨床症状の発現には大きな影響はないことが推察された。

*M. haemolytica*は、常在菌として鼻腔内に長期間検出されやすいと認識していたが、今回の調査では比較的短い期間で鼻腔から消失し、伝播経路の特定には至らなかったが、PFGE型別分類の結果から導入から2ヶ月後、同じ型に集約されることが確認された。これらの結果から、*M. haemolytica*は農場内の環境、あるいは保菌牛からの水平感染で農場内伝播が起きていると考えられたが、日齢の経過とともに呼吸器病の発症数は減少して行く傾向にあるため、調査農場においてBRDC対策として行っている*M. haemolytica*ワクチンは有効であると考えられた。また、導入時にはすでに*P. multocida*と*M. haemolytica*を保菌している個体が散見

されることから、導入時に感受性のある抗生物質を投与することは、導入直後の呼吸器病の発症抑制に効果があると考えられた。

従来、呼吸器病の治療では、一農場内で複数の牛から同一細菌が分離される場合、同じ遺伝子型であると考えて同一の抗生剤を用いて治療が行われ、再発が起こると薬剤の効果が認められないと判断して薬剤の変更が行われている。本調査の結果から、同じ牛の鼻腔から繰り返し同種細菌が分離されても、異なる遺伝子型に置き換わっていることが示され、呼吸器病が再発した牛についても耐性菌が出現していたわけではなく、遺伝子型の異なる同種細菌の新規感染が起こっている可能性が示唆された。この結果から、農場に対し呼吸器病の原因となっている細菌の動態について報告を行い、細菌感染に対する生体側の抵抗力を高めるとともに、畜舎消毒による衛生環境整備の重要性を再認識させられた。

今回は*P. multocida*と*M. haemolytica*の2種類の細菌に対して調査を行ったが、農場内ではより多くの細菌、ウイルス等の侵入があり、体内では複雑な免疫応答が行われていると考えられる。本調査と同様に鼻腔スワブを用いた細菌検査、薬剤感受性試験により、良好な呼吸器病対策を行うことが可能な農場が多いと推察されるが、なかなか本調査の農場のように呼吸器病の減少に至らない農場があることも考えられる。今回、新たに取り組んだPFGE型による型別判定は、呼吸器病の原因菌の伝播感染様式が把握できる[2]ことから、BRDC対策を行う上で有効な調査手段であることが示唆された。

[引用文献]

1. Cravens, L. R. 2004. 臨床獣医, 22 (6) : 15-19
2. Hotchkiss, E. J., Hodgson, J. C., and Schmittvan de Leemput, E. 2011. Vet. Microbiol., 151(3-4): 329-335
3. 加藤敏英. 2010. 家畜診療, 57 : 5-12
4. Katsuda, K., Kohmoto, M. and Kawashima, K. 2003. Epidemiol Infect., 131: 939-946.
5. 高木裕子, 大野治. 2011. 日獣会誌, 64 :

- 215-220
6. 田中秀和, 井隼ミキ. 2010. 家畜診療, 57 : 471-478
7. 富永 潔. 1997. 臨床獣医, 15 (7) : 17-22
8. 富永 潔. 2004. 臨床獣医, 22 (6) : 10-14
9. 塚田祐介, 更科進也. 2006. 家畜診療, 53 : 415-422

Consideration of intra-farm spread of *Pasteurella multocida* and *Mannheimia haemolytica*

Seiji Nishi¹⁾, Tomohiro Kishima¹⁾, Masaaki Amatatsu¹⁾, Masato Ohkubo¹⁾,
Sinzou Fuchiue¹⁾, Takuya Higashiyama²⁾ and Takehisa Chuma²⁾

1) Kagoshima Chubu Prefectural Federation of Agricultural Mutual Aid Associations

2) Joint Faculty of Veterinary Medicine, Kagoshima University

[Abstract]

We investigated the farm which develop the respiratory disease caused by intra-farm spread of *Pasteurella multocida* (*P. multocida*) and *Mannheimia haemolytica* (*M. haemolytica*). Research 1: 12 cows were investigated the carrying status of *P. multocida* and *M. haemolytica* from 3 periods (1, 2 and 3 months after introduction). Research 2: 30 cows were investigated the carrying situation and genotypical classification by pulse field gel electrophoresis (PFGE) method about *P. multocida* and *M. haemolytica* on 0, 1 and 2 months after introduction.

P. multocida at 1, 2 and 3 months after introduction were isolated from 8, 5 and 7 cows, respectively. *M. haemolytica* at 1, 2 and 3 months after introduction were isolated from one cows, respectively. Results of genotypical classification by PFGE method, *P. multocida* were divided into 20 types (A~V), and it was separated continuously. In contrast, *M. haemolytica* were divided into 9 types (A~J), and it was gathered by a specific type. These results indicated that genotypical classification by PFGE method is useful for prevention of epidemics measures in the farm.

Key words: Introduction cow, *Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida*, PFGE method