

牛から分離された *Pasteurella multocida* の 血清型と皮膚壊死毒素産生能

渥美文章*・大谷敏之*・趙 宏坤*・平棟孝志*
菊池直哉*・小岩政照**・高橋英世**

Sero-types and Dermonecrotic Activity of *Pasteurella multocida* Strains Isolated from Cattle in Hokkaido

Fumiaki ATSUMI*, Toshiyuki OHTANI*, Hong Kun ZHAO*
Takashi HIRAMUNE*, Naoya KIKUCHI*, Masateru KOIWA**
and Hideyo TAKAHASHI**

(May 1986)

緒 言

Pasteurella multocida (以下 *P. multocida*) の血清型別は、多くの人によって行われてきた。このうち、莢膜型は Carter の A, B, D, E 型¹⁾、また、菌体型は Namioka and Murata⁸⁾ の 1-12 型および Heddeleston⁴⁾ の 1-16 型が、現在、よく利用されている。1963 年、Namioka and Bruner⁷⁾ は *P. multocida* の血清型と病原性に密接な関係があることを明らかにした。すなわち、Carter の莢膜型と Namioka らの菌体型の組み合わせにより、6: B, 6 E は牛の出血性敗血症を、5: A, 8 A, 9: A は家禽コレラを起こし、その他の血清型は呼吸器疾患、化膿などに関与しているという。さいわい、わが国では出血性敗血症の発生はなく、家禽コレラのそれはきわめて稀であるが、その他の血清型は、各種動物の呼吸器を中心に広く分布していると考えられている。

ところで、わが国では Sawata ら¹⁰⁾、沢田ら¹¹⁾ が、豚の肺炎病巣および萎縮性鼻炎より分離された *P. multocida* の皮膚壊死毒素産生能と莢膜型の関係について報告している。しかし、牛から分離された *P. multocida* の血清型および毒素産生能に関する報告は見あたらない。そこで、著者らは、外見上、健康な牛鼻汁および病的材料から分離された *P.*

* 獣医学科、家畜伝染病学教室

Department of Veterinary Medicine (Epizootiology), Rakuno Gakuen University, Ebetsu, Hokkaido 069, Japan

** 石狩地区農業共済組合、夕張郡由仁町三川

Ishikari Agricultural Mutual Association, Mikawa, Yuni, Hokkaido 069-11, Japan

multocida の血清型および皮膚壊死毒素産生能を調べた。

材料および方法

1. 供試材料

1) 健康牛の鼻腔ぬぐい液

1983年4月から1984年8月の間に、石狩の一肥育牧場に導入された生後7~10日齢の牛15頭を一群とし、計5群を供試した。採材は導入直後、1, 3, 5および7カ月目の5回にわたって行なわれ、のべ369頭の鼻腔ぬぐい液を滅菌綿棒 (Culturette, Marion Scientific Co.) で採取した。

2) 病的材料

1984年から1985年の間に、病性鑑定のため、当教室で取り扱った牛の肺炎病巣など11例を供試した。

2. 菌分離と同定

バンコマイシンを50 $\mu\text{g/ml}$ 添加した5%馬血液寒天培地に材料を接種し、37°Cで24時間培養した。出現したコロニーを純培養し、Namioka⁶⁾の記載に準じて同定した。

3. 荚膜型別

純培養後、直ちに-80°Cに凍結保存した菌株を5%馬血液寒天培地に接種、抗原を作製して、間接赤血球凝集反応¹⁾に供した。また、ヒアルロニダーゼ試験²⁾およびアクリフラビン試験³⁾を併用した。

4. 菌体型別

Heddlestonらの方法⁴⁾によった。すなわち、鶏で作製した16の抗血清を使用し、ゲル内拡散沈降反応を行った。

5. 皮膚壊死毒素の検出法

毒素の抽出は Sawata らの方法¹⁰⁾に基づいて行った。2枚の Yeast extract-proteose peptone-cystine (YPC) 培地に37°Cで18時間、培養した *P. multocida* を生理食塩水50 ml にかきとり、約 10^{10} cell/ml に調製した。次いで菌液を3.5 A, 10分間、超音波処理 (海上電機4280 S) した。これを4°Cで13,000 rpm, 60分、遠沈後、上清を0.2 μm のフィルターで濾過し、菌体を除去後、小試験管に分注し、供試まで-20°Cに凍結保存した。

皮膚壊死毒素の検出には約300 gのモルモットを使用した。腋下と下腹部の両側計4カ所を毛刈り後、被検液を3カ所、対照として生理食塩水を1カ所、それぞれ0.1 ml 皮内接種した。48時間後に観察し、皮膚壊死病変が5 mm以上のものを陽性と判定した。

結 果

1. *P. multocida* の分離

みかけ上、健康な牛の鼻腔ぬぐい液、のべ369例中72例(19.5%)から本菌が分離された。しかし、同一個体から長期間にわたり本菌を証明することはなかった。

病的材料11例から、すべて *P. multocida* が分離された (Table 1)。

Table 1. Isolation of *P. multocida* from cattle specimens

| Group | Specimens | Number of specimens examined | Number of isolates | Rate of isolation (%) |
|--------|-------------------|------------------------------|--------------------|-----------------------|
| Calves | Nasal swab | 369 | 72 | 19.5 |
| Cows | Affected lesions* | 11 | 11 | 100 |

* Lung, trachea and mastitis milk.

2. 荚膜型別

健康牛の鼻汁由来の72株はすべてA型に属した。病的材料11例中9例はA型であったが、肺および気管から分離された各1株はD型であった (Table 2)。

3. 菌体型別

Heddleston の分類した16の参照株で作製した抗血清を用い、ゲル内拡散沈降反応を行ったところ、健康牛の鼻汁由来の72株中32株、病的材料の11株中10株が型別できた。鼻汁由来株のうち、3型は2株、11型は7株で、病的材料由来株は1および4型に各1株、11型に4株が属した。残りの鼻

Table 2. Capsular types of *P. multocida* isolated from cattle

| Strains isolated from | Capsular types | Number of strains |
|-----------------------|----------------|-------------------|
| Calves Nasal swab | A | 72 |
| Cows Lung | A | 6 |
| Trachea | A | 1 |
| Mastitis milk | A | 2 |
| Lung | D | 1 |
| Trachea | D | 1 |

Table 3. Somatic (0) types of *P. multocida* isolated from cattle

| Strains isolated from | 0 types | Number of strains | |
|-----------------------|---------|-------------------|---|
| Calves Nasal swab | 3 | 2 | |
| | 11 | 7 | |
| | C* | 23 | |
| Cows Lung | 4 | 1 | |
| | 11 | 3 | |
| | C* | 3 | |
| | Trachea | 1 | 1 |
| | 11 | 1 | |
| Mastitis milk | C* | 1 | |

1) 32 out of 72 isolated from nasal swabs and 10 out of 11 isolated from lesions were typable strains.

2) C* indicates cross reaction.

汁由来の23株と病的材料由来の4株は2つ以上の型の抗血清と反応した (Table 3)。

4. 皮膚壊死毒素産生性

健康牛の鼻汁由来の72株はすべて、また、病的材料由来の11株中9株は本毒素非産生性であった。肺および気管から分離された各1株が皮膚壊死毒素を産生した (Table 4)。

5. 皮膚壊死毒素産生性と莢膜型の関係

D型に属した2株のみがこの毒素を産生し、A型に属した81株は毒素非産生であった (Table 5)。

Table 4. Dermonecrotic activity of *P. multocida* isolated from cattle

| Strains isolated from | | Dermonecrotic activity | |
|-----------------------|---------------------------------|------------------------|----|
| | | + | - |
| Calves | Nasal swab | 0 | 72 |
| Cows | Lung, trachea, or Mastitis milk | 0 | 9 |
| | Lung | 1 | 0 |
| | Trachea | 1 | 0 |
| Total | | 2 | 81 |

Table 5. Relationship between capsular types and dermonecrotic activity of *P. multocida* isolated from cattle

| Capsular types | Dermonecrotic activity | |
|----------------|------------------------|----|
| | + | - |
| D | 2 | 0 |
| A | 0 | 81 |

考 察

今回、調査した北海道の一牧場の健康牛から分離された *P. multocida* はすべて、また、病変部由来株のほとんどが莢膜型 A であることが判明した。Prescott ら⁹⁾ はカナダのオンタリオ州で牛から分離された本菌の莢膜型は A が多かったと報告している。

いっぽう、Sawata ら¹⁰⁾ は、わが国の豚由来 *P. multocida* の莢膜型は D が A より多かったと述べている。

ところで、Namioka and Murata⁸⁾ が分類した本菌の O 型と動物への起病性に密接な関係のあることが明らかにされている。しかし、今回はこれら O 型の抗血清を揃えることができなかつたため、Heddleston の方法⁴⁾ により、菌体型を調べた。供試 83 株中、42 株が型別でき、型別率は 50.6% と低率であった。この原因として、Heddleston の抗血清が主に鳥類から分離された株で作製されたものであり、牛由来株の抗原と反応しなかつたものが多くみられたものと考えられる。しかし、岩松ら⁵⁾、沢田ら¹¹⁾ は、わが国の豚由来の本菌株のほとんどが Heddleston の方法で型別できたと述べているので、今回の牛由来株の型別率が低い理由については、今後の検討が必要と思われる。

次に、皮膚壊死毒素産生性と莢膜型の関係に興味ある結果が得られた。毒素産生の2株

はいずれも莢膜 D 型であったが、毒素非産生とされた 81 株はすべて A 型であった。この結果は Sawata¹⁰⁾ らの報告した豚由来 *P. multocida* の皮膚壊死毒素産生能と莢膜型の関係に一致している。いっぽう、豚由来の本菌の菌体型は 1 および 3 が多いといわれている。しかし、上述の牛から分離された株の型別率は低く、二つ以上の型の抗血清と反応した株もあり、菌体型と毒素産生の有無との間に、明らかな関係は見られなかった。

健康な子牛の鼻腔から分離された本菌の分離状況、皮膚壊死毒素産生能の成績から、これらの株は、単に通過菌として、そこに付着しているのかも知れない。しかし、*P. multocida* の感染、発病には、血清型および皮膚壊死毒素以外の多くの病原因子あるいは生体側の条件が複雑に関与していると思われるので、これら分離菌の病原的意義を考察するには、今後の検討が必要である。いずれにしても、今回は、限られた牧場の牛についての調査であり、今後、他の地域の牛から分離される本菌の血清型および皮膚壊死毒素産生能を調べ、疫学的考察を加えなければならない。

要 約

牛から *P. multocida* の分離を行い、該菌の血清型および皮膚壊死毒素産生能を調べた。

1. みかけ上、健康な子牛の鼻腔ぬぐい液、のべ 369 例中 72 例から、また、呼吸器疾患などのあった成牛の病的材料 11 例から本菌が分離された。

2. これら分離株の莢膜型を調べたところ、健康牛由来の 72 株はすべて、また病牛由来の 11 株中 9 株は A 型、他の 2 株は D 型であった。

3. Heddleston の方法で菌体型別を行った。型別できた株は健康牛由来で 32/72、病牛のそれでは 10/11 であった。型別できた 42 株中、15 株は 1, 3, 4, および 11 型にそれぞれ属した。他の 27 株は、二つまたはそれ以上の抗血清と反応が見られた。

4. 病牛由来の 2 株のみがモルモットに対し皮膚壊死毒素を産生し、これらは莢膜型 D であったが、本毒素非産生の病牛由来の 9 株および健康牛由来の 72 株はすべて A 型という結果を得た。

文 献

- 1) Carter, G. R., 1955. Studies on *Pasteurella multocida*. I. A hemagglutination test for the identification of serological types. Amer. J. Vet. Res., 16: 481-484.
- 2) Carter, G. R. and Rundell, S. W., 1975. Identification of type A strains of *Pasteurella multocida* using staphylococcal hyaluronidase. Vet. Rec., 87: 343.
- 3) Carter, G. R. and Subronto, P., 1973. Identification of type D strains of *Pasteurella multocida* with acriflavine. Amer. J. Vet. Res., 34: 293-294.
- 4) Heddleston, K. L., Gallagher, J. E. and Rebers, P. A., 1972: Fowl cholera: Gel diffusion

- precipitin test for serotyping *Pasteurella multocida* from avian species. *Avian Dis.*, **16**: 925-936.
- 5) 岩松 茂, 宮本修治, 吉野久信, 沢田拓士 1985. 豚の呼吸器病変と分離 *Pasteurella multocida* の血清型および壊死毒素産生能との関係, 第100回日獣学会講演要旨: 21.
 - 6) Namioka, S. 1978. *Pasteurella multocida*. Biochemical characteristics and serotypes. *Method in Microbiology*. **10**: 271-292.
 - 7) Namioka and Bruner, D. W., 1963. Serological studies on *Pasteurella multocida*. IV. Type distribution of organisms on the basis of their capsule and O groups. *Cornell Vet.*, **53**: 41-53.
 - 8) Namioka, S. and Murata, M., 1961. Serological studies on *Pasteurella multocida*. II. Characteristics of somatic (O) antigen of the organism. *Cornell Vet.*, **51**: 507-521.
 - 9) Prescott, J. F., Bhasin, J. L., Sanford, S. E., Binnington, B. D., Kierstead, M. E., Percy, D. H. and Nicholson, V. M., 1984. Serotypes and antimicrobial susceptibility of *Pasteurella multocida* isolated from cattle and pigs in Ontario. *Can. Vet. J.* **25**: 117-118.
 - 10) Sawata, A., Nakai, T., Tuji, M. and Kume, K. 1984. Dermonecrotic activity of *Pasteurella multocida* strains isolated from pigs in Japanese field. *Jpn. J. Vet. Sci.*, **46**: 141-148.
 - 11) 沢田拓士, 川本英一, 丸山 務, 中井豊次, 久米勝巳 1985. わが国で分離された *Pasteurella multocida* の血清型と壊死毒素産生能. 第99回日獣学会講演要旨: 173.

Summary

The attempts were made to isolate *Pasteurella multocida* from cattle, and to identify the sero-types and to examine dermonecrotic activity for guinea pigs of the isolates.

1) *P. multocida* was isolated in Hokkaido from 72 out of the 369 specimens collected from the nasal cavities of clinically healthy calves and from 11 individual gross lesions of cows affected with respiratory disease or mastitis.

2) Capsular types of these isolates were identified by indirect hemagglutination, hyaluronidase, and acriflavine tests. All 72 strains isolated from the healthy calves and 9 out of 11 strains isolated from affected cows belonged to type A. The other two strains isolated from the affected cows were classified as type D.

3) Somatic (O) types of the isolates were demonstrated by the method of Heddleston. Thirty-two of the 72 strains isolated from healthy calves, and 10 of the 11 strains from the affected cows could be classified as follows: 15 belonged to types 1, 3, 4, or 11; and the remaining 27 strains reacted with 2 or more anti-sera.

4) Two of the 11 strains isolated from the affected cows showed dermonecrotic activity for guinea pigs: the capsule type of these two strains were type D. However, none of the remaining 9 isolates from the affected cows nor any of the 72 from the healthy calves showed the same activity: the capsule type of the strains were type A.