

## ウサギ鼻腔由来 *Pasteurella multocida* の 血清型と皮膚壊死毒素産生能

大久保佳子\*・平棟孝志\*・菊池直哉\*

### Sero-types and Dermonecrotic Activity of *Pasteurella multocida* Isolates from Nares of Rabbits

Yoshiko OHKUBO\*, Takashi HIRAMUNE\*  
and Naoya KIKUCHI\*

(May, 1987)

#### 緒 言

*Pasteurella multocida* (以下 *P. multocida*) は、ウサギのスナッフルの原因菌として知られているほか、肺炎、敗血症などを起こす。通常、ウサギは保菌状態にとどまるが、飼育環境の悪化、実験操作などのストレスが誘因となって発症すると考えられている。本症の治療、予防はきわめて困難であり、実験動物施設あるいはウサギ生産者にとって深刻な疾病のひとつである<sup>4,10)</sup>。

本菌のウサギにおける保菌状況を把握し、その血清型を明らかにすることは、疫学上、また、治療、予防上、重要であると考えられる。外国では、これらに関する多くの報告がなされてきたが、日本では、Sato<sup>12)</sup>、川本<sup>6,7)</sup>の報告が見られるにすぎない。

また、*P. multocida* の皮膚壊死毒素 (以下 DNT) 産生能と血清型の関係について、わが国では、沢田<sup>13)</sup> および Sawata<sup>15)</sup> がブタ由来株で、渥美<sup>1)</sup> がうし由来株で報告しているが、ウサギから分離された株では明らかにされていない。

今回、ウサギの鼻腔から *P. multocida* の分離を試み、臨床症状の認められた群とそれの認められなかった群の間で、分離率、血清型および DNT 産生能に差があるか否かを検討したので、その概要を報告する。

\* 獣医学科、家畜伝染病学教室

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

## 材料および方法

### 1. 対象ウサギ

札幌市周辺で、おもに愛玩用として飼育されていたウサギ 187 例を対象とし、1985 年 6 月から 1986 年 5 月までの 11 カ月間に採材した。

### 2. 採材と菌分離

ウサギを保定したのち、左右の鼻腔にそれぞれ滅菌綿棒を約 1 cm 挿入、ぬぐい液を採取し、これを滅菌小試験管に入れて、当教室に持ち帰り培養に供した。採材時に、鼻汁、くしゃみ、眼結膜および鼻粘膜の充血の有無を観察、記録し、臨床症状の指標とした。

菌の分離には、5% ウマ血液加 Trypticase soy agar (TSA) (BBL, USA) にバンコマイシンを 50  $\mu\text{g/ml}$  加えた選択培地<sup>8)</sup>を使用した。材料を選択培地に直接塗抹し、37°C で 24 時間培養後、*P. multocida* と思われるコロニーを釣菌、純培養した。

### 3. 菌の同定と保存

Namioka<sup>9)</sup> の記載に従い生化学的性状を調べ、*P. multocida* と同定された菌を 10% スキムミルク培地に入れ、使用時まで -80°C に保存した。

### 4. 荚膜型

間接赤血球凝集反応 (IHA)<sup>14)</sup>、ヒアルロニダーゼテスト<sup>2)</sup>、およびアクリフラビンテスト<sup>3)</sup> の 3 つの方法により、調べた。

#### 1) IHA

菌体をヒアルロニダーゼ処理した後、加熱して抗原とした。すなわち、凍結保存してあった菌株を 5% ウマ血液加 TSA 培地に培養後、コロニーを 1 枚の Yeast extract-proteose pepton-cystine (YPC) 培地全面に接種、37°C で 18 時間培養した。これを 1 ml の PBS にかきとり、等量のヒアルロニダーゼ加 PBS (ヒアルロニダーゼ 200 U/ml) を加えて混合し、37°C、2 時間、振盪した。その後、100°C、1 時間加熱し、10,000 rpm で 20 分遠心した上清を抗原とした。

ヒツジ赤血球 0.1 ml を抗原液 2.0 ml に加え、37°C に 2 時間置いて感作した。その後、3 回遠心、洗浄し、10 ml の PBS を加え、1% 感作血球液とした。一方、抗血清 (Carter の A, B, D, E)、それぞれ 0.1 ml に PBS 0.9 ml を加えて 56°C で 30 分非働化した。この 10 倍希釈抗血清を 160 倍まで階段希釈し、各希釈 0.2 ml に感作血球液 0.2 ml を加え、37°C、2 時間感作後、さらに、室温に一夜置いて凝集の有無を判定した。

#### 2) ヒアルロニダーゼテスト

YPC 培地の中心に *Staphylococcus aureus* (北見 3-9D 株) を画線塗抹し、それと直角に

*P. multocida* を塗抹した。37°C, 24時間培養後、両菌の交差域における *P. multocida* 発育阻止がみられたものを A 型とした。

### 3) アクリフラビンテスト

5% ウマ血液加 TSA で培養した *P. multocida* を Brain heart infusion broth (BBL) 3 ml に接種し、37°C, 24時間培養したものを 3,000 rpm, 15分遠心し、菌液 0.5 ml を残して上清を捨てた。これに中性アクリフラビン 1,000 倍溶液、0.5 ml を混合し、室温に 30分静置後、綿状沈殿物の形成されたものを D 型とした。

## 5. 菌 体 型

Heddleston<sup>5)</sup> の 1-16 型の抗血清を用い、ゲル拡散沈降反応を行った。5% ウマ血液加 TSA 3 枚に菌を接種し、37°C, 24時間培養後、菌を 0.3% ホルマリン加生理食塩水 2 ml にかきとり、100°C, 1時間、加熱後、10,000 rpm 20分遠心し、上清を抗原とした。8.5% NaCl 溶液に寒天 0.9% を溶解、約 4 ml をスライドグラス上に流し固めた後、径 5 mm, 間隔 3 mm の穴をあけ、中心の穴に抗血清 (1-16 型) をそれぞれ満たし、周囲の穴に抗原を入れて 37°C, 24時間後、さらに室温に一夜静置して沈降線の有無を記録した。

## 6. DNT の抽出法

これは Sawata ら<sup>15)</sup> の方法で行った。2 枚の YPC 培地に 37°C, 18時間培養した菌を超音波処理 (海上電機 4280S 型, 3.5 A, 10分) 後、13,000 rpm, 60分遠心し、上清を 0.2 μm のフィルターで濾過して菌体を除去し、試料とした。これを使用時まで、-20°C に凍結保存した。

## 7. DNT の検出法

モルモットの腋窩および下腹部の左右 4 カ所の毛を刈り、3 カ所に供試試料を、1 カ所に陽性対照 (渥美<sup>1)</sup> らがウシから分離した DNT 陽性株) 試料をそれぞれ 0.1 ml, 皮内接種した。陰性対照として滅菌生理食塩水 0.1 ml を皮内接種した。48時間後、皮膚壊死病変が直径 5 mm 以上のものを DNT 産生陽性とした。

## 結 果

### 1. 菌 分 離

ウサギの鼻腔から *P. multocida* 分離を試みたところ、鼻汁、くしゃみなどの臨床症状を示した 153 例中 12 例 (7.8%), 臨床症状のみられなかった 34 例中の 1 例 (2.9%), 計 187 例中 13 例 (7.0%) から本菌が分離された (Table 1)。

### 2. 荚膜型別

分離された *P. multocida* の荚膜型を調べたところ、臨床症状を示したウサギ由来の 12

株中 11 株が D 型に、1 株が A 型に属した。臨床症状のみられなかった 1 例からの分離株は D 型であった。これらを合わせると分離 13 株中 12 株 (92.3%) が D 型で、A 型はわずか 1 株であった (Table 2)。

### 3. 菌体型別

分離 13 株のうち、7 株 (53.8%) が型別可能であり、他の株は型別できなかった。型別された 2 株が 3 型に属し、他の 5 株は複数の抗血清 (3, 4, 7, 12, 15 型) と交差反応を示した (Table 3)。

### 4. DNT 産生能

臨床症状を示した例から分離された 12 株のうち 7 株が本毒素を産生し、残りの 5 株と

Table 1. Isolation of *P. multocida* from rabbits

Group	Number of examined	Number of isolates	Rate of isolation (%)
Affected	153	12	7.8
Healthy	34	1	2.9

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

Group	Capsular types	
	A	D
Affected	1*	11
Healthy	0	1

\* Number of isolates.

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

Group	Dermonecrotic activity	
	+	-
Affected	7	5
Healthy	0	1

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

Group	0 types	Number of isolates
Affected	3	2
	4, 7, 15*	1
	3, 4, 7, 12, 15*	3
Healthy	3, 12, 15*	1

- 1) 6 out of 12 isolates from affected rabbits were untypable.
- 2) \* indicates cross reaction.

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

Capsular types	Dermonecrotic activity	
	+	-
A	0	1
D	7	5

臨床症状のない例から分離された1株は本毒素非産生であった (Table 4)。

### 5. DNT 産生能と莢膜型の関係

D型12株中5株が本毒素を産生したが、残りの7株およびA型の1株はこれを産生しなかった (Table 5)。

## 考 察

今回、札幌市周辺で飼育されていたウサギの鼻腔から *P. multocida* の分離を試みたところ、187例中13例 (7.0%) から本菌が分離された。この13例中、12例は鼻汁、くしゃみなどの臨床症状が認められたウサギであり、他の1例は外見上、健康であった。川本ら<sup>6)</sup>は、関東、中部、九州の実験動物施設で飼育されていたウサギ383例中、117例 (30.5%) から本菌が分離されたと報告している。今回の分離率が川本らのそれよりかなり低い理由として、採材地域、一戸あたりの飼育数などが異なるなど飼育環境の違いによるものと考えられる。

つぎに、ウサギ由来本菌の莢膜型について、Sato<sup>12)</sup>、川本ら<sup>7)</sup>の分離株はすべてA型であったとし、また、Rimlerら<sup>11)</sup>は84.2%がA型、7.2%がD型、その他は無莢膜株であったと述べている。これに反し、今回の分離株のほとんどがD型であった。これは、採材地域、症状の程度などの違いによると考えられるが、今後さらに検討する必要がある。

*P. multocida* の菌体型に関し、Rimlerら<sup>11)</sup>は分離株すべてが、また、川本ら<sup>7)</sup>は、分離株の96.6%が、菌体型別されたと述べている。今回の分離株の型別率は53.8%であり、他の報告よりも菌体型別率が低い理由は不明である。型別された7株のうち、単一の型に分類されたのは2株のみで、他の5株は3から5種類の抗血清と交差反応を示した。最も多い菌体型は3型で、この他に4, 7, 12, および15型が見られた。川本ら<sup>7)</sup>、およびRimlerら<sup>11)</sup>の成績では、ともに12型が最も多く、その他、3, 4, 7, および15型も認められたと述べている。これらのことから、菌体型には、地域による大きな差はないと思われる。

ところで、Rimlerら<sup>11)</sup>は、ウサギ由来 *P. multocida* のDNT産生株がすべて莢膜D型に属したという。渥美ら<sup>1)</sup>のウシにおける報告、沢田ら<sup>13)</sup>、およびSawataら<sup>15)</sup>のブタでの報告でも同様なことが認められている。また、沢田ら<sup>13)</sup>は、A型でDNTを産生する株が少数認められたと述べている。今回の成績では、臨床症状の認められたウサギから本菌の分離率が高く、分離株のほとんどがD型に属し、その半分以上がDNT産生株であった。

以上のことから、莢膜D型とDNT産生能には深い関連性があることがウサギ由来 *P. multocida* においても明らかになった。

## 要 約

札幌市周辺で、おもに愛玩用として飼育されていたウサギ187例の鼻腔から*P. multocida*の分離を試み、その莢膜型と菌体型および皮膚壊死毒素産生能を調べた。

1. 鼻汁、くしゃみなどの臨床症状を示した153例中12例(7.8%)、外見上健康な34例中1例(2.9%)、計13例(7.0%)から*P. multocida*が分離された。
2. 分離菌の莢膜型は13株中12株がD型に属し、A型はわずか1株であった。
3. 分離13株中7株(53.8%)が菌体型別可能であり、2株が3型に属し、他の5株は複数の抗血清と反応を示した。
4. 莢膜型D型に属した12株中、7株にDNT産生能が認められた。

## 文 献

- 1) 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, 1986. 牛から分離された*Pasteurella multocida*の血清型と皮膚壊死毒素産生能. 酪農学園大学紀要, 11: 349-354.
- 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) 藤原公策, 1984. 実験動物のパスツレラ症. 獣医伝染病学, 第二版, (笹原二郎他 編), 519-521, 近代出版, 東京.
- 5) 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.
- 6) 川本英一・丸山 務, 1983. 実験用ウサギにおける*Pasteurella multocida*の保菌実態と分離菌株の性状について. 第96回日本獣医学会講演要旨集, 174.
- 7) 川本英一・沢田拓士・丸山 務, 1985. 我が国で分離されたウサギならびに飼育環境由来*Pasteurella multocida*の血清型 第100回日本獣医学会講演要旨集, 204.
- 8) 丸山 務・神崎政子・村上 一, 1982. *Pasteurella multocida*の選択的分離法について, 第93回日本獣医学会講演要旨集. 195.
- 9) Namioka, S., 1978. *Pasteurella multocida*. Biochemical characteristics and serotypes. Method in Microbiology., 10: 271-292.
- 10) 松沼尚史, 1985. ウサギのパスツレラ病. 実験動物感染病学, (藤原公策編), 73-78. ソフトサイエンス社, 東京.
- 11) Rimler, R. B. and Brogden, K. A., 1986. *Pasteurella multocida* isolated from rabbits and swine: serologic types and toxin production. Amer. J. Vet. Res., 15: 159-164.
- 12) Sato, G., Sato, A. and Namioka, S., 1976. *Pasteurella multocida* serotype 1: A associated with respiratory infection of domestic rabbits in a holding colony. Jpn. J. Vet. Res., 15: 159-164.
- 13) 沢田拓士・川本英一・丸山 務・中井豊次・久米勝巳, 1985. 我が国で分離された豚由来*P. multocida*の血清型と壊死毒素産生能. 第93回日本獣医学会講演要旨集, 173.
- 14) Sawada, T., Rimler, R. B. and Rhoades, K. R., 1982. Indirect hemagglutination test that

uses glutaraldehyde-fixed sheep erythrocytes sensitized with extract antigens for detection of *Pasteurella multocida* antibody. J. Clin. Microbiol., 15: 752-756.

- 15) 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.

### Summary

*Pasteurella multocida* strains isolated from rabbits raised in and around Sapporo city were examined to determine their serological types and dermonecrotic activity (DNT).

1. *P. multocida* was isolated from 12 out of 153 rabbits with clinical signs and from 1 out of 34 apparently healthy rabbits.

2. Eleven out of 12 isolates from rabbits with clinical signs and one isolate from apparently healthy rabbit belonged to capsular type D. One strain isolated from affected rabbit was classified as type A.

3. Somatic (0) types of the isolates were examined by the method of Heddleston. Seven out of 13 isolates could be classified 0 types: 2 strains belonged to type 3; the remaining 5 reacted with three or more anti-sera.

4. Seven out of the 12 isolates from affected rabbits showed DNT activity for guinea pigs: the capsular type of these seven strains was type D. No activity was observed in the remaining 5 and one isolate from apparently healthy rabbit: the capsular types of these DNT negative strains were type D and A.