

7 本県における *Mannheimia* 属菌の遺伝子検査による同定方法の検討

中央家畜保健衛生所

前田 将誌

Mannheimia 属菌には現在少なくとも *M. haemolytica* (Mh)、*M. varigena* (Mv)、*M. granulomatis* (Mgr)、*M. glucosida* (Mgl)、*M. ruminantis* (Mr) の5菌種が存在し、Mh、Mv、Mgrの3菌種で牛への病原性が確認されている。Mhは牛マンヘミア症の原因菌で、莢膜抗原の違いにより12種類の血清型に分類され、国内では1、2、6型が主流となっている¹⁾。Mvは肺炎、壊死性腸炎、敗血症、乳房炎、化膿性髄膜炎の原因菌とされており、Mgrは鼻部や舌に好酸球性肉芽腫を形成した事例や潜在性乳房炎、口腔膿瘍、化膿性気管支肺炎からの分離事例がある。一方、Mgl、Mrの2菌種についての病原性は不明で、家畜の上部気道やルーメン等の常在菌と考えられている²⁾。

これら5菌種は市販の生化学性状検査キット(キット)では全てMhもしくはMh Complex(Mh等)と判定され、*Mannheimia* 属菌の菌種を正確に同定できない。また、本県において *Mannheimia* 属菌の同定がされておらず、県内の *Mannheimia* 属菌による影響を正しく評価できていない。そこで今回、*Mannheimia* 属菌について、生化学性状並びに遺伝子検査による同定方法を検討するとともに、国内で分離報告が多いMh血清型1、2、6型の遺伝子検査による型別方法を検討したのでその概要を報告する。

1 材料及び方法

材料：平成30年11月～令和6年1月に県内の病性鑑定牛から分離されキットでMh等と判定された14株を用いた(表-1)。

表-1 材料

番号	事例番号	採材年月	地域	主徴	分離部位	使用キット	判定結果
1	1	H30.11	県央	呼吸器症状	肺	IDテスト	Mh Complex
2	2	H31.4	五豊	呼吸器症状	肺	Api2ONE	Mh
3	3	H31.4	五豊	呼吸器症状	肺	Api2ONE	Mh
4	4	H31.4	県南	発熱	肺	IDテスト	Mh Complex
5	5	R1.5	県央	哺乳子牛の急死	心臓	Api2ONE	Mh
6					肺	Api2ONE	Mh
7					肝臓	Api2ONE	Mh
8					脾臓	Api2ONE	Mh
9					腎臓	Api2ONE	Mh
10					腹水	Api2ONE	Mh
11	6	R3.3	県北	呼吸器症状	肺	IDテスト	Mh Complex
12	7	R5.5	県北	呼吸器症状	肺	IDテスト	Mh Complex
13	8	R6.1	県央	急死	肺	Api2ONE	Mh
14					肺Ln	Api2ONE	Mh

方法：①生化学性状検査：溶血性、ソルビトール、アラビノース、エスクリン検査を実施し、5菌種の判定基準と照合し、菌種を再同定した(図-1)。

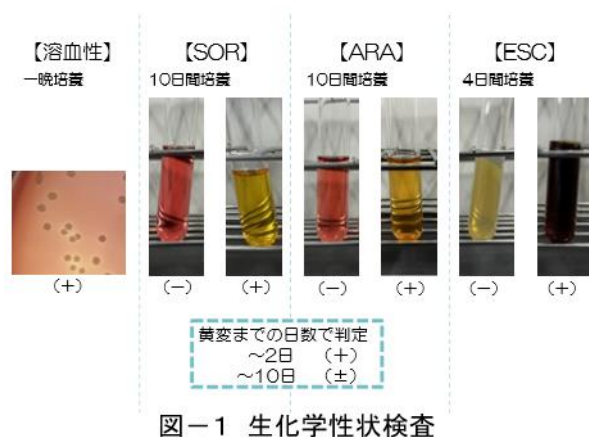


図-1 生化学性状検査

②遺伝子検査：Mh、Mgl、Mrを識別可能なPCR検査(Alexanderら、平成20年)及びMv、Mgrを識別可能なPCR検査(勝田ら、平成28年)を実施した^{3)、4)}。

③Mh血清型1、2、6型の型別：Mh血清型1、2、6型を識別するPCR検査(Klimaら、平成29年)により分類した⁵⁾。

2 成績

①生化学性状検査：14 株中 5 株が Mh、8 株が Mv、1 株が Mgl と同定された（表－2）。

表－2 生化学性状検査による同定結果

番号	事例番号	採材年月	地域	主徴	分離部位	生化学性状分析				菌種
						溶血性	SOR	ARA	ESC	
1	1	H30.11	県央	呼吸器症状	肺	+	+	—	+	Mgl
2	2	H31.4	五島	呼吸器症状	肺	+	+	—	—	Mh
3	3	H31.4	五島	呼吸器症状	肺	+	+	—	—	Mh
4	4	H31.4	県南	発熱	肺	+	+	—	—	Mh
5	5	R1.5	県央	哺乳子牛の急死	心臓	+	—	+	—	Mv
6					肺	+	—	+	—	Mv
7					肝臓	+	—	+	—	Mv
8					脾臓	+	—	+	—	Mv
9					腎臓	+	—	+	—	Mv
10					腹水	+	—	+	—	Mv
11	6	R3.3	県北	呼吸器症状	肺	+	+	—	—	Mh
12	7	R5.5	県北	呼吸器症状	肺	+	+	—	—	Mh
13	8	R6.1	県央	急死	肺	+	—	+	—	Mv
14					肺Ln	+	—	+	—	Mv

②遺伝子検査：14 株中 5 株が Mh、8 株が Mv、1 株が Mgl と同定され、生化学性状検査による同定結果と一致していた。なお、各株間で非特異反応は認められなかった（表－3、4）。

表－3 Mh、Mgl、Mr同定PCR結果

番号	事例番号	採材年月	地域	主徴	分離部位	PCR結果				菌種
						16S	Ukt	Ukt2	HP	
1	1	H30.11	県央	呼吸器症状	肺	+	+	+	+	Mgl
2	2	H31.4	五島	呼吸器症状	肺	+	—	+	+	Mh
3	3	H31.4	五島	呼吸器症状	肺	+	—	+	+	Mh
4	4	H31.4	県南	発熱	肺	+	—	+	+	Mh
5	5	R1.5	県央	哺乳子牛の急死	心臓	+	—	—	—	Mv
6					肺	+	—	—	—	Mv
7					肝臓	+	—	—	—	Mv
8					脾臓	+	—	—	—	Mv
9					腎臓	+	—	—	—	Mv
10					腹水	+	—	—	—	Mv
11	6	R3.3	県北	呼吸器症状	肺	+	—	+	+	Mh
12	7	R5.5	県北	呼吸器症状	肺	+	—	+	+	Mh
13	8	R6.1	県央	急死	肺	+	—	—	—	Mv
14					肺Ln	+	—	—	—	Mv

※ 判定不能

表－4 Mv、Mgl同定PCR結果

番号	事例番号	採材年月	地域	主徴	分離部位	PCR結果			菌種
						Mv	Mgl	PCR	
1	1	H30.11	県央	呼吸器症状	肺	—	—	※	Mgl
2	2	H31.4	五島	呼吸器症状	肺	—	—	※	Mh
3	3	H31.4	五島	呼吸器症状	肺	—	—	※	Mh
4	4	H31.4	県南	発熱	肺	—	—	※	Mh
5	5	R1.5	県央	哺乳子牛の急死	心臓	+	—	Mv	Mv
6					肺	+	—	Mv	Mv
7					肝臓	+	—	Mv	Mv
8					脾臓	+	—	Mv	Mv
9					腎臓	+	—	Mv	Mv
10					腹水	+	—	Mv	Mv
11	6	R3.3	県北	呼吸器症状	肺	—	—	※	Mh
12	7	R5.5	県北	呼吸器症状	肺	—	—	※	Mh
13	8	R6.1	県央	急死	肺	+	—	Mv	Mv
14					肺Ln	+	—	Mv	Mv

※ 判定不能

③Mh 血清型 1、2、6 型の型別：Mh と同定された 5 株は 1 型が 1 株、2 型が 2 株、6 型が 2 株であった。なお、Mgl、Mv と同定された 9 株では陽性反応は認められなかった（表－5）。

表－5 Mh血清型別PCR結果

番号	事例番号	採材年月	地域	主徴	分離部位	菌種	血清型
1	1	H30.11	県央	呼吸器症状	肺	Mgl	※
2	2	H31.4	五島	呼吸器症状	肺	Mh	6型
3	3	H31.4	五島	呼吸器症状	肺	Mh	6型
4	4	H31.4	県南	発熱	肺	Mh	1型
5	5	R1.5	県央	哺乳子牛の急死	心臓	Mv	※
6					肺	Mv	※
7					肝臓	Mv	※
8					脾臓	Mv	※
9					腎臓	Mv	※
10					腹水	Mv	※
11	6	R3.3	県北	呼吸器症状	肺	Mh	2型
12	7	R5.5	県北	呼吸器症状	肺	Mh	2型
13	8	R6.1	県央	急死	肺	Mv	※
14					肺Ln	Mv	※

※ 判定不能

3 まとめ及び考察

今回、過去に Mh 等と判定されていた 14 株の再同定を行った結果、Mh が 5 株、Mv が 8 株、Mgl が 1 株と同定された。また、生化学性状による同定結果と遺伝子検査による同定結果は一致していた。Mh 血清型別については、主要血清型 3 種とも浸潤していることがわかった。この内、Mh 血清型 6 型については他の血清型に比較して薬剤耐性菌の分離割合が高く、また、多剤耐性を示す株の割合も高い傾向にあるとの報告があり、今後の動向に注意が必要と考える⁶⁾。遺伝子検査による同定法は生化学性状検査による同定と比較し、より早く判断が可能である。一方、今回、検査に供した検体数が少ないため、地域的特徴等の県内の傾向については今後もデータの蓄積が必要と考えられることから、今後も積極的に検査を行い、本県における *Mannheimia* 属菌の動向の把握に努めたい。

4 参考文献

- 1) 勝田 賢：牛のパスツレラ症 明石 博臣ら（編）牛病学 第 3 版 近代出版： pp.267 - 270 (2013)
- 2) 勝田 賢ら：牛から分離される *Mannheimia* 属菌の野外実態と生化学的性状について：The Journal of Farm Animal in Infectious Disease Vol.4 No.3 (2015)
- 3) Alexander T.W.et al.:A multiplex polymerase chain reaction assay for the identification of *Mannheimia haemolytica*, *Mannheimia glucosida* and *Mannheimia*

ruminalis: Vet. Microbiol. 130:165-175
(2008).

4) 勝田 賢ら：牛から分離される *Mannheimia*
属菌の PCR による同定法の確立:The Journal of
Farm Animal in Infectious Disease Vol.5 No.3
(2016)

5) Cassidy L. Klima et. al.: A multiplex PCR
assay for molecular capsular serotyping of
Mannheimia haemolytica serotypes 1, 2, and 6:
Journal of Microbiological Methods
139 ,155-160 (2017)

6) 勝田 賢：牛呼吸器主要原因菌 *Mannheimia*
haemolytica の薬剤感受性について:Journal of
Japanese Society for Clinical Infectious
Disease in Farm Animals Vol.5 No.2 (2010)