

11 県営牧場における呼吸器病起因菌のモニタリング調査 及び分子疫学的解析

中央家畜保健衛生所

○石原 径佳・中井 悠華

I はじめに

県営牧場の秩父高原牧場では、2014 年度から「埼玉の肉牛を守り・育てる生産構造転換事業」を開始した。この事業は、県内酪農家から預託されている乳用育成牛に、和牛受精卵を移植し、その後、酪農家で分娩された和牛子牛を、3～5 日齢で買取り、牧場で 9 か月齢まで育成し、県内の肉用牛農家へ供給する事業で、埼玉県産の肉用牛の増頭を目標としている（図 1）。

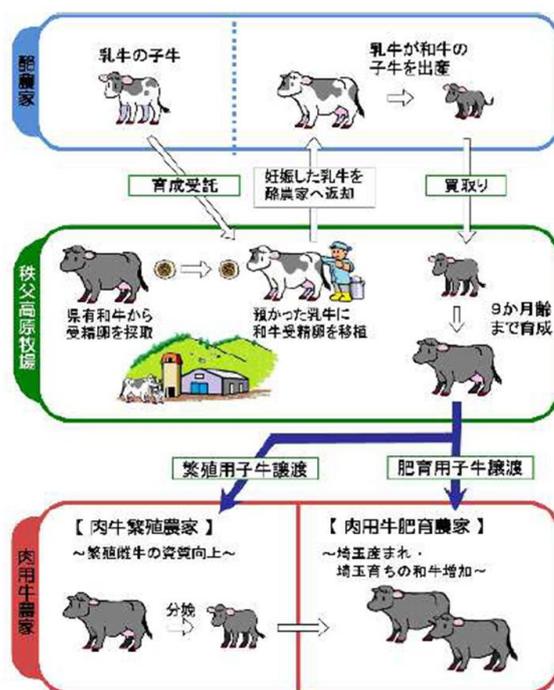


図 1 埼玉の肉牛を守り・育てる生産構造転換事業

事業開始に伴い、2015 年から当該牧場で新たに新生子牛の飼養を開始したが、出生直後の飼養場所の変化や慣れない群飼育などにより、呼吸器疾患が多発した。子牛の呼吸器疾患は、成牛に比べ病態の進行が早く、死産による直接的な損失に加え、発育不良や飼料効率の低下に伴う肉質の低下や繁殖への供用遅延といった間接的な損失も大きい。そのため、生産現場では下痢症とともに経済的被害の大きな疾病である¹⁾。そこで、呼吸器病の予防と発症時の早期治療の参考にするために、牛で代表的な呼吸器病起因

菌である *Pasteuralla multocida* (Pm) 及び *Mannheimia haemolytica* (Mh) の保菌状況調査と薬剤感受性試験を実施した。また、牧場内での伝播様式について調査する為、遺伝子解析手法であるパルスフィールドゲル電気泳動 (pulsed-field gel electrophoresis ; PFGE) による分子疫学的解析を実施したので、その概要を報告する。

II 材料と方法

1 材料

2015、2016 年度の間に、県内 28 農家から買取りした子牛のうち健康牛 77 頭、呼吸器病発症牛 18 頭の鼻腔スワブを用いた。鼻腔スワブは、約 1 か月齢時点、及び呼吸器症状が認められた時点 (約 1~6 か月齢) で採材した。

2 方法

細菌学的検査は、5%羊血液加コロンビア寒天培地 (37℃・48 時間・5%CO₂ 培養) 及び DHL 寒天培地 (37℃・24 時間・好気培養) で分離培養を実施した。分離菌はグラム染色、カタラーゼ及びオキシターゼ試験を実施後、Pm は簡易同定キット (ID テスト・HN-20 ラピッド「ニッスイ」; 日水製薬株式会社)、Mh は前述の簡易同定キット及び PCR²⁾ により同定した。分離菌の薬剤感受性試験は、牧場で使用頻度の高い薬剤を中心に、ペニシリン(PCG)、アンピシリン(ABPC)、カナマイシン(KM)、ストレプトマイシン(SM)、オキシテトラサイクリン(OTC)、ホスホマイシン(FOM)、クロラムフェニコール(CP)、(以上 7 薬剤: センシディスク、日本ベクトンディッキンソン) エンロフロキサシン(ERFX) (VKB ディスク、栄研) の 8 薬剤を一濃度ディスク拡散法で実施した。さらに、PCR³⁾による Pm の莢膜型別、ウサギ免疫血清を用いたスライド凝集反応による Mh の血清型別を実施した。また、Pm と Mh の PFGE による分子疫学的解析を実施した^{4,5)}。

III 結果

月別の検査頭数は、春と秋に多く、呼吸器病発症牛は、11 月か 5 月の寒冷期に認められた (図 2)。

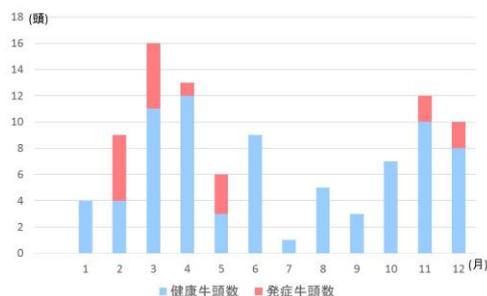


図 2 月別検査頭数内訳

1 分離頭数と分離率

健康牛 77 頭のうち、Pm は 18 頭 (23%)、Mh は 4 頭 (5%) から分離された。このうち 1 頭からは両菌が分離された。呼吸器病発症牛 18 頭のうち、Pm は 9 頭 (50%)、Mh は 2 頭 (11%) から分離された (図 3)。

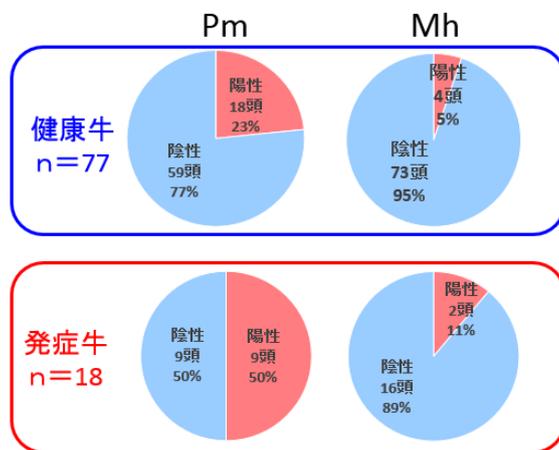


図 3 Pm と Mh の分離頭数と分離率

2 薬剤感受性試験成績

分離された Pm27 株のうち、健康牛から分離された Pm は、PCG、SM、OTC の 3 剤に耐性が認められ、発症牛から分離された Pm は、ABPC、KM、SM、OTC の 4 剤に耐性が認められた。分離された Mh6 株のうち、健康牛から分離された Mh は、SM に耐性が認められ、発症牛から分離された Mh は、KM と SM の 2 剤に耐性が認められた。一方全株が、FOM、CP、ERFX 感受性を示した (図 4)。

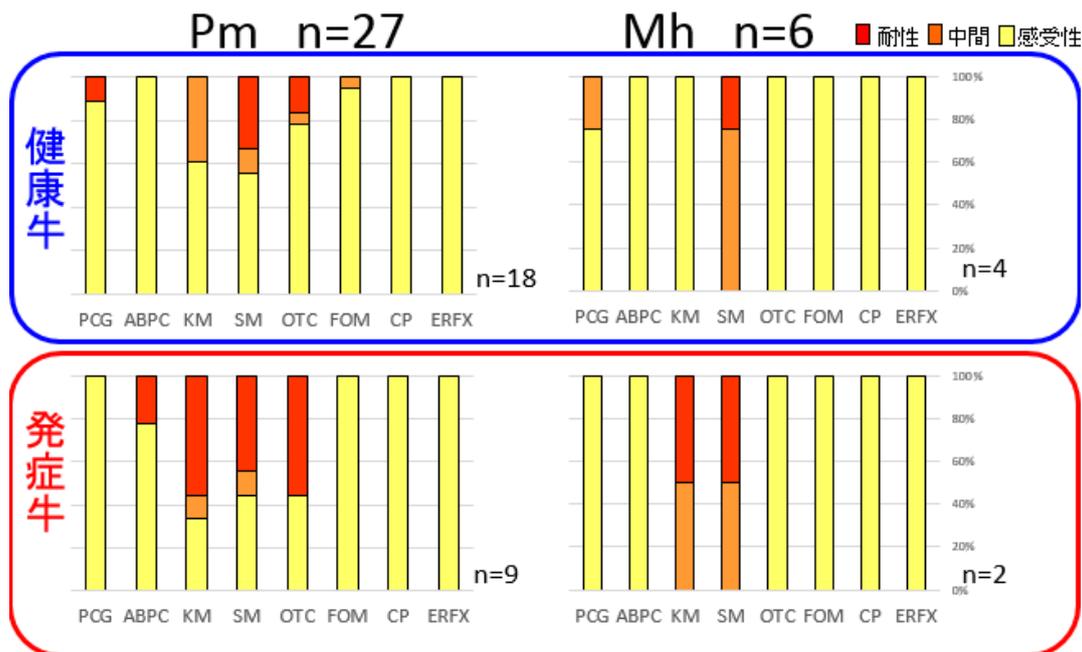


図 4 薬剤感受性試験成績

Pm の薬剤耐性パターンは、健康牛で耐性のなかった株が 67%、1 薬剤以上に耐性の株が 33%であり、耐性薬剤の組合せは、SM を含むものが 6 株認められた。一方、発症牛で耐性のなかった株は 11%、1 薬剤以上に耐性の株が 89%であり、耐性薬剤の組合せは、KM、SM 又は OTC を含むものが 8 株認められた (図 5)。

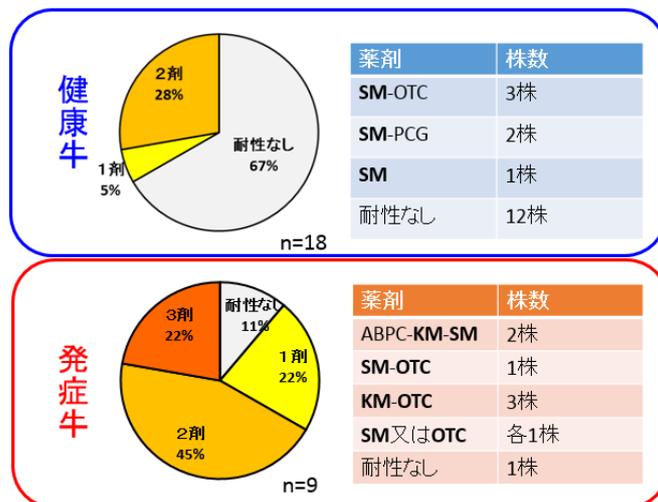


図 5 Pm の薬剤感受性試験成績

Mh の薬剤耐性パターンは、健康牛で耐性のなかった株が 75%、PCG に耐性の株が 25%であった。発症牛で耐性のなかった株は 50%、SM に耐性の株が 50%であった (図 6)。

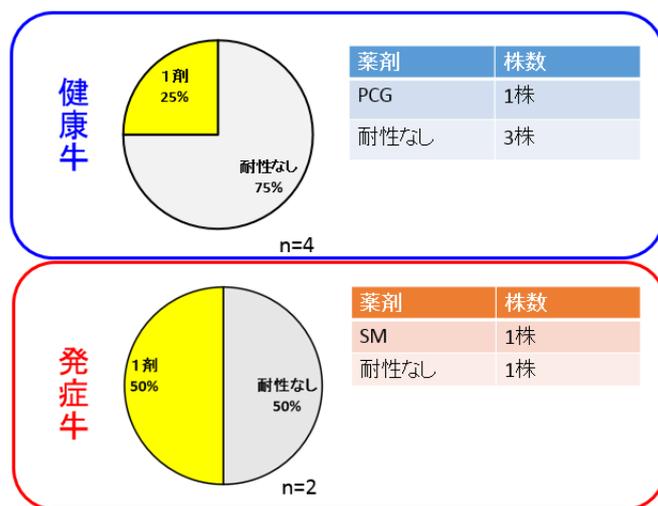


図 6 Mh の薬剤感受性試験成績

3 Pm の莢膜型別と PFGE の結果

分離された 27 株全てが莢膜型 A 型に分類された。PFGE では、8 つのバンドパターンに分類され、さらに 4 つのクレードに分類された (図 7)。同じ個体が 4 か月間同一バンドパターンの株を保菌 (個体名 1528 と 1526)、異なる農場由来産子が、同じ採材日に、同一バンドパターンの株を保菌 (個体名 1635 と 1636、1532 と 1533、1626

と 1628)、採材日は同じだが、異なるクレードに分類される株を保菌（採材年月 2016 年 2 月、3 月、6 月、12 月）している場合が認められた。

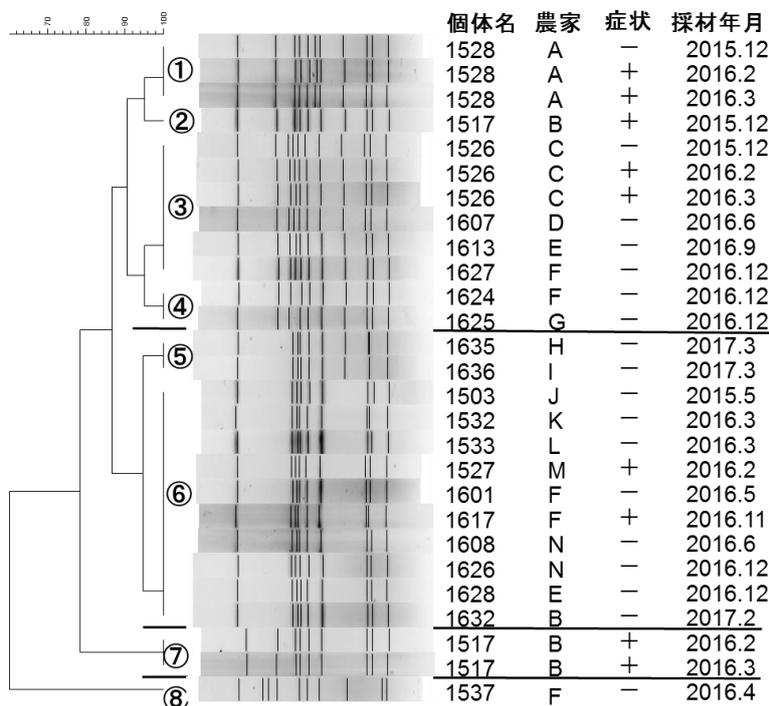


図 7 Pm の PFGE 結果

4 Mh の血清型別と PFGE 結果

分離された 6 株は、5 株が血清型 1 型、1 株が血清型 2 型に分類された。PFGE では、3 つのバンドパターンに分類された（図 8）。同じ個体が 2 か月間同一バンドパターンの株を保菌（個体名 1523）、異なる農場由来産子が、同じ採材日に、同一バンドパターンの株を保菌（個体名 1523 と 1527）、採材日は同じだが、異なるバンドパターンと異なる血清型に分類される株を保菌（採材年月 2015 年 12 月）している場合が認められた。



図 8 Mh の PFGE 結果

IV まとめと考察

当該牧場では、呼吸器病発症牛は主に寒冷期に認められ、保菌状況調査から、健康牛及び呼吸器病発症牛の鼻腔スワブから Pm27 株と Mh6 株が分離された。また、寒さなどのストレスにより、上部気道に常在する Pm と Mh が、呼吸器病発症の一因になっている可能性が示唆された。

薬剤感受性試験では、Pm は KM・SM・OTC、Mh は KM・SM の組合せに耐性が認められたが、分離された全株が、FOM、CP、ERFX には感受性を示した。また、健康牛と比べ、呼吸器病発症牛の方が、耐性率が高い傾向にあった。これらは、個体によって治療歴は異なるものの、呼吸器病発症牛に、PCG 系や PCG と SM の合剤などの薬剤を使用する機会が多いことが影響している可能性があると考えられた。また、呼吸器病が発生した場合の治療には、薬剤感受性試験に基づく適切な薬剤の使用が望ましいが、緊急を要する場合などは、今回の結果を基に、全株で感受性が認められた薬剤の使用を考慮する必要がある。

国内の牛由来 Pm 分離菌株は、呼吸器症状の有無に関わらず、ほとんどが莢膜型 A 型に分類され⁶⁾、今回分離された Pm27 株も全て莢膜型 A 型に分類された。また、牛から分離される Mh の主要な血清型は、1、2、6 型とされ⁷⁾、今回分離された Mh の血清型は、1 型と 2 型に分類された。

Pm の PFGE では、8 つのバンドパターンに分類され、さらに 4 つのクレードに分類された。各クレード間では、4 本以上のバンドの差異があり、これは遺伝子上に 2 つ以上の変異があることを示し、各クレード間で由来が異なるといえる。また、Mh の PFGE では 3 つのバンドパターンに分類された。両菌ともに、同じ個体が数か月間同一バンドパターンの株を保菌していたことから、同じタイプの株を数か月に渡り保菌し続けることが確認された。また、異なる農場由来産子が、同一バンドパターンの株を保菌していたことから、採材までの間に、農場内で水平伝播している可能性が考えられた。さらに、採材日は同じだが、異なるクレードや血清型に分類される株を保菌していたことから、各農家から様々なタイプの株が侵入している可能性が考えられた。

呼吸器病の予防には、「入れない」「広げない」対策が重要だが、様々な農家から買取りを実施している当牧場では、「入れない」対策は難しい。そのため、既に実施している買取り後の隔離飼育や消毒、ワクチン接種などによる「広げない」対策が重要と考えられた。

今度も継続的なモニタリングを実施し、呼吸器病起因菌の保菌状況を把握していく。

V 謝辞

Pm の莢膜型別、Mh の血清型別、及び両菌の PFGE を実施していただいた国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構 動物衛生研究部門 勝田賢先生、上野

勇一先生に深謝いたします。

VI 参考文献

- 1) 佐藤礼一郎 : 子牛の呼吸器疾患の診断、治療、予防に関する全国アンケート.
家畜感染症学会誌. 1,(2).71-81 (2012)
- 2) 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)
- 3) Townsend, K.M., et al : Genetic organization of *Pasteurella multocida* cap
Loci and development of a multiplex capsular PCR typing system.J Clin.
Microbiol. 39, 924-929 (2001)
- 4) Sthitmatee, N., et al : Molecular epidemiology of Japanese avian
Pasteurella multocida strains by the single-enzyme amplified fragment
length polymorphism and pulsed-field gel electrophoresis. J. vet. Med. Sci.
72, (11), :1465-1470 (2010).
- 5) Katsuda, K. et al : Molecular typing of *Mannheimia (Pasteurella)*
haemolytica serotype A1 isolates from cattle in Japan. Epidemiol. Infect.
131, (2) : 939-946. (2003)
- 6) 波岡茂郎 : 獣医微生物学, 第 1 版, 養賢堂, 309-315. (1964)
- 7) 勝田賢 : 牛呼吸器主要病原菌 *Mannheimia haemolytica* の薬剤感受性試験に
ついて : 日本家畜臨床感染症研究会誌. 5,(2). : 33-39. (2010)