

【短 報】 ブロイラーから分離された *Mannheimia haemolytica* 様菌

家畜衛生試験場

○太野垣陽一 荒木 美穂

北部家畜保健衛生所

安里 仁

中央家畜保健衛生所

津波 修

2008年8月、沖縄本島北部のブロイラー A、B 及び C の 3 農場において、沈うつ、発育不良等を主徴とし、死亡鶏が増加する症例が発生した(図 1)。

を試みるとともに、簡易な同定法についての検討を行った。

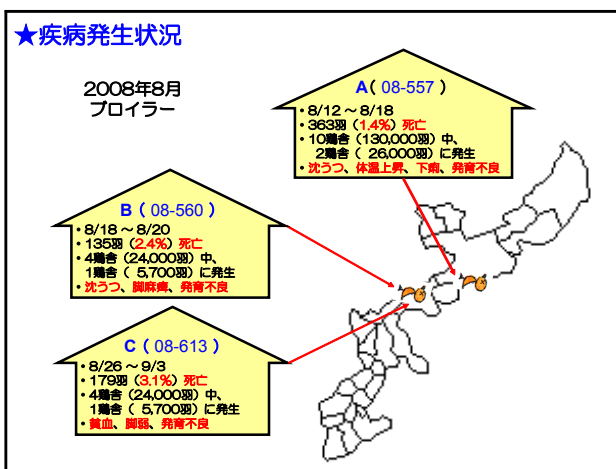


図 1. 疾病発生状況

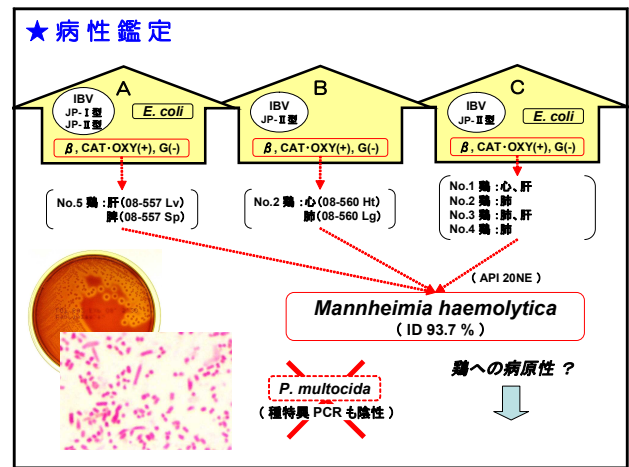


図 2. 病性鑑定

各症例の発症鶏の病性鑑定の結果、A 農場からは JP-I 型及び II 型の伝染性気管支炎(以下「IB」という。)ウイルスと大腸菌が、B 農場からは JP-II 型の IB ウイルスが、C 農場からは JP-II 型の IB ウイルスと大腸菌が分離された。3 症例とも IB と診断されたが、いずれの症例からも β 溶血、カタラーゼ陽性、オキシダーゼ陽性を示し、簡易キット API20NE (シスメックス・バイオメュー社)により ID93.7%で *Mannheimia haemolytica* (以下「Mh」という。)と同定されるグラム陰性多形性桿菌(以下「被検菌」という。)も分離された。被検菌は生化学性状及び種特異 PCR により *Pasteurella multocida* は否定された(図 2)。

表 1. 病変と分離微生物

農場	個体	心	気管	肺	肝	腎	脾	腸	CFU	クロアツク
08-557	1	心外膜炎	-	-	皮膚炎	-	-	腸膜炎	++++	-
	2	-	(JP I型)	-	-	-	-	腸膜炎	+	-
	3	心外膜炎	-	(JP I型)	-	腸炎	-	腸膜炎	+++	(JP I型)
	4	-	(JP II型)	-	腎臓壊死	-	-	-	*	-
	5	心外膜炎	-	気管支炎	皮膚炎	-	-	腸膜炎	++++	-
08-560	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	腸死壊死	-	-	-	-	-
	3	-	-	-	-	-	-	-	+++	-
	4	-	-	-	-	-	-	胃炎?	+++	-
	5	心外膜炎	-	肉芽腫(1部)	-	-	-	胃炎?	+++	-
08-613	1	心外膜炎	-	肺炎	腸膜炎	-	-	腸膜炎	+++	-
	2	心外膜炎	-	肺炎	腸膜炎	-	-	腸膜炎	-	(JP II型)
	3	心外膜炎	-	-	-	-	-	腸膜炎	-	-
	4	心外膜炎	気管炎?	-	腸膜炎	腸管肝炎	-	-	腸膜炎	+++
	5	心外膜炎	-	肺炎?	-	-	-	-	腸膜炎	++

病理組織所見により大腸菌以外に被検菌の関与も疑われたが(表 1)、Mh による鶏の疾病報告は見当たらないことと、1950 年頃から生化学性状が Mh に類似する、いわゆる「Mh 様菌」が分離された鳥類の疾病報告(図 3)があることから、菌種同定に用いられる 16S rRNA 遺伝子の塩基配列解析により被検菌 4 株の同定

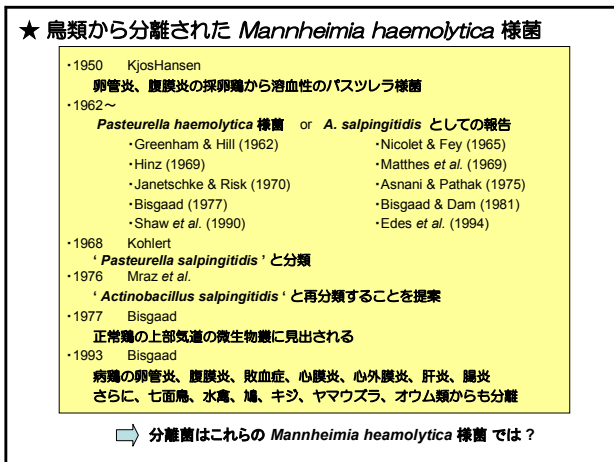


図 3. 鳥類から分離された *Mannheimia haemolytica* 様菌

【材料及び方法】

A 農場 No.5 鶏の肝由来株 (08-557 Lv)、脾由来株 (08-557 Sp)、B 農場 No.2 鶏の心由来株 (08-560 Ht) 及び肺由来株 (08-560 Lg) の 4 株の DNA を、InstaGene Matrix (BIO-RAD 社) を用いて抽出。産物領域が重複した 2 組のプライマーを用いて 16S rRNA 遺伝子領域をそれぞれ増幅 (図 4)。

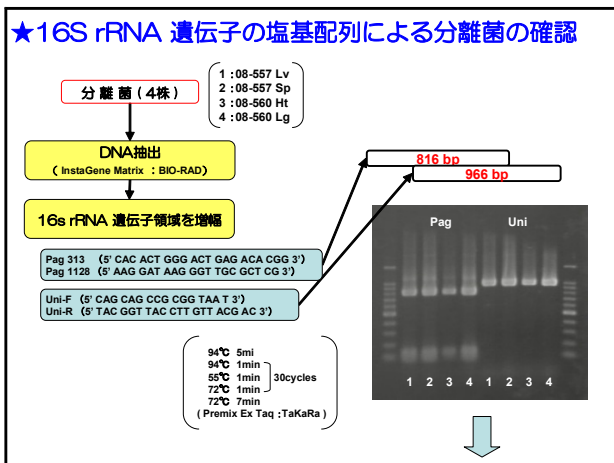


図 4. 16S rRNA 遺伝子塩基配列による被検菌の確認

PCR 産物を 2%アガロースゲルで電気泳動後、目的バンド (816bp、966bp) を切り出し、Gel-M Gel Extraction System (VIOGENE 社) を用いて DNA を精製。4 株 × 2 組のプライマー計 8 本の精製 DNA の両鎖解析を北海道システムサイエンス社に依頼。遺伝情報解析ソフトウェアを用いて株ごとに塩基配列を決定後、4 株の塩基配列を比較した (図 5)。

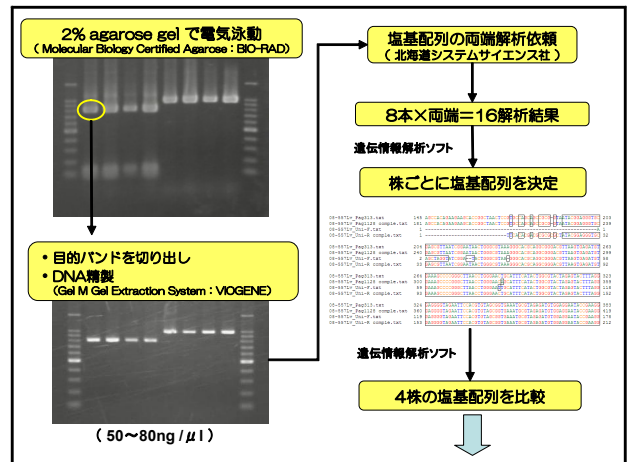


図 5. 被検菌の DNA 精製と塩基配列解析

DNA Data Bank of Japan (以下「DDBJ」という。)の BLAST により被検菌と既知菌種との DNA 相同性解析を行った後、系統樹解析のためパスツレラ細菌の中から主な病原菌 17 種を選抜し (以下「選抜菌」という。表 2)、被検菌と GenBank に登録されている選抜菌の基準株の 16S rRNA 遺伝子塩基配列を用いて、DDBJ の ClustalW 及び TreeView により系統樹解析を行った。

表 2. 選抜したパスツレラ科の主な病原菌

比較のため、パスツレラ科細菌の中から主な病原菌を選抜

属	種	変種	牛	豚	鳥	病原性	主な疾病
<i>Actinobacillus</i>	<i>lignierei</i>		●			●	類放線菌症 (水舌)
	<i>pleuropneumoniae</i>			●		●	豚胸膜肺炎
	<i>suis</i>			●		●	アグチナバチルス症
<i>Avibacterium</i>	<i>gallinarum</i>				△		
	<i>avium</i>			△	△		
	<i>paragallinarum</i>				●	●	伝染性コリーザ
	<i>volantium</i>				△		
<i>Bibersteinia</i>	<i>trehalosi</i>		●				パスツレラ症
<i>Gallibacterium</i>	<i>anatis</i>				?		
	<i>melopitacti</i>				?		
	<i>salpingitidis</i>				?		
	<i>trehalosefermentans</i>				?		
<i>Haemophilus</i>	<i>influenzae</i>					[人]	髄膜炎など
	<i>parasuis</i>			●			グレーサー病
<i>Histophilus</i>	<i>somni</i>		●				ヒストフィルス・ソムニ感染症
<i>Mannheimia</i>	<i>haemolytica</i>		●				パスツレラ (マンヘミア) 症
<i>Pasteurella</i>	<i>multocida</i>	<i>salicida</i>	●	●	●		パスツレラ症、【豚】養豚性肺炎
		<i>multocida</i>					
		<i>septica</i>					

また、今後同様の症例に遭遇した際の参考とするため、被検菌と選抜菌の生化学性状を比較することにより、簡易同定キットを用いて被検菌が同定できるか試みるとともに、市販の薬剤感受性ディスクを用いて一濃度ディスク法により、23 薬剤に対する被検菌の感受性を調べた。

【成績及び考察】

被検菌 4 株から得られた 16S rRNA 遺伝子の塩基配列は 988bp が 100%一致し、同一菌種と考えられた

(図6)。

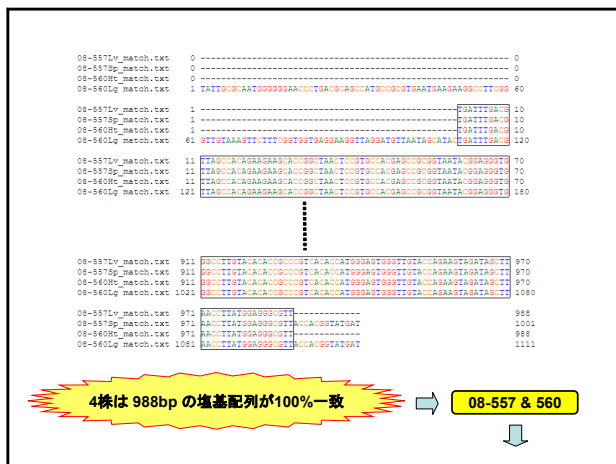


図6. 被検菌4株の塩基配列比較

被検菌4株から得られた共通の塩基配列08-557&560と既知菌種とのDNA相同性は *Gallibacterium anatis* (以下「Ga」という。)が99.4%と最も高かった。Gaの一部は以前 *Pasteurella anatis* として *Pasteurella* 属に分類されていたが、現在では *Gallibacterium* 属の基準種として分類されており(図7)、鳥類からの分離とその病原性が最近報告されてきている。

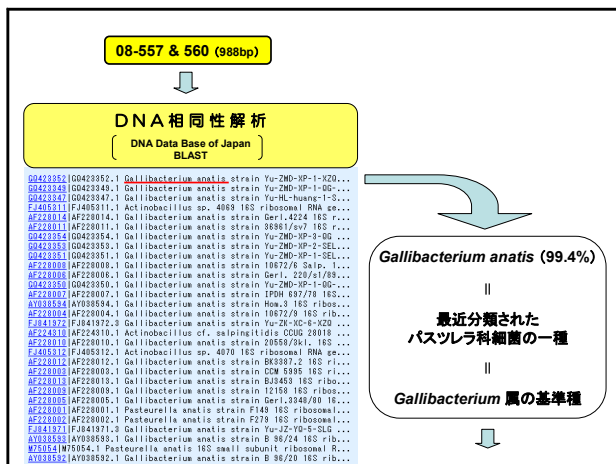


図7. DNA 相同性解析

選抜菌との系統樹解析でも被検菌は Ga であることが伺われ、Mh は対局に位置した(図8)。

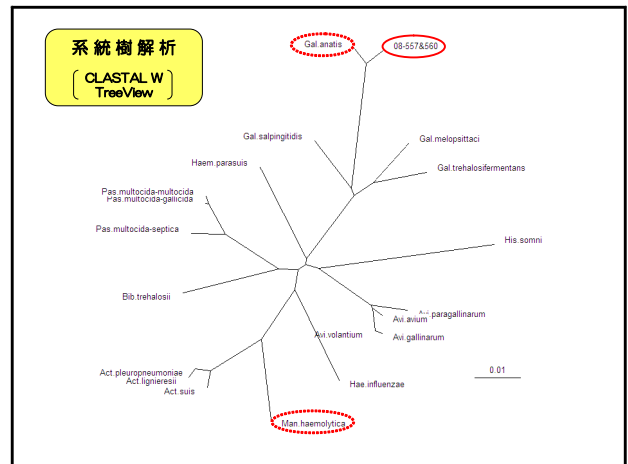


図8. 被検菌と選抜菌の系統樹解析

複数の成書及び論文から引用した選抜菌の主な生化学性状との比較により、被検菌は *Gallibacterium anatis* biovar *haemolytica* であり、市販の簡易同定キットに比較的平易な幾つかの生化学性状検査を追加することで同定できると考えられた(表3、図9)。

表3. 被検菌と選抜菌の主な生化学性状

分離菌と選抜菌の主な生化学性状比較		生化学性状																						
分離菌	種名	カタラーゼ	カタラーゼ	カタラーゼ	カタラーゼ	カタラーゼ	カタラーゼ	カタラーゼ	カタラーゼ	カタラーゼ	カタラーゼ	カタラーゼ	カタラーゼ	カタラーゼ	カタラーゼ	カタラーゼ	カタラーゼ	カタラーゼ	カタラーゼ	カタラーゼ	カタラーゼ	カタラーゼ	カタラーゼ	カタラーゼ
<i>Aerobacillus</i>	<i>hydrophila</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Gallibacterium</i>	<i>anatis</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Pasteurella</i>	<i>multocida</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

★分離菌の生化学性状

簡易同定キットでは

- API ZONE (シスメックス・ピオメリュール)
 - CODE : 1020004 → *Mannheimia haemolytica* (93.7%)
- IDテスト・HN-20ラピッド (日本製薬)
 - CODE : 7457753 → 該当なし
- クイックアイディGN (日本製薬)
 - CODE : 14012 → *Pseudomonas aeruginosa* (44%)
 - 14112 → *Citrobacter freundii* (85%)

図9. 簡易同定キットによる被検菌の検査成績

被検菌の薬剤感受性は図 10 に示すとおりであった。

★ 被検菌の薬剤感受性

	感受性				中間	耐性
ペニシリン系	ABPC	AMPC				PCG
セフェム系	CEZ	CXM	CTF			
アミノグリコシド系	SM	GM				KM
マクロライド系	EM				SPM	OL
テトラサイクリン系	DOXY				OTC	
その他	CP	CL	PL	FOM	LCM	
化学療法剤	ST	NA	ERFX	OFLX		

図 10 . 被検菌の薬剤感受性

以上の成績により、被検菌は以前から鳥類から分離されているものの、他の細菌同様その複雑な性状のため分類が困難であったパスツレラ科細菌の一種で、最近提唱された *Gallibacterium* 属の基準種 *Gallibacterium anatis* biovar *haemolytica* と考えられた。

本症例の病変と分離微生物との関係から、被検菌による病態への関与が疑われたものの、その病原性については、今後、免疫染色による組織検査や動物試験により確認したい。

★ まとめ

- ★ 分離菌は
Gallibacterium anatis biovar *haemolytica*
- ★ 病態に関与したと考えられる
- ★ 市販同定キットと簡易な生化学性状で判別可能
- ★ 抗菌性物質が有効

図 11 . まとめ