

Pasteurella multocida が分離された黒毛和種繁殖牛の乳房炎又吉正直^{1)†} 船倉 栄²⁾ 浦江健太³⁾ 横川顕治³⁾ 河合 透³⁾

1) 沖縄県八重山家畜保健衛生所 (〒907-0022 石垣市大川99)

2) 沖縄県 開業 (牛の病院: 〒907-0243 石垣市宮良下原94-3)

3) 財化学及血清療法研究所 (〒860-8568 熊本市大窪1-6-1)

(2009年9月18日受付・2010年3月5日受理)

要 約

沖縄県石垣市で8歳の黒毛和種の繁殖牛が分娩後80日前後から右前乳房が腫脹、硬結し、California Mastitis Testで陽性、臨床型乳房炎と診断された。乳汁の細菌検査では*Pasteurella multocida*が純培養状に623 CFU/mlで分離された。分離菌はPCRによる莢膜抗原型別試験およびゲル内沈降反応による菌体抗原型別で血清型A:3, 4と型別され、PMT遺伝子*toxA*は保有していなかった。この報告は*P. multocida*が関与した黒毛和種牛の国内最初の乳房炎症例である。——キーワード: 乳房炎, *Pasteurella multocida*, 血清型別。

----- 日獣会誌 63, 524~526 (2010)

牛の*Pasteurella multocida*感染症の病型は、特異的かつ多様であり、特定の血清型が関与する家畜法定伝染病の出血性敗血症、飼育環境の悪化や複合感染に伴うことで輸送性肺炎などを主徴とする子牛バスタレラ症がある。しかし、牛の乳房炎からの分離報告はきわめて少なく、分離例もホルスタイン種などの搾乳牛に限られている [1-6]。今回、肉用牛の臨床型乳房炎に遭遇し、*P. multocida*が分離されたので、その概要を報告する。これは*P. multocida*が関与した黒毛和種繁殖牛からの国内最初の症例報告である。

材料および方法

発症牛: 沖縄県石垣市の肉用牛繁殖農家で飼養される2000年10月30日生まれの黒毛和種雌牛。

細菌学的検査: 薬剤投与前の右前乳房の乳汁を採取し、コロンビア5%ヒツジ血液寒天培地 (日本ベクトン・ディッキンソン(株), 福島) で好気培養を行った。分離菌株の同定は市販キット (IDテストHN-20ラピッド「ニスイ」, 日水製薬(株), 東京) を用いて行った。

***P. multocida*の特異的遺伝子の検出:** 既報 [7] に基づきPCRにより行った。

***P. multocida*の莢膜抗原型別試験:** 既報 [7] に基づきPCRにより行った。

***P. multocida*の菌体抗原型別試験:** 既報 [8, 9] に基づきゲル内沈降反応によりHeddlestonのO抗原型

16種類について行った。

PMT (*Pasteurella multocida* toxin) 遺伝子*toxA* 保有試験: 既報 [10] に基づきPCRにより行った。

薬剤感受性検査: 分離菌について臨床検査標準委員会 (CLSI) [11] に準拠し、ミューラーヒントン5%ヒツジ血液寒天培地 (日本ベクトン・ディッキンソン(株), 福島) を用いて、ベンジルペニシリン, アンピシリン, セファゾリン, カナマイシン, ゲンタマイシン, クリンダマイシン, オキシテトラサイクリン, ドキシサイクリン, クロラムフェニコール, バンコマイシン, ホスホマイシン, スルファメキサゾール/トリメトプリム (以上, 日水製薬(株), 東京) およびエンロフロキサシン (栄研化学(株), 東京) の13薬剤について行った。

成 績

臨床症状: 2009年3月27日分娩。6月22日初診。数日前より、右前分房が腫脹し、疼痛により子牛への授乳を拒否している状態であった。体温39.5℃, 脈拍90回/分, 呼吸30回/分。右前分房の乳汁はPLテスター (日本全薬工業(株), 東京) を用いたCalifornia Mastitis Test (CMT) で陽性反応を示した。

治療経過: 初診ではキシラジン塩酸塩 (セラクター, バイエルメディカル(株), 東京) 60mg 鎮静下で、ベンジルペニシリンプロカイン (400万単位) および硫酸ジヒドロストレプトマイシン (4g) の合剤 (乾乳用軟膏

† 連絡責任者: 又吉正直 (沖縄県家畜衛生試験場)

〒900-0024 那覇市古波蔵112 ☎098-832-1515 FAX 098-853-7376 E-mail: matayoma@pref.okinawa.lg.jp

A, 日本全薬(株, 東京) を罹患乳房に注入した。7月7日の第2診では罹患乳房内に膿瘍と思われる結節を認めため、セファピリンベンザチン (KPドライ, フォートダッジ(株), 東京) 300mg を注入した。第2診の最終治療により罹患分房の症状は改善され治癒した。

細菌学的検査: 乳汁から24時間培養で非溶血性のムコイド状コロニーが純培養状に623CFU/mlで分離された。分離菌はグラム陰性短桿菌で、非溶血性、非運動性、カタラーゼおよびオキシダーゼは陽性だった。分離菌はIDテストHN-20ラビッド「ニスイ」による同定の結果、コードNo. 7615752で*P. multocida* (100% id) と同定された。

***P. multocida* 特異的遺伝子の検出:** *P. multocida* の特異的遺伝子が検出された。

***P. multocida* の莢膜抗原型別試験:** 莢膜抗原はA型と判定された。

***P. multocida* の菌体抗原型別試験:** 菌体抗原は3型および4型抗血清と反応したことから3, 4型と判定された。

PMT 遺伝子 *toxA* 保有試験: *toxA* は検出されなかった。

薬剤感受性検査: クリンダマイシンおよびバンコマイシンは耐性、他の11薬剤はすべて感性であった。

考 察

牛の乳房炎からの分離菌の報告は、世界的にも *Streptococcus* spp, *Staphylococcus* spp, *Escherichia coli*, *Arcanobacterium pyogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* などが多い [3, 4, 12]. Malinowski ら [4] はポーランドにおける乳牛の乳房炎の原因菌調査を行った。CMT陽性の18,713検体からの菌分離では大腸菌 (52.3%) が最も多く分離され、以下 *Streptococcus* spp. (15.7%), Coagulase Negative Staphylococci (CNS) (14.6%), *Staphylococcus aureus* (8.6%) であり、*P. multocida* の分離率は3.1%であった。このように *P. multocida* の乳房炎からの分離報告は少なく、分離例もホルスタイン種などの搾乳牛に限られている [3-6] ことから、今回の症例はきわめて稀少な例であると考えられた。

P. multocida の血清型と菌の病原性には密接な関連性があり、また分離宿主および疾病によって異なる傾向を示す [1, 13]. Davies ら [5] は英国における牛の肺炎や乳房炎由来 *P. multocida* 153検体についてPCRによる莢膜抗原型別を行ったが、F型の1例を除き、すべてがA型に型別された。国内でも牛から分離される *P. multocida* の莢膜抗原型はA型が大多数で、次いでD型が多い [14, 15]. また、国内の乳牛の乳房炎由来株の莢膜抗原型では、株数は少ないが、2株ともA型とされている [6, 14]. 米国の20種類以上の動物から分離し

た762株の成績 [16] では、菌体抗原3, 4型が137株 (18.0%) を占めており、3型 (54.0%) に次いで多かった。その中の牛由来株では55株中5株 (9.1%) を占め、3型 (60.0%), 3, 4, 12型 (20.0%) に次ぐ3番目に多い型であったことから、分離菌は多くの動物由来株に比較的好く認められる血清型であると考えられた。*toxA* は143kDaの易熱性の壊死毒素 (PMT) 蛋白をコードする遺伝子である [17]. 1990年代に入って国内においてもPMT産生性の *P. multocida* が実験的に豚の萎縮性鼻炎をおこし得ることが確認された [18]. 牛由来株のPMT産生性の報告は少ないが、Jaglic ら [19] の調査では、子牛由来31株中1株 (3.2%) で検出され、渥美ら [14] の北海道の子牛由来株の調査では、莢膜型D型に属した2株のみPMTを産生し、A型81株は非産生株であった。

薬剤感受性では、自然耐性とされるクリンダマイシンおよびバンコマイシンにのみ耐性であった。今回の治療は、初診において使用したベンジルペニシリンおよびストレプトマイシンの合剤によって罹患分房の硬結や腫脹が軽減されたが、第2診時に膿瘍と思われる結節が認められた。そのためセファピリンベンザチンに薬剤を変更し、その後良好な経過で治癒した。

今回、患者や哺乳子牛の上部気道からの菌分離は行っておらず、感染経路については不明である。ただし、同居牛に肺炎等の呼吸器症状は認められなかったことや、*P. multocida* は外界での抵抗性は弱く、乾燥や日光などにより長期間生存しないことから [1], 患者の上部気道や環境からの感染の機会は少ないものと考えられた。Maplesden ら [20] は、カナダにおいて世界で初めての *Mannheimia haemolytica* による乳牛の乳房炎を報告し、感染経路は子牛の哺乳によるものであったと推察している。今回、分娩後87日経過しており、子牛の哺乳が一定期間継続していたことから子牛の上部気道や口腔内に常在する *P. multocida* [1, 14] が乳頭口を介して感染した可能性が示唆された。今回の成績から、分離された *P. multocida* については、牛で通常に保菌している可能性もある菌型であったことから、肉用牛の乳房炎については当該菌の関与することも考慮する必要があると考えられた。

稿を終えるにあたり、分離株の菌体抗原型別を実施していただいた(株)農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究所、星野尾歌織研究員に深謝する。

引用文献

- [1] 杉本千尋: パスツレラ属, 新編獣医微生物学, 梁川 良他編, 初版, 230-239, 養賢堂, 東京 (1989)
- [2] 澤田拓士: パスツレラ病, 豚病学, 柏崎 守他編, 第4版, 352-361, 近代出版, 東京 (1999)
- [3] Barnum DA: A herd outbreak of mastitis caused by

- Pasteurella multocida*, Can J Comp Med Vet Sci, 18, 113-119 (1954)
- [4] Malinowski E, Lassa H, Klossowska A, Smulski S, Markiewicz H, Kaczmarowski M : Etiological agents of dairy cows' mastitis in western part of Poland, Pol J Vet Sci, 9, 191-194 (2006)
- [5] Davies RL, MacCorquodale R, Reilly S : Characterisation of bovine strains of *Pasteurella multocida* and comparison with isolates of avian, ovine and porcine origin, Vet Microbiol, 99, 145-158 (2004)
- [6] 後藤利隆 : *Pasteurella multocida* による牛の乳房炎と補体結合反応の診断的意義, 臨床獣医, 13, 66-71 (1995)
- [7] Townsend KM, Boyce JD, Chung JY, Frost AJ, Adler B : genetic organization of *Pasteurella multocida* cap loci and development of a multiplex capsular PCR typing system, J Clin Microbiol, 39, 924-929 (2001)
- [8] Heddleston KL, Gallagher JE, Rebers PA : Fowl cholera : Gel diffusion precipitin test for serotyping *Pasteurella multocida* from avian species, Avian Dis, 16, 925-936 (1972)
- [9] El Tayeb AB, Morishita TY, Angrick EJ : Evaluation of *Pasteurella multocida* isolated from rabbits by capsular typing, somatic serotyping, and restriction endonuclease analysis, J Vet Diagn Invest, 16, 121-125 (2004)
- [10] Nagai S, Someno S, Yagihashi T : Differentiation of toxigenic from nontoxigenic isolates of *Pasteurella multocida* by PCR, J Clin Microbiol, 32, 1004-1010 (1994)
- [11] National Committee for Clinical Laboratory Standards : Performance stand for antimicrobiol disk susceptibility testing, 17th ed, NCCLS M100-S17, Clinical Laboratory Standards Institute, Wayne, Pennsylvania (2007)
- [12] Wenz JR, Barrington GM, Garry FB, McSweeney KD, Dinsmore RP, Goodell G, Callan RJ : Bacteremia associated with naturally occurring acute coliform mastitis in dairy cows, J Am Vet Med Assoc, 219, 976-981 (2001)
- [13] 澤田拓士 : パスツレラ, 獣医感染症カラーアトラス, 見上 彪監修, 第2版, 63-64, 文永堂出版, 東京 (2006)
- [14] 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 : 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 (1986)
- [15] 小池新平, 井上恭一, 米山州二, 市川 優, 田島和彦 : 栃木県で過去16年間に分離された牛呼吸器病原因菌の薬剤感受性調査. 日獣会誌, 62, 533-537 (2009)
- [16] Blackburn BO, Heddleston KL, Pfof CJ : *Pasteurella multocida* serotyping results (1971-1973), Avian Dis, 19, 353-356 (1975)
- [17] Foged NT : Quantitation and purification of the *Pasteurella multocida* toxin by using monoclonal antibodies, Infect Immun, 56, 1901-1906 (1988)
- [18] Kawai T, Honda T, Tokuyama Y, Taneno A, Oishi S, Okamura H, Nonaka F, Sakai E, Miyahara T, Eto M : Reproduction of turbinate atrophy in pigs by intranasal consecutive-day inoculation with suspensions of a toxigenic serotype D strain of *Pasteurella multocida*, J Vet Med Sci, 53, 507-509 (1991)
- [19] Jaglic Z, Kucerova Z, Nedbalcova K, Pavlik I, Alexa P, Bartos M : Characterisation and comparison of *Pasteurella multocida* isolated from different species in the Czech Republic : capsular PCR typing, ribotyping and dermonecrototoxin production, Vet Med-Czech, 50, 345-354 (2005)
- [20] Maplesden DC, Carter GR : Bovine mastitis caused by *Pasteurella haemolytica* : A case report, Can J Comp Med, 19, 295-296 (1955)

Occurrence of Mastitis Associated with *Pasteurella multocida* in Japanese Black Cattle

Masanao MATAYOSHI^{*†}, Hisashi FUNAKURA, Kenta URAE, Kenji YOKOGAWA and Toru KAWAI

^{*} Yaeyama Livestock hygiene Service Center, 99 Ookawa, Ishigaki, 907-0022, Japan

SUMMARY

An eight-year-old breeding Japanese Black cattle showing swollen and palpable induration in the right front quarter was diagnosed with clinical mastitis using the California Mastitis Test, on Ishigaki Island, Okinawa Prefecture, Japan, on June 2009. *Pasteurella multocida* was isolated from the milk sample of the cattle purely with a titer of 623 CFU/ml. The isolate was determined as serotype A : 3, 4 by capsular PCR typing and gel diffusion precipitation. *ToxA* gene encoding *Pasteurella multocida* toxin was not detected from the isolate. This is the first case report of Japanese black cattle mastitis associated with *P. multocida* in Japan.

—Key words : mastitis, *Pasteurella multocida*, serotyping.

† Correspondence to : Masanao MATAYOSHI (Okinawa Prefectural Institute of Animal Health)

112 Kohagura, Nahashi, 900-0024, Japan

TEL 098-832-1515 FAX 098-853-7376 E-mail : matayoma@pref.okinawa.lg.jp

J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 63, 524 ~ 526 (2010)