

## 原 著

# 北海道十勝管内の牛から分離された *Mannheimia haemolytica* の 血清型別、薬剤感受性試験、パルスフィールドゲル 電気泳動を用いた疫学的検討

高木裕子<sup>1)†</sup> 大野 治<sup>1)</sup> 中岡祐司<sup>1)</sup> 勝田 賢<sup>3)</sup>  
内田郁夫<sup>2)</sup> 田中 聖<sup>2)</sup>

- 1) 北海道十勝家畜保健衛生所 (〒089-1182 帯広市川西町基線59-6)  
2) (独)農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究所北海道支所 (〒062-0045 札幌市豊平区羊ヶ丘4)  
3) (独)農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究所東北支所 (〒039-2586 上北郡七戸町字海内31)

(2010年3月23日受付・2010年11月8日受理)

## 要 約

1994～2006年に北海道十勝管内で分離された *Mannheimia haemolytica* 39株について、血清型別、薬剤感受性試験、パルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) による解析を実施した。血清型は、1型21株 (53.8%)、6型16株 (41%)、2型と型別不能が各1株であった。1型は調査期間をとおして分離されたが、6型は平成11年に初めて分離され、16年以降は1型より高率に分離された。1型の18株、6型の15株がPFGEではそれぞれ同一パターンで、1型、6型それぞれ近縁な株が管内に浸潤していると推察された。6型の15株はSM, KM, CP, NA, ERFXを含む多剤に対して耐性で、6型のNA, ERFX, CPのMIC<sub>90</sub>も高値であった。これら多剤耐性6型はほとんどがホルスタイン種雄やF1の若齢肉用牛由来であった。

——キーワード：牛呼吸器病症候群 (BRDC), *Mannheimia haemolytica*, 多剤耐性, 血清型6型。

日獣会誌 64, 215～220 (2011)

*Mannheimia haemolytica* (Mh) は、線維索性肺炎を引き起こし、牛呼吸器病症候群 (BRDC) を重篤化する病原体として重要視されている。当所が1994～2006年に実施した呼吸器病の病性鑑定で、原因が特定された症例では、乳用牛で23.3% (30例中7例)、肉用牛では31.3% (67例中21例) からMhが分離され、呼吸器病の主要原因の一つとなっている。また、Mhの分離は近年増加傾向にあり、肉用牛の症例からは多剤耐性株が分離されるケースもしばしばみられた。

Mhは莢膜の抗原性によって12種類の血清型に分類されている [1]。牛の呼吸器病から分離されるMhは血清型1型が主体であるとされていたが、2000年の米国における報告では、26%が血清型6型に属していた [2]。

国内においても、約20%が血清型6型に属することが報告されている [3]。また、多剤耐性を示すMhの存在も知られている [4]。

北海道内では本菌の疫学情報に関する報告がないことから、本病の対策に活用するため、当所で分離されたMh分離菌株について血清型、薬剤感受性、パルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) による疫学的解析を行い、発生要因を検討した。

## 材料および方法

**材料：**1994～2006年に病性鑑定で12町村、24農場から分離されたMh39株 (乳用牛由来11株、肉用牛由来28株) を用いた (表1)。供試菌株は5%羊血液加寒

† 連絡責任者：高木裕子 (北海道十勝家畜保健衛生所)

〒089-1182 帯広市川西町基線59-6

☎0155-59-2021 FAX 0155-53-4121

E-mail : takagi.yuuko@pref.hokkaido.lg.jp

北海道十勝管内で分離された *Mannheimia haemolytica* の解析

表1 供試菌株一覧と血清型別, 耐性薬剤, PFGE型別

No.	分離年月	市町村	農場	用途	由来	分離月齢	血清型	耐性薬剤 <sup>*1</sup>	PFGE型 <sup>*2</sup>
1	1994. 3	A町	a	乳用牛	肺	不明	1	S・K	I-a
2	1994. 4	B町	b	乳用牛	肺	不明	1	S・K	I-a
3	1994. 9	C町	x	肉用牛	肺	不明	2	S・K	II
4	1994.11	B町	b	乳用牛	肺	不明	1	S	I-a
5	1995. 6	D町	c	肉用牛	肺	不明	1	S・K	I-a
6	1995.12	B町	d	肉用牛	肺	不明	1	S	I-a
7	1996. 2	E町	e	肉用牛	肺	不明	1	S・K	I-a
8	1996.12	F町	f	乳用牛	肺	不明	1	S・K	I-a
9	1997.10	G町	g	肉用牛	鼻汁	不明	1	S・K	I-a
10	1998. 1	H村	h	乳用牛	肺	不明	1	S・K	I-a
11	1998.11	B町	d	乳用牛	肺	不明	1	S	I-a
12	1999.11	C町	i	乳用牛	肺	33カ月	6	S・K	VI-a
13	2001.10	I町	j	肉用牛	肺	不明	1	S・K	I-a
14	2002. 1	J町	k	肉用牛	肺	不明	6	S・K・C・N・ER・A	VI-b
15	2003. 6	K町	l	乳用牛	肺	13カ月	1	S	I-a
16	2003.11	D町	m	乳用牛	鼻汁	3~6カ月	1	S・K	I-a
17	2004. 1	J町	k	肉用牛	鼻汁	2カ月	1	S・K	I-a
18	2004. 3	I町	n	肉用牛	鼻汁	1~2カ月	6	S・K・C・N・ER・O	VI-b
19	2004. 5	I町	o	肉用牛	鼻汁	2カ月	6	S・K・C・N・ER・O	VI-b
20	2005. 3	K町	p	肉用牛	肺	1カ月	6	S・K・C・N・ER・O	VI-b
21	2005. 3	K町	p	肉用牛	肺	1カ月	6	S・K・C・N・ER・O	VI-b
22	2005. 3	K町	p	肉用牛	肺	1カ月	6	S・K・C・N・ER・O・A	VI-b
23	2005. 5	K町	p	肉用牛	肺	4カ月	6	S・K・C・N・ER・O	VI-b
24	2005. 5	J町	q	肉用牛	鼻汁	5カ月	1	S	I-a
25	2005. 5	J町	q	肉用牛	鼻汁	6カ月	1	S・K	I-a
26	2005. 5	K町	p	肉用牛	鼻汁	2カ月	6	S・K・C・N・ER・O	VI-b
27	2005. 8	K町	p	肉用牛	鼻汁	4カ半月	型別不能	S	*
28	2005. 9	K町	p	肉用牛	鼻汁	5カ月	1	S・K	I-a
29	2005. 9	K町	p	肉用牛	鼻汁	5カ月	1	S・N	I-b
30	2005.10	I町	r	肉用牛	肺	3カ月	6	S・K・C・N・ER・O・A	VI-b
31	2005.10	I町	r	肉用牛	肺	4カ月	6	S・K・C・N・ER・O・A	VI-b
32	2005.12	E町	s	肉用牛	鼻汁	2カ月	1	S	I-c
33	2005.12	K町	p	肉用牛	鼻汁	8カ月	6	S・K・C・N・ER・O	VI-b
34	2006. 2	G町	t	肉用牛	鼻汁	1カ月	6	S・K・C・N・ER・O	VI-b
35	2006. 4	D町	u	肉用牛	鼻汁	2カ月	6	S・K・C・N・ER・O・A	VI-b
36	2006. 8	J町	v	肉用牛	鼻汁	3カ月	1	S	I-a
37	2006.10	D町	u	肉用牛	鼻汁	1カ半月	6	S・K・C・N・ER・O・A	VI-b
38	2006.11	B町	d	乳用牛	鼻汁	2カ月	1	S・K	I-d
39	2006.11	L町	w	乳用牛	鼻汁	3カ月	6	S・K・C・N・ER・O	VI-b

※1 S:SM K:KM C:CP N:NA ER:ERFX O:OTC A:ABPC

※2 PFGE型は系統樹解析結果に基づき型別を実施(図3参照).

天培地を用い、好気性下で37℃、24時間培養し、生化学性状(API 20 NE, bioMérieuxまたはIDテスト・HN-20ラピッド, 日水製薬株, 東京)および16S rRNA遺伝子解析[5]により同定した。

**血清型別:**家兎を定法により免疫し作成した抗血清を用い、間接赤血球凝集反応により実施した[3]。

**薬剤感受性試験:**1濃度ディスク拡散法により、アンピシリン(ABPC)、セファゾリン(CEZ)、ストレプトマイシン(SM)、カナマイシン(KM)、エリスロマイシン(EM)、オキシテトラサイクリン(OTC)、ドキシサイクリン(DOXY)、クロラムフェニコール(CP)、コリスチン(CL)、ナリジクス酸(NA)(以上10薬剤:セン

シディスク, Becton Dickinson, U.S.A.), エンロフロキサシン(ERFX)(提供: Bayer HealthCare, Germany)の11薬剤について実施し、薬剤耐性は添付の判定表に基づき判断した。また、CLSI(Clinical and Laboratory Standards Institute)法に準拠した寒天平板希釈法によるMIC測定を、NA, ERFX, CP, フロルフェニコール(FF)の4薬剤について実施した[6]。

**PFGEによる遺伝子型別および系統樹解析:**PFGEは制限酵素Apa IによりDNAを切断後、電圧6v/cm、パルスタイム5-10secで11時間、その後パルスタイム10-80secで9時間の泳動を行い、PFGEパターンを系統樹解析はBioNumerics(Applied Maths, Ver. 4.0)

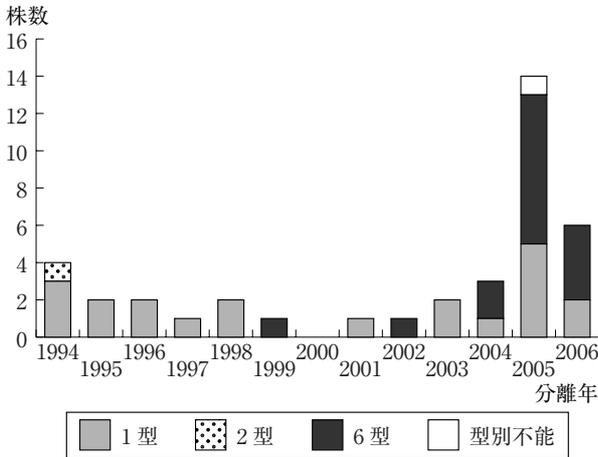


図1 血清型別分離株数の推移

表2 血清型1型と6型株の耐性薬剤

血清型	耐性薬剤*	乳用牛株数	肉用牛株数	計
1型 (21株)	S・K	6	7	13
	S・N		1	1
	S	3	4	7
6型 (16株)	S・K・C・N・ER・O・A		5	5
	S・K・C・N・ER・O	1	8	9
	S・K・C・N・ER・A		1	1
	S・K	1		1

※S: SM K: KM C: CP N: NA ER: ERFX  
O: OTC A: ABPC

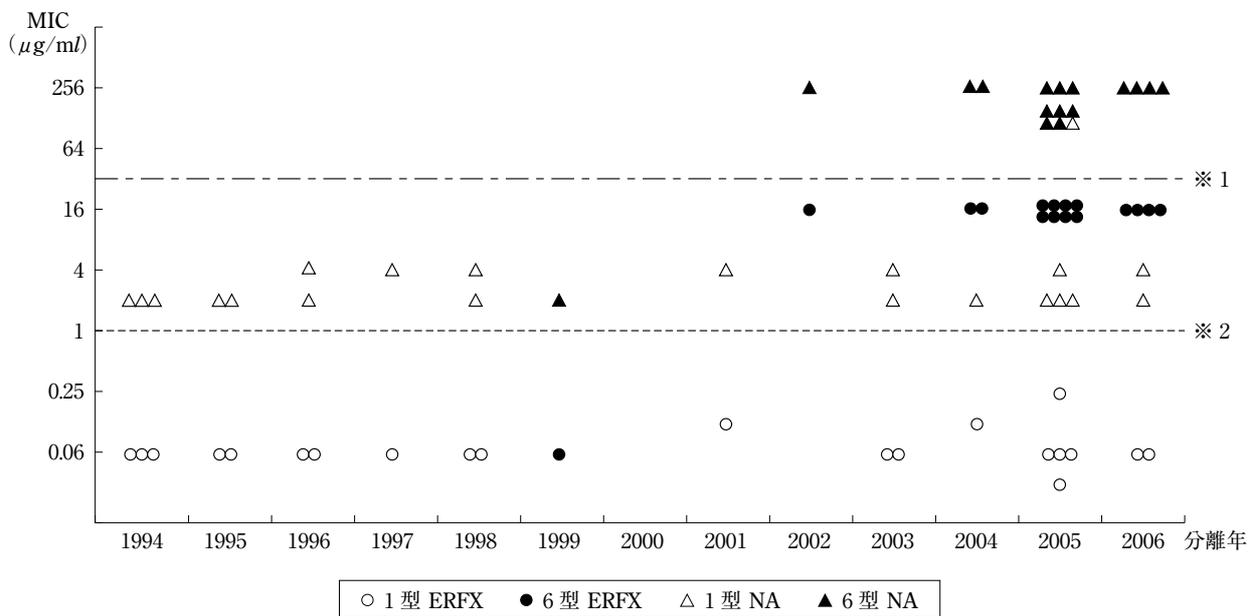


図2 血清型1型・6型株のERFX, NAに対するMICの推移

※1 --- NAのブレイクポイント (32μg/ml) ※2 ----- ERFXのブレイクポイント (2μg/ml)

を用いて実施した。

### 成 績

供試菌株の由来と血清型、薬剤耐性については表1に示した。

**血清型別：**血清型は、1型が21株 (53.8%)、6型が16株 (41.0%)、2型が1株 (2.6%)、型別不能が1株 (2.6%) であった。乳用牛由来11株は、1型が9株 (81.8%)、6型は2株 (18.2%) であったが、肉用牛由来28株は6型が14株で50%を占めた。血清型ごとの乳用牛、肉用牛の割合は、1型は9株が乳用牛由来、12株が肉用牛由来であったのに対し、6型は16株中14株が肉用牛由来で、そのうち11株が3カ月齢以内のホルスタイン種雄やF1であった。また、1型は肺由来が11株、鼻汁由来が10株であり、6型は肺由来、鼻汁由来ともに

8株ずつであった。

1994～1998年に分離された11株は1型が10株 (90.9%) で、11～18年に分離された28株は1型が11株 (39.3%)、6型が16株 (57.1%) であった。1型は調査期間をとおして分離されたが、6型は平成11年に初めて分離され、2004年以降は1型より高率に分離された (図1)。1994～1998年に分離された1型10株のうち9株は肺由来であったが、2001～2006年に分離された1型11株のうち9株が鼻汁由来であった。

**薬剤感受性試験：**1濃度ディスク拡散法による薬剤感受性試験では、1型21株のうち、SM・KM耐性は13株、SM・NA耐性は1株、SM耐性は7株であった。また、6型16株のうち、SM・KM・CP・NA・ERFX・OTC・ABPC耐性は5株、SM・KM・CP・NA・ERFX・OTC耐性は9株、SM・KM・CP・

表3 血清型1型と6型株のMIC

1 型 (21株)	MIC ( $\mu\text{g/ml}$ )															
	$\leq 0.03$	0.06	0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512	MIC <sub>90</sub>
NA							13	7					1			4
ERFX	1	17	2	1												0.125
CP						13	8									1
FF					1	20										1

6 型 (16株)	MIC ( $\mu\text{g/ml}$ )															
	$\leq 0.03$	0.06	0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512	MIC <sub>90</sub>
NA							1						5	10		256
ERFX		1								15						16
CP					1						10	5				64
FF						15	1									1

※網かけは耐性と判断した株

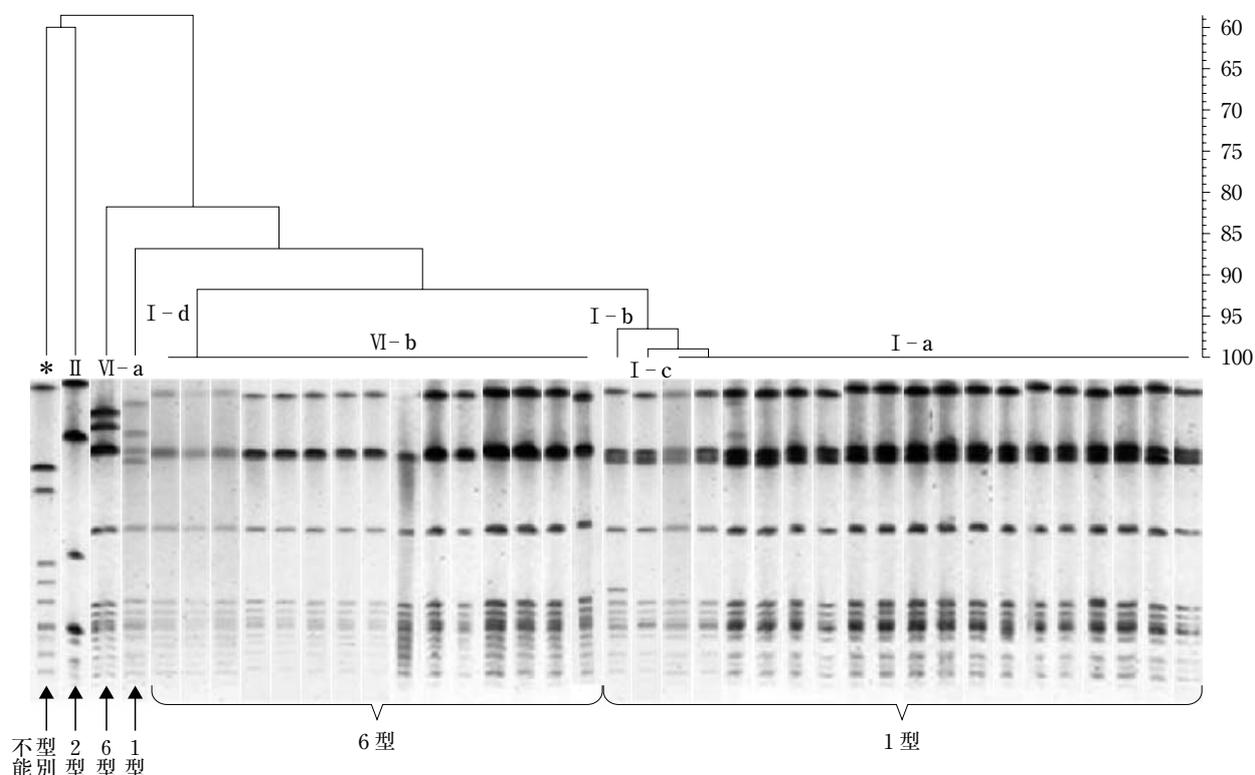


図3 PFGE 遺伝子型別による系統樹解析 (上はPFGE型, 下は血清型)

NA・ERFX・ABPC 耐性は1株, SM・KM 耐性は1株であった。1型に比べ6型はSM・KM・CP・NA・ERFXを含む多くの薬剤に耐性を示し, 多剤耐性の6型15株のうち14株が肉用牛由来であった (表2)。

寒天平板希釈法によるMIC測定では1型21株のMIC<sub>90</sub> ( $\mu\text{g/ml}$ ) は, NA: 4, ERFX: 0.125, CP: 1, FF: 1, 6型の16株については, NA: 256, ERFX: 16, CP: 64, FF: 1であった。NA, ERFX, CPは, MICの値が二峰性を示したことからその中間点を細菌学的ブレイクポイントとし, それぞれ32  $\mu\text{g/ml}$ , 1  $\mu\text{g/ml}$ , 8  $\mu\text{g/ml}$ 以上の株を耐性と判断した (表3)。全39株中15株 (38.5%) がERFXに耐性を示し

(MIC: 16  $\mu\text{g/ml}$ ), それらはすべて6型であった。調査期間をとおして分離された1型のNA, ERFXのMICにはほとんど変化がみられなかったが, 6型については, 平成11年に分離された1株を除き, 近年分離された株ではすべてMICが非常に高値を示した (図2)。

**PFGE 遺伝子型別および系統樹解析:** PFGEによる系統樹解析では, 1型21株のうち18株が同一パターン (I-a) であった。6型16株のうち, 15株が同一パターン (VI-b) で, これらはSM・KM・CP・NA・ERFX等の多剤に耐性の株と一致し, SM・KMに耐性の1株は異なるパターン (VI-a) であった (図3)。

## 考 察

国内におけるMhの血清型の動向に関する調査（1987～2006年，21県208株）において，1型は調査期間をとおして分離されたが，6型は1995年に初めて分離され，近年分離が増加していることが報告された [4]。北海道十勝管内でも同様に，1型は調査期間をとおして分離されたが，6型については，1999年に初めて分離され，2004年以降は1型より高率に分離された。1型は以前から牛群に広く浸潤しているため，移行抗体や低レベルの感染等による免疫状態により発症が抑制され，死亡した牛や病理解剖を行った牛の肺からは6型が高率に分離されるようになったと推察された。

血清型別とPFGE遺伝子型別の結果には相関が認められ，1型，6型それぞれ近縁な株が流行していると推察された。

6型16株のうち15株（6町村8農場由来）はSM・KM・CP・NA・ERFXを含む多剤に耐性で，そのうち11株がホルスタイン種雄やF1の3カ月齢以内の肉用牛由来であった。いっぽう，1型には多剤耐性の株は認められなかった。ERFX，NA，CPのMICは，1型は低く，6型は高い値に分布し，MIC<sub>90</sub>も6型で高値を示した。また1998年以降，家畜では使用されていないクロラムフェニコールでも6型でMICが高値であった。多剤耐性の6型の多くがホルスタイン種雄やF1の若齢肉用牛由来であったのは，これらの牛の飼養形態で多くみられる導入主体の大規模な哺育・育成農場において，抗生物質の使用頻度が増加し，薬剤の選択圧により多剤耐性株のみが生き残ったためと推察された。

導入主体の大規模な哺育・育成農場では，個体の免疫状態，病原体への感受性，保有病原体等，さまざまな状態の幼若牛が群管理されており，移動や集団飼育などによる環境変化によるストレスも加わり，呼吸器病や下痢等の感染症が流行しやすい状態にある。そのため，予防的投与等，薬剤使用頻度が高くなり，耐性菌のまん延を引き起こす可能性があると考えられる。そのような事態

を防止するためにも，導入時の着地検査や隔離飼育，衛生的な飼養管理の徹底等に加え，疾病発生時には原因菌の薬剤感受性試験結果に基づく治療薬の適正使用が望まれる。また，治療薬に頼らない，衛生的な飼養管理を重視した呼吸器病対策を推進する必要があると考える。

## 引用文献

- [1] Angen O, Muters R, Caugant DA, Olsen JE, Bisgaard M : Taxonomic relationship of the [*Pasteurella*] *haemolytica* complex as evaluated by DNA-DNA hybridizations and 16S rRNA sequencing with proposal of *Mannheimia haemolytica* gen. nov., comb. nov., *Mannheimia granulomatis* comb. nov., *Mannheimia glucosida* sp. nov., *Mannheimia ruminalis* sp. nov. and *Mannheimia varigena* sp. nov., Int J Syst Bacteriol, 49, 67-86 (1999)
- [2] Al-Ghamdi GM, Ames TR, Baker JC, Walker R, Chase CC, Frank GH, Maheswaran SK : Serotyping of *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica* isolates from the upper Midwest United States, J Vet Diagn Invest, 12, 576-578 (2000)
- [3] Katsuda K, Kamiyama M, Kohomoto M, Kawashima K, Tsunemitsu H, Eguchi M : Serotyping of *Mannheimia haemolytica* isolates from bovine pneumonia : 1987-2006, The Veterinary Journal, 178, 146-148 (2008)
- [4] Esaki H, Asai T, Kojima A, Ishihara K, Morioka A, Tamura Y, Takahashi T : Antimicrobial susceptibility of *Mannheimia haemolytica* isolates from cattle in Japan from 2001 to 2002, J Vet Med Sci, 67, 75-77 (2005)
- [5] 篠田吉史, 加藤暢夫, 森田直樹 : 16S rRNA 遺伝子解析による細菌の系統分類法, 鳥津評論, 57, 121-132 (2000)
- [6] Watts JL, Shryock TR, Apley M, Bade DJ, Brown SD, Gray JT, Heine H, Hunter RP, Mevius DJ, Papich MG, Silley P, Zurenko GE : Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals; Approved standard -Third Edition, CLSI document M31-A3, 28 (2008)

Epidemiological studies of *Mannheimia haemolytica* isolated from cattle  
in Tokachi area by serotyping, antibiotics sensitivity testing  
and pulse-field gel electrophoresis

Yuko TAKAGI<sup>\*†</sup>, Osamu OHNO, Yuji NAKAOKA, Ken KATSUDA,  
Ikuo UCHIDA and Kiyoshi TANAKA

*\* Hokkaido Tokachi Livestock Hygiene Service Center, 59-6 Kisen, Kawanishicho, Obihiro-shi,  
089-1182, Japan*

SUMMARY

A total of 39 *Mannheimia haemolytica* from cattle in the Tokachi area from 1994 to 2006 were examined for serotyping, with an antibiotics sensitivity test and pulse field gel electrophoresis (PFGE). Twenty-one isolates (53.8%) were serotype 1, sixteen isolates (41%) were serotype 6 and two isolates were serotype 2 and untypable. Serotype 1 strains had been isolated continually, but had serotype 6 strains for the first time in 1999. Serotype 6 strains were isolated in greater number than serotype 1 strains starting 2004. Eighteen isolates of serotype 1 and 15 isolates of serotype 6 showed the same PFGE pattern. It was suggested that closely related isolates of serotype 1 and 6 were prevalent in the Tokachi area. Fifteen isolates of serotype 6 were multidrug resistant to antibiotics including SM, KM, CP, NA, ERFX. MIC<sub>90</sub>s of NA, ERFX and CP were also high in serotype 6 strains. Most of these multidrug-resistance serotype 6 strains were isolated from Holstein or F1 (Holstein × Japanese Black Beef) calves for meat.

— Key words : Bovine Respiratory Disease Complex, *Mannheimia haemolytica*, multidrug-resistance, Serotype 6.

† Correspondence to : Yuko TAKAGI (Hokkaido Tokachi Livestock Hygiene Service Center)

59-6 Kisen, Kawanishicho, Obihiro-shi, 089-1182, Japan

TEL 0155-59-2021 FAX 0155-53-4121 E-mail : takagi.yuuko@pref.hokkaido.lg.jp

— J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 64, 215 ~ 220 (2011) —