

Histophilus somni が分離された乳房炎の1症例大石大樹^{1)†} 蓮田安信¹⁾ 中常路子²⁾ 上野勇一³⁾

- 1) 山口県中部家畜保健衛生所 (〒754-0897 山口市嘉川 671-5)
 2) 山口県農業共済組合中部地区家畜診療所 (〒754-0002 山口市小郡下郷 2276-6)
 3) 国研農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究部門 (〒305-0856 つくば市観音台 3-1-5)

(2017年1月17日受付・2017年8月18日受理)

要 約

2015年4月下旬、山口県中部の酪農場で6歳のホルスタイン種が左前後乳房で乳房炎を発症した。治療後いったん改善したが、5月上旬に左前乳房炎が再発し、細菌検査で*Histophilus somni*が 1.7×10^4 CFU/ml分離された。抗菌薬治療実施後も慢性化し、6月中旬に盲乳処置された。分離後の当該牛追跡調査及び同居牛スクリーニング検査では*H. somni*は分離されなかった。主要外膜蛋白質(MOMP)遺伝子塩基配列解析の結果、本症例の分離株は1999～2015年に山口県の牛から分離された*H. somni* 22株とは異なるクレードに分類され、過去の県内分離株とは由来が異なると推察された。海外の症例と同様に、*H. somni*の乳房炎は単独発生で慢性化する傾向にあることが本症例から再確認された。——キーワード：*Histophilus somni*、主要外膜蛋白(MOMP)、乳房炎。

-----日獣会誌 70, 735～739 (2017)

Histophilus somni (*H. somni*) はグラム陰性、多形性を示す非運動性の通性嫌気性桿菌で牛では血栓塞栓性髄膜脳脊髄炎(Thromboembolic meningoencephalitis: TME)のほか、敗血症、牛の呼吸器病症候群(Bovine Respiratory Disease Complex: BRDC)、心筋炎、関節炎、子宮内膜炎、流産、乳房炎等の原因となる[1]。また、臨床的に健康な牛の鼻腔や生殖器からも分離される[2, 3]。山口県では過去の病性鑑定においてTME、BRDC及び心筋炎を呈した牛等から本菌が分離されている。

今回、山口県中部の搾乳牛約50頭を飼養するフリーストールの酪農場において、乳房炎を発症した牛の乳汁から*H. somni*が分離された。*H. somni*による乳房炎は1980～1990年代にスイス、カナダ等で散発している[6-9]が、国内の症例報告は見当たらない。そこで当該牛の経過を観察するとともに、本症例の分離株について、山口県における過去の分離株との性状比較を実施した。

材 料 及 び 方 法

発症牛：2009年5月25日生まれの自家産のホルスタ

イン種雌牛。

細菌学的検査：2015年5月11日に左前乳房から採材した乳汁100μlを5%羊血液寒天培地(血液寒天基礎培地No. 2, 関東化学(株), 東京)(綿羊脱線血, 日本バイオテスト研究所(株), 埼玉)に塗抹後、37℃ 48時間5%CO₂培養を行った。分離株に対してはグラム染色、カタラーゼ試験、オキシダーゼ試験(チトクローム・オキシダーゼ試験用紙「ニッスイ」, 日水製薬(株), 東京)、OF試験(OF基礎培地, 栄研化学(株), 東京)を実施後、ApiNH(シスメックス・ビオメリュー(株), 東京)を用いて同定を行った。追跡調査として、左前乳房の乳汁を用いて計4回(5月19日, 5月23日, 5月30日, 6月5日)の培養検査を実施した。

遺伝子検査：5月11日に採材した左前乳汁及び分離株から市販試薬(シカジーニアスDNA抽出試薬, 関東化学(株), 東京)によりDNAを抽出し、16S rRNA遺伝子領域を標的とした*H. somni*特異的PCR[4]を実施した。

同居牛スクリーニング検査：*H. somni*の浸潤状況を把握するため、2015年5月27日に乳房炎乳, 体細胞数の高い牛の乳汁4頭5検体及びバルク乳を採材し、細菌

† 連絡責任者：大石大樹(山口県中部家畜保健衛生所)

〒754-0897 山口市嘉川 671-5 ☎ 083-989-2517 FAX 083-989-2518

E-mail: ohishi.daiki@pref.yamaguchi.lg.jp

学的検査と同様の方法で実施した。

性状検査：1999～2015年に山口県で病性鑑定を実施した牛から分離された13農場（A～N農場）由来の*H. somni*計23株を用いて薬剤感受性試験及び主要外膜蛋白質（Major Outer Membrane Protein：MOMP）遺伝子の塩基配列に基づく系統樹解析を実施した。使用菌株の内訳は呼吸器病由来11株、心筋炎由来5株、心筋炎発生農場同居健康牛の鼻腔由来3株、TME由来2株、腹膜炎由来1株、乳房炎由来（本症例）1株であった（図）。

薬剤感受性試験ではMueller Hinton Agar（日本ベクトン・ディッキンソン株、東京）を基礎培地としたミューラーヒントンチョコレート寒天培地を用いて、1濃度ディスク法により以下の11薬剤について実施した。

PCG：ペニシリン，ABPC：アンピシリン，CEZ：セファゾリン，SM：ストレプトマイシン，GM：ゲンタマイシン，EM：エリスロマイシン，OTC：オキシテトラサイクリン，CP：クロラムフェニコール，SXT：スルフアメトキサゾール・トリメトプリム合剤，NA：ナリジクス酸（以上センシディスク，日本ベクトン・ディッキンソン株、東京），ERFX：エンロフロキサシン（KBディスク，栄研化学株、東京）。

MOMP 遺伝子の塩基配列は、データベース上の当該遺伝子周辺領域の配列を参考に設計したプライマー（5'-AGTTCAAAAATTATTCAAAAAGTGTGATTTAGATC-3'及び5'-AGCGAAATTTTGGCTAGCCTACC-3'）を用いてPCR増幅した後、ダイレクトシーケンス法により遺伝子全長（1,143～1,155bp）の塩基配列を決定した。得られた塩基配列をDDBJデータベースに登録した（図）後、遺伝子解析ソフトMEGA6 [5]を用いて系統樹解析を実施した。

成 績

治療経過：当該牛は2015年4月24日に3産目の子牛を分娩後、4月27日に体温39.9℃、呼吸速迫し、やや元気消失、左前及び左後乳房の乳汁中にP.Lテスター（日本全薬工業株、福島）で凝集が認められるとの稟告から、アンピシリン・クロキサシリン合剤（インタゲン、フジタ製薬株、東京）、フルニキシン製剤（フォーベット、ナガセ医薬品株、兵庫）が全身投与され、当該乳房にはセファメジン（セファメジンQR、日本全薬工業株、福島）が投与された。その後症状は改善した。

初診から14日後の5月11日に体温40.0℃を呈し、再び左前乳房腫脹、乳汁中に凝集が認められたため、左前乳汁を採材し、細菌学的検査及び分離株の薬剤感受性試験を実施した。当該乳房は熱感及び硬結はなく、乳量は減少したが凝集以外の乳性状は正常であった。5月15日、体温40.0℃、呼吸速迫、左前乳房腫脹、乳汁中に

凝集が認められたため、分離株に感受性の抗菌薬（セファゾリン注「フジタ」、フジタ製薬株、東京）（セファピリンL、フジタ製薬株、東京）が投与された。5月19日、体温39.3℃、呼吸速迫、乳房の腫大は軽減したが、引き続き乳汁中に凝集が認められたため、アンピシリン・クロキサシリン合剤及びジクロキサリンナトリウム（泌乳期用ジクロキサシリンジ、共立製薬株、東京）が投与された。5月22日には体温が38.5℃と改善したが活力低下し、乳汁中からケトン体（サンケトペーパー、日本全薬工業株、福島）が確認されたことから塩酸オキシテトラサイクリン注射液（エンゲマイシン、株インターベット、東京）が投与され、補液が行われた。左前乳房にはオキシテトラサイクリン（オキシテトラサイクリン乳房炎用液、日本全薬工業株、福島）が投与された。5月26日には体温39.0℃、食欲は廃絶し、左胸部でping音が確認されたため、第四胃変位整復術が実施された。

その後、当該乳房は抗菌薬投与を中止すると凝集が確認され続けたため、6月中旬に畜主により盲乳処置された。

細菌学的検査：5月11日に採材した乳汁から小コロニーが 1.7×10^4 CFU/ml分離された。分離株はグラム陰性桿菌、カタラーゼ陰性、オキシダーゼ陽性、OF試験陰性であった。ApiNHの結果はプロファイルNo. 3200であり、*H. somni*（99.9% id）と同定された。

追跡検査では3回目（5月30日）まで*H. somni*を含む有意菌は分離されなかったが、4回目（6月5日）にCoagulase Negative Staphylococci（CNS）が少量分離された。

遺伝子検査：分離株及び乳汁の両方から400bp付近に増幅断片が検出された。

同居牛スクリーニング検査：*Streptococcus*属菌やCNSが分離されたが、すべての材料で*H. somni*は分離されなかった。

性状検査：薬剤感受性試験では本症例の分離株はEMとCPで耐性、SMで中間を示し、他の薬剤には感受性であった（表）。同一の感受性パターンを示した株は2008年に県東部地域で呼吸器病の肺から分離された1株（株No. BD1307）のみであった。

MOMP 遺伝子塩基配列解析では、山口県の分離株はMOMP 遺伝子多型に基づき5つのクレードに大別された（図）。本症例の分離株（BD1314）は、過去に分離された22株とは別のクレードに配置された（図）。

考 察

*H. somni*による乳房炎は1980～1990年代にスイス、カナダ等で複数報告されている [6-9]。いずれの報告においても発症牛は1頭であり、単独の発生であった。

表 薬剤感受性試験成績

判定/薬剤	PCG	ABPC	CEZ	SM	GM	EM	OTC	CP	SXT	NA	ERFX
感受性	20	22	23	3	23	1	17	14	20	22	23
中間	0	0	0	8	0	8	2	0	0	1	0
耐性	3	1	0	12	0	14	4	9	3	0	0

数字は株数, ■は本症例分離株

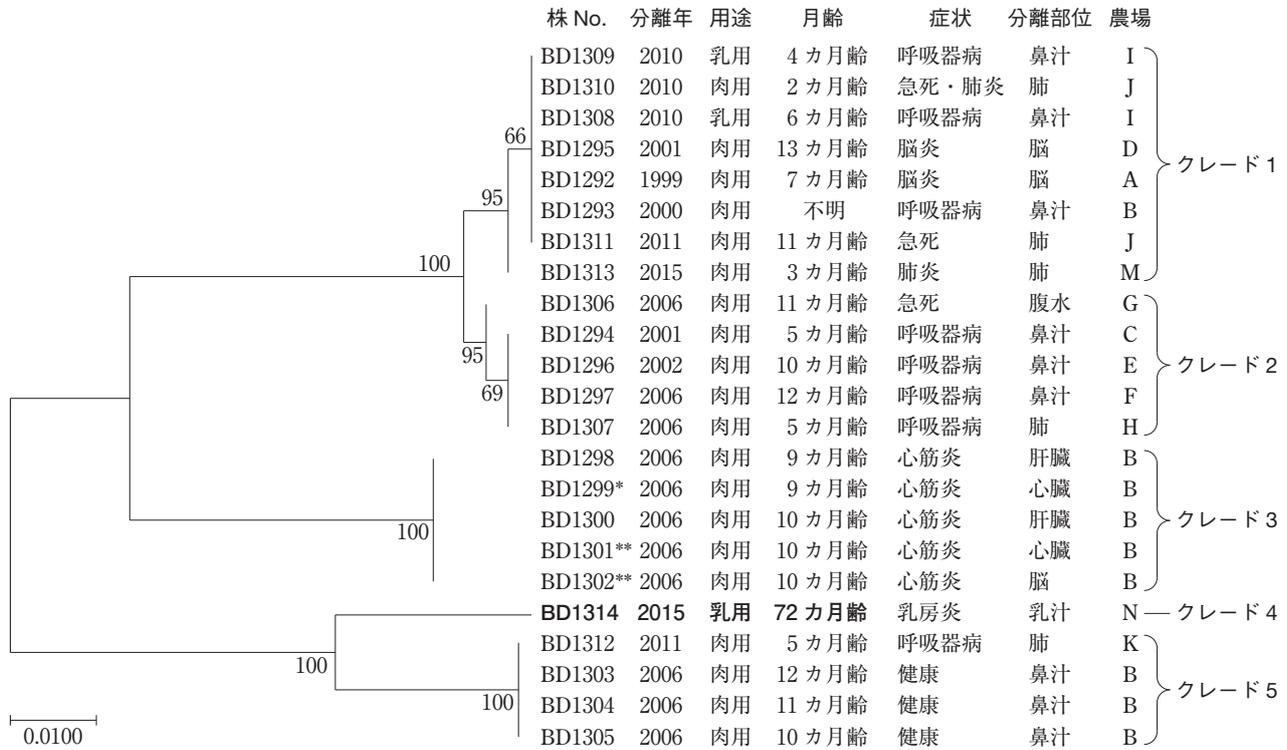


図 MOMP 遺伝子塩基配列に基づく系統樹解析結果 (近隣結合法)

各分岐の数字はブートストラップ解析を1,000回反復した際の信頼度 (%) を示す。

図左下のスケールバーは1塩基あたりの変異頻度を示す。

解析に用いた菌株の情報は系統樹の右側に記載し、本症例分離株の情報は太字で示した。

また、本試験では系統樹の形状から使用菌株を5つのクレードに分類した。

*BD1298と同一個体 **BD1300と同一個体

発症牛の全身症状、乳房の熱感及び硬結の有無、分離菌量等不明な部分も多いが [6-9]、乳性状についてはクリーム状、灰色、水様、黄色など種々の報告があり、乳汁中の凝集についても白色、血液塊、フィブリン塊などさまざまであった [6-8]。抗菌薬治療実施後も慢性化し、その後回復しない症例が多く [6-8]、治癒が認められたのは1983年のスイスの1例のみであった [10]。

Hazlettら [10] はホルスタイン種搾乳牛6頭の乳房内へTME由来 *H. somni* 基準株 5.0×10^4 CFU/ml を実験的に投与したところ、3頭は菌血症及び内毒素血症により急性壊疽性乳房炎となり、3頭は線維化を伴い1年後も菌排泄が認められる慢性乳房炎の経過をたどったと報告している。このような2つの異なるパターンを示した理由については、宿主の免疫応答、特に個体ごとの好

中球の遊走能の違いによるものと推察している。

本症例では39~40℃の発熱及び呼吸速迫等の全身症状が認められた。当該乳房は腫大が認められたが、熱感や硬結は観察期間を通して認められず、乳性状については白色凝集以外に異常は認められなかった。*H. somni* 分離後に感受性の抗生物質投与が行われ、その後の追跡調査で菌が分離されていないことから、抗菌薬治療により乳房内の菌が検出限界以下まで減少したと考えられた。一方、当該乳房は治療後も凝集が確認され続け、既報の多くと同様に慢性化した。乳汁中の凝集のおもな成分は乳房内で微生物を貪食し終えたマクロファージや好中球の塊とされていることから [11]、本症例では、乳房内の *H. somni* は減少したが宿主免疫応答が継続していた、あるいは他の未検出の病原体が関与した可能性が

考えられる。

本症例の発生後、*H. somni* の浸潤状況を調べることを目的とし、畜主への聞き取り及び同居牛のスクリーニング検査を実施したが、同時期に乳房炎を発症した牛はおらず、スクリーニング検査結果も陰性であったことから、牛群内の伝播はなかったと推察された。Grinberg ら [8] は *H. somni* の乳房炎発生後、同居牛の乳汁 300 検体を用いてスクリーニング検査を実施したが、*H. somni* は分離されなかったと報告している。他の野外報告においても 1 頭の単独発生であったことから、*H. somni* の乳房炎が伝播する可能性は低いと考えられた。しかし、感染実験において慢性経過をたどった場合 [10] や、発症 8 週間後も菌が分離された野外症例 [8] も存在することから、未治療の場合には環境中への菌排出が続く可能性は否定できないと考えられた。

Hazlett ら [10] は臨床型乳房炎を示した牛の乳汁サンプル 173 検体及びと畜場で採材した肉用牛 41 頭の 153 乳房の乳腺を用いて *H. somni* の分離を試みたが、すべての検体で *H. somni* は分離されなかったと報告している。また Wedderkopp [9] は、臨床型乳房炎の牛 3,783 頭 6,809 検体について細菌学的検査を実施したところ、*H. somni* は 1 検体からのみ分離され、分離された牛は臨床的に緩やかな症状であったと報告している。これらの報告及び国内における症例報告がないことから、*H. somni* 乳房炎の発生は非常にまれであると推察された。

当該農場では TME や *H. somni* による呼吸器病、流産等の発生は過去に認められていない。搾乳機器や牛舎環境の細菌検査は実施していないため、乳房への感染経路は不明であった。感染経路の究明にはさらに症例を蓄積していく必要があると考えられた。また、初診時 (4 月 27 日) の抗菌薬治療により菌交代症が起こった後に日和見的に *H. somni* が増殖し、今回の発症に至った可能性も考えられた。

本症例の分離株と過去分離株との性状比較において、薬剤感受性試験では過去分離株と明確な差は認められなかった。1 株のみ同一のパターンを示したが、分離年、分離地域及び品種が異なっており、農場間の疫学的関連性も認められなかった。*H. somni* の疫学解析に関しては一般的に用いられる手法は存在しないが、(国研)農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究部門のグループは株間で MOMP の遺伝子が多様であることを報告し、遺伝子多型に基づく型別を実施している [12] (及び未公表データ)。今回、本症例分離株及び過去の県内分離株を用いて MOMP 遺伝子塩基配列解析を実施した結果、本症例分離株は過去分離株とは別のクレードに属した (図)。MOMP 遺伝子多型が *H. somni* 感染症の病態

とどの程度関連するか、あるいは本菌の遺伝的多様性をどの程度反映するかについては今後のデータの蓄積が必要であるが、本症例分離株は過去分離株とは由来が異なると考えられた。

H. somni の乳房炎の発生はまれであり、今回の症例も過去の県内分離株とは異なるクレードの株による単独発生と考えられるが、発症すると治療後も慢性化するなど宿主へのダメージが大きく、経済的損失は大きい。いまだ症例数が少なく実態が不明な部分も多いため、今後も本菌の検出も視野に入れた乳汁検査を実施し、知見を蓄積していく必要があると考えられた。

引用文献

- [1] Harris FW, Janzen ED : The *Haemophilus somnus* disease complex (Hemophilosis): A review, *Can Vet J*, 30, 816-822 (1989)
- [2] Otomaru K : Measures for bovine respiratory disease complex with vaccination in calves, *The Journal of Farm Animal in Infectious Disease*, 2, 105-110 (2013)
- [3] Kwicencien JM, Little PB : *Haemophilus somnus* and reproductive disease in the cow: A review, *Can Vet J*, 32, 595-601 (1991)
- [4] Angen O, Ahrens P, Tegtmeier C : Development of a PCR test for identification of *Haemophilus somnus* in pure and mixed cultures, *Vet Microbiol*, 63, 39-48 (1998)
- [5] Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipinski A, Kumar, S : MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0, *Mol Biol Evol*, 30, 2725-2729 (2013)
- [6] Higgins R, Martin JR, Larouche Y, Goyette G : Mastitis caused by *Haemophilus somnus* in a dairy cow, *Can Vet J*, 28, 117-119 (1987)
- [7] Armstrong KR, Osborne AD, Janzen ED : *Haemophilus somnus* Mastitis in a Dairy Cow, *Can Vet J*, 27, 211-212 (1986)
- [8] Grinberg A, Khatib N, Kosak A : Chronic mastitis caused by *Haemophilus somnus* in a dairy cow, *Can Vet J*, 34, 236-237 (1993)
- [9] Wedderkopp A : Chronic mastitis caused by *Haemophilus somnus*-Unlikely to be a causative microbiological agent in bovine clinical mastitis in Denmark, *Acta Vet scand*, 38, 193-195 (1997)
- [10] Hazlett MJ, Little PB, Barnum DA, Maxie MG, Leslie KE, Miller RB : *Haemophilus somnus*: Investigation of its potential role bovine mastitis, *Am J Vet Res*, 46, 2229-2234 (1985)
- [11] 明石博臣, 江口正志, 神尾次彦, 加茂前秀夫, 酒井 豊, 芳賀 猛, 眞鍋 昇 : 乳房炎, 牛病学, 第 3 版, 309, 近代出版, 東京 (2013)
- [12] Khan MS, Tanaka A, Ide H, Hoshinoo K, Hanafusa Y, Tagawa Y : Molecular characterization of the major outer membrane protein of *Haemophilus somnus*, *Vet Microbiol*, 107, 179-192 (2005)

Occurrence of Mastitis Associated with *Histophilus somni*

Daiki OHISHI^{1)†}, Yasunobu HASUTA¹⁾, Michiko NAKATUNE²⁾ and Yuichi UENO³⁾

- 1) Yamaguchi Prefecture Central Livestock Hygiene Service Center, 671-5 Kagawa, Yamaguchi, 754-0897, Japan
- 2) Yamaguchi Prefectural Agricultural Mutual Aid Association Central Livestock Clinic, 2276-6 Ogoori Shimogo, Yamaguchi, 754-0002, Japan
- 3) National Institute of Animal Health, National Agriculture and Food Research Organization, 3-1-5 Kannondai, Tsukuba, 305-0856, Japan

SUMMARY

At the end of April 2015, a six-year-old Holstein cow suffered from mastitis in the left fore and rear quarters at a dairy farm in the middle of Yamaguchi Prefecture. It partially recovered after treatment, but relapsed at the beginning of May. *Histophilus somni* was isolated from a milk sample of the left forequarter with a bacterial count of 1.7×10^4 CFU/ml. Mastitis became chronic after a series of antibiotic treatments and the affected quarter was permanently dried off in mid-June. One month later, *H. somni* was not isolated from this cow or other cattle at the farm. Between 1999 and 2015, 23 total *H. somni* strains were isolated from clinical samples in Yamaguchi Prefecture and were examined by sequence analysis of its major outer membrane protein (MOMP) gene. Phylogenetic analysis of the MOMP gene indicated that the strain in this study was genetically unique from the other 22 strains of *H. somni*. The current study suggests that mastitis with *H. somni* is sporadic and has a tendency to become chronic.

— Key words : *Histophilus somni*, major outer membrane protein (MOMP), mastitis.

† Correspondence to : Daiki OHISHI (Yamaguchi Prefecture Central Livestock Hygiene Service Center)

671-5 Kagawa, Yamaguchi, 754-0897, Japan

TEL 083-989-2517 FAX 083-989-2518 E-mail : ohishi.daiki@pref.yamaguchi.lg.jp

— J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 70, 735 ~ 739 (2017)