

牛の壊死性化膿性心筋炎・線維索性心外膜炎を 主徴とする *Histophilus somni* 感染症の 病理学的及び細菌学的解析

古田信道^{1)†} 上野勇一²⁾ 小嶋 暢¹⁾

- 1) 山形県中央家畜保健衛生所 (〒 990-2161 山形市漆山 736)
2) 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6月14日受付・2017年10月25日受理)

要 約

重度の心臓病変を認めた牛の *Histophilus somni* 感染症事例について病理学的に解析するとともに、本症例分離菌株(本分離株)の主要外膜蛋白質(MOMP)の抗原型及び培養細胞(EBTr細胞)に対する傷害性を過去の県内分離株2株(脳炎由来株及び肺炎由来株)と比較した。患者は絨毛心(線維索性心外膜炎)を認め、心等から *H. somni* を分離した。MOMP抗原型別の結果、本分離株及び肺炎由来株は3c型に、脳炎由来株は1型に分類された。培養細胞に対する傷害性を株間で比較するため、上記3株をEBTr細胞に接種したところ、本分離株及び肺炎由来株は脳炎由来株と比較して細胞傷害性は軽微であった。以上の結果から、絨毛心は比較的細胞傷害性の弱い本分離株が緩やかに細胞を傷害し慢性経過を辿ったことが一因で形成されたと考察した。

——キーワード：細胞傷害性、線維索性心外膜炎、*Histophilus somni*、MOMP抗原型。

-----日獣会誌 71, 89~94 (2018)

牛の *Histophilus somni* 感染症は、血栓塞栓性髄膜脳脊髄炎、肺炎、流死産、関節炎等の多様な疾患を引き起こす疾病である [1]。おもに肥育牛に発生し、臨床的には呼吸器症状のほか、運動失調や麻痺、昏睡等の神経症状を認める。重篤化した場合の多くは急性死に至ることから、家畜衛生分野において重要な感染症とされているが、本症例のような心筋炎や心外膜炎を呈した症例報告は国内では少ない [2, 3]。原因菌である *H. somni* は、4種のモノクローナル抗体(mAb)に対する主要外膜蛋白質(MOMP)の反応の有無に基づいて1型~4型の4つに分類され、3型はさらに分子量により3a型~3c型に分類される。このMOMP抗原型と宿主の病態には関連が認められることが報告されている [4]。そこで本研究では、山形県において発生した絨毛心を呈し死亡した牛の *H. somni* 感染症1症例の詳細について病理学的に解析するとともに、分離菌株のMOMP抗原型を過去の由来の異なる県内分離株と比較した。また、呼吸器粘

膜面から血中への本菌の移行には、粘膜上皮細胞に対する傷害作用が関与することが培養細胞を用いた実験で示唆されていることから [5, 6]、本症例分離株(以下、心臓病変由来株)と過去の県内分離株を用いて培養細胞に対する傷害性を比較検討した。

材料及び方法

供試動物：患者は雌の黒毛和種牛(12カ月齢)、用途は肥育。平成28年5月20日に歩行異常、循環障害にて初診。22日より発熱はないが起立不能となり、24日に死亡し、同日病性鑑定を実施した。*H. somni* ワクチンは未接種だった。

供試菌株：供試株は、脳炎由来株(品種：黒毛和種、月齢：23カ月齢、性別：不明、分離時期：斃死後12時間以内、分離場所：脳)、肺炎由来株(品種：黒毛和種、月齢：2カ月齢、性別：雄、分離時期：斃死後12時間以内、分離場所：肺)、心臓病変由来株(品種：黒毛和

† 連絡責任者：古田信道(山形県中央家畜保健衛生所)

表1 供試株

由来	品種	月齢	性別	分離時期	分離場所
脳炎由来株	黒毛和種	23カ月齢	不明	斃死後12時間以内	脳
肺炎由来株	黒毛和種	2カ月齢	雄	斃死後12時間以内	肺
心臓病変由来株	黒毛和種	12カ月齢	雌	斃死後6時間以内	心臓

種, 月齢: 12カ月齢, 性別: 雌, 分離時期: 斃死後6時間以内, 分離場所: 心臓) を用いた (表1)。

病理組織検査: 20%中性緩衝ホルマリン液で固定し, パラフィン包埋して薄切後, ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色を行った。免疫組織化学的染色は, 抗 *H. somni* 家兎免疫血清 (国研農業・食品産業技術総合研究機構 動物衛生研究部門より譲渡) を 1:500 倍に希釈して一次抗体とし, その後の反応は DAB 法 (Diaminobenzidine) で実施した。

細菌学的検査: 菌分離は, 5%羊血液寒天培地 (ベクトン・ディッキンソン株, 東京) に脳, 心臓, 肺, 肝臓, 腎臓及び脾臓の新鮮断面をスタンプしたものを, 37°C, 24時間5%炭酸ガス及び嫌気培養することにより実施した。心臓病変由来株は, 心臓スタンプの培養により得られた分離菌を用いて, 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, 東京) 及び 16S rRNA 遺伝子を標的とした菌種特異的 PCR 法により菌種同定した [7]。菌数の測定については PBS を用いて 10%臓器乳剤を作成し, 5%羊血液寒天培地で 37°C, 24時間, 5%炭酸ガス下にて培養し, コロニー数を計測した。過去の県内分離株 2 株 (脳炎由来株及び肺炎由来株) は, 20%グリセロール加 BHI (Brain heart infusion) プロスにて凍結保存していたものを同様の方法で培養した。MOMP 抗原型は, 4種類の mAb を用いたウエスタンブロッティング (mAb 59-8-2, 81-7-19 及び 51-21-4) あるいはドットブロッティング (mAb 43-4) を Tagawa ら [4] 及び Ueno ら [8] と同様の方法で実施し, その結果の組み合わせにより判定した。

細胞培養: 牛胚気管由来細胞 (EBTr 細胞) (国研医薬基盤・健康・栄養研究所より分譲) を抗生物質無添加 MEM 培地 (Eagle's MEM 培地 ③, 日水製薬株, 東京) を用いて, 37°C, 5%炭酸ガス下で静置培養を行った。

分離株の細胞傷害性試験: 心臓病変由来株及び過去県内分離株 (脳炎由来株及び肺炎由来株) を用いた。細胞傷害性については, CCK-8 (Cell Counting Kit-8, 株同仁化学研究所, 熊本) を用いた生細胞の細胞増殖性試

表2 *H. somni* 分離結果

	心	肺	肝	腎	脾	大脳	脳幹部	脳脊髄液
<i>H. somni</i> (分離培養)	+	+	-	-	-	+	+	+
菌数 (cfu/g)	2×10 ⁷	2×10 ⁷	NT	NT	NT	3×10 ⁴	1×10 ⁵	NT

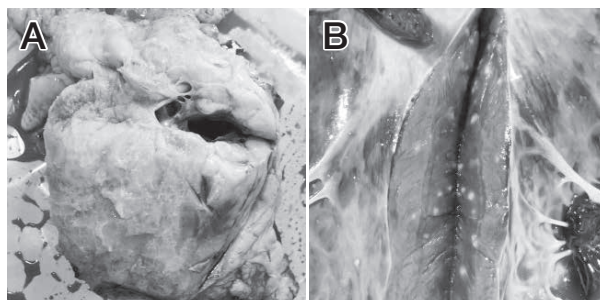


図1 心臓の剖検写真

A: 外貌は高度な絨毛心を呈す。

B: 左右心房室の断面においては粟粒大の白斑が多数存在。

験及び鏡検にて確認した。

CCK-8 を用いた細胞増殖性試験では, 既報 [9] に従い EBTr 細胞を細胞培養用 96 穴プレートに播種 (2.0×10⁴ cells/well) し, 抗生剤無添加 MEM 培地で 24 時間培養した。その後, 細胞に各菌株を multiplicity of infection (MOI) 1, MOI10, MOI100 及び MOI300 となるようにそれぞれ接種し, 24 時間後に同社プロトコール通りにマイクロプレートリーダー (iMark, Bio-Rad Laboratories, U.S.A.) を用いて吸光値を計測した。鏡検では, 上記と同様に 24 穴プレート及び抗生剤無添加 MEM 培地で培養した細胞 (6.0×10⁴ cells/well) に MOI1 となるように各菌を接種し, 菌の接種から 5 及び 24 時間後に顕微鏡 (TH4-100, オリンパス株, 東京) を用いて細胞を観察し, 傷害性の有無を確認した。

成 績

剖検所見: 心臓は絨毛心を呈し, 左右心房室の断面においては粟粒大の白斑が多数存在していた (図1)。肺は左前葉に硬結部位が存在し, 断面は膨隆し膿瘍を認めた。脳では脳溝において白色混濁, 軽度に血管充盈を認めた。また皮下水腫を認めた。

細菌分離検査: 複数臓器及び脳脊髄液 (表2) から純培養的にグラム陰性桿菌を分離し, 簡易同定キット及び PCR 法により, 分離菌を *H. somni* と同定した。PBS による 10%臓器乳剤を用いて各臓器 1g 当たりのコロニーフォーミングユニット (cfu) を計算したところ, 心臓及び肺から 2.0×10⁷ cfu/g, 大脳及び脳幹部からそ

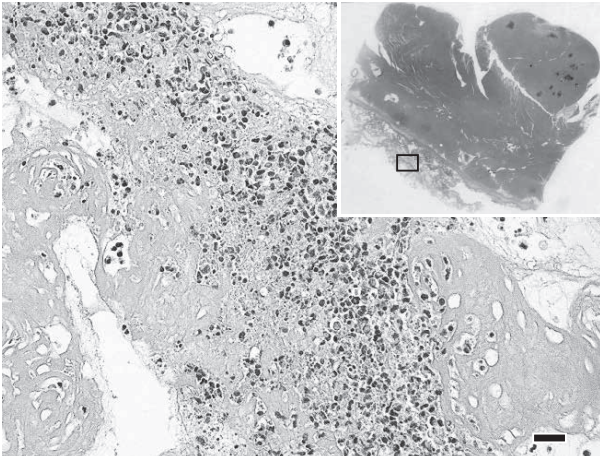


図2 心外膜のHE染色像

心外膜においては、燕麦状細胞・好中球・マクロファージ・線維芽細胞浸潤、また線維素沈着からなる線維素性心外膜炎を認めた (Bar=10 μ m)。

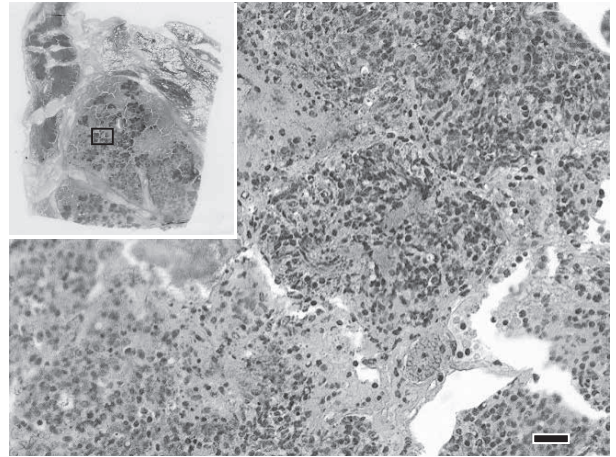


図3 肺のHE染色像

肺においては細菌塊を中心とし燕麦状細胞・好中球・線維芽細胞・細胞頽廃物からなる化膿性壊死性気管支肺炎を認めた (Bar=10 μ m)。

表3 既報 [4, 8] の4つのモノクローナル抗体 (mAb) に対する反応性と分子量に基づく MOMP の抗原型別

菌株	抗原型	モノクローナル抗体(mAb)の反応性				分子量 (kDa)
		59-8-2	81-7-19	52-21-4	43-4	
脳炎由来株	1	+	+	+	+	>40
肺炎由来株	3c	+	+	-	-	>40
本症例由来株	3c	+	+	-	-	>40

それぞれ 3.0×10^4 及び 1.0×10^5 cfu/g の *H. somni* を確認した (表2)。MOMP 抗原型別の結果、心臓病由来株と過去の肺炎由来株は産生する MOMP が4つの mAb のうち2つ (59-8-2 及び 81-7-19) に認識され、40kDa 以上の分子量であったため 3c 型に、脳炎由来株は産生する MOMP が4つの mAb すべてに認識され、40kDa 以上の分子量であったため 1 型 [4] にそれぞれ分類された (表3)。

組織所見：心臓において内腔近傍に巣状壊死が多発。壊死巣は細菌塊及び細胞頽廃物からなり、壊死巣を囲むように燕麦状に変形した細胞、好中球、線維芽細胞及びマクロファージが高度に、リンパ球が軽度に浸潤していた。心外膜においては燕麦状細胞、好中球、マクロファージ及び線維芽細胞が浸潤巣を形成し、また高度にフィブリン沈着を認めた (図2)。肺においては細菌塊を中心とし燕麦状細胞、好中球、線維芽細胞及び細胞頽廃物による広範囲な壊死巣を認め、肺胞腔に細菌塊、好中球、マクロファージ、細胞頽廃物、フィブリン及び漿液が高度に貯留していた (図3)。脳幹部、特に橋においては好中球、マクロファージ、線維素及び細胞頽廃物を

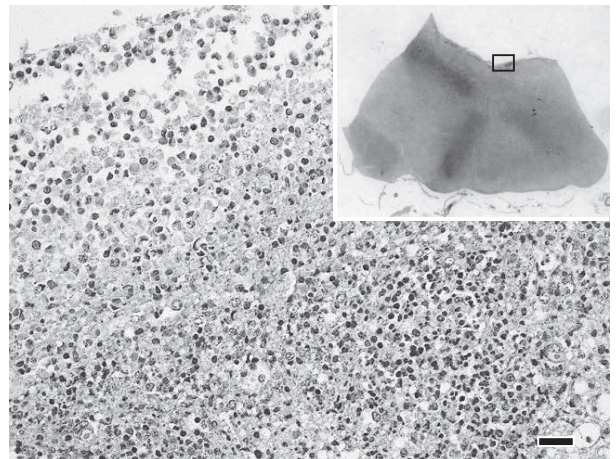


図4 橋のHE染色像

橋においては好中球・マクロファージ・線維素・細胞頽廃物を主とした化膿性髄膜炎を認めた (Bar=10 μ m)。

主とした髄膜炎を認め、周囲皮質において限局的な壊死巣及びマクロファージによる軽度の囲管性細胞浸潤を認めた (図4)。抗 *H. somni* 抗体を用いた免疫染色において、陽性抗原を心臓、心外膜及び肺の壊死巣内のマクロファージや好中球の周囲に高度に、髄膜炎内のマクロファージや好中球の周囲に軽度に認めた (図5)。

細胞傷害性試験：CCK-8 を用いた細胞増殖性試験において、供試菌3株をそれぞれ接種した細胞の吸光値を計測したところ、心臓病由来株を接種した細胞では脳炎由来株を接種した細胞よりもすべての MOI 値において有意に高い値 ($P < 0.05$) を認めた (図6)。また肺炎由来株を接種した細胞では脳炎由来株を接種した細胞よりも、MOI300 の場合を除いて、有意に高い値 ($P < 0.05$) を認めた (図6)。このことから、本症例由来株

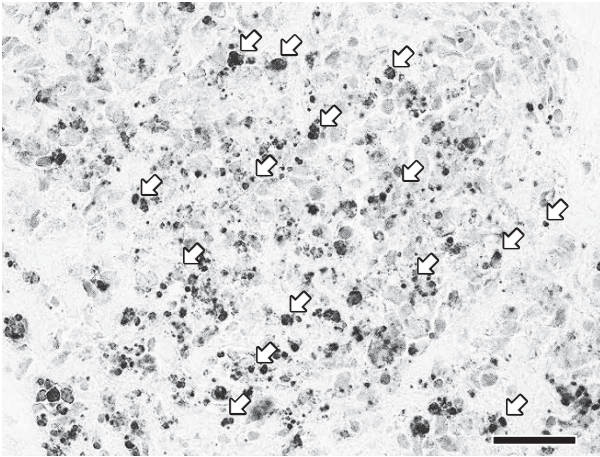


図5 心外膜の抗 *H. somni* 抗体を用いた免疫組織化学的染色像

抗 *H. somni* を用いた免疫染色の結果、心外膜において燕麦状細胞・マクロファージ・好中球の周囲に高度に陽性抗原を認めた。矢印は陽性抗原の一部を示す (Bar=10 μ m)。

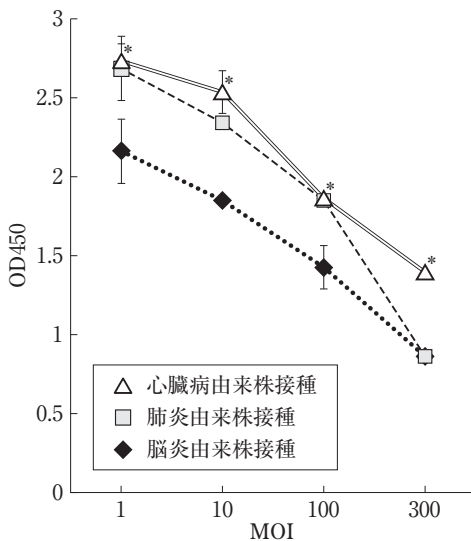


図6 CCK-8を用いた細胞傷害性試験

心臓由来株を細胞に接種した場合の吸光値は、いずれの MOI 値においても、脳炎由来株のそれと比較して有意に高値を示した。肺炎由来株を接種した場合は、MOI300 の場合を除いて、脳炎由来株よりも有意に高い吸光値を示した (*: 本症例由来株と脳炎由来株を比較して有意差 (*t* 検定, $P < 0.05$) が認められた場合)。図は 3 回の試験の平均値及び標準誤差を示した。CCK8 を菌接種より 24 時間後に加え、37℃ で 2 時間反応させたのち吸光度を計測した。

及び肺炎由来株は脳炎由来株よりも EBtr 細胞に対する傷害性が軽微であることが示された。また、細胞に対し接種する菌数を MOI1, MOI10, MOI100, MOI300 と増やした場合に、どの株においても吸光値の減少が認められたことから、接種する菌数の増加に伴う傷害性の

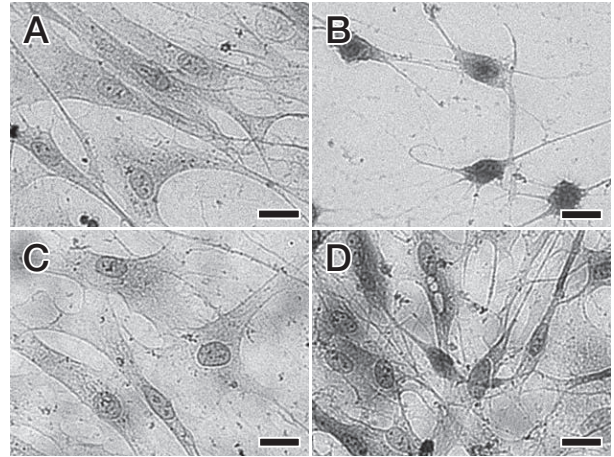


図7 鏡検による細胞傷害性の確認 (菌処理後 5 時間)

- A: 無接種
- B: 脳炎由来株接種
- C: 肺炎由来株接種
- D: 心臓由来株接種 (Bar=10 μ m)

肺炎由来株もしくは心臓由来株は、脳炎由来株と比較して細胞傷害性をほとんど示さず。

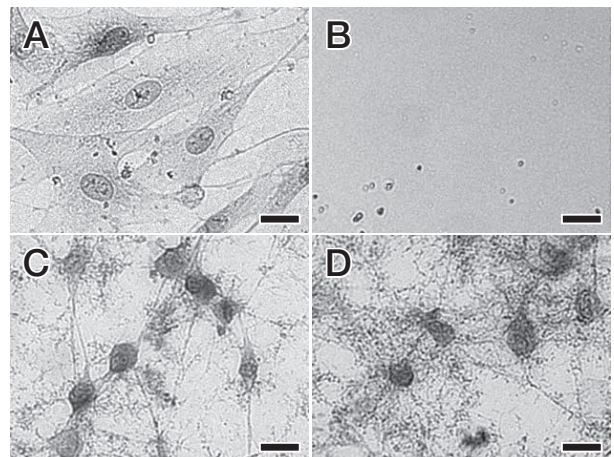


図8 鏡検による細胞傷害性の確認 (菌処理後 24 時間)

- A: 無接種
- B: 脳炎由来株接種
- C: 肺炎由来株接種
- D: 心臓由来株接種 (Bar=10 μ m)

肺炎由来株もしくは心臓由来株を接種した細胞においては細胞質縮小、脳炎由来株においては剝離脱落を示した。

増加が確認された (図6)。次に、各菌株による細胞傷害性の程度を菌感染後 5 及び 24 時間の時点で鏡検にて確認したところ、脳炎由来株を接種した細胞では 5 時間後に細胞質の縮小を認めたが、本症例由来株及び肺炎由来株を接種した細胞においては、ほとんど細胞傷害作用を認めなかった (図7)。さらに 24 時間後には脳炎由来株を接種した細胞はほとんどが剝離脱落していたが、本症例由来株及び肺炎由来株を接種した EBtr 細胞の細胞変性効果は、脳炎由来株の 5 時間感作 (図7B) と同

程度の細胞質の縮小を認めるのみだった (図 8)。

考 察

本症例では、心筋炎、絨毛心 (心外膜炎)、肺炎及び髄膜脳炎を認めた。免疫組織化学的検査の結果、絨毛心は *H. somni* 感染によると判断し、心臓においては牛の *H. somni* による壊死性化膿性心筋炎及び線維素性心外膜炎と診断した。 *H. somni* 感染症における心筋炎の報告は少なく、本症例のような絨毛心を認める症例はまれである [3]。敗血症・髄膜脳脊髄炎を呈した牛の多くは急性経過で死亡することが多いが、本症例の場合、肺及び心臓において重度な組織所見を認め、髄膜脳炎については限局的であり、 *H. somni* 感染症で典型とされる血栓性髄膜脳脊髄炎の所見は認められなかった。また、免疫染色及び菌分離においても脳幹部よりも肺・心臓で *H. somni* を多数認めた。これらの所見から、経気道感染した菌が肺に病変を形成、肺静脈を介して心筋に病変を形成。また、菌は豊富な心臓血管網により心外膜に移行し絨毛心を形成、最終的には肺や心臓で高度に増殖し、敗血症及び髄膜炎を引き起こした結果、死亡に至ったと推察した。

MOMP に類似の他菌種の菌体表面蛋白質では、宿主防御機構からの回避、宿主細胞への付着・侵入等の機能を担うとされており [10]、本菌の MOMP に関しては抗原型と病態に関連があることが報告されている [4]。心臓病変由来株が分類された 3c 型には流産及び健康畜分離株が多く分類され、脳炎由来株が分類された 1 型には髄膜脳脊髄炎由来株の多くや肺炎由来株などの重篤な症状を示した症例由来株が多く分類される [4]。国外で報告された *H. somni* 感染による絨毛心の症例では、感染の慢性化と心外膜線維化との関連が示唆されている [14]。今回の細胞傷害試験において、1 型の脳炎由来株は少菌数かつ短時間で細胞に傷害を与えたのに対し、3c 型の肺炎由来株及び心臓病変由来株では 1 型のそれと比較すると細胞傷害に多菌数かつ時間を要したことから、3c 型の 2 株は 1 型の脳炎由来株よりも細胞傷害性は低いことが示唆された。一方、 *H. somni* 感染症による心筋の膿瘍及び結節形成に関する横山ら [3] の報告によると、敗血症を伴う *H. somni* 感染症例では急性経過で死亡するのが一般的だが、宿主側が強い抵抗性を示す場合、心臓での病変形成に発展することがある。そのため、細胞傷害性の強弱と病態の慢性化との関連性については、病原体側だけでなく、宿主側の要因を考慮する必要がある。本研究の結果だけでは推察の域をでないものの、本症例の絨毛心形成は菌側の一要因として比較的細胞傷害性の弱い 3c 型の *H. somni* 感染による緩やかな病変形成が関与したと推察する。

EBtr 細胞に対する傷害メカニズムに関しては本試験

では検討していないが、他の細胞を用いた実験で明らかになっているのと同様に、高分子量免疫グロブリン結合タンパク質 (IbpA) が関与している可能性がある。IbpA は本菌の菌体外膜蛋白質で、内在する DR1 及び DR2 領域の共通ドメインである Fic ドメインの Rho GTPase 活性制御作用により、マクロファージ由来細胞株や呼吸器上皮由来細胞株に細胞骨格形成障害を引き起こす [11-13]。IbpA を保有しない健康牛由来の 129Pt 株は、マクロファージ系細胞を用いた試験において、細胞の円形化といった細胞傷害性を有さず [15]、牛に対する病原性も低いことが知られている。他の細胞傷害メカニズムとしては、細胞外マトリックスの分解を担うマトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) 1 及び 3 の合成促進による細胞の剥離作用が呼吸器上皮由来細胞株を用いた実験で明らかになっている [5, 6]。本試験で培養細胞に認められた細胞質の縮小や細胞の剥離には、 *H. somni* の培養細胞に対する同様の作用が関与している可能性があることから、さらに今後、培養細胞における細胞骨格形成阻害及び MMP 発現促進作用を菌株間で比較することは、本病が慢性化する仕組みを病原体側から理解するうえで重要であるかもしれない。また、血中に移行した *H. somni* は血管内皮細胞にアポトーシスを誘導し、特に脳において血管の壊死や炎症、血栓形成を引き起こすことで病態を進行させることが報告されているが、そのメカニズムや病原性との関連についてはまだ不明な部分が多い。分離菌株の MOMP 型別結果、宿主の病態や病変の程度、培養細胞に対する傷害作用及び IbpA 遺伝子内 Fic ドメインの菌株間での比較等、さらにデータを蓄積して関連を調べることにより、本菌の病原性について理解が深まると考えられる。

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] 大島寛一 : *Haemophilus somnus* 感染症について, *日獣会誌*, 36, 435-440 (1983)
- [3] 横山栄二, 村上覚史, 山田裕康, 黒田順子, 岸田一則 : *Histophilus somni* による黒毛和種の心筋及び横隔膜膿瘍の 1 例, *日獣会誌*, 58, 275-277 (2005)
- [4] Tagawa Y, Bastida-Corcuera F, Corbeil LB : Immunological characterization of the major outer membrane protein of *Haemophilus somnus*, *Vet Microbiol*, 71, 245-254 (2000)
- [5] Agnes JT, Zekarias B, Shao M, Anderson ML, Gershwin LJ, Corbeil LB : Bovine respiratory syncytial virus and *Histophilus somni* interaction at the alveolar barrier, *Infect Immun*, 81, 2592-2597 (2013)
- [6] Zekarias B, Mattoo S, Worby C, Lehmann J, Rosenbusch RF, Corbeil LB : *Histophilus somni* IbpA DR2/Fic in virulence and immunoprotection at the natural

- host alveolar epithelial barrier, *Infect Immun*, 78, 1850-1858 (2010)
- [7] 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)
- [8] Ueno Y, Hoshinoo K, Tagawa Y : Mutations in the major outer membrane protein gene from *Histophilus somni* by an allelic exchange method, *J Microbiol Methods*, 106, 83-92 (2014)
- [9] Nakagawa I, Inaba H, Yamamura T, Kato T, Kawai S, Ooshima T, Amano A : Invasion of epithelial cells and proteolysis of cellular focal adhesion components by distinct types of *Porphyromonas gingivalis* fimbriae, *Infect Immun*, 74, 3773-3782 (2006)
- [10] Galdiero S, Falanga A, Cantisani M, Tarallo R, Della Pepa ME, D'Orlando V, Galdiero M : Microbe-host interactions: structure and role of Gram-negative bacterial porins, *Curr Protein Pept Sci*, 13, 843-854 (2012)
- [11] Tagawa Y, Sanders JD, Uchida I, Bastida-Corcuera FD, Kawashima K, Corbeil LB : Genetic and functional analysis of *Haemophilus somnus* high molecular weight-immunoglobulin binding proteins, *Microb Pathog*, 39, 159-170 (2005)
- [12] Worby CA, Mattoo S, Kruger RP, Corbeil LB, Koller A, Mendez JC, Zekarias B, Lazar C, Dixon JE : The fic domain: regulation of cell signaling by adenylation, *Mol Cell*, 34, 93-103 (2009)
- [13] Zekarias B, Mattoo S, Worby C, Lehmann J, Rosenbusch RF, Corbeil LB : *Histophilus somni* IbpA DR2/Fic in virulence and immunoprotection at the natural host alveolar epithelial barrier, *Infect Immun*, 78, 1850-1858 (2010)
- [14] Thomas JI : *Histophilus somni*; Biology, Molecular Basis of Pathogenesis, and Host Immunity, *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 1, 15-48 (2016)
- [15] Hoshinoo K, Sasaki K, Tanaka A, Corbeil LB, Tagawa Y : Virulence attributes of *Histophilus somni* with a deletion mutation in the *ibpA* gene, *Microb Pathog*, 46, 273-282 (2009)

Pathological and Bacteriological Analysis of Necrotic Suppurative Myocarditis and Fibrinous Pericarditis Caused by *Histophilus Somni* Infection in a Calf

Nobumichi FURUTA^{1)†}, Yuichi UENO²⁾ and Toru OJIMA¹⁾

1) *Yamagata Prefecture Central Livestock Hygiene Service Center, 736 Urushiyama, Yamagata, 990-2161, Japan*

2) *National Institute of Animal Health, National Agricultural and Food Research Organization, 3-1-5 Kannondai, Tsukuba, 305-0856, Japan*

SUMMARY

In this study, we pathologically analyzed a clinical case of Histophilosis or a *Histophilus somni*-associated disease that occurred in Yamagata Prefecture, Japan. An isolate from a heart lesion and two past isolates (from encephalitis and from pneumonia) were analyzed for the antigen type of the major outer membrane protein (MOMP) and cytotoxicity to EBTr cells. Pathognomonic dissection found a villous heart, and histopathological examination revealed fibrinous pericarditis. MOMP antigen typing showed that isolates from this case and pneumonia were classified as type 3c, and the isolate from encephalitis was type 1. In the experiment on the cytotoxicity of the three isolates to EBTr cells, the isolate from encephalitis was a strong cause of cellular impairment. On the other hand, cellular impairment of the other two isolates was diminished. These results suggest that the cytotoxicity of the isolate from this case is weaker than the isolate from encephalitis, and the weak cytotoxicity caused the villous heart, resulting from a chronic process.

— Key words : cellular impairment, *Histophilus somni*, fibrinous pericarditis, major outer membrane protein.

† Correspondence to : Nobumichi FURUTA (Yamagata Prefecture Central Livestock Hygiene Service Center)

736 Urushiyama, Yamagata, 990-2161, Japan

TEL 023-686-4410 FAX 023-686-5715 E-mail : furutan@pref.yamagata.jp

J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 71, 89~94 (2018)