

牛肺炎症例から分離された既知の菌種には 属さないレンサ球菌

鈴木健太^{1)†} 加藤雅樹¹⁾ 伊藤 唯¹⁾ 常田将宏²⁾ 青柳高弘¹⁾
岡本真理子³⁾ 上野勇一³⁾ 高松大輔³⁾

- 1) 長野県松本家畜保健衛生所 (〒390-0851 松本市島内西川原 6931)
2) 長野県畜産試験場 (〒399-0711 塩尻市大字片丘 10931-1)
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)

(2021年4月12日受付・2021年8月19日受理)

要 約

2020年9月、長野県畜産試験場で、18カ月齢の黒毛和種肉用去勢牛1頭が急性の呼吸器症状を呈し死亡した。剖検では、肺全体が暗赤色化しており、間質性気腫を認めた。細菌学的検査では、肺病変部からグラム陽性球菌が分離された。病理組織学的検査では、化膿性線維素性肺炎が認められた。分離株は生化学性状検査で *Streptococcus suis* (*S. suis*) と判定されたが、*S. suis* 及びその近縁種に特異的な PCR では菌種を同定することができなかった。そこで、16S rRNA 遺伝子解析を実施したところ、既知の菌種には属さないレンサ球菌であることが判明した。本分離株と同一菌種と思われる菌による肺炎症例の報告はないため、本報はこの未知のレンサ球菌による牛の肺炎の初めての報告事例である。——キーワード：牛，肺炎，レンサ球菌。

-----日獣会誌 74, 773~780 (2021)

Streptococcus suis (*S. suis*) や *Streptococcus ruminantium* (*S. ruminantium*) は牛の肺炎病巣から分離される菌として報告されている [1, 2]。 *S. suis* には現在までに 35 種類以上の血清型が報告されているが [3]、そのうち、血清型 33 の株は 2017 年に新菌種 *S. ruminantium* として再分類された [4]。そして過去に *S. suis* と同定された牛の肺炎症例由来株の多くが、*S. ruminantium* である可能性が指摘されている [2]。この 2 つの菌は生化学性状が類似しており、市販同定キットではいずれも *S. suis* と判定されることから [2, 3]、正しく同定するには各菌種に特異的な PCR を行う必要がある [2]。今回、呼吸器症状を呈し急死した 18 カ月齢の肉用牛の肺からグラム陽性球菌が純培養状に分離された。分離株は生化学性状検査で *S. suis* と判定されたため、*S. suis* もしくは *S. ruminantium* の関与を疑い菌種同定を進めたところ、既知の菌種に属さないレンサ球菌と判定された。このレンサ球菌による牛肺炎の症

例は過去に報告がないため、その概要を報告する。

材料及び方法

発生農場の概要及び当該牛の臨床症状：長野県畜産試験場では肉用牛を 60 頭飼養規模で一貫経営しており、定期的に市場等から導入を行っている。当該牛は、自家産の 18 カ月齢の黒毛和種肉用去勢牛で、2020 年 9 月に食欲の廃絶及び軽度の発咳を認めた。体温は 40℃ を超え、呼吸速迫が認められたものの、肺音に異常は認められなかった。塩酸チアミン加ブドウ糖注射液 (ビタミン B₁ 加ブドウ糖 V 注射液 25%, 日本全薬工業(株), 福島) 500ml の補液及びオキシテトラサイクリン注射液 (オキシテトラサイクリン注 NZ, 日本全薬工業(株), 福島) 20ml を静脈注射したが、症状は改善せず翌日死亡した。なお、同農場では、当該牛が呼吸器症状を呈する 2 日前に 1 頭の牛が導入されているが、別の牛舎で飼育されていた。また、当該牛と同居していた別の牛に異常は認め

† 連絡責任者：鈴木健太 (長野県松本家畜保健衛生所)

〒390-0851 松本市島内西川原 6931

☎ 0263-47-3223 FAX 0263-47-0101

E-mail : suzuki-kenta-r@pref.nagano.lg.jp



図1 肺全体の肉眼所見
全体的に暗赤色化が認められた。

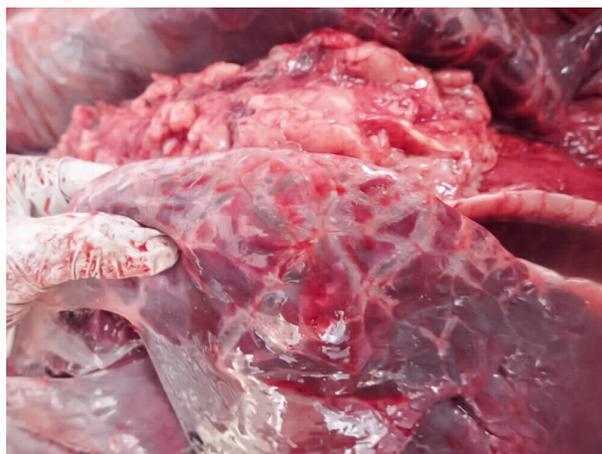


図2 肺前葉の肉眼所見
間質性気腫が顕著に認められた。

られなかった。

細菌学的検査：主要臓器を5%羊血液加トリプトソイ寒天培地（日本ベクトン・ディッキンソン株，東京），5%羊血液加エドワード寒天培地（関東化学株，東京），食塩加マンニット寒天培地（日本ベクトン・ディッキンソン株，東京）及びDHL寒天培地（日水製薬株，東京）に直接スタンプ後，好気条件もしくは5%炭酸ガス条件下で37℃ 24時間培養した。分離株はグラム染色，カタラーゼ試験，オキシダーゼ試験，レンサ球菌同定用キット（ラピッドID32 ストレップアピ，バイオメリユー・ジャパン株，東京）を用いた生化学性状検査及び酵素活性スクリーニングキット（アピザイム，バイオメリユー・ジャパン株，東京）を用いた酵素活性検査を行い類縁菌種と比較した [4-8]。また，分離株から市販キット（インスタジーンマトリックス，Bio-Rad Laboratories, U.S.A.）を用いてDNA抽出を行い，Okwumabuaら [9] の *gdh* 遺伝子及び，Ishidaら [10] の *recN* 遺伝子を標的とした *S. suis* に特異的なPCR，Okuraら [2] の 16S rRNA 遺伝子を標的とした *S. ruminantium* に特異的なPCRを実施した。さらにDorschら [11] 及びAraiら [12] の方法に準拠して分離株の16S rRNA 遺伝子の塩基配列を決定し，EzBioCloud (<https://www.ezbiocloud.net/>) を用いて各菌種の基準株の配列と比較した。本分離株の16S rRNA 遺伝子については，95%以上の一致率を示した他レンサ球菌種及び牛の病原体としても知られる *Streptococcus agalactiae* の当該遺伝子と配列を比較し，遺伝子解析ソフトウェア（Molecular Evolutionary Genetics Analysis software, ver.X [MEGA X]） [13] を用いて近隣結合法 [14-16] による系統樹を作成した。

また薬剤感受性試験をペニシリン，ジクロキサシリン，アモキシシリン，セファゾリン，セフトキシム，ストレプトマイシン，カナマイシン，ネオマイシン，エリ

スロマイシン及びオキシテトラサイクリンについてセンシディスク（日本ベクトン・ディッキンソン株，東京）を用いて，エンロフロキサシンについてVKBディスク（栄研化学株，栃木）を用いて一濃度ディスク法により実施した。

さらに，マイコプラズマ検査として肺をマイコプラズマ（NK）液体培地（関東化学株，東京）に接種し，37℃ 72時間培養を行った。市販キット（インスタジーンマトリックス，Bio-Rad Laboratories, U.S.A.）を用いて培養液からDNAを抽出し，*Mycoplasma bovis*，*Mycoplasma bovis genitalium* 及び，*Mycoplasma bovis rhinis* に特異的なPCRを実施した [17, 18]。また，自動核酸抽出装置（MagLEAD，プレジションシステムサイエンス株，千葉）を用いて肺乳剤からDNAを抽出し，*Mycoplasma dispar* に特異的なPCRを実施した [19]。

病理組織学的検査：主要臓器を10%緩衝ホルマリン液を用いて固定し，定法に従いパラフィン包埋・薄切後，ヘマトキシリン・エオジン（HE）染色及びグラム染色を実施した。

ウイルス学的検査：肺及び気管スワブから自動核酸抽出装置（MagLEAD）を用いて核酸抽出を行い，既報のプライマーを用いて牛コロナウイルス [20]，牛RSウイルス（桐沢力男，荻窪恭明，田島誉士，田上勝則，増田美之，高橋清志，川上善三，岩井 滋：ウシパラインフルエンザウイルス3型，ウシRSウイルスおよびウシウイルス性下痢・粘膜病ウイルス感染のPCRによる検出，酪農学園大学紀要，19，225-237（1994）），牛パラインフルエンザウイルス3型，牛ヘルペスウイルス1型，牛ウイルス性下痢ウイルス及び牛アデノウイルスに特異的なPCRを実施した [21-24]。

成 績

剖検：気管内部に出血及び，多量の泡沫が認められた。肺は全体が暗赤色化しており，間質性気腫が認めら

表1 ラピッド ID32 ストレップアピによる生化学性状

項目	所見				項目	所見			
	1	2	3	4		1	2	3	4
アルギニンジヒドロラーゼ	-	+	-	-	アセトイン産生	-	-	-	-
β -グルコシダーゼ	-	+	+	+	アラニン-フェニルアラニン-プロリンアリルアミダーゼ	+	NL	+	+
β -ガラクトシダーゼ (β GAR)	-	+	-	-	β -ガラクトシダーゼ (β GAL)	-	+	-	-
β -グルクロニダーゼ	+	+	-	-	ピログルタミン酸アリルアミダーゼ	+	+	-	-
α -ガラクトシダーゼ	-	+	-	-	N-アセチル- β -グルコサミニダーゼ	-	+	-	-
アルカリフォスファターゼ	-	-	NL	-	グリシル-トリプトファンアリルアミダーゼ	+	+	+	-
リボース	-	-	-	-	馬尿酸ナトリウム加水分解	-	-	-	-
マンニトール	-	-	-	-	グリコーゲン	+	+	+	-
ソルビトール	-	-	-	-	ブルラン	+	+	+	-
乳糖	+	+	+	+	マルトース	+	NL	+	+
トレハロース	+	+	+	+	メリビオース	-	-	-	-
ラフィノース	-	+	+	+	メレチトース	-	+	-	-
白糖	+	NL	+	+	メチル- β D グルコピラノシド	-	+	-	+
L-アラビノース	-	-	-	-	タガトース	-	NL	-	-
D-アラビトース	-	NL	-	-	β -マンノシダーゼ	-	NL	-	-
シクロデキストリン	-	-	NL	-	ウレアーゼ	-	NL	NL	-

1: 肺分離株, 2: *S. suis* S735^T, 3: *S. ruminantium* GUT-187^T, 4: *S. porcorum* 682-03^T

+: 陽性 - : 陰性 NL (Not listed): 引用文献中に記載なし



図3 肺分離株のコロニーの写真
血液寒天培地上で α 溶血性を示す。

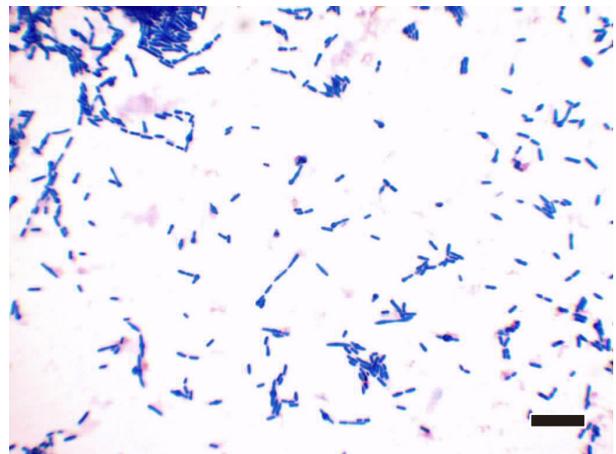


図4 肺分離株のグラム染色像
グラム陽性の球桿菌. 一部が連なって認められた (Bar=10 μ m).

れた(図1). 間質性気腫は肺前葉に顕著であった(図2). 心臓では左心室の心筋が肥厚しており, 右心室の心筋は菲薄化していた. 肝臓はやや退色しており脆弱であった. その他の臓器に著変は認められなかった.

細菌学的検査: 肺病変部から α 溶血性(図3), カタラーゼ陰性, オキシダーゼ陰性のグラム陽性球桿菌(図4)が純培養状に分離され, レンサ球菌同定用キット(ラピッド ID32 ストレップアピ, ピオメリュー・ジャパン

(株, 東京)で *S. suis* と判定された(% ID: 99%)(表1). 酵素活性スクリーニングキット(アピザイム, ピオメリュー・ジャパン(株), 東京)では, α -キモトリプシン, ナフトール-AS-BI-フォスフォヒドロラーゼ及び β グルコシダーゼの活性の有無が類縁菌種と異なっていた(表2). 既報の *S. suis* 特異的 PCR を行ったところ, Okwumabua らの方法では陽性であったが, Ishida らの方法では陰性であった. また, *S. ruminantium* に特

表2 アピザイムによる酵素活性

項目	所見				項目	所見			
	1	2	3	4		1	2	3	4
アルカリフォスファターゼ	-	-	NL	-	ナフトール-AS-BI-フォスフォヒド ローゼ	+	-	-	-
エステラーゼ	+	+	+	-	α -ガラクトシダーゼ	-	+	-	-
エステラーゼリパーゼ	+	+	+	-	β -ガラクトシダーゼ	-	+	-	-
リパーゼ	-	NL	-	-	β -グルクロニダーゼ	+	+	-	-
ロイシンアリルアミダーゼ	+	NL	+	+	α -グルコシダーゼ	-	+	+	-
バリンアリルアミダーゼ	-	-	-	-	β -グルコシダーゼ	-	+	+	+
シスチンアリルアミダーゼ	-	-	-	-	N-アセチル- β -グルコサミニダーゼ	-	+	-	-
トリプシン	-	NL	-	-	α -マンノシダーゼ	-	NL	-	-
α -キモトリプシン	+	-	-	-	α -フコシダーゼ	-	NL	-	-
酸性フォスファターゼ	-	-	-	+					

1: 肺分離株, 2: *S. suis* S735^T, 3: *S. ruminantium* GUT-187^T, 4: *S. porcorum* 682-03^T

+ : 陽性 - : 陰性 NL (Not listed) : 引用文献中に記載なし

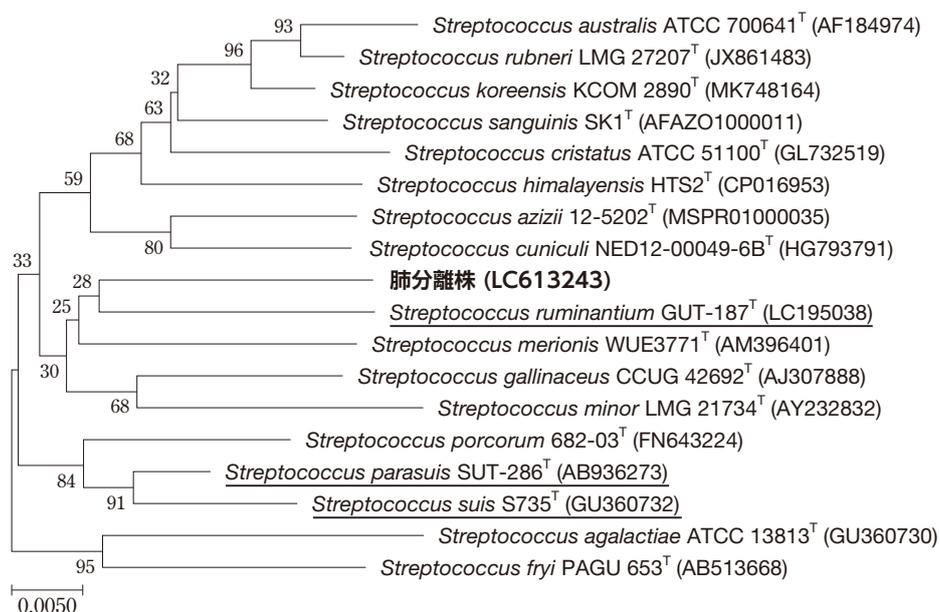


図5 肺分離株及び類縁する *Streptococcus* 属菌の 16S rRNA 遺伝子塩基配列に基づく系統樹

ブートストラップテストを1,000回繰り返し、各クラスターが再現された確率(ブートストラップ確率, %)を対応する枝の隣に記した. 図中のスケールは1塩基あたりの変異頻度を示す. 各菌種の16S rRNA 遺伝子配列のアクセッション番号は括弧内に示す. 太字: 本症例からの分離株, 下線: *S. suis* または *S. suis* から再分類された菌種. 下線の菌種は, 生化学試験に基づく市販同定キットでは, いずれも *S. suis* として同定されることが多い.

異的なPCRは陰性であった. そこで, 本分離株の16S rRNA 遺伝子の部分塩基配列1,504bpを決定し, EzBioCloudを用いて各菌種の標準株の配列と比較したところ, 最も近縁な菌種 *Streptococcus porcorum* (*S. porcorum*) (アクセッション番号: FN643224) でも分離株の配列とは95.94%の一致率しか示さず, 菌種同定の基準となる98.65%以上の一致率[25]を示す既知の菌種は存在しなかった. なお, 16S rRNA 遺伝子配列に

基づく系統樹上では, *S. porcorum* は *S. suis* 及び *Streptococcus parasuis* (*S. parasuis*) と同じクラスターに位置していた. 一方, ブートストラップテストによるクラスターの再現度は低いものの, 本分離株は, *S. ruminantium* と同じクラスターに位置していた(図5). 本分離株の16S rRNA 遺伝子の塩基配列は日本DNAデータバンクに登録した(アクセッション番号: LC613243).

表3 肺分離株の薬剤感受性試験結果（一濃度ディスク法）

薬剤名	阻止円直径 (mm)
ペニシリン	37
ジクロキサシリン	17
アモキシシリン	37
セファゾリン	37
セフロキシム	34
ストレプトマイシン	16
カナマイシン	14
ネオマイシン	9
エリスロマイシン	34
オキシテトラサイクリン	13
エンロフロキサシン	22

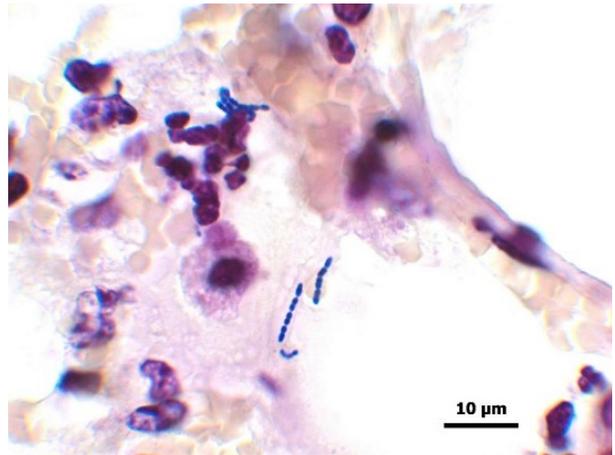


図7 肺胞の強拡大像
病変部に一致してグラム陽性球桿菌が認められた（グラム染色 Bar=10μm）.

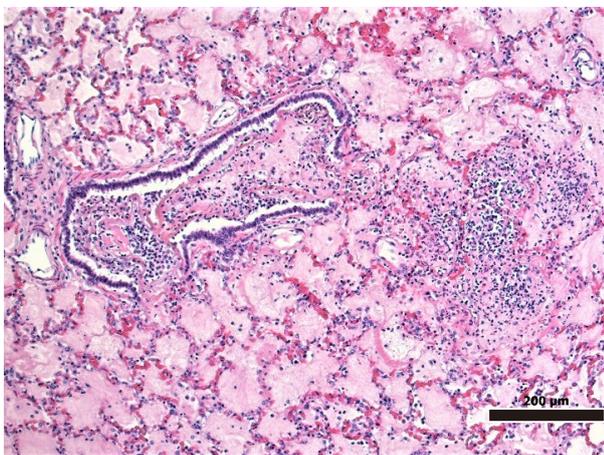


図6 細気管支及び周囲肺胞
細気管支内及び周囲肺胞内に好中球やマクロファージの浸潤及び線維素の析出が認められた（HE染色 Bar=200μm）.

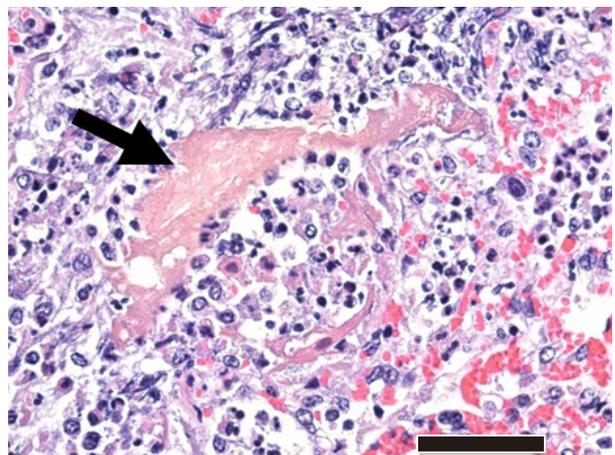


図8 細気管支内の異物
細気管支内に絮状の異物（矢印）が認められた（HE染色 Bar=50μm）.

薬剤感受性試験の結果、ペニシリン、アモキシシリン、セファゾリン、セフロキシム、エリスロマイシンは本分離株に対して直径30mm以上の大きな阻止円を形成し、本株のこれら薬剤に対する高い感受性が推察された。一方、本症例の治療に用いられたオキシテトラサイクリンでは直径13mmの阻止円しか形成されなかった（表3）。

その他の臓器から有意な菌は分離されず、肺を材料としたマイコプラズマに対するPCRはいずれも陰性であった。

病理組織学的検査：肺の細気管支内及びその周囲肺胞内に好中球とマクロファージの浸潤、線維素の析出（図6）及びグラム陽性球桿菌（図7）が認められた。肺胞毛細血管の充血及び肺胞水腫、肺小葉間質及び肺胞の気腫、気管支内の膿性浸出物の貯留も認められた。また、細気管支腔内に橙黄色に染色された異物が認められ（図

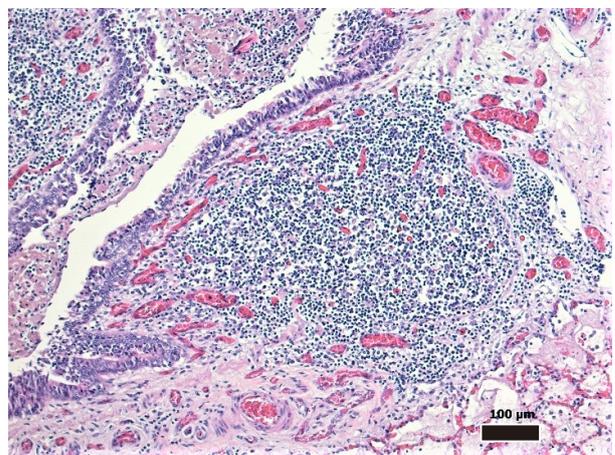


図9 気管支周囲のリンパ濾胞形成
気管支周囲にマイコプラズマの関与を疑うリンパ濾胞の形成が認められた（HE染色 Bar=100μm）.

8), 気管支周囲には軽度のリンパ濾胞形成が認められた(図9)。さらに, 気管支リンパ節の辺縁洞及び髄洞内には好中球及びマクロファージの浸潤が認められた。以上の所見から, 化膿性線維素性肺炎と判断された。その他の臓器では, 肝臓で小葉中心性のうっ血及び肝細胞変性が認められた。心臓, 脾臓, 腎臓に著変は認められなかった。

ウイルス学的検査: PCRでは, 標的としたウイルスはいずれも検出されなかった。

考 察

呼吸器症状を呈し死亡した18カ月齢の黒毛和種肉用去勢牛の肺からグラム陽性球菌が分離された。分離株の16S rRNA遺伝子を解析し, 近縁種の基準株と配列の一致率を比較したところ, 同一菌種であるかどうかの判断基準となる98.65% [25]より高い相同性を示す基準株は認められなかったことから, 本分離株は既知のどの菌種にも属さないと考えられる。一方で, 最も高い一致率を示した菌が*S. porcorum* (95.94%)であり, 16S rRNA遺伝子配列に基づく系統樹上で本分離株は*S. ruminantium*などのレンサ球菌とともにクラスターを形成していたことから, 本分離株はまだ菌種名の付けられていない*Streptococcus*属菌であると考えられた。

病理組織学的検査において, 病変部にグラム陽性球菌が認められたことから, 本菌が肺炎に関与していたと考えられる。

本分離株と同一菌種と考えられるレンサ球菌が関与した牛の肺炎事例の報告は認められないことから, 本症例はこの未知のレンサ球菌による肺炎の初めての報告事例である。本菌の病原性については不明だが, 類似した生化学性状を示す*S. suis*や*S. ruminantium*は健康牛の扁桃や口腔, 肺から分離され, 日和見的に感染を起こすことが示唆されていることから [2], 本菌についても扁桃等に常在し, 日和見的に肺炎を引き起こした可能性がある。本症例では肺から他に有意な菌は分離されなかったが, 過去の*S. ruminantium*による牛の肺炎症例では*Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida*, *Histophilus somni*やマイコプラズマ等が同時に分離されている [2]。本症例では病理組織学的検査で気管支腔内に橙黄色に染色された異物が認められ誤嚥を疑う所見が観察された。また, PCRではマイコプラズマは検出されなかったが, 気管支周囲に軽度のリンパ濾胞が認められ軽度のマイコプラズマの関与を疑う所見も観察された。本症例では, これらの原因が複合的に関係し, 急性の肺炎症状を呈し死亡したと考えられた。しかし, 本菌がどの程度病変に関与しているかは不明であり, その病原性については, 引き続き症例の集積が必要である。また, 同居している牛では呼吸器症状等の異常が認

められなかったことから, 本菌の伝染性はそれほど高くはないと考えられた。

本菌は菌種名が付けられていないため, 生化学性状に基づく市販同定キットでは同定することはできないが, キットを用いた場合は, *S. suis*と一部の生化学性状は異なるもののその類縁菌である*S. ruminantium*等と同様 [2, 3]に*S. suis*と誤同定される可能性が高い。また, 本症例の分離株は最新の分類に基づいて真の*S. suis*のみを検出するように設計されたIshidaら [10]のPCRでは陰性となったが, *Streptococcus orisratti*, *S. parasuis*及び*S. ruminantium*が*S. suis*から再分類される以前に開発されたOkwumabuaら [9]のPCRでは*S. suis*と誤同定された。Okwumabuaらの方法はこれらの*S. suis*類縁菌のほかに*Streptococcus galloyticus*や*Streptococcus gallinaceus*, *Streptococcus ovis*といった菌でも陽性となることが知られている [3]。したがって, 本菌も非特異的に陽性となったと考えられた。

なお, Ishidaら [10]のPCRが報告されたのは2014年であり, それまでは一般にOkwumabuaら [9]の方法がPCRによる同定に用いられていたことから, 過去に*S. suis*による肺炎と診断された症例の中には本菌が原因となった症例が存在する可能性がある。本菌の病原性を明らかにしていくためにも, 過去の同様な症例について最新の分類に基づいて分離株を精査し直す必要がある。

本菌を同定するにあたり現状では16S rRNA遺伝子解析以外の方法がない。本菌の保有状況の調査や病性鑑定時の診断をより簡便に実施するためにも, 新菌種名の正式な提唱と特異的なプライマーの設計等簡易的な同定方法の開発が望まれる。

引用文献

- [1] Higgins R, Gottschalk M, Fecteau G, Sauvageau R, De Guise S, Du Tremblay D: Quebec. Isolation of *Streptococcus suis* from cattle, *Can Vet J*, 31, 529 (1990)
- [2] Okura M, Maruyama F, Ota A, Tanaka T, Matobe Y, Osawa A, Sadaat MS, Osaki M, Toyoda A, Ogura Y, Hayashi T, Takamatsu D: Genotypic diversity of *Streptococcus suis* and the *S. suis*-like bacterium *Streptococcus ruminantium* in ruminants, *Vet Res*, 50, 94 (2019)
- [3] Okura M, Osaki M, Nomoto R, Arai S, Osawa R, Sekizaki T, Takamatsu D: Current taxonomical situation of *Streptococcus suis*, *Pathogens*, 5, e45 (2016), (online), (<https://doi.org/10.3390/pathogens5030045>), (accessed 2021-4-11)
- [4] Tohya M, Arai S, Tomida J, Watanabe T, Kawamura Y, Katsumi M, Ushimizu M, Ishida-Kuroki K, Yoshizumi M, Uzawa Y, Iguchi S, Yoshida A, Kikuchi K, Sekizaki T: Defining the taxonomic status of *Streptococcus*

- suis* serotype 33: the proposal for *Streptococcus ruminantium* sp. nov, Int J Syst Evol Micr, 67, 3660-3665 (2017)
- [5] Nomoto R, Maruyama F, Isida S, Tohya M, Sekizaki T, Osawa R : Reappraisal of the taxonomy of *Streptococcus suis* serotype 20, 22 and 26: *Streptococcus parasuis* sp. nov, Int J Syst Evol Micr, 65, 438-443 (2015)
- [6] Vela AI, Perez M, Zamora L, Palacios L, Domínguez L, Fernández-Garayzábal JF : *Streptococcus porci* sp. nov., isolated from swine source, Int J Syst Evol Micr, 60, 104-108 (2010)
- [7] Vela AI, Casamayor A, Sánchez del Rey V, Domínguez L, Fernández-Garayzábal JF : *Streptococcus plurextorum* sp. nov., isolated from pigs, Int J Syst Evol Micr, 59, 504-508 (2009)
- [8] Vela AI, Sánchez V, Mentaberre G, Lavín S, Domínguez L, Fernández-Garayzábal JF : *Streptococcus porcorum* sp. nov., isolated from domestic and wild pigs, Int J Syst Evol Micr, 61, 1585-1589 (2011)
- [9] Okwumabua O, O'Connor M, Shull E : A polymerase chain reaction (PCR) assay specific for *Streptococcus suis* based on the gene encoding the glutamate dehydrogenase, FEMS Microbiol Lett, 218, 79-84 (2003)
- [10] Ishida S, Tien LHT, Osawa R, Tohya M, Nomoto R, Kawamura Y, Takahashi T, Kikuchi N, Kikuchi K, Sekizaki T : Development of an appropriate PCR system for the reclassification of *Streptococcus suis*, J Microbiol Meth, 107, 66-70 (2014)
- [11] Dorsch M, Stackbrandt E : Some modifications in the procedure of direct sequencing of PCR amplified 16S rDNA, J Microbiol Meth, 16, 271-279 (1992)
- [12] Arai R, Tominaga K, Wu M, Okura M, Ito K, Okamura N, Onishi H, Osaki M, Sugimura Y, Yoshiyama M, Takamatsu D : Diversity of *Melissococcus plutonius* from honeybee larvae in Japan and experimental reproduction of European foulbrood with cultured atypical isolates, PLoS One, 7, e33708 (2012), (online), (<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033708>), (accessed 2021-7-14)
- [13] Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K : MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms, Mol Biol Evol, 35, 1547-1549 (2018)
- [14] Saitou N, Nei M : The neighbor-joining method : A new method for reconstructing phylogenetic trees, Mol Biol Evol, 4, 406-425 (1987)
- [15] Felsenstein J : Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap, Evolution, 39, 783-791 (1985)
- [16] Nei M, Kumar S : Molecular Evolution and Phylogenetics, Oxford University Press, New York (2000)
- [17] Chávez González YR, Ros Bascuñana C, Bölske G, Mattsson JG, Fernández Molina C, Johansson KE : In vitro amplification of the 16S rRNA genes from *Mycoplasma bovis* and *Mycoplasma agalactiae* by PCR, Vet Microbiol, 47, 183-190 (1995)
- [18] Kobayashi H, Hirose K, Worarach A, Paugtes P, Ito N, Morozumi T, Yamamoto K : In vitro amplification of the 16SrRNA genes from *Mycoplasma bovirhinis*, *Mycoplasma alkalescens* and *Mycoplasma bovigenitalium* by PCR, J Vet Med Sci, 60, 1299-1303 (1998)
- [19] 森 康行, 西本清仁, 大元隆夫, 宗田吉広, 下地義弘, 小林秀樹 : 牛肺炎からの *Mycoplasma dispar* の検出, 日本マイコプラズマ学会雑誌, 25, 78-80 (1998)
- [20] Tsunemitsu H, Smith DR, Saif LJ : Experimental inoculation of adult dairy cows with bovine coronavirus and detection of coronavirus in faces by RT-PCR, Arch Virol, 144, 165-175 (1999)
- [21] 尾宇江康啓, 榑原道子, 成田雅子, 佐藤雄太, 菅野 徹 : 北海道における牛パラインフルエンザウイルス3型の分子疫学的解析と迅速診断法の検討, 日獣会誌, 70, 363-369 (2017)
- [22] Roche MA, Barbosa EF, Guimarães SE, Dias Neto E, Gouveia AM : A high sensitivity-nested PCR assay for BHV-1 detection in semen of naturally infected bulls, Vet Microbiol, 63, 1-11 (1998)
- [23] Vilcek S, Herring AJ, Herring JA, Nettleton PF, Lowings JP, paton DJ : Pestiviruses isolated from pigs, cattle and sheep can be allocated into at least three genogroups using polymerase chain reaction and restriction endonuclease analysis, Arch Virol, 136, 309-323 (1994)
- [24] Maluquer de Motes C, Clemente-Casares P, Hundesa A, Martin M, Girones R : Detection of bovine and porcine adenoviruses for tracing the source of fecal contamination, Appl Environ Microb, 70, 1448-1454 (2004)
- [25] Kim M, Oh HS, Park SC, Chun J : Towards a taxonomic coherence between average nucleotide identity and 16S rRNA gene sequence similarity for species demarcation of prokaryotes, Int J Syst Evol Micr, 64, 346-351 (2014)

Streptococcus bacteria not Belonging to Any Known Species Isolated
from Bovine Case of Pneumonia

Kenta SUZUKI^{1)†}, Masaki KATO¹⁾, Yui ITO¹⁾, Masahiro TOKIDA²⁾, Takahiro AOYAGI¹⁾,
Mariko OKAMOTO³⁾, Yuichi UENO³⁾ and Daisuke TAKAMATSU³⁾

- 1) *Nagano Prefectural Matsumoto Livestock Hygiene Service Center, 6931 Shimauchi Nishikawahara, Matsumoto, 390-0851, Japan*
- 2) *Nagano Animal Industry Experiment Station, 10931-1 Kataoka, Shiojiri, 399-0711, Japan*
- 3) *National Institute of Animal Health, National Agriculture and Food Research Organization, 3-1-5 Kannondai, Tsukuba, 305-0856, Japan*

SUMMARY

In September 2020, one 18-month-old Japanese Black cattle died at the Nagano Animal Industry Experiment Station in Japan after showing acute respiratory symptoms. During necropsy and histopathological examination, one entire lung was dark red and showed interstitial emphysema and suppurative fibrous pneumonia. Gram-positive coccobacillus was isolated from the lung lesions and identified as *Streptococcus suis* by biochemical tests. However, the identification was not confirmed by a *S. suis*-specific PCR test, and its species could not be determined even by a PCR specific test for *S. suis*-related species. Therefore, we analyzed the 16S rRNA gene sequence of the isolate to reveal that it belongs to the genus *Streptococcus* but not to any known species. To the best of our knowledge, there are no reported pneumonia cases caused by a bacterium that seems to be the same species as this isolate. Therefore, this is the first case report of bovine pneumonia caused by this unknown novel *Streptococcus*. — Key words : cattle, pneumonia, *Streptococcus*.

† Correspondence to : Kenta SUZUKI (*Nagano Prefectural Matsumoto Livestock Hygiene Service Center*)

6931 Shimauchi Nishikawahara, Matsumoto, 390-0851, Japan

TEL 0263-47-3223 FAX 0263-47-0101 E-mail : suzuki-kenta-r@pref.nagano.lg.jp

J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 74, 773 ~ 780 (2021)