

Mannheimia 属菌の野外実態と同定法の確立

勝田 賢^{1)*}, 河本麻理子¹⁾, 川島健司²⁾, 三上 修¹⁾,
小野寺利幸¹⁾, 庄司智太郎¹⁾, 坪井孝益¹⁾

(平成20年7月29日 受付)

Epidemiological survey and study on identification methods for *Mannheimia* spp.

Ken KATSUDA^{1)*}, Mariko KOHMOTO¹⁾, Kenji KAWASHIMA²⁾, Osamu MIKAMI¹⁾, Toshiyuki ONODERA¹⁾,
Tomotaro SHOJI¹⁾, Takamitsu TSUBOI¹⁾

Mannheimia 属菌の野外分離状況を16S rRNA 遺伝子の塩基配列解析により調査した。生化学性状により *M. haemolytica* と同定された133株中31株は、*M. haemolytica* 以外の菌種であった。一方、血清型別試験で血清型が決定された菌株の96.0%が *M. haemolytica* であった。他の *Mannheimia* 属菌の菌種分類についても、*gyrB* は16S rRNA に比較して有用な遺伝子と考えられた。本遺伝子を対象にした Multiplex PCR 法による菌種同定法を検討し、良好な結果が得られた。*Mannheimia* 属菌を正確に同定するには、生化学性状試験と血清型別試験に加え、遺伝子配列の比較を行う必要性があると考えられる。

はじめに

Mannheimia haemolytica は、牛呼吸器病の主要原因菌の1つである^{7,8)}。本菌には複数の生物型が存在し、*M. haemolytica* complex と呼ばれていた。近年、16S rRNA の塩基配列、DNA-DNA hybridization などの解析により、*M. haemolytica* complex には少なくとも、5菌種

(*M. glucosida*, *M. granulomatis*, *M. haemolytica*, *M. ruminalis*, *M. varigena*) が含まれることが明らかとなった²⁾。しかし、*M. haemolytica* 以外の菌種の病原性については十分に解明されておらず、国内での発生状況は不明である。

平成17年に滋賀県で子牛の壊死性腸炎が複数例報告された¹⁰⁾。原因菌は生化学性状により *M. haemolytica* と同定されていたが、動物衛生研究所での解析により、*M. varigena* と再同定された。病性鑑定において原因を正確に同定することは極めて基本的なことであり、また、疾病予防のために重要である。しかし、生化学的性状により *Mannheimia* 属菌を同定するには、12項目について検査を行い、5日間観察する必要がある¹⁾。また、一般に用いられている生化学性状検査キットでは、*M. haemolytica* 以外の菌種に対応しておらず、*M. haemolytica* complex に属する菌を正確に同定することは、困難と考えられる。本研究では、*Mannheimia* 属菌を区別可能な細菌学的同定法並びに病理組織学的診断法の確立を目的とした。本研究は、平成18～

1) 動物衛生研究所環境・常在疾病研究チーム (東北支所)

〒039-2586 青森県上北郡七戸町字海内31

2) 農林水産技術会議事務局

〒100-8950 東京都千代田区霞が関1-2-1

* Corresponding author: Ken KATSUDA, D.V.M., PhD, Tohoku Research Station, Environmental/Enzootic Diseases Research Team, National Institute of Animal Health, 31 Uminai, Shichinohe, Kamikita, Aomori, 039-2586, Japan.

Tel: 81-176-62-5115

Fax: 81-176-62-5117

E-mail: katsuda@affrc.go.jp

表 1. *Mannheimia* 属菌の分離状況

菌種	株数(%)	分離動物種	分離部位(菌株数)
<i>M. haemolytica</i>	102 (76.7)	牛	肺 (51), 上部気道 (40), その他 (11)
<i>M. varigena</i>	18 (13.5)	牛 豚	肺 (7), 上部気道 (5), 腸 (4), 乳房 (1) 上部気道 (1)
<i>M. glucosida</i>	2 (1.5)	牛	肺 (1), 上部気道 (1)
<i>M. spp.</i>	11 (8.1)	牛	肺 (2), 上部気道 (7), その他 (2)

19年度に重点強化プロジェクト「*M. haemolytica* complexの診断方法の確立と病原性の解析」により実施された。

試験方法の概要

1. 供試菌株および血清型別

簡易同定キット (API20NE) を用いた生化学的性状検査により *M. haemolytica* と同定された 133 株を供試した。供試菌の血清型別は間接赤血球凝集反応により行った⁴⁾。血清型別試験に用いた免疫血清は, *M. haemolytica* 血清型 1 ~ 16 型参照株を用いて家兔を定法により免疫し作製した⁴⁶⁾。

2. 塩基配列の決定

供試 133 株の 16S rRNA 遺伝子を PCR 法で増幅後, その塩基配列 (約 1,500bp) を決定し, 標準株と比較した²⁾。なお, 鋳型 DNA は InstaGene (バイオラド) を用いて抽出した。系統樹は Clustal W 法で作成した。16S rRNA 遺伝子解析により, *M. glucosida*, *M. haemolytica*, *M. varigena* と同定された菌株 37 株の DNA gyrase B subunit 遺伝子 (*gyrB*) の塩基配列を決定した。

3. Multiplex PCR 法による菌種同定の検討

gyrB 遺伝子をターゲットとして *M. glucosida*, *M. haemolytica* および *M. varigena* を同定可能な PCR 用プライマーを設計

表 2. *Mannheimia* 属菌の血清型

菌種	株数	血清型						
		1	2	6	9	11	14	UT
<i>M. haemolytica</i>	102	33	19	41	0	0	2	7
<i>M. varigena</i>	18	0	0	2	0	0	0	16
<i>M. glucosida</i>	2	0	0	0	0	1	0	1
<i>M. spp.</i>	11	0	0	0	1	0	0	10

UT: 型別不能

表 3. *Mannheimia* 属菌の菌種間および菌種内での遺伝子の相違

菌種	相違率 (%)		
	<i>M. haemolytica</i>	<i>M. glucosida</i>	<i>M. varigena</i>
<i>M. haemolytica</i>	0.08 ± 0.07		
	0.10 ± 0.08		
<i>M. glucosida</i>	3.74 ± 0.12	0.20 ± 0.00	
	1.54 ± 0.21	0.80 ± 0.41	
<i>M. varigena</i>	14.32 ± 0.05	15.25 ± 0.15	0.28 ± 0.20
	4.65 ± 0.17	3.52 ± 0.34	1.11 ± 0.80

上段: *gyrB*

下段: 16S rRNA

した。PCR 反応は, DNA2.0 μ l に PCR 反応液 (1 \times PCR buffer, 0.2mM each dNTP, 0.5 μ M each primer および 1.25U の Taq gold DNA polymerase) を加え 25 μ l とし, 95 $^{\circ}$ C 10 分反応後, 95 $^{\circ}$ C / 30 秒, 55 $^{\circ}$ C / 30 秒, 72 $^{\circ}$ C / 30 秒を 35 サイクル行った。

4. 免疫組織化学的検出法の確立

M. haemolytica および *M. varigena* の濃厚菌液を健康モルモットから採取した肝臓片に, それぞれ注入後, これらを 10% 中性緩衝ホルマリン固定, パラフィン包埋, 薄切し, 陽性対照組織とした。これら陽性組織と各菌種に対する家兔免疫血清との反応性について検討を行った。

結果の概要・考察

1) 供試菌株は 16S rRNA 遺伝子の塩基配列により, 102 株 (76.7%) が *M. haemolytica*, 18 株 (13.5%) が *M. varigena*, 2 株 (1.5%) が *M. glucosida* と同定された。一方, *M. granulomatis* と *M. ruminalis* と同定される菌株は認められず, また, 11 株 (8.1%) が *Mannheimia* 属に分類されたが菌種レベルまで同定されなかった (表 1)。簡易同定キットの生化学的性状試験により, *M. haemolytica* と同定された 133 株の約 25% は, *M. haemolytica* 以外の菌種であった。

M. haemolytica 以外の菌種は, 呼吸器以外にも乳房炎, 乳汁, 腸管内容, 膿瘍, 心筋炎, ルーメンなどから分離されることが報告されている¹⁾。今回も乳房 (乳房炎), 腸管 (大腸炎) など呼吸器以外の部位から分離された菌株が *M. varigena* と同定された。

2) 供試菌の血清型別を間接赤血球凝集反応により決定した (表 2)。*M. haemolytica* 102 株は血清型 1 型菌が 33 株 (49.0%), 血清型 2 型菌が 19 株 (22.6%), 血清型 6 型菌

図1. Multiplex PCR 法による
菌種特異遺伝子の検出

M. 分子量マーカー (100bp ラダー)

1. *M. haemolytica* NCTC9380
2. *M. haemolytica* I29
3. *M. varigena* CCUG38462T
4. *M. varigena* SH57
5. *M. glucosida* CCUG38457T
6. *M. glucosida* CCUG28375

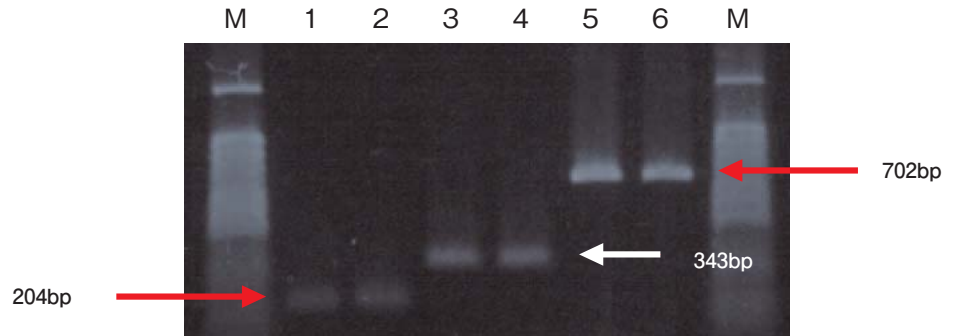
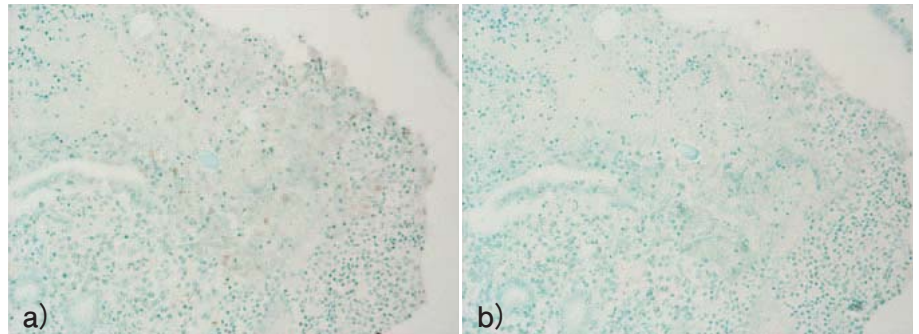


図2. 免疫組織化学的染色法による
M. varigena 抗原の検出

- a) 抗*M. varigena* 血清による免疫染色
- b) 陰性血清コントロールによる染色



が41株(20.2%), 14型菌が2株と分類された。また、血清型別不能が7株(6.3%)存在した。*M. glucosida*と同定された2株のうち、1株は血清型11型であったが、残り1株は血清型別不能であった。*M. varigena* 2株と*M. sp.* 1株が、*M. haemolytica* 6型および9型の家兔免疫血清に対して交差反応を示した。

M. haemolytica は11種類の血清型(1, 2, 5-9, 12-14, 16)に分類される^{25,12)}。また、*M. haemolytica* 血清型11の参照株が、新たに*M. glucosida*に分類され、本菌の野外分離株39株中19株が血清型11に、残り20株は血清型が特定されなかったことが報告されている³⁾。このため、生化学性状で*M. haemolytica*と同定され、血清型11に属する株は*M. glucosida*と同定可能と考えられる。

*M. glucosida*と*M. haemolytica*以外の*Mannheimia*属菌127株中3株(2.36%)が*M. haemolytica*家兔免疫血清(6型, 9型および16型)に対して交差反応を示したことが報告されている³⁾。今回の検討でも3株が交差反応を示した。しかし、血清型が特定された99株中95株(95.96%)は、16S rRNAの塩基配列解析により*M. haemolytica*と同定されたことから、生化学的性状試験と血清型別試験を合わせて実施することにより、同定精度が上昇すると考えられる。

3) *M. glucosida* 2株, *M. haemolytica* 17株および*M. varigena* 18株の*gyrB*の塩基配列を決定し、菌種間および菌種内での相同性を16S rRNAと比較した。*gyrB*は菌種内での相同性と菌種間での相違性が高く、菌種分類に有用と考えられた(表3)。

*gyrB*は全ての菌に普遍的に存在し、また16S rRNAより進化速度が速く、菌種特異性が高い遺伝子として、菌種同定の指標として期待されている¹¹⁾。今回、*Mannheimia*属菌の同定にも*gyrB*が有用であることが示された。しかし、本遺伝子は、データベースの蓄積が不十分である。今後本菌種を含め、多くの細菌種で*gyrB*の塩基配列データの蓄積が行われる必要があると考えられる。

次に*gyrB*遺伝子をターゲットとして*M. glucosida*, *M. haemolytica*および*M. varigena*を同定可能なPCR用プライマーを設計した。設計したプライマーは、*M. glucosida*, *M. haemolytica*および*M. varigena*の3菌種を特異的に検出可能であった(図1)。なお、PCRの特異性は、PCR産物をダイレクトシーケンスすることにより確認した。今後は、PCR法の実用化に向けて、供試菌株数を増やし、プライマー設定部位の変異の有無等についてさらに検討する必要がある。

4) 健康モルモットの肝臓を用いて作成した陽性対照組織を用いた検討により、作製した家兔免疫血清を1:4000倍希釈で使用することで*M. haemolytica*と*M. varigena*を免疫組織学的に区別できた(図2)。*M. glucosida*の免疫組織化学的反応性については、所内プロジェクト「牛呼吸器疾病の免疫組織化学的染色法の高度化」⁹⁾で確立している。今回の検討により*M. glucosida*, *M. haemolytica*および*M. varigena*の3菌種は免疫組織化学染色法により区別することが可能と考えられる。

参考文献

- 1) Angen O, Ahrens P, Bisgaard M: Phenotypic and genotypic characterization of *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica*-like strains isolated from diseased animals in Denmark. *Vet Microbiol* 84:103-114 (2002).
- 2) Angen O, Mutters R, Caugant DA, et al.: Taxonomic relationships 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 Pt 1:67-86 (1999).
- 3) Angen O, Quirie M, Donachie W, Bisgaard M: Investigations on the species specificity of *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica* serotyping. *Vet Microbiol* 65:283-290 (1999).
- 4) Biberstein EL: 1978, Biotyping and serotyping of *Pasteurella haemolytica*, In: Bergam, T., Norris, J.R. (eds.), *Methods in Microbiology*, vol. 10: Academic Press, London 253-269.
- 5) Blackall PJ, Bojesen AM, Christensen H, Bisgaard M: Reclassification of [*Pasteurella*] *trehalosi* as *Bibersteinia trehalosi* gen. nov., comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 57:666-674 (2007).
- 6) Fodor L, Varga J, Hajtos J, et al.: Characterization of a new serotype of *P. haemolytica* isolated in Hungary. *Res Vet Sci* 44:399 (1988).
- 7) Frank G: 1989, Pasteurellosis of cattle, In: Adlam CF, Rutter JM (eds.), *Pasteurella* and Pasteurellosis, Academic Press, London 197-222.
- 8) Gilmour N, Gilmour J: 1989, Pasteurellosis of sheep, In: Adlam CF, Rutter JM (eds.), *Pasteurella* and Pasteurellosis, Academic Press, London 223-261.
- 9) 播谷 亮, 木村久美子, 小林秀樹, 勝田 賢: 牛の呼吸器疾病の免疫組織化学的診断法の高高度化。動物衛生研究所研究報告 113:41-46 (2006).
- 10) 市川雅子, 山中健吾, 石本明宏, 荒木由希子: 滋賀県での *Mannheimia* 属菌分離陽性牛の細菌, ウイルス学のおよび病理組織学的調査. 獣医畜産新報 61 (1) :47-52 (2008).
- 11) McMacken R, Silver L, Georgopoulos C: 1987, *Escherichia coli* and *Salmonella* Typhimurium, In: Neidhardt, FC, Ingraham, JL, Low, KB, Magasanik, B, Schaechter, M, Umberger, HE: *Cellular and molecular biology*, American Society for Microbiology 578-580.
- 12) Younan M, Fodar L: Characterisation of a new *Pasteurella haemolytica* serotype (A17). *Res Vet Sci* 58:98 (1995).

Summary

Epidemiological survey and study on identification methods for *Mannheimia* spp.

Ken KATSUDA¹⁾*, Mariko KOHMOTO¹⁾, Kenji KAWASHIMA²⁾, Osamu MIKAMI¹⁾, Toshiyuki ONODERA¹⁾,
Tomotaro SHOJI¹⁾ & Takamitsu Tsuboi¹⁾

Mannheimia spp. strains were identified by their 16S rRNA gene sequences. Among 133 isolates 76.7% (102 isolates) were *M. haemolytica*. On the other hand, 96.0% serologically typeable strains were identified as *M. haemolytica* by their 16S rRNA gene sequences. The nucleotide sequences of the amplified *gyrB* DNA were determined directly from the amplified fragments. The base substitution frequency of *gyrB* between the strains of *Mannheimia* spp. was much higher than that of the 16S rRNA gene. With a specific set of PCR primers, it was possible to amplify *gyrB* fragments selectively from *M. glucosida*, *M. haemolytica* or *M. varigena*. These observations emphasize that biochemical, serological and genetic characterization is necessary for the proper identification of these organisms.