

原著論文

## 牛から分離される *Mannheimia* 属菌の野外実態と生化学的性状について

勝田 賢<sup>1)</sup> 小嶋 暢<sup>2)</sup> 富山美奈子<sup>3)</sup> 佐藤裕夫<sup>4)</sup> 三上 修<sup>1)</sup>

- 1) (独)農研機構・動物衛生研究所  
〒 305-0856 茨城県つくば市観音台 3-1-5
- 2) 山形県中央家畜保健衛生所  
〒 990-2161 山形県山形市漆山 736
- 3) 青森県十和田家畜保健衛生所  
〒 034-0093 青森県十和田市西十二番町 19-23
- 4) 岩手県中央家畜保健衛生所  
〒 020-0605 岩手県滝沢市砂込 390-5

連絡担当者：勝田 賢  
Tel & Fax : 029-838-7925  
E-mail : katsuda@affrc.go.jp

### [要 約]

*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、血清型別試験と 11 項目の追加の生化学性状試験を合せて実施した。市販の生化学性状同定キットにより *M. haemolytica* と同定された 363 株中 303 株は、16SrRNA 解析により、*M. haemolytica* と同定されたが、残り 60 株は *M. haemolytica* 以外の菌種であった。血清型別試験では、一部の菌株に非特異反応が認められたが、血清型が特定された菌株の 99.0% は 16SrRNA 解析で *M. haemolytica* または *M. glucosida* と同定された菌株であった。同定キットにより *M. haemolytica* と同定された菌株については、オルニチンデカルボキシラーゼ反応、L-アラビノース分解、D-ソルビトール分解、エスクリン反応および  $\beta$ -グルコシダーゼ反応を追加試験として実施し、血清型を特定することにより、同定精度が向上すると考えられる。

**キーワード：***Mannheimia* 属菌、生化学的性状、16SrRNA 解析、血清型別

### 緒論

*Mannheimia haemolytica* は、牛呼吸器病の主要原因菌の 1 つである [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 の塩基配列や 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 [3]。

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事であり、また、疾病予防のために重要である。しかし、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、生化学性状検査キットで *Mannheimia* 属菌を

正確に同定することは困難と考えられる。このため国内での *Mannheimia* 属菌の分離状況は十分に解明されていない。

今回、生化学的性状検査キットにより *M. haemolytica* と同定された菌株の 16SrRNA の塩基配列解析し、*Mannheimia* 属菌の再同定を行った。また、再同定された菌株の血清型や生化学的性状について検討を行ったので報告する。

## 材料及び方法

### 1. 供試菌株

1998年から2013年に牛から分離され、市販の生化学性状同定キット (API20NE) を用いた検査により *M. haemolytica* と同定された363株を供試した。また、基準株として *M. haemolytica* NCTC 9380, *M. glucosida* CCUG 38457, *M. varigena* CCUG 38462, *M. granulomatis* CCUG 45422 および *M. ruminalis* CCUG 38470 の5株を用いた。全ての菌株は30%グリセリンを添加した tryptic soy broth (Becton, Dickinson and Company, USA)、1mlに濃厚浮遊させ -80℃に冷凍保存し、必要に応じて5%羊血液寒天培地を用い、好気性下で37℃、24時間培養し試験に供した。

### 2. 16S rRNA 塩基配列の決定

供試363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、98.5%以上の相同性が認められた場合同一菌種と同定した[3]。なお、鋳型DNAはInstaGene(バイオラド)を用いてプロトコールに従い抽出した。

### 3. 生化学的性状検査および血清型別

16S rRNA 塩基配列解析により *M. glucosida*, *M. granulomatis*, *M. haemolytica*, *M. ruminalis* または *M. varigena* と同定された分離株339株と基準株について表2に示した11項目の生化学的性状について検査を実施した。生化学的性状検査は、既報[2]に基づいて実施した。

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兎を定法により免疫し作成した。分離株の血清型別試験は間接赤血球凝集反応により実施した[5,7]。

## 成績

供試菌株は16S rRNA 遺伝子の塩基配列により、303株(83.5%)が *M. haemolytica*、29株(8.0%)が *M. varigena*、3株(0.8%)が *M. glucosida*、2株(0.6%)が *M. granulomatis*、2株(0.6%)が *M. ruminalis* と同定された。また、24株(6.6%)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)。

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1)。*M. haemolytica* と同定された303株は、血清型1型菌が124株(40.9%)、血清型2型菌が19株(18.4%)、血清型6型菌が102株(33.7%)、血清型14型菌が2株(0.6%)に分類された。また、血清型別不能株が19株(6.3%)存在した。*M. glucosida* と同定された3株のうち、2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. haemolytica* または *M. glucosida* 以外の57株では、*M. varigena* 2株と *Mannheimia* sp. 1株が、*M. haemolytica* の6型および9型の家兎免疫血清に対して交差反応を示したが、残り

Table 1. Identification of *Mannheimia* spp. by sequencing the 16S rRNA and serotype distribution

Taxon	No. of strains (%)	Serotype						
		1	2	6	9	11	14	NT
<i>M. haemolytica</i>	303 (83.5%)	124	56	102	0	0	2	19
<i>M. varigena</i>	29 (8.0%)	0	0	2	0	0	0	27
<i>M. glucosida</i>	3 (0.8%)	0	0	0	0	2	0	1
<i>M. ruminalis</i>	2 (0.6%)	0	0	0	0	0	0	2
<i>M. granulomatis</i>	2 (0.6%)	0	0	0	0	0	0	2
<i>M. sp</i>	24 (6.6%)	0	0	0	1	0	0	23

NT: Not typeable

54株はいずれの抗血清とも反応せず血清型別不能であった。

16SrRNA解析により、*M. haemolytica*、*M. glucosida*、*M. varigena*、*M. granulomatis*、*M. ruminalis*と同定された菌株について11項目の生化学性状試験を実施し、それぞれの基準株と比較を行った(表2)。*M. haemolytica*(303株)では、5%牛血液寒天培地における溶血性、ウレアーゼ産生、オルニチンデカルボキシラーゼ反応、L-アラビノース分解、マルトース分解、D-ソルビトール分解、D-キシロース分解およびβ-グルコシダーゼに対する性状試験の結果は基準株と同様であったが、エスクリン加水分解試験では3株、α-フコシダーゼ産生では28株、β-キシロシダーゼ産生では15株、基準株と異なる性状を示した。*M. varigena*(29株)では、オルニチンデカルボキシラーゼ反応で4株、マルトース分解で4株、D-ソルビトール分解とD-キシロースで1株、エスクリン加水分解試験で7株、α-フコシダーゼ産生で10株、基準株と異なる性状を示す株が認められたが、それ以外の生化学的性状は基準株と同様であった。*M. granulomatis*の基準株はD-キシロース分解は陰性であったが、野外分離株2株は陽性を示し、基準株と異なる性状を示した。

*M. glucosida*(3株)および*M. ruminalis*(2株)の野外株では、今回実施した11項目の生化学性状はすべて基準株と同様であった。

### 考察

*Mannheimia*属に含まれる5菌種の内、*M. haemolytica*は線維索性肺炎を引き起こし、牛呼吸器病の主要原因菌として重要視されている。*M. varigena*は牛の口腔、ルーメン、腸管などに常在しており、肺炎、乳房炎および敗血症の原因菌として報告されている。また、本菌は豚の上部気道に常在し、豚の腸炎、肺炎、敗血症の原因となることが知られている[3]。*M. granulomatis*は牛の皮下脂肪織炎から分離され、シカの気管支肺炎や結膜炎に関与していることも報告されている[3]。一方、*M. glucosida*と*M. ruminalis*は病原性が無く、家畜の上部気道やルーメン等の常在菌と考えられている[3]。このため、牛から分離された*Mannheimia*属菌を菌種レベルまで同定することは、病性鑑定上極めて重要なことと考えられる。しかし、今回の検討では生化学的性状検査キットにより*M. haemolytica*と同定された菌株の16.5%は、16SrRNA解析の結果、*M. haemolytica*以外の菌種と同定され、生化学性

Table 2. Phenotypic characterizing reference and field isolates of *Mannheimia* spp.

Property	<i>M. haemolytica</i>		<i>M. glucosida</i>		<i>M. varigena</i>		<i>M. granulomatis</i>		<i>M. ruminalis</i>	
	NCT C9380 <sup>T</sup>	Field (303)	CCUG 38457 <sup>T</sup>	Field (3)	CCUG 38462 <sup>T</sup>	Field (29)	CCUG 45422 <sup>T</sup>	Field (2)	CCUG 38470 <sup>T</sup>	Field (2)
Haemolysis	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
Urease	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ornithine Decarboxylase	-	-	+	+	+	v (25)	-	-	-	-
Acid from										
L-arabinose	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
Maltose	+	+	+	+	+	v (25)	+	+	-	-
D-Sorbitol	+	+	+	+	-	v (1)	+	+	-	-
D-xylose	+	+	+	+	+	v (28)	-	+	-	-
Esculin hydrolysis	-	v (3)*	+	+	-	v (22)	+	+	-	-
α-fucosidase	+	v (275)	+	+	+	v (19)	-	-	-	-
β-glucosidase	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-
β-xylosidase	-	v (15)	+	+	-	-	-	-	-	-

+ = positive within 1-2 days, - = negative, v = variable  
\* Number in square brackets is number of isolates positive.

状検査キットだけでは、*Mannheimia* 属菌を菌種レベルまで正確に同定することが困難であることが示された。

*M. haemolytica* は12種類の血清型(1, 2, 5-9, 12-14, 16, 17)に分類される[3, 6, 9]。また、血清型11の参照株が、新たに*M. glucosida*に分類され、本菌種に属する野外分離株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[4]。今回の検討でも16SrRNA解析により*M. glucosida*と同定された3菌株中2株が血清型11に属しており、*M. glucosida*以外の菌株で血清型11と反応する菌株が認められなかったことから、生化学性状同定キットで*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*家兎免疫血清(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[4]。今回の検討でも3株が6型または9型の免疫血清に交差反応を示した。しかし、血清型が特定された287株中284株(99.0%)は、16SrRNAの塩基配列解析により*M. haemolytica*または*M. glucosida*と同定されたことから、生化学的性状同定キット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。

今回、16SrRNA解析により、*M. haemolytica*、*M. glucosida*または*M. varigena*と同定された335株はすべて5%牛血液寒天平板上で溶血性が認められた。一方、*M. granulomatis*または*M. ruminalis*と同定された菌株では溶血性が認められなかった。溶血性が認められた3菌種中*M. haemolytica*では、全ての株でオルニチンデカルボキシラーゼ反応が陰性を示し、また、また、99.0%の株がエスクリン反応陰性であり、他の2菌種と異なる性状を示した。*M. glucosida*ではエスクリン反応とβ-グルコシダーゼが陽性を示し、他の2菌種と異なる性状を示した。*M. varigena*では全ての株がL-アラビノース分解陽性を示し、また、29株中28株がD-ソルビトール分解陰性と他の2菌種と異なる性状を示した。一方、5%牛血液寒天平板上で溶血性が認められなかった2菌種では、マルトース分解、

D-ソルビトール分解、エスクリン反応およびβ-グルコシダーゼ反応に対する結果に違いが認められた。このため、生化学的性状同定キットで*Mannheimia*属菌と同定された菌株については、オルニチンデカルボキシラーゼ反応、L-アラビノース分解、D-ソルビトール分解、エスクリン反応およびβ-グルコシダーゼ反応を追加試験として実施し、合せて分離株の血清型を特定することにより、その殆どが同定可能と考えられる。

近年、Alexanderらが、*M. haemolytica*、*M. glucosida*および*M. ruminalis*の3菌種を同定可能なmultiplex-PCR法を報告した[1]。今回の供試菌株についてPCRを実施したところ、*M. haemolytica*(303株)、*M. glucosida*(3株)および*M. ruminalis*(2株)は16SrRNA解析の結果と一致した結果が得られた(結果は示さず)。このことからAlexanderのmultiplex-PCR法は、*Mannheimia*属菌を同定するために非常に有用なツールとなると考えられる。しかし、本PCR法は牛に病原性が認められる*M. varigena*と*M. granulomatis*には対応していないため、この2菌種については同定できない。このため*Mannheimia*属菌5菌種を菌種レベルで同定可能なPCR法の確立が必要と考えられる。

牛から分離される*Mannheimia*属菌の国内での分離状況が解明されて、生化学性状検査キットにより*M. haemolytica*と同定された菌株の6.5%は、別の菌種に分類されることが明らかとなった。牛から分離された*Mannheimia*属菌を同定する際は、生化学性状検査キットに加え、血清型、追加の生化学性状検査、PCR法等、各検査機関で実施可能な手法を組み合わせることで、同定精度が向上すると考えられる。

### 引用文献

1. Alexander, T.W., Cook, S.R., Yanke, L.J., Booker, C.W., Morley, P.S., Read, R.R., Gow, S.P. and McAlister, T.A. 2008. A multiplex polymerase chain reaction assay for the identification of *Mannheimia haemolytica*, *Mannheimia glucosida* and *Mannheimia ruminalis*. Vet. Microbiol. 130: 165-175.
2. Angen, O., Ahrens, P. and Bisgaard, M. 2002. Phenotypic and genotypic characterization of *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica*-like strains isolated from diseased animals in Denmark. Vet. Microbiol. 84:103-114.
3. Angen, O., Mitters, R., Caugant, D.A., Olsen, J.E. and Bisgaard, M. 1999. 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. 49:67-86.
4. Angen, O., Quirie, M., Donachie, W. and Bisgaard, M. 1999. Investigations on the species specificity of *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica* serotyping. Vet. Microbiol. 65:283-290.
5. Biberstein, E.L. 1978. Biotyping and serotyping of *Pasteurella haemolytica*, In: Bergam, T., Norris, J.R. (eds.), Methods in Microbiology, vol. 10: Academic Press, London, pp. 253-269.
6. Blackall, P.J., Bojesen, A.M., Christensen, H. and Bisgaard, M. 2007. Reclassification of [*Pasteurella*] *trehalosi* as *Bibersteinia trehalosi* gen. nov., comb. nov. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 57:666-674.
7. Fodor, L., Varga, J., Hajtos, J., Donachie, W. and Gilmour, N.J. 1988. Characterization of a new serotype of *P. haemolytica* isolated in Hungary. Res. Vet. Sci. 44:399.
8. Frank, G. 1989. Pasteurellosis of cattle, In: Adlam CF, Rutter JM (eds.), *Pasteurella* and Pasteurellosis, Academic Press, London pp. 197-222.
9. Younan, M. and Fodar, L. 1995. Characterisation of a new *Pasteurella haemolytica* serotype (A17). Res. Vet. Sci. 58:98.

## Epidemiological survey and phenotypic characterization of *Mannheimia* spp. isolated from cattle

Ken Katsuda<sup>1)</sup>, Toru Ojima<sup>2)</sup>, Minako Tomiyama<sup>3)</sup>, Yasuo Sato<sup>4)</sup> and Osamu Mikami<sup>1)</sup>

1) National Institute of Animal Health, NARO, 3-1-5 Kannondai, Tsukuba, 305-0856, Japan.

2) Yamagata Prefecture Central Livestock Hygiene Center, 736 Urusiyama, Yamagata, 990-2161, Japan.

3) Aomori Prefecture Towada Livestock Hygiene Service Center, 19-23 Nishi-Nijyuubantyou, Towada, 034-0093, Japan.

4) Iwate Prefecture Central Livestock Hygiene Service Center, 390-5 Sunagome, Takizawa, 020-0605, Japan.

Representative Author: Ken KATSUDA

TEL & FAX: 029-838-7925

E-mail: katsuda@affrc.go.jp

### [Abstract]

Reinvestigation of *Mannheimia haemolytica*-like organisms resulted in reclassification of these organisms and a new genus, *Mannheimia*, containing at least 5 species (*M. haemolytica*, *M. glucosida*, *M. varigena*, *M. granulomatis* and *M. ruminalis*) was established. The aim of the present investigation was to phenotyping, genotyping and serotyping a collection of bacteria previously identified as *M. haemolytica* by commercial identification kit isolated from cattle in Japan.

In all 363 *Mannheimia* spp. isolated cattle between 1998 and 2013 were investigated. Three hundred three isolates belonged to *M. haemolytica*, 29 isolates to *M. varigena*, and 3 isolates to *M. glucosida*. Two isolates identified as *M. granulomatis* and *M. ruminalis*, respectively, were detected. Twenty-four isolates belonged to unnamed groups with the genus *Mannheimia*. 34.2% of the isolates belonged to serotype 1, 15.4% were serotype 2, 28.7% were serotype 6, 20.4% were untypeable, while the rest belonged to serotypes 9, 11, and 14. However, three strains not belonging *M. haemolytica* were typed as serotypes 6 and 9, 99.0% serologically typable strains were identified as *M. haemolytica* or *M. glucosida* by their 16S rRNA gene sequences. In this investigation, 11 additional phenotypic tests for identification of genus *Mannheimia* and consequently at least five additional phenotypic test is necessary for identification.

These observations emphasize that biochemical, serological and genetic characterization is necessary for the proper identification of these organisms.

**Key words:** *Mannheimia* spp., phenotyping, genotyping, serotyping