

## 実験用ウサギのパスツレラ感染に関する病原学的研究

輿水 馨・佐藤 淳子

(家畜微生物学研究室)

平成5年8月10日受理

### Etiological Studies on *Pasteurella multocida* Infections in Laboratory Rabbits

Kaoru KOSHIMIZU and Junko SATO

(Laboratory of Veterinary Microbiology)

#### 緒 言

*Pasteurella multocida* はグラム陰性、通性嫌気性、非運動性、無芽胞の小桿菌で、脊椎動物に感染して多彩な病気を起こす細菌である。本菌はA, B, D, E, Fからなる5型の莢膜(K)抗原およびいくつかの菌体(O)抗原により、K群とO群に分けられ、それらの組合せによって血清型が決められている。血清型は宿主特異性および病原性と密接に関連するため、本菌の感染症を研究するうえで重要な示唆を与える<sup>9)</sup>。

本菌は広範な宿主域をもち、哺乳動物ではウシ、野牛、トナカイ、ヒツジ、ウマ、ブタ、ウサギ、ライオン、イヌ、ネコなど、および各種鳥類の口腔、上部気道に常在していることが知られている<sup>11)</sup>。これらの動物のうちウシの出血性敗血症、鳥類の家禽コレラ(鳥コレラ)は特定の血清型によって起こる激烈な伝染病である。ウシの出血性敗血症は現在わが国に発生は見られないが、家禽コレラは1976年以来散発的に各種の鳥類に発生が認められている<sup>9,11)</sup>。一方、別の特定の血清型はウシ、ブタ、ヒツジ、ヤギなどに慢性的な肺炎あるいは敗血症を起こさせ、最近ではまた、ブタの萎縮性鼻炎にも関係することが報告<sup>6)</sup>されている。

さらに実験動物としてのウサギにも本菌は広く蔓延し、鼻炎、肺炎、膿瘍などが集団的に発生することがあり、動物実験上の大きな障害となっている<sup>7)</sup>。ヒトにも感染して呼吸器病の原因となることもあるため、公衆衛生上からも注意すべき細菌である。

1991年3月、獣医学科家畜微生物学講座に実験動

物として4羽のウサギが購入されたが、そのうち1羽の腹部に乳房を中心に皮下膿瘍が認められ、さらに他の3羽にも連続的なくしゃみと、それに伴う漿液性あるいは粘液性の鼻汁の排出が認められた。そこでパスツレラ感染を疑い、これらのウサギの細菌学的検査を行い、かつブリーダーの汚染度調査を実施したので報告する。

#### 材料および方法

##### 1. 検査に供した動物

細菌検査を実施した動物は某動物ブリーダーより購入した実験用ウサギ(日本白色種♂4羽)で、そのうち1匹は削瘦して腹部の乳房を中心に皮下膿瘍が3ヵ所に認められ(Fig. 1)、他の3匹は鼻かぜ症状(スナッフ)のみを呈していた。

##### 2. 実験に供した参照株

生化学的性状および血清学的性状試験に対照として用いた菌株は農林水産省家畜衛生試験場より分与を受けた*P. multocida* X73(莢膜抗原型A型)、M1404(B型)およびKobe 6(D型)の3株である。

##### 3. 細菌の分離方法

ウサギの膿瘍を切開し、無菌的に採取した膿汁を5%馬血液寒天培地に接種し、37°C24時間培養した。鼻汁および気管からの菌分離には、滅菌綿棒を用いて粘液を採取し、直接血液寒天培地に塗抹して37°Cで24時間培養した。臓器からの菌分離は、無菌的に肺、肝、腎、脾の切片を寒天上に圧平し、常法に従って培養した。



Fig. 1. Subcutaneous abscesses observed in abdominal part of a laboratory rabbit.

#### 4. 分離菌の生物学的性状の検査

血液寒天培地上に発育した集落の性状を観察し、純培養して得られた菌体についてグラム染色、メラーの莢膜染色を行った。さらに生化学的性状試験として、カタラーゼ試験、オキシダーゼ試験、ウレアーゼ試験、インドール試験、硝酸塩還元試験、クエン酸塩利用能試験、PPA 試験、VP・MR 試験、SIM 培地における運動性、マッコンキー寒天培地における発育の有無および各種糖分解能試験を行った。糖分解能は、グルコース、シュクロース、マンニトール、ソルビトール、ラクトース、マルトース、ラフィノース、キシロース、アラビノース、ズルシトールおよびエスクリンに対して試験した。いずれも細菌学実習提要(丸善)に記載された常法に従って行った。ただし糖分解能試験は、分離株および参照株がペプトン水に増殖しなかったため、それに肉エキスを0.3g/100ml 添加した培地を用いた。

#### 5. 分離株の莢膜抗原型別

##### 1) 免疫血清の作成

*P. multocida* 分離株 R-1, および参照株 X73 (A型), M1404 (B型), Kobe 6 (D型) 計4株の Dex-

trose Starch Agar (DSA)(Difco), 37°C18時間培養菌体をかきとり、0.3%ホルマリン生理食塩水に溶解混合し、濃度を McFarland No. 1 に調整した(約  $10^8$ /ml)。この浮遊液を37°C1晩静置し免疫に用いた。免疫には *P. multocida* フリーのウサギ日本白色種♂3 kg を用い、1日、7日、14日、21日、28日、35日目に抗原をそれぞれ、1 ml (皮下), 0.2ml (耳静脈), 0.4ml (耳静脈), 0.6ml (耳静脈), 0.8ml (耳静脈), 1.0ml (耳静脈) 注射し、42日目に試血し、十分な力価が得られた場合は全採血し、よい力価が得られない場合は追加免疫1.0ml (耳静脈) を行った。分離した血清は小試験管に分注して-30°Cで保存した。なお X73 (A型) に対するニワトリの抗血清は東京医科大学の川本英一先生より分与を賜わった。

##### 2) ヒツジ赤血球の固定

間接血球凝集 (IHA) 試験は Carter<sup>1)</sup> によって報告され、後に沢田ら<sup>10)</sup> によって改良された方法に準じて行った。すなわち、まずグルタルアルデヒド固定ヒツジ赤血球 (GA-SRBC) を作成した。新鮮なヒツジ赤血球 (SRBC) を1500rpm15分、リン酸緩衝食塩液 (PBS) で6回洗浄し、0.02M PBS 中に10%浮遊液とした。この浮遊液と同量の1% (vol/vol) グルタルアルデヒド水溶液を混和し、4°Cに30分間、ときどき震盪させながらヒツジ赤血球を固定した。その後、固定した GA-SRBC を1000rpm10分間3回洗浄した。GA-SRBC は PBS 中に10%浮遊液として変質を防止するために0.1%アジ化ナトリウム ( $\text{NaN}_3$ ) を加え4°Cに保存した。

##### 3) 抽出抗原と感作血球の作成

加熱抽出抗原の作成のために分離株および参照株を DSA 上で18時間培養し、それぞれを白金耳でかき取り、DSA 平板1枚分の菌を0.02M PBS 3 ml に浮遊させた(菌量約  $10^8$ 個/ml)。同量の200unit のヒアルロニダーゼ溶液と混合し、ときどき震盪しながら37°C2時間反応させた。その後100°C1時間加熱し莢膜抗原を溶出させ、室温まで冷却し、3000rpm30分間遠心沈殿した。その上清を加熱抽出抗原とし、0.1%  $\text{NaN}_3$  を加え4°Cで保存した。ついで加熱抽出抗原と GA-SRBC を混合し、37°C2時間ときどき震盪しながら感作後、1500rpm10分間遠心沈殿、0.02M PBS で3回洗浄して、0.25%牛血清アルブミン (BSA) と0.1%  $\text{NaN}_3$  を含む PBS 中に感作 GA-SRBC が0.5%になるように調整した。

## 4) IHA 反応の術式

IHA 反応はマイクロタイターシステムを用いて行った。ウサギの抗血清を予め小試験管内で PBS によって 2 倍段階希釈した。希釈された抗血清を U-bottom のマイクロプレートの中にマイクロピペットを用いて  $50\mu\text{l}$  ずつ滴下し、その後、感作血球を  $50\mu\text{l}$  ずつ滴下した。陰性対照として PBS  $50\mu\text{l}$  とそれぞれの抗原感作血球  $50\mu\text{l}$  を含むウェルを置いた。プレートは乾燥しないようにプレート・シーラーで密封して室温に清置し、2 時間後と翌朝に反応を判定した。判定は管底の血球凝集像が (+) を示した血清の最高希釈倍数を以て抗体価とした。

## 6. A 型株の脱莢膜試験

*P. multocida* A 型株の莢膜はヒアルロン酸で構成され、*Staphylococcus aureus* から分泌されるヒアルロニダーゼによって融解されることを利用した脱莢膜試験<sup>2)</sup>を行った。分離株 4 株および参照株 3 株を DSA 上に白金耳を用いて約 5 mm 幅に画線培養し、その画線のほぼ中央右側に教室保存の *S. aureus* T 1 株を濃密にスポット接種した。乾燥しないようにして  $37^{\circ}\text{C}$  24 時間培養し、*P. multocida* の画線培養帯の幅の減少ないし融解現象の有無を観察した。

## 7. 病原性試験

## 1) マウスに対する病原性

R-1 (A 型), X73 (A 型), M1404 (B 型), Kobe 6 (D 型) の計 4 株を用い、DSA にて  $37^{\circ}\text{C}$  18 時間培養した菌を生理食塩水中に浮遊させ、その 10 倍段階希釈液を  $0.2\text{ml}$  ずつ SPF マウス (ICR, 5 週齢, ♀) の腹腔内に投与した。菌投与後、毎日マウスの症状と死亡の有無を観察した。死亡した個体はその日に剖検し細菌分離を行った。生存耐過したものは 14 日に殺処分して剖検し菌分離を行った。

## 2) ウサギに対する病原性

R-1 株の DSA,  $37^{\circ}\text{C}$ , 18 時間培養菌を生理食塩水に浮遊液とし *P. multocida* フリーのウサギ (NZW 種 1 ヶ月齢 ♂) 4 匹に次のように投与した。すなわちウサギ No. R-9 (体重 692g) の腹部皮下 6 ヶ所に *P. multocida* R-1 株  $10^4 \sim 10^9$  個/ $0.1\text{ml}$  ずつを接種した。ウサギ No. R-10 (体重 622g) には、R-1 株  $10^7$  個/ $0.1\text{ml}$  を左右の鼻腔内に 2 滴ずつ 2 日間に亘り滴下した。ウサギ No. R-11 (体重 750g) には、R-1 株  $10^8$  個/ $0.1\text{ml}$  2 滴を経鼻的に投与した。ウサギ No. R-8 (体重 644g) は無処置対照とした。菌投与後、ウサギの症状を観察し、体重の計量および鼻腔からの菌分離を各週毎に試みた。ウサギ No. R-9 は 2 週後に、他の 3 匹は 50 日目に殺処分し、剖検変状を観察し、心血、肺、気管、眼結膜より菌の分離を試みた。

## 8. ブリーダー施設における汚染度調査

動物ブリーダーの飼育施設におけるウサギの *P. multocida* 汚染状態を調べるため、某施設で飼育中の外見的に健康なウサギ NZW 種 8 匹、日本白色種 13 匹の鼻汁を滅菌綿棒で採取し菌の分離を試みた。これらのうち採血が可能であった 2 匹について IHA 試験を行い、3 匹については剖検した。

## 実験成績

1. 実験用ウサギからの *P. multocida* の分離

1991 年 3 月、当教室に搬入された実験用のウサギ 4 匹の鼻汁、気管、肺、膿瘍、肝、脾、腎から細菌の分離を試みたところ、Table 1 に示すように、鼻汁、気管および膿瘍から血液寒天培地上に乳白色粘調のコロニーが培養され (Fig. 2)、グラム陰性で両端濃染の小桿菌がほぼ純粋に分離された。新鮮な分

Table 1. Isolation of *P. multocida* from various sites of experimental rabbits

Rabbit No.	Sites of examined						
	Nasal cavity	Trachea	Lung	Abscess	Liver	Spleen	Kidney
R-1	+	-	-	+* <sup>1</sup>	-	-	-
R-2	+	+	-	*	-	-	-
R-3	+	+	-	*	-	-	-
R-4	+	-	-	+* <sup>2</sup>	-	-	-

+ Positive    - Negative    \*<sup>1</sup> Subcutaneous tissue and paranasal sinuses  
\*<sup>2</sup> Paranasal sinuses  
\* No abscess

離株のコロニーは斜光線による観察によって橙色の蛍光色が認められた。剖検の結果、2匹の副鼻腔にも蓄膿が認められ、この膿からも同様な細菌が分離された。

## 2. 分離菌の生物学的性状による同定

分離菌株 (R-1, R-2, R-3, R-4) はいずれもグラム陰性、通性嫌気性、無芽胞の非運動性の小桿菌で、メラーの莢膜染色によって菌体の周囲を取り囲んでいる薄桃色の莢膜が認められた (Fig. 3)。

その生化学的性状は Table 2 に示すように、グルコース以下各種の糖を分解したが、ラクトース、ラフィノース (分離株は3日以後陽性に転じた)、ズルシトール、エスクリンは分解しなかった。アラビノースの分解性は参照株が陰性であったが、分離株は陽性を示した。また、ズルシトールは参照株の X73 (A型) のみが陽性を示した。その他カタラーゼ (+)、オキシダーゼ (+) (R-4 のみ陰性)、ウレアーゼ (-)、インドール (+)、硝酸塩還元 (+)、クエン酸塩利用能 (-)、PPA 反応 (-)、マッコンキー寒天培地の発育 (-)、VP・MR 反応 (-) であった。以上の成績により分離菌を *P. multocida* と同定した。

## 3. 分離株の莢膜抗原型

### 1) IHA 試験による型別

IHA 試験による分離株 R-1 の莢膜抗原型別は Table 3 示すように、分離株 R-1 の抗血清は R-1 抗原に対し 1 : 320 の抗体価を示し、X73 (A型) に対するウサギ及びニワトリの抗血清は R-1 抗原に対しそれぞれ 1 : 5120, 1 : 1280 の抗体価を示した。

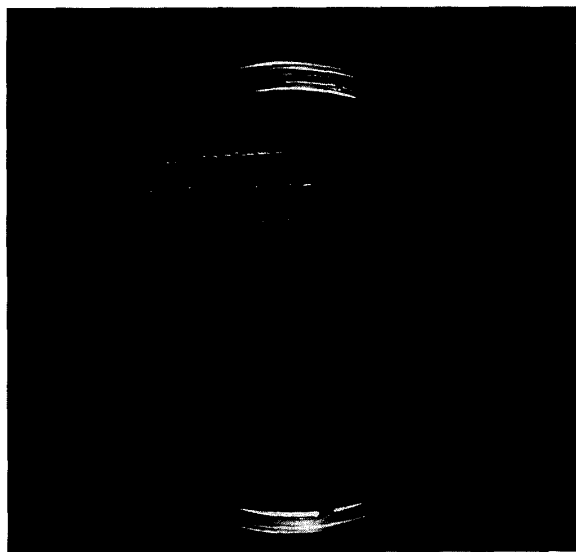


Fig. 2. Colonies of *P. multocida* strain R-1 cultured on DSA incubated at 37°C for 24 hrs.

このことから R-1 の莢膜抗原型を A 型と判定した。Kobe 6 (D型) の抗血清はホモローガスな抗原と反応しなかった。

### 2) ヒアルロニダーゼ脱莢膜試験による型別

分離株 (R-1, R-2, R-3, R-4) および参照株 X73 (A型) はいずれも画線培養帯の融解が認められた (Fig. 4)。しかし莢膜に少量のヒアルロン酸を含む M1404 (B型) 株およびヒアルロン酸を全く含まない Kobe 6 株は陰性を示した。これらのことから分離株の莢膜抗原型は A 型と決定した。

## 4. 病原性試験

### 1) マウスに対する病原性

マウスの腹腔内に *P. multocida* の分離株および参照株を接種した成績を Table 4 に示す。参照株の X73 (A型) と M1404 (B型) はきわめて病原性が強く、接種後 1-2 日で全例が死亡し、鼻汁、肺、心血、腹水などから菌が回収され、すべてのマウスに肺病変が認められた。一方、分離株 R-1 は  $10^3/0.2$  ml と  $10^5/0.2$  ml 接種の 2 匹が 3 日後に死亡したのみで、菌の回収、肺病変の形成が一部のマウスに認められたに過ぎなかった。参照株 Kobe 6 (D型) は

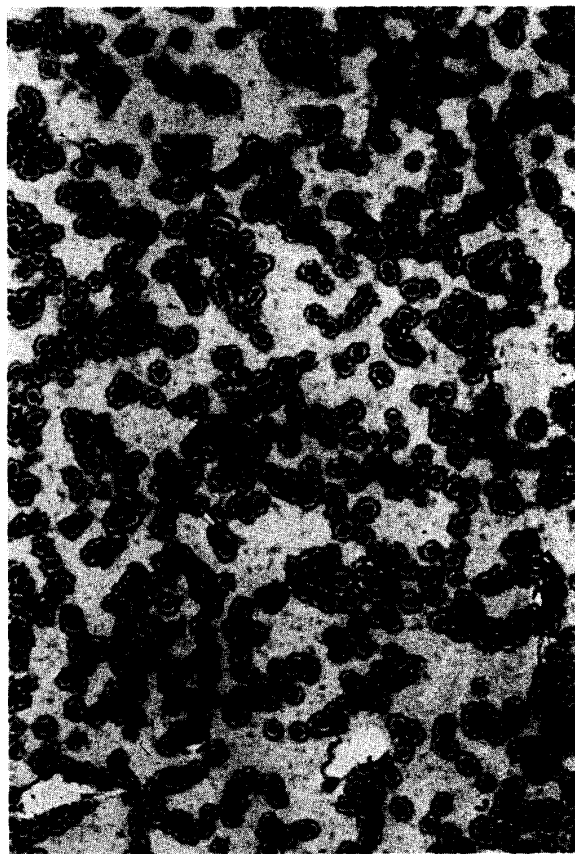


Fig. 3. Capsules of *P. multocida* strain R-1 shown by Möller's staining

Table 2. Biochemical properties of isolated strains

Property	Isolated strain				Reference strain		
	R-1	R-2	R-3	R-4	X73 (Type A)	M1404 (Type B)	Kobe 6 (Type D)
Glucose	+	+	+	+	+	+	+
Sucrose	+	+	+	+	+	+	+
Mannitol	+	+	+	+	+	+	+
Sorbitol	+	+	+	+	+	+	+
Lactose	-	-	-	-	-	-	-
Maltose	+	+	+	+	+	+	+
Raffinose	-*1	-*1	-*1	-*1	-	-	-
Xylose	+	+	+	+	+	+	+
Arabinose	+	+	+	+	-	-	-
Dulcitol	-	-	-	-	+	-	-
Esculin	-	-	-	-	-	-	-
Catalase	+	+	+	+	+	+	+
Oxidase	+	+	+	-	+	+	+
Urease	-	-	-	-	-	-	-
Indole	+	+	+	+	+	+	+
Motility	-	-	-	-	-	-	-
Nitrate	+	+	+	+	+	+	+
Citrate	-	-	-	-	-	-	-
PPA*2	-	-	-	-	-	-	-
MacConkey	-	-	-	-	-	-	-
MR*3	-	-	-	-	-	-	-
VP*4	-	-	-	-	-	-	-

\*1 Positive 3 days later      \*3 Methylred  
 \*2 Phenylpyruvic acid      \*4 Voges-Proscauer

Table 3. Serotyping of capsular antigens of isolates determined by IHA test

Antiserum Antigen	R-1	X73 (Type A)		M1404 (Type B)	Kobe 6 (Type D)
		(1)	(2)		
R-1	320	5120	1280	<20	<20
X73 (Type A)	40	2560	640	<20	<20
M1404 (Type B)	<20	<20	<20	320	<20
Kobe 6 (Type D)	<20	<20	<20	<20	<20

(1) Rabbit antiserum      (2) Chicken antiserum

マウスに対し全く病原性を示さなかった。

2) ウサギに対する病原性

皮下投与されたらウサギ No. R-9 は1週後から食欲廃絶し、下痢、脱水症状を呈した。皮下接種1週後に、R-1株 $10^9$ 個接種部位に径15mmと20mmの2個の円形が繋がったような硬結がみられ、これは次第に赤く浮き上がってきて柔らかい膿瘍となった。2週目には食欲全く廃絶、下痢、脱水症状を呈したため、安楽死させ剖検したところ、腹腔には重度の蓄膿が認められた。皮下の膿瘍および腹腔

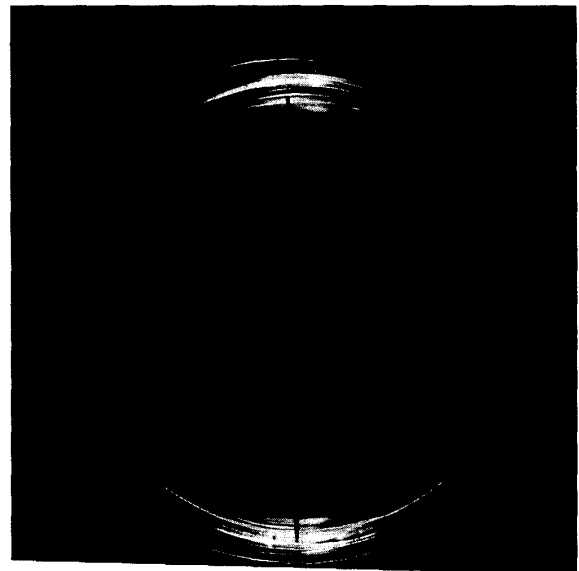


Fig. 4. Hyaluronidase decapsulation of R-1 (Type A) strain seen on the right side of the agar plate. Strain Kobe 6 (Type D) is not decapsulated as seen on the left side of the agar plate.

Table 4. Pathogenicity of *P. multocida* to mice

Strain	Dose 0.2ml	Death or survival after injection (days)							Recovery of organisms				Pneumonia
		1	2	3	4	5	6	7	Nasal	Lung	Blood	Ascites	
R-1 (Isolate)	10	○	○	○	○	○	○	○	-	-	•	+	-
	10 <sup>2</sup>	○	○	○	○	○	○	○	-	+	•	+	+
	10 <sup>3</sup>	○	○	●					+	+	•	+	+
	10 <sup>4</sup>	○	○	○	○	○	○	○	-	+	•	+	-
	10 <sup>5</sup>	○	○	●					+	+	+	+	+
	10 <sup>6</sup>	○	○	○	○	○	○	○	-	-	-	+	+
	10 <sup>7</sup>	○	○	○	○	○	○	○	-	-	-	+	+
X73 (Type A)	10 <sup>2</sup>	●							+	+	+	+	+
	10 <sup>3</sup>	○	●						+	+	+	+	+
	10 <sup>4</sup>	●							+	+	+	+	+
	10 <sup>5</sup>	●							+	+	+	+	+
	10 <sup>6</sup>	●							+	+	+	+	+
	10 <sup>7</sup>	●							+	+	+	+	+
M1404 (Type B)	10 <sup>3</sup>	○	●						+	+	+	+	+
	10 <sup>4</sup>	●							+	+	+	+	-
	10 <sup>5</sup>	●							+	+	+	+	+
	10 <sup>6</sup>	●							+	+	+	+	+
	10 <sup>7</sup>	●							+	+	+	+	+
Kobe 6 (Type D)	10 <sup>2</sup>	○	○	○	○	○	○	○	-	-	-	-	-
	10 <sup>3</sup>	○	○	○	○	○	○	○	-	-	-	-	-
	10 <sup>4</sup>	○	○	○	○	○	○	○	-	-	-	-	-
	10 <sup>5</sup>	○	○	○	○	○	○	○	-	-	-	-	-
	10 <sup>6</sup>	○	○	○	○	○	○	○	-	-	-	-	-
	10 <sup>7</sup>	○	○	○	○	○	○	○	-	-	-	-	-

○ Survival ● Death • Not done

内の膿汁から *P. multocida* が分離された。

経鼻投与した2匹のウサギは元気で食欲もあり体重も順調に増加した。接種後2週目まで鼻腔から *P. multocida* が回収されたが、3週目以降はどのウサギからも検出されなくなった。いずれのウサギも IHA 抗体価は1:20以下であった。

以上の結果、*P. multocida* の皮下接種により膿瘍の形成が再現できた。経鼻接種によっては、菌の短期間における定着は認められたが、明瞭な症状および病変を実証することはできなかった。

### 5. 汚染度調査

某実験動物ブリーダーにおけるウサギのパスツレラ感染の汚染度を調査したところ、外見的に健康な21匹(日本白色種13匹, NZW種8匹)のうち4匹(19.0%)の鼻腔から *P. multocida* が検出された(Table 5)。これらはクリーン生産室(A室)およびリタイア室(B室)の両方にわたって検出された。

これらのウサギのうち3匹を入手して血清のIHA抗体価(一匹は運搬中死亡したため未検査)と剖検変状を調べた成績をTable 5に示す。3匹とも鼻汁、副鼻腔、気管から *P. multocida* が分離された。剖検所見として、心外膜炎、肺炎などの病変が認められた。

### 考 察

わが国における実験用ウサギの微生物統御については多くの問題があり、とくにブリーダーあるいは動物実験施設における *P. multocida* の汚染は深刻な問題である。ウサギのパスツレラ感染について古くは, Webster<sup>12-16)</sup> による一連の研究が行われており *P. multocida* はウサギのいわゆるスナッフの一義的病原体であることが明らかにされている。Kawamotoら<sup>3)</sup> はわが国における11カ所の動物実験施設で飼育されているウサギ668例中199例

Table 5. A survey for contamination of *P. multocida* among experimental rabbits in an animal breeder

Room	Breed	Sex	Isolation of <i>P. multocida</i>	IHA test	Pneumonia
A (Clean)	NZW	♀	—	•	•
	NZW	♀	—	•	•
	NZW	♂	—	•	•
	NZW	♂	+	1:40	+
	JW	♀	—	•	•
	JW	♀	—	•	•
	JW	♂	—	•	•
	JW	♂	+	1:<20	+
	JW	♂	—	•	•
B (Retire)	JW	♂	—	•	•
	NZW	♀	+	*	+
	NZW	♀	+	*	•
	JW	♀	—	•	•
	JW	♂	—	•	•
C (Clean)	JW	♀	—	•	•
	JW	♀	—	•	•
	JW	♀	—	•	•
	NZW	♀	—	•	•
	NZW	♀	—	•	•

• Not done \* Not done due to death

(29.8%) が本菌によって汚染されていることを報告した。これらのうち一見健康なウサギの汚染率は526例中83例 (15.8%) であったが、鼻炎を呈したウサギは142例中116例 (81.7%) で、高率に汚染していたと云う。

本菌の伝播は接触感染よりむしろウサギのくしゃみ等による飛沫感染によるものが多いことが、Kawamoto ら<sup>3)</sup>、松沼<sup>7)</sup> により報告されている。動物実験施設のように個別ケージ飼いのところでは、個体間の接触が少ないことから飛沫感染が当然のように思われる。このようにして本菌の感染はウサギ集団内で比較的速やかに拡大し、多くの動物が無症状のまま保菌状態となり、実験処置を加えたり、過密飼育などの飼育条件が悪化すると発病するものと思われる。本菌による主要な症状はスナッフルであるが、その他肺炎、中耳炎、皮下膿瘍、結膜炎、生殖器疾患、敗血症などがあげられている<sup>7)</sup>。今回、当教室に搬入された実験用ウサギは某ブリーダより購入したものであるが、1匹の腹部には皮下膿瘍が認められ、他の3匹には軽度ながらスナッフルが認めら

れた。そして、これらの膿瘍、鼻汁および気管から *P. multocida* がほぼ純粋に分離されたことから、これらのウサギは典型的なパスツレラ感染症であった。

分離株の生化学的性状のうち、ラフィノーズとアラビノーズの分解が参照株と異なっていたが、これらの性状は菌株によって異なることが知られているので<sup>5)</sup>、分離株を *P. multocida* と同定して差し支えないものと思われる。

Kawamoto ら<sup>4)</sup> は、わが国の各地における動物実験施設で飼育中のウサギおよびその飼育環境から分離した計60株の *P. multocida* の莢膜抗原を IHA による型別し、その全部が A 型であると報告した。今回我々が実験用ウサギの膿瘍から分離した株も莢膜抗原型は A 型であり、Kawamoto ら<sup>4)</sup> の報告と一致した。参照株 Kobe 6 (D 型) に対するウサギ抗血清の力価は追加免疫にもかかわらず上昇が認められなかったが、その理由は不明である。なお菌体抗原 (O 抗原) について Kawamoto ら<sup>4)</sup> Rimler ら<sup>8)</sup> は、12型が多いことを報告しているが、今回我々は実施できなかったので将来に検討が残された。

分離株 R-1 のマウスに対する病原性は  $10^3/0.2\text{ml}$  と  $10^5/0.2\text{ml}$  を腹腔内接種した 2 匹が 3 日目に死亡したのみであった。この成績は参照株の X73 (A 型) および M1404 (B 型) の強い病原性に較べ極めて弱いものであった。すなわち同じ A 型でもマウスに対し菌株によって著しい病原性の差があることが判明した。ブタ由来の *P. multocida* には毒素産生株が知られており<sup>8)</sup>、とくに A 型菌および D 型菌の多くは皮膚壊死毒素 (dermonecrotic toxin; DNT) を産生し、ブタ萎縮性鼻炎との関係が論ぜられているので<sup>6)</sup>、ウサギ由来株の毒素産生性については今後検討すべき課題の一つであろう。

ウサギに対する感染実験において、経鼻接種によっては一過性に菌の定着が認められたに過ぎなかったが、腹部皮下接種により、自然感染例に似た膿瘍が再現した。おそらく自然例では、不潔な床材などに生息していた菌が腹部の小さな傷あるいは乳頭などから皮下に侵入して膿瘍を形成したことが想像される。

さらに、某ブリーダーにおける汚染度調査により、本来クリーンであるべき生産室においても本菌の汚染がみとめられた。このことは、Kawamoto ら<sup>3)</sup> の調査からも判るように、わが国のいくつかのコンベンショナルブリーダーのウサギ飼育室に、*P. multocida* が根強く浸潤していることを示すものである。本菌感染症の対策として、発病動物の隔離、処分、抗生物質の投与、ワクチン接種の試みは、たとえ一時的に発病個体数を減少させることはできるにしても、本病を根絶させるための有効的手段ではない。従って将来の方策として考えられる手段は、帝王切開由来の種親を用いたウサギの SPF 化を進め、バリアー・システム内での繁殖維持集団を確立することであろう。しかも、そのようにして生産されたクリーンな動物の供給がユーザーにとって十分利用できるような商業ベースで行われることが必要である。

## 要 約

実験用ウサギの腹部皮下膿瘍からグラム陰性の小桿菌が分離された。分離株の培養性状ならびに各種生物学的性状より本菌は *Pasteurella multocida* と同定された。グルタルアルデヒド固定・抽出抗原感作ヒツジ赤血球を用いる間接血球凝集反応およびヒアルロニダーゼ脱莢膜試験により、分離株の莢膜抗原型は A 型と決定された。分離株は SPF ICR

マウスの腹腔内投与により弱い病原性を示した。SPF ウサギの腹部皮下注射により自然例に似た膿瘍が再現され、病変部から菌が回収された。本菌を経鼻接種されたウサギには、軽度のスナッフが認められたに過ぎなかった。

某動物ブリーダーの汚染調査において、21 匹中 4 匹 (19%) から *P. multocida* が分離された。このことは、わが国のコンベンショナル動物飼育施設の一部に本菌が根強く汚染していることを示唆している。

**謝辞** 本研究を遂行するに当り、*P. multocida* 参照株の分与にご援助を賜った獣医学科獣医公衆衛生学教室の柚木弘之教授、技術的な面で種々懇切な御指導をいただいた日本獣医大学の沢田拓二教授ならびに東京医科大学の川本英一先生に対し深甚な謝意を表す。

## 文 献

- 1) Carter, G. R.: Studies on *Pasteurella multocida*. I. A hemagglutination test for the identification of serological types. *Am. J. Vet. Res.*, **16**, 481-484 (1955)
- 2) Carter, G. R. and Rundell, S. W.: Identification of type A strains of *P. multocida* using Staphylococcus hyaluronidase. *Vet. Rec.*, **96**, 343 (1975)
- 3) Kawamoto, E., Sawada, T. and Maruyama, T.: Prevalence and characterization of *Pasteurella multocida* in rabbits and their environment in Japan. *Jpn. J. Vet. Res.*, **52**, 915-921 (1990)
- 4) Kawamoto, E., Sawada, T., Suzuki, K. and Maruyama, T.: Serotype of *Pasteurella multocida* isolates from rabbits and their environment in Japan. *Jpn. J. Vet. Sci.*, **52**, 1277-1279 (1990)
- 5) Krieg, N. R. and Holt, J. J.: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 1, pp. 552-557, Williams and Wilkins, Baltimore and London (1984)
- 6) 中瀬安清: ブタの萎縮性鼻炎, 獣医学 1986, pp. 89-106, 近代出版, 東京 (1986)
- 7) 松沼尚史: パストゥレラ病, 実験動物感染病学第 1 版, pp. 42-44, ソフトサイエンス, 東京 (1980)
- 8) Rimler, R. B. and Brogden, K. A.: *Pasteurella multocida* isolated from rabbits and swine: Serologic types and toxin production. *Am. J. Vet. Res.*, **47**, 730-737 (1986)
- 9) 沢田拓二: *Pasteurella multocida* の血清型別に関する研究の現状ならびに、わが国の家畜・家禽における本菌感染症の動向。家畜抗菌剤研究会報, No.11, 2-12 (1990)
- 10) Sawada, T., Rimler, R. B. and Rhoades, K.: Indirect hemagglutination test that uses glutaraldehyde-fixed sheep erythrocytes sensitized with extract antigens for detection of *Pasteurella* antibody. *J. Clin. Microbiol.*, **15**, 752-756 (1982)
- 11) 杉本千尋: パストゥレラセエ (パストゥレラ科), 新編獣医微生物学, pp. 229-239, 養賢堂, 東京 (1989)
- 12) Webster, L. T.: The epidemiology of a rabbit respiratory infection. I. Introduction. *J. Exp. Med.*, **39**, 837 (1924)
- 13) Webster, L. T.: The epidemiology of a rabbit respira-



- tory infection. II. Clinical, pathological, and bacteriological study of snuffles. *J. Exp. Med.*, **39**, 843-856 (1924)
- 14) Webster, L. T.: The epidemiology of a rabbit respiratory infection. III. Nasal flora of laboratory rabbits. *J. Exp. Med.*, **39**, 857 (1924).
- 15) Webster, L. T.: The epidemiology of a rabbit respiratory infection. IV. Susceptibility of rabbits to spontaneous snuffles. *J. Exp. Med.*, **40**, 109 (1924).
- 16) Webster, L. T.: The epidemiology of a rabbit respiratory infection. V. Experimental snuffles. *J. Exp. Med.*, **40**, 117 (1924)

### Summary

An isolation of small Gram-negative bacteria was executed not only from the subcutaneous abscesses in the abdominal part of a Japanese laboratory white rabbit but also from the nasal cavities of other three rabbits afflicted with snuffles. By Möller's staining the isolated organisms were noted to have capsules, and were identified to be *Pasteurella multocida* based on their cultural and other biochemical characteristics.

By means of the following two sorts of test, namely the hemagglutination-inhibition test using the glutaraldehyde-fixed sheep-erythrocytes sensitized with extract antigens, and the hyaluronidase-decapsulation test, capsular antigens of the isolates were fixed to be of serotype-A.

A slight virulence against SPF ICR-mice was shown by the isolates when they were injected intraperitoneally. When a SPF rabbit was injected subcutaneously with the isolated organisms, subcutaneous abscesses similar to the natural ones were formed, with a recovery of the organisms from the lesions. Only mild snuffles were shown by the rabbits injected intranasally with the organisms.

In a survey for *P. multocida* contamination carried out in the rabbit colony by a certain breeder, it was confirmed that the organisms were harbored in the nasal cavities of 4 out of 21 animals (19.0%). This fact may suggest that in Japan there are some conventional animal facilities contaminated firmly with *P. multocida*.