

総説

Staphylococcus aureus による潜在性乳房炎における 乾乳期の乳房内タイロシン注入の効果

原口麻子¹⁾、大田哲夫²⁾、中谷啓二³⁾、神岡康博⁴⁾、竹内泰造⁵⁾、
黒瀬智康³⁾、鈴木直樹²⁾、檜垣恒夫⁶⁾、金子宗平⁷⁾、篠塚康典⁸⁾

1) NOSAI 広島 庄原家畜診療所、2) 北広島家畜診療所、
3) 北広島家畜診療所 廿日市分室、4) 三次家畜診療所、
5) 府中家畜診療所 福山分室、6) 東広島家畜診療所、
7) 府中家畜診療所、8) 麻布大学

*連絡担当者：原口麻子

〒722-0013 広島県庄原市西本町二丁目21番地20

【要約】

Staphylococcus aureus (*S.aureus*) による乳房炎は難治性で、*S.aureus* にはバイオフィーム形成能があることが知られている。*S.aureus* による乳房炎は潜在性でも体細胞が増加するため、治療効果のない場合は盲乳処置や淘汰を行うしかなく、その経済損失は甚大である。しかし、有効な治療報告は少ない。海外では、タイロシンの半合成誘導体であるチルミコシンの乳房内注入による乾乳期治療が報告されている。今回、効果的な乾乳時治療法の確立を目的に、*S.aureus* による潜在性乳房炎におけるタイロシンの全身投与とセフェム系乾乳軟膏及びタイロシンの乳房内注入による乾乳期治療の効果を検討した。材料は平成25年7月から平成28年9月に、乾乳前乳汁の細菌培養検査で*S.aureus* による潜在性乳房炎と診断された24頭34分房である。治癒群は22分房、非治癒群は12分房で群間の年齢、乾乳日数に差をみなかった。治癒率は個体58.3%、分房64.7%で、治癒例にはタイロシン耐性株、感受性中間株もみられた。タイロシンでは、近年バイオフィーム形成阻害作用が報告されており、本法でもその関連の可能性が示唆された。

キーワード：乾乳期治療、乳房内注入、*Staphylococcus aureus*、潜在性乳房炎、タイロシン

1. はじめに

Staphylococcus aureus (*S.aureus*) による乳房炎は、代表的な伝染性乳房炎で、難治性であることが知られ、安全で良質な牛乳生産の上からも適切なコントロールが必要とされている。*S.aureus* による乳房炎に対する乾乳期治療は、泌乳期治療により治癒しなかった分房や*S.aureus* による潜在性乳房炎に対して行われ、

乾乳期には抗菌剤による乳出荷制限も関係しないため、現場で広く実施されている。

Snelら[2]は潜在性乳房炎由来の*S.aureus* の93.3%がバイオフィーム形成能をもつことを報告し、*S.aureus* が形成したバイオフィームは抗菌剤に抵抗性が高いと述べている。

先人[3-4]は*S.aureus* による乳房炎の泌乳期治療での治癒率を、潜在性乳房炎で28.6%、臨床型乳房炎で52.2%と報告している。*S.aureus* による潜在性乳房炎は臨床型乳房炎に比べ治療効果が低い。*S.aureus* による乳房炎

は潜在性でも体細胞が増加するため、治療効果のない場合は盲乳処置や淘汰を行うしかなく、その経済損失は甚大である。しかし、*S.aureus*による潜在性乳房炎に対する有効な治療報告は少ない。

タイロシンはマクロライド系抗菌剤の一つで、細菌のタンパク質合成を阻害して静菌作用を示し、グラム陽性菌やマイコプラズマに対して優れた抗菌力を持つ。マクロライド系抗菌剤の特徴は高い組織移行性で、タイロシンはpHトラップ効果により乳腺に蓄積しやすく、乳汁移行性に優れている。また、マクロファージへも高濃度に移行し、蓄積することでマクロファージ内の*S.aureus*に殺菌的な効果を持つ。さらに、海外においてタイロシンの半合成誘導体であるチルミコシンの乳房内投与による*S.aureus*による乳房炎の乾乳期治療を行った事例 [6-7] が報告されている。チルミコシンもまた牛のマクロファージと乳腺上皮細胞に蓄積し、乾乳期治療に有効だとされている。Nikersonらは、試験感染牛を含む*S.aureus*の潜在性乳房炎において、チルミコシンの乳房内注入、チルミコシンの皮下注射による乾乳期治療を行い、その分房治療率はチルミコシンの乳房内注入で74.2%、チルミコシンの皮下注射では9.1%であったと報告している。また、Dingwellらは自然感染した*S.aureus*の潜在性乳房炎で、チルミコシンの乳房内注入による乾乳期治療を行い、治療率は個体で67.3%、分房で72.5%と高い治療率を示している。このようにチルミコシンの乳房内注入による乾乳期治療では高い治療効果が期待できるが、現在日本において成乳牛に対するチルミコシンの使用は認められていない。そこで、今回筆者らは、成乳牛に対しても広く使用されているタイロシンを用い、効果的な乾乳時治療法の確立を目的に、*S.aureus*による潜在性乳房炎にタイロシンの筋肉注射、乾乳軟膏及びタイロシン乳房内注入を併用した乾乳期治療（タイロシン乳注法）を行ったので、その概要を報告する。

2. 材料および方法

試験期間は平成25年7月から平成28年9月で、材料は広島県内で飼養され、乾乳前に*S.aureus*による潜在性乳房炎と診断されたホ

ルスタイン種24頭34分房である。なお、臨床徴候を示さず乳汁細菌検査にて*S.aureus*が検出されたものを*S.aureus*による潜在性乳房炎とした。

タイロシン乳注法は、タイロシン30mL(6,000mg)を乾乳2日前より1日1回3日間筋肉注射し、乾乳日にタイロシン10mL(2,000mg)及び薬剤感受性試験に基づいた乾乳軟膏を乳房内注入した。乾乳軟膏はセファロニウム250mg、セファゾリン250mg又はセファピリン300mgを含有する乾乳期用注入剤を用いた。ただし、2頭2分房はタイロシン10mL(2,000mg)と乾乳軟膏の乳房内注入のみを行った。治療判定は分娩2週間後と4週間後に乳汁細菌検査を行い、2回の検査で*S.aureus*の検出されなかったものを治療とした。

乳汁細菌検査は、乳汁5μLを5%羊血液寒天培地 {ニッスイプレート羊血液寒天培地、日水製薬(株)、東京}、酵素基質培地 {クロモアガーオリエンタシオン[®]、関東化学(株)、東京}及び黄色ブドウ球菌選択分離培地 {ベアードパーカー寒天培地+PRF、シスメックス・ピオメリュー(株)、東京}に塗抹し、37℃24時間好気培養した。コロニーの色、形態、溶血性、ハロー形成の有無と共にグラム染色にてグラム陽性球菌であることを確認し、ラテックススライド凝集検査キット (ドライスポットスタフィテクトプラス[™]、OXOID、England)にて陽性のものを*S.aureus*と簡易同定した。

薬剤感受性試験は微生物学的増殖培地 {ポアメディア[®] ミューラーヒントンS羊血液寒天培地又はポアメディア[®] ミューラーヒントンS寒天培地、栄研化学(株)、東京}を用いたディスク拡散法にて行った。薬剤感受性は感受性ディスクの判定表に基づき、感受性、中間、耐性の3段階で判定を行った。

供試牛は乾乳時の年齢、乾乳日数を調査し、Student t-検定により治療別に比べた。治療率は、タイロシン乳注法とErskineら [5] の報告にある乾乳期用セファピリンの乳房内注入とオキシテトラサイクリンの筋肉注射群 (CEPH+OXY) 及び乾乳期用セファピリンの乳房内注入のみの群 (CEPH) を比較した。

3. 成績

乾乳時の年齢は治癒群（22分房）が 4.6 ± 1.1 歳、非治癒群（12分房）が 5.5 ± 1.4 歳であった。乾乳日数は治癒群が 52 ± 12 日、非治癒群が 53 ± 17 日であった。年齢及び乾乳日数とも群間に有意差をみなかった（表1）。治癒率は個体で58.3%（24頭中14頭）、分房で64.7%（34分房中22分房）だった（図1）。なお、タイロシンと乾乳軟膏の乳房内注入のみを行った2頭2分房は治癒した。

分離株のタイロシン感受性について、治癒群は感受性8株、感受性中間4株、耐性1株、不明9株だった。非治癒群は、感受性9株、感受性中間0株、耐性2株、不明1株だった（図2）。

4. 考察

年齢や乾乳日数は治癒群と非治癒群間に差

がなく、乳房炎の治療効果に影響を及ぼす要因となっていなかった。タイロシン乳注法による乾乳期治療の治癒率は個体で58.3%、分房で64.7%であった。Erskineら [5] によると、*S.aureus* による潜在性乳房炎の乾乳期治療は CEPH+OXY の治癒率が個体、分房ともに29.4%で、CEPHのみでの治癒率が、個体25.0%、分房27.5%と報告されている。このことから、タイロシン乳注法は、*S.aureus* による潜在性乳房炎の乾乳期治療に有効であることが示唆された。また、2頭2分房はタイロシンと乾乳軟膏の乳房内注入のみで治癒しており、タイロシンは乳房内注入でも効果を示すものと考えられた。

バイオフィームは、細菌が周囲に多糖体を産生し、これを介して隣接した細菌が互いに凝集して共同体をつくり、膜層を形成したもので、多糖類、ポリペプチド、細胞外核酸などからな

表1 供試牛の年齢と乾乳日数

	分房数	年齢	乾乳日数
治癒群	22	4.6 ± 1.1	52 ± 12
非治癒群	12	5.4 ± 1.4	53 ± 17

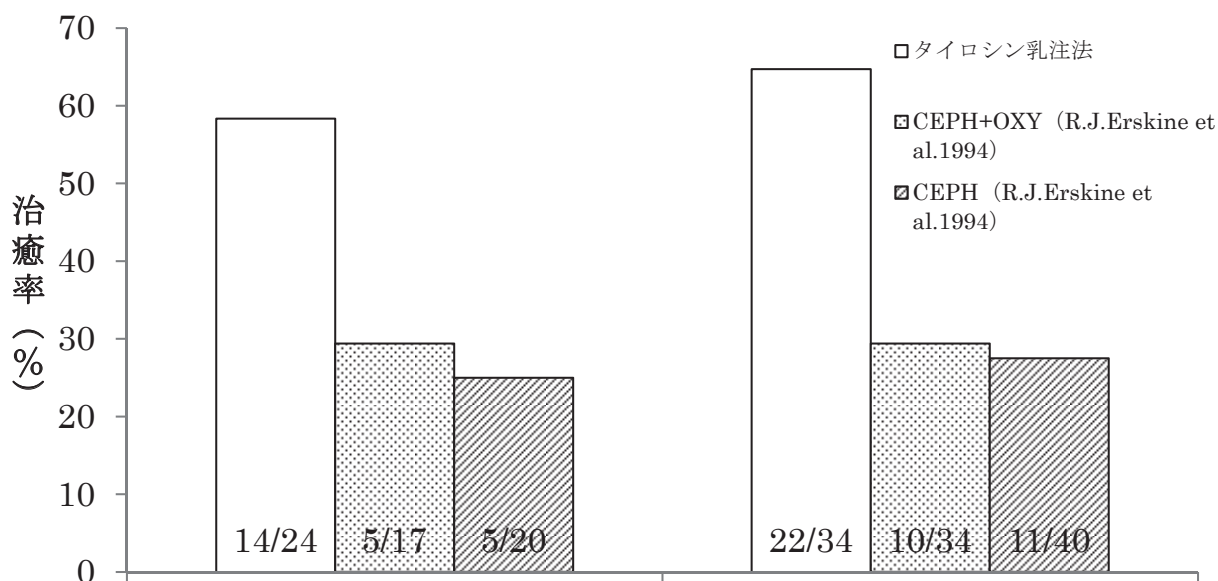


図1 *S.aureus*による潜在性乳房炎におけるタイロシン乳注法とErskineらの報告の治癒率

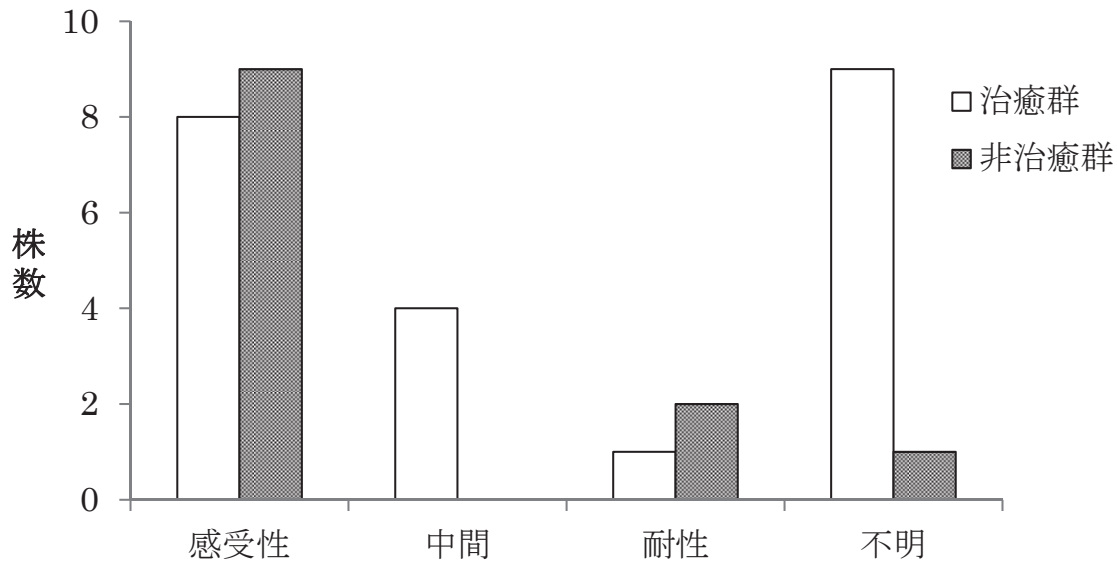


図2 *S.aureus*分離株のタイロシン感受性と治癒状況

るマトリクスで構成されている [11-12]。バイオフィーム内にはクオラムセンシングのシグナル伝達物質であるオートインデューサーなどの低分子物質、バイオサーファクタントなどの界面活性物質も含まれている。バイオフィーム内の細菌が分泌する細胞外多糖は、バリアとなって環境変化や化学物質、抗菌物質から内部の細菌を守っている。また、溶菌酵素に抵抗性を示すだけでなく、好中球などの生体防御機構をかかわすため、難治化の原因となる。

バイオフィームの形成過程は、細菌の固相面への付着、バイオフィームの形成・成熟、バイオフィーム内からの菌の離脱の3つに大きく分類される [11]。まず、浮遊している細菌が細胞外多糖やアルギネートを足場として固相面へ付着する。その後、固相面に定着すると、菌体から放出されるアルギネートや菌体外多糖によってバイオフィームが形成される。これを繰り返しバイオフィームは成熟する。バイオフィーム内で増殖した細菌の一部はバイオフィームからはがれ、液層を浮遊し、新たにバイオフィームを形成しこれを繰り返すことで難治化していく。

医学領域では、緑膿菌が引き起こすびまん性汎細気管支炎などの慢性気道感染症において、バイオフィーム形成が難治化、慢性化要因として重要であることが明らかとなっている [13]。

これに対し、マクロライド系抗菌剤が本来抗菌活性を示さない緑膿菌に対して新作用を示す [10]。この新作用は、①菌体毒素産生抑制作用、②緑膿菌エステラーゼ等のプロテアーゼ産生抑制作用、③細菌が産生するバイオフィームの産生抑制作用、④バイオフィーム破壊作用、⑤菌の細胞付着抑制作用などで、緑膿菌による慢性気道感染症ではマクロライドによる治療が優れた治療効果を発揮する。

また、*S.aureus*においてもバイオフィームの形成が確認されており、細菌がその足場を作るための接着因子や、環境感知による多糖産生の仕組みが明らかとなっている [9]。藤村ら [1] は、チタン製の医療機器に形成された *S.aureus* のバイオフィームが、マクロライド系抗菌剤の一つであるクラリスロマイシンと、セファゾリンあるいはバンコマイシンを組み合わせることによって破壊され、*S.aureus* が除菌されたと報告している。このような、医学領域におけるマクロライドの新作用は、主にアジスロマイシンやクラリスロマイシンなどの14員環マクロライドや15員環マクロライドにて証明されてきた [13]。畜産分野で広く使用されている16員環マクロライドであるタイロシンの効果については、Wangら [8] が、*Streptococcus suis* が形成するバイオフィームで検証しており、タイロシンを作用させると、バイオフィームの形

成が阻害されることを示した。

タイロシン乳注法においても、タイロシン投与によるバイオフィーム形成阻害作用により *S.aureus* によるバイオフィームを減弱し、そこに感受性のある抗菌剤軟膏を注入することで病巣部に抗菌剤が到達して作用し、効果を示す可能性が考えられた。この機序が成立する場合、本方法はタイロシン耐性菌においても効果的ではないかと考えられた。今回、タイロシン耐性株、感受性中間株の *S.aureus* でも治癒例が存在しており、本方法でバイオフィーム形成・増殖阻害作用が関連している可能性が示された。

乳房炎由来の *S.aureus* が形成するバイオフィームや、それに対するマクロライド系抗菌剤の効果や作用機序については未だ明らかになっていない部分も多い。今後の展望として、タイロシン乳注法の症例数を増やし、その有効性をさらに検証していくと共に、バイオフィームの形成やバイオフィームとタイロシンの関係についてさらに研究していきたいと思う。

引用文献

- 1) Fujimura, S., Sato, T., Mikami, T., Kikuchi, T., Gomi, K. and Watanabe, A. 2008. Combined efficacy of clarithromycin plus cefazolin or vancomycin against *Staphylococcus aureus* biofilms formed on titanium medical devices. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 32:481-484.
- 2) Snel, G. M., Malvisi, M., Pilla, R. and Piccinini, R. 2014. Evaluation of biofilm formation using milk in a flow cell model and microarray characterization of *Staphylococcus aureus* strains from bovine mastitis. *Vet. Microbiol.* 174:489-495.
- 3) Sol, J., Sampimon, O. C., Snoep, J. J. and Schukken, Y. H. 1997. Factors associated with bacteriological cure during lactation after therapy for subclinical mastitis caused by *Staphylococcus aureus*. *J. Dairy Sci.* 80: 2803-2808.
- 4) Sol, J., Sampimon, O. C., Barkema, H. W. and Schukken, Y. H. 2000. Factors associated with cure after therapy of clinical mastitis caused by *Staphylococcus aureus*. *J. Dairy Sci.* 83: 278-284.
- 5) Erskine, R. J., Bartlett, P. C., Crawshaw, P. C., and Gombas, D. W. 1994. Efficacy of intramuscular oxytetracycline as a dry cow treatment for *Staphylococcus aureus* mastitis. *J. Dairy Sci.* 77:3347-3353.
- 6) Dingwell, R. T., Leslie, K. E., Duffield, T. F., Schukken, Y. H., DesCoteaux, H., Keefe, G. P., Kelton, D. F., Lissemore, K. D., Shewfwilt, W. 2003. Efficacy of intramammary tilmicosin and risk factors for cure of *Staphylococcus aureus* infection in the dry period. *J. Dairy Sci.* 86:159-168.
- 7) Nickerson, S. C., Owens, W. E., Fox, L. K., Scheifinger, C. C., Shryock, T. R. and Spike, T. E. 1999. Comparison of tilmicosin and cefhapirin as therapeutics for *Staphylococcus aureus* mastitis at dry-off. *J. Dairy Sci.* 82:696-703.
- 8) Wang, S., Yang, Y., Zhao, Y., Zhao, H., Bai, J., Chen, J., Zhou, Y., Wang, C. and Li, Y. 2016. Sub-mic tylosin inhibits *Streptococcus suis* biofilm formation and results in differential protein expression. *Front. Microbiol.* 7:384.
- 9) 白土明子. 2012. 黄色ブドウ球菌の細胞壁成分による自然免疫の誘導と制御. *生化学.* 86:737-752.
- 10) 砂塚敏明. 2004. マクロライド系薬の新作用と創薬. *日本化学療法学会雑誌.* 52:367-370.
- 11) 鈴木一由、加藤敏英. 2014. クオラムセンシングとマクロライド 3. *臨床獣医.* 32:51-54.
- 12) 鈴木一由、加藤敏英. 2015. クオラムセンシングとマクロライド 4. *臨床獣医.* 33:48-52.
- 13) 館田一博、木村総一郎、山口恵三. 2010. バイオフィーム感染症とクオラムセンシング. *日内会誌.* 99:2677-2681.

Effects of dry period intramammary tylosin infusion for treatment of latent mastitis caused by *Staphylococcus aureus*

Asako Haraguchi¹⁾, Tetsuo Ota²⁾, Keiji Nakatani³⁾, Yasuhiro Kamioka⁴⁾, Taizo Takeuchi⁵⁾, Tomoyasu Kurose³⁾, Naoki Suzuki²⁾, Tsuneo Higaki⁶⁾, Souhei Kaneko⁷⁾, Yasunori Sinozuka⁸⁾

- 1) Syobara Veterinary Clinical Center,
- 2) Kitahiroshima Veterinary Clinical Center,
- 3) Hatsukaichi Branch of Kitahiroshima Veterinary Clinical Center,
- 4) Miyoshi Veterinary Clinical Center,
- 5) Fukuyama Branch of Fuchu Veterinary Clinical Center,
- 6) Higashihiroshima Veterinary Clinical Center,
- 7) Fuchu Veterinary Clinical Center, Hiroshima A.M.A.A.
- 8) Azabu University

* Correspondence to : Asako Haraguchi
21-20 Nishihonmachi, Syobara-shi, Hiroshima 722-0013

[Abstract]

Mastitis caused by *Staphylococcus aureus* (*S.aureus*) is difficult to treat and it is reported that *S.aureus* can form biofilms. Latent mastitis caused by *S.aureus* induces increasing somatic cells. Therefore we suffer heavy economic loss due to blind quarter treatment or culling out if therapy has no effect. But reports on effective treatment for latent mastitis caused by *S.aureus* are little. At overseas, dry-period treatment for latent mastitis caused by *S.aureus* with tilmicosin which is a semisynthetic macrolide antibiotic of tylosin is reported. The objective of this study was to establish an effective treatment mean for latent mastitis caused by *S.aureus* at dry-period. This study investigated the effect of dry-period treatment of latent mastitis caused by *S.aureus*. The treatment is composed of systemic administration of tylosin and intramammary infusion of cephem-family dry period ointment and tylosin. The materials were 34 quarters of 24 cows diagnosed with latent mastitis caused by *S.aureus* between July 2013 and September 2016 from the result of the bacterial culture examination of milk produced before the dry period. The cured group consisted of 22 quarters while the non-cured group consisted of 12 quarters. There were no differences in age and number of drying-off days between the groups. The cure rate was 58.3% in dairy cows and 64.7% in quarters. Tylosin-resistant and medium-susceptibility strains were detected in some cured cows. These results suggest that this treatment has potential action of inhibiting biofilm formation.

Keywords: dry-period treatment, intramammary infusion, latent mastitis, *Staphylococcus aureus*, tylosin

牛のプロトテカ乳房炎

加納 壘

日本大学生物資源科学部
獣医臨床病理学研究室

(〒 252-0880 神奈川県藤沢市亀井野 1866)

【要約】

プロトテカ (*Prototheca*) は、藻類の1種であるが、牛舎環境中に偏在していることが知られている。*Prototheca zopfii* は牛の主なプロトテカ乳房炎の原因藻類で、乳汁の質の低下および体細胞数の増加、乳量の減少の原因となる。国内のプロトテカ乳房炎の多くは、潜在性乳房炎または慢性乳房炎が多い。*P. zopfii* は、生化学的あるいは分子生物学的に少なくとも2つの遺伝子型 (genotype 1 および genotype 2) に分類される。本邦においては、プロトテカ性乳房炎の乳汁から分離された株のほとんどが、genotype 2 であることから、同遺伝子型が乳房炎の主要原因藻類であると考えられている。プロトテカ乳房炎の診断は、主に乳汁からの分離培養によって行われる。また genotype 2 はゲンタマイシ、カナマイシン、イトラコナゾールに対して genotype 1 よりも感受性が低い。一方、genotype 2 株の全てで、塩酸アルキルジアミノエチルグリシンおよびクロルヘキシジンは等しく次亜塩素酸、ポピドンヨードよりも強い感受性を示した。そのため現状では、感染源や汚染源の消毒・洗浄と感染牛の隔離・淘汰しか対策が無い。

キーワード：遺伝子型、牛乳房炎、分子疫学、プロトテカ

【はじめに】

プロトテカ (*Prototheca*) は、藻類の1種であるが、二次的に葉緑体を退化させているため光合成を行わない。そのため外部からエネルギー源を摂取する必要があるため、腐生性または寄生性に栄養を得ている。世界中の土壌、植物表面、動物の消化管内、湖沼や汚水中など湿潤な環境下に生息しているが、ヒトや動物に感染する人獣共通病原体でもある。一方で、動物の消化管にも常在していることから、日和見感染症も引き起こす [1]。

発育様式は、直径約 10.5 μm の娘細胞が成長すると、細胞内で多数の胞子嚢胞子を含む直径約 25 μm の胞子嚢となり、やがて破裂して

直径約 6.5 μm 胞子嚢胞子を放出する。これらが娘細胞へと成長する発育環によって増殖する (図 1)。この単純な増殖様式は、自然界および宿主体内においても同様である。

【プロトテカ乳房炎の概要】

牛のプロトテカ乳房炎は、プロトテカが乳房内へ感染して炎症を引き起こすため、乳汁の質の低下および人獣共通感染症の原因となり、酪農業の経済的損失および動物性タンパク質の安定供給にとって深刻な問題となる。臨床症状は、病態の進行によって、乳質が低下するだけで、他に臨床所見の乏しい潜在型乳房炎、乳房に熱感や腫れを認める場合や、時には脳や脊髄にまで感染して神経症状を発症するまで重篤になることもある。多くの場合は、抗生剤などの治療に反応しない慢性の乳房炎から見つかることが

受理：2016年11月11日

多い。近年、欧米型の酪農業を営む国々を中心に発症が報告され、増加傾向にあるため問題視されている。

診断は、乳汁からの分離培養によって行う。ドイツの報告や我々の調査では、プロトテカに対する乳汁中または血清中の特異抗体を測定する、ELISA法も診断に有効であるが[2-4]、コマーシャルラボまでは普及されていない。

治療は、乳汁へ薬剤が移行してしまうため、投薬による治療は行えない。感染源や汚染源の消毒・洗浄と感染牛の隔離・淘汰しか対策が無いのが現状である。そのため、一度牛舎内でプロトテカ乳房炎が蔓延すると、清浄化するのが難しく、酪農家にとって経済的打撃となる。

〔プロトテカ乳房炎の分子疫学〕

牛のプロトテカ乳房炎の主な原因藻種である *Prototheca zopfii* は、生化学的あるいは分子生物学的に少なくとも2つの遺伝子型 (*P. zopfii* genotype 1 および genotype 2) に分類される。genotype 1 は湖沼、汚水、地下水、土壌、植物の表面などの自然環境中から分離される。一方、本邦および欧米においては、プロトテカ性乳房炎の乳汁から分離された株のほとんどが、genotype 2 であることから [5-9]、世界的に同遺伝子型が乳房炎の主要原因藻類であると考えら

れている。

そこで国内のプロトテカ乳房炎発症牛舎について、乳汁、バルク乳、糞便、飲料水、体液（第一胃液、血液、尿）および牛舎環境試料（牛床、飼糧、敷料等）からプロトテカを分離後、遺伝子型を特定し、感染源、伝播経路について検討した。

採材期間は2004年10月から2014年6月の10年間とし、愛知・愛媛・静岡・千葉・富山・奈良・三重・北海道内各農家における感染乳160検体（89頭/44戸）、バルク285（260戸）、糞便821検体（18戸）飲料水478検体（10戸）体液および環境由来各試料105検体からプロトテカの分離を試みた。分離株毎に、18S rDNA領域遺伝子の塩基配列の相同性検索により、種および遺伝子型を特定した。供試検体毎の分離率および遺伝子型比率は、感染乳：100%（genotype 1：2 = 0.6%：99.4% 以下同順）、バルク：11.2%（0：100）、糞便：16.1%（68.2：31.1）、飲料水：5.9%（71.4：28.6）、牛床、牛舎周辺：13.7%（40：60）、他動物糞便：25%（100：0）であった。飼料、牛の体液サンプルでは、プロトテカを認めなかった。

感染乳およびバルク由来株では1株を除き、全て genotype 2 と同定し、同遺伝子型の牛病原性を確認した。糞便および飲料水由来株で

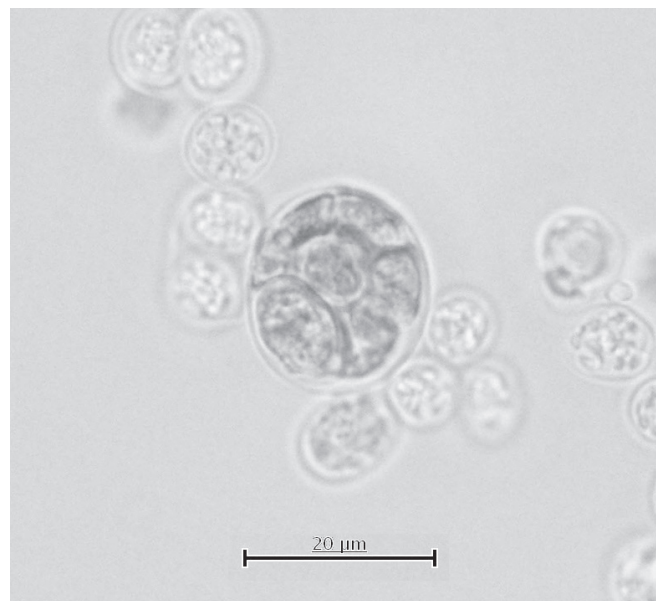


図1 *Prototheca zopfii* genotype 2 の鏡検像。中央の大きい細胞が孢子囊で、その中で多数の孢子囊胞子が生育している。孢子囊胞子が成長すると、孢子囊の細胞壁が壊れ中から孢子囊胞子を放出させる。孢子囊の周囲に有る小型の細胞が、放出された孢子囊胞子と娘細胞である。

は、何れも genotype 1 が優位に存在したが、genotype 2 も確認した。糞便は、環境試料中最も高い分離率を示した。すなわち、感染の有無に関わらず全ての牛糞より genotype 2 を検出し、感染源としての糞便の可能性が強く示唆された。また生後 1 ヶ月齢の仔牛糞便中から genotype 2 を検出したことから、初乳/母乳による経口感染の可能性も併せて考えられた。一方、飲料水からの分離率は低く、採材位置と感染牛との間に位置的関連性も認め得ず、飲料水分離株は、感染乳汁の落下および糞便飛沫の汚染に基づくと推察された。また、牛床も genotype 2 が分離されたことから、汚染源としての可能性を認めた。他動物種由来では、ネズミ一検体からの genotype 1 検出に留まり、出入り動物からの伝播可能性は低いと考えられ

た。

乳房炎を引き起こすプロトテカは、牛の消化管内に生息し、排泄された糞便は感染源となる可能性が高い。また糞便に汚染した床や飲水も牛への二次感染源となると考えられる。このことからこれら感染原から乳頭への汚染が感染経路の一つだと考えられる。

〔各遺伝子型における薬剤および消毒薬感受性の比較〕

本邦分離株について、遺伝子型と薬剤感受性との関連については、明らかでない。そこで、プロトテカ性牛乳房炎治療で、感受性報告のある治療用 4 薬剤 (カナマイシン (KM)、ゲンタマイシン (GM)、アムホテリシン-B (AMP-B)、イトラコナゾール (ITZ)) に対する、

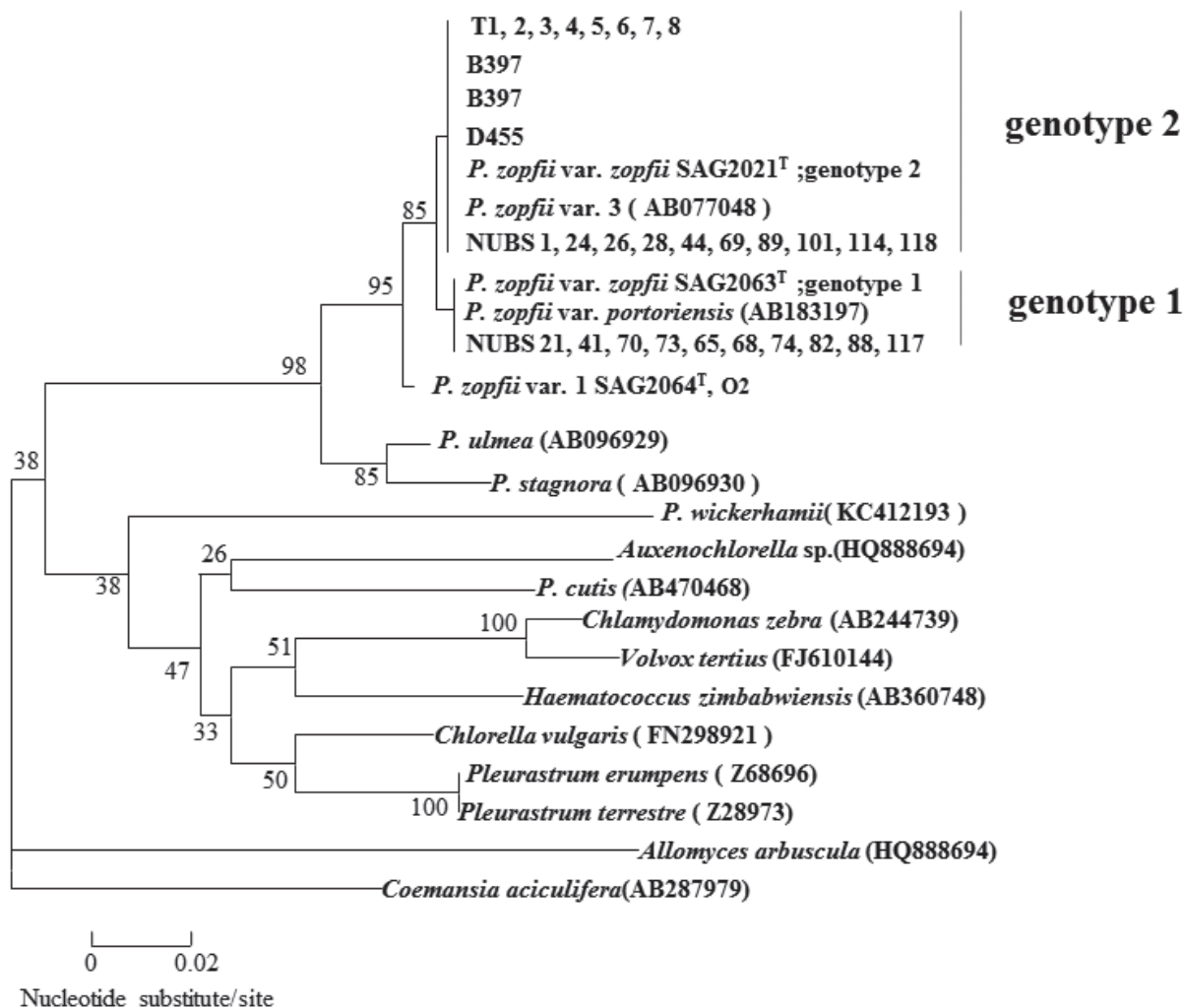


図2 近隣接合を用いたプロトテカ属および近縁藻類のリボゾーム 18S 領域解析による系統樹。プロトテカ乳房炎分離株は、全て genotype 2 に属した。一方、牛舎環境からの分離株は全て genotype 1 に属した。

プロトテカ乳房炎分離株および牛舎環境各分離株の感受性を調べ、遺伝子型と薬剤感受性との関連を中心に検討した。

上記で解析した環境分離株 genotype1 および乳房炎分離株 2 からそれぞれ 10 株を用いて、*P. zopfi* に対して感受性が報告されているゲンタマイシン (GM)、カナマイシン (KM)、イトラコナゾール (ITZ) に対して E-Test による簡易ディスク拡散法による各型の薬剤感受性を測定し、最終発育阻止濃度 (MIC₉₀) と遺伝子型との関連について、t - 検定で有意差を検定した。

Genotype 1 の平均 MIC₉₀ と株ごとの MIC の範囲は、GM に 2.2 μg/ml (1 ~ 4 μg/ml)、KM に 4 μg/ml (2 ~ 32 μg/ml)、ITZ に > 14.4 μg/ml (1 ~ >32 μg/ml) を示した (図 3)。Genotype 2 の平均 MIC₉₀ と株ごとの MIC の範囲は、GM に 10 μg/ml (4 ~ 16 μg/ml)、KM に 127.6 μg/ml (24 ~ 256 μg/ml)、ITZ に > 32 μg/ml であった (図 3)。

このことから Genotype 2 は Genotype 1 に比べていずれも薬剤感受性が低く、とくに ITZ には感受性が認められなかった [10]。乳房炎の原因菌である Genotype 2 は、薬剤感受性が低いことから、乳房炎の治療を困難にしている原因の一つだと考えられる。

次に、一般的な消毒剤である塩酸アルキルジアミノエチルグリシン、クロルヘキシジン、二酸化塩素、ポピドンヨード、次亜塩素酸ナトリウムに対する、液体培地微小希釈法による罹患牛および牛舎環境各分離株の感受性を調べ、乳房炎分離株における遺伝子型と消毒剤に対する

殺菌効果について検討した。

その結果、プロトテカ乳房炎由来 genotype 2 株の全てで、塩酸アルキルジアミノエチルグリシンおよびクロルヘキシジンは等しく次亜塩素酸、ポピドンヨードよりも強い感受性を示した [11]。また、二酸化塩素には感受性を示さなかった [11]。プロトテカ乳房炎の防除には、塩酸アルキルジアミノエチルグリシンおよびクロルヘキシジンが最も有用性があり、次いでポピドンヨードも有効であると思われる。

〔現在考えられる防除法〕

以上、得られた結果から、プロトテカはヨード剤、クロルヘキシジン、塩素などの消毒剤によって死滅する [11]。そのため、感染源や汚染源の消毒・洗浄を行うとともに、感染牛の隔離・淘汰を行う。また感染牛の乳汁中に排泄されることから、搾乳は健康牛よりも最後に行う。また次世代牛への伝搬を防ぐため、子牛へは凍結保存をするか、56℃ 以上 30 分非動化処理をしてプロトテカを死滅させた乳汁を供給すべきである。

一方、海外の報告では、細菌性の乳房炎に対して、抗生剤やステロイドを漫然的に乳房内へ注入治療を続けていると発症しやすいとされている。[8]。おそらく汚染した薬剤とともに物理的に乳頭内に注入してしまい、さらに抗生剤による菌交代症やステロイドによる易感染性が感染原因だと考えられる。そのため、人為的な感染拡大にも注意する。

乳汁中へプロトテカを排出するが、あまり臨床症状を示さない感染牛も多いことから、プロ

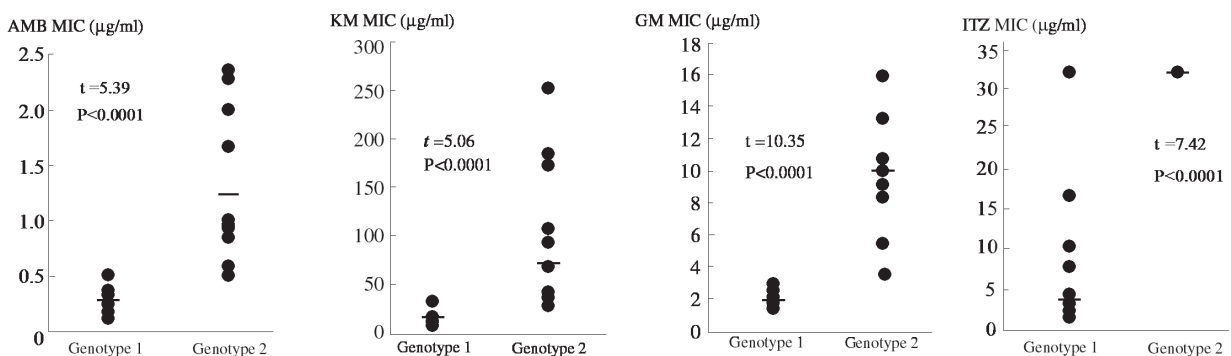


図3 抗真菌剤に対する両遺伝子型の感受性の比較。AMB: アムホテリシンB、KM: カナマイシン、GM: ゲンタマイシン、ITZ: イトラコナゾール。

トテカ乳房炎の発見が遅れてしまい、気が付いた時には牛舎内で感染が広がってしまい清浄化が困難となる場合がある。我々の調査でも、発症牛舎において健常牛も含めて全頭から乳汁を分離培養すると、約10～20%の牛から分離されることがある。他の乳房炎と比較しても、高い感染率である。その中には乳質の異常がほとんど認めない潜伏感染をしている個体も多く見つかるため、バルク乳検査でプロトテカ陽性の場合には、面倒でも全頭検査が必要である。

〔謝辞〕

これらの研究を遂行するにあたって、共同研究者である愛知県農業共済組合連合会家畜メディカルセンター岡崎分室長の伊藤隆晶先生、酪農学園大学獣医学群の鈴木一由先生へ深謝いたします。

また、本研究を行うにあたって文部科学省私立大学戦略的研究基盤形成支援事業「グローバル化社会における動物由来感染症制御のための国際共同研究と若手研究者育成」からの助成研究費を用いました。

〔引用文献〕

1. Pressler, B. M. 2012. Protothecosis and chlorellosis. In: Green, C. E (ed) Infectious diseases of the dog and cat. 4th ed. pp. 696-701. Elsevier, London.
2. Roesler, U., Scholz, H. and Hensel, A. 2001. Immunodiagnostic identification of dairy cows infected with *Prototheca zopfii* at various clinical stages and discrimination between infected and uninfected cows. J. Clin. Microbiol. 39 : 539-543.
3. Roesler, U. and Hensel, A. 2003. Longitudinal analysis of *Prototheca zopfii*-specific immune responses: correlation with disease progression and carriage in dairy cows. J. Clin. Microbiol. 41 : 1181-1186.
4. Kano, R., Sato, A., Sobukawa, H., Sato, Y., Ito, T., Suzuki, K., Hasegawa, A. and Kamata, H. 2016. Short communication: ELISA system for screening of bovine mastitis caused by *Prototheca zopfii*. J. Dairy. Sci. 99 : 6590-6593.
5. Möller, A., Truyen, U., Roesler, U. 2007. *Prototheca zopfii* genotype 2 -the causative agent of bovine protothecal mastitis ?. Vet. Microbiol. 120 : 370-374.
6. Marques, S., Silva, E., Kraft, C., Carnevalheira, J., Videira, A., Huss, V. A. and Thompson, G. 2008. Bovine mastitis associated with *Prototheca blaschkeae*. J. Clin. Microbiol. 46 : 1941-1945.
7. Ricchi, M., Goretti, M., Branda, E., Cammi, G., Garbarino, C. A., Turchetti, B., Moroni, P., Arrigoni, N. and Buzzini, P. 2010. Molecular characterization of *Prototheca* strains isolated from Italian dairy herds. J. Dairy. Sci. 93 : 4625-4631.
8. Pieper, L., Godkin, A., Roesler, U., Polleichtner, A., Slavic, D., Leslie, K. E. and Kelton, D. F. 2012. Herd characteristics and cow-level factors associated with *Prototheca* mastitis on dairy farms in Ontario, Canada. J. Dairy. Sci. 95 : 5635-5644.
9. Sobukawa, H., Yamaguchi, S., Kano, R., Ito, T., Suzuki, K., Onozaki, M., Hasegawa, A. and Kamata, H. 2012. Short communication: Molecular typing of *Prototheca zopfii* from bovine mastitis in Japan. J. Dairy. Sci. 95 : 4442-4446.
10. Sobukawa, H., Kano, R., Ito, T., Onozaki, M., Makimura, K., Hasegawa, A., Kamata, H. 2011. *In vitro* susceptibility of *Prototheca zopfii* genotypes 1 and 2. Med. Mycol. 49 : 222-224.
11. Sobukawa, H., Watanabe, M., Kano, R., Ito, T., Onozaki, M., Hasegawa, A., and Kamata, H. 2011. *In vitro* algacide effect of disinfectants on *Prototheca zopfii* genotypes 1 and 2. J. Vet. Med Sci. 15 : 1527-1529.

Bovine *Prototheca* Mastitis

Rui Kano

Department of Veterinary Pathobiology,
Nihon University College of Bioresource Sciences
1866, Kameino, Fujisawa, Kanagawa, 252-0880, Japan

[Abstract]

Prototheca are achlorophyllic algae that are ubiquitous in cow-barn environments. *Prototheca zopfii* is associated with bovine mastitis, which causes secretion of thin, watery milk with white flakes, reducing milk production. Most cases of bovine protothecal mastitis in Japan are chronic and subclinical. *P. zopfii* has been biochemically and molecularly divided into at least two genotypes, genotype 1 and genotype 2. All isolates from bovine mastitis have been identified as genotype 2, suggesting that this genotype is the main causative agent of bovine protothecal mastitis in Japan. Typically, the identification of protothecal mastitis as the causative agent of mastitis has been depending on a positive result in culture tests of milk samples. *P. zopfii* genotype 2 was not susceptible to itraconazole, gentamicin and kanamycin than *P. zopfii* var. *zopfii* genotype 1. Genotype 2 was susceptible to alkyldiaminoethylglycine hydrochloride, chlorhexidine, povidone iodine and sodium hypochlorous acid, but not dioxide chlorine, are effective against both genotype 2.

Keywords: bovin mastitis, genotype 2, prototheca