

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

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

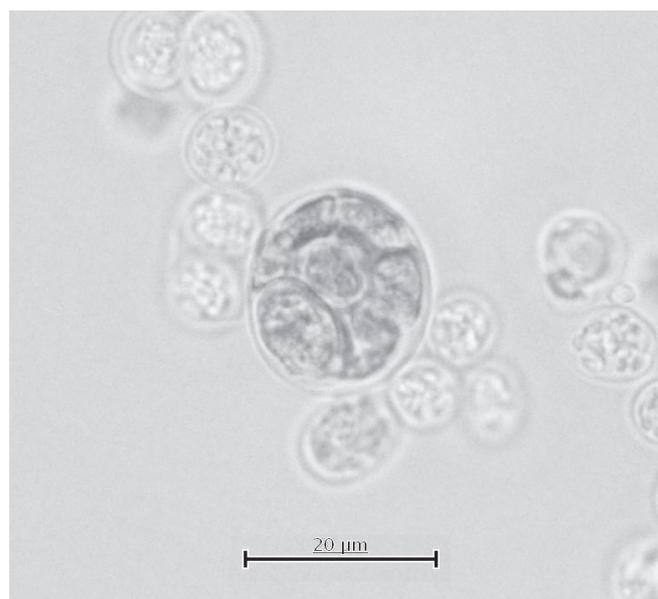


図1 *Prototheca zopfii* genotype 2 の鏡検像。中央の大きい細胞が孢子嚢で、その中で多数の孢子嚢胞子が生育している。孢子嚢胞子が成長すると、孢子嚢の細胞壁が壊れ中から孢子嚢胞子を放出させる。孢子嚢の周囲に有る小型の細胞が、放出された孢子嚢胞子と娘細胞である。

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、

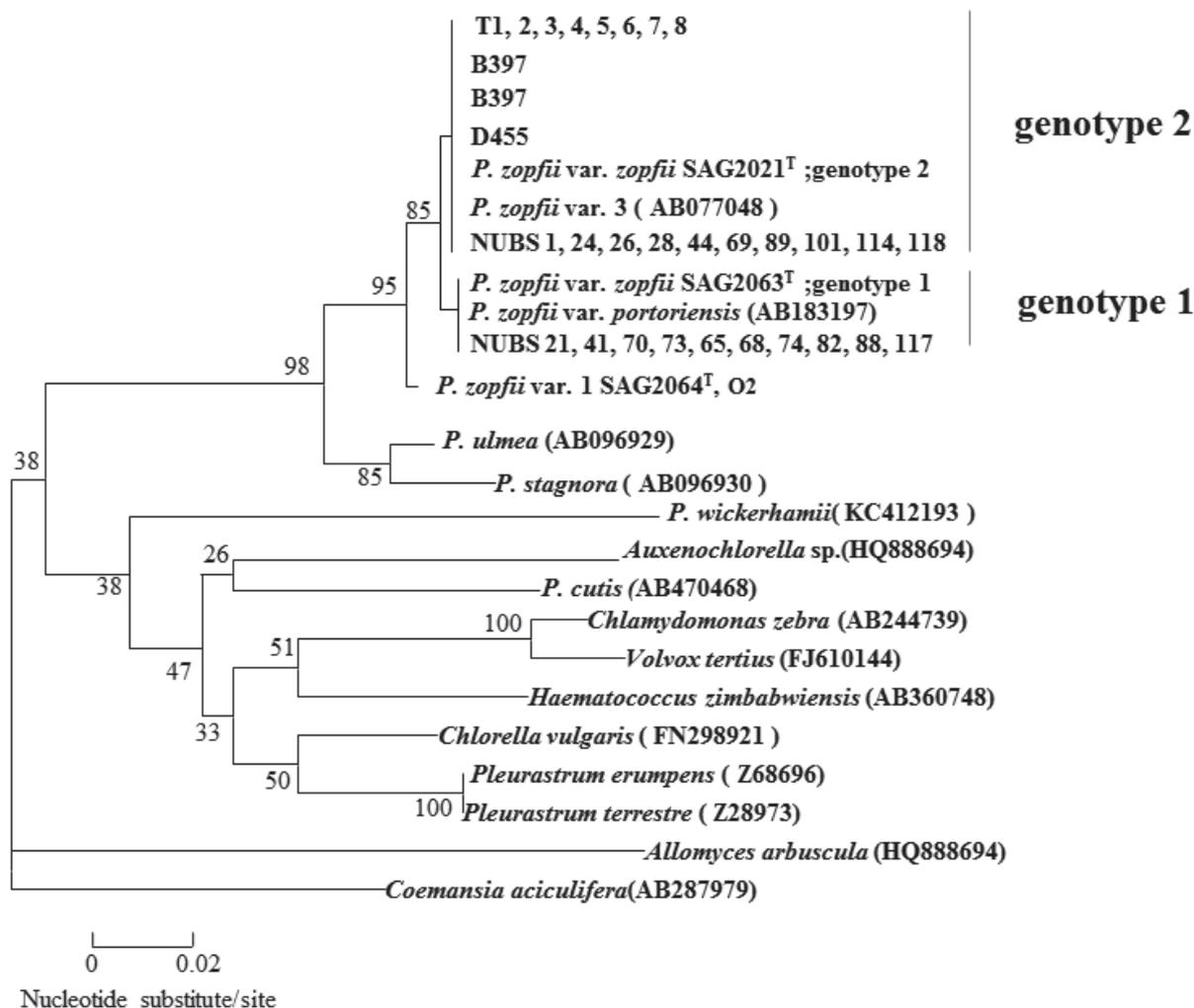


図2 近隣接合を用いたプロトテカ属および近縁藻類のリボゾーム 18S 領域解析による系統樹。プロトテカ乳房炎分離株は、全て genotype 2 に属した。一方、牛舎環境からの分離株は全て genotype 1 に属した。

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

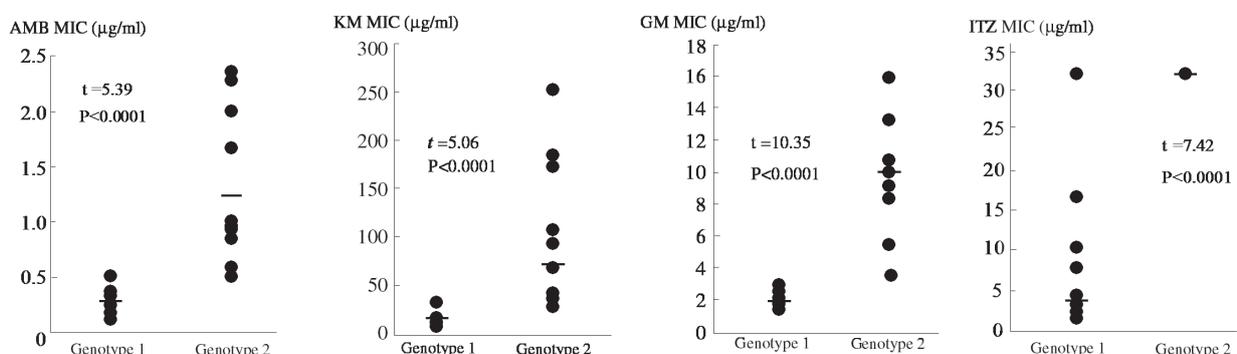


図3 抗真菌剤に対する 両遺伝子型の感受性の比較。AMB: アムホテリシンB、KM: カナマイシン、GM: ゲンタマイシン、ITZ: イトラコナゾール。

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., Carvalheira, 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