

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 4 月 22 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22580368

研究課題名（和文） プロトテカ乳房炎の迅速診断の確立と防除法の検討

研究課題名（英文） Investigation of rapid diagnosis and prevent for protothecal mastitis

研究代表者

加納 壘 (KANO RUI)

日本大学・生物資源科学部・准教授

研究者番号：00318388

研究成果の概要（和文）：、藻類の *Prototheca zopfii* による牛のプロトテカ乳房炎は牛乳の生産低下の原因となり、効果的な治療法がない。そこで効果的な治療法を調べるために抗真菌剤および消毒剤による抗藻活性を調べた。次に 18S ribosomal DNA 領域のシークエンスによる臨床分離株の系統学的解析により、本邦の分離株が genotype 2 標準株と同一のクラスターを形成した。本邦におけるプロトテカ性乳房炎は、各国と同様に *P. zopfii* genotype 2 であることを示唆した。

研究成果の概要（英文）：Bovine mastitis due to *Prototheca zopfii* leads to reduced milk production and is difficult to cure. Therefore, prevention is the best approach and this is best achieved through the use of effective antifungal drugs and disinfectants. The 18S rDNA sequences of diverse clinical specimens from different areas in Japan were studied to clarify the pathogenicity of *P. zopfii* var. *zopfii*. All isolates from bovine mastitis in Japan were identified as *P. zopfii* genotype 2. Therefore, *P. zopfii* var. *zopfii* genotype 2 is associated with bovine mastitis.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011 年度	500,000	150,000	650,000
2012 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学・臨床獣医学

キーワード：農林水産学、獣医学、乳牛、乳房炎

## 1. 研究開始当初の背景

現在、穀物価格の高騰により、本邦の酪

農経営は非常に逼迫している。このような状況で酪農家にとって深刻な打撃となるの

は、乳房炎の集団発生であり、牛乳の長期間出荷停止となると、容易に倒産する可能性が高い。一方、輸入乳製品には、人体に危険な物質が混入していることがTV・新聞などで報道され、食品の国内生産の必要性が増している。そのため、乳房炎の制御は酪農家の保護だけでなく、国民への安全な食品の供給を行うために欠かせない課題である。

乳房炎にはいくつか原因があるが、特に *Prototheca zopfii* による乳房炎は、同一牛舎内での集団感染がしばしばおこり、発症すると効果的な治療法が無い場合、対策として淘汰処分しかなく、非常に危惧される疾患である。

今まで感染経路として、環境中の本菌に汚染された土壌から経皮感染する場合と、汚染された飲み水からの経口感染が推測されているが、明らかになっておらず、効果的な予防法が確立されていない。そのため、本疾患の感染源および感染経路の解明を行うための疫学調査は、本疾患の防疫を行うために非常に重要である。

## 2. 研究の目的

乳牛におけるプロトテカ乳房炎の発生は、酪農家へ甚大な損失をもたらすため、乳製品の国内生産の向上を行うためにも早急の対策が必要である。しかしながら、プロトテカ乳房炎の疫学調査および防除対策は今まで十分に検討されていなかった。そこで今回、「プロトテカ乳房炎の迅速診断の確立と防除法の検討」を計画した。まず、PCR法によるプロトテカ Genotype 特異的検出法を確立し、それを用いて各県の農業共済および家畜保健所の獣医師の協力のもと、乳汁、バルク乳、牛舎環境から病原性 Genotype 株を検出する。さらに、乳房炎分離株に対して抗菌活性の強い抗菌剤・消毒剤を選択し、これらを発症農家で使用することによって防除効果の検討を行う。

## 3. 研究の方法

(1) 牛および牛舎環境より分離された *P. zopfii* および *P. blaschkeae* に対する抗菌剤感受性試験

*P. zopfii* 本邦分離株について、遺伝子型

(genotype) と薬剤感受性との関連については、なお明らかでない。そこで、プロトテカ性乳房炎治療で、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、罹患牛および牛舎環境各分離株の感受性を調べ、野外分離株における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 *P. zopfii* genotype 1 および 2 からそれぞれ10株、*P. blaschkeae* 1株を用いて、*P. zopfii* 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(インバネスメディカル:東京)による簡易ディスク拡散法による各型の薬剤感受性について検討を行った。

まず培養した被験株をPIM炭素原無添加液体培地に加え、濁度調整( $OD_{600}=0.8\sim 1.0$ )し、直ちにRPMI1640寒天培地上(ダイゴ:東京)に接種( $20\mu l$ )、全面塗抹(コンラージ)した。各薬剤浸漬済E-test用紙(ストリップ)を塗抹面中央に設置し $27^{\circ}C$ 、72時間培養後、Minimal Algacide Concentration(最少藻類殺濃度:MAC)を判定した。薬剤濃度は、KM、GM( $0.016\sim 256\mu g/ml$ )、ITZ、AMP-B( $0.002\sim 32\mu g/ml$ )とした。最終発育阻止濃度( $MAC_{90}$ )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。

(2) ウシおよび牛舎環境より分離された *Prototheca* 属藻類の消毒剤感受性試験

プロトテカ乳房炎に対して消毒剤による防除方を検討するために、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、野外分離株における遺伝子型と消毒剤に対する MAC との関連を中心に検討した。

### (3) 牛のプロトテカ乳房炎に対する分子疫学調査

葉緑素不含藻類であるプロトテカ属の *P. zopfii* は、生化学的あるいは血清学的に少なくとも2つの遺伝子型 (*P. zopfii* genotype 1 および genotype 2) に分類される。本研究では、genotype 1、2 の標準株および愛知県の分離株 21 株、さらに北海道臨床分離株 3 株、千葉県臨床分離株 8 株に対して、18S ribosomal DNA 領域における遺伝子解析を行い、系統学的解析から採材地域における分子疫学的調査を行った。

## 4. 研究成果

(1) Genotype 1 の平均  $MAC_{90}$  と株ごとの MAC の範囲は、GM に  $2.2 \mu\text{g/ml}$  ( $1 \sim 4 \mu\text{g/ml}$ )、KM に  $4 \mu\text{g/ml}$  ( $2 \sim 32 \mu\text{g/ml}$ )、ITZ に  $>14.4 \mu\text{g/ml}$  ( $1 \sim >32 \mu\text{g/ml}$ ) を示した。

Genotype 2 の平均  $MIC_{90}$  と株ごとの MIC の範囲は、GM に  $10 \mu\text{g/ml}$  ( $4 \sim 16 \mu\text{g/ml}$ )、KM に  $127.6 \mu\text{g/ml}$  ( $24 \sim 256 \mu\text{g/ml}$ )、ITZ に  $>32 \mu\text{g/ml}$  であった。

*P. blaschkeae* の 2 株は GM に  $3 \mu\text{g/ml}$  ( $2 \sim 4 \mu\text{g/ml}$ )、KM は  $22.7 \mu\text{g/ml}$  ( $8 \sim 32 \mu\text{g/ml}$ )、ITZ は  $>17.3 \mu\text{g/ml}$  ( $1 \sim >32 \mu\text{g/ml}$ ) であった。

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。また *P. blaschkeae* は、被験薬剤全てに感受性を示した。

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。今後は、分子疫学調査を愛知県以外の地域に広

げ、乳房炎と Genotype の関係を調べるとともに、Genotype 2 に対して有効な薬剤の検討を行う予定である。

(2) genotype 1 の平均  $MAC_{90}$  と株ごとの MAC の範囲は、塩酸アルキルジアミノエチルグリシンに  $3.13 \times 10^{-3} \mu\text{g/ml}$  ( $5.0 \times 10^{-4} \sim 5.0 \times 10^{-3} \mu\text{g/ml}$ )、クロロヘキシジンに  $3.13 \times 10^{-3} \mu\text{g/ml}$  ( $2.5 \times 10^{-4} \sim 2.5 \times 10^{-2} \mu\text{g/ml}$ )、二酸化塩素に  $60 \mu\text{g/ml}$  ( $30 \sim 120 \mu\text{g/ml}$ )、ポピドンヨードに  $1.17 \mu\text{g/ml}$  ( $0.78 \sim 3.13 \mu\text{g/ml}$ )、次亜塩素酸ナトリウムに  $0.069 \mu\text{g/ml}$  ( $3 \times 10^{-3} \sim 0.3 \mu\text{g/ml}$ ) であった。

Genotype 2 の平均  $MAC_{90}$  と株ごとの MAC の範囲は、塩酸アルキルジアミノエチルグリシンに  $1.65 \times 10^{-3} \mu\text{g/ml}$  ( $5.0 \times 10^{-4} \sim 5.0 \times 10^{-3} \mu\text{g/ml}$ )、クロロヘキシジンに  $1.72 \times 10^{-3} \mu\text{g/ml}$  ( $2.5 \times 10^{-5} \sim 2.5 \times 10^{-2} \mu\text{g/ml}$ )、二酸化塩素に  $51.5 \mu\text{g/ml}$  ( $15 \sim 120 \mu\text{g/ml}$ )、ポピドンヨードに  $1.63 \mu\text{g/ml}$  ( $0.39 \sim 3.13 \mu\text{g/ml}$ )、次亜塩素酸ナトリウムに  $0.12 \mu\text{g/ml}$  ( $3 \times 10^{-3} \sim 0.3 \mu\text{g/ml}$ ) であった。

このことから、今まで検討を行ったプロトテカ性乳房炎罹患牛乳汁由来 *P. zopfii* genotype 2 : 10 株および同罹患牛飼養牛舎内環境由来 *P. zopfii* genotype 1 : 10 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ロヘキシジンは等しく次亜塩素酸、ポピドンヨードより強い感受性を示した。また、二酸化塩素には感受性を示さなかった。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ロヘキシジンが最も有用性があると思われた。

(3) 18S ribosomal DNA 領域のシーケンスによる臨床分離株の系統学的解析により、本

邦の全ての臨床分離株が genotype 2 標準株と同一のクラスターを形成し、genotype 1 分離株のクラスターから独立することが明らかとなった。また全ての環境由来株（糞便、牛舎環境内汚水、水など）が genotype 1 標準株と同一のクラスターを形成した。この結果から、本邦におけるプロトテカ性乳房炎は、各国と同様に *P. zopffii* genotype 2 であることを示唆した。また、地域および採材場所による系統学的な変異は認めなかった。

#### 5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計 4 件）

① Sobukawa H, Yamaguchi S, Kano R, Ito T, Suzuki K, Onozaki M, Hasegawa A, Kamata H. (2012) Short communication: Molecular typing of *Prototheca zopffii* from bovine mastitis in Japan. *J. Dairy. Sci.* 95, 4442-4426. 査読有 (doi: 10.3168/jds.2011-5101)

② Ito T, Kano R, Sobukawa H, Ogawa J, Honda Y, Hosoi Y, Shibuya H, Sato T, Hasegawa A, Kamata H. (2011) Experimental Infection of Bovine Mammary Gland with *Prototheca zopffii* Genotype 1. *J. Vet. Med. Sci.* 73, 117-119. 査読有 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20736514>)

③ Sobukawa H, Kano R, Ito T, Onozaki M, Makimura K, Hasegawa A, Kamata H. (2011) *In vitro* susceptibility of *Prototheca zopffii* genotypes 1 and 2. *Med. Mycol.* 49, 222-224. 査読有 (doi:10.3109/13693786.2010.511285)

④ Sobukawa H, Watanabe M, Kano R, Ito T, Onozaki M, Hasegawa A, Kamata H. (2011) *In vitro* algacide effect of disinfectants on *Prototheca zopffii* genotypes 1 and 2. *J. Vet. Med. Sci.* 15, 1527-1529. 査読有 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/217379>)

〔学会発表〕（計 1 件）

① 曾布川 英人、山口 修平、加納 壘、伊藤 隆晶、鎌田 寛、本邦から分離された *Prototheca zopffii* の分子疫学的調査、第 154 回日本獣医学科学術集会、2012 年 09 月 15

日～2012 年 09 月 16 日、岩手大学

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

日本大学生物資源科学部獣医学科

<http://hp.brs.nihon-u.ac.jp/~vethome/>

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

加納 壘 (KANO RUI)

日本大学・生物資源科学部・准教授

研究者番号：00318388

(2) 研究分担者 なし

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者 なし

( )

研究者番号：