

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 20 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25450452

研究課題名(和文)プロトテカワクチンの開発

研究課題名(英文)Development for bovine protothecal vaccine

研究代表者

加納 塁 (KANO, Rui)

日本大学・生物資源科学部・准教授

研究者番号：00318388

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：Prototheca zopfiiによる難治性乳房炎は、有効な防除法は確立されていない。そこで抗プロトテカ抗体検出用ELISAプレートを作製し、プロトテカ性乳房炎感染牛およびプロトテカ不活化抗原投与牛における血清中抗体価を測定し、血清学的診断法の有用性について検討を行った。

プロトテカ感染牛血清では、非感染牛および酵母感染牛血清と比較して有意な抗体価の上昇を確認した。抗体上昇のカットオフ値を43.4に設定したところ、高感度(94%)および高特異性(100%)を確認した。不活化抗原接種による2回投与では抗体価上昇は認め、カットオフ値を上回る抗体価上昇と、投与12週後までの抗体価の維持を認めた。

研究成果の概要(英文)：Prototheca zopfii is an achlorophyllic alga that causes bovine mastitis, resulting in a reduction in milk production and the secretion of thin, watery milk with white flakes. This study evaluated the use of an ELISA system for distinguishing cows with mastitis due to P. zopfii genotype 2 from cows with chronic candidal mastitis and healthy cows. Moreover, we investigated the transitional changes of specific antibody titer of healthy cows injected with inactivated P. zopfii genotype-2 cells. This ELISA system exhibited the highest sensitivity (94%) and specificity (100%) for the chronic protothecal mastitis cows when the positive cutoff value was set at 43.4 EU. Anti-protothecal IgG titers were positive in all cows after inoculation with inactivated P. zopfii genotype 2 cells. These results indicated that ELISA detection of anti-prototheca IgG in serum provided specificity and sensitivity sufficient for use in diagnosing protothecal mastitis.

研究分野：獣医臨床病理学

キーワード：牛プロトテカ性乳房炎 血清学的診断法 不活化抗原 ELISA Prototheca zopfii

1. 研究開始当初の背景

国内における生乳不足は、慢性的な状態で未だ改善の兆しが見えていない。その原因として、穀物飼料価格の高騰、乳房炎の増加などが挙げられ、酪農家の経営を圧迫し続けている。そのため、離農する酪農家が増加しており、政府も対策を施しているにも関わらず(農林水産省 HP: <http://www.maff.go.jp/j/chikusan/gyunyu/butter.html>)店頭での乳製品不足は、現在でも続いている。

乳房炎にはいくつか原因があるが、特に藻類による *Prototheca zopfii* による乳房炎は、発症してもあまり顕著な症状が認められないため、知らずに感染が拡大して牛舎内での集団感染に発展してしまう。特に一度発症すると効果的な治療法が無いため、対策として感染牛の淘汰処分しかなく、非常に危惧される疾患である。愛知 NOSAI の調査によると、発生率は、慢性乳房炎牛の約 10~15% であるが、年々増加傾向にある。本感染症の問題として、バルク乳中(一酪農家で搾乳した各牛の乳汁を集めて、タンクで保存したものを検査する。)の細菌数、体細胞数が容易に増加するため、その酪農家全ての牛乳の出荷停止になりやすく被害が甚大になる。

近年、*P. zopfii* は、ドイツの Roesler の遺伝子解析によって Genotype 1,2,3 に分類されているが、3型は *P. blaschleae* (Roesler, 2006) として再分類が提唱されている。そのうち、1,3型は欧州の牛飼育環境から分離されるが非病原性であり、2型は乳房炎の起因

菌と報告されている。我々も、愛知、千葉、北海道 NOSAI と共同研究のもと、*P. zopfii* 感染乳房炎について分子生物的手法を用いた疫学調査を行っている。その結果は欧州と同様に、本邦においても1型は牛飼育環境から分離されるが、2型は乳房炎のみ分離されることが分かった (Oosumi *et al.*, 2008; Sobukawa *et al.*, 2012)。

一方、治療法として2型に対する抗菌剤の抗藻活性を調べた。その結果、従来プロトテカに対して効果があると報告されているアゾール系薬剤、ゲンタマイシン、カナマイシンは、2型では低感受性であった (Sobukawa *et al.* 2011)。

このことから、従来の抗菌剤による本感染症の治療は不可能であることが判明した。これは従来行われてきた、経済的ダメージの高い摘発淘汰しか、現在取る道がないことを裏付けている。

2. 研究の目的

以上の背景から我々は、プロトテカ乳房炎の防除法を確立するために、「プロトテカワクチンの開発」を計画した。疫学調査からほとんどの乳牛は消化管内に2型を保有し、その少数が発症しているため、強力な抗プロトテカ免疫の賦活化を行わなくても、簡単な免疫賦活化で発症は防ぐことができると考えている。

欧米においてワクチン開発の検討は、まだ行われていないため、ワクチン開発は国際的に先駆けた防除法の検討である。さらに本研究

様式 C-19、F-19、Z-19 (共通)

はワクチンの副作用および効果について、他の実験動物を使わずに、実際に牛を用いて検討することから、余分な研究コストを削減するとともに、開発時間を短縮できる長所がある。この様にプロトテカワクチン開発は、世界で先駆けた研究で、しかも独創的である。

3. 研究の方法

(1) *P. zopfii* 遺伝子型の超微細構造解析について

P. zopfii genotype 1, 2 両遺伝子型の詳細な形態学的情報は不足している。そこで、走査 / 透過型電子顕微鏡による両型の外観および細胞内構造評価を行った。

P. zopfii genotype SAG2063^T (genotype 1) および SAG2021^T (genotype 2) の両遺伝子型標準株を用いた。両株をサブローブドウ糖液体培地にて培養し、対数増殖期中期に回収し、0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.2) で遠心・洗浄を行った。

洗浄後、両株を 2% グルタルアルデヒドで 4°C、2 時間前固定を行った。次に、1.25% 四酸化オスミウムにて、4、17 時間の後固定を行った。固定後、順次濃度を高くしたエタノールにて脱水した。脱水後、酢酸イソアミルで置換し、HCP-II (日立) により臨界点乾燥を 21、80 kg/cm² を 20 分、38、100 kg/cm² を 20 分の条件で行った。乾燥後、E-1030 ion sputter (日立) により 7 mm の厚さで白金パラジウム (PtPd) を蒸着し、試料帯電防止を施した。これを Ultra-High Resolution Low-Voltage Scanning Electron Microscopy (S-900LV; 日立) により 2.0 kV の加速電圧で撮影した。

また細胞表面と蒸着検体の比較のために、

無蒸着検体も同時に作成した。後固定処理後、0.05% 四酸化ルテニウムを室温下、7 分、遮光条件で反応させ、伝導染色を施した。以降、同様の脱水、置換および臨海点乾燥を行った後、0.8 kV の加速電圧で撮影した。

透過型電子顕微鏡 (TEM) 解析において回収洗浄した株の固定・脱水は、前述と同じ操作を行った。脱水後、methyl glycidic ether (OY-2; 日新) で置換し、epoxy resin (Plain Resin Kit; 日新) に包埋後、60、48 時間で重合した。重合したブロックをダイヤモンドナイフで薄切りし、酢酸ウランおよびクエン酸鉛により染色した。染色した検体を H-7000 透過型電子顕微鏡 (日立) にて 100kV の加速電圧で撮影した。

(2) 牛プロトテカ性乳房炎診断用 ELISA 法の検討

P. zopfii による難治性乳房炎は、世界各国で増加傾向にあるが、未だ有効な防除法は確立されておらず迅速検出、病態早期の診断法に乏しいのが現状である。そこで本研究では、抗プロトテカ抗体検出用 ELISA プレートを作製し、プロトテカ性乳房炎感染牛およびプロトテカ不活化抗原投与牛における血清中抗体価を測定し、血清学的診断法の有用性について検討を行った。

抗プロトテカ抗体検出用 ELISA プレートの作製: *P. zopfii* SAG2021^T 株を浸透培養後、 1.0×10^7 cells/mL に調整し、0.05M Carbonate buffer pH 9.6 に浮遊させ、超音波処理した。その後、96 穴マイクロプレート (Nunc) に 100 μ L/well (蛋白濃度; 1 μ g/mL) 添加し、プレートへ固相化した。

ELISA の有用性: 各被験血清 (プロトテカ性乳房炎感染牛: 16 例、非感染牛: 15 例、酵

様式 C-19、F-19、Z-19 (共通)

母感染牛:4例)をPBS-Tにて2⁹倍に希釈後、調整したプレートへ50 µl/well 加え、37度で反応させた。洗浄後、800倍希釈したRabbit anti-Bovine IgG conjugated to HRP (biorbyt)を50 µl/well 加え、同条件にて反応させた。

反応基質液 (ABTS2,2-azino-bis (3-ethyl benzothioline-6-sulfonate)を200 µl/well 加え、遮光条件下にて発色処理を行った。発色後、反応停止液 (SDS/DMF ; Sodium Dodecyl Sulfate, *N-N* dimethyl formamide)を50 µl/well を加え、405 nm で吸光度を測定した。

不活化抗原投与牛における抗体価の推移：非感染牛への不活化抗原投与は、3回実施した(第1回:6例、第2回:7例、第3回:10例)。 *P. zopffii* SAG2021^T株を0.05%ホルムアミド加PBSに懸濁し不活化を行った。1.0×10⁷または1.0×10⁸ cells/mLに調整し、Freund's Incomplete Adjuvant (Cappel)と混和し不活化抗原を作製した。被験牛に投与後、投与前および1日、2、4、6、8、12週目に血清を採取し、ELISAにて抗体価を測定した。

4. 研究成果

(1) 細胞外観は、両型共に円/楕円形を呈し、母細胞内に内生胞子を形成、成熟後放出する生活環を示した。細胞内構造は、真核生物に基本的な細胞器官および色素体を有し、藻類類似の細胞壁二層構造を形成していた。両型間の相違として細胞壁表面像において、genotype 1は顆粒状隆起に覆われていたのに対し、genotype 2では無隆起で、内腔に達する直径約20 nm 大の小孔を壁全面に観察した。細胞内構造では、両型間で液胞の染色性に相違を認め、蓄積する代謝物質が相互に異なる

可能性を示した。また genotype 2 では、多量の色素体蓄積および発達した小胞体を認めた。これらの細胞器官の相違は、両型間のタンパク含有量の相違報告と一致した。

以上より、PZの超微細構造における両型間の相違を初めて明らかとした。

(2) ELISAによる抗体価：希釈直線性試験では、希釈倍数に応じて抗体価は低下し、高い直線性を示した ($R^2 = 0.98$)。日差・同時再現性試験におけるCV (coefficient of variation) 値は、概ね10%前後であった。またプロトテカ感染牛血清では、非感染牛および酵母感染牛血清と比較して有意な抗体価の上昇を確認した ($p < 0.001$) (図1A)。ROC (Receiver Operator Characteristic) 解析の結果、抗体上昇のカットオフ値を43.4に設定した(図1B)。

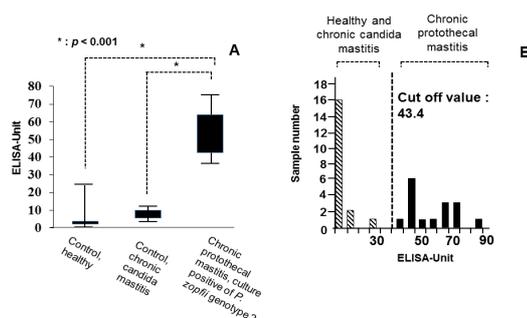


図1 A: プロトテカ感染牛、非感染牛および酵母感染牛における抗プロトテカ抗体価。B: プロトテカ感染牛および非感染牛における抗体上昇のカットオフ値を43.4に設定。

不活化抗原接種による抗体価の推移：単回投与では抗体価上昇は認められたものの、一時的かつ軽度にとどまった。投与回数および投与濃度を増加させた被験牛では、カットオフ値を上回る抗体価上昇と、投与12週後までの抗体価の維持を認めた(図2)。

様式 C-19、F-19、Z-19 (共通)

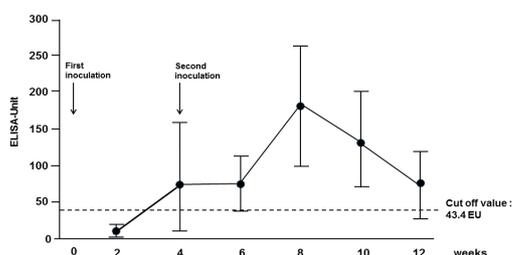


図2 不活化抗原接種による抗体価の推移

感染牛血清で有意な抗体価上昇を認め、その高い希釈直線性と両再現性試験における比較的安定した CV 値とから、ELISA によるプロトテカ感染牛の診断は可能と考える。不活化抗原投与での、投与濃度は 1.0×10^8 cells/mL を適量とし、2 回以上の投与でカットオフ値を上回る抗体価の上昇および維持を確認した。

以上のことから、牛プロトテカ性乳房炎の血清学的診断として ELISA 法は有用と考える。

研究は、本邦における *P. zopfii* 感染性乳房炎に対する予防の可能性を示した。今後の国内外における牛プロトテカ乳房炎の防除対策に大きく寄与すると考える。

<引用文献>

Roesler U, Möller A, Hensel A, Baumann D, Truyen U. Diversity within the current algal species *Prototheca zopfii*: a proposal for two *Prototheca zopfii* genotypes and description of a novel species, *Prototheca blaschkeae* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2006, 56: 1419-1425.

Osumi T, Kishimoto Y, Kano R, Maruyama H, Onozaki M, Makimura K, Ito T, Matsubara K, Hasegawa A. 2008. *Prototheca zopfii* genotypes isolated from cow barns and

bovine mastitis in Japan. *Vet. Microbiol.* 2008, 131: 419-423.

Sobukawa H, Yamaguchi S, Kano R, Ito T, Suzuki K, Onozaki M, Hasegawa A, Kamata H. Short communication: Molecular typing of *Prototheca zopfii* from bovine mastitis in Japan. *J Dairy Sci.* 2012, 95:4442-4446.

Sobukawa H, Kano R, Ito T, Onozaki M, Makimura K, Hasegawa A, Kamata H. *In vitro* susceptibility of *Prototheca zopfii* genotypes 1 and 2. *Med. Mycol.* 2011, 49, 222-224.

Gao J, Zhang HQ, He JZ, He YH, Li SM, Hou RG, Wu QX, Gao Y, Han B. Characterization of *Prototheca zopfii* associated with outbreak of bovine clinical mastitis in herd of Beijing, China. *Mycopathologia.* 2012, 173:275-281.

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3件)

Kano R, Sato A, Sobukawa H, Sato Y, Ito T, Suzuki K, Hasegawa A, Kamata H. (2016) Short communication: ELISA system for screening of bovine mastitis due to *Prototheca zopfii*. *J. Dairy. Sci.* 掲載確定. 査読有 (<http://www.journalofdairyscience.org/>)

加納 壘、松本 忠彦. (2015) 医藻類学の

様式 C-19、F-19、Z-19 (共通)

序説と展望、Med. Mycol. J. 56, J93-J97.

査読有

(Doi:<http://doi.org/10.3314/mmj.56.J93>)

Kano R, Sobukawa H, Suzuki M, Hiruma M, Shibuya K, Hasegawa A, Kamata H. (2014) Immunohistopathology of *Prototheca wickerhamii* in cutaneous lesions of protothecosis. Med. Mycol. J. 55, E29-32.

査読有

(Doi:<http://doi.org/10.3314/mmj.55.E29>)

[学会発表](計2件)

Sobukawa H, Kano R, Maruyama H, Hasegawa A, Osumi M, Okada J, Kamata H: The ultrastructural difference between *Prototheca zopfii* genotypes 1 and 2. 19th Congress of the international Society for Human and Animal Mycology, 2015年. 5月4-8日, Melbourne Convention and Exhibition Center, Melbourne, Australia.

加納 塁. 展望と討論 Survey and Discussion for Medical Phycology. 第58回日本医真菌学会総会, 2014年, 11月1日-2日, ワークピア横浜・横浜貿易ホール, 神奈川県・横浜市.

[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

ISHAM Medical Phycology : Protothecosis and Chlorellosis Working Group

(ISHAM-MPWG)

<http://medicalphycology.org/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

加納 塁 (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

鈴木 一由 (SUZUKI, Kazuyuki)

酪農学園大学・獣医学群・教授

研究者番号: 30339296

(3)連携研究者 なし

()

研究者番号

(4)研究協力者

伊藤 隆晶 (ITO, Takaaki)