

管内 A と畜場に搬入された傷病牛におけるプロトテカ保有状況

愛媛県食肉衛生検査センター ○出野萌子 赤坂遼 峯森雄高¹⁾ 園部祥代²⁾

河瀬智子 溝田文美³⁾ 得居格⁴⁾ 木村俊也

1) 現愛媛県畜産研究センター 2) 現愛媛県今治保健所

3) 現愛媛県保健福祉部薬務衛生課 4) 現愛媛県西条保健所

1 はじめに

プロトテカ (*Prototheca*) は、河川や湿潤な土壌等の環境中に広く分布する腐生性藻類である。人や動物に感染する人獣共通病原体であり、特に、*Prototheca zopfii* (*P. zopfii*) は牛に難治性の乳房炎を引き起こすことが知られている。プロトテカによる乳房炎は、感染牛に乳量及び乳質の低下をもたらし、慢性的に乳汁中や糞便中へプロトテカを排出することで同居牛に感染を拡大させる。また、有効な治療法がないため、早期の摘発隔離ができなければ、酪農家の生産性に大きなダメージを与える。

全国的にプロトテカ乳房炎の症例報告は少なく、本県においても同様である。そこで今回、管内 A と畜場に搬入された傷病牛のプロトテカ保有率を調査し、検出されたプロトテカについて遺伝子型解析を行い、病原性の有無を確認したので概要を報告する。

2 材料及び方法

(1) 検査対象

平成 31 年 4 月～6 月及び令和元年 10 月～令和 2 年 2 月に管内 A と畜場に搬入された傷病牛計 108 頭（うち、乳房炎症状を呈していた牛は 20 頭）

(2) 検体

検査対象から採取した乳汁 84 検体及び直腸便 108 検体

(3) プロトテカ同定

ア 分離方法

(ア) 乳汁からの分離

乳房から採取した乳汁 100 μ L を、*Prototheca isolation medium* (PIM) 平板培地に接種し、滅菌綿棒で均一に塗抹後、37 $^{\circ}$ C 48 時間好気培養を実施した。

(イ) 直腸便からの分離

直腸便を、PIM 液体培地 10mL に懸濁し、37 $^{\circ}$ C 48 時間好気培養を実施した。培養後、培地が白濁した検体は、当該培地 50 μ L を PIM 平板培地に接種し、滅菌綿棒で均一に塗抹後、37 $^{\circ}$ C 48 時間好気培養を実施した。

イ 形態観察

アの分離培養で得られた藻株をラクトフェノールコットンブルー染色し、鏡検に

て大きさ及び形状を確認した。

ウ 遺伝子型解析

イで得られた藻株について純培養後、市販キット（QIAamp DNA Mini Kit(QIAGEN)）を用いてゲノム DNA を抽出し、*TaKaRa* Taq Hot Start Version (TaKaRa) にて PCR 法による遺伝子型解析を実施した。目的の 18S rDNA 断片の増幅により *P. zopfii* を同定し、さらに特異的なプライマーを用いて非病原性の genotype 1 と病原性を有する genotype 2 を判別した。なお、プライマーは Roesler らが設計した下表のものを使用し、PCR 反応時間は 95℃30 秒、57℃60 秒、72℃60 秒を 34 サイクルとした。

表 プライマー

プライマー名	塩基配列(5'→3')	判別
Proto18-4f	GACATGGCGAGGATTGACAGA	<i>P. zopfii</i>
Proto18-4r	AGCACACCCAATCGGTAGGA	
PZGT 1/r	GCCAAGGCCCGCCGAAG	genotype 1
PZGT 2/r	GTCGGCGGGGCAAAAGC	genotype 2

3 結果

乳汁 84 検体中 1 検体 (1.2%) から大型白色コロニー (写真 1) 及び桑実状の藻体 (写真 2) を確認した。遺伝子型解析の結果、*P. zopfii* と同定し、非病原性の genotype 1 と判別した。なお、全ての直腸便からプロトテカは分離されなかった (0/108 検体)。



写真 1 コロニー形態

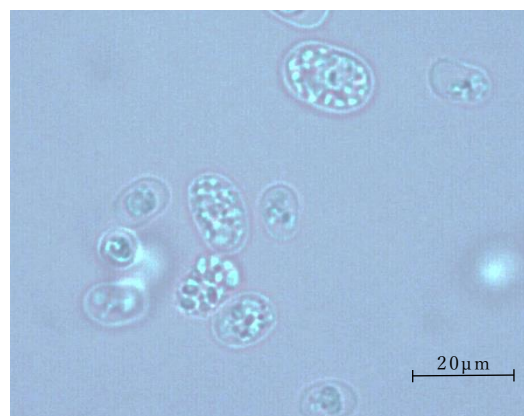


写真 2 鏡検像 (×1000)

桑実状の母細胞 (胞子囊) の中に多数の娘細胞 (胞子嚢胞子) を認める。

4 考察

今回、乳汁から *P. zopfii* が検出された傷病牛は、ホルスタイン種、雌、89 ヶ月齢で、関節炎により廃用とされていた。当該牛は、肉眼所見において乳房炎症状を認めず、検出菌株の遺伝子型解析では、環境中から検出されることが多い非病原株の genotype 1 と判別されたため、プロトテカ乳房炎との診断には至らなかった。なお、当該菌株は飼育中、乳管を通して乳房内へ一時的に侵入したことが推察された。

乳房炎症状を呈していた牛 20 頭からプロトテカが検出されなかった要因として、乳房炎の病態が関係していることが考えられた。プロトテカは細菌性乳房炎に続発して感染し、慢性乳房炎の病態をたどることが多いとの報告があり、今回、乳房炎症状を呈する牛のほとんどが、甚急性若しくは急性乳房炎であったことから、プロトテカの感染が成立する前に廃用とされていることが考えられた。

5 まとめ

近年の酪農形態は大規模集約型へと遷移しており、一度感染症が蔓延すると収束させるのが難しい傾向にある。プロトテカ乳房炎は、感染牛の乳汁中や糞便中に排出されたプロトテカが同居牛に感染することで蔓延し、大規模感染に繋がる可能性があるため、感染牛の早期摘発が重要となる。また、プロトテカ乳房炎の症例報告は増加傾向にあるため、今後より一層の感染対策が必要になると思われる。

今回検出された *P. zopfii* は非病原株の genotype 1 であったが、プロトテカ乳房炎の発生事例において、病原株の genotype 2 に加え genotype 1 についても感染牛及び農場環境中から検出されたとの報告があったため、当該農場環境中にも genotype 2 が分布している可能性が考えられる。今後は、プロトテカが検出された農場の牛及び乳房炎症状が認められた牛を中心に引き続き調査を継続し、必要に応じて生産者等へフィードバックしていきたい。

プロトテカは人獣共通病原体であり、人への感染は稀ではあるものの、重症化すると敗血症や髄膜炎を引き起こすとの報告もある。ついては、解体時の乳房の取り扱いについて衛生的に実施するよう、今後も継続してと畜作業者を指導していくとともに、我々と畜検査員も衛生的なと畜検査に留意したい。

6 引用文献

[1]池田輝雄：獣医臨床皮膚科学会雑誌，8(3),23-32,2002

[2]Roesler., *et al* : International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology , (2006), 56, 1419-1425

[3]加納壘：家畜感染症学会誌，5(4),139-144,2016

[4]西村恵子 他：日本臨床微生物学会雑誌，vol.30,No.1,2020.35