

## 牛プロトテカ乳房炎の浸潤状況調査と治療の試み

西部家畜保健衛生所

○坂下奈津美 三好里美

今雪幹也 光野貴文

はじめに

プロトテカとは、葉緑素を欠損した藻類である。プロトテカ属には約 3 種が属し、池、樹液、土壌、糞便などの環境に常在している。世界的に分布が確認されており、牛などの家畜や愛玩動物、野生動物、人、魚類に感染しプロトテカ症を引き起こすことが知られている。牛ではプロトテカ症として、乳房炎を起こすことが知られてる(1)。

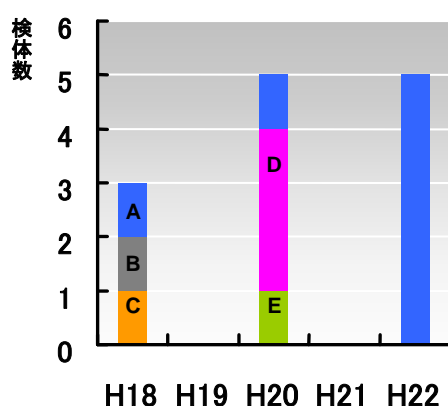


図1 香川県内プロトテカ乳房炎発生状況

過去5年間の家畜保健衛生所に持ち込まれた乳房炎検体のうち、プロトテカが原因と診断された検体数を縦軸、診断年度を横軸に示した。農家別に青、灰、桃、黄緑で色分けし、それぞれにA-Eのアルファベットを振り分けた。

牛のプロトテカ乳房炎は、*Prototheca zopfii*を主とするプロトセカ属藻類が原因である。症状として、乳汁に凝塊物が確認され、乳房が発熱したり、乳房全体が肥厚、硬結し、痛感を伴うことがある。バルク乳の生菌数の著しい増化が見られる。感染経路は、高度に汚染された環境からの感染が主と考えられているが、はっきりと判って

いない。治療法は確立されておらず、盲乳もしくは淘汰が一般的である。このため、経済的損失が大きく、注意が必要な乳房炎のひとつである。日本では、兵庫県で昭和 55 年に報告があつて以来、全国各地で散発しており、平成 21 年度の家畜衛生週報における乳房炎報告では、4 県が 16 頭の報告を行っており、これは報告のあつた乳房炎原因病原体のうち 5.7%を占めていた。県内では、過去 5 年間で 5 戸 13 件の発生があつた。発生件数と発生農家を色分けしてグラフに示した(図 1)。傾向として、ピンク色で示した A の農家(以下農家 A)に継続して発生していた。そこで、農家 A には、なんらかの対策が必要であると考へた。

今回、プロトテカ乳房炎頻発の農家 A で、プロトテカ乳房炎の全頭検査と環境からの検出を実施するとともに、発生牛の治療を試み、管内の浸潤状況調査を行ったので報告する。

### 材料及び方法

対象農家概要：農家 A は、ホルスタイン種 21 頭を飼養し、そのうち 14 頭を搾乳していた。14 頭の搾乳を行っている全分房から生乳 54 検体を採取した。牛房の構造は、1 頭用の

木枠があり、床材はコンクリートで、滑り止めのため、畳が敷いてあった。また、牛床と同じ高さに飼槽があるという平坦な構造であった。牛は各牛房に鎖や紐で繋がれており、比較的低い位置に2頭共有のウォーターカップがあった。

培地：乳汁の検査に、DHL、マンニット食塩培地、血液寒天培地、ミュラーヒントン培地を用いた。また、環境材料の検査には、簡便にプロトテカのみを分離する培地がないことから、一般的な真菌分離培地であるサブローブドウ糖培地に、選択性を高めるためクロールラムフェニコールを添加し分離培地とした。なお、クロールラムフェニコールについては、添加の有無でプロトテカのコロニー形成数に変化がないことを確認した。農場で滅菌綿棒と滅菌 PBS を用いて、検体を採取し、環境のぬぐい液を作成し、分離培地で培養した。培養は、37°Cで36時間とした。分離した病原体は、コロニー形態の観察とグラム染色を実施し、コロニーを釣菌し直接鏡検して、プロトテカ大の細胞を探索した。

乳房炎罹患状況の調査方法：生乳検体について血液寒天培地、DHL、マンニット食塩培地を用いて一般細菌検査を行った。なお、プロトテカの増殖には時間を要することが知られているため、37°Cで通常24時間のところ48時間まで培養した。

環境からの検出：検査対象は、農家 A、対照として同じ地域、同じ飼養形態で乳房炎の報告がない農家を設定した。

プロトセカの存在が知られている牛床、ウォーターカップ壁面、については両農家から、また、農家 A のミルクのティートカップライナ（これは洗浄済み）、農家 A の罹患牛の糞便、鼻鏡から検体を得た。農場で滅菌綿棒や滅菌綿花と滅菌 PBS を用いて、検体を拭き取って採取し、環境のぬぐ

い液を作成し、その 100  $\mu$ L を分離培地で培養した。

治療のプロトコル：カナマイシン注射薬を生理的食塩水 1 L に溶解し、100 mL ずつ朝夕罹患乳房に注入した。1日につき、1000 mg（力価）を6日間連続で投与し、途中3日目と6日目の生乳について細菌検査を行った。

薬剤感受性試験：Disk 法は、定法に従い抗菌剤カナマイシン、アンピシリン、ストレプトマイシン、セフロキシム、セファゾリン、エリスロマイシン、ベンジルペニシリン、オキシテトラサイクリンの8薬剤について実施した。ミュラーヒントン培地で培養後、各阻止円を判定した。寒天平板希釈法は、定法を参考に治療に用いる予定の注射用カナマイシンと、対象としてアンピシリンについて各薬剤を段階希釈後、ミュラーヒントン培地

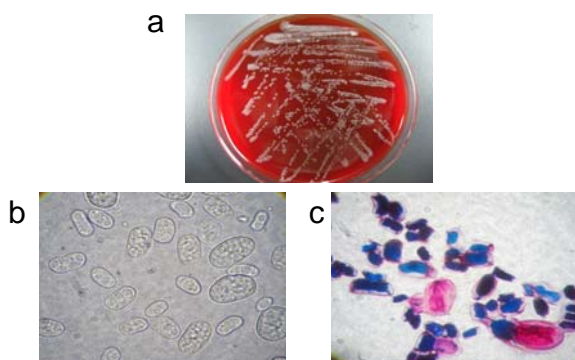


図2 罹患牛の摘発

aは、全頭検査で得られたプロトテカの血液寒天培地における36時間分離培養像である。b、cは、それぞれ直接鏡検とグラム染色の1000倍像である。

と混合し、試験プレートを作成した。プロトセカを画線塗抹し、培養した。判定は 5 個以内のコロニー形成の場合は陰性、5 個より多いコロニー形成を陽性とした。

### 成績

プロトテカ乳房炎発生農家（農家 A）の搾乳牛全 14 頭のうち、搾乳に供する全分房から採取した生乳 54 検体を一般細菌検査したところ、血液寒天培地とマンニット食塩培地に、コロニーが形成された。形成されたコロニーの形状を観察し、グラム染色したところ、プロトテカの特徴である、複雑な嚢状構造の大型細胞とその殻を確認した(図 2)。培養 2 日目でプロトテカが 54 検体中 2 検体、2 頭から検出された。また、プロトテカが検出された検体と他の検体から、他に CNS が検出された。なお、DHL は陰性だった。

プロトテカ乳房炎は主に環境性であるということで発生農家とプロトテカ乳房炎非発生の陰性農家の牛床、ウォーターカップ、ミルク、糞便、鼻鏡の拭き取りによる環境材料を検査したところ、計 2/40 検体（2 検体は発生農家牛床より検出）から、プロトテカが検出された。環境からの検出の結果を、表に示した(表 1)。環境からの検出の結果、農家 A で牛床からプロトセカが検出された。これは、全頭検査で発見された罹患牛とは別の場所であり、湿潤環境である飼槽に近い部分だった。ウォーターカップ周辺や洗浄済みミルクからは検出されなかった。また、罹患牛の糞便、鼻鏡など

表1 環境材料からの分離

a					
	牛床	WC周辺	糞便	鼻鏡	ミルク
農家A	* 2/12	0/8	0/4	0/4	0/4
陰性農家	0/4	0/4	-	-	-

b		
	飼養形態	検出場所
農家A	繋ぎ	飼槽付近の牛床
過去の報告	フリーストール	給水器、ゴムマット上汚水

農家Aの牛床、ウォーターカップ壁面、ウォーターカップ内飲用水などウォーターカップ(WC)周辺、糞便、鼻鏡、ミルクのティートカップライナ、と陰性農家の牛床、WC周辺から検体を得た。結果は分離数/検体数で示した。\*の陽性検体は、牛床の飼槽付近だった。

Disk法 ———— 感受性なし(KMに若干の阻止円有)  
 寒天平板希釈法 ———— KM12.5 µg/ml感受性有

薬剤濃度 (µg/ml)	200	100	50.0	25.0	12.5	6.25	3.13	1.56	0.78	0.00
KM	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
ABPC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

図3 薬剤感受性試験

薬剤感受性試験の種類と結果を示した。表は、寒天平板希釈法について、縦軸に使用した薬剤のカナマイシン(KM)と陰性対照としてアンピシリン(ABPC)、横軸に濃度を示した。

からは検出されなかった。プロトテカ陰性農家からは、検出されなかった。

これを受けて、農家 A で牛床を中心に牛舎環境の消毒を実施した。プロトテカに有効とされる消毒薬、次亜塩素酸ナトリウム、逆性石けんを用いた(4)。また、畜主に対し、前絞り等の廃乳を牛床に落とさないように、指導した。

次に、全頭検査で発見された罹患牛 2 頭について、治療の検討を行った。農家 A より分離したプロトテカについて、薬剤感受性試験を行った。Disk 法は、定法に従い抗菌剤 8 薬剤について判定したところ、カナマイシン、アンピシリンを含む 8 薬剤全てに感受性が無かったが、カナマイシンに若干の阻止円が見られたため、寒天平板希釈法を実施した。カナマイシン濃度  $12.5 \mu\text{g}/\text{ml}$  で発育が阻止されたため、カナマイシンを治療に用いることに決定した(図 3)。

治療 3 日目と 6 日目の乳汁を画線培養したところ、プロトテカが検出され、完治の確認はできなかった(図 3、表 2)。現在 1 頭は自然に盲乳化、もう一頭は廃用となった。この治療法は、表 2 のように治癒例もあるが、慢性乳房炎には治療効果がないと言われており、今回の個体は両方、慢性症状であった可能性が高かった。

また、管内のプロトテカ浸潤状況を調査したところ、酪農 16 戸のバルク乳 16 検体中、検出されたのは農家 A のみだった(表 3)。

#### まとめ及び考察

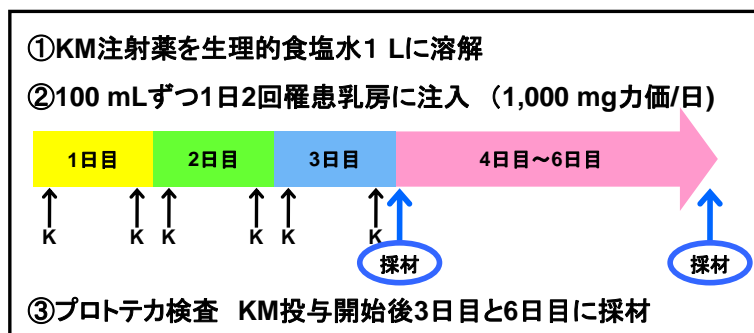


図4 KM投与のプロトコル

①～③の手順でカナマイシンの乳房内注入を試みた。その流れを模式図に示した。KはKM投与時期、青い矢印は生乳の採材時期である。4～6日目も同様に投与した。

表2 KMIによる治療の検討

a				
個体	治療開始	3日目	6日目	転帰
1	H22.7	検出	検出	盲乳化
2	H22.9	検出	検出	廃用

b		
個体	治療頭数	治癒頭数
過去の報告	25	15
管内過去の成績	2	1
今回の試験個体	2	0

a)に、治療した個体の乳汁検査結果と転帰を示した。b)に、過去の文献による報告と管内と今回の試験個体の治療成績を示した。なお、過去の報告の治療プロトコルはKM600 mgとペニシリン60万単位の合剤/日を10日間、管内過去の成績は今回と同様であった。

プロトテカ乳房炎頻発の農家 A で、乳汁の全頭検査を分房ごとに行ったところ、搾乳牛全 14 頭のうち、搾乳に供する全分房から採取した生乳 54 検体中 2 (2 頭) 検体より、プロトテカが検出された。今回の全頭検査の罹患率は、全分房の 3.7% で、搾乳牛の 14.3% だった。これは、フリーストールの過去の感染例に比べると少ない罹患率であり、繋ぎは、罹患牛と直接の接触が少ない分、感染拡大が抑えられていると考えられた。また、プロトセカが分離された 2 頭の牛房は離れていたことから、感染には直接伝播以外の要因が考えられた。分離されたプロトセカについて薬剤感受性試験を行った結果、一般的な抗菌剤に耐性を示したが、カナマイシンについては  $12.5 \mu\text{g}/\text{ml}$  で発育が阻止され、若干の感受性が認められたため、これを用いて 2 頭の治療を試みた。投与期間中と、投与後の検査の結果、プロトセカは減少せず、廃用の転機となった。今回は治療の効果が認められなかった。2 頭の乳房炎が感染初期ではなく、潜在していた期間に慢性化していた可能性が高かった。

**表3 管内浸潤状況調査**

対象	検体	結果
16戸	バルク乳 16検体	1検体陽性

**対象は、農家Aを含めた管内全酪農家16戸より得たバルク乳16検体を分離培養し、1検体からプロトテカが検出された。検出は農家Aであり、罹患牛淘汰後のバルク乳からは検出されなかった。**

プロトテカ乳房炎は主に環境性とのことより、農家 A と非発生農家の環境材料を検査したところ、計 40 検体中、農家 A の牛床 2 検体 (2 検体は発生農家牛床より検出) から、プロトテカが検出された。農家 A は、牛床と同じ高さに飼槽があるという平坦な構造であったが、プロトテカが検出されたのは牛床の中でも飼槽との境界に近い部分であり、畳の下に食べ残しが溜まり、湿潤環境であった。一方、非発生農家からは検出されなかった。この結果をもとに、搾乳の衛生指導、環境の消毒を行った。環境からの検出について、牛舎のような他の汚染菌が多い環境では分離が難しく、特異的な分離培地製作は過程が煩雑である、などの理由で報告例が少ない。平成 13 年河合の報告によると、フリーストール牛舎で牛群の約半数が罹患していたケースで、ウォーターカップ、ゴムマット上汚水などの共有部からプロトテカが検出されたとのことだった(3)。今回、農家 A は繋ぎ飼いであり、ウォーターカップやミルクなど直接他の牛と接触する器具からは検出されず、罹患牛の下以外の牛床からプロトテカが検出された。検出率は 6.25% ということで、環境に大量に繁殖してるとは言えない(表 1)。農家 A では、何らかの原因で持ち込まれたプロトテカが牛床の湿潤環境で保存されている箇所があり、他の乳房炎も発生していることから、そのような管理状態に、感染の成立する要因があると考えられた。繋ぎ飼いでは、他にプロトテカが移動する要因として人の仲介があるので、これら結果をもとに、搾乳の衛生指導、徹底的な環境の消毒を行った。

また、管内の浸潤状況調査については、酪農 16 戸のバルク乳 16 検体中、検出されたの

は農家 A のみだった。他の 15 戸での発生はなく、同じ地域でも、他の農家にプロトテカ乳房炎やプロトテカのラインへの混入は確認されなかった。

治療に関しては、今回は成功した事例がなく、今後も検討が必要である。今回の全頭検査で新たな罹患牛の発見に繋がり、対策を実施できた。その後、新たな牛での発生は確認されていない。

#### 参考文献

- 1 池田輝夫(2002), 動物のプロトテカ症, 獣医臨床皮膚科, Vol. 8 23-32
- 2 佐藤薫(1998), *Prototheca zopfii*による牛乳房炎の 3 症例, 日獣会誌 51, 722-725
- 3 河合一洋(2001), プロトセカ乳房炎の防除事例, Q&A で理解する乳房炎コントロール 7 7, 154-155
- 4 平塚恵子(2008), *Prototheca*による乳房炎発生事例, 三重県家畜保健衛生業績発表会