

## 論文の内容の要旨

氏名：曾布川 英人

博士の専攻分野の名称：博士（獣医学）

論文題名：牛プロトテカ乳房炎の分子疫学および防除に関する研究

牛乳房炎の原因は複数存在するが、藻類である *Prototheca zopfii* (以下 PZ) 感染性牛乳房炎（牛プロトテカ乳房炎）は、顕著な症状を示さず、検出の遅延による感染拡大に発展し易く、治療法を欠き、摘発淘汰を唯一の対策とする点で酪農に打撃の大きい疾病である。

本症の発生は現在、国内外共に増加傾向にあり、伝播には複数の経路が推測されるも、詳細は不明に経過している。故に、本藻類の疫学調査は、感染源および伝播経路の解明および防疫上の観点から重要な意義を有している。

近年 PZ は、分子生物学的解析に基づき二遺伝子型 (genotype 1, 2) に分類され、genotype 1 が牛舎環境から分離される非病原性株、genotype 2 が乳汁由来の病原性株に、それぞれ比定された。本邦では、両遺伝子型解析を基にした分子疫学調査および防除の検討は未だ行われていない。

本研究では、牛プロトテカ乳房炎の感染源解明および防疫を目的に検討を行った。第 1 章では、PZ の分子疫学調査により、感染源および感染経路を推定した。第 2 章では両遺伝子型の相違追求のための分子生物学的解析、PZ 超微細構造観察および抗菌剤/消毒薬感受性試験を実施した。第 3 章では有効な治療法を欠く本症の新たな防除法確立を目途に、プロトテカワクチンを試作し有効性、安全性を評価した。

### 1. *Prototheca zopfii* (PZ) の分子疫学調査による感染源および伝播経路の推定

PZ による難治性乳房炎に関する国内外の疫学的知見は感染源、伝播経路の特定に至っていない。そこで乳汁、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）から本藻を分離後、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 PZ 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 : 0.7 (*P. blaschkeae*))、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、体液サンプルでは、PZ 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は、何れも genotype 1 が優位に存在し、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、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、ネズミー検体からの 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。

以上より、本邦の牛プロトテカ乳房炎では糞便/乳汁が、感染源/伝播経路として機能する可能性が明らかとなった。

## 2. *Prototheca zopfii* (PZ) genotype 1, 2 両遺伝子型の遺伝的/表現形質の相違について

前章の分子疫学調査により、本邦における PZ の遺伝子型と病原性との関連を確認した。両遺伝子型の相違は病原性の解明に資するが、遺伝子の他の相違は不明である。そこで、他藻類でクローニングされているリボソームの Internal Transcribed Spacer (ITS) 領域および  $\beta$ -tubulin 遺伝子の分子系統解析を行うと共に、表現型解析として本藻類の超微細構造を調べ抗菌剤、消毒薬に対する感受性を調査した。

### 1) ITS 領域および $\beta$ -tubulin 遺伝子による PZ 両遺伝子型系統解析

従来、PZ の遺伝子型分類はリボソーム領域 (18S rDNA, D1/D2 26S rDNA) を用い行われてきたが、他遺伝子領域での検討は未だなされていない。そこで乳汁、各環境試料、ヒトおよびイヌ由来の両遺伝子型株を用い、ITS 領域および  $\beta$ -tubulin 領域に関し系統分類を行った。

ITS 領域系統解析の結果、genotype 1 はさらに4つの独立したクラスターを形成したが、分離環境/宿主/地域における関連性は認められなかった。一方、genotype 2 は全て同一のクラスターに属し、牛プロトテカ乳房炎の単系統株に基づく可能性が示唆された。 $\beta$ -tubulin 遺伝子では異クラスター形成を認めず、両型で共通性を示した。また、genotype 1 では遺伝子アレルを散見し、倍数体の存在が考えられた。

以上より、genotype 1 は、遺伝的多様性に富み複数の genotype に分類される一方、genotype 2 は宿主を問わず、単系統を保持し広範囲に分布する現状が明らかとなった。

### 2) PZ 両遺伝子型の超微細構造解析について

PZ 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。

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。

### 3) PZ 各遺伝子型における薬剤および消毒薬感受性の比較

PZ の遺伝子型と薬剤/消毒薬感受性の相違は検討されていない。そこで、牛舎環境由来の genotype 1、乳房炎罹患牛由来の genotype 2 各 10 株および両遺伝子型標準株について、感受性既報の抗菌剤さらに農場で通常使用の各種消毒薬に対し、CLSI 法および E-test 法により感受性試験を実施した。

その結果、使用全薬剤は、genotype 1 に比較し genotype 2 に有意に低感受性を示した ( $p < 0.01$ )。一方、両型共、全消毒薬の通常の使用濃度域に感受性を示した。

以上より、薬剤による本症治療の困難な一方、環境に対する消毒措置の有用性が明らかとなった。

### 3. 試作プロトテカワクチン投与時の抗体価測定および安全性の検討

第 2 章より、genotype 2 の化学療法不応性が判明した。適切な防除法の確立を目的に、ホルムアミド不活化プロトテカワクチンを試作し、仔牛および成牛に対する接種安全性を確認した。また抗牛プロトテカ抗体価測定用 ELISA 系を作製し、抗体価測定応用および診断応用への有用性を検討した。

無作為に抽出した感染牛／非感染牛血清を用いて、genotype 2 破砕物を固層化抗原 (1  $\mu\text{g}/\text{well}$ ) とした ELISA の分析精度を比較し、良好な希釈直線性、再現性を得た (アッセイ内変動係数 : 3.7~9.1 %、アッセイ間変動係数 : 9.9~19.8 %)。

プロトテカ感染牛、非感染牛および酵母感染牛血清の各抗体価をそれぞれ測定し、プロトテカ感染牛血清に有意な高値を確認した ( $p < 0.01$ )。設定カットオフ値を基に、試作不活化ワクチン投与牛 ( $1.0 \times 10^7$  cells/mL およびアジュバント) の抗体価上昇を検出した結果仔牛では、投与 4 週後まで抗体価の上昇を認めず、移行抗体の影響が考えられた。一方、同ワクチン一回接種の成牛では、抗体価の軽度な上昇を認めたが、カットオフ値以上への抗体価上昇および維持を得られず、一回接種法は不適と考えられた。そこで、投与濃度を増加 ( $1.0 \times 10^8$  cells/mL) させ、初回接種 4 週後に第二次接種を行って測定した結果、8 週後まで維持されるカットオフ値を超えた抗体価を認めた。

以上から、試作不活化ワクチンの免疫原性／安全性、接種牛の一般状態および血液検査所見の健常

性を確認し、本不活化ワクチンの牛プロトテカ乳房炎防除への可能性が示唆された。

本研究は、本邦における *Prototheca zopfii* 感染性乳房炎の感染源／伝播経路を明らかにし、本症発生時の対策に途を拓いた。また両遺伝子型での複数遺伝子および表現形質の相違、抗菌剤に対する感染株非感受性／環境株感受性の性向、遺伝子型と難治原因の関係性を示唆し、不活化ワクチンによる予防の可能性を示した。

本藻の感染源／伝播経路、両遺伝子型間の性状解析および新たな予防法の提示は、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。