

## 子牛におけるルーメンアシドーシスの関与が疑われた

*Pichia kudriavzevii* による消化管真菌症

大竹良祐<sup>1)†</sup> 澤田徳子<sup>1)</sup> 木崎あゆみ<sup>1)</sup> 戸塚知恵<sup>1)</sup>  
花房泰子<sup>2)</sup> 芝原友幸<sup>2),3)</sup>

- 1) 岩手県中央家畜保健衛生所 (〒020-0605 滝沢市砂込390-5)  
2) 国研農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究部門 (〒305-0856 つくば市観音台3-1-5)  
3) 大阪府立大学大学院生命環境科学研究科 (〒598-8531 泉佐野市りんくう往来北1-58)

(2021年4月12日受付・2021年8月19日受理)

## 要 約

岩手県内の黒毛和種牛飼養農家で、24日齢の子牛が下痢及び哺乳欲低下を呈し、予後不良となった。剖検では、前胃及び第四胃に腐敗酸臭を伴う灰色泥状内容の貯留がみられた。組織学的に、食道及び前胃の粘膜は肥厚し、上皮細胞の変性、壊死及び錯角化、好中球の浸潤並びに出血が認められた。病変部には多数の酵母様真菌及び仮性菌糸がみられた。免疫組織化学的検査並びに第一胃及び直腸の内容由来分離菌の生化学的性状検査及び分子生物学的解析の結果から、この真菌は*Pichia kudriavzevii*と同定された。また、第一胃内容のpHの低下及び乳酸濃度の著しい上昇が確認された。本症例は*P. kudriavzevii*による子牛の消化管真菌症と診断され、その誘因としてルーメンアシドーシスの関与が疑われた。牛において、*P. kudriavzevii*の消化管真菌症を確認した初の報告である。

—キーワード：子牛、カンジダ症、*Pichia kudriavzevii*。

-----日獣会誌 74, 781~787 (2021)

カンジダ症は、*Candida*属真菌の感染に起因する日和見感染症であり、人及び動物の皮膚、消化管及び泌尿生殖器の粘膜のほか、まれに全身諸臓器に感染し、さまざまな症状を示す [1]。

*Candida*属は、*C. tropicalis*を属の基準種とし、430余の子囊菌酵母が属した真菌の属名である [2]。酵母は形態的特徴に乏しいため分類は困難であったが、近年の分子系統学的研究により、また2013年の国際藻類・菌類・植物命名規約における二重命名法の廃止に伴い、真菌名の変更及び再分類が提案された。たとえば*C. guilliermondii*や*C. krusei*は、それぞれ*Meyerozyma guilliermondii*及び*Pichia kudriavzevii*が正式な真菌種名となった [3]。その一方、医学・獣医学分野では、*C. guilliermondii*や*C. krusei*といった旧名が用いられることが多いのが現状である。

牛におけるカンジダ症は、*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *M. guilliermondii* (*C.*

*guilliermondii*) 及び*P. kudriavzevii* (*C. krusei*)に起因する症例が報告されている [1]。これらのうち、*C. albicans*及び*C. glabrata*は子牛の消化管におけるカンジダ症の原因となり、抗菌薬の継続的な投与や免疫機能の低下、第一胃内の腐敗・発酵が発生の主要因となる [4-7]。この腐敗・発酵は、第二胃溝を通過して第四胃に流入すべきミルクが、第一胃に貯留して、細菌に代謝されることで起こり、産生された乳酸により、第一胃内のpHは低下する [8]。これは第二胃溝の閉鎖不全、ミルクの大量哺乳、カテーテルを用いたミルクの投与、第四胃からの逆流等により起こる [9]。*P. kudriavzevii*は、自然界に広く存在し、土壌や食品、健康な人や動物の消化管からも分離される [10-12]。他方、牛において、本菌による乳房炎 [13] 及び気管支肺炎が報告されている [14]。しかし、これまで本菌による牛の消化管真菌症の報告はない。

本報告では、食道及び前胃粘膜並びに回腸パイエル板

† 連絡責任者：大竹良祐 (岩手県中央家畜保健衛生所)

〒020-0605 滝沢市砂込390-5 ☎019-688-4111 FAX 019-688-4012  
E-mail: 0524.o.ryosuke@pref.iwate.jp

及び回盲部粘膜に消化管真菌症が認められ、第一胃及び直腸の内容から *P. kudriavzevii* が分離された子牛症例の検査成績の詳細を述べる。

## 材料及び方法

**発生状況と材料：**岩手県内の繁殖雌牛 11 頭を飼養する黒毛和種素牛生産農場において、2019 年 10 月 14 日生まれの哺乳牛が 10 月 28 日に下痢を呈した。治療（補液並びにカナマイシン及びエンロフロキサシンの投与）が実施されたが症状は改善せず、11 月 3 日から哺乳欲低下のためカテーテルを用いた代用乳の強制投与が実施された。11 月 7 日、症状は改善せず、予後不良と判断され、病性鑑定に供された。当該牛には、湯で溶解された代用乳 300g/l（推奨濃度：160g/l）が、朝 1 回（1l）、日中 3 回（各 500ml）、夕方 1 回（1l）の計 5 回、鑑定殺前日までの 4 日間給与されていた。

**病理学的検査：**剖検後、全身諸臓器を 10% 中性緩衝ホルマリン液により固定し、定法に従いパラフィン包埋、薄切後、ヘマトキシリン・エオジン（HE）染色を行った。消化管（食道、第一胃、第二胃、第三胃、第四胃、空腸、回腸、回盲部、盲腸、結腸及び直腸）については過ヨウ素酸シッフ（PAS）反応及びグロコット染色を行った。食道、第一胃、第二胃及び第三胃はグラム染色を実施した。

**免疫組織化学的検査：**食道、第一胃、第二胃及び第三胃のパラフィン切片を用い、免疫組織化学的検査を実施した。一次抗体は抗 *C. albicans* 家兎ポリクローナル抗体（2,048 倍希釈、Biogenesis, U.K.）、抗 *Aspergillus* マウスモノクローナル抗体（1,024 倍希釈、Clone：Mab-WF-AF-1, Dako, U.S.A.）及び抗 *Rhizomucor* マウスモノクローナル抗体（256 倍希釈、Clone：Mab-WSSA-RA-1, Dako, U.S.A.）並びに各一次抗体希釈液は市販抗体希釈液（S3022, Dako, U.S.A.）を用い、市販キット（ヒストファインシンプルステイン MAX-PO「MULTI」キット、(株)ニチレイバイオサイエンス、東京）の手順に従って実施した [4, 15]。

**血液検査：**剖検直前に採取した血液を用いて、血液検査は自動血球計数機（MEK-6258 セルタック α、日本光電工業(株)、東京）を用いて実施した。血清の生化学的検査は生化学自動分析装置（富士ドライケム 7000V、富士フイルムメディカル(株)、東京）を用いて実施した。血清中乳酸濃度は除タンパク処理後、酵素法（F キット D-乳酸/L-乳酸、(株)ジェイ・ケイ・インターナショナル、東京）により検査した。血清 IgG 濃度の測定は ELISA 法（Bovine IgG ELISA<sup>BASIC</sup> kit, MABTECH, U.S.A.）により検査した。

**第一胃内容検査：**第一胃内容を用いてガラス電極法により pH を測定した。同内容をスライドガラスへ塗抹し、

光学顕微鏡により原虫の存在を確認した。また、同内容を二重ガーゼで濾過し、この濾液を用いてパーカー・サマーソン法 [16] による乳酸濃度の測定を行った。

**細菌学的検査：**主要臓器は好気性下の 5% 羊血液加寒天培地（Becton, Dickinson and Company, U.S.A.）及び DHL 寒天培地（栄研化学(株)、栃木）並びに嫌気性下の L-システイン（和光純薬工業(株)、大阪）・卵黄加変法 GAM 寒天培地（日水製薬(株)、東京）で 37℃ 24 時間培養した。空腸内容は、嫌気性下の卵黄加 CW 培地（日水製薬(株)、東京）で *Clostridium perfringens* の定量培養を実施した。腸間膜リンパ節、第一胃内容、空腸内容及び直腸内容から分離された *C. perfringens* の毒素型別 PCR [17] を実施した。

**真菌学的検査：**第一胃内容は嫌気性下の GAM 寒天培地で、直腸内容は HTT 培地での増菌後に好気性下の CAS 培地で各々 37℃ 24 時間培養し、発育した真菌をポテト・デキストロース寒天（PDA）培地（日水製薬(株)、東京）に継代して好気性下で 37℃ 24 時間培養してコロニー形態を観察した。また、ラクトフェノール標本を作製し、鏡検することにより真菌の形態を確認した。

分離された真菌から DNA 抽出試薬（Instagene DNA 精製マトリックス、Bio-Rad Laboratories, U.S.A.）を用いて DNA を抽出し、Internal transcribed spacer (ITS) 領域及び rDNA large subunit D1/D2 領域に対するプライマーを用いて PCR を行い [18-20]、得られた PCR 産物の塩基配列をダイレクトシーケンス法により決定した。得られた塩基配列について、National Center for Biotechnology Information の Basic Local Alignment Search Tool (BLAST : <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) を利用し、菌種を同定した。

分離菌の生化学的性状は真菌同定キット（アピ C オクサノグラム、シスメックス・ピオメリュー(株)、France）により確認した。分離菌の薬剤感受性試験は、薬剤感受性キット（酵母様真菌 DP「栄研」、栄研科学(株)、栃木）を用い、Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) M27-A3 に基づく微量液体希釈法により最小発育阻止濃度（MIC）を測定した。

**ウイルス学的検査：**直腸内容を用いて牛ウイルス性下痢ウイルス、牛コロナウイルス、牛アデノウイルス、A、B 及び C 群ロタウイルス、牛エンテロウイルス及び牛トロウイルスの各遺伝子検索 [21] を行った。

## 成 績

**病理解剖所見：**被毛粗剛及び脱水が著しく、肛門周囲には酸臭を伴う緑色泥状便の付着がみられた。前胃及び第四胃には腐敗酸臭を伴う灰色泥状物が貯留していた（図 1）。前胃粘膜は全域にわたり灰白色を呈して肥厚し（図 2）、散在性に出血がみられ、食道粘膜も軽度に肥厚



図1 第一胃内容の肉眼写真  
腐敗酸臭を伴う灰色泥状物が貯留していた。

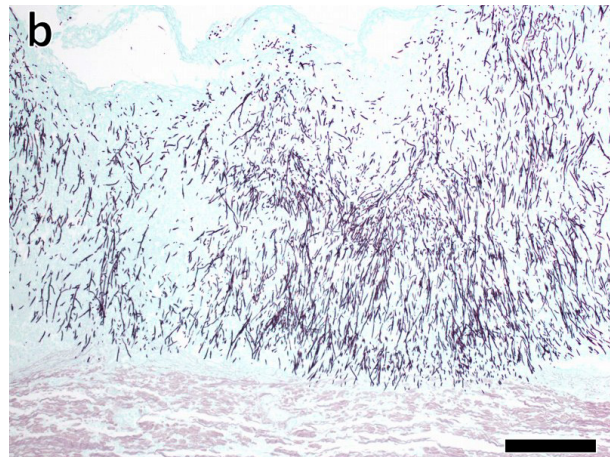
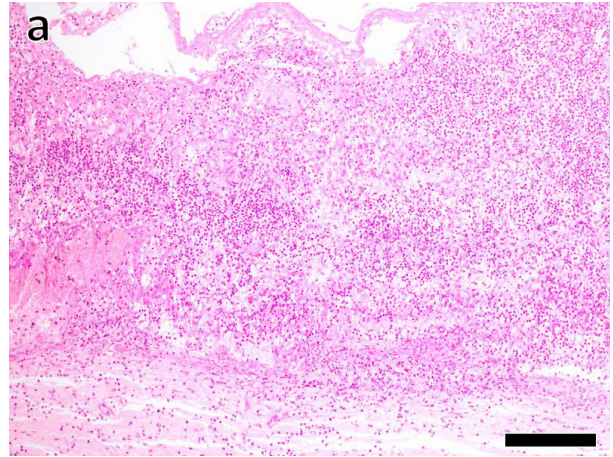


図3 第一胃  
a: 粘膜は著しく肥厚している (HE 染色 Bar=500  $\mu$ m).  
b: 粘膜には多数の真菌 (黒色) が認められる (グロコット染色 Bar=500 $\mu$ m).

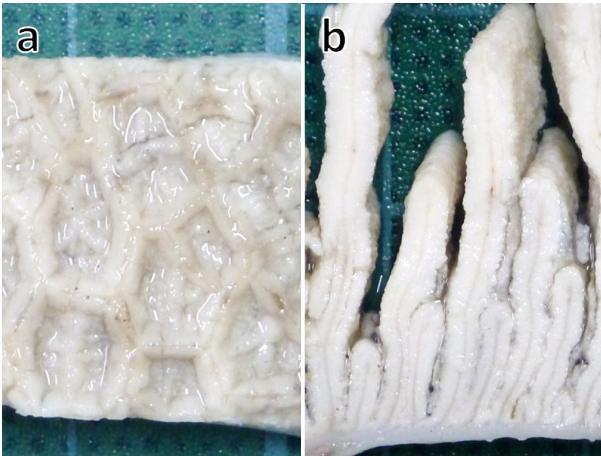


図2 第二胃 (a) 及び第三胃 (b) の肉眼写真 (ホルマリン固定後)  
第二胃後及び第三胃葉は肥厚し、第二胃及び第三胃乳頭は不明瞭である。

していた。胸腺は重度に大きさを減じていた (重量: 56g)。

**病理組織学的所見:** 食道、第一胃、第二胃及び第三胃の粘膜には、び漫性に上皮細胞の中等度から重度の変性、壊死、錯角化及び角化亢進がみられ、好中球の中等度から重度浸潤及び軽度から重度の出血を伴って肥厚していた (図3a)。回腸末端には限局性にパイエル板上皮細胞のわずかな剥離及び円蓋域への好中球の軽度浸潤が認められた。回盲部には限局性に潰瘍が認められ、粘膜下組織の中等度の壊死及び好中球浸潤がみられた。PAS反応及びグロコット染色により、食道、第一胃、第二胃及び第三胃の粘膜に多数の酵母及び仮性菌糸が認められた (図3b)。粘膜表層 (図4a) では仮性菌糸よりも酵母が、深層 (図4b) に向かうにつれて酵母よりも仮性菌糸が優位に認められ、一部の仮性菌糸は粘膜下組織を通過し内筋層に達していた。回腸末端のパイエル板には

剥離した上皮に少数の酵母、円蓋域に少数の酵母及び仮性菌糸が認められた。回盲部の壊死した粘膜下組織には中程度の酵母及び仮性菌糸が認められた。グラム染色により、食道、第一胃、第二胃及び第三胃の粘膜上皮表面及び変性した粘膜上皮内に多数のグラム陽性桿菌が認められた。胸腺は、皮質の細胞数は髄質の細胞数よりも多く、皮髄の境界は明瞭で、間質結合組織の増生はみられず、び漫性に皮質におけるリンパ球のアポトーシス及び崩壊したリンパ球残渣を貪食するマクロファージが軽度に認められた。その他の臓器に著変は認められなかった。

**免疫組織化学的検査:** 食道、第一胃、第二胃及び第三胃に認められた酵母及び仮性菌糸は、抗 *C. albicans* 抗体を用いた免疫組織化学的検査で陽性反応を示し (図5)、抗 *Aspergillus* 抗体及び抗 *Rhizomucor* 抗体を用いた免疫組織化学的検査では陰性を示した。

**血液検査:** 白血球の増加が認められた。血清生化学的検査では、TP、Alb、T-Cho、TG及びIgG濃度の低下がみられ、乳酸濃度は増加していた (表1)。

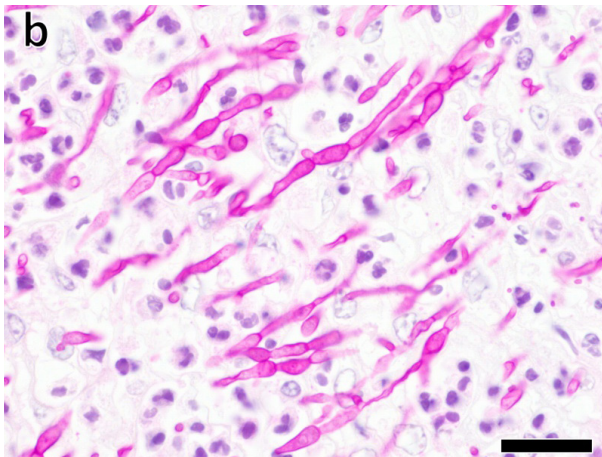
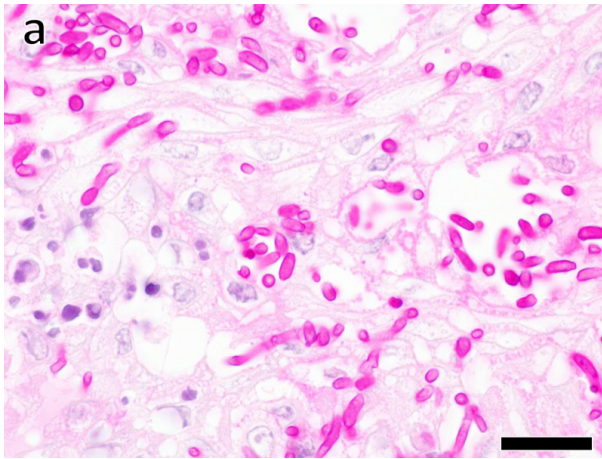


図4 第二胃

a: 粘膜表層に球形 (直径3~4 $\mu$ m) や楕円形の (長さ6~8 $\mu$ m) 酵母が認められる (PAS 反応 Bar = 20 $\mu$ m).

b: 粘膜深層にくびれを有するソーセージ状の仮性菌糸 (幅3~5 $\mu$ m) が認められる (PAS 反応 Bar = 20 $\mu$ m).

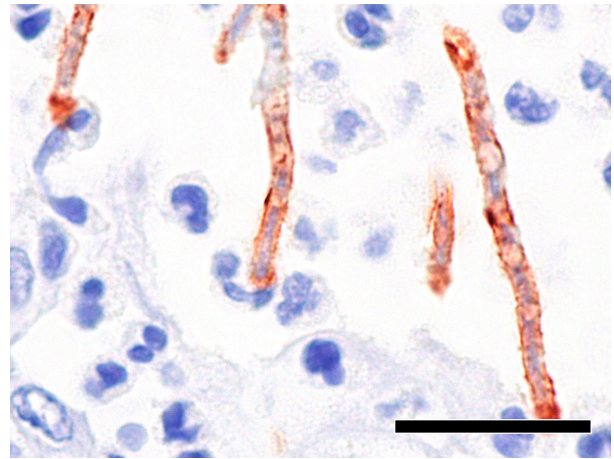


図5 食道

真菌は抗 *Candida albicans* 家兎抗体に陽性反応を示す (免疫染色 Bar = 20 $\mu$ m).

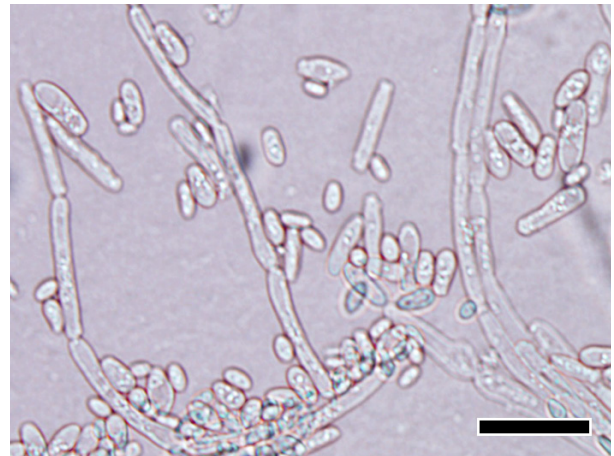


図6 酵母及び仮性菌糸が認められた (ラクトフェノール標本 Bar = 20 $\mu$ m)

**第一胃内容検査:** 第一胃内容に原虫は確認されず, pHの低下及び乳酸濃度の顕著な上昇が認められた (表2).

**細菌学的検査:** 第一胃内容, 空腸内容 ( $3.0 \times 10^8$  個/g), 直腸内容及び腸間膜リンパ節から *C. perfringens* が分離され, 分離菌の毒素型はA型であった.

**真菌学的検査:** 第一胃及び直腸の内容から真菌が分離された. 分離菌はPDA培地上で白色のコロニーを形成し, ラクトフェノール標本の鏡検により酵母及び仮性菌糸が認められた (図6). ITS領域及びD1/D2領域の塩基配列は既知の *P. kudriavzevii* 標準株の当該領域塩基配列 [ITS領域: CBS 5147 (Sequence ID: CP 028531), D1/D2領域: NRRL Y-5396 (Sequence ID: NG 055104)] と100%同一であった. 決定した本症例分離株のITS領域及びD1/D2領域の塩基配列は, 日本DNAデータベースに登録した (アクセッション番号ITS領域: LC633337, D1/D2領域: LC633336). 生化学的性状検査では, グルコース, N-アセチル-D-グ

ルコサミン及びマルトースの利用能陽性, ガラクトース, ラクトース, スクロース及びトレハロースの利用能陰性が確認された. 薬剤感受性試験の結果, 供試した8薬剤に対する分離菌の各MIC ( $\mu$ g/ml) は, フルコナゾール (FLCZ) に対して高い値を示した (表3).

**ウイルス学的検査:** 直腸内容から, 検索した下痢に関連するウイルスの遺伝子は検出されなかった.

## 考 察

下痢及び哺乳欲低下を呈し予後不良となった黒毛和種子牛の食道, 第一胃, 第二胃, 第三胃に真菌性消化管炎がみられ, 組織学的に *C. albicans* 及び *C. glabrata* の前胃炎 [4, 5] と類似の所見が観察された. すなわち, 酵母様真菌を伴う粘膜上皮の炎症, 出血, 錯角化及び角化亢進が認められた. また, 本症例では, 粘膜下組織から内筋層への仮性菌糸の侵入がみられた. さらに, 回腸パイエル板に酵母様真菌を伴う上皮の剝離及び炎症並び

表1 血液検査成績

| 検査項目 (単位)                         | 正常値*              | 本症例    |
|-----------------------------------|-------------------|--------|
| RBC ( $\times 10^6/\mu\text{l}$ ) | 8.86 $\pm$ 0.68   | 9.62   |
| Ht (%)                            | 35.3 $\pm$ 3      | 34     |
| WBC ( $\times 10^3/\mu\text{l}$ ) | 8.65 $\pm$ 1.69   | 24.8   |
| 桿状核好中球 (/μl)                      | 10 $\pm$ 30       | 6,448  |
| 分葉核好中球 (/μl)                      | 2,920 $\pm$ 1,140 | 14,632 |
| リンパ球 (/μl)                        | 5,050 $\pm$ 800   | 2,976  |
| 単球 (/μl)                          | 620 $\pm$ 330     | 744    |
| 好酸球 (/μl)                         | 20 $\pm$ 40       | 0      |
| 好塩基球 (/μl)                        | 0.02 $\pm$ 0.04   | 0      |
| BUN (mg/dl)                       | 7.37~15.8         | 16.3   |
| TP (g/dl)                         | 5.235~6.561       | 4.2    |
| Alb (g/dl)                        | 2.623~3.378       | 2.1    |
| T-Cho (mg/dl)                     | 70.3~151.7        | 67     |
| TG (mg/dl)                        | 12.9~43.07        | 9      |
| 乳酸 (mmol/l)                       |                   |        |
| D-乳酸                              | 1.1 $\pm$ 1.4     | 7.0    |
| L-乳酸                              | 1.5 $\pm$ 0.9     | 0.5    |
| IgG (mg/ml)                       | $\geq$ 20         | 2.8    |

\*引用文献 [22-25]

表2 第一胃内容検査成績

| 項目            | 正常第一胃内容*1     | 本症例     |
|---------------|---------------|---------|
| 色調            | 淡褐色           | 灰色      |
| 臭い            | カビ臭または腐敗臭     | 腐敗酸臭    |
| 性状            | 水様            | 泥状      |
| pH            | 6.5~7.5       | 3.64    |
| 乳酸濃度 (mmol/l) |               | 35.13*2 |
| D-乳酸          | 2.5 $\pm$ 2.7 |         |
| L-乳酸          | 1.9 $\pm$ 4.3 |         |

\*1 引用文献 [24, 26]

\*2 総乳酸値

に回盲弁に酵母様真菌を伴う粘膜下組織の壊死が認められた。第一胃及び直腸の内容から真菌が分離され、同菌の生化学的性状検査及び分子生物学的解析により、*P. kudriavzevii* と同定された。得られた成績から、本症例を *P. kudriavzevii* による消化管真菌症と診断した。

*C. perfringens* A型は健康な動物の消化管内に生息するが、第一胃にミルクが貯留した場合には過剰に増殖し、毒素を産生して第四胃炎や壊死性腸炎を引き起こす [27]。本症例では、食道及び前胃の変性した粘膜上皮内にグラム陽性菌が認められ、第一胃、空腸及び直腸の内容並びに腸間膜リンパ節から *C. perfringens* A型が分離された。しかし、同菌感染症の特徴である第四胃炎及び壊死性腸炎はみられなかった。同菌は第一胃への代用乳の流入により増殖したものの、病変を形成するまでの毒素産生には至らなかったと考えられた。

大多数の *Candida* 属菌の酵母の形態は、球形や卵球形であるが、*P. kudriavzevii* の酵母は大きく、“long grain rice” と形容される [28]。本症例では、ラクト

表3 分離株の薬剤感受性

| 薬剤        | MIC ( $\mu\text{g/ml}$ ) |                                 | MIC ブレイク*1,*2<br>ポイント ( $\mu\text{g/ml}$ ) |     |          |
|-----------|--------------------------|---------------------------------|--|-----|----------|
|           | 本症例<br>分離株               | <i>C. krusei</i> *1<br>ATCC6258 | CLSI M60 Ed2<br>S I R                      |     |          |
| ミカファンギン   | 0.12                     | 0.12~0.5                        | $\leq$ 0.25                                | 0.5 | $\geq$ 1 |
| カスポファンギン  | 1                        | 0.12~1                          | $\leq$ 0.25                                | 0.5 | $\geq$ 1 |
| アムホテリシン B | 1                        | 0.25~2                          |  |     |          |
| フルシトシン    | 8                        | 4~16                            |  |     |          |
| フルコナゾール   | 32                       | 16~64                           |  |     |          |
| イトラコナゾール  | 0.5                      | 0.12~0.5                        |  |     |          |
| ボリコナゾール   | 0.5                      |                                 | $\leq$ 0.5                                 | 1   | $\geq$ 2 |
| ミコナゾール    | 2                        |                                 |  |     |          |

\*1 CLSI M60 Ed2

\*2 アムホテリシン B, フルシトシン, フルコナゾール, イトラコナゾール及びミカファンギンについて MIC ブレイクポイントは設定されていない。

フェノール標本の鏡検により楕円形酵母と仮性菌糸を形成した真菌が確認されている。組織内には、球形から卵球形の酵母と仮性菌糸も多く認められたが、形態から真菌種を同定することは不可能であった。また今回、免疫組織化学的検査に使用した抗 *C. albicans* 家兎ポリクローナル抗体は *C. albicans* 以外の酵母様真菌と交叉反応を示す場合がある。本症例では、分離された真菌の生化学的性状検査及び分子生物学的解析により同定した。今回の分離株は、マルトースを利用するという性状が *P. kudriavzevii* の標準株と異なっていたことから、多種に及ぶ *Candida* 属真菌の正確な同定には分子生物学的解析が重要である [5] ことが再確認された。

第一胃内における高濃度の乳酸は、pH 低下による正常微生物叢の死滅及び粘膜の損傷を引き起こし、酸性環境を好む *Mucor* 属, *Rhizopus* 属及び *Absidia* 属等による真菌性胃炎を招く場合がある [6]。 *P. kudriavzevii* は低 pH 条件下での増殖能力が知られ、pH2 の酸性環境にも耐える [28]。哺乳欲低下及び下痢を呈した本症例では、抗菌剤による治療と高濃度代用乳の強制投与が行われていた。剖検時に、第一胃内容の pH 低下及び乳酸濃度の著しい上昇が認められたため、本症例は第一胃内の異常発酵による乳酸アシドーシスと考えられた。また、カテーテルにより強制投与された代用乳が第一胃内に流入及び貯留したと推察された。本症例では、乳酸アシドーシスと広域抗菌薬投与による正常微生物叢の死滅、それらに伴う菌交代症により *P. kudriavzevii* が優占種となり、さらに第一胃粘膜の変性が本菌の組織内侵入を助長したと考えられた。腸管内では腸内細菌叢が *C. albicans* 感染に対して拮抗的に作用しているが、抗生物質の不適切な使用により腸内細菌が死滅すると *C. albicans* は腸粘膜にコロニーを形成し、腸粘膜を破壊して組織内に侵入する [29]。本症例では回腸末端及び

回盲部に酵母様真菌を伴う病変の形成が認められ、直腸内容から *P. kudriavzevii* が分離された。ルーメンアシドーシスによる *P. kudriavzevii* の増数及び抗生物質の投与による腸管細菌叢の減数が回腸末端及び回盲部の病変形成に関与したことが推察された。*Candida* 属に対する生体防御は好中球、マクロファージ及び樹状細胞が中心となる [30]。また、免疫グロブリンは、*Candida* 属真菌の付着阻止や酵母から仮性菌糸型への形態変化を阻害し [31]、T細胞はサイトカイン放出により好中球及びマクロファージの抗真菌反応を増強する [30]。胸腺は、出生時の100~200gから、生後7~8週齢にかけて約1,000gにまで発育する [32] が、24日齢時の本症例の胸腺は56gであり、病理組織学的成績から低形成と考えられた。本症例は胸腺低形成、低免疫グロブリン血症及び低栄養から低免疫状態であったことが示唆され、*P. kudriavzevii* の組織内侵入及び消化管真菌症の発症を促したことが推察された。

人のカンジダ症主要原因菌 *C. albicans* に対する第一選択薬は FLCZ であるが、*P. kudriavzevii* は FLCZ に自然耐性を示す [28]。本症例分離株は FLCZ に対し 32  $\mu\text{g/ml}$  という MIC を示した。この値は *P. kudriavzevii* の FLCZ に対する MIC としては標準的である。その一方、*C. albicans* に対する FLCZ のブレイクポイントは  $\geq 8\mu\text{g/ml}$  であり、*Candida* 属は菌種によって薬剤感受性パターンが異なる (CLSI M60 Ed2)。家畜に抗真菌薬が用いられることはまれであり、本症例も生前に消化管真菌症と診断されていないが、原因菌種の同定は薬剤感受性の推測のために有用である。

今回、*P. kudriavzevii* による子牛の消化管真菌症が初めて確認された。発症には代用乳のカテーテル投与を要因とするルーメンアシドーシスが主要な役割を果たし、広域抗真菌薬投与及び免疫機能の低下が関与したまれな症例であった。菌種の同定には、病理組織学的検査とあわせて生化学的性状検査及び分子生物学的解析が必要であった。

## 引用文献

- [1] Seyedmousavi S, Bosco SMG, de Hoog S, Ebel F, Elad D, Gomes RR, Jacobsen ID, Jensen HE, Martel A, Mignon B, Pasmans F, Piecková E, Rodrigues AM, Singh K, Vicente VA, Wibbelt G, Wiederhold NP, Guillot J : Fungal infections in animals: a patchwork of different situations, *Med Mycol*, 56, 165-187 (2018)
- [2] 遠藤力也 : *Candida* 属とは何か? —命名法改訂がもたらす酵母学名の再編—, *日本微生物資源学会誌*, 30, 169-175 (2014)
- [3] Borman AM, Johnson EM : Name changes for fungi of medical importance, 2018 to 2019, *J Clin Microbiol*, 59, e01811-20 (2021), (online), (DOI: 10.1128/JCM.01811-20), (accessed 2021-03-25)
- [4] 瀧澤光華, 水野剛志, 中原真琴, 松浦敏幸, 今井直人, Tilusha Manchanayake, 花房泰子, 芝原友幸 : *Candida albicans* による子牛の真菌性前胃炎, *日獣会誌*, 70, 219-223 (2017)
- [5] Wada Y, Nakaoka Y, Matsui T, Ikeda T : Candidiasis caused by *Candida glabrata* in the forestomachs of a calf, *J Comp Pathol*, 111, 315-319 (1994)
- [6] Gelberg HB : Alimentary system and the peritoneum, omentum, mesentery, and peritoneal cavity, *Pathologic Basis of Veterinary Disease*, Zachary JF eds, 6th ed, 393-394, Elsevier, Missouri (2017)
- [7] Uzal FA, Plattner BL, Hostetter JM : Alimentary system, *Pathology of domestic animals*, Maxie MG eds, 6th ed, 2, 202, Elsevier, Missouri (2015)
- [8] Garry F, McConnel C : Diseases of the alimentary tract, *Large Animal Internal Medicine*, Smith BP, et al eds, 6th ed, 878, Elsevier, Missouri (2020)
- [9] 佐藤 繁 : 哺乳期の生理と管理, *新しい子牛の科学*, 家畜感染症学会編, 167-168, 緑書房, 東京 (2021)
- [10] Kurtzman CP : *Pichia* E. C. Hansen (1904), *The Yeasts, a taxonomic study*, Kurtzman CP, et al eds, 5th ed, 696-697, Elsevier, New York (2011)
- [11] Angebault C, Djossou F, Abélanet S, Permal E, Soltana MB, Diancourt L, Bouchier C, Woerther PL, Catzeflis F, Andremont A, D'Enfert C, Bournoux ME : *Candida albicans* is not always the preferential yeast colonizing humans: a study in Wayampi Amerindians, *J Infect Dis*, 208, 1705-1716 (2013)
- [12] Lund A : Yeasts and moulds in the bovine rumen, *J Gen Microbiol*, 81, 453-462 (1974)
- [13] Hayashi T, Sugita T, Hata E, Katsuda K, Zhang E, Kiku Y, Sugawara K, Ozawa T, Matsubara T, Ando T, Obayashi T, Ito T, Yabusaki T, Kudo K, Yamamoto H, Koiwa M, Oshida T, Tagawa Y, Kawai K : Molecular-based identification of yeasts isolated from bovine clinical mastitis in Japan, *J Vet Med Sci*, 75, 387-390 (2013)
- [14] Kano R, Konishi K, Nakata K, Sano K, Komatsu S, Nomura M, Okuzumi K, Hasegawa A : Isolation of *Candida krusei* from a case of bovine bronchopneumonia in a one-year-old heifer, *Vet Rec*, 148, 636 (2001)
- [15] Hanafusa Y, Hirano Y, Watabe H, Hosaka K, Ikezawa M, Shibahara T : First isolation of *Schizophyllum commune* in a harbor seal (*Phoca vitulina*), *Med Mycol*, 54, 492-499 (2016)
- [16] Barker SB, Summerson WH : The colorimetric determination of lactic acid in biological material, *J Biol Chem*, 138, 535-554 (1941)
- [17] Baums CG, Schotte U, Amtsberg G, Goethe R : Diagnostic multiplex PCR for toxin genotyping of *Clostridium perfringens* isolates, *Vet Microbiol*, 100, 11-16 (2004)
- [18] White TJ, Burns T, Lee S, Taylor J : Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics, *PCR Protocols*, Innis MA, et al eds, 315-322, Academic Press, New York (1990)
- [19] Rehner SA, Samuels GJ : Taxonomy and phylogeny

- of *Gliocladium* analyzed from nuclear large subunit ribosomal DNA sequences, *Mycol Res*, 98, 625-634 (1994)
- [20] Vilgalys R, Hester M : Rapid genetic identification and mapping of enzymatically amplified ribosomal DNA from several *Cryptococcus* species, *J Bacteriol*, 172, 4238-4246 (1990)
- [21] Goto Y, Yaegashi G, Fukunari K, Suzuki T : Design of a multiplex quantitative reverse transcription-PCR system to simultaneously detect 16 pathogens associated with bovine respiratory and enteric diseases, *J Appl Microbiol*, 129, 832-847 (2020)
- [22] 水谷 尚 : 付録①各種血液検査, 子牛の医学, 家畜感染症学会編, 441-453, 緑書房, 東京 (2014)
- [23] Kaneko JJ : 付録Ⅶ 大動物の血液成分の正常値<sup>a</sup>, 獣医臨床生化学, 久保修一郎他監訳, 第四版, 884-888, 近代出版, 東京 (1991)
- [24] Grude T, Lorenz I, Rademacher G, Gentile A, Klee W : Levels of D- and L-lactate in rumen liquid, blood and urine in calves with and without evidence of ruminal drinking, *American Association of Bovine Practitioners*, 32, 213-214 (1999)
- [25] 新盛英子, 滄木孝弘, 石井三都男 : 生後7日齢の子牛における血清 IgG および TP 濃度を用いた受動免疫移行不全の診断, 産業動物臨床医誌, 4, 1-7 (2013)
- [26] 片本 宏 : 消化器疾患, 子牛の医学, 家畜感染症学会編, 223-224, 緑書房, 東京 (2014)
- [27] Goossens E, Valgaeren BR, Pardon B, Haesebrouck F, Ducatelle R, Deprez PR, Immerseel FV : Rethinking the role of alpha toxin in *Clostridium perfringens*-associated enteric diseases: a review on bovine necrohaemorrhagic enteritis, *Vet Res*, 48, 9 (2017), (online), (DOI: 10.1186/s13567-017-0413-x), (accessed 2021-03-25)
- [28] Jamiu AT, Albertyn J, Sebolai OM, Pohl CH : Update on *Candida krusei*, a potential multidrug-resistant pathogen, *Med Mycol*, 59, 14-30 (2021)
- [29] Yan L, Yang C, Tang J : Disruption of the intestinal mucosal barrier in *Candida albicans* infections, *Microbiol Res*, 168, 389-395 (2013)
- [30] Whibley N, Gaffen SL : Beyond *Candida albicans*: mechanisms of immunity to non-*albicans* *Candida* species, *Cytokine*, 76, 42-52 (2015)
- [31] Rodier MH, Imbert C, Kauffmann-Lacroix C, Danialt G, Jacquemin JL : Immunoglobulins G could prevent adherence of *Candida albicans* to polystyrene and extracellular matrix components, *J Med Microbiol*, 52, 373-377 (2003)
- [32] 小形芳美, 大塚浩通 : 新生子期の生理と管理, 新しい子牛の科学, 家畜感染症学会編, 123-124, 緑書房, 東京 (2021)

### Alimentary Mycosis Caused by *Pichia kudriavzevii* Associated with Rumen Acidosis in a Calf

Ryosuke OTAKE<sup>1)†</sup>, Noriko SAWADA<sup>1)</sup>, Ayumi KIZAKI<sup>1)</sup>, Chie TOZUKA<sup>1)</sup>, Yasuko HANAFUSA<sup>2)</sup> and Tomoyuki SHIBAHARA<sup>2),3)</sup>

1) *Iwate Prefecture Central Livestock Hygiene Service Center, 390-5 Sunakomi, Takizawa, 020-0605, Japan*

2) *National Institute of Animal Health, National Agriculture and Food Research Organization, 3-1-5 Kannondai, Tsukuba, 305-0856, Japan*

3) *Graduate School of Life and Environmental Sciences, Osaka Prefecture University, 1-58 Rinku-orai Kita, Izumisano, 598-8531, Japan*

#### SUMMARY

A 24-day-old Japanese Black calf reared at a farm in Iwate Prefecture presented diarrhea and anorexia and was euthanized due to a poor prognosis. A necropsy revealed gray muddy content with a putrid acid odor in the forestomach and abomasum. Histologically, degeneration, necrosis, and parakeratosis of epithelial cells; neutrophils infiltration and hemorrhages were identified on the thickened mucosa of the esophagus and forestomach. Numerous yeast-like fungi and pseudohyphae were observed in the lesions. The fungus was identified as *Pichia kudriavzevii* based on the results of biochemical tests, molecular biological analysis of isolates, and immunohistochemical staining of the lesions. In addition, decrease in the pH of ruminal contents and increase in lactic acid level were confirmed. This case was diagnosed as mycosis caused by *P. kudriavzevii* in the alimentary tract of the calf. The involvement of rumen acidosis was suspected as a contributing factor. This is the first report that demonstrates alimentary mycosis caused by *P. kudriavzevii* in cattle.

— Key words : calf, candidiasis, *Pichia kudriavzevii*.

† Correspondence to : Ryosuke OTAKE (Iwate Prefecture Central Livestock Hygiene Service Center)

390-5 Sunakomi, Takizawa, 020-0605, Japan

TEL 019-688-4111 FAX 019-688-4012 E-mail : 0524.o.ryosuke@pref.iwate.jp

— J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 74, 781 ~ 787 (2021)