

令和 2 年 6 月 6 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08110

研究課題名(和文)乳房炎に対するメタゲノム解析を基にした防除法の確立

研究課題名(英文)Prevention for bovine protothecal mastitis by Next-generation sequencing analysis

研究代表者

加納 隼(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) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：北海道ひがし農済および愛知農済下のプロトテカ乳房炎および非乳房炎から乳汁および糞便をそれぞれ採取し、細菌の16Sリボソーム領域を特異的にPCRにて増幅後、それぞれのライブラリーに対する次世代シーケンサー解析を行った。感染牛乳汁からはシアノバクテリア(*Calothrix desertica*)の遺伝子が優位に検出された。一方糞便からは、感染牛および非感染牛とも同様の細菌叢を呈していることが示唆された。プロトテカ乳房炎の新規防除法の候補として、アゾール系抗真菌剤を用いて乳房炎由来のプロトテカに対する薬剤感受性試験を行ったところ、ラブコナゾールが最も抗藻効果が強かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

国内におけるプロトテカ乳房炎乳汁と非乳房炎では、シアノバクテリアが優位に乳房炎乳汁中から検出されることが初めて確認された。藻類のプロトテカ乳房炎は、プロトテカが乳房内で異常に増殖して、乳房炎を引き起こしているだけでなく、乳房内微生物環境まで変化させていることを明らかにしたことは、本研究目的で予想された乳房炎解明への新たな知見となると考えている。またプロトテカ乳房炎の新規防除法の候補として、2018年に国内で上市されたアゾール系薬剤のラブコナゾールを今後のプロトテカ乳房炎、さらに人の感染症に対する治療薬としても期待される。このように治療法についても、研究目的を十分上回る結果が得られた。

研究成果の概要(英文)：The aim of the present study was to evaluate the bacterial flora in the udder and intestinal environments in cows with and without protothecal mastitis. We used next-generation sequencing (NGS) analysis to identify 16S rRNA genes from bacterial flora present in milk and feces samples from protothecal mastitic and healthy dairy cows in the Aichi and Hokkaido regions of Japan. *Calothrix desertica* (a cyanobacterium) showed higher prevalence in milk from cows with protothecal mastitis than in that from healthy cows.

Ravuconazole (RVZ) is a new available human azole drug in Japan since 2018 and broad-spectrum antifungal agent. In the present study, the in vitro susceptibility of clinical and environmental isolates of *P. wickerhamii*, *P. zopfii* and *P. blaschkeae* to itraconazole, voriconazole, posaconazole and RVZ. RVZ was more potent than the other azoles against *Protheca* species and has considerable potential for use as a therapeutic agent for human and animal protothecosis.

研究分野：獣医真菌学、臨床獣医学

キーワード：プロトテカ乳房炎 メタゲノム解析 乳汁 シアノバクテリア

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

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、採算が取れず酪農家が減少していることが指摘されている。牛乳は様々な食品の原料にも使用され、また生産する乳牛はやがて食肉として消費される。そのため酪農業の衰退が、国内の様々な食品事業の衰退へつながってしまう。また国民に安全で高品質な動物性脂質・蛋白性食品の安定供給を続けるためにも、国内における生乳生産は必要である。

生乳不足の主要な原因の一つである乳房炎は、基本的には感染症であり、その発症には牛の免疫機能と正常微生物叢の変化が深くかかわっていると考えられる。乳房炎によって、乳量の減少、品質悪化による乳価の低下または出荷停止、治療費、牛の淘汰、出荷停止中でも毎日2回搾乳は必要で、しかも飼料は与え続けなくてはならない。など酪農家へ様々な経済的な損失を招く疾患である。

このため乳房炎によって、北海道だけでも年間約100億円、酪農家1件あたり約149万円とする膨大な経済的損失が試算されている(農研機構 HP : <https://www.naro.affrc.go.jp/project/results/laboratory/niah/2006/niah06-32.html>)。したがって乳房炎防除は生乳生産には不可欠であり、その対策が早急に必要である。

これまで乳房炎の防除法として、治療法の改良、飼育環境の改善、搾乳前後の消毒、潜在性乳房炎の検出など多くの検討が行われてきた。しかしながら乳房炎の発生機序は、不明なことが多く、防除法も限界に来ている。

2. 研究の目的

藻類の *Prototheca zopfii* 感染プロトテカ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へと発展してしまう。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。

本感染原因は、国内外で調査されているが未だ解明されておらず、そのため有効な予防法が確立されていない。

我々の研究グループにおいても藻類によるプロトテカ乳房炎を中心に、乳房炎発生農場における分子疫学調査および防除法の研究を続けてきた。研究を進めてきて明らかとなってきたのは、今まで考えられてきた単一の病原体感染による発症ではなく、乳房内の微生物叢のバランスも深くかかわっていることが分かってきた。特にプロトテカ乳房炎を含めた難治性乳房炎では、その傾向が著しいようである。そのため、正常乳房および乳房炎における微生物叢の解析が必要になってきた。そこで、乳房炎に対する防除法を発展させるために、今回「牛乳房炎に対するメタゲノム解析を基にした防除法の確立」を計画した。近年開発された次世代シーケンサーは、メタゲノム解析に必須であり、人の腸内細菌叢、皮膚・粘膜の微生物叢の解析に威力を発揮して、多くの新たな知見をもたらしている。

3. 研究の方法

(1)北海道のプロトテカ乳房炎発症酪農家において、2017年に乳牛(約300頭)の臨床診断を行うとともに、乳房炎の診断基準である、乳汁の体細胞数、細菌数、培養検査を実施し、正常、潜在性乳房炎、臨床型乳房炎の診断を行うとともに、既報にしたがって乳汁からプロトテカの分

離培養を行い、遺伝子型の同定を行った。その結果、正常乳汁(7頭分)およびプロトテカ乳房炎乳汁(7頭分)を採取した。

これらプロトテカ陽性乳汁および陰性乳汁(9頭)から、MORA-EXTRACT kit (Kyokuto Pharmaceutical Industrial Co., Ltd., Tokyo, Japan)を用いてDNAを抽出し、細菌のリボゾーム16SのV3-4領域を特異的に増幅するプライマーは、イルミナ社(Illumina, Inc., San Diego, CA)が推奨するS-D-Bact-0341-b-S-17(5'-TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTACGGN GGCWGCAG-3')およびS-D-Bact-0907-a-A-20(5'-GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAG ACAGGACTACHVGGGTATCTAATCC-3)を用いてPCRを行った。増幅したPCR産物を電気泳動で確認後、NEBNext Ultra II DNA library prep kit (New England BioLabs, Inc., Ipswich, MA)を用いてライブラリー化した。これをイルミナ社のMiSeq™ Systemを用いて次世代シーケンサー解析を行った。

各サンプルについて10,000~15,000遺伝子のシーケンスを行い、OTU (Operational Taxonomic Unit)ソフトウェアによる解析遺伝子のクラスタリング処理後、Metagenom@Kin (World Fusion US, Inc.) ソフトウェアにて細菌の相同性解析を行った。

微生物のリボゾーム領域による微生物叢の次世代シーケンサー解析については、イルミナ社HP: http://www.illumina.com/documents/pdf/2014_techsupport_session3.pdf に詳細が掲示されている。

(2) 愛知県下のプロトテカ乳房炎発症酪農家(約60頭)において、2018年に上述と同様にプロトテカ乳房炎の診断および乳汁からの分離・同定を行った。その結果、正常乳汁(9頭分)およびプロトテカ乳房炎乳汁(4頭分)を採取した。また同牛の直腸から糞便を採材し、プロトテカの分離・同定も実施した。乳汁・糞便から上述の方法で遺伝子抽出後、次世代シーケンス解析を行った。

(3)プロトテカ乳房炎乳汁分離 *Prototheca zopfii* genotype 2(10株)およびその標準株(SAG2021^T)、牛舎環境分離 *Prototheca zopfii* genotype 1(10株)およびその標準株(SAG2063^T)、プロトテカ乳房炎乳汁分離 *Prototheca blaskeae*(1株)の計23株について、Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI) M27-A3のマイクロダイリュション法によるアゾール系抗真菌剤であるイトラコナゾール(ITZ)、ポリコナゾール(VRZ)、ポサコナゾール(PCZ)、ラブコナゾール(RVZ)の感受性試験を行った。

4. 研究成果

(1)北海道のプロトテカ感染乳汁中に多い細菌として、*Streptococcus* spp., *Pseudomonas* spp. and *Sphingomonas* spp., *Caulobacter seignis*, *Macrocooccus caseolyticus*, *Methylobacterium tarhaniae* および *Sphingomonas leidyi* が検出され、特に陰性乳汁と比較してシアノバクテリアの *Calothrix desertica* が顕著に検出された(図1)。

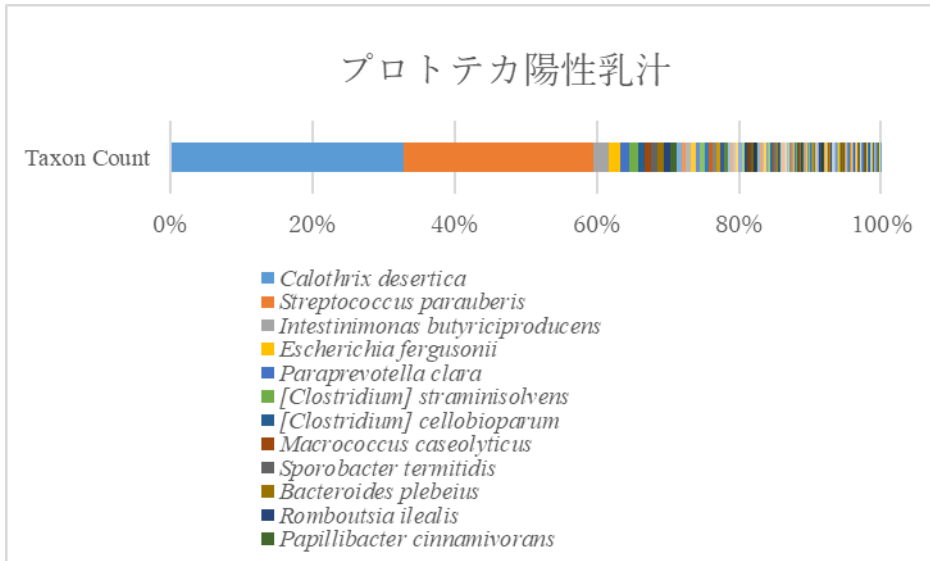


図1 プロトテカ陽性乳汁における細菌叢

一方、陰性乳汁からは牛の乳汁から分離報告があり、一部陽性乳汁からも分離された細菌が認められた。また *Calothrix desertica* は、検出されなかった。このことからプロトテカ感染乳汁の細菌叢は、非病原性でありながらシアノバクテリアなど藍藻類も増加していることが判明した。何らかの原因によって、乳房内菌叢は大きく変化し、乳プロトテカなど藻類も増加しやすい環境になっていると考えられた。今後、他のプロトテカ感染農家での調査およびこの乳房内環境の変化の解明も必要であると考えられた。

(2) 愛知県下のプロトテカ乳房炎乳汁から特異的に検出された細菌の遺伝子は、*Calothrix desertica*, *Corynebacterium simulans*, *Corynebacterium striatum*, *Empedobacter falsenii*, および *Rothia endophytica* が検出された(図2)。特に北海道と同様、シアノバクテリア(*Calothrix desertica*)の遺伝子が、優位に検出されることが確認された。一方、糞便からは、感染牛および非感染牛とも同様の細菌叢を呈していることが示唆された。

Milk samples	healthy cows
<p>protothecal mastitis</p> <p><i>Calothrix desertica</i></p> <p><i>Corynebacterium simulans</i></p> <p><i>Corynebacterium striatum</i></p> <p><i>Empedobacter falsenii</i></p> <p><i>Rothia endophytica</i></p>	<p><i>Atopostipes suicloacalis</i></p> <p><i>Alkalibacterium psychrotolerans</i></p> <p><i>Bacteroides plebeius</i></p> <p><i>Brachybacterium faecium</i></p> <p><i>Brevibacterium senegalense</i></p> <p><i>Brevundimonas abyssalis</i></p> <p><i>Clostridium ghonii</i></p> <p><i>Corynebacterium bovis</i></p> <p><i>Corynebacterium maris</i></p> <p><i>Enterococcus gallinarum</i></p> <p><i>Eubacterium tenue</i></p> <p><i>Facklamia ignava</i></p> <p><i>Facklamia tabacinensis</i></p> <p><i>Fastidiosipilla sanguinis</i></p> <p><i>Intestinimonas butyriciproducens</i></p> <p><i>Micrococcus luteus</i></p> <p><i>Methylobacterium extorquens</i></p> <p><i>Oligella ureolytica</i></p> <p><i>Propionibacterium acnes</i></p> <p><i>Sphingomonas roseiflava</i></p> <p><i>Staphylococcus saprophyticus</i></p> <p><i>Weissella koreensis</i></p>

図2 愛知県下におけるプロトテカ乳房炎乳汁および正常乳汁中の細菌叢

(3) 各アゾール系抗真菌剤に対する分離株の最少発育阻止濃度(MIC)は、11株の *P.zofii* genotype 2 において ITZ: 4->32 mg/L, VRZ: 0.25-4 mg/L, PCZ: 0.03-4 mg/L, RVZ: 0.03-0.25 mg/L であった。11株の *P.zofii* genotype 1 においては、ITZ: 0.25->32 mg/L, VRZ: 0.25-4 mg/L, PCZ: 0.03-0.25 mg/L,

RVZ: 0.03 mg/Lであった(表-1)。1株の *P.blaskeae* においては、ITZ: >32 mg/L, VRZ: 2 mg/L, PCZ: 0.03 mg/L, RVZ: 0.03 mg/L であった(表-1)。以上の結果から RVZ は、最も抗プロトテカ効果が強く、治療薬として有効であることが示唆された。

表-1 アゾール系抗真菌剤に対する最少阻止濃度 MICs (mg/L)

Species	Strain number	Origin (genotype)	MICs (mg/L)			
			RVZ ^a	ITZ ^b	VRZ ^c	PCZ ^d
<i>P. zopfii</i>	SAG2063 ^T	type strain of (GT1)	0.03	1.5	1	0.25
<i>P. zopfii</i>	NUBS ^e 19004	environment (GT1)	0.03	1	0.5	0.125
<i>P. zopfii</i>	I1	environment (GT1)	0.03	2	0.25	0.06
<i>P. zopfii</i>	I3	environment (GT1)	0.03	0.25	0.25	0.03
<i>P. zopfii</i>	W3	environment (GT1)	0.03	4	4	0.125
<i>P. zopfii</i>	W20	environment (GT1)	0.03	4	2	0.03
<i>P. zopfii</i>	S2	environment (GT1)	0.03	32	2	0.06
<i>P. zopfii</i>	S3	environment (GT1)	0.03	8	4	0.06
<i>P. zopfii</i>	S29	environment (GT1)	0.03	>32	4	0.25
<i>P. zopfii</i>	S36	environment (GT1)	0.03	16	4	0.25
<i>P. zopfii</i>	S42	environment (GT1)	0.03	8	2	0.25
<i>P. zopfii</i>	SAG2021 ^T	type strain of GT2	0.125	>32	2	4
<i>P. zopfii</i>	A7	bovine protothecal mastitis (GT2)	0.125	>32	4	0.125
<i>P. zopfii</i>	A8	bovine protothecal mastitis (GT2)	0.03	4	0.5	0.25
<i>P. zopfii</i>	A9	bovine protothecal mastitis (GT2)	0.03	>32	0.25	1
<i>P. zopfii</i>	A10	bovine protothecal mastitis (GT2)	0.03	>32	0.25	0.5
<i>P. zopfii</i>	A11	bovine protothecal mastitis (GT2)	0.25	>32	4	0.25
<i>P. zopfii</i>	A13	bovine protothecal mastitis (GT2)	0.125	>32	2	0.03
<i>P. zopfii</i>	A14	bovine protothecal mastitis (GT2)	0.03	>32	1	0.25
<i>P. zopfii</i>	A15	bovine protothecal mastitis (GT2)	0.0625	>32	0.5	0.25
<i>P. zopfii</i>	A16	bovine protothecal mastitis (GT2)	0.03	8	4	0.5
<i>P. zopfii</i>	A17	bovine protothecal mastitis (GT2)	0.25	4	4	0.5
<i>P.blaskeae</i>	NUBS19005	bovine protothecal mastitis	0.03	32	2	0.03

^aRVZ: ravuconazole; ^bITZ: itraconazole; ^cVRZ: voriconazole; ^dPCZ: posaconazole;

^eNUBS: Nihon University College of Bioresource Sciences.

< 引用文献 >

Osumi T, Kishimoto Y, Kano R, Maruyama M, Onozaki M, Makimura K, Ito T, Matsubara K, Hasegawa A. *Prototheca zopfii* genotypes isolated from cow barns and bovine mastitis in Japan. *Vet. Microbiol.* 2008; 131: 419-423.

CLSI document M27-A3. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; approved standard 3rd ed. Clinical Laboratory Standards Institute. Philadelphia: Wayne, 2008.

Cantón E, Espinel-Ingroff A, Pemán J. Trends in antifungal susceptibility testing using CLSI reference and commercial methods. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2009; 7:107-119.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 5件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Kurumisawa T, Kano R, Nakamura Y, Hibana M, Ito T, Kamata H, Suzuki K.	4. 巻 80
2. 論文標題 Is bovine protothecal mastitis related to persistent infection in intestine?	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The Journal of veterinary Medical Science	6. 最初と最後の頁 950-952
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1292/jvms.17-0710	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Kano R, Kobayashi Y, Nishikawa A, Murata R, Itou T, Ito T, Suzuki K, Kamata H.	4. 巻 59
2. 論文標題 Next-generation Sequencing Analysis of Bacterial Flora in Bovine Prototheca Mastitic Milk	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Medical Mycology Journal	6. 最初と最後の頁 E41-E46.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3314/mmj.18-00004	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Miura A, Kurumisawa T, Kano R, Ito T, Suzuki K, Kamata H.	4. 巻 81
2. 論文標題 Next-generation sequencing analysis of bacterial flora in bovine protothecal mastitic milk and feces	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Next-generation sequencing analysis of bacterial flora in bovine protothecal mastitic milk and feces	6. 最初と最後の頁 1547-1551
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1292/jvms.18-0649	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Kano R.	4. 巻 -
2. 論文標題 Emergence of Fungal-Like Organisms: Prototheca	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Mycopathologia	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11046-019-00365-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Miura A, Kano R, Ito T, Suzuki K, Kamata H.	4. 巻 -
2. 論文標題 In vitro algacidal effect of itraconazole and ravuconazole on Prototheca species	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Medical Mycology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/mmy/myz119	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計1件(うち招待講演 1件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 加納 隼
2. 発表標題 プロトテカ症-微細藻類による感染
3. 学会等名 第61回日本医真菌学会総会(招待講演)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

ISHAM Medical Phycology http://medicalphycology.org/ ISHAM Medical Phycology http://medicalphycology.org/
--

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	鈴木 一由 (SUZUKI Kazuyuki) (30339296)	酪農学園大学・獣医学群・教授 (30109)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	伊藤 隆晶 (ITO Takaaki)	NOSAI 愛知	