

令和 6 年 5 月 23 日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05923

研究課題名（和文）牛趾乳頭腫症病変内のトレポネーマの病原性をサポートする細菌群の探索と機能解明

研究課題名（英文）The growth-stimulating factor for *Treponema phagedenis* from bovine digital dermatitis lesions

研究代表者

谷口 喬子（岩田喬子）（Taniguchi, Takako）

宮崎大学・産業動物防疫リサーチセンター・研究員

研究者番号：50500097

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,800,000円

研究成果の概要（和文）：牛の趾乳頭腫症は、疼痛を伴う蹄の伝染性限局性皮膚炎である。病変内から検出される *Treponema phagedenis* は難培養性で、増殖速度が極めて遅いにも拘らず最も優勢に検出される。PDD病変部から分離された *Falsiporphyrromonas endometre* の培養上清は、*T. phagedenis* に対して増殖促進効果を示した。その培養上清からは高濃度の酪酸が検出され、酪酸の添加は *T. phagedenis* の増殖を促進した。これらの結果は、*T. phagedenis* と PDD病変部から分離された細菌との間に代謝相互作用があることを示唆している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

牛の趾乳頭腫症は、疼痛を伴う蹄の伝染性限局性皮膚炎である。罹患牛は疼痛を伴うため跛行を呈し、体重減少、泌乳量低下等が認められ、経済的損失の大きい疾患である。その病変からは多くの細菌が検出されており、複数の細菌による感染症であると考えられているが、その病原性や発症機序は不明である。本研究では、病変部に存在する最優性菌種の1つである *Treponema phagedenis* と、病変部から分離された細菌との間に代謝相互作用があることが示唆された。この結果は、今後、発生要因解明に繋がる新たな知見であると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Papillomatous Digital Dermatitis (PDD) is a bacterial infectious disease inflaming the skin of the hoof in dairy cattle. *Treponema phagedenis* is the most predominant bacterium in BDD lesions despite its fastidious requirements. Cell-free supernatant (CFS) of *Falsiporphyrromonas endometre*, *Porphyromonas levii*, and *Fusobacterium necrophorum* subsp. *funduliforme* predominantly isolated from PDD lesions had a growth-stimulating effect on *T. phagedenis*. Butyric acid was detected at high concentration in CFS of these three BDD-associated bacteria, and the growth of *T. phagedenis* was significantly promoted by butyric acid supplementation. These results suggest that there are metabolic interactions between *T. phagedenis* and PDD-associated bacteria.

研究分野：細菌学

キーワード：牛趾乳頭腫症 *Treponema phagedenis* Polymicrobial Infection 酪酸 代謝相互作用 牛胎児血清

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

牛の趾乳頭腫症 (Papillomatous Digital Dermatitis ; 以下 PDD と略す) は疼痛を伴う蹄の伝染性限局性皮膚炎である。その病変からは多くの細菌が検出されており、複数の細菌による感染症 (Polymicrobial Infection : 以下 PI) であると考えられているが、その病原性や発症機序は不明である。病変は進行度により様々なステージをたどるが、初期病変は赤変した扁平な潰瘍形成を、慢性化するにつれ乳頭腫状突起物の形成がみられる<sup>1)</sup>。罹患牛は疼痛を伴うため跛行を呈し、体重減少、泌乳量低下等が認められ、経済的損失の大きい疾患である<sup>2)</sup>。PDD の治療法として、病変部に対するリンコマイシンやオキシテトラサイクリン等の抗生物質の直接塗布が症状を緩和することが報告されており、PDD 治療に頻繁に使用されている<sup>3)</sup>。しかしながら、乳用牛においては、牛乳製品中の抗生物質残留問題があり、最近ではワサビやマスタードなどのアブラナ科から見つかった抗菌活性をもつ天然化合物 (イソチオシアニ酸アシル) を利用した治療も報告されているが、完全な治癒には至っていない<sup>4)</sup>。

PDD 病変の分子生物学的解析から、本症は、難培養性の *Treponema phagedenis* を主体とする PI であると考えられる<sup>5)</sup>。PI では、宿主の正常微生物叢が存在する中で起こっていることから、非病原細菌の関与を包含した病態解析も必要となる。本症に常に存在する最優性菌種の *T. phagedenis*、さらに *T. phagedenis* の他にも多数の細菌の関与が考えられるためコホの 4 原則が成立せず、その病原性と発症機序は不明である。PDD 感染の成立要因を明らかにするには、*T. phagedenis* だけでなく、その他の細菌がどのような役割を担ってその病態に関与しているのか、即ち、各細菌の病原因子を特定するとともに、細菌間のクロストレーキング、宿主免疫応答、および感染部位に存在する細菌叢との相互作用等について包括的に解明することが不可欠である。

## 2. 研究の目的

我々は、以前、*Treponema* 属菌が PDD 病変の重要な原因菌である可能性を示し、その際に PDD 病変から *T. phagedenis* を分離・同定することに成功した<sup>5)</sup>。しかし、*T. phagedenis* 単独での感染は必ず不成功に終わるため、PDD の病態は未だ不明である。PDD 病巣の細菌混合物を接種することで、動物モデルで病巣の誘導が可能であることが報告されている<sup>2,6)</sup>。PI では、複数の細菌種が互いに増殖を支援し合い、病原性に寄与していることが示唆される。そこで本研究では、PDD 病変部において *T. phagedenis* の増殖に影響を及ぼす可能性のある菌の探索、また、増殖刺激因子となりうる物質を検出・同定し、細菌群同士の相互作用からその発生要因を明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) PDD 病変からの微生物分離

*Treponema* 属菌以外の PDD に関与する病原細菌を分離するために、広島県の乳牛牧場から M2 期に属する PDD 病変 3 つを採取した。病変は、試料は滅菌皮膚生検パンチ (直径 6mm) を用いて採取し、氷上または 4℃ で保存し、48 時間以内に実験室に運んだ。これらを滅菌メスで小さな断片に切り分け、PDD 液体培地 (GAM broth (日水製薬株式会社) に 0.8% の Brain Heart Infusion broth (日水製薬株式会社)、0.8% の Brucella broth (Becton Dickinson and Company) を添加した培地) 1ml 中で均一化させた。その後、各懸濁液を 1.5 ml チューブに移し、10 倍段階希釈を行った。各懸濁液 100 μL を、PDD 寒天培地 (PDD 液体培地中の GAM broth を GAM 寒天培地 (日水製薬) にした培地) に塗布し、Aneropack (三菱ガス化学) により嫌気条件下で 37℃、96 時間培養を行った。その後、病変あたりの検出コロニー数が多い菌を優性菌種として 10 株選択し、分離コロニーを得た。

### (2) 16S rRNA シークエンス解析

上記の分離コロニーについて、16S rRNA 遺伝子 (V1~V9 可変領域、約 1,500 bp) を決定した。これらの配列は、National Center for Biotechnology Information のデータベースから類似性の検索を行い、99% 以上の類似度をもって配列の同一性を示すと判断した。

### (3) 細菌の培養上清の調製

PDD 病変から分離された 10 株を PDD 寒天培地プレート上で嫌気条件下、37℃ で 48 時間培養した。PDD 液体培地を用いて吸光度 550 nm (OD550) が 0.1 の菌懸濁液を調製し、嫌気条件下で 37℃、96 時間まで培養した。培養後、OD550 を測定した。また段階希釈し、PDD 寒天培地に塗布・培養後、生菌数を測定した。培養液は、14,000 rpm、4℃、30 分間遠心分離を行った。菌体上清を 0.20 μm のフィルター (アドバンテック東洋株式会社) で濾過し、PDD に関する病原細菌の菌体上清 (Cell free supernatant : CFS) とした。

### (4) 増殖促進効果試験

PDD 病変由来 *T. phagedenis* YG3903R 株を 10% 牛胎児血清 (Fetal bovine serum: 以下 FBS) 添加 PDD 寒天培地にて 37℃、嫌気条件下で 7 日間培養した。20% の FBS を添加した PDD 液体培地で約 10<sup>7</sup> cells/ml (OD550 = 0.1) の *T. phagedenis* 懸濁液を調製した。次に、96 ウェルマイクロプレート (AS ONE 株式会社) に、上記のようにして調製した *T. phagedenis* 懸濁液および CFS 100 μL を 50% v/v でそれぞれ添加し、37℃ で 72 時間、嫌気条件下で培養した。対照として、CFS の代わりに同量の PDD 液体培地を使用した。*T. phagedenis* の増殖は、分光光度計 (OD550) により測定した。

さらに、短鎖脂肪酸 (short-chain fatty acids: SCFA) の PDD 病変由来 *T. phagedenis* YG3903R 株および CH9 株に対する増殖促進効果を調べた。SCFA 溶液は、酪酸ナトリウム、プロピオン酸ナトリウム塩 (ナカライテスク)、イソ酪酸 (富士フィルム和光純薬) を PDD ブロスに 0.01-50 mM の濃度で溶解して調製した。各 SCFA 溶液に *T. phagedenis* YG3903R 株および CH9 株の懸濁液を接種し、同様に試験した。

#### (5) 短鎖脂肪酸の定量分析

CFS 中の SCFA (酪酸、イソ酪酸、プロピオン酸、クエン酸) の分析は、財団法人日本食品分析センター (JFRL) のプロトコールに従い、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いて実施した。*Falsiporphyromonas endometrii* HD36 株、*Porphyromonas levii* HS11-12 株、*Fusobacterium necrophorum* subsp. *funduliforme* HDF1 株、*Bacteroides pyogenes* HSB1 株を 96 時間培養して得た CFS サンプルについて分析を行った。

#### 4. 研究成果

今回、M2 期に属する PDD 病変 3 個から、病変あたりの検出コロニー数が多い菌を優性菌種として 10 株選択し、16S rRNA 遺伝子配列により同定した。黒色色素産生菌は *F. endometrii* と *P. levii* と同定された。白色の平坦なコロニーを形成する細菌は *F. necrophorum* subsp. *funduliforme*、白色で小さなコロニーを形成する細菌は、*Bacteroides pyogenes* と *Bacteroides heparinolyticus* と同定された。

96 時間培養後の PDD 関連細菌 10 株の CFS を用い、PDD から分離した *T. phagedenis* YG3903R 株の増殖促進効果を調べた (図 1)。増殖促進効果は、3 日間培養後の *T. phagedenis* の OD550 を測定することにより判定した。*F. endometrii* と *P. levii* の CFS は、*T. phagedenis* に対する増殖促進効果が確認された。*F. necrophorum* subsp. *funduliforme* は増殖促進効果を示したが、同属の *F. varium* は増殖促進効果を示さなかった。また、*B. pyogenes* と *B. heparinolyticus* の CFS は増殖促進効果を示さなかった。

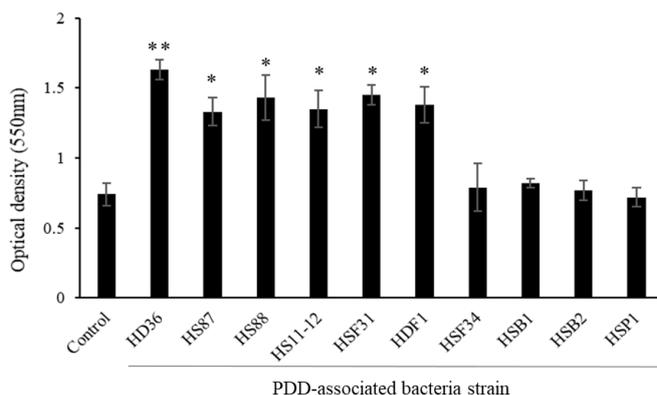


Figure 1. Effect of cell-free supernatants (CFSs) from predominantly isolated bacteria on the growth of *T. phagedenis*.

Stimulatory effects of CFSs on the growth of *T. phagedenis* strain YG3903R (■) were compared with BDD broth as control (□). The optical density was measured at OD<sub>550</sub> on three days of culture. Bacterial strains are indicated as HD36, HS87, HS88; *Falsiporphyromonas endometrii*, HS11-12; *Porphyromonas levii*, HSF31, HDF1; *Fusobacterium necrophorum*, HSF34; *Fusobacterium valium*, HSB1, HSB2; *Bacteroides pyogenes*, HSP1; *Prevotella heparinolytica*. Data are expressed as mean ± SEM (n=3); \*  $p < 0.05$  and \*\*  $p < 0.01$ .

経時的な増殖促進効果を調べるため、最も増殖促進効果の高かった *F. endometrii* HD36 株の懸濁液を調製して菌体増殖曲線を作成し、96 時間の培養中に間隔をおいて CFS を採取した。0 ~ 96 時間の 9 時点の CFS を添加し、*T. phagedenis* YG3903R 株の増殖に対する作用を調べた。図 2 に示すように、*F. endometrii* HD36 株の増殖は培養 36 時間で定常期に達した。*T. phagedenis* YG3903R 株に対する CFS の増殖促進効果は、定常期後期の 60 時間以降に認められ、培養 96 時間で最大となった。定常期に達した後に増殖促進効果が増大する現象は、同じく PI であるヒトの慢性歯周病菌でも観察されており、*Treponema denticola* と *Porphyromonas gingivalis* を共培養すると、定常状態に達した後に相互に増殖が促進され、この効果は代謝副産物によるものと報告されている<sup>7)</sup>。これらのことから、*T. phagedenis* の増殖も *F. endometrii* の代謝副産物によって促進されている可能性が示唆された。

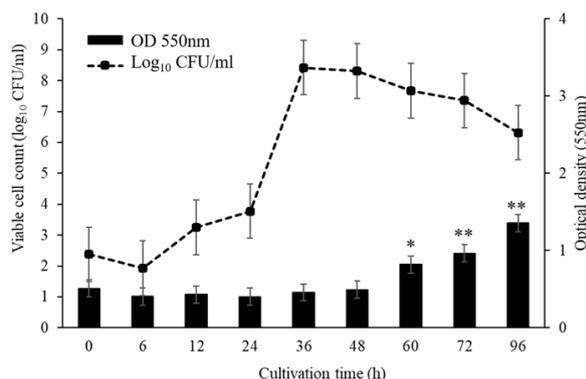


Figure 2. Kinetics of *F. endometrii* growth and the growth-promoting effect of its cell-free supernatant (CFS) on *T. phagedenis*.

*Falsiporphyromonas endometrii* strain HD36 was cultured continuously for 96 h. The standard growth curve based on the colony forming unit count log<sub>10</sub> CFU/ml is indicated (■). Samples of HD36 CFS were collected at 9-time points (0-96 h). The CFS growth-stimulating effect on *T. phagedenis* strain YG3903R was measured in terms of optical density at 550 nm (black bar). Data are expressed as mean ± SEM (n=3); \*  $p < 0.05$  and \*\*  $p < 0.01$ .

すでに、ヒトの慢性歯周病の病巣から分離した *Eubacterium nodatum* や *P. gingivalis* の CFS に含まれる熱安定性低分子物質が、主要病原菌である *T. denticola* の増殖を促進することや、*P. gingivalis* の増殖促進因子がイソ酪酸などの SCFA であることが報告されている<sup>7,8)</sup>。そこで、*T. phagedenis* の増殖促進効果を有する3株 (*F. endometrii*, *P. levii*, *F. necrophorum* subsp. *funduliforme*) の CFS と、有しない *B. pyogenes* の CFS の酪酸、イソ酪酸、クエン酸、プロピオン酸の4種類の SCFA を分析した。*T. phagedenis* に対して増殖促進作用を示す PDD 関連3菌種の CFS 中の酪酸濃度は、増殖促進作用を欠く *B. pyogenes* の CFS と比較して高かった。また、*F. endometrii* と *P. levii* の CFS からは、やや高濃度のイソ酪酸とプロピオン酸が検出されたが、クエン酸はすべての CFS で比較的低濃度に検出された (表1)。

そこで、酪酸、イソ酪酸、プロピオン酸について、*T. phagedenis* YG3903R 株と CH9 株に対する増殖促進効果を評価した。*T. phagedenis* YG3903R 株の増殖は、12.5mM の酪酸、CH9 株の増殖は 3.2mM と 12.5mM の酪酸によって優位に増殖が促進された。プロピオン酸およびイソ酪酸は両株に増殖促進効果を示さなかった。

Table 1. The concentration of PDD co-dominant bacterial short-chain fatty acid in CFS.

Bacteria	Strain	Short chain fatty acid (mM)			
		Butyric acid	Isobutyric acid	Propionic acid	Citric acid
<i>F. endometrii</i>	HD36	45.4	12.5	7.79	1.04
<i>P. levii</i>	HS11-12	38.6	10.21	7.08	0.52
<i>F. necrophorum</i> subsp. <i>funduliforme</i>	HDF1	49.94	1.13	2.83	0.52
<i>B. pyogenes</i>	HSB1	1.14	1.14	1.04	0.71

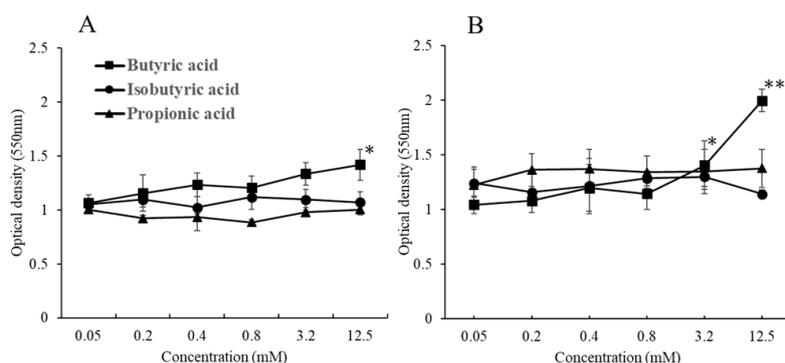


Figure 3. Growth-stimulating effects of short-chain fatty acid solutions. Stimulatory effects were determined by measuring the OD550 of *T. phagedenis* strain YG3903R (A) and CH9 (B) supplemented with butyric acid (■), isobutyric acid (●), and propionic acid (▲). Data are expressed as mean  $\pm$  SEM (n=3); \* p < 0.05 and \*\* p < 0.01.

酪酸は反芻動物の生理学および腸の健康に重要な役割を担っており、エネルギー的または栄養的な役割に加え、酪酸は細胞の分化や運動性を調節し、アポトーシスを誘導する細胞調節作用がある<sup>9,10)</sup>。*T. phagedenis* の代謝における酪酸の役割は不明であるが、牛に外因性酪酸を肺内注入した研究では、酪酸注入によりルーメン細菌中の *Treponema* 属の相対量が増加することが明らかになっている<sup>11)</sup>。

本研究では、酪酸が *T. phagedenis* の増殖刺激因子の一つである可能性が示唆された。一方で、PDD 病変との関連が強いことが示唆されている *Porphyromonas* spp. や *Fusobacterium* spp. はよく知られた酪酸産生菌である<sup>12)</sup>。さらに、*T. phagedenis* 自身も酪酸を産生することが報告されている<sup>13)</sup>。今回、*T. phagedenis* と他の PDD 関連細菌との間に代謝的相互作用が存在することが示唆されたが、*T. phagedenis* が自身及び BDD 関連細菌に及ぼす影響も含め、BDD 病変の形成および病態形成のメカニズムを明らかにするためには、さらなる研究が必要である。

#### <引用文献>

- 1) R.L. Walker, D.H. Read, K.J. Loretz, R.W. Nordhausen, Spirochetes isolated from dairy cattle with papillomatous digital dermatitis and interdigital dermatitis, *Vet. Microbiol.* 47 (1995) 343–355.
- 2) A. Gomez, N.B. Cook, N.D. Bernardoni, J. Rieman, A.F. Dusick, R. Hartshorn, M.T. Socha, D.H. Read, D. Döpfer, An experimental infection model to induce digital dermatitis infection in cattle, *J. Dairy Sci.* 95 (2012) 1821–1830.
- 3) S.L. Berry, D.H. Read, R.L. Walker, T.R. Famula, Clinical, histologic, and bacteriologic

findings in dairy cows with digital dermatitis (footwarts) one month after topical treatment with lincomycin hydrochloride or oxytetracycline hydrochloride, *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 237 (2010) 555-560.

- 4) K. Chiba, T. Miyazaki, Y. Sekiyama, M. Miyazaki, K. Okada, The therapeutic efficacy of allyl isothiocyanate in cows with bovine digital dermatitis, *J. Vet. Med. Sci.* 79 (2017) 1191-1195.
- 5) T. Yano, K.K. Moe, K. Yamazaki, T. Ooka, T. Hayashi, N. Misawa, Identification of candidate pathogens of papillomatous digital dermatitis in dairy cattle from quantitative 16S rRNA clonal analysis, *Vet. Microbiol.* 143 (2010) 352–362.
- 6) R. Arrazuria, C.G. Knight, P. Lahiri, E.R. Cobo, H.W. Barkema, J. De Buck, *Treponema* spp. Isolated from bovine digital dermatitis display different pathogenicity in a murine abscess model, *Microorganisms.* 8 (2020) 1–13.
- 7) D. Grenier, Nutritional interactions between two suspected periodontopathogens, *Treponema denticola* and *Porphyromonas gingivalis*, *Infect. Immun.* 60 (1992) 5298–5301.
- 8) A.M. Nilius, S.C. Spencer, L.G. Simonson, S.C. Spencer, Stimulation of in vitro Growth of *Treponema denticola* by extracellular growth factors produced by *Porphyromonas gingivalis*, *J. Dent. Res.* 72 (1993)
- 9) A. Bedford, J. Gong, Implications of butyrate and its derivatives for gut health and animal production, *Anim. Nutr.* 4 (2018) 151–159.
- 10) R.W. Li, C.J. Li, Butyrate induces profound changes in gene expression related to multiple signal pathways in bovine kidney epithelial cells, *BMC Genomics.* 7 (2006) 1–14.
- 11) R.W. Li, S. Wu, R.L. Baldwin VI, W. Li, C. Li, Perturbation dynamics of the rumen microbiota in response to exogenous butyrate, *PLoS One.* 7 (2012) 1–11.
- 12) M. Shirasugi, M. Nakagawa, K. Nishioka, T. Yamamoto, T. Nakaya, N. Kanamura, Relationship between periodontal disease and butyric acid produced by periodontopathic bacteria, *Inflamm. Regen.* 38 (2018) 1–5.
- 13) H.M. Espiritu, L.L. Mamuad, S.J. Jin, S.H. Kim, S.W. Kwon, S.S. Lee, S.M. Lee, Y. Il Cho, Genotypic and phenotypic characterization of *Treponema phagedenis* from bovine digital dermatitis, *Microorganisms.* 8 (2020) 1–14.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 2. Hori K, Taniguchi T, Elpita T, Khemgaew R, Sasaki S, Gotoh Y, Yasutomi I, Misawa N.	4. 巻 12
2. 論文標題 16S rRNA-based next-generation sequencing analysis of the bacterial population in non-healing claw lesions of dairy cattle	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Animals	6. 最初と最後の頁 3584
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ani12243584.	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 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 堀 香織、谷口 喬子、佐々木 智美、後藤 恭宏、安富 一郎、三澤 尚明
2. 発表標題 乳用牛の難治性蹄病における病変部細菌群の網羅的解析
3. 学会等名 第166回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 谷口 喬子, Rathanon Khemgaew, 三澤尚明
2. 発表標題 牛趾乳頭腫症病変内の細菌によるTreponema phagedenisの増殖促進効果
3. 学会等名 第164回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

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	三澤 尚明  (Misawa Naoaki)  (20229678)	宮崎大学・産業動物防疫リサーチセンター・特別教授    (17601)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------