

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26450406

研究課題名(和文)牛趾皮膚炎病態解明・制圧のための細菌学的・疫学的研究

研究課題名(英文) Bacteriological and epidemiological studies for elucidating the pathophysiology of bovine digital dermatitis and its control

研究代表者

山崎 渉 (Yamazaki, Wataru)

宮崎大学・農学部・准教授

研究者番号：70393262

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：生菌製剤の塗布と削蹄の複合治療により、牛趾乳頭腫症(PDD)の再発やTreponema属菌の再感染を予防できる可能性を示した。細菌叢解析により、T. medium様菌およびT. denticola様菌がPDDの病変形成に重要な役割を果たしている可能性を示した。3種のTreponema属菌を属種・菌種レベルで特異的に検出・鑑別できる3種のリアルタイムPCR法と、4種のLAMP法を開発した。

研究成果の概要(英文)：The possibility of preventing the recurrence of bovine digital dermatitis (PDD) and re-infection of Treponema species was demonstrated by using the combined treatment of application of allyl isothiocyanate (AITC) and hoofing. Microbiome analysis indicated that T. medium-like and T. denticola-like isolates showed the possibility of playing an important role in PDD deformity. We developed three real-time PCR and four LAMP assays that can specifically detect and distinguish three different Treponema species at both genus and species levels.

研究分野：獣医学

キーワード：牛 趾乳頭腫症 生菌製剤 抗生物質 Treponema属菌 細菌叢解析 リアルタイムPCR LAMP

1. 研究開始当初の背景

牛の趾皮膚炎(あるいは趾乳頭腫症、Papillomatous Digital Dermatitis :以下「PDD」)はフリーストール飼育の周産期乳牛後肢に好発する伝染性の強い蹄病である。罹患牛は疼痛を伴うためによる中度から強度の跛行を呈する。罹患牛蹄部では疣状の乳頭突起物形成がみられ、特有の腐敗臭を放つ。潰瘍をとまなうものもある。食欲減退、体重低下、乳量減少等による生産効率低下や治癒後の再発による治療費の増大による経済的損失が問題視されている。ひとたび農場に侵入すると、発生農場の清浄化は極めて困難である。疼痛を伴うことから、動物福祉上の観点からも、制御対策が求められている。

PDD は複合細菌感染症と考えられており、抗生物質が著効することからも、細菌が原因であることが強く示唆されている。PDD 病変部からはスピロヘータ様の大型らせん菌である *Treponema* 属菌が高頻度に検出されている。先行研究において、PDD 牛群と健康牛群を用いた症例対照研究を実施している。両群の蹄部細菌叢のポピュレーション解析比較の結果、*Treponema* 属菌遺伝子が PDD 牛群のみから高頻度に検出されている(Yano et. al., 2010, Vet Microbiol 143, 352-362)。これらの知見から *Treponema* 属菌は PDD の病変形成に大きな役割を果たしていることが推測される。しかし、*Treponema* 属菌が難培養性であることもあり、PDD 病変部から *Treponema* 属菌の分離に成功した例は極めて少ない。それゆえ、PDD の原因菌(群)は不明なままである。

環境中の常在細菌のうち培養できるものはわずか 1-2% にすぎず、その他の大多数のものは培養不能であるとされる。培養の成否というバイアスにとらわれることなく、病変部の実際の細菌叢構成を把握するために遺伝子ベースで解析を実施する必要がある。病変部の構成菌種解明は PDD の原因菌(群)特定に重要であるので、まず、次世代シーケンサを用いて、構成菌種を属レベルで解析することにより、各病態ステージにおける細菌叢の動態を明らかにできると考えられる。さらに 16SrRNA 遺伝子を標的としたクローニング解析を実施することで、構成菌種を菌種レベルで詳細に解析できる。いずれも病変組織からの抽出 DNA に含まれる細菌遺伝子を標的とした PCR の増幅産物を用いた解析なので、培養不能菌であっても解析が可能である。

一方で日本国内では PDD 病変から *T. pahgedenis* 以外の *Treponema* 属菌の分離にはまだ成功していない。*Treponema* 属菌の難培養性や確認可能な生化学的性状の乏しさが PDD 研究のボトルネックのひとつになっている。効果的な培養法や迅速スクリーニング法、遺伝子検査による同定法開発はこれらの

問題解決を促進することができる。

PDD に対する従来の治療法には抗生剤塗布や薬浴、削蹄などがある。しかし、薬剤耐性の出現や銅イオンによる環境汚染の可能性が危惧されている。生菌製剤として知られている AITC(Allyl isothiocyanate)はワサビ、セイヨウワサビ、マスタードなどに含有される強刺激剤であり、細菌増幅期における菌体内部の生合成阻害作用やグラム陰性菌に対する殺菌効果が報告されている。牛趾乳頭腫症(PDD)に対する AITC 塗布療法の効果を検証することで、より安全な新しい治療法が確立できる可能性がある。

PDD 病変部の細菌叢を対象とした治療前後のポピュレーション比較解析、培養法の改善により、原因菌(群)の特定や治療効果の評価ができれば、分離菌の遺伝子解析による侵入・感染ルートの解明、治療法や防疫対策等の確立などの様々な波及効果が期待できる。

2. 研究の目的

前述に記載した背景を基盤として、本研究では、罹患時・治癒後の細菌叢ポピュレーション遺伝子解析比較を第一の目標とした。次に、新規増菌・分離培地を用いた難培養性 *Treponema* 属菌の分離、迅速スクリーニング、遺伝子検査法の開発を第二の目標とした。さらに、PDD の侵入・感染ルートの解明、治療法や防疫対策等の進展への貢献を第三目標とした。

3. 研究の方法

(1) 罹患時・治癒後のポピュレーション遺伝子解析比較による PDD 原因菌(群)の間接的な推定。宮崎県 NOSAI および北海道 NOSAI の協力を得て入手した PDD 病変を使用して実施。PDD 罹患牛の罹患時と治療後の蹄部細菌叢のポピュレーション解析比較。同一個体の罹患時と治癒後の比較を実施。クローニング、次世代シーケンサを用いた細菌叢解析により、PDD の病変形成の原因菌(群)を詳細に解析。

(2) 難培養性菌である *Treponema* 属菌の培養法や迅速スクリーニング法、遺伝子検査による同定法開発。海外研究機関で使用例があるが、国内ではまだ使用実績の無い嫌気性難培養菌用の増菌培地、分離培地ならびに自家製新規分離培地の使用による、*T. pahgedenis* 以外の *Treponema* 属菌の分離。また、LAMP 法およびリアルタイム PCR 法による *Treponema* 属菌の迅速スクリーニング、遺伝子検査法の開発。

(3) PDD の侵入・感染ルートの解明、治療法

や防疫対策等の進展への貢献。分離菌の遺伝子解析による、侵入・感染ルートの解明、治療法や防疫対策等の確立。

4. 研究成果

(1) 罹患時・治療後のポピュレーション遺伝子解析比較

PDD の原因菌 (群) 推定・病態理解のために、AITC ならびに抗生物質 (リンコマイシン) による治療前後における PDD 病変部 (サンプル数 8) の細菌叢の比較解析を次世代シーケンサ (Roche, 454Jr) によって実施した (属レベルの解析)。その結果、*Treponema* 属菌の検出は治療前材料では高頻度 (37.8-79.6%) であったのに対し、治療後材料では、極めて低頻度 (0-10.8%) であった。*Eubacterium* 科も低頻度ながらすべての材料から治療前 (1.8-10.6%) に検出され、治療後 (0-0.6%) では低下傾向が認められた。他に同様の傾向を示す細菌は確認されなかった。一方、治療後材料からは *Anaerococcus*、*Bacteroides* 属、*Fingoldia* 属、*Pseudomonas* 属菌などが治療前と比較して高頻度に検出された。さらに詳細な解析のためにクローニングを実施した結果、治療前材料からは 3 系統の *Treponema* 属菌が検出されたが、治療後材料からは 3 系統のうち、*T. phagedenis* 様菌 1 種のみが検出された (種レベルの解析)。以上の結果より、PDD の病変形成に重要なのは、*T. phagedenis* 様菌よりもむしろ、*T. medium/vincentii* 様菌および *T. denticola/putidum* 様菌である可能性が新たに示唆された。

(2) *Treponema* 属菌の培養法や迅速スクリーニング法、遺伝子検査による同定法開発

海外研究機関で使用例があるが、国内ではまだ使用実績の無い嫌気性難培養菌用の増菌培地および分離培地を輸入し、菌分離率の向上を図った。同様に、牛皮膚破碎乳剤液と抗生物質を添加した羊血液寒天培地をベースとする新規培地を試作して使用した。しかし、いずれも雑菌の過剰発育が多く、標的菌の分離は困難であった。唯一、*T. medium/vincentii* 様菌 (16S rRNA 遺伝子塩基配列解析により暫定的に同定) 1 株の分離に成功した。しかし、継代中に菌株が死滅したため、詳細な解析は実施できなかった。

問題解決のために、豊富な PDD 由来細菌ストックを保有する米国 Wisconsin 大学獣医学部との共同研究を実施した。3 種 34 株の候補菌と 17 種 20 株の非候補菌の計 54 株を検証に用いて、*T. phagedenis* 様菌、*T. medium/vincentii* 様菌および *T. denticola/putidum* 様菌の 3 種の *Treponema* 属菌を各々特異的に検出・鑑別できる 3 種のリアルタイム PCR 法と、この 3 種に加えて *Treponema* 属菌をも特異的に検出・鑑別できる 4 種の LAMP 法の開発に成功した。これに

より、*Treponema* の属・菌種レベル双方における、病変部あるいは病変部増菌培養液からの迅速なスクリーニングおよび分離株の簡易迅速な同定が可能になった。

(3) PDD の侵入・感染ルートの解明、治療法や防疫対策等の進展への貢献。

生菌製剤である AITC 塗布と削蹄の複合治療により、PDD の有力な原因菌と推測されている *Treponema* 様菌は病変部から有意に減少することを明らかにした。疼痛の減少も確認された。この AITC 塗布と削蹄の複合治療により、PDD の再発や *Treponema* 様菌の再感染を予防できる可能性が示唆された。侵入・感染ルートの解明や防疫対策の改善等に直接貢献できるまでの成果を得るには至らなかった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

(雑誌論文) (計 10 件) (すべて査読有)

1. Yamamoto, T., Manabe, H., Yamazaki, W., Misawa, N., Takahashi, M., Okada, K. Combination effect of allyl isothiocyanate and hoof trimming on bovine digital dermatitis. J. Vet. Med. Sci (印刷中).
2. Liu, Y. H., Yamazaki, W., Huang, Y. T., Liao, C. H., Sheng, W. H., Hsueh, P. R. Clinical and microbiological characteristics of patients with bacteremia caused by *Campylobacter* species with an emphasis on the subspecies of *C. fetus*. J. Microbiol. Immunol. Infect (印刷中).
3. Anklam, K., Kulow, M., Yamazaki, W., Dopfer, D. Development of real-time PCR and loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assays for the differential detection of digital dermatitis associated treponemes. PLOS One, Vol.12, No.5, e0178349. pp. E1-E13 (2017).
4. Iraola, G., Forster, S.C., Kumar, N., Lehours, P., García-Peña, F.J., Paolicchi, F., Morsella, C., Hotzel, H., Hung, L.Y., Hsueh, P.R., Vidal, A., Lévesque, S., Bekal, S., Yamazaki, W., Balzan, C., Vargas, A., Piccirillo, A., Chaban, B., Hill, J.E., Betancor, L., Collado, L., Truysers, I., Midwinter, A.C., Dagi, H.T., Calleros, L., Pérez, R., Naya, H., Lawley, T.D. Distinct *Campylobacter fetus* lineages adapted as livestock pathogens and intestinal pathobionts in the human microbiota. Nature Communications Vol.8, 1367. pp. E1-E8 (2017).
5. Yamazaki, W., Sabike, I. I., Sekiguchi, S. High prevalence of *Campylobacter* in broiler flocks is a crucial factor for

- frequency of food poisoning in humans. Jpn. J. Infect. Dis. Vol. 70, No.6, pp. 691-692 (2017).
6. Sabike, I. I., Uemura, R., Kirino, Y., Mekata, H., Sekiguchi, S., Farid, A. S., Goto, Y., Horii, Y., **Yamazaki, W.** Assessment of the *Campylobacter jejuni* and *C. coli* in broiler chicken ceca by conventional culture and loop-mediated isothermal amplification method. Food Control, Vol.74, No.4, pp. 107-111 (2017).
 7. Iizumi, T., Taniguchi, T., **Yamazaki, W.**, Vilmen, G., Alekseyenko, A., Gao, Z., Perez-Perez, G., Blaser, M. J. Effect of antibiotic pre-treatment and pathogen challenge on the intestinal microbiota in mice. Gut Pathogens, Vol.8, 60, pp. E1-E10 (2016).
 8. **Yamazaki, W.**, Uemura, R., Sekiguchi, S., Dong, J.B., Watanabe, S., Kirino, Y., Mekata, H., Nonaka, N., Norimine, J., Sueyoshi, M., Goto, Y., Horii, Y., Kurogi, M., Yoshino, S., **Misawa, N.** *Campylobacter* and *Salmonella* are prevalent in broiler farms in Kyushu, Japan: Results of a 2-year distribution and circulation dynamics audit. J. Appl. Microbiol. Vol.120, No.4, pp. 1711-1722 (2016).
 9. Sabike, I. I., Uemura, R., Kirino, Y., Mekata, H., Sekiguchi, S., Okabayashi, T., Goto, Y., **Yamazaki, W.** Use of direct LAMP screening of broiler fecal samples for *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in the positive flock identification strategy. Frontiers in Microbiol. Vol.7, No.9: 1582, pp. E1-E5 (2016).
 10. Taniguchi, T., **Yamazaki, W.**, Saeki, Y., Takajo, I., Okayama, A., Hayashi, T., **Misawa, N.** The pathogenic potential of *Helicobacter cinaedi* isolated from non-human sources: adherence, invasion and translocation ability in polarized intestinal epithelial Caco-2 cells in vitro. J. Vet. Med. Sci. Vol.78, No.4, pp. 627-632 (2016).

[学会発表] (計 7 件)

1. Victor, A. F., Okabayashi, T., Sakai, Y., Sekiguchi, S., **Misawa, N.**, **Yamazaki, W.** Highly sensitive detection of PEDV in environmental samples using a new virus concentration technique. 12th Annual Meeting Epizone, Paris, France (2017).
2. Sabike, I. I., Uemura, R., Kirino, Y., Mekata, H., Sekiguchi, S., Okabayashi, T., Farid, A. S., Goto, Y., Horii, Y., **Yamazaki, W.** *Campylobacter* prevalence

in broiler flocks highly correlates with food poisoning frequency in Japan: assessment in broiler cecal and fecal samples by conventional culture and loop-mediated isothermal amplification methods. 51th Conference Cholera and other bacterial enteric infections US-Japan cooperative medical science program. Seoul, Republic of Korea (2017).

3. **Yamazaki, W.** Highly sensitive detection of avian influenza virus in environmental samples using a new virus concentration technique. JSPS core-to-core 1st meeting/7th CADIC (Center for Animal Diseases Control) International symposium. Bangkok, Thailand (2017).
4. **Yamazaki, W.**, Uemura, R., Sekiguchi, S., Taniguchi, T., **Misawa, N.** Analysis of chicken cecal contents by pyrosequencing to search probiotics for *Campylobacter*. 50th Conference Cholera and other bacterial enteric infections US-Japan cooperative medical science program Washington DC, USA (2016).
5. **Yamazaki, W.** Novel molecular diagnostic technique for rapid and sensitive detection of foot-and-mouth disease virus (FMDV). 3rd International conference on biotechnology application in agriculture. Sharm El-Sheikh, Egypt (2016).
6. **山崎 渉**, 後藤恭宏, 岡田啓司, 谷口喬子, 林 哲也, 三澤尚明. 牛趾乳頭腫症病変部の治療前後における細菌叢の包括的比較解析. 第 158 回日本獣医学会総会, 十和田市 (2015).
7. **山崎 渉**, 上村涼子, 関口 敏, 谷口喬子, 三澤尚明. 鶏盲腸におけるカンピロバクターへのプロバイオティクス探索を目的としたパイロシーケンス解析. 第 36 回日本食品微生物学会総会. 川崎市 (2015).

[図書] (計 1 件)

1. Ecology, virulence and detection of pathogenic and pandemic *Vibrio parahaemolyticus*. (eds) Raghunath, P., Karunasagar, I., Karunasagar, I., 第 7 章. pp.71-80. Escalante-Maldonado, O. R., Kayali, A. Y., **Yamazaki, W.**, Vuddhakul, V., Nakaguchi, Y., Nishibuchi, M.

[その他]

ホームページ (宮崎大学農学部獣医学科)
http://www.agr.miyazaki-u.ac.jp/~vet/vet_HP1.htm

(1)研究代表者 山崎 渉(YAMAZAKI Wataru)

宮崎大学・農学部・准教授

研究者番号:70393262

(2)研究分担者 無

(3)連携研究者 三澤 尚明(MISAWA

Naoaki)

宮崎大学・産業動物防疫リサーチセンタ

ー・教授

研究者番号:20229678

(4)研究協力者 無