

令和 4年 4月 14日

令和3年度 共同研究報告書

1. 研究課題名	日本語表記：難治性伝染性蹄病へアリーアタック病変内に存在する細菌群の遺伝子学的解析 英語表記：Genetic analysis of bacterial populations in cattle hairy attack as a refractory infectious hoof disease			
2. 研究期間	令和 3年 4月 1日 ~ 令和 4年 3月 31日			
3. 共同研究者 (代表者)	氏 名	機関・所属部署名		職 名
	後藤 恭宏	九州大学大学院医学研究院		助教
	林 哲也	九州大学大学院医学研究院		教授
<p>4. 研究目的</p> <p>牛の趾皮膚炎（BDD：Bovine digital dermatitis）は、疼痛を伴う蹄の伝染性限局性皮膚炎で、その病変からは多くの細菌が検出されており、難培養性の <i>Treponema</i> 属菌を中心とする細菌性複合感染であると考えられている。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るため、経済的損失の高い感染症として重要視されている。近年、ヘアリーアタックと呼ばれる新しい蹄疾患が報告されている。病変は、白帯真皮の増殖性病変を伴う難治性の局所的肉芽病変で、白帯病や蹄尖潰瘍と併発することが多い。病変部は真皮が赤く充血しており、独特な刺激臭を発する。このヘアリーアタックは、難培養性の <i>Treponema</i> 属菌を中心とする伝染性限局性皮膚炎が悪化したものだと考えられていたが、我々の初期の調査において、ヘアリーアタック病変部からの <i>Treponema</i> 属菌の検出率は比較的 low、他の病原細菌群の関与が示唆された。そこで本研究では、ヘアリーアタックの病変内に存在する細菌群を遺伝子学的に解析すると共に、主要原因菌を同定し、その発症機序や発生要因の解明、治療法の開発に資することを目的としている。</p>				
<p>5. 研究内容・成果</p> <p>(1) ヘアリーアタック病変部から <i>Treponema</i> 属菌の分離</p> <p>広島県3農場および北海道2農場で採材されたヘアリーアタック病変部12検体、またコントロールとして健康な乳牛の蹄踵部皮膚の生検3検体を用いた。検体を滅菌メスで切断し、PDDTp寒天培地プレート上にスタンプした。その後、プレートを AnaeroPack（三菱ガス化学）内で37℃、14日間無酸素培養した。フィルム状または群生しているコロニーをクリスタルバイオレット溶液でグラム染色し、形態を観察した。螺旋状の桿菌は、アルカリボイル法によりDNAを抽出し、16S rRNA塩基配列を決定することにより同定した。その結果、病変部2検体から <i>Treponema pagedenis</i> が分離された。これら2株（No.1, 7）の16S rRNA遺伝子（約1500bp）は、ClustalWを用いて、塩基配列に基づく系統樹解析を行った（図1）。分離された2株は、乳牛および羊の趾皮膚炎から分離された菌株と同じクラスターに属し、ヒト由来株のクラスターとは異なるクラスターに属していることが確認され、へ</p>				

アリーアタック病変と BDD トレポネームの関連性が示唆された。

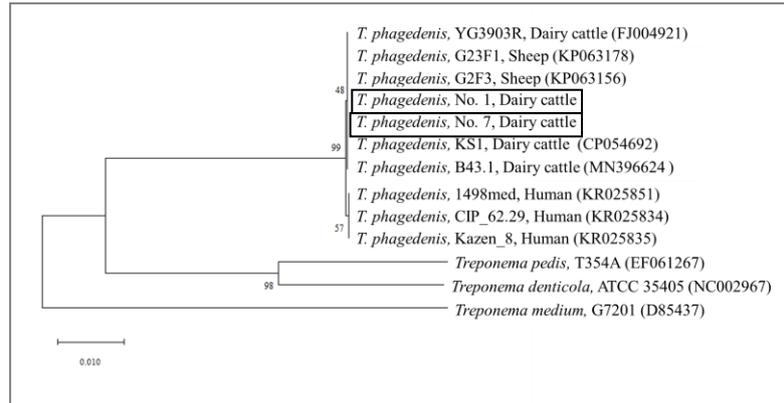


図 1. 16S rRNA 遺伝子塩基配列に基づく系統樹解析

(2) 病変部の 16S rRNA 配列を利用したポピュレーション解析

ヘアリーアタック病変部およびコントロール皮膚から抽出した DNA を鋳型として細菌の 16S rRNA 遺伝子をユニバーサルプライマーにより増幅し、大腸菌ベクターにクローニングした。得られた形質転換体をランダムに選択し、クローニングされた遺伝子 (16S rRNA) の塩基配列を決定した。得られたデータは、BLAST にて相同性を調べ、98%以上の一致をもってその菌種として同定した。1 病変あたり 100 個程度の形質転換体について調べたが、その多くは同定することができなかった。病変部検体 No.7 及び 8 のみ、*T. phagedenis* が検出されたものの、それぞれ 1.1%と 5.8%と低い割合であり、*Treponema* 属菌は、病変部に多く存在しない可能性が示唆された。

(3) 病変部の次世代シーケンサーを用いたメタゲノム解析

ヘアリーアタック病変部 10 検体、コントロール 3 検体から抽出した DNA を鋳型として、プライマー (515F: 5'-TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG-GTGYCAGCMGCCGCGGTAA-3', 806R: 5'-GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAG-GGACTACNVGGGTWTCTAAT-3') を用いて、5'末端にアダプター配列が挿入されるよう 16S rRNA 遺伝子の V4 領域を増幅した。Ampure XP Beads (Beckman Coulter) を用いて精製後、Nextera XT Index Kit (Illumina)を用いて 2nd PCR を実施した。再度、Ampure XP Beads で精製し、MiSeq (Illumina)を用いて 300 bp ペアエンドシーケンスを行った。すべての工程は Illumina のプロトコールに従った。得られた配列情報を Qiime 2 (<https://qiime2.org/>) により解析した。

得られたリードの総数は 386,714 個 (1 検体あたり 14,202~37,069 個) であった。すべての病変部において共通に優勢な属はなく、すべての病変部サンプルは多様な細菌集団構造を示した (図 2)。10 病変の *Treponema* 属に割り当てられた OTU は 0%~12.8%を占めた (平均 4.0%)。つまり、*Treponema* 属はヘアリーアタック病変に存在するが、BDD 病変ほど主要な病原体ではない可能性が示唆された。一方、コントロールにおいては、1 検体のみから *Treponema* 属が検出され (0.4%)、他 2 検体からは検出されなかった。

病変部のほとんどは、コントロールと比較して minor population (8%未満) の割合が高かった。この高い比率は、病変部内の細菌集団が高い多様性で構成されている可能性を示唆しており、ヘアリーアタック病変部は強い多菌感染症である可能性がある。

今回、新たな病態であるヘアリーアタック病変の細菌 DNA 検出と細菌組成の解析を行った。これまで、ヘアリーアタック病変部は BDD トレポネームとの関連が指摘されてきたが、今回の結果から、これらの *Treponema* 属は病変部に存在しても病変を引き起こす主要な病原体とならない可能性が示唆された。ヘアリーアタック病変の病因は、少数の主要な細菌ではなく、様々な細菌群の複合体によって形成されている可能性があり、今後は病変部の細菌組成だけでなく、農場の環境的・物理的要因の分析を追加することによって、治癒しない蹄病変の病因をさらに明らかにすることができるだろう。

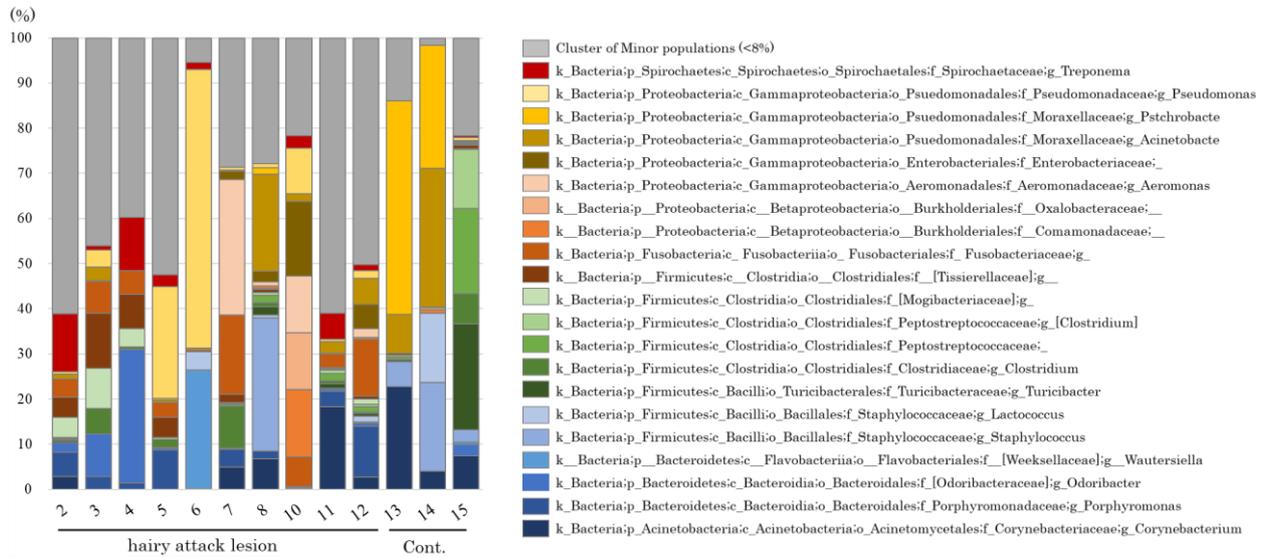


図 2. 病変部の次世代シーケンサーを用いたメタゲノム解析

(参考となる資料を添付してください。)

※ 必要に応じて、枠を広げて記載してください。

6. 成果となる論文・学会発表等

(※参考となる資料を添付してください。)

7. 産業動物防疫リサーチセンターへ訪問した回数

氏名	職名等	性別	国籍	訪問回数・合計日数	訪問時期
後藤 恭宏	助教	男	日本	0回	

8. 利用した設備・施設等 ※必要に応じ様式の追加・削除可。

施設

室名	動物種	飼育数	期間
BSL 3 施設			
獣医棟 P 2 動物実験室			
教育棟 P 2 動物実験室 1			

設備・機器類

(I) 獣医棟 3 階

部屋名	機器名	使用した延日数	
P 2 実験室	V301	フローサイトメーター (ライテクノロジーズジャパン)	
		マイクロプレートリーダー (BioRad)	
		マイクロプレート洗浄装置 (Thermo WellWash)	
		NanoDrop 分光光度計 (Thermo ND-1000)	
		冷却遠心機 (KUBOTA 7780)	
		冷却遠心機 (Thermo)	
		卓上型冷却遠心機 (HITACHI)	
		安全キャビネット (AIRTEC)	
		ハイブリオープン (タイテック)	
		オートクレーブ (平山製作所 HG-50)	
	V304	ヒートブロック (アステック)	
		安全キャビネット (AIRTEC)	
		卓上遠心機 (HITACHI)	
		MALDI Biotyper (BRUKER)	
	V308	アイソレーター (マウス/ラット用) (Tokiwa T-BCC-Micro-M25)	
		安全キャビネット (AIRTEC)	
		オートクレーブ (トミー精工、LSX-700)	
	V310	アイソレーター (マウス/ラット用) (Tokiwa T-BCC-Micro-M25)	
		オートクレーブ (HIRAYAMA HV-110)	
		安全キャビネット (AIRTEC)	
	V313	安全キャビネット (AIRTEC)	
	V314	デジタル撮影装置付蛍光顕微鏡 (OLYMPUS DP74-SET-A)	
		CO ₂ インキュベーター (ASTECC SCI-165D/APC)	
		倒立位相差顕微鏡 (OLYMPUS CKX41)	
		安全キャビネット (AIRTEC)	
		オートクレーブ (平山製作所 HG-50)	
		卓上遠心機 (KUBOTA 5520)	
	V319	卓上冷却遠心機 (eppendorf 5415R)	
		CO ₂ インキュベーター (Thermo F370)	
		安全キャビネット (AIRTEC)	
		倒立蛍光顕微鏡 (KEYENCE BZ-9000)	
		位相差顕微鏡 (OLYMPUS CK2)	

		超遠心機(HITACHI CP80WX)	
	V323	安全キャビネット(AIRTEC)	
		スイングローター付遠心機(HIRASAWA TE-HER)	
		インキュベーター(SANYO MIR-153)	
		卓上冷却遠心機(eppendorf 5415R)	
		紫外・可視分光光度計(GE Healthcare GeneQuant100)	
		ヒートブロック(アステック)	
遺伝子実験室	V303	ゲル・メンブラン撮影装置(BioRad)	
		PCR 装置(BioRad, Applied Biosystems)	
		多標識測定用プレートリーダー(ワラック社)	
		リアルタイム濁度測定装置(テラメックス LoopampEXIA)	
		リアルタイム PCR 装置(ABI, Quant Studio 3)	
		デジタル PCR(日本バイオラッド)	
	V306	卓上遠心機(HITACHI CT6E)	
		卓上冷却遠心機(HITACHI CT15RE)	
	V307	細菌検査用ホモジナイザー(オルガノ EXNIZER400)	
シークエンサー(ABI3130, SeqStudio)			
試薬調製室	V305	pH メーター(HORIBA)	
		デシケーター(ASONE)	
病理標本作製室	V316	パラフィン包埋ブロック作製装置(SAKURA)	
		手動回転式マイクロトーム(Leica MR2235)	
		密閉式自動固定包埋装置(SAKURA)	
		卓上型ドラフト(明光メディカル)	
洗浄室	V318	超純水製造装置(Milli-Q Advantage)	
		オートクレーブ(TOMY SX-500)	
		全自動洗浄機(Miele PG858)	
滅菌室	V322	オートクレーブ(TOMY、平山製作所)	
		高純水製造装置(Merck)	
		全自動血球計数器(日本光電工業)	
微生物保存室	V324	液体室素保存容器(太陽日酸株, アステック)	
		超低温槽(Thermo REVC0 TSX400G)	

(II) 産業動物教育研究センター

部屋名	機器名	使用した延日数
大中動物検査実験室	大中動物検査実験室	
	全身麻酔装置	
	埋込式回転診療台	
中動物陽圧実験室	手術台、無影灯(2機)、麻酔装置、生体情報モニター、X線投下装置(Cアーム)一式	
MRI 室	3T MRI、MRI 用生体情報モニター、MRI 用麻酔装置一式	
	MRI オペレーター	
P2 検査実験室	アイソレーター	

	安全キャビネット	
	オートクレーブ	
器具・薬品庫	ウサギ飼育用ケージ	
滅菌リネン庫	高圧蒸気滅菌装置	
	カートリッジ式酸化エチレンガス滅菌器	
動物飼育	動物飼育費	
	飼育管理員	

その他の装置・データ等

分類	名称	使用した延日数
データベース		
バイオリソース		
データ・文献		
装置		

備考

当初8月に宮崎大学訪問を予定していたが、新型コロナウイルス感染が拡大し、8月末には宮崎県にまん延防止等重点措置が発令されたため、訪問を見送った。その後、年明けの訪問を予定したものの、再度コロナ感染が拡大したため、訪問を断念することとなった。