

# 難培養性トレポネーマを中心とした混合感染症のゲノム解析とその応用

●三澤 尚明   ◆末吉 益雄   ◆中山 恵介  
宮崎大学

## <研究の目的と進め方>

牛の趾乳頭腫症 (Papillomatous Digital Dermatitis : 以下 PDD と略す) は伝染性の強い蹄病で、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。抗生物質の投与により治癒することから細菌性の感染症と考えられており、病変部からスピロヘータ様の大型らせん菌が高頻度に検出されている。しかしながら、菌の分離に成功した例は極めて少なく、再現試験も不成功に終わっているため、真の原因菌は確定していない。これまで PDD 病変の細菌学的並びに分子生物学的検査により、PDD は難培養性のスピロヘータ様細菌を中心とした混合感染であると推定されるが、病変は蹄の接地面の皮膚に好発し、難培養性細菌の存在に加え、常に排泄物や土壌に汚染されているため、本症起因菌の解析は従来の研究法では困難であった。そこで本研究では、ゲノム科学、特にメタゲノム的な研究手法を用いて PDD に関与する病原細菌群を解析し、PDD の原因菌群の同定に加えて、各菌の病原体としての特性や混合感染症発症のゲノム基盤を解明することを目的としている。さらにゲノム解析から得られた情報を基に、PCR や組換え蛋白に対する抗体を用いた診断法やワクチン開発への応用を図る。

## <2007 年度の研究の当初計画>

1) PDD より分離したトレポネーマの性状と感染牛の抗体検査  
PDD 病変に分布する優勢菌を調べるための遺伝子解析では、複数のトレポネーマ菌種が存在することが明らかとなったが、分離培養が可能なトレポネーマは *Treponema phagedenis* 近縁種のみであった。現在までに146頭の牛から154のPDD病変を収集し、27検体(17.5%)から本菌を分離している。分離株の抗原性状の比較解析や遺伝子型別を実施すると共に、感染牛の分離菌株に対する抗体検査を行う。

## 2) PDD由来トレポネーマの全ゲノム配列決定

PDD 由来 *T. phagedenis* YG3903R 株の全ゲノム配列を決定する。その後はすでに全ゲノム配列が解読されている他のスピロヘータ、特に *T. pallidum*, *T. denticola* 等との比較ゲノム解析を行う。

## 3) PDD由来トレポネーマの病原因子の解析

PDDの病態の特徴である炎症性皮膚炎において、*T. phagedenis*がどの程度関与しているかを調べるため、ヒト由来表皮角化細胞を用いて菌接種後の炎症性サイトカインの産生性を調べるとともに、ゲノム情報から炎症に関与する関連遺伝子を検索する。

## 4) 感染実験

PDD病変から分離された*T. phagedenis*の単独接種でPDDが再現できるか確認するため、実験動物を用いた感染実験を実施する。

## 5) メタゲノム解析

PDD病変に分布する細菌群のポピュレーション解析から優勢菌群の中に培養不能な菌が検出されており、これらのゲノム解析をどのように行うかが課題となっている。そこで、PDD組織から抽出したDNAを出発材料として、腸内細菌の解析等に活用されているメタゲノム解析を実施する。

## <2007 年度の成果>

### 1) PDDより分離したトレポネーマの性状と感染牛の抗体検査

病変部から分離した *T. phagedenis* の生化学的性状を調べると共に、遺伝子型解析を行った。基準株として *T. phagedenis* ATCC27087 株及び *T. denticola* JCM8225 株を用いた。分離株のうち増殖性の良好な 12 株を選び、オキシダーゼ、カタラーゼ、馬血液に対する溶血性、API ZIM を用いた酵素活性について調べた。全ての供試菌株は、弱いβ溶血活性を示し、オキシダーゼ陰性、カタラーゼ陽性で、酵素活性の結果と共に *T. phagedenis* と一致したが、*T. denticola* とは異なっていた。遺伝子型別には 14 株を追加し、26 株について制限酵素 *Xba* I を用いた Pulse-field gel electrophoresis (PFGE)、および RAPD-PCR を行った。遺伝子型別では、PFGE および RAPD-PCR の両解析において DNA 多型を示し、同一農場の異なる罹患牛または同一個体からの分離株間でもバンドパターンは大きく異なり、極めて高いバリエーションを持つことが明らかとなった。

次に感染牛の *T. phagedenis* に対する抗体保有状況と認識抗原を調べるため、分離株の全菌体成分を SDS-PAGE で展開した後、被検血清を用いてウェスタンブロット (WB) による解析を行った。さらに PDD 罹患牛と非罹患牛 (PDD 発生農場と清浄農場) から採取した 119 検体の血清について、菌体抽出抗原を用いた ELISA 法により抗体価を測定した。WB の結果、罹患牛の *T. phagedenis* に対する抗体は検出されたが、菌株間で認識抗原に差が認められた。ELISA 法によるスクリーニング検査の結果、PDD 罹患牛の *T. phagedenis* に対する抗体保有率は清浄農場の牛に比較して有意に高かった。さらに、一方、*T. denticola* に対する抗体保有率は低かった。以上の結果から、*T. phagedenis* の抗原性には菌株間の違いは認められるが、本菌に対する抗体の検出は PDD の浸潤状況を把握するのに有用な診断法であると考えられた。

### 2) PDD由来トレポネーマの全ゲノム配列決定

PDD 由来 *T. phagedenis* YG3903R 株 (PFGE による予想ゲノムサイズは約 3.3 ~ 3.6 Mbp) を全ゲノム解析用菌株として選定し、ランダムショットガン法によるゲノム配列解析を開始した。2Kb までのフラグメントとして 27,134 リード、8 ~ 10kb のインサートライブラリーの末端配列解析 (9,920 リード) とそれにより得られた 58 のブリッジングクローンの内部配列解析を行った。Internal sequencing として 769 リードの配列から contig を作成してアセンブリーを行い、3,082Kb の塩基長を決定した。現時点での GC 含量は 40.0%、推定ゲノムサイズは約 3.2Mb で、rRNA 領域は 2 セット確認されている。予測される全ゲノムサイズの 8 倍長のシークエンシングを行ったが、依然として 42 個のギャップが残っている。

2 kbp 以上の contig から 50 aa 以上の ORF を抽出して既知のタンパク質との相同性解析を行ったところ、有意な相同性 (E value < 10E-5) を示した 1508 遺伝子の約 60% が Spirochaetes に分類された。Spirochaetes の内訳としては既に全ゲノム解析の終了している *Treponema denticola* と *Treponema pallidum* が大半を占めており、*T. denticola* が 79%、*T. pallidum* が 21% となっている。

### 3) PDD由来トレポネーマの病原因子の解析

供試菌株として、ヒト由来 *T. phagedenis* ATCC 27087 株、ヒト口腔由来 *T. denticola* JCM 8225 株、および、PDD 病変部より分離された *T. phagedenis* YG3903R、HT201 株を用いた。これらの供試株について、生菌と加熱処理死菌をそれぞれ正常ヒト表皮角化細胞 (NHDK) に接種し、24 時間後の培養上清中のサイトカイン 17 種の濃度を測定した。また IL-8 の産生誘導性に着目し、菌種による IL-8 誘導活性の差異、接種菌量による影響、産生量の継時的変化について調べた。次に、ヒト腸上皮細胞 (INT407) についても表皮角化細胞と同様の実験を行った。さらに、各供試菌株から LPS を抽出し、LPS を培養細胞へ接種した時の IL-8 誘導活性を調べた。その結果、NHDK において生菌および死菌による炎症性サイトカインの誘導がみられた。特に IL-8 の分泌亢進が顕著であり、次いで IL-6 の分泌亢進がみられた。また、IL-8 の産生は生菌よりも死菌を接種した方でより高い産生が認められた。さらに、接種菌数及び共培養の時間に依存して IL-8 の増加が認められた。INT407 においても IL-8 の誘導がみられたが、その産生量は低く、NHDK のおよそ 1/100 以下であった。また、INT407 ではいずれの LPS によるサイトカイン誘導も認められなかったが、NHDK においては YG3903R の高用量接種時にのみコントロールの 5 倍の IL-8 産生量を示した。一方、口腔内由来の *T. denticola* による炎症性サイトカイン誘導の程度は低かった。以上の結果から、PDD 由来トレポネーマは PDD の皮膚の炎症に関与していることが示唆された。また、生菌よりも加熱死菌による炎症性サイトカインの産生亢進がみられたが、LPS のサイトカイン産生誘導能は低く、LPS 以外の耐熱性因子が炎症反応を誘起することが示唆された。

### 4) 感染実験

マウス (Balb/c) を麻酔し、背部を剃毛した後、皮下に PDD 由来 *T. phagedenis* YG3903R 株の生菌を約  $10^{10}$  cfu/0.1ml 接種し、接種部を 1 ヶ月間経時的に観察した。さらに、*T. denticola* JCM8152 と *T. phagedenis* ATCC27087 を用いて同様の感染実験を行った。対照として、培地のみを接種した。その結果、*T. phagedenis* YG3903R 株および ATCC27087 を接種した群では、接種部位の軽微な腫脹、発赤が 2 週間程度観察されたが、いずれのマウスも痕跡を残さずに治癒した。一方、*T. denticola* JCM8152 を接種した群では、接種後 3 週間まで明瞭な発赤・腫脹が認められ、1 ヶ月後においてもわずかに腫脹が観察された。接種 1 ヶ月後に病解剖を行い、接種部位の細菌学的検査を実施したが、いずれの接種群においても接種菌は回収されなかった。

### 5) メタゲノム解析

予備試験として、正常な牛の蹄の皮膚に *T. phagedenis* と *Salmonella* Enteritidis を注射器を用いて接種した後、組織をホモジナイズし、ショ糖密度勾配遠心により接種菌の回収を試みた。遠心後、ショ糖上層部のフラクションから DNA を抽出し、16S rRNA および牛のミトコンドリア DNA に対するプライマーを用いた PCR を行ったところ、16S rRNA の遺伝子のみが増幅され、牛由来ミトコンドリア DNA は検出されなかった。これらの結果から、PDD 病変組織から組織内の細菌群を分離する手法として密度勾配遠心法は有用であると思われた。

### <国内外での成果の位置づけ>

PDD 病変内に存在する細菌群の網羅的解析や難培養性とされていたトレポネーマの分離培養の成功により、PDD の病態が明らかにされてきた。病変内に優勢に存在する *T. phagedenis* を高い分離率で培養できる方法を確立したことで、多くの分離株の特徴を調べたり、感染実験を可能にした。PDD 由来 *T. phagedenis* は DNA 多型を示し、同一牛からの分離株においても異なる遺伝子型を示すことを明らかにした。特に、今回、病変から分離された *T. phagedenis* が炎症を引き起こすサイトカインの産生を強く惹起し

ていることを明らかにしたことは、PDD の病態を明らかにする上で重要な研究成果といえる。PDD 由来 *T. phagedenis* の全ゲノムが解読されれば、病原因子の詳細な検討や診断、治療、予防法への応用が期待できる。

### <達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

PDD 由来トレポネーマの全ゲノム配列をショットガン法により決定したが、現時点においてシーケンシングが完了しなかった。この原因としては 8~10kb インサートライブラリーの偏りが大きく、期待したほどコンティグのブリッジングが進まなかったことが挙げられる。

今回マウスを用いた感染実験では、PDD 病変を再現することができなかった。この結果は、単に動物の感受性の差によるものなのか、単一の菌では再現できないのか明らかにすることが必要である。

### <今後の課題>

ゲノムの完全長を決定するため、40Kb のフォスミドライブラリーを作製し、末端配列解析を行いながらギャップのクロージングとアセンブルを行う。今後は一部のブリッジングクローンについてショットガンシーケンシングを行い、アセンブルを確認しながらフィニッシングを行うが、ゲノム内における組み換え等が危惧されるため、フィニッシングをより慎重に進めていきたいと考えている。さらに、PDD の病態解明を行うための実験動物を用いた感染モデルの確立を継続して行う予定である。PDD 病変内に存在する培養できない優性菌を回収する方法として、ショ糖密度勾配法は有用であることが示唆されたため、この手法を用いてメタゲノム解析を実施し、培養できない優性菌種のゲノム解析を進める。

### <成果公表リスト>

#### 1) 論文

1. 702121805 (論文)  
Ma, M., Ohtani, K., Shimizu, T., and Misawa, N., Detection of a group II intron without open reading frame in the alpha toxin gene of *Clostridium perfringens* isolated from a broiler chicken, *J. Bacteriol.*, 189: 1633-1640 (2007)
2. 702121946 (著書)  
三澤尚明, 牛の趾乳頭腫症, 動物の感染症 第2版, 近代出版, 2006
3. 801282001 (論文)  
Asakura, M., Samosornsuk, W., Taguchi, M., Kobayashi, K., Misawa, N., Kusumoto, M., Nishimura, K., Matsuhisa, K., and Yamasaki, S., Comparative analysis of cytolethal distending toxin (cdt) genes among *Campylobacter jejuni*, *C. coli*, and *C. fetus* strains., *Microb. Pathog.*, 42: 174-183, 2007
4. 801290907 (論文)  
Matsumoto T, Goto M, Murakami H, Tanaka T, Nishiyama H, Ono E, Okada C, Sawabe E, Yagoshi M, Yoneyama A, Okuzumi K, Tateda K, Misawa N., and Yamaguchi K., Multi-Center Study to Evaluate Blood Stream Infection with *Helicobacter cinaedi* in Japan, *J. Clin. Microbiol.*, 45: 2853-2857, 2007
5. 801290920 (論文)  
Yamazaki-Matsune, W., Taguchi, M., Seto, K., Kawahara, R., Kawatsu, K., Kumeda, Y., Kitazato, M., Nukina, M., Misawa, N., and Tsukamoto, T., Development of a multiplex PCR assay for identification of *Campylobacter coli*, *C. fetus*, *C. hyointestinalis* subsp. *hyointestinalis*, *C. jejuni*, *C. lari* and *C. upsaliensis*., *J. Med. Microbiol.*, 56: 1467-1473, 2007
6. 801290934 (論文)  
Enokimoto, M., Kubo, M., Bozono, Y., Mieno, Y., and Misawa, N., Enumeration and identification of *Campylobacter species* in the liver and bile of slaughtered cattle, *Int. J. Food Microbiol.*, 118: 259-263, 2007