

総説

## ポリマイクロナイアル感染症としての牛趾皮膚炎の病態解明

三澤尚明<sup>1†</sup> 谷口喬子<sup>1</sup> 大岡唯祐<sup>2</sup> 後藤恭宏<sup>3</sup> 林 哲也<sup>3</sup>

<sup>1</sup> 宮崎大学産業動物防疫リサーチセンター

〒 889-2192 宮崎県宮崎市学園木花台西 1-1

<sup>2</sup> 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科 感染防御学講座 微生物学分野

〒 890-8544 鹿児島県鹿児島市桜ヶ丘 8-35-1

<sup>3</sup> 九州大学大学院 医学研究院 細菌学分野

〒 812-8582 福岡県福岡市東区馬出 3-1-1

† 責任著者：三澤尚明

Tel & Fax: 0985-58-7284

Email: a0d901u@cc.miyazaki-u.ac.jp

### 【要約】

牛趾皮膚炎 (Bovine Digital Dermatitis : BDD) は跛行を呈する伝染性の蹄病で、病変内に多数のスピロヘータ様細菌が認められるが、真の原因菌は不明のままである。我々は、国内の8地域、12農場のBDD罹患乳牛80頭から91の病変部をバイオプシーにより採取し、スピロヘータの分離を試みた。その結果、2段階培養法により24頭(30%)のBDD病変から40株を分離した。分離株の16S rRNA遺伝子の塩基配列の解析から、*Treponema phagedenis* 基準株および米国や欧州でBDD病変から分離された*T. phagedenis* 類縁菌と99%以上の相同性を示した。これらの*T. phagedenis* 分離株は、供試した一部の抗菌剤に対し自然耐性を示したが、その他の薬剤には感受性を示した。BDD病変内に優勢に存在する細菌群を調べるため、16S rRNA 遺伝子をPCRで増幅した後、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16S rRNA 遺伝子の塩基配列を決定してホモロジー検索を実施し、健康牛の蹄踵部皮膚には存在せず、病変内にものみ分布する優性菌種を明らかにした。5頭のBDD病変から836個のクローンおよび4頭の健康牛の蹄踵部皮膚から689クローンを解析したところ、BDD病変のクローンの143クローンが*T. phagedenis* と、112クローンが*Bacteroidetes* と高い相同性を示した。一方、これらの優勢菌は蹄踵部皮膚からは検出されなかった。さらに、BDD病変内には複数のトレポネーマ属菌が検出された。以上の結果から、BDDはトレポネーマを中心とするポリマイクロナイアル感染症であることが示唆された。

**キーワード：**牛趾皮膚炎、トレポネーマ属菌、ポリマイクロナイアル感染症

### 緒論

牛趾皮膚炎 (Bovine Digital Dermatitis : 以下BDDと略す) は伝染性の強い蹄病で、1974年にイタリアにおいてCheliとMoratellaroによって初めて報告[2]されてから、ヨーロッパ諸国、北米等でその発生が確認されている[1,

16]。日本では1992年に群馬県での発生が木村らによって報告され[9]、以後、酪農地帯である北海道全域に加え、北海道からの導入牛を中心に全国的に発生が確認されている[11, 13, 17]。

保菌あるいは罹患牛の導入による牛舎内汚染と湿潤した牛舎環境等の発生要因が揃うと集団的発生が見られる。フリーストール牛舎のように罹患牛が舎内を自由に動ける畜舎環境での発

受理：2020年4月7日

生が多く認められる傾向がある [13]。前後肢ともに発生するが、特に後肢の蹄踵辺縁に好発し、病変の進行とともに外観が変化する。感染初期は境界明瞭なイチゴ状の発赤丘疹で、表皮のびらん・潰瘍なども認められ、しばしば疼痛と悪臭を伴う。次第に病変部はカリフラワー状あるいはイソギンチャク状の肉芽組織となり、表皮は乳頭腫状の外観を呈する。罹患牛は疼痛ストレスにより増体重および泌乳量の低下など生産性が低下することもあるため、経済的損失の高い感染症として重要視されている [15]。

BDD 病変部の表皮の剖面は乳頭状を呈し、病理組織学的には、有棘細胞層から角質層にかけて著しく増殖し、真皮乳頭の伸展を伴う乳頭腫様の組織像を示す。ワーチンスターリーまたは免疫組織化学的染色で観察すると、ラセン菌は角質層深部から有棘細胞層浅層の細胞間に多数認められる [4, 6, 12, 15]。このラセン菌は、電子顕微鏡観察による形態学的特徴と 16S rRNA 遺伝子の塩基配列の解析からトレポネーマ属菌であると考えられている [5, 8, 18] が、難培養性で培養に成功した例は極めて少なく、病変形成の再現性についても確認されていない。この他にも、形態の異なる複数の菌が病変内に確認されている [14, 19, 20] ことから、BDD はポリマイクロバイアル感染症 (polymicrobial infection) と考えられているが、真の原因菌は明らかにされていない。

本講演では演者がこれまでで行ってきた BDD の細菌学および分子生物学的解析、さらには分離に成功したトレポネーマの病原性について概説し、BDD の病態や治療・診断法に関する研究成果についても述べる。

## 材料と方法

### 1. 材料の収集

国内の 8 地域、12 農場の BDD 罹患乳牛 80 頭から 91 の病変部を採取し、供試材料とした。対照として、4 頭の健康牛の蹄踵部皮膚を食肉処理場にて採取した。採材には、直径 4～8mm の皮膚用バイオプシーパンチ (生検トレパン; カイ インダストリーズ株式会社、岐阜) を用いて 3 箇所から組織を採取し、細菌検査、病理組織検査および分子生物学的検査に供試した。

### 2. トレポネーマ分離培地および培養方法

バイオプシーした BDD 病変に付着した雑菌の増殖を抑制するために抗生剤を添加した輸送培地 [21] に病原入れて数日間 4℃ で静置した後、当研究室で考案した抗生剤を添加したトレポネーマ分離用平板培地 [21] に BDD 組織の剖面を直接スタンプし、アネロパック嫌気 (三菱化学、東京) を用いて 37℃、7～10 日間嫌気培養を行った。

### 3. トレポネーマの同定と形態観察

平板上の単一集落を純培養し、アルカリボイル法により DNA を抽出した。抽出した DNA を鋳型として、16S rRNA のユニバーサルプライマー (8F/16R) を用いた PCR を行い、増幅された遺伝子断片を精製した後、ダイレクトシーケンスを実施した。解読した塩基配列をジーンバンク (GenBank) に登録されている細菌の 16S rRNA 遺伝子配列とのホモロジー検索を実施し、分離された菌種を同定した。さらに、スピロヘータ様菌については、その形態および微細構造を透過型電子顕微鏡で観察した。

### 4. BDD 由来トレポネーマの薬剤感受性

BDD 病変内から主要原因菌の一つと考えられる *T. phagedenis* が分離されたことから、薬剤感受性試験を実施した。BDD 病変部から分離された *T. phagedenis* 株について、15 種類の抗生剤に対する最小発育阻止濃度 (Minimum Inhibitory Concentration; MIC) を微量液体希釈法により決定した [7]。

### 5. BDD 病変内に存在する細菌群の分子生物学的検査

BDD 罹患牛の病変部 5 検体を供試材料とした。対照として、正常な乳牛の蹄踵部皮膚 4 検体を用いた。BDD 病変および正常皮膚を外科用メスで細切し、ultraclean soil DNA isolation kit (MO BIO, USA) を用いて DNA を抽出した。それを鋳型として細菌の 16S rRNA 遺伝子を 2 組の異なるユニバーサルプライマーにより増幅した [23]。

プライマーは、27F (5'-AGAGTTTGATCMTG GCTCAG-3') と 1391R (5'-GACGGGCGGTGWGT

RCA-3'), および 27F と 1492R (5'-GGMTACCTT GTTACGACTT-3') の組み合わせで行った。プログラムは 94°C 2 分、94°C 1 分、55°C 1 分、72°C 2 分を 20 サイクル、72°C 5 分で行った。増幅産物は pT7 blue vector (TaKaRa BIO、東京) にライゲーション後、*E. coli* DH5 *a* にトランスフォームし、LB agar (BD, USA) 上で 28°C 48 時間培養した。得られた形質転換体をランダムに、プライマー 1 組について 96 クローン選択し、クローニングされた遺伝子 (16S rRNA) の塩基配列を Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems, USA) を用い、Genetic Analyzer (Applied Biosystems) により決定した。

なお配列の決定は T7 (5'-TAATACGACTCAC TATAGGG-3') および U19mer (5'-GTTTCCCA GTCACGACGT-3') プライマーを用い、両側から行った。得られた塩基配列はホモロジー検索 (BLAST search) を行って菌種の同定を行うと共に、配列の 99% の相同性を基準として SEQUENCHER (GeneCodes, USA) を用いてクラスター分析を行い、病変サンプル中の細菌群の比率を調べた。その結果、BDD サンプルで高頻度に認められるクローンに関しては、近縁であると考えられる細菌の 16S rRNA 遺伝子配列を GenBank から得て系統樹を作成 (neighbor-joining 法) し、その近縁関係を調べた。

## 6. 病理組織および免疫組織学的検査

BDD 病変部の病理組織学的検査を実施すると共に、病変部より分離した *T. phagedenis* (HT201 株) を家兎に免疫して作製した抗血清を用いて、BDD 病変組織内のトレポネーマ抗原の分布を調べた。

## 7. BDD 由来トレポネーマの細胞侵入性

BDD 由来 *T. phagedenis* (HT201 株) の培養細胞への侵入性を調べた。ヒト表皮角化細胞 (NHDK) およびヒト結腸癌由来上皮細胞 (Caco-2) を多孔性フィルター上でコンフルエントになるまで培養後、供試菌株の生菌又は加熱死菌を細胞の頂上側から接種し、経時的な経上皮抵抗値 (TEER 値) の測定と通過菌の確認を行った。また、細胞間接着分子 (ZO-1)

の発現を菌接種前後で比較した。対照として、ヒト由来 *T. phagedenis* ATCC 27087 および *T. denticola* JCM 8225 を供試した。

## 結 果

### 1. 病理組織および免疫組織学的検査

表皮は有棘細胞層から角質層にかけて著しく増殖し、角質層は錯角化による有核の細胞が認められた。表皮は過形成により、真皮乳頭の著しい伸展を伴う乳頭腫様の組織象を呈していた。らせん菌を検出するためにワーチンスターリー染色を行ったところ、角化深層から有棘細胞層浅層の細胞間に多数のらせん菌が認められた。

BDD 病変部より分離した *T. phagedenis* HT201 株を家兎に免疫して作製した抗血清を用いて、BDD 病変組織内のトレポネーマ抗原の分布を調べた結果、ワーチンスターリー染色の結果と一致した所見が得られた。

### 2. BDD 病変部からの菌分離・同定と形態の特徴

トレポネーマ様大型スピロヘータは BDD 罹患乳牛 24 頭から分離され、これらの 16S rRNA 遺伝子塩基配列を解析したところ、全ての分離株は 99% 以上の相同性を示し、ホモロジー検索の結果、いずれも *T. phagedenis* 2-1498 株と最も高い相同性を示した。2-1498 株は、米国で BDD 病変から分離されたトレポネーマである。分離されたトレポネーマはいずれもカタラーゼ陰性、オキシダーゼ陰性、弱い  $\beta$  溶血性を示した。

BDD 病変から分離された *T. phagedenis* を透過型電子顕微鏡で観察したところ、トレポネーマの特徴である軸糸が菌体周囲に 8 本認められた。菌体の幅は 0.4 から 0.6 ミクロン、長さは 6 から十数ミクロンあった [21]。

### 3. BDD 由来トレポネーマの薬剤感受性

被検菌株は採材地に関係なく、ほぼ同様の薬剤感受性を示した。最も高い感受性を示した薬剤は、ペニシリン G、アンピシリン、エリスロマイシンで、次いでクロラムフェニコール、オキシテトラサイクリンに感受性を示したが、クロラムフェニコールに耐性を示す株も 1 株認められた。リンコマイシンおよびエンロフロキサ

シンに対する MIC 値は 6.25 ~ 25 $\mu$ g/ml であった。カナマイシン、ストレプトマイシン、リファンピシン、スルファメトキサゾール、トリメトプリムおよびコリスチンに対してはいずれも MIC 値は 100 $\mu$ g/ml 以上であった [22]。

#### 4. BDD 病変内に存在する細菌群の分子生物学的解析

BDD 病変部および健康な蹄踵部皮膚から抽出した DNA を鋳型として、16S rRNA 遺伝子を認識する 2 組の異なるユニバーサルプライマーを用いて増幅した PCR 産物の塩基配列を合計 1525 クローン決定し、ホモロジー検索を行った。5 頭の BDD 病変から 836 個のクローンおよび 4 頭の健康牛の蹄踵部皮膚から 689 クローンを解析したところ、BDD 病変のクローンの 143 クローンが *T. phagedenis* と、112 クローンが *Bacteroidetes* と高い相同性を示した。一方、これらの優勢菌は蹄踵部皮膚からは検出されなかった。16S rRNA 遺伝子の塩基配列の解析で、トレポネーマと高い相同性を示したクローンについて、系統分類学的解析を行ったところ、BDD 病変内には 3 菌種 (*Treponema vincentii*, *T. phagedenis*, *T. denticola*) が優勢に分布していた。一方、正常皮膚からもトレポネーマは検出されたが、病変部から検出される菌種とは異なっていた [23]。

#### 5. BDD 由来トレポネーマの細胞侵入性

*T. denticola* は NHDK および Caco-2 を用いても菌接種後に TEER 値は継時的に低下し、ZO-1 の発現も著しく減少するとともに多数の通過菌が確認された。一方、いずれの細胞を用いても BDD 由来 *T. phagedenis* HT201 株は菌接種後も TEER 値は低下せず、ZO-1 の発現にも変化は認められなかったが、両細胞を貫通したことが確認された。よって、*T. phagedenis* ではエンドサイトーシスによる細胞内取り込みにより基底膜側に到達する経路が示唆された (未発表データ)。

### 考 察

BDD は北海道から九州にかけて広く乳牛に浸潤していることが明らかにされた。一般に BDD 病変は急性期にはイチゴ状と形容される

赤色の潰瘍を呈するが、慢性化するとイソギンチャク様と形容される灰色ないし茶色の病変を形成することが知られている [13]。今回の我々の調査では、個々の病変発生の時期や病変部全体像に関する情報が不足していたため、病変のステージの差異を確認することはできなかった。病変部のステージによって組織像も変化している可能性があり、その確認は今後の課題である。

BDD 病変の病理組織学的観察では、*Treponema* 様大型らせん菌は表皮表層から錯角化した上皮細胞深部にかけて観察され、組織中で最も高頻度に認められた。大部分の検体において、らせん菌の侵入は細胞質に豊富にケラチンを含む錯角化層に限局し、顆粒層、有棘層との境界で停滞していた。有棘細胞間や真皮にも多数のらせん菌が観察されるという報告 [4, 6, 10] があるが、今回の我々の調査では、潰瘍により有棘細胞層や真皮が表面部に露出あるいはそれに近い状態の場合において、それらの組織中にらせん菌が侵入していることを確認した。過形成を起こした上皮が厚く、有棘細胞層や真皮が深部にとどまる場合は、らせん菌の侵入は表皮に限られることから、らせん菌の侵入深度にはある程度の限界が存在すると考えられた。また上皮細胞間を埋め尽くすように多数観察されるらせん菌は、時に細胞質内に侵入しているようにも見えるが、これは光学顕微鏡検索切片がある程度の厚みをもつためとも考えられるので、超薄切片を用いた電子顕微鏡によるさらなる観察が必要であろう。

今回実施した免疫組織化学染色の結果、PDD 病変部には高頻度に抗 HT201 抗体に反応する抗原が存在していたが、正常蹄皮膚では検出されなかった。また抗原が確認された部位はワーチンスターリー染色で見られたトレポネーマ様らせん菌の位置とほぼ一致しており、病変内に観察されたトレポネーマ様らせん菌は *T. phagedenis* HT201 株と免疫学的に交差することが示唆された。

今回種々の培地を用いてトレポネーマの分離を試みたが、分離に成功したのは、抗生剤を添加した増菌培地内で 4℃下で数日サンプルを浸漬した後に抗生剤を含むトレポネーマ分離用平板に直接塗抹する方法であった。抗生剤を添加

しないと、トレポネーマ以外の細菌が優位に増殖・遊走し、トレポネーマを分離することはできなかった。選択剤を含んだ増菌培地内で病変部を低温下で静置することによりトレポネーマ以外の多くの菌が死滅するため、平板培地でのトレポネーマの増殖が阻害されないことが分離率の向上の原因であると考えられた。今後は、分離されたトレポネーマの薬剤感受性を調べ、より選択性の高い培地の作製を行うことが必要である。

BDD 病変部から分離された大型のスピロヘータ様らせん菌は、それらの 16S rRNA 遺伝子の塩基配列の比較解析から、いずれも *T. phagedenis* に近縁種であることが分かった。*T. phagedenis* は、ヒトの口腔内に存在するトレポネーマであるが、その病原性は明らかにされていない。トレポネーマ属菌以外の細菌としては、バクテロイデス属菌やカンピロバクターなどの糞便由来と考えられる細菌が分離された。これらの結果は、これまでに他の研究者が行った細菌学的検査結果とほぼ同じものであった。一方、病変部が蹄底部に形成されることもあって、病変部は常に土壌や糞便で汚染されているため、今回行った培養方法では、BDD 病変内に存在する優勢菌種を特定することは困難であった。さらに、培養不能菌あるいは難培養性の細菌の存在も考えられるため、人工培地を用いて全ての細菌を分離培養することは不可能である。したがって、BDD 病変内に存在する優勢菌を特定するためには、分子生物学的手法を用いた網羅的な解析を実施する必要がある。

BDD 病変部位に存在する細菌（群）の網羅的解析結果により、トレポネーマ属菌が最も優勢に検出されたが、一方でその他の複数の嫌気性細菌も病変部から検出された。分離されたトレポネーマは、ヒトの口腔内トレポネーマである *T. phagedenis* に近縁種であった [23]。BDD 病変から分離された *T. phagedenis* には培養細胞を貫通する能力を有することから、病原性を有し、BDD の病態に関与することが示唆された。さらに、*T. phagedenis* 近縁種とは異なる複数の難培養性トレポネーマも同一の病変内に存在していた。以上の結果から、BDD はトレポネーマを中心としたポリミクロバイアル感染症であることが裏付けられた。興味深いことに、

BDD 病変内に検出された構成菌種は、ヒトの歯周病から検出される構成菌種と類似しているとの報告 [3.] がある。

BDD の治療に関しては、オキシテトラサイクリン、リンコマイシン、ペニシリン系およびセファロsporin系薬剤の全身、あるいは局所投与で治療することが報告されている。今回 BDD 病変から分離された *T. phagedenis* に対する MIC を測定したところ、ペニシリン系薬剤、オキシテトラサイクリンには高い感受性を示し、臨床現場における治療効果と一致する結果となった。

感染症の成立要因として、1. 感染源、2. 感染経路、3. 感受性宿主の3要素が挙げられ、どれか一つの要因が欠けても感染は成立しない。この点に関しても BDD では感染源および感染経路を特定するまでには至っていない。したがって、BDD の病態を明らかにするためには、BDD がポリミクロバイアル感染症であるという視点に立ち、発症の原因となる複数の病原体を対象とした解析を進める事が重要である。

## 引用文献

- [1] Blowey, R. W., Done, S. H. and Cooley, W. 1994. Observations on the pathogenesis of digital dermatitis in cattle. *Vet. Rec.* 135: 115–117.
- [2] Cheli, R. and Mortellaro, C. M. 1974. La dermatite digitale del bovino, pp.208–213. *In* P. Gallarati ed. *Proceedings of the 8th International Conference on Diseases of Cattle. International Conference on Diseases of Cattle, Piacenza, Italy.*
- [3] Choi, B. K., Nattermann, H., Grund, S., Haider, W. and Gobel, U. B. 1997. Spirochetes from digital dermatitis lesions in cattle are closely related to treponemes associated with human periodontitis. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47: 175–181.
- [4] Cruz, C. E., Pescador, C. A., Nakajima, Y. and Driemeier, D. 2005. Immunopathological investigations on bovine digital epidermitis. *Vet. Rec.* 157: 834–840.
- [5] Demirkan, I., Carter, S. D., Hart, C. A. and Woodward, M. J. 1999. Isolation and cultivation of a spirochaete from bovine digital dermatitis. *Vet. Rec.*, 145: 497–498.
- [6] Doepfer, D., Koopmans, A., Meijer, F. A., Szakall, I., Schukken, Y. H., Klee, W., Bosma, R. B., Cornelisse, J. L., van Asten, A. J. and ter Huurne, A. A. 1997.

- Histological and bacteriological evaluation of digital dermatitis in cattle, with special reference to spirochaetes and *Campylobacter faecalis*. *Vet. Rec.* 140: 620–623.
- [7] Evans, N. J., Brown, J. M., Demirkan, I., Birtles, R., Hart, C. A. and Carter, S. D. 2009. *In vitro* susceptibility of bovine digital dermatitis associated spirochaetes to antimicrobial agents. *Vet. Microbiol.* 136: 115–120.
- [8] Evans, N. J., Brown, J. M., Demirkan, I., Murray, R. D., Vink, W. D., Blowey, R. W., Hart, C. A. and Carter, S. D. 2008. Three unique groups of spirochetes isolated from digital dermatitis lesions in UK cattle. *Vet. Microbiol.* 131: 141–150.
- [9] Kimura, Y., Takahashi, M., Matsumoto, Tsukuda, H., Sato, M., Ohgawara, K., Kanoe, M., Goto, N., Aoki, O. and Hataya, M. 1993. Verrucose dermatitis and digital papillomatosis in dairy cows. *Jpn. J. Vet. Med.* 46: 899–906.
- [10] Klitgaard, K., Boye, M., Capion, N. and Jensen, T. K. 2008. Evidence of multiple treponema phylotypes involved in bovine digital dermatitis as shown by 16S rRNA gene analysis and fluorescence in situ hybridization. *J. Clin. Microbiol.* 46: 3012–3020.
- [11] 永井文紀, 太田浩運, 藤本勝久, 阿部英雄, 宗像 巧, 安倍健彦, 田中 実, 伊藤 篤, 山本康朗, 安藤達哉, 小岩政照, 谷山弘行, 菊池直哉, 草場信之. 2000. トレポネーマ様らせん菌による乳牛の疣状皮膚炎および趾乳頭腫症の集団発生. *日獣会誌*. 53: 577–581.
- [12] Nordhoff, M., Moter, A., Schrank, K. and Wieler, L. H. 2008. High prevalence of treponemes in bovine digital dermatitis-A molecular epidemiology. *Vet. Microbiol.* 131: 293–300.
- [13] 大竹 修. 2003. わが国の乳牛に多発する肢蹄疾患. *山口獣医学雑誌*. 30: 41–50.
- [14] Ohya, T., Yamaguchi, H., Nii, Y. and Ito, H. 1999. Isolation of *Campylobacter sputorum* from lesions of papillomatous digital dermatitis in dairy cattle. *Vet. Rec.* 145: 316–318.
- [15] Read, D. H., Walker, R. L., Castro, A. E., Sundberg, J. P. and Thurmond, M. C. 1992. An invasive spirochaete associated with interdigital papillomatosis of dairy cattle. *Vet. Rec.* 130: 59–60.
- [16] Rebhun, W. C., Payne, R. M., King, J. M., Wolfe, M. and Begg, S. N. 1980. Interdigital papillomatosis in dairy cattle. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 177: 437–440.
- [17] Shibahara, T., Ohya, T., Ishii, R., Ogihara, Y., Maeda, T., Ishikawa, Y. and Kadota, K. 2002. Concurrent spirochaetal infections of the feet and colon of cattle in Japan. *Aust. Vet. J.* 80: 497–502.
- [18] Walker, R. L., Read, D. H., Loretz, K. J. and Nordhausen, R. W. 1995. Spirochetes isolated from dairy cattle with papillomatous digital dermatitis and interdigital dermatitis. *Vet. Microbiol.* 47: 343–355.
- [19] Warnick, L. D., Nydam, D., Maciel, A., Guard, C. L. and Wade, S. E. 2002. Udder cleft dermatitis and sarcoptic mange in a dairy herd. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 221: 273–276.
- [20] Wyss, C., Dewhirst, F. E., Paster, B. J., Thurnheer, T. and Luginbuhl, A. 2005. *Guggenheimella bovis* gen. nov., sp. nov., isolated from lesions of bovine dermatitis digitalis. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 55: 667–671.
- [21] Yano, T., Yamagami, R., Misumi, K., Kubota, C., Moe, K.K., Hayashi, T., Yoshitani, K., Ohtake, O., Misawa, N. 2009. Genetic heterogeneity among strains of *Treponema phagedenis*-like spirochetes isolated from dairy cattle with papillomatous digital dermatitis in Japan. *J. Clin. Microbiol.* 47: 727–733.
- [22] Yano, T., Moe, K. K., Chuma, T. and Misawa, N. 2010. Antimicrobial susceptibility of *Treponema phagedenis*-like spirochetes isolated from dairy cattle with papillomatous digital dermatitis lesions in Japan. *J. Vet. Med. Sci.* 72: 379–382.
- [23] Yano, T., Moe, K. K., Yamazaki, K., Ooka, T., Hayashi, T. and Misawa, N. 2010. Identification of candidate pathogens of papillomatous digital dermatitis in dairy cattle from quantitative 16S rRNA clonal analysis. 143: 352–362.

## Elucidation of the etiology of bovine digital dermatitis as a polymicrobial infection

Naoaki Misawa<sup>1†</sup>, Takako Taniguchi<sup>1</sup>, Tadasuke Ooka<sup>2</sup>, Yasuhiro Goto<sup>3</sup>, Tetsuya Hayashi<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Center for Animal Disease Control, University of Miyazaki  
1-1 Gakuenkibanadai-nishi, Miyazaki 889-2192, Japan

<sup>2</sup>Department of Microbiology, Graduate School of Medical and Dental Sciences, Kagoshima University  
8-35-1 Sakuragaoka, Kagoshima 890-8544, Japan

<sup>3</sup>Department of Bacteriology, Graduate School of Medical Science, Kyushu University  
3-1-1 Maidashi, Higashi-ku, Fukuoka 812-8582, Japan

<sup>†</sup>Corresponding to: Naoaki MISAWA

### **[Abstract]**

Bovine digital dermatitis (BDD) is a foot infectious disease causing lameness in dairy cattle. Although a large number of spirochetes are observed in the lesions, the etiology of BDD is not yet fully understood. We collected 91 lesions of BDD from 80 dairy cattle on 12 farms in 8 regions of Japan to isolate the spirochetes detected in lesions. We isolated 40 strains of *Treponema phagedenis*-like spirochete from 24 cattle (30.0%) by a simple two-step culture technique. The antimicrobial susceptibility test of *T. phagedenis* suggested that no isolate had acquired resistance to the antimicrobial agents examined, although they may have natural resistance to some agents. Sequencing of the 16S rRNA gene showed that all strains isolated had >99% identity to those of the *T. phagedenis* type strain and of *T. phagedenis*-like strains isolated from BDD lesions in the USA and Europe. To study the bacterial community, we used 16S rRNA gene sequencing of randomly selected clones based on PCR with minimum amplification cycles to search for organisms present in BDD lesions but not in healthy foot skin. The nucleotide sequences of 1525 clones from 5 BDD lesions (836 clones) and 4 samples of healthy foot skin (689 clones) were determined. Two operational taxonomic units (OTUs), P-01 (143 clones; 100% nucleotide sequence identity with *T. phagedenis*) and P-02 (112 clones; 86% identity with *Bacteroidetes*), were detected most frequently in all BDD samples examined. Detection of multiple treponemes and an unknown bacterium close to *Bacteroides* sp. at high rates by a culture-independent approach could be evidence of the association of these organisms with BDD as a polymicrobial infection.

**Keywords:** bovine digital dermatitis, *Treponema* species, polymicrobial infection