

令和 2 年 5 月 28 日現在

機関番号：30109

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09243

研究課題名(和文) アニマルセラピーにおける動物由来感染症起因細菌の網羅的検索

研究課題名(英文) Comprehensive search of anthropozoonotic bacteria isolated from oral cavities of therapy dogs and their owners

研究代表者

村松 康和 (Muramatsu, Yasukazu)

酪農学園大学・獣医学群・教授

研究者番号：50254701

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：飼い主口腔内細菌叢とイヌ口腔内細菌叢に関する分析により、飼い主は犬飼育歴のない人と比べ、イヌとの共通細菌が微増する事が分かった。飼い主 イヌの1ペアでStaphylococcus schleiferi が同定された。飼い主の口腔内細菌叢は犬飼育歴のない人と比較して多様で、飼い主 イヌ間の細菌伝播が示唆された。本調査においてもイヌ口腔内から人獣共通感染症細菌Bergeyella zoohelcumが検出された。一時的な接触にとどまるアニマルセラピー対象者の口腔内へセラピー犬から細菌伝播が起こる可能性は低い、免疫力低下者が対象となる点を踏まえ、アニマルセラピーにおいては十分な衛生指導が必要である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

高齢化社会の進行に伴い需要が増加しているアニマルセラピーの中心的存在であり、人間社会で最も身近な伴侶動物である犬口腔内由来の感染症起因細菌を対象として、その分布状況とヒト口腔内細菌叢との関連性を明らかにした。口腔内細菌叢は人の健康と密接にかかわることから、高齢化社会におけるQuality of lifeの維持向上に果たす役割は大きい。本調査結果によって、一時的な接触にとどまるアニマルセラピー対象者の口腔内へセラピードッグから細菌伝播が起こるリスクは低いことが示された。一方、免疫力の低下したヒトが主たる対象者であることから、アニマルセラピーにおける十分な衛生指導を行う必要がある。

研究成果の概要(英文)：We compared therapy dogs and their owners for oral microbiome as a model for bacterial transmission between therapy dogs and people who receive animal-assisted therapy by using the MALDI-TOF MS system and next generation sequencer.

Unweighted principal coordinate analysis of the abundance rate showed definite clustering among NC group, dog owners, and their dogs. Bacterial flora in oral cavities of dog owners showed diversity higher than those of NC group. Staphylococcus schleiferi was isolated from a pair of the dog owner and the owner's dog. The sequencing analysis for the 16S rDNA of these Sta. schleiferi isolates showed the 100% similarity. We detected B. zoohelcum in oral cavities of therapy dogs in close contact with older people residing in nursing homes. We have provided information on dog-assisted therapy to improve the relationship between humans and animals in aging societies, particularly for preventive healthcare of older people living in nursing care facilities.

研究分野：獣医学

キーワード：獣医公衆衛生 ヒューマン・アニマルボンド

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ヒトの口腔内細菌叢は口腔疾患のみならず全身疾患との関連性が報告されている。また人、そして人と身近に暮らす動物との間で口腔内病原細菌の授受が強く示唆され、公衆衛生上の懸念となっている。近年、メンタルヘルスの重要性が認知されるに伴いアニマルセラピーの社会的注目度と需要が高まっている。一方、アニマルセラピーを必要とする人々は主に高齢者など、免疫能が低下した感染症に対する高リスク群であることが懸念される。従来の培養法や遺伝子解析手法のみでは細菌叢を構成する膨大な数の菌種同定は極めて困難で、日本ではヒトおよび動物における口腔内細菌叢の相互関連に関する知見は乏しい。

近年、マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析システム(MALDI-TOF MS)が高精度な菌種同定を可能とし[1, 2]、申請者は国内のイヌで未同定だった人獣共通感染症原因菌 *Bergeyella zoohelcum* を口腔内から分離した[3]。また、16S rRNA 遺伝子解析による難培養菌の同定は信頼性が高く[4]、次世代シーケンサー(next generation sequencer: NGS)は、培養不可能菌を含む多菌種の同定を可能にした[5, 6]。

2. 研究の目的

MALDI-TOF MSによる菌叢解析ならびにイヌ由来細菌分離株の菌種同定における有用性について検討することを目的として、飼育犬(セラピードッグ)とその飼い主から分離した菌株について MALDI-TOF MSにより菌種を同定し、その結果とNGSによる菌叢解析結果の比較を行った。

アニマルセラピー対象者とセラピードッグ間の細菌伝播の可能性について調べる為に、その検証モデルとして、飼い主とセラピードッグにおける口腔内細菌叢の比較を行った。

3. 研究の方法

2017年9月から2018年9月にかけてセラピードッグ適性検査に参加した飼い主87人、飼育犬82匹、及び10年以上ペット飼育歴のないヒト(Negative Control; NC)5人の口腔内スワブサンプルから分離したヒト由来803菌株の細菌とイヌ由来668菌株をMALDI Biotyper(Bruker Daltonics; 以下Biotyper)を用いて菌種同定した。Biotyperで同定した菌株を一部選択し16S rRNA領域を対象としたPCR-シーケンシングによる菌種の確認を行った。飼い主 イヌ双方に共通の菌種は、16S rRNA シーケンスに基づく相同性解析を行った。犬及び飼い主の10ペアとNC5人のスワブ由来DNAを鋳型として、NGS(MiSeq; Illumina)を用いて得られたデータに基づく細菌叢解析を行い、得られたデータに関して以下の統計解析を実施した。

サンプル提供者から任意で年齢、性別、イヌの種類、ヒトおよびイヌの歯磨き回数、日常の接触度についてのアンケート調査を行った。年齢については25歳以下を若齢、26~40歳を成年、41~65歳を壮年、66歳以上を高齢とした。歯磨き回数についてヒトは1日当たりの回数、イヌは週当たりの回数を集計した。イヌの歯磨きに関して、ブラッシングではなく市販の犬用ガムやスプレーなどを用いている場合は歯磨き回数には含まなかった。接触度については、“キスをする”、“口移しで食べ物を与える”、“同じ部屋で寝る”の選択肢について各1点とし、接触度における合計点をピアソンの積率相関係数および回帰分析を用いてNGSで得られたデータとの相関を求める際に用いた。

NGSの解析データについて、1000read以上ある菌属、またBergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria[7]を用い、1000read以上ある菌属のうち、本研究で用いた細菌の培養条件で発育を否定できない菌属を解析データから選びそれぞれ比較に使用した。Biotyperの結果とNGSの結果比較にはMorisita指数を使用し[8, 9]、解析ソフトは統計解析ソフトR v3.5.0を使用した。(https://www.r-project.org/)

飼い主群とNC群に占める、イヌ群と共通するOperational taxonomic unit(OTU)の割合については、飼い主群とNC群についてそれぞれの群の全OTU数に占める犬と共通なOTU数の割合を示すベータ分布を作成し、それぞれの分布から無作為に1サンプルずつ抽出した値を比較し、飼い主群 - イヌ群と共通するOTUの検出確率およびNC群 - イヌ群で共通するOTUの検出される確率比較の為、サインテストを実施した。それぞれのペア間に共通したOTU数とアンケートとの関係についてピアソンの積率相関係数及び回帰分析を用いて相関を調べた。

1サンプルに含まれる細菌数の推定値についてはChao1 index およびACE indexの計算式を用いて算出し、これらの群間における有意差はウィルコクソンの順位和検定を行って求めた。各群のもつ細菌叢多様性についてはShannon indexとSimpson indexを用いて多様性を求めた。また、NGSによる16S rRNA シーケンスの微生物群集解析データを用いて、微生物群集解析用プログラムQIIME(http://qiime.org/)を用いた主座標分析(Principal Coordinate Analysis; PcoA)を行って多様性を求めた。

4. 研究成果

(1) ヒト由来細菌について、Biotyperにより774菌株(96.4%)を菌属レベルで同定でき、そのうち709菌株(88.2%)は菌種レベルで同定できた(計14菌属45菌種)。イヌ由来細菌については422菌株(63.1%)を菌属レベルで同定でき、そのうち287菌株(42.9%)は菌種レベルで同定できた(計19菌属35菌種)。Biotyperにより菌種レベルで同定された飼い主由来分離菌及びイヌ由来分離菌株のうち、飼い主 イヌの1ペアで *Staphylococcus schleiferi* が同定され、両者の16S rRNA シーケンスは100%一致した。本菌による感染症例報告は、イヌを含め獣医療域

で増加していることから[10, 11]、今後の発生動向に注意が必要である。また、本研究期間内に分離した犬の口腔内スワブ由来菌株においても *B. zoohelcum* を同定し、本菌が我が国のイヌ口腔内に定着していることを明らかにした[12]。*B. zoohelcum* は主にイヌ、ネコの咬傷によりヒトに様々な症状を引き起こすが、高齢者においては咬傷ではなく、イヌ、ネコとの長期接触による感染症例が知られている [13-15]。本菌については最近、イヌとのキスから AIDS 患者が菌血症を呈したことが報告されている[16]。さらに初検出時とは使用培地が異なったことによる検出率の相違から、本菌検出用培地作出に関する萌芽的知見を得た[12]。

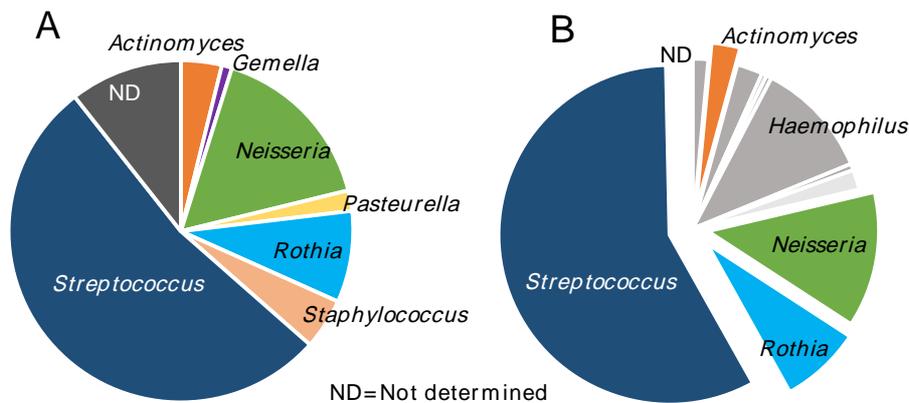


図1 . 飼い主における Biotyper の菌種同定結果と NGS 結果の比較 . パネル A: Biotyper による菌種同定結果、パネル B: NGS による菌叢同定結果 . 両菌叢の類似度を表す Morisita 指数は 0.9726 で、Biotyper による菌種同定結果と NGS による菌叢解析結果の高い類似性が認められた .

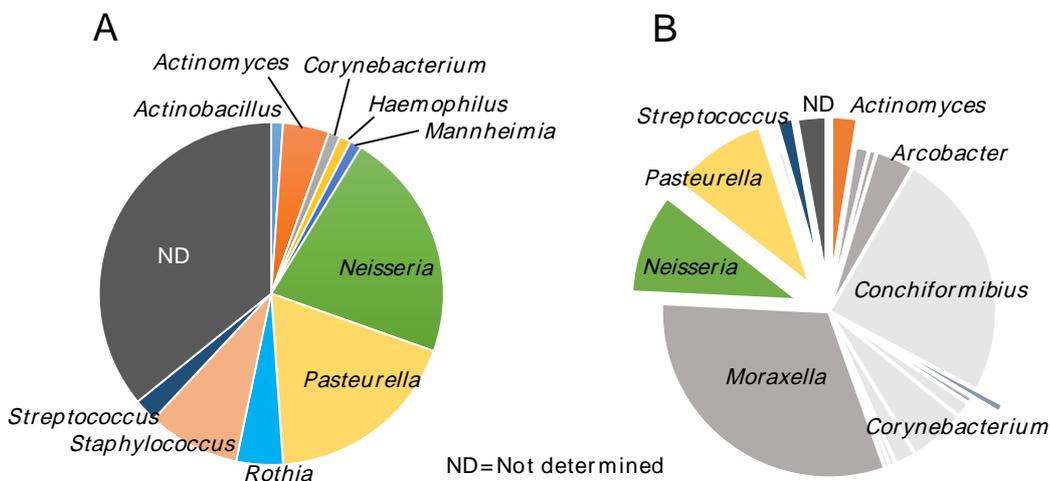


図2 . イヌにおける Biotyper の菌種同定結果と NGS 結果の比較 . パネル A: Biotyper による菌種同定結果、パネル B: NGS による菌叢同定結果 . Morisita 指数は 0.2522 で、ヒトの場合(図 1) と異なり、Biotyper、NGS 双方による菌種同定結果による顕著な類似性は認められなかった .

(2) 選定した 10 ペアのサンプルについて、Biotyper による同定結果と NGS により得られた細菌叢解析結果を比較したところ、同定菌は属レベルで 100%の一致が見られ、NGS ではより多様な菌叢構成が認められた。NGS 解析により各群で見られた主要な細菌の属は、飼い主群では *Streptococcus* が 41.2%で最も多く、次いで *Neisseria* が 9.2%、*Haemophilus* が 8.0%であった。NC 群では *Streptococcus* が 42.0%で最も多く、次いで *Haemophilus* が 17.5%、*Gemellaceae* が 5.9%であった。イヌ群では *Porphyromonas* が 18.7%で最も多く、次いで *Moraxella* が 9.0%、*Conchiformibius* が 7.1%であった。

Biotyper では NGS に使用したサンプルから分離した菌の菌属レベルでの結果を、NGS ではそのデータから今回の培養条件での生育を否定できない、1000read 以上の菌を選別し、Biotyper による同定結果と結果と NGS による細菌叢解析結果の類似性を解析したところ、ヒト由来サンプルで Morisita 指数は 0.9726 と高い類似性を示した(図 1)。我々の調査で用いた NGS (Miseq、及び 16S rRNA 領域を標的としたプライマーを使用) に基づく菌叢解析能力は、他の NGS 機器、あるいは他の 16S rRNA のターゲット領域による菌叢解析の場合と比べて全く遜色のないことから[17]、MALDI-TOF MS システムによるヒト口腔内由来菌種の同定感度については一定の水準を

期待してよいものだと思われる。イヌ由来サンプルでは Morisita 指数は 0.2522 で、その類似性は低かった(図 2)。その要因として、イヌ由来細菌については Biotyper のライブラリ構成が類似性の低下に参与していることが示された。以上から MALDI-TOF MS システムは NGS と併用することで菌叢解析の正確性をより高めることができる。MALDI-TOF MS システムの導入により、イヌ口腔内由来細菌の同定効率が飛躍的に向上したことに疑いの余地はない。更なるライブラリ構成の充実を図ることが、動物由来菌の同定率向上のカギとなる。未知の菌種、あるいは検出がまれな菌種の分離・同定には新たな培地開発も重要である。

(3) NGS 解析により、飼い主 10 検体から 8,645OTU、イヌ 10 検体から 18,536OTU、及び NC5 検体から 1,787OTU 検出された。飼い主とイヌにのみ共通だったのは 1700OTU (図 3、A) 3 群すべてで共通したのは 1970OTU (図 3、B) NC とイヌでのみ共通だったのは 290OTU であった(図 3、C)。飼い主 - イヌの 1 ペア当たりの共通 OTU は平均 46.80OTU であった。飼い主 - イヌ間のペアで見られた OTU の種類は 2040OTU であり、このうち菌種まで同定できたのは 170OTU であった(図 3)。その中には、一般的に人の口腔内には見られずイヌの咬傷感染に関連する *Str. minor* [18] が認められたほか、ヒトの歯周病などに関連する *Por. endodontalis* [19]、*Prevotella intermedia* [20]、*Selenomonas noxia*[21]、*Treponema socranskii* [22] が認められた。これらの共通 OTU 数と飼い主の 1 日あたりの歯磨き回数には弱い負の相関が見られ ($r=-0.36$ 、 $R^2=0.1294$) 飼い主 - イヌ間の接触度には弱い正の相関がみられた ($r=0.25$ 、 $R^2=0.064$)。イヌの 1 週間あたりの歯磨き回数との相関は認められなかった ($r=-0.082$ 、 $R^2=0.0068$)。これらのことから、イヌとの細菌伝播の防御には飼い主自身の口腔衛生管理が寄与すること、及びイヌと濃厚な接触を行うヒトは接触が少ない人に比べて細菌の伝播が起こりやすく、保有するイヌとの共通細菌がわずかながら増加する事が分かった。

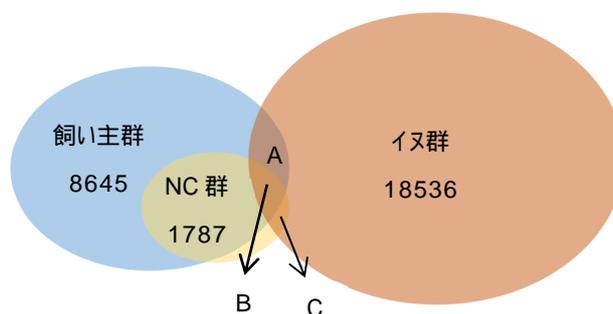


図 3 . NGS による群衆解析で得られた飼い主、イヌ、及び NC 各群の OTU 数、ならびに共通領域における OTU 数 . A、B、及び C 各共通領域の OTU 数は以下の通り . A (飼い主とイヌのみに共通) :170、 B (全群で共通) :197、及び C (NC とイヌのみに共通) :29.

(4) 各サンプルから取得したデータに基づいた PCoA による 多様性解析の結果、各サンプルを構成する OTU と各 OTU に含まれる存在量を考慮した比較を行う weighted の結果では、ヒト群とイヌ群の 2 つにクラスタリングされたが、各サンプルを構成する OTU にのみ注目した比較を行う unweighted の結果ではイヌ群、飼い主群、NC 群の 3 群にクラスタリングされた(図 4)。これらの知見から、飼い主とイヌとの間で共有される細菌種は、飼い主とイヌの双方において主要な口腔内細菌叢構成細菌ではなく、少数派に属することが強く想起された。

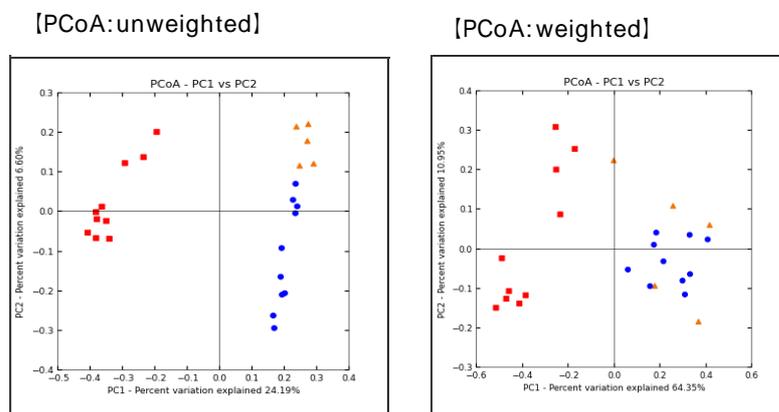


図 4 . 主座標分析 (PCoA) による NGS 結果の 多様性解析 . 各 OTU の存在割合を考慮しない unweighted の解析では飼い主と NC でクラスタリングされるが、存在割合を考慮した weighted の解析ではひとつにまとまった . 赤い四角 : イヌ群、青い丸 : 飼い主群、黄色の三角 : NC 群 .

(5) 多様性解析では、0以上の値をとり、種数が多く、種均等度が高い程、値が大きくなる Shannon index において、イヌ群が最も高く平均 5.53、次いで飼い主群は平均 4.10、NC 群が平均 3.41 という結果となった。ランダムに選んだ 2 本のリードが同じ OTU に属する確率を基にした指数で、0~1 の値をとり、種数が多く、種均等度が高い程、値が 1 に近づくため、優占種の個体数の違いにより数値の変動が大きい Simpson index においても、イヌで最も高く平均 0.91、次いで飼い主群で平均 0.81、NC 群で平均 0.73 となった。得られた OTU 数、singleton、doubleton の数を用いてサンプルに本来含まれている全種数を推定した値である Chao1 index では、1 サンプル当たりの推定平均数がイヌで 8,508、飼い主で 3,919、NC で 1,224 であった。11 リード以上で構成される OTU 数に、10 リード以下で構成される OTU 数、及び、singleton の数を使用して、サンプル中に新たに発見され得る種の数をもとにサンプルに本来含まれている全種数を推定する ACE index では、1 サンプル当たりの推定平均種数がイヌで 9,004、飼い主で 4,037、NC で 1,204 であった。ヒトにおいて、推定される細菌種数の差の有無についてウィルコクソンの順位検定を行ったところ、Chao1 index と ACE index とともに飼い主群と NC の間で優位な差が求められた (Chao1 index : $p=0.002$ 、ACE index : $p=0.005$)。飼い主群は NC 群と比べ多様な細菌叢を有していた。飼い主の口腔内細菌叢は犬を飼っていない人と比較して多様性を有すること、及び飼い主 イヌ間で細菌伝播が起こる事が示唆された。さらに、研究成果(1)より、一部は生菌としての伝播が起こった可能性が示された。

世界人口の高齢化が進んでおり[23]、長寿化に伴い認知症などの慢性疾患の患者数も増加している[24]。高齢者人口の増加と慢性疾患患者数の増加に伴い、アニマルセラピーの需要はますます高まるものと思われる。人獣共通感染症は、動物介在療法に潜在するリスクである[25]。一時的な接触にとどまるアニマルセラピー対象者の口腔内へセラピードッグから細菌伝播が起こる可能性は低い、免疫力の低下したヒトと接することを踏まえ、アニマルセラピーにおいては十分な衛生指導が必要であると考えられる。

<引用文献>

1. Cheng WC, Jan IS, Chen JM, Teng SH, et al. *J. Clin. Microbiol.* 53: 1741-4, 2015.
2. Dubois D, Segonds C, Prere MF, Marty N, Oswald E. *J. Clin. Microbiol.* 51: 1861-7, 2013.
3. 村松 康和、内田 玲麻、堀内 基広 他. 第 158 回 日本獣医学会学術集会 2015.
4. Oliveira MGM, Abels S, Zbinden R, Bloemberg GV, et al. *BMC Microbiol.* 13: 162, 2013.
5. Dewhirst FE, Klein EA, Thompson EC, Blanton JM, et al. *Plos One* 7: e36067, 2012.
6. Sturgeon A, Stull JW, Costa MC, Weese JS. *Vet. Microbiol.* 162: 891-8, 2013.
7. Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria.
<https://www.onlinelibrary.wiley.com/doi/book/10.1002/9781118960608>
8. Wolda H. Similarity indices, sample size and diversity. *Oecologia* 50: 296-302.1981.
9. 土 秀幸, 岡 寛. 生物群集解析のための類似度とその応用 : R を使った類似度の算出、グラフ化、検定. *日本生態学会誌* 61: 3-20, 2011.
10. Kunder DA, Cain CL, Rankin SC, et al. *Vet. Dermatol.* 26: 406-e94, 2015.
11. Morris DO, Boston RC, O'Shea K, Rankin SC. *Vet. Dermatol.* 21: 400-407, 2010.
12. Muramatsu Y, Uchida L, Horiuchi M, et al. *Zoon. Publ. Hlth.* 66: 936-942, 2019.
13. Kivinen PK, Lahtinen MR, Katila ML. *Acta Dermato-Venereologica*, 83: 74-75, 2003.
14. Lin WR, Chen YS, Liu YC. *J. Formos. Med. Assoc.* 106: 573-576, 2007.
15. Noell F, Gorce MF, Garde C, Bizet C. *Lancet* 2: 332, 1989.
16. Sharma S, Salazar H, Dahdouh M, et al. *Cureus* 11: e4494, 2019.
17. Compositions for use in identification of bacteria.
<http://www.patentsencyclopedia.com/app/20100035239>
18. Tré-Hardy M, Saussez T, Yombi JC, Rodriguez-Villalobos H. *New Microbes New Infect.* 14: 49-50, 2016.
19. Ma N, Yang D, Okamura H, Haneji T, et al. *Mol. Med. Rep.* 15: 559-566, 2017.
20. Ruan Y, Shen L, Zou Y, Qin S, et al. *BMC Genomics* 16: 122, 2015.
21. Gonçalves LFH, Fermiano D, Faveri M, et al. *J. Periodontal Res.* 47: 711-718, 2012.
22. Willis SG, Smith KS, Riviere GR, et al. *J. Clin. Microbiol.* 37: 867-869, 1999.
23. World Population Ageing 2017. https://www.un.org/en/development/desa/population/publications/pdf/ageing/WPA2017_Report.pdf.
24. World Alzheimer Report 2015.
<https://www.alz.co.uk/research/WorldAlzheimerReport2015.pdf>
25. Bert F, Gualano MR, Siliquini R, et al. *Eur. J. Integr. Med.* 8: 695-706, 2016.

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 0件）

1. 著者名 Yasukazu Muramatsu Nami Haraya Kazuki Horie Leo Uchida Takanori Kooriyama Akio Suzuki Motohiro Horiuchi	4. 巻 66
2. 論文標題 Bergeyella zoohelcum isolated from oral cavities of therapy dogs	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Zoonoses and Public Health	6. 最初と最後の頁 936-942
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.1111/zph.12644.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 堀江一樹、郡山尚紀、西川泰代、内田玲麻、村松康和
2. 発表標題 ヒト由来口腔内細菌叢との比較に基づく犬由来口腔内細菌叢調査におけるMALDI-TOF MSシステムを用いた菌種同定法の意義
3. 学会等名 令和元年度日本獣医公衆衛生学会（北海道）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 西川泰代、郡山尚紀、堀江一樹、内田玲麻、村松康和
2. 発表標題 飼い主とその飼育犬に関する口腔内細菌叢の相互関連性調査
3. 学会等名 令和元年度日本獣医公衆衛生学会（北海道）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 堀江一樹、郡山尚紀、西川泰代、内田玲麻、村松康和
2. 発表標題 飼育犬とその飼い主の口腔内細菌叢調査におけるMALDI-TOF MSシステムによる菌種同定法の有用性
3. 学会等名 第162回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 西川泰代、郡山尚紀、堀江一樹、内田玲麻、村松康和
2. 発表標題 セラピードッグとその飼い主における口腔内細菌叢の比較
3. 学会等名 第162回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2019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
--	---------------------------	-----------------------	----