

平成30年6月25日現在

機関番号：30109

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2017

課題番号：26860441

研究課題名(和文)豚が保有するクロストリジウム・ディフィシル(C・D)とヒトC・D症の関係解明

研究課題名(英文)The relationship between Clostridium difficile derived from pigs and human clinical isolates

研究代表者

臼井 優 (Usui, Masaru)

酪農学園大学・獣医学群・准教授

研究者番号：60639540

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：子豚糞便からClostridium difficileの分離を行った結果、69検体(58%)から分離された。多くは、強毒型であり、日本の子豚が強毒株を高率に保菌していることが明らかとなった。実験室内においてC. difficileに対して堆肥化と同様の処理を行い、その生存性を確認した。結果、C. difficileは、熱処理を経ても長期間にわたって生存した。豚農場の完熟堆肥14検体からC. difficileの分離を行ったところ5検体(36%)から分離された。堆肥化処理を経てもC. difficileは死滅せず、堆肥中に残存することが明らかとなり、伝播経路の一つとなっていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：C. difficile was isolated from 120 neonatal piglet fecal samples. One-hundred C. difficile strains were isolated from 69(57.5%) samples. These results suggest that C. difficile, prevalent among Japanese pigs, is a potential risk for antibiotic-associated diarrhea. To clarify the survival ability of C. difficile spores in pig feces in the form of manure compost, C. difficile spores were artificially inoculated into pig feces and incubated at several temperatures. C. difficile spores survived in the feces incubated at temperatures below 37 °C for over 30 days. However, spore numbers gradually decreased at thermophilic temperatures (over 55 °C). Ensuring the composting of manure can reduce the occurrence of pathogenic bacteria, including C. difficile. To clarify the distribution of C. difficile in field manure compost, we isolated and characterized C. difficile from the final products of manure compost in 14 pig farms. C. difficile was detected in 36% (5/14) of manure compost samples.

研究分野：公衆衛生

キーワード：Clostridium difficile 堆肥

1. 研究開始当初の背景

*C. difficile*は、院内感染による抗菌薬関連下痢症・偽膜性大腸炎の主要な原因菌である。感染者は治療が困難であることが多く、その約8~15%が死に至るとされ、米国では、年間、約15000~20000人が*C. difficile*による感染症により死亡していると推計されており、医学的及び社会的に大きな問題となっている。日本国内においても、*C. difficile*を原因とする抗菌薬関連下痢症・偽膜性大腸炎が発生しており、死亡例も報告されていることから何らかの対策が必要とされている。*C. difficile*は、健康な豚や牛等の食用動物からも分離される。その疫学解析にはPCRリボタイピングという型別方法が広く用いられており、海外ではヒトの臨床由来株と子豚由来株の両方からヒトに対して強い病原性を示すリボタイプ078が見つかったことから、ヒトにおける重篤な感染と豚肉の摂食との関係が示唆されている。そのため、WHOはヒトだけでなく豚における分布状況の調査が必要と指摘している。一方、日本では、ヒト臨床由来株の主要なリボタイプは018(smz)であることが明らかにされており、海外の流行株とは異なることが示されている。しかし、日本の豚における保菌状況やリボタイプを含むその性質については過去に報告がない。そこで我々は、出荷直前の豚糞便からの*C. difficile*の分離を試みたが、分離することができたのは250検体中2検体(0.8%)のみであり、日本における豚の*C. difficile*の分布状況やその性質について明らかにすることはできなかった。

2. 研究の目的

今回、成豚に比べて高い分離率が得られることが知られる子豚糞便からの*C. difficile*の分離を実施することを計画している。そして、子豚分離株の性質を調べ、日本におけるヒト臨床由来株と比較することで、日本における豚由来*C. difficile*とヒトの感染症との関連性を明らかにすることを目的とする。また、日本は種豚を海外から輸入しているため、種豚を介して海外から*C. difficile*を含む様々な細菌が持ち込まれる可能性がある。そこで、*C. difficile*の豚を介した日本への伝播の可能性について明らかにするために、今回得られる子豚由来株と海外の子豚由来株との比較を行う。その後、市販豚肉及び豚舎環境からの*C. difficile*の分離を行いヒト臨床由来株や子豚由来株との比較を行い、ヒトへの感染経路及び豚舎環境におけるレゼルポアを明らかにし、豚とヒトの感染について関係があった場合には、ヒトへの感染を防ぐための対策を講じることを目的とする。

3. 研究の方法

(1)子豚糞便120検体から*C. difficile*の分離を行い性状解析を実施した。また、これらの株と海外で拡散している株についてMLVA解析(遺伝子の反復回数をカウントすることによる型別方法。リボタイプよりも解析能が高い)による比較を行った。

(2)動物からヒトへの*C. difficile*の伝播を防ぐためには、伝播経路を明らかにする必要がある。家畜の糞便の多くは、堆肥として処理される。一般的に、家畜糞便に含まれる微生物の多くは堆肥化に伴う熱により死滅すると示されている。しかし、*C. difficile*は芽胞形成菌であり、堆肥化を経ても残存することが予想され、豚糞便を由来とする堆肥から土壌、農作物等を介してヒトへ伝播する可能性がある。そこで、実験室内において*C. difficile*に対して堆肥化に伴う熱処理と同様の処理を行い、その生存性を確認した。また、実際に豚農場の完熟堆肥14検体から*C. difficile*の分離を行い性状解析を行った。

(3)市販野菜を介したヒトへの伝播経路を想定し、市販野菜242検体から*C. difficile*の分離を行い性状解析を行った。

(4)動物からヒトへの*C. difficile*の伝播リスクを考えた際、ヒトと接触の機会が多い伴侶動物が*C. difficile*を保菌している場合にリスクが高いと考えられた。そこで、日本のイヌ糞便204検体について*C. difficile*保有状況を調べ性状解析を行った。

4. 研究成果

(1)豚糞便120検体のうち69検体(58%)から*C. difficile*が分離された。分離株の多くは、海外で拡散している強毒型リボタイプ078であり、日本の子豚が強毒株を高率に保菌していることが明らかとなった。また、これらの株と海外で拡散している株についてMLVA解析(遺伝子の反復回数をカウントすることによる型別方法。リボタイプよりも解析能が高い)による比較を行ったところ、非常に類似していた。日本は海外から種豚を輸入しており、リボタイプ078を含む*C. difficile*は、種豚の輸入またはヒトの移動により、海外から日本の豚へ侵入し日本の豚の間で拡散したことが示唆された。現在のところ、日本のヒトにおいてリボタイプ078は拡散していないが、豚からヒトへの伝播について、今後注視する必要がある。

(2)*C. difficile*は、熱処理を経ても長期間にわたって生存した。完熟堆肥14検体のうち5検体(36%)から*C. difficile*が分離された。以上のことから、堆肥化処理を経ても*C. difficile*は死滅せず、堆肥中に残存することが明らかとなり、ヒトへの伝播経路

の一つとなっていることが示唆された。

(3)市販野菜 242 検体のうち、9 検体(3.7%)から *C. difficile* が分離され、中には毒素遺伝子保有株も含まれた。以上のことより、野菜からの伝播経路について、注意すべきことが示唆された。

(4)イヌ糞便 204 検体のうち 62 検体 (30%) が陽性を示した。イヌに関しては豚と異なり年齢による分離率の差は認められなかった。イヌ由来株の中には、ヒトに対して病原性を示す株も認められた。また、イヌ由来株について、全ゲノム配列を明らかにしヒト臨床分離株と比較したところ、極めて類似のゲノム配列を示した。以上のことから、伴侶動物の一部はヒトに対して病原性を示す *C. difficile* を保有しており、伴侶動物との接触は *C. difficile* の伝播リスクがあることが示された

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4件)

臼井優、原田倫子、川端楓実、佐藤友美、樋口豪紀、田村豊 (2017) 成牛及び子牛における *Clostridium difficile* の保菌状況. 日本獣医師会雑載. In press
査読有り

Usui, M., Kawakura, M., Yoshizawa, N., San, L. L., Nakajima, C., Suzuki, Y., & Tamura, Y. (2017). Survival and prevalence of *Clostridium difficile* in manure compost derived from pigs. *Anaerobe*, 43, 15-20.
doi:10.1016/j.anaerobe.2016.11.004
査読有り

Usui, M., Suzuki, K., Oka, K., Miyamoto, K., Takahashi, M., Inamatsu, T., Tamura, Y. (2016). Distribution and characterization of *Clostridium difficile* isolated from dogs in Japan. *Anaerobe*, 37, 58-61.
doi:10.1016/j.anaerobe.2015.10.002
査読有り

査読有り Usui, M., Nanbu, Y., Oka, K.,

Takahashi, M., Inamatsu, T., Asai, T., Tamura, Y. (2014). Genetic relatedness between Japanese and European isolates of *Clostridium difficile* originating from piglets and their risk associated with human health. *Front Microbiol*, 5, 513. doi:10.3389/fmicb.2014.00513

査読有り

[学会発表](計8件)

川端楓実、臼井優、田村豊. 市販野菜を介した *Clostridium difficile* のヒトへの伝播の可能性. 第160回日本獣医学会 2017. 9月. 鹿児島

原田倫子、臼井優、田村豊. 成牛及び子牛における *Clostridium difficile* 保菌状況調査. 第159回日本獣医学会 2016. 9月. 藤沢

川倉茉祐子、臼井優、田村豊. 堆肥を介した豚糞便由来 *Clostridium difficile* のヒトへの伝播の可能性. 第158回日本獣医学会 2015. 9月. 十和田

Usui M., Oka K, Takahashi M, Inamatsu T, Asai T, Kamiya S, Tamura Y. GENETIC RELATEDNESS BETWEEN JAPANESE AND EUROPEAN ISOLATES OF *CLOSTRIDIUM DIFFICILE* ORIGINATING FROM PIGLETS AND THEIR RISK TO HUMAN HEALTH. 7th International Symposium on Emerging and Re-emerging Pig Diseases. 2015. 6月. 京都

Usui M., Suzuki K, Oka K, Takahashi M, Inamatsu T, Kamiya S, Tamura Y. DISTRIBUTION AND CHARACTERIZATION OF *C. difficile* DERIVED FROM DOGS IN JAPAN, AND THEIR RISK ASSOCIATED WITH HUMAN HEALTH. 5th International Clostridium difficile Symposium. 2015. 5月. Bled Slovenia.

臼井優、岡健太郎、高橋志達、稲松孝思、神谷茂、田村豊. 子豚糞便から分離された *Clostridium difficile* とヒト臨床由来株及び欧州分離株との比較. 第89回日本感染症学会. 2015. 4月. 京都

鈴木要人、臼井優、岡健太郎、高橋志達、稲松孝思、神谷茂、田村豊. イヌ糞便由来 *Clostridium difficile* とヒト臨床由来株の比較. 第157回日本獣医学会 2014. 9月. 札幌

南部雪江、臼井優、岡健太郎、高橋志達、稲松孝思、神谷茂、田村豊. 子豚糞便から分離された *Clostridium difficile* とヒト臨床由来株との比較. 第156回日本獣医学会 2013. 9月. 岐阜

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕
なし

出願状況(計0件)

〔その他〕

ATLAS of Science に「Survival and prevalence of *Clostridium difficile* in manure compost derived from pigs」の成果が掲載。 <http://atlasofscience.org/survival-of-clostridium-difficile-spore-in-manure-compost/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

臼井 優 (USUI, Masaru)

酪農学園大学・獣医学群獣医学類・准教授
研究者番号：60639540