

平成25年度厚生労働科学研究費補助金

食品の安全確保推進研究事業

「と畜・食鳥検査における疾病診断の標準化とカンピロバクター等の制御に関する研究」

分担研究報告書

農場におけるカンピロバクターの制御に関する研究

～カンピロバクターの農場内伝播に関する研究～

分担研究者 朝倉宏	国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部
分担研究者 山本茂貴	東海大学 海洋学部 水産学科
研究協力者 渡辺邦雄	共立製薬
研究協力者 茶園明	NPO 法人 日本食品安全検証機構

研究要旨

鶏および鶏肉のカンピロバクター汚染については、国内外を問わず生産現場である農場での制御が根源的な対策と想定されるが、その制御は未だ実現し得ない。その一因としては、農場への当該菌汚染経路と農場内での伝播様式等に関する理解が得られていないことが挙げられる。本研究では、東北地方の養鶏場 10 農場の協力を得て、鶏舎毎のカンピロバクター汚染実態を把握すると共に、分離株に関する遺伝学的性状をもとに鶏舎内・間伝播に関する知見を得ることとした。計 10 農場・98 鶏舎より、各 3 検体（一部 1 検体）の盲腸内容計 242 検体を採取し、カンピロバクターの分離培養と各種検出試験に供した。分離成績としては、6 農場の 59 鶏舎中、49 鶏舎由来検体で本菌が分離された（分離率：83.1%）。同時に実施したリアルタイムPCR法・イムノクロマト法の定性検出成績は、ほぼ全数が陽性を示し（98.0% 及び 97.4%）、分離陰性の検体についても本菌の汚染が想定された。*C. jejuni* 106 株について MLST 法による遺伝子型別を行ったところ、何れの農場においても鶏舎間伝播が生じている現状が把握された。うち、2 農場では単一の遺伝子型株のみが全鶏舎に分布しており、蔓延性の高い菌株の存在が推察された。また、同農場では同一遺伝子型の菌株が作業員の動線下流で高頻度に検出されたことから、作業員の動線が農場内伝播に関連することが示唆された。また、複数の遺伝子型が検出された農場については、概して動線下流では遺伝子型構成が単純化を顕す傾向が認められ、菌株間での伝播能力の差異が示唆された。また、イムノクロマトを用いた迅速簡便法が遺伝子解析法と同等の検出成績を示したことから、同法の現場での応用、すなわち食鳥処理の順序を考えるにあたっての評価法として有用と目される。その有効性については更なる評価が必要であろう。来年度は、農場侵入経路等に関する検討を進め、農場段階でのカンピロバクター制御の可能性について考察したい。

A. 研究目的

カンピロバクターは国内外を問わず、細菌性食中毒の中で最も主要な病原体である。世界的にもその対策は急務とされており、食中毒患者およ

び各種動物・環境より分離された菌株の遺伝学的特性の比較を通じた種々の検討により、現在では鶏がヒト食中毒の最も主要な原因食品と認識されている。鶏をはじめとする家禽類では、本

菌の感染は、生後2-3週令の間に生じるとされており、その後の換羽期を過ぎて、出荷されるまでの間、本菌は継続的に家禽の腸管内(特に盲腸)に不顕性に定着を果たす。

本菌感染(定着)に伴い不顕性に経過する鶏では、従って食鳥処理や食鳥肉加工段階で本菌の汚染を迅速に確認することはできないため、より上流での制御が根源的な対策として広く求められている。一方で、生産現場での対策は未だに果たし得ていない。その要因の一つとしては、農場への本菌の伝播経路が不明である他、農場内での蔓延形態に関する知見が乏しいことが挙げられる。

こうした背景から、本研究では、東北地方の養鶏場の協力を得て、鶏舎毎のカンピロバクター汚染率に関する知見の収集を行った。更に、分離株の遺伝子型別を通じて、農場内における蔓延様式に関する知見を得たので報告する。

B. 研究方法

1. 協力農場とサンプリング

平成25年8月-9月の間に、東北地方にある養鶏場計10農場の協力を得て、同農場内で養鶏に供されていた計98鶏舎を対象として、出荷時に残存していた盲腸内容物計242検体をシードスワブ(ニッスイ)を用いて採取し、冷蔵温度帯で輸送した。輸送は通常、翌日配送であったが、一部検体では交通遅延等により、翌々日の配送となった。

2. 分離培養および各種検出法

シードスワブ検体は、到着後速やかに1mlの滅菌リン酸緩衝液(PBS, pH7.4)に懸濁し、以下の試験に供した。

2.1. 分離培養法

上記懸濁液0.3mlを10mlのプレストン増菌培地(Oxoid)に接種し、24時間、42°Cにて微好気培養した。その後、1白金耳容量をmCCDA寒天培地(栄研化学)に塗布し、42°Cにて24-48時間培養した。出現集落の中で、疑わしいものについては、Cycleave PCR *Campylobacter (jejuni/coli)* Typing kit (タカラバイオ)を用いたリアルタイムPCR法により菌種の同定試験を行った。

2.2. リアルタイムPCR法

上記懸濁液0.3mlを21,500 x g, 5分間遠心分離し、得られた沈査を50ulのPrepMan Ultra (Life Technologies)に再懸濁した。95°Cで10分間加熱した後、1μlを鋳型DNAとして、Cycleave PCR *Campylobacter (jejuni/coli)* Typing kit(タカラバイオ)を用いたリアルタイムPCR法をLight Cycler 480(ロッシュ)にて実施した。本装置における陽性・陰性判定は、LC480 GeneScanningソフトウェア(ロッシュ)を通じて行った。

2.3. イムノクロマト

上記懸濁液0.1mlをNHイムノクロマト カンピロバクター(日本ハム)に供した。判定は、製品の添付指示書に従った。

3. MLST 解析

分離菌株より、DNeasy kit (キアゲン)を用いて全DNAを抽出した後、*Campylobacter* MLST database (<http://www.pubmlst.org/campylobacter>)上のガイドラインに従い、PCR反応およびサイクルシーケンス反応を実施した。得られた配列情報は、CLC Main workbench + MLST module (CLC Bio)を用いて、アセンブルした後、上記データベース上の登録情報との参照を通じて、各菌株の遺伝子型を決定した。

4. 農場情報の収集

供試農場における、作業員動線・鶏舎配置図・消毒槽配置・鶏舎形態・親鶏ロット等の情報について、各農場を管轄する親会社を通じて収集した。各農場配置図に、カンピロバクター分布とその遺伝性状、作業員動線、親鶏ロット等の情報を識別できるように加えた。

C. 研究結果

1. 農場でのカンピロバクター分離・検出成績と迅速検査法との関連性

平成 25 年 8 月～9 月の間に、東北地方の養鶏農場計 10 か所の協力を得て、当該施設内の計 98 鶏舎より、各 1～3 検体の盲腸内容を採用し（計 242 検体）、カンピロバクター・ジェジュニおよびコリ（以下、*C. jejuni* 又は *C. coli*）の分離・検出を試みた。分離培養により、4 農場由来の検体ではほぼ全てで陰性となったが、その多くは採取量が相対的に少ない場合や、配送に 2 日以上を要した場合等が多く認められた。それ以外の 6 農場（A-F）由来の 152 検体については、合計で 69.7%（106 検体/152 検体）の分離陽性率を示した（表 1）。また、全ての検体については、同時に遺伝子あるいは抗原の迅速検出にも供したが、特に、上述の 6 農場由来検体での成績は、分離の有無に関わらず、遺伝子検出法で 98.0%（149 検体/152 検体）、イムノクロマト法でも 97.4%（148 検体/152 検体）の陽性率を示した（表 1、図 1）。

以上より、供試農場で飼養されるブロイラー鶏の多くはカンピロバクターを保菌している実態が明らかになると共に、迅速簡便検査法であるイムノクロマトは遺伝子検査法と同程度の検出成績を示すことが明らかとなった。

2. 農場間・鶏舎別での鶏舎分離陽性率の比較

農場ごとの鶏舎陽性率については表 2 に示した。A-F の 6 農場間での、平均鶏舎陽性率は 69.7% であり、最も高い数値を示した A および C 農場では 83.3%、最も低い数値を示した F 農場の陽性率は 50.0%であった（表 1）。しかしながら、F 農場からの検体採取にあたっては、鶏舎あたり 1 検体のみを採取していたことから、他農場に比べて低い数値となったと考えられた。

鶏舎単位での陽性率を農場別に比較したところ、平均陽性率は 79.7%で、このうち農場 A, B, C では全ての鶏舎が陽性を示した（表 2）。また、農場 D, E においても、同様にほぼ全ての鶏舎（8/9 鶏舎および 12/13 鶏舎）から本菌が分離されたが、農場 F での鶏舎陽性率は 50%（7/14 鶏舎）と他農場に比べて低い傾向を示した（表 2）。

以上、農場別・鶏舎別の分離成績の比較を通じて、検体のサンプリング数および関連性状等が分離成績の大きな決定要因となることが想定された。

3. 親鶏ロット別分離陽性率の比較

本研究で試験対象とした農場で飼養された鶏群については、供給元が一部重複していたことから、次に親鶏ロット別の鶏舎陽性率を比較・調査することとした。表 3 に記したとおり、供試鶏舎で飼養された鶏群の親鶏は計 12 ロットから構成されており、このうち、5 ロット（No. 418, 530, 711, 1114, 926）では 100%陽性を示していた。中でも低い鶏舎陽性率を示したのは、No. 627 や No. 905, No.1010 であったが（57.1%～66.6%）であったが、これらの陰性鶏舎には農場 F の成績が含まれていた（表 3）。

以上より、特定の親鶏からの垂直伝播を指し示

しうる知見は得られず、垂直伝播が農場蔓延の主因とは考え難い状況を把握することができた。

4. 各農場における分離菌株の遺伝子型別と農場内伝播に関する知見

上記の知見を踏まえ、次に5農場(A-E)由来の計106株を対象として、MLST解析を実施すると共に、農場の施設・管理情報等を収集し、遺伝学的同一性を軸とした農場内伝播に関する知見の収集にあたった。

農場CおよびEでは、単一の遺伝子型(以下ST)が農場内に認められた(C、ST-50; E、ST-4526)。両農場では、作業員が2つの動線で管理にあっていたが、このうち、特に農場Eについては、鶏舎毎のST-4526分離頻度が動線の下流で高い傾向を示した(図2)。

また、農場Dでは、何れの鶏舎にも踏み込み式の消毒槽が設置されていたが、ST-2031及びST-50が9鶏舎中8鶏舎より分離された(図3)。作業員の動線は同じく2系統であり、2動線間での顕著な差異は認められず、上流ではST-50、下流ではST-2031が主体となっている傾向が認められた(図3)。

農場Aでは、一部二階建ての鶏舎を使用していた(図4)。本農場内からは、5鶏舎より3種のST(ST-50, ST-2031, ST-6704)を示す*C. jejuni*が分離された。農場Dと同様に、ST-50については作業員動線の上流に限定される傾向が認められた(図4)。

農場Bでは、9鶏舎全てから*C. jejuni*が分離され、それらの遺伝子構成はST-50, ST-2031, ST-4526の3型であった(図5)。上述の農場A,Dと同様、ST-50は作業員動線上流に限定して認められた(図5)。また、本農場からは、*C. coli*も

複数検出されたが(図5)、ST型については新規性のものであった。

以上より、供試農場内に蔓延を示す*C. jejuni*は作業員の動線と一定の関連性を示すことが明らかとなったが、一部の遺伝子型(ST-50)株では、動線に沿った伝播を示し難い傾向も認められた。

D. 考察

本研究では、東北地方の養鶏農場におけるカンピロバクター汚染実態を把握すると共に、親鶏ロット別、農場別の鶏舎汚染率の比較より、供試農場での汚染が垂直伝播に因る可能性は必ずしも高くはないと考えられた。一方で、分離株の遺伝子型別を通じた検討により、農場内の各鶏舎には共通の遺伝子型株が分布している実態が明らかとなり、作業員の動線に沿った水平伝播が農場内蔓延の一要因と目された。

カンピロバクターの農場汚染については、これまでにデンマークをはじめとした欧米諸国で精力的に調査研究が進められ、伝播経路に関する様々な知見が集積されてきた:これまでに、衛生害虫、空気感染、作業員、野鳥、水、飼料、土壌、親鶏等が推定されている(参考文献1-2):

Sommerらは、農場でのカンピロバクター汚染と統計学的に関連性を示す因子として、老朽化鶏舎、全粒小麦の飼料添加開始時期の遅れ、出荷時期の遅延、空気口が多数設置された鶏舎構造、げっ歯類の不適切管理等を挙げている(参考文献1)。また、Haldらは、デンマークの農場周辺に棲息するハエの約8.2%がカンピロバクターを保有していたことを報告しており(参考文献2)、伝播要因として、その後着目されてきた。2006年にデンマークの20農場ではハエ用防虫ネット設置によるカンピロバクターの鶏群汚染率に関する検

討が行われ、同ネットの設置により、51.4%であった汚染率が15.4%にまで低減したことが報告されている(参考文献3)。更に、同国でのヒト・カンピロバクター感染者数は同設備の導入により77%低減していることが報告されている(参考文献3,4)。本研究における対象農場ではいずれも開放鶏舎の形態をとっており、こうした対策を取ることによって、一定の低減がはかれる可能性も示唆されるものの、一方で汚染経路が親鶏からの垂直伝播であった場合には、飼養中のこうした取り組みは、農場内での根源的な制御には結びつかないことは容易に想定できる。更には、開放鶏舎の特性から、空気、多様な衛生害虫、ヒトや野生動物、野鳥等複数の要因が本菌伝播を介在する可能性は依然として否定できない。

本研究では、親ロット別に汚染率を調べると共に、分離株の遺伝学的相同性を検証することで、農場内での水平伝播が蔓延の主因であるとの見解を得た。また、水平伝播を構成する一推定要因として、作業員の動線に伴う同一遺伝子型菌株の複数鶏舎分布を根拠として、ヒトを介した伝播を挙げることができた。

来年度は、本年度の成績を元に、特定の農場を対象として選定した上で、異なる飼養時期で鶏群および各種環境材料のサンプリングを行い、カンピロバクター分離株の性状を明らかにすると共に、農場侵入経路に関して、より詳細な知見の収集に努めたい。

E. 結論

東北地方の養鶏農場で飼養されるブロイラー鶏からは高率にカンピロバクターが分離された。迅速検出法として、イムノクロマト法は遺伝子検出法とほぼ同等の成績を示し、農場出荷時や食

鳥処理場搬入時における現場での汚染識別に有用と目された。農場間、あるいは親鶏ロット別の鶏舎汚染率調査から、本研究で対象とした鶏群のカンピロバクター汚染が垂直伝播による可能性は低いと考えられた。遺伝子型別法を通じて、農場内蔓延性の差異が明らかになると共に作業員の動線に沿った伝播が農場内蔓延の一因として推察された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表等

1: Asakura H, Hashii N, Uema M, Kawasaki N, Sugita-Konishi Y, Igimi S, Yamamoto S. (2013) *Campylobacter jejuni* *pdxA* affects flagellum-mediated motility to alter host colonization. PLoS ONE. 8(8):e70418.

2. 学会等発表

- 1: 朝倉宏、川本恵子、山本茂貴、五十君静信、ウシ肝臓より高率に分離された *Campylobacter jejuni* ST-58 の比較ゲノム解析. 第156回日本獣医学会学術集会. 2013年9月、岐阜.
- 2: 伊藤汐里、村上覚史、蓮沼裕也、村田亮、大場剛実、芝原友幸、朝倉宏. ブロイラーにおける *Campylobacter jejuni* の定着部位と生体内移行. 第156回日本獣医学会学術集会. 2013年9月、岐阜.
- 3: 伊藤汐里、村上覚史、蓮沼裕也、村田亮、朝倉宏. ブロイラーにおける *Campylobacter jejuni* の定着部位と生体内移行. 第271回鶏病事例検討会. 2013年12月. 茨城.

- 4: Asakura H. Molecular Epidemiology of *Campylobacter jejuni* in Japan. UJNR-48th Toxic Microorganisms Joint Panel Meeting. 2014年1月.Tokyo, Japan.

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

- 1.特許取得
なし
- 2.実用新案登録
なし

- 3: Hald B, Sommer HM, Skovgård H. (2007) Use of fly screens to reduce *Campylobacter* spp. introduction in broiler houses. Emerg Infect Dis. 13(12):1951-3.

- 4: Bahrndorff S, Rangstrup-Christensen L, Nordentoft S, Hald B. (2013) Foodborne disease prevention and broiler chickens with reduced *Campylobacter* infection. Emerg Infect Dis. 19(3):425-30.

参考文献

- 1: Sommer HM, Heuer OE, Sørensen AI, Madsen M. (2013) Analysis of factors important for the occurrence of *Campylobacter* in Danish broiler flocks. Prev Vet Med. 111(1-2):100-11.
- 2: Hald B, Skovgård H, Bang DD, Pedersen K, Dybdahl J, Jespersen JB, Madsen M. (2004) Flies and *Campylobacter* infection of broiler flocks. Emerg Infect Dis. 10(8):1490-2.

図1. 鶏盲腸便検体からのカンピロバクター検出ワークフロー

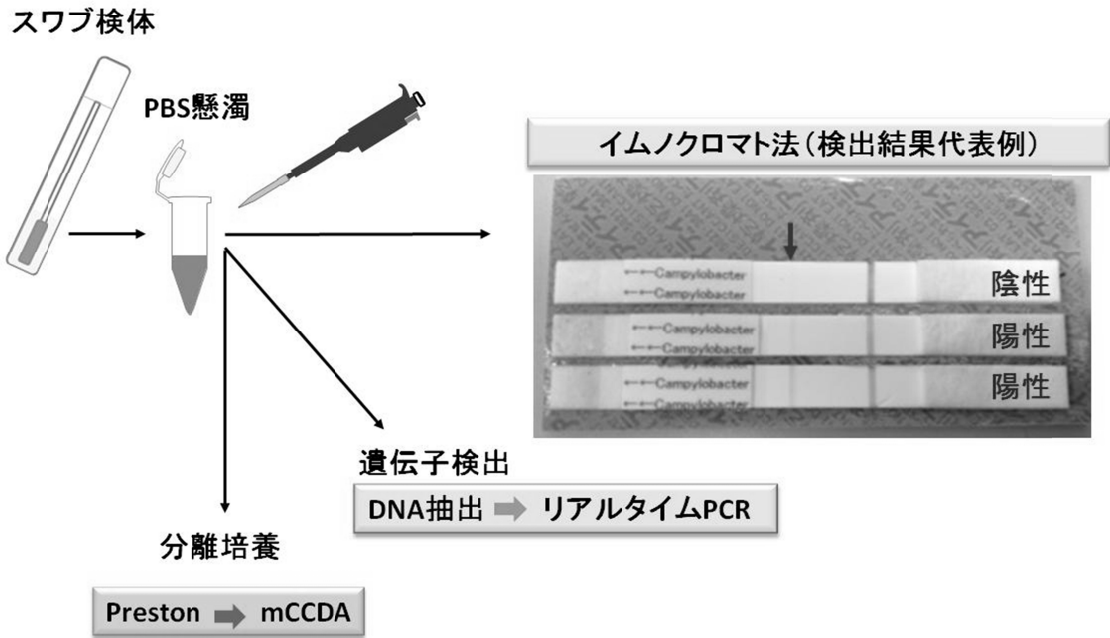
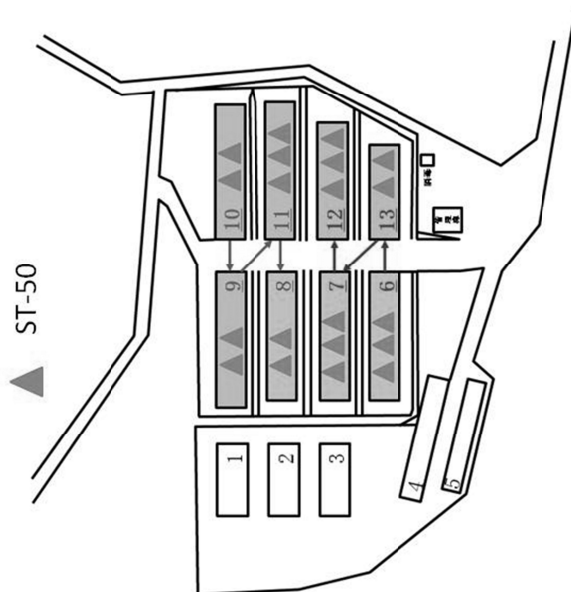
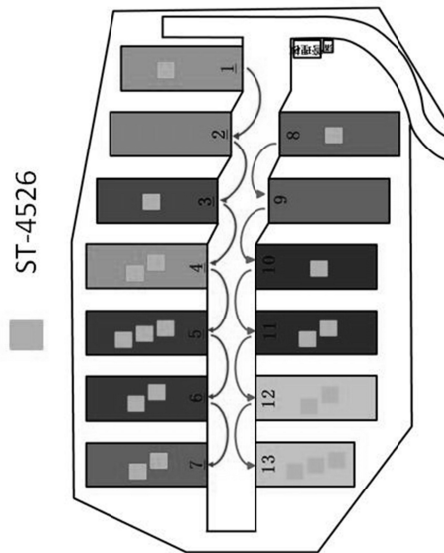


図2. 農場C及びE内におけるカンピロバクター汚染状況

農場C



農場E



親鶏ロットに関わらず、単一遺伝子型が農場内に蔓延

図3. 農場Dにおけるカンピロバクター汚染状況

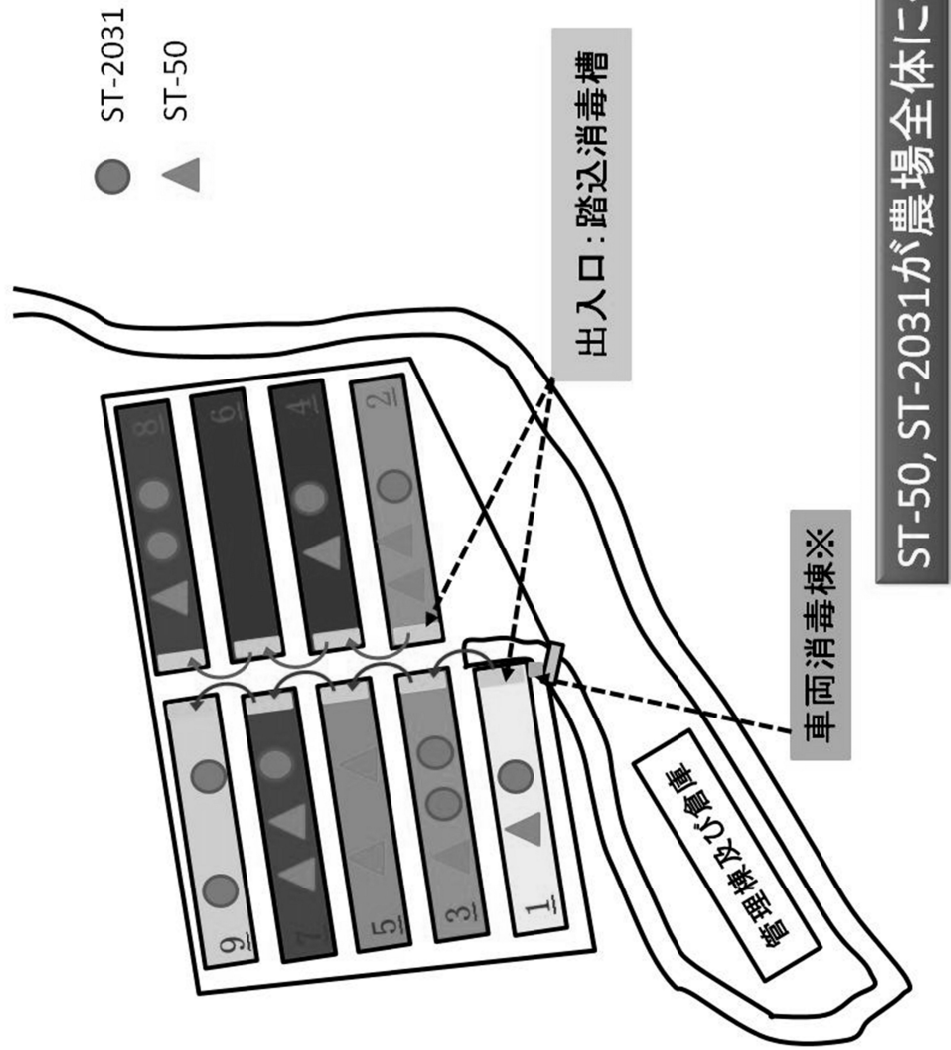


図4. 農場Aにおけるカンピロバクター汚染状況

- ST-2031
- ▲ ST-50
- ✕ ST-6704

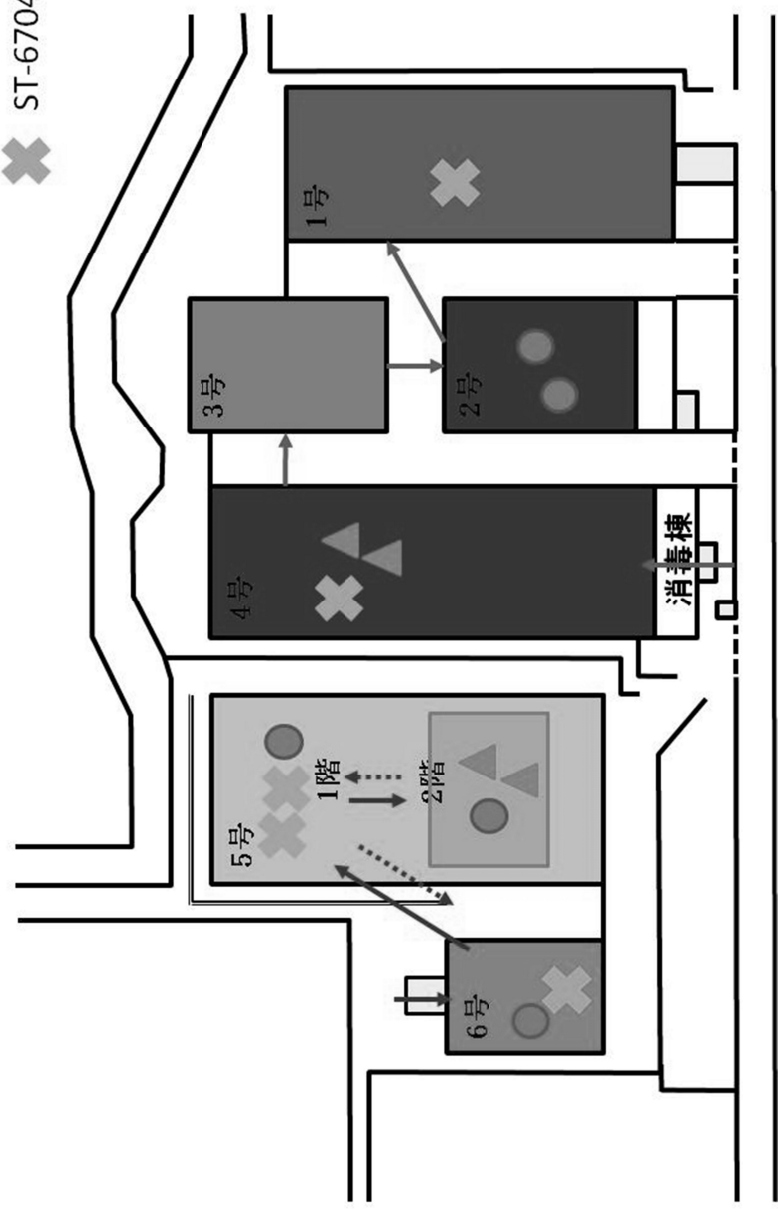


図5. 農場Bにおけるカンピロバクター汚染状況

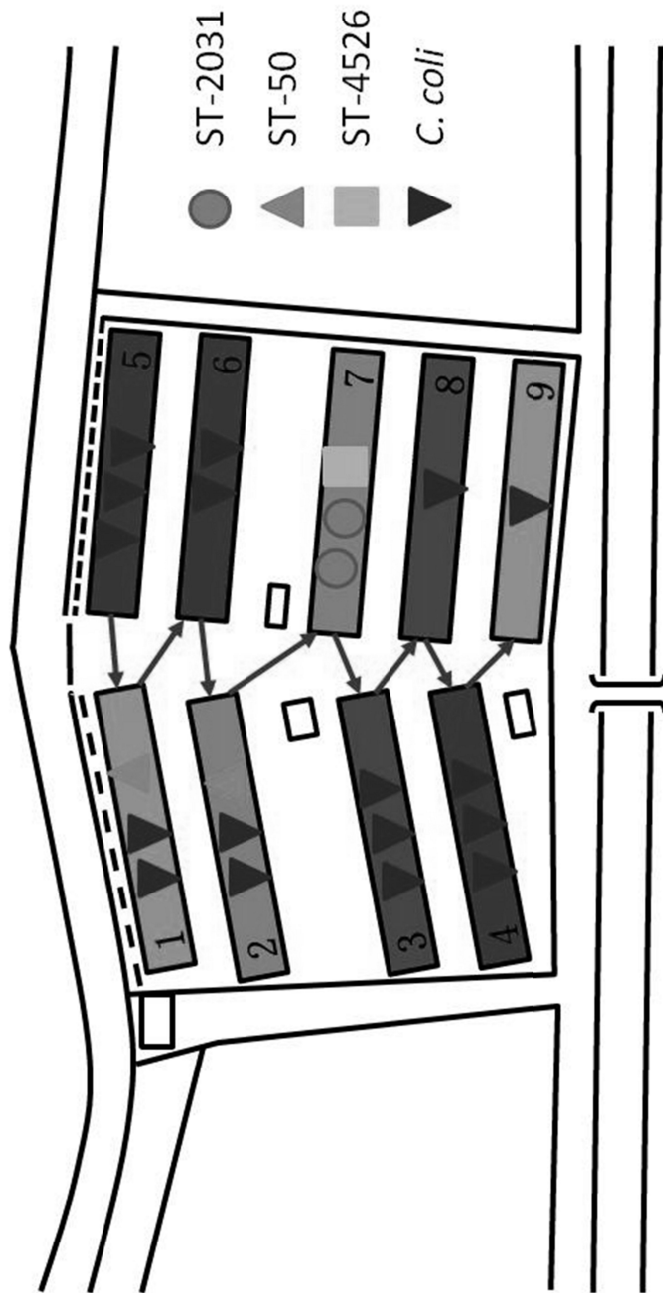


表1. 各種検出手法の成績比較

農場	検体数	イムノクロマト	PCR	培養	分離率%
A	18	18	18	15	83.3
B	30	29	30	22	73.3
C	24	24	24	20	83.3
D	27	26	26	21	77.8
E	39	39	39	21	53.8
F*	14	12	12	7	50.0
平均	152	148	149	106	69.7

* 1鶏舎につき、1検体のみ

表2. 鶏舎別カンピロバクター鶏舎陽性率の比較

農場名	試験鶏舎数	陽性鶏舎数	陽性率
A	6	6	100
B	9	9	100
C	8	8	100
D	9	8	88.9
E	13	11	84.6
F*	14	7	50
計	59	49	83.1

* 1鶏舎につき、1検体のみ

6農場の鶏舎別カンピロバクター分離陽性率を示した。

表3. 親鶏ロット別カンピロバクター分離陽性率の比較

ロットNo.	搬入鶏舎数	陽性鶏舎数	陽性率(%)	搬入農場(陽性鶏舎数/試験対象鶏舎数)
613	10	7	70.0	A(1/1), B(2/3), D(1/1), E(2/2), F(2/3)
818	8	5	62.5	A(1/2), B(1/2), E(2/3), F(1/2)
627	7	4	57.1	A(1/1), D(1/1), E(1/1), F(2/4)
418	6	6	100.0	A(1/1), C(5/5)
905	6	4	66.7	B(1/2), D(2/2), E(1/1), F(0/1)
530	5	5	100.0	C(3/3), E(2/2)
711	4	4	100.0	D(1/1), F(3/3)
1114	4	4	100.0	D(2/2), E(2/2)
1010	3	2	66.7	A(1/1), D(1/1), F(0/1)
926	2	2	100.0	B(2/2)
1017	2	1	50.0	A(1/1), D(0/1)
1222	2	2	100.0	E(2/2)
計	59	49	83.1	-

6農場の成績を、親鶏ロット別カンピロバクター分離陽性率として算出した。