

## II. 分担研究報告

分担研究課題「カンピロバクターの汚染伝播様式と汚染源推定に関する研究」

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
研究協力者 橋 理人	国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部

研究要旨

カンピロバクター食中毒の原因食品の中で、疫学的に最も注視すべき対象に鶏肉が挙げられて以来、その生産現場である農場での衛生管理に係る様々な取り組みが求められてきた。しかしながら、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、昨年度の研究において協力を得た東北地方の養鶏場 10 農場のうち、2 農場(B 及び E 農場)に継続調査を依頼・了解を得た。同農場においては、約 4 週令より出荷時にかけて、1 週間毎に農場内の鶏舎内盲腸便及び周囲環境材料(長靴底、飼料、使用水、鶏舎周辺の土壌、野鳥糞便)を採材し、鶏群内および周囲環境下での汚染動態を経時的に検討した。B 農場では、9 鶏舎の鶏盲腸便検体のうち、6 週令時に 2 検体、出荷時令(7 週令)に 5 検体が本菌陽性となり、出荷時令においてのみ、環境検体の中で土壌 1 検体が陽性を示した。E 農場では、6 週令時迄は全てが陰性であったが、出荷令(8 週令)時には盲腸便 9 検体中 2 検体及び土壌 1 検体より本菌が分離された。MLST 解析により、分離株の遺伝性状は鶏舎間でほぼ均一であったことから、農場内での水平伝播が示唆された。盲腸便検体を用いて 16S rRNA pyrosequencing による菌叢解析に供したところ、カンピロバクター属菌の構成比は、週令が上がるにつれて増加傾向にあり、一部の鶏舎由来盲腸便では分離時期以前の時点でも本属菌由来遺伝子が認められたため、当該鶏舎が汚染源(増幅源)となった可能性が示唆された。こうした菌叢解析法の併用は、今後の生産現場での本菌制御を図るための重要管理点(初発汚染源)の特定に資する有用なツールとなる。

A. 研究目的

カンピロバクター(*Campylobacter jejuni*および*C. coli*)による食中毒は国内外を問わず、細菌性食中毒の中で最も発生数が多く、その制御が求められている。疫学知見の集積を通じ、近年では、非加熱あるいは加熱不十分な調理を経た鶏肉や

牛肉等がヒト食中毒の最も主要な原因食品と認識されている。その中において、鶏をはじめとする家禽類では、生後2-3週令の間に本菌の定着を生じ、以後少なくとも9週間は定着しつづけることが明らかになっている。こうしたことから、コーデックス委員会では、出荷週令を早める等の対策も、

本菌の生産現場での制御には有効な手段として提案している。

鶏肉における本菌汚染は、食鳥処理時における腸管漏出や交差汚染等が主な原因となって生じるが、食鳥処理あるいは食鳥肉加工等の段階において、本菌による汚染を迅速かつ簡便に確認する手立てではなく、生産現場での制御対策も、より下流(調理段階等)での制御と併せて、求められている。生産段階における、本菌定着を制御する手立ては、これまでも検討されてきたものの、その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。

こうした背景を受けて、昨年度の研究においては、東北地方の6養鶏農場を対象として、同環境下で飼養されるブロイラー鶏(出荷時)から高率にカンピロバクターが分離されるものの、各鶏舎より分離された菌株の遺伝性状の相同性から、その農場内汚染伝播に係る知見を得た。本年度は、上述の農場のうち、単一の遺伝性状の菌株のみが蔓延していたE農場、あるいは複数の遺伝性状の*C. jejuni/ C. coli*株が分離されたB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を採取し、カンピロバクター分離培養を行うことで、時系列的蔓延様式を検討すると共に、同時系列での盲腸菌叢を16S rRNA pyrosequencing法により比較解析することで、飼養管理やカンピロバクター保菌との関連性を探索することとした。

## B. 研究方法

### 1. 協力農場とサンプリング

平成26年9月-10月の間に、東北地方にある養鶏場計2農場の協力を得て、同農場内で養鶏に供されていた各9鶏舎、計18鶏舎を対象として、3または4週令から1週毎に出荷時までの間、鶏舎内より新鮮盲腸便をシードスワブ(ニッスイ)を用

いて採材し、冷蔵温度帯で輸送した。また、環境材料として、鶏舎間の土壌、鶏舎内作業用長靴の底部、鶏舎内敷料、飼料(前期・後期・仕上げ飼料)をそれぞれ採材し、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50μl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。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。

### 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SEMB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

試験対象農場における、作業員動線・鶏舎配置図・周辺環境図、サンプリング箇所、発育に応じた各飼料成分表等の情報については、各農場を管轄する親会社より提供を受けた。これらの情報と共に、サンプリング時期ごとのカンピロバクター属構成比率変動を加味した各農場配置図を作成した。

#### 5. 次世代シーケンサを用いた研究

分離培養に供した懸濁残液より、Microbial DNA isolation kit (MO Bio)を用いてDNAを抽出した。その後、16S rRNA 799f-1179r配列をもとに、タグ・アダプター配列等を付加したオリゴヌクレオチドプライマーを用いて、PCR 反応を行い、常法に従って、増幅産物を精製した。同精製物については、30 検体を上限として混合ライブラリーを作成し、Ion PGM Sequencing system (Life Technologies)を用いた Pyrosequencing 解析を行った。得られたリードデータは、CLC Genomic Workbench (CLC Bio-Qiagen)を用いてトリミングを行った後、RDP Classifier pipelineを通じて、リード配列の階層付けを行った。その後、Metagenome@KIN プログラム(World Fusion)を用いて、主成分分析およびクラスター解析を行い、サンプル間における菌叢変動に関する情報を収集した。

### C. 研究結果

#### 1. 出荷時におけるカンピロバクター分離成績および MLST 法による遺伝子型別

平成 26 年 9 月～10 月の間に、東北地方の養鶏農場計 2 か所(B農場、E農場)の協力を得て、当該施設内の計 18 鶏舎(各 9 鶏舎)より、3 また

は 4 週令より出荷時令(7 または 8 週令)の鶏盲腸便および環境材料(鶏舎周辺土壌、鶏舎内作業用長靴底、飼料(前期・後期・仕上げ)、敷料)を採材し(計 144 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。また、得られた分離株を対象に、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。

出荷時の盲腸内容由来検体を用いた分離培養により、A 農場の鶏盲腸内容由来の検体については、55.6%(5 検体/9 検体:1、2、5、6、7号舎)の *C. jejuni* 分離陽性率を示した(表 1)。昨年度分離できた *C. coli* は分離できなかった。B農場由来の検体については、9 検体中 1 検体(11.1%:5号舎)から *C. jejuni* が分離され、異なる 1 検体(11.1%:7号舎)からは、昨年度の検討においては検出されなかった *C. coli* が分離された(表 1)。

MLST 解析の結果、B 農場における鶏盲腸内容由来の分離株の遺伝子型は単一であることが明らかとなったが、本遺伝子型は昨年度の研究においても検出された遺伝子型であった(表 2)。また、E 農場では、*C. jejuni* と *C. coli* の両方が分離されたことから、少なくとも 2 つ以上の侵入経路が存在する可能性も考えられた。E 農場由来の *C. jejuni* 分離株は、昨年度に分離された同菌株と同一の遺伝子型であった(表 2、図 2)ことから、これらが当該農場に常在化していると推察された。

以上より、本研究における供試農場で飼養されたブロイラー鶏は、継続的にカンピロバクターを保菌している実態が明らかとなり、特に出荷時に向けて分離陽性率が急激に増加する傾向が認められた。

#### 2. 飼養期間別での分離陽性率の比較

経時的な汚染の広がりを明らかにし、農場内における蔓延経路を推測するために、出荷時より

前の 4、5、6 週齢時の盲腸内容由来検体を用いた分離を試みた。農場・飼養時期ごとの鶏舎陽性率については表 1 に示した。B 農場において 6 週齢時に 22.2%(2 検体/9 検体:6、7 号舎)の分離陽性率を示した。分離された 2 鶏舎は、出荷時の検体において分離された 5 鶏舎(1、2、5、6、7 号舎)に含まれていた(図 1)。4 週齢、5 週齢時には分離できなかった。MLST 解析の結果、6 週齢検体由来株の遺伝子型は出荷時検体由来株の遺伝子型と同一であった。①遺伝子型が同一であること、②6 週齢時に陽性であった鶏舎が出荷時に陽性であった鶏舎に含まれていること、③6 週齢時に分離できた 2 鶏舎が隣り合っていること(図 1)から、6 週齢時に陽性であった鶏舎が水平感染の起点であることが示唆された。E 農場においては出荷時以外では検体の別によらず、分離できなかった。

以上より、飼養時(4、5、6 週齢)と比較して出荷時における分離陽性率が著しく高いことから、6 週齢から出荷までの 1~2 週間が養鶏におけるカンピロバクター制御において非常に重要な時期であることが示された。この期間は飼料に抗生剤を含まない休薬期間であり、当該因子の関連性も示唆された。

### 3. 農場内環境検体からの検出状況

B 農場の土壌検体からは、出荷時に 2 か所から *C. jejuni* が分離された。MLST 解析の結果、遺伝子型が盲腸内容由来分離株と同じものと異なるものが認められた。遺伝子型が同じもの(ST-2031)は、盲腸内容から分離できなかった鶏舎間(8、9 号舎間)の土壌由来のものであり、*C. jejuni* が農場全体に広がっていると考えられた。また、遺伝子型が異なる *C. coli* 分離株が得られたことより、複数経路による侵入が考えられた。一方、出荷時以外の検体から分離することが出来なかった。この結果は、当該農場においては、鶏同様に 6 週齢から出荷時までの期間における

カンピロバクター制御が特に重要であることを示しているともいえよう。また、鶏舎の内外で同遺伝子型の菌を分離できたことは鶏舎外環境から鶏舎への侵入および鶏舎内から鶏舎外への流出が考えられ、鶏舎内での本菌の増幅と、その後の鶏舎間での水平伝播が農場内蔓延の主因であるとする説を支持する結果となった。一方、E 農場では、環境検体から本菌は分離されなかった。

### 4. 次世代シーケンサを用いた菌叢解析による農場内伝播に関する知見

カンピロバクターの分離培養を行うにあたっては、検体の保存・輸送中に当該菌が死滅・減少することが考えられ、培養成績が必ずしも本菌の所在と一致しない場合も想定される。汚染源の推定を行うにあたって、分離培養の成績を更に検証するため、本研究では、B 農場の分離培養に用いた検体から DNA を抽出し、次世代シーケンサ(NGS)を用いた 16S rRNA pyrosequencing 法に供することで、各盲腸便検体間での構成菌叢の比較を行い、各サンプルに含まれるカンピロバクター属の比率を比較することとした。同解析の結果、カンピロバクター属由来遺伝子は出荷時の盲腸内容由来の全検体において、存在することが示された(表 3、図 3)。この結果から、分離陰性の検体においても相応の汚染が想定され、出荷時には農場内に蔓延していることが示唆された。また、4 週齢で 1 鶏舎、5 週齢で 2 鶏舎、6 週齢で 3 鶏舎からの検体において本菌の存在が認められ、経時的な感染の拡大が示唆された。

また、6 週齢時の検体の中で、分離陽性となった 2 鶏舎(6、7 号舎)のうち、1 鶏舎(7 号舎)由来の検体では、①5 週齢時から本菌が分離されたこと、②経時的に構成比率が増加傾向にあり、出荷時には 20%を超える構成比率を認めることが明らかとなった(表 3、図 3)。

以上の成績より、分離培養成績と矛盾することなく、7 号舎が同農場内でのカンピロバクター蔓

延の起点であったことが示唆された。

#### D. 考察

本研究では、昨年度の検討の結果、広範な汚染を顕した農場を対象に、その汚染源と伝播様式に関する知見を得るため、鶏舎及び同周辺環境検体を用いて、時系列(飼養期間)別に汚染率を調べ、出荷時令以前の検体ではほぼ当該菌が分離されないものの、盲腸内菌叢において本菌由来遺伝子はより早期から検出され、同比率は日齢の増加に伴い、徐々に増加傾向にある鶏舎が存在すること、その中においても、特に早期より比率増加が顕著で出荷時には著しい比率を顕す鶏舎が存在することを明らかにした。鶏腸管内において、カンピロバクターは定着を果たし、腸内細菌叢としてその比率を増加させることが知られており、本研究において認められた比率動態に関する知見は、ある鶏舎に早期から本菌が混入し、増幅源となり、周囲鶏舎への汚染源となっていたものと考えられる。同農場内で検出された本菌株の多くが同一遺伝性状を示したことは、水平伝播が蔓延の主因であることを示しており、上述の推論を支持するものと考えられる。

また、出荷時の盲腸検体において、菌叢に占めるカンピロバクター属由来遺伝子の構成比率が高い検体では、低い検体に比べて、明らかな菌叢構成の差異が認められた。こうした菌叢変動がカンピロバクターの鶏宿主での定着に影響を及ぼしたのか、或はカンピロバクター定着が菌叢を変動させたのかについてはいまだ明らかではない。本菌の鶏宿主における動態の解明は、生産現場での制御に結びつく可能性があることから、これに係る更なる検討を進めていきたい。

本年度の協力農場については、昨年度も出荷時においてのみ検討対象としていたが、本研究における分離菌株の遺伝性状は、昨年度とは異なるものも含まれており、農場内でしばしば認められる持続汚染は、異なる性状の菌株が絶え間

なく侵入する疫学状況を示唆しているとも考えられる。

#### 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。経時的な汚染実態の把握を分離培養法と遺伝学的手法を組み合わせることで、汚染源となった鶏舎の推定を行うことができた。環境での分離時期は鶏盲腸便に遅れて認められたことから、土壌等が初発的な汚染源として鶏舎への本菌伝播を介在した可能性は低いと想定された。盲腸菌叢は、発育期に応じて大きく変動し、出荷時におけるカンピロバクター属菌と一部菌属の構成比率は一定の関連性を示す知見が得られたことから、今後、菌叢に根差した制御対策の実行可能性が期待される。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表等

なし

##### 2. 学会等発表

- 1: Asakura H. Recent trends for the control of meat safety. Korean Society for Food Science and Technology 2014 Annual Meeting. 2014年8月, Gwanju, South Korea.
- 2: 朝倉宏. カンピロバクターの遺伝学的多様性と宿主内外での動態. 第8回日本カンピロバクター研究会総会. 2014年12月, 東京.

#### 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

表1. 飼養期間別に見た、カンピロバクター分離陽性率の推移

【B農場】 盲腸便36検体、土壌36検体、長靴3検体、飼料6検体

サンプル	3W	4W	5W	6W	7W
盲腸便	-	0/9	0/9	2/9	5/9
土壌(鶏舎間)	-	0/9	0/9	0/9	2/9
敷料	-	-	-	-	-
長靴	-	0/1	0/1	0/1	-
飼料	-	0/2	0/2	0/2	-

【E農場】 盲腸便36検体、土壌36検体、敷料2検体、長靴4検体、飼料6検体

サンプル	3W	4W	5W	6W	8W
盲腸便	-	0/9	0/9	0/9	2/9
土壌(鶏舎間)	0/9	0/9	0/9	0/9	1/9
敷料	0/2	-	-	-	-
長靴	0/1	0/1	0/1	0/1	-
飼料	0/2	0/2	-	0/2	-

それぞれの値は、分離陽性数／検体数を示す。また、陽性検体は赤背景で示す。



表2. 昨年度と本年度との分離株遺伝子型比較

農場名	菌種	昨年度 (分離の有無・遺伝子型(ST))	本年度 (分離の有無・遺伝子型(ST))
A	<i>C. jejuni</i>	ST-2031、ST-50、ST-4526	ST-2031、ST-45(土壌のみ)
	<i>C. coli</i>	有り	無し
B	<i>C. jejuni</i>	ST-4526	ST-4526(鶏盲腸便及び土壌)
	<i>C. coli</i>	無し	新規型

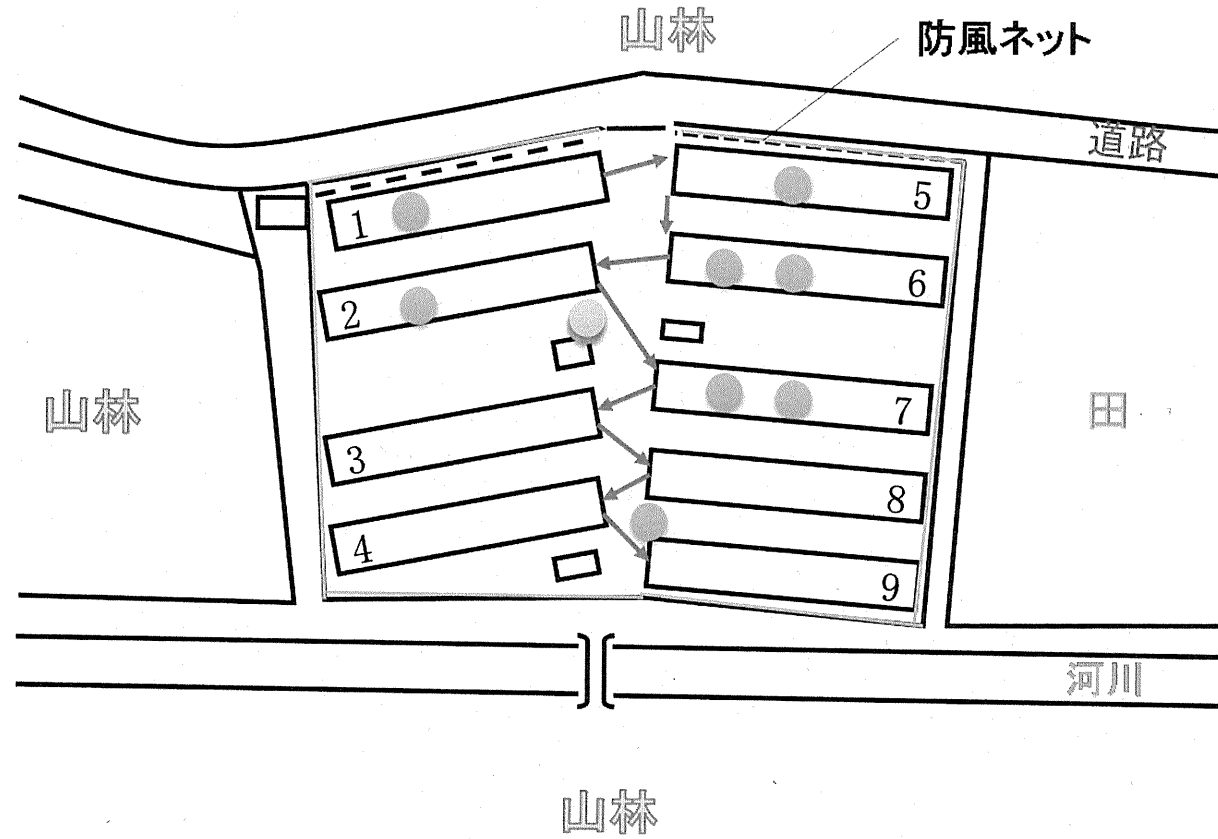


表3. B農場の鶏盲腸便構成菌叢に占めるカンピロバクター属比率(%)

鶏舎	4週齢	5週齢	6週齢	7週齢 (出荷時)
1	0	0	0	3.437
2	0	0	0	0.023
3	0	0	0	0.024
4	0	0	0	0.003
5	0	0	0	20.598
6	0	0	0.020	0.010
7	0	0.035	0.549	24.473
8	0	0.002	0.004	0.010
9	0	0	0	0.008

赤字 分離培養試験において分離できた検体

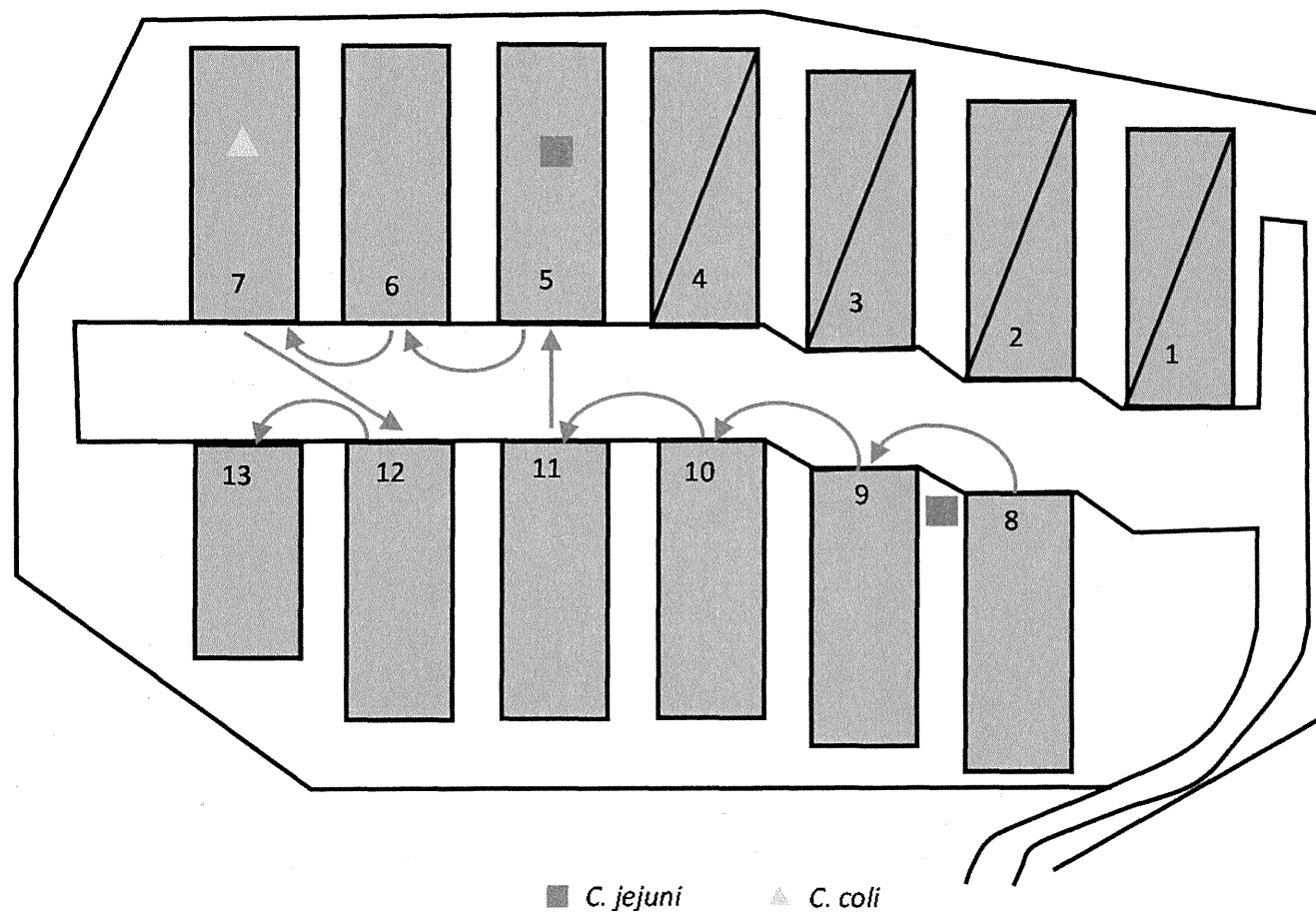
図1. B農場内におけるカンピロバクター汚染状況



○ 6Wで検出 ● 8Wで検出

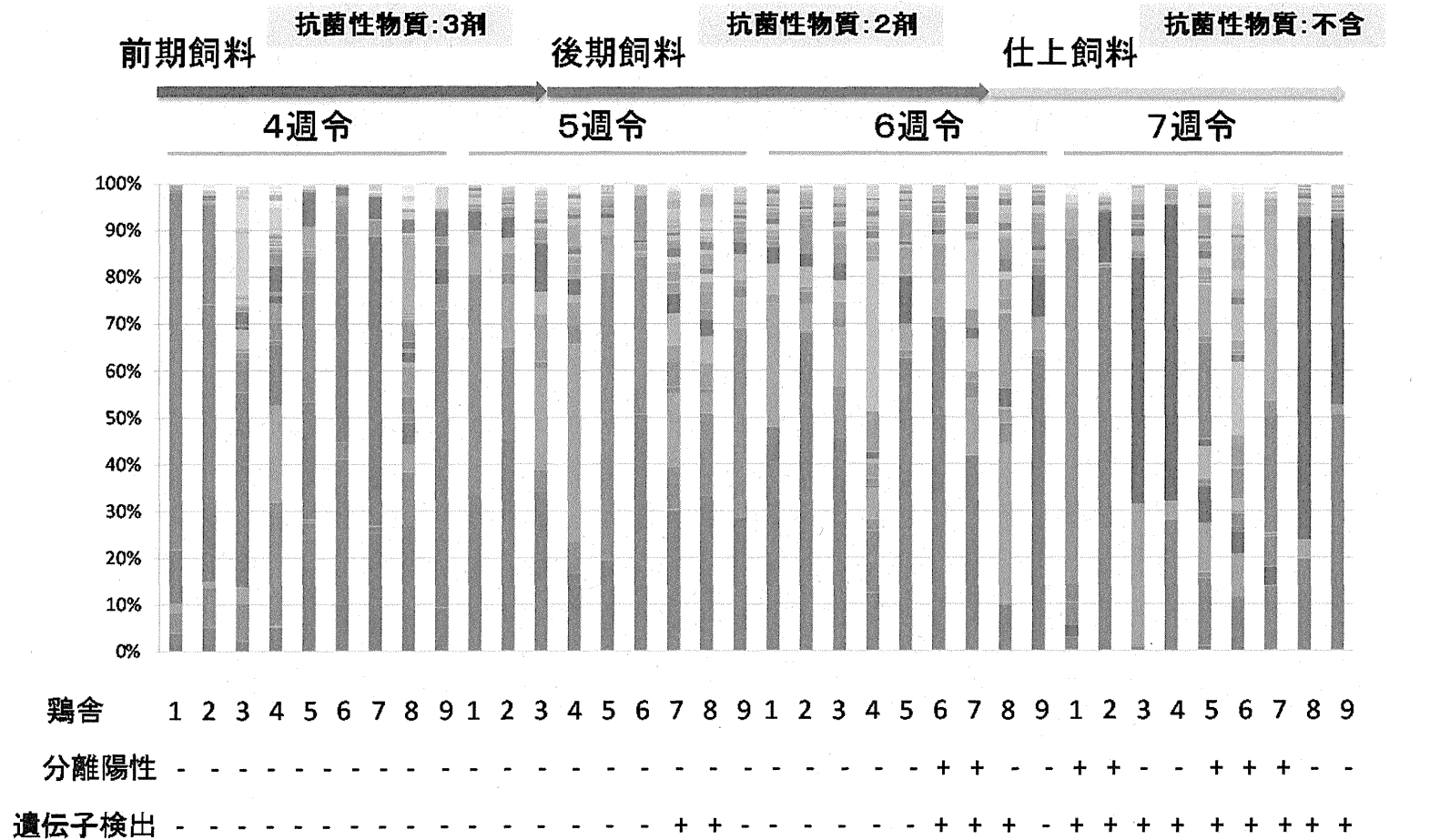
○ (ST-45)を除き、いずれもST-2031(574CC)=昨年度と同一遺伝子型

図2. E農場内におけるカンピロバクター汚染状況



8W(出荷時)にのみ、ST-4526(昨年度と同一遺伝子型)が分離された

図3. B農場における飼料変更、菌叢及びカンピロバクター検出状況の経時変動



各菌群を異なる色で示している

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

分担研究項目:農場段階におけるカンピロバクターの制御に関する研究

「ブロイラー鶏におけるカンピロバクターの持続感染に関する研究」

分担研究者 中馬猛久

ご所属 鹿児島大学共同獣医学部

研究協力者 安藤匡子

ご所属 鹿児島大学共同獣医学部

研究要旨

カンピロバクターは主要な食中毒起因菌であり、その原因食材として特に鶏肉が挙げられる。しかし、本菌のブロイラーへの感染経路はよく知られていない。そこでブロイラー飼育農場のカンピロバクター汚染源と持続感染要因について検討した。日齢の異なる 32 鶏群 160 個体の糞便シードスワブを調べた結果、カンピロバクターは 3~28 日齢まで分離されず、31 日齢以降で分離された。環境サンプルからカンピロバクターは分離されず、45 日齢時の堆積糞と貯水槽サンプルから *C.coli* が分離され、それらの遺伝子型も一致した。ブロイラーへの汚染源特定までには至らなかったが、鶏舎周辺環境から貯水槽を通じて鶏群への汚染が始まる可能性もあることが判った。高頻度汚染農場での持続感染要因を調べるため、農場 A で 2008~2012 年の 5 年間に毎年 1 鶏群から分離された *C.jejuni* の中から 3 株選び、その遺伝子型を比較解析した。その結果、毎年異なる遺伝子型が検出された。農場 B で 2011~2012 年の 1 年間連続して飼育された 5 鶏群から分離された *C.jejuni* の中から 3 株選び、同様に解析を行ったところ、連続鶏群で同じ遺伝子型と異なる遺伝子型がそれぞれ検出された。また、どちらの農場でも近似する遺伝子型群が検出された。遺伝子型の解析により、鶏舎特有の遺伝子型を持つカンピロバクターが持続的に定着しているわけではないことが明らかになった。また、近似する遺伝子型群が検出されたことから地域に小さな変異をしながら定着した菌がいる可能性が示唆された。

A. 研究目的

ブロイラーの飼育段階においてヒナ導入時にはカンピロバクターは検出されることが知られている。しかしながら、飼育中にカンピロバクター保菌鶏が現れると水平感染によって鶏群全体に感染が拡大し、食鳥処理過程の交差汚染によって鶏肉が汚染されることが知られている。昨

年度までにブロイラーの日齢とカンピロバクター感染の関係を調べ、さらに飼育ブロイラーのカンピロバクター汚染要因について調査を行った。

本年度は、飼育農場におけるカンピロバクター汚染源を明らかにするため、分離されたカンピロバクターの遺伝子型の調査比較を試みた。さらに高頻度汚染農場におけるカンピロバク

一持続感染要因を調べるため、分離菌株の遺伝子型比較を実施したので、報告する。

## B. 研究方法

### 1. ブロイラー飼育農場におけるカンピロバクター汚染源の究明

2013年2～3月、7～9月に月2回(約14日間隔)、ブロイラー飼育農場の1～4号舎で得られた材料を検査した。スワブサンプルである斃死雛の遺残卵黄プール、鶏舎入場前長靴底面、堆積糞、盲腸便複数個所プールはCCDA培地(OXOID, LTD)に直接塗布した。原水、貯水槽、鶏舎の手前、中央、奥に設置された飲用水はそれぞれ5mlずつ2倍濃厚プレストン液体培地5mlに接種した。飼料は10gを2倍濃厚プレストン液体培地90mlに接種した。鶏舎周囲の野鳥の糞、サービスルームのネズミの糞は滅菌綿棒でふき取り、2倍濃厚プレストン液体培地5mlに接種した。その後、増菌した2倍濃厚プレストン液体培養液1白金耳量をCCDA培地に画線塗布した。CCDA培地上のカンピロバクター様コロニーを1つ選び、Mueller Hinton(M.H.)寒天培地(OXOID, LTD)に画線塗布し、純培養した。菌の培養はいずれも微好気条件下で42°C、48時間で行い、同定にはMALDI TOF-MSとPCRを用いた。遺伝子型別には7種類(*aspA*, *glnA*, *gltA*, *glyA*, *pgm*, *tkk*, *uncA*)の必須遺伝子領域のシーケンスによるMLST(Multilocus sequence typing)法を用いた。

### 2. 飼育ブロイラーのカンピロバクター持続汚染要因

材料菌株として、食鳥処理場で採取された鶏盲腸由来 *Campylobacter jejuni* 30株を使用した。菌株は農場Aと農場Bから選抜した。農場A由来菌株は2008年9月から2012年7月に5鶏群から計15株(1鶏群3株)を選抜し、農場B由

来菌株は2011年4月から2012年9月に5鶏群から計15株(1鶏群3株)を選抜した。菌株は20%グリセロール存在下で-80°C冷凍保存されており、使用時には保存バイアル300μlを融解後、M.H.寒天培地にコンラージを用いて塗布し、微好気条件下で42°C、48時間培養後、菌の発育を確認し、MALDI TOF-MSにて *C. jejuni* であることを確認し、DNAを抽出した。その後、M.H.寒天培地上のコロニーをマイクロバンク(イワキ株式会社)にて-70°C冷凍保存した。菌株の遺伝子型別にはMLSTに加え、鞭毛構成蛋白をコードするフラジェリン遺伝子のRFLP(Restriction Fragment Length Polymorphism)を用いた。

## C. 研究結果

### 1. ブロイラー飼育農場におけるカンピロバクター汚染源

飼料、斃死雛の遺残卵黄、鶏舎入場前長靴底面、野鳥の糞、ネズミの糞、盲腸便、原水、鶏舎内飲用水からカンピロバクターはどの日齢時にも分離されなかった。45日齢時に2号舎の堆積糞(3月)と貯水槽(9月)から *C. coli* が1株ずつ分離された。MLST解析対象の必須遺伝子を解析した結果、7種類の必須遺伝子番号のうち5種類が一致した。残りの2種類は untypeable であった。シーケンスタイプ(ST)を確定することはできなかったが、堆積糞分離株と貯水槽分離株の遺伝子型は一致した。

### 2. 飼育ブロイラーのカンピロバクター持続汚染要因

2008～2012年に農場Aで分離された *C. jejuni* のSTは毎年異なり、CC ST-354が2008年、2009年、2012年に検出された。RFLPパターンは6種(A～F型)に分けられ、毎年異なった。農場Bで2011年4月と6月に連続して飼育された鶏群から分離された *C. jejuni* のSTは異なり、RFLP型も異なった。2012年7月と9月の鶏群で



は同じ ST と RFLP 型が続けて検出される場合と異なる ST と RFLP が検出される場合があった。また、CC ST-354 が 2011 年 4 月、2012 年 1 月、7 月、9 月に検出され、CC ST-464 が 2011 年 6 月と 2012 年 9 月に検出された。RFLP パターンは 5 種 (A, D, G~I 型) に分かれた。CC ST-354 に属する ST-6849、ST-5721、ST-5265 と CC ST-464 に属する ST-4389、ST-7012 は日本でのみ報告があり、ST-6849 と ST-7012 は本研究で初めて検出された。

#### D. 考察

##### 1. ブロイラー飼育農場におけるカンピロバクター汚染源

飼育農場のカンピロバクター汚染要因をブロイラーの日齢ごとにみると、飼料、使用長靴底面、野鳥や鼠の糞便からカンピロバクターはどの日齢時にも分離されなかったことから、環境が直接汚染要因となる可能性は低いものと考えられた。飼育中のブロイラー盲腸便からも全くカンピロバクターが分離されなかったことから、今回調査を行った農場は通常の農場よりも衛生管理状況が良好であった可能性が考えられる。しかしながら、堆積糞と貯水槽から 45 日齢時に *C. coli* がそれぞれ 1 株ずつ分離されている。このことから、ブロイラーにカンピロバクターが感染する前に鶏舎周辺の環境が何らかの要因でカンピロバクターに汚染されてしまうことが考えられる。本調査では、ブロイラー飼育過程でのカンピロバクター汚染源特定にまでは至らなかったが、その素因に関する一知見が得られた。

#### 結論

ブロイラー飼育農場に搬入直後のヒナは通常カンピロバクター陰性であり、一般的には 3 週令以降に陽性に転じると報告されている。本研究では 29、31、43 日齢時のいずれの材料からもカンピロバクターは分離されなかった。また、45 日

齢時に *C. coli* が 2 株しか分離されなかったことから、検査した鶏舎内は比較的清浄に保たれていたと考えられる。

45 日齢時に 2 号舎の堆積糞と貯水槽から分離された *C. coli* を遺伝子型別した結果、遺伝子型は一致したことから両者には関連があると考えられる。本研究で野鳥の糞からカンピロバクターは分離されなかった。しかし、野鳥の糞、ハエの体表、鶏舎内外の空気、農場の土壌、環境中の水からカンピロバクターが分離された報告がある。農場内で野鳥が糞を落とす、ハエが接触する、空気中の菌が風に乗って運ばれる、汚染された水や土の上を人や車両が行き来するなどの経路によって、*C. coli* が鶏舎外にある堆積糞と貯水槽に媒介され、汚染した可能性が考えられる。

##### 2. 飼育ブロイラーのカンピロバクター持続汚染要因

同一農場から分離された *C. jejuni* 株を遺伝子型別した結果、5 年間すべて遺伝子型が異なった。連続して飼育された鶏群から分離された *C. jejuni* 株では、直前の鶏群とは異なる遺伝子型と同じ遺伝子型が検出された。このことから、鶏舎内に特定の遺伝子型の *C. jejuni* が持続的に定着しているのではなく、鶏群が入れ替わるごとに遺伝子型も変わることが分かった。

他の報告では 1 鶏群から 6 種類の RFLP 型が検出されている。しかし、本研究で調査した 10 鶏群のうち 3 鶏群が 3 株中 1 株の遺伝子型が異なり、残りの 7 鶏群は 3 株すべて同じ遺伝子型であった。このことから特定の遺伝子型の *C. jejuni* が鶏群全体に感染する可能性が高いと考えられる。

MLST 法による菌の遺伝子解析はインターネット上のデータベースにより国、年、由来の異なる菌株を比較することができる。本研究で 8 株検出された ST-354 は 1984 年以降、ルクセンブルク、インド、アメリカなど多くの国で鶏、七面鳥、

人、羊、子牛、環境水から検出され、日本では人と鶏から報告されている。現在 ST-354 は鶏から最も多く検出されている。また、ST-464 は2001年に日本で人から分離されて以降、世界的に拡大し、現在鶏からの検出数が最も多い。このことから、保菌動物に特異的な ST が存在し、ST-354 と ST-464 は鶏と関係があると考えられる。

なし

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表等

なし

### 2. 学会等発表

- ・「ブロイラー農場のカンピロバクター汚染源と持続感染要因」第157回日本獣医学会学術集会 平成26年9月9日(札幌)
- ・「ブロイラー農場におけるカンピロバクター汚染源と遺伝子型の推移」第63回日本獣医公衆衛生学会(九州) 平成26年10月4日(鹿児島)
- ・「遺伝子型からみたブロイラー農場におけるカンピロバクターの経時的推移」第7回日本カンピロバクター研究会(東京) 平成26年12月12日

## 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

## 引用文献

表 1 *C. coli* の MLST 型別と RFLP 型

材料	必須遺伝子							ST
	<i>aspA</i>	<i>glnA</i>	<i>gltA</i>	<i>glyA</i>	<i>pgm</i>	<i>ikt</i>	<i>uncA</i>	
堆積糞	33	UT <sup>1)</sup>	30	82	104	UT	17	UT
貯水槽	33	UT	30	82	104	UT	17	UT

1) untypeable

表 2 農場 A における *C. jejuni* の MLST 型別と RFLP 型の 5 年間の推移

分離日	必須遺伝子							ST	CC	RFLP 型	株数
	<i>aspA</i>	<i>glnA</i>	<i>gltA</i>	<i>glyA</i>	<i>pgm</i>	<i>tkl</i>	<i>unclA</i>				
2008 年 9 月 2 日	8	10	2	2	11	12	6	354	354	A	3
2009 年 10 月 7 日	8	17	2	2	11	1	6	6849	354	B	3
2010 年 10 月 26 日	2	1	1	3	140	3	5	806	21	C	3
2011 年 1 月 18 日	24	17	2	15	23	3	12	443	443	D	3
2012 年 7 月 3 日	8	10	2	4	11	12	335	5721	354	E	2
	9	2	2	2	11	5	6	824	257	F	1

表3 農場Bにおける *C. jejuni* の MLST 型別と RFLP 型の1年間の推移

分離日	必須遺伝子							ST	CC	RFLP 型	株数
	<i>aspA</i>	<i>glnA</i>	<i>gltA</i>	<i>glyA</i>	<i>pgm</i>	<i>tkl</i>	<i>unclA</i>				
2011年 4月5日	8	17	2	2	11	59	6	5265	354	G	3
2011年 6月21日	24	17	12	2	2	3	1	4389	464	H	3
2012年 1月24日	8	10	2	2	11	12	6	354	354	A	3
2012年 7月3日	8	10	2	2	11	12	6	354	354	A	1
	24	17	2	15	23	3	12	443	443	D	2
2012年 9月11日	8	10	2	2	11	12	6	354	354	A	1
	2	2	2	2	11	3	1	7012	464	I	2

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

分担研究項目: 食鳥処理場におけるカンピロバクターの制御

研究協力者 藤田雅弘 坂野智恵子 杉本治義 小倉洋裕 後藤重幸

群馬県食肉衛生検査所

古茂田恵美子 重村泰毅

東京家政大学

鈴木智之

滋賀県衛生科学センター

石岡大成 木村博一

国立感染症研究所

分担研究者 森田幸雄

東京家政大学

### 研究要旨

カンピロバクターは鶏肉から頻繁に検出されることから、鶏肉がカンピロバクター食中毒の感染源となりうる事が指摘されている。そこで、市販鶏肉等についてカンピロバクター検査を実施したところ、20% (6/30 検体: ササミ肉 3/11 検体, ムネ肉 1/8 検体, モモ肉 1/9, こまぎれ 1/2 検体)の鶏肉から分離された。また、1 検体の心臓からカンピロバクターが分離された。分離菌は全て *C. jejuni* であった。カンピロバクター保菌鶏群および非保菌鶏群の区分処理の可能性を考え、処理場に搬入される前に、鶏群のカンピロバクター汚染を把握するための迅速簡便な検査方法について検討した。処理場に搬入される鶏群の糞便中でのカンピロバクター菌数は搬入の 14 日前から処理当日までほとんど変わらない。市販イムノクロマト法キットにより、検査時間が 1 時間以内となり培養法に比べ著しく短縮が可能であったが、菌数が  $10^6$  個/g でなければ検出されないことがあり、増菌培養が必要であると考えられた。また、エアークラーク設置食鳥処理場を訪問し聞き取りおよび見学を実施した。塩素を滴下したチラー水による処理の後に、エアークラークが設置されていた。多くの生産農家・食鳥処理場でカンピロバクター汚染を減少するための行動を行っているが、鶏肉の衛生度が対価として得られていない現状であった。

### A. 研究目的

2013年、我が国の食中毒発生件数は931件、食中毒患者数は20,802人である。主な病因物質別にみた細菌・ウイルス性食中毒事件数、患者数ともに第1位はノロウイルス(328件, 12,672人)、第2位はカンピロバクター(227件, 1,551人)であり、ノロウイルス及びカンピロバクターによる食中毒は公衆衛生上重要である。特に鶏肉や汚染された食品の喫食は人のカンピロバクター感染症の主な原因となっている。カンピロバクターは食鳥と体や市販鶏肉から高率に分離されており、その

多くが *C. jejuni* であること<sup>1, 2)</sup>、*C. jejuni* は冷蔵庫内でも長期間生存すること<sup>3)</sup>、比較的少量の菌量の摂取でも食中毒を発症すること<sup>4)</sup>、そして食中毒のみならず、食中毒症状の回復後にギランバレー症候群(末梢神経麻痺性疾患)を発症する事例もあること<sup>5)</sup>等から食品衛生上のみならず医学的にも注視されている。

カンピロバクター食中毒の制御のためには農場での衛生対策ポイントの検討、食鳥処理場での衛生対策、流通段階における対策が必要である。農場での衛生対策ポイントの検討では、農場