

思われる写真やフロー図がない、2. 検査マニュアルだけで完結しない、3. 診断・類症鑑別に教科書的表記が混在している、4. 農場での所見と・とちく場で見られる所見が混在している、5. 甚急性と慢性の記載が混在している、6. 表現がと畜検査上一般的ではない、7. 繰り返し同じ内容が記載されているとの指摘があった。

マニュアルに必要な項目として、1. 解説、2. 保留基準、3. 採材方法、4. 類症鑑別、4. 検査方法、5. 判定基準、6. 措置についてそれぞれの項目について要点を示し、1冊で完結させる必要がある。こうしたことを踏まえ、平成26年度は敗血症のマニュアルについて改訂のポイントを示した。

D. 考察

1. 農場におけるカンピロバクターの制御に関する研究

①農場におけるカンピロバクターの鶏舎間伝播様式と汚染源推定に関する研究

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：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。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、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。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。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で、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。

また、2農場を対象とした時系列をとった汚染動態に関する検討では、本菌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。

② 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

1) カンピロバクター感染とブロイラー日齢の関係
カンピロバクターは3日齢から28日齢まで全く分離されず、飼育31日齢から陽性に転じた。ブロイラーのカンピロバクター汚染は通常3週齢以降に始まると言われており、今回もほぼ同様の結果が確認された。

2) ブロイラー農場でのカンピロバクター汚染源
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。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見ると、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。

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。

3) 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。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。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。

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。

2. 食鳥処理場におけるカンピロバクターの制御に関する研究

1) A 食鳥処理場でのカンピロバクター汚染調査

カンピロバクター非保菌鶏群を処理した場合はと体からカンピロバクターは検出されなかった。このことから、食鳥処理場に搬入される鶏が保菌していない場合には食鳥処理場内でカンピロバクターの汚染は生じないことが判明した。一方、カンピロバクター保菌鶏群を処理した場合、そのと体からカンピロバクターが分離され、直後に処理される非保菌鶏群のと体も汚染していた。分離株についてまず、血清型別を実施したが、血清型が判明する株が少なかったため、血清型別に続きPCR-RFLP遺伝子型別を実施した。血清型やPCR-RFLP遺伝子型別から、直前に処理された保菌鶏群の盲腸内容物由来株と同一の血清型、PCR-RFLP遺伝子型を示すものが多かった。よって、保菌鶏群の盲腸便中に生息するカンピロバクターが次に処理する鶏群のと体を汚染していることが確認された。

搬入前の養鶏場段階でカンピロバクター非保菌鶏群であるか、保菌鶏群であるか判明することができ、さらに、食鳥処理場でカンピロバクター非保菌鶏を先に搬入し、処理するという、区分処理ができれば、カンピロバクター汚染の無い鶏肉を生産する

ことが可能であると思われた。

カンピロバクターを保菌していない鶏舎の飼育管理状況を把握するため、アンケート調査を実施したが、すべてが直営農場であり、保菌農場と非保菌農場の衛生管理項目について大きな違いは見られなかった。ただ、ウインドレス鶏舎の農場は、開放鶏舎に比べ、有意に低かった。このことから、鶏舎の飼育環境をコントロールし易いウインドレス鶏舎にすることが、カンピロバクター非保菌鶏を生産する一助であると思われた。

2) 農場におけるカンピロバクター汚染調査

処理場に搬入される鶏群は60日齢を目安とされている。このため、区分処理するため、処理場に持ち込まれる1週間前には陽性鶏群を特定する必要がある。今回、搬入14日前、7日前及び当日の盲腸便の保菌数は、ほぼ同等であった。このことから、食鳥処理場でとたいの汚染源となる盲腸内容物の保菌状態が、農場での鶏群の排泄便を調べることにより十分推定できることが判明した。カンピロバクターの保菌状況を把握するため、確立された培養法により検出するためには少なくとも2~3日必要である。このことから、検査に要する時間が検体処理から判定まで短時間(おおむね1時間以内)であるイムノクロマト法キットによる検査法を検討した。しかしながら、便1gあたり 10^5 個/gを下回ると、直接便からの検出が難しくなり、増菌培養をおこなわなくては、いずれのキットにおいても検出することが難しくなる。小田らは、イムノクロマト法キットの検出菌数は 10^6 個/mlであれば十分であるとしているが、簡便なカンピロバクターの増菌培養が可能なキットの開発も必要であると考えられた。

搬入前の養鶏場の段階でカンピロバクターに高度に汚染された鶏群は、食鳥処理場において、施設、他鶏群の処理と体に対してカンピロバクターのリスクを拡大する恐れがある。このため、農場においてイムノクロマト法キットで陽性と判定される高度汚染鶏群については、処理を最後に回し、カンピロバクター非保菌鶏を優先的に処理するという、区分処理ができれば、カンピロバクター汚染の無い鶏

肉を生産することが可能であると思われた。

キットにより、同一サンプルを用いても検出感度に違いが見られることから、市販キットについても用途により選択する必要があると考えられた。

3. 流通段階におけるカンピロバクターの制御に関する研究

1) 市販鶏肉のカンピロバクター汚染調査

今回、カンピロバクターは20% (6/30 検体) の鶏肉から分離された。平成25年度の調査ではカンピロバクターは鶏皮がついている42% (11/26 検体) の鶏もも肉および40% (12/30 検体) の鶏ムネ肉から、また6% (2/31 検体) の鶏ササミ肉から分離されている。平成25年度、今年度も鶏肉はカンピロバクター汚染があるが、同じ方法で調査したにもかかわらず市販鶏肉の汚染率が減少していた。また、前年度の調査では、モモ肉、ムネ肉はササミ肉よりも高率に汚染されていたが、今年の調査ではササミ肉が最も多く27% (3/11 検体) であった。毎年、カンピロバクター食中毒は多発しているため、保健所等もカンピロバクター食中毒防止対策を行っている。このような対策によって市販鶏肉のカンピロバクター汚染率も減少しているのかもしれない。

今回、カンピロバクターが検出された6検体の鶏肉およびカンピロバクターが検出されなかった24検体の鶏肉の一般生菌数や腸内細菌科菌群数を比較したところ、有意差は無かった。鶏肉のカンピロバクター汚染の有無は、鶏肉になってからの衛生的な取扱いではなく、鶏肉になった段階でカンピロバクター汚染があるかないかに左右されていると思われた。

2) 輸入冷凍鶏肉及び国産冷蔵鶏肉でのカンピロバクター汚染率の比較検証

国内で発生するカンピロバクター食中毒では、「生、或いは加熱不足状態での喫食」或いは「器具や手指を介した二次汚染」が、鶏肉をはじめとする原因食品からの病原体伝播を助長する主な環境要因と考えられており、その衛生管理手法による制御として加熱殺菌が最も有効な方法であることはい

うまでもない。一方で、我が国では生食習慣が一定の割合で存在しており、生鶏肉の流通そのものを規制することは、困難である。

本研究では、農場から消費に至る過程での鶏肉でのカンピロバクター汚染制御に資することを年頭におき、各ステージでの検討を行っている。その中の分担研究として、本報では流通段階における生鶏肉の汚染対策として、冷凍処理の有効性について検討を行った。

文献検索を通じて、アイスランド・デンマーク・ニュージーランド各国でのカンピロバクター食中毒低減を果たした実績はいずれも、冷凍処理の有効性を示してきたといえるが、これら3カ国では、農場での制御を根幹として、食鳥処理・流通・消費の各過程に対して、総合的な対策を講じている。アイスランドの例では、農場では鶏群毎の汚染確認を経時的に行い、汚染が認められる・或いは汚染が過去2代に渡って認められた鶏群に対しては、食鳥処理後に冷凍を義務付けることが定められている他、汚染鶏群から非汚染鶏群へと転換を果たした農家に対しては助成金を付与する等の対策がとられている。また、消費者に対しては、冷凍・非冷凍の別から、汚染肉かどうかの判断が容易になることに加え、啓蒙活動を持続的に行う等の対策がとられている。国内における鶏群のカンピロバクター汚染度をはかり、食鳥処理・流通等の各過程での対策を考察することは、海外の事例を踏まえても明らかのように、本食中毒の低減に資することが期待される。

本研究では、冷凍処理を通じた鶏肉内カンピロバクター生存率の低下は特に低い汚染菌数での添加回収試験で顕著であり、約1週間の冷凍処理により、約1対数個程度の菌数低減が期待できることを示した。これらの知見は、海外における成績とほぼ合致しており、その実用化により、国内流通鶏肉の汚染低減が一定の割合ではかられると想定される。

一方で、本菌の食品内挙動にかかるこれまでの知見から、本菌の生存性は必ずしも培養により算定される数値と一致しないとの成績も複数報告されている。実際に、2年目に実施したEMA-PCR法を用い

た検討成績は、これを裏付けることとなった。冷凍初期段階における培養成績との差異を示したことは、本菌が冷凍初期段階において、損傷あるいは生きていないが培養できない状態 (VBNC) 状態に移行していると推察される。後者の定義は、培養できないが、何らかの生理活性を有し、何らかの刺激に伴い、再び培養可能な状態へと復帰することとされているが、冷凍処理に伴う上述の成績の差異を鑑みて、今後、復帰の可能性についても検討する必要があると考える。

応用的側面から言及した場合、低減に資するためには、こうした損傷や VBNC 状態にある細菌亜集団の可能性を除外する必要があると考えられ、そのためには冷凍処理時間の長期化 (少なくとも 3 日以上) をはかる必要がある。実際に、国内で生産・流通する冷蔵鶏肉に比べて、輸入冷凍鶏肉ではカンピロバクターの生存菌数は総じて低い値を示しており、このことは長期的な冷凍処理が本菌汚染低減に有効に機能しているとの証とも取れる。一方で、実用性の面からは、長期的な冷凍処理は実現不可能とも思われる。今後は、食肉の急速凍結を可能とする実用機器を用いた上で、より短時間で処理を行った場合の、汚染低減効果を検証し、もって、その有効性と実用性をあわせて明らかにしたい。

4. 牛内臓肉の衛生管理に関する研究

①牛内臓肉の衛生管理に関する研究

内臓肉の細菌汚染状況から処理施設により、汚染菌数の高いところと低いところがあることが明らかとなった。

粘膜面の汚染が漿膜面に移行していることが明らかで、処理施設では、処理台の洗浄不足、溜水による洗浄などが行われていた。汚染菌数の低い処理施設では、一頭毎に処理台の洗浄を行い、流水洗浄で水槽の水を頻繁に交換していた。

洗浄水の交換を頻繁に行い、処理台を一頭毎に洗浄することが二次汚染の低減につながると考えられた。

②牛内臓肉の洗浄および加熱処理に関する研究

牛タンを対象とした洗浄に関する検討では、微酸性電解水が、次亜塩素酸水や水道水に比べて、より速やかな菌数低減効果を示した。電解水の内部浸透性は次亜塩素酸に比べ弱いとされている一方で表面での効果発現はより速やかと解される。本研究の成績は、したがって、牛タン検体における細菌汚染分布は概ね外表面に限定されることを示唆しているといえよう。また、煮沸加熱に関する検討結果より、牛ミノの煮沸調理にあたっては、少なくとも 1 分間の煮沸処理が望ましいと考えられた。

5. と畜・食鳥検査における疾病診断の標準化に関する研究

食肉衛生検査マニュアルはマニュアルというよりは教科書的にまとめられていることから、食肉衛生検査にはそのまま使いづらいところがある。改訂が必要と考えられた。

たとえば、と畜検査の作業をフロー図にまとめ、チェックシート形式にすることは、各自治体の疾病診断を平準化することに役立つものと考えられた。

E. 結論

1. 農場におけるカンピロバクターの制御に関する研究

①農場におけるカンピロバクターの鶏舎間伝播様式と汚染源推定に関する研究

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。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。更に、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。一方で、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。

②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

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。

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。

2. 食鳥処理場におけるカンピロバクターの制御に関する研究

カンピロバクター保菌鶏が食鳥処理場で処理されると、と体を汚染するとともに施設を汚染し、その汚染が次に処理すると体を汚染していることが遺伝子学的に証明された。鶏肉へのカンピロバクター汚染を無くすためには食鳥処理場でカンピロバクター非保菌鶏を先に搬入し、処理するという、区分処理ができれば、非保菌鶏群のと体へのカンピロバクター汚染は防止できることが確認された。

カンピロバクターの汚染の無い鶏肉を生産するためには、生産農場でカンピロバクターを保菌していない鶏群を生産し、それを食鳥処理場で処理することで達成できることが判明した。農場でカンピロバクターを保有しない鶏を生産することは難しいと思われるが、その一助として鶏舎の形態はウインドレスのほうが有効であると思われた。

処理場搬入鶏群のカンピロバクター汚染の程度は、培養法により得られた保菌数から、搬入の14日前から処理当日までほとんど同じであった。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い時間の短縮が可能であった。しかしながら、同法では菌数が 10^6 個/gでなければ検出されないことがあり、増菌培養を行う必要性が課題として残っている。当該法の使用に

より、農場での汚染鶏群と非汚染鶏群の判別がより可能性を帯びると想定されるが、現場での実用性を鑑みただけの場合には、感度・精度の両面から同キット類については今後も検討の余地がある。

3. 流通段階におけるカンピロバクターの制御に関する研究

市販鶏肉はカンピロバクター汚染されているが、その汚染率は年や産地等によって異なっていることが判明した。また、情報収集を経て、冷凍処理の有効性を鑑み、添加回収試験及び自然汚染検体を用いて同処理の有効性を検証した。同処理に対する感受性は、菌株間でのばらつきが認められ、冷凍初期段階（2日冷凍）では統計学的に有意差を認めたことから、研究用冷凍装置を用いた場合には、より長時間の冷凍処理が制御効果の点から確実性に富むとの結論を得た。また、輸入冷凍鶏肉と国産冷蔵鶏肉における汚染率の比較を行い、冷凍処理が鶏肉における本菌汚染制御に資することを実態として把握した。今後は、実用機器を用いた上でより短時間処理でえられる制御効果を検証し、同処理の例示を行う等、より実態的な検討を進めていきたい。

4. 牛内臓肉の衛生管理に関する研究

汚染菌数の低い処理施設での手順をマニュアル化する必要がある。その際のポイントとして

- ① 一頭毎に処理台を洗浄する。
- ② 洗浄水を適切な頻度で交換する。
- ③ 大腸を切開する際の内容汚染を漿膜面に拡大しない。

等の点が考えられたが、それぞれの処理施設の構造・設備を変更しないと達成できないものもあることから、共通のマニュアル化は困難と考えられた。

牛タンを洗浄する際には、表面での細菌汚染を主眼に置いた上で、効果作用時間等を考慮しつつ、適切な洗浄溶媒の選択が求められよう。また、牛ミノの煮沸加熱処理を通じたD値を求めた。

5. と畜・食鳥検査における疾病診断の標準化に

関する研究

食肉衛生検査マニュアルは現場での使用を視野に入れた改訂が必要である。

F. 健康危機情報

該当なし

G. 研究発表

1. 書籍

- 1) Pascoe B, Lappin-Scott H, Sheppard SK, Asakura H. (2014) A chapter of “Does Biofilm formation aid colonization and infection in *Campylobacter*?” in a book of “*Campylobacter Ecology and Evolution*”. Caister Academic Press. pp.177-188.

2. 論文

- 1) Asakura H, Masuda K, Yamamoto S, Igimi S. (2014) Molecular approach for tracing the dissemination routes of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 in bovine offal at slaughter. *BioMed Res. Int.* 2014: 739139.
- 2) Asakura H, Brueggemann H, Makino S, Sugita-Konishi Y. Molecular approaches for the classification of microbial pathogens of public health significance. *BioMed Res. Int.* 2014: 725801.
- 3) 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.
- 4) Asakura H, Taguchi M, Ekawa T, Yamamoto S, Igimi S. (2013) Continued widespread dissemination and increased poultry host fitness of *Campylobacter jejuni* ST-4526 and ST-4253 in Japan. *J Appl Microbiol.* 114(5): 1529-38.

- 5) Asakura H, Brüggemann H, Sheppard SK, Ekawa T, Meyer TF, Yamamoto S, Igimi S. (2012) Molecular evidence for the thriving of *Campylobacter jejuni* ST-4526 in Japan. PLoS One. 7(11): e48394.

H. 知的財産権取得状況
該当なし

II. 分担総合研究報告

分担研究課題「農場におけるカンピロバクターの鶏舎間伝播と汚染源推定に関する研究」

研究代表者	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(株)
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	川本恵子	国立大学法人帯広畜産大学 動物・食品検査診断センター
研究協力者	榊田和彌	国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部
研究協力者	橘 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

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た。6農場・59鶏舎の盲腸便より本菌が分離され、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分離株をMLST法による遺伝子型別を行い、何れの農場においても鶏舎間水平伝播が生じる現状を把握した。このうち、2農場では、単一の遺伝子型株のみが全供試鶏舎より分離されており、蔓延性の高い菌株の存在が推察された。また、一部の農場では、作業員の動線下流で高頻度に本菌が分離され、農場内蔓延の一因として、作業員の動線が関与することが示唆された。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ろう。

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うと共に、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。更に、このうちの2農場を対象として、異なる飼養時期において、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し、16S rRNA pyrosequencing法により盲腸菌叢の動態に関する知見を得ることとした。

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。また、平成26年9月-10月の間には、2農場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、同2農場内の環境材料として、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加えた。

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. 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取し(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たっていたが、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と同様に、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。

5. 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

ユニおよびコリ(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、B 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 4)。昨年度分離できた *C. coli* は分離できなかった。E 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 4)。

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 5、図 6)。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 5、図 7)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。

6. 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 6)。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 6)から、6 週齢時において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。

7. 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。

8. 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6、図8)。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6、図8)。

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、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、こうした対策を行うことで、一定の低減がはから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。

また、2農場を対象とした時系列をとった汚染動態に関する検討では、本菌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。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。更に、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。一方で、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

- 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: Asakura H, Taguchi M, Ekawa T, Yamamoto S, Igimi S. (2013) Continued widespread dissemination and increased poultry host fitness of *Campylobacter jejuni* ST-4526 and ST-4253 in Japan. J Appl Microbiol. 114(5): 1529-38.
- 3: Asakura H, Brüggemann H, Sheppard SK, Ekawa T, Meyer TF, Yamamoto S, Igimi S. (2012) Molecular evidence for the thriving of *Campylobacter jejuni* ST-4526 in Japan. PLoS One. 7(11): e48394.
- 4: Asakura H, Ekawa T, Sugimoto N, Momose Y, Kawamoto K, Makino S, Igimi S, Yamamoto S. (2012) Membrane topology of *Salmonella* invasion protein SipB confers osmotolerance. Biochem Biophys Res Commun. 426(4):654-8.

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.

- 5: 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.
- 6: 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。
- 7: 朝倉宏、橘理人、廣井豊子、倉園久生、山本茂貴、五十君静信。農場におけるカンピロバクター・ジェジュニの地理・時系列別汚染分布の変動。第 88 回日本細菌学会学術総会。2015 年 3 月, 岐阜。

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

参考文献

- 1: Sommer et al. (2013) Prev Vet Med. 111(1-2):100-11.
- 2: Hald et al. (2004) Emerg Infect Dis. 10(8):1490-2.
- 3: Hald et al. (2007) Emerg Infect Dis. 13(12):1951-3.
- 4: Bahrndorff et al. (2013) Emerg Infect Dis. 19(3):425-30.

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

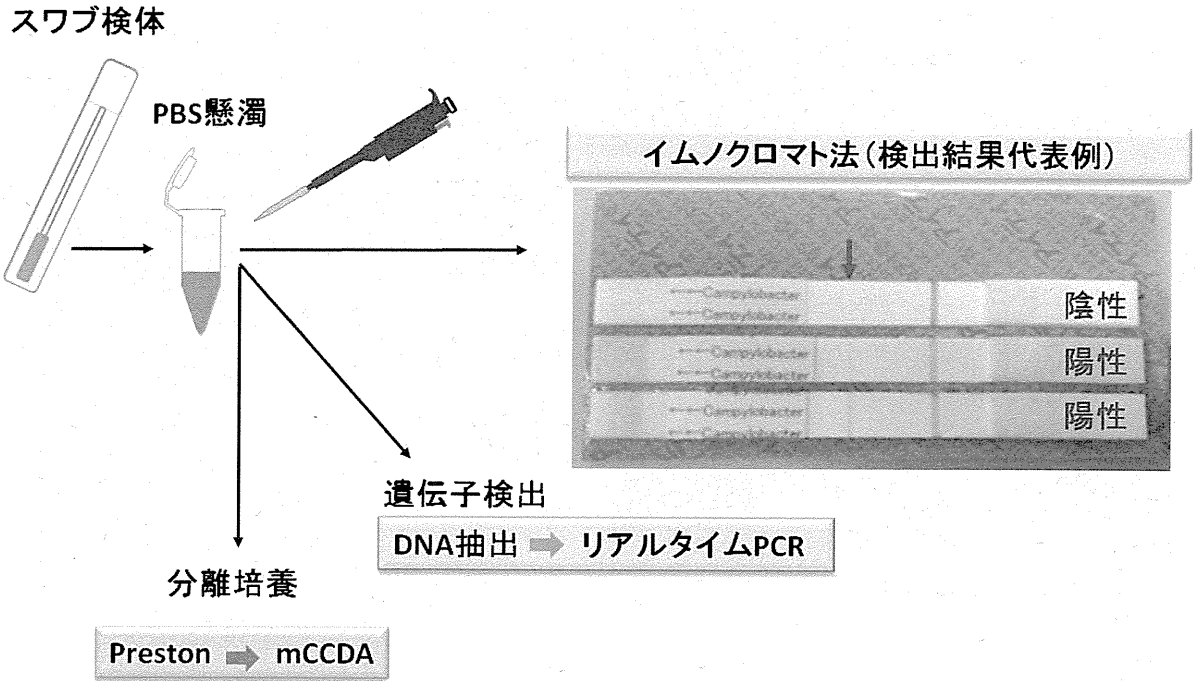
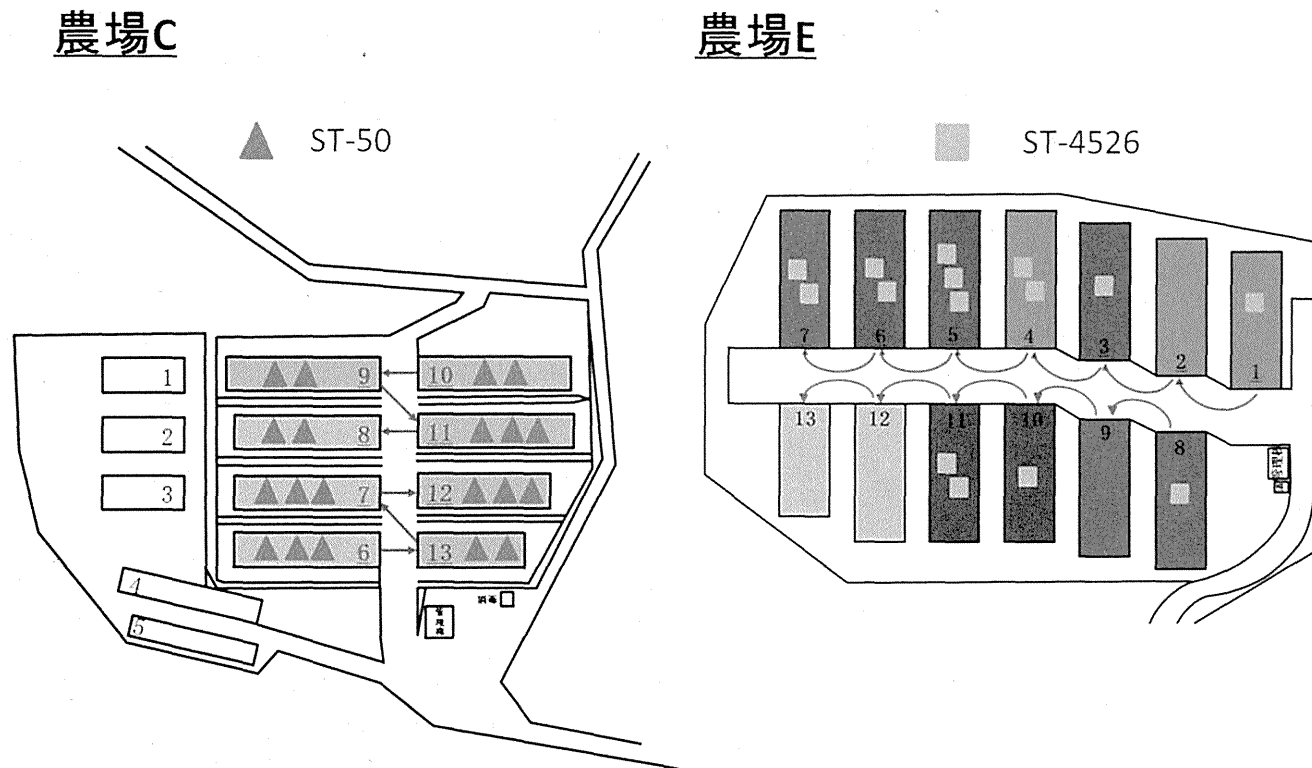


図2. 農場C及びE内におけるカンピロバクター汚染状況



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

