

図4. 農場Aにおけるカンピロバクター汚染状況

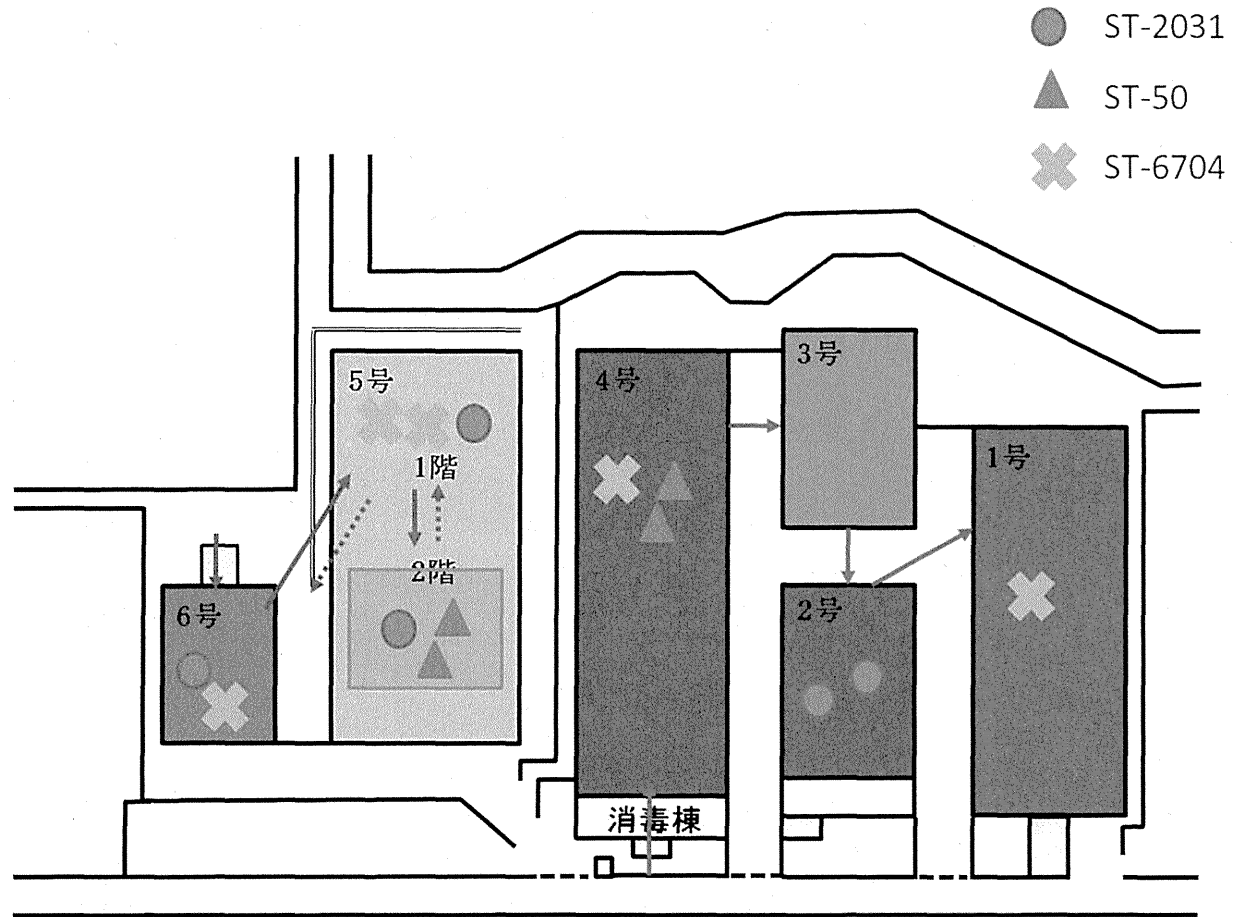


図5. 農場Bにおけるカンピロバクター汚染状況

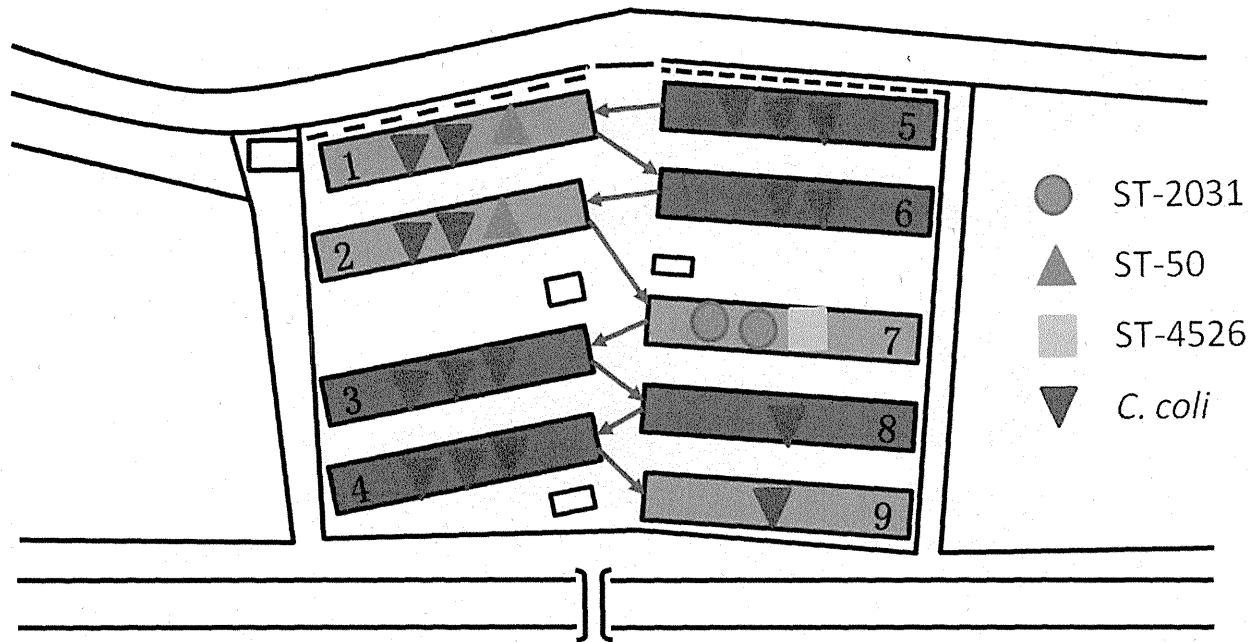


表1. 各種検出手法の成績比較

| 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、親鶏ロット別にカンピロバクター分離陽性率として算出した。

表4. 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5. 昨年度と本年度との分離株遺伝子型比較

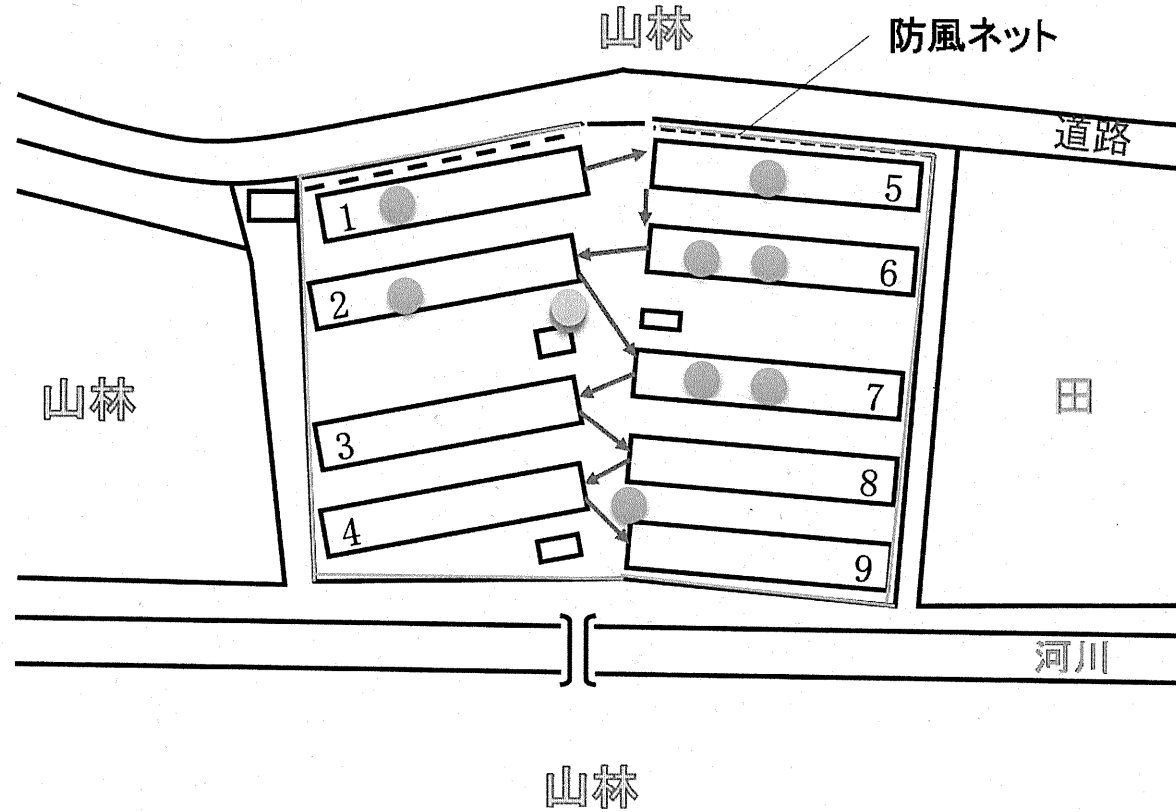
| 農場名 | 菌種 | 昨年度 (分離の有無・遺伝子型(ST)) | 本年度 (分離の有無・遺伝子型(ST)) |
|-----|------------------|-------------------------|-------------------------|
| A | <i>C. jejuni</i> | ST-2031、ST-50、ST-4526 | ST-2031、ST-45(土壌のみ) |
| | <i>C. coli</i> | 有り | 無し |
| B | <i>C. jejuni</i> | ST-4526 | ST-4526(鶏盲腸便及び土壌) |
| | <i>C.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

表6. 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

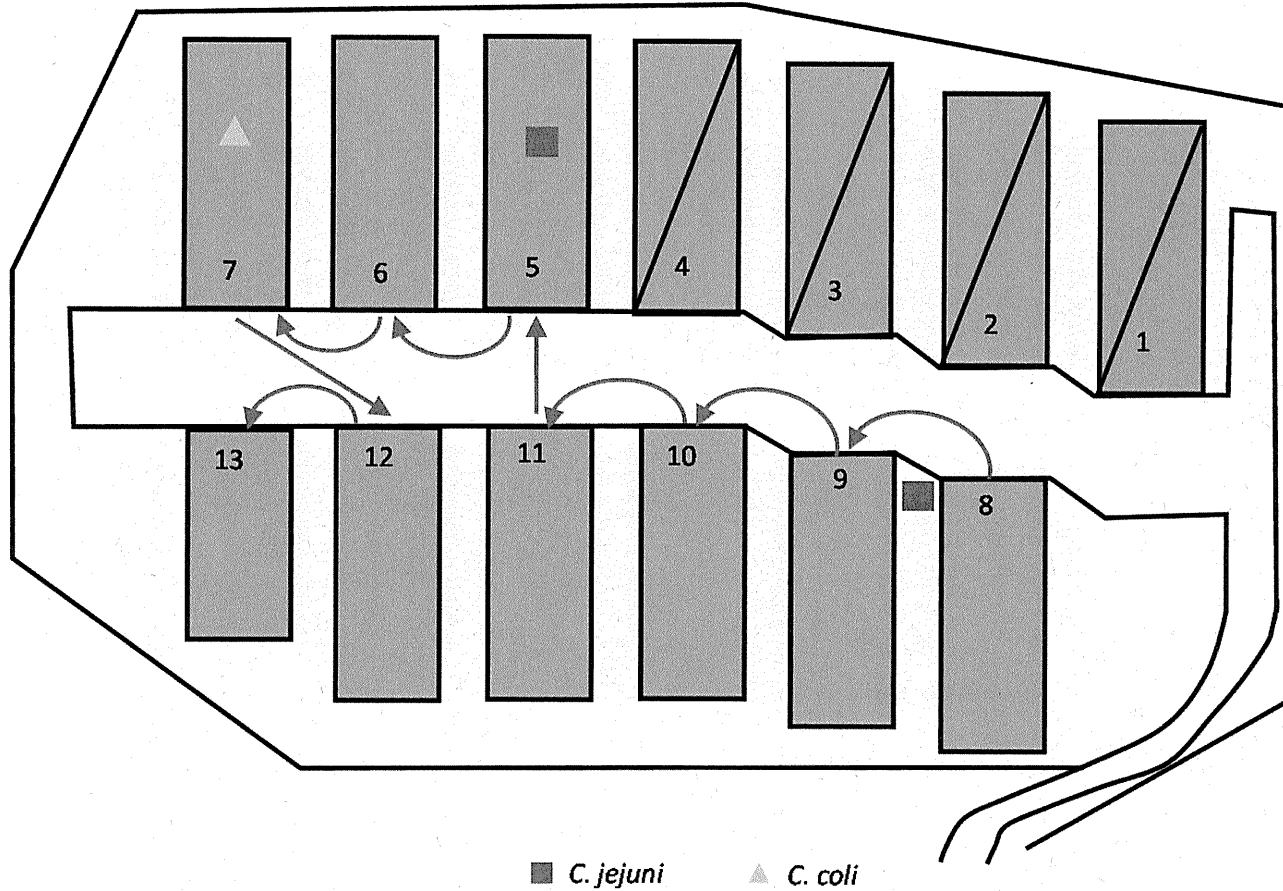
図6. B農場内におけるカンピロバクター汚染状況



● 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7. 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8. 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 | 鹿児島大学共同獣医学部 |
| 研究協力者 | 安藤匡子 | 鹿児島大学共同獣医学部 |
| 研究協力者 | 川原俊介 | MP アグロ(株) |

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、農場飼育段階での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。ブロイラー飼育農場で得られた糞便シードスワブ、環境、飲用水サンプルを材料とし、プレストン培地で増菌後、CCDA 培地を用いて菌の選択分離を行った。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。45 日齢時の糞便と飲用水サンプルから *C.coli* が分離された。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ない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一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。そこで本研究では、ブロイラーの日齢とカンピロバクター一保菌の関係、飼育農場のカンピロバクター一汚染源、カンピロバクター持続感染要因を明

らかにするため、次の3点に焦点をあて調査を実施した。

- ① カンピロバクター感染とブロイラーの日齢の関係
- ② 飼育ブロイラーのカンピロバクター汚染要因
- ③ 高頻度汚染農場におけるカンピロバクター、分離菌株の遺伝子型の比較。

B. 研究方法

1. カンピロバクター感染とブロイラーの日齢の関係

2012年8月から2013年5月に鹿児島県内2カ所のブロイラー飼育農場で得られた各日齢から5検体の直腸スワブを採取し日齢の異なる32鶏群(各日齢から5検体)由来160個体の糞便シードスワブを使用した。カンピロバクターの分離にはCCDA培地を使用した。集落の純培養にはミュラーヒントン培地を使用し、それぞれ42°C、48時間、微好気培養した。同定には質量分析装置(MALDI-TOF MS)とPCR法を用いた。

2. ブロイラー飼育農場におけるカンピロバクター汚染源

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、盲腸便複数箇所プールは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*, *tkt*, *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。

3. 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. カンピロバクター感染とブロイラーの日齢の関係

3日齢から50日齢まで各5羽ずつ検査した結果、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、31日齢から陽性に転じた(図1)。

2. 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(表1)。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(表2)。

3. 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、図2)に分けられ、毎年異なった(表3)。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(表4)。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(図3)。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(表5)。

D. 考察

1. カンピロバクター感染とブロイラーの日齢の関係

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. ブロイラー飼育農場における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週齢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。

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. 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。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。

E. 結論

本研究で調査した農場では飼料、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 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、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た。本研究では野鳥の糞から菌は分離されなかったが、カンピロバクター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た。

連続して飼育された鶏群から分離された *C. jejuni* 株の遺伝子型調査から、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。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り、地域に小さな遺伝子変異をおこしながら定着した菌がいる可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表等(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

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

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

なし

陽性数

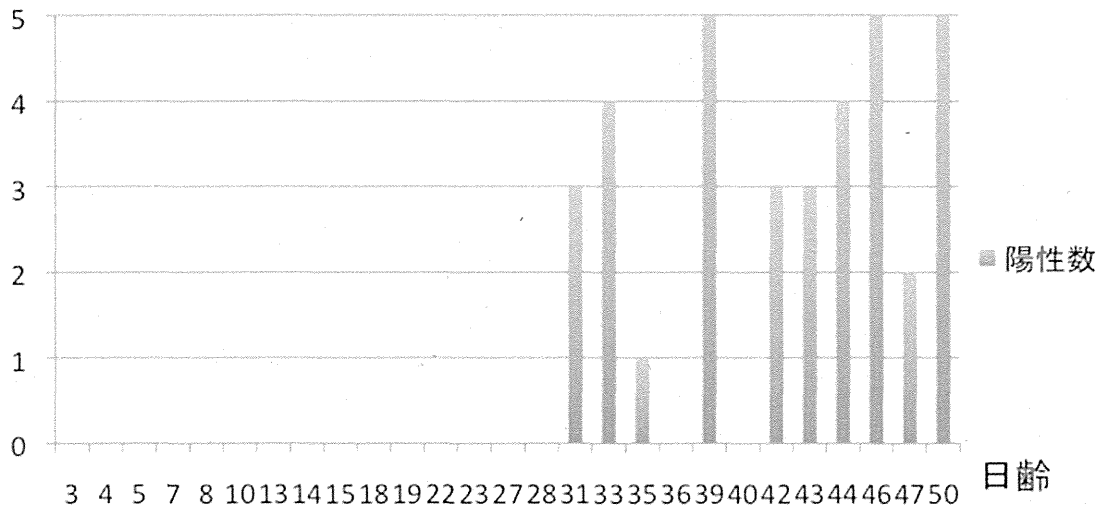


図1 ブロイラー日齢とカンピロバクター陽性数

表1 ブロイラー飼育農場のカンピロバクター汚染状況

| 材料 | 日齢 | | | | | | | |
|---------|------------------|----|----|----|----|----|----|----------------|
| | 0 | 2 | 15 | 17 | 29 | 31 | 43 | 45 |
| 飼料 | — ¹⁾ | — | — | — | — | — | — | — |
| 斃死雞遺残卵黄 | — | — | NT | NT | NT | NT | NT | NT |
| 長靴底面 | NT ²⁾ | — | — | — | — | — | — | — |
| 環境 | 野鳥の糞 | NT | NT | — | — | — | — | — |
| | ネズミの糞 | NT | NT | — | — | — | — | — |
| 糞便 | 盲腸便 | NT | NT | — | — | — | — | — |
| | 堆積糞 | NT | NT | — | — | — | — | <i>C. coli</i> |
| 水 | 原水 | NT | NT | — | — | NT | NT | — |
| | 貯水槽 | NT | NT | — | — | NT | NT | <i>C. coli</i> |
| | 鶏舎 前 | NT | NT | — | — | NT | NT | — |
| | 鶏舎 中 | NT | NT | — | — | NT | NT | — |
| | 鶏舎 奥 | NT | NT | — | — | NT | NT | — |

1) カンピロバクター陰性

2) not tested

表2 *C. coli* の MLST 型別

| 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 ¹⁾ | 30 | 82 | 104 | UT | 17 | UT |
| 貯水槽 | 33 | UT | 30 | 82 | 104 | UT | 17 | UT |

1) untypeable

表3 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>uncA</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 |