

平成 28 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）

「食鳥肉におけるカンピロバクター汚染のリスク管理に関する研究」

分担研究報告書

鶏盲腸菌叢が顕すカンピロバクター制御効果に関する研究

研究分担者	山本茂貴*	東海大学海洋学部食品科学専攻
研究分担者	朝倉 宏	国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部
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	渡辺邦雄	NPO 法人日本食品安全検証機構
研究協力者	倉園久生	国立大学法人帯広畜産大学
研究協力者	川本恵子	国立大学法人帯広畜産大学
研究協力者	猪子理絵	北海道帯広食肉衛生検査所
研究協力者	村上覚史	東京農業大学農学部
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
研究協力者	山本詩織	国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部
研究協力者	渡邊真弘	国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部

（* 平成 28 年 12 月迄）

研究要旨：昨年度検討対象とした農場のうち、計 3 農場（A, B, C）において生産される出荷日齢のブロイラー鶏盲腸便計 60 検体を採材し、カンピロバクター検出試験に供した。C 農場由来検体は全て本菌陰性を示したが、A・B 農場由来検体は、それぞれ 4 検体（20%）および 13 検体（65%）で陽性を示した。農場別に検体構成菌叢を比較したところ、昨年度の成績を裏付けるように、カンピロバクター陰性を示した C 農場由来検体では、相対的に高い *Bacteroides* 属菌構成比率が認められた。当該検体より *Bacteroides* 属菌株を分離同定し（何れも *B. fragilis*）、*C. jejuni* NCTC 11168 株との共培養試験に供したところ、*C. jejuni* は経時的減少が認められた。*B. fragilis* 由来菌体破砕物を *C. jejuni* 株に添加し、同様に微好気培養を行ったところ濃度依存的に *C. jejuni* の増殖を抑制する事象が見いだされた。本菌抽出物による *C. jejuni* に対する抑制効果は、Proteinase 処理により低減したことから、*B. fragilis* 抽出物により生じる静菌作用はタンパク性因子により生じるものと推察された。以上の成績より、*C. jejuni* の生存・増殖が *B. fragilis* 添加により有意に制御される事象が実証された。また、鶏由来 *B. fragilis* 株によるカンピロバクター制御作用は主としてタンパク性因子によるとの推察知見を得たことから、来年度には、当該菌の生菌のみならず、抽出物も視野に入れつつ、鶏生体を用いて制御効果の検証にあたり、農場段階での対策案としての有効性を評価したい。

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頻度が高く、その制御策の構築については社会的に求められている。厚生労働省食中毒

統計によると、2015年に発生したカンピロバクターを原因物質とする食中毒件数は計318件、患者数は2,089人にのぼっており、同年の食中毒事例総数1202件の約26.5%、細菌性食中毒事例総数の約73.8%を占めている。食中毒事件の報告は、ごく一部に限られるとする疫学見解を踏まえると、実際に本食中毒事例数は更に多いと想定される。

本食中毒罹患患者のうち、発症者の多くは下痢を主徴とする予後良好な病態を顕すにとどまるが、一部の患者では、神経変性症の一種であるギランバレー症候群（特に軸索型）を併発する危険性もあることから、本食中毒の予防策を構築することは、公衆衛生学上の意義も高いと考えられる。

本食中毒の原因食品や感染経路については、これまでに多数の疫学研究が積み重ねられ、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の食中毒の最も主要な原因食品と認識されている。その中でも鶏をはじめとする家禽類については、農場への導入時にあたる幼雛期には本菌陰性であるが、2-3週齢の間に本菌の定着を生じ、以後少なくとも9週間は定着し続けることが明らかになっている。国内に流通する鶏肉の多くは50日齢程度のブロイラー鶏由来であり、本菌による汚染を一旦受けた農場で飼育された鶏群は高率に本菌を保菌している傾向が高い。

また、本菌による鶏肉汚染は、食鳥処理工程での交叉汚染が主な要因と目されているが、そもそも生産段階における本菌制御が確立すれば、カンピロバクター食中毒の低減をはかるにあたって、より根源的な対策を立てることが可能となるため、農場段

階における本菌制御策の構築は必要不可欠な課題の一つといえる。

鶏生体における本菌の汚染（定着）への対策としては、これまでも乳酸菌やバシルス属菌等、いわゆる生菌剤（プロバイオティックス）の投与により、一定の抑制効果を果たすことが報告されている。より近年では、こうしたプロバイオティックス効果を裏付ける要因として、乳酸菌の菌体表層タンパク分子あるいは有機酸代謝能といった分子や代謝機構が、カンピロバクターの鶏腸管定着抑制を支える分子基盤として明らかにされつつあるが、それらの多くは依然として不明である。養鶏場での本菌制御策は、世界的な課題として、現在も解決されていないが、一般的に知られる上述のプロバイオティックス細菌以外にも、近年では、カンピロバクターの鶏腸管定着に抑制作用を示す、種々の腸内菌叢が報告されており、生産段階での制御策の構築にあたって期待がもたれる研究分野の一つとなっている。

こうした背景より、本研究では、出荷時齢のプロイラー鶏を対象として、昨年度に検討対象とした7養鶏農場のうち、本菌陽性または陰性であることが確認された計3農場を対象に、本年度も出荷時齢鶏盲腸便のカンピロバクター検出状況及び構成菌叢を継続的に検証した。その中で出荷時にカンピロバクター陰性であることが示された1農場由来検体よりカンピロバクター保菌との関連性が示唆された *Bacteroides* 属菌の分離を行い、試験管内における *C. jejuni* 生存増殖への影響について検討を行ったので、報告する。

B. 研究方法

1. 供試検体の採材

平成28年10月～12月の間に、九州地方にあるA/B農場および北海道・東北地方のC農場において飼養され、出荷時齢にある肉用鶏盲腸便（A及びB農場については20検体、C農場については10検体）をシードスワブ（ニッスイ）を用いて採材した。採材検体は速やかに冷蔵温度帯で研究室に輸送し、カンピロバクター定性検出試験に供した。また、A及びB農場については、当該鶏舎より出荷され、解体処理を受けたモモ肉についても各5検体ずつ採材し、カンピロバクター定量検出試験に供した。

また、上記とは異なる農場DおよびE農場で飼養された肉用鶏盲腸便について、1週齢から出荷時齢まで概ね1週間ごとに採材し、冷凍にて菌叢解析用検体として使用時まで保存した。

2. 分離培養試験（定性）

上記シードスワブより取り出した盲腸便検体は計量後、速やかに1mLの滅菌リン酸緩衝液（PBS, pH7.4）（Thermo Fisher）に懸濁した。うち0.5mLについては、10mLのプレストン培地（ニッセイバイオ）に加え、42℃にて48時間、微好気培養を行った。その後、同培養液を1白金耳分、mCCDA寒天培地に塗布し、42℃で48時間微好気培養を行った。培養後、各検体につき、代表的発育集落を5つ釣菌し、継代培養を行った後、生化学性状試験及びPCR法による菌種同定を行うことで、陽性・陰性の判定を行った。

3. DNA抽出

2.で調整した懸濁溶液残液約0.5mLより、Cica Genious Total DNA prep kit（関東化学）を用いて、DNA抽出を行った。また、分離株についても、同様にDNA抽出を行い、MLST解析に供した。

4. 菌叢解析

盲腸便スワブ懸濁溶液より抽出したDNAを鋳型として、16SrRNA799f-1179rオリゴヌクレオチドプライマーを用いたPCR反応を行い、E-gel Size Select 2%（Thermo Fisher）およびAMPure XP（Beckman）を用いて、増幅産物を精製した。同精製物は、定量後、30検体を上限として等量から成る混合ライブラリーを作成し、Ion Chef/Ion PGMシステムを用いたbarcoded pyrosequencing解析に供した。取得配列データについては、CLC Genomic Workbench（キアゲン）を用いて不要配列を除去した後、RDP Classifier pipelineを介して、リード配列の階級付けを行った。その後、Metagenome@KINプログラム（ワールドヒュージョン）を用い、クラスター解析を行った。

5. *Bacteroides* 属菌の分離

C農場由来盲腸便検体より、Duerdenの方法（J Med Microbiol. 13: 69-78. 1980.）に従って*Bacteroides*属菌の分離を行った。得られた分離株については、16S rRNA部分配列解析データをもとに、NCBI Blastn検索を通じて菌種同定を行い、-80℃にて保存した。

6. *B. fragilis* ゲノム解析

B. fragilis an-51株より全ゲノムを抽出

し、常法に従い、PacBio RSII を用いてドラフトゲノム配列を取得した。得られた配列については、不要配列を除去後、CLC Genomic Workbench ver. 9.0 (Qiagen-CLC)を用いてContig配列を取得すると共に、RAST pipelineを用いて、アノテーション情報を取得した。

7. *C. jejuni*/*B. fragilis* 共培養試験

約 10^4 CFU の *C. jejuni* NCTC 11168 株を 10mL の Mueller-Hinton broth または BHIS broth に懸濁した後、同菌数の *B. fragilis* an-3 株, an-51 株, JCM11019 株をそれぞれ添加し、微好気または嫌気条件下にて培養した。24 時間毎に各培養液を採取し、Mueller-Hinton 寒天培地および BHIS 寒天培地に接種後、それぞれ微好気または嫌気条件下にて培養し、発育集落数を求めた。

8. *C. jejuni* 生存増殖に対する *B. fragilis* 抽出物の制御効果検証試験

約 10^4 CFU の *C. jejuni* NCTC 11168 株を 10mL の Mueller-Hinton broth または BHIS broth に懸濁した後、*B. fragilis* an-51 株由来菌体破碎抽出物をタンパク最終濃度として、0、1、5、10、20、30 μ g/mL となるよう添加し、微好気及び嫌気条件下でそれぞれ培養を行った。培養 24、48、72 時間後の培養液濁度を 600nm の波長で測定し、*C. jejuni* の生存増殖性を経時的に測定した。

また、上述の *B. fragilis* an-51 株由来菌体破碎抽出物 (30 μ g/mL) に対して、Proteinase K (Promega) 100 μ g/mL あるいは Bensonase 25 unit/mL (タカラバ

イオ)を用いて前処理した後、約 10^4 CFU の *C. jejuni* NCTC 11168 株を 10mL の Mueller-Hinton broth または BHIS broth に懸濁し、当該菌の生存増殖性について、同様に、濁度計を用いて測定した。

C. 結果

1. 陽性・陰性農場の識別

計 3 農場 (A・B・C) で採材された出荷時齢鶏盲腸便計 60 検体について、カンピロバクター分離を試みた。農場別の分離培養成績を表 1 に示す。昨年度と同様、C 農場由来検体 (計 20 検体) は全て陰性であったが、A・B 農場由来検体は、それぞれ 4 検体 (20%)、13 検体 (65%) が陽性を示した。また、分離株については、何れも *C. jejuni* が主体であった (表 1)。

以上の成績より、今回供試した出荷時齢の鶏盲腸便検体全体の陽性率は、58.3% (陽性検体 35 / 60 検体) となり、陽性・陰性農場 (鶏舎) はそれぞれ 4 および 3 農場であることが明らかとなった。

2. 鶏盲腸便構成菌叢の比較解析

出荷時の鶏盲腸便検体の構成菌叢に関する知見を得るため、A~C 農場由来検体より、各 3 検体を無作為に抽出し、16S rRNA pyrosequencing 解析に供した。成績概要については図 1 に示した。カンピロバクター分離陰性となった C 農場由来検体と、同陽性を示した A・B 農場由来検体の間で構成比率に有意差を認める菌属を探索したところ、昨年度の成績と同様に、*Bacteroides* 属がカンピロバクター陽性・陰性農場間で有意差を示し、C 農場由来検体における占

有率が平均 19.8%であったのに対し、A・B 農場由来検体における上記属菌の占有率はそれぞれ 8.2%および 5.5%に留まった。

また、別農場由来ではあるが、鶏盲腸便中での *Bacteroidales* 占有率について、生体の週齢をおって経時的に観察したところ、仕上げ飼料を給餌される出荷前 1 週間で顕著な増加を示すことが明らかとなった（図 1）。

以上の成績より、年度に因らず *Bacteroides* 属がカンピロバクター分離培養成績と一定の相関性を示すことが改めて実証された。

3. カンピロバクターに対する鶏盲腸便由来 *B. fragilis* 株の制御効果

カンピロバクター陰性を示した C 農場由来鶏盲腸便検体より、*B. fragilis* an-3 株および an-51 株を分離した（表 2）。当該株ならびに標準株である JCM11019 株を hemin および Vitamin K を含む BHI プロス中にて嫌気培養した後、並行して培養した *C. jejuni* NCTC 11168 株をそれぞれ約 10^4 CFU となるよう、MH プロスあるいは BHI プロス中に懸濁し、微好気および嫌気条件下にて生菌数の挙動を経過観察した。

結果として、菌株及び大気条件に因らず、*B. fragilis* は何れも試験管内における *C. jejuni* の生存・増殖を経時的に減少させた（図 3）。

4. カンピロバクターの生存増殖に対する *B. fragilis* 抽出物の制御効果

異なるタンパク濃度の *B. fragilis* 菌体破碎抽出物を約 10^4 CFU の *C. jejuni* NCTC11168 株を含む液体培地中に添加し、後者の生存増殖性を経時的に観察したとこ

ろ、濃度依存的に本抽出物は *C. jejuni* の増殖を低減させることが明らかとなった（図 4）。本抽出物を Proteinase K を用いて前処理を行った場合、*C. jejuni* の生存増殖に対する制御効果は、無処理投与群に比べ、大きく低減した（図 5）。

以上の成績より、*C. jejuni* の生存増殖に対して顕れる *B. fragilis* の制御効果はタンパク性因子によるものと推察された。

D. 考察

カンピロバクターが顕す鶏腸管定着は、概ね 3 - 4 週齢以降に生じるとされる。同時期は、いわゆる換羽期に相当するため、免疫機構の大幅な変動が予想される他、菌叢にも多大な影響が生じると目される。本研究では、昨年度に引き続き、鶏盲腸菌叢の中で、カンピロバクター保菌の有無と、*Bacteroides* 属占有率について対象農場における普遍性を明らかにすることができた。また、鶏盲腸における *Bacteroidales* 占有率の経時変動成績から、当該属菌は少なくとも換羽期以降に鶏盲腸内に侵入し、潜在的に存在し続けることがカンピロバクター定着に抑制的に作用するものと想定された。

こうした状況を踏まえ、本年度は *Bacteroides* 属分離株が顕す、カンピロバクターの生存増殖に対する影響を試験管内において検討し、実際にその効果を見出すことができた。実際に農場での実証試験等を行う上で、*Bacteroides* 属菌投与の方法としては、飼料への添加等が想定されるが *Bacteroides* 属菌体抽出物がカンピロバクター生存増殖に対する制御効果を示したことから考えて、その投与対象としては必ず

しも生菌である必要性は少ないとも目される。来年度に向けては、本属菌の生菌あるいは抽出物投与による、鶏生体でのカンピロバクター保菌への制御効果を検討することで、農場での制御手法としての有効性を明らかにしたい。

E. 結論

出荷時齢の鶏盲腸便において、カンピロバクター保菌と *Bacteroides* 属構成比の間で相関性を継続的に検討することで、普遍性を実証した。更に、*Bacteroides* 分離株の *C. jejuni* の生存増殖性に対する制御効果を試験管内で明らかにすると共に、当該菌抽出物によっても同様の効果が表れる事象を見出した。来年度は、農場での実証試験へと進み、その有効性評価につなげたい。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

朝倉宏・カンピロバクター・ジェジュニが顕す生存・生息のための環境応答・細菌学領域における基礎と臨床のクロストークセッション・第90回日本細菌学会学術総会シンポジウム（仙台市、2017年3月）

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

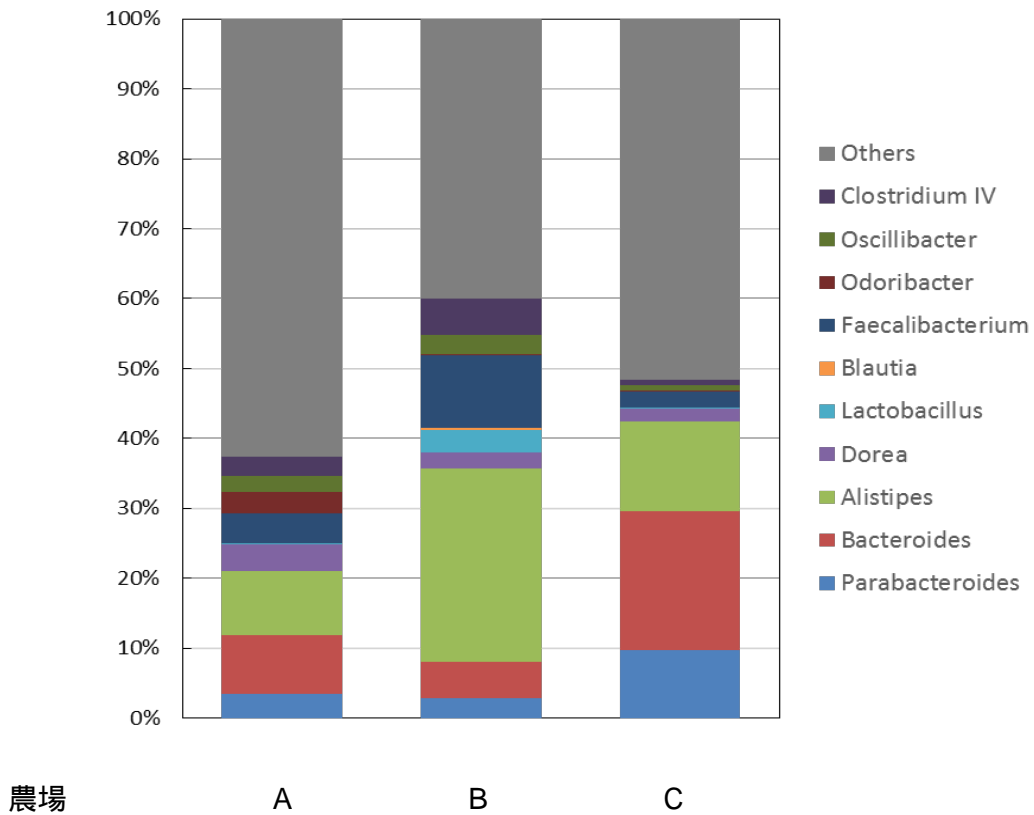


図 1 . 3 農場由来出荷時齢鶏盲腸構成細菌叢の比較概要

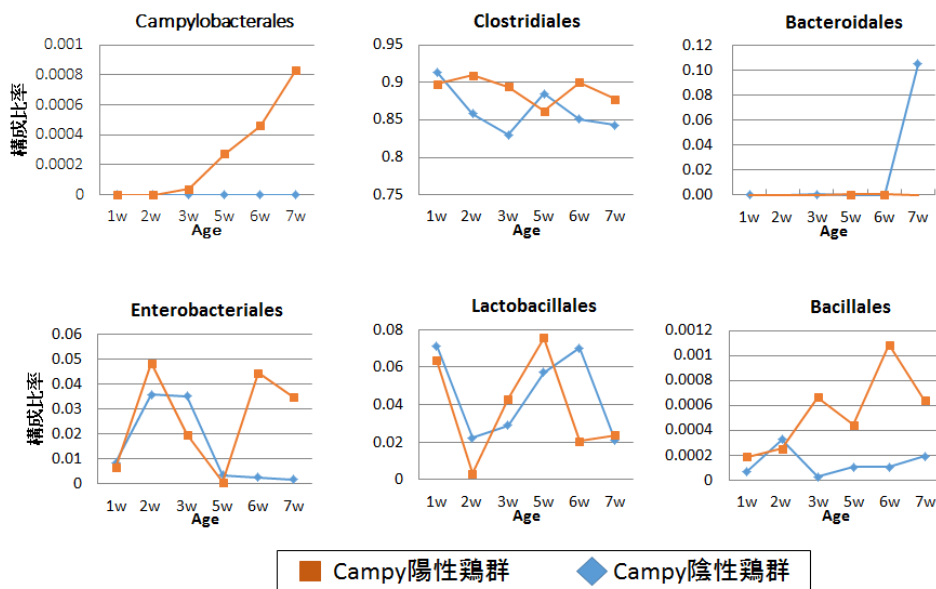


図 2 . 農場 A・C 由来鶏盲腸便検体における主要菌叢の経時挙動 .

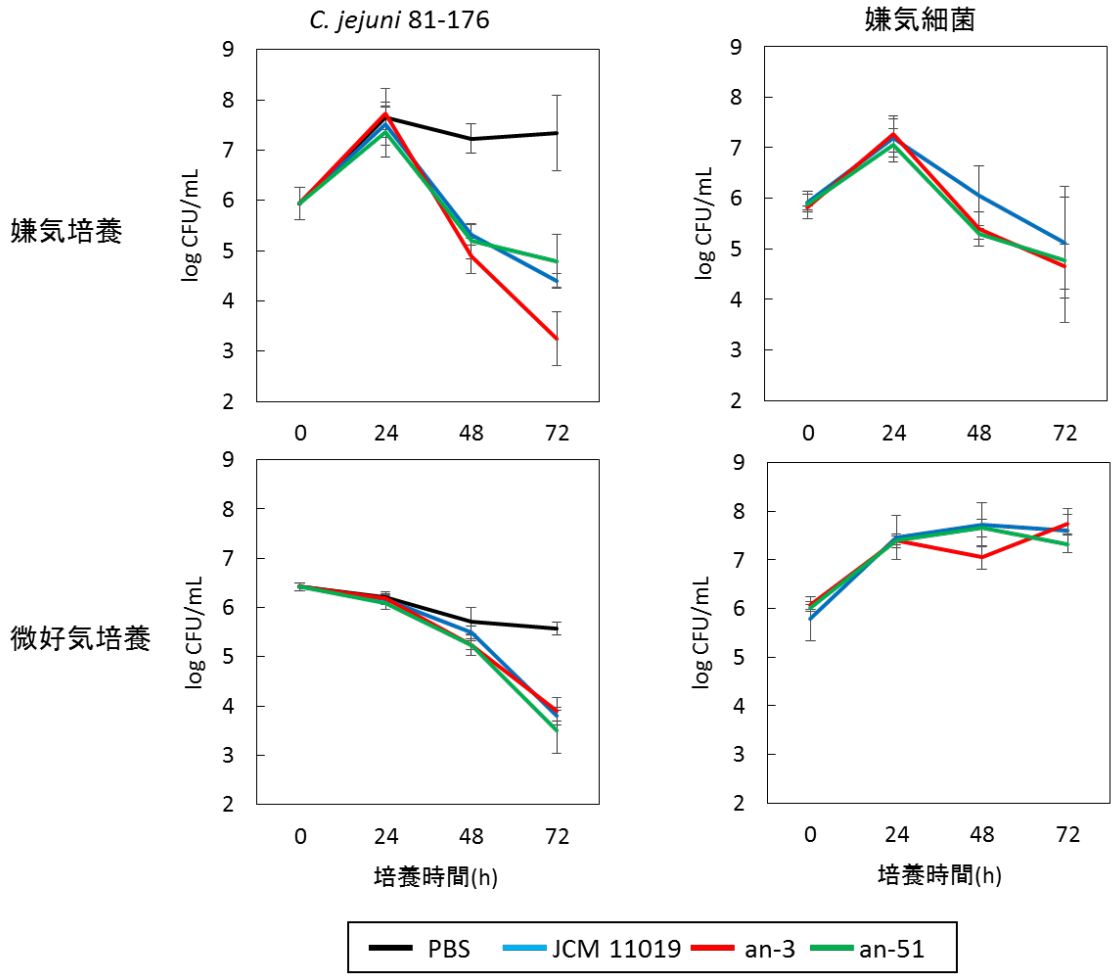
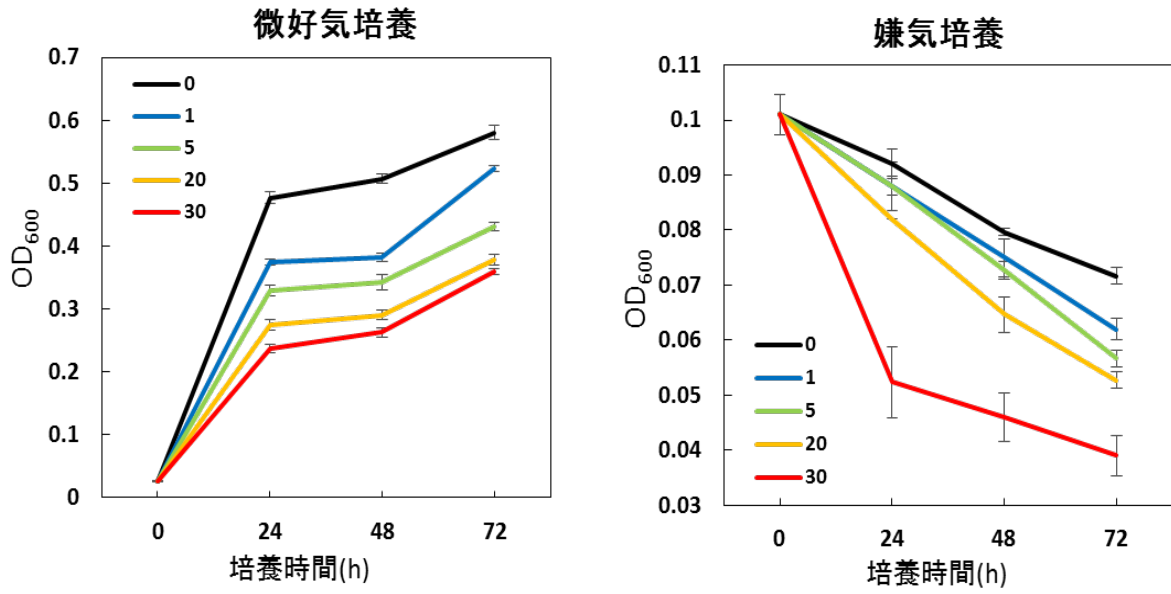


図3 . *B. fragilis* との共培養による *C. jejuni* NCTC 11168 株の生存増殖への影響

A



B

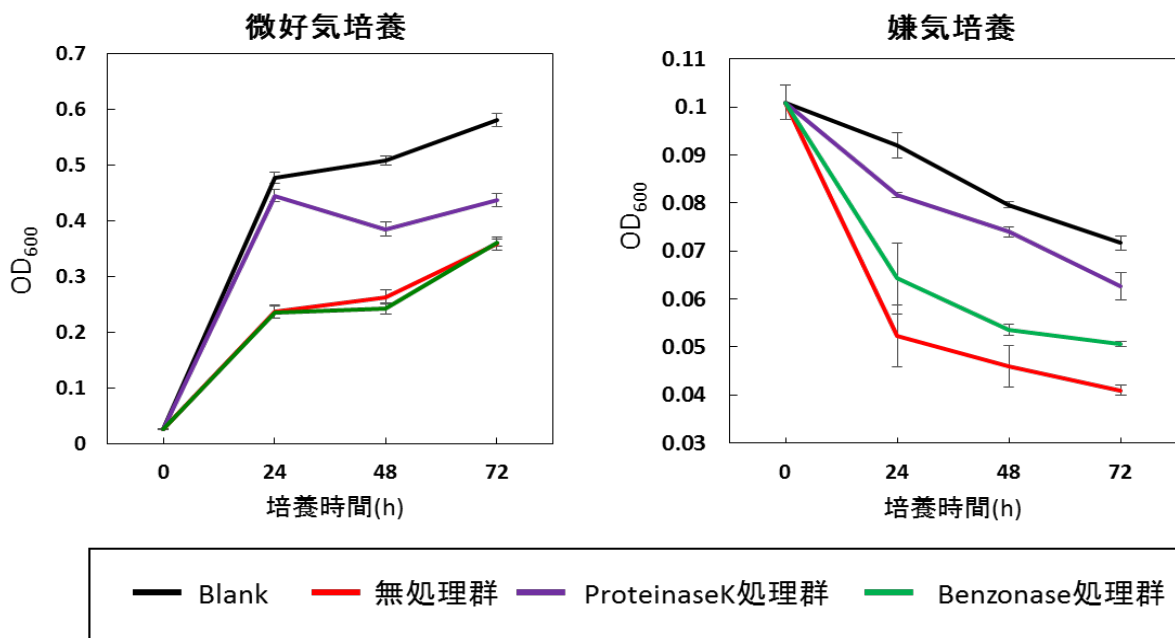


図4 . *B. fragilis* an-51 破碎抽出物の *C. jejuni* NCTC 11168 生存増殖性に対する影響 .

表 1. 農場 A-C において採材した出荷時齢鶏盲腸便からの分離培養成績

農場	有薬・無薬 の別	日齢	検体数	陽性数 (陽性率)	分離菌種
A 農場	有薬	48-49 日齢	20	4 (20%)	<i>C. jejuni</i> (3) <i>C. coli</i> (1)
B 農場	有薬	47 日齢	20	13 (65%)	<i>C. jejuni</i> (10) <i>C. coli</i> (3)
C 農場	有薬	51 日齢	20	0 (0%)	-