

「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」

総合分担研究報告書

農場段階におけるカンピロバクターのリスク管理に関する研究

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
研究分担者	山本茂貴	東海大学海洋学部食品科学専攻
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	川本恵子	帯広畜産大学
研究協力者	倉園久生	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
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	五十君静信	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

研究要旨：農場段階におけるカンピロバクターのリスク管理に関する研究として、国内 7 養鶏農場より出荷されるブロイラー鶏盲腸便を対象に、カンピロバクター検出試験を行い、本菌陽性・陰性農場の識別を行った。その上で検体構成菌叢を農場別に比較したところ、*Bacteroides* 属菌の構成比率と、カンピロバクター保菌との間に関連性を見出した。更に、本菌陰性農場 1 農場で飼養時期別に盲腸便を採材し、鶏の発育に伴う盲腸内菌叢変動を追跡し、*Bacteroides* 属菌の優勢性を確認した。2 農場で *Bacteroides* 不活化抽出物投与群及び非投与群を経口投与した後の出荷時齢鶏生体盲腸内容物 1g 中のカンピロバクター菌数は、A 農場では 1.16×10^7 CFU となり、非投与群 (1.46×10^9 CFU) に比べ、約 2 対数個以上の減少が認められた。同様の傾向は B 農場でも認められた。当該菌は温血動物の腸内環境の健全性を図る指標としても用いられていることから、本属菌の利用は、鶏腸内環境の健全性評価とカンピロバクターの低減を図る一手法として今後の応用性と低減効果を裏付ける分子基盤の解明が期待される。

A. 研究目的

鶏の生産段階におけるカンピロバクター汚染率は総じて高く、特に休薬期間を経た出荷時に急激な菌数の増加が生じるとされる。農場への導入時（幼雛期）には本菌が

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との報告もある。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由来の鶏肉の多くは高率に本

菌汚染を受けている。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ラス属菌等、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、現在も解決されていない世界的課題であるが、一般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、種々の腸内菌叢の存在も見出されつつあり、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。

本分担研究では、出荷時齢のプロイラー鶏を対象として検討を行い、平成27年度から28年度にかけてはカンピロバクター保菌と関連性を示す盲腸構成菌叢を探索した上で、その効果を試験管内で評価した。平成29年度には、鶏盲腸便由来 *Bacteroides* 属不活化抽出物の投与によるカンピロバクター保菌数への影響を評価したので報告す

る。

B. 研究方法

1) 検体

北海道・東北、関東及び九州地方にある養鶏場計7農場より、出荷時齢鶏盲腸便の採材に関する協力を得た。このうち、B農場では有薬飼料を給餌した鶏群と、無薬飼料給餌群の双方が同一農場内で飼育されていたことから、双方を採材対象とした。また、A農場は、特定の鶏舎を対象として、後期飼料切替2日後である18日齢、仕上飼料(抗生物質不含)切替3日後である28日齢、仕上飼料切替7日後である32日齢、出荷4日前である46日齢、出荷時(50日齢)を対象に各10検体の盲腸便を採材し、試験に供した。新鮮盲腸便をシードスワブを用いて採材し、速やかに冷蔵温度帯で輸送した。その後、速やかに1mLの滅菌リン酸緩衝液(PBS, pH7.4)に懸濁した。

2) 分離培養

上記シードスワブ懸濁液0.5mLを10mLのプレストン培地に加え、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

1.で調整した懸濁溶液残液より、Cica Genious Total DNA prep kit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) MLST 解析

Campylobacter MLST database の記載方法に従い、計 7 遺伝子の部分配列を増幅した。ExoSAP-IT を用いた酵素処理後、各増幅産物にシーケンス用プライマーセットならびに BigDye Terminator を加え、ABI3730x を用いたサイクルシーケンス法により、対象増幅産物の塩基配列を決定した。得られた配列情報は、CLC MLST module を搭載した Main Workbench にて、アセンブル・アノテーションを行い、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。

5) 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 を用いて不要配列を除去後、RDP Classifier pipeline を介し、リード配列の階層化及びクラスター解析を行った。

6) Bacteroides 属菌の分離

C 農場由来盲腸便検体より、Duerden の方法に従って *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、菌種同定を行った。ゲノム解析には PacBio RSII を用いた。

7) 共培養試験

約 104CFU の *C. jejuni* NCTC 11168 株を 10mL の MH または BHIS broth に懸濁後、同菌数の *B. fragilis* 株を添加し、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、MH 寒天培地および BHIS 寒天培地に接種後、それぞれの発育集落数を求めた。次に約 104CFU の *C. jejuni* NCTC 11168 株を 10mL の MH または BHIS 培地に懸濁後、異なるタンパク濃度の *B. fragilis* 破碎抽出物を添加し、微好気及び嫌気培養に供し培養後の濁度を 600nm 波長で測定し、*C. jejuni* の生存増殖性を求めた。また、上述の *B. fragilis* 破碎抽出物に対し、Proteinase K あるいは Bensonase を用いて前処理後、*C. jejuni* NCTC 11168 株とともに培地中に加え、生存増殖性を上記と同様に求めた。

8) *B. fragilis* 破碎抽出物投与効果の評価

A・B 農場で搬入飼養される肉用鶏盲腸便を時系列を追って採材し、カンピロバクター定量検出試験に供した。なお、投与群及び非投与群は同一農場敷地内に設置される異なる鶏舎で別個に、但し同時期に導入・飼育されるものとした。

B. fragilis 破碎抽出物を凍結乾燥品として上記農場に送付し、飼料切替時期にそれぞれ飲水に添加した。同時に搬入・飼育される鶏群については陰性対照として設定した。なお、同抽出物は培養しうる微生物が陰性であることを確認後、試験に供した。

C. 結果

1) 陽性・陰性農場の識別

計 7 農場由来の出荷時齢鶏盲腸便計 60 検体をカンピロバクター定性試験に供した

結果、C・F・G農場由来検体は全て陰性であったが、A・B・D・E農場由来検体は、それぞれ11検体(55%;有薬群、3検体(陽性率30%);無薬群、8検体(80%))、10検体(100%)、6検体(60%)、8検体(80%)が陽性を示した。また、分離株には何れも*C. jejuni*であった。供試検体全体の陽性率は、58.3%(陽性検体35/60検体)であり、陽性・陰性農場(鶏舎)は4農場及び3農場であった。

2) 農場内分布株の同一性に関する検討

A・B農場由来株の遺伝子型別を行った結果、A農場では複数の遺伝子型株が分布していたが(ST-5255, ST-2274)、B農場では同一遺伝子型(ST-2274)株のみが認められた。

3) 農場別出荷時齢鶏盲腸便の構成菌叢比較解析

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、C-F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。カンピロバクター分離陰性となったC・F農場由来検体と、同陽性を示したD・E農場間にて構成比率に有意差を認める菌属を探索したところ、*Bacteroides*属が両群間で有意差を示し、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明らかとなった。

4) カンピロバクター陰性農場(C農場)における鶏盲腸便構成菌叢の経時挙動

カンピロバクター陰性のC農場の特定鶏舎で飼養された鶏について、18日齢、28日齢、32日齢および46日齢時に盲腸便を採材し、分離培養及び菌叢解析を行った。最も優勢な菌叢の一つには*Bacteroides*属が挙げられた他、*Sporobacter*属は日齢に

応じて構成比率を増加させた。対して、*Flavonifractor*属、*Oscillibacter*属、*Escherichia*属等の構成比率は経時的に減少した。以上より、カンピロバクター陰性を示したC農場の鶏群盲腸には、*Bacteroides*属が優勢菌叢として存在することが明らかとなった。

5) カンピロバクターに対する鶏盲腸便由来*B. fragilis*株の静菌効果

カンピロバクター陰性のC農場由来鶏盲腸便検体より、*B. fragilis*株を分離し、BHISプロスで嫌気培養後、*C. jejuni* NCTC 11168株と共培養を行った。結果として、菌株及び大気条件に因らず、*B. fragilis*は何れも試験管内で*C. jejuni*の生存・増殖を経時的に減少させた。

異なるタンパク濃度の*B. fragilis*破砕抽出物を*C. jejuni* NCTC11168培養液中に添加し、生存増殖性を経時的に観察した。結果として、本抽出物は濃度依存的に*C. jejuni*の生存増殖を低減させた。Proteinase K処理により本抽出物の上記作用は低減した。

6) *B. fragilis*不活化抽出物投与の*C. jejuni*の生体内挙動に及ぼす影響

A・B農場で、*B. fragilis*不活化抽出物投与群及び非投与群を設定し、盲腸内容物1g中のカンピロバクター菌数を求めたところ、出荷時齢の同菌数はA農場では非投与群が平均 1.46×10^9 CFU/g、投与群が平均 1.16×10^7 CFU/gとなり、約2対数個以上の減少が認められた。また、B農場では非投与群が平均 1.15×10^6 CFU/g、投与群は平均 8.40×10^3 CFU/gとA農場と同様に2対数個/g以上の菌数低減を示した。

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、*Bacteroides* 属由来生理活性物質がカンピロバクター定着に示し得る生物学的役割を検討した。対象農場において、投与群は非投与群に比べて有意な菌数低減を示し、今後の応用性が期待された。一方、その投与方法の至適化は実用化を検討する上では必要不可欠な課題と考えられる。

E. 結論

Bacteroides 不活化抽出物投与は、鶏腸管内におけるカンピロバクター菌数の有意な低減効果が期待される結果となった。今後、適用条件の最適化に加え、低減効果を示し得る物質の特定とその分子基盤の解明は実用化を考慮した場合には更なる検討が必要な課題と考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Asakura H, Kawamoto K, Murakami S, Tachibana M, Kurazono H, Makino S, Yamamoto S, Igimi S. (2016) *Ex vivo* proteomics of *Campylobacter jejuni* 81-176 reveal that FabG affects fatty acid composition to alter bacterial growth fitness in the chicken gut. *Res Microbiol.* 167: 63-71.
- 2) Asakura H, Takahashi N, Yamamoto S, Maruyama H. Draft genome sequence of *Campylobacter jejuni*

CAM970 and *C. coli* CAM962, associated with a large outbreak of foodborne illness in Fukuoka, Japan, in 2016. *Genome Announc.* 5(24): e00508-17.

- 3) Asakura H, Yamamoto S, Momose Y, Kato H, Iwaki M, Shibayama K. Genome Sequence of *Clostridium botulinum* strain Adk2012 associated with a foodborne botulinum case in Tottori, Japan, in 2012. *Genome Announc.* 5(34): e00872-17.

2. 学会発表

- 1) 朝倉宏、坂田淳子、田口眞澄、中村寛海、中山達哉、佐々木貴正、山本詩織、村上覚史. ヒト及び動物由来 *Campylobacter coli* 株の遺伝特性ならびに薬剤耐性. 第10回日本カンピロバクター研究会総会.(宮崎、2017年11月)
- 2) 朝倉宏. ゲノムデータに基づく、カンピロバクターの蔓延要因と宿主・環境適応機構の探知. 第37回日本食品微生物学会学術総会(東京、2017年9月).
- 3) 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)
- 4) 木村浩紀、蓮沼愛弓、山谷郁子、朝倉宏、村上覚史. 鶏盲腸内での時系列的 *Campylobacter jejuni* の定着動態と盲腸菌叢変動要因の探索に関する検討. 第8回日本カンピロバクター研究会. (京都、2015年12月)

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

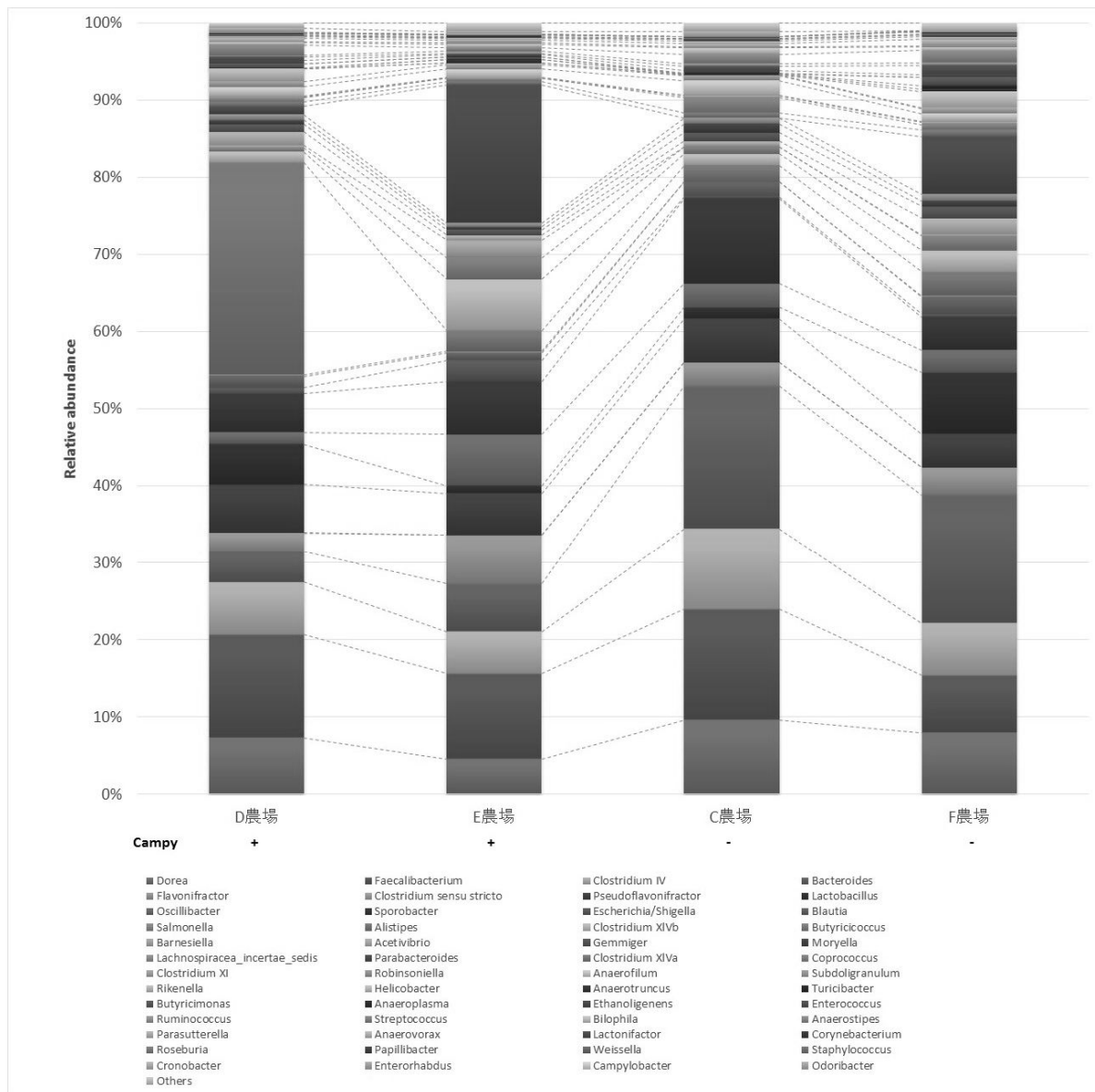


図 1. 出荷時肉用鶏の盲腸菌叢の農場別比較

D 農場・E 農場由来検体は、カンピロバクター陽性検体を、C・F 農場由来検体についてはカンピロバクター陰性検体を対象として、菌叢解析に供した。上図は、各農場につき 3 検体を無作為に抽出して得られた平均値を示す。矢印で示す枠は、*Bacteroides* 属を示す。

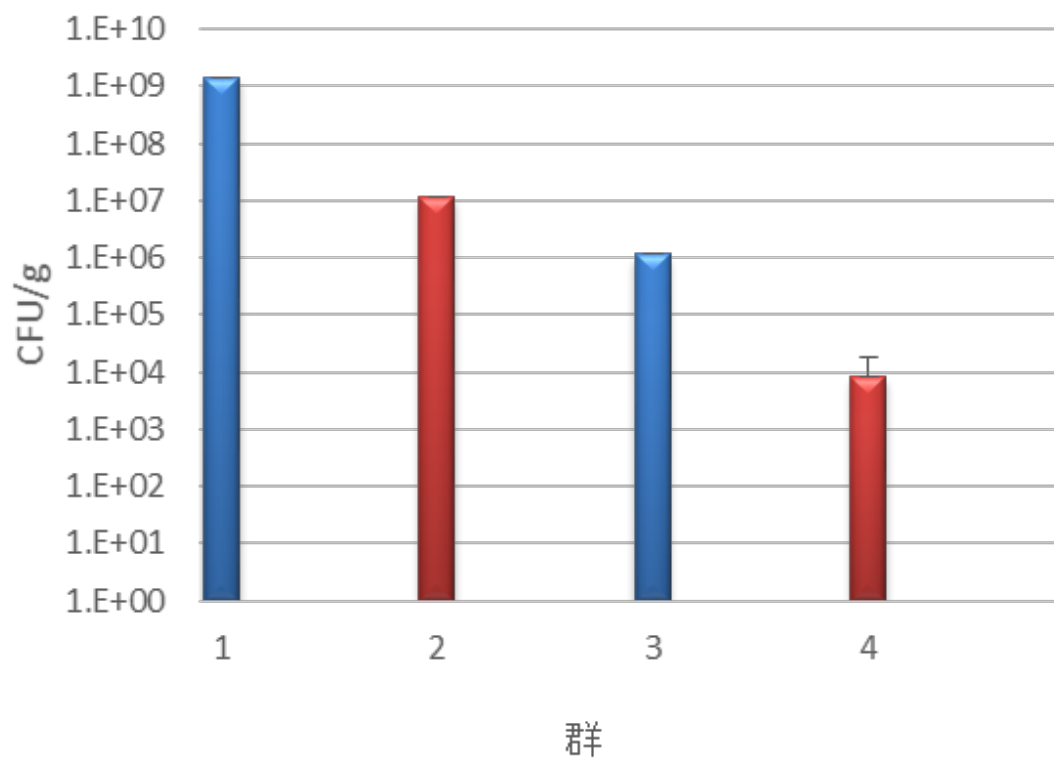


図 2 . *Bacteroides* 属菌由来不活化抽出物投与による、出荷時齢鶏盲腸便におけるカンピロバクター菌数への影響 .

1 : A 農場・非投与群 (対照群) 2 : A 農場・投与群、 3 : B 農場・非投与群 (対照群) 4 : B 農場・投与群 .

