

博士論文

肉用鶏と野生動物の *Campylobacter* 汚染に関する研究

竹下 奈知子

目次

緒言.....	1
第1章 養鶏場における <i>Campylobacter</i> 汚染調査	
1. はじめに.....	4
2. 材料と方法.....	6
1) 鶏舎内での試料収集.....	6
1-1) 国内での試料収集.....	6
1-1.1) 出荷間近および空舎時期での試料収集.....	6
1-1.2) 週齢ごとの試料収集.....	8
1-2) 海外での試料収集.....	10
2) 鶏舎外での試料収集.....	11
3) ゲノム DNA の抽出.....	12
3-1) 盲腸便および糞便からのゲノム DNA 抽出.....	12
3-2) 拭き取り試料からのゲノム DNA 抽出.....	13
3-3) 土、ミミズおよび昆虫等からのゲノム DNA 抽出.....	14
4) Nested PCR を用いた <i>C. jejuni</i> / <i>C. coli</i> 遺伝子の検出.....	15
5) Nested PCR 増幅産物の塩基配列決定.....	17
6) 研究倫理.....	18

3. 成績.....	19
1) Nested PCR 増幅産物の塩基配列.....	19
2) 出荷間近および空舎時期に収集した試料の <i>C. jejuni</i> / <i>C. coli</i> 遺伝子検出 成績.....	19
3) 週齢ごとに収集した試料の <i>C. jejuni</i> / <i>C. coli</i> 遺伝子検出成績.....	20
4) 海外で収集した試料の <i>C. jejuni</i> / <i>C. coli</i> 遺伝子検出成績.....	20
5) 鶏舎外で収集した試料の <i>C. jejuni</i> / <i>C. coli</i> 遺伝子検出成績.....	21
4. 考察.....	21
5. 要約.....	25

第2章 野生動物における *Campylobacter* 汚染調査

1. はじめに.....	27
2. 材料と方法.....	28
1) 野生動物の糞便収集.....	28
2) ゲノムDNAの抽出.....	29
3) Nested PCR を用いた <i>C. jejuni</i> / <i>C. coli</i> 遺伝子の検出.....	30
4) 拾った糞便の動物種特定.....	30
5) 鶏舎周辺への赤外線カメラ設置と野生動物の撮影.....	32
3. 成績.....	32
1) 野生動物の糞便試料における <i>C. jejuni</i> / <i>C. coli</i> 遺伝子検出成績.....	32
2) 赤外線カメラで撮影された野生動物.....	34
4. 考察.....	35
5. 要約.....	38

第3章 16S rRNA 遺伝子増幅産物による細菌叢解析

1. はじめに.....	40
2. 材料と方法.....	41
1) 供試した試料.....	41
2) 16S rRNA 遺伝子領域の塩基配列決定.....	42
3) 取得した配列の前処理と細菌分類群の推定.....	45
4) 統計処理と解析.....	47
4-1) 週齢および飼料の違いによる細菌叢の比較.....	47
4-2) 養鶏場および国の違いによる細菌叢の比較.....	49
4-3) <i>C. jejuni</i> の有無による細菌叢の比較.....	50
3. 成績.....	51
1) データの基本情報.....	51
2) 週齢および飼料の種類による細菌叢の違い.....	52
3) 養鶏場および国による細菌叢の違い.....	54
4) <i>C. jejuni</i> の有無による細菌叢の違い.....	55
4. 考察.....	57
5. 要約.....	64
総括.....	65

謝辞.....	68
文献.....	70
表.....	87
図.....	96

緒言

近年の日本の食中毒統計を見るとノロウイルスを除く殆どが細菌性食中毒で占められており、中でも *Campylobacter* 食中毒は患者数が最も多い (1)。

Campylobacter 食中毒の代表的な臨床症状は下痢や、腹痛、頭痛、発熱、嘔吐等で死に至ることはほとんどないが、感染後約 10 日を経て神経疾患であるギラン・バレー症候群を発症することも稀にあるため軽視することはできず (2)、防御対策を施すべき重要な食中毒である。*Campylobacter* 食中毒の主な原因細菌は *Campylobacter jejuni* あるいは *Campylobacter coli* (以下、*C. jejuni*/*C. coli*) であり、多くの場合、汚染された鶏肉または鶏内臓肉を十分に加熱せず摂取することで罹患する (1)。*C. jejuni*/*C. coli* は肉用鶏を飼育している養鶏場 (以下、養鶏場) でニワトリの腸管内に定着し、食鳥処理場で鶏肉へ交差汚染することがわかっている (3)。*C. jejuni*/*C. coli* に汚染されたニワトリを食鳥処理の段階で区別することができれば、食中毒のリスクを低減できる可能性があるが、ニワトリは *C. jejuni*/*C. coli* に感染しても無症候であるため (4)、感染したニワトリを臨床症状によって特定することは容易ではない。したがって、*Campylobacter* 食中毒の発生を防止するためには、養鶏場の段階でニワトリへの *C. jejuni*/*C. coli* の汚染を防ぐことが重要であり (5)、そのためには汚染源や汚染経路の解明が必要だと考えられ (5)、これまでに多くの調査が行われてきた

(5-7)。例えば、ニワトリ用の飲み水や飼育時に使用する器具等、種々の飼育環境が汚染源である可能性が指摘されており、それらの適切な洗浄と消毒により汚染のリスクが低減すると言われている (6, 7)。また、*Campylobacter* 食中毒の発生率や養鶏場での *C. jejuni*/*C. coli* 汚染率は夏に高いことから (8, 9)、暖かい時期に活発に活動する野生動物や昆虫等が汚染源や汚染経路である可能性も指摘されている (10, 11)。このように、汚染源の候補は複数存在するものの、主要な汚染源と汚染経路は依然として不明のままである。

ところで、養鶏場での *C. jejuni*/*C. coli* 汚染率は 40%以上と高いが (12-14)、汚染がないと思われる養鶏場も確認されている (15)。しかし、何故それらの養鶏場が汚染を制御できているかは不明である。そこで、汚染した養鶏場と汚染していない養鶏場の違いを調査することで、*C. jejuni*/*C. coli* の汚染源あるいは汚染経路を推定できると考えた。さらに、ニワトリが *C. jejuni*/*C. coli* に汚染される際、汚染源に存在する他の細菌にも汚染されると仮説を立てた。つまり、腸内細菌叢を調査し、*C. jejuni*/*C. coli* と共にニワトリを汚染したと思われる細菌とその由来を特定することで汚染源を推定できると考えた。本論文は全 3 章から構成されている。第 1 章ではニワトリの盲腸便や養鶏場の鶏舎内および鶏舎外の環境試料における *C. jejuni*/*C. coli* の汚染を調査し、汚染源や汚染経路の推定を試みた。第 2 章では汚染源の候補である野生動物の糞便中での *C.*

*jejuni/C. coli*の汚染調査を行い、野生動物の糞便が汚染源になり得るかを評価した。第3章ではニワトリ盲腸便の細菌叢を *C. jejuni/C. coli* 陽性および陰性試料と比較し、その違いから汚染源の推定を試みた。

第1章 養鶏場における *Campylobacter* 汚染調査

1. はじめに

ニワトリは世界中で広く飼育されている一般的な家禽である。ニワトリは他の家畜よりもライフサイクルが短く飼料効率が大きいため安価であり、今後も需要が増加することが予想されるが、一方で *Salmonella* や *C. jejuni*/*C. coli* 等の病原細菌の感染源にもなり得ることが問題となっている (16, 17)。国内の養鶏場におけるニワトリの *C. jejuni*/*C. coli* 汚染率は 40%以上と高く (12, 13)、鶏肉の汚染率は 60%とさらに高い (18)。また、海外で行われた調査では 70%以上の養鶏場が *C. jejuni*/*C. coli* に汚染されていた国もあった (14)。日本での鶏肉輸入量は年々増加しており、平成 29 年の鶏肉輸入量は 56 万トン以上と過去最高を記録した。また、平成 25 年にタイ産鶏肉の輸入解禁以降、タイからの輸入量は増加傾向にあり (19)、海外の養鶏場での *C. jejuni*/*C. coli* 汚染についても無視できない状況にある。

ニワトリの飼育方法の 1 つとして、オールインオールアウト法があり、多くの養鶏場がこの方法を採用している。オールインオールアウト法は同じ日齢の雛を同日に鶏舎に導入し、飼育したニワトリを同日に出荷することで鶏舎の中にニワトリがいない期間 (空舎期間) を作る飼育法であり、空舎期間に清掃、消毒、

および乾燥を行うことができるため、感染症の予防や生産性の向上につながる
と言われている (20)。培養検査による調査で、清掃後の鶏舎から *C. jejuni*/*C.*
coli は検出されなかったという報告があることから (21)、オールインオールア
ウト法は *C. jejuni*/*C. coli* の排除に有効だと考えられる。一方で、*C. jejuni*/*C.*
coli は生存環境によっては生きていますが培養できない (viable but non-
culturable: VBNC) 状態を呈するため (22, 23)、培養検査だけでは汚染状況を十
分に把握できない可能性がある。実際に、培養検査と遺伝子検査を併用した清掃
後の鶏舎の調査では、遺伝子検査でのみ *C. jejuni*/*C. coli* が検出されており
(24)、*C. jejuni*/*C. coli* は VBNC 状態で清掃後の鶏舎で生存し続けている可能
性がある。そこで、本研究では出荷間近および空舎時期に鶏の盲腸便試料と餌
箱、ファン等の拭き取り試料を収集し、遺伝子検査を用いて、前の鶏群からの持
ち越しによる *C. jejuni*/*C. coli* 汚染があるのかを調査した。また、過去に長靴を
介して鶏舎外から鶏舎内へ *C. jejuni*/*C. coli* が持ち込まれる可能性が報告され
たため (21, 25)、鶏舎内外で使用する長靴および土等の鶏舎外環境中での *C.*
jejuni/*C. coli* の汚染調査も行った。さらに、週齢ごとに試料を収集し、*C.*
jejuni/*C. coli* がニワトリを汚染する時期とその経路を調査した。調査は国内だ
けはなく海外 (ベトナムとタイ) でも行い、日本との汚染状況の違いを調査した。

2. 材料と方法

1) 鶏舎内での試料収集

1-1) 国内での試料収集

1-1.1) 出荷間近および空舎時期での試料収集

東北、九州 A、および九州 B の養鶏場にて、出荷間近および空舎時期に試料を収集した。全ての養鶏場ではチャンキー種がオールインオールアウト法で飼育されており、いずれも約 50 日齢で出荷された。試料の収集は衛生上の問題から養鶏場職員に依頼した。また、養鶏場間で試料収集方法に偏りが出ないように著者らが事前に養鶏場へ赴き、試料の収集方法を直接指導した。さらに、目的に合致した試料収集が確実に行われるように、著者が作成した写真付きの試料収集方法の説明書を参照するよう各養鶏場に依頼し、毎回同じ担当者が試料を収集した。

1 回目の試料収集は 2016 年 6~7 月に実施し、出荷間近のニワトリ (46 日齢) を飼育している鶏舎内に落ちていた盲腸便と糞便試料、同一鶏舎内に設置された餌箱、ファン、および給水器の拭き取り試料を収集した。盲腸便と糞便はポリプロピレンマイクロスパーテル 150mm (As One, Osaka, Japan) を用いて 2 杯あるいは大盛り 1 杯分を拾い、500 μ l の RNA/*later* Stabilization Solution (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, U. S. A.) が入った滅菌チューブ

に入れた。スパーテルは試料ごとに新しいものに交換し、異なる滅菌チューブに入れた。また、餌箱、ファン、および給水器の拭き取り試料は便と同日に収集した。具体的には RNA/*later* Stabilization Solution (Thermo Fisher Scientific) で湿らせた 3 本の HydraFlock® (Puritan Medical, Maine, U. S. A.) で拭き取り、5 ml の RNA/*later* Stabilization Solution (Thermo Fisher Scientific) が入った滅菌チューブに入れた。便と拭き取り試料が入ったチューブは直ちに保冷剤を入れたチャック付保冷袋 (Sakai Chemical Group, Fukuoka, Japan) あるいは発泡スチロール箱で保冷した。試料は収集当日か数日以内に、冷蔵便で研究室へ送付した。当日に送付できなかった場合は、養鶏場施設内の冷蔵庫で試料を保管した。研究室に届いた試料は使用するまで-20°Cで保管した。

2 回目の試料収集は 2016 年 9~10 月に実施し、出荷間近のニワトリ (46 または 47 日齢) を飼育している鶏舎内に落ちていた盲腸便と糞便試料、同一鶏舎に設置された餌箱、ファン、および鶏舎内使用の長靴底の拭き取り試料を収集した。さらに、空舎時の試料収集として、2 回目の試料収集を実施した鶏群が出荷され、清掃と乾燥が終了した鶏舎内に設置されたの餌箱、ファン、および鶏舎内使用の長靴底から拭き取り試料を収集した。盲腸便と糞便試料、および餌箱とファンの拭き取り試料は 1 回目と同様に収集した。長靴の拭き取り試料は左右の靴底をそれぞれ 3 本の HydraFlock® (Puritan Medical) で拭き取り、5 ml の

RNA/*later* Stabilization Solution (Thermo Fisher Scientific) が入った滅菌チューブに入れて収集した。ただし、鶏舎内使用の長靴は鶏舎に入る前に消毒槽を用いて靴底を消毒し、2 歩以上歩かない内に試料を収集した。収集した試料は 1 回目に収集した試料と同様の手順で研究室に送付し、保管した。鶏舎内使用の長靴の消毒には、東北の養鶏場ではアンテックビルコン® S (LANXESS, Cologne, Germany) の約 500 倍希釈溶液が、関東では消石灰が、九州 A ではアストップ® (Scientific Feed Laboratory, Tokyo, Japan) あるいはアストップ®200 (Scientific Feed Laboratory) の約 1000 倍希釈溶液が、九州 B の養鶏場ではロンテクト® (Scientific Feed Laboratory) の 500~1000 倍希釈溶液が使用されていた。消毒液は九州 A では 1 週間に 1 度、東北と九州 B では毎日交換されていた。また、関東では 1 週間に 1 度、少なくなった分の消石灰を継ぎ足して使用していた。

1-1.2) 週齢ごとの試料収集

東北、関東、九州 A、および九州 B の養鶏場で 2016 年 10 月~2018 年 1 月にニワトリの盲腸便を継時的に収集した。試料の収集時期の詳細は図 1A に示した。飼育方法、品種は全ての養鶏場で 1-1.1) と同様であった。また、関東、九州 A、および九州 B の養鶏場でニワトリは約 50 日齢で出荷されたが、東北

の養鶏場では4～5週齢の時期に一部のニワトリが出荷され、残りのニワトリが約50日齢で出荷された。試料の収集は1-1.1)と同様に、衛生上の問題から養鶏場職員に依頼し、実施した。盲腸便は1週間に1度、4個ずつ、6週連続で収集し、一部で同日に餌箱、ファン、および鶏舎内使用の長靴底の拭き取り試料も収集した。試料は、関東の養鶏場で1鶏群、東北と九州Aで各2鶏群、九州Bで3鶏群の計8鶏群から収集した。また、同一養鶏場で複数の鶏群から試料を収集する場合は、時期をずらして同じ鶏舎で実施した(図1A)。また、ニワトリの成長に合わせて飼料の種類が餌付け、後期、あるいは仕上げに切り替えられていたので、切り替えた日齢についても情報を収集した(図1B)。餌付けの飼料は1～2週齢の時期に、後期の飼料は3～4週齢の時期に、仕上げの飼料は5～6週齢の時期に与えられていることが多かったが、各鶏群で時期は前後していた。また、一部のニワトリが早期に出荷された東北の養鶏場では仕上げの飼料へ切り替える時期が早かった(図1B)。飼料の組成に関する詳しい情報は開示されなかったが、タンパク質の量は餌付けの飼料で最も多く、仕上げの飼料で最も少なかった。一方、脂質の量は、仕上げの飼料で最も多く、餌付けの飼料で最も少なかった。抗菌薬は餌付けと後期の飼料には含まれていたが、仕上げの飼料には含まれていなかった。

1-2) 海外での試料収集

ベトナムのホーチミン市にある養鶏場で、2017年8月30日に盲腸便試料と餌箱およびファンの拭き取り試料を22日齢前後あるいは31日齢前後のニワトリを飼育している2つの鶏舎から収集した。当該養鶏場では Luong Phuong 種がオールインオールアウト法で飼育されており、約60日齢で出荷されていた。ただし、日本とは異なり飼育されているニワトリの日齢は2～3日のばらつきがあり、統一されていなかった。試料収集は養鶏場職員ではなく著者らが行い、日齢が低い鶏群から順に収集した。盲腸便は22日齢前後の鶏群から14検体を、31日齢前後の鶏群から12検体を1-1.1)と同様に収集した。また、拭き取り試料は両鶏群の餌箱3個とファン2個から1-1.1)と同様に収集した。試料は共同研究先であるノンラム大学施設の冷蔵庫で使用するまで保管した。

タイのナコーンパトム県にある養鶏場で、2017年11月1日に盲腸便試料と餌箱およびファンの拭き取り試料を収集した。当該養鶏場では Arbor Acres 種がオールインオールアウト法で飼育されており、約40日齢で出荷されていた。ただし、ベトナムの養鶏場と同様、飼育されていたニワトリの日齢は2～3日のばらつきがあった。試料収集は著者らがタイの養鶏場に赴き、40日齢前後の鶏群2つ(鶏群AとBとする)から盲腸便12検体および餌箱とファンの拭

き取り試料それぞれ 3 検体を 1-1.1) で示した通りに収集した。試料は共同研究先であるカセサート大学施設の冷蔵庫で使用するまで保管した。

2) 鶏舎外での試料収集

東北、関東、および九州 B の養鶏場にて 2018 年 8~11 月に鶏舎外壁 3 検体、排水溝 3 検体、および鶏舎外使用の長靴底 2 検体 (関東のみ 4 検体) の拭き取り試料を収集した。九州 B では 1 台の飼料運搬車からタイヤ表面 2 か所と運転席の計 3 か所を拭き取った試料 1 検体も収集した。また、同時期に鶏舎周辺に生息する昆虫とワラジムシも収集した (表 1)。排水溝は鶏舎の側壁下部に設置しており、空舎時の清掃で鶏舎内に撒いた消毒液や水を鶏舎外に排出するために使用され、鶏舎内外を繋ぐ構造になっていた。また、開閉が可能だが、いずれの養鶏場でもニワトリの飼育時には閉まっていた。鶏舎外壁、排水溝、および鶏舎外使用の長靴底の拭き取り試料は滅菌 phosphate buffered salts (PBS) で湿らせた HydraFlock® (Puritan Medical) 3 本を用いて拭き取り、5 ml の滅菌 PBS が入った滅菌チューブに入れて収集した。昆虫とワラジムシはそれぞれ新しい実験用ゴム手袋をした手で捕獲し、5 ml の滅菌 PBS が入った滅菌チューブに入れた。収集した試料は 1-1.1) と同様の方法で研究室に送付し、保管した。

東北、関東、九州 B の養鶏場、および東北の養鶏場と同一企業に所属する北海道の養鶏場で 2019 年の 7~9 月に鶏舎周辺の土およびミミズを 12 検体ずつ収集した。鶏舎周辺の土を収集する際には、ポリプロピレンマイクロスパーテル 150mm (As One) を使用し、表面から深さ 5 cm 以内の土を空の滅菌チューブへ入れた。ミミズはそれぞれ新しい実験用ゴム手袋をした手で捕獲し、空の滅菌チューブに入れた。土あるいはミミズを収集したチューブは 1-1.1) と同様の方法で研究室に送付し、保管した。

3) ゲノム DNA の抽出

3-1) 盲腸便および糞便からのゲノム DNA 抽出

RNA/*later* Stabilization Solution (Thermo Fisher Scientific) 500 μ l および試料が入ったチューブに 0.85%滅菌生理食塩液を 500 μ l 加え、攪拌した後に 13,000 $\times g$ で 5 分間遠心し、上清を捨てた。沈渣を 0.85%滅菌生理食塩液 1 ml に懸濁し、再び 13,000 $\times g$ で 5 分間遠心した後、上清を捨てた。さらに、沈渣を 0.85%滅菌生理食塩液 500 μ l に懸濁し、再び 13,000 $\times g$ で 5 分間遠心した後、上清を捨て、残った沈渣からゲノム DNA を抽出した。ゲノム DNA の抽出は PowerFecal[®] DNA Isolation kit (Qiagen, Hilden, Germany) を使用し、説明書に従い行なった。ただし、抽出効率を高めるために、キット付

属のガーネットビーズの代わりに直径 0.5 mm のジルコニアビーズ (Toray, Tokyo, Japan) 400 μ l と直径 5 mm のジルコニアビーズ (Toray) 2 個を使用した (26)。また、ビーズ破碎機はビーズクラッシャー μ T-12 (Taitec, Saitama, Japan) を使用した。各試料から抽出したゲノム DNA は QuantiFluor® dsDNA System (Promega, Wisconsin, U. S. A.) あるいは QuantiFluor® ONE dsDNA System (Promega) を用いて濃度を測定した後、使用するまで-20°Cで保管した。

3-2) 拭き取り試料からのゲノム DNA 抽出

HydraFlock® (Puritan Medical) を用いて拭き取った環境試料については PowerBiofilm® DNA Isolation Kit (Qiagen) を用いて、説明書に従いゲノム DNA を抽出した。まず、チューブに入っている HydraFlock® (Puritan Medical) 3 本と RNA/*later* Stabilization Solution (Thermo Fisher Scientific) あるいは PBS を全て滅菌ストマッカー袋 (Atect, Osaka, Japan) に移し、30 秒間袋の外側から手で揉んだ後、液体試料のみをチューブに戻した。チューブを 10,000 $\times g$ で 5 分間遠心し、上清を捨てた後、沈渣を 0.85%滅菌生理食塩液 1 ml に懸濁し、その懸濁液を 2 ml チューブに移した。チューブを 13,000 $\times g$ で 5 分間遠心し、上清を捨てた後に残った沈渣に 0.85%滅菌生理食塩液 500 μ l

を加えて懸濁した。再び $13,000 \times g$ で 5 分間遠心し、上清を捨てた後に残った沈渣からゲノム DNA を抽出した。盲腸便試料と同様にキット付属のビーズの代わりにジルコニアビーズ (Toray) を使用し、ビーズ破碎機はビーズクラッシャー μ T-12 (Taitec) を使用した。各試料から抽出したゲノム DNA は 3-1) と同様に濃度を測定し、使用するまで -20°C で保管した。

3-3) 土、ミミズおよび昆虫等からのゲノム DNA 抽出

土は PowerSoil® DNA Isolation Kit (Qiagen) を用いて、説明書に従いゲノム DNA を抽出した。ビーズはキット付属のガーネットビーズを使用し、ビーズクラッシャー μ T-12 (Taitec) を使用した。各試料から抽出したゲノム DNA は 3-1) と同様に濃度を測定し、使用するまで -20°C で保管した。

ミミズ、昆虫、およびワラジムシは PowerFecal® DNA Isolation Kit (Qiagen) を用いてゲノム DNA を抽出した。ミミズは 70%エタノールを含ませたカット綿で体表面を拭き取り、土を取り除いた後、2 ml チューブに入れ、ゲノム DNA の抽出に用いた。チューブに入りきらない場合は滅菌したハサミで胴体を切断し、一部分をゲノム DNA 抽出に用いた。昆虫についても、チューブに入らない大きさの検体は滅菌したハサミで解剖し、腹部のみを使用した。ワラジムシは大きさが小さかったのでそのまま使用した。ミミズ、昆虫、およびワラジムシは直

径 0.5 mm のジルコニアビーズ (Toray) 400 μ l、直径 5 mm のジルコニアビーズ (Toray) 2 個、および 0.85%滅菌生理食塩水 500 μ l が入ったチューブに滅菌ピンセットを用いて移し、ビーズクラッシャー μ T-12 (Taitec) を用いて 3,200 回/分で 1 分間破碎した。破碎した検体を 13,000 $\times g$ で 5 分間遠心し、上清を捨てた後に残った沈渣からゲノム DNA を説明書に従い抽出した。盲腸便試料と同様にキット付属のビーズの代わりにジルコニアビーズ (Toray) を使用し、ビーズ破碎機はビーズクラッシャー μ T-12 (Taitec) を使用した。各試料から抽出したゲノム DNA は 3-1) と同様に濃度を測定し、使用するまで -20°C で保管した。

4) Nested PCR を用いた *C. jejuni*/*C. coli* 遺伝子の検出

3) で抽出したゲノム DNA 中の *C. jejuni*/*C. coli* 遺伝子を Nested PCR を用いて検出した。Nested PCR は 1 回目を実施する PCR (1st PCR) 領域よりも内側に設計されたプライマーを使用して 2 回目の PCR (2nd PCR) を実施するため、通常の PCR よりも感度と特異性が高い。本研究では Inglis & Kalischuk (2003) の報告にある *C. jejuni* の *mapA* (membrane associated protein) および *C. coli* の *ceuE* (*Campylobacter* enterochelin uptake) を標的としたプライマーを使用した (27) (表 2)。PCR 反応液は 10 \times Blend Taq[®]用 PCR

buffer (TOYOBO, Osaka, Japan) 2.5 μ l、各プライマー溶液 (Sigma-Aldrich Japan, Tokyo, Japan) 0.2 μ M (最終濃度)、2 mM dNTPs (TOYOBO) 2.5 μ l、Blend Taq[®] (TOYOBO) 0.25 μ l、および 1st PCR では抽出したゲノム DNA 1 μ l と蒸留水 (distilled water: DW) 16.75 μ l を、2nd PCR では 1st PCR の増幅産物 0.5 μ l と DW 17.25 μ l を混合し、1 検体あたり全量を 25 μ l とした。ABI 2720 (Thermo Fisher Scientific)、T100™ thermal cycler (Bio-Rad Laboratories, California, U. S. A.)、あるいは MyCycler™ Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories) を用いて PCR 反応液を 94 °C で 2 分間加熱した後、94 °C で 30 秒間、58 °C で 30 秒間、72 °C で 1 分間の加熱を 1st PCR では 25 サイクル、2nd PCR では 35 サイクル繰り返し、最後に 72 °C で 10 分間加熱し、標的配列を増幅した。ポジティブコントロールとして国立研究開発法人理化学研究所バイオリソース研究センター微生物材料開発室 (Ibaraki, Japan) から提供された *C. jejuni* 2013 株と *C. coli* 2529^T 株を使用した。*C. jejuni* 2013 株および *C. coli* 2529^T 株のゲノム DNA を PureLink[®] Genomic DNA Mini Kit (Thermo Fisher Scientific) を用いて説明書通りに抽出し、使用するまで -20°C で保管した。ネガティブコントロールとしては DW を使用した。PCR 増幅産物は Tris hydroxy methyl amino methane (Tris)-Phosphate Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) (TPE) buffer (リン酸 (WAKO,

Osaka, Japan) 1.55 ml、0.5 M EDTA pH 8.0 (WAKO) 4 ml、Tris (STAR CHEMICAL, Aichi, Japan) 10.8 g を混合して作製)、および 2%電気泳動用寒天 (Agarose H14 「TAKARA」, TaKaRa Bio Inc., Shiga, Japan) を用いたアガロースゲル電気泳動を行った。分子量マーカーとして Gene Ladder 100 (0.1-2 kbp) (NIPPON GENE, Tokyo, Japan) を使用し、泳動条件は電圧：100 V、電流：400 mA で約 40 分間 (AE-8135 my power II 300, ATTO, Tokyo, Japan)とした。核酸染色用色素 (GelRed™, Biotium, California, U. S. A.) を用いて泳動後のアガロースゲルを 10 分間染色した後、化学発光ゲル撮影装置 AE-6971 型 ライトキャプチャー (ATTO) を用いて PCR 増幅産物の存在と分子サイズを確認した。

5) Nested PCR 増幅産物の塩基配列決定

4) で増幅された塩基配列が *C. jejuni*あるいは *C. coli*の配列と一致することを確認するために、4) でポジティブコントロールとして用いた *C. jejuni* 2013 株と *C. coli* 2529^T株から抽出したゲノム DNA の塩基配列と比較した。まず、無作為に抽出した *C. jejuni*陽性試料 10 検体および *C. coli*陽性試料 8 検体、*C. jejuni* 2013 株および *C. coli* 2529^T株のゲノム DNA を Nested PCR に供試し、その増幅産物を NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel,

Nordrhein-Westfalen, Germany) で精製した。精製した増幅産物を 4) と同様の条件でアガロースゲル電気泳動に供試し、目的遺伝子が増幅されていることを確認した。次に、Nested PCR の 2nd PCR で使用したプライマーを使用し (表 2)、Big Dye® terminator v3.1 Cycle sequence kit (Applied Biosystems, Massachusetts, U. S. A.) を用いたサンガー法によりキャピラリーシーケンサー (Applied Biosystems 3130xl Genetic Analyzer, Applied Biosystems) で塩基配列を決定した。得られた塩基配列情報を Sequencher software v. 5.4.6 (Hitachi Software Engineering, Kanagawa, Japan) を用いて比較し、PCR 増幅産物が *C. jejuni*/*C. coli* の塩基配列と一致することを確認した。

6) 研究倫理

本研究は東京大学ライフサイエンス研究倫理支援室の動物実験専門委員会において、倫理規定に係る作業が含まれないことを確認された。本研究の主旨を各養鶏場の管理責任者に説明し、試料収集の了解を得た上で実施した。

3. 成績

1) Nested PCR 増幅産物の塩基配列

*C. jejuni*陽性だった 10 検体の Nested PCR 増幅産物と *C. jejuni* 2013 株の Nested PCR 増幅産物の塩基配列は一致した。また、*C. coli*陽性だった 8 検体の Nested PCR 増幅産物と *C. coli* 2529^T株の Nested PCR 増幅産物の塩基配列は一致した。

2) 出荷間近および空舎時期に収集した試料の *C. jejuni*/*C. coli* 遺伝子検出成績

収集した試料における *C. jejuni*/*C. coli* 遺伝子の検出成績を図 2 に示した。東北および九州 A の養鶏場では試料収集 1 回目で *C. jejuni*/*C. coli* 遺伝子は検出されなかった。しかし、試料収集 2 回目では、東北で収集した試料からは *C. jejuni* と *C. coli* 遺伝子が共に検出され、九州 A で収集した試料からは *C. jejuni* 遺伝子が検出された。一方、試料収集 1 回目で *C. jejuni* 遺伝子が検出された九州 B は試料収集 2 回目で *C. jejuni*/*C. coli* 遺伝子は検出されなかった。また、空舎期間に収集した試料は、試料収集 2 回目で *C. jejuni*/*C. coli* 遺伝子が検出された東北と九州 A を含め、全ての養鶏場で *C. jejuni*/*C. coli* 遺伝子は検出されなかった。試料収集 2 回目に消毒後の長靴底から拭き取り試料を収集したところ、東北の養鶏場では *C. jejuni*/*C. coli* 遺伝子が検出された。

3) 週齢ごとに収集した試料の *C. jejuni*/*C. coli* 遺伝子検出成績

週齢ごとに収集した試料における *C. jejuni*/*C. coli* 遺伝子の検出成績を図3に示した。収集した全ての試料から *C. coli* 遺伝子は検出されなかった。一方、*C. jejuni* 遺伝子は 1~6 週齢までの全週齢で検出され、週齢が上がるにつれて陽性検体数が増え、6 週齢では半数以上の試料が陽性であった（盲腸便: 32 検体中 20 検体、鶏舎内環境試料: 46 検体中 27 検体）。また、収集した試料の一部が *C. jejuni* 陽性でも次週以降に収集した試料が陽性であるとは限らず、次週の試料からは全く検出されない鶏群もあった。また、鶏群 1、2、および 6 以外の鶏群において、6 週齢の時に消毒した鶏舎内使用の長靴底から拭き取り試料を収集したところ、鶏群 4 と 7 の拭き取り試料で *C. jejuni* 遺伝子が検出された。一方、鶏群 3 と 8 では、盲腸便からは *C. jejuni* 遺伝子が検出されたが長靴底からは検出されなかった。鶏群 5 では盲腸便と長靴底のどちらからも *C. jejuni* 遺伝子は検出されなかった。

4) 海外で収集した試料の *C. jejuni*/*C. coli* 遺伝子検出成績

ベトナムの養鶏場で 22 日齢前後の鶏群から収集した盲腸便 14 検体中 12 検体、餌箱 3 検体、およびファン 2 検体から *C. jejuni* 遺伝子が検出された。また、収集した盲腸便 14 検体のうち 1 検体から *C. coli* 遺伝子が検出された。一

方、31日齢前後の鶏群から収集した盲腸便12検体、餌箱3検体、およびファン2検体からは *C. jejuni*/*C. coli* 遺伝子は検出されなかった。

タイの養鶏場で鶏群AとBから収集した計24検体の盲腸便試料および計12検体の環境試料の全てから *C. jejuni* 遺伝子が検出された。一方、*C. coli* 遺伝子は鶏群Aの盲腸便試料および拭き取り試料からは検出されなかったが、鶏群Bの盲腸便12検体中5検体および全ての拭き取り試料からは検出された。

5) 鶏舎外で収集した試料の *C. jejuni*/*C. coli* 遺伝子検出成績

国内の養鶏場3か所で収集した計27検体の鶏舎外環境試料（排水溝、鶏舎外壁、鶏舎外使用の長靴底、および飼料運搬車）のうち、関東の養鶏場で収集した排水溝の拭取り試料1検体から *C. jejuni* 遺伝子が検出された。また、*C. coli* 遺伝子はいずれの試料からも検出されなかった。国内の養鶏場4か所で収集した全ての土、ミミズ、昆虫、およびワラジ虫から *C. jejuni*/*C. coli* 遺伝子は検出されなかった。

4. 考察

本研究で使用した Nested PCR は *C. jejuni*/*C. coli* を分離することなく、ウシの糞便から直接検出する目的で開発されたものだが (27)、本研究で用いた試

料に対しても *C. jejuni/C. coli* 遺伝子が特異的に増幅されたことがサンガー法を用いて得られた塩基配列により確認された。したがって、ウシの糞便以外の試料に対して Nested PCR を使用した成績も信頼できると考えた。次に、出荷間近および空舎時期に収集した試料の *C. jejuni/C. coli* 遺伝子検出成績より、養鶏場を汚染あるいは非汚染養鶏場として区別することはできず、飼育と出荷の時機が異なる鶏群ごとに汚染の有無は変動することが示唆された。過去の報告で、同じ鶏舎から検出される *C. jejuni/C. coli* の遺伝子型が時期によって異なっていたことから (13, 28)、鶏舎内に *C. jejuni/C. coli* が残存するのではなく、新たに鶏群が *C. jejuni/C. coli* に汚染されると考えられた。また、出荷後の清掃と乾燥作業を終えた鶏舎から *C. jejuni/C. coli* 遺伝子が検出されなかったことから、今回調査した養鶏場では *C. jejuni/C. coli* は VBNC 状態で生存せず、清掃と乾燥作業により排除されたと考えられた。したがって、オールインオールアウト法は *C. jejuni/C. coli* の汚染防除に有用な飼育法であると思われた。一方で、清掃後の鶏舎から *C. jejuni/C. coli* 遺伝子が検出されたという報告もあるため (24)、オールインオールアウト法を採用するだけでなく、空舎時に適切な清掃と消毒を行うことが重要だと思われた。

ベトナムとタイで収集した試料において、同一養鶏場で同時期に飼育されていた鶏群の *C. jejuni/C. coli* 汚染の有無が異なっていたことから、国内外を問

わず、*C. jejuni*/*C. coli* 汚染は鶏群ごとに独立して起こると考えられた。特に、ベトナムでは 22 日齢の鶏群からは *C. jejuni* 遺伝子が検出されたが、31 日齢の鶏群からは検出されなかったことから、鶏舎間を移動する際は長靴を代える等の対策を講じ、鶏群間での汚染を防ぐ必要があると考えられた。

C. jejuni/*C. coli* は 5~6 週齢の時期に汚染率が高くなることが過去に示されており (29)、本研究でも同様の成績であった。ニワトリの日齢と *C. jejuni* の定着には関係があることが報告されており (30)、本研究での検出率の偏りも週齢の影響によるものだと思われる。一方、汚染率は低いものの、*C. jejuni* 遺伝子は 1~4 週齢の時期にも検出され、業者が出入りした後等の特定の時機ではなく、無作為の時機に汚染が確認された。また、九州 B で収集した飼料運搬車からは *C. jejuni*/*C. coli* 遺伝子が検出されなかったことから、外部の業者ではなく鶏舎に出入りする頻度が高い飼育員等が *C. jejuni*/*C. coli* による汚染に関与している可能性が高いと考えられた。また、1 週齢のニワトリから *C. jejuni* 遺伝子が検出されたが、一般的に *C. jejuni*/*C. coli* はニワトリでの垂直感染は起こらないとされている (31, 32)。したがって、養鶏場での汚染だけではなく、鶏舎に導入される前のニワトリへの汚染、すなわち、孵卵場の環境や職員からの汚染についても今後調査する必要があると思われた。

長靴を介して外部から鶏舎内に *C. jejuni*/*C. coli* が持ち込まれる可能性が過去に示されており (5)、本研究でも消毒後の長靴底から *C. jejuni*/*C. coli* 遺伝子が検出された。したがって、長靴用消毒槽は *C. jejuni*/*C. coli* の除去という点で十分な効果を示さないこともあり得る。ただし、鶏舎内使用の長靴と盲腸便は同時期に汚染されていたことから、長靴は汚染源ではなく、汚染された盲腸便を踏んだことで二次的に汚染された可能性があり、本成績からは、長靴とニワトリのどちらが先に汚染されたのかを判断することはできなかった。しかし、長靴が汚染源ではない場合も、汚染された長靴が原因となり他の鶏群へ汚染が伝播する可能性があるため、長靴の扱いには注意が必要だと思われる。以上より、*C. jejuni*/*C. coli* による他の鶏群への汚染を防ぐために、長靴の適切な洗浄と消毒が重要であると思われる。

鶏舎外の環境試料での *C. jejuni*/*C. coli* 汚染を調査した結果、排水溝から *C. jejuni* 遺伝子が検出された。排水溝は空舎時の清掃時に鶏舎内で使用した消毒液等の排水を鶏舎外へ排出する際に使用されるため、排水に *C. jejuni* が含まれていたと推察した。したがって、空舎時の清掃で生じる排水の扱いには十分に注意する必要がある。また、本成績で、土とミミズから *C. jejuni*/*C. coli* 遺伝子は検出されなかった。過去に、鶏舎周辺の土壌 100 検体中 1 検体から *C. jejuni* が検出されたという報告があるが (33)、養鶏場の汚染率と比較して土の汚染率が

非常に低いことから、土および土を摂取しているミミズが主な汚染源である可能性は低いと思われた。また、*C. jejuni*/*C. coli*の媒介生物と考えられている昆虫等についても調査を行なったが、*C. jejuni*/*C. coli*遺伝子は検出されなかった。過去に報告された昆虫の汚染率も約1%と非常に低いため(10, 34)、昆虫は鶏群間の汚染経路の1つにはなり得るが、主要な汚染源ではないと思われた。本研究で収集した鶏舎外環境試料はいずれも主要な*C. jejuni*/*C. coli*の汚染源ではないことが示唆されたため、汚染源解明のためには養鶏場外の環境を含む、さらなる調査が必要だと考えられた。

5. 要約

第1章では養鶏場内の*C. jejuni*/*C. coli*汚染源および汚染経路を推定するために、国内外の複数の養鶏場で試料を収集し、汚染源の推定を行なった。まず、鶏舎内での*C. jejuni*/*C. coli*汚染を調査した結果、養鶏場を汚染あるいは非汚染養鶏場として区別することはできず、飼育と出荷の時機が異なる鶏群ごとに汚染の有無は異なることが明らかになった。空舎期間の洗浄と消毒で*C. jejuni*/*C. coli*汚染はほぼなくなっていたこと、また、国内外に関わらず鶏群ごとに汚染の有無が異なっていたことから、鶏舎に残存する*C. jejuni*/*C. coli*が汚染源になるというよりも、毎回新たに汚染が起こると考えられた。次に、鶏舎

内の *C. jejuni*/*C. coli* 汚染を経時的に調査した結果、*C. coli* 遺伝子は検出されなかったが、*C. jejuni* 遺伝子は、検出率に偏りはあるものの、1~6 週齢のいずれの時期でも検出されたことから、*C. jejuni* による汚染は特定の時機ではなく、無作為の時機に起こると思われた。消毒槽を用いて消毒した長靴底からも *C. jejuni*/*C. coli* 遺伝子が検出されたため、消毒槽は *C. jejuni*/*C. coli* の除去という点では十分な効果があるとは言えず、長靴を介して *C. jejuni*/*C. coli* が鶏舎外から鶏舎内に持ち込まれる可能性が示された。しかし、土や昆虫等の鶏舎外環境試料からは *C. jejuni*/*C. coli* 遺伝子は検出されなかったため、その他の鶏舎外試料あるいは養鶏場外での調査が必要だと考えられた。

第2章 野生動物における *Campylobacter* 汚染調査

1. はじめに

第1章で *C. jejuni*/*C. coli* は鶏舎内に常在せず、空舎時の清掃で一度排除されるが、新たな鶏群飼育後に再び鶏舎内が汚染されることが示唆された。また、第1章で収集した鶏舎外の環境試料のうち、排水溝以外からは *C. jejuni*/*C. coli* 遺伝子が検出されず、主要な汚染源を見出せなかったことから、第2章では養鶏場外に焦点を当て、汚染源を調査した。多くの論文がこれまでに外部環境からの *C. jejuni*/*C. coli* 汚染について議論しており (5, 35)、その中でも野生動物や他の農場で飼育している家畜が汚染源の1つとして注目されている。*C. jejuni*/*C. coli* はウシや、ヒツジ、イヌ、ネコ等、様々な動物から検出されており (36, 37)、汚染源となり得る動物種は多岐にわたる。海外で行われた野生動物調査ではイノシシやシカ等から *C. jejuni*/*C. coli* が検出され、その内の50%以上がテトラサイクリンやストレプトマイシンに対して耐性を持っていたことから (38)、野生動物への *C. jejuni*/*C. coli* 汚染制御は養鶏場への汚染防止だけでなく、薬剤耐性菌の拡散防止にも重要であると考えられる。

日本では松崎らが1986年に、*C. jejuni*/*C. coli* はタヌキからは検出されたが、イノシシや、イタチ、キツネ等からは検出されなかったと報告した (39)。

一方で、日本のイノシシから *C. jejuni* が検出されたという報告もある (40)。しかし、これらの調査は培養法で *C. jejuni*/*C. coli* を検出しており、VBNC 状態の菌体は検出できないことを考慮すると (22, 23)、報告よりも多くの野生動物が汚染されている可能性がある。

本研究では、養鶏場の周辺で野生動物を捕獲するのは困難であると判断し、狩猟あるいは害獣として駆除された動物の糞便や、交通事故等により死亡した動物の糞便、養鶏場敷地内に落ちていた糞便を用いて *C. jejuni*/*C. coli* の汚染を調査した。また、赤外線カメラを鶏舎周辺に設置し、野生動物が養鶏場敷地内に侵入しているのか、また、どのような動物種が頻繁に侵入しているのかを確認し、野生動物からニワトリへ *C. jejuni*/*C. coli* の汚染が起こり得るのかを評価した。

2. 材料と方法

1) 野生動物の糞便収集

2014年8月30日～2019年3月23日に狩猟あるいは害獣として駆除されたシカ75頭およびイノシシ75頭の糞便試料が山口大学共同獣医学部獣医微生物学教室から分与された。また、2018年11月6日～2019年1月25日に狩猟あるいは害獣として駆除されたシカ25頭およびイノシシ25頭の糞便試料が

鹿児島大学共同獣医学部獣医公衆衛生学教室から分与された。糞便試料は滅菌チューブに入れた状態で冷凍便で送付され、使用するまで-20°Cで保管した。

2019年3月28日～8月16日に害獣として駆除されたアライグマ100匹、アナグマ9匹、ハクビシン21匹、交通事故等で死亡したテン1匹とイタチ1匹、および疥癬に感染したため感染症予防のために殺傷されたタヌキ8匹の糞便試料がふるさと自然公園センター (Wakayama, Japan) から分与された。糞便試料は冷凍便で送付され、使用するまで-20°Cで保管した。

2019年7月11日に第1章で協力を依頼した九州Bの養鶏場敷地内に落ちていた野生動物の糞便1検体と、2019年9月24～26日に同じく第1章で協力を依頼した北海道の養鶏場敷地内に落ちていた野生動物の糞便10検体と野鳥の糞便2検体をそれぞれ新しい実験用ゴム手袋で拾い、滅菌チューブに入れて収集した。拾った糞便試料は冷凍便で送付し、使用するまで-20°Cで保管した。

2) ゲノム DNA の抽出

野生動物の糞便は PowerFecal® DNA Isolation Kit (Qiagen) を用いて、説明書に従いゲノム DNA を抽出した。抽出効率を高めるために、第1章に示した方法と同様に、キット付属のビーズの代わりにジルコニアビーズ (Toray) を使用した。また、ビーズ破砕機はビーズクラッシャー μ T-12 (Taitec) を使用し

た。各試料から抽出したゲノム DNA は第 1 章と同様に濃度を測定し、使用するまで-20°C で保管した。

3) Nested PCR を用いた *C. jejuni*/*C. coli* 遺伝子の検出

第 1 章に示した方法を用いて 2) で抽出したゲノム DNA 中の *C. jejuni*/*C. coli* 遺伝子を検出した。

4) 拾った糞便の動物種特定

養鶏場敷地内で拾った野生動物の糞便 11 検体は 2) で述べた方法により DNA を抽出した後、冷蔵便にて株式会社生物技研 (Kanagawa, Japan) に送付し、以下の作業を依頼した。まず、ゲノム DNA 中のチトクロム C 酸化酵素サブユニット I 遺伝子を表 3 に示したプライマーで増幅した。PCR 反応液は 10×Ex buffer (TaKaRa Bio Inc., Shiga, Japan) 1.0 μl、2.5 mM dNTP 0.8 μl、Ex taq HS (TaKaRa Bio Inc.) 0.1 μl、各プライマー溶液 0.5 μM (最終濃度)、DW 5.1 μl、およびゲノム DNA 10 ng を混合し、1 検体あたり全量を 10 μl とした。PCR 反応液を 94 °C で 2 分間加熱した後、94 °C で 30 秒間、52 °C で 30 秒間、72 °C で 30 秒間の加熱を 35 サイクル繰り返し、最後に 72 °C で 5 分間加熱し、標的配列を増幅した。次に、PCR 増幅産物を Agencourt AMPure

XP beads (Beckman Coulter Inc., California, U. S. A.) を用いて精製した後、各塩基配列がどの試料由来の配列であるかを紐付けすることができるよう、精製した試料に対し検体ごとに異なる Nextera XT Index Kit (Illumina)を用いた Index 配列を用いて PCR を行った。PCR 反応液は 10×Ex buffer (TaKaRa Bio Inc.) 1.0 μ l、2.5 mM dNTP 0.8 μ l、Ex taq HS (TaKaRa Bio Inc.) 0.1 μ l、各プライマー溶液 0.5 μ M (最終濃度)、DW 5.1 μ l、および PCR 増幅産物 2.0 μ l を混合し、1 検体あたり全量を 10 μ l とした。PCR 反応液を 94 °C で 2 分間加熱した後、94 °C で 30 秒間、60 °C で 30 秒間、72 °C で 30 秒間の加熱を 10 サイクル繰り返し、最後に 72 °C で 5 分間加熱し、Index 配列を付加した。Agencourt AMPure XP beads (Beckman Coulter Inc.) を用いて PCR 増幅産物を精製した後に、Synergy H1 (Biotech inc., Georgia, U. S. A.) と QuantiFluor® ONE dsDNA System (Promega) により濃度を測定した。また、Fragment Analyzer (Thermo Fisher Scientific) と dsDNA 915 Reagent Kit (Advanced Analytical Technologies Inc., Heidelberg, Germany) を用いて PCR 増幅産物の品質を確認した後、試料と等量の 0.2 N NaOH を加え 5 分間反応を行うことで 1 本鎖に変性させた。変性後の試料に Hybridization buffer (Illumina) を加え 10 pM に希釈し、さらに 96 °C で 2 分間熱変性を行った後、氷上で 5 分間以上静置した試料 600 μ l を MiSeq v3 Reagent Kit

(Illumina) に供試し、2 × 300bp の条件で高速シーケンサーMiSeq (Illumina) にて塩基配列を決定した。

5) 鶏舎周辺への赤外線カメラ設置と野生動物の撮影

夜間に効果を発揮する LED 照明を備えた赤外線付きトレイルカメラ Browning Strike Force Pro (BTC-5HDP) (Browning, Utah, U. S. A.) を養鶏場敷地内の電信柱等に固定することで設置し、野生動物を撮影した (図 4A)。赤外線カメラは動物が前を通り過ぎると 10 秒間動画を撮影するように設定した。また、赤外線カメラの前に居続ける動物を連続して撮影するのを防ぐために、動画の撮影後 5 分間は動画を撮影しないように設定した。関東の養鶏場に 2 台、北海道、東北、および九州 B の養鶏場に 4 台の赤外線カメラを設置した。また、関東の養鶏場では撮影を 2 回実施した (表 4)。

3. 成績

1) 野生動物の糞便試料における *C. jejuni*/*C. coli* 遺伝子検出成績

山口大学から分与されたシカの糞便では 75 検体中 8 検体から *C. jejuni* 遺伝子が、75 検体中 11 検体から *C. coli* 遺伝子が検出された。季節ごとの *C. jejuni*/*C. coli* 遺伝子の検出率は、表 5 に示すように夏 (6~8 月) で最も高かつ

た。また、年ごとの *C. jejuni*/*C. coli* 遺伝子の検出率は、表 6 に示すように 2014 年で最も高く、その後年々低下していた。鹿児島大学から分与されたシカの糞便では 25 検体中 7 検体から *C. jejuni* 遺伝子が、25 検体中 8 検体から *C. coli* 遺伝子が検出された。

山口大学から分与されたイノシシの糞便では 75 検体中 2 検体から *C. jejuni* 遺伝子が、75 検体中 6 検体から *C. coli* 遺伝子が検出された。季節ごとの *C. jejuni*/*C. coli* 遺伝子の検出率は、表 5 に示すように夏 (6~8 月) で最も高かった。また、年ごとの *C. jejuni*/*C. coli* 遺伝子の検出率は、表 6 に示すように 2014 年と 2015 年が最も高く、その後年々低下していた。鹿児島大学から分与されたイノシシの糞便では 25 検体中 15 検体から *C. jejuni* 遺伝子が、25 検体中 13 検体から *C. coli* 遺伝子が検出された。

ふるさと自然公園センターから分与された糞便のうち、アライグマ以外の検体 (アナグマ、タヌキ、ハクビシン、テン、およびイタチ) からは *C. jejuni*/*C. coli* 遺伝子は検出されなかった。一方、アライグマの糞便では 100 検体中 2 検体から *C. jejuni* 遺伝子が検出された。また、*C. coli* 遺伝子は検出されなかった。

九州 B の養鶏場敷地内で収集した野生動物の糞便 1 検体の動物種はネコであることが塩基配列により特定された。また、北海道の養鶏場敷地内で収集した試料はシカの糞便 8 検体とキツネの糞便 2 検体であった。収集した野生動物の糞

便計 11 検体と野鳥の糞便 2 検体からは *C. jejuni*/*C. coli* 遺伝子は検出されなかった。

2) 赤外線カメラで撮影された野生動物

合計で、4142 本の動画が撮影された。そのうちの計 388 本に動物が写っており、残りの 3754 本は従業員が写っていた、あるいは風によって動いた草や葉に赤外線が反応して撮影されたと思われ、動物等は写っていなかった。一部の動画には例えばタヌキ 2 匹等、複数の動物が写っていたが、異なる動物種が同じ動画に同時に写ることはなかった。また、動物が写っていた 388 本の動画中、366 本では動物の種類を識別することができたが、残りの 22 本は動物の体の 1 部しか動画に写っていない、あるいは識別するには遠すぎる位置に動物が写っていたため動物種を特定できなかった。

得られた動画の約半数にネコが写っており (186/388 本、47.9%)、全ての養鶏場で観察された (表 4)。ネコの次に多く撮影された動物はタヌキで (114/388 本、29.4%)、北海道を除く全ての養鶏場で観察された (表 4)。ハトやカラスを含む野鳥は 3 番目に多く (40/388 本、10.3%)、全ての養鶏場で観察された (表 4)。その他の動物としてシカや、キツネ、テン、イヌ、ネ

ズミ、アライグマ、ハクビシン、イタチ等が確認された。また、野生動物や野鳥が鶏舎の間近まで侵入していた様子が観察された (図 4 B)。

4. 考察

Nested PCR を用いた遺伝子検査により、調べたアライグマ、シカ、およびイノシシの糞便から *C. jejuni*/*C. coli* 遺伝子が検出された。日本のアライグマを対象とした *C. jejuni*/*C. coli* 汚染に関する調査報告はこれまでに存在しないため、本研究が日本に生息するアライグマから *C. jejuni*/*C. coli* が検出されたことを示す初めての報告だと思われる。アライグマは現在日本に広く存在する害獣として知られており、その分布は近年著しく拡大している (41)。本成績でアライグマからの *C. jejuni*/*C. coli* 遺伝子の検出率は低かったものの、海外ではアライグマからヒトへ直接 *C. jejuni* が感染したという報告もあるため (42)、養鶏場の汚染だけではなくヒトへの感染を防ぐためにもアライグマとその糞便には注意する必要がある。イタチやハクビシン等、他の動物種からは *C. jejuni*/*C. coli* 遺伝子が検出されなかったが、検体数がアライグマ等と比較して少なかつたため、更に調査が必要だと思われた。特にタヌキは過去に行われた調査で *C. jejuni*/*C. coli* が検出されているため (39)、検体数を増やすことで *C. jejuni*/*C. coli* 陽性の個体が見つかる可能性がある。日本の野生動物における *C. jejuni*/*C.*

coli 汚染調査はほとんど行われていないため、汚染源推定のために更に調査が必要だと思われた。

本研究で、イノシシの糞便からの *C. jejuni*/*C. coli* 遺伝子検出率は、日本全国を対象に行われた汚染調査の成績 (*C. jejuni* の検出率 0.8%) よりも高かった (40)。さらに、その調査ではシカ糞便から *C. jejuni*/*C. coli* は検出されなかったのに対し (40)、本研究ではシカ糞便から *C. jejuni*/*C. coli* 遺伝子が検出された。本研究では培養法や PCR よりも感度が高い Nested PCR を使用したことが、過去の報告よりも検出率が高かった原因の一つであると考えられた。これらの成績から、*C. jejuni*/*C. coli* 遺伝子が検出されたアライグマ、シカ、およびイノシシは汚染源あるいは汚染経路になり得ると思われた。一方で、*C. jejuni*/*C. coli* 遺伝子の検出率は高いとは言えなかったことから、*C. jejuni*/*C. coli* は上記の野生動物の常在細菌ではないと思われた。さらに、野生動物は生息域に偏りがあり、例えばイノシシは北海道等の多雪地域にはほとんど生息していない (43)。したがって、アライグマ、シカ、およびイノシシは日本における共通の汚染源とは考えにくかった。また、養鶏場敷地内で拾った野生動物あるいは野鳥の糞便からは *C. jejuni*/*C. coli* 遺伝子が検出されなかったことから、今後、他の野生動物についても調査を行い、野生動物が汚染源かどうか評価する必要があると思われた。

季節ごとの *Campylobacter* 食中毒および養鶏場での汚染調査で、夏が最も *C. jejuni*/*C. coli* の検出率が高いことが示されており (9, 44)、この傾向は本研究のシカとイノシシでも確認されたため (表 5)、野生動物でも養鶏場と同様に *C. jejuni*/*C. coli* の汚染率と気温は関係があると思われた。次に、山口大学から分与された糞便の *C. jejuni*/*C. coli* 汚染率を年ごとに比較すると、2015 年以降低下傾向にあった (表 6)。山口県では 2015 年 12 月から「やまぐち高度衛生管理養鶏場認定制度」を肉用鶏養鶏場と採卵鶏養鶏場に対して実施しており (45)、「鶏舎内は定期的に清掃を行い、汚れがないことを肉眼的に確認し、汚れが認められたら適宜清掃する」「履物は鶏舎ごとに替え、踏込消毒槽等で十分に消毒する」といった 100 項目以上の管理要件を満たすことが推奨されている。上記制度により山口県の養鶏場の衛生環境が向上したとすれば、それが同県内に生息する野生動物の衛生環境にも影響した可能性がある。養鶏場での対策と野生動物の *C. jejuni*/*C. coli* 遺伝子検出成績が関連しているように思われたことは大変興味深い、本研究ではその因果関係を示すことはできなかった。野生動物と養鶏場での *C. jejuni*/*C. coli* 汚染調査を同じ地域で同時期に行う等をさらに繰り返し、高い相関関係を明らかにすることで、汚染源となる野生動物を特定できる可能性が考えられた。

赤外線カメラを用いた調査では、複数の動物種が鶏舎の間近まで侵入していることが確認され、それらの糞便を踏むことで長靴が汚染される可能性が示された。また、野生動物は *C. jejuni*/*C. coli* だけではなく *Salmonella* 等その他の病原微生物を複数持っている可能性があるため十分な注意が必要だと言える(46)。過去に行われた野生動物調査で養鶏場から検出される *C. jejuni* と野生動物や野鳥からから検出される *C. jejuni* では血清型や遺伝子型が異なるという報告もあるため(47, 48)、今後は *C. jejuni*/*C. coli* の遺伝子型や血清型も調査し、野生動物と養鶏場で検出される *C. jejuni*/*C. coli* の関係性についても調査を行う必要がある。

5. 要約

第1章で *C. jejuni*/*C. coli* の汚染源が養鶏場外に存在する可能性が示されたため、第2章では野生動物に焦点を当てて汚染源を調査した。アライグマ、シカ、およびイノシシの糞便から *C. jejuni*/*C. coli* 遺伝子が検出されたことから、それらの野生動物が汚染源の候補だと考えられた。一方で、野生動物は生息域に偏りがあるため、アライグマ、シカ、およびイノシシは日本における共通の汚染源とは考えにくかった。また、養鶏場敷地内で拾った野生動物の糞便からは *C. jejuni*/*C. coli* 遺伝子が検出されなかったため、野生動物が主要な汚染源だと断

定するには至らなかった。養鶏場での *C. jejuni*/*C. coli* 汚染率は夏が最も高いと言われており、その傾向はシカとイノシシの糞便でも同様に確認された。さらに、山口大学から分与されたシカとイノシシの糞便での *C. jejuni*/*C. coli* 汚染率減少と山口県の養鶏場での衛生状態向上が関連しているような成績が得られたが、その因果関係は不明であった。*C. jejuni*/*C. coli* 汚染調査を同じ地域で同時期に行う等を繰り返し、高い相関関係を明らかにすることで、汚染源となる野生動物を特定できる可能性がある。赤外線カメラを用いた養鶏場における動物の侵入調査では、複数の動物種が鶏舎の間近まで侵入していることが確認された。野生動物は *C. jejuni*/*C. coli* だけではなく *Salmonella* 等その他の病原微生物を複数持っている可能性があるため、養鶏場への侵入には注意が必要だと考えられた。

第3章 16S rRNA 遺伝子増幅産物による細菌叢解析

1. はじめに

第2章で野生動物を対象とした汚染調査を行ったが、野生動物が主要な汚染源だと断定することはできなかった。そこで、*C. jejuni*/*C. coli*による汚染が起こる際、汚染源で共存するその他の細菌も共にニワトリを汚染し、腸管内に定着すると仮説を立て、第3章では *C. jejuni*/*C. coli* 陽性および陰性試料間でニワトリ盲腸便の細菌叢を比較することで汚染源の推定を試みた。一般に、細菌は腸内や環境中で単独で生存せず、複数の細菌と共存している。そのため、病原細菌等がヒトに感染する際には、汚染源で共存する他の細菌も同じ経路を介して共に伝播することが知られており (49)、同様に、*C. jejuni*/*C. coli*も汚染源で共存する他の細菌と共にニワトリを汚染すると推測した。そこで、*C. jejuni*/*C. coli* 陽性試料にのみ存在する細菌、あるいは陽性試料で存在率が高い細菌の由来を調査することで、*C. jejuni*/*C. coli*の由来を推定できると考えた。

ニワトリの腸内細菌叢は *C. jejuni*/*C. coli* の定着と関係していることが示唆されていることから (50)、両者の相互関係は注目されている。特に、盲腸は細菌の数と種類がニワトリ腸管中で最も多く (51, 52)、ニワトリの免疫系の調節や、栄養の吸収、病原細菌の防御等、様々な役割も持つため (53)、腸内細菌

叢の中でも特に注目され、広く研究されている (52)。例えば、ニワトリの盲腸の細菌叢を変化させ、*C. jejuni* の定着を抑制させる等の研究が行われているが (54, 55)、商業用の養鶏場で上記の研究成績が実用化されるには至っていない。その原因の1つとして、多くの研究が実験用に飼育したニワトリを用いていることが挙げられる。商業用に飼育したニワトリを用いた調査も近年行われているが、養鶏場間での比較を行っていない (56)、飼料の情報が欠如している等 (57)、情報に偏りがあるため、より包括的な研究が必要だと思われる。そこで、本研究では汚染源の推定を行うだけでなく、商業用に飼育されたニワトリの盲腸便細菌叢を明らかにすることも目的とし、週齢、飼料の種類、および養鶏場の違いが盲腸便細菌叢に与える影響について調査した。

2. 材料と方法

1) 供試した試料

第1章で収集した盲腸便試料から抽出したゲノム DNA を本章でも使用した。東北、九州 A、および九州 B の養鶏場で週齢ごとに2鶏群以上から収集した盲腸便 168 検体、ベトナムで2鶏群から収集した盲腸便 14 検体、およびタイで2鶏群から収集した盲腸便 14 検体の計 196 検体のゲノム DNA を 16S rRNA 遺伝子増幅産物による細菌叢解析に供試した。第1章での Nested PCR の成績

で、週齢ごとに収集した全ての試料で *C. coli* 遺伝子は検出されなかったため、タイとベトナムで収集した盲腸便についても *C. coli* 遺伝子が検出された試料は除外して使用した。

2) 16S rRNA 遺伝子領域の塩基配列決定

16S rRNA 遺伝子領域の塩基配列決を Illumina Inc. Part #15044223 Rev.B (Illumina) に従って行なった。16S rRNA 遺伝子の V3-V4 可変領域を Klindworth, *et al.* (2013) の報告にあるプライマーを用いて増幅した (58) (表 7)。PCR 反応液は 2×KAPA HiFi HotStart ReadyMix (Kapa) 12.5 μ l、各プライマー溶液 (Sigma-Aldrich Japan) 0.2 μ M (最終濃度)、およびゲノム DNA 12.5 ng を混合し、1 検体あたり全量を 25 μ l とした。ABI 2720 (Thermo Fisher Scientific)、T100™ thermal cycler (Bio-Rad Laboratories)、あるいは MyCycler™ Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories) を用いて PCR 反応液を 95 °C で 3 分間加熱した後、95 °C で 30 秒間、55 °C で 30 秒間、72 °C で 30 秒間の加熱を 25 サイクル繰り返し、最後に 72 °C で 5 分間加熱し、標的配列を増幅した。PCR 増幅産物は Agilent 2100 バイオアナライザ電気泳動システム (Agilent Technologies Japan, Tokyo, Japan) を用いて品質を確認した後に Agencourt AMPure XP beads (Beckman Coulter Inc.) を用いて

精製した。各塩基配列がどの試料由来の配列であるかを紐付けすることができ
るよう、精製した試料に対し検体ごとに異なる Nextera XT Index Kit (Illumina)
を用いた Index 配列を用いて PCR を行った。PCR 反応液は 2×KAPA HiFi
HotStart ReadyMix (Kapa Biosciences) 25 μ l、Nextera XT Index プライ
マー N (Illumina) 5 μ l、Nextera XT Index プライマー S (Illumina) 5 μ l、DW
10 μ l、および PCR 増幅産物 5 μ l を混合し、1 検体あたり全量を 50 μ l とした。
ABI 2720 (Thermo Fisher Scientific)、T100™ thermal cycler (Bio-Rad
Laboratories)、あるいは MyCycler™ Thermal Cycler (Bio-Rad
Laboratories) を用いて PCR 反応液を 95 °C で 3 分間加熱した後、95 °C で
30 秒間、55 °C で 30 秒間、72 °C で 30 秒間の加熱を 8 サイクル繰り返し、
最後に 72 °C で 5 分間加熱し、Index 配列を付加した。PCR 増幅産物は
Agencourt AMPure XP beads (Beckman Coulter Inc.) を用いて精製した後
に、Agilent 2100 バイオアナライザ電気泳動システム (Agilent Technologies
Japan) を用いて品質を確認した。精製した試料は Library Quantification Kit
for Illumina (Kapa Biosciences) を使用したリアルタイム PCR によって定量
化した。リアルタイム PCR 反応液は KOD SYBR® qPCR Mix (TOYOBO) 10
 μ l、Primer P1 (Kapa Biosciences) 0.2 μ M (最終濃度)、Primer P2 (Kapa
Biosciences) 0.2 μ M (最終濃度)、50×ROX reference dye (TOYOBO) 0.4

μl、DW 7.28 μl、および精製した試料 2 μl あるいは DNA スタンダード (Kapa Biosciences) 2 μl を混合し、1 検体あたり全量を 20 μl とした。Primer P1 と P2 の配列は表 7 に示した。Applied Biosystems® StepOnePlus™リアルタイム PCR システム (Thermo Fisher Scientific) を用いて PCR 反応液を 98 °C で 2 分間加熱した後、98 °C で 10 秒間、50 °C で 10 秒間、68 °C で 45 秒間の加熱を 45 サイクル繰り返し、最後に融解曲線機能を用いて標的配列以外が増幅されていないことを確認した。リアルタイム PCR の成績をもとに、精製した試料を 10 mM Tris-HCl バッファー pH8.5 を用いて 5 nM に希釈した後、試料と等量の 0.2 N NaOH を加え 5 分間反応を行うことで 1 本鎖に変性させた。変性後の試料に Hybridization buffer (Illumina) を加え 2 pM に希釈した。次に、試料と同様の手順で phiX (Illumina) を 1 本鎖に変性した後、Hybridization buffer (Illumina) を加え 2 pM に希釈した。試料と phiX を等量混合した溶液を 96 °C で 2 分間加熱した後、氷上で 5 分間以上静置した試料 600 μl を MiSeq v3 Reagent Kit (Illumina) に供試し、2 × 300bp の条件で高速シーケンサー MiSeq (Illumina) にて塩基配列を決定した。タイで収集した鶏盲腸便 14 検体は 16S rRNA 遺伝子の V3-V4 可変領域の PCR 終了後、その増幅産物を株式会社生物技研に冷蔵便で送付し、MiSeq (Illumina) による塩基配列の決定を依頼

した。塩基配列の決定は Illumina Inc. Part #15044223 Rev.B (Illumina) に従ってその他の試料と同様に行った。

Miseq (Illumina) を用いて得られた計 196 検体の塩基配列は DNA Data Bank of Japan に登録した。国内で収集した 168 検体の塩基配列におけるアクセッション番号は DRA007956、国外で収集した 28 検体の塩基配列におけるアクセッション番号は DRA008534 である。

3) 取得した配列の前処理と細菌分類群の推定

取得した配列の前処理は複数のソフトウェアを内包するパイプライン Illinois Mayo Taxon Organization from RNA Dataset Operations (IM-TORNADO) ver. 2.0.3.2 (59) を用いて、東京大学ヒトゲノム解析センターのスーパーコンピュータ-SHIROKANE (<http://sc.hgc.jp/shirokane.html>) 上で行った。IM-TORNADO に含まれている、低品質な塩基配列を除去するためのソフトウェア Trimmomatic のパラメーターを LEADING: 20、TRAILING: 20、MINLEN: 180 に変更し、その他のソフトウェアに関するパラメーターは初期設定のまま使用した。精度の低い配列やキメラ配列を削除した後 IM-TORNADO 内の mothur (60) を用いて、配列が 100%一致していた塩基配列同士をクラスタリングし、1 つの operational taxonomic unit (OTU) とした (図 5)。作成した

OTU を用いて Ribosomal Database Project (RDP) データベース ver. 11 (Michigan State University, Michigan, U. S. A.) (61) に対して 97%を閾値とした相同性検索を行い、各 OTU の細菌分類群を属レベルで推定した (図 5)。属名まで推定することのできなかつた OTU は推定できる範囲で分類し、末尾に unclassified と表記した。また、各細菌の分類階級は 1 文字目に示した (k: 界、p: 門、c: 綱、o: 目、f: 科、g: 属)。

処理をした配列のうち 25,000 本を Quantitative Insights Into Microbial Ecology (QIIME) ver. 1.9.1 (62) の core_qiime_analyses.py スクリプトを用いて試料ごとに無作為に抽出し、以後の解析に使用することで試料間の配列本数の偏りを排除した。得られた配列に属する OTU は推定した分類階級の上位からアルファベット順に並べ、1 から順番に番号を付与した (図 5)。25,000 本が解析に十分な配列本数であるかを判断するために、QIIME の alpha_diversity.py スクリプトを用いて Good's coverage を計算した。また、決定した配列情報から得た OTU 数を示す希薄化曲線を QIIME の alpha_rarefaction.py スクリプトを用いて描いた。

4) 統計処理と解析

4-1) 週齢および飼料の違いによる細菌叢の比較

東北、九州 A、および九州 B の養鶏場で週齢ごとに収集した盲腸便 168 検体からの塩基配列を解析に使用した。得られた OTU 数と α 多様性を表す指数 (Chao1、Simpson、および Shannon) を週齢および飼料の種類ごとに QIIME の alpha_diversity.py スクリプトを用いて計算した。検体間で α 多様性に有意差があるかどうかは統計解析フリーソフト R (以後、R と示す) (63) の NSM3 パッケージの pSDCFlig 関数を使用して、ノンパラメトリック多重比較検定 (Steel-Dwass) を行い、 P 値が 0.05 未満のとき統計的に有意とみなした。

OTU は 100% 一致している塩基配列のまとまりであり、推定された細菌分類群を同じとする OTU が複数存在している (図 5)。そこで、QIIME の summarize_taxa_through_plots.py スクリプトを用いて細菌分類群ごとに OTU をまとめ、平均存在率 2% 以上の構成細菌を週齢および飼料の種類ごとに積み上げ棒グラフを用いて表した。

各 OTU における平均存在率ごとの出現頻度を Microsoft®Excel for mac ver. 16.16.16 (Microsoft Corporation, Washington, U. S. A.) を用いて計算し、度数分布表で示した。また、各平均存在率区分における OTU の全体に占める割合を円グラフで示した。

試料間の構成細菌の違いを比較するために、OTU の代表配列を用いた系統樹を作成し、比較する 2 つの試料間の構成細菌の違いを UniFrac 距離として系統樹の枝長から計算する方法を用いた (64)。構成細菌の存在量を考慮しない unweighted UniFrac 距離および存在量を考慮する weighted UniFrac 距離の両方を QIIME の `beta_diversity_through_plots.py` を用いて計算した。次に、試料間の距離を 2 次元平面上に投影 (似たものは近くに、異なつたものは遠くに配置) する解析手法である多次元尺度構成法 (multidimensional scaling: MDS) を UniFrac 距離に対して行なつた。MDS 解析は R の MDS 関数を用いて行い、R の `ggplot2` パッケージを用いて作図した。作図する際、横軸を第一主成分、縦軸を第二主成分とした。第一主成分とは、距離行列を元に散布図を作成した際に、分散が最大となる方向に引いた軸のことであり、第二主成分は第一主成分に対して直角に引いた軸のことである。作図後、`ggplot2` の `stat_ellipse` (`type = "norm"`) 機能を用いて多変量 t 分布の 95%信頼区間を表す楕円 (95% 確率楕円) を比較する試料ごとに描いた。

週齢によって存在率が変化した OTU を見つけるために、QIIME の `group_significance.py` スクリプトを用いて分散分析 (analysis of variance: ANOVA) を行つた。1~2 週齢、3~4 週齢、および 5~6 週齢で収集した試料間の変動に対して ANOVA を行い、Bonferroni 法で調整した P 値が 0.05 未満

のとき統計的に有意とみなした。餌付け、後期、および仕上げの飼料を与えている時期に収集した試料についても上記と同様に ANOVA 解析を行い、Bonferroni 法で調整した P 値が 0.05 未満のとき統計的に有意とみなした。次に、週齢と飼料の種類によって存在率が変化した OTU 数をベン図を用いて比較した。また、存在率が有意に変化した OTU の平均存在率ごとの出現頻度を Microsoft®Excel for mac (Microsoft Corporation) で計算し、度数分布表で示した。細菌分類群に対しても上記と同様に ANOVA 解析を行い、ベン図で示した。

4-2) 養鶏場および国の違いによる細菌叢の比較

国内で 5~6 週齢の時期に収集した盲腸便 56 検体と、ベトナムおよびタイで収集した盲腸便 28 検体の計 84 検体から得た塩基配列を解析に使用した。 α 多様性を 4-1) と同様の方法で計算し、Steel-Dwass 検定を用いて比較し、 P 値が 0.05 未満のとき統計的に有意とみなした。また、積み上げ棒グラフを用いて各養鶏場の主要な構成細菌を 4-1) と同様の方法で示した。また、MDS 解析を 4-1) で記した方法と同様に行い、養鶏場ごとの構成細菌を比較した。

細菌叢におけるバイオマーカーを発見するためのツール Linear discriminant analysis effect size (LEfSe) を用いた解析を行った (65)。

LEfSe 解析は複数の細菌叢のデータを対象に、集団の違いを示し得る特徴的な OTU を統計学的に抽出することができる解析である。本研究では日本、ベトナム、およびタイの養鶏場で飼育されたニワトリの盲腸便細菌叢の違いを特徴付ける OTU を探索するために LEfSe 解析を用いた。LEfSe 解析のパラメーターは ANOVA: $P < 0.01$ 、 ウィルコクソンの順位和検定: $P < 0.01$ 、 および LDA スコア (\log_{10}) < 2.5 に変更し、その他のパラメーターは初期設定のままで使用した。

4-3) *C. jejuni*の有無による細菌叢の比較

国内の養鶏場で 5~6 週齢の時期に収集した盲腸便 56 検体、およびベトナムの 2 鶏群から収集した盲腸便 14 検体の計 70 検体から得た塩基配列を解析に使用した。解析を行うにあたって試料が *C. jejuni* 陽性か陰性かは第 1 章で行った Nested PCR の成績を参照した。 α 多様性を 4-1) と同様の方法で計算し、ウェルチの T 検定を用いて比較し、 P 値が 0.05 未満のとき統計的に有意とみなした。

C. jejuni 陽性試料にのみ存在している細菌を調査するために、各養鶏場で収集した陽性試料の半数以上に存在している、かつ陰性試料には存在しない OTU を抽出した。

陽性試料で有意に存在率が高い OTU を調査するために、陽性および陰性試料間でウェルチの T 検定を行い、 P 値が 0.05 未満のとき統計的に有意とみなした。また、ベン図を用いて陽性試料で有意に存在率が高い OTU を養鶏場間で比較した。

C. jejuni 陽性試料で特徴的な OTU を探索するために陽性および陰性試料間で 4-2) と同様に LEfSe 解析を行った。また、ベン図を用いて陽性試料で特徴的な OTU を養鶏場間で比較した。

3. 成績

1) データの基本情報

塩基配列を決定した結果、計 18,930,423 本の配列が 196 検体の盲腸便試料から得られ、OTU は 3,696 個形成された。得られた OTU に対し 97%を閾値とした相同性検索を行った結果、OTU は 231 個の細菌分類群に割り当てられたが、そのうち 58 個は属レベルまで分類できなかった。また、*Campylobacter* に属する OTU は 7 個存在していた。第 1 章で行った Nested PCR で *C. jejuni* 遺伝子が検出された試料からは 16S rRNA 遺伝子増幅産物でも *Campylobacter* 遺伝子が検出され、その一致率は 84%であった。

配列情報から得た OTU 数を示す希薄化曲線において、抽出した配列本数 (25,000 本) で曲線は横軸に対して平行に近づいた (図 6)。また、Good's coverage はすべてのサンプルで 98.3%以上であった。

2) 週齢および飼料の種類による細菌叢の違い

OTU 数と Chao1 指数は、週齢の増加、および飼料の切り替えによって有意に増加した (図 7A、B)。同様に、Simpson 指数と Shannon 指数も週齢の増加および飼料の切り替えによって有意に増加した (図 7C、D)。存在率 2%以上の主要な構成細菌分類群のうち *f_Lachnospiraceae* ; *g_unclassified* は 1 週齢から 2 週齢および餌付けから後期の飼料への切り替えで存在率が低下したが (図 8)、その他の細菌分類群は週齢や飼料の種類による大きな違いは認められなかった。また、OTU の 90%以上は平均存在率が 0.05%未満であったことから、盲腸便細菌叢は主に存在率が低い OTU で構成されていることがわかった (図 9A)。一方で、存在率が高い OTU は、数は少ないものの、全体に占める割合は大きく、平均存在率 0.05%以上の OTU は構成細菌全体の 81.3%、平均存在率 0.01%以上の OTU は全体の 97.1%を占めていた (図 9B)。

Unweighted UniFrac 距離を用いた MDS 解析では、5~6 週齢の時期に収集した試料を示す点は互いに近い位置にプロットされ、95%確率楕円の半径は 1

～2 週齢および 3～4 週齢に収集した試料を示す確率楕円の半径よりも小さかった (図 10A)。同様に、仕上げの飼料を与えていた時期に収集した試料を示す点も互いに近い位置にプロットされ、95%確率楕円の半径は小さかった (図 10B)。また、1～2 週齢と 5～6 週齢、餌付けと仕上げの飼料を与えていた時期に収集した試料を示す点はそれぞれ離れた場所にプロットされ、95%確率楕円は重ならなかった (図 10A、B)。次に、週齢および飼料の種類ごとにデータを分けて MDS 解析を行った結果、3～4 週齢、5～6 週齢、および仕上げの飼料を与えている時期に収集した試料では、一部 95%確率楕円が重なる部分はあるものの、各試料でクラスターを形成し、養鶏場間の違いが認められた (図 11)。一方、wseighted UniFrac 距離を用いた MDS 解析では、週齢および飼料の種類ごとに描かれた 95%確率楕円は全て重なっていた (図 10C、D)。

週齢の変化 (1～2 週齢、3～4 週齢、および 5～6 週齢) により 244 個の OTU は存在率が有意に変化していた (図 12A)。また、飼料の種類により存在率が有意に変化した OTU は 386 個あり、そのうち 196 個は週齢の変化によっても存在率が有意に変化していた (図 12A)。これらの計 434 個の OTU について、平均存在率を調査した結果、半数以上の OTU は平均存在率が 0.05%未満であった (図 12B)。次に、週齢および飼料の種類により存在率が有意に変化した細菌分類群を調査したところ、f_ *Carnobacteriaceae* ; g_unclassified、

g_Lactobacillus、および *f_Ruminococcaceae* ; *g_Clostridium_V* は週齢でのみ存在率が有意に変化しており (図 13)、そのうち *f_Carnobacteriaceae* ; *g_unclassified* と *g_Lactobacillus* は週齢の増加とともに存在率も増加した。一方、10 個の細菌分類群が飼料の種類でのみ存在率が有意に変化していた (図 13)。そのうち、*g_Anaeroplasma* と *g_Enterococcus* は飼料の切り替えによって存在率が低下し、*g_Atopostipes*、*g_Brevibacterium*、*c_Clostridia* ; *o_unclassified*; *f_unclassified*; *g_unclassified* 、 *g_Intestinimonas* 、 *g_Ruminococcus*、および *f_Syntrophomonadaceae* ; *g_unclassified* は飼料の切り替えによって存在率が増加していた。*g_Campylobacter* を含む 31 個の細菌分類群は週齢および飼料の種類の変化の両方で存在率が有意に変化していた。

3) 養鶏場および国による細菌叢の違い

OTU 数と Chao1 指数は九州 B が他の養鶏場よりも有意に高かったが、Simpson 指数と Shannon 指数は九州 B と他の養鶏場の間で有意な差は認められなかった (図 14)。また、東北よりも九州 A の OTU 数は有意に多かったが、多様性指数では有意な差が認められなかった (図 14)。存在率 2%以上の主要な構成細菌分類群はベトナムとタイで *f_Lachnospiraceae*; *g_unclassified* の存

在率が高く、g_ *Lactobacillus* の存在率が低いようであった (図 15)。その他の細菌分類群は養鶏場間で大きな違いは認められなかった (図 15)。

Unweighted UniFrac 距離を用いた養鶏場ごとの MDS 解析では、東北と九州 B を示す 95%確率楕円の大部分が重なっていた (図 16A)。また、その他の試料は各養鶏場ごとにクラスターを形成したが、95%確率楕円の一部は重なっていた (図 16A)。Weighted UniFrac 距離を用いた養鶏場ごとの MDS 解析では東北とタイの試料は離れた位置にプロットされたが、その他の養鶏場を示す 95%確率楕円は全て重なっていた (図 16B)。

日本、ベトナム、およびタイの試料を用いて行った LEfSe 解析ではベトナムで 5 個、タイで 8 個の OTU が各国の特徴的な OTU として確認された (図 17)。一方、日本に特徴的な OTU は確認できなかった (図 17)。

4) *C. jejuni* の有無による細菌叢の違い

国内で 5~6 週齢の時期に収集した試料について、養鶏場ごとに *C. jejuni* 陽性および陰性試料間で α 多様性を比較した結果、有意な差は認められなかった。また、図 18 で示すように、日本の試料で *C. jejuni* 陽性および陰性試料間で α 多様性を比較しても、その違いは認められなかった。ベトナムで収集した試料では Simpson 指数と Shannon 指数が陽性試料で陰性試料よりも有意に高かった

が (図 18C、D)、OTU 数と Chao1 指数では有意な差は認められなかった (図 18A、B)。

C. jejuni 陽性試料の半数以上に存在し、陰性試料には存在しなかった OTU は、*g_Campylobacter* に属する OTU を除き、東北、九州 A、および九州 B でそれぞれ 2 個、6 個、および 1 個確認されたが、それらは養鶏場間で共通しなかった (表 8)。また、ベトナムで収集した試料のうち、陽性試料の半数以上に存在し、陰性試料には存在しなかった OTU は *Campylobacter* に属する OTU を除き 1140 個確認された。

C. jejuni 陽性試料で有意に存在率が高い OTU は、*g_Campylobacter* に属する OTU を除き、東北、九州 A、九州 B、およびベトナムでそれぞれ 12 個、63 個、20 個、および 134 個確認され、上記の 4 養鶏場で共通の OTU は存在しなかった (図 19A)。また、上記のうち 55 個の OTU は養鶏場によっては陰性試料で有意に存在率が高かった。

C. jejuni 陽性試料で特徴的な OTU を LEfSe 解析により調査した結果、*g_Campylobacter* に属する OTU を除き、東北、九州 A、九州 B、およびベトナムでそれぞれ 1 個、19 個、7 個、および 42 個の OTU が確認されたが、上記の 4 養鶏場で共通する OTU は認められなかった (図 19B)。また、上記のうち 3 個は、養鶏場によっては陰性試料に特徴的な OTU として検出された。

4. 考察

本研究では商業用に飼育されたニワトリを研究対象としているため、盲腸内細菌叢を調査するために屠殺し、盲腸を試料として使用することは難しい。そこで著者は、多様性、豊富さ、および構成細菌の組成が盲腸の細菌叢と非常に類似していることが過去に示された盲腸便に対し細菌叢解析を行った (66)。本研究で得られた成績では、盲腸便の主要な構成細菌は実験用に飼育されたニワトリに関する以前の報告と一致しており (66)、f_*Lachnospiraceae* ; g_unclassified 、 g_*Lactobacillus* 、 および f_*Ruminococcaceae* ; g_unclassified が主要な構成細菌であったことから (図 8、15)、本研究で解析した盲腸便の細菌叢においてもニワトリ盲腸内細菌叢の特徴を反映していたと考えられた。本章の 16S rRNA 遺伝子領域を標的とした細菌叢解析では属レベルで細菌分類群の推定を行なったため、*C. jejuni*/*C. coli*の区別はつかなかった。また、第 1 章の Nested PCR よりも *Campylobacter* 遺伝子の検出率が低かったことから、*C. jejuni*/*C. coli*陽性および陰性試料間で比較を行う際は Nested PCR の成績を使用した方が良いと考えられた。

ニワトリの盲腸の細菌叢に関するこれまでの報告は実験用に飼育されたニワトリによるものが多いため、まずは、本研究で用いた商業用のニワトリの盲腸便細菌叢を明らかにすることを目的とし調査を行なった。その結果、実験用のニワ

トリでの報告と一致して (67-70)、商業用のニワトリも週齢が上がるにつれて盲腸便細菌叢の多様性は増加していた (図 7)。一方で、飼料の切り替えでも盲腸便細菌叢の多様性は増加したが (図 7)、飼料はニワトリの成長に応じて切り替えられたため、飼料の種類だけではなく週齢の影響も受けて多様性が増加したと考えられた。Unweighted UniFrac 距離の MDS 解析では、週齢の増加および飼料の切り替えに応じて構成細菌の種類が試料間で類似する、すなわち個体差が小さくなることが示された (図 10A、B)。これは実験用のニワトリでの週齢に関する研究と同様の成績であり (55, 71)、多様性が増加することで盲腸便細菌叢が安定化し、ニワトリ間での差が小さくなったと思われた。一方、weighted UniFrac 距離の MDS 解析では、週齢や飼料の種類の違いによる構成細菌の違いは認められなかった (図 10C、D)。Weighted UniFrac 距離では、存在量の少ない要素が UniFrac 距離に与える影響は小さくなることが示されている (72)。したがって、weighted UniFrac 距離の MDS 解析では、存在率が高い OTU の影響を受けたため、組成に変化が認められなかったと思われた。つまり、存在率が高い構成細菌の組成は大きく変化しないことが示された。そこで、各 OTU の平均存在率ごとの出現頻度を調べると、盲腸便細菌叢の大部分が存在率の低い OTU で占められていた (図 9A)。これらの成績より、ニワトリ盲腸便細菌叢は週齢や飼料の種類の変化により存在率の低い細菌が影響を受け、

組成が変化することが示された。したがって、ニワトリ盲腸便細菌叢の変化を調査する際には存在率の低い細菌にも着目する必要があると考えられた。

次に、週齢や飼料の種類の影響を受けて存在率が変化した OTU を ANOVA により調査した。まず、有意に存在率が変化した OTU の平均存在率を確認したところ、半数以上が平均存在率 0.05%以下と低かった。したがって、存在率の低い細菌により盲腸便細菌叢が変化したことが再確認された (図 12B)。飼料はニワトリの成長に応じて切り替えられたため、盲腸便細菌叢の変化を週齢と飼料の種類で区別して評価することは困難である。しかし、飼料の種類でのみ存在率が変化した OTU 数の方が週齢の変化でのみ存在率が変化した OTU 数よりも多かったことから (図 12A)、飼料の種類が盲腸便細菌叢に与える影響は大きいと思われた。飼料の種類で存在率が変化した細菌分類群の 1 つとして *g_Enterococcus* が挙げられ (図 13)、飼料の切り替えに応じて存在率が低下した。ニワトリに日和見感染を起こす病原細菌として *Enterococcus faecium* および *Enterococcus faecalis* が知られており、これらの薬剤耐性菌の存在が深刻な問題となっている (73, 74)。さらに、近年 *Enterococcus cecorum* のニワトリへの感染による経済的損失も問題となっている (75)。本研究の成績は飼料の切り替えと *g_Enterococcus* の因果関係を示すものではないが、飼料の切り替えに応じて多様性の増加と盲腸便細菌叢の安定化が進み、その結果

g_Enterococcus の存在率が減少したのであれば、*Enterococcus* の対策に飼料の切り替え時機の調整が利用できる可能性がある。一方、週齢により存在率が変化した細菌分類群としては *g_Lactobacillus* が挙げられ (図 13)、存在率は週齢に応じて増加したが、これは実験用に飼育されたニワトリでの成績と一致しなかった (76, 77)。本研究で用いた商業用のニワトリでは、プロバイオティクスとして *Lactobacillus* が与えられたため、異なる成績が得られたと思われる。また、*g_Campylobacter* は週齢と飼料の種類、およびその両方の影響を受けているようであった (図 13)。飼料の種類の切り替えと *C. jejuni* の定着に関係があることは、実験的に飼育されたニワトリで最近報告されており (69)、本研究で初めて商業用のニワトリでも関連が認められた。

以前の研究で、飼育場所により盲腸内細菌叢の組成が異なることが実験用のニワトリと商業用のニワトリの両方で示されたが (78, 79)、図 10 で示すように、1~6 週齢の試料を用いた MDS 解析では養鶏場による構成細菌の違いは認められなかった。一方で、週齢や飼料の種類ごとに MDS 解析を行うと、養鶏場間の違いが明瞭になった (図 11)。以上より、週齢や飼料の種類が盲腸内細菌叢に与える影響が大きいため、異なる週齢、あるいは飼料を与えたニワトリを用いて細菌叢を比較すると養鶏場の違いを確認することが困難になると思われる。実験用のニワトリでのこれまでの報告は週齢、飼料、あるいは飼育場所の違いに

より細菌叢が受ける影響を別々に比較するものであり(55, 69, 71, 78, 79)、それらの因子の関係性を総合的に示すものではなかった。したがって、飼育場所の違いによる細菌叢の変化よりも週齢や飼料による変化の方が大きいことが本研究で初めて示された。

日本の試料で養鶏場の違いが明確に現れた 5~6 週齢のニワトリ盲腸便試料と、タイおよびベトナムで収集した同様の試料とを比較したところ、それらの構成細菌の組成は国ごとに異なる傾向が認められた (図 16A)。しかし、LEfSe 解析で日本に特徴的な OTU 存在はしなかったことから (図 17)、国によってニワトリ盲腸便細菌叢は異なるが、その違いは大きいとは言えなかった。ベトナムの試料で特徴的だとされた *g_Collinsella* は主にヒト腸内に存在する細菌であり (80)、飼育員からニワトリへ伝播した可能性がある。ヒト腸内からニワトリへの細菌の伝播についてはこれまでに調査がなされていないため、今後、ヒトとニワトリの腸内細菌叢の変化を関連づけて解析することは興味深い事柄である。特に、その存在が未だ明確にされていない *C. jejuni/C. coli* 無症状保菌者の割合についても調査し、*C. jejuni/C. coli* がヒトからニワトリへ伝播する可能性も含めて汚染源を特定する必要があると考えられた。

以上より、整えられた環境下で飼育される実験用のニワトリとは異なり、商業用のニワトリは週齢の変化だけではなく、飼料の種類や養鶏場、国の違い等、

様々な要因の影響を受け、盲腸便細菌叢が変化すると考えられた。したがって、*C. jejuni* 陽性および陰性試料間で比較を行う際には日齢や飼料の種類、地理的条件を統一する、あるいは個体差が小さいとされた 5~6 週齢もしくは仕上げの飼料を与えている時期に収集した試料を用いる必要があると思われた。上記の成績をふまえて *C. jejuni* 陽性および陰性試料間で盲腸便細菌叢を比較したところ、実験用に飼育されたニワトリでの成績と一致して (70)、ベトナムでは陰性試料よりも陽性試料の多様性が有意に高かった (図 18)。しかし、日本では陽性および陰性試料間で多様性の違いは認められなかったため、この傾向は普遍的ではないと思われた。また、*C. jejuni* 陽性試料のみに存在する OTU は日本の養鶏場でほとんど確認できなかったことから (表 8)、*C. jejuni* による汚染が盲腸便細菌叢の変化に及ぼす影響は小さいと思われた。一方で、ベトナムの *C. jejuni* 陽性試料のみに存在する OTU 数は多かったが、*C. jejuni* 陽性および陰性鶏群で 1 週齢以上の差があるため、得られた成績は週齢による影響を受けたと思われた。

C. jejuni 陽性試料で有意に存在率が高い、あるいは陽性試料で特徴的な OTU を調査した結果、いくつかの OTU が確認されたものの、それらは養鶏場間で共通しなかった (図 19)。さらに、陽性試料で有意に存在率が高い、あるいは特徴的だとされたにも拘らず、他の養鶏場では陰性試料で有意に存在率が高い、ある

いは特徴的だとされた OTU も存在し、養鶏場間で相反する成績が得られた。以上のように、*C. jejuni* 陽性および陰性試料のそれぞれを特徴付ける OTU は確認できなかったことから、汚染源が複数存在する、*C. jejuni* と共にニワトリを汚染した細菌は腸内に定着せず排除された、あるいは汚染源の細菌叢とニワトリの盲腸便細菌叢が類似している可能性が示された。汚染源が複数存在するため共通する変化が認められなかった場合は、より多くの鶏群から試料を収集して陽性試料間で比較し、共通の汚染源を持つ鶏群を探索することで汚染源を特定できる可能性がある。一方で、同時に汚染した細菌の中で *C. jejuni* のみがニワトリ腸内に定着できた場合、汚染源から *C. jejuni* を含む複数の細菌がニワトリを汚染した後、*C. jejuni* 以外の細菌が排除されることで徐々に元の組成に戻ったと考えられる。したがって、*C. jejuni* のニワトリへの定着能に関する調査、および汚染が起きた直前と直後の日齢での構成細菌の比較が必要だと思われた。また、汚染源の細菌叢とニワトリの盲腸便細菌叢が類似しているため陽性および陰性試料間で違いが認められなかった場合は、血清型や遺伝子型を用いて汚染源の候補とニワトリ間での細菌の伝播について更に調査をする必要があると思われた。本研究で *C. jejuni*/*C. coli* のニワトリへの定着能、または汚染源の細菌叢に関する予測を提示したことは、今後の汚染源特定に大いに貢献するものと期待される。

5. 要約

第1章と第2章で *C. jejuni*/*C. coli* の主要な汚染源を特定するには至らなかったため、第3章では第1章で収集した盲腸便試料を使用し、*C. jejuni* 陽性試料に共通して存在する細菌を検出し、それらの由来から、汚染源の特定を試みた。また、商業用のニワトリの盲腸便細菌叢を明らかにすることも目的とし調査を行なった。その結果、存在率の高い細菌は週齢や飼料の種類が変化しても大きく変化せず、存在率の低い細菌が変動していた。また、週齢の増加や飼料の切り替えによって細菌叢の多様性は高くなり、構成細菌の種類は試料間で類似する、すなわち、個体差は小さくなるようであった。さらに、週齢の変化や飼料の種類の切り替えよりも影響は小さいものの、養鶏場や国の違いも盲腸便細菌叢に影響を与えていた。以上より、整えられた環境下で飼育される実験用のニワトリとは異なり、商業用のニワトリは週齢だけではなく、飼料の種類や養鶏場、国の違い等の様々な影響を受け、盲腸便細菌叢が変化すると考えられた。次に、*C. jejuni* 陽性および陰性試料間で盲腸便細菌叢を比較したが違いは確認できなかった。陽性および陰性試料間で違いが確認できない理由としては、汚染源が複数存在する、*C. jejuni* と共にニワトリを汚染した細菌は腸内に定着せず排除された、あるいは汚染源の細菌叢とニワトリの盲腸便細菌叢が類似している可能性が示された。

総括

本研究は *Campylobacter* 食中毒の主な原因細菌である *C. jejuni*/*C. coli* の主要な汚染源を推定することで、ニワトリへの *C. jejuni*/*C. coli* 汚染を防止することを目的として行なった。第 1 章では汚染および非汚染養鶏場の相違点を調査することで、汚染源の推定を試みた。その結果、養鶏場を汚染あるいは非汚染養鶏場として区別することはできず、飼育と出荷の時機が異なる鶏群ごとに汚染の有無は異なることが示された。また、清掃後の鶏舎からは *C. jejuni*/*C. coli* 遺伝子が検出されなかったことから、*C. jejuni*/*C. coli* は鶏舎の適切な清掃と消毒により排除され、鶏舎内に残存し続ける *C. jejuni*/*C. coli* が汚染源になるというよりもむしろ、毎回新たに汚染が起こると思われた。さらに、*C. jejuni*/*C. coli* による鶏舎の汚染時期は不定期であること、消毒後の長靴底から *C. jejuni*/*C. coli* が検出されたことから、鶏舎に頻繁に出入りする飼育員の長靴を介して汚染が起こる可能性が示された。ただし、*C. jejuni*/*C. coli* 遺伝子が検出されなかった鶏舎内使用の長靴もあったことから、確実な消毒により長靴からも *C. jejuni*/*C. coli* は排除可能であり、汚染を制御できると考えられた。また、1 週齢のニワトリからも *C. jejuni* 遺伝子が検出されたため、それらのニワトリは鶏舎に導入された後だけではなく、導入前に汚染された可能性もあると思われた。したがって、孵卵場の職員や環境からの汚染についても今後調査する

必要があると思われた。次に、鶏舎外での *C. jejuni*/*C. coli* 汚染調査を行なったところ、排水溝から *C. jejuni* 遺伝子が検出されたため、鶏舎からの排水が汚染源となり得ることが示された。

第2章で野生動物での *C. jejuni*/*C. coli* 汚染調査を行なった結果、アライグマ、シカ、およびイノシシの糞便から *C. jejuni*/*C. coli* 遺伝子が検出されたことから、上記の野生動物が汚染源の候補だと考えられた。一方で、アライグマ、シカ、およびイノシシは生息域に偏りがあるため、これらが日本における共通の汚染源とは考えにくかった。また、どのような動物種が養鶏場敷地内に侵入したのかを赤外線カメラを用いて確認したところ、複数の動物種が鶏舎の間近まで侵入していたため、それらの動物の糞便を踏むことで長靴が汚染される可能性が示された。野生動物は *C. jejuni*/*C. coli* だけではなく *Salmonella* 等その他の病原微生物を複数持っている可能性があるため十分な注意が必要だと言える。

第3章では *C. jejuni*/*C. coli* による汚染が起こる際、汚染源で共存するその他の細菌も共にニワトリを汚染し、腸管内に定着すると考え、*C. jejuni*/*C. coli* の共存細菌を推定し、その由来から汚染源を特定することを試みた。また、細菌叢に関する報告は実験用に飼育されたニワトリによるものが多いため、商業用のニワトリの盲腸便細菌叢の特徴を調査することも目的とした。細菌叢の組成を調べた結果、ニワトリの成育や飼料の切替えに伴って、存在率の高い細菌は変

動せず、存在率の低い細菌が変動したため、ニワトリ盲腸便細菌叢の変化を調査する際には存在率の低い細菌に着目する必要があると考えられた。また、整えられた環境下で飼育される実験用のニワトリとは異なり、商業用のニワトリは飼料の種類や養鶏場、国の違い等、様々な要因からの影響を受け、盲腸便細菌叢が変化することが示された。一方で、*C. jejuni* 陽性および陰性試料間での盲腸便細菌叢の違いは確認できなかった。したがって、汚染源が複数存在する、*C. jejuni* と共にニワトリを汚染した細菌は腸管内に定着しない、あるいは、汚染源の細菌叢とニワトリの盲腸便細菌叢が類似していたため、陽性および陰性試料間で細菌組成に違いが認められなかったと思われた。また、ベトナムで収集した試料でヒト腸内からニワトリへ伝播した可能性のある細菌が確認できたことから、今後、ヒトの腸内細菌叢との関連、特に *C. jejuni*/*C. coli* 無症状保菌者の割合についても調査し、*C. jejuni*/*C. coli* がヒト腸内からニワトリへ伝播する可能性も含めて解析する必要があると考えられた。

本研究で *C. jejuni*/*C. coli* の動態を明らかにしたことで、長靴の消毒法の見直しをする等、鶏舎に *C. jejuni*/*C. coli* を持ち込まないための対策を講じることで、ニワトリへの *C. jejuni*/*C. coli* 汚染を防止できる可能性が示唆された。さらに、養鶏場の鶏舎に導入する前のニワトリと接触する孵卵場の環境や職員からの伝播の可能性が疑われたこと、ヒトからニワトリへ細菌が伝播したと思わ

れる成績が得られたことから、今後はワンヘルスの概念から養鶏場や、野生動物、環境だけではなく、例えば人が保有する細菌についても調査を行うことで *C. jejuni*/*C. coli* の汚染源を特定できる可能性がある。

謝辞

本論文を終わるにあたり、御校閲を賜りました東京大学大学院農学生命科学研究科 平山和宏教授、角田茂准教授、三浦こずえ准教授、大阪府立大学大学院生命環境科学研究科 山崎伸二教授に深甚の謝意を表します。

本研究の実施にあたって、ご指導、ご協力をいただいた東京大学大学院農学生命科学研究科 関崎勉教授、宮下直教授、仁田義弘特任助教、日本学術振興会特別研究員 黒木香澄博士、日本大学歯学部基礎自然科学分野（化学）渡辺孝康助教には心より感謝いたします。また、試料の収集に協力してくださったノンラム大学 Ngọc Hải Nguyễn 先生、カセサート大学の Nattakan Meekhanon 先生、およびサンプルを分与してくださった鹿児島大学共同獣医学部獣医公衆衛生学教室 中馬猛久教授、山口大学共同獣医学部獣医微生物学教室 前田健教授（現：国立感染症研究所獣医科学部 部長）、ふるさと自然公園センター 鈴木和男先生には御礼を申し上げます。また、試料の収集に協力してくださった北海道、東北、関東、および九州の養鶏場の皆様には心より感謝いたします。本研究の遂行を通

じて様々な点でご協力いただきました、東京大学大学院農学生命科学研究科食
の安全研究センター食品病原微生物学研究室の皆様には感謝いたします。

文献

1. 厚生労働省「令和元年（2019年）食中毒発生事例（速報）」
(https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou_iryou/shokuhin/syokuchu/04.html)（2020/03/10閲覧）.
2. Nachamkin I, Allos BM, Ho T. 1998. *Campylobacter* species and Guillain-Barré syndrome. Clin Microbiol Rev 11:555–67.
3. Melero B, Juntunen P, Hänninen ML, Jaime I, Rovira J. 2012. Tracing *Campylobacter jejuni* strains along the poultry meat production chain from farm to retail by pulsed-field gel electrophoresis, and the antimicrobial resistance of isolates. Food Microbiol 32:124–128.
4. Doyle MP, Erickson MC. 2006. Reducing the carriage of foodborne pathogens in livestock and poultry. Poult Sci 85:960–973.
5. Newell DG, Fearnley C. 2003. Sources of *Campylobacter* colonization in broiler chickens. Appl Environ Microbiol 69:4343–4351.
6. Sasaki Y, Tsujiyama Y, Tanaka H, Yoshida S, Goshima T, Oshima K, Katayama S, Yamada Y. 2011. Risk factors for *Campylobacter*

- colonization in broiler flocks in Japan. *Zoonoses Public Health* 58:350–356.
7. Agunos A, Waddell L, Léger D, Taboada E. 2014. A systematic review characterizing on-farm sources of *Campylobacter* spp. for broiler chickens. *PLoS One* 9:e104905.
 8. Jorgensen F, Ellis-Iversen J, Rushton S, Bull SA, Harris SA, Bryan SJ, Gonzalez A, Humphrey TJ. 2011. Influence of season and geography on *Campylobacter jejuni* and *C. coli* subtypes in housed broiler flocks reared in Great Britain. *Appl Environ Microbiol* 77:3741–3748.
 9. Djennad A, Lo Iacono G, Sarran C, Lane C, Elson R, Höser C, Lake IR, Colón-González FJ, Kovats S, Semenza JC, Bailey TC, Kessel A, Fleming LE, Nichols GL. 2019. Seasonality and the effects of weather on *Campylobacter* infections. *BMC Infect Dis* 19:1–10.
 10. Royden A, Wedley A, Merga JY, Rushton S, Hald B, Humphrey T, Williams NJ. 2016. A role for flies (Diptera) in the transmission of *Campylobacter* to broilers? *Epidemiol Infect* 144:3326–3334.

11. Prince Milton AA, Agarwal RK, Priya GB, Saminathan M, Aravind M, Reddy A, Athira CK, Anjay, Ramees TP, Dhama K, Sharma AK, Kumar A. 2017. Prevalence of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in captive wildlife species in India. Iran J Vet Res 18:177–182.
12. Haruna M, Sasaki Y, Murakami M, Ikeda A, Kusukawa M, Tsujiyama Y, Ito K, Asai T, Yamada Y. 2012. Prevalence and antimicrobial susceptibility of *Campylobacter* in broiler flocks in Japan. Zoonoses Public Health 59:241–245.
13. Yamazaki W, Uemura R, Sekiguchi S, Dong JB, Watanabe S, Kirino Y, Mekata H, Nonaka N, Norimine J, Sueyoshi M, Goto Y, Horii Y, Kurogi M, Yoshino S, Misawa N. 2016. *Campylobacter* and *Salmonella* are prevalent in broiler farms in Kyushu, Japan: Results of a 2-year distribution and circulation dynamics audit. J Appl Microbiol 120:1711–1722.
14. Powell LF, Lawes JR, Clifton-Hadley FA, Rodgers J, Harris K, Evans SJ. 2012. The prevalence of *Campylobacter* spp. in broiler flocks

- and on broiler carcasses, and the risks associated with highly contaminated carcasses. *Epidemiol Infect* 140:2233–2246.
15. Perez-Arnedo I, Gonzalez-Fandos E. 2019. Prevalence of *Campylobacter* spp. in poultry in three Spanish farms, a slaughterhouse and a further processing plant. *Foods* 8:111.
 16. Skarp CP, Hänninen ML, Rautelin HI. 2016. Campylobacteriosis: The role of poultry meat. *Clin Microbiol Infect* 22:103–109.
 17. Eng SK, Pusparajah P, Ab Mutalib NS, Ser HL, Chan KG, Lee LH. 2015. *Salmonella*: A review on pathogenesis, epidemiology and antibiotic resistance. *Front Life Sci* 8:284–293.
 18. Vetchapitak T, Misawa N. 2019. Current status of *Campylobacter* food poisoning in Japan. *Food Saf* 7:61–73.
 19. 農林水産省「農林水産物輸出入概況（2018年）」
(http://www.maff.go.jp/j/tokei/kouhyou/kokusai/houkoku_gaikyo_u.html#r29) (2020/03/10閲覧).
 20. Prabakaran R. 2003. Good practices in planning and management of integrated commercial poultry production in South Asia. Food & Agriculture Org.

21. Van De Giessen AW, Tilburg JJ, Ritmeester WS, Van Der Plas J. 1998. Reduction of *Campylobacter* infections in broiler flocks by application of hygiene measures. *Epidemiol Infect* 121:57–66.
22. Li L, Mendis N, Trigui H, Oliver JD, Faucher SP. 2014. The importance of the viable but non-culturable state in human bacterial pathogens. *Front Microbiol* 5:1–1.
23. Ramamurthy T, Ghosh A, Pazhani GP, Shinoda S. 2014. Current perspectives on viable but non-culturable (VBNC) pathogenic bacteria. *Front public Heal* 2:1–9.
24. Battersby T, Whyte P, Bolton DJ. 2016. The pattern of *Campylobacter* contamination on broiler farms; external and internal sources. *J Appl Microbiol* 120:1108–1118.
25. Evans SJ, Sayers AR. 2000. A longitudinal study of *Campylobacter* infection of broiler flocks in Great Britain. *Prev Vet Med* 46:209–223.
26. Arai S, Kim H, Watanabe T, Tohya M, Suzuki E, Ishida-Kuroki K, Maruyama F, Murase K, Nakagawa I, Sekizaki T. 2018. Assessment of pig saliva as a *Streptococcus suis* reservoir and potential source

- of infection on farms by use of a novel quantitative polymerase chain reaction assay. *Am J Vet Res* 79:941–948.
27. Inglis GD, Kalischuk LD. 2003. Use of PCR for direct detection of *Campylobacter* species in bovine feces. *Appl Environ Microbiol* 69:3435–3447.
 28. Shreeve JE, Toszeghy M, Ridley A, Newell DG. 2002. The carry-over of *Campylobacter* isolates between sequential poultry flocks. *Avian Dis* 46:378–385.
 29. Gregory E, Barnhart H, Dreesen DW, Stern NJ, Corn JL. 1997. Epidemiological study of *Campylobacter* spp. in broilers: source, time of colonization, and prevalence. *Avian Dis* 41:890–898.
 30. Han Z, Pielsticker C, Gerzova L, Rychlik I, Rautenschlein S. 2016. The influence of age on *Campylobacter jejuni* infection in chicken. *Dev Comp Immunol* 62:58–71.
 31. Callicott KA, Frioriksdóttir V, Reiersen J, Lowman R, Bisailon JR, Gunnarsson E, Berndtson E, Hiett KL, Needleman DS, Stern NJ. 2006. Lack of evidence for vertical transmission of *Campylobacter* spp. in chickens. *Appl Environ Microbiol* 72:5794–5798.

32. Cox NA, Richardson LJ, Maurer JJ, Berrang ME, Fedorka-CRAY PJ, Buhr RJ, Byrd JA, Lee MD, Hofacre CL, O'kane PM, Lammerding AM, Clark AG, Thayer SG, Doyle MP. 2012. Evidence for horizontal and vertical transmission in *Campylobacter* passage from hen to her progeny. J Food Prot 75:1896–1902.
33. Zhang X, Yin T, Du X, Yang W, Huang J, Jiao X. 2017. Occurrence and genotypes of *Campylobacter* species in broilers during the rearing period. Avian Pathol 46:215–223.
34. Hald B, Skovgård H, Pedersen K, Bunkenborg H. 2008. Influxed insects as vectors for *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in Danish broiler houses. Poult Sci 87:1428–1434.
35. Ellis-Iversen J, Ridley A, Morris V, Sowa A, Harris J, Atterbury R, Sparks N, Allen V. 2012. Persistent environmental reservoirs on farms as risk factors for *Campylobacter* in commercial poultry. Epidemiol Infect 140:916–924.
36. Svedhem A, Kaijser B. 1981. Isolation of *Campylobacter jejuni* from domestic animals and pets: probable origin of human infection. J Infect 3:37–40.

37. Moore JE, Corcoran D, Dooley JSG, Fanning S, Lucey B, Matsuda M, McDowell DA, Megraud F, Cherie Millar B, O'Mahony R, O'Riordan L, O'Rourke M, Rao JR, Rooney PJ, Sails A, Whyte P. 2005. *Campylobacter*. Vet Res 36:351–382.
38. Carbonero A, Paniagua J, Torralbo A, Arenas-Montes A, Borge C, García-Bocanegra I. 2014. *Campylobacter* infection in wild artiodactyl species from southern Spain: Occurrence, risk factors and antimicrobial susceptibility. Comp Immunol Microbiol Infect Dis 37:115–121.
39. Matsusaki S, Katayama A, Itagaki K, Yamagata H, Tanaka K, Yamami T, Uchida W. 1986. Prevalence of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* among wild and domestic animals in Yamaguchi prefecture. Microbiol Immunol 30:1317–1322.
40. Sasaki Y, Goshima T, Mori T, Murakami M, Haruna M, Ito K, Yamada Y. 2013. Prevalence and antimicrobial susceptibility of foodborne bacteria in wild boars (*Sus scrofa*) and wild deer (*Cervus nippon*) in Japan. Foodborne Pathog Dis 10:985–991.

41. 環境省「アライグマ、ハクビシン、ヌートリアの生息分布調査の結果について」 (<https://www.env.go.jp/press/105902.html>) (2020/03/10 閲覧).
42. Saunders S, Smith K, Schott R, Dobbins G, Scheftel J. 2017. Outbreak of *Campylobacteriosis* associated with raccoon contact at a wildlife rehabilitation centre, Minnesota, 2013. *Zoonoses Public Health* 64:222–227.
43. 環境省 「全国のニホンジカ及びイノシシの生息分布拡大状況調査」 (<https://www.env.go.jp/press/100922.html>) (2020/03/10 閲覧).
44. Yamazaki W, Sabike II, Sekiguchi S. 2017. High prevalence of *Campylobacter* in broiler flocks is a crucial factor for frequency of food poisoning in humans. *Jpn J Infect Dis* 70:691–692.
45. 山口県 「やまぐち高度衛生管理農場認定制度について」 (<https://www.pref.yamaguchi.lg.jp/cms/a17600/150322/20160322.html>) (2020/03/10 閲覧).
46. Cantlay JC, Ingram DJ, Meredith AL. 2017. A review of zoonotic infection risks associated with the wild meat trade in Malaysia. *Ecohealth* 14:361–388.

47. Petersen L, Nielsen EM, Engberg J, On SLW, Dietz HH. 2001. Comparison of genotypes and serotypes of *Campylobacter jejuni* isolated from Danish wild mammals and birds and from broiler flocks and humans. *Appl Environ Microbiol* 67:3115–3121.
48. Okamura M, Kaneko M, Ojima S, Sano H, Shindo J, Shirafuji H, Yamamoto S, Tanabe T, Yoshikawa Y, Hu D-L. 2018. Differential distribution of *Salmonella* serovars and *Campylobacter* spp. isolates in free-living crows and broiler chickens in Aomori, Japan. *Microbes Environ* 33:77–82.
49. Browne HP, Neville BA, Forster SC, Lawley TD. 2017. Transmission of the gut microbiota: spreading of health. *Nat Rev Microbiol* 15:531–543.
50. Han Z, Willer T, Li L, Pielsticker C, Rychlik I, Velge P, Kaspers B, Rautenschlein S. 2017. Influence of the gut microbiota composition on *Campylobacter jejuni* colonization in chicken. *Infect Immun* 85:1–15.
51. Bjerrum L, Engberg RM, Leser TD, Jensen BB, Finster K, Pedersen K. 2006. Microbial community composition of the ileum and cecum

- of broiler chickens as revealed by molecular and culture-based techniques. *Poult Sci* 85:1151–1164.
52. Yeoman CJ, Chia N, Jeraldo P, Sipos M, Goldenfeld ND, White BA. 2012. The microbiome of the chicken gastrointestinal tract. *Anim Heal Res Rev* 13:89–99.
53. Oakley BB, Lillehoj HS, Kogut MH, Kim WK, Maurer JJ, Pedroso A, Lee MD, Collett SR, Johnson TJ, Cox NA. 2014. The chicken gastrointestinal microbiome. *FEMS Microbiol Lett* 360:100–112.
54. Scupham AJ, Jones JA, Rettedal EA, Weber TE. 2010. Antibiotic manipulation of intestinal microbiota to identify microbes associated with *Campylobacter jejuni* exclusion in poultry. *PLoS One* 5:e12345. doi:10.1371/journal.pone.0123456
55. Thomas M, Wongkuna S, Ghimire S, Kumar R, Antony L, Doerner KC, Singery A, Nelson E, Woyengo T, Chankhamhaengdecha S, Janvilisri T, Scaria J. 2019. Gut microbial dynamics during conventionalization of germfree chicken. *mSphere* 4:1–12.
56. Park SH, Lee SI, Kim SA, Christensen K, Ricke SC. 2017. Comparison of antibiotic supplementation versus a yeast-based

- prebiotic on the cecal microbiome of commercial broilers. *PLoS One* 12:e0182805.
57. Johnson TJ, Youmans BP, Noll S, Cardona C, Evans NP, Karnezos TP, Ngunjiri JM, Abundo MC, Lee C-W. 2018. A consistent and predictable commercial broiler chicken bacterial microbiota in antibiotic-free production displays strong correlations with performance. *Appl Environ Microbiol* 84:e00362-18.
 58. Klindworth A, Pruesse E, Schweer T, Peplies J, Quast C, Horn M, Glöckner FO. 2013. Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Res* 41:e1.
 59. Jeraldo P, Kalari K, Chen X, Bhavsar J, Mangalam A, White B, Nelson H, Kocher J-P, Chia N. 2014. IM-TORNADO: A tool for comparison of 16S reads from paired-end libraries. *PLoS One* 9:e114804.
 60. Schloss PD, Westcott SL, Ryabin T, Hall JR, Hartmann M, Hollister EB, Lesniewski RA, Oakley BB, Parks DH, Robinson CJ, Sahl JW, Stres B, Thallinger GG, Van Horn DJ, Weber CF. 2009. Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-

- supported software for describing and comparing microbial communities. *Appl Environ Microbiol* 75:7537–7541.
61. Cole JR, Wang Q, Cardenas E, Fish J, Chai B, Farris RJ, Kulam-Syed-Mohideen AS, McGarrell DM, Marsh T, Garrity GM, Tiedje JM. 2009. The Ribosomal Database Project: improved alignments and new tools for rRNA analysis. *Nucleic Acids Res* 37:141–145.
62. Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, Bittinger K, Bushman FD, Costello EK, Fierer N, Peña AG, Goodrich JK, Gordon JI, Huttley GA, Kelley ST, Knights D, Koenig JE, Ley RE, Lozupone CA, McDonald D, Muegge BD, Pirrung M, Reeder J, Sevinsky JR, Turnbaugh PJ, Walters WA, Widmann J, Yatsunenko T, Zaneveld J, Knight R. 2010. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data Intensity normalization improves color calling in SOLiD sequencing. *Nat Publ Gr* 7:335–336.
63. Ihaka R, Gentleman R. 1996. R: a language for data analysis and graphics. *J Comput Graph Stat* 5:299–314.

64. Lozupone CA, Knight R. 2005. UniFrac: a new phylogenetic method for comparing microbial communities. *Appl Environ Microbiol* 71:8228–8235.
65. Segata N, Izard J, Waldron L, Gevers D, Miropolsky L, Garrett WS, Huttenhower C. 2011. Metagenomic biomarker discovery and explanation. *Genome Biol* 12:R60.
66. Pauwels J, Taminiou B, Janssens GP, De Beenhouwer M, Delhalle L, Daube G, Coopman F. 2015. Cecal drop reflects the chickens' cecal microbiome, fecal drop does not. *J Microbiol Methods* 117:164–170.
67. Ocejo M, Oporto B, Hurtado A. 2019. 16S rRNA amplicon sequencing characterization of caecal microbiome composition of broilers and free-range slow-growing chickens throughout their productive lifespan. *Sci Rep* 9:1–14.
68. Danzeisen JL, Kim HB, Isaacson RE, Tu ZJ, Johnson TJ. 2011. Modulations of the chicken cecal microbiome and metagenome in response to anticoccidial and growth promoter treatment. *PLoS One* 6:e27949.

69. Ijaz UZ, Sivaloganathan L, McKenna A, Richmond A, Kelly C, Linton M, Stratakos AC, Lavery U, Elmi A, Wren BW, Dorrell N, Corcionivoschi N, Gundogdu O. 2018. Comprehensive longitudinal microbiome analysis of the chicken cecum reveals a shift from competitive to environmental drivers and a window of opportunity for *Campylobacter*. *Front Microbiol* 9:2452.
70. Awad WA, Mann E, Dzieciol M, Hess C, Schmitz-Esser S, Wagner M, Hess M. 2016. Age-related differences in the luminal and mucosa-associated gut microbiome of broiler chickens and shifts associated with *Campylobacter jejuni* infection. *Front Cell Infect Microbiol* 6:154.
71. Lu J, Idris U, Harmon B, Hofacre C, Maurer JJ, Lee MD. 2003. Diversity and succession of the intestinal bacterial community of the maturing broiler chicken. *Appl Environ Microbiol* 69:6816–6824.
72. Wong RG, Wu JR, Gloor GB. 2016. Expanding the UniFrac Toolbox. *PLoS One* 11:e0161196.

73. Giraffa G, Carminati D, Neviani E. 1997. Enterococci isolated from dairy products: A review of risks and potential technological use. *J Food Prot* 60:732–738.
74. Arias CA, Murray BE. 2012. The rise of the *Enterococcus*. Beyond vancomycin resistance. *Nat Rev Microbiol* 10:266–278.
75. Jung A, Chen LR, Suyemoto MM, Barnes HJ, Borst LB. 2018. A review of *Enterococcus cecorum* infection in poultry. *Avian Dis* 62:261–271.
76. Mohd Shaufi MA, Sieo CC, Chong CW, Gan HM, Ho YW. 2015. Deciphering chicken gut microbial dynamics based on high-throughput 16S rRNA metagenomics analyses. *Gut Pathog* 7:1–12.
77. Xi Y, Shuling N, Kunyuan T, Qiuyang Z, Hewen D, ChenCheng G, Tianhe Y, Liancheng L, Xin F. 2019. Characteristics of the intestinal flora of specific pathogen free chickens with age. *Microb Pathog* 132:325–334.
78. Zhou X, Jiang X, Yang C, Ma B, Lei C, Xu C, Zhang A, Yang X, Xiong Q, Zhang P, Men S, Xiang R, Wang H. 2016. Cecal microbiota of

Tibetan chickens from five geographic regions were determined by 16S rRNA sequencing. *Microbiologyopen* 5:753–762.

79. Pandit RJ, Hinsu AT, Patel N V., Koringa PG, Jakhesara SJ, Thakkar JR, Shah TM, Limon G, Psifidi A, Guitian J, Hume DA, Tomley FM, Rank DN, Raman M, Tirumurugaan KG, Blake DP, Joshi CG. 2018. Microbial diversity and community composition of caecal microbiota in commercial and indigenous Indian chickens determined using 16s rDNA amplicon sequencing. *Microbiome* 6:1–13.
80. Whitman WB, Goodfellow M, Kämpfer P, Busse H-J, Trujillo ME, Ludwig W, Suzuki K. 2012. *Bergey's manual of systematic bacteriology: Volume 5: The actinobacteria*. Springer Science & Business Media.

表1. 収集した昆虫等

養鶏場	昆虫等の一般名 (学名)	検体数
	オンブバッタ (<i>Atractomorpha lata</i>)	2
東北	ハラオカメコオロギ (<i>Loxoblemmus campestris</i>)	1
	ワラジムシ (<i>Porcellio scaber</i>)	2
	エンマコオロギ (<i>Teleogryllus emma</i>)	4
	オンブバッタ (<i>Atractomorpha lata</i>)	9
関東	コカマキリ (<i>Statilia maculata</i>)	2
	テントウムシの幼虫 (<i>Coccinella</i>)	1
	ハラオカメコオロギ (<i>Loxoblemmus campestris</i>)	3
	ヒゲジロハサミムシ (<i>Anisolabella marginalis</i>)	1
	エンマコオロギ (<i>Teleogryllus emma</i>)	2
	オンブバッタ (<i>Atractomorpha lata</i>)	1
	クルマバッタ (<i>Gastrimargus marmoratus</i>)	1
九州B	クルマバッタモドキ (<i>Oedaleus infernalis</i>)	1
	コバネイナゴ (<i>Oxya yezoensis</i>)	1
	シヨウリヨウバッタ (<i>Acrida cinerea</i>)	2
	トノサマバッタ (<i>Locusta migratoria</i>)	6

表2. *C. jejuni*/*C. coli* 遺伝子の検出に用いたNested PCR用プライマー

Primer名	塩基配列 (5'-3')	標的遺伝子	目的
MDmapA1Upper	CTATTTTATTTTTGAGTGCTTG		<i>C. jejuni</i> 遺伝子を標的とした1st PCR
MDmapA2Lower	GCTTTATTTGCCATTTGTTTATTA		
CJmapAN3F	TGGTGGTTTTGAAGCAAAGA	<i>mapA</i>	<i>C. jejuni</i> 遺伝子を標的とした2st PCR
CJmapAN3R	GCTTGGTGCGGATTGTAAA		
COL3Upper	ATTTGAAAATTGCTCCAACATATG		<i>C. coli</i> 遺伝子を標的とした1st PCR
MDCOL2Lower	TGATTTTATTTATTTGTAGCAGCG		
CCceuEN3F	AAGCGTTGCAAAACCTTTATGG	<i>ceuE</i>	<i>C. coli</i> 遺伝子を標的とした2nd PCR
CCceuEN3R	CCTTGTGCGGTTCTTTATT		

表3. 動物種特定のために使用したプライマー

Primer名	塩基配列 (5´-3´)	標的遺伝子	目的
1st-IntF	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATC- TGGWACWGGWTGAACWGTWTAYCCYCC	チトクロムC酸化酵素 サブユニットI	動物種の特定
1st-HCOmR	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGA- TCTTAHACTTCNGGGTGKCCRAARAATCA		

表4. 赤外線カメラの設置と撮影された野生動物に関する情報

養鶏場	敷地面積 (m ²)	カメラの数 (台)	設置期間	動物の一般名 (学名)	撮影された動画数
北海道	1,710,000	4	3日間 (2019. 09.24~26)	キツネ (<i>Vulpes</i>)	2
				シカ (<i>Cervus nippon</i>)	3
				ネコ (<i>Felis catus</i>)	2
				野鳥 (<i>Aves</i>)	2
				不明*	1
東北	11,200	4	62日間 (2018.08.09~10.09)	キツネ (<i>Vulpes</i>)	9
				タヌキ (<i>Nyctereutes procyonoides</i>)	38
				テン (<i>Martes</i>)	1
				ネコ (<i>Felis catus</i>)	166
				カラス (<i>Corvus</i>)	11
				キジバト (<i>Streptopelia orientalis</i>)	13
				不明*	6

関東	10,900	2	31日間 (2018.07.03~08.02)	ネコ (<i>Felis catus</i>)	7
				アライグマ (<i>Procyon lotor</i>)	2
				イヌ (<i>Canis familiaris</i>)	2
				タヌキ (<i>Nyctereutes procyonoides</i>)	18
				ネコ (<i>Felis catus</i>)	8
				ネズミ (<i>Rattus rattus</i>)	2
				ハクビシン (<i>Paguma larvata</i>)	1
				野鳥 (<i>Aves</i>)	1
				不明*	10
				イタチ (<i>Mustela</i>)	4
九州B	11,062	4	60日間 (2018.08.27~10.25)	タヌキ (<i>Nyctereutes procyonoides</i>)	58
				ネコ (<i>Felis catus</i>)	3
				野鳥 (<i>Aves</i>)	13
				不明*	5

*動物種を特定できなかつたため不明とした。

表5. 山口大学から分与された試料における季節ごとの *C. jejuni*/*C. coli* 遺伝子

の検出成績

動物種	季節 (月)	陽性検体数 / 総検体数 (%)		
		<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>	<i>C. jejuni</i> / <i>C. coli</i> *
シカ	春 (3~5月)	1/24 (4.2%)	3/24 (12.5%)	3/24 (12.5%)
	夏 (6~8月)	2/21 (9.5%)	5/21 (23.8%)	5/21 (23.8%)
	秋 (9~11月)	3/16 (18.8%)	2/16 (12.5%)	3/16 (18.8%)
	冬 (1~2、12月)	2/14 (14.3%)	1/14 (7.1%)	2/14 (14.3%)
イノシシ	春 (3~5月)	0/18 (0%)	0/18 (0%)	0/18 (0%)
	夏 (6~8月)	0/8 (0%)	3/8 (37.5%)	3/8 (37.5%)
	秋 (9~11月)	0/21 (0%)	0/21 (0%)	0/21 (0%)
	冬 (1~2、12月)	2/28 (7.1%)	3/28 (10.7%)	4/28 (14.3%)

* *C. jejuni* あるいは *C. coli* のどちらか一方あるいは両方が陽性の検体。

表6. 山口大学から分与された試料における年ごとの *C. jejuni*/*C. coli* 遺伝子の検出成績

動物種	年	陽性検体数 / 総検体数 (%)		
		<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>	<i>C. jejuni</i> / <i>C. coli</i> *
シカ	2014	4/8 (50.0%)	3/8 (37.5%)	4/8 (50.0%)
	2015	4/38 (10.5%)	5/38 (13.2%)	6/38 (15.8%)
	2016	0/14 (0%)	2/14 (14.3%)	2/14 (14.3%)
	2017	0/5 (0%)	1/5 (20.0%)	1/5 (20.0%)
	2018	0/8 (0%)	0/8 (0%)	0/8 (0%)
	2019	0/2 (0%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)
イノシシ	2014	0/16 (0%)	3/16 (18.8%)	3/16 (18.8%)
	2015	1/16 (6.3%)	3/16 (18.8%)	3/16 (18.8%)
	2016	0/12 (0%)	0/12 (0%)	0/12 (0%)
	2017	1/13 (7.7%)	0/13 (0%)	1/13 (7.7%)
	2018	0/13 (0%)	0/13 (0%)	0/13 (0%)
	2019	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)

* *C. jejuni* あるいは *C. coli* のどちらか一方あるいは両方が陽性の検体。

表7. 細菌叢解析のために使用したプライマー

Primer名	塩基配列 (5'-3')	標的遺伝子	目的
S-D-Bact-0341-b-S-17	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAG- AGACAGCCTACGGGNGGCWGCAG	16S rRNA gene	16S rRNA遺伝子の V3-V4可変領域の 増幅
S-D-Bact-0785-a-A-21	GTCCTCGTGGCTCGGAGATGTATAAG- AGACAGGACTACHVGGGTATCTAATCC		
P1	AATGATACGGCGACCACCGA	MiSeq (Illumina)	精製したV3-V4可変 領域増幅産物の定量
P2	CAAGCAGAAGACGGCATACGA	のアダプター配列	

表8. 日本の養鶏場で *C. jejuni* 陽性試料にのみ存在した operational taxonomic unit (OTU)

養鶏場	細菌分類群*	OTU
東北	p_ <i>Bacteroidetes</i> * ¹	OTU495
	g_ <i>Lactobacillus</i>	OTU1488
九州A	p_ <i>Firmicutes</i> * ²	OTU940
	c_ <i>Alphaproteobacteria</i> * ³	OTU3472
	o_ <i>Bacteroidales</i> * ⁴	OTU508、OTU518
	g_ <i>Lactobacillus</i>	OTU1423
九州B	g_ <i>Streptococcus</i>	OTU1513
	g_ <i>Alistipes</i>	OTU754

* 各細菌の分類階級は1文字目に示した (p: 門、c: 綱、o: 目、f: 科、g: 属)。

*¹ p_ *Bacteroidetes*; c_unclassified; o_unclassified; f_unclassified; g_unclassified

*² p_ *Firmicutes*; c_unclassified; o_unclassified; f_unclassified; g_unclassified

*³ c_ *Alphaproteobacteria*; o_unclassified; f_unclassified; g_unclassified

*⁴ o_ *Bacteroidales*; f_unclassified; g_unclassified

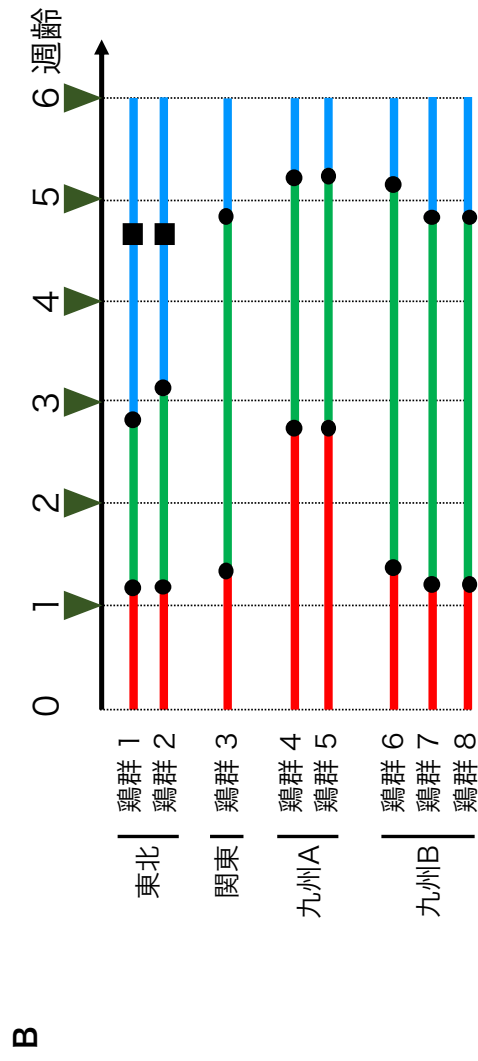
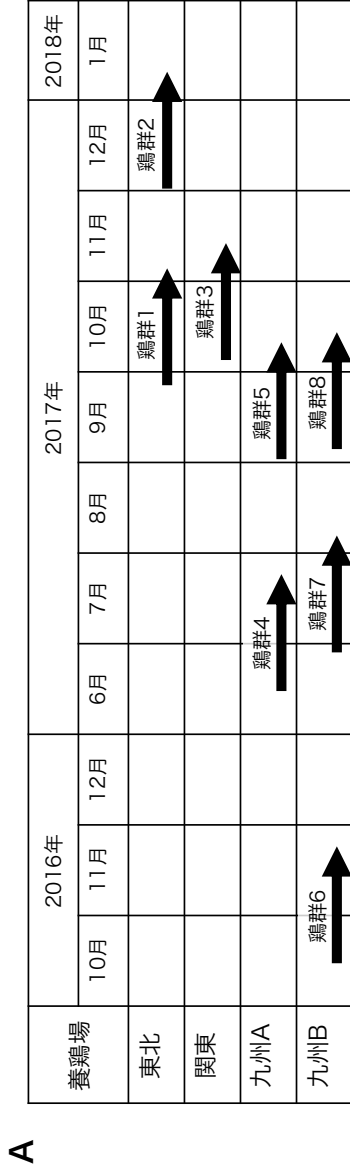


図1. 週齢ごとに収集した試料の情報

(A) 試料の収集期間を矢印で示した。(B) 試料の収集時期を▼、一部のニワトリが早期に出荷された時期を■で示した。飼料の種類を赤色（餌付け）、緑色（後期）、および青色（仕上げ）で示し、その切り替え時期を●で示した。

養鶏場	試料の種類	1回目		2回目		空舎時	
		陽性検体数/総検体数 <i>C. jejuni</i> / <i>C. coli</i>	陽性検体数/総検体数 <i>C. coli</i>	陽性検体数/総検体数 <i>C. jejuni</i> / <i>C. coli</i>	陽性検体数/総検体数 <i>C. coli</i>	陽性検体数/総検体数 <i>C. jejuni</i> / <i>C. coli</i>	陽性検体数/総検体数 <i>C. coli</i>
東北	盲腸便	0/10	0/10	-	-	-	-
	糞便	0/2	0/2	8/8	3/8	-	-
	餌箱	0/6	0/6	3/3	3/3	0/3	0/3
	ファン	0/6	0/6	-	-	-	-
	給水器	0/6	0/6	-	-	-	-
	鶏舎内用の長靴	-	-	2/2	1/2	0/2	0/2
九州A	盲腸便	0/10	0/10	2/7	0/7	-	-
	餌箱	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
	ファン	0/3	0/3	2/3	0/3	0/3	0/3
	給水器	0/3	0/3	-	-	-	-
	鶏舎内用の長靴	-	-	0/2	0/2	0/2	0/2
九州B	盲腸便	10/10	0/10	0/8	0/8	-	-
	餌箱	3/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
	ファン	2/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2
	給水器	3/3	0/3	-	-	-	-
	鶏舎内用の長靴	-	-	0/2	0/2	0/2	0/2

図2. 出荷間近および空舎時期に収集した試料における*C. jejuni*/*C. coli* 遺伝子の検出成績

各試料を収集した時期を▲で示した。赤い文字は*C. jejuni*/*C. coli* 遺伝子が検出された検体を示す。

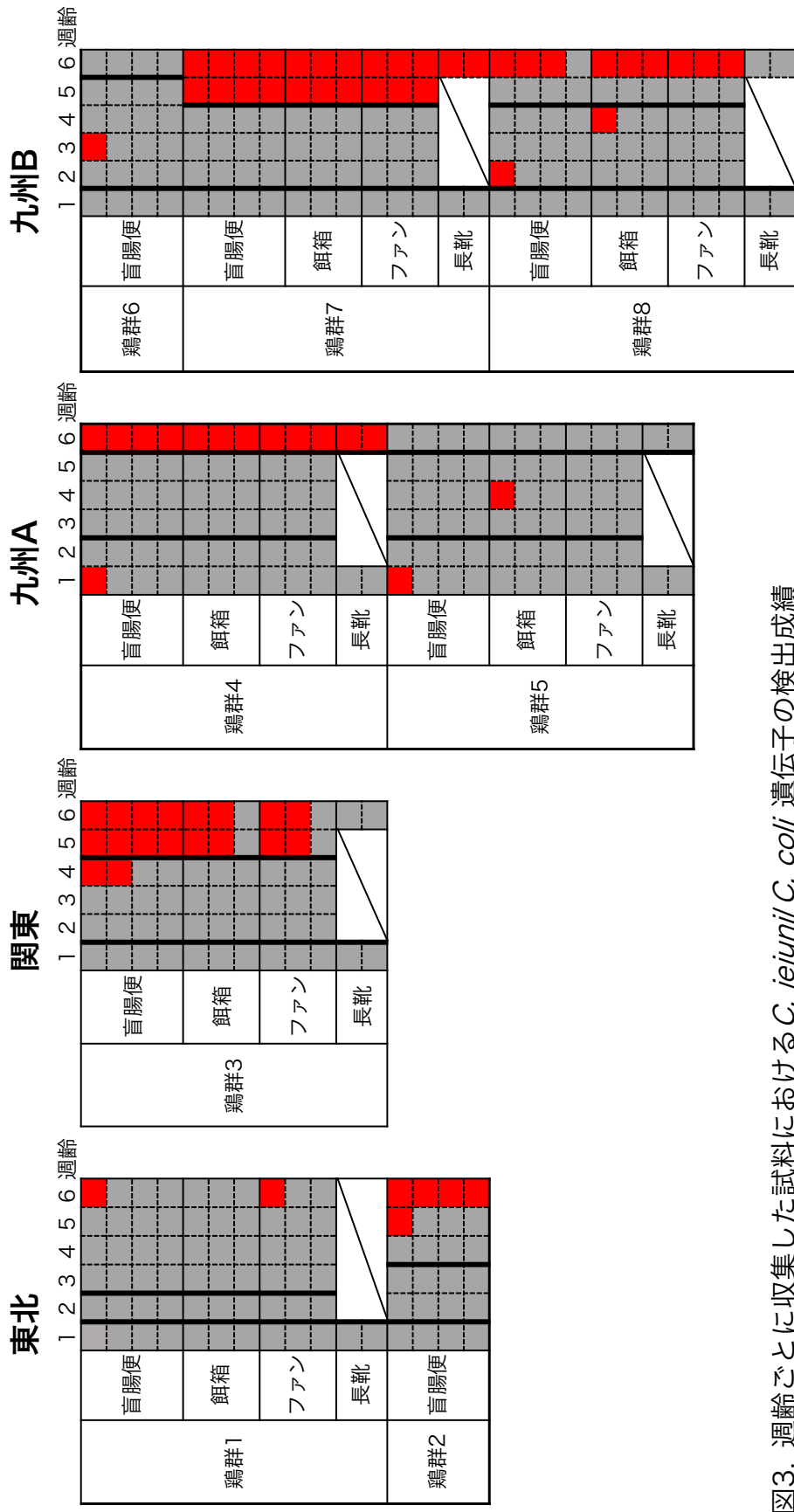


図3. 週齢ごとに収集した試料における*C. jejuni*/*C. coli* 遺伝子の検出成績

試料中の*C. jejuni*/*C. coli* 遺伝子の有無を赤色 (陽性) および灰色 (陰性) で示した。また、飼料の切り替え時期を太線で示した。収集していない試料は斜線で示した。

A



B

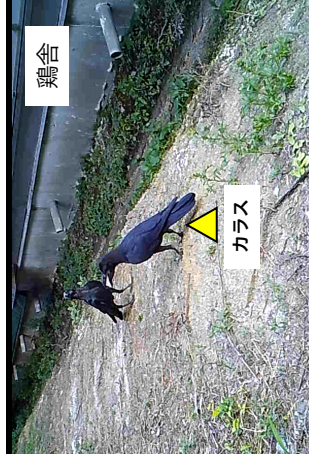
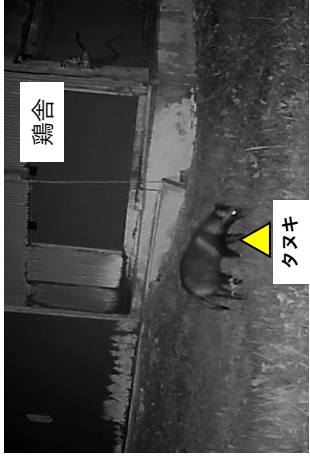


図4. 赤外線カメラの設置と撮影された動物

(A) 赤外線カメラの設置例。(B) 赤外線カメラで撮影した主な動画の例。

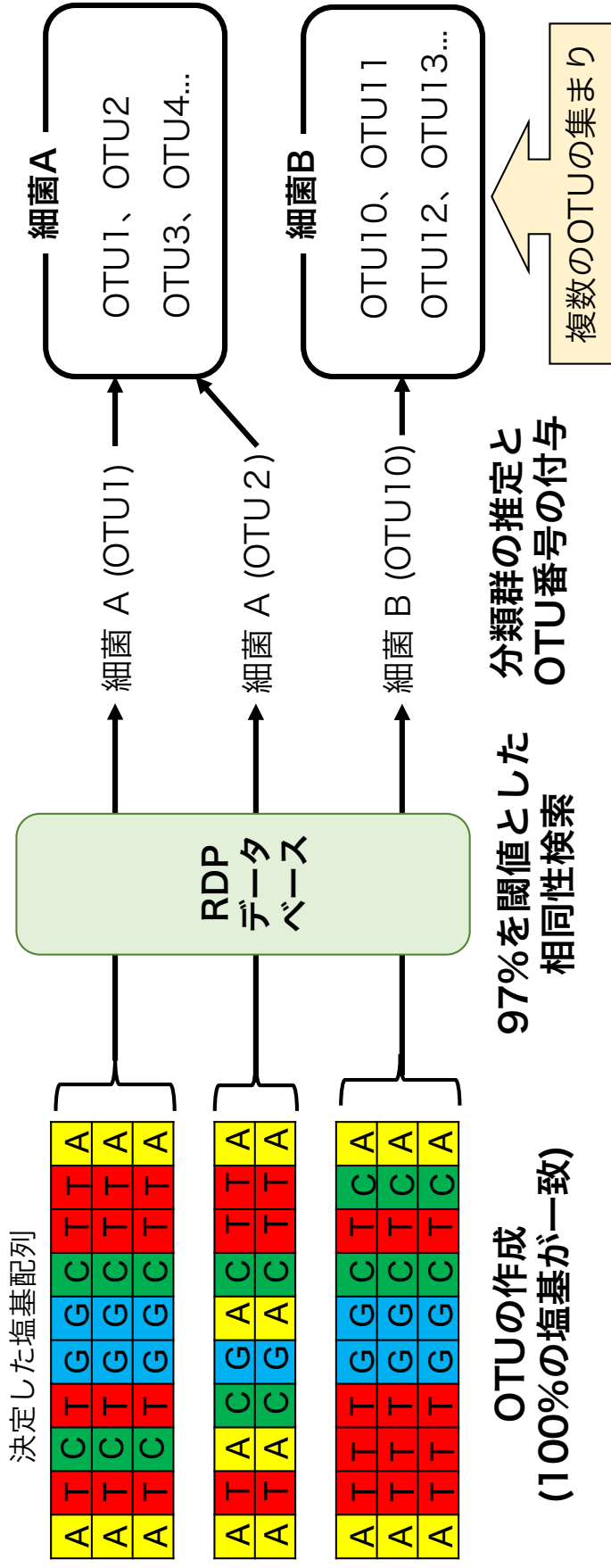


図5. Operational taxonomic unit (OTU) の作成と細菌分類群の推定

精製した配列をソフトウェアmothurを用いてクラスタリングし、OTUを形成した。その後、RDPデータベースを用いて97%を閾値とした相同性検索を行い、細菌分類群を属レベルで推定した。また、推定した分類階級の上位からアルファベット順に各OTUに番号を付与した。

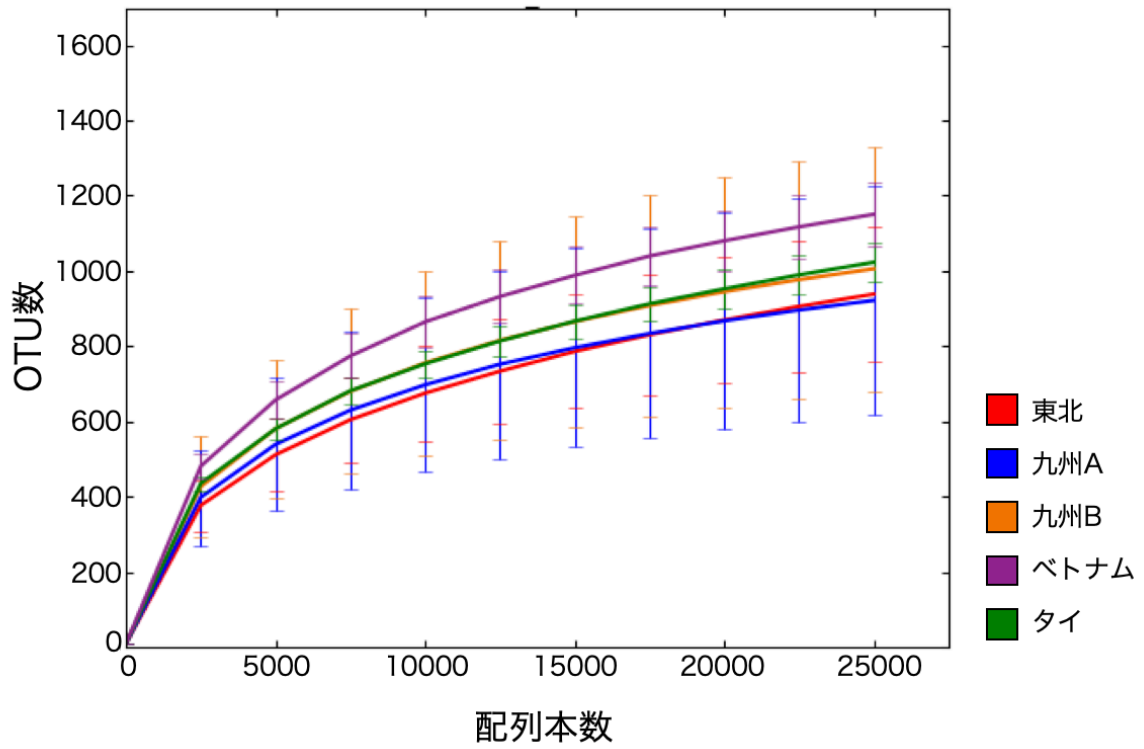


図6. 決定した配列情報から得たOTU数を示す希薄化曲線

各養鶏場における希薄化曲線を異なる色を用いて示した。

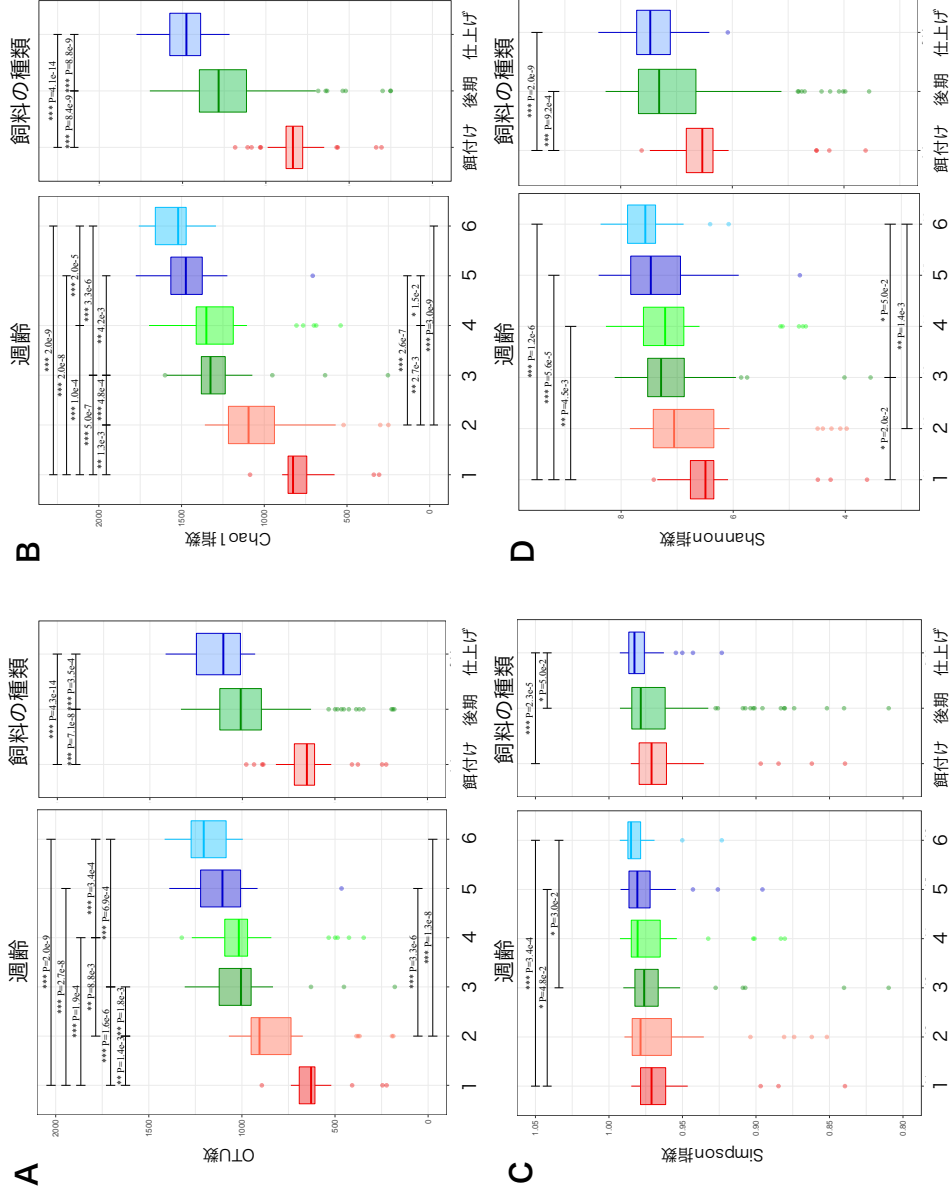


図7. ニフトリ盲腸便細菌叢の週齢および飼料の種類ごとの多様性指数

(A) OTU数、(B) Chao1指数、(C) Simpson指数、(D) Shannon指数。(* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$)

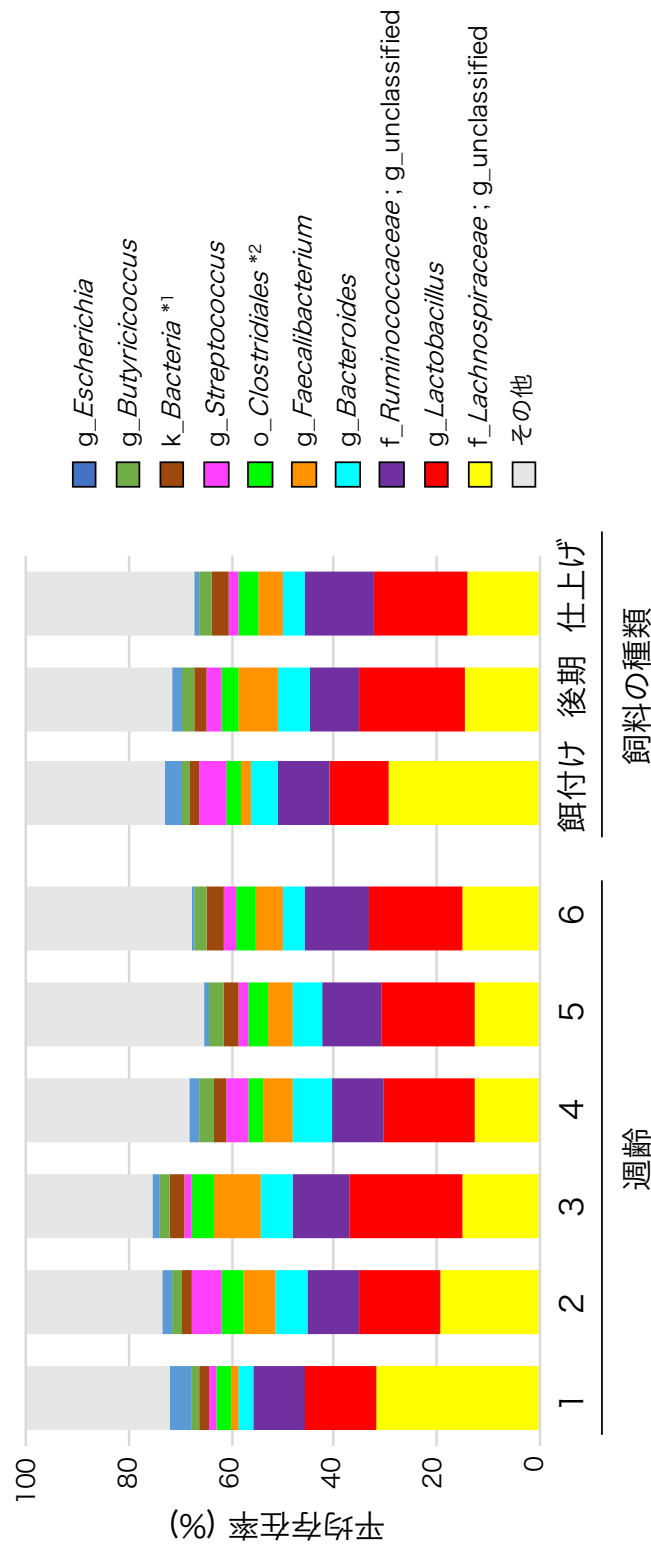


図8. ニワトリ盲腸便細菌叢における週齢および飼料の種類ごとの主要な構成細菌

存在率の平均が2%以上の細菌分類群を異なる色で示した。存在率の平均が2%未満の細菌分類群はその他として灰色で示した。各細菌の分類階級は1文字目にした (k: 界、p: 門、c: 綱、o: 目、f: 科、g: 属)。

*¹ k_Bacteria ; p_unclassified; c_unclassified; o_unclassified; f_unclassified; g_unclassified

*² o_Clostridiales ; f_unclassified; g_unclassified

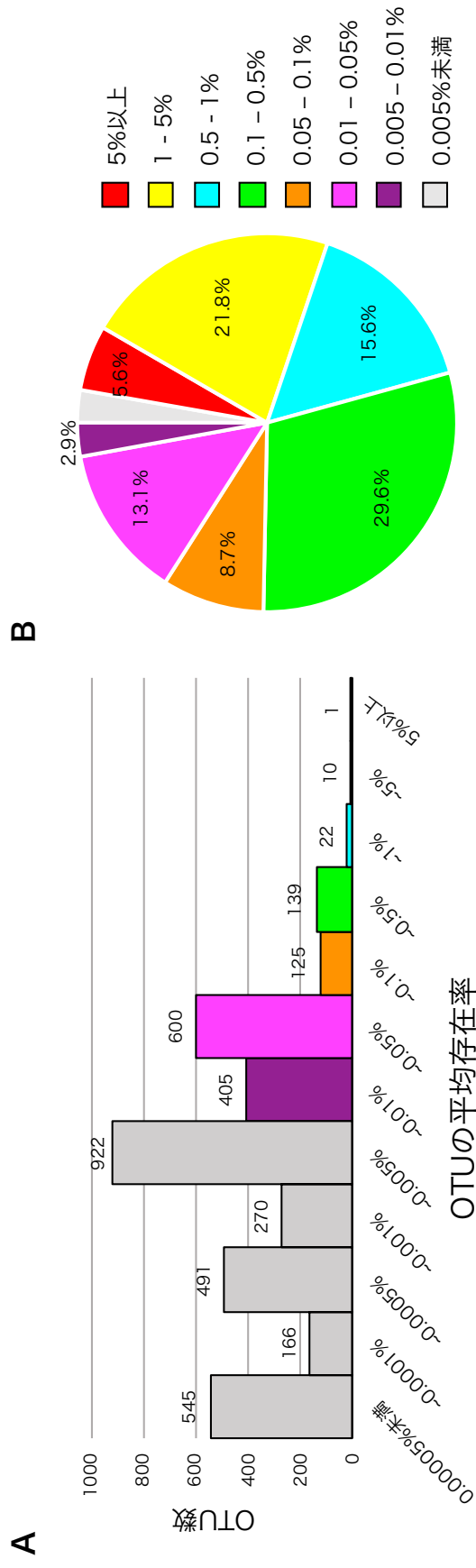


図9. ニフトリ盲腸便細菌叢での平均存在率ごとのOTU数と全体に占める割合

(A) 平均存在率ごとのOTU数と、(B) それらが全体に占める割合。各平均存在率の区分を異なる色で示した。

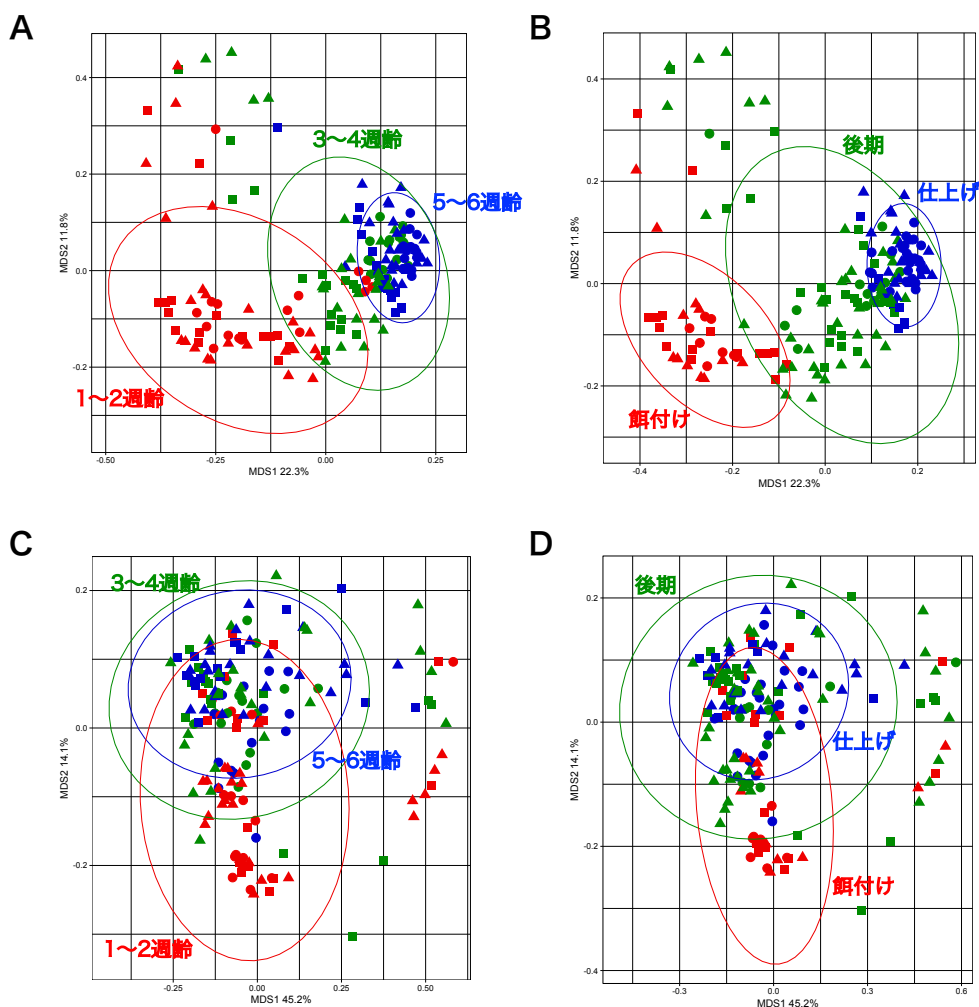


図10. ニワトリ盲腸便細菌叢情報に対する週齢および飼料の種類ごとの multidimensional scaling (MDS) 解析

(A、B) Unweighted UniFrac距離、(C、D) weighted UniFrac距離を用いて解析を行い、各養鶏場を● (東北)、■ (九州A)、および▲ (九州B) で示した。(A、C) 各試料を収集した時期を赤色 (1~2週齢)、緑色 (3~4週齢)、および青色 (5~6週齢) で示した。また、95%確率楕円を週齢ごとに示した。(B、D) 試料を収集した時に与えていた飼料の種類を赤色 (餌付け)、緑色 (後期)、および青色 (仕上げ) で示した。95%確率楕円を飼料の種類ごとに示した。

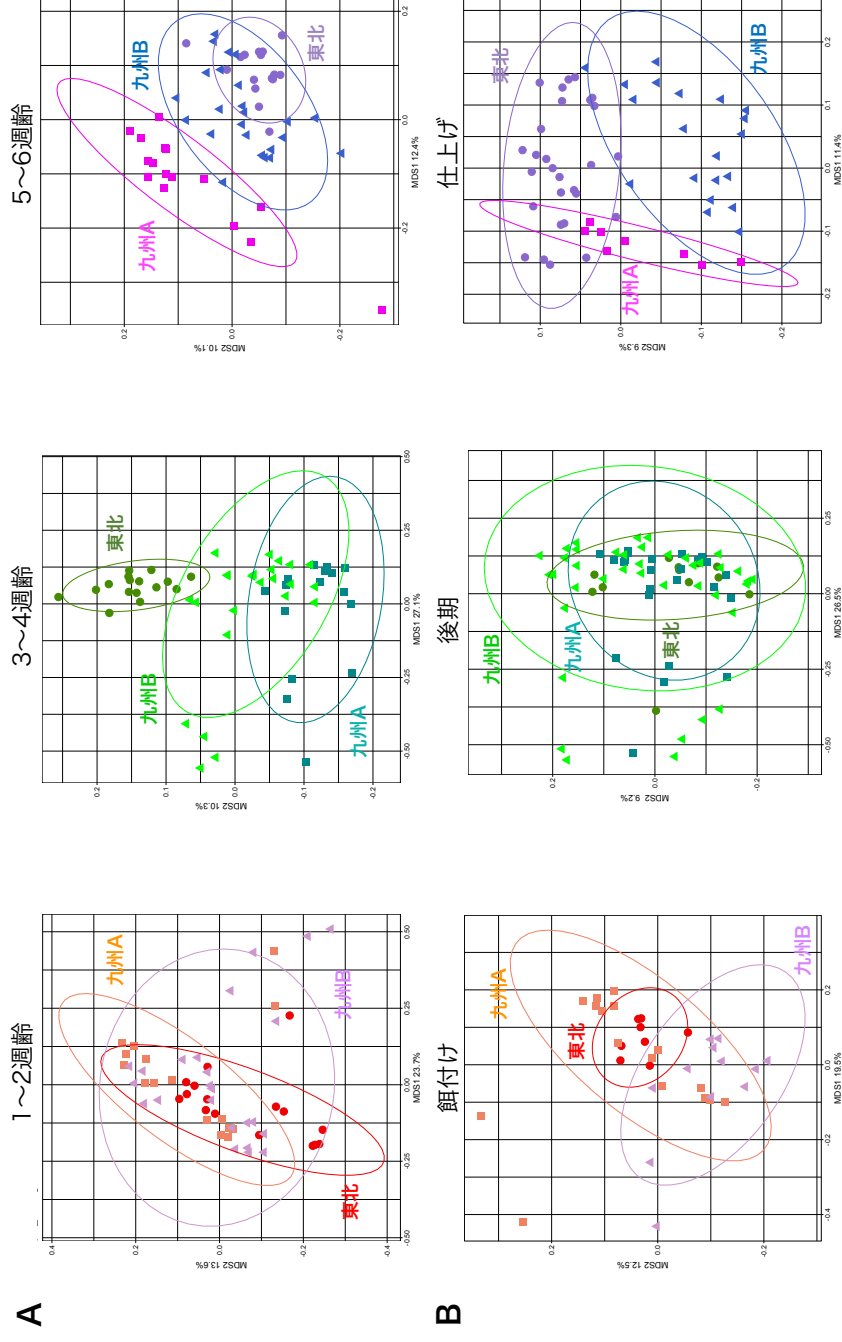
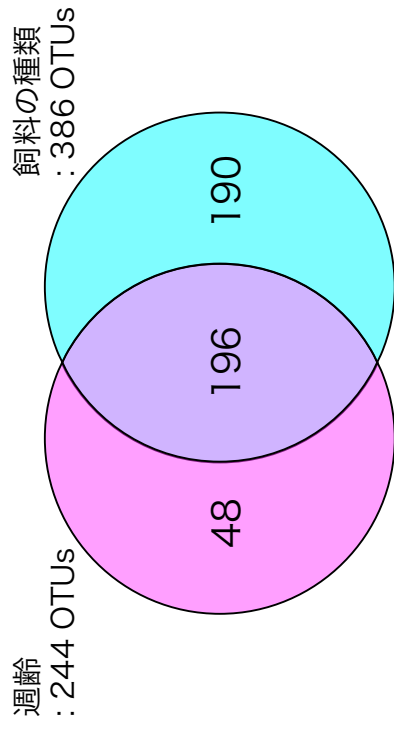


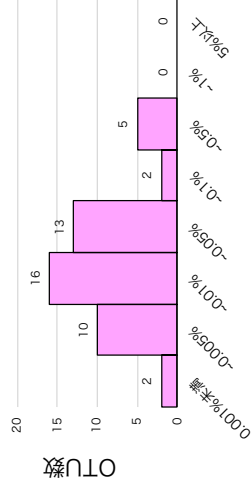
図11. ニワトリ盲腸便細菌叢情報に対するunweighted UniFrac距離を用いた週齢および飼料の種類別のMDS解析

(A) 週齢ごと、(B) 飼料の種類ごとに解析を行い、各養鶏場を●(東北)、■(九州A)、および▲(九州B)で示した。また、95%確率楕円を養鶏場ごとに示した。

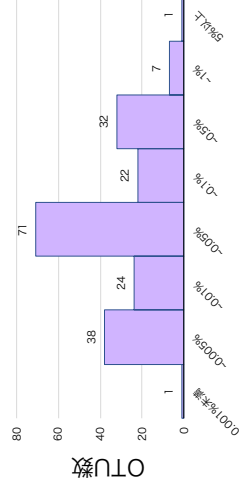
A



B 週齢でのみ有意に存在量が変化したOTU



週齢と飼料の種類で共通して有意に存在量が変化したOTU



飼料の種類でのみ有意に存在量が変化したOTU

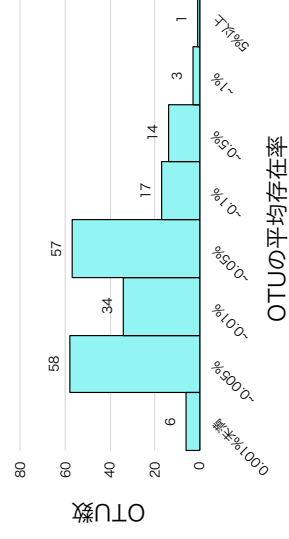


図12. ニワトリ盲腸便細菌叢での週齢および飼料の種類で有意に存在率が変化したOTU数

(A) 週齢および飼料の種類で有意に存在率が変化したOTU数と、(B) それらの平均存在率ごとの出現頻度。

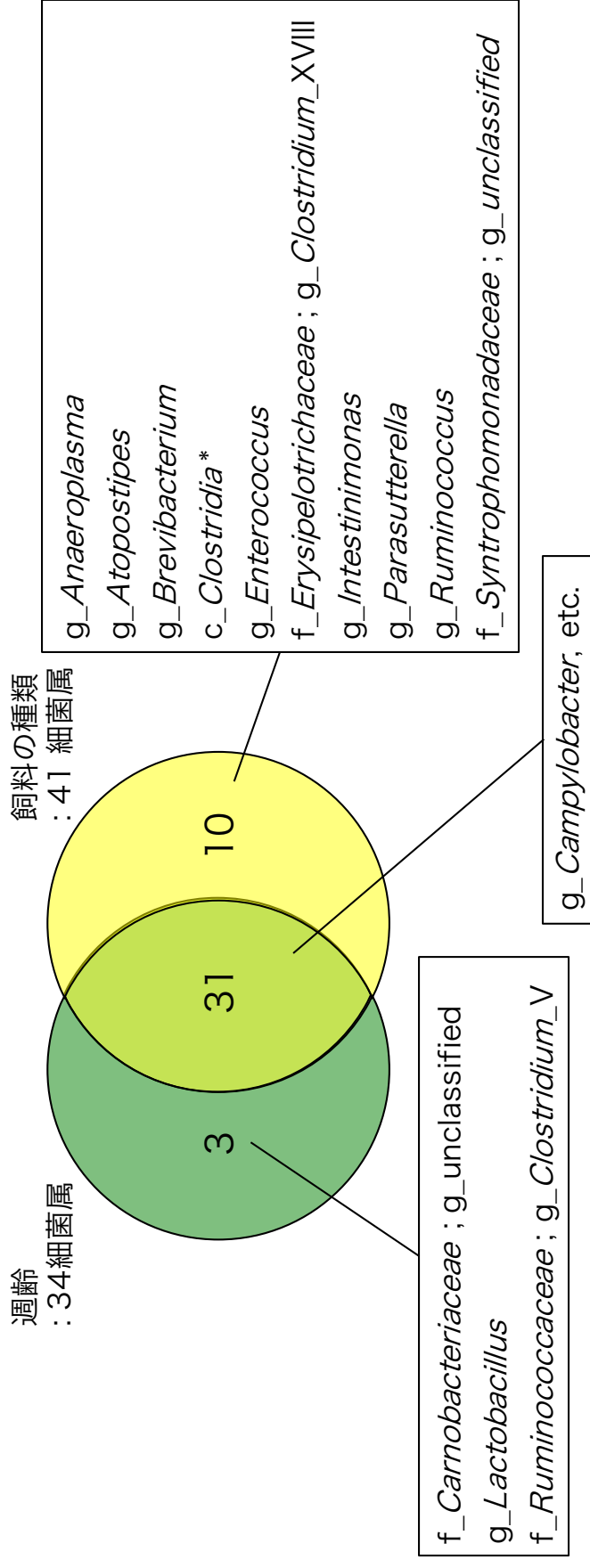


図13. ニワトリ盲腸便細菌叢での週齢および飼料の種類で有意に存在率が変化した細菌分類群

週齢および飼料の種類で有意に存在率が変化した細菌分類群の数。各細菌の分類階級は1文字目にした (c: 綱、o: 目、f: 科、g: 属)。

* c_Clostridia ; o_unclassified; f_unclassified; g_unclassified

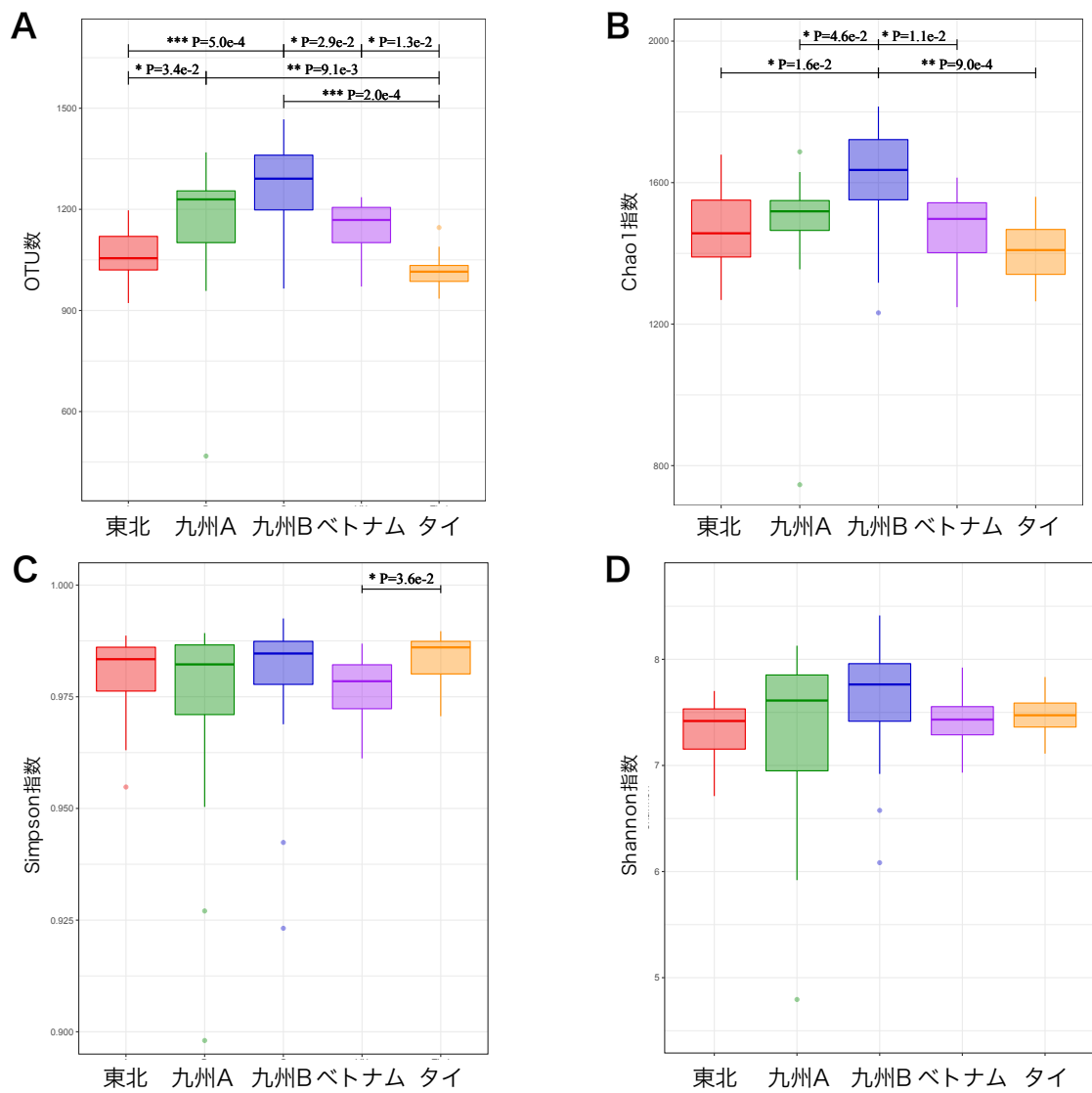


図14. ニワトリ盲腸便細菌叢における養鶏場ごとの多様性指数

(A) OTU数、(B) Chao1指数、(C) Simpson指数、(D) Shannon指数。

(* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ 、*** $P < 0.001$)

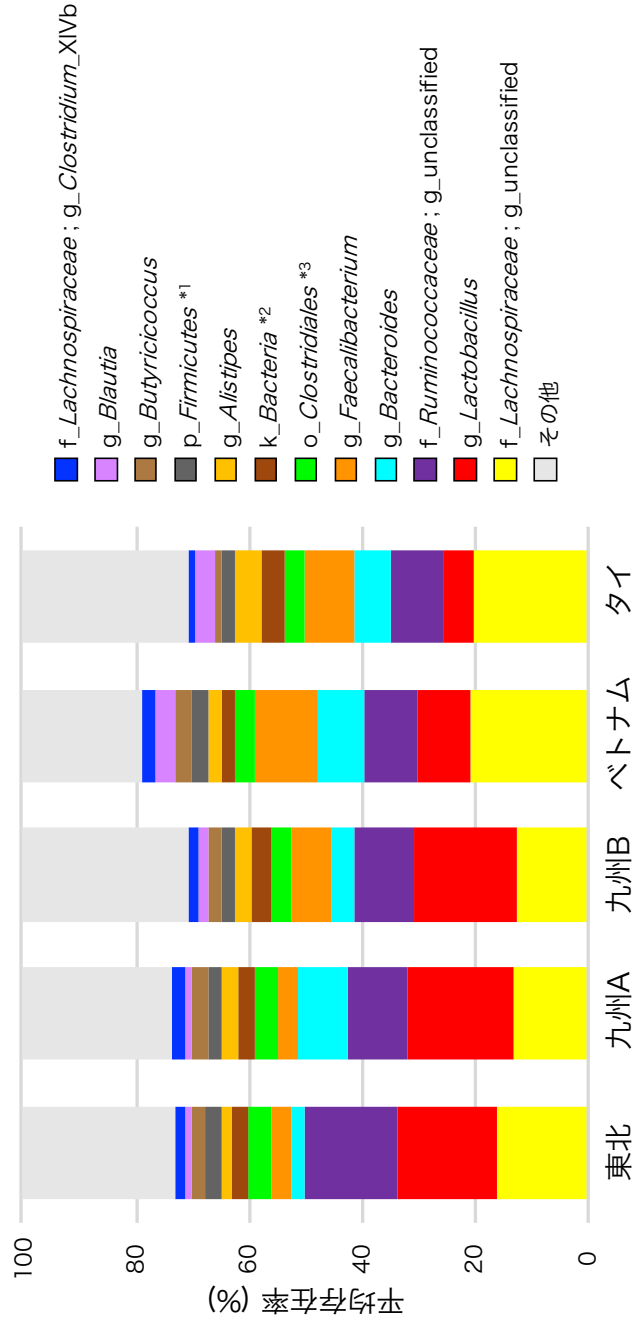


図15. 養鶏場ごとの主要なニワトリ盲腸便細菌叢の構成細菌

存在率の平均が2%以上の細菌分類群を異なる色で示した。存在率の平均が2%未満の細菌分類群はその他として灰色で示した。各細菌の分類階級は1文字目にした (k: 界、p: 門、c: 綱、o: 目、f: 科、g: 属)。

*¹ p_Firmicutes ; c_unclassified; o_unclassified; f_unclassified; g_unclassified

*² k_Bacteria ; p_unclassified; c_unclassified; o_unclassified; f_unclassified; g_unclassified

*³ o_Clostridiales ; f_unclassified; g_unclassified

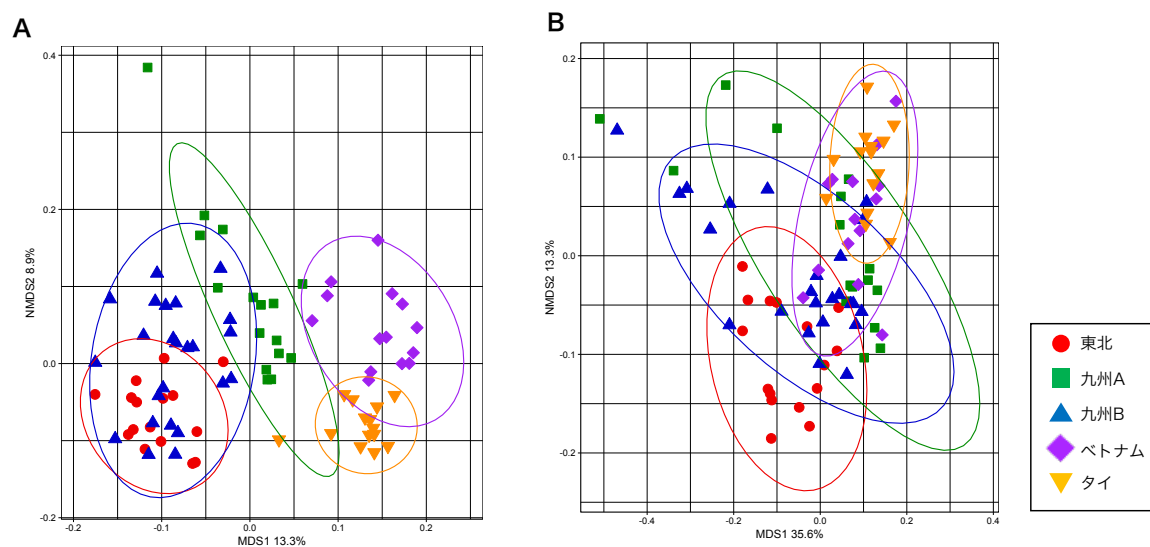


図16. ニワトリ盲腸便細菌叢情報に対する養鶏場ごとのMDS解析

(A) Unweighted UniFrac距離、(B) weighted UniFrac距離を用いて解析を行い、各養鶏場を● (東北)、■ (九州A)、▲ (九州B)、◆ (ベトナム)、および ▼ (タイ) で示した。日本については5~6週齢の時期に収集した試料のデータを使用した。95%確率楕円を養鶏場ごとに描いた。

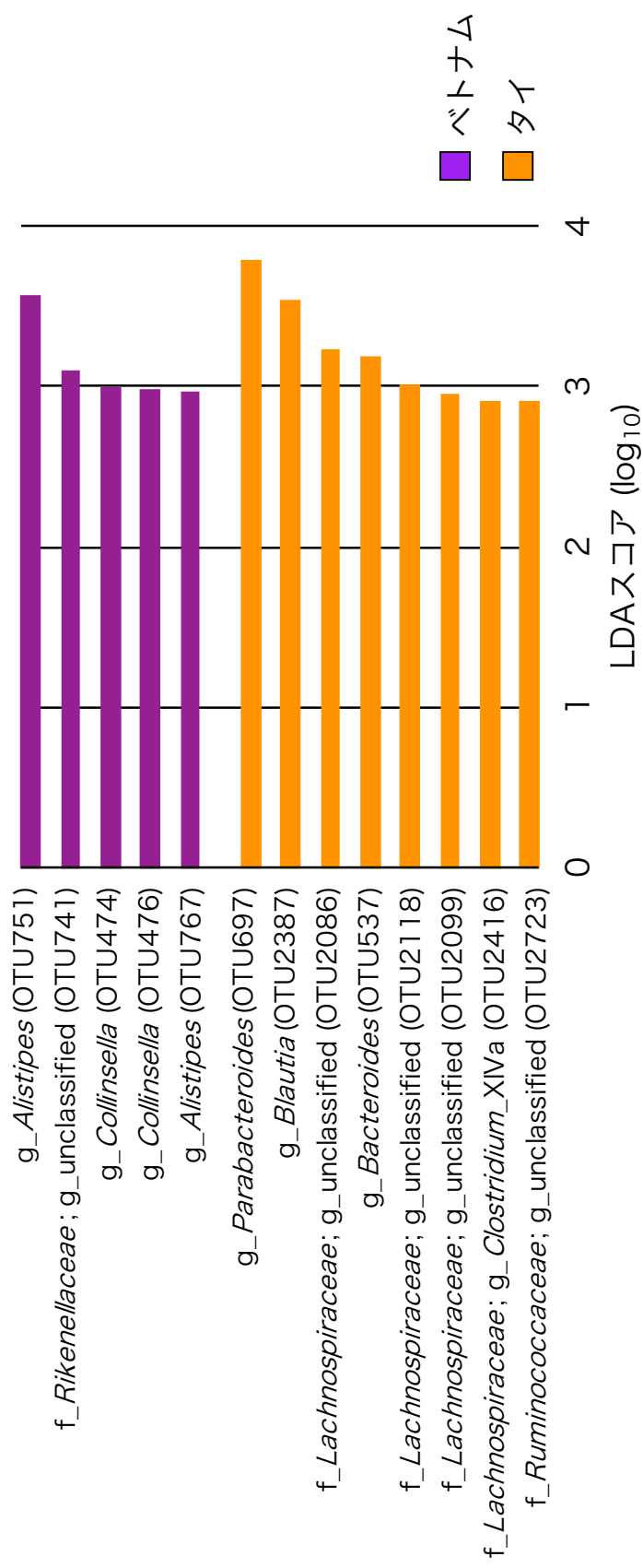


図17. 日本、ベトナム、タイのニワトリ盲腸便細菌叢情報に対して行ったLinear discriminant analysis effect size (LEfSe)

解析

国の違いを異なる色で示した。各細菌の分類階級を1文字目に (f: 科、g: 属)、OTU番号を括弧内に示した。日本に特徴的なOUTは確認できなかった。

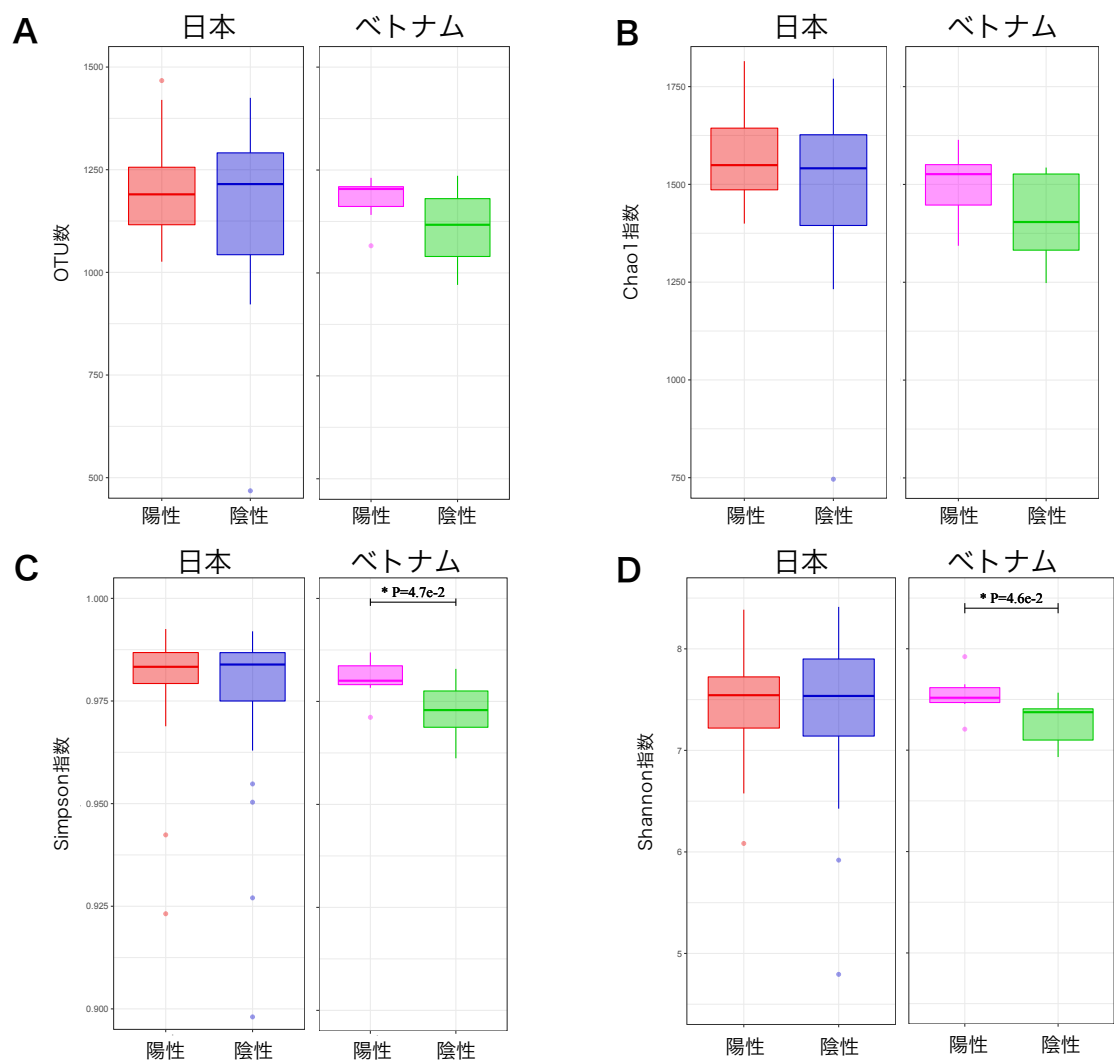


図18. *C. jejuni* 陽性あるいは陰性だったニワトリ盲腸便細菌叢での多様性指数

(A) OTU数、(B) Chao1 指数、(C) Simpson 指数、(D) Shannon 指数。

(* $P < 0.05$)

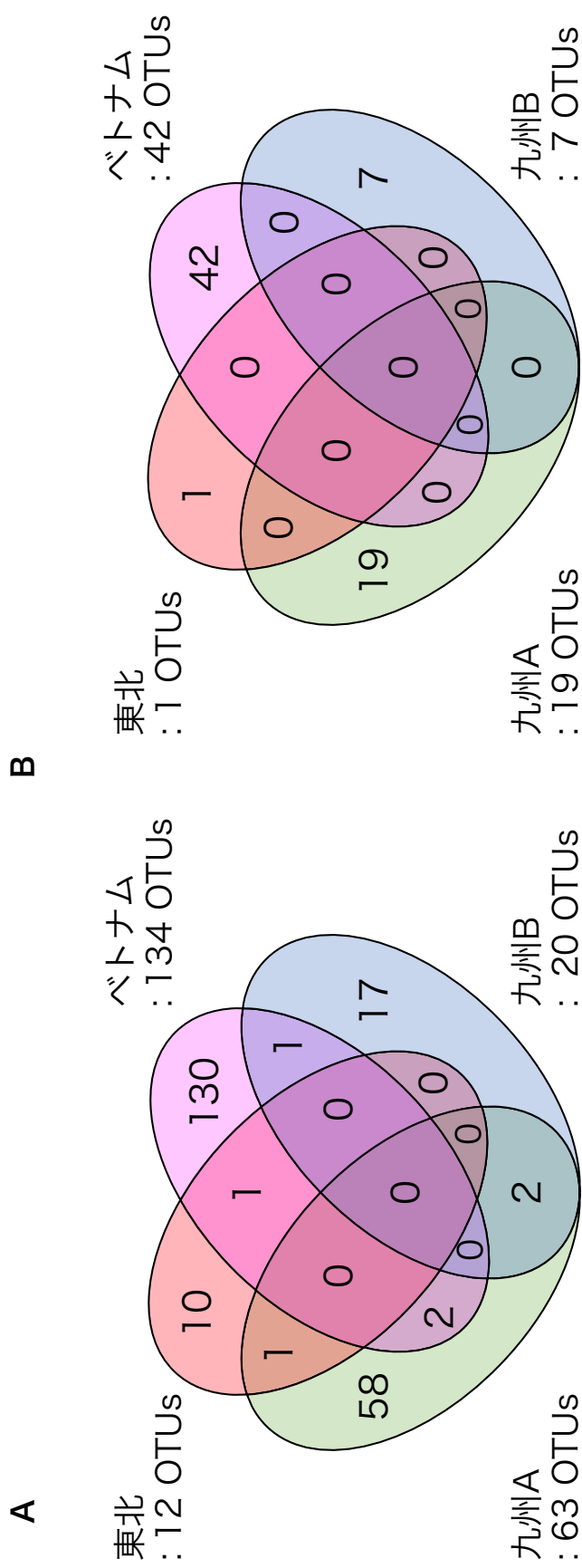


図19. *C. jejuni* 陽性だったニワトリ盲腸便細菌叢で有意に存在率が高いあるいは特徴的なOTU

(A) *C. jejuni* 陽性試料で有意に存在率が高かったOTU数、(B) LEfSe解析で *C. jejuni* 陽性試料で特徴的だとされたOTU数をベン図で示し、養鶏場間で比較した。