

## 論文の内容の要旨

獣医学専攻

平成 28 年度博士課程 入学

氏名 竹下 奈知子

指導教員 関崎 勉

論文題目 肉用鶏と野生動物の *Campylobacter* 汚染に関する研究

*Campylobacter* 食中毒は細菌性食中毒としては日本で発生件数が最多で、主に *Campylobacter jejuni* あるいは *coli* (以下、*C. jejuni*/*C. coli*) に汚染された鶏肉または鶏内臓肉の摂取により発症する。*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。したがって、養鶏場で *C. jejuni*/*C. coli* 汚染を制御することができれば、食鳥処理場での汚染も低下し、食中毒リスクの低減につながると期待される。*C. jejuni*/*C. coli* による汚染を養鶏場で制御するためには汚染源や汚染経路の解明が重要であると考えられ、多くの調査が行われてきたが、主要な汚染源は未だに不明である。また、*C. jejuni*/*C. coli* が生存環境によって生きていますが培養できない (viable but non-culturable: VBNC) 状態を呈することが調査を更に困難にしている。例えば、培養検査と遺伝子検査を併用した調査では、遺伝子検査でのみ清掃後の鶏舎から *C. jejuni*/*C. coli* が検出されており、VBNC 状態で鶏舎内等に残存した *C. jejuni*/*C. coli* が汚染源になっている可能性がある。

ところで、養鶏場での *C. jejuni*/*C. coli* 汚染率は 40% 以上と高いが、その一方で、汚染がないと思われる養鶏場も確認されている。そこで、複数の養鶏場で *C. jejuni*/*C. coli* の汚染調査を行い、汚染養鶏場と非汚染養鶏場の違いを調査することで、汚染源あるいは汚染経路を推定できると考えた。また、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おり、病原細菌等がヒトに感染する際には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いる。同様に、*C. jejuni*/*C. coli* による汚染が起こる際、汚

染源で共存する他の細菌も共にニワトリを汚染するはずである。そこで、*C. jejuni*/*C. coli* 陽性および陰性のニワトリ腸内細菌叢を比較することで、*C. jejuni*/*C. coli* と汚染源で共存する細菌を推定し、その由来を特定することで汚染源を絞り込むことができると考え、以下の研究を行なった。

第1章では国内外の養鶏場での *C. jejuni*/*C. coli* 汚染調査を Nested PCR を用いて行い、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、鶏群ごとの汚染は海外で収集した試料でも認められた。さらに、過去の報告と異なり、ニワトリ飼育時の鶏舎から *C. jejuni*/*C. coli* 遺伝子が検出されても、清掃後の鶏舎からは *C. jejuni*/*C. coli* 遺伝子が検出されないことが全ての養鶏場で示されたため、*C. jejuni*/*C. coli* は VBNC 状態で残存しないと考えられた。以上の成績より、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思われた。次に、経時的な調査として、国内の養鶏場にてニワトリ盲腸便を6週間毎週収集したところ、どの週齢でも初めて *C. jejuni*/*C. coli* に汚染されたような成績が得られた。さらに、消毒済みの鶏舎内使用の長靴からも *C. jejuni*/*C. coli* 遺伝子が検出されたため、頻繁に鶏舎に出入りする飼育員の長靴を介して鶏舎内が汚染された可能性が示された。そこで、鶏舎外での *C. jejuni*/*C. coli* 汚染調査を行い汚染源の推定を試みた結果、排水溝から *C. jejuni* 遺伝子が検出され、鶏舎からの排水が汚染源となり得ることが示された。一方で、収集した土や昆虫等の試料からは *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章では野生動物での *C. jejuni*/*C. coli* 汚染調査を行なった。養鶏場敷地内に落ちていた野生動物の糞便および他施設から分与された野生動物の糞便を用いて Nested PCR により調査を行なった結果、養鶏場敷地内で拾った糞便からは *C. jejuni*/*C. coli* 遺伝子は検出されなかった。しかし、検体数が少なかったため、検体数を増やして更に調査を行う必要があると思われた。他施設から分与された糞便では、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。過去に日本で行われた培養検査でシカか

ら *C. jejuni*/*C. coli* は検出されなかったが、本成績では検出されたため、検出方法の違いにより成績が異なると考えられる。また、本研究が日本に生息するアライグマの糞便から *C. jejuni* 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、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ものの、その検出率は概して低く、*C. jejuni*/*C. coli* はこれら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。したがって、アライグマ、シカ、およびイノシシは日本の養鶏場における共通の汚染源とは考えにくかった。一方で、因果関係は不明だが、養鶏場、シカ、およびイノシシ間で *C. jejuni*/*C. coli* 遺伝子の検出成績が関連しているような成績が得られたことは興味深かった。今後、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経路を特定できる可能性がある。次に、赤外線カメラを国内の養鶏場敷地内に設置し、どのような動物種が頻繁に養鶏場敷地内に侵入したかを調査した結果、複数の動物種が鶏舎の間近まで侵入していることが示された。それらの動物の糞便を踏むことで長靴が汚染され、これが十分に消毒されないまま鶏舎内へ持ち込まれる可能性があるため十分な注意が必要だ。

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ニワトリを汚染し、腸内に定着すると仮説を立て、その共存細菌の由来から汚染源を推定することを試みた。調査には第1章で収集した盲腸便を用いたが、その中で *C. coli* 陽性だった試料については数が少なかったため用いなかった。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を明らかにすることも目的とした。実験用のニワトリの報告と一致して、商業用のニワトリも週齢に応じて盲腸便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ことが示された。また、飼料の種類の変更でも同様に、仕上げの飼料を与えている時期が最も盲腸便細菌叢の多様性は高く、個体差は小さかった。しかし、飼料はニワトリの成長に応じて種類が切り替えられたため、飼料だけではなく週齢の影響も受けて盲腸便細菌叢は変化したと思われた。一方で、飼料の切り替えにより存在率が有意に変

化した細菌の数は週齢の影響を受けて存在率が変化した細菌の数よりも多かったため、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。また、週齢や飼料の種類による影響よりは小さいものの、国や養鶏場の違いによる影響も受け盲腸便細菌叢は変化した。したがって、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、国の違い等の影響も受け、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結果、陽性試料にのみ存在する細菌や陽性試料に有意に多く存在する細菌を確認できたものの、その数は少なかった。さらに、養鶏場間で相反する成績も得られ、*C. jejuni* 陽性試料を特徴付ける細菌は養鶏場間で共通していなかった。したがって、汚染源が複数存在する、ニワトリを汚染した細菌の中で *C. jejuni* のみが腸管内に定着した、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たため陽性および陰性試料間で細菌叢の違いが認められなかったと思われた。*C. jejuni*/*C. coli* の汚染源を盲腸便細菌叢の変化から推定するためには、汚染が起きた直前と直後の日齢で構成細菌の比較を行う等、より詳細な調査が必要だと言える。

以上より、長靴を適切に消毒する等、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養鶏場の汚染を制御できると思われた。また、野生動物の糞便を踏むことで飼育員の長靴が汚染される可能性があるため注意が必要だ。細菌叢の調査では、商業用のニワトリは飼料の種類や養鶏場の違いなど、様々な影響を受けて盲腸便細菌叢が変化することが示された。一方で、*C. jejuni* の汚染による盲腸便細菌叢の変化は養鶏場間で共通しなかった。養鶏場間で共通する変化が認められなかった要因を明らかにすることで、汚染源を絞り込むことができる可能性があるため、更に調査が必要だ。