

研究課題の概要

研究課題名	農場における鶏の食中毒菌汚染による食中毒発生に関するリスク評価法の確立
主任研究者	中村 政幸
所属機関	北里大学
研究成果の概要	本研究では、わが国で初めて大手ブロイラー生産会社2社の協力を得て、傘下のブロイラー農場、孵卵場および種鶏農場のカンピロバクター汚染実態に関するデータを収集した。1)農場の汚染状況は20%以下と予想以上に低く、農場汚染のリスク要因を統計学的に明らかにすることは困難であった。2)孵卵場のサンプルからはカンピロバクターは分離されず、汚染はコマーシャル農場で始まっていると考えられた。汚染リスクの高まる時期は3週齢以降であった。3)分離株の遺伝子型は比較的類似していたが、多様性が認められ、7週齢以降には地理的に近隣の農場間では類似した遺伝子型が認められた。4)各農場へは、様々な由来から菌株が人為的に侵入していることが示唆された。これらの結果から、農場汚染制御に向けたシナリオとして、農場での飼育管理従事者や経営者あるいは関連業者の教育／啓発が重要と考えられた。

評価所見	調査の実施について制約がある中で36農場ものカンピロバクターの汚染実態のデータが得られた事は評価できる。しかし、汚染実態等は限定された系列農場で得られたものであり、また、汚染が確認された農場等が少なく、今回の調査農場の結果を日本の農場の汚染レベルとするには、さらなる調査解析が必要である。
評価結果	目標の達成は不十分であった。

研究成果報告書（研究要旨）

研究課題名	農場における鶏の食中毒菌汚染による食中毒発生に関するリスク評価法の確立
主任研究者名	所属： 学校法人 北里研究所 氏名： 中村 政幸(研究課題番号：0806)

本研究では、わが国で初めて大手ブロイラー生産会社2社の協力を得て、傘下のブロイラー農場、孵卵場および種鶏農場のカンピロバクター汚染実態に関するデータを収集した。1) 農場の汚染状況は20%以下と予想以上に低く、農場汚染のリスク要因を統計学的に明らかにすることは困難であった。2) 孵卵場のサンプルからはカンピロバクターは分離されず、汚染はコマーシャル農場で始まっていると考えられた。汚染リスクの高まる時期は3週齢以降であった。3) 分離株の遺伝子型は比較的類似していたが、多様性が認められ、7週齢以降には地理的に近隣の農場間では類似した遺伝子型が認められた。4) 各農場へは、様々な由来から菌株が人為的に侵入していることが示唆された。これらの結果から、農場汚染制御に向けたシナリオとして、農場での飼育管理従事者や経営者あるいは関連業者の教育／啓発が重要と考えられた。

研究成果報告書（本体）

研究課題名	農場における鶏の食中毒菌汚染による食中毒発生に関するリスク評価法の確立 (研究期間：平成20年度～21年度)
主任研究者名	所属： 学校法人 北里研究所 氏名： 中村 政幸(研究課題番号：0806)

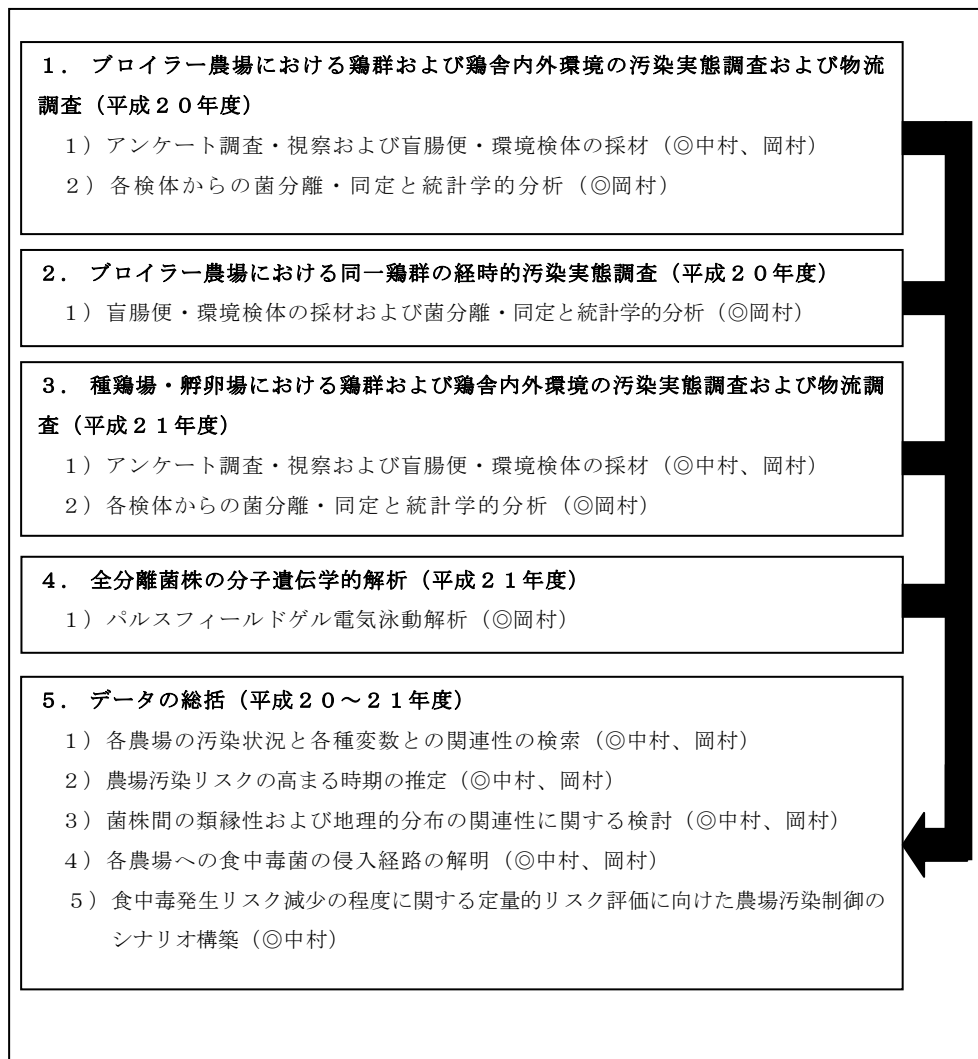
1. 研究の概要

カンピロバクターは、食中毒の原因菌としてわが国を含めて世界各国で公衆衛生上の重要な問題と位置づけられている。カンピロバクター食中毒事例は世界的に増加の一途をたどり、欧米の先進諸国同様にわが国でも生鮮あるいは加熱不十分の鶏肉がその主要なリスク因子であると指摘されている。カンピロバクターは、わが国では 2001 年および 2003 年以降でサルモネラに代わり食中毒事例数で第 1 位、2006 年には患者数も第 1 位となった。カンピロバクターが汚染鶏肉を介した食中毒の発生に関連していることから、食品の安全性確保に関する施策の必要性が高まっており、FAO および WHO は、CODEX 委員会などの諮問を受けて、食品中の両菌に関するリスク評価を行った。わが国も食品安全委員会で鶏肉中のカンピロバクターについてリスク評価を実施中である。

カンピロバクター食中毒の主なリスク要因は、生産、食鳥処理・加工、流通・販売、および消費を含むフードチェーン全体に存在している。本研究課題申請者は 2005 から 2006 年にかけて、食鳥処理中の中抜きと体から盲腸内容物採取し、近年当研究室で確立した両菌の同時検出系を用いてカンピロバクターおよびサルモネラの汚染状況を調査した。その結果、カンピロバクターおよびサルモネラによる汚染が極めて高いこと（カンピロバクター陽性率は個体別で 59.7%、農場別では 94.7%、サルモネラ陽性率は個体別で 18.7%、農場別では 52.6%）を確かめている。無菌的に採取した盲腸内容物サンプルを用いたこの調査結果は、生産段階すなわち農場においてすでに鶏群がこれらの菌に感染していることを示しており、その対応は容易ではない。このような汚染を、CODEX が推奨しているように食鳥処理段階における清浄鶏群および汚染鶏群の選別による交差汚染の予防だけで解決するためには、新たな展開が必要である。加えて、特にカンピロバクターはその増殖に微好気環境を要求するため、サルモネラと異なり、食鳥処理・加工以降の段階で増殖することはない。したがって、食中毒発生リスクを最小限に制御するためには、フードチェーンのなかで最も上流に位置する生産段階における制御とこれに関するリスク評価が必要不可欠である。しかしながら、農場は既存の法律が及びにくいいため、これまでその汚染実態を調査することは困難であった。このことは、リスクプロファイルにおいて農場に関する情報の不足が指摘されていることから明らかであり、その情報収集には農場側の協力が必須である。そこで、主任研究者は、これまでの調査で汚染率を確かめている東日本を生産本拠とするブロイラーインテグレーターである A 社および B 社（国内生産規模はいずれも 10 位以内）と当該地域の養鶏農場を対象にコンサルタント活動を行う C 研究所に働きかけ、これらの全面協力を得ることができた。本研究では、これらの傘下で経営されているブロイラー農場、孵卵場および種鶏農場の食中毒菌汚染実態に関する詳細なデータを収集し、比較・検討する。これはわが国初の試みであり、国内ブロイラー出荷羽数 6 億 690 万羽のうち 25%を生産する地域で膨大なデータが得られるため、わが国独自のリスク評価法構築に資するに足るものである。最終的に以上のデータに基づき、農場汚染制御に向けたシナリオの構築とこれによって得られる食中毒発生リスク減少の程度について検討する。本研究によって鶏肉中のカンピロバクターに関してさらに詳細なリスクプロファイルと現在不足しているデータを提供し、定量的リスク評価法の構築に貢献できる。

本研究は、ブロイラー農場、種鶏農場および孵卵場を対象としたアンケート調査や視察によってその生産規模、飼養形態、衛生管理などの特徴づけを行うとともに、盲腸便および鶏舎内外の環境検体を採材し各農場の鶏群におけるカンピロバクター汚染状況を調査する。加えて、鶏群の導入前、導入後、育成中および出荷直前に各種検体を経時的に採材し、カンピロバクター汚染状況の追跡調査を実施する。いずれの試験においても分離菌株を分子遺伝学的手法により解析する。以上のデータに基づき、1) 各農場の汚染状況と各種

変数との関連性の検索、2) 農場汚染リスクの高まる時期の推定、3) 菌株間の類縁性および地理的分布の関連性に関する検討、4) 各農場への食中毒菌の侵入経路の解明を行い、最終的には5) 農場汚染制御に向けたシナリオの構築と、これによって得られる食中毒発生リスク減少の程度に関する定量的なリスク評価につなげる。研究全体の体制、計画等は下図のとおりである。なお、◎は担当責任者とする。



2. 研究の成果

(1) 研究の成果と概要

1) 平成20年度研究成果の概要

1. ブロイラー農場における鶏群および鶏舎内外環境の汚染実態および物流調査（平成20年度計画）

目的： 各農場の汚染状況と各種変数との関連性と、各農場への食中毒菌の侵入経路を検討するため

方法： 上記既往成果に基づき、これまでにカンピロバクター汚染実態を把握している20農場を対象に生産規模、飼養形態、衛生管理などに関するアンケート調査を実施した。項目は以下の通り：飼育羽数、鶏種、鶏舎棟数、鶏舎構造（開放型あるいはウインドウレス型）、築後年数、経験年数、従業員数、換気方式、ファン数、カーテン、冷却パッド、舎内防水加工、飲水の方式、前室の有無、温度制御、農場内飼育動物、立ち入り制限、車両消毒、入口消毒、入口更衣室の有無、専用履物、各鶏舎での着替え、出入り回数、舎内での帽子・マスク・手袋の着用、履物の交換、踏込槽の消毒薬と交換頻度、服の交換頻度と消毒・洗濯、出荷後の鶏舎内消毒薬、鶏舎外の石灰散布、空舎期間、飲水消毒、防鳥ネットの有無、ネズミ駆除の方法と頻度、死鳥回収の頻度、生菌剤の使用、抗菌剤の使用、出荷日齢、年間出荷回数、出荷前の断餌時間。各項目に対する回答に基づき、農場をカンピロバクター汚染歴の有無によって分類し、Fisherの直接確率法あるいは χ^2 検定により汚染に寄与するあるいは関連するリスク因子を探索した。

結果： 20農場中19農場と高率にカンピロバクターに汚染されていたために、上記2種類の統計学的解析法ではいずれの項目も農場汚染のリスク因子とは特定されなかった。一方、*C. jejuni*汚染率は15%で、上記同様に統計学的解析では農場汚染のリスク因子は特定されなかった。

2. ブロイラー農場における同一鶏群の経時的汚染実態調査（平成20年度計画）

目的： 農場汚染リスクの高まる時期を推定するため

方法： 既往成果に基づき、ブロイラーインテグレーターAの契約農場のうち、カンピロバクター汚染歴のある5農場A～Eを対象に経時的にカンピロバクター検査を実施した。各農場より2鶏舎を試験対象とし、各鶏舎より①出荷後鶏舎消毒完了時に床2カ所、壁、ホッパーおよび外回り計5サンプルのドラッグスワブ、②1週齢、③3週齢、④5週齢および⑤7週齢時に各5サンプルの盲腸便を採取した。これらの計248サンプルについて、CEM培地により微好気環境にて37℃で増菌培養を行い、その後CCDA平板培地に塗抹して微好気環境にて37℃で培養した。得られたコロニーの一部を用いて鏡検により菌の大きさやコルク栓抜き運動を確認するとともに、*Campylobacter* spp、*C. jejuni*および*C. coli*に特異的な3種類のプライマーによるPCR法により菌種を同定し、-80℃で保存した。また、*C. jejuni*株についてはパルスフィールドゲル電気泳動（PFGE）法（後述の研究項目4）により遺伝子型別を行った。

結果： 表1に示す通り、農場BおよびCでカンピロバクター汚染が認められた。農場Cでは3週齢から高度の汚染が認められ、その後陽性率の変動に一定の傾向は見られなかった。いずれの菌株も*C. jejuni*であった。これらの菌株についてPFGE法により型別を行ったところ、図1のようにパターンAからKの11種類のパターンが得られた。このパターンを農場毎に要約したのが表2である。農場Cでは3、5および7週齢においてPFGEパターンは変動しており、さらに7週齢では近隣の農場Bと同一のパターンKが認められた。なお、表2および図1における赤色の線は、その前後で分離された菌株のPFGEパターンが大きく異なることを示している。

さらに、今年度に新築された2農場（ブロイラーインテグレーターAおよびBとそれぞれ契約）についても同様に経時的なカンピロバクター検査を実施しているが、現在まで汚染は確認されていない。

3. 種鶏場・孵卵場における汚染実態調査（平成21年度計画〔一部20年度に前倒しして実施〕）

目的： ブロイラー農場汚染に先行した汚染ひなの導入の可能性を明らかにするため

方法： ブロイラーインテグレーター2社の契約農場へひなを出荷している孵卵場4カ所（A～D）

農場への出荷数 1-5 万羽／日）を対象に、死籠り卵および虚弱ひなのカンピロバクター検査を実施した。

結果： 各孵卵場につき 2 ロット、1 ロットあたり死籠り卵 100 個と虚弱ひな 50 羽を調査対象とした。さらに、孵卵場 A および B では、卵は 10 個を個別に、残り 90 個を 5 個ずつプールし、ひなは 10 羽を個別に、残り 40 羽を 5 羽ずつプールし、それぞれ肝臓・脾臓混合、遺残卵黄および消化管混合の 3 種類を採材し、計 504 サンプルを検査した。孵卵場 C および D では卵は 100 個を 10 個ずつプール、ひなは 50 羽を 10 羽ずつプールし、それぞれ肝臓・脾臓・消化管混合サンプルと遺残卵黄の 2 種類を採材し、計 90 サンプルを検査した。その結果、いずれもカンピロバクターは陰性であった。

4. 全分離菌株の分子遺伝学的解析（平成 21 年度計画〔一部 20 年度に前倒しして実施〕）

目的： ブロイラー農場汚染に関与した菌株間の類縁性および地理的分布に関して検討するため

方法： 得られた菌株のゲノム DNA を *Sma*I および *Kpn*I で切断し、そのパターンを Fingerprinting II ソフトウェア（Biorad 社）を用いて比較・解析した。

結果： 前述の研究項目 2 を参照のこと。

5. データの総括

①農場のカンピロバクター汚染率が 95%と極端に高く、汚染要因を統計学的に特定することは不可能であった。また、*C. jejuni* に限った汚染率は 15%であったが、これに関しても汚染要因を統計学的に特定することは不可能であった。

②農場は 3 週齢以降にカンピロバクター汚染が認められたが、その後の陽性率の変動には一定の傾向は見られなかった。また、同一農場由来 *C. jejuni* 株の PFGE パターンについても変動が認められ、さらに 7 週齢では近隣に位置する農場で同一のパターンが認められた。

③調査した農場へ新規ひなを供給する 4 カ所の孵卵場からはカンピロバクターが検出されなかった。

<考察および結論>

本調査により、農場汚染の要因は明らかにはならなかったが、少なくとも孵卵場から供給されるひなは清浄であることから、ひな自体は汚染源ではなく、農場で何らかの汚染機会があるものと考えられる。また、現時点でのアンケート調査の統計学的分析からは、築後年数と汚染状況の間に関連は見いだされていないが、新築農場ではカンピロバクターフリーの状態を維持できているため、鶏舎の老朽化による出荷後洗浄消毒の不備が汚染の一因となる可能性は否定できない。3 週齢からカンピロバクターが検出され始めること、同一農場での PFGE パターンの変動と、7 週齢時における近隣農場との同一パターンの出現は、3 週齢以降に侵入汚染源が複数あることと、その後近隣地域内で汚染源あるいは保菌者（物）の移動があることを示唆している。これらの農場では、38 日齢頃に鶏群の一部を出荷する（俗に「中抜き」と呼ばれる）が、5 週齢と 7 週齢の間に実施されることから、特に捕鳥業者の出入りがカンピロバクター侵入の機会になっている可能性が十分考えられる。加えて、死鳥回収業者や飼料搬入車など、複数の農場を巡回する業者の関連も考慮する必要がある。

表 1
一 鶏 群

農場名	鶏舎番号	採材時期				
		消毒完了後	1 週齢	3 週齢	5 週齢	7 週齢
A	1	0/5 0(%)	0/5 0	0/5 0	0/5 0	0/5 0
	2	0/5 0	0/5 0	0/5 0	0/5 0	0/5 0
B	1	0/5 0	0/5 0	0/5 0	0/5 0	1/5 20
	6	0/5 0	0/5 0	0/5 0	0/5 0	3/4 75
C	1	0/5 0	0/5 0	5/5 100	0/5 0	1/5 20
	2	0/5 0	0/5 0	5/5 100	2/5 40	5/5 100
D	5	0/5 0	0/5 0	0/5 0	0/4 0	0/5 0
	6	0/5 0	0/5 0	0/5 0	0/5 0	0/5 0
E	1	0/5 0	0/5 0	0/5 0	0/5 0	0/5 0
	2	0/5 0	0/5 0	0/5 0	0/5 0	0/5 0

ブロイラー農場における同
の経時的汚染実態調査

表 2 同一鶏群の経時的汚染実態調査で得られた菌株の PFGE パターン

産地名	鶏舎番号	採材時期				
		消毒完了後	1週齢	3週齢	5週齢	7週齢
A	1	—	—	—	—	—
	2	—	—	—	—	—
B	1	—	—	—	—	K(2)
	6	—	—	—	—	K(3)
C	1	—	—	B(3) H(1) F(1) I(1) G(1) S(1)	—	J(2)
	2	—	—	A(2) F(1) B(10) G(1)	B(3) D(1) C(1) E(1)	J(10) K(6)
D	5	—	—	—	—	—
	6	—	—	—	—	—
E	1	—	—	—	—	—
	2	—	—	—	—	—

は、当該
示している。

カッコ内の数値
パターンを示した菌株数を

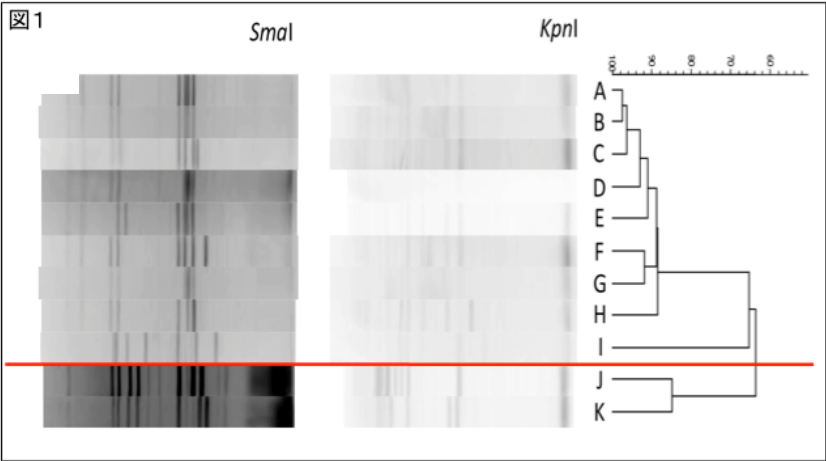


図 1

PFGE パターンの系統樹解

2) 平成 21 年度研究成果の詳細

1. ブロイラー農場における鶏群および鶏舎内外環境の汚染実態および物流調査（平成 21 年度継続）

目的： 各農場の汚染状況と各種変数との関連性と、各農場への食中毒菌の侵入経路を検討するため

方法： ブロイラーインテグレーターB（以下、「インテ B」という。）契約 16 農場を対象にカンピロバクター汚染状況を調査し、加えて生産規模、飼養形態、衛生管理などに関するアンケート調査を実施した。項目は以下の通り：飼育羽数、鶏種、鶏舎棟数、鶏舎構造（開放型あるいはウインドウレス型）、築後年数、経験年数、従業員数、換気方式、ファン数、カーテン、冷却パッド、舎内防水加工、飲水の方式、前室の有無、温度制御、農場内飼育動物、立ち入り制限、車両消毒、入口消毒、入口更衣室の有無、専用履物、各鶏舎での着替え、出入り回数、舎内での帽子・マスク・手袋の着用、履物の交換、踏込槽の消毒薬と交換頻度、服の交換頻度と消毒・洗濯、出荷後の鶏舎内消毒薬、鶏舎外の石灰散布、空舎期間、飲水消毒、防鳥ネットの有無、ネズミ駆除の方法と頻度、死鳥回収の頻度、生菌剤の使用、抗菌剤の使用、出荷日齢、年間出荷回数、出荷前の断餌時間。各項目に対する回答に基づき、農場をカンピロバクター汚染歴の有無によって分類し、Fisher の直接確率法あるいは χ^2 検定により汚染に寄与するあるいは関連するリスク因子を検索した。

結果： 全 104 検体を検査に用いた結果、インテ B 契約 16 農場のうち 3 農場（18.8%）からカンピロバクター属菌が分離されたのみで、統計学的解析による農場汚染リスク因子の特定には至らなかった。

2. ブロイラー農場における同一鶏群の経時的汚染実態調査（平成 21 年度継続）

目的： 農場汚染リスクの高まる時期を推定するため

方法： 既往成果に基づき、ブロイラーインテグレーターA（以下、「インテ A」という。）契約農場のうち、カンピロバクター汚染歴のある 3 農場 A～C を対象に経時的にカンピロバクター検査を実施した。各農場より 2 鶏舎を試験対象とし、各鶏舎より①出荷後に床、配電盤、入口、換気扇および側溝の計 5 検体、②鶏舎消毒完了時に前述 5 検体およびチックマットの計 6 検体、③ 1 週齢、④ 3 週齢、⑤ 5 週齢および⑥ 7 週齢時にサービスルーム、鶏舎前方、中央および後方の各 4 検体の牽引スワブを採取した。これらの検体について、CEM 培地により微好気環境にて 37℃で増菌培養を行い、その後 CCDA 平板培地に塗抹して微好気環境にて 37℃で培養した。得られたコロニーの一部を用いて鏡検により菌の大きさやコルク栓抜き運動を確認するとともに、*Campylobacter spp.*、*C. jejuni* および *C. coli* に特異的な 3 種類のプライマーによる PCR 法により菌種の同定を試みた。また、各インテと契約する農場のうち、平成 20 年度に建築された新規鶏舎（インテ A：1 農場 2 鶏舎、50 検体；インテ B：2 農場 4 鶏舎 169 検体）に関しても同様に数サイクルにわたって調査を継続した。さらに、鶏および関連環境材料からのカンピロバクター分離・培養法の標準化および最適化の一助として、カンピロバクター検査において可能な限り 2 種類以上の増菌培養法を使用し、その検出精度を比較検討する。

結果： 全 374 検体について検査したが、いずれの農場からもカンピロバクターは検出されなかった。新築鶏舎についても計 219 検体を検査したが、いずれのインテと契約する農場においてもカンピロバクター汚染は確認されなかった。したがって、カンピロバクター分離・培養法の標準化に向けた試験を実際の検体を用いて行ったものの、評価は不可能であった。そこで、既知の菌濃度の溶液を用いて CEM、ボルトンおよびプレストンの各増菌培地の増菌効率を評価した。その結果、表 3 に示すように、CEM（馬脱線血）では増菌効率があまり良くないことが明らかとなったのに対し、CEM（馬溶血液）、ボルトンおよびプレストン増菌培地では、最大 10⁸CFU/mL まで増菌することができた。

3. 種鶏場・孵卵場における汚染実態調査（平成 21 年度継続）

目的： ブロイラー農場汚染に先行した汚染ひなの導入の可能性を明らかにするため

方法： インテ B 契約孵卵場へ種卵を出荷している種鶏場から 10 羽の血清サンプルを入手し、抗

カンピロバクター抗体検査を実施した。さらに、前年度に行った調査において、両インテの各契約農場へひなを出荷している孵卵場で入手した虚弱ひな体内から採取・保管しておいた遺残卵黄についても抗カンピロバクター抗体検査を実施した。血清サンプルは100倍希釈して供し、血清IgGの検出にはSahinらの方法に従ってELISAを行い、抗*C. jejuni*抗体（血清IgG）レベルの測定を行った。一方、遺残卵黄サンプルについては250倍希釈でELISAに供した。

結果：種鶏の血清抗体（IgG）レベルを図2に示す。ポジティブコントロールとして、当研究室保存の*C. jejuni*攻撃地鶏の血清を用い、ネガティブコントロールとして同ロットのコントロール群の地鶏の血清を用いた。種鶏の血清抗体レベルはポジティブコントロールの血清レベルと同様に高かったため、抗カンピロバクター抗体を保有していると考えられる。次に250倍希釈した遺残卵黄を用いた結果を図3に示す。ポジティブコントロールおよびネガティブコントロールは上記を用いた。遺残卵黄のIgGレベルはポジティブコントロールと同様に高かった。また、測定値の高値が抗体の存在によるのか卵黄の性質によるのかを確認するため、プレートに固相化する抗原を*C. jejuni*抗原以外に*Salmonella*抗原と希釈液のみを用いて行ったELISAの結果を図4に示す。*C. jejuni*抗原を固相化した時に吸光度の数値が最も高かったことから、得られた結果は抗カンピロバクター抗体が移行抗体として卵黄に含まれていることを示唆していると考えられた。

4. 全分離菌株の分子遺伝学的解析（平成21年度継続）

目的：ブロイラー農場汚染に関与した菌株間の類縁性および地理的分布に関して検討するため

方法：得られた菌株のゲノムDNAを*Sma*Iおよび*Kpn*Iで切断し、そのパターンをFingerprinting IIソフトウェア（Biorad社）を用いて比較・解析した。

結果：平成21年度は、研究項目1.において得られた数株のみが新規に分離された*C. jejuni*であったが、分離直後に新鮮な状態で-80℃に保存したにもかかわらず、これを培地に塗抹しても復帰させることができなかったため、これらの分離株については分子遺伝学的解析を行うことはできなかった。また、前年度に得られた菌株のうち解析未了のものについて分子遺伝学的解析を継続したが、前年度の結果に加えるべき新たな菌株やバンドパターンを得ることはなかった。

5. データの総括

①インテB契約16農場でもカンピロバクターの低汚染率（18.8%）が認められたため、同様の汚染要因の特定にはいたらなかった。なお、インテBから得た社内データによると、前年度は5農場（31.3%）で汚染が認められていたことから、1年間で2農場ではあるが汚染が減少したようである。

②新築農場では、最初のひな導入以降研究期間を通して全くカンピロバクターが検出されなかった。

③ひな体内の遺残卵黄や種鶏血清における抗カンピロバクター抗体の存在が示唆された。この結果は、3週齢以前のひながカンピロバクター汚染を受けにくいことを部分的に説明できる可能性がある。

<考察および結論>

我々の2005-6年に行った調査結果よりもカンピロバクター汚染率は低下しているように見受けられる。ただし、実際に農場汚染率が低下したとも考えられるが、あるいはインテ間での経営方針や農場への指導などの違い、検査年度の違いや季節性がカンピロバクター汚染に関与している可能性は否定できない。前年度の結果から、特に捕鳥業者、死鳥回収業者や飼料搬入車などの複数の農場を巡回する業者の関連も考慮する必要があったが、これらに関する詳細な情報を得ることはできなかった。一方、種鶏血清における抗カンピロバクター抗体の存在は種鶏の潜在的汚染を示唆しているが、種鶏場は一般的にコマーシャル農場よりも厳しいバイオセキュリティ下で鶏を飼育しているため、その可能性は考えにくい。今後さらに調査が必要と考えられる。また、今回見いだされた移行抗体の存在は、3週齢以前のひなにおけるカンピロバクター汚染抵抗性に何らかの形で寄与しているものと推察される。

表 3：増菌培地の増菌効率の比較

増菌培地	接種菌液菌数	直接塗抹時菌数	1 日増菌後菌数
CEM(脱線血)	5.10	5.57-5.81	4.54-4.63
	3.10	3.51-3.72	2.40
	1.10	0-2.40	0-2.40
CEM(溶血液)	5.10	5.57-5.74	8.20-8.59
	3.10	2.88-3.72	8.38-8.60
	1.10	0.00	7.92-8.34
ボルトン	5.10	4.41-4.53	6.69-6.75
	3.10	2.88-3.00	8.17-8.46
	1.10	0.00	8.41
プレストン	5.10	5.44-5.81	8.40-8.77
	3.10	3.72-3.76	8.71-8.48
	1.10	0.00	8.38-8.39

いずれの数値も菌数($\log_{10}$ CFU/mL)を示す。

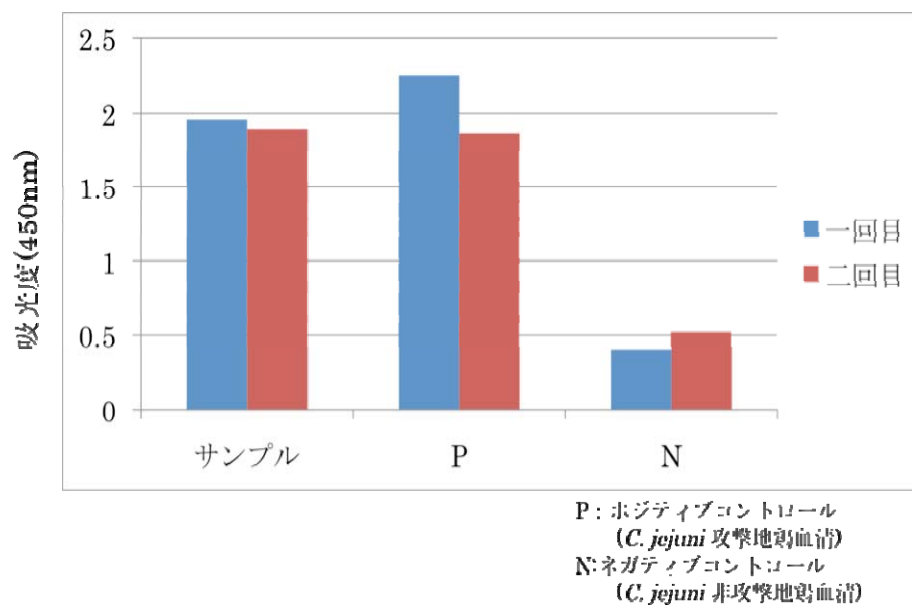


図2：種鶏の血清抗カンピロバクターIgG レベル

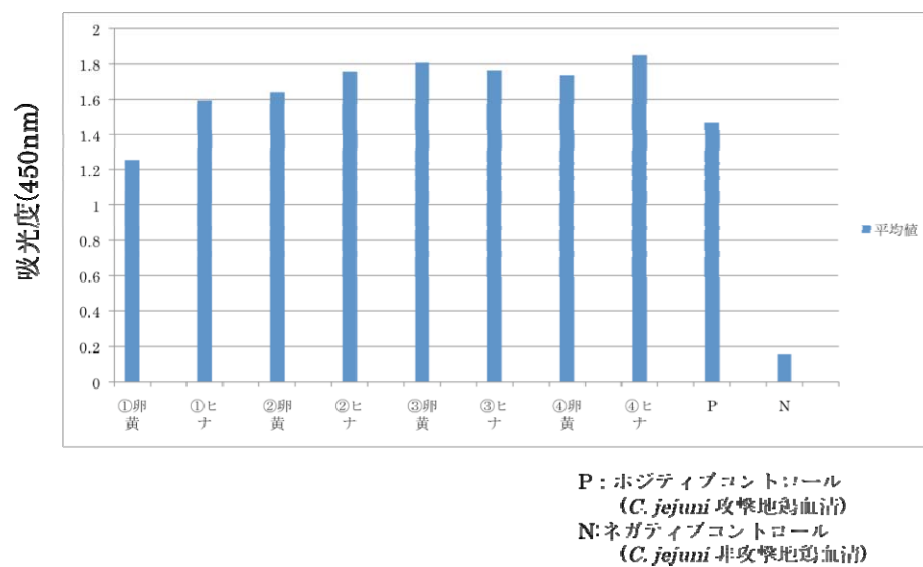


図3：虚弱ひなの遺残卵黄抗カンピロバクターIgG レベル

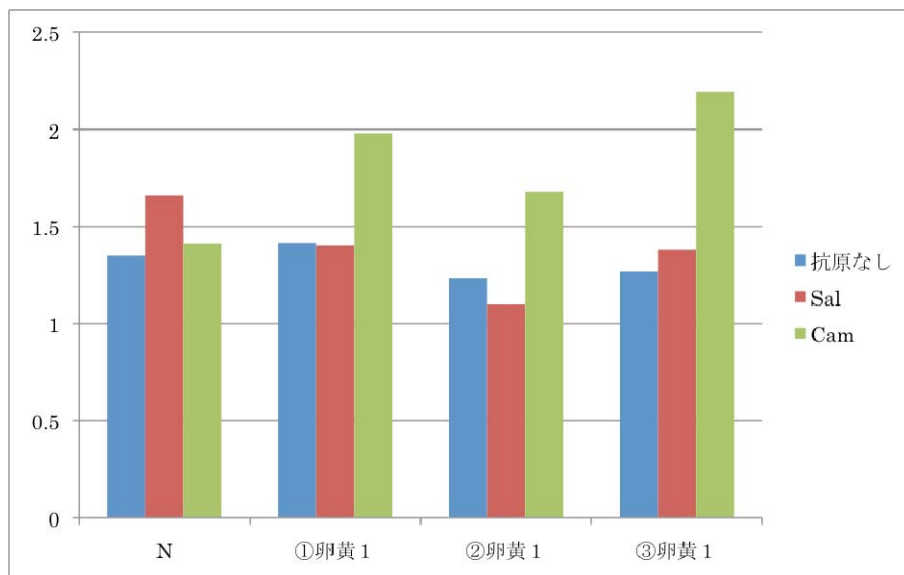


図4：固相化抗原の種類による ELISA 測定値の変化

N はネガティブコントロールとしてカンピロバクター非感染鶏由来鶏卵の卵黄を使用。

3) 2年間の研究成果のまとめ

1. ブロイラー農場における鶏群および鶏舎内外環境の汚染実態および物流調査（平成 20 および 21 年度計画）

目的： 各農場の汚染状況と各種変数との関連性と、各農場への食中毒菌の侵入経路を検討するため

方法： 上記既往成果に基づき、これまでにカンピロバクター汚染実態を把握しているインテ A 契約 20 農場を対象に生産規模、飼養形態、衛生管理などに関するアンケート調査を実施した。項目は以下の通り：飼育羽数、鶏種、鶏舎棟数、鶏舎構造（開放型あるいはウインドウレス型）、築後年数、経験年数、従業員数、換気方式、ファン数、カーテン、冷却パッド、舎内防水加工、飲水の方式、前室の有無、温度制御、農場内飼育動物、立ち入り制限、車両消毒、入口消毒、入口更衣室の有無、専用履物、各鶏舎での着替え、出入り回数、舎内での帽子・マスク・手袋の着用、履物の交換、踏込槽の消毒薬と交換頻度、服の交換頻度と消毒・洗濯、出荷後の鶏舎内消毒薬、鶏舎外の石灰散布、空舎期間、飲水消毒、防鳥ネットの有無、ネズミ駆除の方法と頻度、死鳥回収の頻度、生菌剤の使用、抗菌剤の使用、出荷日齢、年間出荷回数、出荷前の断餌時間。各項目に対する回答に基づき、農場をカンピロバクター汚染歴の有無によって分類し、Fisher の直接確率法あるいは χ^2 検定により汚染に寄与するあるいは関連するリスク因子を検索した。さらに、インテ B 契約 16 農場についてもカンピロバクター汚染状況を検査し、同様のアンケート調査を実施した。

結果： インテ A では、20 農場中 19 農場と高率にカンピロバクター属菌に汚染されていたために、上記 2 種類の統計学的解析法ではいずれの項目も農場汚染のリスク因子とは特定されなかった。一方、*C. jejuni* 汚染率に限ると 3 農場（15%）にとどまり、上記同様に統計学的解析では農場汚染のリスク因子は特定されなかった。また、インテ B 契約 16 農場に関しても、3 農場（18.8%）からカンピロバクター属菌が分離されたのみで、統計学的解析による農場汚染リスク因子の特定には至らなかった。

2. ブロイラー農場における同一鶏群の経時的汚染実態調査（平成 20 および 21 年度計画）

目的： 農場汚染リスクの高まる時期を推定するため

方法： 既往成果に基づき、インテ A 契約農場のうち、カンピロバクター汚染歴のある 5 農場 A～E を対象に経時的にカンピロバクター検査を実施した。各農場より 2 鶏舎を試験対象とし、各鶏舎より①出荷後鶏舎消毒完了時に床 2 カ所、壁、ホッパーおよび外回り計 5 サンプルのドラッグスワブ、②1 週齢、③3 週齢、④5 週齢および⑤7 週齢時に各 5 サンプルの盲腸便を採取した。これらのサンプルについて、CEM 培地により微好気環境にて 37℃で増菌培養を行い、その後 CCDA 平板培地に塗抹して微好気環境にて 37℃で培養した。得られたコロニーの一部を用いて鏡検により菌の大きさやコルク栓抜き運動を確認するとともに、*Campylobacter* spp、*C. jejuni* および *C. coli* に特異的な 3 種類のプライマーによる PCR 法により菌種を同定し、-80℃で保存した。*C. jejuni* 株についてはパルスフィールドゲル電気泳動（PFGE）法（後述の研究項目 4）により遺伝子型別を行った。同様に、インテ A 契約農場のうち、カンピロバクター汚染歴のある 3 農場 A～C を対象に経時的にカンピロバクター検査を実施した。各農場より 2 鶏舎を試験対象とし、各鶏舎より①出荷後に床、配電盤、入口、換気扇および側溝の計 5 検体、②鶏舎消毒完了時に前述 5 検体およびチックマットの計 6 検体、③1 週齢、④3 週齢、⑤5 週齢および⑥7 週齢時にサービスルーム、鶏舎前方、中央および後方の各 4 検体の牽引スワブを採取し、カンピロバクターの分離を試みた。また、各インテと契約する農場のうち、平成 20 年度に建築された新規鶏舎（インテ A：1 農場 2 鶏舎、50 検体；インテ B：2 農場 4 鶏舎 169 検体）に関しても同様に数サイクルにわたって調査を継続した。さらに、鶏および関連環境材料からのカンピロバクター分離・培養法の標準化および最適化の一助として、カンピロバクター検査において可能な限り 2 種類以上の増菌培養法を使用し、その検出精度を比較検討した。

結果： 5 農場の検査では、全 248 検体が得られた。表 1 に示す通り、農場 B および C でカンピロバクター汚染が認められた。農場 C では 3 週齢から高度の汚染が認められ、その後陽性率の変

動に一定の傾向は見られなかった。いずれの菌株も *C. jejuni* であった。これらの菌株について PFGE 法により型別を行ったところ、図 1 のようにパターン A から K の 11 種類のパターンが得られた。このパターンを農場毎に要約したのが表 2 である。農場 C では 3、5 および 7 週齢において PFGE パターンは変動しており、さらに 7 週齢では近隣の農場 B と同一のパターン K が認められた。なお、図 1 および表 2 における赤色の線は、その前後で分離された菌株の PFGE パターンが大きく異なることを示している。3 農場の検査では全 374 検体を得られたが、いずれの農場からもカンピロバクターは検出されなかった。新築鶏舎についても計 219 検体を検査したが、いずれのインテと契約する農場においてもカンピロバクター汚染は確認されなかった。したがって、カンピロバクター分離・培養法の標準化に向けた試験を実際の検体を用いて行ったものの、評価は不可能であった。そこで、既知の菌濃度の溶液を用いて CEM、ボルトンおよびプレストンの各増菌培地の増菌効率を評価した。その結果、表 3 に示すように、CEM（馬脱線血）では増菌効率があまり良くないことが明らかとなったのに対し、CEM（馬溶血液）、ボルトンおよびプレストン増菌培地では、最大 10^8 CFU/mL まで増菌することができた。

3. 種鶏場・孵卵場における汚染実態調査（平成 20 および 21 年度計画）

目的： ブロイラー農場汚染に先行した汚染ひなの導入の可能性を明らかにするため

方法： インテ 2 社の各契約農場へひなを出荷している孵卵場 4 カ所（A～D：農場への出荷数 1-5 万羽/日）を対象に、死籠り卵および虚弱ひなのカンピロバクター検査を実施した。続いて、インテ B 契約孵卵場へ種卵を出荷している種鶏場から 10 羽の血清サンプルを入手し、抗カンピロバクター抗体検査を実施した。さらに、20 年度に行った調査において、両インテの各契約農場へひなを出荷している孵卵場で入手した虚弱ひな体内から採取・保管しておいた遺残卵黄についても抗カンピロバクター抗体検査を実施した。血清サンプルは 100 倍希釈して供し、血清 IgG の検出には Sahin らの方法に従って ELISA を行い、抗 *C. jejuni* 抗体（血清 IgG）レベルの測定を行った。一方、遺残卵黄サンプルについては 250 倍希釈で ELISA に供した。

結果： 各孵卵場につき 2 ロット、1 ロットあたり死籠り卵 100 個と虚弱ひな 50 羽を調査対象とした。さらに、孵卵場 A および B では、卵は 10 個を個別に、残り 90 個を 5 個ずつプールし、ひなは 10 羽を個別に、残り 40 羽を 5 羽ずつプールし、それぞれ肝臓・脾臓混合、遺残卵黄および消化管混合の 3 種類を採材し、計 504 サンプルを検査した。孵卵場 C および D では卵は 100 個を 10 個ずつプール、ひなは 50 羽を 10 羽ずつプールし、それぞれ肝臓・脾臓・消化管混合サンプルと遺残卵黄の 2 種類を採材し、計 90 サンプルを検査した。その結果、いずれもカンピロバクターは陰性であった。

種鶏の血清抗体（IgG）レベルを図 2 に示す。ポジティブコントロールとして、当研究室保存の *C. jejuni* 攻撃地鶏の血清を用い、ネガティブコントロールとして同ロットのコントロール群の地鶏の血清を用いた。種鶏の血清抗体レベルはポジティブコントロールの血清レベルと同様に高かったため、抗カンピロバクター抗体を保有していると考えられる。次に 250 倍希釈した遺残卵黄を用いた結果を図 3 に示す。ポジティブコントロールおよびネガティブコントロールは上記を用いた。遺残卵黄の IgG レベルはポジティブコントロールと同様に高かった。また、測定値の高値が抗体の存在によるのか卵黄の性質によるのかを確認するため、プレートに固相化する抗原を *C. jejuni* 抗原以外に *Salmonella* 抗原と希釈液のみを用いて行った ELISA の結果を図 4 に示す。*C. jejuni* 抗原を固相化した時に吸光度の数値が最も高かったことから、得られた結果は抗カンピロバクター抗体が移行抗体として卵黄に含まれていることを示唆していると考えられた。

4. 全分離菌株の分子遺伝学的解析（平成 20 および 21 年度計画[一部 20 年度に前倒しして実施]）

目的： ブロイラー農場汚染に関与した菌株間の類縁性および地理的分布に関して検討するため

方法： 得られた菌株のゲノム DNA を *Sma*I および *Kpn*I で切断し、そのパターンを Fingerprinting II ソフトウェア（Biorad 社）を用いて比較・解析した。

結果： 前述の研究項目 2 を参照のこと。

5. データの総括

①インテ A 契約 20 農場の *C. jejuni* による汚染率は 15%と低く、農場の汚染要因を統計学的に特定することは困難であった。インテ B 契約 16 農場でもカンピロバクターの低汚染率（18.8%）が認められたため、同様の汚染要因の特定にはいたらなかった。なお、インテ B から得た社内データによると、前年度は 5 農場（31.3%）で汚染が認められていたことから、1 年間で 2 農場ではあるが汚染が減少したようである。

②農場は 3 週齢以降にカンピロバクター汚染が認められたが、その後の陽性率の変動には一定の傾向は見られなかった。また、同一農場由来 *C. jejuni* 株の PFGE パターンについても変動が認められ、さらに 7 週齢では近隣に位置する農場で同一のパターンが認められた。一方、新築農場では、最初のひな導入以降研究期間を通して全くカンピロバクターが検出されなかった。

③調査した農場へ新規ひなを供給する 4 カ所の孵卵場からはカンピロバクターが検出されなかった。しかし、ひな体内の遺残卵黄や種鶏血清における抗カンピロバクター抗体の存在が示唆された。この結果は、3 週齢以前のひながカンピロバクター汚染を受けにくいことを部分的に説明できる可能性がある。

<考察および結論>

我々の 2005-6 年に行った調査結果よりもカンピロバクター汚染率は低下していた。ただし、実際に汚染率が低下したとも考えられるが、あるいはインテ間での経営方針や農場への指導などの違い、検査年度の違いや季節性がカンピロバクター汚染に関与している可能性は否定できない。いずれにしても、農場汚染の要因は明らかにはならなかったが、少なくとも孵卵場から供給されるひなは清浄であることから、ひな自体は汚染源ではなく、農場で何らかの汚染機会があるものと考えられる。また、現時点でのアンケート調査の統計学的分析からは、築後年数と汚染状況の間に関連は見いだされていないが、新築農場ではカンピロバクターフリーの状態を維持できているため、鶏舎の老朽化による出荷後洗浄消毒の不備が汚染の一因となる可能性は否定できない。3 週齢からカンピロバクターが検出され始めること、同一農場での PFGE パターンの変動と、7 週齢時における近隣農場との同一パターンの出現は、3 週齢以降に侵入汚染源が複数あることと、その後近隣地域内で汚染源あるいは保菌者（物）の移動があることを示唆している。これらの農場では、38 日齢頃に鶏群の一部を出荷する（俗に「中抜き」と呼ばれる）が、5 週齢と 7 週齢の間に実施されることから、特に捕鳥業者の出入りがカンピロバクター侵入の機会になっている可能性が十分考えられる。加えて、死鳥回収業者や飼料搬入車など、複数の農場を巡回する業者の関連も考慮する必要がある。本研究では、これらに関する詳細な情報を得ることはできなかったが、農場汚染制御に向けたシナリオとして、農場での飼育管理従事者や経営者あるいは関連業者の教育／啓発が重要と考えられた。なお、その効果、とくに関連業者の教育／啓発の効果を数値化するためには、もう一步踏込んだ調査が必要であろう。一方、種鶏血清における抗カンピロバクター抗体の存在は種鶏の潜在的汚染を示唆しているが、種鶏場は一般的にコマーシャル農場よりも厳しいバイオセキュリティ下で鶏を飼育しているため、その可能性は考えにくい。今後さらに調査が必要と考えられる。また、今回見いだされ

た移行抗体の存在は、3 週齢以前のひなにおけるカンピロバクター汚染抵抗性に何らかの形で寄与しているものと推察される。

表 1：ブロイラー農場における同一鶏群の経時的汚染実態調査

農場名	鶏舎番号	採材時期				
		消毒完了後	1 週齢	3 週齢	5 週齢	7 週齢
A	1	0/5 0(%)	0/5 0	0/5 0	0/5 0	0/5 0
	2	0/5 0	0/5 0	0/5 0	0/5 0	0/5 0
B	1	0/5 0	0/5 0	0/5 0	0/5 0	1/5 20
	6	0/5 0	0/5 0	0/5 0	0/5 0	3/4 75
C	1	0/5 0	0/5 0	5/5 100	0/5 0	1/5 20
	2	0/5 0	0/5 0	5/5 100	2/5 40	5/5 100
D	5	0/5 0	0/5 0	0/5 0	0/4 0	0/5 0
	6	0/5 0	0/5 0	0/5 0	0/5 0	0/5 0
E	1	0/5 0	0/5 0	0/5 0	0/5 0	0/5 0
	2	0/5 0	0/5 0	0/5 0	0/5 0	0/5 0

表 2：同一鶏群の経時的汚染実態調査で得られた菌株 PFGE パターン

農場名	鶏舎番号	採材時期				
		消毒完了後	1週齢	3週齢	5週齢	7週齢
A	1	—	—	—	—	—
	2	—	—	—	—	—
B	1	—	—	—	—	K(3)
	6	—	—	—	—	K(9)
C	1	—	—	B(3) H(1) F(1) K(1) G(1) S(1)	—	J(3)
	2	—	—	A(2) F(1) B(10) G(1)	B(2) D(1) C(1) E(1)	J(10) K(5)
D	5	—	—	—	—	—
	6	—	—	—	—	—
E	1	—	—	—	—	—
	2	—	—	—	—	—

カッコ内の数

値は、当該パターンを示した菌株数を示している。

表 3：増菌培地の増菌効率の比較

増菌培地	接種菌液菌数 ($\log_{10}$ CFU/mL)	直接塗抹時菌数	1日増菌後菌数
CEM(脱線血)	5.10	5.57–5.81	4.54–4.63
	3.10	3.51–3.72	2.40
	1.10	0–2.40	0–2.40
CEM(溶血液)	5.10	5.57–5.74	8.20–8.59
	3.10	2.88–3.72	8.38–8.60
	1.10	0.00	7.92–8.34
ボルトン	5.10	4.41–4.53	6.69–6.75
	3.10	2.88–3.00	8.17–8.46
	1.10	0.00	8.41
プレストン	5.10	5.44–5.81	8.40–8.77
	3.10	3.72–3.76	8.71–8.48
	1.10	0.00	8.38–8.39

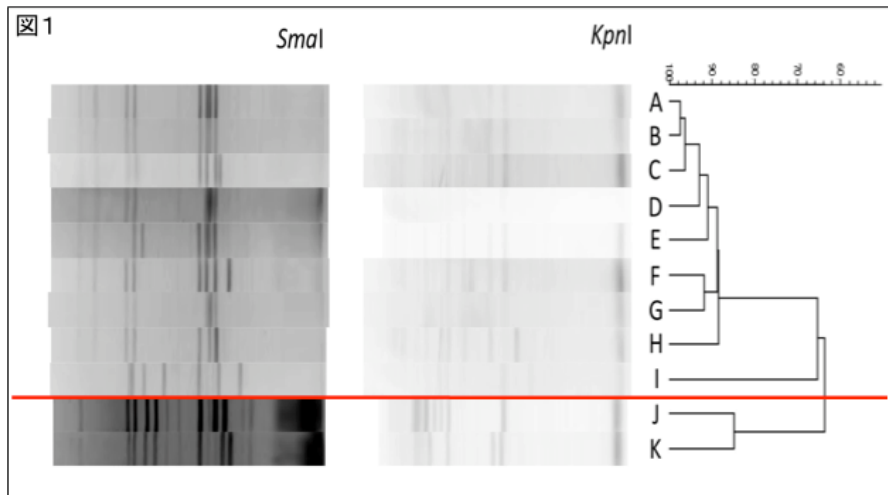


図1：PFGE パターンの系統樹解析

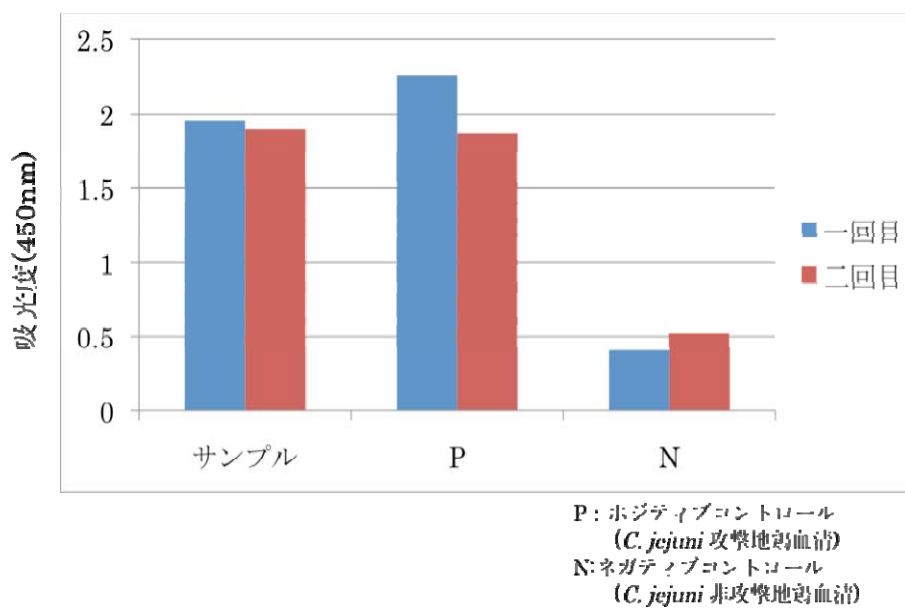


図2：種鶏の血清抗カンピロバクターIgG レベル

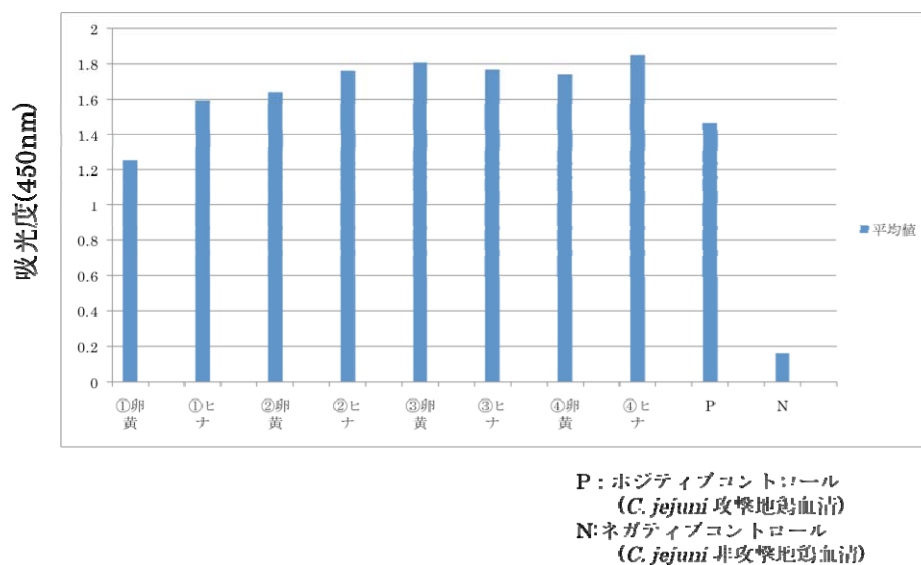


図3：虚弱ひなの遺残卵黄抗カンピロバクターIgG レベル

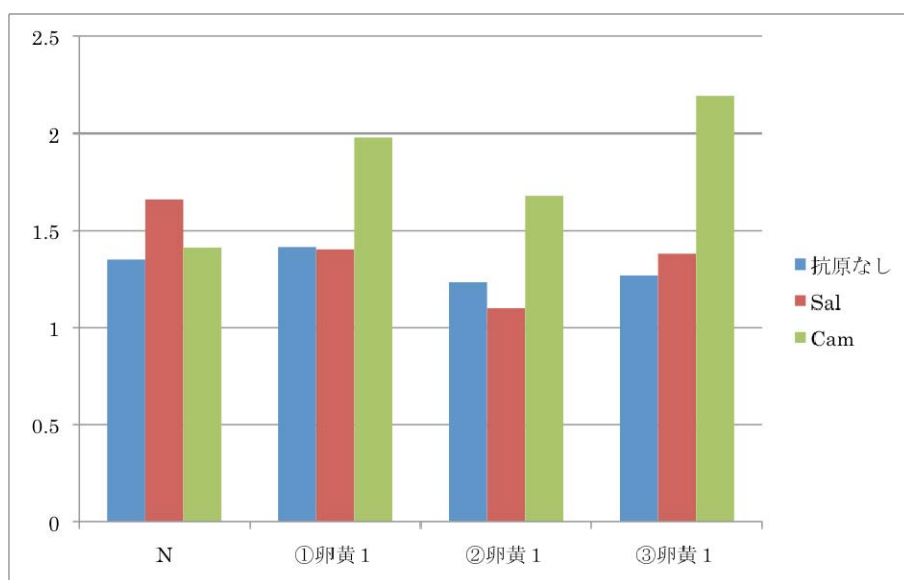


図4：固相化抗原の種類による ELISA 測定値の変化

Nはネガティブコントロールとしてカンピロバクター非感染鶏由来鶏卵の卵黄を使用。

(2) 本研究を基に発表した論文と掲載された雑誌名のリスト（論文は、添付すること。）

なし (Potential risk factors for *Campylobacter jejuni* contamination of broiler farms in Japan (仮) として、2010 年中に Applied and Environmental Microbiology 誌等に投稿・発表予定)

(3) 特許及び特許出願の数と概要

なし

(4) その他（各種受賞、プレスリリース、開発ソフト・データベースの構築等）

なし

3 今後の問題点等

2年にわたって2社のインテグレーター契約農場全36ヵ所において、カンピロバクター汚染状況を調査し、アンケート調査を行ったが、当初の予想よりも陽性率が低く、40以上に及ぶ項目のいずれもリスク因子に該当しないという結果に終わった。

一方、当初の計画では、今年度は我々が自ら農場を訪問し採材を行う予定であったが、農場側にとっても今回の調査はメリットがあるとのことで、採材したものを農場負担で当研究室に送付する旨申し出が強く、これを当研究室で検査するという前年度の形態を引き続き踏襲することとなった。