

第1章 養鶏場環境及び鶏からの試料収集及びカンピロバクター 遺伝子の検出

東京大学大学院農学生命科学研究科附属食の安全研究センター
竹下奈知子、潘雅琪、新井沙倉、渡辺孝康、黒木香澄、関崎勉

1. はじめに

国内のブロイラー養鶏場から様々な試料を収集し、鶏へのカンピロバクター侵入の契機と経路を推定することを目的として、各試料に含まれるカンピロバクターの有無を調査した成績について報告します。本章で収集した試料は2、3章にも用いました。

2. 事業実施方法

国内の4か所の養鶏場(養鶏場A、B、C、D)から盲腸便、通常便などの生体試料を計267検体、餌箱、ファン、給水器、長靴などの環境試料を計357検体収集しました。平成28年度には3回試料を収集し、3回目は2回目に収集した鶏が出荷された後の空舎期間に行いました。平成29年度には、1週間に1度、6週間連続の試料収集を複数回行いました。収集した試料は市販のキットを用いてDNAを抽出し、Nested PCR [1]でカンピロバクター遺伝子の有無を確認しました。

3. 事業実施成果

平成28年度に収集した試料では、1回目では養鶏場Cが、2回目では養鶏場AとBがカンピロバクター遺伝子陽性でした。また、空舎期間に収集した試料は全てカンピロバクター遺伝子陰性でした。

平成29年度に収集した試料における成績を表1に示しました。すなわち、1～6週齢の全ての時期で本菌遺伝子陽性の試料が確認されました。また、4週齢以降の試料の方がそれ以前の週齢よりもカンピロバクター遺伝子が高い陽性率で存在しました。

表 1. 平成 29 年度収集試料における遺伝子調査の成績

養鶏場	試料収集時の週齢					
	1週齢	2週齢	3週齢	4週齢	5週齢	6週齢
A	+	-	-	+	+	+
B	-	-	-	+	+	+
C	+	-	-	+	-	+
D	-	+	+	+	+	+

- : 全ての試料が陰性
+ : 収集した試料の中に陽性試料が存在

4. 考察

平成 28 年度の成績より、汚染養鶏場は汚染状態を維持しているわけではなく、時期によって汚染、非汚染は変動することが明らかとなりました。また、空舎期間に収集した試料において、2 回目の採材で陽性だった養鶏場 A、B を含め、全ての試料が陰性だったことから、出荷後の清掃、乾燥でカンピロバクター遺伝子が検出できない程度まで排除されることが示されました。養鶏場敷地内に汚染源がある場合、汚染養鶏場は常に汚染状態を維持することが予想されます。従って、養鶏場敷地内には汚染源がないことが推定されました。さらに、消毒槽にて消毒を行った後の長靴からカンピロバクターが検出されたことから、消毒槽は本菌の除去という点では十分な効果があるとは言えず、長靴を介して鶏舎内外、また、養鶏場内外でカンピロバクターの伝播が起きる可能性が示されました。

平成 29 年度の調査では時系列的にカンピロバクターの存在を追いました。その結果、カンピロバクターの侵入は 1 週齢目から確認され、かつ不特定の時期に起きている様子が観察されました。特定の時期に集中して汚染が起きるのではなく、無作為に汚染が起きていることから、鶏舎に入る頻度が高いと推定される飼育員が本菌の侵入に最も関与している可能性が高いと考えられました。

5. 引用文献

1. Inglis, G. D., & Kalischuk, L. D. (2003). Use of PCR for direct detection of *Campylobacter* species in bovine feces. *Applied and environmental microbiology*, 69(6), 3435-3447.

第2章 16S rRNA 遺伝子増幅産物によるメタゲノム解析

東京大学大学院農学生命科学研究科附属食の安全研究センター
竹下奈知子、潘雅琪、新井沙倉、渡辺孝康、黒木香澄、関崎勉

1. はじめに

カンピロバクターが養鶏場に侵入する際、本菌単独で侵入するのではなく、汚染源で共存する他の細菌も同時に侵入することが予想されます。そこで、本菌が養鶏場に侵入する前後における細菌叢の変化を観察し、汚染源で本菌と一緒に共存する細菌を推定した成績について以下に報告します。

2. 事業実施方法

1章で抽出したDNAにおける16S rRNA 遺伝子のV3-V4領域を、PCRを用いて増幅し、MiSeq (Illumina, CA, U.S.A.) を用いて塩基配列を決定しました。決定した塩基配列はIM-TORNADO [1]とよばれる16S rRNA メタゲノム解析用のパイプラインを用いて処理を行いました。また、各試料に存在する構成細菌やその比率、試料間の関連性などをQuantitative Insights Into Microbial Ecology (QIIME) [2]とR言語 [3]を用いて精査しました。

3. 事業実施成果

生体試料においては、盲腸便と通常便は構成細菌が異なること、および盲腸便の主要な構成細菌は週齢間で大きな差がないことが示されました。環境試料においては餌箱とファン、長靴の主要な構成細菌が似ているのに対し、給水器は異なる構成細菌を有していました。

汚染試料と非汚染試料における構成細菌の違いを明らかにするために、Linear discriminant analysis (LDA) effect size (LEfSe) 解析[4]を行いました。LEfSe解析ではLDAスコアが大きいほど各試料群を特徴付けている細菌といえます。平成28年度に行った解析では13種類の汚染試料に特徴的な細菌と、8種類の非汚染試料に特徴的な細菌が確認されました。また、平成29年度に行った解析では8種類の汚染試料に特徴的な細菌と、3種類の非汚染試料に特徴的な細菌が確認されました。平成28年度と29年度の成績で共通して確認できたのは *Porphyromonadaceae* だけでした。

4. 考察

盲腸便の主要な構成細菌は *Lactobacillus*、*Lachnospiraceae*、*Ruminococcaceae* であり、この 3 菌種で全体の 40 %以上を占めていました。この構成は汚染・非汚染養鶏場間、また、鶏の週齢によらず同じであり、細菌叢の変化を観察するためには主要な構成細菌ではなく、存在率の低い細菌の観察が必要だと考えられました。

存在率の低い細菌も考慮して構成細菌を比較すると、平成 28 年度では 13 種類の、平成 29 年度では 8 種類の汚染試料に特徴的な細菌が確認されました。これらの細菌は汚染源でカンピロバクターと共存している可能性があります。今後、さらに継続的な観察を行い、普遍的に本菌と共存する細菌を特定することで、カンピロバクター汚染防除法の開発につながる可能性があると思われます。

第 1 章および第 2 章の成績を合わせると、カンピロバクターの汚染源は養鶏場外にあり、鶏舎に頻繁に出入りしている飼育員などが長靴を介して本菌を鶏舎内に持ち込んでいることが示唆されました。また、16S rRNA 解析により、汚染源で本菌と共存している可能性がある細菌を複数種類確認することができました。以上の成果から、本菌の侵入経路と推測される長靴を履き替える場所や、その消毒法を見直し、鶏舎内外の区域を完全に分けるなど、鶏舎に本菌を持ち込まないための対策を講じることで、鶏への本菌汚染を防止できることが明らかとなりました。

5. 引用文献

1. Jeraldo, P., Kalari, K., Chen, X., Bhavsar, J., Mangalam, A., White, B., Nelson, H., Kocher, J., & Chia, N. (2014). IM-TORNADO: a tool for comparison of 16S reads from paired-end libraries. PLoS One, 9(12), e114804.
2. Caporaso, J. G., Kuczynski, J., Stombaugh, J., Bittinger, K., Bushman, F. D., Costello, E. K., Fierer, N., Pena, A. G., Goodrich, J. K., Gordon, J. I., Huttley, G. A., Kelley, S. T., Knights, D., Koenig, J. E., Ley, R. E., Lozupone, C. A., Donald, D. M., Muegge, B. D., Pirrung, M., Reeder, J., Sevinsky, J. R., Turnbaugh, P. J., Walters, W. A., Widmann, J., Yatsunenko, T., Zaneveld, J & Knight, R. (2010). QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. Nature methods, 7(5), 335-336.
3. Ihaka, R., & Gentleman, R. (1996). R: a language for data analysis and graphics. Journal of computational and graphical statistics, 5(3), 299-314.
4. Segata, N., Izard, J., Waldron, L., Gevers, D., Miropolsky, L., Garrett, W. S., & Huttenhower, C. (2011). Metagenomic biomarker discovery and explanation. Genome biology, 12(6), R60.

本事業では「全ゲノム配列によるメタゲノム解析と汚染源等の特定事業」について京都大学に委託しました。結果、その概要が回答として得られました。以下、文責は委託先事業担当者です。

日本中央競馬会平成 29 年度畜産物防止対策強化事業「メタゲノム解析によるカンピロバクター汚染防止法開発事業」報告書

国立大学法人京都大学 大学院医学研究科 微生物感染症学分野
藤吉奏、丸山史人

全ゲノム配列によるメタゲノム解析と汚染源等の特定事業

本事業では、16S rRNA メタゲノム解析結果の信頼性を評価し、さらに、早い段階でカンピロバクター汚染の有無を検出できるような指標となる遺伝子の候補を見出すため、全ゲノム解析を行った。その結果、1) 16S rRNA 遺伝子情報とメタゲノム種組成は類似しており、解析対象が細菌叢の種組成であるならば、16S rRNA 遺伝子のみの解析で代替可能であることがわかった。2) カンピロバクター汚染の有無による機能遺伝子と抗生物質耐性遺伝子の組成に統計的な差異は認められず、また、35 日齢までの中雛に投与される抗生物質（ナラシン、アビラマイシン、硫酸コリスチン）への耐性遺伝子は検出されなかった。3) 病原遺伝子ではカンピロバクターの莢膜合成遺伝子と鞭毛合成遺伝子およびヘリコバクターの鞭毛合成遺伝子が汚染試料において有意に高く、Burkholderia の莢膜合成遺伝子が非汚染試料で有意に高く存在することが明らかとなった。これは、カンピロバクター汚染の検出指標としてこれらの遺伝子を利用可能であることを示している。これらの指標遺伝子は、LAMP（Loop-Mediated Isothermal Amplification）法といった迅速、簡易な標的遺伝子検出法と組み合わせることでカンピロバクターの汚染を早期に発見できる可能性がある。これらのことから、本事業によりカンピロバクター汚染源特定の一助となる成果を得ることができた。