



JRA 畜産振興事業

平成 29 年度

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

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

2017 年 3 月

JRA 畜産振興事業

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

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
2017年3月

はじめに

近年の日本の食中毒統計を見ると、ノロウイルスを除き殆どが細菌性食中毒で占められている。中でもカンピロバクター食中毒は毎年 2,000~4,000 人以上の患者が報告されており、防御対策を施すべき最も重要な食中毒である。原因食としては、カンピロバクター (9 割以上は *Campylobacter jejuni* subsp. *jejuni*) に汚染された鶏肉または鶏内臓肉が最も多い。本菌は本来鶏腸管内に生息し、筋肉組織には定着していないが、食肉加工時の糞便からの交差汚染により精肉に付着する。しかし、現状の食鳥処理方法ではこの汚染を避けることは難しい。一方、一部の養鶏場では汚染が検出されないことも知られ、食品安全委員会のリスク評価においても、汚染養鶏場と非汚染養鶏場の鶏を食鳥処理の段階で分別することにより、カンピロバクター食中毒患者を 44%低減できると試算している。すなわち、養鶏場単位、ないし養鶏場内の区画単位などでカンピロバクター汚染がないと証明することができれば、食肉加工時の交差汚染も当然起こらず、カンピロバクターフリーの安全な食鳥肉の安定供給が可能と考えられる。

鶏雛は孵化直後には無菌であるが、通常 1~2 日のうちに腸内に細菌が生息し始め、数日で腸内細菌叢が定着する。一方、カンピロバクターは、孵化直後には定着しないが、孵化後 3~4 週間のうちに定着する。そこで、その汚染源特定のために多くの調査が行われているが、雛の育成のどの段階で汚染が起きるのか、何が最も重要な汚染源であるのかについては未だに解答が見出せず、現在でも最も重要かつ緊急に解決すべき課題の一つとなっている。汚染源としては、鶏自身のほかに飼育環境中の種々の要因が考えられ、それらの組合せによる汚染経路に基づいて、鶏への直接および間接の接触によりカンピロバクターが伝播すると考えられる。

しかしながら、汚染が起きる時にはカンピロバクター単独で鶏腸管内に侵入せず、汚染源に共存していた他の細菌も同時に侵入し、一時的に共存するものと思われる。鳥類の腸内細菌叢は主として *Bacteroidetes*、*Firmicutes*、*Proteobacteria* 門によって構成され、鶏では *Firmicutes* 門細菌種の構成比率が高いことで知られる。ヒトや環境中の細菌叢が外的刺激に応じて細菌種構成を柔軟に変化させるといったある種のしなやかさ・弾性を持つように、鶏の腸内

細菌叢もまた、カンピロバクターを含む細菌種群の侵入に応じて時系列的にその細菌種構成を変化させているであろうことは予測できる。そこで、カンピロバクター汚染が起きる前から起きた後までの一連の過程で、雛の腸内容、糞便試料と同時に、餌箱・ファン・給水器・長靴の拭き取り試料を採集し、そこに存在する全ての細菌種の同定と動態を明らかにできるメタゲノム解析を実施すれば、何を主たる汚染源としていつ汚染が起きるのかを推定できると期待できる。以上を踏まえて、本事業では養鶏場における鶏および飼育環境の、カンピロバクターを含む細菌叢動態をメタゲノム解析技術により解明することで、その知見を応用して我が国独自の新しいカンピロバクター汚染防止法の開発を目指した。

本事業では、一脊椎動物種の成育過程を通じた腸内細菌叢、および飼育環境の細菌叢の動態を明らかにするもので、微生物生態学的手法を獣医学領域で応用するものといえる。地理的・空間的に限られた場所における、単一動物種の同一部位の細菌叢変化を調べることで、およびその際に動物周囲の環境細菌叢も同時に調べることを実施した解析は少ないことから、本事業における解析を通じて、養鶏場におけるカンピロバクターの汚染源および汚染経路を初めて明らかにすることを目標とした。本事業では、特定の病原体の高感度な検出法とその場に存在する細菌叢全体の動態を組み合わせ、感染や汚染が起きる場所、タイミング、ルートなどを明らかにする手法をとっており、これまでにない成績が得られると期待された。さらに、ここで得た基礎的知見によって、各養鶏場において重点的に衛生管理を行う飼育段階が明らかになれば、カンピロバクター非汚染の鶏群を作出できると期待され、カンピロバクターによる食中毒発生を大幅に低減できると考える。本報告書には、それらの成績の詳細がまとめられている。本事業から得られた知見が、今後の食肉の衛生管理に役立っていくことを願っている。

2017年3月

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長

関崎 勉

目次

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

竹下奈知子、潘雅琪、新井沙倉、渡辺孝康、黒木香澄、関崎勉・・・page 6

第2章 16S rRNA 遺伝子増幅産物によるメタゲノム解析

竹下奈知子、潘雅琪、新井沙倉、渡辺孝康、黒木香澄、関崎勉・・・page 13

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試料を収集し、各試料に含まれるカンピロバクターの有無を調査することでカンピロバクター侵入の時期と経路を推定した成績について以下に述べる。本章で収集した試料は2、3章にも用いた。

2. 事業実施方法

1) 試料の収集地および収集対象

本事業の趣旨に理解を得られた4か所の国内養鶏場から試料を収集した(図1)。事業実施者が事前に養鶏場へ赴き、試料収集担当者へ収集方法を直接伝えることで、養鶏場間で試料収集方法に偏りが出ないように配慮した。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、事業実施者が作成した写真付きの試料収集方法説明書を参照するよう、各養鶏場に依頼した。収集した試料はDNAの分解抑制作用のある溶液 RNAlater Stabilizing Solution (Thermo Fisher Scientific, MA, U.S.A.) が入ったチューブに入れて、当日にあるいは養鶏場にて冷蔵庫で一時的に保管してもらい、冷蔵便で研究室へ送付してもらった。鶏盲腸便と環境試料については、同時期に双方を収集し、汚染源と汚染時期の特定を図った。

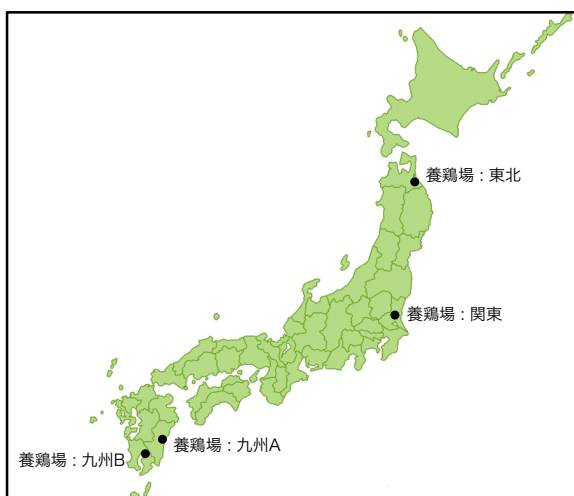


図1. 試料を収集した農場の地理的位置
養鶏場の位置を丸で示す。

試料の収集は各養鶏場で可能な限り同時期に、かつ同じ日齢の鶏に対して行うよう調整した。また、出荷直前および空舎の時期に行った試料収集の方法と時期、検体数については図2と表1に、週齢ごとの試料収集については図3と表2に詳細を記した。週齢ごとの試料収集においては鶏に与えた餌の情報も収集した。抗菌薬においては、餌付け～後期の餌には含まれているが、仕上げ時期の餌には含まれていないという特徴がある。ただし、図3に示した通り、関東と九州B3回目の餌には餌付け時期から硫酸コリスチンが含まれておらず、東北1回目の餌には抗菌薬が含まれていない。また、東北の養鶏場では2、3回目の試料収集において4～5週齢の時期に中抜き業者の出入りがあった。

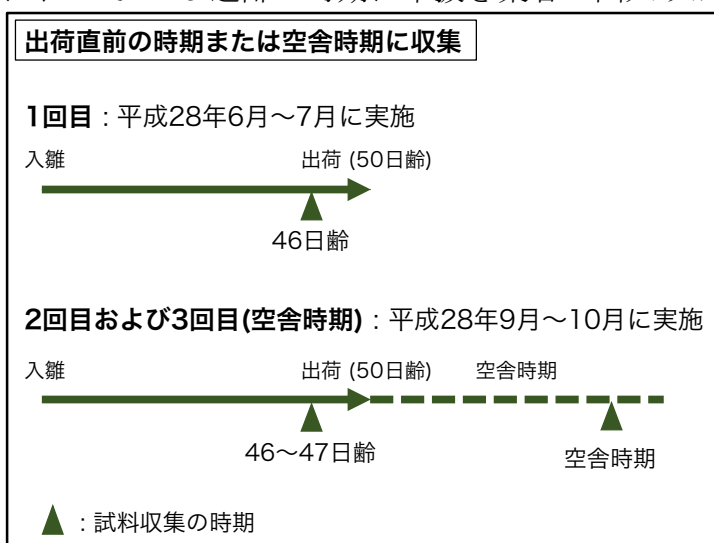


図2. 出荷直前および空舎時期の試料収集

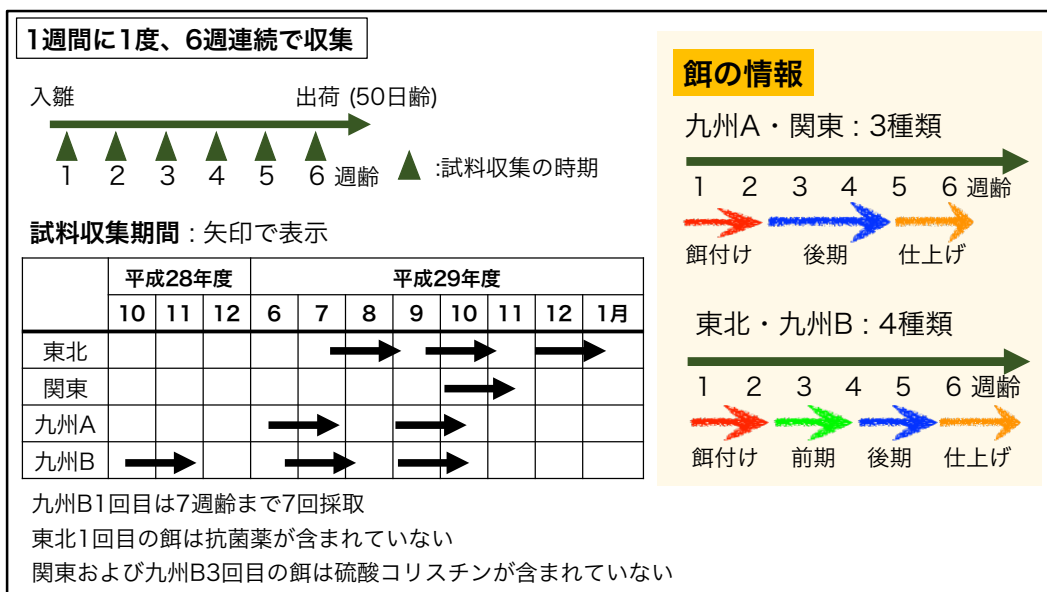


図3. 週齢ごとの試料収集

表 1. 出荷直前および空舎時期に収集した試料の内訳

養鶏場	試料の種類	試料数			小計	合計
		1回目	2回目	3回目 (空舎)		
東北	生体試料	盲腸便	12	-	-	12
		通常便	-	8	-	8
	環境試料	餌箱	6	3	3	12
		ファン	6	-	-	6
		給水器	6	-	-	6
		長靴	-	2	2	4
九州A	生体試料	盲腸便	10	7	-	17
		餌箱	3	3	3	9
	環境試料	ファン	3	3	3	9
		給水器	3	-	-	3
		長靴	-	2	2	4
		その他	-	-	4	4
九州B	生体試料	盲腸便	10	8	-	18
		餌箱	3	3	3	9
	環境試料	ファン	2	2	2	6
		給水器	3	-	-	3
		長靴	-	2	2	4
		その他	-	-	4	4

表 2. 週齢ごとに収集した試料の内訳

養鶏場	試料の種類	試料数			小計	合計
		1回目	2回目	3回目		
東北	生体試料	盲腸便	16	24	24	64
		餌箱	18	18	-	36
	環境試料	ファン	18	18	-	36
		長靴	4	2	-	6
関東	生体試料	盲腸便	24	-	-	24
		餌箱	18	-	-	18
	環境試料	ファン	18	-	-	18
		長靴	4	-	-	4
九州A	生体試料	盲腸便	24	24	-	48
		餌箱	18	18	-	36
	環境試料	ファン	18	18	-	36
		長靴	4	4	-	8
九州B	生体試料	盲腸便	28	24	24	76
		餌箱	-	18	18	36
	環境試料	ファン	-	18	18	36
		長靴	-	4	4	8

2) DNA 抽出

養鶏場から送付された試料は DNA の分解を最小限に抑えるため、その日のうちに DNA 抽出作業を行うか、DNA 抽出を行うまで-20℃の冷凍庫に保管した。RNA later 中に採集した試料は、遠心分離した後に沈渣を滅菌生理食塩液に懸濁し、再び遠心して沈渣を 1 ml の滅菌生理食塩液に懸濁して DNA 抽出に用いた。盲腸便試料に対しては市販の PowerFecal® DNA Isolation Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) を用いて、環境試料に対しては同じく市販の PowerBiofilm® DNA Isolation Kit (QIAGEN) を用いて、キットの指示書に従い DNA を抽出した。ただし、細胞破碎に利用するビーズをジルコニアビーズ (Toray, Tokyo, Japan) に換え、Beads Crusher µT-12 (TAITEC, Saitama, Japan) を用いて抽出した。

3) カンピロバクター遺伝子の検出

試料中のカンピロバクターの存在を調べるために Nested PCR [1]を用いて遺伝子を検出した。Nested PCR の概要は図 4 に示した。

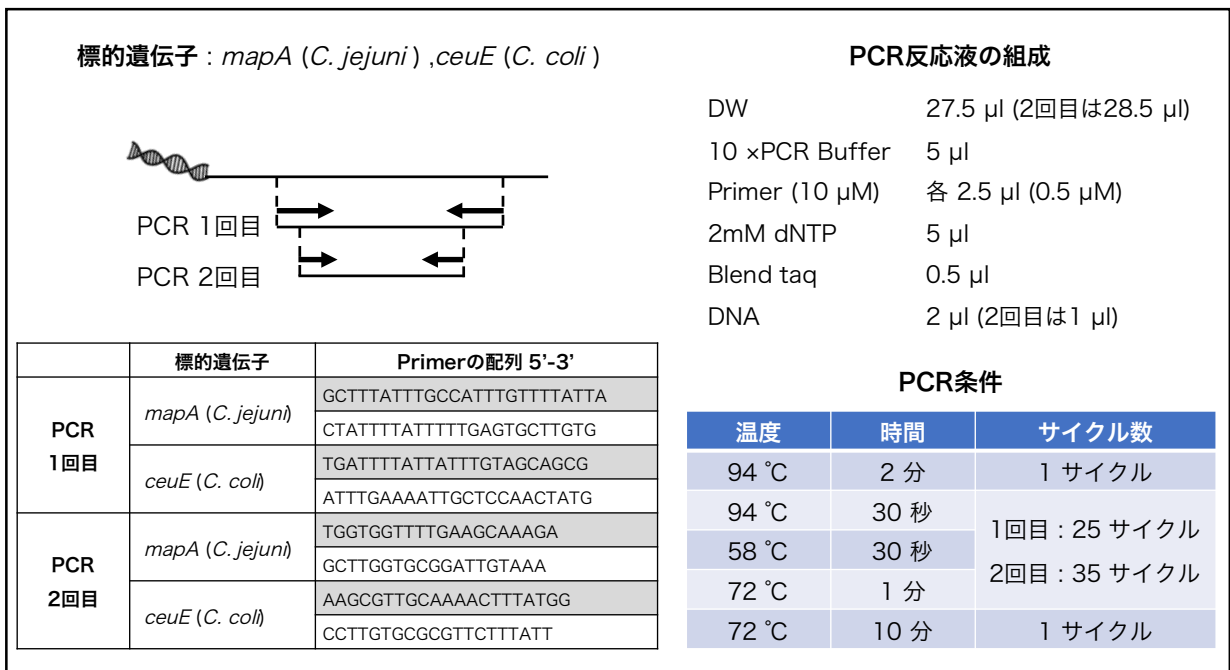


図 4. 本事業で使用した Nested PCR の標的遺伝子、プライマー配列及び反応条件

3. 事業実施成果

1) 出荷直前および空舎時期でのカンピロバクター遺伝子検出

収集した試料におけるカンピロバクター遺伝子検出の成績を表 3 に示した。試料収集 1 回目でカンピロバクター陰性だった東北、九州 A の養鶏場は試料収集 2 回目で陽性になった。一方、試料収集 1 回目でカンピロバクター陽性だった九州 B は試料収集 2 回目では陰性になり、本菌の陽性、陰性は鶏群ごとに変動することが示された。また、空舎期間に収集した試料では、試料収集 2 回目で陽性だった東北、九州 A 含め、全ての試料が陰性になった。試料収集 2 回目から消毒槽で消毒後の長靴からも試料を収集したところ、東北の試料からカンピロバクター遺伝子が検出された。

表 3. 出荷直前および空舎時期に収集した試料での Nested PCR の成績

養鶏場	陽性検体数/総検体数					
	1回目		2回目		3回目 (空舎)	
	<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>	<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>	<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>
東北	0/30	0/30	13/13 (通常便 8/8 餌箱 3/3、長靴 2/2)	7/13 (通常便 3/8 餌箱 3/3、長靴 1/2)	0/5	0/5
九州 A	0/19	0/19	4/15 (盲腸便 2/7、ファン 2/3 餌箱 0/3、長靴 0/2)	0/15	0/8	0/8
九州 B	18/18 (盲腸便 10/10、餌箱 3/3 ファン 2/2、給水器 3/3)	0/18	0/15	0/15	0/10	0/10

2) 週齢ごとに収集した試料のカンピロバクター遺伝子検出

収集した試料からは *C. coli* 遺伝子は検出されなかった。一方、*C. jejuni* 汚染試料は 1 週齢から 6 週齢までの全週齢で認められたが、週齢が上がるにつれて陽性検体数が多くなり、6 週齢では半数以上の試料が陽性だった (図 5)。また、1～3 週齢では鶏舎の一部に汚染があったとしても鶏舎全体へは及ばないか、次週の試料からは全く検出されない鶏群があった (図 5)。一方、5～6 週齢で汚染が起こった鶏群においては、最終的に糞便・鶏舎内環境試料ともにほぼ全てが *C. jejuni* 遺伝子陽性になった。また、1 週齢と 6 週齢の時にのみ消毒後の長靴からも試料を収集した結果、一部の試料で *C. jejuni* 遺伝子が検出された。東北 1 回目の餌には抗菌薬が、また、関東および九州 B 3 回目の餌には硫酸コリスチンが含まれていないが、汚染の有無は他の試料収集時期と同様に週齢が上がるにつれて陽性検体数が多くなっていった。また、東北の養鶏場では 2、3 回目の試料収集において 4～5 週齢の時期に中抜き業者が出入りしているが、その後にカンピロバクター遺伝子は検出されなかった。

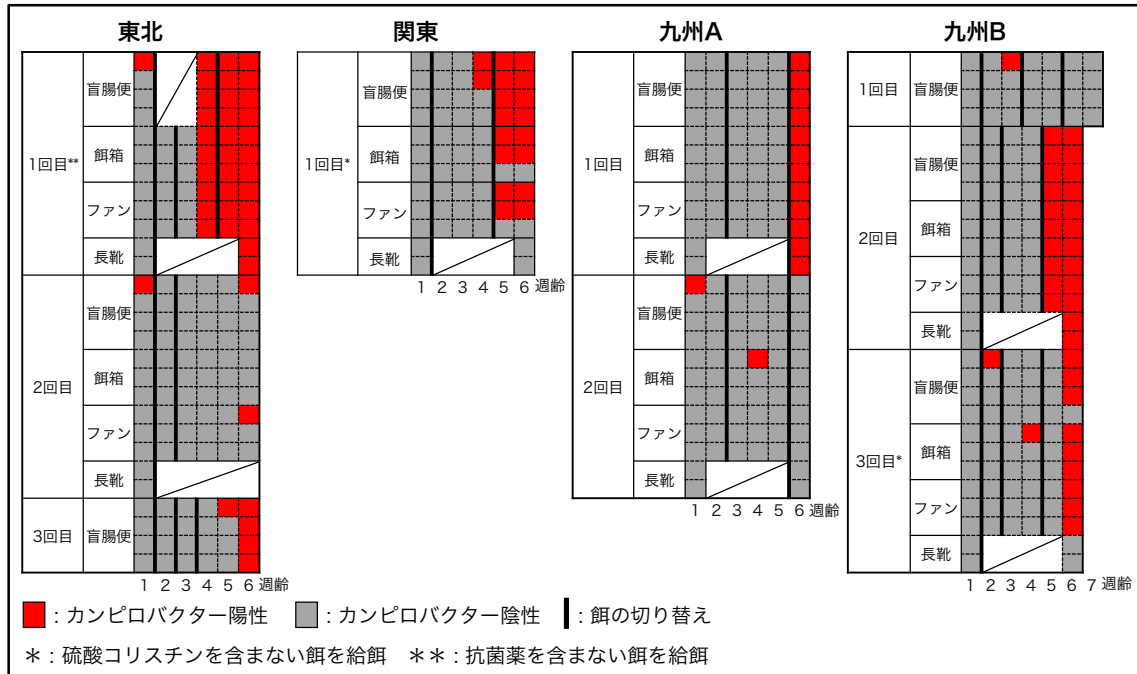


図 5. 週齢ごとに収集した試料のカンピロバクター遺伝子検出成績

4. 考察

出荷直前に収集した試料のカンピロバクター遺伝子検出成績より、汚染養鶏場は汚染状態を維持しているわけではなく、鶏群ごとに汚染、非汚染は変動することが明らかとなった。また、出荷後の清掃、乾燥作業を終えた鶏舎からカンピロバクター遺伝子は検出されないことが示された。さらに、長靴の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、養鶏場内外で本菌の伝播が起きる可能性が示された。

週齢ごとに収集した試料の汚染状況を調査した結果、鶏が1～3週齢の鶏舎では汚染状態が継続しないことが示された。カンピロバクターは一度鶏舎に侵入すると直ちに鶏舎内の鶏全てに伝播するとの報告があるが[2, 3]、週齢が低い鶏には当てはまらないことが明らかとなった。従って、カンピロバクターの鶏への定着には、何らかの因子が必要と思われる。すなわち、その因子を明らかにすることで、本菌の定着を防ぎ、本菌による汚染防止が促進されると期待される。1～3週齢の鶏と4～6週齢の鶏では、餌の種類、飼料への抗菌薬添加の有無、腸内細菌叢など様々な違いがあるが、抗菌薬の有無による本菌の定着の違いは見出せなかった。なお、腸内細菌叢の違いについては第2章で詳しく報告する。

汚染の広がり方は異なるものの、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た。中抜き業者の出入りなどの特定の時期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飼育員などがカンピロバクターの侵入に最も関与している可能性が高いと考えられた。

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.
2. Skarp, C. P. A., Hänninen, M. L., & Rautelin, H. I. K. (2016). Campylobacteriosis: the role of poultry meat. *Clinical microbiology and infection*, 22(2), 103-109.
3. Lee, M. D., & Newell, D. G. (2006). *Campylobacter* in poultry: filling an ecological niche. *Avian diseases*, 50(1), 1-9.

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る。そこで、カンピロバクター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、汚染源でカンピロバクターと共存する細菌を推定した成績について以下に述べる。

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、高速シーケンサーMiSeq (Illumina, CA, U.S.A.) を用いて塩基配列を決定した。決定した塩基配列はIllinois Mayo Taxon Organization from RNA Dataset Operations (IM-TORNADO) [1]とよばれる16S rRNA メタゲノム解析用のソフトウェアを用いて処理を行った。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]というソフトウェアとR言語[3]を用いて精査した。試料中の構成細菌を比較するためにQIIMEを用いてUnifrac距離を計算し、R言語により主座標分析を行った。また、本菌と関係を持つ細菌を明らかにするためにLinear discriminant analysis (LDA) effect size (LEfSe) 解析[4]と相関関係解析を行った。相関関係解析では、Spearmanの順位相関係数をR言語により計算し、カンピロバクターとの相関係数が $\rho > 0.7$ の細菌を正の相関を持つ細菌、 $\rho < -0.7$ の細菌を負の相関を持つ細菌とした。多様性の比較では、細菌種数の推定値であるChao1 [5]をQIIMEにて計算し、餌の種類およびカンピロバクターの有無による違いをSteel-Dwass法にて比較した。

データの性質の違いから、解析は出荷直前および空舎時期に収集した試料と週齢ごとに収集した試料で分けて行った。また、統計学的処理を行う際はR言語を用いてデータの正規性をShapiro-Wilk検定で判断した。データが正規分布に従っていた場合は、等分散性をF検定あるいはBartlett検定で判断し、適切な統計手法を選定した。

3. 事業実施成果

1) データの信頼性・概要

平成 28 年度、29 年度におけるいずれの試料においても Good's coverage 値が 0.99 以上であることから、本解析に十分な配列本数を取得できたと考えられる(表 1, 2)。多様性を示す指数である Simpson, Shannon, Equitability, Chao1 の値を各試料群で Steel-Dwass 法にて検定を行った結果、環境試料において、出荷直前の時期と空舎期間で多様性に差があるとは言えなかった。また、盲腸便は通常便や環境試料よりも多様性が有意に高かった(表 1, 2)。

表 1. 出荷直前および空舎時期に収集した試料のデータ概要

多様度指数	空舎期間									
	盲腸便	通常便	餌箱	ファン	長靴	給水器	餌箱	ファン	長靴	体重計
Good's coverage	≥ 0.99	≥ 0.99	≥ 0.99	≥ 0.99	≥ 0.99	≥ 0.99	≥ 0.99	≥ 0.99	≥ 0.99	≥ 0.99
Simpson	0.98 ± 0.01	0.85 ± 0.04	0.94 ± 0.02	0.95 ± 0.01	0.96 ± 0.01	0.97 ± 0.02	0.94 ± 0.03	0.93 ± 0.002	0.95 ± 0.03	0.95 ± 0.01
Shannon	7.62 ± 0.47	4.11 ± 0.56	5.70 ± 0.77	5.83 ± 0.47	6.04 ± 0.51	6.43 ± 0.85	5.69 ± 0.44	4.86 ± 0.14	6.16 ± 0.86	6.11 ± 0.11
Equitability	0.73 ± 0.04	0.45 ± 0.04	0.57 ± 0.06	0.58 ± 0.04	0.58 ± 0.04	0.66 ± 0.07	0.60 ± 0.05	0.52 ± 0.01	0.61 ± 0.07	0.58 ± 0.01
Chao1	1463 ± 130	820 ± 360	1368 ± 296	1394 ± 186	1732 ± 148	968 ± 210	817 ± 127	842 ± 115	1260 ± 398	1734 ± 137

表 2. 週齢ごとに収集した盲腸便試料のデータ概要

多様度指数	1週齢	2週齢	3週齢	4週齢	5週齢	6週齢
Good's coverage	≥ 0.99	≥ 0.99	≥ 0.99	≥ 0.99	≥ 0.99	≥ 0.99
Simpson	0.96 ± 0.03	0.96 ± 0.04	0.96 ± 0.04	0.97 ± 0.03	0.97 ± 0.02	0.98 ± 0.01
Shannon	6.39 ± 0.85	6.64 ± 1.2	6.95 ± 1.07	6.99 ± 1.02	7.35 ± 0.73	7.58 ± 0.51
Equitability	0.66 ± 0.08	0.66 ± 0.09	0.67 ± 0.08	0.68 ± 0.08	0.70 ± 0.06	0.71 ± 0.04
Chao1	943 ± 171	1226 ± 330	1546 ± 273	1534 ± 300	1756 ± 193	1843 ± 141

2) 出荷直前および空舎時期に収集した試料での 16S rRNA 遺伝子解析の成績

2-1) 主要な構成細菌の比較

出荷直前および空舎の時期に収集した試料の構成細菌 (属レベル) およびその比率を積み上げ棒グラフで示した (図 1, 2)。糞便試料においては、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養鶏場間で大きな差がないことが示された (図 1)。環境試料においては餌箱とファン、体重計の主要な構成細菌が似ているのに対し、給水器と長靴は異なる構成細菌を有していた (図 2)。また、出荷直前の時期と空舎期間で環境試料の構成細菌は異なることが示唆された(図 2)。

鶏を使用した実験において、カンピロバクター存在時には *Firmicutes* に属する細菌の存在率が高く、*Proteobacteria* に属する細菌の存在率が低いとの報告がある [6]。本調査でも門レベルで解析を行い、その存在率を Wilcoxon の順位和検定で比較した結果、カンピロバクター存在時に *Firmicutes* に属する細菌は存在率が有意に低く、*Proteobacteria* に属する細菌は有意に高いという、過去の調査とは反対の成績が得られた。

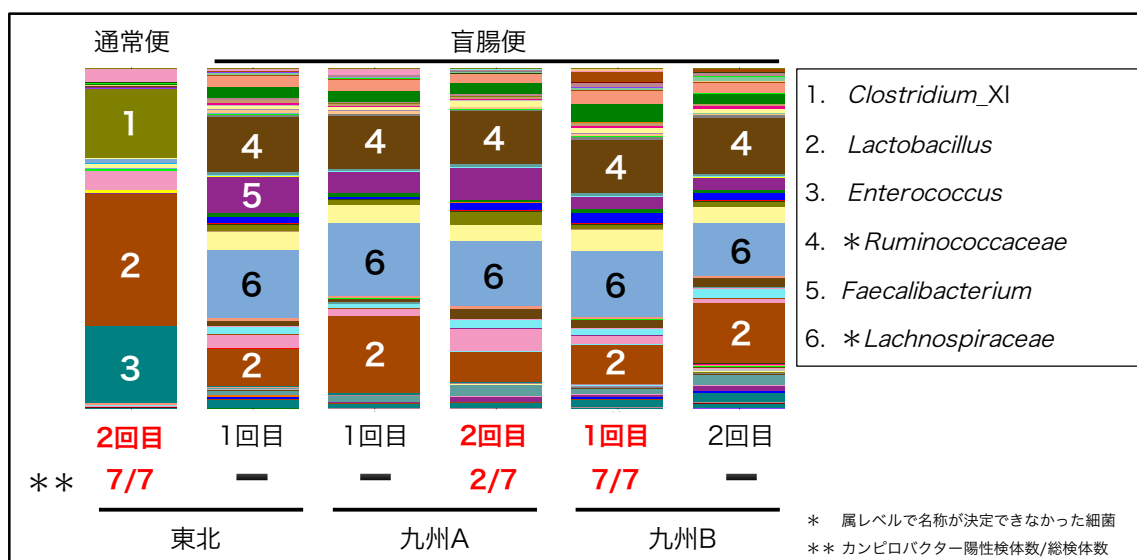


図 1. 出荷直前の糞便試料の構成細菌 (属レベル)
存在率が 10%以上の細菌属には番号を振り、属名を示した。

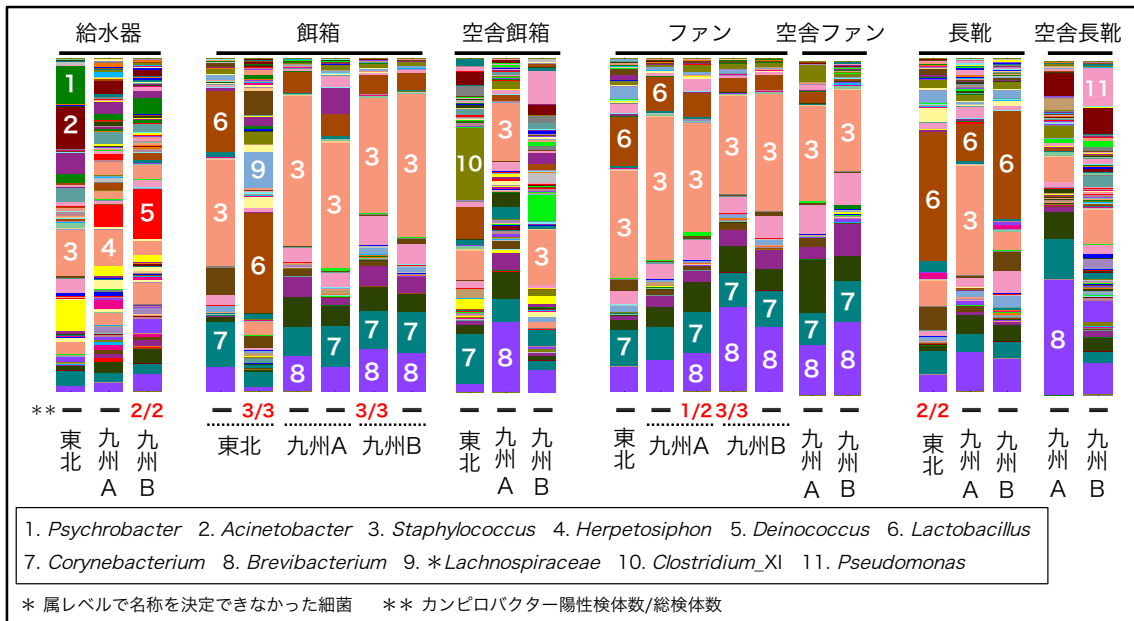


図 2. 出荷直前および空舎時期の鶏舎内環境試料の構成細菌 (属レベル) 存在率が 10%以上の細菌属には番号を振り、属名を示した。

2-2) 主座標分析

主座標分析では各点が各試料を示しており、点と点の距離が近いほど細菌叢組成が似ていることを意味する。盲腸便試料において、各試料は養鶏場ごとにクラスターを形成していたことから(図 3)、主要な細菌は養鶏場間で違いが認められなかったが (図 1)、存在率の低い細菌も考慮すると養鶏場間で細菌叢組成は異なることが示された。出荷直前および空舎時に収集した鶏舎内環境試料においては、餌箱とファン、汚染した長靴の構成細菌が似ていること、および給水器と空舎時期の環境試料の構成細菌が似ていることが示された。また、出荷直前の時期と空舎時期では構成細菌が異なることが示された (図 4)。そこで、出荷直前の時期に収集した餌箱とファン、長靴のみで主座標分析を行うと、各試料は養鶏場ごとにクラスターを形成した (図 4)。

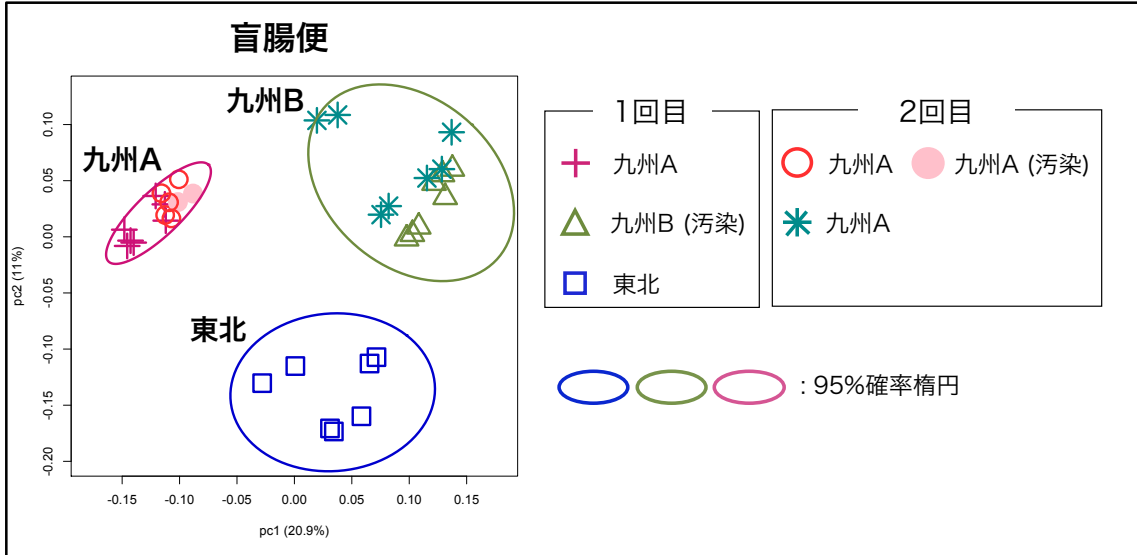


図 3. 出荷直前の盲腸便試料における主座標分析

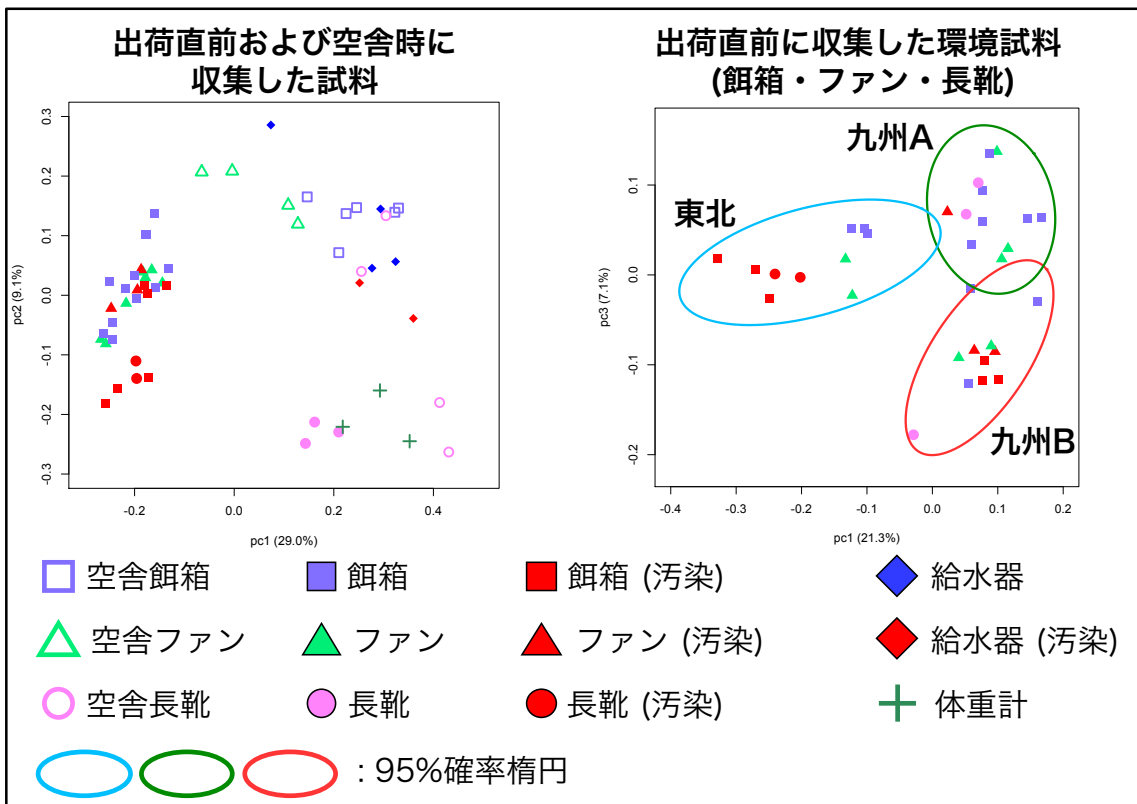


図 4. 出荷直前および空舎時期の鶏舎内環境試料における主座標分析

2-3) 出荷直前と空舎時期における構成細菌比較

出荷直前と空舎時期で構成細菌が異なることが示されたことから、どのような細菌属がそれぞれの環境に特有な細菌叢を構成しているのかを調査したところ、出荷直前にのみ存在している細菌属 11 種類と空舎時にのみ存在している細菌属 10 種類が確認された (図 5, 6)。

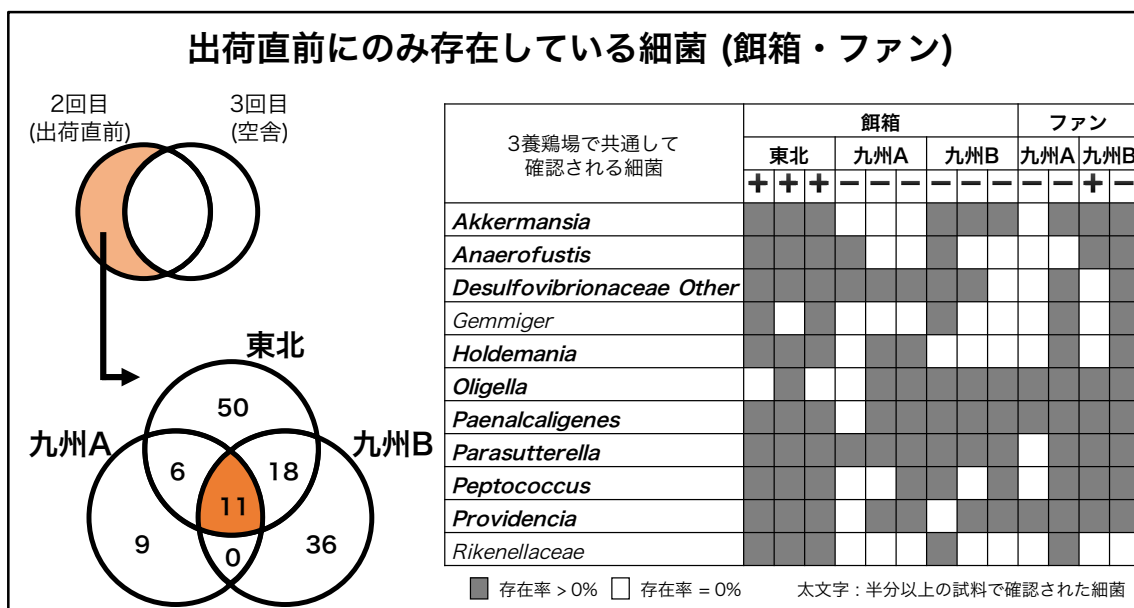


図 5. 出荷直前にのみ存在している細菌

養鶏場名の下に、カンピロバクター陽性試料には+を、陰性試料には-を示した。

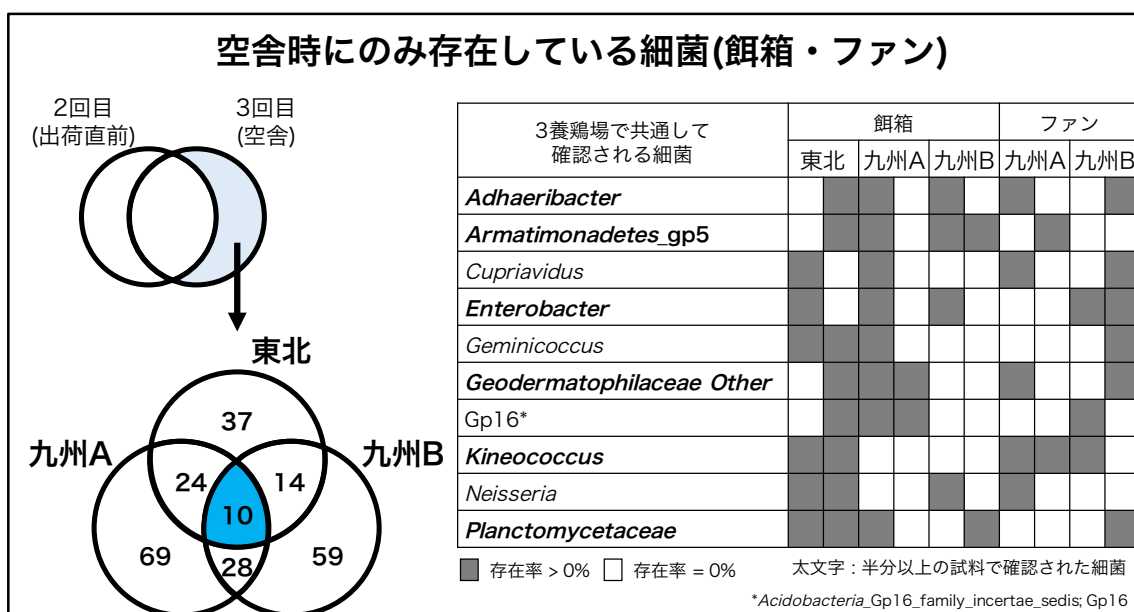


図 6. 出荷直前にのみ存在している細菌

養鶏場名の下に、カンピロバクター陽性試料には+を、陰性試料には-を示した。

2-4) LEfSe 解析による汚染時と非汚染時の構成細菌比較

養鶏場ごとの構成細菌の違いによる影響を排除するため、汚染・非汚染試料の両者が揃った九州 B の試料を LEfSe 解析にて比較した。LEfSe 解析は個体差による違いを考慮して分散分析を行うという特徴がある。また、LDA スコアが大きいほど汚染または非汚染を特徴付けている細菌といえる。LEfSe 解析では汚染試料に特徴的な細菌 10 種類と、非汚染試料に特徴的な細菌 9 種類が確認された (図 7)。また、汚染試料に特徴的な細菌 10 種類のうち 8 種類の細菌は分類学上の名称が決っておらず、培養不能あるいは研究が進んでいない細菌であると考えられた (図 7)。

相関関係解析では 5 種類の細菌においてカンピロバクターと正の相関が確認された (図 8)。また、*Rikenella* と *Helicobacter* は盲腸便と鶏舎内環境試料の両者においてカンピロバクターと正の相関を持っていた。カンピロバクターと負の相関を持つ細菌は *Clostridium (sensu stricto)* 1 種類のみだった。

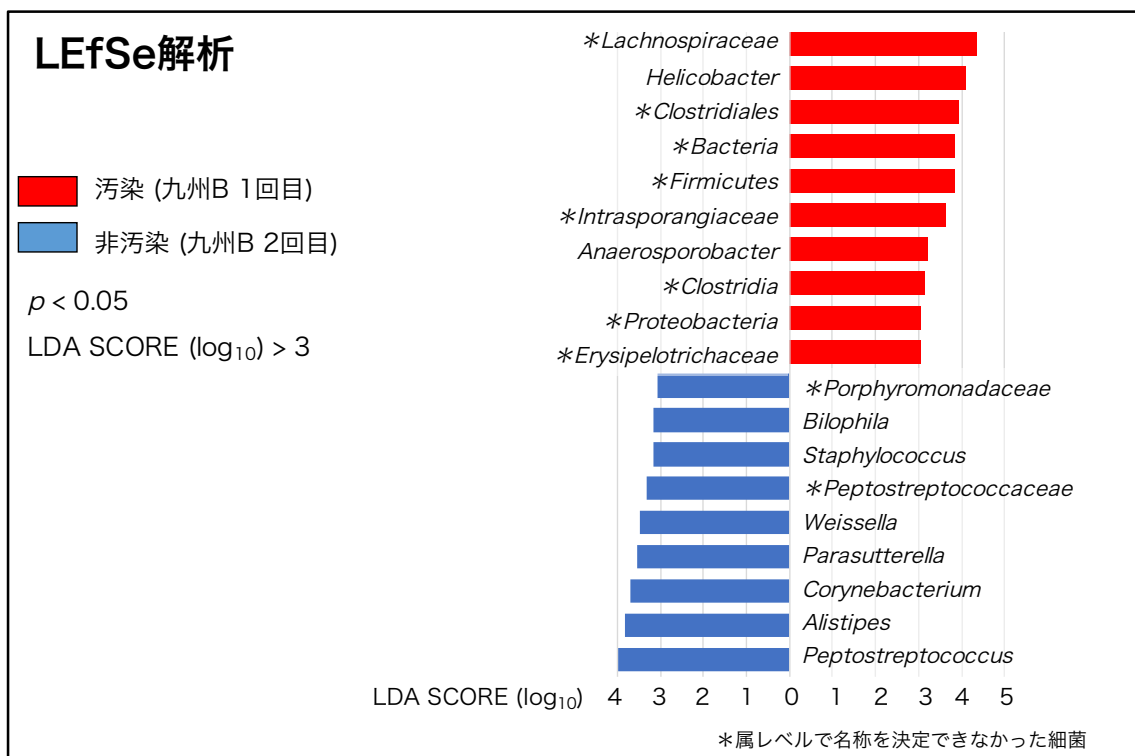


図 7. 出荷直前で九州 B から収集した試料における LEfSe 解析

カンピロバクターと正の相関を持つ細菌	相関係数	**試料
<i>Rikenella</i>	0.87	盲腸便
<i>Helicobacter</i>	0.82	
<i>Parabacteroides</i>	0.76	
<i>Peptococcus</i>	0.72	
* <i>Actinomycetales</i>	0.72	
<i>Rikenella</i>	0.86	環境試料
<i>Helicobacter</i>	0.76	
カンピロバクターと負の相関を持つ細菌	相関係数	**試料
<i>Clostridium</i> (sensu stricto)	-0.78	盲腸便

* 属レベルで名称を決定できなかった細菌
** 盲腸便試料: 東北、九州A、九州Bの採材1回目、 環境試料: 東北、九州A、九州Bの採材1回目と2回目

図 8. 相関関係解析

3) 週齢ごとに収集した試料での 16S rRNA 遺伝子解析の成績

3-1) 主要な構成細菌の比較

週齢ごとに収集した盲腸便試料の構成細菌 (属レベル) およびその比率を週齢、餌の種類およびカンピロバクターの有無で平均化して積み上げ棒グラフで示した (図 9)。主要な構成細菌は *Ruminococcaceae*、*Lachnospiraceae*、*Lactobacillus* の3種で、出荷直前に収集した試料の成績と一致していた。また、週齢およびカンピロバクターの有無による構成細菌の違いは認められなかった。

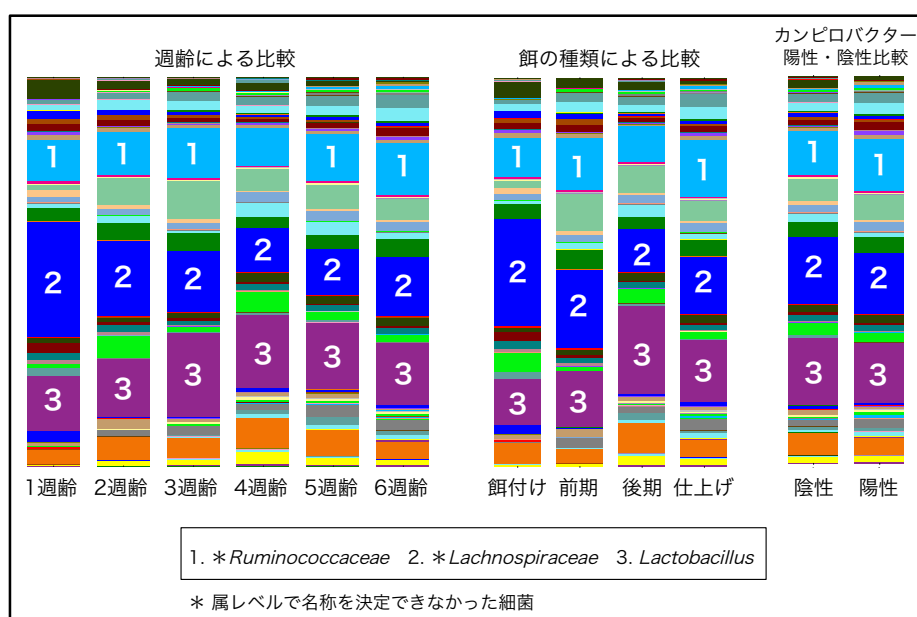


図 9. 週齢ごとに収集した試料の構成細菌 (属レベル) 存在率が 10%以上の細菌属には数字で名前を示した。

3-2) 主座標分析

週齢ごとに収集した試料において主座標分析を行った結果、各試料は餌の種類ごとにクラスターを形成した (図 10)。また、汚染・非汚染試料を示す点は近い位置に打たれたことから、両者の構成細菌には大きな差はないことが示された。

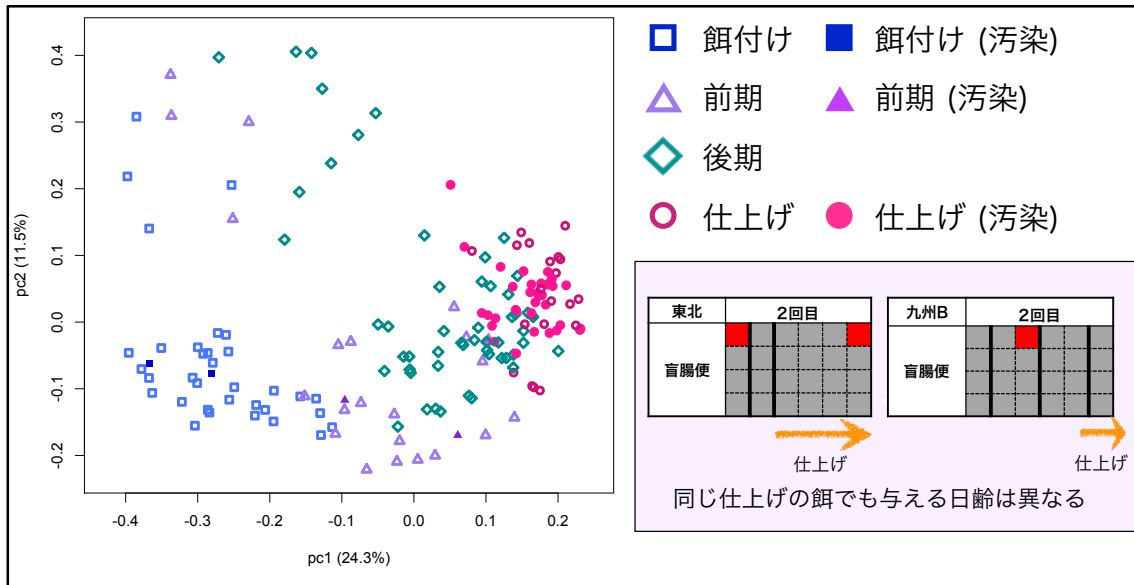


図 10. 週齢ごとに収集した試料における主座標分析

3-3) 多様性の比較

餌の種類およびカンピロバクターの有無で比較した Chao1 は、餌付けから仕上げの餌へと変化するにしたがって多様性が高くなった (図 11)。また、カンピロバクターの有無による多様性の違いは認められなかった (図 11)。

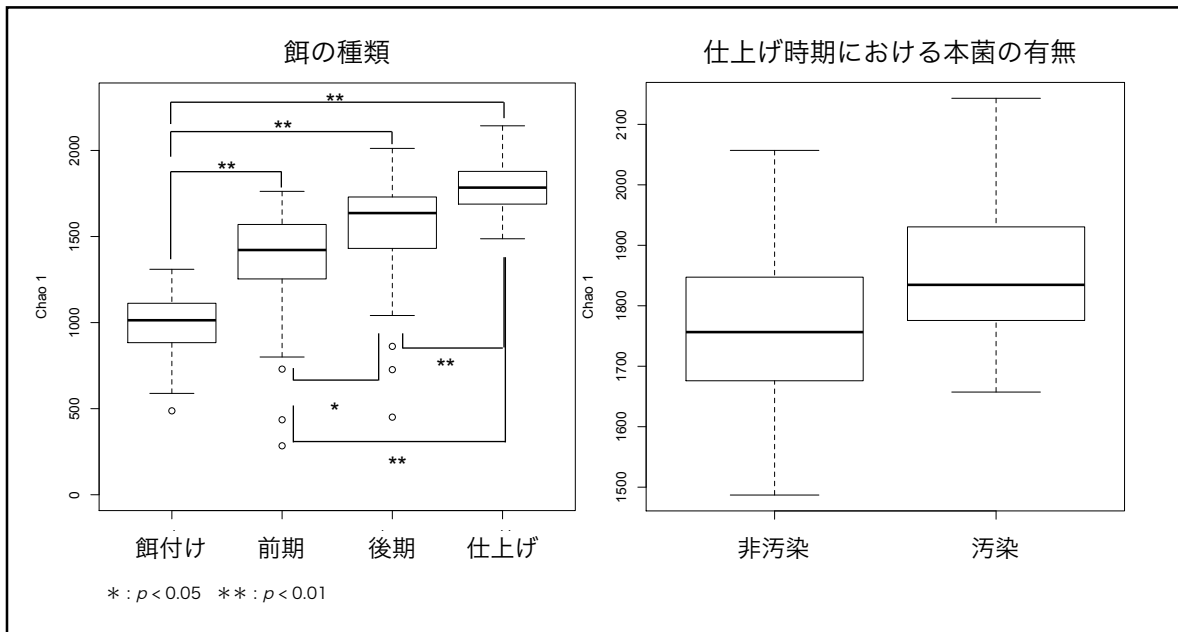


図 11. 多様性比較 (Chao1)

3-4) 餌の種類で比較した LEfSe 解析

第1章にて1~3週齢の鶏で本菌の定着が起きにくい可能性が示唆されたことから、餌の違いによる構成細菌の違いを明らかにするために、餌付け・前期の時期に収集した試料と、仕上げの時期に収集した試料において LEfSe 解析を行った。その結果、餌付け・前期の時期に特徴的な細菌は11種類、仕上げ時期に特徴的な細菌は29種類だった (図12)。

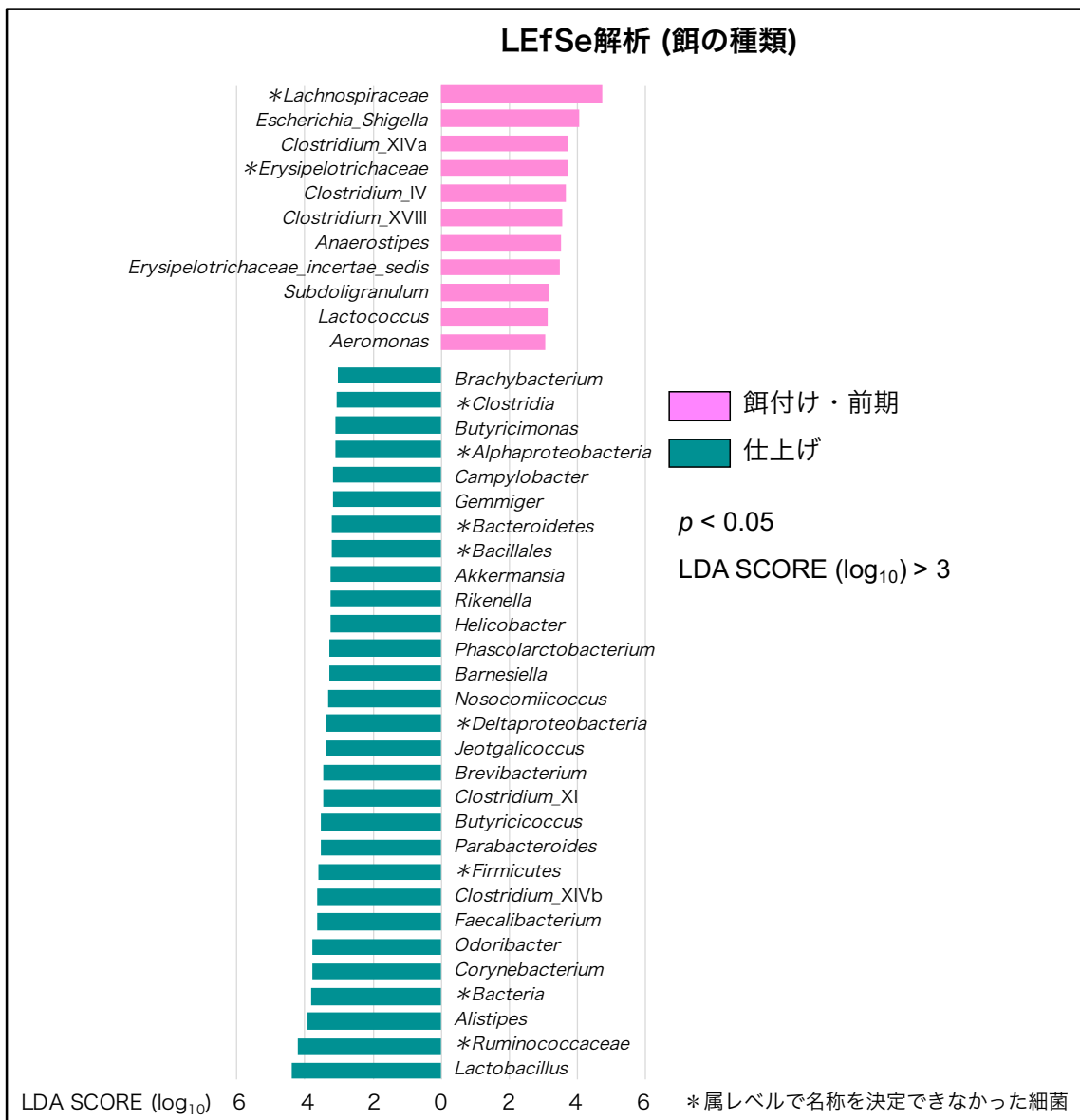


図12. 餌の種類別 LEfSe 解析

3-5) 汚染・非汚染試料で比較した LEfSe 解析

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、週齢ごとに収集した全ての盲腸便試料に対し LEfSe 解析を行った (図 13)。また、出荷直前時期に収集した試料での成績と比較するため、週齢ごとに収集した九州 B の試料のみの解析も行った(図 14)。

全ての盲腸便試料に対して LEfSe 解析を行った結果、LDA スコアが 3 以上の細菌として汚染試料では *Campylobacter* (LDA スコア 3.6) と *Bacteroidetes* (LDA スコア 3.4)、非汚染試料では *Erysipelotrichaceae_incertain_sedis* (LDA スコア 3.1) と *Phascolarctobacterium* (LDA スコア 3.0)が見つかった。これらに加えて LDA スコア 2 以上の細菌を図 13 に記載した。一方、九州 B のみの比較では、LDA スコア 3 以上の細菌が、汚染試料では 31 種類、非汚染試料では 12 種類見つかった (図 14)。九州 B で出荷直前に収集した、汚染試料で特徴的な細菌 10 種類のうち 5 種類は週齢ごとに収集した試料でも見つかった (図 7, 14)。また、九州 B で出荷直前に収集した、非汚染試料で特徴的な細菌 9 種類のうち、1 種類は週齢ごとに収集した非汚染試料に特徴的な細菌にもあった (図 7, 14)。しかし、*Parasutterella* と *Alistipes* は九州 B で出荷直前に収集した試料では非汚染試料で確認されたにもかかわらず、週齢ごとに収集した試料では汚染試料で確認された (図 7, 14)。

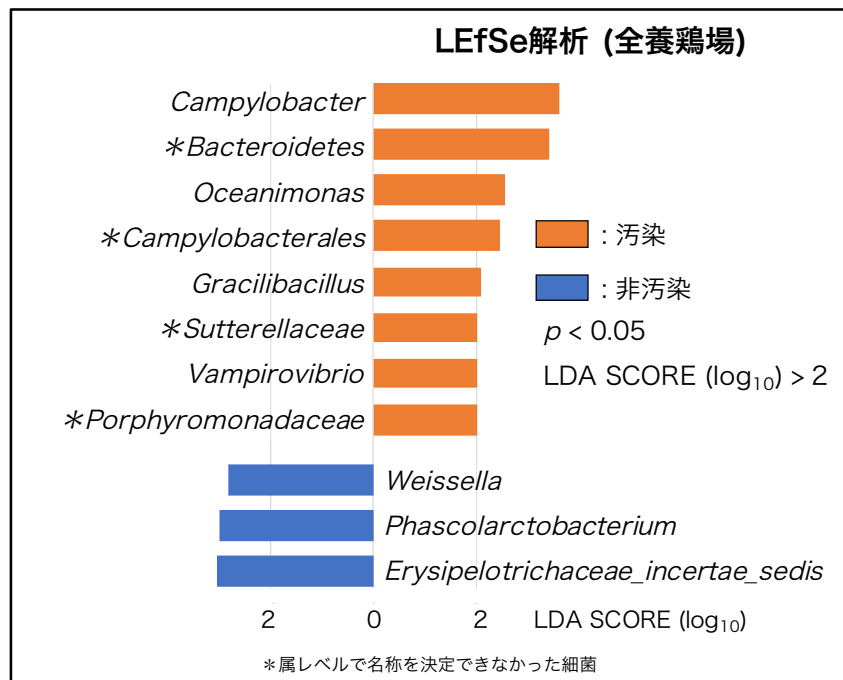


図 13. 週齢ごとに収集した試料における LEfSe 解析

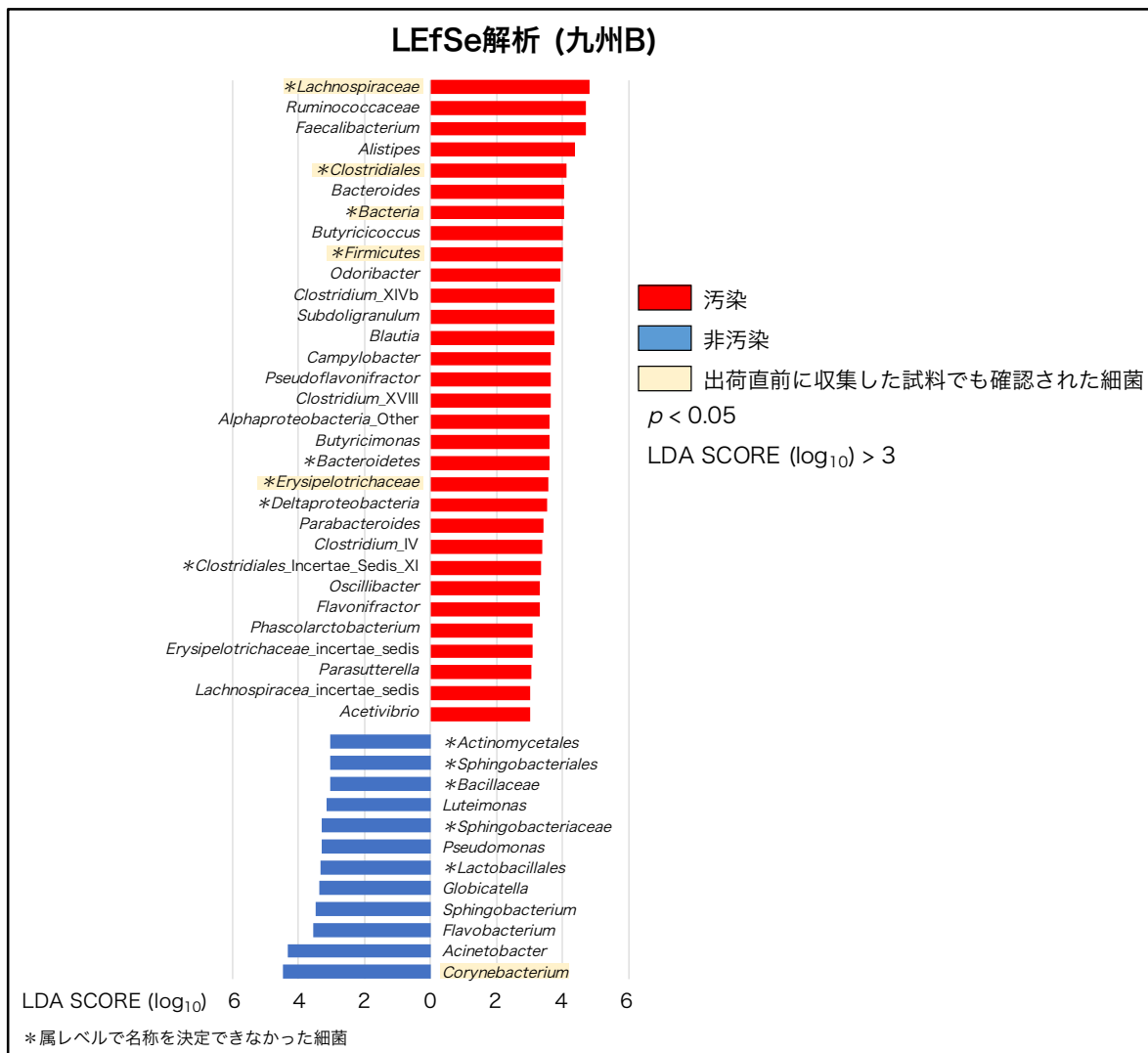


図 14. 週齢ごとに収集した九州 B の試料における LEfSe 解析

4. 考察

出荷直前に収集した試料に対して行った 16S rRNA メタゲノム解析により、盲腸便と通常便は主要な構成細菌が異なること、また、盲腸便の方が通常便よりも多様性が有意に高いことが示された (表 1、図 1)。通常便においては概して多様性は低く、*Lactobacillus* が 90 %を超える存在率を示した検体も存在しており、細菌叢の変化を観察する上で適切な試料ではないと考えられた。また、カンピロバクターの有無による構成細菌の違いを比較した結果、本菌が感染した鶏の腸管では *Firmicutes* の存在率が低く、*Proteobacteria* の存在率が高いという過去の報告と反対の成績が得られた。鶏を用いた動物実験による調査では養鶏場の状態を再現することは難しいため、本事業のような養鶏場での調査がより自然の環境を反映しているといえる。盲腸便の主要な構成細菌は *Ruminococcaceae*、*Lachnospiraceae*、*Lactobacillus* の 3 種であり、試料間で大きな違いは認められなかった (図 1)。従って、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も必要と考えられた。また、主座標分析により養鶏場ごとに構成細菌が異なることが示されたため (図 3, 4)、カンピロバクターの侵入と定着による細菌叢の変化も養鶏場毎に分けて考える必要があると考えられた。また、空舎の時期と出荷直前の時期で構成細菌が異なっていたことから (図 5, 6)、本菌を含めた複数の細菌が清掃・乾燥により排除され、空舎時期特有の細菌叢が形成されることが示唆された。

週齢ごとに収集した試料での主座標分析において、細菌組成は餌の種類によってクラスターを形成した (図 10)。出荷直前に収集した試料に対して行った主座標分析のように、同じ日齢の鶏から収集した試料のみで構成細菌を比較すると養鶏場ごとに違いが出るが (図 3, 4)、全ての試料を合わせて主座標分析を行うと餌の時期による構成細菌の違いの方が大きいことが示された。餌は日齢に従って切り替えるため、餌と週齢のどちらが細菌叢に影響を与えたのかが判断し難い。しかし、養鶏場により餌の切り替え時期は異なっており、特に東北が 3 週齢目から仕上げ時期の餌を与えているにも関わらず、主座標分析で仕上げ時期を示す点が全て近い位置に打たれたことから、日齢よりも餌が細菌叢に影響を与えたと思われた (図 10)。さらに、Chao1 を用いた多様性比較においても同様に、餌の種類によって多様性が異なることが示された (図 11)。一方、カンピロバクターの有無による腸内細菌叢の違いは主座標分析と多様性比較のどちらからも確認できず (図 10, 11)、過去の報告とは異なる成績となった [6]。

出荷直前に収集した試料での成績で、鶏腸内細菌叢は養鶏場ごとに異なるという成績が得られたことから、カンピロバクターと腸内細菌叢の関係性を観察する上で、養鶏場の違いは考慮するべきといえる。週齢ごとに収集した全養鶏場の成績を合わせて LEfSe 解析を行った際に、汚染および非汚染試料に特徴的な細菌が少数しか認められなかったことから、養鶏場ごとに分けて解析を行うべきだと考えられた。出荷直前、および週齢ごとに収集した試料の中で、最も検体数が多く、かつ汚染・非汚染試料数が均等に取れた九州 B の試料で LEfSe 解析の成績を比較すると、汚染試料に特徴的な細菌として 5 種類の細菌が共通して確認された。この 5 種類の細菌は九州 B の汚染源にカンピロバクターと共存している可能性がある。しかし、出荷直前と週齢ごとに収集した試料で反対の成績が得られた細菌も存在しているため、今後も継続的な観察を行い、普遍的にカンピロバクターと共存する細菌を特定するべきだろう。また、汚染試料に特徴的な細菌は属レベルで分類学的な名称が決定していないものが多かった。これは、汚染源の細菌叢には培養不能あるいは研究が進んでいない細菌が存在することを示唆しており、汚染源とその細菌叢を明らかにすることは学術的にも有意義であるといえる。

第 1 章にて週齢の低い鶏では 5~6 週齢の鶏よりも本菌の定着が起きにくいことが示されたが、腸内細菌叢の違いという点から考察すると、週齢ではなく餌の種類が本菌の定着に影響を与えたと考えられた。餌の種類によって鶏腸管の粘液組成や組織学的形態が変わり、本菌の定着に影響を与えたことが過去に報告されたが[7, 8]、餌の種類による腸内細菌叢の違いも本菌の定着に関与している可能性がある。餌の種類における LEfSe 解析の成績と、九州 B で収集した盲腸便試料の汚染・非汚染試料における LEfSe 解析の成績を比較すると、出荷直前に収集した汚染試料に特徴的な細菌であるとされた 10 種類の細菌のうち 4 種類が、さらに週齢ごとに収集した汚染試料に特徴的な細菌であるとされた 31 種類の細菌のうち 15 種類が仕上げ時期に特徴的な細菌と共通していた (図 7, 12, 14)。一方、餌付け・前期の時期と非汚染試料で共通して認められた細菌は存在しなかったことから、餌付け・前期の餌によって本菌の定着が妨げられたのではなく、仕上げ時期の餌が本菌の定着を助長している可能性がある。餌と鶏腸内細菌叢が本菌の定着に与える影響について、さらに試料を収集し、養鶏場ごとに傾向を調査することで、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示された。

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.
5. Chao, A. (1984). Nonparametric estimation of the number of classes in a population. *Scandinavian Journal of Statistics*, 11, 265-270.
6. Awad, W. A., 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. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 6, 154.
7. Fernandez, F., Sharma, R., Hinton, M., & Bedford, M. R. (2000). Diet influences the colonisation of *Campylobacter jejuni* and distribution of mucin carbohydrates in the chick intestinal tract. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 57(12), 1793-1801.
8. Molnár, A., Hess, C., Pál, L., Wágner, L., Awad, W. A., Husvéth, F., Hess, M., & Dublicz, K. (2015). Composition of diet modifies colonization dynamics of *Campylobacter jejuni* in broiler chickens. *Journal of applied microbiology*, 118(1), 245-254.

総括

本事業では、2年間にわたり養鶏場でのカンピロバクターの動態と細菌叢の変化を追跡することでカンピロバクターの汚染防止法開発につながる成績を得た。

カンピロバクターの遺伝子調査では、本菌は空舎時期に排除され、毎回新たに養鶏場に侵入することが明らかとなった。また、その侵入時期は不定期であること、消毒後の長靴から本菌が検出されたことから、頻繁に鶏舎に出入りしている飼育員の長靴を介して起きる汚染が一つの可能性として示された。汚染防止対策としては、長靴の履き替え時に交差汚染が起きないように、清潔・不潔域を明確に分けること、また、長靴の洗浄を徹底することが必要である。しかし、鶏が汚染しているのに長靴から検出されない試料もあり、他にも汚染源がある可能性も考えられる。さらに、本菌の定着は仕上げ時期の鶏に起き易いことが明らかとなったことから、仕上げ時期のカンピロバクター汚染に特に注意が必要と言える。

16S rRNA メタゲノム解析では、鶏腸内細菌叢とカンピロバクターの関係を調査する上で通常便よりも盲腸便の方が適していること、また、主要な構成細菌ではなく存在率が低い細菌に注目して観察する必要があるという、基礎的な知見を得ることができた。腸内細菌叢は餌の種類の影響を最も受けており、餌の種類と本菌の定着における関係を調査することで汚染防除法の開発につながる可能性が示された。また、腸内細菌叢を観察する際に、養鶏場の違いは考慮すべき項目であり、養鶏場ごとに腸内細菌叢の変化を調査する必要がある。本事業では、九州 B の汚染源でカンピロバクターと共存している可能性がある 5 種類の細菌を確認することができたため、同様の方法で他の養鶏場も調査を進めることで、汚染源で本菌と共存している細菌を明らかにできる可能性がある。今後、各養鶏場で汚染源が異なるのか、それとも、汚染源は共通しているが、汚染源に存在する細菌が養鶏場ごとに異なっているのかを調査する必要があるだろう。

本事業の最終目的は本菌侵入の時期と場所、経路を解明し、その汚染を防止する方法を確立することであり、その目的は達成されたと言える。汚染は鶏の週齢を問わず不定期に起きており、常に本菌の侵入は起きうることが示された。一方、本菌の侵入はいつでも起きるものの、定着は仕上げの餌を与えている時期に起きやすいことが示唆されたことから、仕上げの時期に最も本菌の侵入に注意すべきだといえる。また、本菌の侵入は飼育員など頻繁に出入りする者の長靴

を介して起きる可能性がある。したがって、長靴の消毒法の見直しや、履き替える場所で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った。

今後、上述の様な対策を講じた後の鶏舎におけるカンピロバクター汚染率を調査することで、本事業で提案した汚染防止法の効果を確認したいと考えている。また、本事業では本菌の汚染源を特定することができなかつたため、継続して養鶏場での調査を行うのに加え、養鶏場周辺の環境における調査も今後行う予定である。養鶏場外における本菌の分布を調査することで、養鶏場外周縁や汚染源付近へ消石灰を散布し消毒するといった、より具体的な汚染防除法を提案していきたい。

あとがき

本事業では、2年間という限られた時間ではあったが、まず出荷直前の鶏糞便と鶏舎内環境試料および空舎時の鶏舎内環境試料を収集して、カンピロバクター遺伝子検出とメタゲノム解析を行った。この時期は、試料採集方法やDNA抽出法など基本となる手技の信頼性を確認するとともに最適条件を決定するなど、準備段階に多くの時間を費やした。そのため、収集した試料数がまだ多くないところで年度半ばを過ぎてしまい、条件が整ったところでさらに多くの試料収集をお願いしようという矢先、高病原性鳥インフルエンザ流行が始まってしまった。そのため、養鶏場は厳戒態勢となってしまう、我々との業務上の連絡さえスムーズにできない状況であった。結局、各養鶏場とそれまで通りの連絡をとり試料採集を再開してもらえたのは、翌年度の6月上旬だった。しかし、その反面、遅れを取り戻すためによく協力してくれて、週齢ごとの連続の試料収集も2回ずつ繰り返してくれるなど、望外の対応に恵まれ初期の目標以上の収穫があった。一方、初年度は収集した試料が少なかつたとはいえ、計画では全試料の一部だけをメタゲノム解析に使用する予定だったが、試料採集が中断していたことから、ほぼ全ての試料に対して解析でき、次年度に向けて大変参考になる情報を得ることができた。

本文に詳しく報告されているが、この事業でいくつか予想していなかったことが分かった。一つは、鶏群ごとに汚染・非汚染と異なる成績で、鶏舎に残存するカンピロバクターによる汚染というよりも、毎回新たに汚染が起こっていると思われること。空舎期間の洗浄・消毒で汚染はほぼなくなっていると思われること。鶏群へのカンピロバクターの侵入は、1週齢から6週齢までのいつでも不定期に起こっていること。消毒槽に浸漬した長靴でも、カンピロバクターは検出されることである。これらの成績は、対策をきちんと実行すれば、全ての鶏群を汚染から守れると確信できる成績となり、現場で実施可能な汚染防止法の提案に繋がる知見である。また、これまでもいくつか報告があったが、鶏群全体へ汚染が広がるのは4週齢以降の成長が進んだ後の時期であることも確かめられた。特に、成長後期の汚染拡大は、複数の養鶏場について同時期に観察した結果、汚染鶏群に共通して見られ、飼料の切り替えと関連しそうなことも判明したことから、汚染拡大の要因解明にとって重要な知見になると思われる。

一方、本事業で解明できなかった部分として、養鶏場の外から敷地内へどのようにしてカンピロバクターが侵入してくるのか、その汚染源・レゼルボアは何かという点である。今後、養鶏場周辺の環境に生息する野生動物などにも調査の範囲を広げ、さらに数多くの試料を収集し、同様な解析進めることで明らかにできるものと思う。最後に、本事業は、食の安全研究センターに所属する特任教員、研究員、大学院生、事務スタッフによる日夜を問わない献身的な作業があつてこそ達成できたものである。事業に関わつたこれらのメンバーにここで改めて謝意を表したい。

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長
関崎 勉

謝辞

本事業の実施にあたり、協力養鶏場を紹介して下さいました一般社団法人日本食鳥協会専務理事大島照明氏、茨城県北家畜保健衛生所大谷芳子氏に感謝申し上げます。また、事業推進にあたりご助言・ご批判を賜りました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推進委員会委員、日本食鳥協会大島照明氏、北里大学岡村雅史氏、東京大学平山和宏氏、大阪府立大学山崎伸二氏に深謝します。また、日常業務ご多忙な中、鶏および鶏舎内環境試料の採集を行い、ご送付・ご提供戴くことにご快諾下さいました東北、関東、および九州2カ所の養鶏場の皆様に心からの御礼を申し上げます。

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

ホームページ <http://www.frc.a.u-tokyo.ac.jp/>

facebook <https://www.facebook.com/UTokyo.foodscience>

メール shokuhin@frc.a.u-tokyo.ac.jp

〒113-8657 東京都文京区弥生 1-1-1