

平成25年3月18日

レギュラトリーサイエンス新技術開発事業
研究実績報告書

課題番号：2203

「肉用鶏農場のカンピロバクター汚染低減技術の確立等に関する研究」

研 究 期 間：平成22年度～平成24年度（3年間）

研究総括者名：岡村 雅史

試験研究機関名：北里大学獣医学部

I. 試験研究の全体計画

1. 研究目的

*Campylobacter jejuni/coli*によ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、公衆衛生上の重要な問題と位置づけられている。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要因であると指摘されているのは周知の通りである。このような状況を受け、諸外国同様に、わが国も内閣府食品安全委員会において「鶏肉中のカンピロバクター・ジェジュニ／コリ」の食品健康影響評価が実施されたのは記憶に新しい。この結果を取りまとめた評価書（2009年6月）では、わが国固有の問題と言える「鶏肉の生食」の食中毒発生リスク要因としての重要性が特に浮き彫りになった。生食を80%低減すれば、69.6%の感染者数低減率が得られること、食鳥処理場での汚染・非汚染鶏群の区分処理と農場汚染率80%低減の組み合わせは84.0%の感染者数低減をもたらすことが指摘された他、具体的対策として5項目が挙げられている：①鶏肉の生食割合及び加熱不十分割合の低減ならびに交差汚染防止に向けた普及啓発及びリスクコミュニケーション、②鶏肉の生食等の消費者行動を踏まえた管理手法の検討、③農場段階での汚染・非汚染農場の区分及び汚染・非汚染農場を検出するための統一された手法等の開発、④食鳥処理場での塩素濃度管理の徹底等鶏肉への汚染菌数の低減手法の検討、及び⑤農場汚染率の低減に向けた具体的なリスク管理手法の研究開発）。このうち2項目は鶏肉の生食や加熱不十分による感染者の低減を目的としている。一方で、生産及び処理段階での対策（上記下線部）にも注力する必要がある。

本研究課題は、主に生産段階に着目し、①農場へのカンピロバクター侵入の疫学調査と感染経路の解明、②農場段階で鶏群単位での感染の有無を確認するための簡易迅速検査法の開発、③上記の成果を生かした農場段階で実行可能な管理法の開発を行い、現場の状況に対応した実現可能なリスク管理措置の確立に資する。

2. 研究内容

1 中課題1：肉用鶏農場へのカンピロバクター侵入経路の疫学的究明

(1) 小課題1：農場の視察及び各種調査【北里大学獣医学部】

インテグレーター2社及びコンサルタント獣医師との協力体制を継続し、農場を出入りする各種業者や野生動物、さらには農場飼育動物も考慮に入れたアンケート調査（結果は中課題3で活用）と採材を行うとともに、分離株の分子疫学的解析を行い、最終的に菌の侵入経路、拡大経路の特定を行う。さらに、可能であればインテグレーターと契約していない農場についても新規に調査を行い、上記の農場との比較を進める。農場により汚染状況に大きな差が見られる場合は、個別の有効なリスク管理法を検討する。

2 中課題2：農場において鶏群単位での感染の有無の確認及び食鳥処理場での区分処理を行うための方法の開発

(1) 小課題1：迅速検査法の開発と応用【北里大学獣医学部】

従来の細菌学的検査法とリアルタイムPCR法などの遺伝子診断法を用いた迅速な統一のカンピロバクター検出法を確立する。

(2) 小課題2：鶏群区分処理の効果の推定【北里大学獣医学部】

インテグレーターの保有する大規模処理場あるいは地鶏などを処理している認定小規模処理場において、上記統一の検査法を応用した汚染実態調査を行うとともに、汚染鶏群の区分処理の可能性を探り、その効果を推定する。

3 中課題3：生産資材の消毒等の農場で実現可能な管理法の開発

(1) 小課題1：農場での管理法の検討【北里大学獣医学部】

主に文献調査等により、生産資材等の消毒法や、鶏腸管への菌定着の予防法で有望なものをピックアップし、研究室内 *in vivo* 試験を行う。カンピロバクターの糞便中排菌量に影響が見られたものがあつた場合、インテグレーター各社とその契約農場及びコンサルタント獣医師とその実施の可能性について話し合いを通じて試行する。

(2) 小課題2：従事者への教育啓発【北里大学獣医学部】

農場従事者、経営者及び関連業者の意識調査を行う。また、その結果に基づき効果が見込まれる場合は、教育／啓発を行う機会（セミナー開催やポスター配布など）を試験的に作り、その効果を中課題1で得られた農場汚染率や汚染濃度をパラメータとして調査する。

3. 達成目標及び期待される成果

- ①農場及び鶏舎内への菌の侵入経路及び鶏群内での菌の拡大経路を明らかにする。
- ②汚染鶏群の区分処理の可能性を探るとともに、仮に区分処理を実施する場合に有効な遺伝子診断法を提示する。
- ③農場での衛生対策をはじめとする有効なリスク管理法を評価・提示する。また、農場従事者、関連業者の教育・啓発を行うことで鶏群及び鶏肉汚染率の低減につなげる。

4. 年次計画

項目	平成22年度	平成23年度	平成24年度
1. 肉用鶏農場へのカンピロバクター侵入経路の疫学的究明 (1) 農場の視察及び各種調査	農場の汚染調査（北里大）		
2. 農場において鶏群単位で感染の有無の確認及び食鳥処理場での区分処理を行うための方法の開発 (1) 迅速検査法の開発と応用	リアルタイムPCR法の確立（北里大）	リアルタイムPCR法の応用（北里大）	
(2) 鶏群区分処理の効果の推定	処理場の実態調査（北里大）	処理場の汚染調査（北里大）	
3. 生産資材の消毒等の農場で実現可能な管理法の開発 (1) 農場での管理法の検討	文献調査（北里大）	実験室内 in vivo 感染試験（北里大）	農場での試験（北里大）※
(2) 従事者への教育啓発	農場の意識調査（北里大）	ポスター等の作成及び配布（北里大）※	
所要経費（合計）	12,500 千円	10,000 千円	10,000 千円

※当初計画していたが、結果をふまえて実施せず

Ⅱ．実施体制

項目	担当研究機関	研究担当者	エフォート (%)
研究総括者	北里大学獣医学部	◎岡村 雅史	20
1. 肉用鶏農場へのカンピロバクター 侵入経路の疫学的究明 (1) 農場の視察及び各種調査 2. 農場において鶏群単位での感染の 有無の確認及び食鳥処理場での区 分処理を行うための方法の開発 (1) 迅速検査法の開発と応用 (2) 鶏群区分処理の効果の推定 3. 生産資材の消毒等の農場で実現可 能な管理法の開発 (1) 農場での管理法の検討 (2) 従事者への教育啓発	北里大学獣医学部	岡村 雅史	前出

(注) 研究総括者には◎、中課題担当者には○、小課題担当者には△を付すこと。

Ⅲ. 主要な成果

1. 成果の内容

1) 肉用鶏農場へのカンピロバクター侵入経路の疫学的究明

①農場から食鳥処理場における鶏群追跡調査

農場から食鳥処理場までの汚染状況の把握のため、3農場から菌分離を行った。その結果、カンピロバクターは分離されなかったものの、各工程においてサルモネラが分離されたため、その血清型、遺伝子型を検査した。その結果から、農場分離株は同一の汚染源に由来するが、処理場分離株は複数の汚染源に由来すると考えられた。また、消毒前後で生鳥かごのサルモネラ陽性率が減少しなかったことから、生鳥かごが農場間でのサルモネラ汚染の拡大の一因となっている可能性が示唆された。

②農場の飲用水及び捕鳥業者の調査

飲用水及び捕鳥業者が汚染源となるかの検討を行った。前者については、カンピロバクターが農場から出荷された鶏群の盲腸内容から分離されたが、入雛前後や出荷前の飲用水からは分離されなかった。後者については、農場から出荷された鶏群の盲腸内容から分離されたカンピロバクターの菌種・遺伝子型及びサルモネラの血清型・遺伝子型が、捕鳥後・洗浄後の長靴裏から分離されたものと一致した。さらに、捕鳥前の長靴裏から、他の農場で分離された株と同じ血清型・遺伝子型のサルモネラが分離された。以上の結果から、捕鳥業者の長靴の洗浄が不十分である場合、他の農場に汚染を拡大させてしまう可能性が示唆された。

2) 農場において鶏群単位での感染の有無の確認及び食鳥処理場での区分処理を行うための方法の開発

①リアルタイム PCR 法を用いた迅速検査法の確立

平成 23 年度には *C. jejuni* のみ、平成 24 年度には *C. jejuni*/*C. coli* 両方を検出するリアルタイム PCR 法を確立した。前者の検出限界は 3.48×10^5 CFU/g 盲腸便、後者の検出限界はそれよりも約 1 オーダー低い $4.0\text{--}8.8 \times 10^4$ CFU/g 盲腸便であり、前者に比べて感度が改善された。区分処理に向けて市販の遺伝子検査法（食品検査用）の有用性を比較するため、25 鶏群（出荷 1 週間前）の糞便をサンプルとし、PCR 法、リアルタイム PCR 法、LAMP 法で遺伝子検査を行った。出荷後の鶏肉製品の検査結果（培養法）と比較した結果、4 鶏群において糞便と鶏肉製品の検査結果がともに陽性で一致し、残りの 21 鶏群において偽陽性を示さなかった LAMP 法が最も特異性の高い傾向が見られた。

②カンピロバクター検出に適した培養法の検討

鶏盲腸便を含む農場由来サンプルを検査対象とし、平成 23 年度には増菌培地（CEM/ボルトン）、分離培地（CCDA/CCDA(SEL)）の比較を、平成 24 年度には両分離培地を用いて直接塗抹と CEM 増菌培養の比較を行った。その結果、増菌培地間で大きな差はなかったが、分離培地は CCDA では 10 サンプル全てに夾雑菌が認められたのに対し、CCDA(SEL)では全く認められなかった。また、直接塗抹に比べ CEM 増菌後ではコロニー出現率が高い傾向が見られた。CCDA と比べ、CCDA(SEL)は、直接塗抹、増菌後の両方において夾雑菌の発生を有意に抑制し、検出に適していると考えられた。

③処理場の汚染調査

2 処理場で調査した結果、と体の肉眼的な汚染は脱羽後には見られず、内臓摘出後には臓器の破損による汚れが散見された。また、1 処理場で、洗浄後の鶏処理設備に対し拭き取り検査を実施した結果、一部のサンプル（脱毛機、中抜き機等）からサルモネラが検出された。更に、洗浄前後の生鳥かごに対し拭き取り検査を実施した結果、全てのサンプルからサルモネラが検出された。一方、カンピロバクターは設備や生鳥かごから検出されなかった。以上の結果から、脱羽及び内臓摘出の2工程と生鳥かごは、サルモネラ汚染リスク上の重要ポイントであると推測された。

3) 生産資材の消毒等の農場で実現可能な管理法の開発

①鶏腸管への菌定着予防法の検討

鶏腸管への菌の定着を予防し、農場での汚染拡大を防ぐため、中鎖脂肪酸の効果の検討を行った。初生ひなに中鎖脂肪酸を給与し、5日齢でカンピロバクターを接種した。経時的に盲腸便を採材しカンピロバクター菌数を測定した。その結果、接種28日後に初めて有意に盲腸便への排菌数が減少した。また、中鎖脂肪酸の給与により増体に影響は見られなかった。以上の結果から、中鎖脂肪酸の給与を続けることで、鶏自体を損耗させることなく、汚染拡大を防ぐことができる可能性が示された。

②農場従事者の意識調査

平成22年度には19農場に対しアンケートを行い、意識調査を行った。15農場で、鶏肉を介してヒトがカンピロバクターに感染する危険性について認識していることが分かった。また、手の洗浄・消毒とネズミ・昆虫対策を困難と認識する生産者が多かった。これは、鶏舎の構造が要因となるため、更新等の機会がなければ改善しがたいからだと考えられた。平成24年度には農場で実際に用いられている衛生対策マニュアルを入手し、調べたところ、飲水と細霧に関連する対策に力を入れていることが分かった。

2. 成果の活用

開発したカンピロバクター遺伝子検査法を用いて、食鳥処理場への出荷1週間前の段階で食鳥処理時の鶏群のカンピロバクター感染の有無を推定でき、区分処理を実行する際に使用できる可能性が示された。

IV. 研究実績報告

1. 中課題1「肉用鶏農場へのカンピロバクター侵入経路の疫学的究明」

東日本のインテグレーターB 契約農場を対象に、農場から処理場におけるカンピロバクター汚染鶏群追跡調査を行った。平成 22 年度には、3 農場及び処理場から菌分離を行った。その結果、カンピロバクターは分離されなかったが、サルモネラは分離され、血清型別及び PFGE パターンによる遺伝子型別から、農場分離株は同一の汚染源に由来するが、処理場分離株は複数の汚染源に由来すると考えられた。また、いずれの農場の生鳥かごも、洗浄・消毒前後からサルモネラが分離された。平成 23 年度には、別の 3 農場を対象に、捕鳥作業前後及び洗浄後の長靴から菌分離を行った。捕鳥作業前の長靴からサルモネラが、捕鳥作業後及び洗浄後の長靴からはカンピロバクター及びサルモネラが分離された。以上の結果から、農場及び鶏舎内への菌の侵入には、出荷時の生鳥かごや捕鳥業者などがベクターとして寄与している可能性が示された。

平成 24 年度には、さらに別の 3 農場を対象に汚染状況を調査した。その結果、カンピロバクターが鶏舎内の敷料及び盲腸便、処理場の盲腸内容物から分離された。菌数は敷料では増菌レベル ($<10^2$ CFU/g) であったが盲腸内容物では約 10^8 CFU/g であった。一方、同一サンプルを用いてサルモネラ検査も実施したが、含まれる菌数はすべて増菌レベルであり、カンピロバクターとは異なる様相を示した。

カンピロバクター汚染経路の一つに飲水が考えられているため、5 農場を対象に飲用水の調査を実施したが、消毒前であっても対象農場からカンピロバクターは分離されなかった。今回の調査においては、飲水が最初の汚染源となっている可能性は低く、汚染源については不明のままである。一方、分離されたサルモネラはいずれも菌数が増菌レベル以下であり、カンピロバクターとは異なる様相を示した。

(1) 小課題1「農場の視察及び各種調査」

1) 平成 23 年度までの研究実績概要

- 1 : 農場から食鳥処理場におけるカンピロバクター汚染鶏群追跡調査
- 2 : インテグレーター契約外農場におけるカンピロバクター汚染調査
- 3 : 農場における水及び盲腸便の汚染状況の調査
- 4 : 捕鳥業者の長靴、出荷鶏群盲腸便及び肉製品の汚染状況の調査

2) 平成 24 年度の研究実績概要

- 1 : 農場から食鳥処理場におけるカンピロバクター汚染鶏群追跡調査
- 2 : 他地方の農場におけるカンピロバクター汚染調査

3) 成果の内容

(1) 小課題1「農場の視察及び各種調査」

1) 平成 23 年度までの研究実績概要

1 : 農場から食鳥処理場におけるカンピロバクター汚染鶏群追跡調査 (平成 22・23 年度)

インテグレーターB と契約する 3 カ所のブロイラー農場 1 (調査歴なし)、2 及び 3 (カンピロバクター汚染歴あり) において、出荷直前の鶏群におけるカンピロバクター汚染状況を調査し、さらにこれらの鶏群が食鳥処理場において解体処理される際にと体、環境及び製品の汚染状況を調査することで、農場から食鳥処理にいたる一連の汚染状況を追跡した。

カンピロバクターはいずれの農場・処理場のサンプルからも分離されなかった。一

方、サルモネラは農場・処理場いずれのサンプルからも多く分離された（表1）。サルモネラ分離株の血清型別及び PFGE パターンによる遺伝子型別（表2）から、農場分離株（農場サンプル（サービスルーム床、配電盤周り及び鶏舎内長靴の牽引スワブと、鶏糞、盲腸便及び原水の計6サンプル）から分離された菌株）は同一の汚染源に由来するが、処理場分離株は複数の汚染源（汚染された他の鶏群や処理場設備など）に由来すると考えられた。生鳥かごがカンピロバクター陰性鶏群がと殺後陽性となる要因のひとつとなりうる（Slader *et al.*, 2002）ため、洗浄・消毒前後の生鳥かご各 15 点を対象にカンピロバクター及びサルモネラの分離を行った。その結果、カンピロバクターは分離されなかったが、サルモネラは、消毒前後とも、生鳥かご 15 点中 14 点から分離されており、その後の他農場での再利用を考慮すると、生鳥かごは農場間でのサルモネラ汚染拡大の一因となる危険性が示唆された。なお、カンピロバクターについても検査を行ったが、生鳥かごを含めていずれのサンプルからも検出されることはなかった。しかしながら、前述の Slader *et al.* (2002) をはじめとする海外の報告において、再利用された生鳥かごを介したカンピロバクター汚染の拡大が示唆されていることから、生鳥かごの重要性は、農場がカンピロバクターで汚染された場合においても適用されると考えられる。

引用文献

Slader J, Domingue G, Jørgensen F, McAlpine K, Owen RJ, Bolton FJ, Humphrey TJ. 2002. Impact of transport crate reuse and of catching and processing on *Campylobacter* and *Salmonella* contamination of broiler chickens. *Appl Environ Microbiol.* 68:713-9.

表 1：各生産・処理段階におけるサルモネラ陽性率と分離された血清型

サンプル	農場		
	1	2	3
農場サンプル ¹	3/6	6/6	4/6
	ST	SI, S.IIIa	ST
かご（消毒前）	5/5	4/5	5/5
	ST	SA,SI,ST	ST
かご（消毒後）	5/5	4/5	5/5
	ST	SA	SA,ST
脱羽後と体	5/5	5/5	5/5
	ST	SI	SI,ST
盲腸内容 ²	3/5	2/5	3/5
	ST	SI	ST
と体洗浄水	1/1	1/1	1/1
	ST	SI	ST
チラー前と体	5/5	1/5	2/5
	ST	SI	SI,ST
チラー冷却水① ³	1/1	1/1	1/1
	ST	SI	ST
〃② ³	1/1	0/1	1/1
	ST		ST
〃③ ³	0/1	0/1	1/1
			ST
チラー後と体	3/5	0/5	0/5
	ST		
生鮮製品 ⁴	13/23	5/23	6/23
	ST	SI	SI,ST
冷凍製品 ⁵	16/23	5/23	5/23
	ST,SI	SI	SI,ST

ST: *S. Typhimurium*

SA: *S. Agona*

SI: *S. Infantis*

S. IIIa: *Salmonella enterica* subspecies IIIa

¹農場サンプル：サービスルーム床、配電盤回り及び鶏舎内長靴の牽引スワブと、鶏糞、盲腸便及び原水の計 6 サンプル。

²盲腸内容：処理場において中抜き工程で摘出される盲腸を採材し、内部に含まれる内容をサンプルとした。

³チラー冷却水：対象処理場には、3つのチラー槽が連続して設置されており、各槽の冷却水を個別に採取して検査に供した。

⁴生鮮製品：もも肉、むね肉、及びささみ各 1 検体ずつ、手羽元肉、手羽先肉、肝、及び砂肝各 5 検体ずつ。食鳥処理当日採材直後に研究室に持ち帰り、検査に使用した。

⁵冷凍製品：もも肉、むね肉、及びささみ各 1 検体ずつ、手羽元肉、手羽先肉、肝、及

び砂肝各 5 検体ずつを食鳥処理直後に急速冷凍（－43℃、13 時間）したものが処理翌日に発送され、食鳥処理 2 日後に研究室到着後、検査に供された。

表 2：各生産・処理段階において分離されたサルモネラ血清型とその遺伝子型

サンプル	農場		
	1	2	3
農場サンプル	T4	I3,I5,X	T6,T7
かご（消毒前）	T2,T4	I4,I5,T3,A3	T6,T7
かご（消毒後）	T4,T5	A1,A2,A3	T6,T8,T9,A2,A4
脱羽後と体	T2,T4	I4,I5	T6,I6
盲腸内容	T4	I5	T6,T10,T11
と体洗浄水	T4	I5	T6
チラー前と体	T4	I1	T6,I6
チラー冷却水①	T4	I5	T6
〃 ②	T4	—	T6
〃 ③	—	—	T6
チラー後と体	T4	—	—
生鮮製品	T1,T2,T4	I4,I5	T6,I6
冷凍製品	T2,T4,I2	I5	T6,T12,T13,I6,I7,I8

T1～T13：ST、I1～I8：SI、

A1～A4：SA、X：S.Ⅲa

2：インテグレーター契約外農場におけるカンピロバクター汚染調査（平成 22 年度）

インテグレーター契約外農場が見つからなかったため、試験的に某小規模認定処理場で同一ロット（一農場由来の同じ日齢、同じ処分日）の採卵鶏の廃鶏 74 羽を入手し、盲腸内容物を 3～4 羽分ずつプールして 1 サンプルとし、カンピロバクター検査を行った。その結果、20 サンプルのうち 11 サンプルにおいてカンピロバクター属菌が検出され、PCR 法により、*C. jejuni* が 10 サンプル、*C. coli* が 2 サンプルと判明した（1 サンプルは両菌陽性）。本調査から、採卵鶏の廃鶏のカンピロバクター汚染が明らかとなった。しかしながら、廃鶏の肉のリスクを推定する場合は、廃鶏の肉がどのような過程を経てどのような形で消費されるかという点を考慮する必要がある。

3：農場における水及び盲腸便の汚染状況の調査（平成22年度）

インテグレーターBと契約する5カ所のブロイラー農場4-7（カンピロバクター汚染歴あり）及び8（調査歴なし）において、鶏に与える水の供給元となる塩素添加前の原水とニップルの末端の塩素添加後の水各1リットルをそれぞれ1あるいは2サンプル、入雛前から入雛後18日齢までに1回と39～49日齢に1回、計2回採材し、さらにその農場由来の鶏の処理後に5羽の盲腸内容を採材し、カンピロバクター汚染状況を調査した。カンピロバクターは農場4及び6の盲腸内容からは分離されたものの、いずれの水からも分離されず（表3）、本調査では、水がカンピロバクターの感染源である可能性は示されなかった。

表3：飲水及び盲腸便における食中毒菌の分離成績とその遺伝子型

農場	サンプル	サルモネラ検査結果 (陽性検体数/検査検体数)	カンピロバクター検査結果 (陽性検体数/検査検体数)
4	水(入雛前)	0/4	0/4
	水(49日齢)	0/2	0/2
	盲腸内容	0/5	5/5 CJ(J3, J4)
	水(次鶏群3日齢)	0/2	0/2
5	水(入雛前)	0/4	0/4
	水(39日齢)	0/2	0/2
	盲腸内容	0/5	0/5
	水(次鶏群1日齢)	0/2	0/2
6	水(18日齢)	0/2	0/2
	水(47日齢)	0/2	0/2
	盲腸内容	0/5	5/5 CJ(J4)
	水(5日齢)	0/2	0/2
7	水(42日齢)	0/2	0/2
	盲腸内容	2/5 SA(A6)	0/5
	水(7日齢)	0/2	0/2
8	水(42日齢)	0/2	0/2

検査結果中の検査検体数は半数が原水、残りの半数は塩素添加後のニップル水。農場8については処理後の盲腸内容を採取していないため、未検査。

SA: *S. Agona*

CJ: *C. jejuni*

4：捕鳥業者の長靴、出荷鶏群盲腸便及び肉製品の汚染状況の調査（平成23年度）

インテグレーターB と契約する3カ所のブロイラー農場3、9（カンピロバクター汚染歴あり）及び10（調査歴なし）において、鶏群出荷の際に捕鳥者3名の長靴の裏の拭き取りサンプルを、捕鳥前、捕鳥後及び水道水による洗浄後の計3回にわたり採材し、カンピロバクター及びサルモネラの検査を行った（表4）。いずれの農場も同一業者による捕鳥が行われた。

農場3ではカンピロバクターは分離されなかったが、サルモネラは捕鳥後及び洗浄後の長靴裏から分離され、盲腸内容や鶏肉製品から分離された遺伝子型は同一のものを含んでいた。農場9では、捕鳥作業前の長靴からいずれの菌も分離されなかったが、捕鳥後及び洗浄後の長靴からはサルモネラ及びカンピロバクターが分離された。分離株はさらに処理場において採材した当該出荷鶏群由来の鶏肉製品と盲腸便から分離されたものと同じの遺伝子型を含んでいた。これらの結果から、農場の鶏群が保有していた菌が捕鳥者及び鶏肉を汚染したことが示唆された。

農場10では、サルモネラは捕鳥前の長靴からも分離されており、以前の捕鳥作業で洗浄除去できなかったものが付着・生残していると考えられた。さらに、農場9の捕鳥後の長靴裏から分離された菌株と同一の遺伝子型のサルモネラが、農場10の捕鳥前の長靴裏から分離された。以上のことから、捕鳥作業終了後の長靴から菌を除去できなかった場合には、長靴を介して別の農場が同一菌株に汚染される可能性があると考えられた。

表4：捕鳥業者の長靴とその出荷鶏群由来の肉製品と盲腸便における食中毒菌汚染率と分離株の遺伝子型

サンプル	農場3（8/9採材）		農場9（6/23採材）		農場10（9/2採材）	
	サルモネラ	カンピロバクター	サルモネラ	カンピロバクター	サルモネラ	カンピロバクター
長靴裏：捕鳥前	0/3	0/3	0/3	0/3	1/3	0/3
	ST(T1)/SI(I8,I9)					
長靴裏：捕鳥後	2/3	0/3	3/3	3/3	3/3	0/3
	SI(I10)		SI(I9)	CJ(J1)	ST(T2)/SI(I9)	
長靴裏：洗浄後	2/3	0/3	3/3	3/3	2/3	0/3
	SI(I10)		SI(I9)	CJ(J1)	SI(I9)	
盲腸内容	5/5	0/5	5/5	5/5	4/5	4/5
	SI(I10)		SI(I9)	CJ(J1, J2)	SI(I9)	CJ(J1)
手羽先	3/5	0/5	5/5	5/5	5/5	4/5
	SI(I10, J11)		SI(I9)	CJ(J1)	SI(I9)	CJ(J1)
手羽元	3/5	0/5	5/5	5/5	5/5	2/5
	SI(I10, J12)		SI(I9)	CJ(J1)	SI(I9)	CJ(J1)

2) 平成24年度における研究実績概要

1: 農場から食鳥処理場におけるカンピロバクター汚染鶏群追跡調査 (平成24年度)

インテグレーターBと契約する3カ所のブロイラー農場4、11及び12 (カンピロバクター汚染歴あり) において、入雛前の鶏舎内サンプル (サービスルーム床、配電盤、長靴裏、給餌器パイプ、飼料、敷料及び細霧配管内の水)、3週齢及び7週齢時の鶏舎内サンプル (サービスルーム床、配電盤、長靴裏、飼料、敷料 (鶏糞) 及び盲腸便)、さらに出荷後の処理場サンプル (盲腸内容物、手羽先及び手羽元) のカンピロバクター汚染状況を通年調査した。いずれの農場でも、5月から8月入雛鶏群では処理時のカンピロバクター検出率が83% (6処理場中5処理場)、9月から12月入雛鶏群では20% (5処理場中1処理場) であった。以上の結果から、諸外国でも報告されているように日本でも季節性がうかがえる。さらに処理場サンプルでは鶏肉製品のみならず盲腸便でも汚染が認められた (表5-8)。このことは、処理場での交差汚染だけが問題となるわけではなく、7週齢時から出荷までの1週間にも汚染が起こりうることを示唆している。

本調査では、菌数の測定も行った。カンピロバクターの分離された敷料1サンプル及び盲腸便3サンプル中1サンプルは増菌レベル ($<10^{2.6}$ CFU/g) であったが、残りの盲腸便2サンプル及び処理場で採取された盲腸内容物計20サンプルはいずれも 10^6 CFU/g を超えており、特に盲腸内容物はいずれも約 10^8 CFU/g であった。鶏肉製品中のカンピロバクターについてはすべて増菌レベル ($<10^{2.6}$ CFU/g) であった。これは、処理過程において、盲腸内容物の漏出はなかったが交差汚染が起きた、あるいは、盲腸内容物の漏出により汚染が起きたが冷却工程で大量の水による希釈と添加塩素などの殺菌作用により菌数が低減したものと考えられる。

一方、同一サンプルを用いてサルモネラ検査も実施したが、農場サンプルも処理場サンプルも、含まれる菌数はすべて増菌レベル ($<10^{2.6}$ CFU/g) であり、カンピロバクターとは異なる様相を示した。

さらに、農場を巡回するインテグレーターの車が伝播源となる可能性も考慮し、3台からタイヤホイール、運転席マット及び荷台の拭き取りサンプルを1点ずつ、計9サンプル採材し、菌分離を試みたが、カンピロバクター陰性であった。

表5：5月入雛鶏群の調査結果

農場由来サンプルの調査結果1							
農場	入雛日	入雛前	3週齢	出荷一週間前	入雛前	3週齢	出荷一週間前
		サルモネラ			カンピロバクター		
4	2012/5/16	0/7	0/6	0/6	0/7	0/6	1/6 盲腸便 <i>C.jejuni</i>
11	2012/5/16	0/6	3/6 飼料・敷料・盲腸便 <i>S. Typhimurium</i>	4/6 サービスルーム床・長靴裏・敷料・盲腸便 <i>S. Typhimurium</i>	0/6	0/6	0/6
インテグレーターの車両			0/3			0/3	
処理場由来サンプルの調査結果1							
農場(処理場)	サンプル	サルモネラ			カンピロバクター		
4 (α) 2012/7/2	盲腸内容	0/5			5/5 <i>C.jejuni</i>		
	手羽先	1/5 <i>S. Typhimurium</i>			5/5 <i>C.jejuni</i>		
	手羽元	1/5 <i>S. Typhimurium</i>			5/5 <i>C.jejuni</i>		
11 (β) 2012/7/4	盲腸内容	2/5 <i>S. Typhimurium</i>			0/5		
	手羽先	5/5 <i>S. Typhimurium</i>			0/5		
	手羽元	5/5 <i>S. Typhimurium</i>			0/5		

(注) インテグレーターの車両については、タイヤホイール、運転席マット及び荷台の計3カ所の拭き取りサンプルを採取した。

表6：6月/7月入雛鶏群の調査結果

農場由来サンプルの調査結果							
農場	入雛日	入雛前	3週齢	出荷一週間前	入雛前	3週齢	出荷一週間前
		サルモネラ			カンピロバクター		
4	2012/7/19	0/7	0/6	0/6	0/7	0/6	0/6
11	2012/7/19	0/6	4/6 サービスルーム床・長靴裏・敷料・盲腸便 <i>S. Typhimurium</i>	2/6 敷料・盲腸便 <i>S. Typhimurium</i>	0/6	2/6 敷料・盲腸便 <i>C.jejuni</i>	1/6 盲腸便 <i>C.jejuni</i>
12	2012/6/20	0/7	0/6	0/6	0/7	0/6	0/6
処理場由来サンプルの調査結果							
農場(処理場)	サンプル	サルモネラ			カンピロバクター		
4 (β) 2012/9/5	盲腸内容	0/5			5/5 <i>C.jejuni</i>		
	手羽先	0/5			5/5 <i>C.jejuni</i>		
	手羽元	0/5			5/5 <i>C.jejuni</i>		
11 (β) 2012/9/5	盲腸内容	1/5 <i>S. Typhimurium</i>			5/5 <i>C.jejuni</i>		
	手羽先	2/5 <i>S. Typhimurium</i>			5/5 <i>C.jejuni</i>		
	手羽元	3/5 <i>S. Typhimurium</i>			4/5 <i>C.jejuni</i>		
12 (γ) 2012/8/6	盲腸内容	2/5 <i>S. Infantis</i>			5/5 <i>C.jejuni</i>		
	手羽先	2/5 <i>S. Infantis</i>			4/5 <i>C.jejuni</i>		
	手羽元	3/5 <i>S. Infantis</i>			4/5 <i>C.jejuni</i>		

表7：8月/9月入雛鶏群の調査結果

農場由来サンプルの調査結果

農場	入雛日	入雛前	3週齢	出荷一週間前	入雛前	3週齢	出荷一週間前
		サルモネラ			カンピロバクター		
4	2012/9/26	0/7	0/6	0/6	0/7	0/6	0/6
11	2012/9/27	0/7	0/6	2/6 敷料・盲腸便 <i>S.Typhimurium</i>	0/7	0/6	0/6
12	2012/8/31	0/7	0/6	0/6	0/7	0/6	1/6 盲腸便 <i>C.jejuni</i>

処理場由来サンプルの調査結果

農場(処理場)	サンプル	サルモネラ	カンピロバクター
4 (α) 2012/11/12	盲腸内容	0/5	0/5
	手羽先	0/5	0/5
	手羽元	0/5	0/5
11 (β) 2012/11/13	盲腸内容	4/5 <i>S.Typhimurium</i>	0/5
	手羽先	5/5 <i>S.Typhimurium</i>	0/5
	手羽元	3/5 <i>S.Typhimurium</i>	0/5
12 (α) 2012/10/16	盲腸内容	5/5 <i>S.Typhimurium</i>	5/5 <i>C.jejuni</i>
	手羽先	0/5	5/5 <i>C.jejuni</i>
	手羽元	0/5	5/5 <i>C.jejuni</i>

表8：11月/12月入雛鶏群の調査結果

農場由来サンプルの調査結果

農場	入雛日	入雛前	3週齢	出荷一週間前	入雛前	3週齢	出荷一週間前
		サルモネラ			カンピロバクター		
4	2012/12/3	0/6	ND	0/6	0/6	ND	0/6
11	2012/12/6	0/3	ND	2/6 敷料・盲腸便 <i>S. Typhimurium</i>	0/3	ND	0/6
12	2012/11/9	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6

処理場由来サンプルの調査結果

農場(処理場)	サンプル	サルモネラ	カンピロバクター
4 (α) 2013/1/19	盲腸内容	0/5	0/5
	手羽先	0/5	0/5
	手羽元	0/5	0/5
11 (α) 2013/1/22	盲腸内容	4/5 <i>S. Infantis</i> , <i>S. Typhimurium</i>	0/5
	手羽先	3/5 <i>S. Infantis</i>	1/5 <i>C.jejuni</i>
	手羽元	5/5 <i>S. Infantis</i>	0/5
12 (γ) 2012/12/25	盲腸内容	0/5	0/5
	手羽先	0/5	0/5
	手羽元	0/5	0/5

2：他地方の農場におけるカンピロバクター汚染調査（平成24年度）

西日本のインテグレーターCと契約する6農場（番号13～18）の7鶏舎（調査歴なし）において、入雛前の鶏舎内サンプル（土間2カ所、消毒前後の飲水、長靴裏）及び出荷前サンプル（長靴裏、鶏糞3カ所（＝鶏舎入口、中央、奥の敷料）、盲腸便5個）を採取し、カンピロバクター及びサルモネラの汚染状況を調査した。なお、1農場（15）については、最終的に出荷前サンプルが得られなかった。計5農場6鶏舎中、4農場5鶏舎においていずれも出荷1週間前の鶏糞及び盲腸便からカンピロバクターが分離された（表9）。菌数は、農場13で 10^6 CFU/g、農場14では鶏舎2が 10^4 – 10^5 CFU/g、鶏舎1が 10^6 – 10^8 CFU/gであったほかは、増菌レベル（ $<10^{2.6}$ CFU/g）であった。一方、サルモネラについては5農場6鶏舎のうち4農場5鶏舎において出荷前の鶏糞及び盲腸便から分離され、菌数はいずれも増菌レベルであった。両菌ともに入雛前サンプルや飲水サンプル、長靴裏サンプルからは検出されなかった。

表9：インテグレーターCにおける汚染調査結果

農場(鶏舎番号)	入雛日 出荷日	入雛前サンプル 出荷前サンプル		入雛前サンプル 出荷前サンプル	
		サルモネラ		カンピロバクター	
13(24)	2012/5/18 2013/7/8	0/5	0/5	0/5	4/5 <i>C.jejuni</i> 鶏糞(敷料入口・中央・奥)・盲腸便
14(2)	2012/11/17 2013/1/5	0/5	2/5 <i>S.infantis</i> 鶏糞(敷料)中央・盲腸便	0/5	4/5 <i>C.jejuni</i> 鶏糞(敷料入口・中央・奥)・盲腸便
14(1)	2012/11/17 2013/1/5	0/5	4/5 <i>S.infantis</i> 鶏糞(敷料入口・中央・奥)・盲腸便	0/5	3/5 <i>C.jejuni</i> 鶏糞(敷料中央・奥)・盲腸便
15(2)	2012/12/13 2013/2/1	0/5	ND	0/5	ND
16(1)	2012/12/18 2013/2/6	0/5	2/5 <i>S.Schwarzengrund</i> 鶏糞(敷料入口)・盲腸便	0/5	0/5
17(1)	2012/12/22 2013/2/9	0/5	3/5 <i>S.infantis</i> , <i>S.Schwarzengrund</i> 鶏糞(敷料入口・中央)・盲腸便	0/5	1/5 <i>C.jejuni</i> 盲腸便
18(1)	2012/12/29 2013/2/18	0/5	3/5 <i>S.infantis</i> , <i>S.Schwarzengrund</i> 鶏糞(敷料入口・中央・奥)	0/5	2/5 <i>C.jejuni</i> 敷料(鶏糞入口)・盲腸便

ND：サンプルを入手できず、検査を行っていない。

3) 成果の内容

1. 農場でのサルモネラ汚染は同一の汚染源、処理場でのサルモネラ汚染は複数の汚染源にそれぞれ由来することが示唆された。生鳥かごが農場間でのサルモネラ汚染拡大の一因である可能性があると考えられた。農場でのカンピロバクター汚染については、飲用水が原因である可能性は低く、捕鳥業者の靴の洗浄が不十分であることが原因である可能性が高いと考えられた。
2. 農場で採取した盲腸便の汚染菌数はサルモネラよりもカンピロバクターの方が高いことを示した。

2. 中課題2「農場において鶏群単位での感染の有無の確認及び食鳥処理場での区分処理を行うための方法の開発」

平成23年度には *C. jejuni* のみを検出するリアルタイムPCR法、平成24年度には *C. jejuni*/*C. coli* 両方を検出するリアルタイムPCR法を確立した。前者の検出限界は 3.48×10^5 CFU/g 盲腸便、後者の検出限界はそれよりも約1オーダー低い $4.0\text{--}8.8 \times 10^4$ CFU/g 盲腸便であり、前者に比べて感度が改善された。また、25鶏群（出荷1週間前）の農場由来サンプル（糞便）を市販の遺伝子検査法（食品検査用）を用いて検査し、その結果と当該鶏群が出荷された後の鶏肉製品の培養法による検査結果を比較することで、区分処理に向けた遺伝子検査法の有用性を調べた。その結果、4鶏群において農場由来サンプルと鶏肉製品の検査結果がともに陽性で一致し、他の鶏群のサンプルにおいて偽陽性を示さなかった LAMP 法が最も明瞭な結果を示した。培養法については、鶏盲腸便を含む農場由来サンプルを検査対象とした場合、増菌培地にはボルトン培地よりも CEM を用いた方が検出率は高く、分離培地には近年新たに市販されている CCDA (SEL) などの基質特異性拡張型 β ラクターマーゼ (ESBL) 産生菌の発育を抑制できる培地が適切であることが示された。

(1) 小課題1「迅速検査法の開発と応用」

1) 平成23年度までの研究実績概要

- 1: *C. jejuni* 検出用リアルタイムPCR法の開発
- 2: 市販のリアルタイムPCR法の応用
- 3: 他の検査法の応用
- 4: 培養法の改良

2) 平成24年度の研究実績概要

- 1: *C. jejuni*/*C. coli* 同時検出用リアルタイムPCR法の開発
- 2: *C. jejuni*/*C. coli* 同時検出用リアルタイムPCR法の応用
- 3: 培養法の改良（続）

3) 成果の内容

(2) 小課題2「鶏群区分処理の効果の推定」

1) 平成23年度までの研究実績概要

- 1: 処理場の実態調査
- 2: 処理場の汚染調査

2) 平成24年度の研究実績概要

- 1: 市販 *C. jejuni*/*C. coli* 検出用遺伝子検査法の評価と区分処理への効果の推測

3) 成果の内容

(1) 小課題1「迅速検査法の開発と応用」

1) 平成23年度までの研究実績概要

1: *C. jejuni* 検出用リアルタイムPCR法の開発（平成22・23年度）

C. jejuni ゲノムに含まれる数種類の遺伝子を対象として、リアルタイムPCR法に必要なプライマーの設計を行い、さらに当研究室保存株をスタンダードとして用いて、最適な遺伝子Aとその特異的プライマーペアを選定した。その結果、*C. jejuni* ゲノムの10倍階段希釈液は比較的正確な検量線を示し（図1A）、その相関係数 (R^2) は0.988と高い相関を示し、PCRの増幅効率 は103.225%であった。増幅曲線におい

ても約3サイクル ($\sqrt{10}$) 程度ごとに曲線が作成され、理想的と考えられた (図1B)。また、他の菌種 (*Listeria monocytogenes*、*Staphylococcus aureus*、*Escherichia coli* 及び *Salmonella enterica* 11 血清型) では遺伝子の増幅は全く認められず、その特異性が証明された (図2)。次に、鶏盲腸便に *C. jejuni* をスパイクし、検出感度を調べた。*C. jejuni* フリーのブロイラー5羽の盲腸便をプールし、9倍量の PBS を加えて混和した。これを 4.5mL ずつストマッカー袋に分注し、*C. jejuni* 純培養液の 10 倍階段希釈液 0.5mL を加えてさらにストマッカー処理した。このうち各 200 μ L を Qiagen 社の QIAamp DNA Stool Mini Kit に供し、DNA を抽出した。この *C. jejuni* スパイク鶏盲腸便由来 DNA 及び *C. jejuni* 純培養液由来 DNA をサンプルとして本リアルタイム PCR 法を実施し増幅効率を比較すると、前者の 1 反応チューブあたり *C. jejuni* 10^4 CFU 相当の DNA 量からの増幅曲線が、後者の 10^3 CFU 相当の DNA 量からの増幅曲線と一致した (図3)。すなわち、糞便の存在下では、検出菌数が 10 倍程度低下すると考えられた。また、*C. jejuni* スパイク鶏盲腸便 PBS を培養法で計数したときの菌数が 3.48×10^5 CFU/g 盲腸便以上であった場合、本リアルタイム PCR 法でカンピロバクターを検出することができ、本リアルタイム PCR 法の検出限界は、 3.48×10^5 CFU/g 盲腸便と決定した (表 10)。

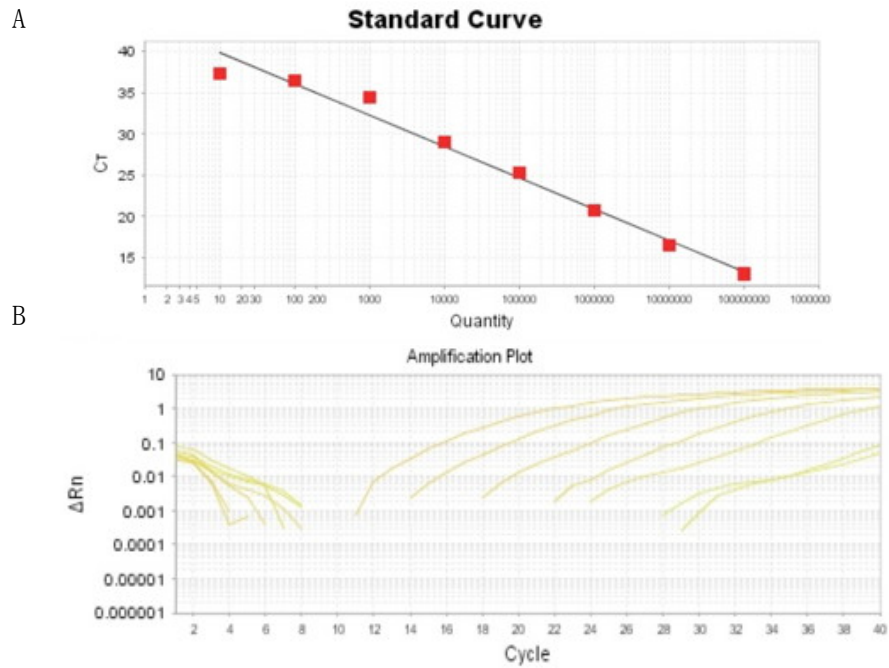


図 1. 10 倍階段希釈した *C. jejuni* ゲノムをスタンダードとし、遺伝子 A の配列に基づいて設計したプライマーペアを用いたリアルタイム PCR で得られた Ct 値及び菌数の検量線 (A) 及び増幅曲線 (B)

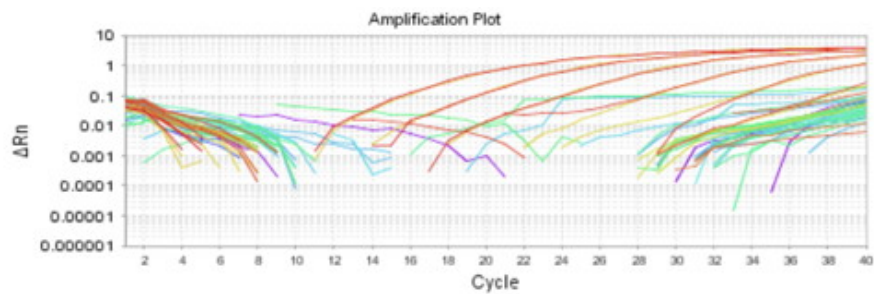
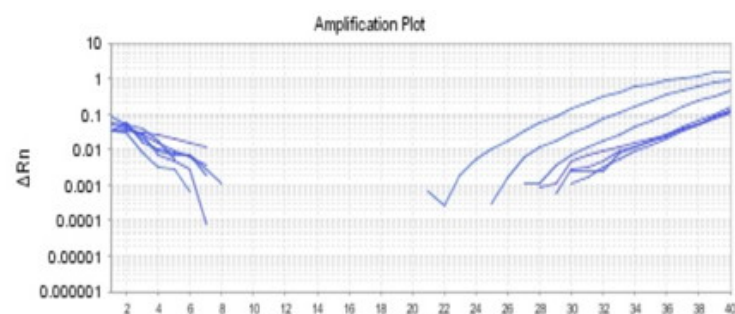


図 2. *C. jejuni* (10 倍階段希釈液) とその他の菌種由来 DNA の増幅曲線
用いた菌種は次の通り : *C. jejuni* (赤色) ; *Listeria monocytogenes*;
Staphylococcus aureus; *Escherichia coli*; *Salmonella enterica* serovars
Typhimurium; Agona; Infantis; Saintpaul; Braenderup; Corvalis; Montevideo;
Thompson; Virchow; Enteritidis; Pullorum。

A



B

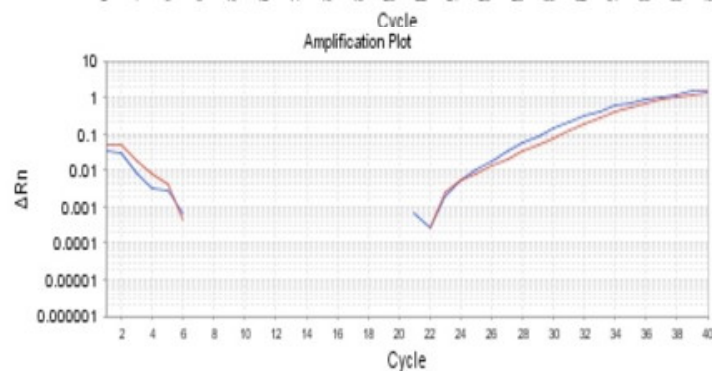


図3. *C. jejuni* をスパイクした盲腸便から抽出した DNA の増幅曲線(A)と *C. jejuni* 純培養液由来 DNA の増幅曲線 (赤色) との比較 (B)。B において、青色曲線：*C. jejuni* スパイク鶏糞便抽出 DNA (1 反応チューブあたり菌 10^4 CFU 相当の DNA 量) からの増幅曲線、赤色曲線：*C. jejuni* 純培養液由来 DNA (1 反応チューブあたり菌 10^3 CFU 相当の DNA 量) からの増幅曲線。

表 10. リアルタイム PCR 法の検出限界

菌数 (培養法)	3.48x10 ⁴	3.48x10 ⁵	3.48x10 ⁶	3.48x10 ⁷	3.48x10 ⁸	3.48x10 ⁹
CFU/g 盲腸便						
リアルタイム	-	+	+	+	+	+
PCR 結果						
CT 値		31.252	27.822	24.205	20.516	17.355

2：市販のリアルタイム PCR 法の応用（平成 23 年度）

実際の農場由来サンプルを想定し、カンピロバクター実験感染鶏由来盲腸便からのカンピロバクター検出を、リアルタイム PCR 法及び食品検査用に LAMP 法を応用して開発された Loopamp カンピロバクター検出キット(栄研化学)で実施した。DNA 抽出に Qiagen 社のキット (QIAamp DNA Stool Mini Kit) を用いた場合、両法において検出が可能であり、LAMP 法でも目視での判定が可能であった(表 11、図 4)。一方、Loopamp カンピロバクター検出キットに付属した ExF(Extraction solution for Foods)液を使用して抽出した DNA サンプルでは、本リアルタイム PCR 法を用いてカンピロバクターを検出することができなかった。このキットは食品用に開発されており、ExF 液を用いたプロトコール内に遠心による糞便除去の過程がなく、糞便に含まれる PCR 阻害物質等がうまく除去できなかったためと考えられる。以上の結果から、Qiagen 社の DNA 抽出キットを使うことで、食品用に開発された Loopamp カンピロバクター検出キットを糞便にも適用できることが分かった。

表 1 1 : 実験感染鶏由来盲腸便からの検出試験 (A : 39 日齢 ; B : 51 日齢)

A

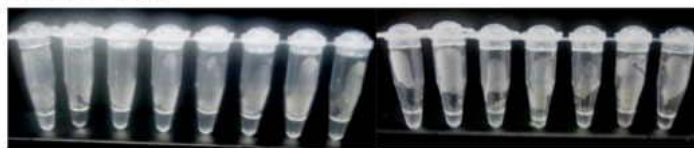
サンプル	培養法	リアルタイムPCR		LAMP法 リアルタイム濁度測定装置使用	
		DNA Stool Kit	ExF	DNA Stool Kit	ExF
1	1.28×10^6	8.8×10^6	—	+	+
2	2.84×10^8	2.5×10^7	—	+	+
3	2.2×10^6	4.7×10^5	—	+	+
4	2.8×10^7	4.1×10^4	—	+	+
5	4.32×10^6	3.9×10^6	—	+	+
6	3.6×10^7	2.8×10^6	—	+	+

B

サンプル	培養法	リアルタイムPCR		LAMP法 リアルタイム濁度測定装置使用	
		DNA Stool Kit	ExF	DNA Stool Kit	ExF
1	6.4×10^7	1.6×10^8	—	+	+
2	2.44×10^6	3.9×10^7	—	+	+
3	4.8×10^7	1.7×10^8	—	+	+
4	2.12×10^8	2.3×10^8	—	+	+
5	1.72×10^8	2.2×10^8	—	+	+
6	2.4×10^7	2.7×10^8	—	+	+

数値はいずれも CFU/g 盲腸便

DNA Stool Kit使用



DNA(+)DNA(-) 1 2 3 4 5 6 1 2 3 4 5 6 39日齢 51日齢 非感染

ExF使用



DNA(+)DNA(-) 1 2 3 4 5 6 1 2 3 4 5 6 39日齢 51日齢 非感染

図 4 : LAMP 法の目視による判定結果

3：他の検査法の応用（平成23年度）

遺伝子検出法のみならず、他の検査法も視野に入れて最も簡便なものを選択できるよう、イムノクロマトグラフ法を応用した市販の診断キットも使用した。このキットでは、増菌前のサンプルでは原液（増菌培地での10倍希釈液）のみが陽性を示したが、ボルトン及びCEMで増菌培養すると、いずれの希釈菌液も陽性となった。なお、PBSで希釈した場合は、本イムノクロマトグラフ法による偽陽性が出た（表12）。

表12：イムノクロマトグラフ法による検出（A, B：各希釈菌液の増菌培養後の菌数；C：増菌前後のイムノクロマトグラフ法による検出結果）

A		CEM				
希釈倍率		0	2	4	6	log(cfu/ml)
	10 ⁻¹	∞	∞	6	0	7.8692317
		∞	∞	31	0	
	10 ⁻²	∞	∞	24	0	7.8808136
		∞	∞	14	0	
	10 ⁻³	∞	132	0	0	6.6532125
		∞	93	0	0	
	10 ⁻⁴	∞	17	0	0	5.69897
		∞	8	0	0	
	10 ⁻⁵	∞	11	0	0	5.4771213
		∞	4	0	0	
	10 ⁻⁶	∞	2	0	0	5.30103
		∞	8	0	0	
	10 ⁻⁷	∞	4	0	0	5.20412
		∞	4	0	0	
	10 ⁻⁸	∞	6	0	0	5.30103
		∞	4	0	0	
	B					
ボルトン						
希釈倍率		0	2	4	6	log(cfu/g)
	10 ⁻¹	∞	181	5	0	6.8273693
		∞	155	2	0	
	10 ⁻²	∞	255	22	0	6.9375179
		∞	178	4	0	
	10 ⁻³	∞	∞	71	0	8.5263393
		∞	∞	97	0	
	10 ⁻⁴	∞	237	12	0	6.9991305
		∞	262	13	0	
	10 ⁻⁵	∞	189	21	0	6.8692317
		∞	181	11	0	
	10 ⁻⁶	∞	253	2	0	7.0261245
		∞	278	7	0	
	10 ⁻⁷	∞	232	1	0	6.91698
		∞	181	13	0	
	10 ⁻⁸	∞	∞	7	0	6.8299467
		∞	169	13	0	

C

イムノクロマト判定結果

	ボルトン		CEM		PBS	
	増菌前	増菌後	増菌前	増菌後	増菌前	増菌後
	希釈倍率					
原液	+	+	+	+	+	
10 ⁻¹	—	+	—	+	+	
10 ⁻²	—	+	—	+	+	
10 ⁻³	—	+	—	+	+	
10 ⁻⁴	—	+	—	+	+	
10 ⁻⁵	—	+	—	+	+	
10 ⁻⁶	—	+	—	+	+	
10 ⁻⁷	—	+	—	+	+	
10 ⁻⁸	—	+	—	+	+	

4：培養法の改良（平成23年度）

平成22年度の成果からカンピロバクターが全く検出されず(Jasson V et al., 2009)近年、基質特異性拡張型βラクタマーゼ（ESBL）産生大腸菌がブロイラーで増加傾向にあり、CCDA培地上での雑菌コロニーとしての混在が検出上の問題となっていることを考慮して、カンピロバクター増菌用培地（CEM/ボルトン）及び分離用培地（CCDA/CCDA（SEL）（関東化学））の比較・検討を行った。以下に、各培地の組成を示す。

CEM：Nutrient broth（CM1;Oxoid）、ウマ脱線血液6-7%、50mg/Lトリメトプリム、20mg/Lバンコマイシン、5000U/LポリミキシンB、2mg/LアンホテリシンB

ボルトン増菌培地：Bolton selective enrichment broth（CM983;Oxoid）、ウマ溶血液5%、Bolton selective supplement（SR183；Oxoid [20mg/Lセフォペラゾン、20mg/Lバンコマイシン、20mg/Lトリメトプリム、51mg/Lシクロヘキシミド]）

CCDA：Campylobacter blood-free selective medium（modified CCDA-Preston（CM739；Oxoid）、CCDA selective supplement（SR155；Oxoid [32mg/Lセフォペラゾン、10mg/LアンホテリシンB]）

CCDA（SEL）：上記CCDAに含有される抗生物質を変更しているが、詳細は不明

増菌培地については、CEMとボルトン培地で増菌後の菌数に大きな違いはなく、これら増菌培地の違いが後の分離培地での検出感度に及ぼす影響も少なかった。しかし、CCDA培地上には、カンピロバクター特有の色調・質感・形状を示さない、いわゆる夾雑菌が多く観察されたが、CCDA（SEL）上にはそのような夾雑菌が全く観察されなかった（写真1）。農場及び処理場由来227サンプル（盲腸便）中30サンプルがカンピロバクター陽性であった。このうちCEMを用いてカンピロバクター陽性となったのは29サンプルであった。また、ボルトン培地を用いてカンピロバクター陽性となったのは27サンプルであった（表13A）。また、CCDAとCCDA（SEL）両方を分離に用いた75サンプルのうち、いずれかの培地でカンピロバクター陽性となったのは20サンプルであり、CCDAで検出できたのは14（ボルトン使用時）あるいは18サンプル（CEM使用時）、CCDA（SEL）で検出できたのは増菌培地の種類にかかわらず19サンプルであった（表13B及びC）。

さらに、4、20あるいは40日齢時にカンピロバクター $10^4 \sim 10^6$ CFUを経口接種した鶏から接種21及び29日後（25及び33、41及び49、あるいは61及び69日齢）の盲腸便をストマッカー袋に個別に採取し、9倍量のボルトンあるいはCEMを加え、 10^{-2} 、 10^{-4} 、 10^{-6} に100倍階段希釈し、CCDAとCCDA（SEL）両培地にスプレッディングし、菌数計算、夾雑菌の有無を確認した。CEMを用いたCCDAとCCDA（SEL）の比較試験では、CCDAを用いた場合、10サンプルすべてで夾雑菌が観察されたがCCDA（SEL）を用いた場合、10サンプルすべてで夾雑菌が観察されなかった。また培地のコロニー数には両培地で差がなかった（表14）。一方、ボルトン培地を用いた比較試験でも、CEM培地を用いた場合と同様に、CCDAでは10サンプルすべてで夾雑菌が観察されたが、CCDA（SEL）を用いた場合には10サンプルすべてにおいて夾雑菌が観察されなかった。また、CCDAとCCDA（SEL）の間で、培地に出現したカンピロバクターのコロニー数には差がなかった（表15）。

引用文献

Jasson V, Samperis I, Botteldoorn N, López-Gálvez F, Baert L, Denayer S, Rajkovic A, Habib I, De Zutter L, Debevere J, Uyttendaele M. Characterization of *Escherichia coli* from raw poultry in Belgium and impact on the detection of *Campylobacter jejuni* using Bolton broth. Int J Food Microbiol. 2009 Nov 15;135(3):248-53.



写真 1 : CCDA (左) と CCDA (SEL) (右) に発育したカンピロバクター及び夾雑菌。矢印は夾雑菌。

表 1 3 : カンピロバクター増菌用培地及び分離用培地のカンピロバクター陽性率の比較

A. CCDA(SEL)での分離の際に用いた増菌培地によるカンピロバクター陽性率の違い

	+	—	計
ボルトン	27	166	193
CEM	29	164	193

B. ボルトン増菌培地使用後の平板培地によるカンピロバクター陽性率の違い

	+	—	計
CCDA	14	61	75
CCDA(SEL)	19	56	75

C. CEM 増菌培地使用後の平板培地によるカンピロバクター陽性率の違い

	+	—	計
CCDA	18	57	75
CCDA(SEL)	19	56	75

表 1 4 : カンピロバクター増菌用培地 (CEM) 及び分離用培地でのカンピロバクター分離菌数及び夾雑菌の有無①

CEM	実験感染鶏の日齢	カンピロバクター		夾雑菌の有無
		カンピロバクター菌数 (log CFU/g 盲腸便)	平均菌数 (log CFU/g 盲腸便)	
CCDA	25	8.133538908	6.65 ± 0.82	+
	33	7.579783597		+
	41	7.079181246		+
	49	6.924279286		+
		6.482873584		+
	61	5.982271233		+
		6.204119983		+
		6.643452676		+
	69	5.380211242		+
		6.041392685		+
CCDA(SEL)	25	7.681241237	6.41 ± 1.03	—
	33	6.230448921		—
	41	7.301029996		—
	49	6.079181246		—
		6.068185862		—
	61	5.602059991		—
		7.079181246		—
		7.770852012		—
	69	5.643452676		—
		4.602059991		—

夾雑菌の有無：夾雑菌のコロニーが認められれば＋、認められなければ－とした。
61 日齢及び 69 日齢の実験感染鶏については各 3 羽から採取した盲腸便を用いた。

表 15 : カンピロバクター増菌用培地 (ボルトン) 及び分離用培地でのカンピロバクター分離菌数及び夾雑菌の有無②

ボルトン	実験感染鶏の日 齢(攻撃時)	カンピロバクター菌 数(log CFU/g 盲腸 便)	カンピロバクター平 均菌数(log CFU/g 盲腸便)	夾雑菌の有無
CCDA	25	7.963787827	7.59±1.52	+
	31	9.838849091		+
	41	7.385606274		+
	47	8.944482672		+
	62	7.380211242		+
		5.681241237		+
		6.342422681		+
		9.785329835		+
	68	5.903089987		+
		6.707570176		—
CCDA(SEL)	25	7.643452676	6.56±0.91	—
	31	7.447158031		—
	41	7.380211242		—
	47	5.716003344		—
	62	6.133538908		—
		7.204119983		—
		7.301029996		—
		5.903089987		—
	68	5.505149978		—
		5.380211242		—

夾雑菌の有無：夾雑菌のコロニーが認められれば＋、認められなければ－とした。

2) 平成 24 年度における研究実績概要

1 : *C. jejuni*/*C. coli* 同時検出用リアルタイム PCR 法の開発 (平成 24 年度)

前年度に開発したリアルタイム PCR 法は *C. jejuni* のみを検出するものであった。しかし、食中毒菌としてはわずかではあるが *C. coli* も含まれることから、新たに両菌を同時に検出できるリアルタイム PCR 法の開発を試みた。①両菌に共通した遺伝子配列を標的とした単独のプライマーペアを用いる方法と②両菌それぞれに特異的な 2 種類のプライマーペアを用いる方法を検討した。

- ① 既報 (Gupta RS, 2006) によると、28 種類のタンパク質が両菌に共通であり、CampyDB で検索したところ、そのうち 8 種類の候補 (CJE0266、CJE0477、CJE0835、CJE1104、CJE1105、CJE1376、CJE1392 及び CJE1552) がゲノム解読済 *C. jejuni* 8 株に存在し、かつプライマー設計が可能であった。そこで、その 8 種類のプライマーペアを用いて *C. jejuni* 6 株、*C. coli* 2 株、*C. lari* 2 株、*C. hyointestinalis* 1 株、*C. upsaliensis* 2 株、*Salmonella enterica* 各種血清型計 11 株、*E. coli*、*Staphylococcus aureus*、*Listeria monocytogenes* 及び *Rhodococcus equi* 各 1 株

のゲノム抽出物についてリアルタイム PCR を行った。その結果、CJE1376 及び CJE1392 に対するプライマーペアを用いた場合にのみ、*C. jejuni* 及び *C. coli* のみに特異的な反応が認められたが、前者では *C. hyointestinalis* 及び *C. upsaliensis* に対しても反応が認められたため、CJE1392 を選択した。(表 16)。しかし、同じ菌数に調整した両菌液を用いて CJE1392 を標的遺伝子としたリアルタイム PCR を実施し、反応を比較したところ、平均 Ct 値が *C. jejuni* で 14.7 であったのに対し、*C. coli* で 32.3 と大きく異なった (図 5)。このため、実際のサンプルに用いると菌数の測定が困難になることから、本プライマーペアを用いた方法は不適と判断した。

- ② 既報 (Wang G et al., 2002) を参考に、*C. jejuni* の特異的遺伝子 *hipO* 及び *C. coli* の *glyA* の特異領域を標的としたプライマーペアを作成し、上記菌株についてリアルタイム PCR 法を行ったところ、いずれもそれぞれ *C. jejuni* 及び *C. coli* のみを特異的に検出できた (表 17)。検量線はいずれも R^2 が 0.999、増幅効率 は 96.96 または 105.79% で理想的であった。また、*C. jejuni* スパイク鶏盲腸便や *C. coli* スパイク鶏盲腸便を培養法で計数したときの菌数が、それぞれ 4.0×10^4 CFU/g 盲腸便、 8.8×10^4 CFU/g 盲腸便以上であった場合、本リアルタイム PCR 法で菌を検出することができ、本リアルタイム PCR 法の検出限界は 4.0 – 8.8×10^4 CFU/g 盲腸便と決定した (図 6 及び 7)。検出限界は前年度に開発した *C. jejuni* 検出用リアルタイム PCR 法よりも約 1 オーダー低くなり、改善されたと言える。

引用文献

- Gupta RS. Molecular signatures (unique proteins and conserved indels) that are specific for the epsilon proteobacteria (Campylobacteriales). BMC Genomics. 2006 Jul 4;7:167. Review.
- Wang G, Clark CG, Taylor TM, Pucknell C, Barton C, Price L, Woodward DL, Rodgers FG. Colony multiplex PCR assay for identification and differentiation of *Campylobacter jejuni*, *C. coli*, *C. lari*, *C. upsaliensis*, and *C. fetus* subsp. *fetus*. J Clin Microbiol. 2002 Dec;40(12):4744–7.

表 16 : 特異性試験の結果

菌種	CJE1376	CJE1392	菌種	CJE1376	CJE1392
<i>Campylobacter jejuni</i> subsp. <i>jejuni</i> ATCC700819	+	+	<i>Salmonella agona</i>	—	—
<i>Campylobacter jejuni</i> subsp. <i>jejuni</i> ATCC33560	+	+	<i>Salmonella typhimurium</i>	—	—
<i>Campylobacter jejuni</i> ATCC BAA-1062	+	+	<i>Salmonella infantis</i>	—	—
<i>Campylobacter jejuni</i> ATCC BAA-2151	+	+	<i>Salmonella saintpaul</i>	—	—
<i>Campylobacter jejuni</i> PD316	+	+	<i>Salmonella braenderup</i>	—	—
<i>Campylobacter jejuni</i> subsp. <i>doylei</i>	+	+	<i>Salmonella corvallis</i>	—	—
<i>Campylobacter coli</i> ATCC33559	+	+	<i>Salmonella pullorum</i>	—	—
<i>Campylobacter coli</i> ATCC BAA-1061	+	+	<i>Salmonella montevideo</i>	—	—
<i>Campylobacter lari</i> ATCC35221	—	—	<i>Salmonella virchow</i>	—	—
<i>Campylobacter lari</i> BAA-1060	—	—	<i>Salmonella enteritidis</i>	—	—
<i>Campylobacter hyointestinalis</i> ATCC35217	+	—	<i>Salmonella thompson</i>	—	—
<i>Campylobacter upsaliensis</i> ATCC43954	+	—	<i>Escherichia coli</i>	—	—
<i>Campylobacter upsaliensis</i> ATCC BAA-1059	+	—	<i>Staphylococcus aureus</i>	—	—
			<i>Listeria monocytogenes</i>	—	—
			<i>Rhodococcus equi</i>	—	—

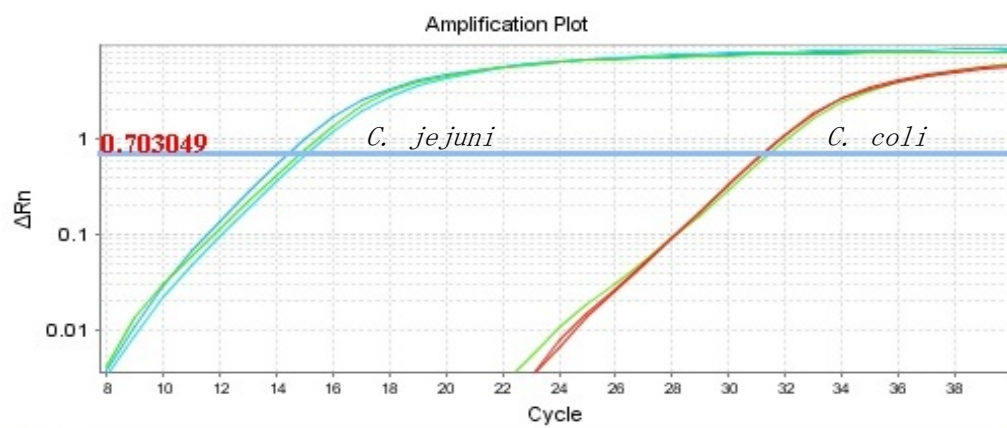


図5 : Ct 値の比較

表 17 : 特異性試験の結果

菌種	hipO	glyA	菌種	hipO	glyA
<i>C. jejuni</i> PD-316	+	—	<i>S. Agona</i>	—	—
<i>C. jejuni</i> subsp. <i>jejuni</i> ATCC33560	+	—	<i>S. Typhimurium</i>	—	—
<i>C. jejuni</i> ATCC BAA-1062	+	—	<i>S. Infantis</i>	—	—
<i>C. jejuni</i> ATCC BAA-2151	+	—	<i>S. Saintpaul</i>	—	—
<i>C. jejuni</i> subsp. <i>jejuni</i> ATCC700819	+	—	<i>S. Braenderup</i>	—	—
<i>C. jejuni</i> subsp. <i>doylei</i>	+	—	<i>S. Corvallis</i>	—	—
<i>C. coli</i> ATCC33559	—	+	<i>S. Pullorum</i>	—	—
<i>C. coli</i> ATCC BAA-1061	—	+	<i>S. Montevideo</i>	—	—
<i>C. lari</i> ATCC35221	—	—	<i>S. Virchow</i>	—	—
<i>C. lari</i> BAA-1060	—	—	<i>S. Enteritidis</i>	—	—
<i>C. hyointestinalis</i> ATCC35217	—	—	<i>S. Thompson</i>	—	—
<i>C. upsaliensis</i> ATCC43954	—	—	<i>Escherichia coli</i>	—	—
<i>C. upsaliensis</i> ATCC BAA-1059	—	—	<i>Staphylococcus aureus</i>	—	—
			<i>Listeria monocytogenes</i>	—	—
			<i>Rhodococcus equi</i>	—	—

・盲腸便液内の *C. jejuni* 各菌液濃度に対するCt値の計測結果

菌液濃度 (CFU/g盲腸便)	0 (超純水)	397	3970	4.0×10^4	4.0×10^5	4.0×10^6	4.0×10^7	4.0×10^8	4.0×10^9
平均Ct値	31.93	31.91	30.82	30.55	27.49	24.01	20.21	16.89	13.35

・作成された検量線 ($4.0 \times 10^4 \sim 4.0 \times 10^9$ CFU/g盲腸便)

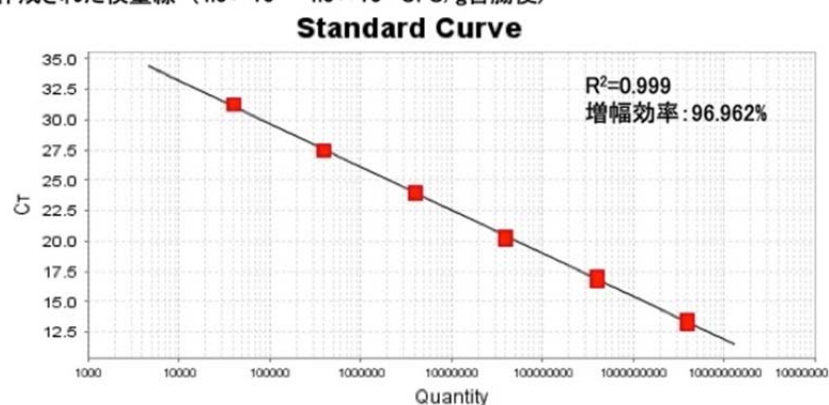


図 6 : *C. jejuni* の検量線と検出限界

・盲腸便液内の *C. coli* 各菌液濃度に対する Ct 値の計測結果

菌液濃度 (CFU/g 盲腸便)	0 (超純水)	878	8780	8.8×10^4	8.8×10^5	8.8×10^6	8.8×10^7	8.8×10^8	8.8×10^9
平均 Ct 値	30.49	31.10	30.66	29.50	26.88	23.69	20.38	16.89	13.81

・作成された検量線 ($8.8 \times 10^4 \sim 8.8 \times 10^9$ CFU/g 盲腸便)

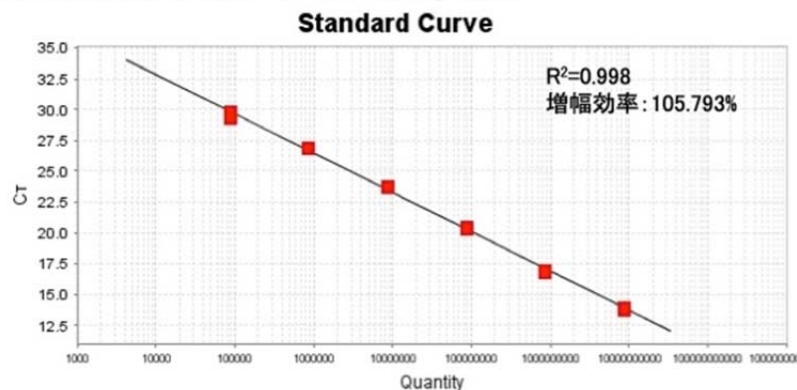


図 7 : *C. coli* の検量線と検出限界

2 : *C. jejuni*/*C. coli* 同時検出用リアルタイム PCR 法の応用 (平成 24 年度)

実際に中課題 1 の調査で得られた 13 サンプル (盲腸便 2、敷料 1、盲腸内容物 10) について上記で開発したリアルタイム PCR 法を適用し、その有用性を評価した。サンプルからの DNA 抽出には Qiagen 社のキットを用いた。その結果、培養法とリアルタイム PCR 法の両方で陽性となったのは 11/13 サンプル、両方で陰性となったのが 1/13 サンプルであった (表 18)。また、1/13 サンプルがリアルタイム PCR 法のみで陽性となり、サンプルが非常に乾燥した敷料であったことから、死菌由来 DNA を検出したことが原因として考えられた。また、両検出法による測定菌数は、いずれのサンプルにおいてもほぼ同程度であり、その差は最大でも約 10 倍であった (表 18)。以上の結果から、本リアルタイム PCR 法では、従来の培養法と同程度の菌数を測定可能であることが示された。

表 18 : 培養法とリアルタイム PCR 法による検出菌数の比較

検体	<i>C. jejuni</i> を用いた検量線に基づく結果		<i>C. coli</i> を用いた検量線に基づく結果		培養法による菌数 (CFU/g)
	平均 Ct 値	菌数 (CFU/g)	平均 Ct 値	菌数 (CFU/g)	
糞便	20.72	3.2×10^7	20.71	6.4×10^7	1.1×10^6
	34.38	検出限界以下	34.01	検出限界以下	—
敷料	22.23	1.2×10^7	22.48	1.8×10^7	—
	15.15	1.2×10^9	15.14	3.6×10^9	2.6×10^8
盲腸内容	17.11	3.3×10^8	17.65	5.8×10^8	1.8×10^8
	17.59	2.5×10^8	17.97	4.6×10^8	3.4×10^8
	18.56	1.3×10^8	18.84	2.5×10^8	1.3×10^8
	19.22	8.6×10^7	19.35	1.7×10^8	6.5×10^8
	21.04	2.6×10^7	20.45	7.7×10^7	2.0×10^7
	21.97	1.5×10^7	22.29	2.0×10^7	7.2×10^7
	20.02	5.1×10^7	20.27	8.8×10^7	8.8×10^7
	20.76	3.2×10^7	21.29	4.2×10^7	2.0×10^7
	20.22	4.5×10^7	20.43	7.8×10^7	1.2×10^8

3：培養法の改良（続）（平成24年度）

前年度、農場及び処理場由来盲腸便75サンプルについてCEMにより増菌培養し、CCDAとCCDA (SEL) 両方を分離に用いたが、24年度にはさらにサンプルを追加し、合計241サンプルとして直接塗抹とCEM増菌培養後塗抹の結果を比較した（表19）。直接塗抹時には、33/241がいずれかの培地で陽性となり、27サンプルが両方で陽性、1サンプルがCCDAのみで陽性、5サンプルがCCDA (SEL)のみで陽性となった。一方、増菌後塗抹時は、38サンプルが両方で陽性となり、33サンプルがCCDA (SEL)のみで陽性であったが、CCDAのみで陽性となったサンプルは0であった。また、CCDA (SEL)におけるカンピロバクター特有の色調・質感・形状を示さないコロニー（夾雑菌）の出現は、CCDAよりも顕著に抑制された（図1）。以上の結果から、農場サンプル及び鶏肉サンプルからのカンピロバクターの分離には、近年新たに市販されている基質特異性拡張型βラクタマーゼ（ESBL）産生菌の発育を抑制できるCCDA (SEL)などの培地が適切であることが示された。

表19：CCDA及びCCDA (SEL)を用いた場合の農場及び処理場由来241サンプルからのカンピロバクター分離率（左：直接塗抹時；右：増菌培養後塗抹）

直接塗抹	CCDA (SEL)		計	
	+	-		
	+	27	1	28
CCDA	-	5	208	213
計	32	209	241	

一日増菌	CCDA (SEL)		計	
	+	-		
	+	38	0	38
CCDA	-	33	170	203
計	71	170	241	

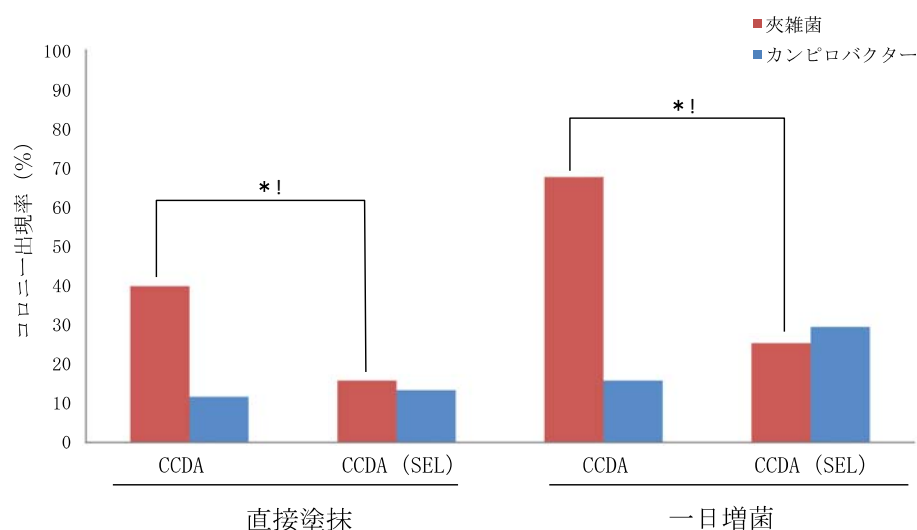


図3 検体（n=241）におけるカンピロバクターおよび夾雑菌のコロニー出現率
*は有意差あり（ $P<0.01$ ）

図8：農場及び処理場由来241サンプルからのカンピロバクター及び夾雑菌の出現率（*： $P<0.01$ ）

3) 成果の内容

1. *C. jejuni/coli* 特異的な同時検出用リアルタイム PCR 法を開発した。
2. 培養法に適切な市販の培地を明らかにした。

(2) 小課題2「鶏群区分処理の効果の推定」

1) 平成23年度までの研究実績概要

1: 処理場の実態調査

<A>大規模処理場の視察（平成22年度）

インテグレーターAの保有する大規模食鳥処理場で処理工程を視察した。さらに、インテグレーターBの保有する2ヵ所の大規模処理場においても中課題1で実施した調査のサンプリングに並行して処理工程を視察した。各処理場の工程をそれぞれ図9-11に示す。一般的に、処理工程におけるカンピロバクター汚染リスク上の重要ポイントは、脱羽及び内臓摘出の2工程である（図9、赤色のラインは筆者加筆）。これらの工程を重点的に視察したところ、と体の肉眼的な汚染は脱羽後に認められることはなく、内臓摘出後の消化管の破損や肝臓などの実質臓器などの破損による内容物・血液汚れが散見された。中課題1の結果にも述べたように、実際のと体拭き取りサンプルからはいずれの工程においてもカンピロバクターは分離されなかったが、サルモネラは分離されたことから、サルモネラの汚染リスク上の重要ポイントである可能性がある。

また、冷却槽内のチラー水における塩素濃度の維持も重要と考えられたため、その工程を視察した。冷却槽の数はインテグレーターAで1つ、インテグレーターB①で3つ、②で2つと異なるものの、いずれにおいても総残留塩素濃度は2時間ごとに確認されていた。しかし、実際にはチラー水は肉眼的にはかなり濁っており、特にインテグレーターBでの調査ではチラー水からサルモネラが分離されたことから、塩素濃度が維持されていてもその効果は有機物存在下における有効塩素濃度の低下及び菌の塩素に対する抵抗性の高さに依存すると考えられる。

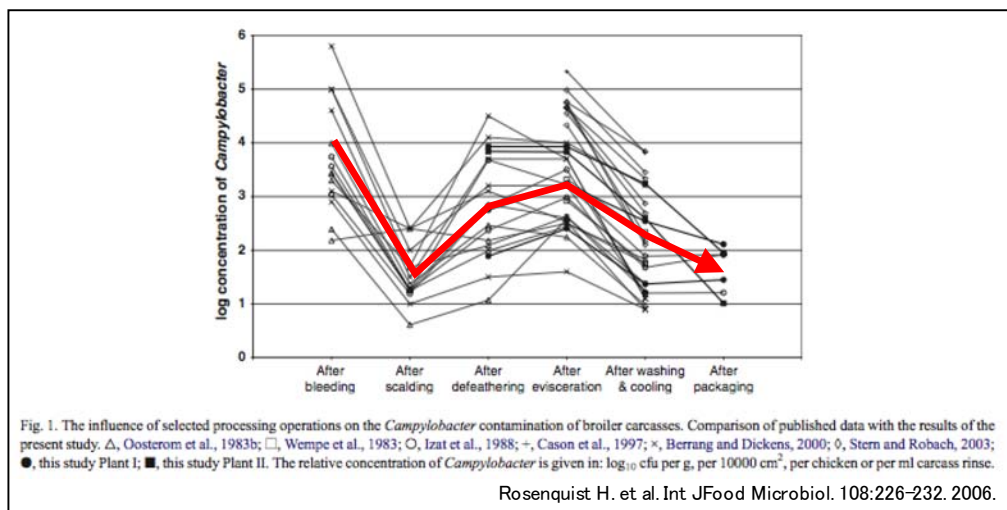


図9：処理場各工程におけるカンピロバクター濃度の増減

 認定小規模処理場の視察（平成22年度）

ある認定小規模処理場を視察した。大規模処理場と異なるのは、①放血が機械ではなく用手による、②脱羽工程ではと体が懸鳥ラインから外れて小型の脱羽器に入り、中でフィンガーが回転することで脱羽される（外部から内部を観察可能）、③脱羽後と体が内臓摘出前に一時的に氷冷される、④内臓摘出が用手による、⑤一次冷却槽のみ塩素が添加され、二次冷却槽は氷水のみ、⑥肉のカット工程が完全手作業による、の6点であった。内臓摘出と体からの水滴が二次冷却槽に落下する、用手による内臓摘出において腸切れが散見されるなど、汚染リスクになり得る場面もあった。なお、処理羽数は500羽／日以下、週2日稼働であった。

引用文献

Rosenquist H, Sommer HM, Nielsen NL, Christensen BB. The effect of slaughter operations on the contamination of chicken carcasses with thermotolerant *Campylobacter*. Int J Food Microbiol. 2006 Apr 25;108(2):226-32.

2：処理場の汚染調査

<A> 大規模処理場の調査（平成23年度）

区分処理以外の汚染低減対策となり得るポイントを探るため、インテグレーターBの保有する処理場内の鶏処理設備の拭き取りサンプルを食鳥処理後の洗浄後に採取し、汚染実態を調査した。拭き取り対象である、脱毛機、ベントカッター、ベントオープナー、中抜き機、マエストロシステム受皿、内臓検査用皿及びジグ、砂肝セパレーター、きも桶、きも洗浄槽、きも冷却槽、肺取機吸口、砂肝ギザートディファッターゴム、砂肝冷却槽の13サンプルのうち、下線9サンプルからサルモネラ (Infantis 6株、Agona 2株及びTyphimurium 1株) が検出されたが、カンピロバクターは検出されなかった（表20）。さらに、処理場において生鳥かご洗浄設備を新しい物に更新する機会があったので、更新前後にそれぞれの設備で採取したかごの拭き取りサンプル計20点（各設備につき洗浄前、後5点ずつ）を培養法により検査した。いずれからも全てのサンプルでサルモネラが検出されたが、カンピロバクターは検出されなかった（表21）。

表 20：処理場内設備拭き取りサンプルの汚染状況

サンプル	サルモネラ	カンピロバクター
脱毛機	+ (Agona:A6) *	-
ベントカッター	+ (Infantis:I12)	-
ベントオープナー	+ (Infantis:I12)	-
中抜き機	+ (Infantis:I12)	-
マエストロシステム受皿	+ (Agona:A6)	-
内臓検査用皿及びジグ	+ (Infantis)	-
砂肝セパレータ	+ (Typhimurium:T14)	-
きも樋	-	-
きも洗浄槽	+ (Infantis:I12)	-
きも冷却槽	+ (Infantis:I12)	-
肺取機吸口	-	-
砂肝ギザートディファッターゴム	-	-
砂肝冷却槽	-	-

* (血清型：PFGE による遺伝子型)

表 21：洗浄設備更新前後の生鳥かごの汚染率と処理場内設備の汚染率

サンプル	洗浄設備更新前かご	洗浄設備更新後かご
洗浄前	5/5 SI	5/5 SA、SI、ST
洗浄後	5/5 SI、ST	5/5 SI、ST

2) 平成 24 年度における研究実績概要

1：市販 *C. jejuni*/*C. coli* 検出用遺伝子検査法の評価と区分処理への効果の推測 (平成 24 年度)

すでに市販されている遺伝子検査法である PCR 法、リアルタイム PCR 法及び LAMP 法は、いずれも食肉を検査対象としている。しかし、これらが農場由来サンプル、特に糞便や盲腸便にも適用可能かどうかは知られていない。そこで、食鳥処理場への出荷 1 週間前に鶏舎内で調査対象鶏群の糞便を採取し、さらに調査対象鶏群が食鳥処理された後、その鶏群に由来する鶏肉製品（胸肉及び肝臓）と盲腸内容物も採取し、従来の培養法に加えて上記 3 種類の遺伝子検査法で検査を実施し、評価した。

インテグレーターB 契約農場の 25 鶏群について、農場において糞便 5 サンプル（約 1g）、処理場において盲腸内容 4 サンプル（内容物全て）、胸肉 5 サンプル（50g 程度）及び肝臓 5 サンプル（50g 程度）、計 475 サンプルを採取し、いずれもプールせずに個別に以下の検査（培養法、菌種の同定、遺伝子検査）に用いた。培養法では CCDA 培地への直接塗抹と、プレストン培地での増菌培養後の CCDA 培地への塗抹を行った。菌種の同定には各種生化学試験及び PCR 法（タカラバイオ、Campylobacter (cdt gene) PCR Detection and Typing Kit）を用いた。遺伝子検査法については、糞便及び盲腸内容物のみを対象として実施し、1 g を Qiagen 社の QIAamp DNA Stool キットの Buffer ASL10mL と十分に混合し、混合液の 2 mL について当該キットを用いて DNA を抽出した。

抽出された DNA を用いて、上記 PCR 法、リアルタイム PCR 法（タカラバイオ、CycleavePCR *Campylobacter(jejuni/coli)* Typing Kit）及び LAMP 法（栄研化学、Loopamp カンピロバクター検出試薬キット）により、カンピロバクターの検出を行った。その結果（表 22）、4 鶏群（f、g、h 及び x）では農場由来糞便がいずれの検査法でも陽性となり、処理場由来サンプルでも鶏群 f の胸肉以外全てで陽性となった。これらの事例は、鶏群の汚染がそのまま鶏肉の汚染につながったためと考えられる。一方、2 鶏群（d 及び e）は農場由来糞便が陰性ながら、処理場由来サンプルが陽性であった。d の場合は処理場での交差汚染と考えられるが、e の場合は盲腸のみ陽性であったことから、出荷前 1 週間での汚染拡大も疑われる。4 農場（a、i、s 及び v）では糞便においてリアルタイム PCR のみで弱陽性（±）ないし陽性（+）の結果が得られ、別の 6 農場（b、m、n、r、y 及び z）では同じく PCR のみで弱陽性の結果が得られたが、いずれも処理場由来サンプルからはカンピロバクターが分離されなかった。リアルタイム PCR 及び PCR が死菌 DNA を検出している可能性も考えられるが、同じサンプルを用いて検査しているため、両方で異なる結果を示す原因は明確ではない。しかし、いずれにしても処理場由来サンプルの結果を考慮すると、4 鶏群において農場由来サンプルと鶏肉製品の検査結果がともに陽性で一致し、他の鶏群のサンプルにおいて偽陽性を示さなかった LAMP 法が、汚染鶏群かつ処理場での潜在的交差汚染源を把握するのに適していると考えられた。したがって、出荷 1 週間前の農場で採取された盲腸便や糞便について LAMP 法を用いて検査をすれば、最も偽陽性を出しにくいと推測される。また、中課題 1 の結果から、出荷前 1 週間で群内で汚染が拡大する可能性を考慮し、農場での採材を可能な限り出荷日の直前にすれば、検査精度と区分処理の効果は上がるものと期待される。

表 2 2 : 各種遺伝子検査法によるカンピロバクター検出結果

鶏群	農場由来 糞便					処理場由来		
	培養法	リアルタイム PCR	PCR		LAMP	盲腸	胸肉	肝臓
			cdtB	cdtC		培養法	培養法	培養法
f	+5/5(C. jejuni)	+(C. jejuni)	+(C. jejuni)	+(C. jejuni)	+	+4/4(C. jejuni)	—	+5/5
g	+5/5(C. jejuni)	+(C. jejuni)	+(C. jejuni)	+(C. jejuni)	+	+4/4(C. jejuni)	+5/5	+5/5
h	+5/5(C. jejuni)	+(C. jejuni)	+(C. jejuni)	+(C. jejuni)	+	+4/4(C. jejuni)	+5/5	+5/5
x	+5/5(C. jejuni)	+(C. jejuni)	+(C. jejuni)	+(C. jejuni)	+	+4/4(C. jejuni)	+3/5	+5/5
d	—	—	—	—	—	+4/4	+5/5(C. jejuni)	+5/5(C. jejuni)
e	—	—	—	—	—	+3/4(C. jejuni)	—	—
a	—	±(C. jejuni)	—	—	—	—	—	—
i	—	+(C. jejuni)	—	—	—	—	—	—
s	—	+(C. jejuni)	—	—	—	—	—	—
v	—	+(C. jejuni)	—	—	—	—	—	—
b	—	—	—	±(C. coli)	—	—	—	—
m	—	—	—	±(C. coli)	—	—	—	—
n	—	—	—	±(C. coli)	—	—	—	—
r	—	—	—	±(C. jejuni/coli)	—	—	—	—
y	—	—	—	±(C. fetus)	—	—	—	—
z	—	—	—	±(C. coli)	—	—	—	—
他9農場	—	—	—	—	—	—	—	—

3) 成果の内容

1. 脱羽及び内情摘出の2工程と生鳥かごは、サルモネラ汚染リスク上の重要ポイントであると推測された。
2. 汚染鶏群を検出するための適切な市販の遺伝子検査法を特定した。

3. 中課題名「生産資材の消毒等の農場で実現可能な管理法の開発」

農場でのリスク管理法に関する文献調査において有効性が示唆された中鎖脂肪酸は、実際の農場での試用には至らなかったものの、実験室内 in vivo 試験においてカンピロバクター定着に対する部分的な抑制効果を示した。また、日齢の異なる鶏を用いて感染実験を行い、ひな導入初期に見られるカンピロバクターの鶏盲腸への定着抑制機序を部分的に解明した。一方、生産者に対してアンケート調査を行い、生産者への教育啓発がカンピロバクター汚染率の低減につながることを明らかにした。また、生産者のみならず関連事業者への教育啓発も同時に行う必要がある。

(1) 小課題 1 「農場での管理法の検討」

1) 平成 23 年度までの研究実績概要

1 : 農場でのリスク管理法に関する文献調査

2 : 実験室内 in vivo 感染試験

2) 平成 24 年度の研究実績概要

1 : 感染実態のシミュレーション

3) 成果の内容

(2) 小課題 2 「従事者への教育啓発」

1) 平成 23 年度までの研究実績概要

1 : 農場（生産者）の意識調査

2) 平成 24 年度の研究実績概要

1 : 農場で実施されている衛生管理マニュアルの入手

3) 成果の内容

(1) 小課題 1 「農場での管理法の検討」

1) 平成 23 年度までの研究実績概要

1 : 農場でのリスク管理法に関する文献調査（平成 22 年度）

1. 衛生管理

農場での汚染拡大を防ぐためには、飼育環境の衛生管理が重要である。特にカンピロバクターにおいては、一旦養鶏場内に持ち込まれると水平伝達によってその群内汚染率は数日以内にほぼ 100%に達し（文献 6, 8）、ブロイラー鶏群のと殺日齢における農場陽性率は数%から 90%以上に及ぶ（文献 3, 6, 7）ことが国内外で報告されている。したがって、空舎期間の確実な洗浄消毒に加え、昆虫やげっ歯類などのベクターコントロール、養鶏場あるいは鶏舎を出入りする人数、従業員の長靴の消毒、ネズミ駆除の立入り、そして清浄な飼料と飲水の使用などを含めた飼育期間中のバイオセキュリティの維持が最も重要と考えられる。また、わが国では一般的なブロイラー飼育期間は 50 日前後であるが、同一鶏舎内手前に雄、奥に雌を配置して出荷日を数日ずらす例や、35-40 日齢で鶏群の一部を出荷する例が散見される。これは出荷前に生産者以外の関連業者の入舎機会を生じることになり、バイオセキュリティの破綻につながる可能性があるため、オールイン・オールアウト方式の採用が望ましい（文献 1）。なお、このような出荷に関連した事項として、カンピロバクター陰性鶏群がと殺後陽性となる要因のひとつとなりうる生鳥かごの洗浄消毒の徹底も重要である（文献 9）。

2. 鶏腸管への菌定着の予防

農場での汚染拡大を防ぐためにもう一つ重要なのは、鶏腸管への菌定着の予防である。いずれの菌に感染しても鶏自体の損耗がほとんどないこと、食品としての鶏肉への残留や、耐性菌の出現などを考慮して、抗生物質の使用はかなり限定される（文献2）。したがって、わが国を含め世界各国でプレバイオティックス／プロバイオティックスや競合排除法製品の飼料添加が多くの実験で検討されている（文献14）。なかでも、近年はカプリル酸などの中鎖脂肪酸のカンピロバクター（文献10,11）排除効果に関する報告が多い。また、新たな方法論としてバクテリオファージ（文献5,13）やバクテリオシン（文献4,12）を応用した排除法も報告されている。

3. 引用文献

1. Allen VM, Weaver H, Ridley AM, Harris JA, Sharma M, Emery J, Sparks N, Lewis M, Edge S. 2008. Sources and spread of thermophilic *Campylobacter* spp. during partial depopulation of broiler chicken flocks. J Food Prot. 71:264-70.
2. Bywater RJ. 2005. Identification and surveillance of antimicrobial resistance dissemination in animal production. Poult Sci. 84:644-8.
3. Evans SJ, Sayers AR. 2000. A longitudinal study of campylobacter infection of broiler flocks in Great Britain. Prev Vet Med. 46:209-23.
4. Line JE, Svetoch EA, Eruslanov BV, Pereygin VV, Mitsevich EV, Mitsevich IP, Levchuk VP, Svetoch OE, Seal BS, Siragusa GR, Stern NJ. 2008. Isolation and purification of enterocin E-760 with broad antimicrobial activity against gram-positive and gram-negative bacteria. Antimicrob Agents Chemother. 52:1094-100.
5. Loc Carrillo C, Atterbury RJ, el-Shibiny A, Connerton PL, Dillon E, Scott A, Connerton IF. 2005. Bacteriophage therapy to reduce *Campylobacter jejuni* colonization of broiler chickens. Appl Environ Microbiol. 71:6554-63.
6. Ono K, Yamamoto K. 1999. Contamination of meat with *Campylobacter jejuni* in Saitama, Japan. Int J Food Microbiol. 47:211-9.
7. Perko-Mäkelä P, Hakkinen M, Honkanen-Buzalski T, Hänninen ML. 2002. Prevalence of campylobacters in chicken flocks during the summer of 1999 in Finland. Epidemiol Infect. 129:187-92.
8. Shreeve JE, Toszeghy M, Pattison M, Newell DG. 2000. Sequential spread of *Campylobacter* infection in a multipen broiler house. Avian Dis. 44:983-8.
9. Slader J, Domingue G, Jørgensen F, McAlpine K, Owen RJ, Bolton FJ, Humphrey TJ. 2002. Impact of transport crate reuse and of catching and processing on *Campylobacter* and *Salmonella* contamination of broiler chickens. Appl Environ Microbiol. 68:713-9.
10. Solis de los Santos F, Donoghue AM, Venkitanarayanan K, Reyes-Herrera I, Metcalf JH, Dirain ML, Aguiar VF, Blore PJ, Donoghue DJ. 2008. Therapeutic supplementation of caprylic acid in feed reduces *Campylobacter*

- jejuni* colonization in broiler chicks. Appl Environ Microbiol. 74:4564-6.
11. Solís de los Santos F, Hume M, Venkitanarayanan K, Donoghue AM, Hanning I, Slavik MF, Aguiar VF, Metcalf JH, Reyes-Herrera I, Blore PJ, Donoghue DJ. 2010. Caprylic Acid reduces enteric campylobacter colonization in market-aged broiler chickens but does not appear to alter cecal microbial populations. J Food Prot. 73:251-7.
 12. Stern NJ, Svetoch EA, Eruslanov BV, Perelygin VV, Mitsevich EV, Mitsevich IP, Pokhilenko VD, Levchuk VP, Svetoch OE, Seal BS. 2006. Isolation of a *Lactobacillus salivarius* strain and purification of its bacteriocin, which is inhibitory to *Campylobacter jejuni* in the chicken gastrointestinal system. Antimicrob Agents Chemother. 50:3111-6.
 13. Wagenaar JA, Van Bergen MA, Mueller MA, Wassenaar TM, Carlton RM. 2005. Phage therapy reduces *Campylobacter jejuni* colonization in broilers. Vet Microbiol. 109:275-83.
 14. Wagner RD. 2006. Efficacy and food safety considerations of poultry competitive exclusion products. Mol Nutr Food Res. 50:1061-71.

2：実験室内 in vivo 感染試験（平成22年度）

ブロイラー初生ひなを12羽×3群に分け、それぞれコントロール群、0.1%中鎖脂肪酸給与群及び0.3%中鎖脂肪酸給与群とした。中鎖脂肪酸の給与は1日齢から開始した。5日齢時に、*Campylobacter jejuni* PD316 株（Lior4 PennerB）菌液を、シーダーバード法により各群12羽中2羽に 3.4×10^8 CFU/羽で経口接種（以後攻撃と表記）した。盲腸便を、攻撃3、7、14、21及び28日後の計5回採材した。また、攻撃29日後に解剖し、肝臓、脾臓及び盲腸内容を採材した。いずれのサンプルについても、9倍量のCEMを加えてホモジナイズ後、PBSで10倍階段希釈液を作製し、CCDA培地に塗抹した。微好氣的に37℃で一日増菌後、出現したコロニー数からサンプル1g当たりの生菌数を算出し、対数値に変換して（検出限界400 CFU/g = $2.3 \log_{10}$ CFU/g）統計学的解析を行った。また、CEMを加えた盲腸便は、微好氣的に37℃で24時間増菌培養後、上記直接塗抹でコロニーが生えなかったサンプルをCCDA培地に塗抹することでカンピロバクター陽性か否かを確認し、増菌レベルで陽性の場合は $1/2 \log_{10} 400$ CFU/gと仮定して統計学的解析を行った。

中鎖脂肪酸給与は、いずれの濃度においても攻撃28日後で初めて有意に盲腸便への排菌数を減少させた（図10）。また、0.3%給与時には29日後の解剖で得られた盲腸内容においてのみ得られた菌数の減少が認められた（図11）。中鎖脂肪酸の給与で鶏の増体に影響は見られなかった（図12）た。出荷直後の盲腸内*Campylobacter*菌数を減少させ、最終的にと体表面への付着菌数を減少できる可能性を検証するために、ブロイラー鶏の出荷日齢（54日前後）直前まで給与を続けるか、あるいは出荷直前の数日間に給与する試験が、更に必要と考えられた。

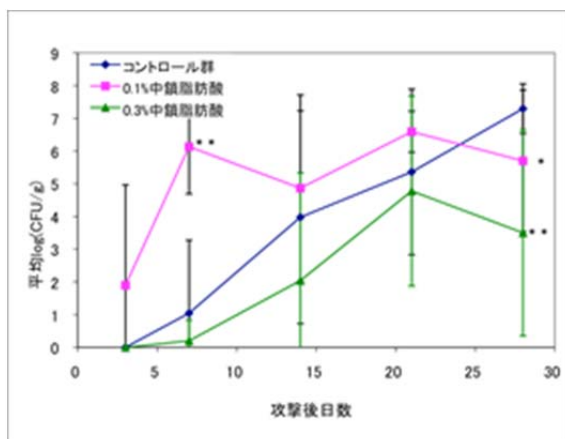


図 10. 攻撃後の盲腸便への排菌数の推移

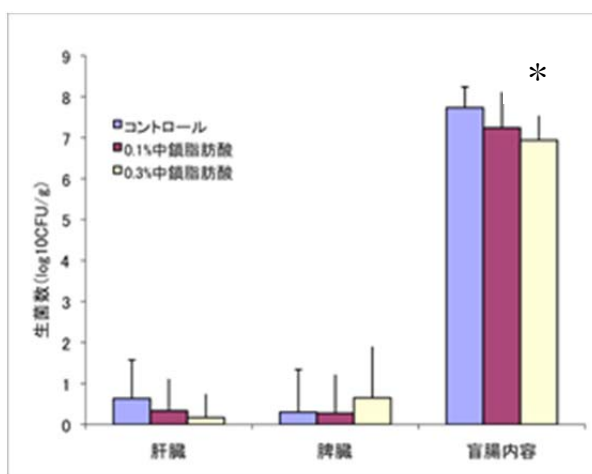


図 11. 解剖時の肝臓、脾臓及び盲腸内容における生菌数

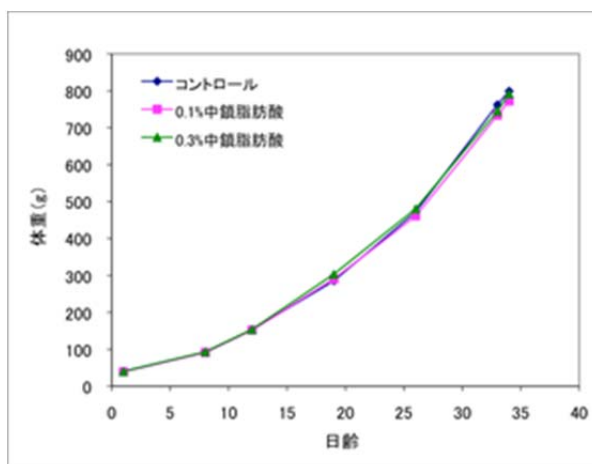


図 12. 平均体重の推移

2) 平成24年度における研究実績概要

1: 感染実態のシミュレーション

世界的な事例報告では鶏群のカンピロバクター汚染は若齢期では顕在化しないことが示されている。そこで、その原因の解明と今後の対策確立に資するため、以下のような実験室内感染実験を行った。

4日齢及び28日齢のブロイラーひなを各30羽用意し、そのうち各15羽には、5%馬脱繊維血加寒天培地に発育したコロニーを滅菌PBSで浮遊・調製した *C. jejuni* (接種菌液 a) を1羽あたりそれぞれ 1.0×10^6 CFU/0.2mL (4日齢ひな) 及び 1.0×10^6 CFU/1.0mL (28日齢ひな) ずつ胃ゾンデを用いてそ嚢内に接種した。残りの各15羽には Brucella broth で発育した *C. jejuni* (接種菌液 b) を1羽あたりそれぞれ 1.0×10^4 CFU/0.2mL (4日齢ひな) 及び 1.0×10^4 CFU/1.0mL (28日齢ひな) ずつ胃ゾンデを用いてそ嚢内に接種した。接種菌液 a 及び b を接種した群はそれぞれ接触しないように別の飼育室で飼育した。よって、鶏群は以下の通りとなった：①4日齢に接種菌 a を投与した群 (以下 4a 群)；②4日齢に接種菌 b を投与した群 (以下 4b 群)；③28日齢に接種菌 a を投与した群 (以下 28a 群)；④28日齢に接種菌 b を投与した群 (以下 28b 群)。接種1、2、3、4、5、7、9、11、14及び17日後に各群の受糞板に落下した新鮮盲腸便を採取して生菌数を測定した。接種4及び17日後に各群から5羽ずつ任意に選定し、頸椎脱臼により安楽死処置後、臓器 (肝臓、脾臓) 及び盲腸内容物を採取して生菌数を測定した。また、t 検定による統計学的解析を行った。その結果、図13のように、いずれの方法で調整された菌液を接種された場合においても、28日齢の方が4日齢よりも菌の検出が4日間程度早く起こることが分かった。さらに4a群と4b群で比較すると、実際には4a群の方が接種菌数が2オーダー高いにもかかわらず、定着前 (攻撃後0～7日) における4a群の盲腸便中の菌数は、4b群より顕著に低かった (Student の t 検定、 $P < 0.05$)。臓器内菌数については群間で大きな違いは認められなかった。

以上の結果から、若齢期には腸管から回収されるカンピロバクター生菌数が低いことが実験的にも証明された。寒天培地に発育したコロニーはバイオフィルム内の菌と類似した遺伝子発現を示すことが報告されており、このことが4a群と4b群の検出菌数が異なった一因かもしれない。また、汚染が認められにくい期間が実際の3週齢程度と比較して実験では1週間程度と短かったが、接種菌数の多さと全羽接種が原因と考えられる。すなわち、実際にはおそらく鶏群のうち数羽のみがより少ない菌数を経口的に摂取し、これが鶏群内を伝播・拡散していくと考えられるため、より時間が必要になる。

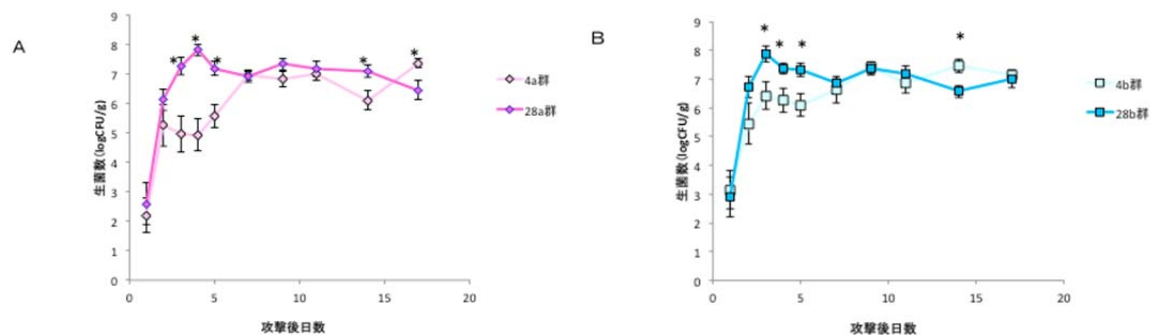


図 13：異なる日齢で、血液寒天培地に発育したコロニーから調整した菌液を 10⁶CFU 接種した場合 (A) と液体培地に発育した菌液を 10⁴CFU 接種した場合 (B) における新鮮盲腸便中の生菌数の推移

3) 成果の内容

1. 中鎖脂肪酸のカンピロバクター定着に対する部分的な抑制効果を示した。
2. 28 日齢ひなに比べ、4 日齢ひなの方がカンピロバクターの鶏盲腸への定着率が低いことが分かった。

(2) 小課題 2 「従事者への教育啓発」

1) 平成 23 年度までの研究実績概要

1：農場（生産者）の意識調査（平成 22 年度）

インテグレーター B と契約する農場のうち 19 戸において、生産者を対象に以下のような意識調査を行った。結果を以下に記載する。

A. 回答者の基本情報について

ブロイラー生産歴	0-10 年：4/19	11-20 年：3/19	>21 年：12/19
オールインオールアウト	あり：19/19		なし：0/19
部分出荷の有無	あり：1/19		なし：18/19
水源	自家水：17/19		水道水：2/19
▶自家水の場合：消毒の有無	あり：17/17		なし：0/17
食の安全、バイオセキュリティ、鶏の健康管理、公衆衛生についてのセミナー等への関心	あり：11/19		なし：8/19

B. 食の安全に対するブロイラー生産におけるリスクに関する意識について

「農場における食の安全」への関心	あり：15/19		なし：4/19
動物用医薬品における薬剤耐性への関心	あり：12/19	なし：6/19	無回答：2/19
▶ありの場合：薬剤耐性の原因は…である。			
疾病治療のための薬剤使用	はい：9/19	いいえ：2/19	無回答：8/19
成長促進・疾病予防のための薬剤使用	はい：7/19	いいえ：2/19	無回答：10/19

過度の／誤った薬剤使用		はい：8/19	いいえ：2/19	無回答：9/19
ヒトにおける薬剤耐性の問題と、ブロイラーにおける薬剤使用の関連性		あり：8/19	なし：10/19	無回答：1/19
▶なしの場合：ヒトにおける薬剤耐性に関連しているのは…				
医療機関等での過剰投与：3/10　ブロイラーだけでなく他の動物なども関与：1/10 分からない：1/10　未回答：5/10				
日本のブロイラーにおいて調査すべき危害は…である。				
薬剤残留	はい：11/19	いいえ：5/19	無回答：3/19	
生産を低下させる病原体	はい：15/19	いいえ：3/19	無回答：1/19	
人獣共通病原体	はい：15/19	いいえ：3/19	無回答：1/19	
▶いずれかに対して「はい」と答えた場合：その調査費用を負担すべきなのは…である。				
消費者	はい：4/19	いいえ：4/19	無回答：11/19	
政府	はい：13/19	いいえ：2/19	無回答：4/19	
生産者	はい：4/19	いいえ：5/19	無回答：10/19	
その他	はい：3/19	いいえ：4/19	無回答：12/19	
鶏肉からヒトへ伝播する恐れのある病原体または危害は…である。				
サルモネラ	はい：16/19	いいえ：3/19	無回答：0/19	
大腸菌	はい：13/19	いいえ：5/19	無回答：1/19	
カンピロバクター	はい：15/19	いいえ：3/19	無回答：1/19	
残留抗生物質	はい：12/19	いいえ：5/19	無回答：2/19	
病原体対策の実施頻度				
飼料添加物の使用	使用なし：7/19	適宜使用：7/19	常に使用：4/19	無回答：1/19
抗菌剤の飼料添加	使用なし：6/19	適宜使用：10/19	常に使用：2/19	無回答：1/19
抗菌剤の飲水添加	使用なし：6/19	適宜使用：12/19	常に使用：0/19	無回答：1/19
有機酸の添加	使用なし：11/19	適宜使用：3/19	常に使用：1/19	無回答：4/19
CE 製品の使用	使用なし：14/19	適宜使用：1/19	常に使用：0/19	無回答：4/19
バイオセキュリティの徹底	しない：0/19	努力：15/19	不十分：0/19	無回答：4/19

C. 対策について

1. 鶏舎内に立ち入り制限区域を設けている						
	はい：10/19		いいえ：1/19		無回答：8/19	
	容易：2/19	やや容易：11/19	可能：3/19	やや困難：2/19	困難：1/19	無回答：0/19
	困難な理由：時間がかかりすぎる（2/3）、費用がかかりすぎる（1/3）					
2. 訪問者は農場内に入る前に手を洗淨消毒している（石鹸を含む）						
	はい：11/19		いいえ：0/19		無回答：8/19	
	容易：0/19	やや容易：12/19	可能：5/19	やや困難：0/19	困難：0/19	無回答：2/19
3. 訪問者は農場内に入る前に衣服を交換している						

	はい：9/19		いいえ：0/19		無回答：10/19	
	容易：0/19	やや容易：11/19	可能：7/19	やや困難：0/19	困難：0/19	無回答：1/19
4. 鶏舎内に入る前に手を洗浄消毒している（石鹸を含む）						
	はい：8/19		いいえ：1/19		無回答：10/19	
	容易：1/19	やや容易：10/19	可能：6/19	やや困難：1/19	困難：0/19	無回答：1/19
	困難な理由：洗浄後の排水の問題（1/1）					
5. 鶏舎内では専用の作業着を使用している						
	はい：11/19		いいえ：0/19		無回答：8/19	
	容易：2/19	やや容易：11/19	可能：4/19	やや困難：0/19	困難：0/19	無回答：2/19
6. 鶏舎内では専用の長靴あるいはブーツカバーを使用している						
	はい：12/19		いいえ：0/19		無回答：7/19	
	容易：4/19	やや容易：11/19	可能：2/19	やや困難：0/19	困難：0/19	無回答：2/19
7. 野鳥が鶏舎に入らない措置を採っている						
	はい：10/19		いいえ：0/19		無回答：9/19	
	容易：2/19	やや容易：13/19	可能：1/19	やや困難：0/19	困難：0/19	無回答：3/19
	困難な理由：時間がかかりすぎる（2/3）、費用がかかりすぎる（1/3）					
8. ネズミが鶏舎に入らない措置を採っている（ネズミ駆除を除く）						
	はい：9/19		いいえ：0/19		無回答：10/19	
	容易：0/19	やや容易：5/19	可能：7/19	やや困難：3/19	困難：1/19	無回答：3/19
9. 昆虫が鶏舎に入らない措置を採っている						
	はい：6/19		いいえ：0/19		無回答：13/19	
	容易：1/19	やや容易：3/19	可能：4/19	やや困難：5/19	困難：4/19	無回答：2/19
	困難な理由：困難な理由：費用がかかりすぎる（3/9）、虫は無理（1/9）、構造上無理（1/9）、無回答（4/9）					
10. 定期的に給餌システムを点検・洗浄している						
	はい：10/19			いいえ：1/19		無回答：8/19
	容易：1/19	やや容易：11/19	可能：3/19	やや困難：0/19	困難：0/19	無回答：4/19
11. 必要に応じて飼料を検査している						
	はい：2/19		いいえ：3/19		無回答：14/19	

	容易：1/19	やや容易：1/19	可能：5/19	やや困難：7/19	困難：2/19	無回答：3/19
	困難な理由：時間がかかりすぎる（1/9）、費用がかかりすぎる（3/9）、飼育農場では難しい（1/9）、未回答（4/9）					
12. 各鶏群飼育期間あるいは空舎期間に配水管を洗浄消毒している						
	はい：10/19		いいえ：1/19		無回答：8/19	
	容易：1/19	やや容易：11/19	可能：4/19	やや困難：0/19	困難：0/19	無回答：3/19
13. 1日2回は鶏群をチェックし、1日1回は死鳥を除去している						
	はい：11/19		いいえ：0/19		無回答：8/19	
	容易：4/19	やや容易：10/19	可能：2/19	やや困難：0/19	困難：0/19	無回答：3/19
14. 薬剤の使用について、鶏群ごとに記録している						
	はい：11/19		いいえ：0/19		無回答：8/19	
	容易：3/19	やや容易：11/19	可能：2/19	やや困難：0/19	困難：0/19	無回答：3/19
15. 各鶏群の記録を保存している						
	はい：10/19		いいえ：0/19		無回答：9/19	
	容易：4/19	やや容易：10/19	可能：2/19	やや困難：0/19	困難：0/19	無回答：3/19
16. 他の鳥類を飼育していない（ペットを含む）						
	はい：11/19		いいえ：0/19		無回答：8/19	
	容易：4/19	やや容易：9/19	可能：2/19	やや困難：0/19	困難：0/19	無回答：4/19
17. 空舎期間中に鶏舎を洗浄消毒している						
	はい：11/19		いいえ：0/19		無回答：8/19	
	容易：4/19	やや容易：10/19	可能：2/19	やや困難：0/19	困難：0/19	無回答：3/19
18. ネズミ駆除業者は清潔な長靴と衣服を使用している						
	はい：11/19		いいえ：0/19		無回答：8/19	
	容易：3/19	やや容易：11/19	可能：2/19	やや困難：0/19	困難：0/19	無回答：3/19
19. 捕鳥業者は清潔な長靴と衣服を使用している						
	はい：10/19		いいえ：0/19		無回答：9/19	
	容易：1/19	やや容易：	可能：6/19	やや困難：	困難：0/19	無回答：3/19

		9/19		0/19		
20. 孵卵場以外の人員がひなを農場へ届けている						
	はい：3/19			いいえ：3/19		無回答：13/19
	容易：1/19	やや容易： 8/19	可能：5/19	やや困難： 0/19	困難：0/19	無回答：5/19

この結果によると、例えば「農場での食の安全を学ぶことに興味がある」は15件（問B-1）、「サルモネラ、大腸菌、カンピロバクター、あるいは残留抗生物質は鶏肉から人へ伝播する恐れがある」はそれぞれ16件、13件、15件、あるいは12件（問B-5）であった。これらのことから、生産者は鶏肉を介したヒトのカンピロバクター感染についてある程度認識していることが分かる。一方、「ブロイラーにおける薬剤残留、生産性を低下させる病原体及び人獣共通感染症病原体のリスクについて調査の必要性がある」についてはそれぞれ11件、15件、及び15件（B-4）であったが、その調査費用を負担すべきなのは政府（13件）と考えている生産者が消費者（4件）や生産者（4件）と考えている生産者よりも多かった。

バイオセキュリティに関する認識については、多くの生産者（15件）は「できるだけ努力している」と答えている。対策（C）の各項目において、実際に実施しているか否かについての回答は19件中5～12件と少なくバラつきもあったため、正確な解析は困難であったが、「昆虫が入らない措置を採っている」と答えたのは6件、「必要に応じて飼料を検査している」と答えたのは2件と、他の項目に比べて非常に少なかった。また、生産者にとって困難あるいはやや困難と認識されている項目は、「鶏舎周辺に立入制限域を設けている」（3件）、「鶏舎に入る前に手を洗浄消毒している」（1件）、「ネズミが鶏舎に入らない措置を採っている（ネズミ駆除を除く）」（4件）、「昆虫が入らない措置を採っている」（9件）、「必要に応じて飼料を検査している」（9件）の5項目であった（C-1～20）。これらの項目のうち、手の洗浄消毒とネズミ／昆虫対策については鶏舎構造によって困難な場合も指摘されたため、鶏舎の更新等の機会でなければ改善されにくいものと考えられる。なお、水源として自家水を使用している17農場はいずれも水の消毒を実施しており（A-4）、配管の洗浄消毒も実施している（C-12）ことから、カンピロバクター汚染との直接的な関連はこの時点では不明である。

本アンケート結果によると、ネズミ駆除業者及び捕鳥業者はいずれも清潔な長靴と衣服を使用している（それぞれ11件及び10件、他は未回答）と答えており、難易度の認識も困難あるいはかなり困難と答えた生産者は0であった。しかし、中課題1において実際に捕鳥作業を観察していると、捕鳥業者は一般的な防水性の作業着を通常の服装の上に着用し、トラックが農場に入る際や捕鳥業者が鶏舎内に入る際も、特別な消毒作業は行っておらず、作業終了時の長靴は水で軽く洗浄するのみであった。このインテグレーターBについては、複数の処理場に生鳥を出荷するのにそれぞれ異なる捕鳥業者が担当しており、いずれも元を辿れば一般の運送会社である。このように、農場から処理場への生鳥出荷は、おそらく他の地方でも同様の業種業態で実施されているものと推測される。出荷の時点で、自分が鶏舎から病原体を運んでしまう可能性があるという意識を持っていない業者が混在していれば、生産段階でそれまで衛生対策を積み重ねていても、汚染が起きてしまう可能性がある。

2) 平成24年度における研究実績概要

1: 農場で実施されている衛生対策マニュアルの入手

インテグレーターBのカンピロバクター汚染率は比較的低いことから、特別な衛生対策を行っている可能性を考慮し、毎年度更新される衛生対策マニュアルを入手した。その内容は、飲水と細霧（主に夏期に暑熱低減のために天井付近から水を噴霧するシステム）に関連する対策となっており、配管の洗浄と、飲水の消毒に力を入れている、というものであった。インテグレーターBの社内データでは、平成22年度3月期の鶏肉汚染率が、本対策を行うことで翌年同時期には半分程度にまで低下したとのことである。ただし、中課題1においてインテグレーターB及びCの飲水の消毒前後の検査を行ったが、いずれもカンピロバクター陰性であったため、消毒前の原水がカンピロバクターに汚染されているとは考えにくい。一方で、配管内のバイオフィルム形成した菌を水流が鶏群へ伝播していた可能性のほか、夏期の細霧システム使用によって鶏糞及び盲腸便を含む敷料が必要以上に水分を含み、乾燥に弱いカンピロバクターの生残に寄与していた可能性も十分に考えられる。

なお、インテグレーターBはカンピロバクター陽性農場に対して厳しい姿勢を示しており、農場側は会社側から十分に教育・啓発を受けているものと考えられた。

3) 成果の内容

1. 生産者への教育啓発がカンピロバクター汚染率の低減につながると考えられた。
2. 生産者のみならず関連事業者への教育啓発が不可欠であると考えられた。

V. 論文、特許等の実績等

別添のとおり。

これまでの論文、特許等の実績等

試験研究課題名	肉用鶏農場のカンピロバクター汚染低減技術の確立等に関する研究
---------	--------------------------------

学術論文

タイトル、著者名、学会誌名、巻、ページ、発行年月	機関名
なし	

口頭発表

タイトル、発表者名、学会等名、発表年月	機関名
「生産段階におけるサルモネラおよびカンピロバクターの制御に向けて」 岡村雅史(鶏病研究会北海道・東北地区技術研修会特別講演、秋田市、09/02/2010)	北里大学
「鶏由来カンピロバクター分離のための増菌培地の比較・評価」 田中佑哉、岡村雅史、清家史生、寺谷知恵、戸塚麻喜、松本和佳子、竹原一明、中村政幸(第150回日本獣医学会学術集会、帯広市、09/18/2010)	北里大学
「ブロイラー農場および関連施設におけるサルモネラ分離状況(2006-2009)」 戸塚麻喜、岡村雅史、清家史生、田中佑哉、寺谷知恵、松本和佳子、佐藤優、竹原一明、中村政幸(第150回日本獣医学会学術集会、帯広市、09/18/2010)	北里大学
「肉用鶏および鶏肉におけるカンピロバクターの制御に向けて」 岡村雅史(平成22年度食肉衛生技術研修会、十和田市、11/27/2010)	北里大学
「ブロイラー農場におけるカンピロバクター制御に向けて」 岡村雅史(第3回カンピロバクター研究会総会シンポジウム、宮崎市、12/04/2010)	北里大学
「肉用鶏の生産段階における食中毒原因菌汚染とその制御ーカンピロバクターを例としてー」 岡村雅史(平成22年度食品安全に係る科学セミナー、東京、01/26/2011)	北里大学
「生産段階におけるカンピロバクター制御の取組み」 岡村雅史(平成22年度日本獣医師会年次大会日本獣医公衆衛生学会シンポジウム、岐阜市、02/11/2011)	北里大学
「農場および食鳥処理場をターゲットとしたカンピロバクター食中毒軽減戦略」 岡村雅史(第262回鶏病事例検討、つくば、09/16/2011)	北里大学
「ブロイラー農場から食鳥処理場に至るサルモネラ汚染鶏群の追跡調査」 岡村雅史、戸塚麻喜、井筒達也、小畠健史郎、佐藤優、中村政幸、吉川泰弘(第152回日本獣医学会学術集、大阪、09/21/2011)	北里大学
「食鳥処理場におけるカンピロバクター対策」 岡村雅史(平成23年度食肉および食鳥肉衛生技術研修会、東京、02/16/2012)	北里大学

「鶏における食中毒菌汚染の制御」 岡村雅史（平成24年度鶏病研究会北海道・東北地区技術研修会、青森、08/31/2012）	北里大学
「鶏盲腸便からのCampylobacter jejuniの迅速検出」 岡村雅史、佐々木翔太、磯村亮輔、吉川泰弘、胡 東良（第154回日本獣医学会学術集会、盛岡、09/16/2012）	北里大学
「ブロイラー農場および食鳥処理場由来検体におけるカンピロバクター汚染濃度」 逸見仁美、鈴木直樹、十川一樹、岡村雅史、胡 東良（第5回日本カンピロバクター研究会、大阪、11/30/2012）	北里大学
「マルチプレックスリアルタイムPCR法を用いた鶏盲腸便からのCampylobacter jejuni/coliの同時検出」 磯村亮輔、岡村雅史、胡 東良（第5回日本カンピロバクター研究会、大阪、11/30/2012）	北里大学

(4) 出版図書

区分:①出版著書、②雑誌、③年報、④広報誌、⑤その他

区分	著書名、(タイトル)、著者名、出版社名、発行年月	機関名
	なし	

(5) 国内特許権等

特許権等の名称	発明者	権利者 (出願人等)	特許権等の種類	番号	出願年月日	取得年月日	機関名
なし							

(6) 国際特許権等

特許権等の名称	発明者	権利者 (出願人等)	特許権等の種類	番号	出願年月日	取得年月日	機関名
なし							