

令和 5 年 6 月 5 日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06432

研究課題名（和文）鶏大腸菌症の起因菌の特定によるブロイラー生産の改善

研究課題名（英文）Improvement of broiler meat production based on identification of causative agents of colibacillosis in chickens

研究代表者

村瀬 敏之（Murase, Toshiyuki）

鳥取大学・農学部・教授

研究者番号：20229983

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：鶏の大腸菌症は発育不良や死亡率の増加をもたらすため、養鶏産業における経済的損失につながる。本症の原因は、特定の性質を示す、すなわち病原性の強い大腸菌が原因である可能性が示唆されているが、その指標となる性質は明らかでない。本研究では、大腸菌症の鶏から分離された大腸菌の多くが系統発生グループFと称される群に属することが明らかとなった。したがって、養鶏場においてグループFの大腸菌を早期に発見することにより、大腸菌症の予防による生産の改善に寄与する可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

鶏の大腸菌症の原因となる大腸菌を特徴づける菌の性質はこれまで明らかでなかったため、診断や発生予防策の確立が困難である。このことは、人の腸管出血性大腸菌症の原因菌が志賀毒素（ペロ毒素）を産生することが指標となっている状況と、明らかに異なる。本研究における遺伝学的な解析の結果、大腸菌症の鶏から分離された大腸菌の多くが系統発生グループFと称される群に属することが明らかとなったことから、養鶏場で検出された大腸菌のグループを調べることにより本症の予防に私することが可能と考えられた。

研究成果の概要（英文）：Colibacillosis in chickens is associated with reduction in meat and egg production and high mortality, resulting in significant economic losses to the poultry industry. It is considered that colibacillosis is caused by virulent strains of *Escherichia coli* although the characteristics the strains were unsure. In the present study, the prevalence of phylogroup F among colibacillosis-related isolates was significantly higher than that 32 among healthy chicken-related isolates. Therefore, the results suggest that immediate detection of *E. coli* strains with phylogroup F in chicken farms contributes to the prevention of colibacillosis and improved production.

研究分野：獣医細菌学

キーワード：鶏大腸菌症 ブロイラー 病原性 系統解析

## 1. 研究開始当初の背景

ブロイラー鶏が大腸菌症に罹患した場合は生産性が高度に低下するため、養鶏産業界に多大な経済的損失をもたらすこととなる。近年、食鳥検査におけるブロイラー鶏の解体禁止の原因として本症が占める割合は、食鳥処理場を所管するほとんどの自治体の統計において、第1位か2位である。応募者のこれまでの調査結果から、鶏の大腸菌症の分子疫学的解析の結果、本症を引き起こす病原性が強い菌株が存在し、それを原因とする集団感染による大腸菌症の発生と考えるべき事例が存在することが明らかとなった。加えて、大腸菌症の鶏から分離された菌株と健康鶏の糞便から分離された菌株の病原性を、実験感染モデルとしてひなと発育鶏卵を用いて検討したところ、大腸菌症由来株はいずれも病原性を示したが、糞便由来株は示さなかった。以上の成績は、健康な鶏の腸管内に存在する大腸菌とは異なり、明らかに鶏に病気を引き起こす大腸菌 (Avian Pathogenic *Escherichia coli*, APEC) が存在することを強く示唆している。

大腸菌は鶏のみならず哺乳類においても腸管外の感染症を引き起こし、その原因となる大腸菌は Extra-intestinal Pathogenic *E. coli* (ExPEC) と呼称される。近年、APEC は ExPEC を構成する一部であると解釈され、鶏以外の ExPEC と共通する病原性関連因子が APEC においても検出される。一方、大腸菌の系統発生的なグループのうち特定のグループに鶏以外の ExPEC の多くが認められることが報告されている。APEC に関する同様の検討は十分になされていないものの、APEC の多くが特定の系統発生グループに属するとしたら、病原性関連因子に加えこのグループも APEC と判断する性状の候補となりうる。

大腸菌症が発生するブロイラーの飼養環境には APEC が必ず存在するので、飼養環境中の APEC の菌数を制御することが大腸菌症の発生予防に有用と考えられる。そのためには飼養環境中に存在する大腸菌の中から APEC と判断される大腸菌を見つけ出すことが必要である。本研究は、APEC の大多数に認められる病原性関連遺伝子と系統発生グループを、APEC と判断するための手段として活用できるのではないかと仮定のもとに計画した。

## 2. 研究の目的

ブロイラーの大腸菌症は、おもに呼吸器より感染し敗血症を引き起こす。本症は国内及び国外を問わず発生が認められ、養鶏産業界に多大な経済的損失を与えているものの、予防対策が確立されていない。応募者をはじめとする疫学的及び病原学的調査の結果、鶏に対し強い病原性を示す大腸菌の菌株が存在していることが明らかにされている。しかし、腸管出血性大腸菌 O157 の志賀毒素産生性のような、鶏大腸菌症の原因となる大腸菌 (Avian Pathogenic *Escherichia coli*, APEC) を特徴づける毒素や血清型のような性状は明らかにされていない。もし、APEC を特徴づける性状を明らかにできれば、それを用いてブロイラー農場における APEC の存在もしくは汚染状況を推定することにより、本症の発生予防対策を講じることが可能となる。そこで本研究では、APEC を特徴づける大腸菌の性状を明らかにすることを目的とする。

## 3. 研究の方法

これまでに大腸菌症に罹患した鶏の病変由来株、健康鶏の糞便由来株及び鶏の飼養環境から分離した大腸菌株を供試した。大腸菌症由来株には集団発生事例から分離された株が含まれるので、遺伝学的に近縁な菌株の重複を避けるため、パルス・フィールド・ゲル電気泳動法 (PFGE) により、互いに異なる PFGE パターンを示す菌株を選択した。大腸菌症以外の分離株についても同様に PFGE パターンが互いに異なる菌株を選択した。それらの菌株を対象に、APEC 及び ExPEC において病原性に関与すると考えられている因子を、PCR 法により検出した。さらに、系統発生的なグループの特定のため近年改良された方法によりグループ分け (遺伝型別) を実施した。

一方、発育鶏卵における大腸菌の病原性を接種後の死亡率に基づく病原性評価により実施した。本法により判定した大腸菌症由来株並びに健康鶏及び鶏舎環境由来株の病原性と遺伝型別との関連を検証した。

## 4. 研究成果

大腸菌症由来株として、採卵鶏の病変由来の 48 株及び肉用鶏の病変由来の 56 株、並びに健康鶏関連株として採卵鶏農場の鶏舎内環境由来の 60 株及び肉用鶏糞便由来の 59 株の計 223 株を用いた。パルスフィールドゲル電気泳動解析により、供試した 223 株について 137 のパルスタイプがみとめられた。2つのパルスタイプを除き、同じパルスタイプに属する株全てが同一の系統発生グループに型別された。グループ F に属するパルスタイプの割合は、健康鶏関連株 (3.1%) に比べ大腸菌症由来株 (48.6%) において有意に高く、グループ A 及びグループ B1 に属するパルスタイプの割合は大腸菌症由来株 (8.1% 及び 18.9%) に比べ健康鶏関連株 (36.7% 及び 49.0%) においてそれぞれ有意に高かった (図 1)。病原性関連遺伝子の保有状況より APEC と判定されたのは 15 のパルスタイプで、このうち 12 のパルスタイプが系統発生グループ F に属し、いずれも大腸菌症の鶏から分離された。グループ A 及びグループ B1 に属する全ての株は APEC でない (non-APEC) と判定された。また、健康鶏関連株に APEC と判定された株はなかった。

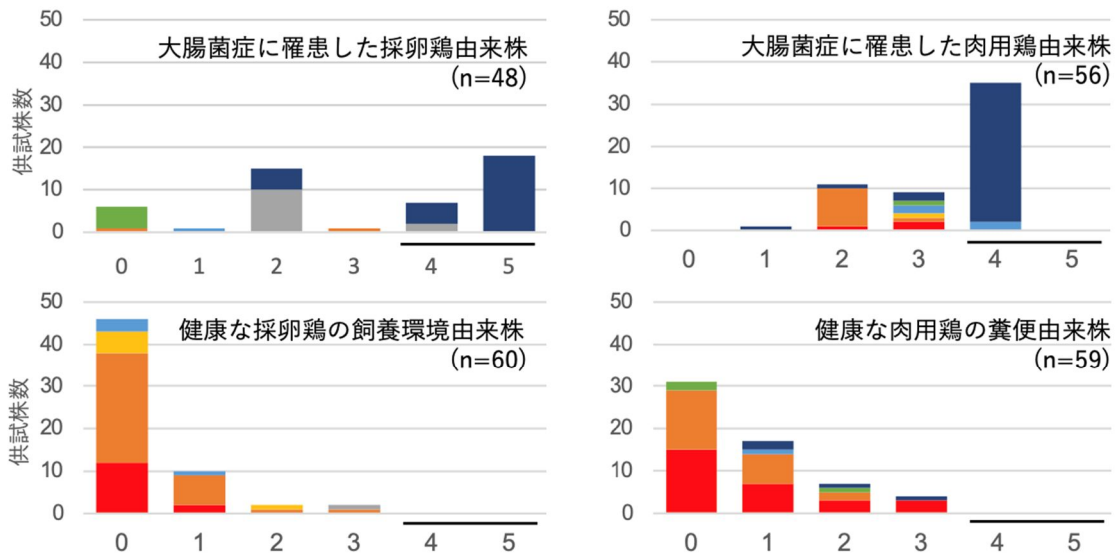


図1. 供試大腸菌菌株の系統発生グループと病原性関連遺伝子の保有状況。  
 系統発生グループ：■, A; ■, B1; ■, B2; ■, C; ■, D; ■, E; ■, F  
 病原性関連遺伝子（横軸）：(1) *kpsMTII*、(2) *iss*、(3) *tsh*、(4) *papA*、*papC*、*papEF*、*sfa*又は*foc*のいずれか、(5) *iutA*又は*fyuA*のいずれか、のうち4つ  
 以上のカテゴリーに該当した場合、APECと判定した。横線はAPEC株を示す。

一方、大腸菌症罹患鶏由来の計 104 株のうち APEC と判定されたのは 61 株で、それ以外の 43 株は non-APEC と判定された（表 1）。この理由として、ウイルスやマイコプラズマによる先行感染や劣悪な飼養環境のため呼吸器粘膜に損傷が生じたため、non-APEC の感染を起こしやすい

表 1. 供試株における病原性関連遺伝子の保有

菌株由来	系統発生 グループ	株数	下記病原性関連遺伝子を保有する株数										APECと判定 された株数*
			<i>kpsMT II</i>	<i>iss</i>	<i>tsh</i>	<i>sfa</i>	<i>foc</i>	<i>papA</i>	<i>papC</i>	<i>papEF</i>	<i>iutA</i>	<i>fyuA</i>	
大腸菌症に罹患した採卵鶏	A	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	B1	2	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0
	B2	12	12	12	0	2	0	0	0	0	0	2	2
	C	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	D	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	E	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
F	28	25	28	23	0	0	0	17	17	26	0	23	
大腸菌症に罹患した肉用鶏	A	3	1	3	1	0	0	0	0	0	3	1	0
	B1	10	0	10	0	0	0	0	1	1	10	0	0
	B2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	C	1	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0
	D	4	3	4	2	0	0	0	1	1	4	1	2
	E	1	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0
F	37	1	36	34	0	0	0	33	28	37	5	34	
健康な採卵鶏の飼養環境	A	13	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	B1	34	0	4	0	0	0	0	1	0	3	0	0
	B2	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0
	C	6	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0
	D	4	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	E	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
F	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
健康な肉用鶏の糞便	A	27	2	8	1	0	0	1	2	3	4	1	0
	B1	21	0	6	0	0	0	0	3	3	1	1	0
	B2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	C	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	D	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
	E	3	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0
F	4	1	1	1	0	0	0	2	2	1	1	0	

\* APECの判定基準は図 1 参照

状態にあった可能性、もしくは、これら non-APEC と判定された菌株に未知の病原性関連因子が存在している可能性が考えられた。莢膜の形成に関連する *kpsMTII* 遺伝子は大腸菌症に罹患した採卵鶏由来株において 77% (37/48) にみとめられたが、肉用鶏由来株では 8.9% (5/56) に過ぎなかった。APEC には複数の病原型が存在することが知られているため、本研究に教示した菌株の病原学的な解析により *kpsMTII* 遺伝子の機能が明らかにされる可能性がある。

供試株の発育鶏卵における病原性を調べるため、1 株あたり 12 個の発育鶏卵に接種して鶏胚 4 個以上を死滅させた場合を病原性、3 個以下の場合を非病原性と判定した。グループ F の大腸菌症由来 APEC 株のうち 39 株は鶏胚に病原性を示したものの、残る 18 株は非病原性と判定された (図 2)。グループ F の健康鶏関連株(non-APEC)のうち 3 株を供試したところ、2 株が非病原性、1 株が病原性と判定された。F 以外のグループの株も含め大腸菌症由来の APEC 株 61 株のうち 42 株が、また、non-APEC の 43 株のうち 17 株が鶏胚に病原性を示した。健康鶏関連株 92 株(いずれも non-APEC)のうち 5 株のみが鶏胚に病原性を示した。接種した発育鶏卵 12 個のうち死滅したのが 3 個以下であった菌株(非病原性)について、大腸菌症由来株の鶏胚致死率は平均 16%であったのに対し、健康鶏関連株では 4.5%であった。

以上の成績より、大腸菌症由来株と健康鶏関連大腸菌を構成する主要な系統発生グループがそれぞれ異なること、系統発生グループと病原性関連遺伝子の保有に基づく APEC の判定が相關することが示唆された。

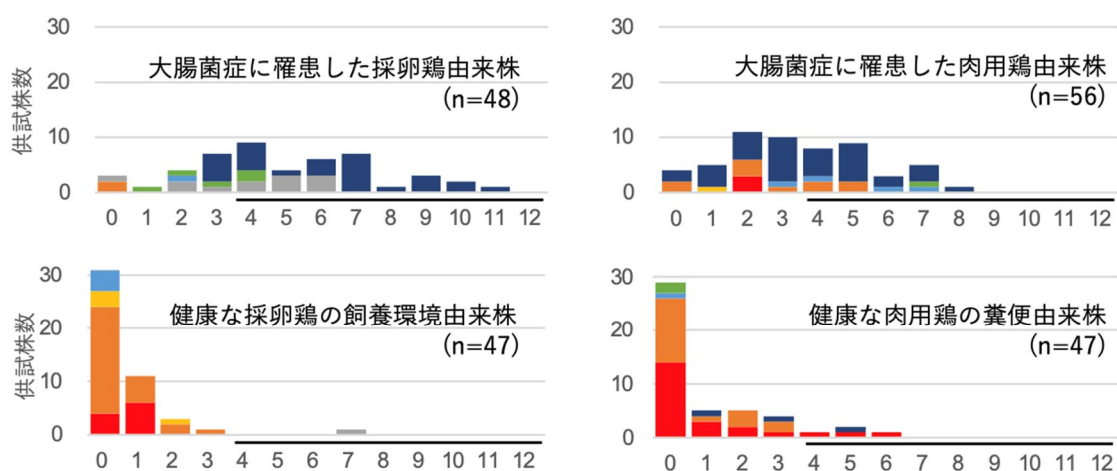


図2. 供試大腸菌菌株の系統発生グループと発育鶏卵接種後48時間までの死亡胚数。  
 系統発生グループ：■, A; ■, B1, ■, B2; ■, C; ■, D; ■, E; ■, F  
 死亡鶏胚数 (横軸)：各菌株を接種した12個の発育鶏卵のうち、4個以上死亡した場合病原性ありと判定した。横線は病原性ありの株を示す。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Murase Toshiyuki、Ozaki Hiroichi	4. 巻 101
2. 論文標題 Relationship between phylogenetic groups of Escherichia coli and Pathogenicity among Isolates from chickens with Colibacillosis and healthy chickens	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Poultry Science	6. 最初と最後の頁 102007 ~ 102007
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.psj.2022.102007	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 村瀬敏之、河原あかね、尾崎弘一
2. 発表標題 鶏大腸菌症及び健康鶏由来大腸菌の発育鶏卵接種試験における病原性
3. 学会等名 第164回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 村瀬敏之、河原あかね、尾崎弘一
2. 発表標題 鶏大腸菌症及び健康鶏由来大腸菌の系統解析に基づく型別（Phylogenetic group）
3. 学会等名 第163回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
研究協力者	尾崎 弘一  (OZAKI Hiroichi)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------