

令和元年5月21日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08015

研究課題名(和文)カンピロバクター食肉汚染防除のための鶏腸管・環境メタゲノム解析

研究課題名(英文) Metagenomic analysis of microbiota within chicken intestinal tract and environment for prevention of Campylobacter spread to chicken meat

研究代表者

渡辺 孝康 (WATANABE, Takayasu)

日本大学・歯学部・助教

研究者番号：70725514

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：国内養鶏場において、鶏の盲腸便試料および送風機、給水機など飼育環境のスワブ拭き取り試料から、腸内細菌叢の細菌構成が鶏の成育段階に沿って、週齢依存的に変化していることが示された。一方、カンピロバクターは週齢によって検出率が異なっていた。よって、前述のような細菌叢の構成変化が、カンピロバクターの定着に影響を与えている可能性が示唆された。特に、カンピロバクターの検出の有無によって試料を陽性群と陰性群に2分したとき、両群の間で有意に相対比率に差のあった細菌群が、細菌叢の構成変化に関与していると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

カンピロバクターの定着率に変化のある成育段階を推定し、定着を防止するための具体的な方策の考案に生かすことができる。また、細菌叢において特定の細菌群の定着の阻害もしくは促進を通じ、カンピロバクターの定着に変化を与えることが可能となれば、食肉処理より上流となる養鶏場の段階でカンピロバクターの汚染防除を達成し、食中毒リスクの大幅な低減に繋がると期待される。

研究成果の概要(英文)：We analyzed bacterial composition and presence of Campylobacter in the samples of chicken cecal feces and swabs used to wipe the surface of fan and water dispenser in chicken farms in Japan. We observed that the bacterial composition was flexible in an age-dependent manner, whereas the detection rate of Campylobacter was different among ages in week. These observations suggested that the change of bacterial composition would influence Campylobacter colonization. In particular, the bacterial group exhibiting significant difference in their abundance between the Campylobacter-positive and -negative samples were considered to be potentially responsible for the change of bacterial composition.

研究分野：口腔細菌学

キーワード：カンピロバクター 食中毒 メタゲノム解析 16S rRNA遺伝子 Nested PCR

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

カンピロバクター食中毒は、本邦において発生件数が最多の食中毒である。その原因となる細菌であるカンピロバクターは、ヒトが食物とともに摂取すると腸管内にて病原性を発揮し、下痢などの症状を惹起する。その一方で、主たる定着部位である鶏の腸管内では病原性を呈さず、鶏には病的な症状を惹起しない。このような理由から、養鶏場において本菌に感染した鶏個体を区別することは難しい上、仮に感染していても食肉のための加工に際して問題はないために、養鶏場における本菌の定着状態ならびにその機序は依然として不明である。鶏が生育する際、鶏肉は本菌が定着する部位ではないが、腸内に残存した本菌が食肉処理時に枝肉へ交差汚染として定着すると考えられている。

### 2. 研究の目的

交差汚染の原因として疑われるのは、本菌を無症候的に保菌した鶏の腸管である。本菌が鶏の腸管内に定着するのは、孵化後2~3週間の間とされる。一般的に、出荷に適する週齢に達した鶏群を出荷した後は、鶏舎を清掃してから次の鶏群の飼育を行うため、飼育を開始した時点では清潔な環境が保たれていると思われる。しかし本菌に汚染された枝肉が実際に存在することを考慮すると、清掃によって除去されなかった本菌が鶏舎に残存しているか、もしくは飼育中に何らかの外的要因によって本菌が侵入するといったような理由で、鶏の腸管に本菌が定着し、食肉処理時の交差汚染に繋がっていることが推察される。本研究では、PCRを用いた検出法と、細菌が有する16S rRNA遺伝子を網羅的に調べるメタゲノム解析を、鶏の成育段階に沿って鶏腸管および飼育環境の細菌叢について適用し、細菌叢の動態とカンピロバクターの定着との関連を調べることを目的とした。

### 3. 研究の方法

国内の養鶏場3箇所について、鶏の飼育開始から週ごとに6週齢までの盲腸便試料を複数個採取し、このとき同時に鶏舎内の送風機や給水機のスワブ拭き取り試料を採取した。これらの試料から細菌DNAを、ビーズ破砕法によって抽出精製し、これを鋳型としてカンピロバクターを特異的に検出できる定量的PCRおよびnested PCRを適用した。また、抽出したDNAから、細菌の16S rRNA遺伝子に特異的なプライマーを用いて同領域を増幅し、Illumina MiSeqにて塩基配列を決定した。取得した塩基配列情報を公共の16S rRNA遺伝子データベースと照合し、属レベルにて分類学的位置を推定して、試料ごとにそれぞれの分類群の相対比率として数値化した。試料ごとの分類群の構成を、主座標分析にて2次元上に散布図として可視化し、週齢による分布の違いを調べた。カンピロバクターの検出の有無により試料を2群に区別し、両群の間で有意に相対比率の差がある細菌群を調べた。

### 4. 研究成果

当初、定量的PCRにてカンピロバクターの検出を行なったが、検出限界値を下回るにもかかわらず検出値の存在する試料が存在することがわかった。そのため、定量はできないが検出感度が高いとされるnested PCRを、過去の論文報告の方法に沿って適用した結果、定量的PCRで陰性となった試料でも、nested PCRにて陽性となることが確認されたことから、以後nested PCRを検出に用いることとした。一方、メタゲノム解析ではいずれの試料においても十分量の塩基配列データを得ることができ、カンピロバクターの存在の有無はごく一部の試料を除いてnested PCRの検出結果と一致することを確認した。カンピロバクターは週齢によって検出率が異なっており、主座標分析における細菌叢の細菌構成は週齢依存的に変化するような位置関係を示したことから、細菌叢の構成が鶏の成育にしたがって変化することで、カンピロバクターの定着に影響を与えていることが示唆された。また、カンピロバクター陽性群と陰性群の間において、特定の細菌群の存在比率が有意に高い、もしくは逆に低いことが示され、このような細菌群が、細菌叢においてカンピロバクターの定着を助けたり、逆に定着を阻害するはたらきを有している可能性が示唆された。

### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計12件)

村本慶子, 渡辺孝康, 芝多佳彦, 船橋健太, 小川卓也, 中川一路, 森山啓司. 口唇裂・口蓋裂患者のブランク細菌叢を対象とした16S rRNA遺伝子解析. 日本矯正歯科学会雑誌. 査読有. 2019, Vol.78, pp.14-21, doi: なし.

Funahashi K, Shiba T, Watanabe T, Muramoto K, Takeuchi Y, Ogawa T, Izumi Y, Sekizaki I, Nakagawa I, Moriyama K. Functional dysbiosis within dental plaque microbiota in cleft lip and palate patients. Prog Orthod. 査読有. 2019, Vol.20, p.11, doi: 10.1186/s40510-019-0265-1.

Yamada S, Shibasaki M, Murase K, Watanabe T, Aikawa C, Nozawa T, Nakagawa I. Phylogenetic relationship of prophages is affected by CRISPR selection in Group A *Streptococcus*. BMC Microbiol. 査読有. 2019, Vol.19, p.24, doi: 10.1186/s12866-019-1393-y.

渡辺孝康. ヒトの口腔内菌叢解析の特徴と応用事例. ペット栄養学会誌. 査読有. 2018,

Vol.21, pp.154-157, doi: 10.11266/jpan.21.3\_154.

Arai S, Kim HJ, Watanabe T, Tohya M, Suzuki E, Ishida-Kuroki K, Maruyama F, Murase K, Nakagawa I, Sekizaki T. Assessment of pig saliva as a *Streptococcus suis* reservoir and potential source of infection on farms by use of a novel quantitative polymerase chain reaction assay. Am J Vet Res. 査読有. 2018, Vol.79, pp.941-948, doi: 10.2460/ajvr.79.9.941.

Yamada R, Tien Ie HT, Arai S, Tohya M, Ishida-Kuroki K, Nomoto R, Kim HJ, Suzuki E, Osawa R, Watanabe T, Sekizaki T. Development of PCR for identifying *Streptococcus parasuis*, a close relative of *Streptococcus suis*. J Vet Med Sci. 査読有. 2018, Vol.80, pp.1101-1107, doi: 10.1292/jvms.18-0083.

Shibasaki M, Watanabe T, Kasugai S, Nakagawa I. Distribution of single nucleotide polymorphisms in protein-coding regions of *emm12* Group A *Streptococcus* from two scarlet fever outbreaks. J Stomatol Soc Jpn. 査読有. 2018, Vol.85, pp.1-8, doi: なし.

Tohya M, Arai S, Tomida J, Watanabe T, Kawamura Y, Katsumi M, Ushimizu M, Ishida-Kuroki K, Yoshizumi M, Uzawa Y, Iguchi S, Yoshida A, Kikuchi K, Sekizaki T. Defining the taxonomic status of *Streptococcus suis* serotype 33: the proposal for *Streptococcus ruminantium* sp. nov. Int J Syst Evol Microbiol. 査読有. 2017, Vol.67, pp.3660-3665, doi: 10.1099/ijsem.0.002204.

Watanabe T, Shibasaki M, Maruyama F, Sekizaki T, Nakagawa I. Investigation of potential targets of *Porphyrromonas* CRISPRs among the genomes of *Porphyrromonas* species. PLoS One. 査読有. 2017, Vol.12, p.e0183752, doi: 10.1371/journal.pone.0183752.

Kubota-Aizawa S, Ohno K, Fukushima K, Kanemoto H, Nakashima K, Ushida K, Chambers JK, Goto-Koshino Y, Watanabe T, Sekizaki T, Mimuro H, Tsujimoto H. Epidemiological study of gastric *Helicobacter* spp. in dogs with gastrointestinal disease in Japan and diversity of *Helicobacter heilmannii sensu stricto*. Vet J. 査読有. 2017, Vol.225, pp.56-62, doi: 10.1016/j.tvjl.2017.04.004.

Kubota-Aizawa S, Ohno K, Kanemoto H, Nakashima K, Fukushima K, Ushida K, Chambers JK, Goto-Koshino Y, Mimuro H, Watanabe T, Sekizaki T, Tsujimoto H. Epidemiological study on feline gastric *Helicobacter* spp. in Japan. J Vet Med Sci. 査読有. 2017, Vol.79, pp.876-880, doi: 10.1292/jvms.16-0567.

Shiba T, Watanabe T (equal contribution), Kachi H, Koyanagi T, Maruyama N, Murase K, Takeuchi Y, Maruyama F, Izumi Y, Nakagawa I. Distinct interacting core taxa in co-occurrence networks enable discrimination of polymicrobial oral diseases with similar symptoms. Sci Rep. 査読有. 2016, Vol.6, p.30997, doi: 10.1038/srep30997.

[学会発表](計11件)

渡辺孝康. ヒトの口腔内菌叢解析について. 日本ペット栄養学会第20回大会. 2018.

舩橋健太, 渡辺孝康, 芝多佳彦, 村本慶子, 小川卓也, 森山啓司. 口唇口蓋裂患者における口腔内細菌叢の細菌ネットワーク構造に関する検討. 第77回日本矯正歯科学会学術大会. 2018.

竹下奈知子, 渡辺孝康, Hyunjung Kim, 黒木香澄, 関崎勉. 養鶏場におけるカンピロバクターの定着と腸内細菌叢の時系列的調査. 第91回日本細菌学会総会. 2018.

渡辺孝康, 柴崎真樹, 関崎勉, 中川一路. *Porphyrromonas* 属ゲノムにおける CRISPR と免疫対象の探索. 第91回日本細菌学会総会. 2018.

Ogata N, Watanabe T, Kim HJ, Ishida-Kuroki K, Sekizaki T. Longitudinal study of *Campylobacter* spp. colonization and chicken intestinal microbiota in broiler farms. The 9th Joint Symposium of Veterinary Research among Universities of Veterinary Medicine in East Asia. 2018.

渡辺孝康, 柴崎真樹, 中川一路. *Porphyrromonas* 属内における CRISPR と免疫対象の関係. 第59回歯科基礎医学会学術大会. 2017.

小方奈知子, Yaqi Pan, 渡辺孝康, 新井沙倉, Hyunjung Kim, 関崎勉. プロイラー養鶏場におけるカンピロバクターの汚染状況と細菌叢組成調査. 第160回日本獣医学会学術大会. 2017.

小方奈知子, 潘雅琪, 渡辺孝康, 新井沙倉, 金炫呈, 関崎勉. 16S rRNA 遺伝子解析を用いた国内養鶏場におけるカンピロバクター動態調査. 第90回日本細菌学会総会. 2017.

渡辺孝康, 芝多佳彦, 加地博一, 村瀬一典, 竹内康夫, 丸山史人, 和泉雄一, 中川一路. 細菌叢遺伝子発現解析によるインプラント周囲炎および歯周炎の疾患特異的な細菌ネットワーク. 第90回日本細菌学会総会. 2017.

Ogata N, Pan Y, Watanabe T, Arai S, Kim H, Sekizaki T. Investigation of microbiota with and without *Campylobacter jejuni/coli* by 16S rRNA gene sequencing. The 8th Joint Symposium of Veterinary Research among Universities of Veterinary Medicine in East Asia. 2017.

渡辺孝康，芝多佳彦，加地博一，竹内康夫，丸山史人，和泉雄一，中川一路．インプラント周囲炎と歯周炎における細菌叢メタトランスクリプトーム解析．第 58 回歯科基礎医学会学術大会．2016.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

該当なし

## 6．研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：関崎 勉

ローマ字氏名：SEKIZAKI, Tsutomu

所属研究機関名：東京大学

部局名：大学院農学生命科学研究科

職名：教授

研究者番号 (8 桁)：70355163

### (2)研究協力者

該当なし