

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月28日現在

機関番号：32607

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2012

課題番号：21780279

研究課題名（和文） 腸内細菌叢の確立がカンピロバクターの鶏盲腸定着に及ぼす影響とその要因

研究課題名（英文） Effects of intestinal microflora on chicken cecal colonization by *Campylobacter* and the causative factors

研究代表者

岡村雅史（OKAMURA MASASHI）

北里大学・獣医学部・准教授

研究者番号：70374775

研究成果の概要（和文）：*Campylobacter jejuni* 汚染鶏肉に関連する食中毒事例が国内外で頻発している。一般的に、*C. jejuni* は3週齢前後の鶏群から検出され始め、7-8週齢での出荷時には鶏群内汚染率約100%に達するが、それ以前の日齢における定着はほとんど起こらない。本研究では、3週齢までの鶏に *C. jejuni* が定着しにくい要因として、当初着目した腸内細菌叢だけでは説明できず、むしろ、環境中に低濃度で存在する菌の状態とその遺伝子発現状況が、鶏体内に入った直後から定着増幅するまでの時間を延長させるように働いているものと推測された。

研究成果の概要（英文）：The increased cases of human food-borne campylobacteriosis have been reported worldwide, of which more than 50% could be attributed to contaminated chicken meat and broiler flocks as a reservoir. *Campylobacter jejuni* start to be detected from 3-week old broilers, and the prevalence reaches 100% at 7-8-week old. We attempted to elucidate how chickens can be free of *C. jejuni* before 3 weeks of age. From the results, the factors associated with the phenomena could not be explained, and rather, the status of the bacteria at lower concentration and gene expression in the environment may affect the bacterial colonization.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	838,268	450,000	1,288,268
2012年度	661,732	0	661,732
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学、応用獣医学

キーワード：人獣共通感染症

1. 研究開始当初の背景

Campylobacter jejuni 汚染鶏肉に関連する食中毒事例が国内外で頻発している。一般的に、C. jejuni は 3 週齢前後の鶏群から検出され始め、7-8 週齢での出荷時には鶏群内汚染率約 100% に達するが、それ以前の日齢における定着はほとんど起こらない。日齢の経過にともなって C. jejuni の鶏腸管への定着が強まると考えられるが、その要因は明らかではない。

2. 研究の目的

本研究では、C. jejuni 定着感受性に対する鶏の日齢の影響を明らかにすることを目的とした。また、この現象を 3 週齢前後に起こる腸内細菌叢の確立による盲腸内環境の変化とも関連づける。

3. 研究の方法

実験1. C. jejuni定着と移行抗体の有無

ある孵卵場へ種卵を出荷している種鶏場から血清サンプルを入手し、ELISAによる抗カンピロバクター抗体検査を実施した。さらに、コマースヤル農場へひなを出荷している孵卵場で入手した虚弱ひな体内から採取・保管しておいた遺残卵黄についても同検査を実施した。

実験2. 体内外におけるVBNC状態のC. jejuniの検出

鶏由来検体からのC. jejuniの分離培養法は、いまだスタンダードと呼べるものが確立されていない。そこで、VBNC菌の検出に先立ち、3段階のドーズのC.jejuni菌液を直接増菌培地に接種する方法、非感染鶏由来糞便に3段階のドーズのC.jejuniをスパイクしたものを増菌培地に接種する方法で、最も増菌効率の高い培地の選択を検討した。用いた増菌培地は一般的な培養法をCEM、ボルトンおよびプレストンの3種類である。次に、CEMを用いて実際のサンプルのC. jejuni検査を行った。用いたサンプルは、農場で採取した糞便を含む敷料と盲腸便、そして処理場で採取した盲腸内容物である。

実験3. C. jejuniの盲腸定着に直接関与する因子の同定

日齢の影響を厳密に解釈するため、特に腸内細菌叢に着目した。①受精卵をアイソレーター内で孵化・飼育した無菌群(GF群)、②抗生物質処置により腸内細菌叢を制限した群(ERFX群)、③通常飼育群(CV群)および④競合排除法製品処置により早期に多様な腸内細菌叢を確立させた群(CE群)を設定した。盲腸内容物由来総DNAから得た様々な菌種の16SrDNAのPCR増幅産物を用いて、変性剤濃度勾配ゲル電気泳動(DGGE)を行い、各群の腸内細菌叢が異なることを確認した。さらに、各群にCJを経口接種し、経時的に肝臓、脾臓、盲腸内容を採材し、CJ定着を比較した。

DGGE)を行い、各群の腸内細菌叢が異なることを確認した。さらに、各群にCJを経口接種し、経時的に肝臓、脾臓、盲腸内容を採材し、CJ定着を比較した。

実験4. 接種菌の作製法が鶏感染試験におけるCJの体内動態に及ぼす影響

農場では、C. jejuniはバイオフィルムを形成して環境中に維持されていると考えられている。そこで、バイオフィルムを模した菌液(a:寒天培地上に発育したコロニーをPBSで回収した菌液)、あるいはこれまでの実験で用いてきた菌液(b:直接液体培養した菌液)を用いて、異なる日齢の鶏に接種して感染実験を行った。

実験5. 接種菌液の状態による遺伝子発現の違い

実験4で作製したaおよびbのCJの遺伝子発現の状態をDNAマイクロアレイにより比較し、その後のin vivoにおける定着性に影響を及ぼす因子をスクリーニングした。

4. 研究成果

実験1 :

100倍希釈した種鶏の血清抗体(IgG)レベルは、実験感染鶏由来陽性対照血清レベルと同様に高かったため、抗カンピロバクター抗体を保有していると考えられた。次に250倍希釈した遺残卵黄のIgGレベルも陽性対照と同様に高かった。以上のことから、種鶏の段階でC. jejuni汚染が起こっていることが示唆され、3週齢までの移行抗体によるC. jejuni定着防御の可能性は否定できない。

実験2 :

3段階のドーズのC.jejuni菌液を直接増菌培地に接種すると、いずれの増菌培地でも有効な増菌培養が確認できた。しかし、非感染鶏由来糞便に3段階のドーズのC.jejuniをスパイクし、その後増菌培地に接種したところ、いずれの増菌培地においても増菌効率の低下が認められたが、CEMでのみ低菌数からの増菌が認められた。すなわち、盲腸便に存在する菌の増菌培養の有効性はあまり高くないが、CEMを用いれば低菌数であっても増幅が可能であり、VBNC状態の菌も検出できる可能性が示唆された。次に、CEMを用いて農場サンプルの検査を行ったところ、糞便を含む敷料において菌は増菌レベル(10^{26} CFU/g以下)しか存在しなかったが、盲腸便や盲腸内容物では 10^5 CFU/g以上の菌が存在した。このことから、農場には鶏体外では低濃度で菌が存在するが、これを摂食することで鶏体内で菌数が増幅することが示唆された。すな

わち、鶏体内での増幅が日齢の影響を受けると推測される。

実験 3 :

二回の試験において、GF 群は他の群と比較し特に盲腸内容において高い定着菌数を示し、CE 群は盲腸において攻撃 4 日後に GF 群や CV 群よりも概して低い CJ 定着を示した。すなわち、実験的に腸内細菌叢を早期に定着させた鶏群では、無菌的に孵化・発育させた鶏群よりも CJ の定着が妨げられ、当初の仮説を支持しない結果が得られた。このことは、*C. jejuni* の腸管定着に見られる日齢の違いが腸内細菌叢のみでは説明できないことを示している。

実験 4 :

接種菌 a を 4 日齢に接種した群(4a 群)および接種菌 b を 4 日齢に接種した群(4b 群)では、それぞれの菌液を 2-3 週齢以降に接種した群よりも有意に低い CJ 定着が認められた。すなわち、CJ は 4 日齢よりも 2-3 週齢以降の鶏において感染後早期に腸管に定着することがわかった。さらに、4a 群では 4b 群よりも腸管定着が顕著に低く、CJ は a の条件下では腸管定着に至るのに長い時間を要することが明らかとなった。したがって、接種菌の作製法は CJ の腸管定着に影響を及ぼすことが確認され、農場でバイオフィルムを形成して維持されている菌は鶏に定着するのに時間がかかることが示唆された。

実験 5 :

a の状態では b の状態よりも細胞膜構成成分や細胞の遺伝子発現が顕著に低下していた反面、触媒活性や抗酸化活性といった分子機能に関連する遺伝子発現は上昇していることが明らかになった。これらの遺伝子発現が、直後の腸内定着に影響するものと考えられる。

結論 :

本研究から、3 週齢までの鶏に *C. jejuni* が定着しにくい要因として、当初着目した腸内細菌叢だけでは説明できないことが分かった。むしろ、環境中に低濃度で存在する菌の状態とその遺伝子発現状況が、鶏体内に入った直後から定着増幅するまでの時間を延長させるように働いているものと推測された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計 6 件)

①岡村雅史 農場レベルでのカンピロバクター汚染とその制御 第 86 回日本細菌学会総会 (千葉) 2013. 3. 19

②岡村雅史、戸塚麻喜、井筒達也、小島健史、佐藤優、中村政幸、吉川泰弘 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 第 152 回日本獣医学会学術集会 (大阪) 2011. 9. 21

③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 ブロイラ農場および関連施設におけるサルモネラ分離状況 (2006-2009) 第 150 回日本獣医学会学術集会 (帯広) 2010. 9. 18

④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 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 第 150 回日本獣医学会学術集会 (帯広) 2010. 9. 18

⑤寺谷知恵、岡村雅史、清家史生、田中佑哉、戸塚麻喜、松本和佳子、竹原一明、中村政幸 鶏における腸内細菌叢の確立とカンピロバクター定着の関連性 第 150 回日本獣医学会学術集会 (帯広) 2010. 9. 18

⑥大島瑠美子、上田通裕、小林将英、塚田真理、富永歩、岡村雅史、佐藤優、竹原一明、中村政幸 ブロイラ農場におけるサルモネラおよびカンピロバクター浸潤調査 第 148 回日本獣医学会学術集会 (鳥取) 2009. 9. 26

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡村雅史 (OKAMURA MASASHI)

北里大学・獣医学部・講師

研究者番号 : 70374775